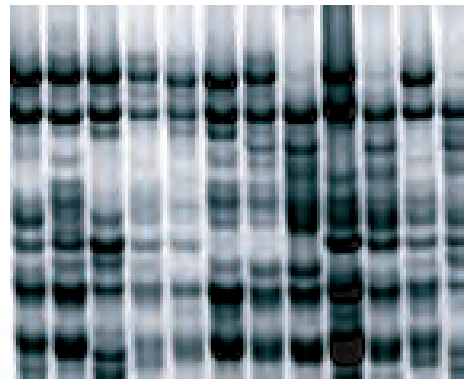


NOVÉ POZNATKY Z GENETIKY A ŠLACHTENIA POĽNOHOSPODÁRSKÝCH RASTLÍN



CENTRUM VÝSKUMU RASTLINNEJ VÝROBY PIEŠŤANY
- Výskumný ústav rastlinnej výroby Piešťany
SEKCIA GENETIKY, ŠŤACHTENIA A SEMENÁRSTVA
ODBORU RASTLINNEJ VÝROBY SLOVENSKEJ AKADÉMIE
PÔDOHOSPODÁRSKÝCH VIED

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

Zborník zo 16. vedeckej konferencie
21.–22. október 2009

Názov: Nové poznatky z genetiky a šľachtenia poľnohospodárskych rastlín.

Editor: Ing. Valéria Šudyová, CSc.

Recenzent: prof. RNDr. Zdenka Gálová, CSc., SPU Nitra

Ing. Tibor Maliar, PhD., UCM Trnava

Autorský kolektív:

Adamčíková	Beata	76	Križanová	Klára	115
Antalíková	Gabriela	80	Kuna	Roman	121, 127
Antalíková	Gabriela	113	Libantová	Jana	121, 123, 127
Bacsová	Zuzana	90	Lichvárová	Mária	105
Bauerová-Hlinková	Vladena	14	Maliar	Tibor	7
Benková	Michaela	82	Malovcová	Lubica	57, 72
Beňová	Zuzana	45	Martínek	Petr	45, 53, 137
Bielíková	Magdaléna	80, 103, 141	Masár	Štefan	68, 85, 88, 117
Blažek	Jan	18, 119	Masarovičová	Elena	57
Blažková	Marcela	36	Matušíková	Ildikó	121, 123, 127
Bojnanská	Katarína	85, 88	Melounová	Martina	18, 95, 119, 135
Boleček	Peter	121, 127	Mendel	Lubomír	64, 103
Boszorádová	Eva	123	Mihalčík	Peter	111
Brestič	Marián	72	Michalko	Jaroslav	121
Čegan	Radim	139	Mikulíková	Daniela	36
Černý	Ivan	76, 90,	Moravčíková	Jana	121, 123, 127
Čičová	Iveta	93	Múdry	Pavol	27, 105
Čilová	Daniela	22, 95, 135	Murín	Richard	49
Dvončová	Daniela	64, 68	Nesvadba	Vladimír	22
Faragó	Juraj	45, 97, 100, 129	Nevrtalová	Eva	139
Faragová	Natália	97, 100	Pačuta	Vladimír	76
Feketová	Miroslava	61	Papštejn	František	18
Ferencová	Jana	72, 113	Pastirčák	Martin	117, 125
Gajdošová	Alena	27	Peško	Matúš	57
Gajdošová	Alena	105	Piršelová	Beáta	121, 127
Gavurníková	Soňa	103	Plačková	Anna	111
Gregová	Eďita	53	Psota	Vratislav	45
Gubiš	Jozef	85, 107, 115	Pšenáková	Ivana	129
Gubišová	Marcela	107	Roháčik	Tibor	117
Halouzková	Eva	137	Sachambula	Lenka	45
Hauptvogel	Pavol	53, 80, 103	Sedlák	Petr	18, 31, 95, 135
Havrlentová	Michaela	53, 64, 68	Sedláková	Vladimíra	31
Hlinková	Elena	14	Singer	Peter	111
Hlinková	Andrea	64, 85	Sleziak	Ludovít	115
Hobza	Roman	139	Suchánková	Pavla	31
Horváth	Lubomír	61	Svitáčková	Béla	133
Horváthová	Viera	36	Štiková	Svetlana	41, 131
Hozlár	Peter	68, 85	Šramková	Zuzana	53
Hricová	Andrea	105	Šturdík	Ernest	53
Hudzieczek	Vojtěch	139	Šudyová	Valéria	41, 131
Hudcovicová	Martina	41, 107	Törökóvá	Monika	90
Hunková	Elena	72, 113	Uher	Jiří	133
Chovaníková	Jaroslava	129	Užik	Martin	141
Jančich	Miroslav	109	Vašek	Jakub	22, 95, 135
Jopčík	Martin	123	Vašíčková	Šárka	95, 135,
Jurovatová	Jana	53	Vávra	Radek	18, 119
Kabát	Peter	14	Vejl	Pavel	18, 31, 95, 119, 135
Klčová	Lenka	41	Voburka	Zdeněk	14
Klučiarovský	Filip	129	Vyhnánek	Tomáš	137, 139,
Kraic	Filip	53	Zirkelbachová	Katarína	103
Kraic	Ján	64, 80, 111	Zoufalá	Jana	18, 119
Krášová	Katarína	57	Živčák	Marek	72
Krivousudská	Eleonóra	80, 113	Žofajová	Alžbeta	115, 117, 141

© CVRV Piešťany - Výskumný ústav rastlinnej výroby Piešťany

ISBN 978-80-89417-04-9

Obsah

Prednášky

MALIAR, T.: Biologické vlastnosti poľnohospodárskych kultúr ako možný aspekt ich kvality a komerčnej aplikácie	7
HLINKOVÁ, E.; BAUEROVÁ-HLINKOVÁ, V.; KABÁT, P.; VOBURKA, Z.: Molekulárne charakteristiky vybraných nešpecifických PR-proteínov jačmeňa infikovaného múčnatkou.....	14
VEJL, P.; MELOUNOVÁ, M.; ZOUFALÁ, J.; SEDLÁK, P.; VÁVRA, R.; BLAŽEK, J.; PAPRŠTEJN, F.: Molekulární markery genů <i>Rvi2</i> , <i>Rvi4</i> , <i>Rvi5</i> , <i>Rvi6</i> a <i>Rvi8</i> u odrůd a genových zdrojů jabloní v České republice a jejich využití ve šlechtění vůči strupovitosti.....	18
VAŠEK, J.; VEJL, P.; ČÍLOVÁ, D.; NESVADBA, V.: Porovnání variability planých a kulturních chmelů mikrosatelitními markery.....	22
MÚDRY, P.; GAJDOŠOVÁ, A.: Metodológia analýzy polymorfizmu enzýmov druhov rodu láskavec (<i>Amaranthus</i> sp. L.) pre účely genetiky, šľachtenia a semenárstva.....	27
SEDLÁKOVÁ, V.; SEDLÁK, P.; VEJL, P.; SUCHÁNKOVÁ, P.: Možnosti detekce somatických hybridů bramboru.....	31
BLAŽKOVÁ, M.; HORVÁTHOVÁ, V.; MIKULÍKOVÁ, D.: Produkcia bioetanolu z odrôd pšenice s rozdielnym podielom amylózy v škrobe.....	36
ŠUDYOVÁ, V.; ŠLIKOVÁ, S.; HUDCOVICOVÁ, M.; KLČOVÁ, L.: Genetické markery – nástroj selekcie nových genotypov.....	41
PSOTA, V.; MARTINEK, P.; SACHAMBULA, L.: Pěstitelská a sladovnická charakteristika tritordea (<i>X Tritordeum</i> Ascherson et Graebner).....	45
MURÍN, R.; BEŇOVÁ, Z.; FARAGÓ, J.: Vplyv odrody a druhu auxínu na <i>in vitro</i> regeneračnú kapacitu zrelých embryí pšenice letnej (<i>Triticum aestivum</i> L.).....	49
ŠRAMKOVÁ, Z.; KRAIC, F.; JUROVATÁ, J.; MARTINEK, P.; HAVRLETOVÁ, M.; HAUPTVOGEL, P.; ŠTURDÍK, E.; GREGOVÁ, E.: Vzťah medzi nutričnými a technologickými parametrami pšeničných odrôd a reologickými vlastnosťami cesta.....	53
MASAROVIČOVÁ, E.; PEŠKO, M.; KRÁĽOVÁ, K.; MALOVCOVÁ, E.: Zhodnotenie 14 odrôd <i>Brassica napus</i> z hľadiska produkcie biomasy a kvalitatívnych parametrov semien.....	57
HORVÁTH, E.; FEKETOVÁ, M.: Efektívnosť izolačných vzdialeností pri pestovaní geneticky modifikovanej kukurice v SR.....	61
HLINKOVÁ, A.; HAVRLETOVÁ, M.; DVONČOVÁ, D.; MENDEL, E.; KRAIC, J.: Vplyv dusíka a selénu na obsah β-glukánu v zrne ovsa siateho (<i>Avena sativa</i> L.).....	64
HAVRLETOVÁ, M.; MASÁR, Š.; HOZLÁR, P.; DVONČOVÁ, D.: Ovossiaty s vyšším obsahom β-D-glukánu v zrne – realita a možnosti využitia.....	68
HUNKOVÁ, E.; ŽIVČÁK, M.; FERENCOVÁ, J.; MALOVCOVÁ, E.; BRESTIČ, M.: Dynamika obsahov asimilačných pigmentov vo vybraných genotypoch kapusty repkovej pravej (<i>Brassica napus</i> subsp. <i>napus</i>)	72

Postery

ADAMČÍKOVÁ, B.; ČERNÝ, I.; PAČUTA, V.: Vplyv biologického materiálu a foliárnej výživy na úrodu a kvalitu repy cukrovej.....	76
ANTALÍKOVÁ, G.; HAUPTVOGEL, P.; KRAIC, J.; KRIVOSUDSKÁ, E.; BIELIKOVÁ, M.: Vplyv vodného deficitu na vlastnosti cícera baranieho (<i>Cicer arietinum</i> L.).....	80
BENKOVÁ, M.: Adaptabilita genotypov jarného jačmeňa z rôznych geografických oblastí.....	82
BOJNANSKÁ, K.; DVONČOVÁ, D.; GUBIŠ, J.; HOZLÁR, P.; MASÁR, Š.: Odolnosť voči vybraným hubovým patogénom.....	85
BOJNANSKÁ, K.; MASÁR, Š.: Odolnosť novošľachtených kmeňov pšenice letnej voči vybraným obligátnym patogénom.....	88
ČERNÝ, I.; BACSOVÁ, Z.; TÓRÓKOVÁ, M.: Vplyv biologického materiálu a foliárnej aplikácie Atoniku na úrodu a olejnatosť nažiek slnečnice ročnej.....	90

ČIČOVÁ, I. : Hodnotenie variability morfológických znakov láskavca (<i>Amaranthus L.</i>).....	93
ČÍLOVÁ, D.; VEJL, P.; MELOUNOVÁ, M.; VAŠEK, J.; SEDLÁK, P.; VAŠÍČKOVÁ, Š. : Mikrosatelitní analýza variability populací jitrocele kopinatého (<i>Plantago lanceolata L.</i>) a jitrocele většího (<i>P. major L.</i>).....	95
FARAGOVÁ, N.; FARAGÓ, J. : Vplyv pH pôdy na priemernú utilizáciu C-zdrojov a metabolickú diverzitu aeróbných baktérií v rizosfére geneticky modifikovaných rastlín lucerny siatej.....	97
FARAGOVÁ, N.; FARAGÓ, J. : Vplyv pH pôdy na početnosť aeróbných mikroorganizmov v rizosfére geneticky modifikovaných rastlín lucerny siatej.....	100
GAVURNÍKOVÁ, S.; HAUPTVOGEL, P.; MENDEL, E.; ZIRKELBACHOVÁ, K.; BIELIKOVÁ, M. : Technologická kvalita vybraných európskych odrôd pšenice letnej.....	103
HRICOVÁ, A.; LIBIAKOVÁ, G.; MÚDRY, P.; GAJDOŠOVÁ, A. : <i>In vitro</i> regenerácia láskavca (<i>Amaranthus sp.</i>).....	105
HUDCOVICOVÁ, M.; GUBIŠ, J.; GUBIŠOVÁ, M. : Detekcia patogéna <i>Drechslera tritici repentis</i> a analýza jeho genetickej diverzity použitím DNA markerov.....	107
JANČICH, M. : Využitie vybraných odrôd repky olejnej na bioenergetické účely.....	109
KRAIC, J.; MIHALČÍK, P.; SINGER, M.; PLAČKOVÁ, A. : Koexistencia geneticky modifikovanej a konvenčnej kukurice: Praktické skúsenosti z pestovania na Slovensku.....	111
KRIVOSUDSKÁ, E.; HUNKOVÁ, E.; FERENCOVÁ, J.; ANTALÍKOVÁ, G. : Účinok postupnej dehydratácie na fyziologické parametre vybraných genotypov cícera baranieho (<i>Cicer arietinum L.</i>).....	113
KRIŽANOVÁ, K.; ŽOFAJOVÁ, A.; SLEZIAK, E.; GUBIŠ, J. : Stabilita úrody genotypov jačmeňa siateho f. jarná.....	115
MASÁR, Š.; ŽOFAJOVÁ, A.; PASTIRČÁK, M.; ROHÁČIK, T. : Reakcia odrôd pšenice s rôznymi alelami <i>RHT</i> génov na <i>F. culmorum</i> , <i>F. graminearum</i> a <i>F. poae</i>	117
MELOUNOVÁ, M.; VEJL, P.; ZOUFALÁ, J.; BLAŽEK, J.; VÁVRA, R. : Nový PCR marker v lokus <i>Md-ACO1</i> ovplyvňujúciho mäkknutí plodů jabloní v průběhu skladování.....	119
MICHALKO, J.; LIBANTOVÁ, J.; MORAVČÍKOVÁ, J.; PIRŠELOVÁ, B.; KUNA, R.; BOLEČEK, P.; MATUŠÍKOVÁ, I. : Analýza štruktúry génu glukanázy z rosičky okrúhlohlstej (<i>Drosera rotundifolia L.</i>).....	121
MORAVČÍKOVÁ, J.; BOSZORÁDOVÁ, E.; JOPČÍK, M.; MATUŠÍKOVÁ, I.; LIBANTOVÁ, J. : Genetická transformácia repky olejky pomocou <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	123
PASTIRČÁK, M. : Výskyt, rozšírenie a význam hyperparazitických druhov mikroskopických húb v agrosystéme.....	125
PIRŠELOVÁ, B.; LIBANTOVÁ, J.; MORAVČÍKOVÁ, J.; KUNA, R.; BOLEČEK, P.; MATUŠÍKOVÁ, I. : Ťažkými kovmi indukovaná akumulácia β -1,3-glukanáz v koreňoch kukurice.....	127
PŠENÁKOVÁ, I.; FARAGÓ, J.; CHOVANÍKOVÁ, J.; KLUČIAROVSKÝ, P. : Biologicky aktívne látky v <i>in vitro</i> kultúrach chmeľu obyčajného (<i>Humulus lupulus L.</i>).....	129
ŠLIKOVÁ, S.; ŠUDYOVÁ, V. : Deoxynivalenol v zrnách pšenice pestovanej v rôznych lokalitách Slovenska.....	131
UHER, J.; SVITÁČKOVÁ, B. : Šlechtění dosen (<i>Canna L.</i>) a historické sortimenty (review).....	133
VAŠÍČKOVÁ, Š.; VEJL, P.; VAŠEK, J.; ČÍLOVÁ, D.; MELOUNOVÁ, M.; SEDLÁK, P. : Molekulární detekce somaklonální variability druhu <i>Plantago lanceolata</i> při <i>in vitro</i> množení.....	135
VYHNÁNEK, T.; HALOUZKOVÁ, E.; MARTINEK, P. : Identifikace alel lokusu <i>GLU-A1</i> tritikale pomocí DNA markerů.....	137
VYHNÁNEK, T.; NEVRTALOVÁ, E.; ČEGAN, R.; HUDZIECZEK, V.; HOBZA, R. : Screening kandidátních genů rezistence k těžkým kovům u rodu <i>Silene</i>	139
ŽOFAJOVÁ, A.; UŽÍK, M.; BIELIKOVÁ, M. : Produktivita a kvalita vybraných súčasných zahraničných a domácich odrôd pšenice letnej f. ozimnej.....	141

BIOLOGICKÉ VLASTNOSTI POĽNOHOSPODÁRSKÝCH KULTÚR AKO MOŽNÝ ASPEKT ICH KVALITY A KOMERČNEJ APLIKÁCIE

BIOLOGICAL PROPERTIES OF THE CROPS AS POSSIBLE ASPECT OF QUALITY AND THEIR COMMERCIAL APPLICATION

¹Tibor MALIAR – ²Mária MALIAROVÁ

The aim of the work is the presentation of the various biological activities of the randomly selected crops – cereals as well as forage crops. From extensive research in this paper are presented biological activities as follows: antioxidant activity, inhibition effect on the potentially pathophysiological proteinases and antimicrobial effect in vitro, except this cytostatic effect ex vivo and immunity modulatory effect in vivo. From the achieved we can declare significant potential of the positive influence on the consumer physiology and health depending on the cultivar of the crop. This property it is possible to sign on the crop passport or other documents and could be applied as aspect of quality and commercial application.

Key words: cereal crops, forage crops, antioxidant activity, inhibition effect, antimicrobial effect, in vitro, ex vivo

Úvod

Výsledkom prudkého civilizačného rozmachu sprevádzaného zmenami v životnom prostredí a v životnom štýle je dramatický vzostup tzv. civilizačných ochorení. Sú to ochorenia, ktoré majú úzky vzťah k výžive, pretože sa zistilo, že zdravie človeka je až z päťdesiatich percent ovplyvnené spôsobom jeho životného štýlu, t.j. stravovaním, využitím voľného času a pod. V posledných rokoch sa zaznamenal rapidný nárast rôznych ochorení, ktorých vznik úzko súvisí so zmenami životného prostredia a životného štýlu populácie. Zvlášť chronické choroby predstavujú v súčasnosti veľkú výzvu pre medicínu a predpokladá sa, že táto skutočnosť bude pretrvávať aj v budúcich desaťročiach (Urquiaga a Leighton, 2000, Bauman, 2004; Parillo a Riccardi, 2004; Willet, 1995). Otázky výživy ozrejmuje vzťah medzi potravou a chronickými ochoreniami ako sú napríklad obezita, kardiovaskulárne a onkologické ochorenia. Kardiovaskulárne ochorenia, onkologické ochorenia a Diabetes mellitus sa ukázali ako choroby s najvyšším vplyvom na kvalitu života a tým teda narastá aj stupeň záujmu o opatrenia, ktoré môžu regulovať tento stav (Sloan, 2000). Výskyt ochorení vo svete /percentuálny podiel/podľa autora Sloan, 2000) je nasledovný: kardiovaskulárne ochorenia 49%, onkologické ochorenia 37%, obezita 37%, osteoporóza 27%, interné ochorenia 21%, ochorenia imunitného systému 17% a ďalšie.

V Európskej únii sú špeciálne potraviny (určené na osobitné výživové účely) a výživové doplnky delené na tri skupiny. Prvou sú tzv. novel food – nové jedlá, ktoré sú v normách Európskej únie presne definované a ich uvádzanie na trh je regulované. Druhou sú tzv. funkčné jedlá (functional food), ktoré nemajú právnický sformulovanú definíciu a tretou sú tzv. nutraceutiká (nutraceuticals), prostriedky dopĺňujúce výživu, ktoré sa predávajú v obchodoch, nie sú viazané na predaj v lekárni a nie sú v EU regulované (LACINOVÁ, 2005, RODRIGUEZ-MEIZOSO a kol., 2007). Produkty patriace do tejto kategórie nutraceutík môžu mať charakter izolovaných látok, komerčných diét, doplnkov stravy, potravín vyrobených zo suroviny pochádzajúcej z geneticky modifikovanej odrody rastliny, funkčných potravín, produktov na báze liečivých rastlín, alebo dokonca rôznych polievok, cereálnych zmesí a špecifických nápojov akým je napríklad aj čaj (FOŘT, 2005). Fytochemikálie sú bioaktívne nevyživné rastlinné zmesi v ovocí, zelenine, zrne a ďalších rastlinných potravinách spojené so znížením rizika chronických ochorení. Je známych viac ako 5000 fytochemikálií, aj keď značné percento zostáva neznáme (SHAHIDI a NACZK, 1995).

Pre prevažnú časť ľudstva našej Zeme sú obilniny najdôležitejšou a základnou potravinou, ktorá je v prirodzenom stave zdrojom sacharidov, ale dodáva nám aj vysokohodnotné bielkoviny, vitamíny, minerálne látky i dôležitú vlákninu. Obilniny výrazne ovplyvňujú výživovú bilanciu svetovej populácie a čo do objemu konzumu majú medzi ostatnými poľnohospodárskymi produktmi výsadné postavenie (ŽAJOVÁ a PORUBSKÁ, 1997). Existuje množstvo mechanizmov, pomocou ktorých celozrnné potraviny môžu priaznivo vplyvať na zdravie (SLAVIN, 2000; LIU, 2003). (ANDERSON a kol., 2000; ADOM a kol., 2003; CLEVELAND, 2000; MARQUART a kol., 2000).

Materiál a metódy

Rastlinný materiál

Náhodne vybrané vzorky rastlín i osív krmovín i zrnovín boli získané z VÚRV Piešťany. Vzorky zrn boli získané v množstve niekoľkých gramov, mladé rastlinky krmovín boli vypestované štandardným režimom.

Prvú množinu vzoriek tvorili vzorky krmovín:

Anthyllis taurica /UKRKRY98-132/, *Anthyllis vulneraria* /SVKNTAT 01-503, CZEMKRAS 01-14, SVKBES99-515, SVKSPI97-92, SVKSPI97-33, SVKSPI97-101, SVKFAT97-47, SVKKYS97-56, Trebický, HRVISTRA02-263/, *Anthyllis vulneraria ssp. Alpestre* /SVKBES99-616/, *Astragalus cicer* /TB-

8, C-24, Windsor/, *Astragalus excapus* /CZEPAL03-195/, *Astragalus glycyphyllos* /SVKCER99-1, SVKNTAT01-504/, *Astragalus onobrychis* /CZEPAL03-168/, *Coronilla varia* /CZEBES99-261, Eroza, SVKNTAT 01-502/, *Lotus corniculatus* /Cree, Giada, POLBES99-793, UKRKAR96-381, TATRY95-234, Lotar, SVKPOL96-132/, *Lotus uliginosus* /POLBES99-666/, *Medicago lupulina* /Ekola/, *Medicago sativa* /Daphne, Mírna, Osječka 95, Osječka 88, Osječka 11, Osječka 89, Slavonka, NS Mediana ZMS, Slavia, Vršac ZMS, Syntéza 1, Canelle, Able, Class, Prevail, Advance, Arrow, AC Grazeland Br, Alfagraze, Millenium, Apollo Supreme, UKRKRY 98-72, H-0256 (Ekotyp Radošina), Diablo Verde, Lucia, Regia, Bobrava, Palava, Magda, Zuzana, Morava, Viktoria, Niva, Jarka, Jitka, OS-11, OS-Sz, OS-88, Hodonínka, Táborka, CF, Erecta, Hunor 40, Granat, Adonis, Dolichi, Florina, OS-L-XXVI, AV 89-14 AVR, AV 89-14 C, UC 257 VR, UC 193-194 VR, C -25, C-29, C-31, Vali, Vanda, Gabika, Defi, Erbi, Vanda, Verko, Plato, Prerovská, Palava, Tachiwakaba, MSA- PL- L, Julius, Nitranka, KAZACH 90 0142H, KAZACH 90 0161H, KAZACH 90 0193H, KAZACH 90 0220H, KAZACH 90 0223H, KAZACH 90 0225H, KAZACH 90 0125H, POLKIE 99-2, UKRKRY 98-72, SVNPIR 01-82, SVNPIR 01-207, SVNPIR 01-101, SVKNTAT 01-406, CZEPOD 00-18, SVNPIR 01-256, SVNPIR 01-198, SVNPIR 01-217/, *Melilotus alba* /SVKNTAT 01-501, CZEKRK 01-66 Krajova, Adela, Kecskemeti keteves/, *Melilotus dentata* /T 180 0002/, *Melilotus neapolitanus* /UKRKRY98-180/, *Melilotus officinalis* /Norgold, ZEPOD00-20, SVNPIR01-257/, *Melilotus tauricus* UKRKRY98-111/, *Onobrychis viciaefolia* /Skrieszowicka, Fakir, Erlangen, Lunique, Visnovsky, CZEMKRAS 01-15/, *Trifolium alexandrinum* /Atilla/, *Trifolium alpestre* /SVKSIT97-225, SVNPIR01-173/, *Trifolium angustifolium* /UKRKRY98-28/, *Trifolium arvense* /SVKPOL96-80, SVKBES99-565/, *Trifolium aureum* /CZEJES00-26, SVKSPI97-34/, *Trifolium fragiferum* /HRVISTRA02-175, SVNPIR01-123, SVNPIR01-199, CZEPAL03-138/, *Trifolium hybridum*, /Aurora, Taborsky, TATRY95-382, SVKSPI97-9, SVKSPI97-72/, *Trifolium incarnatum* /Kardinál/, *Trifolium medium* /SVKSIT97-24, SVKBES99-559, SVKROH00-70, SVKBES99-615/, *Trifolium montanum* /SVKSPI97-85/, Druhú množinu vzoriek tvorili vzorky zŕn vybraných obilovín:

Amaranthus caudatus /Ames 5127, 29 USA, 00005 5DF 118, 00006 Burgundy, 00019 29 USA, 00062 PI 604671, 00065 PI 604672/, *Amaranthus hybridus* /PI 604672/, *Amaranthus hypochondriatus* /369/, *Avena nuda* /Ábel, Adam, Bandicoot, Jakub, Neon/, *Avena sativa* L./Autevil, G2 Taiko, Sirene, Aveia Peluda, Borka, Caracas, Cyril, Flamingstern Trend, G2, Aragon, G2 Indio, German, Jumbo, Kanton, Lutz, Senator, Šampionka, Tarra, Argentina, Edit, Flamingstern Plus, G2 Seven Antree, Gambo, Maris Oberon, Master, Orfine, Pendek, Revisor, Sanova AS181325, Stormon Scerptre, ABEL, ADAM, AVENUDA/JAKUB/, ALLEPPO, BANDICOOT, EURO, FL. PLUS, FL. TREND, HRON (DS 100), IZAK, NEON, PETRA, VIKTOR, ZLAŤÁK, ZVOLEN, CARACAS, ORFINE /, *Cicer arietinum* /Slovák, Irenka, AVG 480YIALOVSA, AYDIN – 92, SLOVÁK, ALFA, BETA, IRENKA, CALIA, SULTANO, BRAZTZOV CHIFLIK 1, PLOVDIV 019, LYONS 512 300/, *Hordeum vulgare* L., /Bear USA, CI 5 DEU, CI 15 DEN, Hyproly USA, KM 1057CZE, KM 1910 CZE, KM 2037 CZE, Oriflame, Peregrine CAN, Tibet White, DEU/, *Fagopyrum esculentum* /Pyra, Ó Lifago, Bogatyr, Fag 120/82/, *Glycine max* /Quito, S 120, Lokus/, *Lathyrus sativus* /Arida/, *Linum flonale*, *Lupinus albus* /Feli/, *Lupinus angustifolius* /Rubine/, *Lupinus luteus* /Getman/, *Panicum miliaceum* /Unikum, Voroneškoje 420/, *Secale cereale* L./Albedo, Selgo, DANKOWSKIE NOWE, HACADA, GALMA, OBERKARTNER, PUDMERICKE, RADOŠINSKY, REKORD, SVK POL 96 20, SVK POL 96 127, ZDUNO/, *Triticum aestivum* L. /Aranka, Laval 19, CUBUS, IGNIS, ILONA, MALYSKA, VENISTAR, VERITA, MALVÍNA, SOLARA, BARDOTKA, STANISLAVA, ESTELLA, INES, MARKOLA, ŠÁRKA, MLADKA, TORYSA, VANDA, VELDAVA, EVELÍNA, PAVLÍNA/, *Triticum araraticum* /JAKUBZ. Landrace 1/98- Armenischer Wilder Emmer/, *Triticum carthlicum* /NEVSKI Cv.No.48478/, *Triticum dicoccon* /SCHRANK Cv.DI 5/, *Triticum durum*, /DESF, Neodur, Mexidur/, *Triticum monococcum* L. /Italienischer Einkorn 24, Vorarlberger Einkorn 70/, *Triticum petropavlovskyi* /UDACZ. et MIGUSCH, Line 3/99/, *Triticum polonicum* L. /Kamut, Cv.Weihenstephaner/, *Triticum spelta* L./Spalda (Landrace 1-96), *Triticum sphaerococcum*, /PERCIV. LYALL PUR/, *Triticum timopheevii* /ZHUK. CV.TM 1/, *Triticum turgidum* L. /CV.ALASKA/, *xTriticosecale* Witt. /RADKO, KENDO/,

Spracovanie rastlinného materiálu

Na prípravu vzorky pre skríning ostatných biologických aktivít vo všeobecnosti bol použitý 1 g natívnej dezintegrovanej hmoty, ktorý bol macerovaný v 25 ml 80% (v/v) etanolu v tme počas minimálne 24 hodín. Po prefiltrovaní bol macerát preliaty do banky-slzy s guľatým dnom (50 ml) a odparený do sucha na vákuovej odparke pri 50°C. Suché odparky boli zmyté 1 ml DMSO. Takto pripravená vzorka bola skladovaná v endorfnej skúmavke a označená skladovaná v chladničke.

Stanovenie obsahu flavonoidov a fenolových zložiek vo vzorkách

Obsah flavonoidov bol stanovený podľa AlCl₃ metódy opísanej Rakotoarisonom a kol. (1997). Do mikroplatničky bola pipetovaná vzorka a 2% metanolického roztoku AlCl₃ . 6H₂O v pomere 1:1. Ako štandard bol použitý 18mM roztok kvercetínu v DMSO (KRIS-ETHERTON, 2002). Po 10 minútach bola meraná absorbanca pri 410 nm, výsledky boli interpretované ako obsah flavonoidov vo vzorkách

ekvivalentný roztoku štandardu, vyjadrený percentuálne. Na dôkaz fenolových zložiek vo vzorkách bola použitá metóda založená na aplikácii Folin-Ciocalteuovej reagensii opísanú Rakotoarisonom a kol. (1997). Do mikroplatničky sme pipetovali 140 μ l destilovanej vody, 10 μ l Folin-Ciocalteuovej reagensie a 10 μ l extraktu. Po troch minútach sme pridali 40 μ l 20% (v/v) roztoku Na₂CO₃ a nechali stáť 1 minútu vo vodnom kúpeli pri 100°C. Ako štandard bola použitá kyselina galová (2 mM). Po ochladiení bola absorbanca meraná pri 630 nm. Výsledky boli interpretované ako obsah polyfenolických látok vo vzorkách ekvivalentný roztoku štandardu, vyjadrený percentuálne.

Detekcia inhibičnej aktivity na vybrané proteínázy

Na určenie inhibičnej aktivity vybraných vzoriek poľnohospodárskych kultúr boli použité fotometrické metódy s chromogénnymi substrátmi (ZABLOTNA a kol., 2004) pre trypsin, trombín, urokinázu a katepsín B: α -benzoyl-D,L-argininnitroanilid hydrochlorid (BAPNA) resp. N-glycyl-arginyl-paranitroanilid (gly-arg-pNA.2HCl), α -benzoyl-D-fenylalanyl-valyl-arginín-paranitroanilid (Bz-Phe-Val-Arg-pNA) a α -CBZ-L-lyzín-tiobenzyl ester hydrochlorid (CBZ-Lys-pNF). Pomocou mikroplatničkového skriningového systému sme merali pri 410 nm koncentráciu uvoľneného nitroanilínu. Mikroplatničky boli dávkované i pomocou 8-kanálovej pipety (Dynex, Socorex) a celá reakcia bola štartovaná príslušným roztokom enzýmu (0,0015 mg/ml trypsin – 3BAEE jednotky; 0,0005 mg/ml trombín; 0,05 mg/ml urokináza – 500 Plough jednotiek, 1 IU katepsín B). Fyzikálne podmienky: teplota 37°C, čas merania 1min. a 61 min. Zmerané hodnoty po konverzii cez textový formát boli prenesené a uložené v PC a spracované v programe MS Excel, pre každú vzorku bolo vypočítané % inhibície.

Skrining antioxidačnej aktivity Metódami DPPH, FRAP a BKLM

Stanovenie antioxidačnej aktivity (BARTOSZ, 2003) metódou vychytávania DPPH radikálu in vitro (1,1-difenyl-2-pikryl-hydrazyl-DPPH•) bolo uskutočnené podľa metódy, ktorá je založená na schopnosti antioxidantov vychytávať DPPH• radikál za vzniku žltého DPPH komplexu, čo sa sleduje spektrofotometricky pri vlnovej dĺžke 517 nm. Antioxidačná aktivita vzoriek sa merala v mikroplatničkách 50 μ l vzorky, 100 μ l 96% etanolu a 100 μ l 0.012% roztoku DPPH a po 10 minútach sa zmerala absorbanca pri 517 nm.

V hydrofilnom prostredí bola antioxidačná aktivita stanovená spektrofotometricky aj metódou redukčnej sily (FRAP - ferric reducing antioxidant potencial) in vitro pri vlnovej dĺžke $\lambda=700$ nm. Princípom metódy je parciálna premena Fe³⁺ na Fe²⁺ v závislosti od množstva a potenciálu testovaných antioxidačných látok a následná kolorizácia vytvoreného komplexu a meranie pri 700 nm. 1 ml vzorky sa pridalo ku 2.5 ml fosfátového tlmivého roztoku (pH = 6.6) a 2.5 ml 1% K₃Fe(CN)₆. Zmes sa inkubovala 20 minút pri 50 °C, následne sa ochladila a pridalo sa 2.5 ml 10% TCA, zo zmesi sa odobralo do mikroplatničky 50 μ l, pridalo sa 50 μ l destilovanej vody a 10 μ l 0,1% FeCl₃ a zmerala sa absorbanca pri 700nm.

Stanovenie antioxidačnej aktivity vzoriek v lipofilnom prostredí bolo uskutočnené metódou β -karotén linoleátového modelového systému. Jedná sa o jednoduchú spektrofotometrickú metódu stanovenia antioxidačnej aktivity látok využívajúcu schopnosť zabrániť peroxidácii lipidov v lipofilnom prostredí. Antioxidanty chránia β -karotén, čím nedochádza k jeho eliminácii.

230 μ l β -karotén linoleátovej suspenzie, pripravenej špeciálnym postupom sa dávkuje do jamiek mikroplatničky spolu s 20 μ l testovanej vzorky. Mikroplatničky boli následne inkubované v termostate pri 50 °C 90 minút a zmeraná pri 290 nm.

Pri všetkých troch metódach obsahovala kontrola čistý metanol, respektíve DMSO. Ako štandardy boli použité: 0,018mM roztok BHA (butylhydroxyanisol) v metanole s pracovným označením syntetický štandard SS1, 0,018mM roztok kvercetínu v DMSO ako syntetický štandard 2 – SS2 a roztok štandardizovaného extraktu čierneho čaju v DMSO (5mg/ml), pripraveného postupom uvedeným vyššie s pracovným označením prírodný štandard 1 -NS1. Namerané hodnoty boli spracované pomocou programu MS EXCEL, antioxidačná aktivita bola vyjadrená ako % reziduálnej aktivity (% RA), ktorá sa dá vyjadriť ako %inhibičnej aktivity - % IA = 100 - % RA, Z minimálne 4 hodnôt %RA bola metódou lineárnej regresie vypočítaná hodnota parametrov DPPH/FRAP/BKLM₅₀ (riedenie vzorky, pri ktorom bola pozorovaný pokles RA na 50%).

Pomocou troch metód a postupov popísaných vyššie bola stanovená aj termostabilita 10 vybraných vzoriek. Postup hodnotenia antioxidačnej aktivity bol rovnaký, vzorky boli predinkubované 1 hod, respektíve 4 hod vo vodnom kúpeli s teplotou 80°C, spôsob vyhodnotenia bol rovnaký ako je popísaný v predchádzajúcej kapitole.

Stanovenie antimikrobiálnej aktivity

Stanovenie antimikrobiálnej aktivity bolo determinované stanovením parametra MIC /Minimal Inhibition concentration – eng./ na rast mikroorganizmov *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* a *Aspergillus niger*.

Stanovenie imunomodulačnej aktivity in vivo

Adjuvantná artritída bola indukovaná aplikáciou 0,1 ml suspenzie tepelne usmrtených mykobaktérií 12 mg/ml v inkompletom Freundovom adjuvane intradermálnou injekciou do koreňa chvosta samcov inbredného kmeňa Lewis o živej hmotnosti 170±10g. Testované vzorky boli pripravené v laboratóriách VÚP Bratislava, BC v Modre. Počas experimentu bola dokumentovaná hmotnosť zvierat od 1. dňa štúdie každý týždeň v rovnaký deň na elektronických váhach (Accurat 2000). Artrogramy sa zisťovali subjektívnym hodnotením a opuchy zadných končatín sa merali pomocou plethysmometra na 14., 21., 28. deň experimentu. Vzorky krvi boli odobraté na 14., 21., 28. deň štúdie z očného retroorbitálneho sínusu a krvné sérum sa zakonzervovalo mrazom pri - 20°C a následne boli stanovené hodnoty albumínu a cholesterolu. K popisu výsledkov experimentov sa použili základné štatistické hodnoty deskriptívnej štatistiky (aritmetický priemer, smerodajná odchýlka) a jednofaktorová analýza rozptylu (ANOVA). Štúdia bola realizovaná na súbore 56 zvierat rozdelených do 7 skupín po 8 potkanov.

Stanovenie protinádorovej aktivity ex vivo

V rámci štúdie bolo otestovaných 7 náhodne vybraných vzoriek extraktov s anonymným pracovným označením 1a, 2a, 4a, 5 1, 6a, 7a, 8a (1a - Cícer – YIALOVSA, 2a -Jačmeň jarný - TIBET WHITE (kód krajiny DEU), 4a - Láskevce - PI 604672, 5-1 - OVOS rok 2005 - 75.ABEL (kód N), 6a - Pohánka - 0003 BOGATÝR, 7a - Pšenica letná – IGNIS, 8a - Raž -DANKOWSKIE NOWE). Testovaný bol ich efekt na viabilitu buniek sublinií L1210/VCR_resistant a L1210/VCR_sensitive, metódou MTT testu. DMSO extrakty sa pridávali priamo do kultivačného média v dvoch koncentráciách tak aby finálna koncentrácia DMSO bola 0.5 a 1.0 % (v/v). Použili sme neriedené extrakty. Bunky boli kultivované dva dni štandardným spôsobom (5×10^4 buniek v 200 μ l média, presný popis podmienok kultivácie je uvedený v prácach (Barančík a kol., 2006). Nakoľko DMSO samotný môže spôsobovať zmeny v raste buniek, efekt extraktov sme porovnali s efektom DMSO pri tej istej koncentrácii.

Výsledky a diskusia

Inhibičná aktivita vybraných kultúr na potenciálne patofyziologické proteínázy

Cieľom tejto časti projektu bolo verifikovať metódy stanovenie inhibičnej aktivity na vybrané proteínázy trypsín (potenciálny patofyziologický efektor pankreatitídy), trombín (potenciálny patofyziologický efektor cievnych ochorení), urokináza (potenciálny promótor metastázovania nádorových buniek) a orientačne určiť mieru týchto biologických aktivít. Pre určenie miery pravdepodobnosti záchytu účinných vzoriek extraktov testovaných kultúr boli pre každý proteolytický enzým vygenerované grafy popisujúce distribúciu početnosti aktívnych vzoriek, túto skutočnosť prezentuje príloha Obrázok 1.

Pozorovaná bola štatisticky významná rozdielnosť v hodnotách inhibičnej aktivity medzi uvedenými vzorkami. Z výsledkov vyplýva aj pomerne vysoká inhibičná schopnosť vzoriek I. etapy, ktorú predstavujú vo väčšej miere vzorky ďatelíny. Analogickým spôsobom bola hodnotená relatívna antiproteínázová aktivita vybraných vzoriek (extraktov) lucerny a ďatelíny na trombín a urokinázu. Z výsledkov opäť vyplýva aj pomerne vysoká „potencia“ väčšiny vzoriek.

Hodnotenie simulovanej termickej záťaže vybraných vzoriek

V tejto časti práce bolo hodnotených 10 najúčinnějších vzoriek extraktov zrn, ktoré boli podrobené rôznemu druhu záťaže. Keďže je potravina vystavená rôznemu vplyvu prostredia počas technologického procesu a po konzumácii v tráviacom trakte, pokúsili sme sa o priblíženie daných prostredí a hodnotili ich vplyv na antioxidantnú aktivitu. Pri 4 hodinovej termickej záťaži možno konštatovať, že časť vzoriek svoju antioxidantnú potenciál stráca a naopak časť vzoriek svoju antioxidantnú aktivitu zvyšuje. Získané výsledky sú však v závislosti od testovanej metódy a samozrejme od konkrétnej odrody. Ako perspektívne, termicky relatívne odolné sa ukázali vzorky extraktov zrn nasledovných odrôd: jačmeň jarný Detenický Kargyn, jačmeň jarný Kompakt, pšenica letná Ines a jačmeň jarný Jubilant. Výsledky prezentuje Tabuľka 1.

Antimikrobiálna aktivita vybraných kultúr krmovín a osív

Antimikrobiálna aktivita bola testovaná na 24 vzorkách krmovín prezentovaných v nasledujúcej Tabuľka 2. Z výsledkov hodnotenia antimikrobiálnej (antibakteriálnej i antifungálnej aktivity) je zrejmé, že táto vlastnosť je individuálna vzhľadom ku odrodám, vo všeobecnosti možno konštatovať, že vzorky inhibovali rast G^+ baktérie *Staphylococcus aureus* a kvasinky s potenciálne patologickým myceliárnym prejavom *Candida albicans*. Pozoruhodné výsledky boli pozorované v prípade extraktu odrody *Trifolium pratense* NIB 895.

Stanovenie imunomodulačnej aktivity in vivo

Vo vykonanom experimente sa sledoval vplyv aplikácie jednotlivých testovaných látok - mláto pri výrobe sladú zo sladového jačmeňa Detenický Kargyn (VZ1), čistý ovos /odroda Avenuda – Jakub/ (VZ2), ďalej ovos s probiotickou kultúrou (VZ3), výpalky z fermentačného odpadu kukurice (VZ4) a čistý, izolovaný

beta-glukán ako štandard (VZ5) na zápalové a artritické ukazovatele u potkanov s adjuvantnou artritídou. Liečba bola profylaktická, čo znamená, že zvieratám sa podávali testované substancie hneď po aplikácii adjuvansu a trvanie liečby bolo celkom 28 dní.

Výsledky štúdie z profylaktickej liečby jednotlivými testovanými substanciami ukázali, že aplikácia týchto látok sledované parametre v porovnaní s neliečenou artritickou kontrolou zlepšuje najmä v prípade samotného ovsa (VZ2) a pri kŕmnej zmesi upravenej glukánom (VZ5) signifikantne na úrovni štatistickej významnosti s hodnotami $p \leq 0,05$.

Stanovenie protinádorovej aktivity *ex vivo*

Bunky línie L1210 sú štandardným modelom akútnej lymfocytickej leukémie vhodné na toxikologický a farmakologický skrining látok. Pri opakovanej kultivácii týchto buniek v prítomnosti zvyšujúcich sa subletálnych dávok niektorých cytostatik napr. vinkristínu alebo doxorubicínu dochádza u nich k vývoju fenotypu „*multidrug*“ rezistencie (MDR), ktorá je spojená s masívnou nadexpresiou membránovej transportnej ATPázy – P-glykoproteínu (P-gp). Takýmto spôsobom sme navodili MDR u sublínie L1210/VCR_resistant, ktorú sme spolu s parentálnymi bunkami využili pre skrining efektu extraktov z niektorých poľnohospodárskych plodín v DMSO.

Z výsledkov je evidentné, že DMSO samotný znižoval viabilitu buniek koncentračne závislým spôsobom. Toto sa väčšou mierou prejavilo u senzitivných ako u rezistentných buniek. Extrakty potom v niektorých prípadoch zmiernovali alebo odstraňovali efekt DMSO na viabilitu buniek. Najvyššiu efektivitu sme pozorovali u extraktu 4a a 6a, konkrétne sa jedná o Láskevce - PI 604672 a Pohánku - 0003 BOGATÝR.

Záver a diskusia

Zo získaných výsledkov možno konštatovať, že v poskytnutých vzorkách poľnohospodárskych kultúr sa skrýva cenná biologická aktivita, ktorá je predmetom výskumu predloženého projektu. Sumárne je zrejmé, že biologické aktivity jednotlivých odrôd sú odlišné a prísne individuálne od vzorky ku vzorke. Zatiaľ absentuje dôkaz o potenciálnej protinádorovej aktivite testovaných vzoriek, potrebná je zmena metodiky prípravy extraktov pre tento test. I keď možno predpokladať, že antioxidačný účinok vzoriek extraktov odrôd môže a často koreluje s protinádorovou aktivitou nakoľko deje okolo proliferácie, malignity a rastu nádorových línií sú často spojené s oxidatívnym poškodením biologického materiálu. Časť testovaných vzoriek vykazovala inhibičnú aktivitu na niektoré, respektíve viaceré z patofyziologických proteínáz (trypsín, trombín, urokinázu, respektíve katepsín B), časť vzoriek vykazovala antioxidačnú aktivitu, u časti vzoriek sa dá predpokladať imunostimulačná aktivita v dôsledku signifikantného obsahu cenných beta-glukánov. Všetky spomínané a zdôraznené biologické aktivity testovaných vzoriek sú na signifikantnej úrovni, čo možno demonštrovať porovnaním s vhodne zvoleným štandardom alebo s publikovanými výsledkami.

Logickým završením biologického hodnotenia *in vitro* je pilotný experiment účinnosti vybraných vzoriek v „drastickom“ modeli adjuvantnej artritídy *in vivo*, výsledky štúdie z profylaktickej liečby jednotlivými testovanými substanciami - mláto, ovos Avenuda (Jakub), ovos s probiotickými kultúrami, výpalky a čistý beta-glukán z hlivy *Pleurotus ostreatus* ukázali, že aplikácia týchto látok sledované parametre v porovnaní s neliečenou artritickou kontrolou zlepšuje najmä pri aplikácii kŕmnej zmesi obohatenej beta-glukánom, a na druhom mieste pri konzumácii ovsa nahého, odroda Avenuda (Jakub) ako bazálneho nutrientu, čo korešponduje s obsahom rozpustných beta-glukánov.

V rámci projektu bol splnený bazálny cieľ, konkrétne bolo navrhnutých niekoľko foriem symbolového zápisu cenných biologických vlastností testovaných odrôd, ktoré vychádzali z viacerých aktivných parametrov (% inhibície, DPPH₅₀, FRAP₅₀, BKLM₅₀, MIC, špecifická aktivita vzťahnutá na obsah polyfenolov, alebo flavonoidov a pod.), ktoré je možné uplatniť zápisom na kartu (passport) danej odrody.

Pod'akovanie. Táto práca vznikla s podporou projektov AV4/0107/04 OvaT VŠ MŠ SR, APVV-LPP-0251-07 a sčasti aj ako realizácia štátnej úlohy Úloha výskumu a vývoja 2003 SP 27/028 OD 01/028 OD 01 - 03-04-04. Pod'akovanie patrí celému kolektívu autorov, pracovníkov FPV UCM v Trnave, pracovníkov NÚRCH Piešťany, pracovníkov FCHaPT STU a ÚMFG SAV v Bratislave.

Literatúra

- ADOM, K. K., SORRELLS, M. E., LIU R. H.: Phytochemical profiles and antioxidant activity of wheat varieties. *J. Agric. Food Chem.*, (2003), **51**: 7825-7834.
- ANDERSON, J. W., HANNA, T. J., PENG, X., KRYSCIO, R. J.: Whole grains foods and heart disease risk. *J. Am. Coll. Nutr.*, (2000), **19**:291-299.
- BARANCIK M, BOHACOVA V, SEDLAK J, SULOVA Z, BREIER A. LY294,002, a specific inhibitor of PI3K/Akt kinase pathway, antagonizes P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Eur. J. Pharm Sci.* (2006), **29**(5): 426-34.
- BARTOSZ, G., Total antioxidant capacity. *Adv. Clin. Chem.* (2003), **37**: 219-292.
- CLEVELAND, L. E., MOSHFEGH, A. J., ALBERTSON, A. M., GOLDMAN, J. D.: Dietary intake of whole grains. *J. Am. Coll. Nutr.*, (2000), **19**: 331-338.

KRIS-ETHERTON, P. M., HECKER, K. D., BONANOME, A., COVAL, S. M., BINKOSKI, A. E., HILPERT, K. F., GRIEL, A. E., ETHERTON, T. D.: Bioaktívne zlúčeniny v potravinách: Ich úloha v prevencii kardiovaskulárnej choroby a rakoviny. *Am. J. Med.*, (2002), **113**: 71-88.

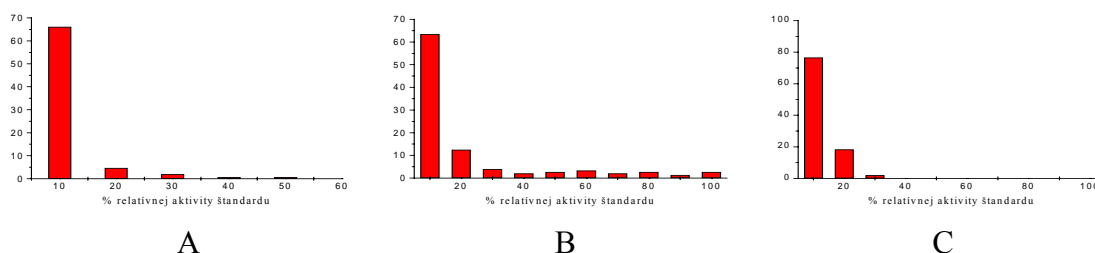
LIU, S., SESSO, H. D., MANSON, A. E., WILLETT, W. C., BURING, J. E.: Is intake of breakfast cereals related to total and cause-specific mortality in men? *Am. J. Clin. Nutr.*, (2003), **77**: 594-599.

SLAVIN, J. L., JACOBS, D., MARQUART, L.: Whole-grain consumption and chronic disease: protective mechanisms. *Nutr. and cancer*, (1997), **27**: 14-21.

SLOAN, E. A.: Look what's coming to our shores. Global nutraceutical trends and opportunities. *Nutraceuticals World*, (2000), **3**: 46-52.

ZABŁOTNA, E., DYSASZ, H., LESNER, A., JAŚKIEWICZ, A., KAŻMIERCZAK, K., MIECZNIKOWSKA, H., ROLKA, K. : A simple method for selection of trypsin chromogenic substrates using combinatorial chemistry approach. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, (2004), **319**(1): 185-188.

Obrázok 1: Distribúcia početnosti aktívnych vzoriek extraktov krmovín podľa % inhibície na trypsin /A/, trombin /B/ a urokinázu /C/.



Tabuľka 1: Antioxidačná aktivita 10 vybraných vzoriek mechanizmami DPPH, FRAP a BKLM bez a po 4-hodinovej termickej záťaži, vyjadrená pomocou aktivných parametrov DPPH₅₀, FRAP₅₀, BKLM₅₀

Odroda	bez termickej záťaže			po 4 hodinovej termickej záťaži		
	DPPH ₅₀	FRAP ₅₀	BKLM ₅₀	DPPH ₅₀	FRAP ₅₀	BKLM ₅₀
Jačmeň jarný Detenický Kargin	0,03 ± 0,01	N	0,31 ± 0,01	N	1,01 ± 0,04	0,54 ± 0,01
Jačmeň jarný Jubilant	0,05 ± 0,01	N	1,9 ± 0,12	N	0,05 ± 0,01	0,54 ± 0,29
Jačmeň jarný KM1910	0,99 ± 0,07	N	N	1,53 ± 0,23	N	N
Jačmeň jarný Kompakt	N	N	0,98 ± 0,07	N	N	N
Ovos Maris Oberon	0,32 ± 0,04	N	0,07 ± 0,01	N	N	1,37 ± 0,77
Ovos Sirene	0,19 ± 0,03	N	N	N	N	2,54 ± 0,77
Pohánka 00003 Bogatýr	N	N	1,89 ± 0,22	N	0,11 ± 0,02	N
Pohánka 00007 Pyra	1,28 ± 0,08	N	0,2 ± 0,01	1,04 ± 0,19	N	1,15 ± 0,45
Pšenica letná Ines	0,03 ± 0,01	N	1,43 ± 0,48	N	1,22 ± 0,13	4,09 ± 1,14
Pšenica letná Karolinum	0,06 ± 0,01	N	0,61 ± 0,11	N	N	2,02 ± 0,78

N- vzorka nevykazovala antioxidačnú aktivitu danou metódou.

Tabuľka 2: Antimikrobiálna aktivita vybraných vzoriek extraktov na modelové, skriningové mikroorganizmy *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* a *Aspergillus niger*.

Plodina	Odroda	MIC (titer)			
		<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Aspergillus niger</i>
<i>Astragalus excapus</i>	CZEPAL03-195	-	-	10	-
<i>Astragalus glycyphyllos</i>	SVKNTAT01-504	10	20	-	-
<i>Astragalus onobrychis</i>	CZEPAL03-168	-	-	10	-
<i>Lotus corniculatus</i>	Giada	-	20	10	-
<i>Lotus uliginosus</i>	POLBES99-666	-	20	10	-
<i>Medicago sativa</i>	Granat	10	80	-	-
<i>Medicago sativa</i>	Dolichi	-	40	10	-
<i>Medicago sativa</i>	Florina	-	80	10	-
<i>Melilotus officinalis</i>	Norgold	10	40	10	-
<i>Onobrychis viciaefolia</i>	Erlangen	-	20	-	-
<i>Trifolium arvense</i>	SVKPOL96-80	-	20	10	-
<i>Trifolium fragiferum</i>	CZEPAL03-138	10	20	10	-
<i>Trifolium pratense</i>	SVKBES99-564	10	80	20	-
<i>Trifolium pratense</i>	UKRKAR96-169	-	80	20	-
<i>Trifolium pratense</i>	SVKCER99-35	10	40	10	-
<i>Trifolium pratense</i>	Viglana	-	80	10	-
<i>Trifolium pratense</i>	NIB 1095	-	80	20	-
<i>Trifolium pratense</i>	NIB 895	20	80	10	-
<i>Trifolium pratense</i>	Varte	10	80	10	-
<i>Trifolium repens</i>	SVKFAT97-89	10	20	20	-
<i>Trifolium resupinatum</i>	Mornos	-	20	10	-
<i>Trifolium rubens</i>	HVISTRA 2-190	10	20	10	-
<i>Trifolium rubens</i>	SVNPIR01-131	10	20	-	-

MOLEKULÁRNE CHARAKTERISTIKY VYBRANÝCH NEŠPECIFICKÝCH PR- PROTEÍNOV JAČMEŇA INFIKOVANÉHO MÚČNATKOU MOLECULAR CHARACTERISTICS OF BARLEY SELECTED NON-SPECIFIC PR- PROTEINS INFECTED WITH POWDERY MILDEW

Elena HLINKOVÁ¹ – Vladena BAUEROVÁ-HLINKOVÁ² – Peter KABÁT⁴ – Zdeněk
VOBURKA³

*Present work is a continuation our previous works at PR-proteins, with future possible using of their genes for construction gene cassette for preparing more resistant barley cultivars to powdery mildew. Our attention was concentrated on some molecular and proteomic characteristic of intercellular chitinases Chi14.5, Chi 21 and membrane protein Glu24.4. Sequence analysis of studied proteins showed that gene for Chi_{14.5} (amino acid sequence for the first fragment from N-end is next-**ATFNKXCGSTIWPAGIPV**) has a 95% identity to putative acid PR-5 protein resp. to thaumatine-like protein (PR-5). This difference is connected with underlined amino acid residue as well as with the discrepancy between extra and intracellular proteins which genes are published in the gene database from which they were the BLAST-P computer program compared. Chi₂₁, from the N-end of protein, has the following sequence for the first ten-th of amino acid: **SGETTDNTA**. Sequence analysis for Glu24.4 meanwhile was not satisfactory. DNAXDNA hybridization analysis for pathogen nuclear DNA gave positive signal for the presence of orthologic gene in the genome of powdery mildew, race – Sk-5/11.*

Key words: barley, powdery mildew, PR-proteins, chitinases, thaumatine-like-protein

Úvod

PR-proteíny sú vo všeobecnosti syntetizované po infekcii hostiteľov patogénmi, či už baktériami, vírusmi alebo hubami. Majú rôznu biochemickú funkciu a mnohé gény kódujúce ich proteíny nepoznáme (Lyon & Newton 2005; Reiss et al. 2006; Hlinková et al. 2007; 2008; 2003; Caldo et al. 2004; Hajouj et al. 2000). V súčasnosti sú už kategorizované do 17 skupín, z ktorých väčšina bola identifikovaná aj u jačmeňa infikovaného múčnatkou (Muthukrishnan et al. 2001). Ich kvalitatívne a kvantitatívne zastúpenie sa v infikovaných rastlinných bunkách mení v závislosti od typu interakcie, vývojového štádia hostiteľského orgánu ako aj štádia anamorfy patogéna. Najväčšiu početnosť v zastúpení majú oxidoreduktázy a hydrolázy. Tieto sa vyskytujú ako v ranných tak neskorých fázach štádia infekcie len s rozdielnymi izozýmovými spektrami. My sme sústredili našu pozornosť na poslednú fázu anamorfy múčnatky jačmennej (*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*) pri kompatibilnej interakcii so senzitívnym kultivarom Dvoran, ktorý neobsahuje vo svojom genóme gény rezistencie z *MI-a* lokusu. V tejto fáze sú syntetizované viaceré PR- proteíny (PR-2, PR-3, PR-4, PR-5: Hlinková et al. 2008, 2003; Reiss et al. 2006; Muthukrishnan et al. 2001) pričom ostatné tri s chitinázovou aktivitou, avšak iba v miestach infekcie. Vo vzdialenejších bunkách od miesta infekcie sa tieto proteíny v primárnych listoch jačmeňa nevyskytujú. Tieto proteíny sme zaregistrovali aj u izogénnych línií cv Pallas nesúcich gény rezistencie *MI-a9,10 a 12*. Zo skupiny PR-3 - PR-5 proteínov sme vybrali intercelulárne proteíny Chi14,4, Chi21 a membránový proteín Glu24,4(PR-2) , ktoré sme podrobili molekulárnym a proteomickým analýzám za účelom zistiť ich sekvencie a prítomnosť / neprítomnosť ortologických génov u patogéna.

Materiál a metódy

Intercelulárny proteínový extrakt sme získali z infikovaných častí primárnych listov jačmeňa, asepticky kultivovaného cv. Dvoran na ôsmy deň od inokulácie patotypom múčnatky Sk-5/11 (začiatok sporulácie patogéna). Kultivar Dvoran neobsahuje vo svojom genóme gény rezistencie z *MI-a* lokusu. Proteínový extrakt sme 10x zakoncentrovali na chladenej centrifúge Beckman pri $rcf=16\ 000xg$ a 4°C. 40µl zakoncentrovaného roztoku ($c=1\mu g.\mu l^{-1}$) sme denaturovali v Laemmliho denaturačnom vzorkovom roztoku (Laemmli 1970). Denaturované proteínové vzorky sme separovali na 15% diskontinuálnom pomocou 1D-SDS PAGE (Smith 1988). Proteíny sme preniesli mokrou blotovacou technikou na PVDF(Immobilon P^{SQ}) membránu. Membránu sme rozdelili na dve časti pre sekvencovanie Edmanovou metódou – degradovanie proteínov/polypeptidov ide z N-konca (Smith & Green 2009) a imunologickú interakciu pre prítomnosť a lokalizáciu PR-4 proteínu Western-blotovacou technikou (Smith 1988). Protilátka k PR-4 proteínu bola pripravená podľa Repku (1997) v imbreďných líniách kralíkov. Ako molekulový štandard sme použili predfarbený široko-spektrálny hmotnostný proteínový marker pre SDS-PAGE od firmy Fermentas, (Life Scie.). Na komparatívne analýzy aminokyselinových sekvencií sme použili počítačový systém BLAST-P a proteínovú sekvenčnú databázu (Ma &

Adresy autorov:

1. E. Hlinková, ÚBB PRIFUK Bratislava, Mlynská dolina G-1, 842 15 Bratislava 4; elena.hlinkova@fns.uniba.sk
2. V. Hlinková-Bauerová, ÚMB SAV, Dúbravská cesta 21, 842 23 Bratislava 4;
3. Z. Voburka, ÚOCHB ČAV, Flemingovo nám.2, 166 10 Praha 6;
4. P. Kabát, VÚ SAV, Dúbravská cesta 9, 842 45 Bratislava 4.

Sheldrick 2005; Mount 2004). DNA izoláciu, značenie a hybridizáciu sme robili podľa manuálu od firmy Boehringer Mannheim (1998) s pomocou príslušných kitov.

Výsledky a diskusia

Hmotnostná spektrometria izolovaného a prečisteného PR4 proteínu upresnila jeho molekulovú hmotnosť na $M_r = 14,5$ kDa. Pôvodná molekulová hmotnosť bola $M_r \sim 14,4$ kDa. Chyba s akou sme ho určili my pomocou jedno a dvojdimenziálnej PAGE (Hlinková et al. 2007, 2008) bola teda menšia ako 1%. Sekvenčná analýza tohto intercelulárneho proteínu s chitinázovou aktivitou identifikovaného v mieste infekcie Edmanovou metódou ukázala, že prvý fragment F1 (20ak) získaný z proteínu PR4 ($Chi_c14,5$) má nasledovnú sekvenciu z N-konca:

F1: Hv (Chi_c 14, 5; PR-4/5) – ATFNIKXCGSTIWPAGIPV

Kompletný proteín je zložený ~ 132 aminokyselinových (ak) radikálov. Blast-P počítačová analýza ukázala, že aminokyselinovej sekvencii nášho intercelulárneho PR-4 proteínu izolovaného z infikovaného miesta primárneho listu jačmeňa, boli priradené dve možnosti z génovej databázy s vysokou až 95% ak zhodou. A to 1) 95% ak identita s kyslým **putatívny prekurzor PR-5** proteínu syntetizovaného v primárnych listoch *Hordeum vulgare* po infekcii (**gén: EMBL:AM403331.1, zhoda od 1 ak z N- konca**) a 2)- 95% ak zhoda s **PR-5** :taumatínom- like-proteínom syntetizovanom v *Triticum aestivum* infikovanom múčatkou (**gén: gb |AKK 60668.1 |AF3 84146 1, zhoda od 21 ak z N -konca**). Tento proteín/ polypeptid s chitinázovou aktivitou na 1D-SDS PAGE dáva pri väčšej nanáške dubletovú čiaru (Dva izoméry s rozdielnou biochemickou funkciou. Rozdiel medzi prúžkami je 100Da). Reiss et. al.(2006) pri analýze mRNA pre intracelulárny PR- proteín s $M_r:14,4$ kDa predpokladajú, že má glukonázovú aktivitu a jedná sa o **taumatín-like-proteín** so skupiny **PR-5** proteínov. Nemecká skupina pracovala však s intracelulárnymi mRNA extraktami. My sme pri štúdiu glukonázovej aktivity intracelulárnych proteínov získaných z infikovaných primárnych listov jačmeňa nesúcich rôzne gény rezistencie získali iba slabý Glu signál pre cv. Dvoran, avšak silný signál pre tento proteín sme zaznamenali pre izogénne línie cv Pallas – P04B (dominantný gén rezistencie *Ml-a7*) a P10(dominantný gén rezistencie *Ml-a12*). Prítomnosť tohto proteínu vykazuje silnú špecifickosť na gény rezistencie (Hlinková et al. 2002). Výraznejšia odpoveď bola pri extracelulárnych proteínoch na chitinázovú aktivitu. (Hlinková et al. 2003). Imunologické reakcie s protilátkou pripravenou k tomuto proteínu potvrdili prítomnosť produktu ortologického génu aj u múčnatky jačmennej, rasa Sk-5/11 (Hlinková et al. 2007). Imunologickú reakciu potvrdili aj DNAXDNA hybridizácie s PCR produktom odvodeným z ak sekvencie pre Chi_c 14.5 (obr.1,2,3, 4). Analýza dát z génových databáz na základe našich proteomických údajov poopravila aj kategorizáciu $Chi_c14,5$ na zaradenie do skupiny **PR-5** proteínov. Definitívnu odpoveď či sa teda jedná o kyslý putatívny prekurzor PR-5 proteínu alebo taumatín-like proteín (obr. 5) dajú ešte ďalšie doplňujúce ak sekvencie pre $Chi_c14,5$ predovšetkým z C konca, ktoré Edmanova metóda neumožňuje. Chitináza $Chi_c14,5$ má silný antifungálny účinok. Ďalším proteínom, ktorý sme podrobili proteomickej analýze bola Chi_c21 (PR-3 proteín). Sekvenčná analýza ak ukázala, že sekvencie pre prvý fragment z N-konca sú nasledovné:

Fragment 1: Hv (Chi_c 21; PR-3)-SGETTDNTA

Proteomická analýza a porovnanie cez systém BLAST-P nedala uspokojivú odpoveď. V tomto prípade sa asi jedná o časť sprievodného proteínu, ktorý má s vysokou pravdepodobnosťou blokovaný N-koniec. Membránový proteín Glu24,4 sa nám zatiaľ nepodarilo uspokojivo osekvenovať v dôsledku silného znečistenia radikálmi z membránových proteínov pri izolácii.

Súhrn

Záverom môžeme konštatovať, že proteomické a molekulárne metódy umožnili osekvenovať dve intercelulárne chitinázy syntetizované v mieste infekcie senzitivného hostiteľa;

♣ upresnili molekulovú hmotnosť a kategorizáciu $Chi_c14,5$ ako PR-5 proteínu;

♣ v prípade chitinázy s nižšou molekulovou hmotnosťou sme zistili, že obsahuje ~ 132 ak a Chi_c21 (PR-3) obsahuje ~ 200 ak;

♣ osekvenovaná časť $Chi_c14,5$ proteínu má 95% zhodu s taumatínom-like proteínom ako aj kyslým putatívnym prekurzorom proteínom PR-5, ktorý má ortologický gén u patogéna;

♣ Chi_c 14,5 má silný antifungálny účinok.

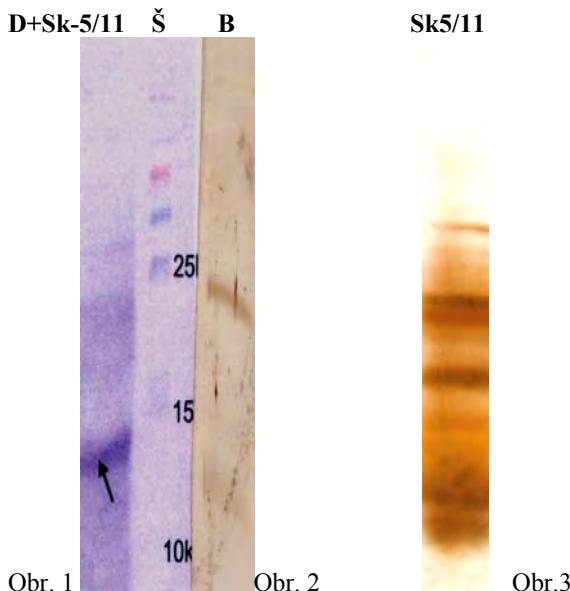
Pod'akovanie. Predložená práca vznikla na základe podpory grantovej agentúry Vega MŠ SR: projekt číslo1/4360/07.

Adresy autorov:

1. E. Hlinková, ÚBB PRIFUK Bratislava, Mlynská dolina G-1, 842 15 Bratislava 4; elena.hlinkova@fns.uniba.sk
2. V. Hlinková-Bauerová, ÚMB SAV, Dúbravská cesta 21, 842 23 Bratislava 4;
3. Z. Voburka, ÚOCHB ČAV, Flemingovo nám.2, 166 10 Praha 6;
4. P. Kabát, VU SAV, Dúbravská cesta 9, 842 45 Bratislava 4.

Literatúra

- Boehringer Mannheim Manual: Nucleic acid isolation and purification (1998), Boehringer Mannheim GmbH, Biochemica, pp 181.
- Caldo, R.A., Netleton, D., Wise, R.P.: (2004): Interaction-dependent gene expression in *Mla*-specified response to barley powdery mildew. *Plant Cell* 16:2514-2528.
- Hajouj, T., Michelis, R., Gepstein, S. (2000): Cloning and characterization a receptor-like kinase gene associated with senescence. *Plant Physiol.* 124:1305-1314.
- Hlinková, E., Bauerová-Hlinková, V., Bobák, M., Valková, D. (2008): Niektoré molekulárne a biochemické vlastnosti PR-4 proteínu pri interakciách hostiteľ patogén. In: *Nové poznatky z genetiky a šľachtienia poľnohospodárskych rastlín* (č. 15; eds.: V. Šudyová; E. Gregová), SARC, Piešťany, 108-111.
- Hlinková, E., Bobák, M., Hlinková, V., Rafay, J. (2007): Pathogenes as a source of possible new resistance genes. In: *Book of abstracts, 18-th Eucarpia Meeting*, (ed. P. Hauptfogel et al.) May 23-26, 2007 Piešťany, SARC Nitra, 153.
- Hlinková, E., Bobák, M., Hudecová, M., Illéš, P., Rafay, J., Perečko, D. (2003): PR-proteíny- potenciálny zdroj genetickej informácie pre zvýšenie rezistencie hostiteľských rastlín voči patogénom. In: *Zborník prednášok. BIOS 2003, Biotechnologické metódy v rastlinnom šľachtiteľstve*. (ed. M. Bežo), PU Nitra, 18. 9. 2003, 35-41.
- Hlinková, E., Bobák, M., Illéš, P. (2002): Chitinases and endoglucanases synthesized in the infected barley leaves in the powdery mildew period sporulation. *Plant Protect. Sci.* 38 (Sp. Issue 2), 469-473.
- Laemmli, U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Lyon, G.D., Newton, A.C. (2005): Disease resistance-related proteins in barley. <http://www.scri.sari.ac.uk/SCRI/Web/Site/...logy/Cereals>
- Mount, D.W. (2004): *Bioinformatics: Sequence and genome analysis*. Cold Spring harbor
- Ma, Q., Sheldrick, G.M. (2005): Thaumatin-like protein, <http://molbio.info.nih.gov/cgi-bin/moldraw?1RQW>
- Muthukrishnan, S., Liang, G. H., Trick, H. N., Gill, B. S. (2001): Pathogenesis related proteins and their genes in cereals. *Plant Cell, Tiss. & org. Cul* 64: 93-114.
- Repka, V. (1977): Intra and extracellular isoforms of PR-3 class chitinases in virus-infected cucumber plants. *Acta Virologica* 41:71-75.
- Smith, J. A. (1988): *Analysis of proteins* In: *Current protocols in molecular biology*. (Eds.: Ausubel, F. M. et al.) John Wiley & sons, Chichester, NY, Toronto, Cambridge.
- Reiss E., Schleisser, B., Brandt, W. (2006): cDNA sequences, MALDI-TOF analyses and molecular modeling of barley PR-5 proteins. *Phytochemistry* 67: 1856-1864.



Adresy autorov:

1. E. Hlinková, ÚBB PRIFUK Bratislava, Mlynská dolina G-1, 842 15 Bratislava 4; elena.hlinkova@fns.uniba.sk
2. V. Hlinková-Bauerová, ÚMB SAV, Dúbravská cesta 21, 842 23 Bratislava 4;
3. Z. Voburka, ÚOCHB ČAV, Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6;
4. P. Kabát, VÚ SAV, Dúbravská cesta 9, 842 45 Bratislava 4.

Obr.1 Coomassie blue R-250 farbená PVD membrána s preblotovaným zakoncentrovaným intercelulárnym proteínovým extraktom izolovaným z infikovaného miesta cv. Dvoran po ôsmich dňoch od inokulácie patotypom múčnatky Sk-5/11. Kultivar Dvoran neobsahuje gény rezistencie z *MI-a* lokusu. Šípkami sú označené proteíny PR-3(Chi_c21) a PR-4/5 ($Chi_c14,5$) ktoré boli sekvenované Edmanovou metódou z N-konca. Nanáška na SDS-PAGE bola 40 μ g zakoncentrovaného proteínového extraktu. Ako molekulový štandard sme použili predfarbený proteínový širokospektrálny molekulový marker od firmy Fermentas s vyznačenými Mr.

Obr.2 Western blot po imunologickej reakcii na PVD membráne s čiastočne špecifickou protilátkou pripravenou pre $Chi_c14,5$.

Imunologická reakcia prezentuje prítomnosť všetkých izozýmovo zhodných Chi v intercelulárnom extrakte-5 imunologicky zhodných izozým.

Obr.3 1D-SDS PAGE proteínového extraktu izolovaného z osemdňových konídiospór (20 μ l) patotypu múčnatky rasa-Sk-5/11.

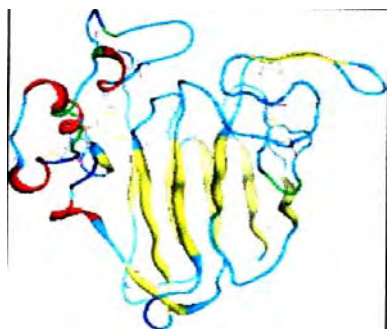
Hviezdičkou je označený proteín imunologicky zhodný s PR4/5 proteínom izolovaným z infikovaného miesta primárnych listov jačmeňa cv.Dvoran. Nanáška činila 0.9 μ g proteínového extraktu na dráhu. Gél bol farbený $AgNO_3$.



Obr. 4.

Obr.4 DNAXDNA hybridizácia s označenou sondou pripravenou pre N-koniec sekvenovaného proteínu/polypeptidu $Chi_c14,5$.

Sonda bola pripravená pomocou PCR-reakcie. DNA bola vy izolovaná zo 40 μ l konídiospór patogéna. Nanáška na Southern blot bola 7 μ g DNA. Prvý dot-rastlinná DNA vyizolovaná z infikovaného miesta jačmeňa (1g rastlinného materiálu); druhý dot-blot DNA múčnatky rasa Sk5/11. Pozitívny signál u druhého dotu indikuje na prítomnosť ortologického génu v genóme patogéna.



Obr. 5

Obr.5 Terciárna štruktúra taumatín-like proteínu vypracovaná pre PR-5 proteín identifikovaný v listoch jačmeňa po infekcii múčnatkou (Reiss et al. 2006).

**MOLEKULÁRNÍ MARKERY GENŮ *Rvi2*, *Rvi4*, *Rvi5*, *Rvi6* A *Rvi8* U ODRŮD A
GENOVÝCH ZDROJŮ JABLONÍ V ČESKÉ REPUBLICE A JEJICH VYUŽITÍ VE
ŠLECHTĚNÍ VŮČI STRUPOVITOSTI**

**MOLECULAR MARKERS OF *Rvi2*, *Rvi4*, *Rvi5*, *Rvi6* AND *Rvi8* GENES IN APPLE
VARIETIES AND GENETIC RESOURCES COLLECTED IN THE CZECH REPUBLIC
AND THEIR APPLICATION IN APPLE SCAB RESISTANCE BREEDING**

Pavel VEJL – Martina MELOUNOVÁ – Jana ZOUFALÁ – Petr SEDLÁK – Radek
VÁVRA – Jan BLAŽEK – František PAPERŠTEJN

*The apple scab caused by ascomycete Venturia inaequalis belongs to the most important apple diseases. Breeding and further growing of resistant varieties represents a significant part of integrated apple protection. The entire majority of commercially cultivated apple varieties possessing the resistance against the apple scab have *Rvi6* locus. The resistance controlled by this locus has been broken down by occurrence of new aggressive races in last years. In this paper, the evaluation of 179 varieties, 520 newly bred varieties and 4 gene's sources is presented in term of the loci *Rvi2*, *Rvi4*, *Rvi5*, *Rvi6* and *Rvi8* presence controlling the race specific resistance against the apple scab. The presence of locus *Rvi6* marker fully correlates with the pedigree of assessed genotypes. The development of new marker (paralog of locus *Rvi6* which is not a linkage one) is also presented in this paper. Marker of *Rvi5* locus was detected at 41.9% newly bred apple varieties of Czech origin. However, the possibility of a recombination between markers and loci *Rvi2*, *Rvi4* and *Rvi8* might exist (depending on genetic distance between them) and therefore this fact is a necessary factor in apple breeding. Key words: Malus, Venturia, inaequalis, resistance, *Rvi2*, *Rvi4*, *Rvi5*, *Rvi6*, *Rvi8*, marker assisted selection*

Úvod

Mezi nejvýznamnější choroby jabloní patří strupovitost, jejímž původcem je askomyceta *Venturia inaequalis* CKE. Intenzivní pěstování nerezistentních odrůd jabloní je spojeno až s 15-ti fungicidními ošetřeními během jedné vegetace. Produkty rezistentního šlechtění jsou všeobecně chápány jako jeden z neúčinnějších součástí integrované ochrany jabloní vůči strupovitosti. U všech komerčně pěstovaných rezistentních odrůd v České republice je rezistence založena na majorgenu *Rvi6*, který je známější pod původním označením *Vf*. Masivní pěstování rezistentních odrůd zejména v Německu, Holandsku a Francii bylo z hlediska populační genetiky důležitým selekčním faktorem, který způsobil prolomení této rezistence (Guérin a Le Cam (2004). V České republice byl v roce 2009 zaznamenán výskyt těchto nových ras strupovitosti v řadě velkoplášných výsadby odrůd Topaz nebo Selena. Tato skutečnost si vynucuje zaměřit pozornost na využívání dalších donorů rezistence respektive vysoké tolerance vůči strupovitosti.

Podrobný přehled o donorech genů rezistence jabloní vůči strupovitosti a o nové nomenklatuře těchto genů podává Bus (2008). Původní označení lokusů jsou v následujícím odstavci uváděna v závorce za aktuální nomenklaturou. Odrůda Golden Delicious je donorem lokusu *Rvi1* (*Vd*), klon TSR34T15 je donorem lokusu *Rvi2* (*Vh2*), kříženec odrůdy Geneva je donorem lokusu *Rvi3* (*Vh3*), klon TSR33T239 je donorem lokusu *Rvi4* (*Vh4*, *Vx*, *Vr1*), ruský semenáč 9-AR2T193 je donorem lokusu *Rvi5* (*Vm*), odrůda Priscilla je donorem lokusu *Rvi6* (*Vf*), *M. floribunda* klon 821 je donorem lokusu *Rvi7* (*Vfh*), klon GMAL3631-W193B je donorem lokusu *Rvi8* (*Vh8*), kříženec J34 odrůdy Dolgo je donorem lokusu *Rvi9* (*Vdolge*), Antonovka PI172623 je donorem lokusu *Rvi10* (*Va*), *M. baccata jackii* je donorem lokusu *Rvi11* (*Vbj*), Hansenova baccata 2 je donorem lokusu *Rvi12* (*Vb*), kříženec odrůdy Durello di Forli je donorem lokusu *Rvi12* (*Vd*), kříženec odrůdy Dülmener Rosen je donorem lokusu *Rvi14* (*Vdr1*), klon GMAL2473 je donorem lokusu *Rvi15* (*Vr2*), klon PRI 80015-125 je donorem lokusu *Rvi16* (*V25*) a klon MIS op 93.051 g07-089 je nositelem *Rvi17* (*Vmis*). Odrůda Gala je považována za náchylnou vůči všem doposud známým rasám *V. inaequalis*.

Následující část literárního úvodu je zaměřena na 4 lokusy, které jsou objektem tohoto příspěvku. Xu a Korban (2002) zjistili, že lokus *Rvi6* je tvořen 4 paralogy genu. Jedná se o geny označené jako *Vfa1*, *Vfa2*, *Vfa3* a *Vfa4*. Tyto jednotlivé geny vykazují velmi silnou homologii, ale liší se dobou exprese. Transkript genu *Vfa3* je nefunkční (Malnoy *et al.*, 2007). Geny *Vfa1*, *Vfa2* jsou exprimovány v mladých nevyvinutých listech, zatímco exprese genu *Vfa4* probíhá ve vyspělých listech. Strukturním charakterem patří do skupiny R genů, které kódují extracelulární LRR a transmembránové domény. Donorem lokusu *Rvi5* je *Malus x atrosanguinea* 804. Tento gen je zodpovědný za výrazné omezení sporulace houby. Dalším donorem lokusu *Rvi5* je botanický druh *Malus micromalus* Makino. Tento gen je zodpovědný za rezistenci vůči rasám strupovitosti 1-4. Donorem lokusu *Rvi4* je genotyp R12740-7A, který byl získán v USA z volného cizosprašení semenáčků jabloní ruského původu v roce 1935. Vyznačuje se rezistencí vůči rasám 6 a 7 BUS *et al.* (2005) se domnívá, že lokus *Rvi8* je v těsné genové vazbě s *Vh2* lokusem ruského semenáče R12740-7A. Nevylučuje, že tyto dva geny mohou být vzájemně alelické. Efekt lokusu *Rvi8* spočívá ve tvorbě nektróz přibližně po 4 – 6 dnech od navození infekce.

Materiál a metódy

Rostlinný materiál a izolácia DNA

Pro analýzy bylo použito 179 odrůd světového sortimentu odrůd jabloní uchovávaných genovou bankou při VŠÚO Holovousy s.r.o. Současne byly hodnoceny donory studovaných genů *Malus floribunda* klon 821, 9-AR2T128 (INRA), 9-AR2T196 (INRA), TSR33T239 (INRA), R1740-7A a OR-45-T-132. Analyzováno bylo rovněž 520 rostlin pocházejících z 12 kombinačních křížení VŠÚO Holovousy s.r.o. DNA byla izolována z listových čepelí pomocí DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen).

Marker lokusu Rvi2

Pro amplifikaci polymorfních PCR produktů byly použity primery OPL19-SCAR a teplotní a časový profil reakce, které publikoval Bus *et al.* (2005). Optimalizovaná reakce probíhala v následujících podmínkách. Reakční směs o objemu 12,5 μl obsahovala 30 ng templátové DNA, 0,6 U *Taq* polymerázy (Fermentas) a 5 μg BSA. Koncentrace ostatních komponent PCR reakce byla následující: 10 mM Tris-HCl (pH 8,8), 50 mM KCl, 0,08%, Nonidet P40, 1,3 mM MgCl₂, 100 μM dNTP, 0,1 μM primer OPL19-SCAR-F, 0,1 μM primer OPL19-SCAR-R a 4,8 % DMSO.

Marker lokusu Rvi4

V experimentech byl použit PCR marker AD13-SCAR podle Boudichevskaia *et al.* (2006). Výsledkem optimalizace je následující složení reakční směsi. Reakční směs o objemu 12,5 μl obsahovala 50 ng templátové DNA, 0,6 U *Taq* polymerázy (Fermentas) a 5 μg BSA. Koncentrace ostatních komponent PCR reakce byla následující: 10 mM Tris-HCl (pH 8,8), 20 mM (NH₄)₂SO₄, 0,08%, Nonidet P40, 1,5 mM MgCl₂, 100 μM dNTP, 0,2 μM primer AD13-F, 0,2 μM primer AD13-R a 4,8 % DMSO.

Marker lokusu Rvi5

Pro analýzy byl použit vazebný marker lokusu *Rvi5* podle Cheng *et al.* (1998). Pro amplifikaci byly použity podmínky, které uvádí Melounová *et al.* (2004).

Marker lokusu Rvi6

Kodominantní PCR marker ALO7 podle TARTARINI *et al.* (1999) je lokalizován ve vzdálenosti 0,9 cM od lokusu *Rvi6*. Pro amplifikaci markeru byl použit modifikovaný postup podle VEJL *et al.* (2003).

Nový marker paralogu lokusu Rvi6 - VfAD

Pro návržení páru primerů *VfA* – *VfD* byla použita úplná CDS databáze NCBI EU794466. Jednalo se o sekvenci *HcrVf4* genu *M. floribunda* klonu M18-6Cs. Pro amplifikaci polymorfního PCR ampliconu byly použity následující primery: *VfA* 5'ggtgtaagataaatcctcttggc3' a *VfD* 5'aatgccaggaatccagatg3'. Reakční směs o objemu 12,5 μl obsahovala 50 ng templátové DNA, 0,7 U *Taq* polymerázy (Fermentas) a 5 μg BSA. Koncentrace ostatních komponent PCR reakce byla následující: 10 mM Tris-HCl (pH 8,8), 50 mM KCl, 0,08%, Nonidet P40, 2 mM MgCl₂, 0,2 μM dNTP, 0,48 μM primer *VfA*, 0,48 μM primer *VfD* a 4 mM tetramethyl amonium oxalát (Top Bio). Amplifikace probíhala v termocykleru C1000 (BioRad) při následujících podmínkách: 1x (95°C, 3 minuty), 35x (94°C 30 sekund, 66,8°C, 30 sekund, 72°C, 1 minuta), 1x (72°C, 7 minut). Produkty amplifikace byly separovány v 1,5 % agarózovém gelu v 1xTBE pufru po dobu 1 hodiny.

Marker lokusu Rvi8

Pro amplifikaci polymorfních PCR produktů byly použity primery OPL19-SCAR a teplotní a časový profil reakce, které publikoval Bus *et al.* (2005). Optimalizovaná reakce měla shodné složení, jako u lokusu *Rvi2*.

Výsledky a diskuse

Lokus Rvi2

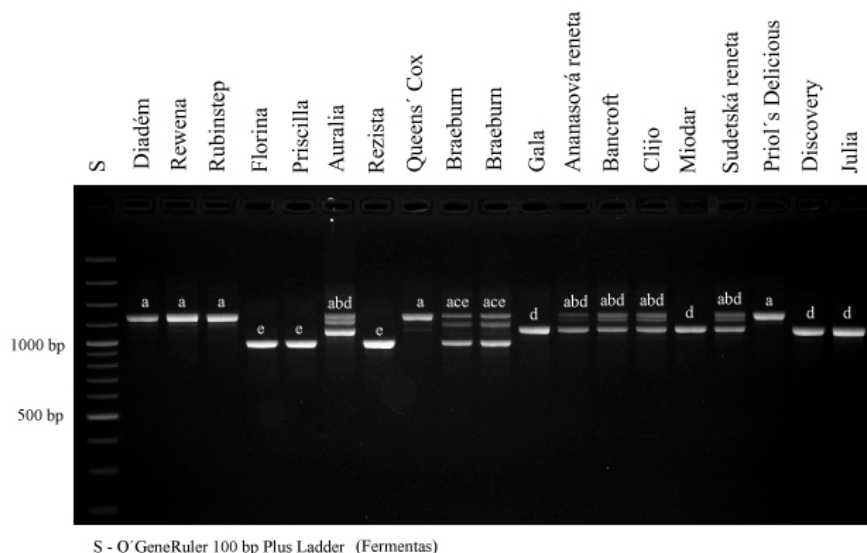
Potomstvo křížení Royal Gala x TSR34T15, které hodnotil Bus *et al.* (2005) vykazovalo dva PCR produkty u markeru OPL19-SCAR. Fragment o přibližné velikosti 1120 bp byl nemarkerující a vyskytoval se jak u rezistentního genotypu TSR34T15, tak i u vysoce náchylné odrůdy Royal Gala. Přítomnost *Rvi2* genu charakterizovala přítomnost PCR fragmentu o velikosti 433 bp. Amplicon o velikosti 433 bp byl detekován rovněž u 80 odrůd (44,7%) a dále u genových zdrojů 9-AR2T128, 9-AR2T196 a TSR33T239, které nejsou odvozeny od genotypu TSR34T15. Tato skutečnost přesně odpovídá původu a typu markeru – marker OPL19-SCAR je konvertovaný vazebný RAPD marker, který u klonu TSR34T15 v těsné vazbě s lokusem *Rvi2*. U ostatních genotypů, které nemají odvozený původ od výše zmíněných donorů, však tato genová vazba neexistuje.

Lokus Rvi4

Boudichevskaia *et al.* (2006) na souboru 31 genotypů identifikovala 4 alely: a (1300 bp), b (1100 bp), c (950 bp) a d (750 bp). Přičemž s rezistencí asociovala alela „c“, kterou detekovala pouze u genotypu R12740-7A a odrůd od něj odvozených. Stejný PCR produkt byl autorkou zjištěn i u některých botanických druhů rodu *Malus*. Ve své práci autorka však nehodnotila širokou kolekci odrůd, které nejsou rezistentní ke strupovitosti. Z obrázku 1 vyplývá, že při hodnocení 179 odrůd jabloní bylo získáno 5 ampliconů s variabilní délkou. Tyto fragmenty byly označeny písmeny a, b, c, d, e. Námí získaný fragment označený jako „e“

vykazoval veľkosť 950 bp a bol charakteristický práve pro genotyp R12740-7A. Tento fragment se svou velikostí shoduje s PCR produktem, který Boudichevskaia *et al.* (2006) označila jako alelu „c“. PCR produkt o velikosti 750 bp, který Boudichevskaia *et al.* (2006) označila jako alelu „d“, nebyl u žádného z hodnocených genotypů získán. Tuto skutečnost si lze vysvětlit tím, že Boudichevskaia *et al.* (2006) tento amplikon získala pouze u botanického druhu *M. baccata* – klon 420. Námi získaný amplikon „d“ o přibližné velikosti 1050 bp BOUDICHEVSKAIA *et al.* (2006) nezískala. PCR produkt „a“ získaný při řešení projektu odpovídal velikosti 1100 bp alele „b“, kterou popsala Boudichevskaia *et al.* (2006).

Obrázek 1: Elektroforeogram PCR markeru AD13-SCAR u vybraných genotypů jableň



U některých genotypů byly získány 3 amplikony, které by teoreticky mohly odpovídat triploidnímu genotypu. Na základě znalosti opylovacích poměrů těchto odrůd byla hypotéza triploidie zamítnuta. Z obrázku 1 vyplývá, že u některých genotypů s fragmentem „a“ se nachází fragment „b“ nebo „c“. Tyto fragmenty mohou být buďto nealelické povahy nebo při vzniku odrůdy mohlo dojít reduplikaci úseku chromozómu, který nese homologní sekvence pro nasedání primeru. Boudichevskaia *et al.* (2006) uvádí, že marker AD13-SCAR vznikl konverzí RAPD markeru. Tudiž lze předpokládat, že se jedná o dominantní typ markeru. U donoru R12740-7A a u jeho kříženců byla ověřena genová vazba na vlastní lokus *Rvi2*. U mapovacích populací, které Boudichevskaia *et al.* (2006) použila, byla zjištěna síla vazby mezi markerem AD13-SCAR a lokusem *Rvi2* o přibližné hodnotě 8 cM. Tato skutečnost byla dokázána i v námi prováděných analýzách. Při experimentech byl analyzován jediný donor genu *Rvi2* (R12740-7A). Teoreticky markerující fragment „e“ byl však detekován u 17,5% hodnocených genotypů, na jejichž vzniku se ruský semenáč R12740-7A jednoznačně nepodílel.

Lokus *Rvi5*

Přítomnost dominantního markeru lokusu *Rvi5* byla zjištěna u dvou genotypů - donorů: 9-AR2T196 a OR-45-T-132. Tyto výsledky plně souhlasí se závěry Cheng *et al.* (1998). Ani jedna ze 179 hodnocených odrůd tento lokus nenese. Tyto výsledky souhlasí s rodokmeny těchto odrůd, které nejsou odvozeny z mezidruhového křížení s *Malus x atrosanguinea* nebo *M. micromalus*. Donor lokusu *Rvi5* OR-45-T-132 je však hojně využíván v rámci českého rezistentního šlechtění. Z 520 hodnocených novošlechtění byla přítomnost markeru lokusu *Rvi5* zjištěna u 218 (41,9 %) rostlin.

Lokus *Rvi6*

Marker ALO7 podle TARTARINI *et al.* (1999) představuje kodominantní typ markeru. Byl detekován u deklarovaného donora - *M. floribunda* klon 821. U všech 31 odrůd, jejichž původ je odvozen z křížení s *M. floribunda* klonu 821 byla zjištěna heterozygotní sestava alel lokusu *Rvi6*. Jedna z těchto odrůd byla i odrůda Priscilla, kterou Bus (2008) uvádí jako donora lokusu *Rvi6*. Z 520 hodnocených novošlechtění byla přítomnost dominantní alely lokusu *Rvi6* zjištěna u 213 (41,0 %) rostlin. U 13 (2,5 %) neošlechtění z 520 hodnocených byla zjištěna kumulace lokusů *Rvi5* a *Rvi6*.

Nový marker paralogu lokusu *Rvi6* - *VfAD*

Primery pro amplifikaci polymorfního PCR produktu byly navrženy na základě úplné CDS *HcrVf4* genu *M. floribunda* klonu M18-6Cs (EU794466). U této sekvence byla pomocí programu NCBI Blast identifikována značná homologie s ortology *Vf* genů. Produktem amplifikace byl 1100 bp fragment, který charakterizoval pouze odrůdy s deklarovanou rezistencí vůči strupovitosti řízenou lokusem *Rvi6*. Velikost sekvence ohraničené primery *VfA* a *VfD* u CDS je 971 bp. Skutečný PCR produkt vykazoval přibližnou délku 1100 bp, což svědčí o tom, že u genomické templátové DNA docházelo k amplifikaci exonových i

intronových sekvencií. Nově navržený PCR marker *VfAD* představuje typ genového dominantního markeru. Jeho výhodou je to, že detekuje skutečnou sekvenci genu a ne pouze sekvenci těsně vázanou na gen *Vf*, jako je například lokus ALO7 (TARTARINI *et al.*, 1999). Jistou jeho nevýhodou je, že genotypy s absencí detekovaného genu jsou charakteristické výskytem tak zvaných nulových alel.

Lokus *Rvi8*

Donorem tohoto genu je genotyp GMAL3631-W193B. Bus *et al.* (2005) se domnívá, že lokus *Rvi8* je v těsné genové vazbě s *Rvi2* lokusem. Nevylučuje, že tyto dva geny mohou být vzájemně alelické. Potomstvo křížení Royal Gala x W193B, které hodnotil Bus *et al.* (2005) vykazovalo dva PCR produkty u markeru OPB18-SCAR. Fragment o přibližné velikosti 628 bp představoval alelu s delecí, která nebyla ve vazbě na rezistenci. Naopak amplicon o velikosti 799 bp dle sekvenační analýzy, kterou provedl rovněž Bus *et al.* (2005), delecí neobsahoval a byl ve vazbové fázi s rezistentním projevem. Jiné produkty amplifikace BUS *et al.* (2005) nezaznamenal. Příčinou byla zřejmě skutečnost, že v práci publikuje výsledky jednoho kombinačního křížení, kde oba rodičovské komponenty jsou v markeru OPB18-SCAR kontrastní. Při hodnocení naší kolekce odrůd a donorových genotypů bylo získáno celkem 5 různě velkých ampliconů. Stejně jako u markeru AD13-SCAR, který byl popsán v předchozí části příspěvku, rovněž i u markeru OPB18-SCAR byla zjištěna zdvojená zóna, která je označena písmeny „a“ a „c“. Právě amplicon „c“ odpovídá velikostí markerujícímu fragmentu 799 bp, který popsal Bus *et al.* (2005). Zdvojení fragmentů je možné zřejmě vysvětlit stejnou hypotézou, jako u markeru AD13-SCAR. Je zajímavé, že amplicon „c“ byl detekován pouze u minoritního počtu genotypů. Jedná se o odrůdy Antonovka, Antonovka těžká, Borovinka a Bogajevskij Charvanskij, které byly získány z bývalého SSSR.

Závěr

Rezistentní odrůdy jabloní, které byly v České republice vyšlechtěny nebo které jsou zde velkoplošně pěstovány, nesou mimo polygenní faktorů odolnosti vůči strupovitosti pouze jeden ze známých majorgenů – lokus *Rvi6*. V blízké budoucnosti se jeví jako perspektivní využití lokusu *Rvi5*, který je vnesen do řady nadějných novošlechtění. Při aplikaci vazebných genetických markerů dalších perspektivních lokusů *Rvi2*, *Rvi4* a *Rvi8* je vždy potřeba vyhodnotit jejich markerovací potenciál, který může být výrazně omezen ne příliš silnou vazbou mezi amplicovaným fragmentem a skutečným lokusem.

Poděkování. Prezentované výsledky byly získány za podpory grantových projektů NAZV MZe ČR QH81142 a QD1267.

Litatura

- BOUDICHEVSKAIA, A. - FLACHOWSKY, H. - PEIL, A., FISCHER, C. - DUNEMANN, F. (2006): Development of a multiallelic SCAR marker to scab resistance gene *Vr1/Vh4/Vx* from R12740-7A apple and its utility for molecular breeding. In: Tree Genetics & Genomes, vol. 2, N. 4., 2006, pp. 186-195.
- BUS, V. (2008): Nomenclature of the differential host-pathogen interactions of *Venturia inaequalis* and *Malus*, dostupné z: <http://www.vinquest.ch/nomenclature/nomenclature.pdf>
- BUS, V. G. M. - LAURENS, F. N. D. - VAN DE WEG, W. E. - RUSHOLME, R. L. - RIKKERINK, E. H. A. - GARDINER, S. E. - BASSETT, H. C. M. - KODDE, L. P. - PLUMMER, K. M. (2005): The *Vh8* locus a new gene-for-gene interaction between *Venturia inaequalis* and the wild apple *Malus sieversii* is closely linked to the *Vh2* locus in *Malus pumila* R12740-7A. In: New Phytologist, vol. 166, N. 3, 2005, pp. 1035-1049.
- GUÉRIN, F. - LE CAM, B. (2004): Breakdown of the Scab Resistance Gene *Vf* in Apple Leads to a Founder Effect in Populations of the Fungal Pathogen *Venturia inaequalis*. In: Phytopathology, vol. 94, N. 4, 2004, pp. 365-369.
- CHENG, F. S. - WEEDEN, N. F. - BROWN, S. K. - ALDWINCKLE, H. S. - GARDINER, S. E. - BUS, W. G. (1998): Development of a DNA marker for *Vm*, a gene conferring resistance to apple scab. In: Genome, vol. 42, N. 2, 1998, pp. 208-214.
- MELOUNOVÁ, M. - VEJL, P., SEDLÁK, P. - REZNEROVÁ, A. - TESAŘOVÁ, M. - BLAŽEK, J. - ZOUFALÁ, J. (2004): The Variability of *Venturia inaequalis* CKE. Races in the Czech Republic and the Accumulation of Resistance Genes in Apple Germplasm. In: Plant, Soil and Environment, vol. 50, N. 9, 2004, pp. 416 – 423.
- TARTARINI, S. - GIANFRANCESCO, L. - SANSVINI, S. - GESSLER, C. (1999): Development of reliable PCR markers for the selection of the *Vf* gene conferring scab resistance in apple. In: Plant Breeding, vol. 118, N. 2, 1999, pp. 183-186.
- VEJL, P. - SKUPINOVÁ, S. - BLAŽEK, J. - SEDLÁK, P. - BARDOVÁ, M. - BLAŽKOVÁ, H. - MILEC, Z. (2003): PCR Markers of Apple Resistance to Scab (*Venturia inaequalis* CKE.) Controlled by *Vf* Gene in Czech Apple Breeding. In: Plant, Soil and Environment, vol. 49, N. 9, 2003, pp. 427–432.
- XU, M. - KORBAN, S. S. (2002): A Cluster of Four Receptor-Like Genes Resides in the *Vf* Locus That Confers Resistance to Apple Scab Disease. In: Genetics, vol. 162, N. 4, 2002, pp. 1995-2006.

POROVNÁNÍ VARIABILITY PLANÝCH A KULTURNÍCH CHMELŮ MIKROSATELITNÍMI MARKERY COMPARISON OF VARIABILITY AMONG WILD AND CULTIVATED HOPS BY MICROSATELLITE MARKERS

Jakub VAŠEK – Pavel VEJL – Daniela ČÍLOVÁ – Vladimír NESVADBA

It was tested genetic diversity and relatedness of world wide collection of wild and cultivated hops. Total of 225 plants were assessed by 6 SSR markers. We have found 71 different alleles across six microsatellite loci with average 11,87 allele per locus. Degree of variability was estimated and compared by Ho and PIC measures. Average Ho and PIC were 0,391 and 0,614 for wild hops and 0,264 and 0,242 for cultivars, respectively. Cluster analysis based on DA matrix divided wild hops into 3 subgroup – North-American, Caucasian and European. Cultivars were clustered together with European subgroup of wild hops, but detailed analysis revealed different genetic structure among these wild and cultivated forms of hop.

Key words: hop (Humulus lupulus L.), variability, microsatellites

Úvod

Mikrosatelitní lokusy jsou tvořeny tandemově se opakujícími sekvencemi v délce 1 až 6 bp. Popularita těchto molekulárních markerů je založena na řadě předností mezi něž patří vysoký stupeň variability, kodominantnost, přítomnost jak u eukaryotních tak prokaryotních organismů a rovnoměrné rozprostření v celém genomu (Oliveira et al., 2006), abychom jmenovali alespoň ty nejdůležitější. Značná šíře aplikovatelnosti mikrosatelitů neboli SSR v celé řadě genetických analýz je patrná ze studií zaměřených na tvorbu genových map, zjišťování genetické diversity, struktury populací či testy paternity a maternity.

Chmel (*Humulus lupulus* L.) je hospodářsky významnou rostlinou především pro pivovarnický a v posledních letech i farmaceutický průmysl. Z botanického hlediska se jedná o dvoudomou, popínavou a vytrvalou rostlinu, která je řazena do čeledi *Cannabaceae*. V současné době narůstají požadavky na výnos, odolnost a složení jednotlivých chemických látek obsažených v chmelových hlávkách samičích rostlin. Tyto nároky je nutno zohlednit při šlechtění nových odrůd a proto je důležité shromáždit pokud možno co nejvíce geneticky variabilní materiál, který poskytuje dobrý základ v dalším šlechtitelském procesu. Významným zdrojem jsou často plané chmely, ale i kultivary rozdílného původu. Mikrosatelitní genetické markery jsou vhodným nástrojem k posouzení variability jak planých tak kulturních chmelů, což dokazuje řada studií (Jakše et al., 2004; Štajner et al., 2007), umožňují jejich vzájemné srovnání a dovolují určit jejich genetickou podobnost. Získané údaje poskytují další hledisko při rozhodování je-li daný genetický materiál vhodný pro šlechtění či nikoliv.

Materiál a metody

Rostlinný materiál

Jednotlivé vzorky planých a kulturních chmelů byly poskytnuty genobankou Chmelařského institutu s.r.o. v Žatci. Do analýzy bylo zahrnuto celkem 225 rostlin. Z toho 177 rostlin tvořily plané chmely pocházející ze Španělska (28), Francie (23), Belgie (3), Švýcarska (9), Rakouska (2), ČR (15), Bulharska (2), Kavkazu (31), USA (24) a Kanady (40). Zbýlých 48 rostlin byly kulturní odrůdy z 12-ti zemí původu (podrobný seznam na požádání).

Izolace a amplifikace DNA

DNA byla izolována z mladých listů pomocí DNase Plant Mini Kit (Qiagen). Jednotlivé kroky izolace byly provedeny dle manuálu výrobce, ale z důvodu vysokého obsahu látek inhibujících následnou amplifikaci byl postup v některých krocích upraven dle Landergott et al. (2006). Variabilita planých a kulturních chmelů byla porovnána na šesti mikrosatelitních lokusech – HIGA03, HIGA09, HIGT05, HIGT09, HIGT10 a HIGT12. Amplifikace byla provedena pomocí sekvenčně specifických primerů dle Jakše et al. (2002). PCR Reakční směs o celkovém objemu 12,5 µl obsahovala přibližně 20 ng DNA a 0,5 jednotky *Taq* polymerázy (Roche), koncentrace ostatních komponent byla následující: 1x KCl či $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4^{2-}$ PCR pufr, 0,2 mM dNTP a 0,4 µM pro každý z příslušného páru primerů, 0,32 µg/µl BSA a 2 mM TMA-oxalát (Top-Bio). Koncentrace MgCl_2 se pro jednotlivé primery lišila a je uvedena společně s teplotním programem v tabulce 1.

Amplifikace mikrosatelitů byla provedena v termocyklerech T1000 (Bio-Rad) a Bioengine (Bio-Rad) pomocí TD-PCR nebo klasické PCR. Teplotní program se skládal z následujících kroků: 1x pre-denaturace při 95°C 4 min. (platí pro oba typy PCR), pro primery HIGA03 a HIGA09 následoval příslušný počet cyklů (N1), kdy se opakovaly kroky denaturace při 94°C 45 sec., annealace při příslušné annealační teplotě (init. Ta) 30 sec., která byla snižována o 1 či 0,5°C na cyklus a elongace při 72°C 90 sec. Poté následovaly (pro primery HIGA03 a HIGA09) či začínaly (pro ostatní primery) jednotlivé fáze: denaturace při 94°C 45 sec.,

annelace při příslušné annelační teplotě (T_a) 30 sec. a elongace při 72°C 90 sec., které se opakovaly daným počtem cyklů (N2). Finální elongace probíhala při 72°C 8 min.

Tabulka 1: Teplotní program a koncentrace MgCl

Locus	TD-PCR			PCR		pufr	MgCl ₂ (mM)
	init. T_a (°C)	snížení na cyklus (°C)	N1	T_a (°C)	N2		
HIGA03	64	1	3	61	25	(NH ₄) ₂ SO ₄ ²⁻	2.5
HIGA09	63	0.5	12	57	15	KCl	3
HIGT05				60	29	KCl	1.5
HIGT09				55	32	KCl	1.5
HIGT10				57	26	KCl	1.5
HIGT12				56	26	KCl	1.5

Vzorky byly separovány ve vertikální elektroforetické cele Sequi-Gen GT (Bio-Rad) v 6% w/v denaturačním (s 8M močovinou) polyakrylamidovém gelu v 0,5x TBE pufru. Příprava vzorků před nanášením na gel zahrnovala smíchání s denaturačním roztokem dle Benbouza et al. (2006), denaturaci při 94°C 5 min. a ponechání alespoň 30 minut na ledu. Denaturační roztok byl smíchán v poměru 1:1 pro plané chmely, s výjimkou pro amplikony lokusu HIGT10, a amplikony kultivarů v lokusech HIGT05 a HIGT09 a v poměru 1:2:1 (vzorek:denaturační roztok:voda) pro amplikony zbylých lokusů kultivarů a pro amplikony planých chmelů lokusu HIGT10.

Statistická analýza

K posouzení variability na základě deskriptivní statistiky (Ho a PIC) mezi planými a kulturními formami chmele byl použit program Cervus 3.0 (Kalinowski et al., 2007). Shluková analýza jednotlivců byla provedena programem Populations ver. 1.2.30 (vyvinutý a distribuovaný O. Langellou, volně dostupný na <http://bioinformatics.org/~tryphon/populations/>) na základě DA matice (Nei et al., 1983) metodou Neighbor Joining s bootstragem na lokus. Byla zvolena hodnota 500 opakování pro porovnání všech chmelů a 1000 opakování pro porovnání evropské podskupiny s kultivary na lokus jako parametry pro bootstrap metodu. Zobrazení dendrogramu bylo vytvořeno pomocí programu TreeView 1.6.6 (Page, 1996).

Výsledky a diskuse

Charakteristika mikrosatelitních markerů

Celkově bylo v souboru 225 rostlin nalezeno v 6 SSR lokusech 71 různých alel s průměrem 11,83 alely na lokus. Největší počet alel byl nalezen v lokusech HIGA09 (20) a HIGT05 (19) a naopak nejméně v lokusu HIGA03 (6), u lokusů HIGT09 a 12 bylo detekováno 9 alel a 8 pro lokus HIGT10. Jestliže porovnáme plané a kulturní chmele mezi sebou z hlediska počtu alel, pak 70 alel bylo detekováno u planých a 25 u kultivarů. U kultivarů byla nalezena pouze jediná alela, která se nevyskytovala mezi planými chmely, ale rozdílnost kultivarů spočívala především v kombinacích jednotlivých alel. Na základě shlukové analýzy (viz. níže), která prokázala že jsou kultivary nejvíce podobné evropské podskupině planých chmelů byly porovnány tyto dvě skupiny a ukázalo se, že počet alel a průměrný počet alel na lokus je podobný - 30 u planých chmelů a 25 u kultivarů a průměrný počet alel na lokus je roven 5 pro plané a 4,17 pro kultivary. Tabulky 2 a 3 ukazují variabilitu jednotlivých podskupin a planých chmelů jako celku, kultivarů a celkovou variabilitu testovaných rostlin dohromady. Toto rozdělení lépe ukazuje rozložení variability, protože pouhé srovnání planých a kulturních chmelů je samo o sobě mírně zavádějící vzhledem k původu většiny kultivarů.

Tabulka 2: Hodnoty Ho pro jednotlivé lokusy a chmely

Lokus	Ho – heterozygotnost pozorovaná					
	Planý chmel				Kulturní chmel	Kulturní a plané chmely dohromady
	Všechny podskupiny	Kavkazská podskupina	Severo-americká podskupina	Evropská podskupina		
HIGA03	0,475	0,742	0,609	0,268	0,229	0,422
HIGA09	0,373	0,806	0,266	0,293	0,500	0,400
HIGT05	0,563	0,667	0,484	0,585	0,417	0,531
HIGT09	0,290	0,161	0,444	0,220	0,188	0,268

Lokus	Ho – heterozygotnosť pozorovaná					
	Planý chmel				Kultúrny chmel	Kultúrny a plané chmely dohromady
	Všetchny podskupiny	Kavkazská podskupina	Severo-americká podskupina	Evropská podskupina		
HIGT10	0,384	0,613	0,484	0,220	0,188	0,342
HIGT12	0,260	0,742	0,172	0,146	0,063	0,218
průměr	0,391	0,621	0,410	0,264	0,264	0,364

Tabulka 3: Hodnoty PIC pro jednotlivé lokusy a chmely

Lokus	PIC - polymorfni informační index					
	Planý chmel				Kultúrny chmel	Kultúrny a plané chmely dohromady
	Všetchny podskupiny	Kavkazská podskupina	Severo-americká podskupina	Evropská podskupina		
HIGA03	0,649	0,566	0,589	0,243	0,198	0,581
HIGA09	0,657	0,767	0,420	0,288	0,495	0,661
HIGT05	0,830	0,742	0,596	0,618	0,376	0,838
HIGT09	0,689	0,378	0,683	0,269	0,169	0,623
HIGT10	0,499	0,374	0,618	0,191	0,155	0,451
HIGT12	0,358	0,714	0,234	0,172	0,060	0,302
průměr	0,614	0,590	0,523	0,297	0,2422	0,576

Z tabulek je patrné, že nejvíce variabilní je kavkazská podskupina jak z hlediska heterozygotnosti, tak hodnot polymorfního informačního indexu. Získané výsledky jsou v dobrém souladu s chemickými analýzami, protože tato skupina vykázala i největší rozsah v obsahu jednotlivých látek (V. Nesvadba, osobní komunikace). Zarážející je velmi nízká hodnota heterozygotnosti u severoamerické skupiny pro lokus HIGA09, protože v této skupině se vyskytovalo 14 alel z celkových 20. Tento výsledek by mohl naznačovat výskyt tzv. nulové alely a tím pádem by docházelo k jistému zkreslení co se týče stupně genetické diversity, která je pravděpodobně vyšší. Tuto domněnku navíc podporuje i vysoký podíl homozygotních jedinců. Přibližně stejné nejen průměrné hodnoty Ho (264 vs. 264) a PIC (0,297 vs. 0,242) ukazují na značnou podobnost genetické diversity evropské podskupiny planých a skupiny kultivarů, ačkoliv se kompozicí alel mezi sebou liší.

Shluková analýza

Shluková analýza byla provedena v několika krocích. Nejprve byla provedena analýza individuálních genotypů planých chmelů, která ukázala, že jednotlivé plané chmely lze celkem jednoznačně zařadit do jedné ze tří podskupiny a to severo-americkou, kavkazskou a evropskou (obrázek 1 příloh). Následně byly do analýzy zařazeny i kultivary a bylo zjištěno, že převážná většina z nich jednoznačně spadá (až na několik výjimek) do evropské podskupiny (data nejsou zobrazena). Zde se jednalo o kultivary amerického původu, které však sdílejí i některé evropské alely. Proto byla provedena třetí shluková analýza z důvodu lepšího posouzení variability mezi evropskými planými a kulturními chmely, při které byly vynechány genotypy z ostatních podskupin. Genetická podobnost jednotlivých genotypů je patrná na obrázku 2 v sekci přílohy.

Dendrogram vytváří v podstatě dvě velké skupiny s oddělenou třetí - menší skupinou, která je tvořena pouze kultivary. Ačkoliv tedy plané a kulturní rostliny chmele mají společný evropský genofond, existují mezi nimi výrazné rozdíly. První skupina obsahuje značnou část kultivarů a je patrné, že ji lze rozdělit do čtyř menších podskupin, přičemž některé zahrnují i plané chmely. Druhá skupina se skládá hlavně z planých chmelů. Výrazným znakem této skupiny je, že chmely nelze jednoznačně rozlišit podle místa původu. Důvodem může být relativně nízká variabilita chmelů evropského genofondu pramenící z krátkého časového úseku kdy se chmel rozšířil do jednotlivých geografických oblastí (Murakami et al., 2006).

Závěr

Plané chmely vykázaly mnohem vyšší genetickou diversitu ve srovnání s kulturními, nicméně pokud byla porovnávána pouze evropská podskupina planých chmelů s kultivary (taktéž převážně evropského původu), tak nebyly zjištěny výrazné rozdíly ve stupni heterozygotnosti a hodnotách PIC.

Shluková analýza jednotlivých vzorků rozdělila plané chmely na tři geneticky rozdílné podskupiny –

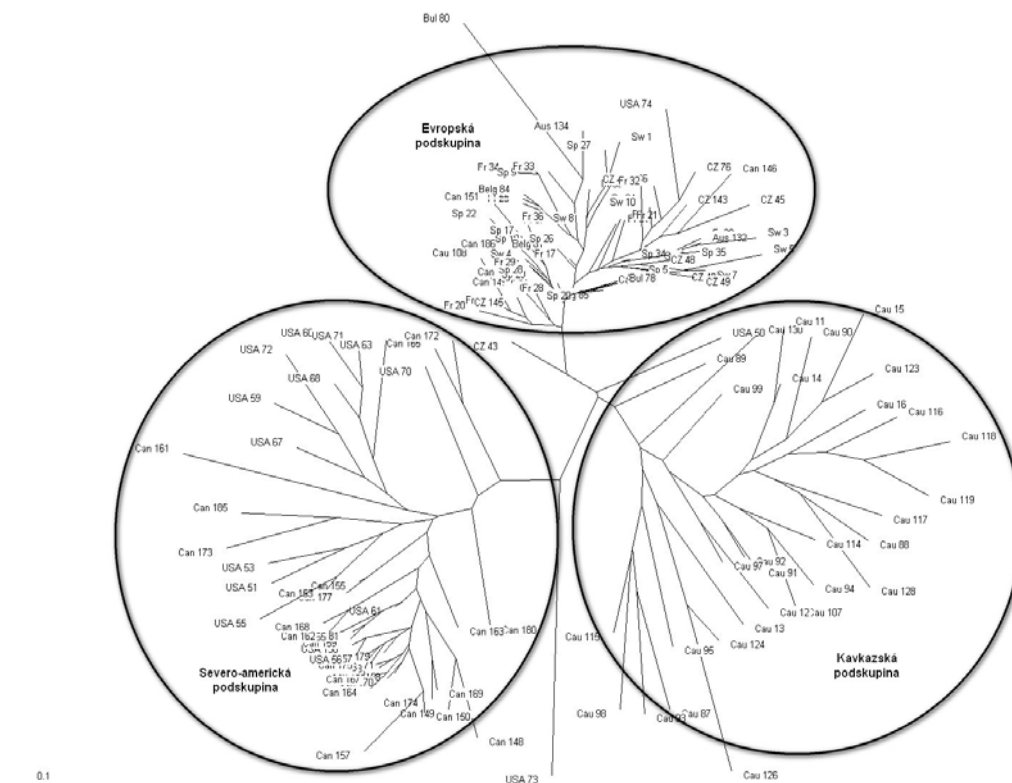
severoamerickou, kavkazskou a evropskou. Väčšina kultivarů byla převážně zařazena k evropské podskupině planých chmelů.

Detailnější shluková analýza pouze evropské podskupiny planých chmelů a kultivarů ukázala, že každá skupina má rozdílnou genetickou strukturu, kterou se od sebe vzájemně liší.

Poděkování. Tato studie byla podpořena následujícími grantovými projekty: „Komplexní analýza mikrosatelitních lokusů genových zdrojů chmele“ GA-FAPPZ ČZU v Praze č. 21 360/13 12/31 42 a projektem MŠMT 6046070901 „Setrvalé zemědělství, kvalita zemědělské produkce, krajinné a přírodní zdroje“.

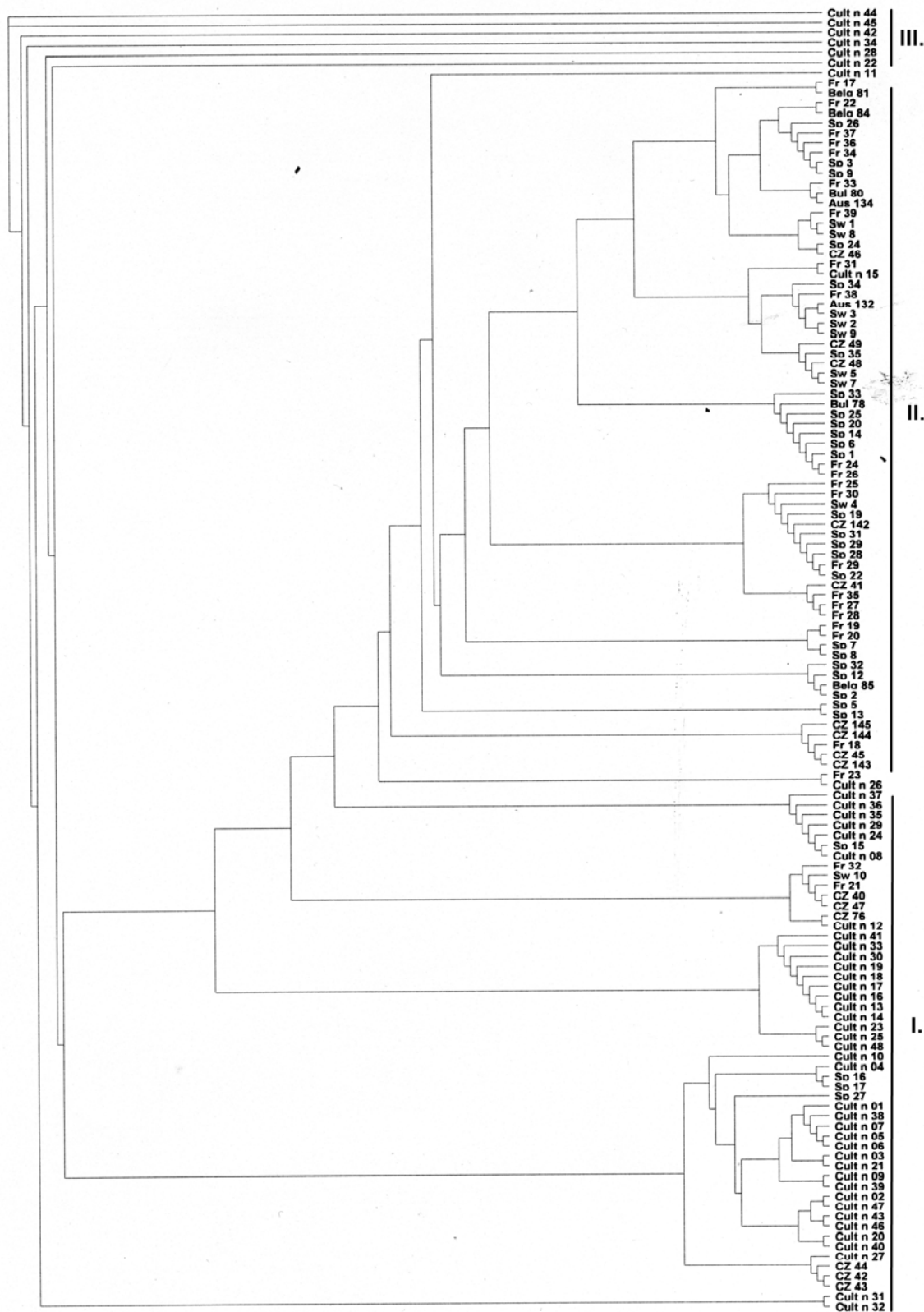
Literatura

- 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.
- 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.
- 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
- Kalinowski, S. T. - Taper, M. L. - Marshall, T. C. (2007): Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. In: *Mol. Ecol.*, vol. 16, 2007, N. 5, pp. 1099-1106.
- 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. In: *Theor. and Appl. Genet.*, vol. 113, 2006, N. 3, pp. 453-465.
- Murakami, A. - Darby, P. - Javornik, B. - Pais, M. S. S. - Seigner, E. - Lutz, A. - Svoboda, P. (2006): Molecular phylogeny of wild hops, *Humulus lupulus* L. In: *Heredity*, vol. 97, 2006, N. 1, pp. 66-74.
- Nei, M. - Tajima, F. - Tateno, Y. (1983): Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. In: *J. Mol. Evol.*, vol. 19, 1983, N. 2, pp. 153-170.
- Oliveira, E. J. - Pádua, J. G. - Zucchi, M. I. - Vencovsky, R. (2006): Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. In: *Genet. Mol. Biol.*, vol. 29, 2006, N. 2, pp. 294-307.
- Page, R. D. M. (1996): TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. In: *Comput. Appl. Biosci.*, vol. 12, 1996, N. 4, pp. 357-358.
- Štajner, N. - Šatovic, Z. - Čerenak, A. (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.



Vysvětlivky: Aus – Rakousko, Belg – Belgie, Bul – Bulharsko, Can – Kanada, Cau – Kavkaz, CZ – Česká republika, Fr – Francie, Sp – Španělsko, Sw – Švýcarsko, USA – Spojené státy americké

Obrázek 1: Dendrogram planých chmelů na základě DA matice



Vysvětlivky: Aus – Rakousko, Belg – Belgie, Bul – Bulharsko, Cult - kultivar, CZ – Česká republika, Fr – Francie, Sp – Španělsko, Sw – Švýcarsko

Obrázek 2: Dendrogram jednotlivých planých chmelů evropské podskupiny a kultivarů na základě DAMaticy

METODOLÓGIA ANALÝZY POLYMORFIZMU ENZÝMOV DRUHOV RODU LÁSKAVEC (*AMARANTHUS SP. L.*) PRE ÚČELY GENETIKY, ŠĽACHTENIA A SEMENÁRSTVA

METHODOLOGY OF ENZYME POLYMORPHISM ANALYSIS OF SPECIES OF GENUS AMARANTH (*AMARANTHUS SP. L.*) FOR GENETICAL, BREEDING AND SEED IMPROVEMENT PURPOSES

Pavol MÚDRY – Alena GAJDOŠOVÁ

Increasing demand for the breeding and proteomic study in Amaranthus species led us to test some methodological approaches to enzyme polymorphism analysis during 2008 – 2009. For these experiments two genotypes of Amaranthus were selected – Amaranthus cruentus L. (genotype Fichta) and D 279 (A. hypochondriacus L. x A. hybridus L.), which are characterized by a good seed quality and quantity, suitable for food production. The attention was devoted to testing of methodology published by STUBER et al. (1988), slightly modified for enzyme (ACP, ADH, CAT, DIA, GLU, GOT, IDH, MDH, PGD, PGI and PGM) multiplicity analysis for amaranths and testing of feasibility of chosen analysed organ (dry seeds and seedlings) weights, dimensions of Whatman No. 2 wicks and different volumes of extract buffer. This work presents whole methodology feasible for enzyme multiplicity analysis of amaranth species.

Key words: Amaranthus sp., isoenzymes, horizontal starch gel electrophoresis, methodology, molecular markers, isozymograms

Úvod

Posledné polstoročie vo vede, okrem iného, je poznamenané intenzívnym štúdiom polymorfizmu enzýmov hlavne poľnohospodárskych plodín. Centrom dlhoročnej pozornosti, ako v oblasti teoretickej, tak aj v oblasti aplikatívnej, je polymorfizmus enzýmov kukurice, sóje, slnečnice, hrachu, niektorých druhov tráv, d'ateľín a husto siatych obilovín. Pri všetkých vymenovaných plodinách poznanie polymorfizmu enzýmov prerástlo do tvorby štandardizovaných metodológií analýzy polymorfizmu, čo umožňuje jednotný prístup k riešeniu analýz polymorfizmu enzýmov výskumným pracovníkmi a testovacím laboratóriám prakticky po celom svete. So všetkými plodinami, okrem husto siatych obilovín, máme metodologické a experimentálne skúsenosti, ktoré sme publikovali a osobne prezentovali na domácich a zahraničných konferenciách.

Nie všetky poľnohospodárske druhy sú na úrovni poznania polymorfizmu enzýmov, ako uvedené plodiny. Dobrým príkladom je rod láskavec (*Amaranthus sp. L.*), kde polymorfizmus enzýmov je riešený veľmi sporadicky napriek skutočnosti, že združuje 85 druhov láskavcov, medzi ktorými sú aj poľnohospodársky cenné druhy. Publikácií, ktoré sú metodologicky podnetné ľahko možno spočítať na prstoch jednej ruky. Nedostatok prác riešiacich polymorfizmus enzýmov láskavcov vyplýva pravdepodobne z toho, že ich ekonomický význam a ich tradícia pestovania nie sú tak veľké, ako hore uvedených druhov v európskych krajinách. K tomuto stavu mohla prispieť aj publikovaná práca v roku 1980 (JAIN *et al.*, 1980), ktorá hovorí o úzkej variabilite polymorfizmu enzýmov láskavcov, čím mohla odradiť ďalšie výskumné pracoviská od riešenia projektov štúdia polymorfizmu enzýmov láskavcov.

K hlavným dôvodom riešenia metodológie analýzy polymorfizmu enzýmov nás viedli tieto skutočnosti: a) posledné tri desaťročia zvýšený záujem o výskum, pestovanie a využívanie láskavcov v poľnohospodársky vyspelých krajinách Európy vrátane Slovenska, b) aktívne a úspešné šľachtenie nových kultivarov láskavcov v spomínaných krajinách vrátane Slovenska (Gajdošová *et al.*, 2008), a tým tvorba nového vysokovýkonného genofondu láskavcov, c) metodologická nejednotnosť, absencia štandardizovanej metodiky a nejednotnosť názorov na možnosti praktického využitia polymorfizmu enzýmov láskavcov a d) proklamovaný zvýšený záujem zo strany niektorých štátov o popis genofondov a hlavne nových kultivarov láskavcov aj na báze polymorfizmu enzýmov (Goptsiy *et al.*, 2008).

Hlavným cieľom našej experimentálnej práce bolo otestovať vhodnosť štandardizovanej metodológie analýzy polymorfizmu enzýmov pre koleoptilu kukurice autorov STUBER *et al.* (1988) pre analýzu polymorfizmu enzýmov láskavcov a otestovať vhodnosť vybraných rastlinných orgánov, rôzne hmotnosti ich vzoriek, rozmery knôtov Whatman 2 a rôzne objemy extrakčného činidla.

Materiál a metódy

Experimentálnu prácu sme zrealizovali v rokoch 2008-2009. Vybrali sme dva genotypy láskavca – láskavec metlinatý (*Amaranthus cruentus L.*), kultivar Fichta (HTS 0.85 g) a kultivar D 279 (HTS 0.73 g) produkt medzidruhového kríženia (*A. hypochondriacus L. x A. hybridus L.*). Oba genotypy sa vyznačujú dobrými kvalitatívnymi i kvantitatívnymi parametrami a sú vhodné pre výrobu potravín. Pôvodné vzorky boli získané z Génovej banky Výskumného ústavu rastlinnej výroby Praha-Ruzyně, Česká republika.

Prvý experiment zahŕňal vzorky suchých semien kultivarov Fichta aj D 279 a boli testované hmotnosti 10, 50, 100, 150 a 200 mg (13, 65, 130, 195, 235 a 14, 70, 135, 210, 270 semien) a tri rozmery knôtov Whatman 2 (11 x 1,5; 11 x 2,0 a 11 x 3,0 mm). V druhom experimente boli zahrnuté vzorky jedno-, troj- a šesť

dňových klíčencov tých istých hmotností, ako boli uvedené vyššie. Rozmer knôtov bol uniformný v tomto experimente - 11 x 1,5 mm. Klíčenie semien a rast klíčencov prebiehal v termostate na mokrom filtračnom papieri sytenom redistilovanou vodou v Petriho miskách v tme, pri teplote 25 °C a relatívnej vlhkosti 95%. Pre porovnanie mobility zón enzymatickej aktivity láskavcov s mobilitou zón aktivity enzýmov časti koleoptily bol použitý extrakt z päťdňovej koleoptily dvojliniového hybridu kukurice (Sc 3098 x 3150, Sempol Holding, Trnava, Slovenská republika) pestovanej za tých istých kultivačných podmienok.

Bola testovaná vhodnosť standardizovanej metódy horizontálnej elektroforézy na škrobovom géle autorov Stuber *et al.* (1988) a neskôr publikovanej autormi Múdry a Juráček (2001) a podľa tejto metodiky sa realizovala analýza polymorfizmu kyseljej fosfatázy (ACP, E.C. 3.1.3.2), alkoholdehydrogenázy (ADH, E.C. 1.1.1.1), katalázy (CAT, E.C. 1.11.1.6), diaforázy (DIA, E.C. 1.6.99.2), β -glukozidázy (GLU, E.C. 3.2.1.21), glutamát-oxaloacetáttransaminázy (GOT, E.C. 2.6.1.1), izocitrátdehydrogenázy (IDH, E.C. 1.1.1.42), malátdehydrogenázy (MDH, E.C. 1.1.1.37), 6-fosfoglukonátdehydrogenázy (PGD, E.C. 1.1.1.44), fosfoglucoizomerázy (PGI, E.C. 5.3.1.9) a fosfoglukomutázy (PGM, E.C. 2.7.5.1). Všetky biologické vzorky boli homogenizované ručne sklenou tyčinkou v homogenizačnom zariadení umiestnenom v ľade. Pri homogenizovaní vzoriek suchých semien láskavcov s prídavkom niekoľkých zrn čistého piesku. Zloženie extrakčného činidla bolo: 5 ml vody; 0,84 g sacharózy a 0,42 g askorbátu sodného. Extrakčné činidlo sme aplikovali nasledovne: 20 μ l/časť koleoptily kukurice jedenásť mm dlhjej a 10/10, 50/50, 100/100, 100/150 a 100/200 (μ l/mg) suchých semien alebo klíčencov láskavca. Škrobové gély mali zloženie: 77,31 g hydrolyzovaného škrobu zo zemiakov pre elektroforézu (Starch Art Corporation, Smithville, USA), 15 g sacharózy a 600 ml gélového tlmivého roztoku. Zloženie tlmivých roztokov je uvedené v Tab. 1. Extrakt vzoriek boli vložené do škrobového gélu prostredníctvom papierových knôtov (Whatman 2) približne 3 cm od katódového konca. Elektroforetická separácia prebiehala v chladničke pri teplote 4 °C a za režimu konštantného výkonu Tab 2. Po skončení separácie bol gél horizontálne rezaný na niekoľko tenkých plátov (asi 1,2 mm hrubé) a umiestnené do boxov s tlmivými roztokmi na vyfarbenie zón enzymovej aktivity. Zloženie tlmivých roztokov na prípravu vyfarbovacích roztokov je uvedené v Tab. 3. Zloženie farbiacich médií pre jednotlivé roztoky je nasledovné: **ACP:** 50 ml 0,1 mol.l⁻¹ tlmivý roztok zloženia octan sodný - kyselina octová (pH = 5,0), 50 mg soľ Fast Garnet GBC, 50 mg MgCl₂, 50 mg sodná soľ kyseliny α -naftyl fosforečnej. **ADH:** 50 ml 0,05 mol.l⁻¹ tlmivý roztok zloženia Tris-HCl (pH = 8,0), 1 ml 95% etanol, 20 mg β -nikotínamidadenín dinukleotid, 20 mg MTT, tetrazolium tiazolyl modrá, 5 mg fenazín metosulfát. **CAT:** 500 mg ferikyamid draselný, 500 mg chlorid železitý, 50 ml H₂O, 0,01 % H₂O₂. **DIA:** 15 ml 0,05 mol.l⁻¹ tlmivý roztok zloženia Tris-HCl (pH = 8,0), 1 mg 2,6-dichlórfenol indofenol, 10 mg redukovaná forma β -nikotínamidadenín dinukleotid, 5 mg tetrazolium tiazolyl modrá. **GLU:** Roztok 1: 50 ml 0,05 mol.l⁻¹ tlmivý roztok zloženia fosforečnan draselný (pH = 6,5), 1 g polyvinylpyrolidon 40, 100 mg soľ Fast blue BB. Roztok 2: 50 mg 6-bromo-2-naftyl- β -D-glukozid v 5 ml N,N-dimetyl formamide. **GOT:** 50 ml substrátový roztok, 50 mg soľ Fast blue BB, substrátový roztok (pH = 7,4), 400 ml H₂O, 146,1 mg kyseliny α -ketoglutárovej, 532,4 mg kyselina L-asparágová, 2 g polyvinylpyrolidon 40, 200 mg dvojsodná soľ kyseliny etyléndiamín tetraoctovej, 5,68 g Na₂HPO₄. **IDH:** 50 ml 0,05 mol.l⁻¹ tlmivý roztok zloženia Tris-HCl (pH = 8,0), 50 mg MgCl₂, 150 mg trojsodná soľ kyseliny DL-izocitrónovej, 5 mg sodná soľ β -nikotínamidadenín dinukleotidfosfátu, 5 mg tetrazolium tiazolyl modrá, 1 mg fenazín metosulfát. **MDH:** 50 ml 0,1 mol.l⁻¹ tlmivý roztok zloženia Tris-HCl (pH = 9,1), 100 mg neutralizovaná kyselina DL-jablčná, 20 mg redukovanej formy β -nikotínamidadenín dinukleotidu, 10 mg nitro blue tetrazolium, 1,25 mg fenazín metosulfát. **PGD:** 50 ml 0,05 mol.l⁻¹ tlmivý roztok zloženia Tris-HCl (pH = 8,0), 20 mg trojsodná soľ kyseliny 6-fosfogluconovej, 50 mg MgCl₂, 5 mg sodná soľ β -nikotínamidadenín dinukleotidfosfátu, 5 mg tetrazolium tiazolyl modrá, 1,5 mg fenazín metosulfát. **PGI:** 50 ml 0,05 mol.l⁻¹ tlmivý roztok Tris-HCl (pH = 8,0), 50 mg trojsodná soľ D-fruktóza-6-fosfátu, 50 mg MgCl₂, 5 mg sodná soľ β -nikotínamidadenín dinukleotidfosfátu, 5 mg tetrazolium tiazolyl modrá, 1,5 mg fenazín metosulfát, 10 jednotiek NADP-závislej glukóza-6-fosfát dehydrogenázy. **PGM:** 50 ml 0,1 mol.l⁻¹ tlmivý roztok zloženia Tris-HCl (pH = 8,5), 100 mg MgCl₂, 250 mg dvojsodná soľ α -D-glukóza-1-fosfát, 10 mg sodná soľ β -nikotínamidadenín dinukleotidfosfátu, 7,5 mg tetrazolium tiazolyl modrá, 1 mg fenazín metosulfát, 37,5 jednotiek NADP-závislej glukóza-6-fosfát dehydrogenázy.

Izozymogramy (fingerpriny) láskavcov boli zakresľované na milimetrovú sieť, fotografované digitálnym fotoaparátom, vypočítavaný faktor relatívnej mobility zón enzymovej aktivity a vytvorené diagramy izozymogramov.

Výsledky a diskusia

Pri štúdiu polymorfizmu enzýmov podstatnú úlohu zohráva kvalita zymogramov (fingerprintov). Je dôležité, aby každý izozymogram bol kompletný a aby sa každý pás izozýmvej aktivity dal dobre odlišiť jeden od druhého. Jestvuje veľa faktorov, ktoré môžu ovplyvniť čitateľnosť zymogramov od biologickej vzorky, ktorá je analyzovaná, až po vyfarbovanie zymogramov. Pretože pre láskavce chýba štandardizovaná metodológia analýzy polymorfizmu enzýmov, ktorá by prinášala výsledky analýz z rôznych laboratórií pre konfrontáciu vlastných získaných výsledkov, rozhodli sme sa otestovať vhodnosť štandardizovanej metodológie horizontálnej elektroforézy na škrobovom géle publikovanej autormi Stuber *et al.* (1988) a Bourgoin-Greeneche *et al.* (1998) pre časť koleoptily klíčenca kukurice. Analýzou polymorfizmu enzýmov dvoch druhov láskavcov vyplynulo, že ich fingerprinty sú pre ACP, ADH, GOT, IDH, MDH, PGD a PGI monomorfné. Izozymogramy CAT boli slabé, rozmazané, pre GLU väčšinou chýbali a pre DIA izozymogramy boli nejasné s dvoma a piatimi škvrnami. Pretože aktivita izoenzýmov DIA bola slabá a pozadie vyfarbených škrobových plátov bolo tmavé, tento enzým si vyžaduje ďalšiu experimentálnu prácu. Experimentálne genotypy boli rozlíšiteľné na báze polymorfizmu PGM. Vo vzťahu k rozmerom knôtov Whatman 2 a ku koncentrácii extraktov zo suchých semien láskavcov podľa vizuálneho hodnotenia kvality izozymogramov vyplynulo toto poradie kvality pre genotyp Fichá - MDH > ADH > PGI > PGD > IDH > PGM > ACP > GOT > CAT > DIA, GLU, pre genotyp D 279 - MDH > ACP > PGI, PGD > ADH > IDH > PGM > GOT > CAT > DIA, GLU a za oba genotypy - MDH > ADH, PGI > PGD > ACP > IDH > PGM > GOT > CAT > DIA and GLU. Vplyv rozmeru knôtu na kvalitu izozymogramov bol malý a mierne rástla k rozmeru 11 x 3,0 mm. Aj koncentrácia extraktu mala malý vplyv na kvalitu izozymogramov. Kvalita sa zvýšila z koncentrácie 4 (navážka 4) na koncentráciu 5 (navážka vzorky 5). Kvalita izozymogramov genotypu Fichá bola trochu väčšia ako genotypu D 279. Pre rýchlu prípravu extraktov je veľkou nevýhodou veľká tvrdosť semien a malý objem extraktu pre vzorku 1 (navážka vzorky 1) pre viac ako dva knôty. Kvalita izozymogramov vo vzťahu ku kultivácii a koncentrácii extraktov z klíčencov mala nasledovnú klesajúcu tendenciu pre genotyp Fichá - MDH > ACP > ADH, PGI, PGD > GOT, IDH > PGM > CAT, DIA a GLU, pre D 279 - MDH > ACP, ADH > GLU > PGI, PGD, PGM > IDH > GOT > CAT, DIA a pre oba genotypy - MDH > ACP > ADH > PGI > PGD > PGM > IDH > GOT > GLU > CAT and DIA. Vplyv dĺžky kultivácie na kvalitu izozymogramov bol evidentný a kvalita klesala od 1-dňovej (náročnejšia príprava vzorky) ku 6-dňovej kultivácii, ale rozdiely medzi 3-dňovou a 6-dňovou kultiváciou boli minimálne. Koncentrácia extraktu pri navážke vzorky 1, 2 a 3 mala malý, až temer žiadny vplyv na kvalitu izozymogramov. Kvalita mierne vzrástla s navážkou 4 k navážke 5. V tomto prípade kvalita izozymogramov genotypu Fichá bola trochu menšia ako genotypu D 279.

Záver

Práca potvrdzuje vhodnosť a prináša celý jemne modifikovaný metodologický postup (Stuber *et al.*, 1988) analýzy polymorfizmu enzýmov pre druhy rodu láskavec so závermi: a) odlišnosti medzi fingerprintami semien a klíčencov láskavca sú malé, ale praktickejšie pre rýchlu prípravu extraktov a testovacie účely boli 3-dňové klíčence amarantov, b) vplyv rozmerov knôtov na kvalitu izozymogramov bol malý – je známe, že vzrastajúca šírka knôtov znižuje kapacitu vzoriek škrobového gélu and c) najvhodnejšia koncentrácia extraktu bola 5 (100/200 µl/mg).

Pod'akovanie: Výskum bol podporený Vedeckou grantovou agentúrou MŠ SR a Slovenskou akadémiou vied VEGA (projekt č. 2/0109/09).

Literatúra

- GAJDOŠOVÁ, A., LIBIAKOVÁ, G., OSTROLUCKÁ, M. G., FEJÉR, J. (2008): Mutation breeding in selected *Amaranthus* ssp. In: Libiaková, G., Gajdošová, A. (Ed.): *Amaranth – plant for the future*. 5th International Symposium of the European Amaranth Association, Book of abstracts, Institute of plant Genetics and Biotechnology SAS, Nitra, Slovak Republic, 93-94. ISBN 978-80-89088-70-6.
- GOPTSIY, T., VORONCOV, N., POPOV, V., ZHYRAVEL, D., GROMENKO, S. (2008): Grain varieties of amaranth developed by selection at Kharkiv National Agrarian University and the perspectives of their use. In: Libiaková, G., Gajdošová, A. (Ed.): *Amaranth – plant for the future*. 5th International Symposium of the European Amaranth Association, Book of abstracts, Institute of plant Genetics and Biotechnology SAS, Nitra, Slovak Republic, 97-100. ISBN 978-80-89088-70-6.
- JAIN, S.K. - WU, L. - VAIDYA, K.R. (1980): Levels of morphological and allozyme variation in Indian amaranths: a striking contrast. *The Journal of Heredity* 71: 283-285.
- MÚDRY, P. - JURÁČEK, E. (2001): Modifikovaná štandardizovaná metodika analýzy polymorfizmu jedenástich druhov enzýmov – molekulárnych značkovačov kukurice siatej (*Zea mays* L.). Modified and standardized methodology of polymorphism analysis of eleven enzyme types – molecular markers of maize (*Zea mays* L.). In: *Biotechnologické metódy v šľachtení rastlín BIOS 2001*.

Zborník referátov zo VII. vedeckej konferencie s medzinárodnou účasťou, SPU – Nitra, 68-73. ISBN 80-7137-915-8.

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

Tabuľka 1: Zloženie elektródových a gélových tlmivých roztokov podľa použitého systému (Stuber a kol., 1988)

System	Elektródový tlmivý roztok	Gélový tlmivý roztok
B pH=5,7	0,065 M L-histidin (10,088 g/l) 0,02 M kys. citrónová.H ₂ O (asi 4,125 g/l) pH upraviť kys. citrónovou	0,009 M L-histidin 0,003 M kys. citrónová . H ₂ O (1:6 roztok elektródového tlmivého roztoku)
C pH=8,3	0,19 M kys. boritá (11,875 g/l) 0,04 M hydroxid litný (asi 1,60 g/l) pH upraviť s LiOH	9 dielov Tris - kys. citrónová tlmivý roztok /0,05 M Trizma báza (6,20 g/l), 0,007 M kys. citrónová . H ₂ O (1,50 g/l) 1 diel elektródový C tlmivý roztok
D pH=6,5	0,065 M L-histidin (10,088 g/l) 0,007 M kys. citrónová . H ₂ O (asi 1,50 g/l) pH upraviť kyselinou citrónovou	0,016 M L-histidin 0,002 M kys. citrónová . H ₂ O (1:3 roztok tlmivého roztoku)
F pH=7,0	0,135 M Trizma báza 0,04 M kyselina citrónová. H ₂ O(asi 9,0 g/l), pH sa upraví s kys. citrónovou	0,009 M Trizma báza 0,003 M kys. citrónová . H ₂ O (elektródový tlmivý roztok zriedený 1:14)

Tabuľka 2: Gélový systém, výkon a pracovný čas podľa Stuber a kol. (1988)

Gélový systém	Výkon	Prac. Čas	System je optimálny pre:
B	17,0 W	7 1/4 hod	ACP, GLU, MDH
C	12,0 W	6 hod.	ADH, GOT
D	16,0 W	6 1/2 hod.	CAT, IDH, PGM, 6-PGD, PHI
F	15,0 W	6 1/2 hod	DIA

Tabuľka 3: Tlmivé roztoky pre prípravu farbiacich roztokov (Stuber a kol., 1988)

Enzým	pH tlmivého roztoku	Zloženie
ADH,DIA,IDH, PGI/6-PGD	8,0	0,05 M Trizma báza (6,05 g/l) titrovať do pH=8,0 s HCl
ACP	5,0	0,1 M octan sodný . 3 H ₂ O (13,6 g/l) titrovať do pH=5,0 s 0,1 M kys. octovou
CAT	-	-
GLU	6,5	0,05 M dihydrogén fosforečnan draselný (6,8 g/l) titrovať do pH=6,5 s 5 N NaOH
PGM	8,5	0,1 M Trizma báza (12,1 g/l) titrovať do pH=8,5 s HCl
MDH	9,1	0,1 M Trizma báza (12,1 g/l) titrovať do pH=9,1 s HCl

MOŽNOSTI DETEKCE SOMATICKÝCH HYBRIDŮ BRAMBORU POSSIBILITIES IN POTATO SOMATIC HYBRIDS DETECTION

Vladimíra SEDLÁKOVÁ – Petr SEDLÁK – Pavel VEJL – Pavla SUCHÁNKOVÁ

Since 2007, different experiments with potato and related species to potato protoplast culture have been accomplished at Dept of Genetics and Breeding FAFNR CULS Prague. In connection, there were obtained different plants as results of direct cell regeneration and protoplast fusion experiments with the aim to create new genetics resources suitable for the potato late blight resistance breeding. The majority of regenerated plants resulted as somatic hybrids of potato doublehaploid clone DH165 and *Solanum bulbocastanum* clone 66 obtained from Gene Bank of Potato Research Institute in Havlíčkův Brod (Czech). Different methods for reliable and time and cost non-consummating detection of somatic hybrids were verified. The set of compared methods obtained morphological evaluation of plant by an official UPOV classifier, different cytological techniques as the flow-cytometry and further simpler measurement of stomata length or counting of a chloroplasts number in stomatal cells. Finally, all results were verified by molecular analyse of total DNA by RAPD and by analyse of some loci sequences of chloroplast DNA. According to all used methods we can declare we have 22 different somatic hybrids with higher level of resistance to late blight in compare to used potato doublehaploid used to cell fusion experiments.

Key words: *Solanum*, somatic hybrids detection techniques, RAPD, stomatal chloroplasts number.

Úvod

Fúze protoplastů vedoucí k somatické hybridizaci a následná *in vitro* regenerace rostlin umožňují přenos kompletních genomů z jedné rostliny do rostliny jiné bez ohledu na mezidruhovou bariéru nekřížitelnosti (Cheng *et al.*, 1995). V rámci tohoto příspěvku byla metoda somatické hybridizace využita pro tvorbu somatických hybridů bramboru s cílem získání odolnosti k plísní bramboru z genových zdrojů rodu *Solanum*. Somatické hybridy je možné detekovat z hlediska morfologického, kde se porovnávají morfologické znaky těchto jedinců s rodičovskými komponentami. Vzhledem k tomu, že při somatické hybridizaci dochází i ke zvyšování stupně ploidie, lze hodnotit takto vzniklé jedince metodami detekce polyploidů. K nepřímým metodám detekce polyploidů patří například zjišťování počtu chloroplastů v uzavíracích párových buňkách průduchů, velikosti průduchů, měření velikosti pylových zrn nebo zjišťování počtu pórů na pylových zrnech. Všechny tyto metody jsou pouze orientační, a proto se používá hlavně cytologická analýza, která je rozhodujícím a definitivním kritériem. Cytologické vyšetření se provádí na kořenových špičkách nebo na mladých listcích rostlin (Zadina *et al.*, 1976). Při detekci somatických hybridů je důležité stanovit kromě počtu chromozómů i složení genomu. K těmto účelům se v současné době používá metoda průtokové cytometrie (angl. Flow cytometry), kde je navíc možné detekovat, zda se jedná o genotyp vzniklý homofúzí nebo heterofúzí a kolik buněk od každé rodičovské komponenty se na vzniku tohoto genotypu podílelo (Doležel *et al.*, 2007).

V současné době se nabízí celá řada molekulárně genetických metod umožňujících studium rostlinné DNA. Jednou z možností studia polymorfismu celkové genomické DNA je metoda RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), která se jeví jako cenově efektivní diagnostická metoda ve šlechtění rostlin (Masuelli *et al.*, 1995). Využití krátkých libovolných primerů pro náhodnou amplifikaci při studiu polymorfismů DNA poprvé publikovali Williams *et al.* (1990). Szczerbakowa *et al.* (2005) využili tuto metodu pro charakterizaci vnitrodruhových a mezidruhových somatických hybridů bramboru.

Další možností genetické analýzy aplikované pro studium variability rostlin je využití nekódujících oblastí chloroplastové DNA (cpDNA) a mitochondriální - mtDNA - (Duminil *et al.*, 2002; Taberlet *et al.*, 1991).

Materiál a metody

Rostlinný materiál

Genotypy rodu *Solanum*, které byly použity při tvorbě a hodnocení somatických hybridů, byly získány z genové banky při Výzkumném ústavu bramborářském v Havlíčkově Brodě s.r.o. Konkrétně se jednalo o tři genotypy druhu *Solanum bulbocastanum* Dun. (PI243510) – S. blb 17, 60 a 66, deklarovaných jako donory genu rezistence *Rpi-blb1* vůči *Phytophthora infestans*, dále jeden genotyp *S. verrucosum* Schlecht. (PI161173) – S. veru 299, jeden genotyp *S. tuberosum* ssp. *tuberosum* L. – R10 a čtyři dihaploidy *S. tuberosum* ssp. *tuberosum* L. – DH 165, 322, 387 a 388. Protoplasty byly vyzolovány a fúzovány v elektrickém poli modifikovanou metodou dle Cheng *et al.* (1995) a Carlberg *et al.* (1987). Bylo získáno celkem 24 potenciálních somatických hybridů, kde 22 vzniklo z kombinace S. blb 66 x DH 165, jeden ze S. blb 60 x DH 388 a jeden z S. veru 299 x DH 322.

Adresy autorů:

Vladimíra Sedláková¹, Petr Sedlák¹, Pavel Vejl¹, Pavla Suchánková²

¹ Česká zemědělská univerzita v Praze, Fakulta agrobiologie potravinových a přírodních zdrojů, Kamýčká 129, 165 21 Praha 6 – Suchbát. E-mail: sedlakova@af.czu.cz

² Ústav experimentální botaniky AV ČR, v.v.i. Sokolovská 76/6, 779 00 Olomouc-Klášteří Hradisko

Detekce somatických hybridů

Všechny genotypy získané *in vitro* regenerací protoplastových kultur a jejich rodiče byly převedeny záhy do skleníku, aby bylo možno provést komplexní hodnocení. Toto hodnocení zahrnovalo jednak morfologický popis, dále metody nepřímé detekce (odhadu) stupně ploidie rostlin pomocí níže uvedených cytologických měření a dále dvěma nezávislými metodami molekulární analýzy DNA.

Jako exaktní důkaz zvýšeného počtu chromozómů regenerovaných rostlin ve srovnání s výchozími partnerskými genotypy byla využita analýza velikosti jader průtokovou cytometrií ve spolupráci s ÚEB AV v Olomouci. Tato metoda byla doplněna nepřímým hodnocením stupně ploidie analýzou velikosti průduchových buněk a počtu chloroplastů v obou svěřacích buňkách průduchu. Byla odebrána část spodní pokožky ze středové části listů prvních čtyř listových pater rostliny a obarvena 0,1 % AgNO₃. V rámci této analýzy byly vzájemně porovnány genotypy S. blb 17 (2n), DH 387 (2n), S. tub R10 (4n) a somatický hybrid REG 34 F (4n). Výsledky byly statisticky zpracovány v programu Statistica 09.

Jako důkaz hybridnosti genotypu byly využity dvě nezávislé metody molekulární analýzy DNA, které měly doložit jak hybridnost v oblasti jaderné DNA tak i DNA cytoplazmatické. Hodnocení hybridnosti jaderné DNA bylo provedeno metodou RAPD. Pro analýzu bylo použito celkem 7 RAPD primerů OPN 8, 11, 13, 14, 15, 20 a OPH 20. 12,5 µl PCR reakční směsi obsahovalo 1x reakční pufr (1 mM Tris HCl – pH 8,8, 5 mM KCl, 0,008 % Nonidet P40), MgCl₂ o koncentraci 2,5 mM, dNTP o koncentraci 0,3 mM, 15 ng primeru, 0,5 jednotky *Taq* polymerázy (Fermentas, Litva) a 10 ng DNA. Teplotní a časový profil reakce byl následující: 94°C po dobu 180 s při první denaturaci, následované 40 PCR cykly (94°C 20 s denaturace, 36,5°C 45 s annealing, 72°C 105 s elongace) a 72°C po dobu 360 s pro závěrečnou extenzi. Pro analýzu chloroplastové DNA byl použit univerzální pár primerů, který ohraničuje oblast intergenového mezerníku chloroplastové DNA trnL/trnF o velikosti 418bp (Taberlet *et al.*, 1991). 25 µl reakční směsi obsahovalo 1x výše citovaný reakční pufr, 2,5 mM MgCl₂, 0,3 mM dNTP, 30 ng každého primeru, 1 jednotku *Taq* polymerázy (Fermentas, Litva) a 20 ng DNA. Teplotní a časový profil PCR reakce byl následující: 180 s při teplotě 94°C pro první denaturaci následovanou 30 PCR cykly (40 s při 94°C pro denaturaci, 30 s při 67°C annealing, 60 s při 72°C pro extenzi) a 360 s při teplotě 72°C pro finální extenzi. Pro vyhodnocení byl tento produkt osekvenován u genotypů S. blb 66, DH 165 a jejich potenciálních somatických hybridů REG 30 F, 39 F, 34 F a 35 F.

Hodnocení somatických hybridů na odolnost k *Phytophthora infestans*

Pro fenotypové zhodnocení odolnosti genotypů k *P. infestans* byl použit infekční test metodou listových terčů (Zadina *et Jermoljev*, 1976). K testu byly použity listy o velikosti přibližně 30 x 15 mm. Tři listy byly na spodní straně listů inokulovány suspenzí sporangii izolátu *Phytophthora infestans* s komplexní virulencí k majorgenům rezistence odvozeným ze *Solanum demissum* (R1, R2, R3, R4, R6, R7, R8, R9, R10, R11). Koncentrace této suspenze byla 20 000 sporangií na 1 ml roztoku. Izolát pocházel z lokality Valečov (Česká republika) a byl získán ve spolupráci s Katedrou ochrany rostlin (ČZU v Praze). Čtvrtý list byl ponechán jako negativní kontrola. Lístky byly po jednom dni otočeny a po čtyřech dnech byly hodnoceny projevy odolnosti či náchylnosti genotypů.

Výsledky a diskuze

Většina rostlin potenciálně vzniklých somatickou hybridizací vykazovala ve skleníku viditelně intenzivnější růst, vývoj a vzrůst než původní rodičovské genotypy a mnoho morfologických znaků přechodného charakteru (Obr. 1). Příkladem jsou zejména listy, kdy hybridní rostliny obsahují pouze 2 jařma párových lístků a jeden koncový lístek, zatímco *S. bulbocastanum* má listy jednoduché vejčité a *S. tuberosum* DH165 složený obvykle z 5 párů jařmových lístků. Důležitým prvkem je také schopnost většiny získaných regenerantů tvořit květy.

Cytometrická vyšetření rostlin morfologicky přechodného typu ukazují na zvýšený počet chromozómů oproti původním diploidním jedincům použitým k fúzím protoplastů. Průtoková cytometrie odhalila u některých potenciálních somatických hybridů více jak 1,5 násobek obsahu jaderné hmoty (zřejmě se jedná o aneuploidy), většina hybridů však vykazovala přibližně dvojnásobný obsah oproti původním diploidům. Ačkoliv se jedná o metodu jednoduchou a nedestruktivní, vyžaduje specifické a poměrně náročné vybavení, což je z pohledu praktického šlechtění mírně komplikující moment. Naproti tomu hodnocení vlastností průduchů se ukázalo být jednoduchou a hlavně minimálně nákladnou metodou použitelnou jako důkaz změny stavu karyotypu. Původní diploidy s hodnotou karyotypu 2n=2x=24 vykazovaly průměrnou délku průduchových buněk 24,01µm (s=3,4µm), kdežto tetraploidy (2n=4x=48) vykazovaly délku 34,29 µm (s=3,87µm). Obdobná situace nastala i v případě počtu chloroplastů ve svěřacích buňkách průduchů, kdy diploidy obsahovaly v průduchu v průměru 13,1 chloroplastů (s=1,87 ks) zatímco tetraploidy průměrně 21,9 chloroplastů (s=3,37 ks). Číselné hodnoty o počtu chloroplastů odpovídají informacím podle Zadina *et Jermoljev* (1976). Analýza rozptylu prokázala, že rozdíly mezi diploidy a tetraploidy jsou statisticky velmi

Adresy autorů:

Vladimíra Sedláková¹, Petr Sedlák¹, Pavel Vejtl¹, Pavla Suchánková²

¹ Česká zemědělská univerzita v Praze, Fakulta agrobiologie potravinových a přírodních zdrojů, Kamýcká 129, 165 21 Praha 6 – Suchbátka. E-mail:

sedlakova@af.czu.cz

² Ústav experimentální botaniky AV ČR, v.v.i. Sokolovská 76/6, 779 00 Olomouc-Klášteřínský Hradisko

významné ($p \ll 0.001$). Výsledky dokumentuje graf na obrázku 2. Z metodického hlediska je důležité zjištění, že stomata jsou z hlediska délky a obsahu chloroplastů nejméně variabilní ve třetím listovém paře. Z hlediska molekulární analýzy DNA potenciálních somatických hybridů a jejich rodičovských komponent, bylo v případě RAPD primerů OPN 8, 11, 13, 14, 15, 20 a OPH 20 prokázáno, že se jedná o somatické hybridy v případě 22 z 24 genotypů (Obr. 3). U genotypu REG 52 F, který pocházel z kombinace S. blb 66 x DH 165, bylo RAPD analýzou zjištěno, že k fúzi nedošlo a tento regenerant je z hlediska RAPD produktů totožný s DH 165. Stejný výsledek vykazoval genotyp REG 24 F pocházející z kombinace S. veru 299 x DH 322. Rovněž tento regenerant byl genotypově totožný s DH 322. Tento fakt potvrdily mimo jiné testy odolnosti k *P. infestans*. Zde je možné dodat, že ačkoliv je aplikace metody RAPD často zpochybňována, je to v tuto chvíli jediná plně vyhovující metoda pro rychlou a spolehlivou detekci somatických hybridů. Jednak je velmi rychlá a nedestructivní, v zásadě však i relativně levná a pro účely detekce somatických hybridů dostatečně opakovatelná a citlivá. Popsané primery lze proto doporučit pro detekci somatických hybridů bramboru univerzálně.

Sekvenční analýzou produktu markeru trnL/trnF u rodičovských komponent S. blb 66 a DH 165 a jejich čtyř potenciálních somatických hybridů bylo prokázáno, že zdědily tuto část chloroplastové DNA pouze po rodiči DH 165. Pokud by došlo k fúzi cytoplazem obou komponent, měly by vzniklé genotypy standardně obsahovat oba typy chloroplastové DNA v rámci analyzovaného lokusu. Tento výsledek by na první pohled bylo možno interpretovat dvěma způsoby, buď k fúzi cytoplazmy vůbec nedošlo, nebo byly chloroplasty S. blb 66 v průběhu regenerace protoplastů v cytoplazmě eliminovány. Výsledky metody RAPD a průtokové cytometrie prokazují, že u těchto somatických hybridů došlo k fúzi pravděpodobně celých jader. Proto je nepravděpodobné, aby společně s jádrem S. blb 66 nefúzovala alespoň malá část cytoplazmy. Tuto možnost prakticky vylučují i přímá pozorování průběhu fúze, kdy dochází ke slévání obsahu celých buněk. Proto se spíše přikláníme k teorii, která předpokládá, že někdy během vývoje hybridního kalusu došlo k eliminaci protoplastů pocházejících ze *S. bulbocastanum*.

V tomto příspěvku poslední, a ze šlechtitelského hlediska velmi důležité hodnocení somatických hybridů týkající se odolnosti k *Phytophthora infestans* přineslo do jisté míry pozitivní výsledky, jelikož jak v laboratorním tak polním pokusu rostliny vykázaly poměrně značnou míru odolnosti. Zatímco neopakované, tedy jednoleté pokusy v oblasti Prahy informují o vysoké polní odolnosti, kdy prakticky po celou dobu vegetace nebyly zaznamenány symptomy choroby na listech ani stoncích, v laboratorním pokusu většina somatických hybridů vykazuje odolnost střední až vysokou. Pozitivní je zejména fakt, že pokud dojde k rozvoji nekrózy na listu, patogen je schopen sporulace pouze při extrémní vlhkosti prostředí. Navíc, sporangiofory vytváří pouze sporadicky a jen v oblasti nekrózy a nikoliv v oblasti pletiva nekrózy ohraničujícího, jako je tomu u listů rostlin extrémně náchylných, kam patří i použité dihaploidy *S. tuberosum* DH 165 a DH 388. Ačkoliv tedy projev odolnosti nebyl tak silný jako v případě *S. bulbocastanum* 66, je evidentní, že genetické interakce v hybridním genotypu udržely odolnost na relativně vysoké úrovni, která sice nevede k úplnému potlačení patogena, ale významně omezuje jeho šíření v rostlině i v porostu.

Závěr

Na základě shora uvedených výsledků lze vyvodit následující závěry. Úspěšně byl ověřen soubor celé řady metod vhodných k detekci somatických hybridů bramboru. Na základě každé jednotlivé metody, kromě analýzy plastidové DNA, bylo možno prakticky jednoznačně identifikovat somatické hybridy v souboru regenerantů. Výsledky korespondovaly s morfologickými vlastnostmi rostlin a odolností k *Phytophthora infestans*. V obsahu plazmatické genetické výbavy somatických hybridů, ač je při fúzi založena podvojně, se podařilo identifikovat pouze složku jednoho z rodičů, vždy se jednalo o plazmotyp bramboru. Pro další určení šlechtitelské hodnoty somatických hybridů budou mít zajisté význam cytologické testy karyotypu a studium fyziologie opylení a oplození s cílem získání filiálních generací po křížení s kulturními odrůdami bramboru.

Poděkování. Výsledky byly získány za podpory výzkumného záměru MSM 6046070901

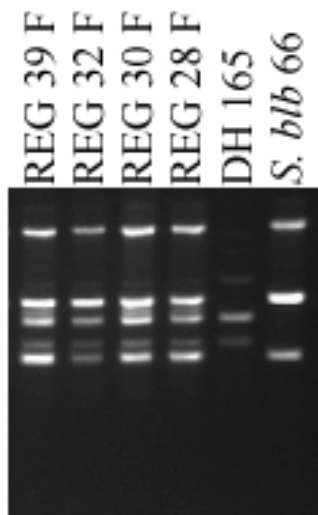
Literatura

- DOLEŽEL, J. - GREILHUBER, J. - SUDA, J. (2007): Flow Cytometry with Plant Cells. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2007, 454 p.
- DUMINIL, J. - PEMONGE, M. H. - PETTIT, 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.
- CHENG, J. - SAUNDERS, J. A. (1995): Protoplast Electrofusion and Regeneration in Potato. In: Methods in Molecular Biology, 55. In: Plant Cell Electroporation and Electrofusion Protocols, 1995, p. 181 – 188.

- 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: Theoretical and Applied Genetics, 91, 1995, p. 401 – 408.
- SZCZERBAKOWA, A. - BOLTOWICZ, D. - LEBECKA, R. - RADOMSKI, P. - WIELGAT, B. (2005): Characteristics of the interspecific somatic hybrids *Solanum pinnatisectum* (+) *S. tuberosum* H-8105. In: Acta Physiologiae Plantarum, 27 (3A), 2005, p. 265-273.
- 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, 17, 1991, p. 1105 - 1109.
- WILLIAMS, J. G. K. - KUBELIK, A. R. - LIVAK, K. J. - RAFALSKI, J. A. - TINGEY, S. V. (1990): DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. In: Nucleic Acids Research, 18, 1990, p. 6531-6535.
- ZADINA, J. - JERMOLJEV, E. (1976): Šlechtění bramboru. Academia, Praha, 1976, s. 359.

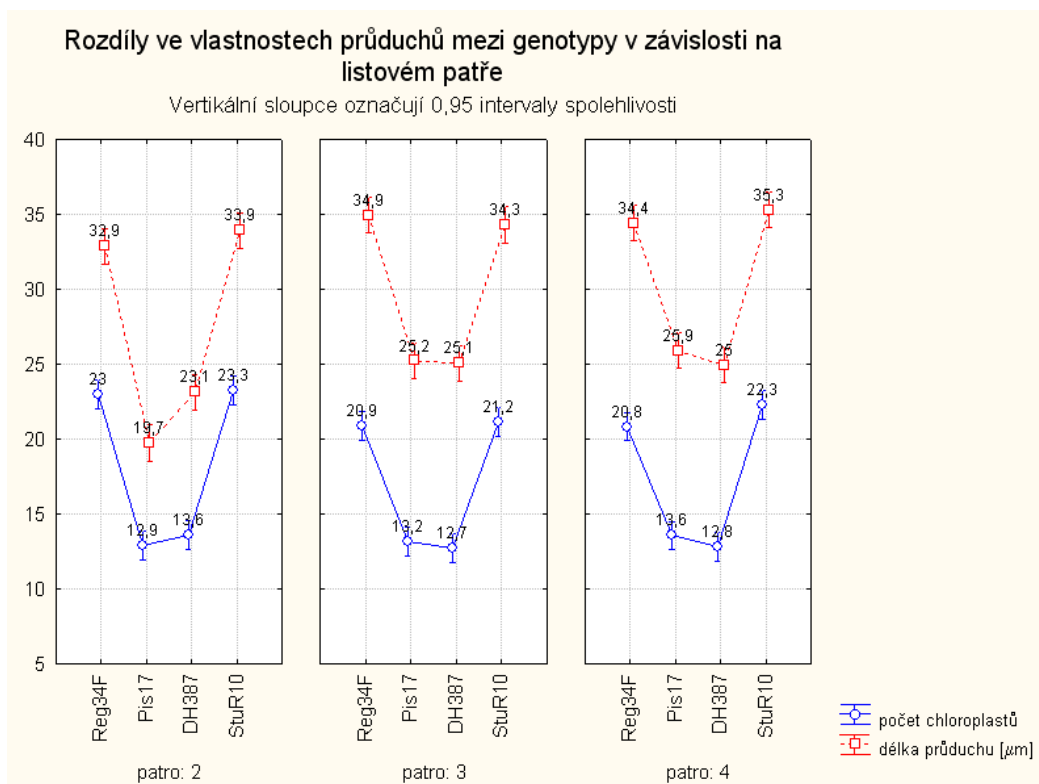


Obr. 1. Dihaploid *S. tuberosum* ssp. *tuberosum* 165 (vlevo), *S. bulbocastanum* 66 (vpravo) a jejich somatický hybrid (rostliny po čtyřech týdnech kultivace *ex vitro* ve skleníkovém pokusu)



S. blb – *Solanum bulbocastanum*, DH – dihaploid *S. tuberosum* ssp. *tuberosum*, REG – jedinec vzniklý somatickou hybridizací *S. blb* 66 a DH 165

Obr. 3: RAPD analýza PCR produktů primeru OPN 11 u somatických hybridů a jejich rodičovských komponent



Obr. 2: Výstup analýzy rozptylu dvojného třídění dokumentující rozdíly mezi měřenými hodnotami stomatárních buněk rostlin s různým počtem chromozomů.

Adresy autorů:Vladimíra Sedláková¹, Petr Sedlák¹, Pavel Vejř¹, Pavla Suchánková²¹ Česká zemědělská univerzita v Praze, Fakulta agrobiologie potravinových a přírodních zdrojů, Kamýcká 129, 165 21 Praha 6 – Suchbát. E-mail: sedlakova@af.czu.cz² Ústav experimentální botaniky AV ČR, v.v.i. Sokolovská 76/6, 779 00 Olomouc-Klášteří Hradisko

PRODUKCIA BIOETANOLU Z ODRÔD PŠENICE S ROZDIELNYM PODIELOM AMYLÓZY V ŠKROBE BIOETHANOL PRODUCTION FROM WHEAT CULTIVARS WITH DIFFERENT AMYLOSE RATIO IN STARCH

Marcela BLAŽKOVÁ – Viera HORVÁTHOVÁ – Daniela MIKULÍKOVÁ

Currently, there are known parameters which directly affect the course of starch hydrolysis and fuel ethanol production. These include especially high starch content (65% of dry matter), low amylose ratio and high activity of endogenous α -amylase. The aim of the study was to carry out hydrolysis and fermentation of wheats with standard amylose content (varieties Pavlina, Veldava a Venistar) and with lower amylose content (varieties Baranjka and Loreto). All experiments were performed with wheat groats suspensions containing 10% of starch. It was found out, that varieties with lower amylose content are able to achieve higher cleavage rate of starch, higher dextrose equivalent value and also higher ethanol yield in conditions of separated hydrolysis and fermentation and simultaneous saccharification and fermentation. Key words: ase, bioethanol, fermentation, hydrolysis, starch, winter wheat

Úvod

Súčasný svet čelí energetickej kríze. Zmenšujú sa svetové zásoby ropy, zhoršuje sa životné prostredie, v krajinách, ktoré patria k svetovým lídrom v ťažbe ropy je politická nestabilita. To je len zopár dôvodov, pre ktoré spoločnosť uvažuje nad využívaním alternatívnych palív.

V minulosti boli fosílna palivá lacné, jednoducho dostupné a samozrejme preferované ako primárny globálny zdroj energie. Avšak ropná kríza v roku 1970 značne zmenila ceny benzínu a nafty. V rozmedzí rokov 1978 – 2001 sa cena ropy zvýšila o 69% z 13\$ za barel (159 l) na 22\$ za barel. V nasledujúcich piatich rokoch sa zvýšila o 150% z 22\$ na 55\$ za barel ropy. American Institute of Petroleum odhadol, že zásoby ropy budú vyčerpané niekedy v 21. storočí s výrazným negatívnym dopadom samotnej ťažby uhlia a ropy na životné prostredie (Otero a kol., 2007; Glazer a Nikaido, 1995).

V cestnej doprave sa ako perspektívna náhrada za konvenčné uhl'ovodíkové palivá presadzujú kvapalné biopalivá tzv. alkoholové palivá. Etanol ako biopalivo môže byť používané vo viacerých formách, napríklad ako bezvodý etanol (100% - ný etanol), etanol obsahujúci vodu (95% etanolu a 5% vody), bezvodý etanol spolu s benzínom (10-20% etanolu v benzíne).

Na produkciu bioetanolu sú vhodné suroviny s vysokým obsahom škrobu, celulózy alebo hemicelulózy, ktoré možno hydrolyzovať na skvasiteľné sacharidy. Pri nadprodukcii obilnín sú práve tieto vhodným substrátom na výrobu palivového etanolu. Za limitnú hranicu rentability sa považuje 65% škrobu v sušine zrna. Z hľadiska efektívnej rastlinnej produkcie v SR je pre využitie na energetické účely perspektívnym zdrojom škrob zo semien pšenice a tritikale. Možno ich úspešne pestovať aj v marginálnych oblastiach.

Problematika kinetiky hydrolyzy škrobu vo vzťahu k podielu amylozy a amylopektínu je v ostatnom čase intenzívne študovaná. Je známe, že hĺbka hydrolyzy škrobu a hodnota dextrózového ekvivalentu (DE) sa zvyšuje v poradí: 100 % amyloza < vysoký obsah amylozy < obsah amylozy bežný v natívnych škrobových substrátoch < 0 % amyloza (= 100 % amylopektín = waxy škrob). Waxy (voskové) škroby ľahko podliehajú mazovateniu a hydrolyze, preto majú vysokú rýchlosť konverzie pri produkcii etanolu (Wu a kol., 2007). Skutočnosť, že škroby bez amylozy sú vhodnejšie pre hydrolyzu, potvrdili aj iní autori (Barredo a kol., 2001; Anker-Nilssen a kol., 2006). V zhode s tým sa zistilo, že proces hydrolyzy prebieha rýchlejšie v malých škrobových granulách typu B (Stevnebo a kol., 2006), ktoré majú aj nižší obsah amylozy.

Predpokladáme, že pre výrobu bioetanolu má veľký význam molekulárne šľachtenie (MAS) pšenice za účelom získania línie s vysokým obsahom škrobu bez amylozy. Možno to dosiahnuť zablokovaním enzýmovej aktivity GBSSI (na granuly viazaná syntetáza škrobu), ktorá je v pšenici regulovaná *WAXY* génmi: *Wx-A₁* (7AS chromozóm), *Wx-B₁* (4AL) a *Wx-D₁* (7DS). Zabudovaním troch nulových *waxy* alel sa podiel amylozy v škrebe zníži takmer na nulovú hodnotu. V praxi bežne používané slovenské a české odrody majú približne rovnaký podiel amylozy v škrebe (21-27%). Existujú však odrody s vysokým obsahom škrobu a s vysokou aktivitou α -AMS. Zabudovaním troch nulových *waxy* alel do ich genómu možno cielene získať línie bez amylozy, ktoré budú mať všetky predpoklady pre účinnú hydrolyzu a pre produkciu etanolu. V tejto súvislosti sa perspektívnymi ukazujú odrody Pavlina (vyznačuje sa vysokým obsahom škrobu) a Veldava (má vysokú autoamylolytickú aktivitu).

Materiál a metódy

Ako vstupný materiál boli použité nepotravinárske odrody pšenice Pavlina, Veldava, Venistar (odrody so štandardným podielom amylozy v škrebe) a odrody Baranjka a Loreto (odrody so zníženým podielom amylozy v škrebe). Všetky odrody sa použili vo forme šrotov, z ktorých boli pripravené suspenzie s 10%-ným obsahom škrobu (w/v). Na hydrolyzu boli použité komerčné enzýmové prípravky Termamyl 120L (termostabilná α -amyláza, E.C. 3.2.1.1), Promozyme D2 (pululanáza, E.C. 3.2.1.41) a AMG 300L

(glukoamyláza, 3.2.1.3) od firmy Novozymes (DK), fermentácia sa uskutočnila použitím kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* CCY-11-3. Na produkciu etanolu sa použila metóda oddelenej hydrolyzy a fermentácie a tiež metóda simultánneho scukrovania a fermentácie.

Vo vzorkách pšeničného šrotu bola stanovená sušina (sušením do konštantnej hmotnosti pri teplote 105°C), obsah škrobu (metódou podľa Ewersa) a amylózy (spektrofotometricky meraním absorbancie jód-amylozového komplexu pri vlnovej dĺžke 590 nm). Proces hydrolyzy bol vyhodnocovaný stanovením redukujúcich sacharidov (Miller, 1959), glukózy (použitím setu BIOLA TEST® GLUKOSA GOD 1500) a počítaním dextrózového ekvivalentu (DE). Proces fermentácie sa vyhodnotil pyknometrickým stanovením etanolu vo vyfermentovanom médiu (Davídek a kol., 1981) a vypočítaním stupňa konverzie glukózy na etanol.

Výsledky a diskusia

1. Charakteristika substrátov

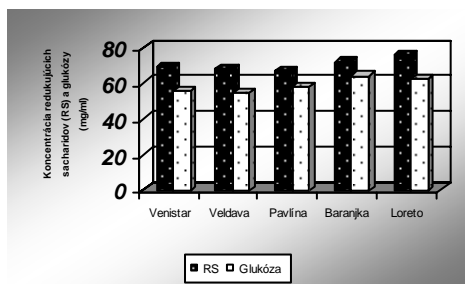
V experimentálnej práci sme pracovali s piatimi odrodami pšenice (vo forme zošrotovaného zrna), konkrétne s dvoma nepotravinárskymi odrodami (Pavlna, Veldava a Venistar), ktoré majú štandardný obsah amylózy a dvoma odrodami so zníženým obsahom amylózy (Baranjka a Loreto). Odrody Pavlna, Veldava a Venistar nemajú žiadnu nulovú alelu *WAXY* génov *Wx-A1*, *Wx-B1* a *Wx-D1*. Talianska odroda Loreto a chorvátska Baranjka majú nulovú alelu *Wx-B1* génu. Ak sa v genóme pšenice nachádzajú iba funkčné *waxy* alely, aktivita GBSSI (na granuly viazaná škrobová syntetáza) je normálna a vzniká normálne množstvo amylózy. Prítomnosť mutovanej alely však spôsobí výrazné zníženie aktivity GBSSI, preto vzniká menej amylózy. V testovaných vzorkách sa pred ich fermentačným spracovaním stanovil obsah sušiny, škrobu a amylózy. Výsledky uvádzané v nasledujúcej tabuľke (Tab.1) sú priemerné hodnoty z troch stanovení ± smerodajná odchýlka

Tabuľka 1: Obsah sušiny, škrobu a amylózy v pšeničných odrodách

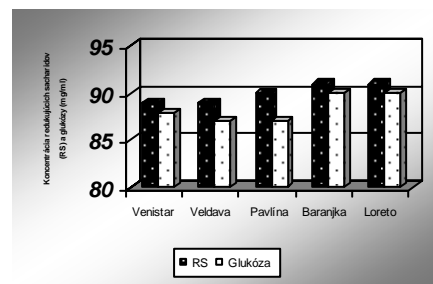
Odroda	Sušina [%]	Obsah škrobu v 100g sušiny [%]	Amylóza v 100g sušiny [%]
Pavlna	92 ± 0,3	65 ± 0,8	19 ± 0,7
Veldava	90 ± 0,4	64 ± 0,1	19 ± 0,5
Venistar	92 ± 0,3	59 ± 0,3	22 ± 0,6
Baranjka	85 ± 0,2	67 ± 1,4	12 ± 0,4
Loreto	87 ± 0,6	63 ± 0,6	13 ± 0,8

Z výsledkov uvedených v Tabuľke 1 vyplýva, že z testovaných odrôd majú najvyšší obsah škrobu odrody Baranjka (67%) a Pavlna (65%). Najnižší obsah škrobu sme stanovili v zrne odrody Venistar (59%). Z analýzy podielu amylózy v šrote pšeníc sme zistili, že v nepotravinárskych odrodách bol jej obsah priemerne 20%, v odrodách so zníženým obsahom amylózy priemerne 12,5%. Podiel amylózy a amylopektínu v škrobe je podmienený geneticky. Existujú ojedinelé informácie o zastúpení podielu amylózy medzi geograficky rozdielnymi lokalitami (napr. severná a južná Európa). Odrody pšenice severnej Európy majú vyšší podiel amylózy, kým odrody južnej Európy majú podiel amylózy nižší (Rodriguez-Quijano a kol., 1998; Marcoz-Ragot a kol., 2000; Nieto-Taladriz a kol., 2000).

Keďže škrob nie je kvasinkami priamo využiteľný na etanol, je potrebné pred fermentáciou uskutočniť jeho hydrolyzu. V našej práci sme v prvej fáze pripravili škrobové hydrolyzáty dvojstupňovou enzýmovou hydrolyzou pomocou komerčných enzýmových prípravkov. Počas hydrolyzy sme odoberali vzorky na stanovenie redukujúcich sacharidov a glukózy. Fázu stekutenia sme vyhodnocovali aj kvalitatívnou skúškou s jódovým roztokom. Ak došlo k nedostatočnému stekuteniu, suspenziu sme opätovne tlakovo stekutovali. Na nasledujúcich obrázkoch (Obr.1 a 2) sú výsledky získané z hydrolyzy suspenzií testovaných vzoriek, konkrétne z 24-hodinového scukrovania, ktoré nasledovalo po tlakovom stekutení.



Obr. 1: Koncentrácia redukujúcich sacharidov (RS) a glukózy po 8 hodinách scukrenia stekutených suspenzií s koncentráciou škrobu 10%



Obr. 2: Koncentrácia redukujúcich sacharidov (RS) a glukózy po 24 hodinách scukrenia stekutených suspenzií s koncentráciou škrobu 10%

Z prezentovaných výsledkov je zrejmé, že enzýmová hydrolyza prebiehala rýchlejšie v prípade vzoriek so zníženým obsahom amylózy. Koncentrácia redukujúcich sacharidov aj glukózy po ôsmich hodinách scukrenia bola u vzoriek so zníženým obsahom amylózy vyššia ako u vzoriek s jej štandardným obsahom. Z hodnôt dextrózového ekvivalentu dosiahnutých po 24 hodinách scukrovania konštatujeme, že u odrôd Pavlina, Veldava a Venistar sme zaznamenali DE priemerne 87%, u odrôd Baranjka a Loreto sme na konci procesu zaznamenali DE priemerne 90%.

2. Fermentácia pšeničných hydrolyzátov

Po hydrolyze pšeničných suspenzií sme v experimentálnej práci pokračovali fermentáciou hydrolyzátov. Fermentácia sa uskutočnila vo fľašiach s kvasným uzáverom kvasinkami *Saccharomyces cerevisiae* CCY-11-3 pri teplote 30°C počas 72h. Dosiahnuté výsledky (Tab.2) sú priemerné hodnoty z troch stanovení ± smerodajná odchýlka.

Tabuľka 2: Množstvo etanolu a stupeň konverzie po fermentácii hydrolyzátov pripravených zo suspenzií pšeničných šrotov s obsahom škrobu 10%

Odroda	Množstvo bezvodého etanolu [g/100ml média]	Množstvo bezvodého etanolu [g/g škrobu]	Stupeň konverzie* [%]
Pavlina	2,8 ± 0,1	0,28 ± 0,01	63
Veldava	2,6 ± 0,1	0,26 ± 0,03	56
Venistar	2,4 ± 0,3	0,24 ± 0,03	53
Baranjka	3,3 ± 0,2	0,33 ± 0,02	72
Loreto	3,2 ± 0,2	0,32 ± 0,02	70

* Stupeň konverzie je percentuálna hodnota vzťahovaná na maximálny teoretický výťažok etanolu (z 1g glukózy 0,51g etanolu) (Ballesteros a kol., 2004).

Z uvedených výsledkov vyplýva, že priemerné množstvo etanolu dosiahnuté z nepotravinárskych odrôd bolo nižšie ako z odrôd so zníženým obsahom amylózy. Stupeň konverzie glukózy na etanol u odrôd Pavlina, Veldava a Venistar predstavuje priemerne 58%, u odrôd Baranjka a Loreto 71%.

3. Simultánna sacharifikácia a fermentácia (SSF) pšeničných hydrolyzátov

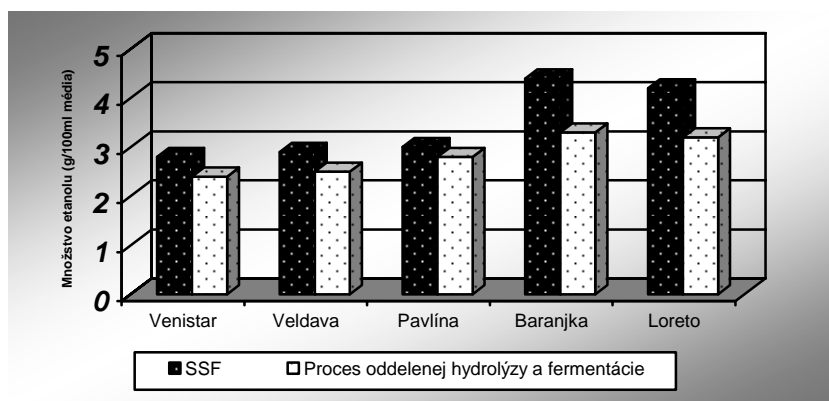
V procese simultánnej sacharifikácie a fermentácie sme pracovali tak, že po stekutení škrobu v pšeničnej suspenzii a krátkom predscukrení sa uskutočnilo scukrovanie a fermentácia simultánnym spôsobom. Koncentrácie redukujúcich sacharidov a glukózy sú uvedené v nasledujúcej tabuľke (Tab.3).

Tabuľka 3: Koncentrácie redukujúcich sacharidov, glukózy a dextrózový ekvivalent po predscukrení pšeničných suspenzií s koncentráciou škrobu 10 % v procese SSF

Odroda	Redukujúce sacharidy		Glukóza	
	c [mg/ml]	mg/g sušiny	c [mg/ml]	DE [%]
Pavlina	16 ± 0,6	174 ± 0,8	12 ± 0,2	11
Veldava	18 ± 0,4	198 ± 0,8	13 ± 0,1	12
Venistar	18 ± 0,7	196 ± 2,2	13 ± 0,3	12
Baranjka	25 ± 0,1	294 ± 0,4	18 ± 0,2	16
Loreto	23 ± 0,3	264 ± 1,7	17 ± 0,3	15

Z dosiahnutých výsledkov prezentovaných v Tab. 3 je zrejmé, že škrob bol pred procesom SSF rozštiepený do rôznej hĺbky. U odrôd Pavlina, Veldava a Venistar bola hodnota DE 11 – 12 %, u odrôd Baranjka a Loreto to bolo 15 – 16 %. Z týchto výsledkov usudzujeme, že pšeničný škrob so zníženým obsahom amylózy je hydrolyzovaný ľahšie.

Proces SSF sa uskutočnil vo fľašiach s kvasným uzáverom pri teplote 30°C 72 hodín. Po jeho skončení sme vo vyfermentovanom médiu pyknometricky stanovili množstvo etanolu. V nasledujúcom grafe porovnávame množstvá etanolu dosiahnuté procesom SSF a procesom oddelenej hydrolyzy a fermentácie (Obr. 3). Výsledky sú priemerné hodnoty z troch stanovení.



Obr. 3: Množstvo etanolu dosiahnuté procesom SSF a oddelenou hydrolyzou a fermentáciou suspenzií pšeničných vzoriek s obsahom škrobu 10%

4. Fermentácia v laboratórnom fermentore

Ďalšie fermentačné experimenty so vzorkou Pavlina sme uskutočnili v 5L laboratórnom fermentore s nepretržitým miešaním. Miešanie v týchto procesoch je významným parametrom, najmä pri práci s vyššími koncentraciami škrobu v počiatkových suspenziách. Tiež je významné aj z dôvodu lepšieho kontaktu kvasiniek so sacharidmi prítomnými v médiu. V nasledujúcej tabuľke (Tab.4) sú uvedené výsledky SSF uskutočnenej v 5l laboratórnom fermentore.

Tabuľka 4: Koncentrácia redukujúcich sacharidov a glukózy po predscukrení suspenzie šrotu odrody Pavlina s 10%-ným obsahom škrobu a množstvo vyprodukovaného etanolu

Odroda	Redukujúce sacharidy		Glukóza		Množstvo bezvodého etanolu [g/100ml média]	Množstvo bezvodého etanolu [g/g škrobu]
	c [mg/ml]	mg/g sušiny	c [mg/ml]	DE [%]		
Pavlina	19 ± 0,5	190 ± 1,2	12 ± 0,2	11	3,6	0,36

Porovnaním výsledkov fermentácie v laboratórnom fermentore a v kvasných fľašiach sme dospeli k záveru, že miešanie počas procesu bolo významným faktorom ovplyvňujúci výsledné množstvo etanolu vo vyfermentovanom médiu. Fermentáciou vzorky odrody Pavlina vo fermentore sme dosiahli vyššie hodnoty vyprodukovaného etanolu, konkrétne toto zvýšenie predstavovalo približne 28%.

Záver

1. Oddelená hydrolyza a fermentácia

- realizovali sme etanolovú fermentáciu hydrolyzátoz pripravených zo suspenzií pšeničných šrotov s 10%-ným obsahom škrobu
- stanovovaním redukujúcich sacharidov a glukózy vznikajúcich počas scukrovania pšeničných suspenzií sme dospeli k záveru, že u odrôd so zníženým obsahom amylozy sme zaznamenali hodnotu DE 80% už po ôsmich hodinách procesu, u ostatných odrôd bol tento čas dlhší
- vyššie množstvo etanolu sme stanovili po fermentácii hydrolyzátoz pripravených z odrôd so zníženým obsahom amylozy (Baranjka, Loreto),

2. Simultánna sacharifikácia a fermentácia

- proces SSF sme realizovali so suspenziami s 10%-ným obsahom škrobu
- najnižšie množstvo ($0,28 \pm 0,02$ g bezvodého etanolu/1g škrobu) etanolu sme stanovili vo vyfermentovanom médiu z odrody Venistar, najvyššie množstvo ($0,44 \pm 0,03$ g bezvodého etanolu/1g škrobu) po SSF odrody Baranjka.

3. Fermentácia v laboratórnom fermentore

- proces sme realizovali s odrodou Pavlina
- porovnaním SSF vo fermentore a v kvasných fľašiach konštatujeme, že vo fermentore sme dosiahli o 28% vyššie množstvo etanolu

Pod'akovanie: Autori ďakujú Ing. E. Rückschlossovi z VŠS Vígľaš-Pstruša za poskytnutie rastlinného materiálu. Výskum bol finančne podporený projektom MŠ SR, projekt APVV LPP No. 0251-07.

Literatúra

- ANKER–NILSSEN, K., FAERGESTAD, E. M., SAHLSTROM, S., UHLEN, A. K.: Interaction between barley cultivars and growth temperature on starch degradation properties measured in vitro. *Animal Feed Science and Technology*, 130, 2006, s. 3–22.
- BALLESTEROS, M., OLIVA, J.M., NNEGRO, M.J., MANZANARES, P., BALLESTEROS, I.: Ethanol from lignocellulosic materials by a simultaneous saccharification and fermentation process (SFS) with *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875. *Process Biochemistry*, 39, 2004, s. 1843–1848.
- BARREDO–MOGUEL, L.H., ROJAS DE GANTE, C., SERNA SALDIVAR, S.O.: Comparisons between a commercial wort and a waxy sorghum wort fermented into lager beer, with emphasis on yeast growth and ethanol production. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 59, 2001, s. 24–27.
- DAVÍDEK, J., HRDLÍČKA, J., KARVÁNEK, M., POKORNÝ, J., SEIFERT, J., VELÍŠEK, J.: Laboratorní příručka analýzy potravin. Alfa, Praha, 1981. 718s.
- GLAZER, A.N., NIKAIIDO, H. : *Microbial Biotechnology: Fundamentals of Applied Microbiology*, Freeman, New York, 1995, 92s.
- MARCOZ–RAGOT, C., GATEAU, I., KOENIG, J., DELAIRE, V., BRANLARD, G.: Allelic variants of granule–bound starch synthase proteins in European bread wheat varieties. *Plant Breeding*, 119, 2000, s. 305–309.
- MILLER, G. L.: Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 3, 1959, s. 426–428.
- NIETO–TALADRIZ, M.T., RODRIGUEZ–QUIJANO, M., CABRILLO, J.M.: Polymorphism of waxy proteins in Spanish durum wheats. *Plant Breeding*, 119, 2000, s. 277–279.
- OTERO, J.M., PANAGIOTOU, G., OLSSON, L.: Fueling industrial Biotechnology growth with bioethanol. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 108, 2007, s. 1–40.
- RODRIGUEZ–QUIJANO, M., NIETO–TALADRIZ, M.T., CARRILLO, J.M.: Polymorphism of waxy proteins in Iberian hexaploid wheats. *Plant Breeding*, 117, 1998, s. 341–344.
- STEVNEBO, A., SAHLSTROM, S., SVIHUS, B.: Starch structure and degree of starch hydrolysis of small and large starch granules from barley varieties with varying amylose content. *Animal Feed Science and Technology*, 130, 2006, s. 23–38.
- WU, X., ZHAO, R., BEAN, S. R., SEIB P.A., McLAREN, J.S., MADL, R.L., TUNISTRA, M., LENZ, M.C., Wang, D.: Factors impacting ethanol production from grain sorghum in the dry–grind process. *Cereal Chemistry*, 84, 2007, s.130–136.

GENETICKÉ MARKERY – NÁSTROJ SELEKCIE NOVÝCH GENOTYPOV GENETIC MARKERS – SELECTION TOOL FOR NEW GENOTYPES

Valéria ŠUDYOVÁ – Svetlana ŠLIKOVÁ – Martina HUDCOVICOVÁ – Lenka KLČOVÁ

MAS – marker assisted selection is method efficient to monitor the transfer of alleles or specific chromosome segments including important agronomic traits into elite cultivars. This method makes genotypic selection possible whereby selection process is more effective. In Slovak Agricultural Research Centre - Research Institute of Plant Production in Piešťany we use genetic markers for control of transfer of valuable genes in these programs: 1. development of winter barley lines resistant to BaYMV/BaMMV, 2. development of spring barley lines resistant to BYDV, 3. development of wheat lines resistant to leaf rust (gene pyramiding) 4. development of wheat lines with null waxy alleles.

Key words: marker assisted selection (MAS), barley, wheat, gene pyramiding, rym genes, Ryd2 gene, Lr genes, waxy alleles

Úvod

Poľnohospodárstvo patrí medzi najcitlivejšie reagujúce odvetvie na klimatické zmeny. Horúce vlny, suchá, choroby a škodcovia poľnohospodárskych plodín pravdepodobne zvýšia výskyt neúrod (Agra Europe, č. 2265, 29. 6. 2007 EP/10). Už dnes je nevyhnutné, aby sa poľnohospodárstvo týmto zmenám prispôbovalo. Toto bude vyžadovať zmeny využívania pôdy, produkčné metódy a zmeny poľnohospodárskej štruktúry. Zaradenie molekulárno-biologických metód do konvenčných postupov tvorby nových biologických materiálov pomáha zefektívniť proces šľachtenia. Efektivita spočíva v jednoznačnej identifikácii znakov v rastlinách, ktoré sú z hospodárskeho hľadiska významné, pri prenose a kombinovaní génov resp. alel a to i takých, ktoré pri klasickom šľachtení nie je možné identifikovať. Molekulárne markery sú molekuly (úseky DNA alebo proteín), ktoré identifikujú prítomnosť určitého génu a ním podmienený znak v sledovanom genotypu (Ovesná a kol. 2002). Na našom pracovisku CVRV-VÚRV Piešťany sú rutinne využívané markery pre tvorbu genotypov jačmeňa sateho f. jarná a pšenice letnej f. ozimnej s génmi rezistencie proti vybraným vírusovým a hubovým chorobám a v programe tvorby genotypov pšenice s waxy alelami ako vhodného substrátu na výrobu palivového etanolu.

MAS pri tvorbe genotypov jačmeňa s génmi rezistencie proti chorobám spôsobených vírusmi

Prenos génov rezistencie označených *rym* účinných proti žltej (barley yellow mosaic virus - *BaYMV*) a miernej mozaike jačmeňa (barley yellow mild virus - *BaMMV*) pri ozimnej forme jačmeňa je známy od 80-tych rokov minulého storočia. Doteraz bolo objavených štrnásť génov s rôznym stupňom rezistencie k žltej mozaike (Hofinger a kol., 2008). Odrody s génmi rezistencie sa šľachtili najmä v Nemecku a Francúzsku, kde sa ozimný jačmeň vzhľadom na priaznivé klimatické podmienky pestuje na veľkých plochách. Vektorom tejto choroby je pôdna huba *Polymyxa graminis* Led., proti ktorej nie je žiadna chemická ochrana možná. Strata na úrode môže dosiahnuť 20-50%. Vírusy prežívajú v kľudovom štádiu v pôde, literárne údaje uvádzajú zamorenie pozemku na 30 a viac rokov. Rezistencia európskych ozimných jačmeňov k tejto chorobe spočíva na recesívnom géne *rym4*. Okrem neho je ďalší gén – *rym11* účinný aj proti kmeňu 2 *BaYMV*. Testovanie novovytvorených genotypov sa robí na testovacom poli v Nemecku a Francúzsku. V prípade, ak nemá šľachtiteľ k dispozícii patogéna alebo možnosť testovať novovytvorený biologický materiál na fytopatologickom poli, je možnosť detegovania prítomnosti, resp. neprítomnosti génov rezistencie v potomstve pomocou molekulárnych markerov.

V ostatných rokoch zaznamenávame zmeny vo vývoji počasia na jeseň, ktorá býva teplotne nadpriemerná, čo priaznivo pôsobí na vývoj vektorov vírusových chorôb ako aj samotných chorôb. Vírus spôsobujúci žltú zakrpatenosť jačmeňa (barley yellow dwarf virus - *BYDV*) patrí k najzávažnejším patogénom ozimných i jarných obilnín. Infikovanie porastov je možné na jeseň, kedy môže byť infikovaných až 95% porastov, pri jarných infekciách je to asi 15% porastov. Teplá dlhotrvajúca jeseň podporuje rozvoj vektorov vírusu- vošiek. Po objavení prvých príznakov sa na diagnostikáciu prítomnosti vírusu používa ELISA – test. Táto choroba sa každoročne objavuje prevažne v regiónoch juhozápadného Slovenska. Príznaky ochorenia sa často zamieňajú s deficitnou výživou, hlavne nedostatkom dusíka. Po oneskorenom definovaní príčin býva spravidla neskoro na chemický zásah proti vektorom a tak genetická rezistencia, resp. tolerancia zabezpečovaná génom *Ryd2* pri ozimnom i jarnom jačmeni môže viesť k zníženiu strát na kvalite i kvantite produkcie.

MAS pri tvorbe genotypov pšenice s génmi rezistencie proti Puccinia recondita

Hľadanie zdrojov rezistencie a následná tvorba nových genotypov pšenice letnej f. ozimnej sa javí najúčinnějšíou cestou ochrany proti tejto chorobe. V hexaploidnej pšenici bolo doteraz pomocou multipatotypového testovania potvrdených viac ako 50 génov rezistencie proti hrdzi pšenicovej (McIntosh a kol. 2003). V súčasnosti je známe, že medzi účinné gény patria hlavne tie, ktoré boli prenesené

z divorastúcich a príbuzných druhov do pšenice. Potvrdzujú to i výsledky z virulenej analýzy vykonanej na Slovensku v rokoch 1995-2004. V pokusoch bola sledovaná virulencia populácie hrdze pšenice na izogénnych líniah Thatcher s génmi rezistencie *Lr1* až *Lr28* a diferenčných odrodách. Gény rezistencie *Lr24* a *Lr28* boli efektívne proti všetkým patotypom do roku 2001. V roku 2001 bola detekovaná 20% a 10% virulencia izolátov na líniah s génmi rezistencie *Lr24* a *Lr28* (Hanzalová a kol., 2008). Uvedené gény boli prenesené z divorastúcich druhov do jarného genotypu hexaploidnej pšenice Thatcher, ktorý nie je vhodný pre pestovateľské využitie. Začlenenie viacerých účinných génov rezistencie do výkonného genotypu pšenice pravdepodobne prispeje k predĺženiu trvania rezistencie odrody.

MAS pri tvorbe genotypov pšenice s nulovými waxy alelami vhodných pre produkciu bioetanolu

V zrnách obilnín sa nachádza škrob v podobe škrobových granúl pozostávajúcich z amylozy a amylopektínu. V biosyntéze škrobu je rozhodujúce zaktivizovanie syntézy amylozy alebo amylopektínu, ktorá ovplyvní ich podiel v škrebe. Variabilita v obsahu amylozy s klesajúcou tendenciou (od 20 do 0%, Petrova a kol., 2007) má podstatný vplyv na technologickú kvalitu škrobu. Enzým GBSSI (granule-bound starch synthase), tiež nazývaný Wx-proteín je kľúčový enzým v syntéze amylozy v škrobových granulách. Wx-proteíny sú kódované génmi s rovnakým označením Wx. Mutácie Wx-génov môžu viesť k redukcii, prípadne strate amylozy. Pomocou molekulárneho šľachtenia vzniká možnosť vytvárať genotypy s produkciou škrobových zŕn obsahujúcich rozdielne zastúpenie amylozy a amylopektínu. Cieľom je získanie genotypov, ktoré budú mať vysoký obsah škrobu bez amylozy ako vhodného substrátu pre etanolovú fermentáciu.

Materiál a metódy

Biologický materiál

Hybridné kombinácie pre prenos markerov génov rezistencie k vírusovým a hubovým chorobám a prenos Wx-alel boli vytvorené klasickou hybridizáciou:

jačmeň siaty f. ozimná: akceptor génu *rym4* a *rym11* odrody Tiffany, Copia, Luxor, Kamil, KM 104, donor génu *rym4* odroda Romanze, génu *rym11* odroda Russia 57

jačmeň siaty f. jarná: akceptor génu *Ryd2* odrody Nitran, Ludan a nšľ. SK 5104, donor Sutter, Shannon a UC 566

pšenica letná f. ozimná:

a) prenos génov rezistencie k hrdzi pšenice: akceptor odrody Hana, Klea, Brea, Astella, Alka, donor génu *Lr19* je odroda Sunnan, génu *Lr24* Thatcher/*Lr24* a génu *Lr35* Thatcher/*Lr35*

b) prenos Wx-alel – akceptor odroda Veldava, donor NX04Y2107 (tvrdá pšenica) a NX03Y2395 (mäkká pšenica)

DNA analýza

Genomická DNA bola izolovaná z listových segmentov pomocou Plant DNAzol (Invitrogen). Na PCR amplifikácie špecifických primerov bol použitý PTC-200 termocykler (MJ-Research) a separácia amplifikovaných produktov bola urobená v agaróze géli.

Pre gén *rym4* pri ozimnej forme jačmeňa bol použitý kodominantný STS marker odvodený z RFLP markera MWG838 (Tuveson a kol., 1998), pre gén *rym11* bol použitý kodominantný SSR marker HVM3 (Bauer a kol., 1997).

Nepriama selekcia genotypov jarného jačmeňa bola urobená dominantným ASPCR markerom Y1p, ktorý je úzko viazaný s génom *Ryd2* (Ford a kol., 1998).

Prítomnosť génov rezistencie *Lr19* a *Lr 24* bola detekovaná dominantnými STS markermi podľa Prinsa a kol. (2001) a Schachermayr a kol. (1995).

Prítomnosť génu *Lr35* v genotypoch pšenice bola detekovaná dominantným SCAR markerom podľa Gold a kol. (1999).

Pomocou molekulárnych markerov sme vyselektovali jedince so zabudovanými nulovými alelami na *waxy* lokusoch. Primery sme použili podľa Nakamura a kol. (2002): AFC/AR2 pre *Wx-A1*, BDFL/BRD pre *Wx-B1*, BDFL/DRSL pre *Wx-D1*. Na separáciu PCR produktov *Wx-A1* sme použili 6 % PAGE farbený striebrom. Produkty amplifikácie *Wx-B1* boli separované v 2 % agarózovom géli farbenom etídiumbromidom. Na oddelenie PCR produktov *Wx-D1* postačoval 0,7 % agarózový géľ farbený etídiumbromidom.

Výsledky a diskusia

Program: MAS pri tvorbe genotypov jačmeňa s génmi rezistencie proti chorobám spôsobených vírusmi

Použitie molekulárne markery pre gény *rym4* a *rym11* inkorporované do ozimnej formy jačmeňa odlišili v F_2 jedince senzitivne a rezistentne homozygotné a jedince heterozygotné. Z experimentov boli vylúčené jedince senzitivne homozygotné a heterozygotné. Overovanie prítomnosti génu rezistencie *rym4* po nepriamej selekcii bolo aj na fytopatologickom poli v Nemecku. Spoľahlivosť selekcie rastlín molekulárnym

markerom v porovnaní s testovaním na fytopatologickom poli bola na 80%. V ďalšom kroku sme pracovali aj na inkorporácii génu *rym11* a pyramídovaní génov *rym4 +rym11* do jedného genotypu. Selekcia rastlín v F₂ generácii molekulárnymi markermi bola separátne pre každý gén. Na našom území ani v Českej republike neboli doteraz detegované tieto choroby, ale je len otázkou času, kedy sa dostanú aj na naše územie, pretože na jar 2008 boli zaznamenané prvé symptómy žltej mozaiky v Poľsku (Jeżewska, 2009, nepublikované) a záznamy sú aj z Mironovského regiónu (Snihur 2008).

Gén *Ryd2* bol detegovaný v roku 1963 vo veľmi skorých odrodách jačmeňa etiópskeho pôvodu. Významná úroveň rezistencie k BYDV sa získava kombináciou major génu *Ryd2* s minor génmi prítomnými v mierne odolných odrodách (Šíp a kol. 1997, OVESNÁ a kol. 2001). Vhodným markerom pre detekciu génu *Ryd2* v jarnom jačmeni sú markery YLM a Ylp. Collins a kol. (1996) po analýze jedincov F₂ lokalizovali gén *Yd2* vo vzdialenosti 0,5 cM od centroméry. V súčasnosti je na detekciu využívaný marker Ylp, ktorý je v tesnejšej väzbe s lokusom *Ryd2*. Programy inkorporácie génov rezistencie sú rozvinuté vo všetkých krajinách zaoberajúcich sa pestovaním nielen jarného jačmeňa, ale aj jačmeňa ozimného typu určeného na produkciu sladu. Výhodou nepriamej selekcie pri géne *Ryd2* je odbúranie náročného chovu vektorov choroby, avšak z pohľadu fytopatologického by bolo potrebné overenie tolerancie po transfere génu rezistencie aj po umelej infekcii. V súčasnosti máme línie z viacerých typov kríženia v generácii BC₃, niektoré s kombinovanou rezistenciou k vírusovej a hubovej chorobe (múčnatka trávová na jačmeni). Využívanie génov rezistencie v šľachtiteľských programoch umožňuje eliminovať používanie insekticídov zabráňujúcich šíreniu vektorov a vylučuje zásah na cieľové skupiny organizmov.

Program: MAS pri tvorbe genotypov pšenice s génmi rezistencie proti Puccinia recondita

Pri inkorporácii génov rezistencie Lr19, Lr24 a Lr35 proti hrdzi pšenicovej bola robená detekcia prítomnosti, resp. neprítomnosti jednotlivých génov pomocou MAS bez prítomnosti fytopatologických testov (Hudcovicová a kol. 2008). Biologický materiál s génom *Lr19* bol odovzdaný na VŠS a taktiež oň prejavili záujem pestovatelia v Nemecku na farmu zameranú na ekologické poľnohospodárstvo. Je veľký predpoklad, že kombináciou viacerých účinných génov do jedného genotypu sa predĺži čas, ktorý potrebuje patogén na prekonanie rezistencie, ak je v genotype zabudovaný iba jeden efektívny gén. V súčasnosti je rozpracovaný biologický materiál s kumulovanými génmi *Lr19+Lr35*. Pri kumulovaných génoch rezistencie v jednom genotype je selekcia molekulárnym markerom jediným spôsobom overenia prítomnosti, resp. neprítomnosti markera majúceho blízku väzbu na uvedené gény rezistencie.

Program: MAS pri tvorbe genotypov pšenice s nulovými waxy alelami vhodných pre produkciu bioetanolu

Rastliny pšenice ozimnej v F₂ generácii boli selektované na prítomnosť nulových alel lokusu Wx-A1, Wx-B1 a Wx-D1. Celkovo bolo analyzovaných 1188 rastlín z dvoch kombinácií kríženia. Na základe PCR analýzy alelovo špecifickými primermi pre alelu lokusu Wx-B1 sa určila možná alelická zostava lokusov Wx-A1 a Wx-D1. Pre kombináciu Veldava x NX04Y2107 sa vytvorilo 8 skupín alelických zostáv, do ktorých boli rastliny po analýze postupne zaraďované. Z 249 rastlín bolo vyselektovaných 29 jedincov s požadovanou alelickou zostavou. Pre ich získanie bolo celkovo potrebných 387 ďalších DNA analýz. Pre kombináciu Veldava x NX03Y2395 sa vytvorili 4 skupiny alelických zostáv s nulovými Wx-alelami. Počiatočná analýza DNA lokusu Wx-B1 bola z 260 rastlín, pre získanie 21 jedincov bolo celkom vykonaných 292 ďalších DNA analýz. Nulové alely pri jednotlivých lokusoch nemajú ten istý vplyv na obsah amyulózy v škrobe. Nulová alela Wx-B1 génu má najvyšší vplyv na redukciu obsahu amyulózy (Nakamura a kol. 2002, Graybosch a kol. 2003). Taktiež rozdielna kombinácia funkčných a nulových alel na Wx-lokusoch ovplyvňuje akumuláciu amyulózy v škrobových zrnách (Yamamori a kol. 1994). Obsah škrobu v zrne jednotlivých druhov obilovín je ovplyvnený ročníkom a lokalitou (Petrova a kol. 2007, Mikulíková a kol. 2008), obsah amyulózy v škrobe je podmienený geneticky (Graybosch 1998). Na základe analýz súboru 26 odrôd pšenice letnej f. ozimnej sa vhodnou odrodou pre molekulárne šľachtenie zamerané na tvorbu genotypov podľa obsahu škrobu a aktivity α -amylázy pre produkciu palivového etanolu javia odrody Pavlína a Veldava.

Záver

Vizuálne hodnotenie napadnutia rastlín môže byť nepresné, pretože symptomatický prejav choroby nie je vždy jednoznačný. V poľnom testovaní, hlavne v skorších generáciách nie je možné odlišiť homozygótne a heterozygótne jedince. Toto umožňujú molekulárno- genetické metódy. Markermi podporená selekcia zároveň znižuje množstvo biologického materiálu postupujúceho do ďalšej selekcie. Tvorba biologického materiálu s génmi rezistencie je smerovaná na jeho odovzdanie užívateľovi – šľachtiteľovi. Novovytvorené genotypy môžu byť genetickým zdrojom pre ďalšie šľachtenie alebo v prípade vhodných agronomických znakov zaradené priamo do selekčného procesu.

Pod'akovanie: Autori ďakujú RNDr. Daniele Mikulíkovej, PhD. za poskytnutie cenného rastlinného materiálu. Práca vznikla za podpory APVV agentúry v rámci projektu: „**SK-CZ-0028-07**“.

Literatúra

- BAUER, E., WEYEN, J., SCHIMAN, A., GRANER, A., ORDON, F.: Molecular mapping of novel resistance genes against Barley Mild Mosaic Virus (BaMMV). In: Theor. Appl. Genet., 95, 1997, s. 1263-1269.
- COLLINS, N. C., PALTRIDGE, N. G., FORD, C. M., SYMONS, R. H.: The *Yd2* gene for barley yellow dwarf virus resistance maps close the centromere on the long arm of barley chromosome 3. In: Theor. Appl. Genet., 92, 1996, s. 858-864.
- FORD, C.M., PATRIGE, N.G., RTHJEN, J.P., MORITZ, R.L., SIMPSON, R.J., SYMONS, R.H.: Rapid and informative assays for *Yd2*, the barley yellow dwarf virus resistance gene, based on the nucleotide sequence of a closely linked gene. In: Molecular Breeding, 4, 1998, s. 23-31.
- HANZALOVÁ, A., HUSZÁR, J., BARTOŠ, P., HERZOVÁ, E.: Occurrence of wheat leaf rust (*Puccinia triticina*) races and virulence changes in Slovakia in 1994–2004. In: Biologia, 63, 2, 2008, s. 171-174.
- HUDCOVICOVÁ, M., ŠUDYOVÁ, V., ŠLIKOVÁ, S., GREGOVÁ, E., KRAIC, J., ORDON, F., MIHÁLIK, D., HOREVAJ, V., ŠRAMKOVÁ, Z.: Marker-assisted selection for the development of improved barley and wheat lines. In: Acta Agronomica Hungarica, 56, 4, 2008, s. 385-392.
- HOFINGER, B. J., BASS, CH., BALDWIN, T., BEAUDION, F., HAMMOND-KOSACK, K., KANYUKA, K.: Discovery of novel EIF4E alleles conferring broad spectrum resistance to bymoviruses by exploiting genetic diversity of natural barley germplasm. In: 7th IWGPV Symposium Quedlinburg, September 1-4, J. Kühn – Institute, Erwin-Baur-Strasse 27, 2008, s. 25.
- JEŽEWSKA, M., TRZMIEL, K.: First report of *Barley yellow mosaic virus* infecting barley in Poland (akceptované na publikovanie apríl 2009).
- McINTOSH, R.A., APPLES, R., DEVOS, K.M., DUBCOVSKY, J., ROGERS, W.J., YAMAZAKI, Y.: Catalogue of gene symbols for wheat. In: Proc. of 10th Inter. Wheat Genet. Symp., Paestum Italy, 2003.
- MIKULÍKOVÁ, D., HORVÁTHOVÁ, V., ŽOFAJOVÁ, A.: Obsah a zloženie škrobu v zrne pšenice, raže a tritikale. In: Chemické listy 102, 2008, s. 822-828.
- NAKAMURA, T., VRINTEN, P., SAITO, M., KONDA, R.: Rapid Classification of Partial Waxy Wheat Using PCR-based Markers. In: Genome, 45, 2002, s. 1150-1156.
- OVESNÁ J., ŠÍP V., KUČERA L., CHRPOVÁ J., NOVÁKOVÁ I., JAHOOOR A., VACKE J: Genetic Diversity of BYDV Resistant Barley Cultivars determined by Molecular Markers. In: Czech J. Genet. Breed., 37, 1, 2001, s. 17-22.
- OVESNÁ, J., POLÁKOVÁ, K., LEIŠOVÁ, L.: DNA Analyses and their Applications in Plant Breeding. In: Czech J. Genet. Plant Breed., 38, 1, 2002, s. 29-40.
- PALTRIDGE, N. G., COLLINS, N. C., BENDAHDANE, A., SYMONS, R. H.: Development of YLM, a codominant PCR marker closely linked to the *Yd2* gene for resistance to barley yellow dwarf disease. In: Theor. Appl. Genet., 96, 1998, s. 1170-1177.
- PETROVA, I. V., CHEBOTAR, S. V., RYBALKA, A. I., SIVOLAP, Yu. M.: Identification of *Wx* Genotypes among Different Varieties of Soft Winter Wheat. Cytology and Genetics, 41, 6, 2007, s. 337-342.
- SNIHUR, H., POLISCHUK, V., BUDZANIVSKA I., KASTIRR, U.: Detection of cereal soil-borne viruses in agroecosystems of Ukraine. In: 7th IWGPV Symposium Quedlinburg, September 1-4, J.Kühn-Institute, Erwin-Bauer Strasse 27, 2008, s. 25.
- ŠÍP, V., VACKE, J., CHRPOVÁ, J., ŠKORPÍK, M.: Genetická diverzita a dedičnosť rezistence k viru žlté zakrslosti ječmene u ječmene jarného. In: Genet. a šlecht., 33, 4, 1997, s. 261-279.
- TUVESSON, S., POST, L., ÖHLUND, R., HAGBERG, P., GRANER, A., SVITASHEV, S., SCHEHR, M., ELOVSSON, R.: Molecular breeding for the BaMMV/BaYMV resistance gene *ym4* in winter barley. In: Plant Breed., 117, 1998, s. 19-22.

**PĚSTITELSKÁ A SLADOVNICKÁ CHARAKTERISTIKA TRITORDEA
(X TRITORDEUM ASCHERSON ET GRAEBNER)
AGRONOMIC AND MALTING CHARACTERISTICS OF TRITORDEUM
(X TRITORDEUM ASCHERSON ET GRAEBNER)**

Vratislav PSOTA¹ – Petr MARTINEK² – Lenka SACHAMBULA¹

*The chromosome duplication of *Hordeum chilense* and *Triticum durum* crosses have led to the development of tritordeum, a novel hexaploid amphiploid cereal crop. In the Czech Republic (CR) matured very late and non-uniformly because of a semiperennial character of original *H. chilense*. Yields of hexaploid tritordeum reached on average 30 % of spring wheat check cultivars in the CR in 2000-2008. A mild course of the winter did not damage tritordeum sown in autumn and the vernalisation effect limited problems with late and non-uniform maturation of the heads. In case no visible injury was observed during the winter period, it yielded on average 42 % in comparison with winter wheat check cultivars. The tritordeum lines had lower starch content but high contents of lutein, β -carotens, ferulic acid and higher superoxide dismutase activity. Due to the antioxidant effect of these substances, tritordeum can be considered a source of the substances beneficial to health. Basic malting parameters were determined.*

Key words: tritordeum, starch content, malting parameters

Vznik tritikale jako významné nově vytvořené allohexaploidní plodiny inspiroval šlechtitele k pokusům s hybridizací pšenice s ječmenem, které jsou doloženy již od počátku minulého století. Zatímco křížení pšenice s *Hordeum vulgare* L. vede k získání autosterilních F₁ rostlin (Molnar-Lang et al., 2002), první informace o vytvoření fertálního křížence pocházejí z roku 1977 z křížení *Hordeum chilense* Roemer et Schultese, 2n = 2x = 14; H^{ch}H^{ch}) s hexaploidní pšenicí (Martin a Chapman, 1977). Postupně byly vytvořeny syntetické allootoploidní (2n = 8x = 56; H^{ch}H^{ch}BBAADD) a allohexaploidní (2n = 6x = 42; H^{ch}H^{ch}BBAA) formy s názvem tritordeum (X *Tritordeum* Ascherson et Graebner). Použitý *H. chilense* je planou převážně vytrvalou formou ječmene, pocházející z Chile a malé části Argentiny. Hexaploidní formy tritordea mají genom H^{ch} ječmene a genomy B a A pšenice. V současnosti šlechtění tritordea probíhá v CSIC (Instituto De Agricultura Sostenible) v Cordobě ve Španělsku, kde byla vytvořena křížením oktoploidních a hexaploidních forem navzájem řada sekundárních hexaploidních forem s dostatečnou šlechtitelsky využitelnou variabilitou (Martin et al., 1999). Některé vzorky byly získány do Agrotrest fyto, s.r.o. v Kroměříži k výzkumným účelům a v průběhu let byly rozpracovány rovněž vlastní linie a dihaploidní (DH) formy ve spolupráci s Ing. L. Ohnoutkovou, Ph.D. (Ústav experimentální botaniky v.v.i. v Olomouci), které byly použity rovněž v této studii.

Použití planých ječmenů pro hybridizaci s pšenicí bylo prováděno rovněž z důvodu snahy po přenosu nových, většinou nehostitelských typů rezistencí do pšenice. Hexaploidní tritordeum má vyšší obsah bílkovin než pšenice, jejich složení odpovídá více pšenici seté než tvrdé. Primární formy obsahují 19 – 22 % bílkovin. Sekundární (rekombinantní) formy, vytvořené křížením primárních forem navzájem, mají obsah bílkovin o něco menší (Martin et al. 1999; Martinek, 2003). Řada linií tritordea je tolerantní vůči obvyklým houbovým chorobám pšenice, ale i některým živočišným škůdcům. V současnosti stále existují pouze jarní formy, které mají ve středoevropských podmínkách proti běžným odrudám pšenice delší vegetační dobu a méně než poloviční výnosy. Značné mezigenotypové rozdíly tritordea se projevují v technologických vlastnostech těsta. Některé chromosomy H^{ch} genomu mohou zřejmě částečně nahradit funkci 1D a 6D chromosomů, které nesou významné gliadinové a gluteninové alely odpovědné za viskoelastické vlastnosti lepkových bílkovin. Je uváděno, že technologická kvalita hexaploidního tritordea je více podobná pšenici seté než pšenici tvrdé (Alvarez, Martin, 1994; Caballero et al., 2001; Hrušková et al., 2008abc). Možnost využití tritordea pro výrobu sladu zmiňují pouze Martín et al. (1999), kteří uvádějí u tritordea vyšší obsah dusíku (3,19 %), Kolbachovo číslo na úrovni 39 %, diastatickou mohutnost na úrovni 553 °WK a vyšší hodnotu viskozity.

Práce se věnuje charakteristice tritordea v našich podmínkách a jeho sladovnické kvalitě.

Materiál a metody

a) polní pokusy

Byly prováděny polní výnosové pokusy, s rozdílnými genotypy jarního tritordea pocházejícími ze Španělska, v letech 2000 až 2008 v Agrotrest fyto, s.r.o. 13 linií (HT31-1, HT31-2, HT31-3, HT31-4, HT31-5 / = linie odvozené z HT31/, HT115, HT119, HT129, HT135, HTC1323, HTC1324, HTC1331, HTC1380) bylo zkoušeno od roku 2000, od roku 2002 bylo navíc zkoušeno 15 dihaploidních (DH) linií (HT109DH, čtyři DH linie odvozené od HT129, dvě DH linie odvozené od HT135, HTC1323 a 7 DH linií odvozených od HTC1331), které byly vytvořeny v od roku 2005 bylo navíc zkoušeno 6 nových linií (HT 352, HTC1324, HTC2060, HTC2071, HTC2083, HTC2084).

Adresa autorov: Ing. Vratislav Psota, CSc.¹, Dr. Ing. Lenka Sachambula¹ Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a.s., Sladařský ústav, Mostecká 7, 614 00 Brno, Česká republika, Tel.: +420 545 214 110/27, GSM: +420 606 754 564/27, Fax: +420 545 321 225, E-mail: psota@brno.beerresearch.cz, sachambula@brno.beerresearch.cz;
Ing. Petr Martinek, CSc.², Agrotrest fyto, s.r.o., Havlíčkova 2787/121, 767 01 Kroměříž, Česká republika, Tel.: +420 573 317 158, E-mail: martinek.petr@vukrom.cz

Tritordeum bylo pěstováno v letech 2000 – 2008 jako jarní i ozimá plodina. V závislosti na termínu výsevu byly použity jako kontrolní odrůdy jarní (Sandra kvalita B, Saxana - kvalita A) a ozimé (Astella - kvalita B, Brea - kvalita E) pšenice. Ve všech případech byla předplodinou ozimá řepka. Velikost parcel byla 10 m², počet parcel (opakování) byl v průběhu let proměnlivý. Byly použity výsevky 6,0 a 4,5 milionů klíčivých zrn na 1 ha u jarních výsevů tritordea a kontrolních odrůd pšenice, v případě ozimů byl výsevek u obou plodin snížen o půl mil. klíčivých zrn na 1 ha.

Vzhledem k nižší odnožovací schopnosti tritordea byl jeho výsevek vyšší oproti pšenici o 1,5 mil. klíčivých zrn na 1 ha. U jarního a podzimního výsevu bylo použito shodně celkové dávky dusíku 70 kg.ha⁻¹, která byla rozdělena na jaře do dvou dávek (regenerační, produkční). Bylo provedeno základní vegetační pozorování a vyhodnocení výnosů.

b) rozbory kvality zrna

Bylo analyzováno 7 linií hexaploidního tritordea (HTC1331DH, HTC1323DH, HTC1331bDH, HTC1331cDH, HTC1380, HT135aDH, HT135bDH), 1 linie haynaldotikum s italským místním názvem Denti de Cani C.V. (v překladu „psí zub“) X *Haynaldoticum sardoum* Meletti et Onnis, která vznikla údajně jako spontánní hybrid mezi *Triticum durum* Desf. a *Haynaldia villosa* Schur na jihu Itálie, kde byla nalezena (Meletti, et al., 1996); vzorek je k dispozici v Genové bance v Praze pod číslem EVIGEZ 401C2400003.

Pro srovnání byly jako kontroly použity 2 odrůdy pšenice Grandur (*T. durum*), SW Kadrlj (*T. aestivum*) a jarní sladovnický ječmen Bojos. Pro analýzy bylo použito zrno sklizené v roce 2006 z jarních výsevů. Sladovnická kvalita byla stanovena podle metod EBC (1998) a MEBAK (1997). Slad a sladina byly charakterizovány přibližně 30 různými znaky, např. aktivita lipoxigenasy (LOX), superoxididmutasy (SOD), obsah vitamínu E, pentozanů a podobně.

Výsledky a diskuse

a) polní pokusy

Tritordeum vysévané na jaře mělo datum metání přibližně stejné jako u kontrolních odrůd, ale podstatně opožděnější dobu dozrávání. Bylo to velmi pravděpodobně způsobeno genem (geny) pro vytrvalostní charakter planého *H. chilense*. Ten pravděpodobně indukuje vysoký stupeň zmlazování (podrůstání) bočních odnoží, a toto má za následek vizuální zvýšení nevyrovnanosti porostu a oddálení doby dozrávání. Vlastní stanovení data zralosti je u jarních výsevů tritordea značně problematické protože v dozrávajícím porostu jsou kromě zralých klasů zcela nezralé klasy z vedlejších odnoží (s výjimkou ročníků s výrazným výskytem sucha během dozrávání). Tyto faktory ovlivnily výnosy tritordea, které byly v průměru hodnocených let u jarních výsevů pouze 30% ve srovnání s jarní pšenicí (Tab.1).

Tabulka 1: Průměrné výnosy (t.ha⁻¹) hexaploidních forem tritordea vysévaných jako jař a ozim

Rok sklizně (počet testovaných genotypů tritordea)	Vyséváno na jaře			Vyséváno na podzim		
	Tritordeum	Jarní pšenice		Tritordeum	Ozimá pšenice	
		Sandra	Saxana		Astella	Brea
2000 (13)	1,48±0,31	6,25	6,41	2,04±0,46	9,27	7,45
2001 (13)	2,44±0,33	6,89	7,02	3,92±0,84	8,26	6,74
2002 (28)	1,16±0,36	4,1	4,12	4,17±0,61	8,99	7,01
2003 (28)	2,25±0,41	7,71	8,02	*)	*)	*)
2004 (28)	1,55±0,28	7,3	7,42	3,95±0,57	9,54	8,68
2005 (34)	1,51±0,21	6,36	6,55	*)1,97±0,64	9,74	9,33
2006 (34)	2,62±0,30	7,27	7,36	4,25±1,02	8,75	8,23
2007 (34)	2,26±0,30	7,45	7,95	3,18±0,31	9,21	8,97
2008 (34)	1,95±0,30	5,28	5,64	*)2,06±0,43	10,75	9,85
Průměr	1,91 (= 30%)	6,45 (= 100%)		3,59 (= 42%)	8,45 (= 100%)	

*) plně zničené nebo poškozené parcely mrazem nebyly zahrnuty do průměru

Průkazně pozdější dozrávání rovněž vedlo ke ztrátě citlivosti k houbovým chorobám ve srovnání s kontrolní pšenicí. Bylo zajímavé, že odvozené dihaploidní linie měly mírně vyšší výnosy než ostatní linie, což by mohlo nasvědčovat tomu, že vyšší genetická uniformita u DH linií může sehrávat pozitivní vliv na výnos. V nejpříznivějším roce 2006 nejlepší linie tritordea HTC1331-1DH dosáhla výnosu 3,73 t.ha⁻¹ (= 51% ve srovnání s jarní pšenicí).

Vzhledem k této skutečnosti jsme prováděli hodnocení tritordea v podzimních výsevech, které umožnilo eliminovat problémy s pozdním dozráváním vlivem jarovizace během zimního období. U tritordea vyšetého jako ozim bylo datum metání a dozrávání přibližně stejné jako u kontrolních odrůd ozimé pšenice a výnosy byly v průměru 42% ve srovnání s kontrolami. Do tohoto průměru nebyly zahrnuty ročníky, kdy došlo k vymrznutí nebo výraznému poškození hodnocených porostů během zimy.

b) charakteristiky kvality zrna

Zrno tritordea je drobnější, o čemž svědčí nižší podíl zrna nad sítím 2,8 mm a vyšší procentické podíly menších velikostních podílů (2,2 - 2,5 mm, 2,5 - 2,8mm), a rovněž nižší HTZ než u ostatních sledovaných druhů (Tab 2). Tritordeum a haynaldotikum měly výrazně vyšší obsah dusíkatých látek (17,0 % resp. 18,6 %). To potvrzuje dřívější výsledky pokládající tritordeum za významný zdroj bílkovin uváděný v rozmezí 16 – 22 % (Martinek, 2003). Naopak obsah škrobu byl u nich nízký (59,5 % resp. 57,7 %). Tritordeum mělo ve srovnání s ostatními sledovanými druhy vyšší obsah tuku v obilkách. Přítomnost pšeničných genomů u tritordea, haynaldotikum (ale i kontrolních odrůd tvrdé a chlebové pšenice) vedlo k výrazně nižšímu obsahu β -glukanů v obilkách oproti odrůdě ječmene Bojos. Obsah vitamínu E byl u tritordea a haynaldotikum nižší než u pšenice a ječmene. Naopak v obsahu luteinu překonávali 3 – 4 x kontrolní odrůdy pšenice a ječmene. Rovněž byl u nich zaznamenán vyšší obsah kyseliny ferulové a β -karotenu. Aktivita sledovaných enzymů byla u tritordea a haynaldotikum přibližně stejná nebo mírně vyšší než u kontrolních odrůd pšenice a ječmene. U tritordea byla aktivita LOX přibližně poloviční ve srovnání s haynaldotikum, pšenicí SW Kadrijl a ječmenem Bojos. Naproti tomu linie tritordea vynikaly dvojnásobnou aktivitou SOD ve srovnání s ostatními sledovanými liniemi a odrůdami.

Tabulka 2: Výsledky rozborů sladovnické kvality

Znak	Tritordeum (7 linií)	Haynaldotikum	Grandur (<i>T. durum</i>)	SW Kadrijl (<i>T. aestivum</i>)	Bojos (<i>H. vulgare</i>)	Znak	Tritordeum (7 linií)	Haynaldotikum	Grandur (<i>T. durum</i>)	SW Kadrijl (<i>T. aestivum</i>)	Bojos (<i>H. vulgare</i>)
Analýza obilky						Analýza sladu					
	$\bar{x} \pm s_x$						$\bar{x} \pm s_x$				
Přepad nad 2,8 mm (%)	18,1±8,2	64,0	73,3	57,4	64,9	Přepad nad 2,5 mm (%)	74,9±10,7	99,0	91,6	87,7	98,9
2,5 - 2,8 mm (%)	51,9±4,1	33,3	18,7	30,8	31,2	Friabilita (%)	75,0±9,0	26,0	34,6	31,4	92,0
2,2 - 2,5 mm (%)	28,0±8,1	2,6	5,5	7,7	3,6	N-látky d.m. (%)	16,7±0,4	18,3	12,7	13,3	11,7
Propad pod 2,2 mm (%)	2,0±1,2	0,1	2,5	4,1	0,3	β -glukany d.m. (%)	0,10±0,00	0,30	0,06	0,08	0,19
HTZ (g)	29,4±2,3	39,9	37,9	37,7	41,5	Kys. ferulová (mg/g)	1,65±0,20	1,27	1,06	0,94	1,16
Objemová hmotnost (g/l)	75,2±1,1	75,8	77,0	69,2	64,9	Vitamin E (mg/kg)	12,97±2,08	11,64	9,48	9,74	17,46
Moučnatost L _{Tm} (%)	45±21	13,0	20,0	14,0	94,0	LOX (U/mg pr.)	3,7±0,7	11,0	2,5	13,4	6,4
Dusíkaté látky d.m. (%)	17,0±0,4	18,6	12,9	13,6	12,2	SOD d.m. (U/g)	128±38	130	32	153	134
Škrob d.m. (%)	59,5±0,6	57,7	68,4	67,6	62,8	Analýza sladiny					
Tuk d.m. (%)	2,35±0,05	1,41	2,17	1,81	1,64	Extrakt sladu (%)	79,9±0,8	78,3	82,6	82,4	81,3
Pentosany d.m. (%)	6,50±0,63	8,11	9,81	10,14	7,69	Relat. extrakt 45°C (%)	31,8±2,1	34,3	33,6	34,8	40,5
β -glukany d.m. (%)	0,29±0,12	0,40	0,16	0,39	3,94	Kolbachovo číslo (%)	43,3±7,8	37,7	68,1	42,1	42,3
Vitamin E (mg/kg)	7,62±2,36	7,33	11,64	7,74	13,86	Dia. mohutnost (WK)	533±29	429	466	367	415
Lutein (ug/kg)	6504±666	1530	2164	2046	1414	Dos. st. prokvašení (%)	75,7±2,0	76,5	74,0	79,8	80,5
β -karoten (ug/kg)	274±57	84	97	99	158	β -glukany (mg/l)	17±2	32	22	24	63
Kys. ferul. d.m. (mg/g)	1,32±0,08	1,18	1,00	0,78	0,82	Pentosany (mg/l)	1526±136	1494	1245	1549	499
β -glukanasa	33,4±8,0	23,0	47,0	18,0	22,0	Celk. polyfenoly (mg/l)	12,42±3,95	41,25	10,00	40,34	58,71
α -amylasa (U/g)	0,53±0,19	0,32	0,75	0,21	0,05	Barva (EBC)	4,9±0,9	4,5	3,2	3,5	3,9
β -amylasa (U/g)	1192±163	890	1065	703	637	Doba zcukření (min)	21±3	15	48	11	10
LOX (U/mg prot.)	11,4±3,7	27,8	8,5	24,1	29,5	Zákal 90° (EBC)	22,58±10,87	11,37	4,54	1,23	0,67
SOD d.m. (U/g)	206±10	156	133	137	102	Zákal 15° (EBC)	22,99±19,19	17,94	6,93	1,63	0,65

HTZ - Hmotnost tisíce zrn; LOX - lipoxygenasa; SOD - superoxididismutasa; d.m. - dry matter (sušina);

$\bar{x} \pm s_x$ průměr \pm směrodatná odchylka

Lze konstatovat, že tritordeum obecně má sice nižší obsah škrobu, ale disponuje vyššími až výrazně vyššími obsahy luteinu, β -karotenů, kyseliny ferulové a vyšší aktivitou enzymu SOD, což jsou látky s výrazným antioxidačním účinkem. Proto tritordeum (a částečně i haynaldotikum) lze považovat za potenciální zdroj látek s výrazným zdravotním benefitem pro člověka a hospodářská zvířata.

Slady vyrobené ze vzorků tritordea měly výrazně nízký obsah β -glukanů ve srovnání se sladem z odrůdy ječmene Bojos. Obsah kyseliny ferulové byl u sladů z tritordea a haynaldotikum vyšší než ve sladu srovnávacích odrůd pšenice a ječmene. Aktivita LOX ve sladu byla nejvyšší u haynaldotikum. Aktivita SOD byla na podobné úrovni jako u srovnávací odrůdy ječmene. Analýza sladiny ukazuje, že úroveň sledovaných parametrů je ve srovnání s odrůdou Bojos i ve srovnání s požadavky na sladovnickou kvalitu obecně nedostatečná.

Některé ze zkoušených linií tritordea by byly v současné době vhodné spíše pro výrobu speciálních sladů. Slad je možno využít jako součást mšlí nebo pro výrobu různých extraktů. Z tohoto důvodu, by bylo vhodné rozšířit analýzu sladu a sladiny o lutein, β -karoten, případně další z hlediska zdravotního prospěšné látky.

Všechny sledované linie tritordea a haynaldotikum vykazovaly vysoký obsah celkového dusíku ve sladu. Obsah extraktu se pohyboval v průměru kolem 79,9 % resp. 78,3 %. Kolbachovo číslo se u většiny sledovaných linií pohybovalo kolem 40 %. Relativní extrakt při 45 °C byl spíše na nižší úrovni (31,8 % resp. 34,3 %). Všechny linie tritordea měly diastatickou mohutnost nad 500 °WK, linie haynaldotikum měla 429 °WK. Obsah β -glukanů byl u všech linií nízký, ale úroveň friability vykazovala značné meziliniové rozdíly (75 % resp. 26 %). Dosažitelný stupeň prokvašení se pohyboval v průměru kolem 75,7 % resp. 76,5 %.

Kromě jedné linie vykazovaly ostatní zákal sladiny. Zajímavá je nižší úroveň aktivity LOX u tří linií (2,4 – 3,8 U/mg pr.) a vyšší aktivita SOD (205 U/g) u jedné linie.

Výsledky rozborů zrna tritordea a možná i haynaldotikum mohly být rovněž ovlivněny tím, že se jedná o bezpluché formy. U některých linií tritordea se může vyskytovat určitá míra podílu pluchatých zrn, která je pokládána za negativní vlastnost, jež působit problémy při mláčení a čištění zrna. Pro vlastní rozborů bylo použito jen dokonale vyčištěné zmo. Výsledky charakterizující vlastnosti sladu byly u tritordea ovlivněny vysokým obsahem dusíku. Hodnocené linie vykazovaly nižší obsah β -glukanů a výrazně vyšší obsah pentosanů ve sladince než u sladovnického ječmene. Hodnoty viskozity sladiny byly u všech sledovaných linií vyšší. Svými vlastnostmi se linie tritordea a haynaldotikum blíží spíše hodnotám, kterých dosáhly obě kontrolní odrůdy pšenice.

V současnosti se možnosti využití tritordea zabývá ve střední Evropě ještě rakouská firma Saatucht Donau GesmbH. & CoKG, Reichersberg am Inn. Dosažení požadované mrazuvzdornosti by bylo možné dosáhnout přenosem genů pro mrazuvzdornost z vhodných donorů pšenice pomocí zpětného křížení nebo technikami amfiploidizace vhodných F_1 hybridů. Ve Španělsku usilují o přenos pouze vybraných chromosomů *H. chilense* nebo jejich segmentů do pšenice za účelem zvýšení odolnosti k braničnatce pšeničné a sněti mazlavé (na $7H^{ch}$) a zvýšení obsahu karotenoidů (které jsou podmíněny geny na $4H^{ch}$) do tetraploidní pšenice (Rubiales et al., 2004).

Závěry

Snahy po vyšlechtění tritordea pro středoevropské podmínky by měly vycházet z potřeby vyšlechtit ozimé formy, protože ty budou dosahovat vyšší výnosy. Rovněž bude nutné, aby tyto ozimé formy měly dostatečnou úroveň mrazuvzdornosti, aby byly schopny přežít nepříznivá zimní období, jakými byla například zima 2002/2003 (Prášilová et al., 2003).

U linií tritordea nebyl tak rozsáhlý rozbor sladu a sladiny ještě proveden, haynaldotikum nebylo z tohoto pohledu hodnoceno asi vůbec. Některé sledované linie vykazují zajímavé technologické vlastnosti. V budoucnu se mohou stát novými plodinami, obdobně jako je dnes tritikale nebo donory nových vlastností ve šlechtění pšenice.

Poděkování: Děkuje prof. Antoniu Martínovi za poskytnutí vzorků tritordea. Práce byla podpořena projekty Ministerstva školství mládeže a tělovýchovy České republiky MSM6019369701, KONTAKT-mobilita MEB080827 a projektem Ministerstva zemědělství České republiky QI91B095.

References

- ALVAREZ J. B., MARTIN L. M.: The amphiploid *Hordeum chilense* x *Triticum aestivum*. Evaluation of its grain, flour and dough characteristics, and comparison with those of other related cereals. *Cereal Research Communications*, 22(1/2), 1994: 49-56.
- CABALLERO L., ALVAREZ J. B., MARTIN L. M.: Analysis of D-prolamins synthesized by the *Hordeum chilense* genome and their effects on gluten strength in hexaploid tritordeum. *Plant Breeding*, 120(2), 2001: 185-187.
- EBC Analysis committee: Analytica-EBC. Carl, Getränke-Fachverlag, Nürnberg 1998.
- HRUŠKOVÁ M., SEKEROVÁ H., ŠVEC I., VACULOVÁ K., MARTINEK P.: Vliv přídavku tritordea a netradičních materiálů jarního ječmene s bezpluchým zrnem na kvalitu těstovin. *Obilnářské Listy*, 16, 16(4), 2008: 109-114.
- HRUŠKOVÁ M., ŠVEC I., JURINOVÁ I., MARTINEK P.: Hodnocení technologických vlastností mouky z vybraných dihaploidních forem tritordea. XXXIX. Symposium o nových směrech výroby a hodnocení potravin. Sborník příspěvků. 26. - 28. 5. 2008 Skalský Dvůr, 2008, 255-258.
- HRUŠKOVÁ M., ŠVEC I., MARTINEK P.: Vlastnosti mouky tritordea. *Mlynářské Noviny*, 19, 2008, 1, 6-7
- MARTIN A., ALVAREZ J. B., MARTIN L. M., BARRO F., BALLESTEROS J.: The development of tritordeum: a novel cereal for food processing. *Journal of Cereal Science*, 30(2), 1999: 85-95.
- MARTIN A., CHAPMAN V.: A hybrid between *Hordeum chilense* and *Triticum aestivum*. *Cereal Research Communications*, 26(5), 1977: 365-268.
- MARTINEK P.: Grain quality parameters in tritordeum (*X Tritordeum* Ascherson et Graebner). *Proceedings of the 10th International Wheat Genetics Symposium, Volume 3, Section 7 – Grain Quality*, 2003: 1367-1369.
- MEBAK: Brautechnische Analysenmethoden, MEBAK, Weihenstephan - Freising 1997.
- MELETTI P., SBRANA V., QUATTRUCCI E., GALLI V., CAPRONI E., CORAZZA L., BALMAS V., STEFANI A., BOZZINI A.: Denti de cani (= *X Haynaldoticum sardoum*) spontaneous hexaploid wheat. *Agronomic and technological characterization [Sardinia - Tuscany - Calabria - Sicily]*. *Sementi Elette (Italy)* 42(6), 1996: 33-41.
- MOLNAR-LANG M., LINC G., NAGY E. D., SCHNEIDER A., MOLNAR I.: Molecular cytogenetic analysis of wheat-alien hybrids and derivatives. *Acta Agronomica Hungarica* 2002, 50(3): 303-311.
- PRÁŠILOVÁ P., MARTINEK P., PRÁŠIL I. T.: Winter resistance of wheat cultivars in different countries of origin. *Proceedings of the 10th International Wheat Genetics Symposium, Proceedings, Volume 2, Section 1: Cytogenetics and Germplasm Evaluation*, 2003: 622-624.
- RUBIALES D., NIKS E. R., CARVER T. L. W., BALLESTEROS J. MARTÍN A.: Prospects for exploitation of disease resistance from *Hordeum chilense* in cultivated cereals. *Hereditas*, 135(2-3) 2004: 161-169.

**VPLYV ODRODY A DRUHU AUXÍNU NA *IN VITRO* REGENERAČNÚ
KAPACITU ZRELÝCH EMBRYÍ PŠENICE LETNEJ (*TRITICUM AESTIVUM* L.)
EFFECT OF VARIETY AND TYPE OF AUXIN ON *IN VITRO*
REGENERATION CAPACITY OF MATURE EMBRYOS OF COMMON
WHEAT (*TRITICUM AESTIVUM* L.)**

Richard MURÍN¹ – Zuzana BEŇOVÁ² – Juraj FARAGÓ^{2,3}

Wheat (Triticum aestivum L.) is one of the most important cereals of the world. Genetic improvement of wheat depend on efficient and reproducible in vitro regeneration system. We used the method of mature embryo culture technique for testing the in vitro regeneration capacity of 25 different cultivars of wheat on two callus induction media differing in the auxin type (2,4-dichlorophenoxyacetic acid vs. dicamba). We observed that callus induction, somatic embryo formation and plant regeneration are three independently regulated in vitro processes differently affected by the genotype and/or auxin type. The less sensitive to both factors was callus formation, while plant regeneration was significantly affected by both the genotype and culture medium composition. Mature embryo culture in wheat seems to be a viable alternative to the currently most exploited immature embryo culture technique.

Key words: wheat, in vitro system, auxin

Úvod

Úspešná genetická transformácia pšenice závisí od funkčného *in vitro* regeneračného systému Shewry a kol., (2008). Pre účely mikrobaliistickej metódy genetickej transformácie sú zatiaľ najvhodnejšími explantátmi nezrelé embryá a kalusy odvodené z nezrelých embryí Bhalla a kol. (2006). Tieto boli tiež využité pre transformáciu prostredníctvom *Agrobacterium tumefaciens* (Cheng a kol., 1997). Využitie nezrelých embryí však prináša určité nevýhody, ako obmedzenosť ich využitia z hľadiska sezóny a tiež náročnosť na pestovateľské podmienky. Niektorí autori, napr. Delporte a kol. (2001), doporučujú použitie zrelých embryí na genetickú transformáciu pšenice. Ich využitie môže byť revolučným z hľadiska skrátenia časovej náročnosti pri využití daného explantátu, nakoľko zrelé embryá možno využiť kedykoľvek počas roka, z hľadiska skladovateľnosti a vyrovnanejšieho fyziologického stavu, ľahšej manipulácie s nimi a potenciálne nižšiemu výskytu somaklonálnej variability pri regenerantoch (Yu a Wei, 2007). Menej sa na genetickú transformáciu pšenice používajú embryá odvodené z peľnicovej kultúry a mikrospór (Ingram a kol., 2001), listových báz (Wang a Wei, 2004), kvetenstiev (Caswell a kol., 2000) a špičiek výhonkov (Viertel a Hess, 1996). Regeneračná schopnosť rastlinných explantátov v *in vitro* kultúre závisí od rastových faktorov obsiahnutých v živnom médiu, od druhu pletiva, z ktorého boli bunky izolované a od genotypu rastliny (Faragó, 2003), tiež od veku a veľkosť embryí, koncentrácia auxínov a dĺžka inkubačnej periódy Bhalla a kol. (2006) prípadne priamo koncentrácie 2,4-dichlórfenoxyoctovej kyseliny (2,4-D) Wang a kol. (2005). Väčšina autorov uvádza pri *in vitro* kultúrach pšenice využitie Murashige a Skogovho (MS) média (Murashige a Skoog, 1962) ako základ, či už médií pre kalogenézu, alebo médií určených na regeneráciu rastlín. O charaktere rastu explantátovej kultúry nerozhoduje len koncentrácia jednotlivých rastlinných hormónov, ale často aj ich vzájomný pomer. Bhalla a kol. (2006), uvádzajú najčastejšie využívanie odrody 'Bobwhite' na genetickú transformáciu pšenice, ktorá predstavuje genotyp s najlepšou regeneračnou schopnosťou spomedzi testovaných odrôd pšenice, je však z agronomického hľadiska nepoužiteľný. Je potrebné hľadať také *in vitro* rezponzívne genotypy, ktoré prislúchajú k hospodársky významným odrodám a mohli by byť použité na genetickú transformáciu pšenice. Toto bolo aj cieľom našej práce, v ktorej sme testovali *in vitro* regeneračnú schopnosť zrelých embryí 25 vybraných odrôd pšenice letnej z kolekcie odrôd pšeníc v Génovej banke CVRV (VÚRV) Piešťany.

Materiál a metódy

Východiskovým rastlinným materiál boli zrelé semená 25 odrôd pšenice letnej (*T. aestivum* L.). Osivo dvadsaťpäť odrôd ozimnej formy pšenice letnej bolo poskytnuté Ing. P. Hauptvogelom, PhD. z Génovej banky SR v Centre výskumu rastlinnej výroby (predtým VÚRV) Piešťany. Boli to nasledovné odrody (v zátvorke štát pôvodu): Biscay (DEU), GK Forrás (HUN), MV Sügeves (HUN), Verna (ITA), Mottin (ITA), Dorico (ITA), Golia (ITA), Steklovidnaja (KAZ), Pehlivan (TUR), Shaan 8007-7 (CHN), Shark-4 (MEX), Edison (AUT), Exquisit (AUT), Bardotka (FRA), Bocquiau (FRA), Passarinho (FRA), Maverick (GBR), Delta (RUS), Lira (RUS), Moldavska L 1052 (RUS), Vendur (SVK), Astella (SVK), Ilona (SVK), Markola (SVK) a Pavlína (SVK). Ako explantáty slúžili zrelé štítky s embryovou osou, ktoré sa po povrchovej sterilizácii v 0,1% roztoku HgCl₂ opatrne oddelili skalpelom od endospermu zrna. V aseptických podmienkach sa z explantátu skalpelom a pinzetou oddelili rastové vrcholy výhonku (koleoptila) a koreňa (koleorhiza), aby sa čo najviac zabránilo klíčeniu zrelého embrya. Výsledný upravený explantát pozostával zo zrelého štítku (*scutellum*) a strednej časti

embryovej osi (mezokotyl). Na kultiváciu explantátov boli využité 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 (zrelé štítky so zbytkom embrya) boli ukladané na 2 druhy KIM líšiacich sa druhom rastového regulátora. Základné zloženie oboch kalus indukujúcich živných médií tvorili MS (Murashige a Skoog, 1962) soli a vitamíny doplnené 200 mg.l⁻¹ Myo-inozitolu, 2 mg.l⁻¹ glycinu, 1000 mg.l⁻¹ kazeínového hydrolyzátu, 500 mg.l⁻¹ prolínu, 30 g.l⁻¹ maltózy a 3 g.l⁻¹ Phytagelu, pH = 5,8. Médium označené M3D5 obsahovalo auxín 2,4-dichlór-fenoxycetovú (2,4-D) v koncentrácii 5 mg.l⁻¹, zatiaľ čo médium M3Di5 obsahovalo auxín kyselinu 3,6-dichlór-o-anizovú (dicamba) v rovnakej koncentrácii 5 mg.l⁻¹. Explantáty boli nasádzané embryovou časťou v kontakte s kalus indukujúcim živným médium. Z každého genotypu (odrody) pšenice bolo na každú variantu KIM nasadených 60 zreých embryí (okrem odrody Ilona, kde na médium M3Di5 bolo nasadených 55 explantátov) do sklenených Petriho misiek (PM) priemeru 10 cm (20 explantátov/PM). Explantáty v primokultúre sa kultivovali 28 dní v tme pri teplote 17±2°C. Na regeneráciu rastlín z indukovaných kalusov sa použilo živné médium MSS (Machii a kol. 1998) obsahujúce 0,1 mg.l⁻¹ BAP, 30 g.l⁻¹ sacharózy a 2 g.l⁻¹ Phytagelu, pH=5,8. Kalusy boli na MSS médium presádzané po 28 dňoch kultivácie na kalus indukujúcich živných médiách. Väčšie kalusové explantáty boli rozdelené na menšie s priemerom 5±1 mm tak, aby sa zachovalo označenie kalusových línií, t.j. kalusov pochádzajúcich z toho istého kalusu indukovaného na KIM. Kalusy na RM sa kultivovali v podmienkach fotoperiód 16 h svetlo/8h tma a intenzite osvetlenia pribl. 40 μE.m⁻².s⁻¹ a pri teplotnom režime 25±1°C za svetla a 20±1°C v tme. V primokultúre, t.j. na kalus indukčných živných médiách, boli hodnotené nasledovné parametre *in vitro* kultúry: frekvencia predčasne klíčiacych embryí, frekvencia kalogenézy a index kalogenézy. Po aspoň 4 týždňoch kultivácie kalusov na regeneračnom médiu boli hodnotené: frekvencia embryogénnych kalusov, frekvencia embryogénnych kalusových línií, frekvencia regenerujúcich kalusov, frekvencia regenerujúcich kalusových línií, priemerný počet regenerantov na kalus, výskyt albinotických regenerantov a frekvencia tvorby adventívnych koreňov kalusmi.

Výsledky a diskusia

Kalusy sa indukovali zo zreých embryí pšenice 4-6 dní po nasadení na kalus indukujúce živné médiá (KIM). Po 4 týždňoch na KIM tvorila väčšina genotypov kalusy vo frekvencii 100 % (18 odrôd na M3D5 a 12 odrôd na M3Di5). Priemerná frekvencia tvorby kalusov bola 98,0 % na M3D5 a 98,3 % na M3Di5. Najnižšia frekvencia kalogenézy bola zaznamenaná na médiách M3D5 pri odrode Dorico (66,7 %) a na médiách M3Di5 pri odrode Pavlína (88,3 %).

Rýchlosť rastu kalusov bola relatívne nízka, o čom svedčia indexy kalogenézy v rozmedzí 1,00-1,78 na médiách M3D5 a 1,00-1,62 na médiách M3Di5. Indexy kalogenézy (I_K) boli porovnateľné na oboch živných médiách (priemerný index kalogenézy na médiách M3D5 bol $I_K = 1,236$ a na médiách M3Di5 $I_K = 1,242$). Najvyšší index kalogenézy na médiu M3D5 bol pozorovaný pri odrode Pehlivan ($I_K = 1,780$) a na médiu M3Di5 pri odrode Markola ($I_K = 1,621$) (Tab. 1).

Priemerná frekvencia embryogénnych kalusových línií bola vyššia pri kalusoch indukovaných na M3Di5 médiu (41,1 %) než pri kalusoch indukovaných na M3D5 médiu (36,1 %). Pri 10 odrodách bol zaznamenaný vyšší výskyt embryogénnych kalusových línií pri kalusoch indukovaných na médiu M3D5 a pri 15 odrodách naopak, na médiu M3Di5.

Najvyššia frekvencia embryogénnych kalusových línií dosahovali odrody Maverick (57,5 %), Passarinho (52,9 %) a Steklovidnaja 24 (51,7 %) pri médiách M3D5 a Maverick (55,8 %), Biscay (55,0 %) a Exquisit (54,5 %) pri médiách M3Di5. Najnižšími frekvenciami výskytu embryogénnych kalusových línií sa vyznačovali odrody Bocquiau (11,7 %) pri médiu M3D5 a Shark-4 pri médiu M3Di5 (25,0 %).

Aj z hľadiska priemerného výskytu embryogénnych kalusov boli lepšie výsledky dosiahnuté na živných médiách M3Di5 (obsahujúcich auxín dicamba). Kalusy indukované na médiách M3Di5 tvorili somatické embryá priemerne vo frekvencii 35,4 %, kým kalusy indukované na médiách M3D5 vo frekvencii 32,5 %. Rovnako ako pri výskyte embryogénnych kalusových línií vyšší výskyt embryogénnych kalusov bol zaznamenaný pri 10 odrodách bol zaznamenaný pri médiu M3D5 a pri 15 odrodách pri médiu M3Di5 (Tab. 1). Najvyšší výskyt embryogénnych kalusov vykazovali odrody Maverick (54,0 %), Dorico (49,0 %) a Passarinho (48,3 %) pri indukcii kalusov na médiách M3D5 a odrody Maverick (50,8 %), Exquisit (48,6 %) a MV Suveges (48,5 %) pri indukcii kalusov na médiách M3Di5. Najnižšími frekvenciami výskytu embryogénnych kalusov sa vyznačovali odrody Bocquiau (9,6 %) pri médiu M3D5 a Pavlína pri médiu M3Di5 (23,0 %) (Tab. 1).

Najvýraznejšie rozdiely medzi živnými médiami použitými na indukciu kalogenézy sa prejavili v parametroch regenerácie výhonkov, t.j. frekvenciách regenerujúcich kalusových línií a kalusov. Kým pri použití živného média M3Di5 obsahujúceho auxín dicamba na indukciu kalusov zo zreých embryí pšenice letnej regenerovalo zelené výhonky všetkých 25 testovaných odrôd, pri použití média M3D5 (2,4-D, 5 mg.l⁻¹), regenerovalo 17 odrôd (68 %) a 8 odrôd bolo v daných podmienkach kultivácie neregenerujúcich (Tab. 1). Navyše pri regenerujúcich genotypoch iba v dvoch (frekvencia regenerujúcich kalusových línií), resp. troch (frekvencia regenerujúcich kalusov) prípadoch bola zaznamenaná vyššia frekvencia regenerácie pri kalusoch

indukovaných na médiách M3D5 (Tab. 1), v ostatných prípadoch regenerovali lepšie odrody pri použití média M3Di5 na indukciu kalogenézy.

Tabuľka 1: *In vitro* regeneračná schopnosť 25 odrôd pšenice letnej rôznej proveniencie z kolekcie génových zdrojov pšenice letnej vo CVRV Piešťany v *in vitro* kultúre zrelých embryí na médiu M3D5 a M3Di5.

Odroda	Kraj. pôv.	Počet nasad. explt.		Frekv. kalog. (%)		Index kalog.		Frekv. embryogén. kal.línií (%)		Frekv. embryogén. kal. (%)		Frekv. regen. kal. línií (%)		Frekv. regen. kal. (%)		Priem. počet reg./kal.	
		M3D5	M3Di5	M3D5	M3Di5	M3D5	M3Di5	M3D5	M3Di5	M3D5	M3Di5	M3D5	M3Di5	M3D5	M3Di5	M3D5	M3Di5
Shaan 8007-7	CHN	60	60	98,3	100	1,23	1,30	30,0	39,0	28,6	31,2	2,5	8,5	2,0	6,5	0,08	0,13
Biscay	DEU	60	60	100	96,7	1,10	1,20	46,7	55,0	45,5	47,8	6,7	15,0	6,1	13,0	0,07	0,30
GK Forrás	HUN	60	60	100	98,3	1,08	1,20	42,4	49,0	42,4	45,8	6,1	12,2	6,1	13,6	0,42	0,23
Mottin	ITA	60	60	100	100	1,30	1,16	40,0	45,8	32,1	38,6	16,7	18,6	12,8	15,7	0,26	0,28
Verna	ITA	60	60	100	98,3	1,33	1,44	48,3	38,5	41,8	27,1	6,7	17,9	5,1	11,9	0,07	0,16
Steklovidnaja 24	KAZ	60	60	100	98,3	1,60	1,45	51,7	37,3	37,5	29,1	6,7	16,9	5,2	12,8	0,09	0,32
Shark-4	MEX	60	60	100	98,3	1,00	1,03	25,0	25,4	25,0	26,2	0	1,7	0	1,6	0	0,01
Vendur	SVK	60	60	100	100	1,46	1,03	46,7	26,8	40,3	25,0	20,0	7,3	14,9	7,7	0,20	0,09
Pehlivan	TUR	60	60	98,3	98,3	1,78	1,50	43,6	35,6	29,6	27,3	2,6	11,9	1,4	8,0	0,04	0,11
Edison	AUT	60	60	100	100	1,15	1,28	13,8	46,7	13,4	39,0	0	11,7	0	9,1	0	0,14
Exquisit	AUT	60	60	100	100	1,25	1,35	34,5	54,5	32,9	48,6	10,3	16,4	9,6	14,3	0,32	0,38
Bardotka	FRA	60	60	100	98,3	1,13	1,30	26,7	35,6	26,5	28,6	0	5,1	0	3,9	0	0,09
Bocquiau	FRA	60	60	100	100	1,21	1,40	11,7	33,3	9,6	28,6	0	13,3	0	10,7	0	0,15
Passarinho	FRA	60	60	100	100	1,15	1,15	52,9	42,9	48,3	41,5	0	5,4	0	4,6	0	0,06
Maverick	GBR	60	60	100	98,3	1,21	1,15	57,5	55,8	54,0	50,8	7,5	23,1	6,0	21,3	0,08	0,41
MV Suveges	HUN	60	60	100	100	1,11	1,10	33,3	51,7	31,8	48,5	13,3	20,0	12,1	18,2	0,22	0,31
Dorico	ITA	60	60	66,7	100	1,27	1,21	50,0	50,0	49,0	43,9	5,0	16,7	3,9	13,6	0,09	0,24
Golia	ITA	60	60	98,3	91,7	1,00	1,10	21,4	40,7	21,4	37,3	3,6	3,7	3,6	3,4	0,03	0,05
Delta	RUS	60	60	100	100	1,05	1,00	37,9	34,0	37,7	34,0	0	3,8	0	3,8	0	0,03
Lira	RUS	60	60	100	100	1,20	1,15	40,0	30,0	34,7	26,1	3,3	8,3	2,8	7,2	0,02	0,13
Moldavska L 1052	RUS	60	60	100	98,3	1,01	1,11	21,7	45,3	21,3	43,3	6,7	18,9	6,6	16,7	0,06	0,31
Astella	SVK	60	60	100	100	1,41	1,43	51,7	35,0	40,0	29,1	28,3	20,0	20,0	14,0	0,38	0,24
Ilona	SVK	60	55	98,3	98,2	1,00	1,11	24,5	50,0	24,5	44,8	5,7	25,0	5,7	22,4	0,05	0,31
Markola	SVK	60	60	98,3	96,7	1,45	1,62	33,9	50,9	29,1	36,0	0	16,4	0	10,1	0	0,16
Pavčina	SVK	60	60	91,7	88,3	1,38	1,18	32,7	26,9	23,3	23,0	0	3,8	0	3,3	0	0,04

Priemerná frekvencia regenerujúcich kalusových línií bola 6,1% pri médiách M3D5 a viac ako dvojnásobok, 12,8% pri médiách M3Di5. Frekvencie regenerujúcich kalusových línií sa pohybovali pri jednotlivých odrodách v rozmedzí 0–28,3 % pri médiách M3D5 (Tab. 1) a 1,7–25,0 % pri médiách M3Di5 (Tab. 1). Najvyšším výskytom regenerujúcich kalusových línií sa vyznačovali Slovenské odrody Astella (28,3 %) a Vendur (20,0%) a Francúzska odroda Mottin (16,7 %) pri použití média M3D5 na indukciu kalusu a odrody Ilona (25,0 %), Maverick (23,1 %) a Astella a MV Suveges (20,0 %) pri použití média M3Di5 na indukciu kalusu. Žiadne výhonky neregnerovali odrody Shark-4, Edison, Bardotka, Bocquiau, Passarinho, Delta, Markola a Pavčina pri použití média M3D5 na indukciu kalusu. Pri indukcii kalusov na M3Di5 bola zaznamenaná najnižšia frekvencia regenerujúcich línií pri odrode Shark-4 (1,7 %).

Priemerná frekvencia regenerujúcich kalusov bola 5,1 % pri médiách M3D5 a viac ako dvojnásobok, 10,6 % pri médiách M3Di5. Frekvencie regenerujúcich kalusových línií sa pohybovali pri jednotlivých odrodách v rozmedzí 0–20,0 % pri médiách M3D5 (Tab. 1) a 1,6–22,4 % pri médiách M3Di5 (Tab. 1). Najvyšším výskytom regenerujúcich kalusových línií sa vyznačovali Slovenské odrody Astella (20,0 %) a Vendur (14,9 %) a Francúzska odroda Mottin (12,8 %) pri použití média M3D5 na indukciu kalusu a odrody Ilona (22,4 %), Maverick (21,3 %) a MV Suveges (18,2 %) pri použití média M3Di5 na indukciu kalusu. Žiadne výhonky neregnerovali odrody Shark-4, Edison, Bardotka, Bocquiau, Passarinho, Delta, Markola a Pavčina pri použití média M3D5 na indukciu kalusu. Pri indukcii kalusov na M3Di5 bola zaznamenaná najnižšia frekvencia regenerujúcich línií pri odrode Shark-4 (1,6 %).

Regenerujúce kalusy regenerovali 1–8 zelených výhonkov. Žiadne albinotické (bezchlorofylové) regeneranty neboli zaznamenané ani pri jednom z 25 použitých genotypov. V priemere viac regenerantov sa tvorilo na kalusoch indukovaných na médiu M3Di5 (0,19 regenerantu/kalus), než pri použití média M3D5 (0,10 regenerantu/kalus). Priemerné počty regenerantov na jeden kalus sa pri 25 testovaných odrodách pšenice pohybovali od 0 – 0,424 pri médiách M3D5 a 0,016 – 0,410 pri médiách M3Di5 (Tab. 1).

Najvyššie priemerné počty regenerantov na kalus sa tvorili pri odrodách GK Forrás (0,424), Astella (0,388) a Exquisit (0,329) pri indukcií kalusov na médiách M3D5 a pri odrodách Maverick (0,410), Exquisit (0,386) a Steklovidnaja (0,326) pri indukcií kalusov na médiách M3Di5 (Tab. 1). Žiadne výhonky pri použití média M3D5 na indukciu kalusu neregenerovali odrody Shark-4, Edison, Bardotka, Bocquiau, Passarinho, Delta, Markola a Pavlína. Najnižší priemerný počet regenerantov na kalus bol zaznamenaný pri odrode Shark-4 (0,016) pri použití média M3Di5 na indukciu kalusu.

Priemerný výskyt rizogenézy bol pri indukcií kalusov na médiách M3D5 39,4 %, kým pri indukcií kalusov na médiách M3Di5 až 69,5 %. Napriek všeobecne vyššiemu výskytu rizogenézy pri kalusoch indukovaných na médiu M3Di5, t.j. médiu obsahujúcom auxín dicamba bola vyššia aj *in vitro* regeneračná schopnosť týchto kalusov. Je preto možné predpokladať ešte vyšší *in vitro* regeneračný potenciál kalusov indukovaných na médiách s auxínom dicamba v prípade úpravy kultivačných podmienok tak, aby sa znížila frekvencia výskytu rizogenézy.

Záver

Efektívna genetická transformácia pšenice je závislá na účinnosti použitého *in vitro* regeneračného systému. Preto cieľom našej práce bolo otestovať *in vitro* regeneračnú schopnosť 25 vybraných odrôd pšenice letnej z kolekcie odrôd pšeníc v Génovej banke VÚRV (CVRV) Piešťany v kultúre zrelých embryí. V práci sme zistili, že tvorba kalusov, somatických embryí z nich a regenerácia rastlín z embryogénnych kalusov sú tri nezávislé javy ovplyvňované do rôznej miery genotypom a druhom auxínu. Najmenej citlivá na oba faktory bola tvorba kalusov, kým regenerácia rastlín bola silne ovplyvnená aj genotypom aj druhom auxínu. Záverom je možné konštatovať, že vzhľadom na mnohé výhody kultivácia zrelých embryí je vhodnou alternatívou oproti v súčasnosti najviac používanému systému kultivácie nezrelých embryí pri obilninách všeobecne a zvlášť pri pšenici.

Literatúra

- BHALLA, P.L.; OTTENHOF, H.H.; SINGH, M.B.: Wheat transformation – an update of recent progress, In: Euphytica, 149, 2006, s. 353-366.
- CASWELL, K.L.; LEUNG, N.L.; CHIBBAR, R.N.: An efficient method for *in vitro* regeneration from immature inflorescence explants of Canadian wheat cultivars, In: Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 10, 2000, 69-73.
- CHENG, M.; FRY, J.E.; PANG, S.; ZHOU, H.; HIRONAKA, C.M.; DUNCAN, D.R.; CONNER, T.W.; WAN, Y.: Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. In: Plant Physiology, 115, 1997, s. 971-980.
- DELPORTE, F.; MOSTADE, O.; JACQUEMIN, J.M.: Plant regeneration through callus initiation from thin mature embryo fragments of wheat. In: Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 67, 2001, s. 73-80.
- FARAGÓ, J.: Explantátové kultúry a rastlinné biotechnológie. Učebné texty, UCM Trnava, 2003.
- INGRAM, H.M.; LIVESEY, N.L.; POWER, B.; DAVEY, M.R.: Genetic transformation of wheat: progress during the 1990s into the Millenium, In: Acta Physiologiae Plantarum, 23, 2001, s. 221-239.
- 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 and Organ Culture, 53, 1998, s. 67-74.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F.: A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. In: Physiologia Plantarum, 15, 1962, s. 473-497.
- SHEWRY, P.R.; JONES, H.D.; HALFORD, N.G.: Plant biotechnology: transgenic crops. In: Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, 111, 2008, s. 149-186.
- VIERTTEL, K.; HESS, D.: Shoot tips of wheat as an alternative source for regenerable embryogenic callus cultures. In: Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 44, 1996, s. 183-188.
- WANG, C.T.; WEI, Z.M.: Embryogenesis and regeneration of green plantlets from wheat (*Triticum aestivum*) leaf base. In: Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 77, 2004, s. 149-156.
- WANG, Y.; XUE, Y.; LI, J.: Towards molecular breeding and improvement of rice in China. In: Trends in Plant Science, 10, 2005, s. 611-614.
- YU, Y.; WEI, Z.M.: Factors affecting efficient plant regeneration from wheat mature embryos. In: Journal of Molecular Cell Biology, 40, 2007, s. 443-450.

VZŤAH MEDZI NUTRIČNÝMI A TECHNOLOGICKÝMI PARAMETRAMI PŠENIČNÝCH ODRÔD A REOLOGICKÝMI VLASTNOSŤAMI CESTA RELATIONSHIP BETWEEN RHEOLOGICAL PROPERTIES OF DOUGH AND TECHNOLOGICAL AND NUTRITIONAL QUALITY PARAMETERS OF WHEAT CULTIVARS

Zuzana ŠRAMKOVÁ – Filip KRAIC – Jana JUROVATÁ – Petr MARTINEK – Michaela HAVRLETOVÁ – Pavol HAUPTVOGEL – Ernest ŠTURDÍK – Edita GREGOVÁ

*In this work, set of 52 wheat cultivars (*Triticum aestivum* L.) was characterized by sixteen variables. Parameters such as protein, starch and β -glucan content, grain hardness, Zeleny sedimentation index and falling number were determined. Rheological properties of dough were also assessed. Chemometrical data analysis revealed relations among the wheat grain quality attributes.*

*Key words: cluster analysis, correlation analysis, principal component analysis, quality, wheat (*Triticum aestivum* L.)*

Introduction

Wheat processing and product quality are important breeding objectives in many parts of the world. Definition of quality varies among regions. Generally, grain hardness, content of proteins and their quality are considered the three main determinants of wheat quality. Because of the fact that leavened bread is in our geographic location the most common form, in which wheat is consumed, the bread-making quality has become one of the most important issue. Devices such as mixograph, farinograph, alveograph etc., are used to characterize dough properties and to predict the bread-making quality of wheat. However, grain quality is not only defined in terms of product processing, but also encompasses nutritional quality, since wheat presents the main source of nutrients to the majority of the world's population. The content of important wheat components, like starch, proteins and fibre, varies directly from climatic and geographic conditions and cultivar.

In our present study, statistic methods were used to observe relationships between tested parameters of technological and nutritional quality of wheat grain.

Material and methods

The set of 52 wheat cultivars (*Triticum aestivum* L.) from the collection of the Genebank Piešťany and Agricultural Research Institute- Agrotest Fyto, Ltd. Kroměříž, was analyzed in our study.

Starch content was determined using the Ewers's polarimetric method (STN 461011-37); falling number was measured according to STN ISO 3093; (1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 4)- β -D-glucan content by Mixed-linkage beta-glucan assay kit (Megazyme International Ireland Ltd.); following parameters: protein content, wet gluten content, Zeleny sedimentation index and grain hardness were determined by NIRS method. Farinograph (Brabender OhG, Duisburg, Germany; ICC 115/1) was used to assess rheological properties of wheat cultivars (water absorption, dough development and stability, degree of dough softening, farinograph quality number).

Statistical calculations were performed using following techniques: principal component analysis (PCA), cluster analysis (CA), correlation analysis, analysis of variance (ANOVA) and linear discriminant analysis (LDA). Commercial software package Statgraphics centurion, JMP (ver. 7.0), SPSS (ver. 15) were used for the performed calculations.

List of variables by which the wheat samples were characterized: dry matter (*DM*), starch content (denominated as *a*, *StDM*, *StRM*, resp.), (1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 4)- β -D-glucan content (*gluc*), protein content (*Prot*), wet gluten content (*glu*), Zeleny sedimentation index (*SedInd*), grain hardness (*Tvr*), falling number (*Pok*) farinographic water absorption (*VazVody*), dough development (*V γ v*), dough stability (*Stab*), degree of dough softening (*M10*, *M12*), farinograph quality number (*FQN*).

Results and discussion

Correlation analysis

The output of correlation analysis is the correlation table (data not shown), which contains pair (or Pearson) correlation coefficients expressing the strength of correlation between all possible pairs of variables. The entries in this table are symmetrical according to diagonal. Correlation table was achieved under the same conditions, which were described in the part of cluster analysis.

The following conclusions from the correlation table: (a) The highest correlations were found between *FQN* and *Stab*. (b) Very high correlations were between *lepDM* and *prot*, *M10* and *M12*. (c) High significant correlations were between *Vyv* and *VazVody*, *M10* and *Stab*, *M12* and *Stab*, *FQN* and *M10* (last three dependences are inverse). (d) Significant correlations were observed between *VazVody* and *Tvr*, *Stab* and *Vyv*, *FQN* and *Vyv*, *FQN* and *M12* (last dependence is inverse). Critical values for correlation coefficients for $n=52$ objects (wheat samples) depend on the probability level: $r_{crit} = 0,2732$ at 95 % (significance level $\alpha=0,05$), $r_{crit} = 0,3218$ at 98 % ($\alpha=0,02$), $r_{crit} = 0,3542$ at 99 % ($\alpha=0,01$).

Cluster Analysis

Generally, the clustering process in cluster analysis may be performed either with objects or variables (Khattree and Naik, 2000). In this work clustering was made for the studied sixteen variables. The result of cluster analysis is a dendrogram depicted in Fig. 1. The basis for the performed calculations were data on 52 objects representing 52 wheat samples from 10 countries measured for each of 16 investigated variables. Ward's method of clustering and squared Euclidean distance was used in these calculations.

Clearly noticeable is the initial clustering of the variables in the left cluster *a*, *StRM* and *StDM* as well as in the central cluster *DM*, *Tvr*, *VazVody*, *Vyv* and in two right clusters *prot* with *lepDM* and *Stab* with *FQN*.

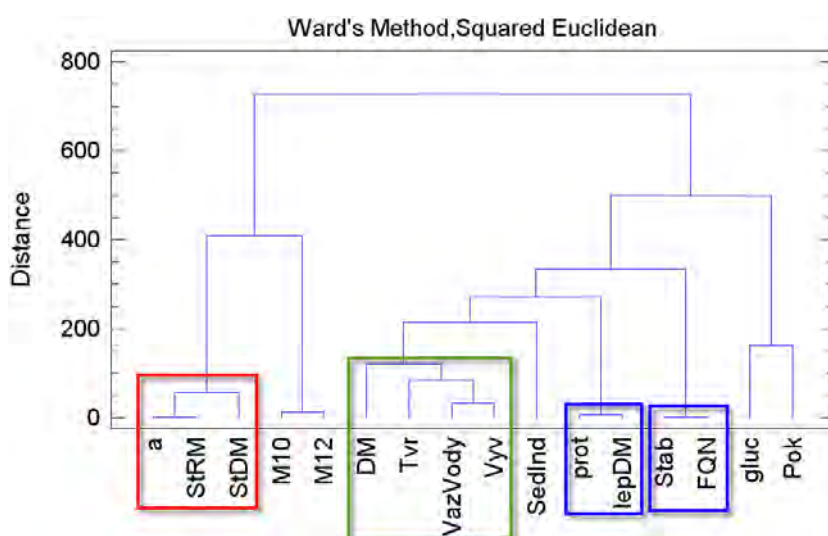


Figure 1: Cluster analysis dendrogram of 16 variables using 52 wheat samples and Ward's clustering technique. Software Statgraphics Centurion.

Linear discriminant analysis (LDA)

LDA is one of the most widely used classification procedures. The method maximizes the variance between categories and minimizes the variance within categories. It merely looks for a sensible rule to discriminate between them by forming linear functions of the data maximizing the ratio of the between-group sum of squares to the within-group sum of squares. The linear functions are constrained to be orthogonal. Once the linear functions have been found, an observation is classified by computing its Euclidean distance from the group centroids, projected onto the subspace defined by a subset of the linear functions. The observation is then assigned to the closest group. To assess the performance of this method, the group centroids are estimated using a 'leave one out' cross-validation method. Each observation is removed in turn from the data set and the group centroids calculated without reference to the missing data point. The excluded observation is then classified using these new group centroids. The data point is then replaced and the next observation removed from the data set. This process is repeated until all observations have been left out in turn. Thus, the percentage of observations correctly classified can be ascertained by comparing the true class membership with that estimated by LDA. This provides a good indication of the reliability of the classification method (Zhang and Wang, 2007).

Classification performance depends on the selected categorical target variable. Figure 2 shows the case when categorical variable *Prot* (protein content) was used as the target variable. 82.7% of the originally grouped objects were correctly classified when the discrimination model was calculated and 61.5% of the objects were correctly classified using leave-one-out cross-validation method. It means that 20 objects out of 52 ones were

categorized into a different category than supposed. Here it can be observed that the first discriminant function DF1 separates the wheat samples by protein content. Cultivars with lower protein content, which were grouped into the B-class according to the STN standard, had low values of DF1. On the other hand, cultivars included in the elite (E, best) class were shown to have high DF1-values. Thus, we can suppose that DF1 axis determines the quality of wheat samples on the basis of protein content.

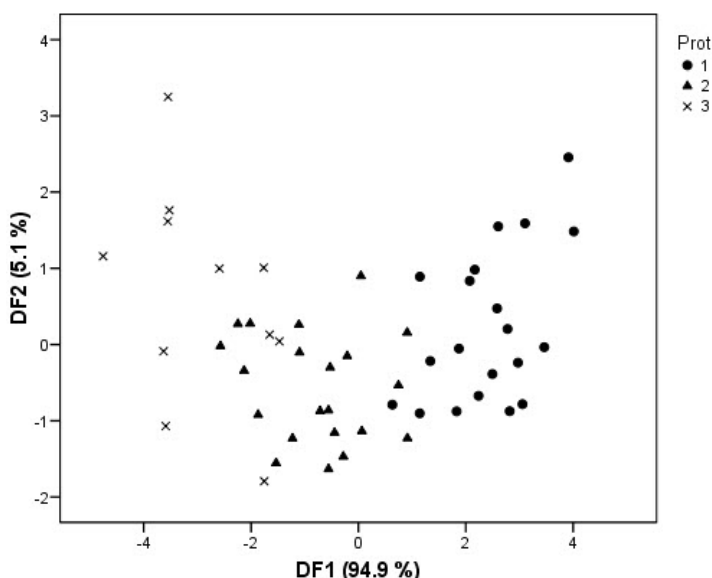


Figure 2: Plot of discriminant functions (DF's) showing 52 wheat samples clustered by protein. A 82.7 % performance was achieved for the wheat samples classification in discrimination model; 61.5 % performance was achieved for the wheat samples classification using leave-one-out validation. Software SPSS 15. Wheat cultivars were distributed by protein content to three classes in accordance with standard STN 46 1100-2 (classes 1-3 on figure represents STN classes E, A and B respectively). 1= elite class (E), marked with dots; 2= good quality class (A), marked with diamonds; 3= standard class (B), marked with plus signs.

Principal component analysis

In principal component analysis, PCA, some natural grouping of the objects (the wheat samples in this work) and the studied variables (the sample characteristics) may be seen. The principal components, PCs, are calculated as the linear combinations of original variables (Sharma 1996, Khattree and Naik, 2000). According to the computed eigenvalues only three out of six principal components (PCs) were found important as their value was larger than 1, which is usually considered as the criterion of significance. Three kinds of graphical outputs are used in the PCA, namely scatterplot showing the objects, the loadings plot showing the variables, and the biplot where both, the objects and variables are depicted together. The advantage of first two graphical representations is a possibility to obtain the 2D graph as well as the 3D illustration where usually the first two or three most important PCs are used as the axes. On the other hand, the biplot, even though plotted in two dimensions, provides some additional information about the studied problem.

Figure 3. exhibits the biplot, which simultaneously represents the wheat samples (depicted here by the numbers) and fifteen original descriptors, depicted by the rays starting from the origin and ending at the point determining the position of the corresponding variable. The samples are here categorized by three quality classes (1 – Elite, 2 – A, 3 – B) by protein content. Even though PCA method is not used for classification, high values of the first principal component, PC1, are observable for the samples from elite class of quality. The factors mostly influencing the first principal component, PC1, are dough stability (*Stab*) and farinograph quality number (*FQN*).

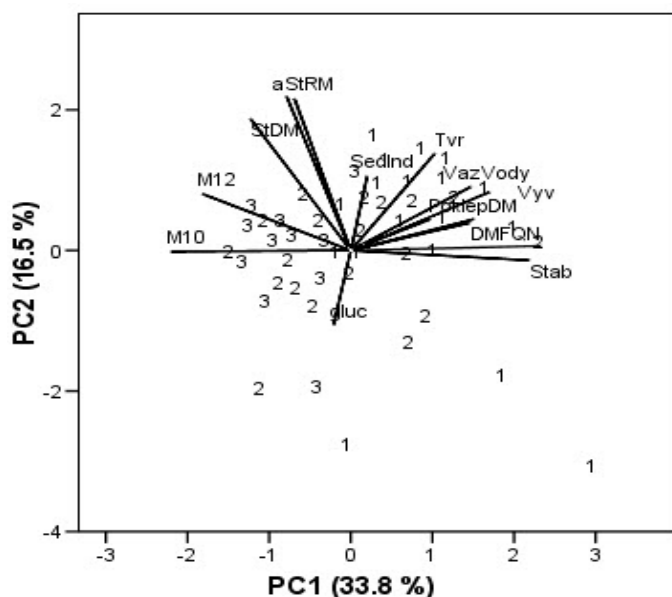


Figure : Biplot PC2 vs. PC1 for 15 measured descriptors and 52 wheat samples. Software SPSS 15.

Conclusion

Using the chemometrical data treatment, we observed close relationship between following parameters: grain hardness, water absorption and dough development. According to our results, high correlation exists between protein content and wet gluten content. These parameters are commonly used in assessment of wheat grain quality for food-processing. Two main clusters of variables were observed on dendrogram. The variables forming the same cluster are most similar; the measure of mutual similarity is given by the distance on the vertical axis of dendrogram. The results of cluster analysis are in agreement with the outputs of correlation analysis.

The obtained results demonstrated a good applicability of the used multivariate statistical methods for graphical representation of the wheat samples in two dimensional visual display. Principal component analysis showed that wheat samples of elite class (high protein content) are characterized by the highest farinographic quality number and dough stability values.

Acknowledgements. This work was supported by the Slovak Research and Development Agency under the contract No. APVV-0770-07 and APVV - No. "SK-CZ-0028-07".

References

- SHARMA, S.: Applied Multivariate Techniques. Wiley, New York, 1996.
 KHATTREE, R., NAIK, D.N.: Multivariate data reduction and discrimination. SAS Institute, Cary, North Carolina, USA, 2000.
 ZHANG, H., WANG, J.: Detection of age and insect damage incurred by wheat, with an electronic nose. Journal of Stored Products Research, 43, 2007, 489–495.

ZHODNOTENIE 14 ODRÔD *BRASSICA NAPUS* Z HĽADISKA PRODUKcie BIOMASY A KVALITATÍVNYCH PARAMETROV SEMIEN EVALUATION OF 14 *BRASSICA NAPUS* GENOTYPES FROM THE ASPECT OF BIOMASS PRODUCTION AND SEED QUALITATIVE PARAMETERS

Elena MASAROVIČOVÁ – Matúš PEŠKO – Katarína KRÁĽOVÁ – Ľubica MALOVCOVÁ

Fourteen rapeseed genotypes were cultivated in the both field and hydroponic conditions. Seeds harvested from field cultivation were analysed on the content and composition of fatty acids. From tested Brassica napus varieties there were 9 line (Catalina, Atlantic, Astrid, Magali, Verona, Robust, Rodeo, Oponent, PR45W04) and 5 hybrid (PR46W10, PR45D03, PR45W31, SDX0083, Baldur) genotypes. Additionally, seed yield per hectare was estimated. Moreover, for seven weeks old plants of tested rapeseed genotypes cultivated in hydroponics shoot and root dry mass was determined. Genotype differences of studied parameters were discussed.

Key words: biomass, Brassica napus L., fatty acids, line and hybrid genotypes, rapeseed oil, seed yield

Úvod

Olejnatosť kapusty repkovej pravej (repka olejka forma ozimná, *Brassica napus* L. subs. *napus* – ďalej len repka), ako najvýznamnejší kvalitatívny znak, je geneticky podmienenou vlastnosťou, pričom ju ovplyvňuje komplex agrotechnických faktorov v nasledovnej postupnosti: odroda (1–4 %), ročník a pestovateľská oblasť (1–3 %), ošetrovanie pôdy po zbere úrody (0,5–1 %), spevnenie pôdy (0,5–1 %). Okrem odrôd sa na olejnatosti semien výrazne prejavuje ročník, pričom lokality s chladným počasím jednoznačne preukázali vyššiu olejnatosť ako lokality s teplým počasím (prehľadne Zupalová et al. 2006).

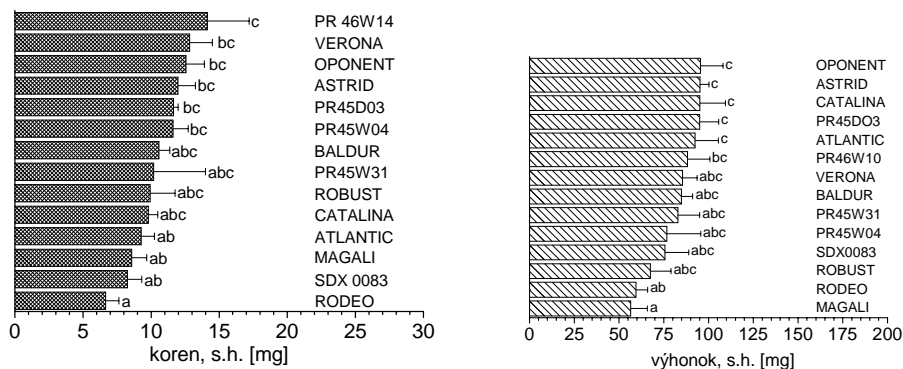
Vzhľadom k tomu, že repka patrí medzi naše agrotechnicky najnáročnejšie plodiny (Surovčík, 2000) a jej úrodovotné prvky (počet rastlín, počet šesľů na rastline, počet semien v šesľů, hmotnosť tisíc semien) sú vo výraznom inverznom vzťahu (Jambor 2007), v našom predchádzajúcom príspevku (Masarovičová et al. 2008b) sme sa venovali štúdiu genotypových rozdielov (odrodovej variability) repky so zreteľom na produkciu semien, obsah a kvalitu oleja. V tomto príspevku sme sa zamerali na zhodnotenie 14 odrôd repky (9 líniové a 5 hybridné odrody) z hľadiska produkcie biomasy a kvalitatívnych parametrov semien.

Materiál a metódy

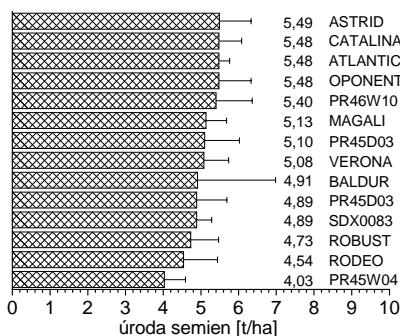
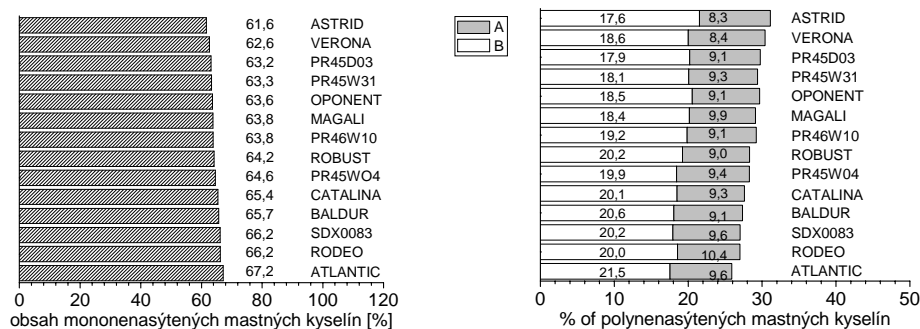
Na poľný experiment sa použili semená deviatich líniových (Catalina, Atlantic, Astrid, Magali, Verona, Robust, Rodeo, Oponent, PR45W04) a piatich hybridných (PR46W10, PR45D03, PR45W31, SDX0083, Baldur) odrôd repky. Semená pre poľné pokusy sa vysiali po predplodine pšenica ozimná dňa 27.8.2007 na experimentálnych plochách SCPV- VÚRV v Borovciach. Podrobný opis použitej agrotechniky je uvedený v našej predchádzajúcej práci (Masarovičová et al. 2008b). Pokus sa realizoval na experimentálnych parcelách (10 m²) v 4 opakovaníach. Zber úrody repky sme vykonali 11.07.2008. Zo semien sa odobrala vzorka pre kvantitatívne a kvalitatívne analýzy repkového oleja (obsah oleja v semenách, obsah a zloženie mastných kyselín v oleji), ktoré vykonalo akreditované pracovisko Štátny veterinárny a potravinový ústav v Bratislave, Skúšobné laboratórium, podľa aktuálnych platných noriem. V prípade laboratórných pokusov semená repky klíčili 6 dní v tme pri teplote 25 °C na filtračnom papieri navlhčenom destilovanou vodou. Potom sa semenáčky repky premiestnili do nádob s Knopovým živným roztokom a pestovali sa 6 týždňov v kultivačnej komore za štandardných podmienok (teplota vzduch 25 °C, energia fotosynteticky aktívneho žiarenia 100 μM m⁻² s⁻¹, fotoperiódá 16 h deň/ 8 h noc). Potom sa u všetkých testovaných odrôd stanovila suchá hmotnosť výhonkov a koreňov. Na štatistické vyhodnotenie výsledkov sa použil test ANOVA.

Výsledky a diskusia

Vzhľadom k tomu, že kvalita oleja je determinovaná zložením nenasýtených mastných kyselín (zastúpené sú hlavne kyselina olejová, linolová, linolénová, eruková a eikosenová) v našej predchádzajúcej práci (Masarovičová et al. 2008b) sme sa venovali štúdiu obsahu týchto kyselín vo vzťahu k úrode semien 6 líniových odrôd repky, ktoré zastupovali všetky 3 základné výrobné oblasti pestovania plodín na Slovensku. V tomto príspevku sme sa zamerali na zhodnotenie 14 odrôd repky (9 líniové a 5 hybridné odrody) z hľadiska produkcie biomasy a kvalitatívnych parametrov semien.



Obr. 1 Suchá hmotnosť koreňov a výhonkov hydroponicky pestovaných rastlín repky olejky. Na štatistické vyhodnotenie výsledkov sa použil test ANOVA.



Obr. 2 Hodnoty úrody semien repky a obsahu mononenasytených a polynenasýtených mastných kyselín (A - kyselina linolová, B - kyselina linolénová) v semenách repky pochádzajúcich z poľných experimentov.

Výsledky z hydroponického pokusu potvrdili štatisticky významné genotypové rozdiely v suchej hmotnosti výhonkov aj koreňov (Obr. 1). Najvyššie hodnoty suchej hmotnosti výhonkov u odrody Oponent, najnižšie u odrody Magali, zatiaľ čo suchá hmotnosť koreňov bola najvyššia u odrody PR46W10 a najnižšia u odrody Rodeo. Pomer suchej hmotnosti výhonku ku koreňu (S/R pomer) testovaných odrôd klesal v nasledovnom poradí: Atlantik: 10,0; Catalina: 9,7; SDX0083: 9,2; Rodeo: 8,9; PR45D03: 8,2; PR45W31: 8,2; Baldur: 8,0; Astrid: 8,0; Oponent: 7,6; Robust: 6,8; PR45W04: 6,6; Verona: 6,6; Magali: 6,6; PR46W10: 6,2. Česká odroda Oponent mala celkovo najvyššie hodnoty suchej hmotnosti nadzemnej časti rastlín, ale aj dobre vyvinutý koreňový systém (v poradí tretí zo 14 pestovaných odrôd), čo sa následne prejavilo v nižšej hodnote pomeru S/R (7,6). Takéto prerozdelenie biomasy je pre rastliny výhodné z hľadiska ich lepšej zásobovateľnosti vodou aj živinami, a teda aj z hľadiska tolerance voči vodnému stresu. Na druhej strane, odrody s väčšou nadzemnou biomasou sú po zbere úrody semena využiteľné aj ako zdroj alternatívnej energie (prehľadne Masarovičová et al. 2008a).

Štatisticky významné genotypové rozdiely v úrode semien potvrdili výsledky z poľného pokusu (Obr. 2). Úroda semien sa pohybovala od 4,03 t/ha (PR45W04), pričom Oponent spolu s odrodami Astrid, Catalina a Atlantic patrili k najproduktívnejším odrodám (5,5 t/ha). Úrodu semena odrody Oponent v rozmedzí 4,5 – 5,3 t/ha v závislosti od pestovateľskej lokality zistili aj Bečka et al. (2006a). Títo autori (Bečka et al. 2006b) tiež zaznamenali vyššiu úrodu semena hybridov repky v porovnaní s líniami repky (v priemere o 18 %), čo sa v prípade nami testovaného súboru líniových a hybridných odrôd nepotvrdilo (Obr. 2).

Semená z poľného pokusu sa analyzovali na obsah nasýtených (arachnová, behénová, myristová, stearová a palmitová kyselina), mononenasýtených (olejová, eikosénová, eruková a palmitoolejová kyselina) a polynenasýtených mastných kyselín (linolová a linolénová kyselina). Celkový obsah nasýtených kyselín sa pohyboval od 6,70 % (Baldur) po 7,24 % (Astrid). Vyšší podiel nasýtených mastných kyselín prispieva k vyššej oxidačnej stabilite oleja. Obsah mononenasýtených mastných kyselín bol v rozsahu 61,6 % (Astrid) až 67,2 % (Atlantic); odroda Oponent mala nižší obsah týchto mastných kyselín (63,6 %) (Obr.2). Dominantnou mononenasýtenou kyselinou v repkovom oleji je kyselina olejová, obsah ktorej sa u testovaných kultivarov pohyboval od 60,24 % (Astrid) až do 65,80 % (Atlantic). Situácia v obsahu polynenasýtených mastných kyselín bola opačná ako v prípade mononenasýtených kyselín, keď odroda Astrid mala najvyššiu (9,6 %) a Atlantic najnižšiu (8,3%) obsah tejto mastnej kyseliny. Oponent patrí medzi odrody s vyšším obsahom polynenasýtených mastných kyselín (9,3 %). Potrebné je zdôrazniť, že kvalitatívne zloženie uvedených mastných kyselín je dôležité vo výrobe kvalitného FAME (metylester repkového oleja) ako biokomponentu alternatívneho motorového paliva „Biodiesel“ (oxidačná stabilita a chladová odolnosť oleja; porovnaj Buchta 2004). Totiž je známe, že vyšší podiel polynenasýtených mastných kyselín (hlavne kyseliny linolovej a kyseliny linolénovej) znižuje oxidačnú stabilitu, ale na druhej strane zvyšuje chladovú odolnosť oleja (Jevič a Šedivá, 2004). Poznávame, že v prípade všetkých študovaných odrôd repky sa obsah kyseliny erukovej pohyboval od < 0,01 do 0,05%, čo spĺňa kritéria STN 46 2300-2.

Prezentované výsledky skríningu produkcie biomasy a kvalitatívnych parametrov semien 14 odrôd *B. napus* poskytujú prospešné informácie domácim pestovateľom repky o ich genotypových rozdieloch, ktoré by sa potom dali využiť pri selekcii najvhodnejších odrôd repky hlavne v kukuričnej výrobní oblasti. Potrebné je však zdôrazniť, že základný a aplikovaný výskum olejnin, vrátane repky, ako aj moderné biotechnologické a komerčné aplikačné výstupy na Slovensku výrazne zaostávajú za Českou republikou. ČZU v Prahe spolu so Zemědělskou společností při ČZU v Prahe – pobočka FYTO a katedra rostlinné výroby (motto: *Agricultura – Scienita – Prosperitas*) sú dlhoročnými organizátormi pravidelných konferencií s medzinárodnou účasťou špecializovaných na olejninu. Široko koncipovaný program konferencií je zameraný na šľachtenie, pestovanie, ochranu, a odrodové skúšky olejnin, na nové technológie pri zbere olejnin, na ich agroekonómiu aj biotechnologické využitie (vrátane biopalív). Skutočnosť, že v Českej republike si uvedomujú dôležitosť takto koncipovaných odborných podujatí potvrdzuje niekoľko desiatok sponzorov, ktorí tieto aktivity finančne podporujú. Zdá sa, že súčasný prístup vo financovaní výskumu ako aj daňová politika, ktorá sa u nás v oblasti spracovávaní a využívania repky aplikuje danej situácii neprospeje.

Záver

Výsledky z hydroponického pokusu potvrdili štatisticky významné genotypové rozdiely v suchej hmotnosti výhonkov aj koreňov. Najvyššie hodnoty suchej hmotnosti výhonkov sa zistili u odrody Oponent, najnižšie u odrody Magali, zatiaľ čo suchá hmotnosť koreňov bola najvyššia u odrody PR46W10 a najnižšia u odrody Rodeo. Pre produkčnú charakteristiku S/R pomer sme zistili najvyššiu hodnotu u odrody Atlantic a najnižšiu u odrody PR46W10. Česká odroda Oponent patrí k odrodám s dobre vyvinutým koreňovým systémom, čo je výhodné z hľadiska ich lepšej zásobovateľnosti vodou aj živinami, a teda aj z hľadiska tolerancie voči vodnému stresu. Štatisticky významné rozdiely sa potvrdili v poľných pokusoch aj v prípade úrody semien. Oponent patrí medzi odrody s vysokou úrodou semena a vyšším obsahom polynenasýtených mastných kyselín (hlavne kyseliny linolovej a linolénovej) v oleji, čo je dôležité z hľadiska kvality FAME ako biokomponentu pre alternatívne motorové palivo „Biodiesel“.

Pod'akovanie: Práca bola finančne podporená Združením pre výrobu a využitie biopalív AZC, a.s.

Literatúra

- BEČKA, D., VAŠÁK, J., ŠTRANC, P. 2006a: Odrúďová agrotechnika – výsledky poloprovozných pokusů 2005/06. p.25-31. Sborník z konferencie „Prosperující olejninu“. ČZU v Praze, Katera rostlinné výroby Fakulty agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, 13.12.2006.
- BEČKA, D., VAŠÁK, J., CIHLÁŘ, P. 2006b: Odrúďová agrotechnika – maloparcelkové pokusy v Červeném újezdě 2005/06. p.32-40. Sborník z konferencie „Prosperující olejninu“. ČZU v Praze, Katera rostlinné výroby Fakulty agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, 13.12.2006.
- BUCHTA, J., 2004: Motorové oleje – biopalivá.

<http://www.cappo.cz/veletrh2004/buchta2.html>

JAMBOR, M., 2007: Výsledky poloprevádzkových odrodových pokusov s ozimnou repkou olejkom.

<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., 2008a: 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.

MASAROVIČOVÁ, E., KRÁĽOVÁ, K., MALOVCOVÁ, Ľ., SUROVČÍK, J., BERESTIČ, M., OLŠOVSKÁ, K., 2008b: Genotypové rozdiely repky olejky z hľadiska obsahu oleja, kvality oleja a produkcie semien. p.19-22. Zborník z konferencie „Nové poznatky z genetiky a šľachtienia poľnohospodárskych rastlín, VÚRV Piešťany, 12.-13.11.2008.

SUROVČÍK, J.: Úrodová reakcia repky olejky f. ozimnej na aplikáciu pesticídov. Sborník referátů z XV. České a Slovenské konference o ochraně rostlin. September 12. - 14., 2000, Vyd. Konvoj, p. 253-254.

ZUKALOVÁ, H., BEČKA, D., VAŠÁK, J.: Kvalita olejin - I. Řepka ozimná. P.73-78. Sborník z konferencie „Prosperující olejniny“. ČZU v Praze, Katerina rostlinné výroby Fakulty agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, 13.12.2006.

EFEKTÍVNOSŤ IZOLAČNÝCH VZDIALENOSTÍ PRI PESTOVANÍ GENETICKY MODIFIKOVANEJ KUKURICE V SR

EFFECTIVENESS OF ISOLATION DISTANCES FOR THE CULTIVATION OF GENETICALLY MODIFIED MAIZE IN SLOVAKIA

Ľubomír HORVÁTH – Miroslava FEKETOVÁ

Effectiveness of isolation distances for the cultivation of genetically modified crops is most important factor to achieve appropriate level of GM contamination of neighbouring non-GM field products and to achieve desired coexistence level of GM and non-GM crops in conventional and ecological farming. The level of GM maize MON 810 contamination of neighbouring conventional maize fields in Slovakia in 2006, 2007 and 2008 is presented and evaluated in dependence on isolation distances between GM and non-GM fields. Testing of neighbouring conventional maize products were performed by using statistical sampling of harvested crops from individual fields in compliance with ISTA Rules for Seed Testing and Recommendation No. 2004/787/EC and tested by using a real-time PCR procedure for MON 810 maize quantification according to EN ISO 21570.

Cultivation of GM crops for commercial use in Slovakia has started in 2006. Cultivated area of three fields with GM maize, each situated in different county, represented totally 33 ha. Sixteen farmers grew approximately 949 ha of GM maize on 28 fields in 2007 and thirteen farmers grew 1942 ha of GM maize on 40 fields in 2008. Cultivated GM maize hybrids were based on the event MON 810. Isolation distances between GM and non-GM fields vary between 200 m and 1500 m (minimum isolation distance according to the Slovak national legislation is 200 m for conventional crops and 300 m for ecological farming).

No contamination of neighbouring fields was observed in 2006. Together 7 neighbouring non-GM maize fields were contaminated due to MON 810 event in 2007 and 19 non-GM maize fields were contaminated in 2008. GM contamination vary between 0,02% and 0,83% (w/w) of MON 810. Relationship between GM contamination level and isolation distances and between the number of contaminated fields per individual distances versus isolation distances were analysed.

Statistically was documented decreased relationship between GM contamination and isolation distances. Measured data were extrapolated by logarithmic and polynomial regression curves. Obtained trends give GM contamination between 0,15% for isolation distances of 200 m, 0,12% for isolation distances of 300 m and 0,20% for isolation distances of 100 m. The highest distance with positive contamination was 750 m (0,03%) and so extrapolated 0% value of GM contamination is at 1500 m.

Within isolation distances between 200 and 400 m there was observed a very high increasing of GM contamination and this data are not statistically consistent with data for other distances. GM admixtures in harvested crops are caused due to combined factors as crosspollination, contamination by sowing machines, harvesting machines, by transport, storage, etc. Up to these distances (200 – 400 m) agrotechnical activities are probably realized concurrently and using the same machinery (i.e. higher probability of contamination).

Consumer and producer risks (α -risk and β -risk) were analysed for minimal isolation distances (200 and 300 m) in conditions of actual GMO limits, determined GM admixtures and used testing procedures. Calculated values gives good results for conventional maize production, i.e. for 0,9% GMO limit, isolation distances 200 m and approximately 0,2% GMO level impurities, which can production practice support. Obtained values of consumer β -risk is 4,8% and producer α -risk is 0% are sufficient for conventional maize production, and confirming optimal value of minimal isolation distances (200 m).

But risk values for ecological maize production gives bad results, i.e. for 0,01% GMO limit, isolation distances 300 m and approximated 0,12% GMO level production impurities at this distances. Computed value of consumer β -risk is 50% and producer α -risk over 98%, which are fully insufficient values for ecological maize production. Isolation distances 300 m are not sufficient for ecological maize production at the condition of recent production practice in SK.

Key words: GMO, MON810 cultivation, coexistence, isolation distances, impurities.

Introduction

Control and measurements of coexistence between GM and non-GM agricultural crops in Slovakia are based on the Act No. 184/2006 on regulation of cultivation of GM plants in agriculture and Decree of Ministry of Agriculture No. 69/2007 with technical rules for cultivation of GM plants in agriculture. The Department of Molecular Biology NRL of the Central Control and Testing Institute (CCTIA) executed detection, identification, quantification and evaluation of GM admixtures in harvested crops in non-GM fields. Inspection of GM fields and neighbouring conventional maize fields (including field characteristics as distances, areas, flowering synchronicity, prevailing wind, etc.) and sampling of harvested crops ensure seed inspectors of the CCTIA.

Together from 3 fields in 2006, from 40 of neighbouring conventional maize fields in 2007 and from 40 of neighbouring conventional maize fields in 2008 the harvested lots of products were individually sampled and adequate number of incremental bulk, laboratory and control samples were prepared and tested for presence of MON810 hybrids. Distances between GM maize fields and conventional maize fields were varying between 200 and 1500 m. Maize buffer zones 35 or 80 rows wide were applied around the GM maize fields and 200 m wide isolation distances from nearest conventional maize fields were used. Minimum isolation distance between GM and conventional maize according to Decree No 69/2007 is 200 m, or

equivalent buffer rows number (1 row is equal to 2 m distance). Testing of neighbouring conventional maize products was realized after harvesting of maize fields (i.e. measured GM admixtures in harvested crops are caused due to all factors as crosspollination, contamination by sowing, harvesting, transport, storage, etc.).

Material and methods

Sampling procedures were done according to ISTA rules and Recommendation No. 2004/787/EC. Analytical and control samples with minimum 3000 maize grains were taken out from appropriate number of composite samples and used for testing of mean level of GMOs contamination.

Construct-specific real-time PCR method according to EN ISO 21570 and CTAB method for DNA extraction according to EN ISO 21571 were used for GMO detection and quantification. Maize samples were grinded by using LM 3303 laboratory mill, at least 100 g of individual samples were homogenized and 2g of each sample were incubated for 1 h at 60°C in 10 ml of CTAB lysis buffer with proteinase K, followed by chloroform / isopropanol treatment and ethanol precipitation of DNA. DNA was purified using Wizard or JetQuick spin columns and dissolved in TE buffer. DNA samples were quantified using UV-VIS spectrophotometer and agarose electrophoresis, 50 ng of sample DNA per 25 µl PCR reaction volume was used. For MON810 target sequence detection MON810 2-5' and MON810 2-5' primers and TaqMan labelled probe MON810-Taq were used. For maize reference sequence detection SSIIb 1-5, and SSIIb 1-3' primers and TaqMan labelled probe SSIIb-Taq were used. Real-time PCR testing was performed using ABI7900 HT System. IRMM maize powder CRMs (ERM-BF413, MON810 - 5%, 2%, 1%, 0.5% and 0.1%) and ΔC_t procedure in three repetitions for each analyzed sample were used. All of the liquid handling operations were performed by using epMotion LH system. Quantitative results were in mass fractions, in DNA copy number and in relative number of GM maize grains expressed. Consumer and producer risks (α -risk and β -risk) were analysed according to Remund et al (2001).

Results and discussion

No detectable GM contamination of conventional maize fields was observed in 2006. The GM contamination of non GM maize fields products was detected together in 7 fields (~ 17,5% of tested fields) in 2007 and in 19 fields (~ 47,5% of tested fields) in 2008. The GM contamination level within 7 fields in 2007 was between 0,01% and 0,15% (w/w) and the mean contamination was 0,03%. The GM contamination level within 19 fields in 2008 was between 0,01% and 0,83% (w/w) and the mean contamination was 0,21%. Flowering of both types of fields (GM and non-GM) was assumed as synchronous (< 10 days).

Quality of the sampling procedure was tested according to quantitative testing of independently prepared control samples. Both pairs of results were in good conformity and inside of expanded uncertainty interval ($k=2$).

The level of neighbouring fields contamination by MON810 within 2007 and 2008 is presented in Graph 1. Values are extrapolated by logarithmic trend curve. Extrapolated values for 300 m distance is 0,12%, for 200 m 0,15% and for 100 m 0,2% of GMO. The highest detected distance with positive contamination was 750 m and extrapolated value to 0% of GM contamination is 1500 m.

Increase of ratio of GM contaminated fields for decreased isolation distances is presented in the Graph 2. Logarithmic trend curve good extrapolate relationship between isolation distances and relative number of contaminated fields. Increase of the number of contaminated neighbouring fields related to year of cultivation is presented in the Graph 3. Increase of the mean level of GM contamination of non-GM fields related to year of cultivation is presented in the Graph 4.

Results presented in above mentioned graphs No 1, 2 and 3 give information on real situation in agricultural production practices within mentioned 3 years.

Within isolation distances between 200 and 400 m there was observed a very high increasing of GM contamination and this data are not statistically consistent with data for other distances. GM admixtures in harvested crops are caused due to combined factors as crosspollination, contamination by sowing machines, harvesting machines, by transport, storage, etc. Up to these distances (200 – 400 m) agrotechnical activities are probably realized concurrently and using the same machinery (i.e. higher probability of contamination). Consumer and producer risks (α -risk and β -risk) were analysed for minimal isolation distances (200 and 300 m) in conditions of actual GMO limits, determined GM admixtures and used testing procedures. Calculated values gives good results for conventional maize production, i.e. for 0,9% GMO limit, isolation distances 200 m and approximately 0,2% GMO level impurities, which can production practice support. Obtained values of consumer β -risk is 4,8% and producer α -risk is 0% and they are sufficient for conventional maize production. But risk values for ecological maize production give bad results, i.e. for 0,01% GMO limit, isolation distances 300 m and approximated 0,12% GMO level production impurities at this distances. Computed value of consumer β -risk is 50% and producer α -risk over 98%, which are fully insufficient values for ecological maize production.

Conclusion

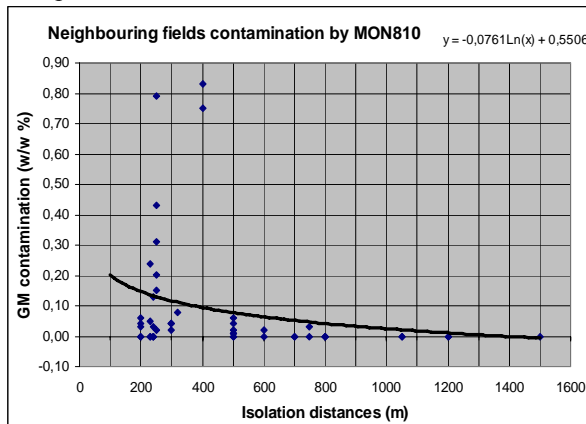
Objective of above listed analyses was to verify effectiveness of isolation distances, national legislation, technical rules and production practice to ensure the coexistence of GM maize with conventional and ecological farming in Slovakia.

Obtained values of producer α -risk and consumer β -risk confirmed optimal value of minimal isolation distances (200 m) for conventional maize farming and they are sufficient to ensure the contamination level under 0.9%, which is required for conventional plant products in the EU. But obtained values α -risk and β -risk for isolation distances 300 m are not sufficient for ecological maize production on the condition of recent production practice in SK.

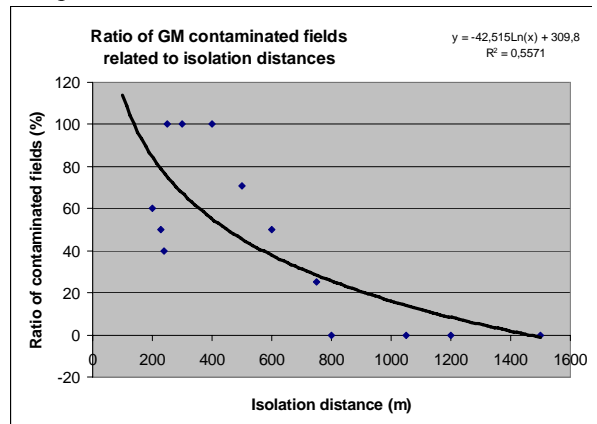
Literature

- HORVATH, L. - HUDECOVA, Z. - FEKETOVA, M.: Control of Coexistence between GM and non-GM Agricultural Crops in Slovakia. Book of Abstracts. 3rd International Conference on Coexistence GM and non-GM based Agricultural Supply Chains. 20-22 November 2007, Sevilla (Spain), p.351-352.
- HORVATH, L. - FEKETOVA, M.: Measurement of the Mean Level of GM Maize Contamination in non-GM Fields in Term of Coexistence between GM and non-GM crops. Book of Abstracts. 1st Global Conference on GMO Analysis, 24-27 June 2008, Como, Italy, p.115.
- REMUND, Kirk, M. et al.: Statistical considerations in seed purity testing for transgenic traits. Seed Science Research, 2001, 11, p.101–119.
- TATAROVÁ, M.: Správa o výkone zákona č. 184/2006 Z. z. o pestovaní geneticky modifikovaných rastlín v poľnohospodárskej výrobe v znení neskorších predpisov za rok 2008. ÚKSÚP Bratislava, 2009.

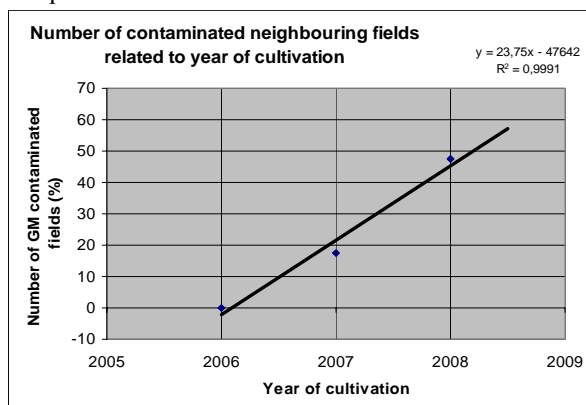
Graph 1:



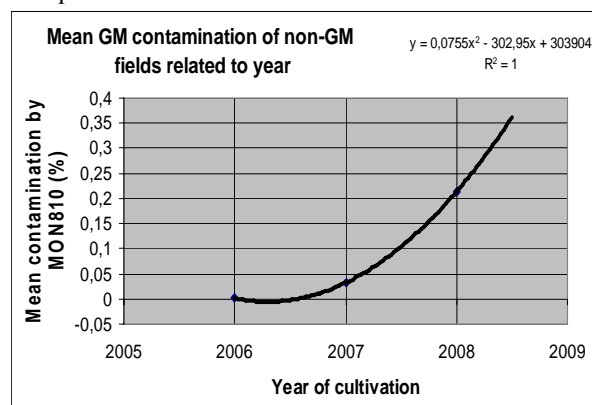
Graph 2:



Graph 3.:



Graph 4:



VPLYV DUSÍKA A SELÉNU NA OBSAH β -GLUKÁNU V ZRNE OVSA SIATEHO (*AVENA SATIVA* L.)

THE INFLUENCE OF NITROGEN AND SELENIUM ON β -GLUCAN CONTENT IN OAT GRAIN (*AVENA SATIVA* L.)

Andrea HLINKOVÁ – Michaela HAVRLENTOVÁ – Daniela DVONČOVÁ – Ľubomír MENDEL – Ján KRAIC

β -glucan is a common cell wall polysaccharide of Poales with elevated content in the endosperm cell walls of oat and barley. Its content in cereals can be influenced by both genetic and environmental factors. The influence of various nitrogen amounts and combination of nitrogen and selenium on the β -glucan content in oat grains was monitored in presented work. Four oats (two naked and two hulled) were grown in two years (2007 and 2008) in experimental field of the Plant Production Research Center in Vigľaš-Pstruša in eight variants of nitrogen and selenium fertilization. β -glucan content was measured by enzymatic method (Megazyme International Ireland, Ltd.). Variation influenced by different nitrogen and selenium application within experimental plots and during both years was observed. The highest content of β -glucan in 2007 was detected for the variant six, where nitrogen was applied to the soil before the seeding and then supplemented during the growth on the ground of soil analysis. The highest content of monitored polysaccharide in 2008 was evaluated for the variant eight, by which the soil was enriched by both nitrogen and selenium in amount of 15 kg.ha⁻¹ and 5 g.ha⁻¹, respectively. On the other hand, the supplementation with only nitrogen reduced the β -glucan level in oat samples. We can conclude that there exists not only strong influence of fertilization, but also effect of growing year on the variation in β -glucan content in oat grains. Our results can be used in growing and breeding programmes with the aim to cultivate plants with higher quality of the grain in the case of health beneficial β -glucan.

Key words: β -glucan, oat, nitrogen, selenium, genotype, variability

Úvod

Ovos siaty (*Avena sativa* L.) je obilnina z nutričného a dietetického hľadiska vysoko cenená. S jeho výživovými hodnotami, ktoré poukazujú na priaznivý pomer bielkovín a sacharidov, vhodný obsah nenasýtených mastných kyselín a vysoký obsah vlákniny, hlavne β -glukánu, je spojené jeho využitie v produkcii funkčných potravín. Záujem o produkciu ovsa sa zvýšil po tom, čo Americký vládny úrad pre výživu a liečivá uznal ovsené plevy ako potravinu, ktorá môže znižovať riziko srdcových chorôb v dôsledku fyziologických účinkov β -glukánu znižovaním hladiny cholesterolu v ľudskom sére (FDA, 1997).

β -glukán je celulóze podobná slizovitá látka, ktorá sa nachádza v okrajových vrstvách endospermu obilnín. V najväčšej miere je zastúpený v zrnách ovsa a jačmeňa. Jeho architektonická úloha je formovať tenkú povrchovú vrstvu na celulózových mikrofibrilách, aby tieto mohli interagovať počas rastu s ostatnými celulózou poprepletanými glykánmi. Po chemickej stránke je lineárny, viskózný homopolysacharid tvorený β -(1 \rightarrow 3) a β -(1 \rightarrow 4)-D-glukopyranózovými jednotkami. β -glukán je známy množstvom zdraviu prospešných účinkov na ľudský organizmus. Je považovaný predovšetkým za veľmi účinný aktivátor imunity. Pomáha znižovať hladinu celkového i LDL cholesterolu v krvi a tak redukovať riziko vzniku srdcovo-cievnych chorôb, má schopnosť spomaliť absorpciu glukózy v krvi a preto môže u ľudskej populácie redukovať výskyt cukrovky. V potravinárskej technológii sa uplatňuje ako zahusťovadlo, či pri výrobe nízkotučných produktov. Iné výskumy poukazujú na jeho schopnosť zlepšiť senzorické vlastnosti potravín. V praxi sú známe jeho aplikácie i v kozmetickom priemysle. Biosyntéza β -glukánu je katalyzovaná β -glukán syntetázou, pričom ako donorový substrát vstupuje uridindifosfát glukóza (UDP-Glc). Zistilo sa, že syntéza β -glukánu prebieha v Golgiho membráne a vyžaduje prítomnosť Mg²⁺ alebo Mn²⁺ a má hodnotu Michaelisovej konštanty typickú pre UDP-Glc. Množstvo β -glukánu v zrnách obilnín je polygénou črtou a je pod kontrolou génov s prevažne aditívnym efektom. Podmienky pestovania majú výrazný vplyv na hladinu β -glukánu. Interakcia genotyp x prostredie je významným preukazným zdrojom variácie v obsahu β -glukánu, avšak genotyp je prostrediu nadradený. Zvýšená hladina aplikovaného dusíka v hnojive zvyšuje obsah bielkovín, β -glukánu, avšak môže znižovať hladinu lipidov v zrne ovsa. Výsledky výskumu Brunnera a Feeda (1994) naznačujú, že prostredie, najmä pôdny dusík a klimatická premenlivosť roka, sú dôležité pri určení koncentrácie β -glukánu, nakoľko zvýšenie hodnôt aplikovaného dusíka inklinovalo k zvýšeniu obsahu β -glukánu v zrnách. Významné sú aj interakcie odroda x ročník alebo odroda x lokalita. Je známe, že bilancia dusíkatého hnojiva môže byť do značnej miery podmienená závlahou pôdy alebo zrážkami. Güler (2003) potvrdil negatívny vplyv zavlažovania na obsah β -glukánu, pričom obsah daného metabolitu bol ovplyvnený len množstvom aplikovaného dusíka. Napriek tomu, že vplyv selénu na obsah β -glukánu zatiaľ nebol preukázaný, najnovšie výskumy preukazujú na významný vplyv daného mikroprvku na zvyšovanie obsahu vybraných aminokyselín, predovšetkým izoleucínu v zrnách jačmeňa (Duma a Karklina (2008)).

Materiál a metódy

V práci sa použili 4 odrody ovsu siateho, dve plevnaté (Vendelin, Zvolen) a dve nahé (Detvan a Avenuda) vysiate v dvoch ročníkoch (2007, 2008). Proces vysievania a hnojenia sa realizoval na pokusných plochách VŠS Vígľaš – Pstruša, pričom sa použilo deväť variantov dusíkatej výživy (Tab.1) a každý variant sa vysial v štyroch opakovaníach.

Tabuľka 1: Varianty dusíkatej výživy ovsu

Var.	N	N	Se	P	K
	<i>kg.ha⁻¹</i>	<i>kg.ha⁻¹</i>	<i>g.ha⁻¹</i>	<i>kg.ha⁻¹</i>	
1.	0	0	0	P	K
2.	N _{PS} do 0,3 m 100 % využitie N _{an} na úrodo 4 t.ha ⁻¹	N1	0	P	K
3.	N _{PS} do 0,6 m 50 % využitie N _{an} na úrodo 4 t.ha ⁻¹	N2	0	P	K
4.	N _{PS} do 0,3 m 100 % využitie N _{an} na úrodo 4 t.ha ⁻¹ + N v DC 29	N1+15	0	P	K
5.	N _{PS} do 0,6 m 50 % využitie N _{an} na úrodo 4 t.ha ⁻¹ + N v DC 29	N2+15	0	P	K
6.	N _{PS} do 0,3 m 100 % využitie N _{an} na úrodo 4 t.ha ⁻¹	N1	5	P	K
7.	N _{PS} do 0,6 m 50 % využitie N _{an} na úrodo 4 t.ha ⁻¹	N2	5	P	K
8.	N _{PS} do 0,3 m 100 % využitie N _{an} na úrodo 4 t.ha ⁻¹ + N v DC 29	N1+15	5	P	K
9.	N _{PS} do 0,6 m 50 % využitie N _{an} na úrodo 4 t.ha ⁻¹ + N v DC 29	N2+15	5	P	K

N_{PS} – dusík aplikovaný pred sejbou,

N_{DC29} – dusík aplikovaný počas vegetácie vo fáze 29 DC - koniec odnožovania ,

N1, N2 – varianty hnojenia dusikom podľa analýz pôdy,

P – dávka fosforu bude konštantná, v závislosti od stanoveného obsahu prvku v pôde,

K – dávka draslíka bude konštantná, v závislosti od stanoveného obsahu prvku v pôde.

Rôzne dávky dusíkatých hnojív sa aplikovali v dvoch termínoch (pred sejbou a kombinácia hnojenia pred sejbou a počas vegetácie). Taktiež niektoré varianty boli fortifikované selénom v množstve 5g.ha⁻¹. Obsah β-glukánu sa stanovil enzymatickou súpravou Mixed-linkage beta-glucan assay procedure K-BGLU 04/06 (Megazyme International Ireland, Ltd.) (McCleary, 2006). Každá vzorka sa podrobila analýze v dvoch opakovaníach a výsledné hodnoty sa prepočítali na sušinu. Získané údaje boli spracované pomocou štatistického balíka Statgraphics 5.0 pomocou analýzy rozptylu (ANOVA) využitím všeobecného lineárneho modelu (GLM), na hodnotenie štatistickej významnosti rozdielov priemerov (P<0,05) bola použitá metóda najmenších štvorcov (LSD).

Výsledky a diskusia

V prípade nahej odrody Avenuda, na základe výsledkov môžeme usúdiť, že hodnotené ročníky 2007 a 2008 sa prejavili rôzne na obsahu β-glukánu. Kým v roku 2007 bola kontrolná hodnota najnižšia (4,41 %) a všetky varianty hnojenia spôsobili zvýšený obsah β-glukánu (4,66-5,58 %), v roku 2008 bola situácia odlišná. Obsah β-glukánu je výrazne ovplyvnený nielen genotypom, ale aj faktormi prostredia (Johansson a kol., 2000; Ames a kol., 2006) a interakcia genotyp x prostredie je významne preukazným zdrojom variácie v obsahu danej látky, preto bolo možné očakávať vplyv ročníka s rozdielnym priebehom počas vegetácie. V prípade danej odrody sa v roku 2007 ako najlepší variant prihnojovania s najvyšším nárastom v obsahu β-glukánu (5,58 %) prejavil variant 4 avšak v roku 2008 sa práve tento variant prejavil ako najhorší, keď spôsobil výrazný pokles hladiny sledovanej látky. Taktiež i prípade odrody Detvan boli hodnoty sledovanej látky v prípade kombinácie prvkov dusík a selén vyššie oproti kontrole. Pohybovali sa v rozmedzí 4,16 až 4,93 %. Ako najlepší variant výživy, s najvyšším obsahom β-glukánu, sa prejavil v roku 2007 v prípade odrody Detvan variant 8 a v roku 2008 variant 9 aj keď hodnota obsahu β-glukánu bola len o 0,07 % vyššia oproti kontrolnej hodnote.

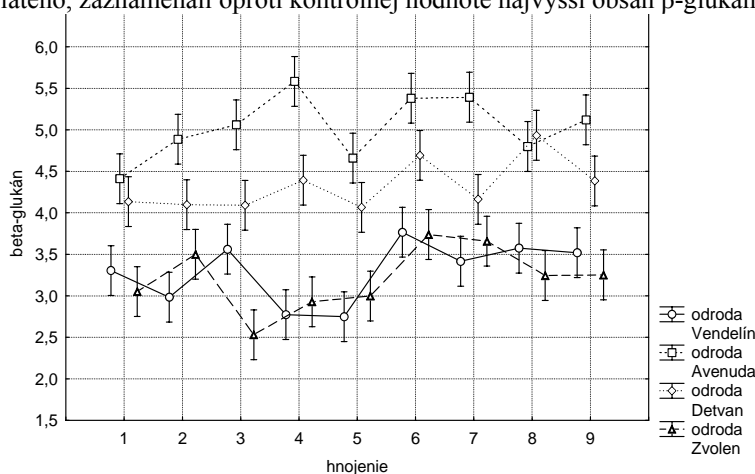
V roku 2007 disponovala plevnatá odroda Vendelin v kontrolnom variante obsahom β-glukánu v hodnote 3,30 %. Kým v prípade dusíkatej výživy boli hladiny β-glukánu oproti kontrolnej hodnote nižšie, v prípade prihnojovania rastlín selénom sme pozorovali pri všetkých variantoch nárast v obsahu danej látky v zreých zrnách. Obsahy sa pohybovali v rozmedzí 3,42-3,77 %. Ako najlepší variant výživy môžeme pre rok 2007 vyhodnotiť variant 6. V roku 2008 sme prípade dusíkateho hnojenia a obdobne pri prídavku selénu sme pozorovali i stúpajúci i klesajúci trend oproti kontrole. Najvyšší obsah β-glukánu sme pozorovali pri variante 8.

V prípade posledného hodnoteného materiálu, plevnatej odrody Zvolen, môžeme konštatovať, že rok 2007 a rôzne formy hnojenia sa prejavili na variabilite v obsahu β-glukánu rôznorodo. Priemerná hodnota v kontrolnej vzorke bola 3,05 % a hodnoty pri dusíkatej výžive i prídavku selénu boli variabilné, i nižšie i vyššie oproti kontrole. Avšak v prípade suplementu selénom môžeme konštatovať, že hladiny obsahu β-glukánu boli vo všetkých štyroch variantoch vyššie oproti kontrole, pohybovali sa v hodnotách 3,24 až 3,74 %. Najvyšší obsah β-glukánu sme zaznamenali pri variante 6. V roku 2008 reagovala odroda z hľadiska

variability v obsahu β -glukánu na výživu dusíkom i selénom obdobne ako v predchádzajúcom roku. Hodnoty sa pohybovali v rozmedzí 3,61 až 4,44 %. Jednoznačne variant 8 môžeme hodnotiť ako variant s najvyšším nárastom (4,44 %) v obsahu β -glukánu.

Naše výsledky ukazujú, že fortifikácia pôdy má vplyv na variabilitu v obsahu β -glukánu. V roku 2007 sme oproti kontrolnému variantu vo všeobecnosti vo všetkých variantoch, kde bol pridávaný dusík a selén, pozorovali nárast hladiny β -glukánu. V prípade roku 2008 medzi jednotlivými variantmi sú taktiež výrazné rozdiely v obsahu β -glukánu. Oproti kontrolnému variantu sme pozorovali pri variantoch 2 a 3, tiež 4 a 5, ale i pri variantoch 6 a 9, pri ktorých bola pôda fortifikovaná okrem dusíka i selénom, zníženú hladinu β -glukánu. Aj tieto rozdiely v obsahu β -glukánu medzi jednotlivými rokmi poukazujú na výrazný vplyv prostredia, pravdepodobne vplyv teplotných a zrážkových pomerov v jednotlivých sledovaných rokoch.

V roku 2007 reagovali nahé genotypy Avenuda a Detvan na dusíkaté hnojenie pomerne zhodne, avšak sa v najvyššej pozorovanej hodnote β -glukánu výrazne líšili (Obr.1). Zatiaľ, čo pri genotypy Avenuda sme zaznamenali oproti kontrole najvyššiu hodnotu pri variante 4, genotyp Detvan obsahoval najvyšší obsah daného zdravíu prospešného polysacharidu pri variante 8. Odrody Zvolen a Vendelin, ktoré predstavujú plevnatý typ ovsa siateho, zaznamenali oproti kontrolnej hodnote najvyšší obsah β -glukánu pri variante 6.



Obr.1: Variabilita v obsahu β -glukánu v sledovanom roku 2007 v jednotlivých odrodách vzhľadom na varianty dusíkatej výživy

Obrázok 2 poukazuje, že v druhom hodnotenom roku obe nahé odrody reagovali rôzne na fortifikáciu dusíkom a selénom, najmä pri variantoch 2-5 a taktiež sa odlišujú vo variante s najvyšším obsahom daného metabolitu. Zatiaľ čo odroda Detvan obsahovala najvyšší obsah pri variante 9 (suplementácia selénom), v prípade druhej nahej odrody Avenuda sa ako variant s najvyšším zastúpením β -glukánu prejavil kontrolný variant. V prípade odrody Zvolen sme pri všetkých variantoch okrem kontrolného sledovali zvýšenú hladinu daného metabolitu a tak celkovo už od variantu 2 možno pozorovať stúpajúci trend hladiny β -glukánu, až na najvyššiu hodnotu pri variante 8 a následný pokles vo variante 9 (podobne ako pri nahej odrode Avenuda). Odroda Vendelin disponuje v hodnotenom roku 2008 najvyššou hladinou β -glukánu pri rovnakom variante výživy ako odroda Zvolen, ide o variant 8. Taktiež aj pri tejto odrode sme pozorovali pri variante 9 pokles v hladine danej zložky zrna.

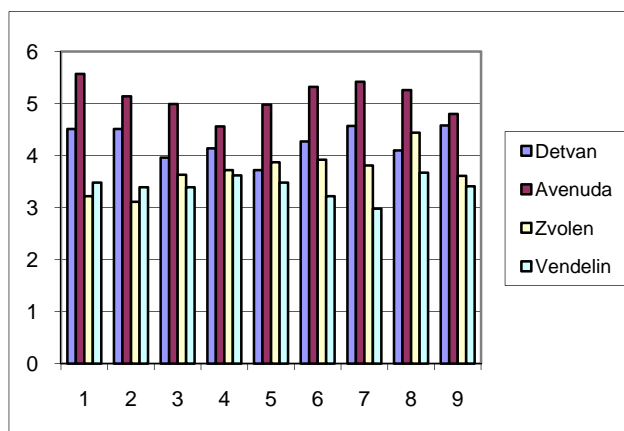
Z našich výsledkov ďalej vyplýva, že nahé genotypy (Avenuda a Detvan) sa vyznačujú vyššou hladinou daného metabolitu v porovnaní s plevnatými. Túto skutočnosť potvrdilo vo svojich prácach množstvo autorov (napr. Givens, 2000, Gajdošová a kol., 2007). Najvyšším obsahom β -glukánu sa vyznačovala v našom prípade odroda nahého ovsa Avenuda. Priemerný obsah β -glukánu bol v tejto odrode v našich pozorovaniach 5,03 % v roku 2007 a 5,11 % v roku 2008.

Tabuľka 2 znázorňuje, že varianty dusíkatej výživy 2 a 3 a taktiež varianty 4 a 5 nemali štatisticky významný vplyv na obsah sledovaného metabolitu z zrelých zrnách ovsa siateho. Na druhej strane varianty 6, 7, 8 a 9 t.j. varianty s prídavkom selénu k predchádzajúcemu dusíkatému hnojeniu mali štatisticky významný vplyv na obsah β -glukánu. Rozdiel medzi oboma ročníkmi predstavuje variant 9. Zatiaľ, čo pri ročníku 2007 mal tento variant štatisticky významný vplyv na hladinu β -glukánu, podobne ako ostatné varianty výživy obohatené selénom, v roku 2008 sa na základe štatistického vyhodnotenia jeho významný vplyv nepreukázal.

Záver

Medzi ôsmymi variantmi dusíkatej výživy sme pri analýze obsahu β -glukánu v štyroch odrodách ovsa siateho pestovaného na jednej lokalite v dvoch rokoch pozorovali variabilitu a štatisticky významné rozdiely. Štatistické vyhodnotenie potvrdilo, že dusíkatá výživa v kombinácii so selénom má štatisticky preukazný pozitívny vplyv na hladinu daného polysacharidu. Nahé odrody ovsa sa vyznačovali vyšším obsahom β -glukánu v porovnaní s plevnatými a najvyšší obsah danej látky sme sledovali v odrode Avenuda. Všetky odrody vysiate v roku 2007 obsahovali najvyššie zastúpenie daného polysacharidu pri variante 6 a odrody vysiate v roku 2008 vo variante 8. Na základe našich výsledkov môžeme odporučiť pre plevnaté genotypy

ako najvhodnejšie z hľadiska vysokého obsahu β -glukánu varianty 6 a 8, avšak pre nahé odrody nie je jednoznačné určiť najvhodnejší variant výživy, nakoľko odrody nereagovali zhodne na jednotlivé varianty výživy. V prípade odrody Detvan môžeme odporučiť varianty 8 a 9, avšak v prípade odrody Avenuda sa ako najvhodnejší variant potvrdil variant 4 teda v tomto prípade selén nemal pozitívny vplyv na nárast hladiny sledovanej látky. Súhrnným zhodnoteným oboch ročníkov môžeme teda vyhodnotiť varianty s prídavkom selénu do pôdy ako varianty najvhodnejšie a pozitívne vplyvajúce na hladinu študovaného polysacharidu.



Obr.2: Variabilita v obsahu β -D-glukánu vzhľadom na varianty dusíkatej výživy pre ročník 2008

Tabuľka 2: Priemerné hodnoty obsahu a homogénne skupiny β -glukánu hodnoteného súboru ovsu v roku 2007 a 2008 na hladine $\alpha = 0,05$

Variant dusíkatej výživy	β -D-glukán (%)	1	2	3	4	5
5	3,62		***			
1	3,72	***	***			
3	3,81	***	***			
2	3,87	***		***		
4	3,92	***		***		
9	4,07			***	***	
8	4,14				***	
7	4,16				***	
6	4,39					***

Variant dusíkatej výživy	β -D-glukán (%)	1	2
3	3,99	****	
4	4,01	****	
5	4,01	****	
2	4,04	****	
9	4,10	****	
6	4,18	****	****
1	4,19	****	****
7	4,20	****	****
8	4,36		****

Literatúra

- AMES, N., RHYMER, C., ROSSNAGEL, B.: Genotype and environment effects on oat β -glucan, total dietary fiber and antioxidant activity. *Agriculture and Agri-Food Canada*, 15, 2006, s. 1-9.
- BRUNNER, B.R., FEED, R.D.: Oat grain β -glucan content as affected by nitrogen level, location and year. *Crop Science*, 33, 1994, s. 473-476.
- DUMA, M., KARKLINA, D.: Selenium and changes of amino acids content in germinated barley grains. [online]. 2008. Dostupné na internete: <http://lufb.ltu.lv/conference/foodbalt/2008/Foodbalt-Proceedings-2008-25-29.pdf>. 2008
- FDA: FDA allows whole oat foods to make health claim on reducing the risk of heart disease. In: FDA Talk Paper, roč. 5, 1997. <http://www.cfsan.fda.gov/~lrd/tpoats.html>
- GAJDOŠOVÁ, A., PETRULÁKOVÁ, Z., HAVRLETOVÁ, M., ČERVENÁ, V., HOZOVÁ, B., ŠTURDÍK, E., KOGAN, G.: The content of water soluble and water insoluble β -D-glucans in selected oats and barley varieties. *Carbohydrate Polymers*, 70, 2007, s. 46-52.
- GIVENS, D.I., DAVIES, T.W., LAVERICK, R.M.: Dietary fibre in hulled and naked winter oat grain: effects of cultivar and various agronomic factors. In: *Journal of Science Food Agriculture*, roč. 80, 2000, s. 491-496.
- GÜLER, M.: Barley grain β -glucan content as affected by nitrogen and irrigation. *Field Crop Research*, 84, 2003, s. 335-340.
- JOHANSSON, L., VIRKKI, L., MAUNUS, P.: Structural characterisation of water soluble β -glucan of oat bran. *Carbohydrate Polymers*, 42, 2000, s. 143-148.
- McCLEARY, B.V.: Megazyme: Mixed-linkage beta-glucan assay procedure (McCleary method). [online]. 2006. Dostupné na internete: www.megazyme.com

OVOS SIATY S VYŠŠÍM OBSAHO M β -D-GLUKÁNU V ZRNE – REALITA A MOŽNOSTI VYUŽITIA

OAT WITH HIGHER AMOUNT OF β -D-GLUCAN – REALITY AND UTILIZATION POSSIBILITIES

Michaela HAVRENTOVÁ – Štefan MASÁR – Peter HOZLÁR – Daniela DVONČOVÁ

Oat (Avena sativa L.) is characterized by beneficial effects on human health thanks to high amounts of β -D-glucan in grains. Its content is affected by both, genotype and environment what we achieved on 10 oat genotypes from two localities (Borovce and Vígľaš-Pstruša) in two consecutive years (2006 and 2007). Higher amounts were showed in drier and warmer year 2007 and in naked oats what can indicate a protective role of this cell wall polysaccharide after stress conditions. Therefore the aim of our work was to monitor, in controlled conditions, the influence of Puccinia coronata mixture on the variability of β -D-glucan content in young oat leaves. A statistically significant influence of the infection, genotype, and leave, respectively, on the content of β -D-glucan was observed. Our results indicate not only health benefit of β -D-glucan and its use in food industry, but also its role during stress conditions.

Key words: oat, β -D-glucan, variability, food industry, Puccinia coronata, stress

Úvod

Ovos siaty (*Avena sativa L.*) má z nutričného i dietetického hľadiska významné postavenie medzi základnými obilninami. Záujem o jeho produkciu sa zvýšil po tom, ako Americký vládny úrad pre výživu a liečivá v Rockville (Maryland, USA) v roku 1997 zaradil ovsené plevy medzi funkčné potraviny. V bunkových stenách ovsených pliev sa ako štruktúrna zložka nachádza β -D-glukán, ktorý má u cicavcov schopnosť priaznivo ovplyvňovať fyziologické procesy v dolnej časti tráviaceho traktu. Taktiež významne znižuje hladiny cholesterolu v sére a pozitívne pôsobí na hladiny glukózy a inzulínu. V posledných rokoch sa obzvlášť upozorňuje na jeho jedinečné výživové a dietetické vlastnosti, najmä na význam ovsenej vlákniny v prevencii mnohých civilizovaných chorôb vrátane srdcovo-cievnych a onkologických. Neustále stúpa jeho význam v potravinárskom priemysle, v humánnej výžive ako tzv. funkčnej, príp. multifunkčnej potraviny, ktorá poskytuje konzumentovi nielen živiny, ale zároveň aj zlepšuje jeho zdravotný stav vďaka prirodzene obsiahnutým látkam.

Vývoj odrôd ovsa s vyšším podielom β -D-glukánu je významnou celosvetovou prioritou (Rampitsch a kol., 2006) a prispieva k zvýšeniu nutričnej a ekonomickej hodnoty plodiny. V roku 2006 sa v USA vyšľachtila prvá odroda ovsa so zvýšeným obsahom potravinovej vlákniny a β -D-glukánu, ktorá má okrem veľmi dobrých odrodových vlastností aj výbornú rezistenciu voči chorobám (Suszkiw, 2006).

(1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 4)- β -D-glukán (zjednodušene β -D-glukán) je polysacharid bunkovej steny nachádzajúci sa iba v obilninách, trávach a v malom množstve druhov radu *Poales*. Glukány tvoria až 75 % bunkovej steny a spolu s arabinoxylánmi patria k najdôležitejším neškrobovým polysacharidom endospermu obilných zŕn. Obsah β -D-glukánu v zrne je polygénnym znakom a je pod kontrolou génov s prevažne aditívnym efektom. Heritabilita (dedivosť) je v rozmedzí 0,27 až 0,58 (Holthaus a kol., 1996), t.j. celkový obsah β -D-glukánu je ovplyvnený ako genetickými, tak i ekologickými činiteľmi.

β -D-glukán plní v bunkovej stene architektonickú a zásobnú funkciu. Vyskytuje sa v epidermálnych vrstvách buniek, kde pôsobia stresy vonkajšieho prostredia. Bunkové steny rastlín predstavujú dynamické štruktúry reprezentujúce kľúčové determinanty podoby rastliny, jej rastu a vývoja a odpovedí na environmentálne a patogénom podmienené stresy, pričom jej polysacharidy sa v jednotlivých vývinových štádiách menia a rôzne odpovedajú na stresory (Hrmova a Fincher, 2001). Schopnosť rastliny odolávať fyzikálnym, chemickým a biotickým stresom závisí od bunkovej steny, jej pevnej povrchovej vrstvy. V skupine *Gramineae* môže byť do značnej miery metabolizmus β -D-glukánu zodpovedný za odpoveď rastliny na environmentálne signály mierneho, fyziologického rozsahu (Hoson, 1998). Na druhej strane, zloženie bunkových stien rastlín má veľký význam aj v kvalite a príprave potravín na rastlinnej báze pre humánu i živočíšnu výživu, taktiež v rôznych iných odvetviach priemyslu.

Materiál a metódy

V práci sme 10 genotypov ovsa siateho pestovali v dvoch lokalitách (VP Borovce a VŠS Vígľaš-Pstruša) v dvoch vegetačných rokoch (2006, 2007) v troch opakovaníach metódou delených parciel. Veľkosť pokusnej parcely bola 1,25 m² a za vzorku sme považovali cca 200 g súbor zŕn z každého opakovania.

V počte 2x10 zŕn sme v nádobových pokusoch v kontrolovaných podmienkach vysiali ovsy Abel, Auron, Detvan, Euro, Expander, Flamingsstern, Izák, Jakub, Kanton a Zvolen. Jedno opakovanie slúžilo ako kontrola, druhé sa infikovalo štyrmi izolátmi *Puccinia coronata*. Rastliny sme kultivovali po infekcii 10 dní pri teplote 18 °C a 12-hodinovej fotoperióde. V kontrolných a infikovaných vzorkách 1. a 2. listu sme následne po vysušení a pomleli.

Na stanovenie obsahu β -D-glukánu v zrnách i listoch sme použili analytický kit „Mixed-linkage beta-glucan assay procedure“ (K-BGLU, BBG 5/03, metóda na stanovenie obsahu β -D-glukánu) (McCleary, 2006) od firmy Megazyme (Megazyme International Ireland Ltd.). Vysušený materiál sme tesne pred analýzami (v dvoch opakovaní) pomleli na hrúbku zrna 0,5 mm, stanovili podiel sušiny a skladovali v uzatvárateľných nádobách v tme pri teplote 8 °C.

Analýzu variácie získaných hodnôt (ANOVA pre $P < 0,05$, príp. $P < 0,01$) s následným Tukey testom sme spracovali štatistickým programom SPSS (11.5.1.).

Výsledky a diskusia

Variabilitu obsahu β -D-glukánu v zrne ovsa siateho a vplyv faktorov (genetických aj prostredia) na jeho obsah sme sledovali v súbore 5 nahých odrôd (Avenida, Detvan, Izak, PS-90, Salomon) a 5 plevnatých (Edit, Edmund, Expander, Petra, Zvolen). Z analýzy rozptylu vyplýva, že lokalita, meranie ani opakovanie významne neovplyvnili variabilitu β -D-glukánu. Tú významne ($P \leq 0,05$) ovplyvnil rok a významne ($P \leq 0,01$) genotyp (tabuľka 1). V prípade nahých ovsov meranie a opakovanie významne neovplyvnili obsah β -D-glukánu. Významne ($P \leq 0,01$) obsah β -D-glukánu ovplyvnili rok, lokalita a genotyp. Pri plevnatom ovse lokalita, meranie a opakovanie významne neovplyvnili variabilitu obsahu sledovanej látky. Na druhej strane, významne ($P \leq 0,01$) ju ovplyvnili rok a genotyp. Prítomnosť plevy mala štatisticky významný ($P \leq 0,01$) vplyv na obsah a variabilitu obsahu β -D-glukánu. Priemerný obsah β -D-glukánu v nahých ovsoch stúpajú v poradí: Detvan (3,95 %) < Salomon (4,17 %) < Izak (4,32 %) < PS-90 (4,36 %) < Avenida (4,52 %). Plevnaté ovsy obsahujú v zrelom zrne vo všeobecnosti nižší obsah β -D-glukánu. Detekovali sme nasledovné priemerné hodnoty: 2,65 % (Edmund), 2,82 % (Edit), 2,85 % (Petra), 3,20 % (Zvolen) a 3,46 % (Expander), pričom naše výsledky sú v zhode s výsledkami iných autorov (napr. Šterba, 2002; Grausgruber a kol., 2004). Swanston (1995) zistil, že zvýšený obsah β -D-glukánu je asociovaný s prítomnosťou nud génu pre bezplevnatý typ zrna. Podobný trend popisali aj iní autori (Faustnaught a kol., 1996; Ehrenbergerová a kol., 2003) v semenách jačmeňa, pričom nahé odrody mali štatisticky významne vyšší obsah β -D-glukánu aj bielkovín v súvislosti s lokusom na chromozóme 2(2H).

Tabuľka 1: Priemerné štvorce z analýzy rozptylu vplyvu genotypu, roku a lokality na obsah β -D-glukánu v genotypoch nahého a plevnatého ovsa

	Variabilita skupín	df	Rok	Lokalita	Meranie	Plevy	Opakovanie		Genotyp	
			MS	MS	MS	MS	df	MS	df	MS
Všetky	Medzi	1	3,38*	1,02	0,05	96,04**	2	0,03	9	12,32**
	Vnútri	238	0,52	0,53	0,53	0,13	237	0,53	230	0,07
	Celkom	239					239		239	
Nahé	Medzi	1	1,10**	1,08**	0,02		2	0,09	4	1,13**
	Vnútri	118	0,07	0,07	0,08		117	0,08	115	0,05
	Celkom	119					119		119	
Plevnaté	Medzi	1	2,40**	0,15	0,03		2	0,01	4	2,57**
	Vnútri	118	0,15	0,17	0,17		117	0,17	115	0,08
	Celkom	119					119		119	

* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$

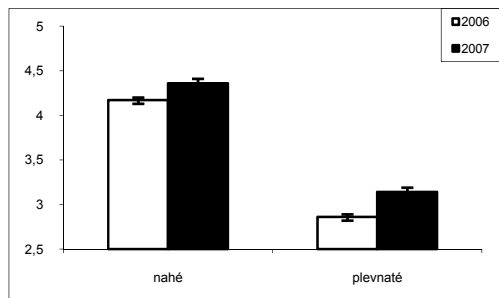
Zo všeobecného lineárneho modelu (tabuľka 2) vyplýva, že variabilitu obsahu β -D-glukánu významne ($P \leq 0,01$) ovplyvnili rok, lokalita i genotyp. Rovnako interakcie rok x genotyp, lokalita x genotyp a rok x lokalita x genotyp významne vplývali na obsah sledovaného metabolitu. Obsah látky bol v oboch hodnotených rokoch a na oboch lokalitách rôzny, s výnimkou nahého ovsa. Brindzová a kol. (2008) taktiež pozorovali oveľa nižší variačný koeficient v obsahu β -D-glukánu v nahých ovsoch v porovnaní s plevnatými.

Tabuľka 2: Priemerné štvorce (MS) z analýzy rozptylu obsahu β -D-glukánu v hodnotenom súbore ovsa

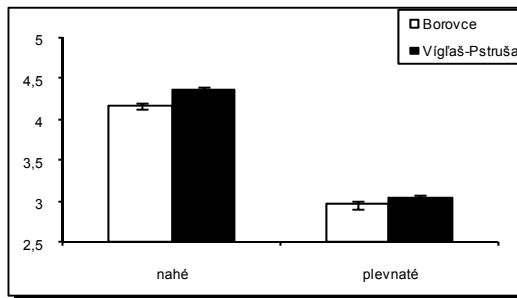
Zdroj variability	Všetky		Nahé		Plevnaté	
	df	MS	df	MS	df	MS
Model	40	82,15**	20	109,43**	20	54,86**
Rok	1	3,38**	1	1,10**	1	2,40**
Lokalita	1	1,02**	1	1,08**	1	0,15**
Genotyp	9	12,32**	4	1,13**	4	2,57**
Rok * Lokalita	1	0,00	1	0,02	1	0,03
Rok * Genotyp	9	0,57**	4	0,14**	4	1,11**
Lokalita * Genotyp	9	0,16**	4	0,03	4	0,27**
Rok * Lokalita * Genotyp	9	0,13**	4	0,14**	4	0,14**
Chyba	200	0,02	100	0,02	100	0,01
Celkom	240		120		120	

** $P \leq 0,01$

Priemerná hodnota obsahu β -D-glukánu bola v plevnatých aj nahých ovsoch vyššia v roku 2007 (obrázok 1). V nahých sa v roku 2006 hodnoty pohybovali v rozmedzí 4,1-4,23 % a v roku 2007 medzi hodnotami 4,28 až 4,44 %. V plevnatých ovsoch bol v roku 2006 obsah sledovaného metabolitu v rozmedzí 2,76 až 2,95 %, kým v nasledujúcom roku 3,03-3,25 %. Rok 2007 sa vyznačoval vyššou priemernou teplotou počas vegetácie a nižším objemom zrážok (výsledky neuvádzame), čo sa prejavilo vyšším obsahom β -D-glukánu v zrne ovsa. Podobne aj iní autori zistili, že teplejšie a suchšie podmienky pestovania vedú k vyšším výťažkom β -D-glukánu v ovsenom jačmennom zrne, čo súvisí so skutočnosťou, že vplyvom sucha dochádza k pretransportu látok v rastline smerom do zrna. Ak sa však tieto faktory vyskytnú a prejavia v období nalievania zrna, nemajú vplyv na obsah β -D-glukánu (Lazaridou a kol., 2008). Čo sa týka vplyvu lokality, priemerné hodnoty obsahu β -D-glukánu boli vyššie (4,36 % v nahých a 3,03 % v plevnatých ovsoch) v lokalite Vigľaš-Pstruša (obrázok 2). V Borovciach sa hodnoty pohybovali v rozmedzí 4,1-4,24 % pre nahé a 2,85 až 3,08 % pre plevnaté ovsy. Na základe dosiahnutých výsledkov možno konštatovať, že z hľadiska dosiahnutia vyššieho obsahu zdraviu prospešného β -D-glukánu je na pestovanie ovsa Vigľaš-Pstruša vhodnejšia lokalita než lokalita Borovce, čo je aj prirodzenejšie prostredie pre pestovanie ovsa siateho.



Obrázok 1: Priemerné hodnoty β -D-glukánu v nahých a plevnatých ovsoch v závislosti od roka.



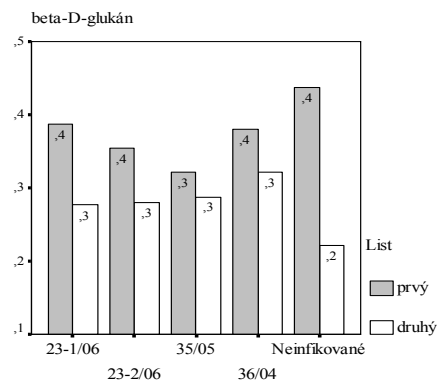
Obrázok 2: Priemerné hodnoty β -D-glukánu v súbore nahých a plevnatých ovsov v závislosti od lokality

Z hľadiska posúdenia vplyvu hladiny β -D-glukánu na ochranu rastliny pred biotickým stresom (vplyvom patogéna) sme sledovali jeho obsah v infikovaných a neinfikovaných (kontrolných) vzorkách mladých listov ovsa. Zistili sme významný ($P \leq 0,01$) vplyv lineárneho modelu ($r^2=0,97$), genotypu, infekcie *Puccinia coronata*, infikovaného a neinfikovaného listu a všetkých interakcií na obsah β -D-glukánu (tabuľka 3). Vplyvom infekcie sme pozorovali štatisticky významný pokles β -D-glukánu v prvom liste, ktorý bol infikovaný, v liste druhom obsah β -D-glukánu oproti neinfikovanej kontrole naopak stúpol. Najväčší rozdiel v obsahu β -D-glukánu bol medzi prvým a druhým listom v neinfikovanom variante (obrázok 3).

Tabuľka 3: Vplyv odrody, listu a infekcie *Puccinia coronata* na obsah β -D-glukánu v mladých listoch ovsa siateho.

Zdroj	df	Priemerné štvorce
Model	100	0,440**
Genotyp	9	0,020**
Infekcia	4	0,022**
List	1	0,923**
Genotyp * Infekcia	36	0,007**
Genotyp * List	9	0,029**
Infekcia * List	4	0,096**
Genotyp * Infekcia *		
List	36	0,009**
Chyba	290	0,004
Celkom	390	

** $P < 0,01$



Obrázok 3: Významná interakcia vplyvu infekcie *Puccinia coronata* na obsah β -D-glukánu v listoch ovsa.

Pre šľachtiteľskú prax sú znaky, ktoré sú podmienené prevažne geneticky, veľmi výhodné. Môžu byť, oproti tým, ktoré sú silne ovplyvnené prostredím, relatívne jednoducho manipulovateľné (Rhymes a kol., 2005). Keďže nahé genotypy ovsa majú vyšší obsah β -D-glukánu a predpokladá sa, že ten môže byť ovplyvnený prítomnosťou *nud* génu, možnosti pre šľachtenie sú vysoko reálne. V prospech nahých ovsov je aj skutočnosť, že v praxi sú preferované práve také plodiny, ktoré nie sú iba zdrojom výživných látok, ale majú aj geneticky podmienený, prípadne kontrolovaný, zvýšený alebo znížený obsah nutrične významných komponentov s dokázateľnými zdraviu prospešnými účinkami na konzumenta (Kerckhoffs a kol., 2003).

Touto prácou sme taktiež získali prvotné údaje o vzťahu medzi hladinou β -D-glukánu a infekciou hrdze ovsenej - faktora biotických stresov, ktoré môžu pomôcť k rozšíreniu úrovne vedomostí v zatiaľ málo

preskúmanej oblasti týkajúcej sa protektívnych účinkov β -D-glukánu. Na základe výsledkov môžeme predpokladať, že vyššie hladiny β -D-glukánu v nahých ovsoch môžu byť akýmsi ochranným prvkom chrániacim rastlinu pred biotickými i abiotickými stresovými faktormi, keďže zrna nie je chránené pleťami.

Záver

- ❖ Z hľadiska obsahu β -D-glukánu sú nahé ovsy (s priemerným obsahom 3,95-4,52 %) štatisticky vysoko významne jeho vhodnejšie prirodzené zdroje v porovnaní s plevnatými (2,65-3,46 %), čo je pravdepodobne v spojitosti s prítomnosťou nud génu.
- ❖ Na variabilite v obsahu β -D-glukánu sa vysoko významne podieľa rok, lokalita a genotyp a ich vzájomné interakcie.
- ❖ Vyššie hodnoty daného metabolitu sme v nahých i plevnatých ovsoch pozorovali v suchšom a teplejšom roku 2007.
- ❖ Bol pozorovaný významný vplyv infekcie *Puccinia coronata* na variabilitu obsahu β -D-glukánu.
- ❖ Možnosti využitia odrôd ovsu s vyšším obsahom β -D-glukánu sú nielen v potravinovom a farmaceutickom priemysle, ale aj pri ochrane rastliny pred stresormi.
- ❖ Naše predbežné výsledky poukazujú na protektívny význam β -D-glukánu v bunkových stenách ovsu siateho.

Pod'akovanie. Práca bola vykonaná v rámci úlohy MP SR č. 2006 UO 27/091 05 01/091 05 11.

Literatúra

- BRINDZOVÁ, L., ČERTÍK, M., RAPTA, P., ZALIBERA, M., MIKULAJOVÁ, A., TAKÁCSOVÁ, M. 2008. Antioxidant activity, β -glucan and lipid contents of oat varieties. In *Czech Journal of Food Science*, roč. 26, s. 163-173.
- EHRENBERGEROVÁ, J., VACULOVÁ, K., PSOTA, V., HAVLOVÁ, P., ŠERHANTOVÁ, V. 2003. Effects of cropping system and genotype on variability in important phytonutrients content of the barley grain for direct food use. In *Plant Soil and Environment*, roč. 49, s. 443-450.
- FASTNAUGHT, C. E., BERGLUND, P. T., HOLM, E. T., FOX, G. J. 1996. Genetic and environmental variation in β -glucan content and quality parameters of barley for food. In *Crop Science*, roč. 36, s. 941-946.
- GRAUSGRUBER H., SCHEIBLAUER J., SCHÖNLECHNER R., RUCKENBAUER P., BERGHOFER E. 2004. Genetic variation for plant breeding. In *Proceedings Book of the 17th EUCARPIA General Congress*, 8. – 11. september 2004, Tulln, s. 23.
- HOLTHAUS J. F., HOLLAND, J. B., WHITE, P. J., FREY, K. J. 1996. Inheritance of β -glucan content of oat grain. In *Crop Science*, roč. 36, s. 567-572.
- HOSON, T. 1998. Apoplast as the site of response to environmental signals. In *Journal of Plant Research*, roč. 111, s. 167-177.
- HRMOVA, M., FINCHER, G. B. 2001. Structure-function relationship of β -D-glucan endo- and exohydrolases from higher plants. In *Plant Molecular Biology*, roč. 47, s. 73-91.
- KERCKHÖFFS, D. A. J. M., HORNSTRA, G., MENSINK, R. P. 2003. Cholesterol-lowering effect of β -glucan from oat bran in mildly hypercholesterolemic subjects may decrease when β -glucan is incorporated into bread and cookies. In *American Journal of Clinical Nutrition*, roč. 78, s. 221-227.
- LAZARIDOU, A., CHORNICK, T., BILIADERIS, C. G., IZYDORCZYK, M. S. 2008. Sequential solvent extraction and structural characterization of polysaccharides from the endosperm cell walls of barley grown in different environments. In *Carbohydrate Polymers*, roč. 73, s. 621-639.
- MCCLEARY, B. V. 2006. *Megazyme: Mixed-linkage beta-glucan assay procedure (McCleary method)*. Bray : Bray Business Park, 15 s.
- RAMPITSCH, CH., BIZIMUNGU, B., AMES, N., ROTHWELL, L. 2006. Early generation β -glucan selection in oat using a monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay. In *Cereal Chemistry*, roč. 83, s. 510-512.
- RHYMES, C., AMES, N., MALCOLMSON, L., BROWN, D., DUGUID, S. 2005. Effects of genotype and environment on the starch properties and end-product quality of oats. In *Cereal Chemistry*, roč. 82, s. 197-203.
- SUSZKIW, J. 2006. New oat boasts more beta-glucan for healthier hearts. In *Agricultural Research*, roč. 54, s. 11.
- SWANSTON, J. S. 1995. Effects on barley grain size, texture and modification during malting associated with three genes on chromosome 1. In *Journal of Cereal Science*, roč. 22, s. 157-161.
- ŠTĚRBA, Z. 2002. *Vliv genotypu a agroekologických podmínek na kvalitu bezpluchého ovsu : autoreferát dizertačnej práce*. Školiteľ J. Moudrý. České Budejovice : Zemědělská fakulta Jihočeské univerzity. 22 s.

DYNAMIKA OBSAHOV ASIMILAČNÝCH PIGMENTOV VO VYBRANÝCH GENOTYPOCH KAPUSTY REPKOVEJ PRAVEJ (*BRASSICA NAPUS* SUBSP. *NAPUS*)

THE DYNAMICS OF ASSIMILATIVE PIGMENTS CONTENTS IN SELECTED GENOTYPES OF OILSEED RAPE (*BRASSICA NAPUS* SUBSP. *NAPUS*)

Elena HUNKOVÁ – Marek ŽIVČÁK - Jana FERENCOVÁ – Ľubica MALOVCOVÁ - Marián BRESTIČ

*The assimilative pigments content in chosen genotypes of winter oilseed rape (*Brassica napus* subsp. *napus*) was done by Department of Plant Physiology (Slovak University of Agriculture in Nitra). Genotypes were grown since autumn 2007 till summer 2008 year on experimental station in Borovce (SCAR – RICE Piešťany, west Slovakia, maize grown region, Luvi-Haplic Chernozem, 167 m above sea level). Next genotypes were chosen: 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⁻¹ in autumn and 62 kg N.ha⁻¹ in spring were applied under oilseed rape. It was found statistical significant difference between genotype Rodeo toward genotypes Oponent and Magali in total content of chlorophyll a+b together during vegetation (average from five sampling 24.4., 29.4., 13.5., 27.5. and 3.6.2008). Similar trend was shown in parameters of chlorophyll a content and chlorophyll b content, too. The carotenoids content and ratio of chlorophyll a / chlorophyll b were without statistical significant differences between genotypes of oil seed rape. In a comparison of pigments content from silique walls with pigments contents from leaves (3.6.2008), the correlation level was low for each of tested parameters (for content of chlorophyll b, total content of chlorophyll a+b together, content of carotenoids, ratio of chlorophyll a / b, ratio of chlorophyll a+b / carotenoids), with exception of chlorophyll a – middle level of correlation.*

Key words: winter oilseed rape, genotypes, assimilative pigments, siliques

Úvod

Proces fotosyntézy sa začína pohltením svetla rastlinným pigmentovým systémom, pričom sa energia kvánt spotrebuje vo fotosyntetickom procese (Švihra a kol., 1989). Všetky fotosyntetické farbivá sú lokalizované v chloroplastoch, a to výhradne v membránach. V tylakoidných membránach sa nachádzajú všetky chlorofyly a prevažná časť karotenoidov. Chlorofyl *a* je nevyhnutný pre vlastnú premenu energie vo fotosyntéze. Všetky ostatné pigmenty majú len pomocnú funkciu, pretože zachycujú dopadajúce kvantá žiarenia a energiu svojho excitovaného stavu odovzdávajú na chlorofyl *a*. Karotenoidy sú doplnkové pigmenty, ktoré však chránia fotosyntetický aparát pred nevratnou fotooxidáciou (Procházka a kol., 1998). Repka počas svojej jarnej vegetácie vytvára za krátky čas veľké množstvo biomasy, čo poukazuje na jej značný fotosyntetický potenciál (Diepenbrock, 2000), závislý na kvalitatívnych a kvantitatívnych parametroch asimilačných orgánov, medzi inými aj na obsahu asimilačných farbív.

Materiál a metódy

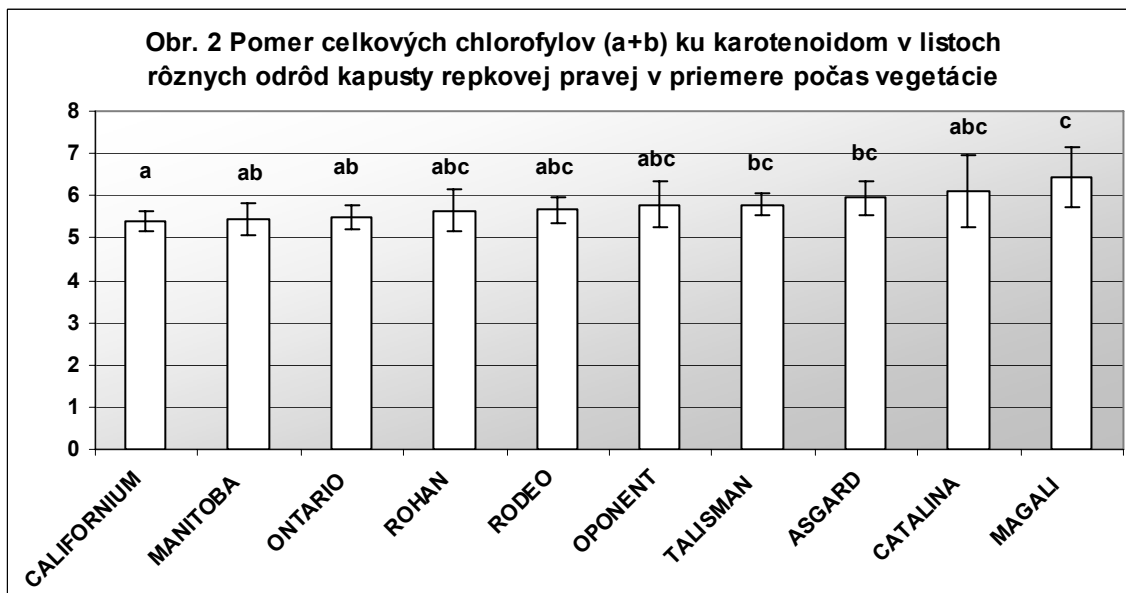
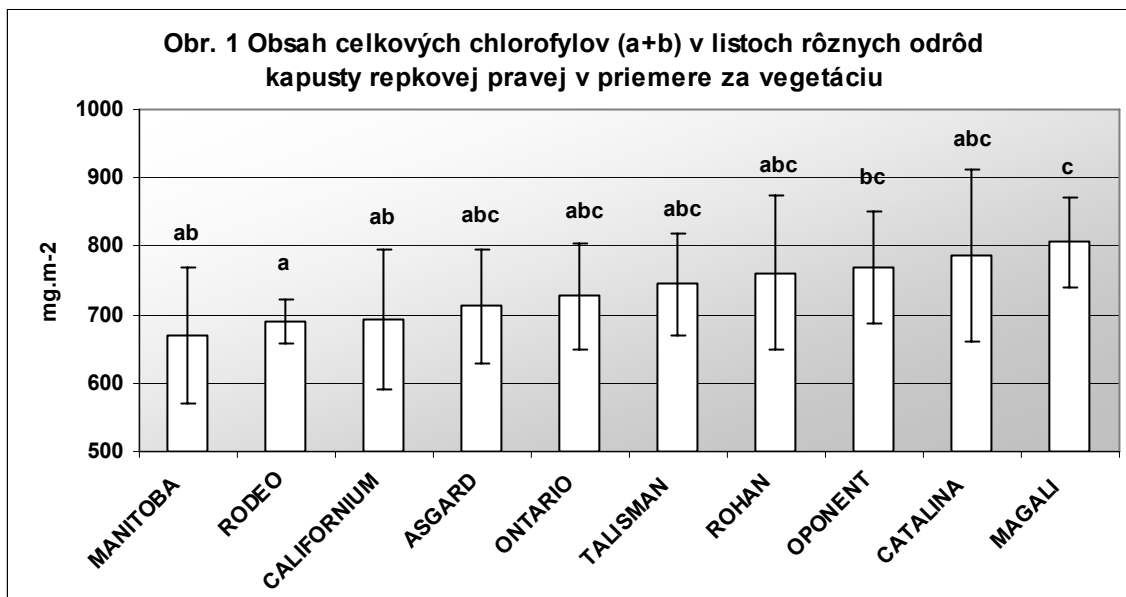
Na experimentálnej báze v Borovciach bol na jeseň 2007 založený pracovníkmi SCPV – VÚRV Piešťany poľný pokus s kapustou repkovou pravou, forma ozimná. Lokalita sa nachádzala na úrodných pôdach kukuričnej výrobnjej oblasti, v nadmorskej výške 167 m. Charakter podnebia je kontinentálny s priemerom zrážok 593 mm za rok (za vegetáciu 358 mm) a s priemerom teploty vzduchu 9,2°C za rok (za vegetáciu 15,5°C). Pokus bol založený na černoze hnedozemnej s 1,8 -2,0%-ným obsahom humusu, s pH 6,35 – 7,2 (Žák, Lehocká, Klimeková et al., 2006). Na parcelky o rozmeroch 10 m² (1,25 x 8 m) v štyroch opakovaní boli na jeseň aplikované N-P-K hnojivá v dávke 160 kg.ha⁻¹. Na jar v roku 2008 boli prihnojované dusíkom v dávke 62 kg.ha⁻¹ (údaje z experimentálnej stanice Borovce). Z nich boli odoberané rastliny pracovníkmi Katedry fyziológie rastlín SPU v Nitre pre účely zistenia obsahu asimilačných pigmentov v termínoch 24.4., 29.4., 13.5., 27.5. a 3.6. 2008. Pestované genotypy kapusty repkovej pravej boli rôznej proveniencie, z ktorých boli vybrané nasledovné: Asgard (Nemecko), Californium (Francúzsko), Catalina (Francúzsko), Magali (Francúzsko), Manitoba (Francúzsko), Ontario (Taliansko), Oponent (Česká republika), Rodeo (Nemecko), Rohan (Nemecko), Talisman (Dánsko). Na katedre fyziológie rastlín SPU v Nitre boli izolované pigmenty (chlorofyl *a*, chlorofyl *b* a karotenoidy) z najmladších plne vyvinutých listov (a 3.6. 2008 aj z chlopni šesťuľ) z acetónového extraktu v zmysle metodiky Šesták, Čatský (1966). Absorbancia asimilačných pigmentov bola zisťovaná spektrofotometricky (spektrofotometer JENWAY 6405 UV/Vis.) Zo zmeraných hodnôt absorbancií bol vypočítaný obsah pigmentov (mg.m⁻²) podľa Lichtenthalera (1987) a štatisticky vyhodnotený pomocou Studentovho t-testu.

Výsledky a diskusia

Získané priemerné hodnoty obsahu asimilačných farbív sledovaných genotypov v priebehu vegetácie (24.4., 29.4., 13.5., 27.5. a 3.6. 2008) boli porovnané využitím nepárového Studentovho t-testu. Obsah celkových chlorofylov (obr. 1) je vyjadrený sumárne ako stredné hodnoty za celé sledované obdobie, pričom

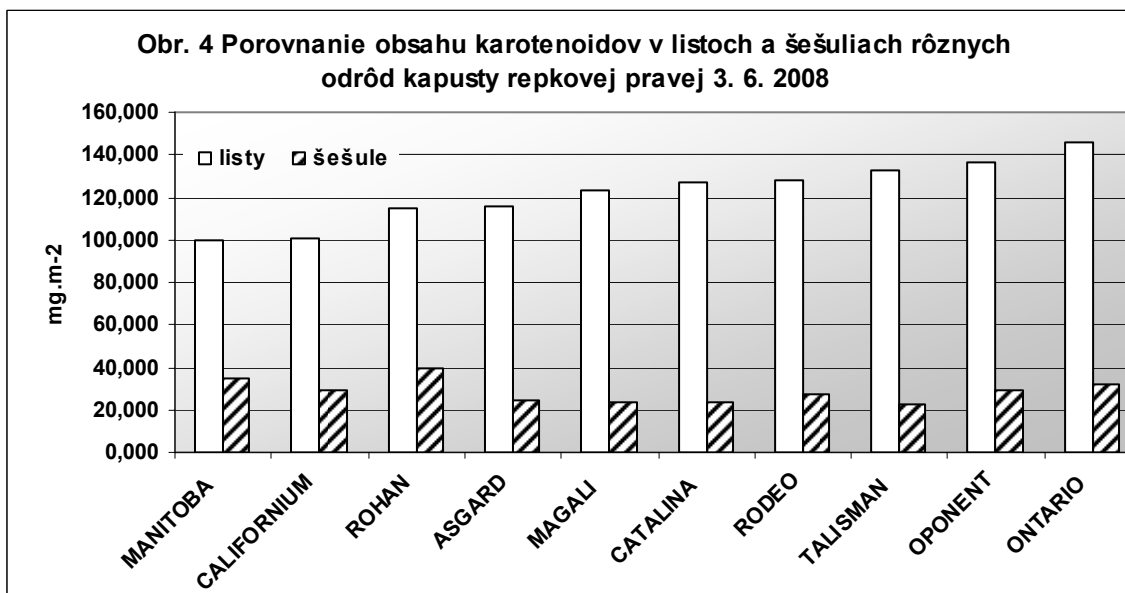
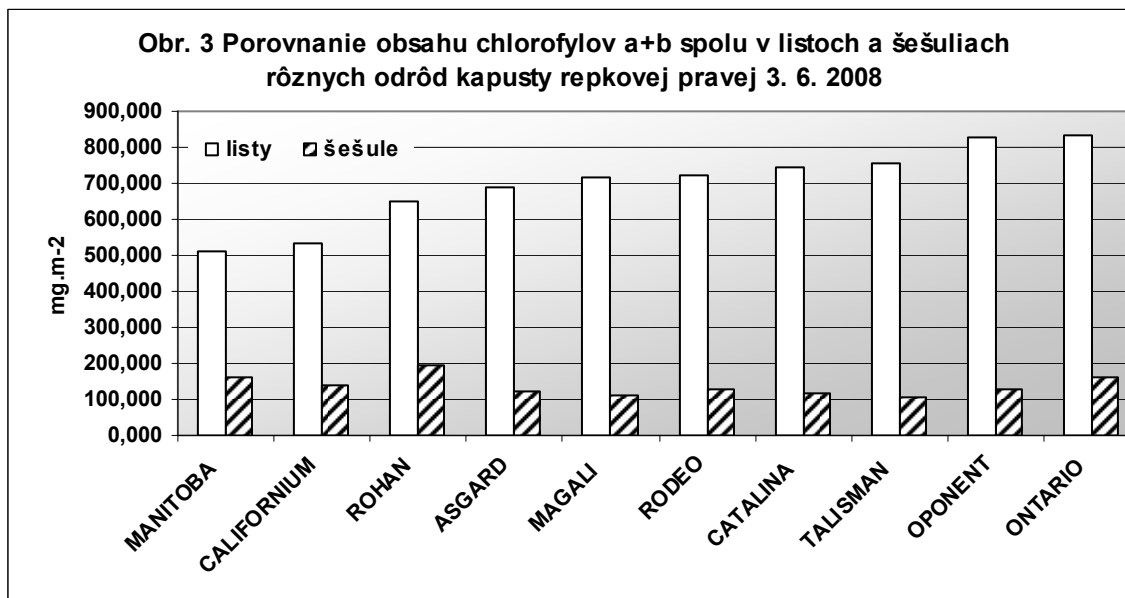
úsečky vyjadrujú smerodajnú odchýlku od priemeru počas vegetácie a štatistické vyhodnotenie je vyjadrené zatriedením genotypov do homogénnych skupín (a, ab, abc, bc, c = homogénne skupiny). Štatisticky preukazný rozdiel prejavil genotyp Rodeo (nižší celkový obsah asimilačných pigmentov chlorofylu $a+b$) oproti genotypu Oponent a Magali (vyšší celkový obsah asimilačných pigmentov chlorofylu $a+b$). Zvyšné odrody možno rátať medzi genotypy s vyššou sezónnou premenlivosťou obsahu chlorofylu $a+b$ počas vegetácie. Podobný trend prejavil aj priemerný obsah chlorofylu a samostatne a priemerný obsah chlorofylu b samostatne v listoch vybraných genotypov. Oproti tomu v prípade obsahu karotenoidov a v pomere obsahu chlorofylu a ku chlorofylu b neboli zistené preukazné rozdiely medzi jednotlivými genotypmi kapusty repkovej pravej.

Štatisticky preukazný rozdiel bol ešte zaznamenaný pri pomere celkových chlorofylu ($a+b$) ku karotenoidom (obr. 2), a to medzi genotypom Californium (nižší pomer) a genotypmi Talisman, Asgard a Magali (vyšší pomer). Ostatné odrody boli v tomto parametri viac indiferentné a rozdiely medzi nimi boli štatisticky nepreukazné.



Dňa 3.6.2008 bol navyše hodnotený aj obsah asimilačných pigmentov v chlopniach šesúľ a porovnávaný s obsahom asimilačných pigmentov v listoch testovaných genotypov kapusty repkovej pravej (obr. 3, obr. 4). Obsah chlorofylu $a+b$ ako aj obsah karotenoidov v listoch javili takmer identický trend – v oboch parametroch boli namerané najvyššie hodnoty u genotypu Oponent a Ontario. V prípade šesúľ bol najvyšší obsah týchto pigmentov zaznamenaný u genotypu Rohan. Ako však môžeme vidieť z tab. 1, úroveň korelácií

bola prevažne nízka u testovaných parametrov, s výnimkou chlorofylu *a*, kde bola zistená stredná úroveň korelácie.



Tabuľka 1: Hodnotenie korelácií

Parameter	chlorofyl a	chlorofyl b	chl a+b	karotenoidy	chl a/b	chl a+b/karot
r	-0,30866	-0,25623	-0,29438	-0,28821	-0,26639	-0,05426
r ²	0,09527	0,06565	0,08666	0,08307	0,07096	0,00294
Úroveň korelácie	stredná	nízka	nízka	nízka	nízka	nízka

Dynamika obsahu pigmentov je však v prípade stresu silne ovplyvnená, najmä, ak ide o vodný stres (Nilsen, Orcutt, 1996, Brestič, Olšovská, 2001). Stredne veľký a veľmi silný vodný deficit limituje fotosyntézu chloroplastov pri nadmernom zvyšovaní sa koncentrácie Mg²⁺ v nich (Masarovičová, Repčák a kol., 2002), dokonca môže spôsobiť až ich degradáciu (Matile, Hörtensteiner, Thomas, 1999).

Záver

Merania obsahu asimilačných pigmentov ukázali pomerne malé rozdiely medzi súčasnými modernými pestovanými genotypmi tak v celkovom obsahu, ako aj vo funkčných pomeroch medzi asimilačnými farbivami v rastlinách. Napriek tomu, je možné identifikovať genotypy s preukazne vyšším obsahom

chlorofylov na jednotku plochy listov, čo poukazuje na ich možný vyšší fotosyntetický potenciál. Obsah pigmentov v šesľuliach nekoreloval s ich obsahom v listoch. Prítomnosť chlorofylov v šesľuliach poukazuje na ich nie zanedbateľný podiel na celkovej fotosyntéze, predovšetkým v rozhodujúcich obdobiach formovania úrody a kvalitatívnych parametrov semien kapusty repkovej pravej.

Pod'akovanie. Príspevok bol podporený grantami VEGA 1/0803/08 a VEGA 1/0807/09

Literatúra

- Brestič, M. – Olšovská, K.: Vodný stres rastlín. Nitra : SPU v Nitre, 2001. 149 s. ISBN 80-7137-902-6.
- 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.
- Lichtenthaler, H.K.: Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. In: Methods of Enzymology, roč. 148, 1987, s. 350-382.
- Masarovičová, E. – Repčák, M. a kol.: Fyziológia rastlín. Bratislava : UK, 2002. 304 s. ISBN 80-223-1615-6.
- Matile, P. – Hörtensteiner, S., Thomas, H.: Chlorophyll degradation. In: Annual Reviews of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, roč. 50, 1999, s. 67-95.
- Nilsen, E. T. – Orcutt, D. M.: The physiology of plants under stress : Abiotic factors. New York : John Wiley and Sons, 1996. 689 s.
- Procházka, S. – Macháčková, I. – Krekule, J. – Šebánek, J a kol.: Fyziologie rostlin. Praha : Academia, 1998. 488 s. ISBN 80-200-0586-2
- Šesták, Z. – Čatský, J.: Metody studia fotosyntetické produkce rostlin. Praha : Academia, 1966. 359 s.
- Žák, Š. – Lehocká, 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.

VPLYV BIOLOGICKÉHO MATERIÁLU A FOLIÁRNEJ VÝŽIVY NA ÚRODU A KVALITU REPY CUKROVEJ

INFLUENCE OF BIOLOGICAL MATERIAL AND FOLIAR NUTRITION ON YIELD AND QUALITY OF SUGAR BEET

Beata ADAMČÍNOVÁ – Ivan ČERNÝ – Vladimír PAČUTA

The field polyfactorial experiment was established on experimental locality Dolná Malanta in 2005 – 2007. Four varieties (Takt, Terano, Radek, Federica) and three variants of fertilization (V1 - NPK + FM control, V2 - NPK + FM + Atonik, V3 - NPK + FM + Campofort Fortestim beta) were monitored. Influence of biological material and foliar application of preparations on root yield, digestion and raffinose yield of sugar beet was evaluated. Applied preparations had positive influence on all monitored parameters. Growth stimulator the best influenced root yield (61,84 t.ha⁻¹) and the highest digestion value was achieved after leaf fertiliser application (16,57 ‰). Influence of both preparations on raffinose yield was positive. The highest raffinose yield was achieved after application of leaf fertiliser (8,35 t.ha⁻¹). In term of biological material, the highest root yield (statistically high significant) was achieved by variety Takt (63,48 t.ha⁻¹), the highest digestion (statistically high significant) by variety Federica (16,96 ‰). We observed the most considerable raffinose yield (statistically not significant) by variety Takt (8,51 t.ha⁻¹).

Key words: sugar beet, variety, root yield, digestion, raffinose yield

Úvod

Repa cukrová predstavuje v podmienkach mierneho pásma najvyššieho producenta energie zo všetkých kultúrnych plodín a je jedinou, ktorá sa využíva ako surovina na získavanie cukru. Zvyšovanie úrody a kvality repy cukrovej je komplikovaný problém vyvolaný vzájomným pôsobením viacerých faktorov (Cooke et al., 1993). Je možné ovplyvniť to geneticky (rezistencia proti chorobám, herbicídna rezistencia; efektívne využitie živín pre produkciu biomasy a rozvádzanie do zložiek poľnohospodárskej produkcie) a poľnohospodárskymi opatreniami (výber odrody, spracovanie pôdy, kvalita osiva, výživa a hnojenie, sejba a organizácia stanovišťa a zavlazovanie) (Pačuta et al., 2000; Pačuta et al. 2002).

Cukrová repa má vysoké nároky na pôdu a živiny, nakoľko produkuje značné množstvo sušiny. Aby sa naplno využilo úrodový potenciál tejto pre poľnohospodára „hodnotnej plodiny“ je nutné optimálne zásobovanie živinami (Kováčová, 2005).

Oršulová et al. (2003) konštatujú, že aplikácia listových hnojív pri pestovaní repy cukrovej má pozitívny agronomický, ale aj ekonomický efekt. Listové hnojivá môžu zvýšiť využiteľnosť príjmu základných živín rastlinou repy, čo sa následne môže prejavovať na úrode a jej kvalite. Môžu tiež optimalizovať výživový stav rastlín, t.j. prostredníctvom nich môžeme dodať živiny, ktoré rastlina prijala cez pôdu v nedostatočnom množstve oproti ostatným.

V kontexte s mimokoreňovou aplikáciou hnojív, za účelom zmiernenia dôsledkov stresov vyvolaných vonkajšími podmienkami, niektorí autori (Černý et al., 2002; Kováčová 2002; Pulkrábek et al. 2007) odporúčajú používať také prípravky, ktoré sa svojim zložením podieľajú na regulácii rastových a vývojových procesov v rastline, ovplyvňujú dynamiku tvorby úrod a podporujú zvýšenie využitia genetického potenciálu odrôd.

Regulátory rastu sa v posledných rokoch stávajú veľmi dôležitým intenzifikačným faktorom v rastlinnej výrobe. Uplatňujú sa totiž pri stimulácii produkcie, v štádiu regulácie transportu látok v rastlinách, podporujú zakoreňovanie a prezimovanie rastlín. Rovnako urýchľujú postresovú regeneráciu rastlín, a tým ovplyvňujú tvorbu výnosu a kvality rastlinnej produkcie (Pulkrábek et al. 2007)

Materiál a metódy

Poľný polyfaktorový pokus bol založený v rokoch 2005 – 2007 na experimentálnom stanovišti Dolná Malanta. Územie sa nachádza v nadmorskej výške 175 – 180 m.n.m, patrí do kukuričnej výrobnjej oblasti, do klimatického regiónu teplého a mierne suchého.

Experiment bol založený metódou kolmo delených dielcov (Ehrenbergerová, 1995), pričom stupne faktorov boli umiestnené v náhodnom usporiadaní. Pokusná plocha mala rozlohu 32,4 x 70 m a veľkosť pokusnej parcelky bola 5,4 x 6 m. Pokus bol realizovaný v troch opakovaniach.

Do pokusu boli zaradené štyri odrody repy cukrovej: Takt (triploidná, normálneho typu, tolerantná k rizománii a cercospóre), Terano (triploidná, normálneho typu, tolerantná k rizománii a cercospóre), Radek (triploidná, normálno-cukornatého typu, tolerantná k rizománii a cercospóre), Federica (normálno-cukornatého typu).

Listové hnojivá radu Campofort obsahujú základné makroprvky a mikroprvky, stimulačné látky umožňujúce vyššie využitie genetického potenciálu moderných odrôd rastlín. Tieto hnojivá majú biostimulačný a protistresový účinok, zvyšujú prírastky úrody a zlepšujú jej kvalitatívne vlastnosti.

Atonik je rastlinný stimulátor, ktorý obsahuje zmes troch aromatických nitrozlučenín na báze nitrofenolátu sodného (2-nitrofenolát sodný, 4-nitrofenolát sodný a nitroguajakolát sodný). Priaznivo ovplyvňuje úrodu buliev, výťažnosť, výnos rafinády a technologickú kvalitu repy cukrovej. Zvyšuje odolnosť rastliny voči škodlivým činiteľom a pomáha jej prekonať stresové podmienky (napr. dlhotrvajúce sucha a vysoké teploty).

Založenie porastu repy cukrovej a príprava pôdy boli v súlade so zásadami technológie pestovania repy cukrovej s výsevom na konečnú vzdialenosť. Repa cukrová sa pestovala v sponě 0,16 x 0,45 m a jej predplodinou bola pšenica letná forma ozimná. Základné hnojenie sa vykonalo bilančnou metódou na základe agrochemického rozboru pôdy.

Do experimentu boli metodicky začlenené tri variantmi foliárnej aplikácie prípravkov a hnojív:

- V1 kontrolný variant (NPK + MH, dávka živín vypočítaná na základe pôdných rozborov na úrodu 50 t.ha⁻¹)
- V2 NPK + MH + Atonik:
0,6 l.ha⁻¹ vo fáze 4. – 6. listov
0,6 l.ha⁻¹ pred uzavretím porastu
- V3 NPK + MH + Campofort fortestim beta:
7 l.ha⁻¹ vo fáze 4. -6. listov
10 l.ha⁻¹ vo fáze 9. – 10. listov
10 l.ha⁻¹ dva týždne po zapojení porastu

Cieľom experimentu bolo zhodnotiť vplyv biologického materiálu a foliárnej aplikácie prípravkov na výšku úrody buliev, digesciu a úrodu rafinády repy cukrovej.

Výsledky experimentu boli vyhodnocované v štatistickom programe Statgraphics Plus pomocou viacfaktorovej analýzy rozptylu. Poveternostné podmienky pestovateľských rokov sú znázornené na obrázku 1. a 2.

Výsledky a diskusia

Priemerná úroda buliev dosiahnutá v rámci celého experimentu bola 61,09 t.ha⁻¹. Ako vyplýva z tabuľky 1, priemerné hodnoty úrody buliev sa po aplikácii prípravkov zvýšili. Vyššie zvýšenie úrody buliev bolo po aplikácii rastlinného stimulátora Atonik (o 1,45 t.ha⁻¹ oproti neošetrenej kontrole), čo sa zhoduje s výsledkami pokusu Černého, Pačutu a Villára (2001). Vplyv aplikovaných prípravkov na výslednú úrodu buliev bol štatisticky nepreukazný (Tabuľka 2).

V rámci jednotlivých odrôd, najvyššiu úrodu buliev na kontrolnom variante sme zaznamenali pri odrode Radek (63,69 t.ha⁻¹), a naopak najnižšiu pri odrode Federica (58,01 t.ha⁻¹). V súvislosti s úrodou buliev, sledované odrody reagovali na aplikované prípravky nasledovne:

- Takt – (Atonik +3,42 t.ha⁻¹, Campofort +4,43 t.ha⁻¹)
- Terano – (Atonik +3,39 t.ha⁻¹, Campofort +2,75 t.ha⁻¹)
- Radek – (Atonik -0,26 t.ha⁻¹, Campofort -3,7 t.ha⁻¹)
- Federica – (Atonik -0,75 t.ha⁻¹, Campofort -0,84 t.ha⁻¹)

Vplyv odrody na úrodu buliev bol štatisticky vysoko preukazný.

Priemerná hodnota digescie v rámci celého experimentu bola 16,39 °S. Priemerné hodnoty digescie sa po aplikácii prípravkov zvýšili a zistený vplyv bol štatisticky preukazný. Vyššie zvýšenie digescie bolo po aplikácii listového hnojiva (o 0,28 °S oproti neošetrenej kontrole), čo potvrdzujú aj výsledky rozsiahleho výskumu s repou cukrovou v rokoch 1962 – 2002, kde aplikácia listového hnojiva zvýšila digesciu o 0,5 – 0,8% (Zahradníček et al., 2004).

Významné rozdiely sme zistili na úrovni hodnotenia jednotlivých odrôd, ktorých vplyv na digesciu bol štatisticky vysoko preukazný. Najvyššiu hodnotu digescie na kontrolnom variante dosiahla odroda Federica (16,84 °S) a najnižšiu odroda Radek (15,80 °S). Odrody reagovali na foliárnu aplikáciu prípravkov rôzne:

- Takt – (Atonik -0,07 °S, Campofort +0,36 °S)
- Terano – (Atonik +0,16 °S, Campofort +0,02 °S)
- Radek – (Atonik +0,08 °S, Campofort +0,31 °S)
- Federica – (Atonik -0,07 °S, Campofort +0,44 °S)

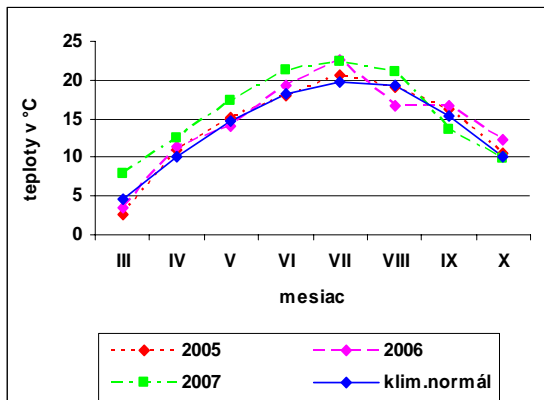
Priemerná úroda rafinády celého pokusu bola 8,25 t.ha⁻¹. Aplikácia prípravkov zvýšila priemernú úrodu rafinády. Najvyššie zvýšenie úrody rafinády sme zaznamenali po aplikácii listového hnojiva (o 0,27 t.ha⁻¹ v porovnaní s kontrolou), pričom rastlinný stimulátor zvýšil úrodu rafinády o 0,24 t.ha⁻¹ v porovnaní s kontrolou. Vplyv prípravkov na úrodu rafinády sa štatisticky neprejavil.

Vplyv odrody na úrodu rafinády bol štatisticky nepreukazný. Najvyššiu úrodu rafinády na kontrolnom variante sme dosiahli pri odrode Federica (8,31 t.ha⁻¹) a najnižšiu pri odrode Terano (7,84 t.ha⁻¹). Vplyv aplikovaných prípravkov na jednotlivé odrody bol nasledovný:

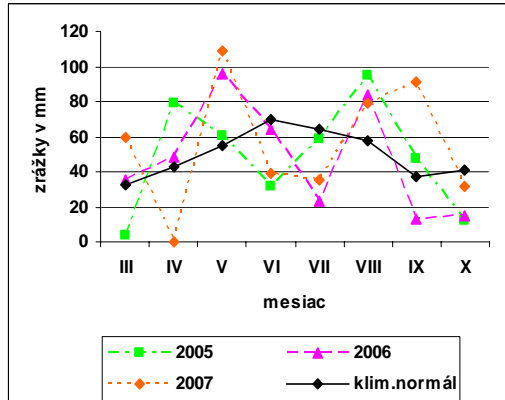
- Takt – (Atonik +0,65 t.ha⁻¹, Campofort +0,84 t.ha⁻¹)
- Terano – (Atonik +0,5 t.ha⁻¹, Campofort +0,38 t.ha⁻¹)

Radek – (Atonik +0,06 t.ha⁻¹, Campofort -0,28 t.ha⁻¹)
 Federica – (Atonik -0,28 t.ha⁻¹, Campofort -0,11 t.ha⁻¹).

Obrázok 1: Priemerné teploty vegetačného obdobia rokov 2005-2007



Obrázok 2: Priemerné zrážky vegetačného obdobia rokov 2005-2007



Tabuľka 1: Priemerné hodnoty úrody buliev, digescie a úrody rafinády jednotlivých odrôd repy cukrovej v závislosti od variantu hnojenia za roky 2005-2007

Ukazovateľ	Odroda	Varianty hnojenia			
		V1	V2	V3	priemer
Úroda buliev v t.ha ⁻¹	Takt	60,86	64,28	65,29	63,48
	Terano	59,00	62,39	61,75	61,05
	Radek	63,69	63,43	59,99	62,37
	Federica	58,01	57,26	57,17	57,48
	x	60,39	61,84	61,05	
Digescia v °S	Takt	16,32	16,25	16,68	16,42
	Terano	16,20	16,36	16,22	16,26
	Radek	15,80	15,88	16,11	15,93
	Federica	16,84	16,77	17,28	16,96
	x	16,29	16,32	16,57	
Úroda rafinády v t.ha ⁻¹	Takt	8,01	8,66	8,85	8,51
	Terano	7,84	8,34	8,22	8,13
	Radek	8,17	8,23	7,89	8,10
	Federica	8,31	8,03	8,42	8,25
	x	8,08	8,32	8,35	

Tabuľka 2 Analýza rozptylu (ANOVA) sledovaných parametrov repy cukrovej za roky 2005-2007

Faktor	Sledovaný parameter		
	Úroda buliev	Digescia	Úroda rafinády
	p-hodnota		
Odroda	0,0080**	0,0000**	0,2836
Preparát	0,6452	0,0467*	0,3690

** Štatisticky vysoko preukazný vplyv faktora na sledovaný parameter

* Štatisticky preukazný vplyv faktora na sledovaný parameter

Záver

Vplyv aplikovaných prípravkov na sledované parametre bol pozitívny. Na tvorbe úrody buliev sa najvýznamnejšie podieľala aplikácia rastlinného stimulantu (61,84 t.ha⁻¹) a aplikácia listového hnojiva mala najvýznamnejší vplyv (štatisticky preukazný) na hodnotu digescie (16,57 °S). Vplyv oboch prípravkov na

úrodu rafinády bol pozitívny. Aplikácia rastlinného stimulátora zvýšila priemernú úrodu rafinády o $0,24 \text{ t} \cdot \text{ha}^{-1}$ a listové hnojivo spôsobilo zvýšenie o $0,27 \text{ t} \cdot \text{ha}^{-1}$ v porovnaní s kontrolou.

Z hľadiska biologického materiálu sme dosiahli vyššie parametre (štatisticky vysoko preukazné) úrody buliev ($63,48 \text{ t} \cdot \text{ha}^{-1}$) pri odrode Takt (normálny typ). Najvýznamnejšia hodnota digestie (štatisticky vysoko preukazná) ($16,96 \text{ }^\circ\text{S}$) bola pri odrode Federica (normálno-cukornatý typ). Vplyv odrody na úrodu rafinády sa štatisticky neprejavil. Najvyššiu úrodu rafinády sme zaznamenali pri odrode Takt (normálny typ) ($8,51 \text{ t} \cdot \text{ha}^{-1}$).

Literatúra

- COOKE, D. A. – SCOTT, R. K.: The sugar beet crop. In: *Science in to Practice*. London: Chapman and Hall, 1993, 649 p. ISBN 0-412-251302
- ČERNÝ, Ivan et al.: Vplyv ročníka a aplikácie Atoniku na vybrané parametre a úrodu buliev repy cukrovej. In: *J. Central european Agriculture*. roč. 3, č. 1/2002, s. 15-22
- ČERNÝ, I. – PAČUTA, V. – VILLÁR, G.: Intenzívne pestovanie repy cukrovej vplyvom aplikácie Atoniku a Samppi no. 3. In: *IV. celoslovenská vedecká repárska konferencia*. Nitra: VES SPU, 2001, s. 123-125
- EHRENBERGEROVÁ, J.: *Zakládání a hodnocení pokusu*. Brno: MZLU, 1995, 109 s.
- KOVÁČOVÁ, M.: Listovými hnojivami poistíme úrodu repy cukrovej. In: *Listy cukrovarické a řepářské*. roč. 121, 2005, č. 11/12, s. 312-314 ISSN 1210-3306
- KOVÁČOVÁ, M.: Přípravok Elorisan pri pestovaní cukrovej repy. In: *Listy cukrovanické a řepářské*. roč. 118, č. 3/2002, s. 72-73 ISSN 1210-3306
- ORŠULOVÁ, J. – PAČUTA, V. – TÓTH, P.: 2003. Kvalitatívne parametre odrôd repy cukrovej ovplyvnené foliárnou výživou. In: *V. celoslovenská vedecká repárska konferencia*. Nitra: VES SPU, 2003, s. 181-184
- PAČUTA, V. – ČERNÝ, I. – KARABÍNOVÁ, M.: Influence of selected factors on sugar beet yield and quality. In: *Rostlinná výroba*, vol. 46, 2000, no.8, p. 371-378
- PAČUTA, V. – ČERNÝ, I. – KARABÍNOVÁ, M.: Utilization of leaf fertilizers containing biologically active matters at sugar beet yield and quality creation. In: *Řepářství 2002 – zborník z konferencie*. Praha: ČZU, 2002, s. 131-135 ISBN 80-213-0877
- PULKRÁBEK, J. – URBAN, J.: Vliv biologicky aktivních látek na produkční ukazatele cukrovky. In: *Naše pole*, roč.55, č. 5/2007, s. 52-54 ISSN 0139-6013
- PULKRÁBEK, J. – URBAN, J. – BEČKOVÁ, L.: Využití Atoniku Pro k urychlení postresové regenerace a zmírnění dopadů herbicidního stresu na cukrovku. In: *Listy cukrovarnické a řepářské*. roč. 123, č. 2/2007, s. 43-46 ISSN 1210-3306
- ZAHRADNÍČEK, J. – SOUKUP, J. – KOTYK, A. – JARÝ, J.: Vliv foliárního hnojení a biostimulátorů na metabolismus a technologickou jakost cukrovky vegetující a skladované. In: *Řepářství a sladovnícký ječmen. Sborník z konference*. Praha: ČZU, 2004, s.121-124.

VPLYV VODNÉHO DEFICITU NA VLASTNOSTI CÍCERA BARANIEHO (*CICER ARIETINUM L.*) THE IMPACT OF THE WATER DEFICIT ON CHARACTERISTICS OF CHICKPEA (*CICER ARIETINUM L.*)

Gabriela ANTALÍKOVÁ – Pavol HAUPTVOGEL – Ján KRAIC – Eleonóra KRIVOSUDSKÁ – Magdaléna BIELIKOVÁ

This study is focused on characteristics of chickpea in condition of water stress. In 2007 and 2008 evaluations and measurements were made in container by water deficit condition and without it. There were seven genotypes of chickpea in four repeating in every option. Genotypes 88 194 (SYR), KNOOR 91 (TUR), CM-7-1/85 (SYR), Punjab 91 (SYR), PK 51 814 (SYR), Slovak (SVK) and Irenka (CZE) were used. The water stress induced by reduction in sealing in the end of the phase of flowering caused significant decline in parameters of observed traits. The highest reduction (about 64.97%) occurred in trait – weight of productive seeds per plant in compare with standard option. The highest weight of productive seeds per plant had genotype 88 194 (SYR) in standard as well as in stress option. This type of kabuli genotype had the lowest per cent reduction of weight in comparison with standard (about 53.26%). The mean proteins content was higher in stress option (25.23%) than in standard option (18.39%). The highest content of proteins in stress option had genotype kabuli type KNOOR 91 (TUR) – 28.78%, in standard variety genotype third type Slovak (SVK) – 19.74%.

Key words: Cicer arietinum L., chickpea, drought, traits, water deficit

Úvod

Vodný deficit a následne stres zo sucha patrí k najzávažnejším abiotickým faktorom, ktorý obmedzuje rast a produktivitu rastlín na zemi (MASAROVICHOVÁ et al, 2002). Globálne otepľovanie, ktoré spôsobí posun klimatických pásiem, ovplyvní aj pestovanie plodín na našom území. Šľachtenie rastlín na zvýšenú toleranciu voči suchu v našich podmienkach je zložitá, pretože medzi ročníkmi je významná variabilita zrážok a rastliny mnohokrát reagujú opačne v prípade dostatku vlhky (ŽOFAJOVÁ, UŽÍK, 1996). Prikladom je cícer baraní, ktorý patrí spomedzi všetkých strukovín k najmenej citlivým na suchu, ale aj pri tejto plodine je tvorba úrody závislá od množstva vlhky. Cícer je zrnová strukovina, ktorá je odpradávná spájaná s poľnohospodárstvom na Blízkom Východe. S ročnou produkciou cca 8 miliónov ton sa zaraďuje medzi tretiu najpestovanejšiu strukovinu vo svete. Výživná hodnota cícera je dôležitá pri udržiavaní zdravia ľudí v rozvojových krajinách (ABBO et. al, 2005). Prednosťou cícera je nielen vhodné zloženie a obsah bielkovín, ale aj vysoký obsah škrobu a vlákniny, pričom desi typ má vyšší percentuálny podiel vlákniny v semene ako typ kabuli (UPADHYAYA et al, 2008).

Cieľom tejto práce bolo zistiť vplyv vodného deficitu na vlastnosti cícera baranieho.

Materiál a metódy

V rokoch 2007, 2008 bol založený vegetačný nádobový pokus so 7 genotypmi cícera: 88 194 (SYR), KNOOR 91 (TUR), CM-7-1/85 (SYR), Punjab 91 (SYR), PK 51 814 (SYR), Slovák (SVK) a Irenka (CZE). Rastliny každého genotypu (po 9 rastlín) boli vysiate v nádobách v štyroch opakovaníach s náhodným usporiadaním pokusných členov a v dvoch variantoch: kontrolný variant (KV) a variant so zníženou závlahou (SV). Základné hodnotenie počas vegetácie bolo vykonávané podľa DESCRIPTORS FOR CHICKPEA, 1993. Po dozretí cícera boli z každej nádoby vykonané rozbery rastlín a získané kvantitatívne parametre znakov boli prepočítané na 1 rastlinu. Obsah dusíkatých látok bol stanovený Dumasovou metódou. Obsah bielkovín (N x 6,25) bol prepočítaný na 100% sušinu.

Pokusy sa nachádzali v prirodzených klimatických podmienkach s regulovanou závlahou (SV-bez zrážok) v areáli VÚRV. Piešťany sa nachádzajú v kukuričnej výrobnjej oblasti, subtyp kukurično-pšeničný. Nadmorská výška je 163 m, severná zemepisná šírka 48°35' a východná zemepisná dĺžka 17°50'. Priemerná ročná teplota je 9,2°C a úhrn zrážok za rok je 625 mm. Priemerná teplota a úhrn zrážok v mesiacoch apríl až júl bola nasledovná:

Rok	Priemer mesiacov	DN*	Teplota [°C],	DN	Zrážky [mm]
2007	IV. – VII.	15,0	17,9	250,0	176,8
2008	IV. – VII.	15,0	16,9	250,0	240,0

* - dlhodobý normál [1951-1980] v Piešťanoch

Výsledky a diskusia

V nádobových pokusoch s cícerom vodný stres indukovaný znížením závlahy na konci kvitnutia spôsobil oproti kontrolnej variante významné zníženie parametrov sledovaných znakov až na obsah bielkovín. Charakteristika vybraných znakov genotypov cícera je uvedená v tabuľke. Z výsledkov vyplýva, že najväčšia redukcia nastala v hmotnosti produktívnych semien z rastliny oproti kontrolnej variante (o 64,97%).

Tabuľka: Vplyv vodného deficitu na znaky genotypov cícera baranieho vo vegetačných nádobových pokusoch v priemere rokov 2007 a 2008

Hodnotené znaky	Kontrolný variant	Stresový variant	Stupeň redukcie [%]
Dĺžka vegetačnej doby [dni]	110,07	100,79	8,43
Výška rastlín/1r [mm]	453,47	412,78	8,97
Počet strukov z rastliny (1r)	8,14	3,67	54,91
Počet produktívnych strukov/1r	6,48	2,57	60,35
Počet semien/1r	9,38	3,41	63,65
Počet produktívnych semien/1r	7,91	2,83	64,09
Počet semien/1struk	1,32	1,13	14,39
Hmotnosť produktívnych semien/1r [g]	2,04	0,71	64,97
Obsah bielkovín [%]	18,39	25,23	-

Pri porovnaní kontrolnej a stresovej varianty v interakcii s genotypom, najväčšia redukcia bola v počte produktívnych strukov a semien z rastliny pri genotype Irenka, avšak v KV mal tento genotyp maximálne hodnoty týchto znakov. Najvyššiu hmotnosť produktívnych semien z rastliny mal genotyp typu kabuli 88 194 (SYR) v oboch variantách, ktorý zároveň patril medzi genotypy s najvyššou hmotnosťou 1000 semien v tomto súbore (316 g). Tento genotyp mal najnižšie percento redukcie hmotnosti oproti kontrolnej variante (o 53,26%).

Priemerný obsah bielkovín genotypov cícera bol vyšší vo variante s deficitom vlhky - 25,23% ako v kontrolnej variante - 18,39%. Maximálny obsah bielkovín vo variante s vodným deficitom mal genotyp typu kabuli KNOOR 91 (TUR) - 28,78%, a v zavlažovanej variante Slovák (SVK) - 19,74% (tretí typ, podobný hrachu). Typ desi a kabuli mali v zavlažovanej variante obsah bielkovín na rovnakej úrovni - 18,13% a 18,30%.

Okrem závlahy mali na pestovanie genotypov cícera vplyv aj teplotné podmienky v jednotlivých ročníkoch. Rok 2007 bol oproti roku 2008 v priemere mesiacov apríl, máj a jún teplejší, čo urýchlilo vzhádzanie, rast a vývoj genotypov cícera. Na dopestovanie kvalitnej a dostatočne vysokej úrody v suchých podmienkach sú vhodné adaptabilné genotypy, s efektívnym využívaním vody na tvorbu sušiny a s vysokým úrodnotvorným potenciálom v rôznych ekologických podmienkach (BRESTIČ, OLŠOVSKÁ, 2001).

Záver

Vodný deficit vo vegetačných nádobových pokusoch počas rokov 2007 a 2008 významne ovplyvnil vlastnosti cícera baranieho. Vysoký stupeň redukcie nastal vo variante s deficitom vlhky oproti kontrolnej variante v znakoch: počet produktívnych strukov - o 60,35%, počet produktívnych semien - o 64,09% a hmotnosť produktívnych semien z rastliny o - 64,97%.

Pod'akovanie: Príspevok bol vypracovaný v rámci úlohy výskumu a vývoja č. 2005 UO 27/055 02 06/050 02 06.

Literatúra

- ABBO, S. – MOLINA, C. – JUNGSMANN, R. – GRUSAK, M. – BERKOVITCH, Z. – REIFEN, R. – KAHL, G. – WINTER, P. – REIFEN, R.: Quantitative trait loci governing carotenoid concentration and weight in seeds of chickpea (*Cicer arietinum* L.). In: Theor Appl Genet, 2005, 111, p. 185-195.
- BRESTIČ, M. – OLŠOVSKÁ, K.: Vodný stres rastlín: príčiny, dôsledky, perspektívy. Nitra: SPU, 2001, 149 s. ISBN 80-7137-902-6.
- DESCRIPTORS FOR CHICKPEA: IPGR/ICRISAT/ICARDA, Rome 1993, 31. ISBN 92-9043-137-7.
- MASAROVICHOVÁ, E. a kol.: Fyziológia rastlín. Bratislava: Univerzita Komenského, 2002, s. 267-282. ISBN 80-223.
- ŽOFAJOVÁ, A. – UŽÍK, M.: Použitie fyziologických a morfológických znakov obilnín v šľachtení na toleranciu voči suchu 1996. In: Nové poznatky z genetiky a šľachtienia poľnohospodárskych rastlín. Zborník z odborného seminára, Piešťany 1996, s. 33-36. ISBN 00-88790-03-04.
- UPADHYAYA, H. D. – DWIVEDI, S. L. – BAUM, M. – VARSHNEY, R. K. – UDUPA, S. M. – GOWDA, CH. L. L. – HOISINGTON, D. – SINGH, S.: Genetic structure, diversity, and allelic richness in composite collection and reference set in chickpea (*Cicer arietinum* L.). In: BMC Plant Biology 2008, 8:106.

ADAPTABILITA GENOTYPOV JARNÉHO JAČMEŇA Z RÔZNYCH GEOGRAFICKÝCH OBLASTÍ

ADAPTABILITY OF SPRING BARLEY GENOTYPES FROM VARIOUS GEOGRAPHIC REGIONS

Michaela BENKOVÁ

On experimental basis of RIPP in 2005-08 a set of 24 spring barley genetic resources from different geographic regions on the part of yield was tested. The obtained data were analysed statistically using basic statistic characteristics. An analysis of variance revealed strong influences of year and geographic regions and also of interaction year x geographic regions on the yield of barley genotypes. During four different years (2005, 2006, 2007, 2008) and especially during the dry year 2007, genotypes from central Europe - Ebson [CZE], Express [SVK], Nitran [SVK], Messina [AUT] and from north Europe - Meltan [SWE] and Margred [DEU] achieved maximal yield of grain. The genotypes from these two geographic groups differed markedly of others geographic groups.

Key words: barley, geographic regions, yield

Úvod

Jačmeň siaty (*Hordeum vulgare* L.) je druhou najrozšírenejšou plodinou po pšenici. V súčasnosti je na Slovensku registrovaných 49 odrôd jačmeňa jarného a 26 odrôd jačmeňa ozimného (*Listina registrovaných odrôd*, 2009). Z tohto počtu je 18 slovenského pôvodu. Požiadavky na vlastnosti a znaky súčasťných odrôd sú podobné v celej Európe, ale v porovnaní so západnou Európou sú úrody zrna jačmeňa u nás častejšie ohrozené suchom a vyššími teplotami v období klasenia do zrelosti. Práve voči týmto abiotickým faktorom sú naše najnovšie odrody tolerantnejšie, pretože rastlina je pevne viazaná na prostredie. Hodnotením zahraničného a domáceho sortimentu jačmeňa ostáva pravidlom, že často vysoko produktívne zahraničné genetické zdroje sú menej prispôsobivé našim podmienkam. Domáce odrody odolávajú konkurencii vďaka ich stabilite pre naše pôdne a poveternostné podmienky (HOLKOVÁ, 2003). Osobitné postavenie majú staré krajové odrody, ktoré sa vyznačujú vysokou nenáročnosťou, odolnosťou voči suchu a skorosťou (LEKEŠ, 1997), avšak ich sklon k poliehaniu znižuje konečnú úrodu. Ukázalo sa, že využívanie krajových odrôd, ako aj divorastúcich odrôd ma význam pri šľachtení kultivarov jačmeňa pre oblasti s nízkymi zrážkami (GRANDO, 1988). Vývoj nových odrôd jačmeňa odolných voči biotickým a abiotickým stresom je v súčasnosti hlavným cieľom v šľachtení (ELLIS, 2000). Cieľom práce je zhodnotiť genetické zdroje z rôznych geografických oblastí z hľadiska celkovej úrody zrna a zistiť ich adaptabilitu v našich podmienkach v rozdielnych vegetačných ročníkoch.

Materiál a metódy

V rokoch 2005–2008 sme hodnotili 24 genotypov jačmeňa siateho f. jarnej z rôznych geografických oblastí. Pokus sa vysieval strojom na parcelky so zberovou plochou 2,5 m², v dvoch v opakovaní. Do hodnotenia boli zaradené odrody slovenského pôvodu Nitran a Express, česká odroda Ebson, ďalej pôvodné krajové československé odrody ako Diosecký 802, Diosecký Kneifl, Diosecký Sprinter, Terrasol Pivovarský, Dregerův Imperial, Dregerův, Krajová St. Hrozenkov a krajová populácia z Poľska „Tatry 1995“. Okrem toho v súbore boli zaradené zahraničné odrody Messina (AUT), Baronesse (ITA), Jelen (SRB), Pivrac (HRV), Braemar (GBR), Margret (DEU), Meltan (SWE), Hyproly (USA), Glacier (USA), Lacey (USA), CI 5 a CI 24 (MEX) a Tibet White 9 (CHN). V tomto pokuse sme hodnotili dĺžku vegetačnej doby (dni), výšku rastliny (mm), z chorôb odolnosť voči múčnatke trávovovej (9-1bod), odolnosť voči hrdzi jačmennej (9-1bod), odolnosť voči poliehaniu (9-1b), počet klasov/m², hmotnosť 1000 zrn - HTZ (g) a úrodu zrna v g/m². Súbor bol vyhodnotený základnými štatistickými charakteristikami pomocou štatistického balíka SPSS 8,1 pre Windows (SPSS, 1998).

Výsledky a diskusia

Vegetačné obdobia v sledovaných rokoch boli značne rozdielne, čo sa prejavilo aj na konečnej úrode zrna. Najproblematickejšie vegetačné obdobie pre jačmeň bolo v roku 2007, kedy značné suchó v čase odnožovania spôsobilo oslabenie rastlín, s menším nárastom listovej plochy, čo sa v celkovom dôsledku prejavilo v neskorších štádiách na znížení hmotnosti 1000 semien a znížení úrody zrna.

Z výsledkov analýzy rozptylu (tab. 1) vyplýva, že na variabilitu výšky úrody zrna štatisticky významne ($p < 0,01$) vplývali roky, geografické skupiny, ale aj interakcia rok x geografická skupina. Podobne to bolo aj pri HTZ a počte klasov na m².

Tabuľka 1: Štatistická významnosť faktorov z analýzy rozptylu pre úrodu za roky 2005-2008

Zdroj premenlivosti	SS	Df	MS	F
Geog.skupina	846569.24	6	141094.87	14.723**
Rok	473270.86	3	157756.95	16.462**
Geog.skup.x rok	440034.75	18	24446.375	2.551**
Chyba	651665.96	68	9583.3230	
Spolu	2854505.9	95		

** významnosť $P < 0,01$, * významnosť $P < 0,05$

V priemere za štyri roky bola celková priemerná úroda pokusu $374,92 \text{ g.m}^2$, s variačným rozpätím od $187,33$ do $559,44 \text{ g.m}^2$. Počas štyroch rozdielnych rokov (2005, 2006, 2007, 2008) mali najväčšiu priemernú úrodu genotypy pochádzajúce zo strednej Európy (StE) – $508,99 \text{ g.m}^2$ a severnej Európy (SE) – $491,77 \text{ g.m}^2$, ďalej nasledovali genotypy z južnej Európy (JE) – $367,51 \text{ g.m}^2$, genotypy stredoeurópske historické (StEhis) – $310,11 \text{ g.m}^2$, potom genotypy zo strednej Ameriky (SA) – $305,19 \text{ g.m}^2$ a genotypy z americkej geografickej skupiny – $279,48 \text{ g.m}^2$. Genotypy pochádzajúce zo strednej a severnej Európy sa teda najviac prispôsobili našim podmienkam (tab. 3) a dosahovali najvyššie úrody aj počas suchého ročníka v roku 2007. Zo skupiny stredoeurópskych genotypov najväčšiu priemernú úrodu dosiahli genotypy Ebson (CZE) – $559,44 \text{ g.m}^2$, Expres (SVK) – $548,89 \text{ g.m}^2$ a Nitran – $545,13 \text{ g.m}^2$, čím sa potvrdila dlhoročná skúsenosť, že domáce odrody odolávajú konkurencii vďaka ich stabilite pre naše pôdne a poveternostné podmienky (HOLKOVÁ, 2003). Stabilnú úrodu v rôznych ročníkoch vykazoval aj genotyp Messina (AUT) – $522,44 \text{ g.m}^2$ a zo skupiny severoeurópskych genotypov: Meltan (SWE) – $518,58 \text{ g.m}^2$ a Margred (DEU) – $500,05 \text{ g.m}^2$. Je zaujímavé že krajové odrody zaradené do stredoeurópskej skupiny historických jačmeňov (StHist), ktoré pochádzajú z obdobia vzniku rokov 1900–1946 a sú znevýhodnené svojou náchylnosťou na poliehanie a následne aj slabou odolnosťou voči chorobám sa zaradili svojou úrodou zrna na 4 miesto. Týmto sa potvrdzuje tvrdenie mnohých autorov (GRANDO, 1988, LEKEŠ 1998) o ich nenáročnosti na prostredie a odolnosti voči suchu, ktoré môže byť využité v šľachtení.

Tabuľka 2: Konfidenčné intervaly v jednotlivých geografických skupinách pre úrodu (g.m^2) za roky 2005-2008

	N	Úroda (\bar{O})	95 % konfidenčný interval		Poradie
Celý súbor	96	374,92	345,49	404,35	
Geograf. skupina					
StE	20	508,989	442,24	575,74	1
StEhis	28	310,111	253,70	366,53	4
JE	12	367,511	281,34	423,68	3
SE	12	491,767	405,60	577,94	2
Amerika	12	279,481	193,30	365,66	6
SA	8	305,194	199,65	410,73	5
VA	4	255,780	106,52	405,04	7
Rok					Homogénne skupiny
2005	24	451,08	392,22	509,94	X
2006	24	294,63	235,77	353,48	X
2007	24	263,15	204,29	322,01	X
2008	24	490,83	431,98	549,69	X
StE – stredná Európa, SE – severná Európa, StE hist – Stredná Európa, historické GZ, SA – stredná Amerika, JE – južná Európa, VA – východná Ázia					

Mnohonásobným porovnávaním priemerov úrod genetických zdrojov jačmeňa siateho f. jarnej Scheffeho testom sme získali 2 homogénne skupiny (tab. 2), vytvorené reakciou genotypov na priebeh počasia v rokoch 2005 a 2008 ako aj v rokoch 2006 a 2007, pričom musíme konštatovať, že vegetačné obdobie v roku 2007 bolo najmenej vhodné pre pestovanie jačmeňa.

Ďalším porovnávaním priemerov úrod v rámci geografických skupín sme zistili (tab. 3), že genotypy zo stredoeurópskej (StE) a severoeurópskej (SE) geografickej skupiny sa dosahovanými úrodami výrazne odlišovali od genotypov ostatných geografických skupín. Počas štyroch rokov dosahovali genotypy zo stredoeurópskej a severoeurópskej geografickej skupiny najvyššie úrody, a to aj v suchom roku 2007.

Tabuľka 3: Homogénne skupiny úrody (g/m^2) genotypov na základe Sheffeho testu

Geograf. skupina	N	homogénna skupina
VA	4	X
Amerika	12	X
SA	8	X
StEhist JE	28	X
JE	12	X
SE	12	X
StE	12	X

Záver

V rokoch 2005 - 2008 bolo hodnotených na základe vybraných znakov, ale hlavne z hľadiska úrody zrna 24 genotypov jačmeňa siateho f. jarnej rôznej proveniencie, rozdelených do geografických skupín na pozemkoch VÚRV v Piešťanoch. Z výsledkov analýzy rozptylu genotypov jačmeňa siateho f. jarnej vyplýva, že na variabilitu výšky úrody štatisticky významne vplývali roky, geografické oblasti, ale aj interakcia rok x geografická skupina. Podobne to bolo aj pri HTZ a počte klasov na m^2 . Počas štyroch rozdielnych rokov (2005, 2006, 2007, 2008) mali najväčšiu priemernú úrodu, aj počas suchého roku 2007, a boli najviac prispôbené našim podmienkam genotypy jačmeňa pochádzajúce zo strednej Európy - Ebson [CZE], Expres [SVK], Nitran [SVK], Messina [AUT] a severnej Európy - Meltan [SWE] a Margred [DEU]. Genotypy z týchto geografických skupín sa výrazne odlišovali svojimi hospodárskymi znakmi a vlastnosťami od genotypov ostatných geografických skupín.

Pod'akovanie. Táto práca bola podporovaná Agentúrou na podporu vedy a techniky na základe Zmluvy č. APVT-27-028704 a projektom 2005 ÚO 27/050 0206/050 0206, získaným z MP SR.

Literatúra

- ELLIS R.P. – FORSTER,B.P. – ROBINSON,D. – HANDLEY,L.L.: Wild barley: a source of genes for crop improvement in the 21st century? Journal of Experimental Botany. Oxford: Jan 2000. Vol. 51, Iss. 342; p. 9
- GRANDO, S.: Breeding for low rainfall areas Cereal Improv. Program annual rep., 1988, Aleppo, Syria: ICARDA, 1989, s.26-35.
- HOLKOVÁ, S.: Šľachtenie a semenárstvo jačmeňa. In.: Jačmeň, biológia , pestovanie, využívanie. Nitra, 2003, s.51 - 71
- LEKEŠ, J.: Šlechtění obilovin na území Československa. Plant select, Brázda 1997, Praha, str.80. ISBN 80-209-0271-6.
- Listina registrovaných odrôd. 2009. Bratislava : AT Publishing, 2009, s. 20-22.

ODOLNOSŤ OVSA VOČI VYBRANÝM HUBOVÝM PATOGÉNOM OAT RESISTANCE AGAINST SELECTED FUNGAL PATHOGENS

Katarína BOJNANSKÁ – Daniela DVONČOVÁ – Jozef GUBIŠ – Peter HOZLÁR – Štefan MASÁR

Resistance of 26 breeding lines and varieties of oats to selected pathogens was examined in 2009. Attack of pathogens caused oat powdery mildew, crown rust and leaf blotches complex was evaluated on two Slovakian localities Borovce and Pstruša. The AUDPC values indicate the measures of area under disease progress curve. Visible symptoms of oat powdery mildew were detected only at locality Pstruša and even though by minimal disease measure. Avenuda, PS-163, PS-153 and Valentín were most resistant to oat powdery mildew in laboratory conditions. PS-162, Avenuda, Zvolen and Izak had the least crown rust AUDPC values. Caleche, PS-157 and PS-166 have had the least leaf blotches complex AUDPC values. Varieties Izak and Zlaták have had satisfying level of resistance to all evaluated pathogens in field conditions.

Key words: oats, Avena, powdery mildew, crown rust, leaf blotches complex, resistance

Úvod

V dnešnej dobe má ovos siaty okrem krmnej úlohy v živočíšnej výrobe aj významné postavenie v racionálnej výžive ľudí. V nárokoch na prostredie je ovos pomerne plastický, avšak vysoké a stále úrody možno dosahovať len pestovaním vo vhodných podmienkach a vo vhodnej odrodovej skladbe. Pestovanie odrôd odolných voči patogénom je dobrým predpokladom ich uplatnenia v rámci integrovaného poľnohospodárstva. V pokusoch boli sledované nekrotrofné a obligátne patogény. Nekrotrofné parazity hnedá škvrnitosť ovsa (*Drechslera avenae* (Eidam) Scharif, teleomorfa *Pyrenophora avenae* Ito & Krib.) a septória ovsená (*Septoria avenae* (A.B. Frank) Bisset) spôsobujú značné straty najmä v chladnejších regiónoch (Harder, Haber, 1992) a to až 50 % v ročníkoch priaznivých pre rozvoj patogéna. Z obligátnych parazitov boli hodnotené hrdza ovsená (*Puccinia coronata* Cda. f. sp. *avenae* Erikson) a múčnatka trávová na ovse (*Blumeria graminis* D.C. f. sp. *avenae* Em. Marchal).

Materiál a metódy

V roku 2009 bola hodnotená odolnosť 26 registrovaných odrôd a novošľachtených kmeňov (ďalej len kmene) ovsa siateho (*Avena sativa* L.) a ovsa nahého (*Avena nuda* L.) pochádzajúcich z VŠS Vigľaš – Pstruša voči listovým patogénom ovsa v poľných a laboratórnych podmienkach. Genotypy boli hodnotené na dvoch lokalitách, Borovce a Vigľaš – Pstruša, v dvoch opakovaniach. V poľných podmienkach bolo napadnutie patogénmi hodnotené podľa Babajanca (1988) v troch termínoch. Z percentuálnych hodnôt plochy napadnutia boli vypočítané hodnoty AUDPC podľa Shaner & Finney (1977). V laboratórnych podmienkach bola odolnosť hodnotená na základe plochy napadnutia listových segmentov po infekcii 5 izolátmi patogéna *Blumeria graminis* f. sp. *avenae*. Listové segmenty boli infikované a kultivované podľa metódy Hsama & Zellera (1997). Analýzou variancie boli analyzované AUDPC hodnoty a transformované hodnoty percentuálneho napadnutia listových segmentov genotypov ovsa.

Výsledky a diskusia

Múčnatka trávová. Napadnutie múčnatkou trávovou bolo hodnotené len na lokalite Pstruša v jednom termíne, nakoľko sa toto ochorenie vyskytlo len na tejto lokalite v štádiu mliečnej zrelosti a rozsah ochorenia sa ďalej nezväčšoval. Hodnoty sa pohybovali v rozsahu od 8,5 do 5 bodov. Najvyššie bodové hodnoty dosiahli kmene PS-162, PS-165, PS167 a odroda Vendelín. V laboratórnych podmienkach boli analýzou variancie zistené významné rozdiely ($P \leq 0,01$) v hodnotách plochy napadnutia listových segmentov medzi genotypmi. Plocha napadnutia sa pohybovala v rozsahu od 58 % do 94 %. Najmenšiu plochu napadnutia mala odroda Avenuda 58 % a preukazne štatisticky zhodnú plochu napadnutia mali kmene PS-163 a PS-153 a odroda Valentín.

Hrdza ovsená. Analýzou variancie bol zistený významný vplyv lokality ($P \leq 0,01$) na hodnoty AUDPC hrdze ovsenej. Vplyv odrody bol nevýznamný. Z analýzy všeobecného lineárneho modelu vyplýva významný vplyv modelu ($P \leq 0,01$), vplyv lokality ($P \leq 0,01$), vplyv genotypu ($P \leq 0,01$) a vplyv interakcie lokalita x genotyp ($P \leq 0,05$) na hodnoty AUDPC hrdze ovsenej. Významne najnižšie hodnoty AUDPC hrdze ovsenej ($P \leq 0,05$) mali genotypy PS-162, Avenuda, Zvolen a Izak. Významne najvyššie hodnoty AUDPC ($P \leq 0,05$) mali genotypy PS-157 a PS-158.

Listové škvrnitosti. Takisto ako pri analýze hodnôt AUDPC hrdzi trávovej, tak i pri listových škvrnitostiach bol analýzou variancie zistený významný vplyv lokality ($P \leq 0,01$) na hodnoty AUDPC listových škvrnitostí a nevýznamný vplyv odrody. Z analýzy všeobecného lineárneho modelu vyplýva významný vplyv modelu ($P \leq 0,01$), vplyv lokality ($P \leq 0,01$), vplyv genotypu ($P \leq 0,01$) a vplyv interakcie lokalita x genotyp ($P \leq 0,01$) na hodnoty AUDPC listových škvrnitostí. Bez napadnutia (AUDPC = 0) bola

odroda Caleche. Významne najnižšie hodnoty AUDPC listových škvrnitostí mali tiež kmene PS-157 a PS-166 (tabuľka 1). Významne najvyššie hodnoty AUDPC listových škvrnitostí mali kmene PS-168 a PS-162.

Na lokalite Borovce sa neprejavili príznaky múčnatky trávovej, hodnoty AUDPC listových škvrnitostí boli významne nižšie ($P \leq 0,01$) ako na lokalite Pstruša. Na tejto lokalite boli najvyššie hodnoty AUDPC hrdze trávovej. Na lokalite Pstruša boli významne vyššie ($P \leq 0,01$) hodnoty AUDPC listových škvrnitostí.

Na základe bodového hodnotenia boli odrody a kmene ovsu v poľných podmienkach vysoko odolné až slabo náchylné (Babajanca, 1988) voči múčnatke trávovej na ovse. V poľných podmienkach kmeň PS-162 s najvyššou úrovňou odolnosti voči múčnatke trávovej prejavil vyššiu úroveň odolnosti aj v laboratórnych podmienkach. Rovnako aj odrody Kanton a Flägminstern prejavili uspokojivú úroveň odolnosti voči múčnatke trávovej v poľných aj laboratórnych podmienkach. Kmeň PS-162 bol zároveň aj najodolnejší voči hrdzi, avšak, súčasne bol najnáchylnější na listové škvrnitosti. Dobrú úroveň odolnosti voči múčnatke a hrdze mal ešte kmeň PS-167. Ako rezistentná voči listovým škvrnitostiam sa prejavila odroda Caleche, vysokú úroveň odolnosti voči listovým škvrnitostiam prejavili ešte kmene PS-157 a PS-166. Odrody Izak a Zlatáček mali uspokojivú úroveň odolnosti v poľných podmienkach voči všetkým sledovaným patogénom.

Tak isto ako tvorba a hodnotenie nových genotypov je potrebné sledovanie a hodnotenie odrôd z hľadiska zmien v populáciách rastlín na úrovni nešpecifickej odolnosti. Zatiaľ čo k zmenám virulencie v populáciách patogénov dochádza už v kratšom časovom období 3 – 5 rokov (Sunics *et al.*, 2000; Šebesta *et al.*, 2003; Rattu *et al.*, 2009), k pozitívnym zmenám na úrovni nešpecifickej odolnosti dochádza až po dlhšom časovom období pestovania rastlín v konkrétnom konštantnom prostredí (Paillard *et al.*, 2002). Preto je v procese tvorby nových odrôd nevyhnutné tvoriť, hodnotiť a testovať nový materiál v našich podmienkach. Podobne Jørgensen *et al.* (2000) považuje skrining a testovanie nových materiálov a komerčných odrôd za dôležitý vstup pre tvorbu európskych rezistentných odrôd.

Záver

Medzi sledovanými genotypmi ovsu siateho boli nájdené kmene aj odrody odolné voči samostatným patogénom, ale boli nájdené aj genotypy s dostatočnou odolnosťou voči všetkým sledovaným patogénom súčasne. Genotypy s vyhovujúcou odolnosťou voči obom sledovaným znakom sú vhodné do kontinuálneho procesu tvorby nových odrôd dobre adaptovaných pre pestovateľské podmienky Slovenska.

Pod'akovanie. Táto práca bola podporovaná Ministerstvom pôdohospodárstva Slovenskej republiky projektom Výskumu a vývoja č. 2006 UO 27/091 05 01/091 05.

Literatúra

- BABAJANC, I. 1988. Metody selekcie i ocenki ustojčivosti pšenici i jačmenja k boleznjam v stranach - členach, SEV. Praha, s. 321.
- HARDER, D.E. – HABER, S. 1992. Oat diseases and pathological techniques. In: Oat science and technology. Agron. Monogr. 33. Edited by Marshall H.G. and Sorrells M.E. American Society of Agronomy, Inc., Madison, Wisc., and Crop Science Society of America, Inc., Madison, Wisc., 1992, pp. 307-425.
- HSAM, S.L.K. – ZELLER, F.J. 1997. Evidence of allelism between genes *Pm8* and *Pm17* and chromosomal location of powdery mildew and leaf rust genes in the common wheat cultivar Amigo. In: Plant Breeding, Vol. 116, N. 2, 1997, pp. 119-122.
- JØRGENSEN, J.H. - BECH, C. - JENSEN J. 2000. Reaction of European spring barley varieties to a population of the net blotch fungus. In: Plant Breeding, Vol. 119, N. 1, 2000, pp. 43-46.
- PAILLARD, S. - GOLDRINGER, I. – ENJALBERT, J. - DOUSSILNAULT, G. - DE VALLAVIEILLE-POPE, C. - BRABANT, P. 2002. Evolution of resistance against powdery mildew in winter wheat populations conducted under dynamic management. II. Adult plant resistance. TAG, Vol.101, N.3, 2002, pp. 457-462.
- RATTU, A.R. - AHMAD, I. - FAYYAZ, M. - AKHTAR, M.A. - IRFAN-UL-HAQUE – ZAKRIA, M. SYED NADEEM AFZAL. 2009. Virulence analysis of *Puccinia triticina* cause of leaf rust of wheat. In: *Pak. J. Bot.*, vol. 41, N. 4, 2009, pp.1957-1964.
- SHANER, G. – FINNEY, R.E. 1977. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in Knox wheat. In: *Phytopathology*, Vol. 67, N. 8, 1977, pp. 1051-1056.
- SUNICS, L. - SUNICS, L. - VIDA, G. 2000. Changes in the virulence of the wheat powdery mildew population over a period of nearly thirty years. In: *Növénytermelés*, Vol. 49, N. 1-2., 2000, pp. 13-25.
- SEBESTA, J. – ZWATZ, B. – RODERICK, H. – CORAZZA, L. – MANISTERSKI, J. – STOJANOVIC, S. 2003. Incidence of crown rust and virulence of *Puccinia coronata cda*. f. sp. *avenae* Eriks. and the effectiveness of *Pc* genes for resistance in Europe, middle east and north Africa. In: *Phytopathology and Plant Protection*, Vol. 36, N. 3-4, 2003, pp. 179-194.

Tabuľka 1: Hodnoty napadnutia genotypov ovsu siateho listovými škvrnitostami, hrdzou ovsenou a múčnatkou trávovou v roku 2009.

Listové škvrnitosti na ovse		Hrdza ovsená		Múčnatka trávová na ovse			
Genotyp	AUDPC	Genotyp	AUDPC	Poľné podmienky		Laboratórne podmienky	
				Genotyp	Bodové hodnotenie	Genotyp	Plocha napadnutia listových segmentov %
Caleche	0 ^{a*}	PS-162	50 ^a	PS-162	8,5	Avenida	59 ^a
PS-157	14 ^{ab}	Avenida	55 ^a	PS-167	8,5	PS-163	68 ^{ab}
PS-166	17 ^{ab}	Zvolen	58 ^a	PS-165	8,5	Valentín	70 ^{a-c}
Izak	21 ^{a-c}	Izak	64 ^a	Vendelín	8,0	PS-153	74 ^{a-d}
Zlaťák	21 ^{a-c}	PS-169	70 ^{ab}	Kanton	7,5	Detvan	80 ^{b-e}
PS-153	21 ^{a-c}	PS-167	75 ^{ab}	Flägminstern	7,5	PS-162	84 ^{b-f}
PS-158	21 ^{a-c}	Detvan	78 ^{ab}	Zlaťák	7,5	Kanton	84 ^{b-f}
Flägminstern	22 ^{a-c}	Zlaťák	79 ^{ab}	Atego	7,5	Flägminstern	84 ^{b-f}
PS-164	28 ^{a-d}	Ardo	79 ^{ab}	Auron	7,5	Vendelín	86 ^{c-g}
Atego	29 ^{a-d}	Kanton	82 ^{a-c}	Ardo	7,5	Izak	87 ^{d-h}
Euro	29 ^{a-d}	Valentín	82 ^{a-c}	Zvolen	7,5	Euro	87 ^{d-h}
Valentín	29 ^{a-d}	Auron	83 ^{a-c}	Avenida	7,0	PS-164	87 ^{d-h}
PS-165	30 ^{a-d}	PS-165	93 ^{a-c}	PS-163	7,0	Zlaťák	88 ^{d-h}
PS-160	32 ^{a-d}	Flägminstern	97 ^{a-c}	Valentín	7,0	PS-169	88 ^{d-h}
PS-161	32 ^{a-d}	PS-168	103 ^{a-c}	Detvan	7,0	Atego	91 ^{e-i}
Detvan	37 ^{a-e}	PS-163	105 ^{a-c}	Izak	7,0	Auron	92 ^{e-i}
Zvolen	37 ^{a-e}	PS-160	108 ^{a-c}	Euro	7,0	PS-158	92 ^{e-i}
PS-169	38 ^{a-e}	PS-164	108 ^{a-c}	PS-164	7,0	PS-167	92 ^{e-i}
Ardo	40 ^{b-e}	PS-153	108 ^{a-c}	PS-169	7,0	PS-161	94 ^{f-i}
Auron	43 ^{b-e}	Atego	109 ^{a-c}	PS-166	7,0	PS-157	94 ^{f-i}
PS-163	44 ^{b-e}	Vendelín	114 ^{a-c}	PS-161	6,5	PS-165	94 ^{f-i}
Kanton	51 ^{b-e}	PS-166	115 ^{a-c}	PS-168	6,5	Ardo	96 ^{g-i}
PS-167	57 ^{c-e}	Caleche	116 ^{a-c}	PS-160	6,5	Zvolen	96 ^{g-i}
Vendelín	62 ^{de}	PS-161	126 ^{a-c}	PS-153	6,0	PS-168	97 ^{h-i}
Avenida	66 ^{de}	Euro	150 ^{a-c}	PS-158	6,0	PS-166	97 ^{h-i}
PS-168	71 ^e	PS-157	170 ^{bc}	PS-157	5,0	PS-160	98 ⁱ
PS-162	75 ^e	PS-158	186 ^c	-	-	-	-

a* AUDPC hodnoty a hodnoty plochy napadnutia listových segmentov v percentách sú štatisticky významne odlišné podľa Tukey (P < 0.05)

ODOLNOSŤ NOVOŠĽACHTENÝCH KMEŇOV PŠENICE LETNEJ VOČI VYBRANÝM OBLIGÁTNYM PATOGÉNOM RESISTANCE OF WHEAT BREEDING LINES TO SELECTED OBLIGATE PATHOGENS

Katarína BOJNANSKÁ – Štefan MASÁR

Resistance of 87 wheat breeding lines to powdery mildew and to leaf rust was observed in 2009. The evaluation was done at the field conditions. Just in all cases of wheat breeding line the ranges of the attack of two selected obligate pathogens, powdery mildew and wheat leaf rust were evaluated by means of AUDPC values. The AUDPC values were statistically treated. Significantly differences were found among the AUDPC values of breeding lines. Breeding lines with significantly lower AUDPC values when compared only to one control variety Torysa were found. The breeding lines V2 – 9, V2 – 24, V2 – 25 from Research and Breed Station Vígľaš – Pstruša; MS 1756, K 1988-106, K 1953-9 from Research and Breed Station Malý Šariš, and SK4, SK8, SK9, SK10 from HORDEUM Ltd have had lower powdery mildew and leaf rust AUDPC values than control varieties. According, the breeding lines listed above had higher level of resistance than the control varieties.

Key words: wheat, powdery mildew, leaf rust, Blumeria graminis, Puccinia recondita, resistance

Úvod

V tvorbe nových odrôd pšenice má šľachtenie na odolnosť voči patogénom nezastupiteľné postavenie. Nešpecifická odolnosť sa najčastejšie vyhodnocuje v poľných podmienkach, kde jej prítomnosť v testovaných genotypoch signalizujú hodnoty nameraných epidemiologických parametrov (Broers *et al.*, 1996). V poľných podmienkach bola sledovaná odolnosť novošľachtených kmeňov voči obligátnym patogénom *Blumeria graminis* (DC) Speer f. sp. *tritici* Marchal (pôvodca múčnatky trávovej na pšenici) a *Puccinia recondita* Rob. ex Desm. f. sp. *tritici* (Ericks., & E. Henn) (pôvodca hrdze pšenicevej).

Materiál a metódy

V poľných podmienkach CVRV - VÚRV v Piešťanoch bolo v roku 2009 hodnotených 87 novošľachtených kmeňov (ďalej len kmene) pšenice letnej formy ozimnej (*Triticum aestivum* L.) pochádzajúcich z VŠS Vígľaš - Pstruša, z VŠS Malý Šariš a zo spoločnosti HORDEUM s.r.o. zo Sládkovičova. Odolnosť kmeňov bola porovnávaná voči kontrolným odrodám. V prirodzených poľných podmienkach bolo hodnotené napadnutie podľa Babajanca (1988) v dvoch opakovaníach v pravidelných časových intervaloch. Hodnoty plochy napadnutia v percentách boli použité na stanovenie AUDPC (plochy napadnutia pod krivkou vývoja choroby) podľa Shanera a Finneya (1977). Hodnoty AUDPC pre múčnatku trávovú a hrdzu pšenicevú boli použité na analýzu variácie a v následnom testovaní boli porovnávané k hodnotám AUDPC kontrolných odrôd: Ilias, Ilona, Torysa a Venistar. Na štatistické spracovanie bol použitý štatistický program SPSS® (13.0).

Výsledky a diskusia

Vo vnútri všetkých troch súborov boli zistené rozdiely medzi hodnotami AUDPC múčnatky trávovej, menšia variabilita bola zistená medzi hodnotami AUDPC hrdze pšenicevej. Najširšia variabilita bola nájdená medzi hodnotami AUDPC múčnatky trávovej kmeňov z VŠS Vígľaš - Pstruša.

Hodnoty napadnutia AUDPC múčnatky trávovej 42 kmeňov z VŠS Vígľaš – Pstruša sa pohybovali v rozmedzí od 70 (V2 - 30) do 1002 (V2 - 6). Kmene V2 – 30 a V2 – 36 mali významne ($P \leq 0,05$) najnižšie hodnoty AUDPC len v porovnaní s kontrolnou odrodou Torysa. Hodnoty AUDPC ostatných kmeňov sa štatisticky významne v porovnaní s kontrolnými odrodami neodlišovali, okrem kmeňa V2 – 6, ktorý mal významne najvyššie hodnoty AUDPC. Nižšie hodnoty AUDPC ako kontrolné odrody mali ešte kmene V2 – 22, V2 – 35, V2 – 40, V2 – 27, 39, V2 – 8, V2 – 28, V2 – 24, V2 – 29, V2 – 9, V2 – 1, V2 – 16, V2 – 42, V2 – 18, V2 – 37, V2 – 15, V2 – 19 a V2 – 10. Hodnoty napadnutia AUDPC hrdze pšenicevej sa pohybovali od 4 (V2 - 11) do 236 (V2 - 2). Všetky kmene mali významne ($P \leq 0,05$) nižšie hodnoty AUDPC v porovnaní len s kontrolnou odrodou Torysa. Nižšie hodnoty AUDPC ako kontrolné odrody mali kmene V2 – 11, V2 – 24, V2 – 25 a V2 – 9.

Hodnoty napadnutia AUDPC múčnatky trávovej 31 kmeňov z VŠS Malý Šariš sa pohybovali v rozmedzí od 239 (K1988-106) do 968 (K 1732-131-51-16). V hodnotení napadnutia významne ($P \leq 0,05$) nižšie hodnoty AUDPC múčnatky trávovej mali kmene K 1988-106 a K 2054-253 v porovnaní len s kontrolnou odrodou Torysa. Hodnoty AUDPC sa v porovnaní s ostatnými kontrolnými odrodami neodlišovali. Nižšie hodnoty AUDPC, avšak nie významne, ako kontrolné odrody mali kmene K 1953-9, MS 1756, K 1997-74, K 1953-207, K 1993-45, K 2123-193 a K 1986-189. Hodnoty napadnutia AUDPC hrdze pšenicevej sa pohybovali od 5 (K 1953-9) do 210 (K 2009-315). Všetky kmene mali významne ($P \leq 0,05$) nižšie hodnoty AUDPC v porovnaní len s kontrolnou odrodou Torysa. Nižšie hodnoty AUDPC ako kontrolné odrody mali kmene K 1953-9, K 1988-106, MS 1804 a MS 1756.

Hodnoty napadnutia AUDPC múčnatky trávovej 14 kmeňov zo spoločnosti HORDEUM s.r.o. Sládkovičovo sa pohybovali v rozmedzí od 267 (SK9) do 765 (SK7). Všetky kmene mali významne nižšie ($P \leq 0,05$) hodnoty AUDPC ako kontrolná odroda Torsya. Kmeň SK9 mal významne nižšiu hodnotu AUDPC ešte v porovnaní s kontrolnou odrodou Ilias. Významne vyššie hodnoty AUDPC ako kontrolné odrody Ilona a Venistar mali kmene SK1 a SK7. Nižšie hodnoty AUDPC, avšak nie významne, ako kontrolné odrody mali kmene SK10, SK11, SK2, SK8, SK14, SK12 a SK4.

Novošľachtené kmene V2 – 9, V2 – 24, V2 – 25 z VŠS Vígľaš – Pstruša; MS 1756, K 1988-106, K 1953-9 z VŠS Malý Šariš; a SK4, SK8, SK9, SK10 zo spoločnosti HORDEUM s.r.o. mali buď významne alebo nevýznamne nižšie hodnoty AUDPC pre obe ochorenia v porovnaní so všetkými kontrolnými odrodami. Nízke hodnoty AUDPC múčnatky trávovej a hrdze pšenicovej sú prejavom vysokej úrovne odolnosti voči uvedeným chorobám v poľných podmienkach.

Na základe výskumu Paillarda *et al.* (2000) je potrebné tvoriť odrody v podmienkach, pre ktoré budú novovzniknuté odrody určené, nakoľko prostredie v dlhšom časovom období ovplyvňuje vývin populácii rastlín. Ako môže dôjsť k prekonaniu špecifickej rezistencie rastlín, tak dochádza k zmenám aj v prejave nešpecifickej rezistencie. Paillard *et al.* (2000) zistil, že rovnaké východiskové populácie pšenice pestované na rôznych miestach v podmienkach rozličného infekčného tlaku patogéna počas desiatich rokov sa v konečnom dôsledku líšili v úrovni nešpecifickej rezistencie. Za podmienok vyššieho infekčného tlaku mala aj nešpecifická rezistencia vyššiu úroveň. Preto v procese tvorby nových odrôd je nevyhnutné hodnotiť a testovať nový materiál v našich podmienkach. Podobne Jørgensen *et al.* (2000) považujú skríning a testovanie nových materiálov a komerčných odrôd za dôležitý vstup pre tvorbu európskych rezistentných odrôd.

Záver

Medzi sledovanými novošľachtenými kmeňmi pšenice letnej boli vo všetkých súboroch nájdené genotypy odolné voči samostatným patogénom, ale boli nájdené aj genotypy s dostatočnou odolnosťou voči obom sledovaným patogénom súčasne. Genotypy s vyhovujúcou odolnosťou voči obom sledovaným znakom sú vhodné do kontinuálneho procesu tvorby nových odrôd dobre adaptovaných pre pestovateľské podmienky Slovenska.

Pod'akovanie. Práca bola financovaná finančnými prostriedkami štátnej úlohy výskumu a vývoja 2006 UO 27/091 05 01/091 05 11 "Biologické faktory podmieňujúce efektívnu a konkurencieschopnú rastlinnú výrobu" a Zmluvy č. APVT-27-028704.

Literatúra

- BABAJANC, I. 1988. Metody selekcie i ocenki ustojčivosti pšenici i jačmenja k boleznjam v stranach - členach, SEV. Praha, s. 321.
- BROERS, L.H.M. - SUBIAS, C.X. - ATILANO, L.R.M. 1996. Field assessment of quantitative resistance to yellow rust in ten spring bread wheat cultivars. In: Euphytica Vol. 90, N. 1, 1996, pp. 9-16.
- JØRGENSEN, J.H. - BECH, C. - JENSEN J. 2000. Reaction of European spring barley varieties to a population of the net blotch fungus. In: Plant Breeding, Vol. 119, N. 1, 2000, pp. 43-46.
- PAILLARD, S. - GOLDRINGER, I. - ENJALBERT, J. - DOUSSILNAULT, G. - DE VALLAVIEILLE-POPE, C. - BRABANT, P. 2002. Evolution of resistance against powdery mildew in winter wheat populations conducted under dynamic management. II. Adult plant resistance. TAG, Vol.101, N.3, 2002, pp. 457-462.
- SHANER, G. - FINNEY, R.E. 1977. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in Knox wheat. In: Phytopathology, Vol. 67, N. 8, 1977, pp. 1051-1056.

VPLYV BIOLOGICKÉHO MATERIÁLU A FOLIÁRNEJ APLIKÁCIE ATONIKU NA ÚRODU A OLEJNATOSŤ NAŽIEK SLNEČNICE ROČNEJ

INFLUENCE OF BIOLOGICAL MATERIAL AND ATONIC FOLIAR APPLICATION ON YIELD AND OILY OF SUNFLOWER ACHENES

Ivan ČERNÝ – Zuzana BACSOVÁ – Monika TÖRÖKOVÁ

Field polyfactorial experiment was carried out in PD Nitra Blatnica in 2007-2008. The field trials were monitored four hybrids of Sunflower (Brio NK, NK Armonia, Country NK, NK Ferté), for their growing conditions PD - Nitra Blatnica. Studied the impact of the year and growth promoter Atonik of the biological materials. The results suggest that the effect of year was not statistically proved the formation of the production parameters of Sunflower. Application of growth promoter Atonik demonstrated statistical impact on the production of sunflower hybrids achenes.

Key words: Sunflower, Atonik, oiliness, crops achenes

Úvod

Olejniný sú jednou z perspektívnych komodít a to nielen na trhoch domácich, ale predovšetkým svetových. Svoje prvenstvo v poradí zastáva kapusta repková pravá a na druhom mieste v pestovaní je slnečnica ročná, ktorá je v našich pestovateľských podmienkach zaujímavou tržnou plodinou.

Na trhu je dopyt po olejových typoch hybridoch, s obsahom kyseliny olejovej nad 82 %. Úspešnosť pestovania slnečnice ročnej je závislá od viacerých ukazovateľov. Jedným z najdôležitejších faktorov pestovania slnečnice ročnej (Beard a Geng 1982) je výber a optimálna rajonizácia hybridu. Podľa Ferrerasa a Costu a kol. (2000) hybridy ovplyvňujú nielen úrodu a olejnosť, ale aj parametre jednotlivých úrodotvorných prvkov.

Rastové stimulatory sú látky, ktoré majú vplyv na vývojové a rastové procesy prebiehajúce v rastline. Ich využiteľnosť, v maximálnej miere, stúpa s rešpektovaním jednotlivých agrotechnických výživárskych, ochranných a pestovateľských opatrení (Záhradníček, 2007). Často o miere regulátorov rastu na produkčné ukazovatele rozhoduje priebeh poveternostných podmienok ročníka.

Mýtinová et. al., (2005) uvádza, že súčasne ekonomická situácia vyžaduje rastlinnú výrobu s najefektívnejšími vstupmi. Počas rastu plodiny prechádzajú rôznymi záťažovými procesmi, obmedzujúcimi ich rast a tým úrodu a kvalitu produkcie. Pri vývine rastlín dochádza k rôznej intenzite spotreby živín, vrátane stopových prvkov. Postupne dochádza k zmenám potreby a pomerov endogénnych fytohormónov, podieľajúcich sa na látkovej výmene (účinnosť enzýmov, tvorbu aminokyselín a bielkovín, z ktorých mnohé ovplyvňujú odolnosť rastlín voči nepriaznivým vplyvom stanovišťa a suchu).

Regulatory rastu sa v posledných rokoch stávajú veľmi dôležitým intenzifikačným faktorom v celej rastlinnej výrobe. Uplatňujú sa pri stimulácii produkcie, v štádiu regulácie transportu látok v rastlinách, podporujú zakoreňovanie a prezimovanie rastlín. Rovnako urýchľujú postresovú regeneráciu rastlín a tým ovplyvňujú tvorbu výnosu a kvality rastlinnej produkcie (Pulkrábek, 2007).

Materiál a metódy

V rokoch 2007–2008 bol na pozemkoch PD Nitrianska Blatnica, v kukuričnej výrobní oblasti charakterizovanej ako teplá a mierne suchá, založený poľný polyfaktorový pokus s registrovanými hybridmi slnečnice ročnej. Pokus bol založený v štyroch opakovaní metódou delených dielcov.

Príprava pôdy a spôsob založenia porastu boli realizované v súlade so zásadami technológie pestovania slnečnice ročnej. Predplodinou bola pšenica letná forma ozimná. Základné hnojenie bolo vykonané bilančnou metódou na základe agrochemického rozboru pôdy na predpokladanú úrodu 3 t.ha⁻¹.

Výsledky experimentu boli vyhodnocované v štatistickom programe Statgraphics Plus pomocou viacfaktorovej analýzy rozptylu.

Sledované faktory experimentu

Hybridy

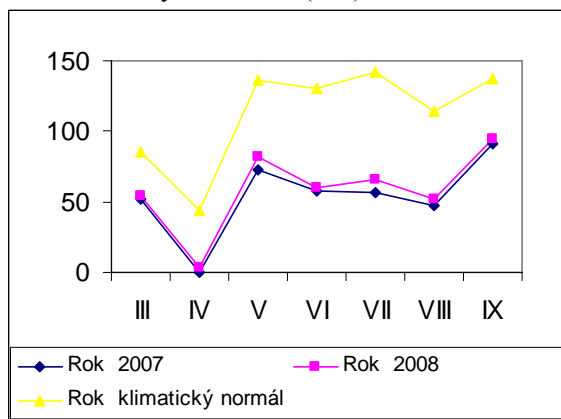
Do experimentu bol zaradený biologický materiál: NK Brio (stredne neskorý), NK Armoni (stredne neskorý), NK Countri (stredne neskorý), NK Ferti (stredne skorý).

Ročník

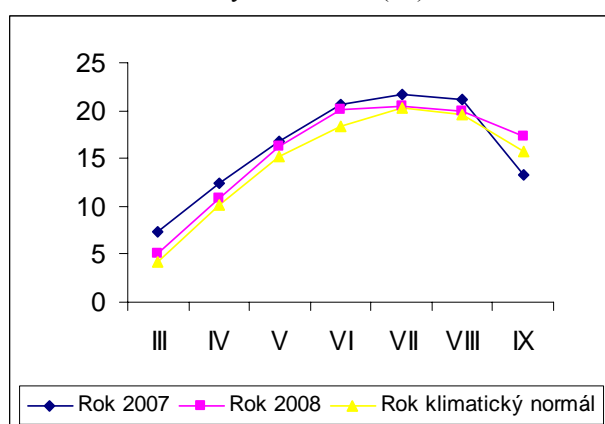
V experimentoch boli sledované poveternostné podmienky experimentálnych rokov 2007 – 2008:

- teplota (°C)
- úhrn zrážok (mm).

Obrázok 1: Priemerné hodnoty zrážok za roky 2007-2008 (mm)



Obrázok 2: Priemerné hodnoty teplôt za roky 2007-2008 (°C)



Ošetrovanie Atonikom

Atonik je rastlinný stimulátor, ktorého účinnými látkami sú aromatické nitrozluččeniny ortho-nitrofenolát sodný (2 g.l^{-1}), para – nitrofenolát sodný (3 g.l^{-1}) a 5 – nitroguajakolát sodný (1 g.l^{-1}), v prirodzených podmienkach nachádzajúce sa v každej rastline.

Úroveň ošetrovania Atonikom: - kontrolný variant (neošetrený Atonikom)
- ošetrený Atonikom (1.termín: BBCH 18; 2.termín: BBCH 53)

Cieľom experimentu bolo porovnať úrodovú výkonnosť a olejnatosť sledovaných hybridov slnečnice ročnej a ich reakciu na rôznu úroveň ošetrovania rastovým stimulátorom Atonik. Sledovať úroveň poveternostných podmienok (priemerná denná teplota, úhrn zrážok), ich priebeh a vplyv na úrodu a kvalitu slnečnice ročnej.

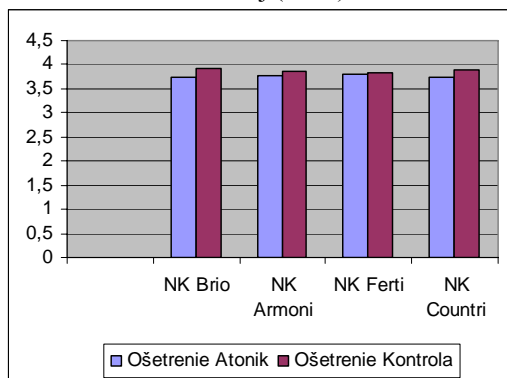
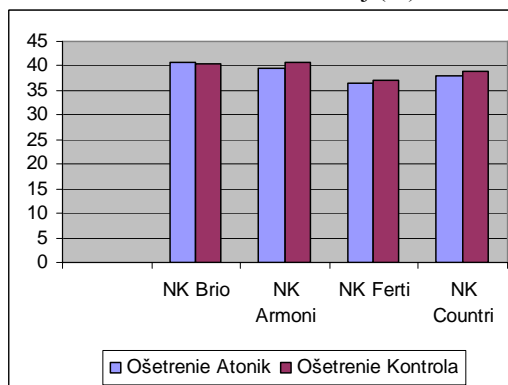
Výsledky a diskusia

Baničová (2003) uvádza významný vplyv poveternostných podmienok ročníka na tvorbe úrody slnečnice ročnej. Nami dosiahnuté výsledky experimentov nepotvrdili štatisticky vysokú závislosť vplyvu poveternostných podmienok ročníka na formovaní produkčných parametrov slnečnice ročnej. V úrode nažiek boli, v rámci ročníkov, zaznamenané minimálne rozdiely a to v prospech experimentálneho roka 2007 ($+ 0,06 \text{ t.ha}^{-1}$). Pri analyticky stanovenom obsahu tukov bola tendencia opačná, t. j. rok 2008 ($+ 0,9 \%$). V roku 2007 boli poveternostné podmienky priramennejšie ako v roku 2008, čo sa odzrkadlilo na zvýšenej úrode, aj keď len v nepatrnom množstve.

Z pohľadu použitých hybridov konštatujeme, že najvyššie parametre úrody nažiek boli zistené pri hybride Brio $3,8 \text{ t.ha}^{-1}$. Uvedená tendencia je zhodná i s úrovňou maximálneho obsahu tukov v nažkách (Brio 40,85 %).

Rastový stimulátor Atonik ukazovatele hodnotenia pokusu ovplyvnil štatisticky nepreukazne. V rozsahu kontrolného variantu bol zistený prírastok nielen na úrode nažiek ($+ 0,11 \text{ t.ha}^{-1}$), ale aj pri obsahu oleja v nažkách ($+0,74 \%$). Pri použití biologického materiálu nebol vplyvom Atoniku zaznamenaný prírastok úrody nažiek ani na jednom skúšanom hybride.

Celkové hodnoty obsahu oleja boli priaznivejšie na kontrolnom variante, bez ošetrovania Atonikom. Výnimku tvorí hybrid Brio, pri ktorom na variante ošetrovanom Atonikom bolo zaznamenané zvýšenie obsahu oleja o 0,05% v porovnaní s kontrolným variantom.

Obrázok 3: Úroda hybridov
slnčnice ročnej (t.ha⁻¹)Obrázok 4: Olejnatosť hybridov
slnčnice ročnej (%)

Tabuľka 1: Vplyv ročníka na produkčné parametre slnčnice ročnej (2007 - 2008)

Hybrid	2007		2008	
	%	t.ha ⁻¹	%	t.ha ⁻¹
NK Brio	40,46	3,94	41,25	3,81
NK Armoni	36,3	3,87	36,23	3,81
NK Ferti	36,3	3,87	35,5	3,79
NK Countri	36,3	3,87	39,98	3,76

Záver

V poľných polyfaktorových pokusoch realizovaných v rokoch 2007 – 2008, v teplej kukuričnej výrobní oblasti charakterizovanej ako teplá a mierne suchá, bol sledovaný vplyv poveternostných podmienok ročníka, aplikácie rastového stimulantu Atonik na výšku úrody a olejnatosti hybridov NK Brio, NK Armoni, NK Ferti, NK Countri.

Pri formovaní produkčných parametrov slnčnice ročnej bol, v sledovaných ročníkoch, vplyv poveternostných podmienok nevýrazný, pričom najvýznamnejšie hodnoty sledovaných parametrov boli pri hybride Brio.

Z výsledkov pokusu vyplýva že foliárna aplikácia rastového stimulantu Atonik, v rastových fázach 18 – 53 BBCH, nemala v konkrétnych podmienkach prostredia vplyv na úrodu nažiek a olejnatosť slnčnice ročnej v daných ročníkoch. Na rastový stimulant Atonik najlepšie reagoval hybrid Brio, kde na variante s Atonikom sa zvýšila olejnatosť oproti kontrolnému variantu.

Literatúra

- BANIČOVÁ, J., RYŠAVÁ, B., 2003. Slnečnica biológia, pestovanie a využívanie. 1 vyd. Nitra: SPU Nitra, 2003. 104 s. ISBN 80-8069-165-7.
- BEARD, B.H. – GENG, S., 1982: Interrelationship of morphological and economic characters of sunflower, Crop Science, Vol. 22, pp. 817 – 822.
- FERRERAS, L. A. – COSTA, J. L. – GARCÍA, F. O. – PECORARI, C., 2000: Effect of no-tillage on some soil physical properties of a structural degraded Petrocalcic Paleudoll of the southern „Pampa“ of Argentina, Soil and Tillage Research, Vol. 54, pp. 31-39.
- MÝTINOVÁ, J., WILHELMOVÁ, N., GAUDINOVÁ, A., MOTYKA, V., 2005. In: Srovnání účinků v různých abiotických stresů na antioxidační enzymový systém v rostlinách s odlišným metabolismem cytokinů – vliv biotických a abiotických stresorů na vlastnosti rostlin: Sborník vědeckých referátů. 2005. 211-215p.
- PULKRÁBEK, J., - URBAN, J., BEČKOVÁ, L., 2007. Atonik utilization for acceleration of poststress regeneration and lessening impact of herbicide stress on sugar beet plants, 2007. Listy Cukrovarnické a Reparské 123 (2), pp. 43-46.
- ZÁHRADNÍČEK, J. – TYŠLER, L. – KOŽNÁROVÁ, V., - ŠVACHULA, V., - JARÝ, J., 2007. Zralost cukrovky z pohledu pěstitele a cukrovarníka. In Úroda, roč. 55, 2007, č.9, s 30-31. ISSN 0139-6013.

HODNOTENIE VARIABILITY MORFOLOGICKÝCH ZNAKOV LÁSKAVCA (*AMARANTHUS L.*) EVALUATION VARIABILITY OF MORPHOLOGICAL TRAITS OF AMARANTH (*AMARANTHUS L.*)

Iveta ČIČOVÁ

According to the Descriptor for amaranth genetic resources, there were studied also genetic resources in Piešťany. Several morphological traits of amaranth were evaluated: plant height, growth habit, leaf number and colour, leaf length and width, leaf shape and margin, petiole pigmentation, stem colour and pubescence, root type, inflorescence length stalk and laterals, inflorescence shape and colour, inflorescence density index, seed colour and shape, branch number, 1000-seed – weight. We have evaluated species of amaranth and found out its large variability in plant height (1131 – 1874 mm), leaf width (62,3 - 101,53 mm), inflorescence length (368,73 – 701,33 mm).

Key words: amaranth, morphological traits, genetic resources

Úvod

Láskavec (*Amaranthus L.*) je stará kultúrna plodina amerického kontinentu. V histórii stredoamerických kmeňov Aztékov a Mayov bol do španielskej okupácie v 16. storočí treťou najrozšírenejšou plodinou. Pred objavením Ameriky predstavovala jeho ročná produkcia semien 15 – 20 tisíc ton. Aztékovia, Inkovia a Mayovia používali láskavec ako základnú potravinu spolu s kukuricou a fazuľou. Láskavec bol pestovaný na ťažko prístupných miestach hornatých oblastí Strednej a Južnej Ameriky. V Indii, Číne a ďalších nevládných oblastiach Himálaj sa táto rastlina stala dôležitou obilninou a zeleninou.

Materiál a metódy

Poľný pokus bol založený v rokoch 2007 – 2008, blokovou metódou (R. A. FISCHER, 1953). Do pokusu bolo zaradených deväť odrôd láskavca. Predplodinou láskavca bola pšenica letná - forma ozimná. Príprava pôdy a spôsob založenia porastu bol v súlade so zásadami technológie pestovania láskavca vypracovanej autorským kolektívom (Jarošová a kol., 1997). Seje sa do hĺbky 10 – 15 mm, na vzdialenosť medzi riadkami 0,30 m, optimálna hustota porastu je 10 – 16 vzídených rastlín na bežný meter (30 – 40 rastlín na m²). Po vzídení a vytvorení páru pravých listov bol porast plečkováný. Morfológické hodnotenie odrôd bolo robené podľa klasifikátora: G. J. H. GRUBBEN: Genetic Resources of Amaranths (IBPGR 1981).

Výsledky a diskusia

U všetkých odrôd dochádza k čiastočnému vypadávaní semien. Rastliny láskavca sú zelené, s vysokým obsahom vody i po dozretí semien a vegetáciu končia až s príchodom mrazov. Môžu mať vysoké percento vody v stonkách, listoch (až 70%) a v semenách (18-27 %). Obsah vody v láskavci je limitujúcim faktorom pre priamy zber kombajnom

Tabuľka 1: Hodnotenie morfológických znakov láskavca v rokoch 2007 a 2008

Odroda	Výška rastliny (mm) 2007	Výška rastliny (mm) 2008	Dĺžka listu (mm) 2007	Dĺžka listu (mm) 2008	Šírka listu (mm) 2007	Šírka listu (mm) 2008	Dĺžka súkvetia (mm) 2007	Dĺžka súkvetia (mm) 2008
Koniz	1191,00	1314,67	139,03	128,97	65,90	62,33	567,00	566,00
1008	1352,33	1538,67	162,70	139,33	101,23	89,30	486,67	427,50
Olpir	1490,33	1687,00	160,43	129,37	94,27	79,23	505,67	438,00
Golden Giant	1695,33	1733,00	179,40	129,90	101,53	72,73	571,33	436,00
Annapurna	1819,33	1874,33	133,57	115,70	79,27	67,73	682,00	590,67
Burgundy	1520,00	1702,67	153,87	121,27	84,93	68,67	564,67	442,67
Love-lies-bleeding	1131,00	1428,33	134,83	130,73	82,40	82,50	368,67	379,00
K-283	1182,67	1513,33	155,93	124,97	87,60	75,93	462,67	450,00
Plainsman	1684,00	1846,00	126,73	114,30	72,27	69,03	701,33	547,00

Tabuľka2: Hodnotenie morfológických znakov láskavca v rokoch 2007 a 2008

Odroda	ochlpenie stonky	pigmentácia stonky	pigmentácia listu	tvar listu	pigmentácia stopky	tvar súkvetia	prítomnosť pazušných súkvetí	hustota súkvetia	farba súkvetia
Koniz	nízke	zelená	zelená/ purpurová	elipsovité	zelená	3	áno	prostredný	ružová
1008	nízke	zelená	zelená	vajcovité	zelená	2	áno	hustý	žltá
Olpir	nízke	zelená	zelená	elipsovité	zelená	2	áno	prostredný	ružová
Golden Giant	nízke	hnedá	zelená	elipsovité	zelená	2	áno	prostredný	hnedá
Burgundy	nízke	purpurová	purpurová	elipsovité	zelená	2	nie	prostredný	purpurová
Love-lies bleeding	nízke	zelená	zelená	vajcovité	zelená	2	nie	hustý	žltá
K-283	nízke	zelená	zelená	elipsovité	zelená	2	áno	prostredný	žltá
Plainsman	nízke	purpurová	zelená	vajcovité	zelená	2	nie	prostredný	purpurová

Záver

Všetky pozorované odrody majú vzpriamený habitus rastliny, bez bočných vetiev, bez trňov a ihlic v pazuchách listov. Rozdielne je ochlpenie stonky, ktoré je zreteľné u Golden Giant, Annapurna, Burgundy, pigmentácia stonky je zelená, iba pri odrode Burgundy má purpurovú farbu a odroda Golden Giant má hnedú farbu. Listy sú neochlpené, elipsovité až vajcovité, s celistvým okrajom, s nápadnými cievami, zelené, iba Burgundy má purpurové sfarbenie listov. Tvar súkvetia je vzpriamená metlina s krátkymi alebo dlhými vetvami, väčšinou hustá, farba súkvetí je zelená, žltá, hnedá a bordová. Semená sú svetlé a okrúhle. Ako vidieť z tabuľky1 najvyššou odrodou v roku 2007 aj 2008 bola Annapurna, ktorá pochádza z Himalájí. Počas celého vegetačného obdobia bola výrazne vyššia v porovnaní s ostatnými odrodami. Je to vysoká a mohutná odroda s najhrubšou stonkou, preto by bola vhodná na výrobu bioplynu, alebo na krmovinárske účely. Najväčšiu dĺžku a šírku listov dosiahol Golden Giant (dĺžka 179,4 mm a šírka 101,53 mm) a druhou odrodou s veľkými listami bola 1008, ktorá je povolenou odrodou aj na krmovinárske účely. Najdlhšie súkvetie v tomto sledovanom období mala americká odroda Plainsman (701,33 mm), ktorá je povolenou potravinárskou odrodou. Hodnotením genetických zdrojov sa zaoberal Varalakshmi (2004), ktorý hodnotil zeleninové druhy láskavca a zistil jeho veľkú variabilitu vo výške rastlín (31-81,5 cm), dĺžke vetiev (5-58,3 cm), šírke listov (3-12 cm), dĺžke súkvetia (5-50 cm) a dĺžke kvitnutia (29-69 dní). Podľa klasifikátora pre genetické zdroje láskavca boli skúmané i genetické zdroje v Číne a z hodnotenia boli doporučené pre prax vhodné genotypy pre túto klimatickú oblasť (Wu a kol., 2000). Zrnové typy, ktoré boli v Amerike domestikované poskytujú vysokú úrodu semien a sú vhodné pre ľudskú výživu. Zeleninové typy poskytujú vysokú úrodu biomasy a hmotu pre alternatívne využitie napríklad pre krmovinárske, alebo pre energetické účely (Mapes a kol., 1996).

Pod'akovanie. Táto práca bola podporovaná Agentúrou na podporu výskumu a vývoja na základe zmluvy č. VMSP - P - 0143 -09

Literatúra

- GRUBBEN, G.J.H.: Genetic resources of Amaranths, IBPGR Secretariat, Rome, 1981, 57p.
- HABÁN, M. a kol.: Effect of amaranth genotypes on seed production and weight of seeds, In: Acta fytotechnica et zootechnica, Vol. 4, 2001, p.218-220.
- JAROŠOVÁ, J. – MICHALOVÁ, A. – VAVREINOVÁ, S. – MOUDRÝ, J.: Podmínky pro dodávky potravinářského amarantu, in Metodiky pro zemědělskou praxi, Pěstování a využití amarantu 13/1997, Praha, s.28-29.
- MAPES, C. – CABALLERO, J. – ESPITIA, E. – BYE, R. A.: Morphophysiological variation in some Mexican species of vegetable *Amaranthus*: evolutionary tendencies under domestication. In: Genetic Resources and Crop Evolution, 1996, vol.43, pp. 283-290.
- VARALAKSHMI, B.: Characterization and preliminary evaluation of vegetable amaranth (*Amaranthus* spp.) germplasm. In: Plant Genetic Resources Newsletter, IPGRI, 2004, No 137:55-57.
- WU, H. – SUN, M.- YUE, S. – SUN, H.- CAI, Y. – HUANG, R. – BRENNER, D. – CORKE, H.: Field evaluation of an *Amaranthus* genetic resource collection in China. In: Genetic Resources and Crop Evolution, 2000, vol. 47, No. 1, pp. 43-53.

MIKROSATELITNÍ ANALÝZA VARIABILITY POPULACÍ JITROCELE KOPINATÉHO (*PLANTAGO LANCEOLATA* L.) A JITROCELE VĚTŠÍHO (*P. MAJOR* L.) MICROSATELLITE VARIABILITY ANALYSIS OF RIBWORT PLANTAIN (*PLANTAGO LANCEOLATA* L.) AND COMMON PLANTAIN (*P. MAJOR* L.) POPULATIONS

Daniela ČÍLOVÁ – Pavel VEJL – Martina MELOUNOVÁ – Jakub VAŠEK – Petr SEDLÁK – Šárka VAŠIČKOVÁ

Two populations (each containing 30 genotypes) of Plantago major and Plantago lanceolata coming from the locality Vinařická Hora were assessed. Loci Pll 1, Pll 8 and Pll 11 were analysed at P. lanceolata population by SSR markers, loci Pm3, Pm5 and Pm 11 at P. major, respectively. The presence of further alleles was observed at P. major population in comparison to published data. Lower values of H_o to H_e was found at loci Pll 8, Pm3, and Pm5 which might be caused by a space isolation and ongoing inbreeding. PIC and null allele frequency were estimated, too.

Key words: Plantago lanceolata, Plantago media, SSR, biodiversity

Úvod

Biodiverzita patří mezi základní rysy přirozených populací. Biodiverzitu lze charakterizovat na základě rozdílných fenotypových znaků, dle evoluce druhu, fylogenetického nebo kladistického přístupu. Techniky zaměřené na studium polymorfismů nukleových kyselin představují významný nástroj určený pro studium biodiverzity. Biodiverzita má nesmírný význam nejen z pohledu adaptability biologického druhu, ale její šíře hraje klíčovou roli procesu domestikace a následného šlechtění rostlin. Čeleď *Plantaginaceae* představuje starobyrou čeleď řádu *Plantaginales*. Primitivnější taxon, ze kterého se tato čeleď vyvinula, není známý. Jitrocel kopinatý (*Plantago lanceolata* L.) a jitrocel větší (*Plantago major* L.) představují dva nejrozšířenější zástupce této čeledi. Jedná se o typické větrosrubitné druhy s hermafroditními květy, které se vyznačují protogynií. Prašníky jitrocele kopinatého jsou na rozdíl od nenápadných prašníků jitrocele většího zbarveny výrazně žlutě a slouží jako atraktant pro opylovače – pestřenky rodu *Erythralis* (Stelleman a Meeuse, 1976). Jitrocel kopinatý i jitrocel větší jsou vytrvalá trsnatá byliny pocházející z Evropy a Asie. V důsledku lidské činnosti patří dnes mezi kosmopolitní rostliny. Oba druhy jsou velmi proměnlivé téměř ve všech znacích. Variabilita se nejnápadněji projevuje ve vzrůstu, odění, velikosti a tvaru listů a velikosti klasů. Jitrocel kopinatý i větší představují druhy využívané farmaceutickým průmyslem i v lidovém léčitelství. Mezi jejich významné účinné látky patří slizy, glykosidy aukubin a katalpol, třísloviny, kyselina citrónová a polyfenolické látky (Jurišić-Grubešić *et al.*, 2005).

Mikrosatelitní DNA markery představují v současnosti jednu z nejčastěji využívaných metod populačně genetických studií. Hale a Wolff (2003) identifikovali u *P. lanceolata* pět mikrosatelitních lokusů vykazujících polymorfismus u dvou populací pocházejících z Velké Británie a USA. Britská populace vykazovala ve srovnání s americkou populací vyšší stupeň variability. Hale a Wolff (2003) nepředpokládají výskyt nulových alel ani u jednoho z hodnocených lokusů. Squirrell a Wolf (2001) našli u druhu *P. major* rovněž pět polymorfních a kodominantních mikrosatelitních lokusů. Pro své experimenty použili sympatrickou populaci jitrocele většího pocházející z Itálie.

Materiál a metody

Ekologická charakteristika stanoviště hodnocených populací

Pro experimenty byly vybrány přirozené populace *P. lanceolata* a *P. major* rostoucí na shodné lokalitě vykazující určitý způsob prostorové izolace od okolních populací. Jednalo se o nejspodnější část opuštěného jámového etážového lomu národní památky Vinařická hora u Kladna ve středních Čechách. Vinařická hora je typickým stratovulkánem. Plocha o přibližné velikosti 400 m² je pokryta vrstvou neuzpevněného tufitu a čedičové sutě. Od okolních porostů je oddělena kolmou 25 metrů vysokou skalní bariérou. Bylinný porost je minimálně sešlapáván. *P. lanceolata* a *P. major* představují převažující druhy bylinného patra. Porost není spásán ani kosen. Vzdálenost mezi 30 náhodně vybranými analyzovanými rostlinami byla přibližně 1 m.

Mikrosatelitní analýzy

DNA byla izolována pomocí DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen). U *P. lanceolata* byly hodnoceny lokusy Pll1, Pll8 a Pll11 při použití primerů podle Hale a Wolff (2003). U *P. major* byly hodnoceny lokusy Pm3, Pm5 a Pm11 při použití primerů podle Squirrell a Wolf (2001). Reakční směs o objemu 12,5 µl obsahovala 50 ng templátové DNA, 0,7 U *Taq* polymerázy (Fermentas) a 5 µg BSA. Koncentrace ostatních komponent PCR reakce byla následující: 10 mM Tris-HCl (pH 8,8), 50 mM KCl, 0,08%, Nonidet P40, 1,5 mM MgSO₄, 0,2 µM dNTP, 0,24 µM primer F, 0,24 µM primer R a 4 mM tetramethyl amonium oxalát (Top Bio). Amplifikace probíhala podle následujícího schématu: 1x (95°C, 3 minuty), 35x (94°C 30 sekund, anelační teplota dle lokusu 40 sekund, 72°C 40 sekund), 1x (72°C 10 minut). Pro lokusy Pll1, Pll8, Pll11 a Pm11 byla

použita anelační teplota 59°C, pro lokus Pm3 60°C a pro lokus Pm5 52°C. Polymorfismus markerů byl detekován s využitím sekvenční elektroforézy Sequi-Gene II (Bio-Rad) modifikovaným postupem podle Benbouza *et al.* (2006). Populační statistické parametry H_E , H_0 a PIC vyhodnoceny programem Cervus 3.0 (Kalinowski, 2007).

Výsledky a diskuse

V tabulce 1 je uveden přehled základních populačně genetických parametrů pro obě hodnocené populace. Z této tabulky vyplývá, že počet alel je závislý na analyzovaném lokusu. U *P. lanceolata* získané výsledky odpovídají experimentům Hale a Wolff (2003), kde u lokusu PII1 bylo nalezeno 8 alel, u lokusu PII8 13 alel a u lokusu PII11 22 alel. Námí hodnocená populace *P. major* vykazovala vyšší spektrum alel oproti populacím, které hodnotili Squirrell a Wolf (2001). Citovaní autoři u lokusu Pm3 našli pouze 1 alelu a lokusy Pm5 a a Pm11 po 4 alelách. Jejich výsledky jsou zapříčiněny zřejmě tím, že hodnotili pouze 10 rostlin. Námí zjištěná heterozygotnost populace *P. major* byla tudíž vyšší ve srovnání s údaji, které uvádějí Squirrell a Wolf (2001). U populace *P. lanceolata* se heterozygotnost v lokusu PII11 blížila údajům stanoveným pro tento lokus Hale a Wolff (2003). V lokusech PII1 a PII8 vykazovala populace Vinařické hory výrazně nižší heterozygotnost ve srovnání s americkou a britskou populací, které hodnotili Hale a Wolff (2003). V tabulce 1 jsou uvedeny rovněž hodnoty pravděpodobnosti výskytu nulové alely, které vycházejí z frekvence nalezených homozygotů. Vzhledem k prostorové izolaci populací obou druhů lze tyto interpretovat rovněž jako důsledek inbreedingu, ke kterému s velkou pravděpodobností po řadu generací dochází.

Tabulka 1: Populačně genetické parametry

Botanický druh	Lokus	Počet detekovaných alel	PIC	Zjištěná heterozygotnost H_0	Očekávaná heterozygotnost H_E	Pravděpodobnost výskytu nulové alely
<i>Plantago lanceolata</i> 30 rostlin	PII1	4	0,361	0,200	0,395	0,356
	PII8	13	0,794	0,433	0,822	0,305
	PII11	20	0,924	0,833	0,944	0,054
<i>Plantago major</i> 30 rostlin	Pm3	8	0,713	0,433	0,763	0,261
	Pm5	6	0,646	0,233	0,698	0,508
	Pm11	9	0,666	0,633	0,707	0,042

Závěr

V příspěvku jsou prezentovány výsledky pilotních studií polymorfismů mikrosatelitních markerů u populací *P. lanceolata* a *P. major* v České republice. U každého druhu byla optimalizována detekce alel u 3 mikrosatelitních lokusů. Zvolený postup umožnil charakterizovat základní populačně genetické parametry. Nižší stupeň zjištěné heterozygotnost u obou druhů je v souladu s hypotézou o prostorové izolaci populací.

Poděkování. Prezentované výsledky byly získány za podpory grantového projektu MSM 6046070901.

Litatura

- BENBOUZA, H. - JACQUEMIN, J. M. - BAUOIN, 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, N. 2, 2006, pp. 77-81.
- HALE, M. L. – WOLFF, K. (2003): Polymorphic microsatellite loci in *Plantago lanceolata*. In: Molecular Ecology Notes, vol. 3, N. 1, 2003, pp. 134-135.
- JURIŠIĆ-GRUBEŠIĆ, R. – VUKOVIĆ, J. – KREMER, D. – VLADIMIR-KNĚŽEVIĆ, S. (2005): Spectrophotometric method for polyphenols analysis: Prevalidation and application on *Plantago L.* species. In: Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, vol. 39, N. 3-4, 2005, pp. 837-842.
- KALINOWSKI, S. T. - TAPER, M. L. – MARSHALL, T. C. (2007): Revising how the komputer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. In: Mol. Ecol., vol. 16, 2007, N. 5, 2007, pp. 1099-1106.
- SQUIRRELL, J. – WOLF, K. (2001): Isolation of polymorphic microsatellite loci in *Plantago major* and *P. intermedia*. In: Molecular Ecology Notes, vol. 1, N. 3, 2001, pp. 179-181.
- STELLEMAN, P. – MEEUSE, A. D. J. (1976): Anthecological relations between reputedly anemophilous and syrphid flies. Part I The possible role of syrphid flies as pollinators of *Plantago*. In: Tijdschrift voor Entomol, vol. 119, N. 1, 1976, pp. 15-31.

VPLYV PH PÔDY NA PRIEMERNÚ UTILIZÁCIU C-ZDROJOV A METABOLICKÚ DIVERZITU AERÓBNÝCH BAKTÉRIÍ V RIZOSFÉRE GENETICKY MODIFIKOVANÝCH RASTLÍN LUCERNY SIATEJ

EFFECT OF SOIL PH ON AVERAGE METABOLIC RESPONSE AND COMMUNITY METABOLIC DIVERSITY OF AEROBIC BACTERIA IN THE RHIZOSPHERE OF TRANSGENIC ALFALFA

Natália FARAGOVÁ – Juraj FARAGÓ

In laboratory conditions we evaluated the average C-source utilization patterns and metabolic diversity levels of microbial communities in rhizospheres of transgenic alfalfa lines GTL4/404-1, GTL4/402-2 and A5-3-3 containing the gene AMVcp-s coding for Alfalfa Mosaic Virus coat protein, and the non-transgenic counterpart SE/22-GT2. The plants were grown in two types of soils, i.e. neutral (pH = 7.0) and acidic (pH = 4.0), and the biochemical analyses (average metabolic response, AMR, and community metabolic diversity, CMD) were performed using the BiologTM microtiter plates for Gram-positive and Gram-negative bacteria, respectively. Statistically significant differences between non-transgenic control plants and transgenic lines containing the AMVcp-s were detected for the line GTL4/404-1 in metabolic diversities of microorganisms (CMD) and average C-source utilization patterns (AMR) in neutral soil, for GTL4/402-2 in CMD and AMR in neutral soil and in AMR in acid soil, and for A5-3-3 in AMR in neutral soil. The functional densities of bacteria and the levels of C-source utilization of the rhizosphere communities increased proportionally with time in all the lines of alfalfa grown in both types of soil, respectively.

Key words: aerobic bacteria, average metabolic response, community metabolic diversity, genetically modified alfalfa

Úvod

Predpokladá sa, že v budúcnosti budú geneticky modifikované plodiny hrať dôležitú úlohu v poľnohospodárskej produkcii. Mnohé z týchto geneticky modifikovaných rastlín môžu mať odlišné koreňové exudáty, ktoré následne môžu ovplyvniť mikrobiálne spoločenstvá rizosféry. Zmena v zložení koreňových exudátov môže pozmeniť aj pôdnu biocenózu (O'CONNELL a kol., 1996). Preto sa v súčasnosti venuje veľké úsilie vývoju metód na posúdenie potenciálnych účinkov geneticky modifikovaných rastlín na biotické a abiotické environmentálne charakteristiky (CUSTERS, 2001; CONNER a kol., 2003; DAVIES, 2003; CORPILLO a kol., 2004). Jednou z úloh pre naplnenie týchto požiadaviek je aj determinácia či geneticky modifikované a izogénne nemodifikované rastliny majú jedinečné bakteriálne populácie rizosféry spojené s nimi a zistiť potenciál účinku genotypu transgénnych rastlín na homeostázu pôdneho ekosystému (O'CALLAGHAN a GLARE, 2001; GERMIDA, 2004).

Materiál a metódy

Rastlinný materiál:

- 1.) geneticky modifikované klony lucerny siatej (*Medicago sativa* L.), pochádzajúce z vysokoregenerujúceho genotypu Rg 9/I-14-22, izolovaného z odrody Lucia (FARAGÓ a kol., 1997) s vneseným génom AMVcp-s pre plášťovú bielkovinu vírusu mozaiky lucerny (KÚDELA a kol., 1995): GTL4/404-1, GTL4/402-2 a A5-3-3
- 2.) východiskový nemodifikovaný klon: SE/22-GT2.

Biochemické analýzy využitím systému BiologTM (USA):

- 1.) priemerná respiračná aktivita C-zdrojov mikroorganizmov (AMR)
- 2.) metabolická diverzita mikrobiálnych spoločenstiev (CMD).

Výsledky a diskusia

Pri hodnotení metabolickej diverzity mikrobiálnych spoločenstiev (CMD) a priemernej utilizácie C-zdrojov mikrobiálnou komunitou (AMR) v rizosfére geneticky modifikovaných klonov lucerny s vneseným AMVcp-s génom a ich parentálnych nemodifikovaných línií, pestovaných v neutrálnej (pH = 7) i kyslej (pH = 4) pôde, boli potvrdené štatisticky významné rozdiely medzi použitými variantami pôdy (sterilný a nesterilný), typom platničky (pre grampozitívne a gramnegatívne baktérie), meraniami (v 24-hodinových intervaloch) a jednotlivými genotypmi (ANOVA, $p < 0,01$, $p < 0,001$).

V neutrálnej pôde bola metabolická diverzita mikroorganizmov vyššia o 19 % a priemerná utilizácia C-zdrojov až o 54 % v porovnaní s kyslou pôdou. V oboch pôdnych substrátoch bola zaznamenaná vyššia metabolická diverzita aj utilizácia zdrojov C v substráte ošetrenom pred výsadbou sterilizáciou. V neutrálnej pôde sa najvyšším počtom substrátov utilizovaných mikrobiálnymi spoločenstvami a taktiež aj priemernou respiráciou C-zdrojov vyznačovali nemodifikované klony SE/22-GT2 a v kyslej pôde zase genotyp s vneseným AMVcp-s génom GTL4/404-1. Štatisticky vysoko preukazné rozdiely v priemernej respirácii C-zdrojov a metabolickou diverzitou boli detekované medzi gramnegatívnymi a grampozitívnymi baktériami (ANOVA, $p < 0,001$). Gramnegatívne baktérie sa vyznačovali o 54 až 143 % vyššou metabolickou diverzitou

mikrobiálnych spoločenstiev rizosféry ako grampozitívne bakteriálne spoločenstvá v rizosfére bez ohľadu na pôdny substrát. V kyslej pôde sa zvýšila priemerná utilizácia C-zdrojov gramnegatívnymi baktériami o 16 % v porovnaní s grampozitívnymi baktériami. Funkčná hustota mikrobiálnych spoločenstiev a utilizácia C-zdrojov sa zvyšovala priamoúmerne s časom bez ohľadu na pôdny substrát v rizosférach všetkých sledovaných transgénnych a netransgénnych klonov lucerny.

Metabolická diverzita mikroorganizmov v rizosfére transgénneho klonu GTL4/404-1 bola v porovnaní s netransgénnou kontrolnou líniou nižšia o 7 % v neutrálnej pôde a vyššia o 1 % v kyslej pôde. Podobne aj priemerná respirácia v rizosfére tohto klonu bola v neutrálnej pôde znížená o 22 % a v kyslej pôde o 3 % vyššia oproti geneticky nemodifikovanému klonu. Štatisticky preukazné rozdiely v oboch sledovaných charakteristikách medzi transgénnym klonom GTL4/404-1 a netransgénnou izogénnou kontrolou boli detekované len v neutrálnej pôde (ANOVA, $p < 0,05$).

V rizosfére geneticky modifikovaného klonu GTL4/402-2 bola metabolická diverzita mikroorganizmov v porovnaní s nemodifikovaným klonom SE/22-GT2 znížená o 14 % v neutrálnej a o 3 % v kyslej pôde. Rizosféra klonu GTL4/402-2 sa vyznačovala nižšou utilizáciou C-zdrojov o 19 % v neutrálnej a o 8 % v kyslej pôde oproti rizosférenej aktivite geneticky nemodifikovaného klonu. V neutrálnej pôde boli štatisticky preukazné rozdiely medzi rizosférami týchto dvoch klonov pozorované aj pri funkčnej hustote mikrobiálnych spoločenstiev, aj pri priemernej utilizácii C-zdrojov (ANOVA, $p < 0,001$). V kyslom pôdnom substráte sa pri porovnaní rizosfér týchto klonov potvrdili štatisticky významné rozdiely iba pri utilizácii C-zdrojov (ANOVA, $p < 0,05$).

Hoci bola sledovaná nižšia funkčná hustota mikroorganizmov v rizosfére klonu A5-3-3 oproti rizosfére netransgénnej kontroly v neutrálnej (o 7 %) aj kyslej pôde (o 0,1 %), štatisticky neboli tieto rozdiely potvrdené. Priemerná utilizácia C-zdrojov v rizosfére klonu A5-3-3 bola v neutrálnej pôde nižšia o 9 % a v kyslej pôde vyššia o 0,1 % v porovnaní s rizosférou netransgénnej kontroly. Variabilita utilizácie C-zdrojov medzi transgénnym klonom A5-3-3 a netransgénnym klonom SE/22-GT2 bola štatisticky významne potvrdená len v neutrálnej pôde (ANOVA, $p < 0,05$).

V mnohých prácach boli zistené rozdiely v mikrobiologických charakteristikách pôd medzi pôdami s vysiatymi transgénnymi alebo kontrolnými rastlinami, hoci veľký počet štúdií nenašlo žiadne vplyvy. V niektorých štúdiách boli zistené vplyvy porovnávané s tými, ktoré boli spôsobené environmentálnymi faktormi alebo inými druhmi plodín a často bolo konštatované, že tieto faktory majú väčší vplyv na mikrobiologické charakteristiky pôd, než geneticky modifikovaná vlastnosť. Vplyvy sú často obmedzené na rizosféru transgénnych rastlín alebo k časovému úseku, keď boli tieto rastliny prítomné, a navyše mnoho týchto opísaných vplyvov bolo založených na analýzach symbiotických mikroorganizmov, ktoré žijú v blízkej asociácii s rastlinami, ako napr. mykorrhízne huby alebo endofytické baktérie. Vplyv na tieto mikroorganizmy asociované s rastlinami môže byť nevýhodný pre plodinu samotnú a môže preto reprezentovať potenciálne ekonomické obmedzenie pre využívanie tejto plodiny, skôr než nebezpečenstvo pre ekosystém. Navyše veľa z nájdených vplyvov bolo časovo aj priestorovo obmedzených, a preto môžu potenciálne ovplyvňovať samotnú transgénnu plodinu. Tieto závery však predstavujú hypotézy, založené na dostupných údajoch a vyžadujú vedecké vyhodnotenie v budúcich experimentoch a pri monitoringu poľi vysadených geneticky modifikovanými plodinami. Výsledky mnohých štúdií naznačujú, že nástroje pre citlivú detekciu zmien v mikrobiálnych charakteristikách pôd sú dostupné, ukazujú však tiež, že v súčasnosti je veľmi ťažké až nemožné stanoviť, ktoré zmeny v týchto charakteristikách môžu predstavovať neakceptovateľné poškodenie pre pôdne systémy. Definícia a identifikácia indikátorov, ktoré kvantitatívne reprezentujú kvalitu pôdy alebo poškodenie pôdy bude jednou z veľkých vedeckých výziev pre pôdnu ekológiu v blízkej budúcnosti. Analýzy mikrobiálnych spoločenstiev pôdy s ich rozmanitými funkciami, môže prispieť k identifikácii takýchto indikátorov, ktoré potom môžu byť použité pre špecifickú diagnostiku a hodnotenie poškodení pôdnych systémov (WIDMER, 2007).

Záver

Štatisticky významné rozdiely medzi netransgénnymi parentálnymi líniami a transgénnymi klonmi obsahujúcimi *AMVcp-s* gén boli zachytené pri GTL4/404-1 (v metabolickej diverzite mikroorganizmov a priemernej utilizácii C-zdrojov len v neutrálnej pôde), GTL4/402-2 (v metabolickej diverzite mikroorganizmov a priemernej utilizácii C-zdrojov v neutrálnej pôde a pri utilizácii C-zdrojov v kyslej pôde) a pri A5-3-34 (v priemernej utilizácii C-zdrojov len v neutrálnej pôde). Funkčná hustota rizosféry baktérií a ich utilizácia C-zdrojov sa zvyšovala priamoúmerne s časom pri všetkých sledovaných klonoch lucerny, pestovaných v oboch pestovateľských substrátoch.

Literatúra

CONNER, A.J. – GLARE, T.R. – NAP, J.P. 2003. The release of genetically modified crops into the environment. II. Overview of ecological risk assessment. In: *Plant J.*, 33, 2003, s. 19-46.

- CORPILLO, D. – GARDINI, G. – VAIRA, A.M. – BASSO, M. – AIME, S. – ACCOTTO, G.P. – FASANO, M. 2004. Proteomics as a tool to improve investigation of substantial equivalence in genetically modified organisms: The case of a virus-resistant tomato. In: *Proteomics*, 4, 2004, s. 193-200.
- CUSTERS, R. 2001. Safety of genetically engineered crops. VIP Publ., Zwijnaarde, Netherlands, 2001, 160 s.
- DAVIES, J. 2003. Guidance document for the risk assessment of genetically modified plants and derived food and feed. European Commission, Brussels, 2003, 27 s.
- GERMIDA, J. 2004. Microbial communities influenced by transgenic oilseed rape. In: Proc. 8th Int. Symp. „Biosafety of Genetically Modified Organisms“, Sept. 26-30, 2004, Montpellier, France, s. 206-209.
- FARAGÓ, J. – HAUPTVOGEL, P. – KRAIC, J. 1997. Development of a breeding material of alfalfa with high regeneration ability by recurrent somatic embryogenesis. In: *Chloupek, O. – Simon, U. (Eds.): Seed Production of Lucerne. Academia Prague*, 1997, s. 38-39.
- KÚDELA, O. – GALLO, J. 1995. Characterization of the alfalfa mosaic virus strain T6. In: *Acta Virologica*, 39, 1995, s. 131-135.
- O'CALLAGHAN, M. – GLARE, T.R. 2001. Impacts of transgenic plants and microorganisms on soil biota. In: *New Zealand Plant Prot.*, 54, 2001, s. 105-110.
- O'CONNELL, K. P. – GOODMAN, R. M. – HANDELSMAN, J. 1996. Engineering the rhizosphere: expressing a bias. In: *Trends in Biotechnology* 14, 1996, s. 83-88.

VPLYV PH PÔDY NA POČETNOSŤ AERÓBNÝCH MIKROORGANIZMOV V RIZOSFÉRE GENETICKY MODIFIKOVANÝCH RASTLÍN LUCERNY SIATEJ

EFFECT OF SOIL PH ON ABUNDANCE OF AEROBIC MICROORGANISMS IN THE RHIZOSPHERE OF TRANSGENIC ALFALFA PLANTS

Natália FARAGOVÁ – Juraj FARAGÓ

In this study, we evaluated the abundance of microbial communities in the rhizosphere of transgenic alfalfa plants containing the AMVcp-s gene coding for Alfalfa Mosaic Virus coat protein. Transgenic plants of three lines, GTLA/404-1, GTLA/402-2 and A5-3-3, as well as of the non-transgenic control line SE/22-GT2, were grown in two types of soils, neutral (pH = 7.0) and acidic (pH = 4.0), respectively, in a climatic room. Selective culture media were used for microbiological analyses. Statistically significant differences between transgenic lines of alfalfa containing the AMVcp-s gene, and the isogenic control line SE/22-GT2 were detected in abundances of actinomycetes (for line GTLA/404-1), cellulolytic bacteria (A5-3-3), rhizobia (GTLA/402-2) and number of bacterial spores (GTLA/402-2) in neutral soil, and of actinomycetes (for line GTLA/404-1), cellulolytic bacteria (GTLA/404-1 and A5-3-3), nitrifying bacteria (GTLA/404-1), denitrifying bacteria (A5-3-3) and total number of colony-forming units of microorganisms (GTLA/402-2) in acid soil, respectively.

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

Úvod

Väčšina štúdií, týkajúcich sa potenciálnych rizík pestovania geneticky modifikovaných rastlín, bola zameraná hlavne na „nadzemné“ vplyvy, hoci vplyv transgénnych plodín na mikrobiálne spoločenstvá a procesy v pôde sú dôležitým kľúčom fungovania ekosystému. Podľa LYNCH a kol. (2004) to môže byť spôsobené tým, že vplyvy na pôdnu biotu sú len ťažšie analyzovateľné. Mikroorganizmy sú dominantnými pôdnymi organizmami, zodpovednými za funkcie ako cyklus živín a ich dekompozícia, priame a nepriame interakcie s rastlinami a vplyv na vegetačnú dynamiku (BRUINSMA a kol., 2003). Základnou mikrobiologickou metódou zameranou na kvantitatívnu charakteristiku mikroorganizmov je kultivačná metóda alebo metóda najpravdepodobnejšieho počtu. Metóda sa spoľahlivo využíva na detekciu špecifických pôdných mikroorganizmov ako symbiotické N₂-fixujúce baktérie, mikroorganizmy rozkladajúce rôzne organické substráty, nitrifikačné baktérie a pod. a poskytuje jednoduchý a užitočný prostriedok na identifikáciu a charakterizáciu zmien špecifických skupín mikroorganizmov v rizosfére rastlín (BRUINSMA a kol., 2003; DONEGAN a kol., 1995; SAXENA a STOTSKY, 2001; WU a kol., 2004).

Materiál a metódy

Rastlinný materiál:

- 1.) geneticky modifikované klony lucerny siatej (*Medicago sativa* L.), pochádzajúce z vysokoregenerujúceho genotypu Rg 9/I-14-22, izolovaného z odrody Lucia (FARAGÓ a kol., 1997) s vneseným génom AMVcp-s pre plášťovú bielkovinu vírusu mozaiky lucerny (KÚDELA a kol., 1995): GTLA/404-1, GTLA/402-2 a A5-3-3
- 2.) východiskový nemodifikovaný klon: SE/22-GT2.

Mikrobiologické analýzy:

- 1.) prítomnosť *Azotobacteria* v pôde na Ashbyho agare agregátovou metódou vyjadrením fertílých zrníčok z celkového počtu v %
- 2.) celkový počet aeróbných mikroorganizmov tvoriacich kolónie na Thorntonovom agare vyjadrením počtu kolónietvoriacich jednotiek (KTJ) v prepočte na 1 g sušiny pôdy
- 3.) početnosť celulolytických baktérií využitím filtračného papiera ako zdroja uhlíka v živnom médiu vyjadrenú v KTJ/ 1 g sušiny pôdy
- 4.) početnosť amonizačných baktérií kultivovaných na MPA (mäsovopeptónový agar) v KTJ/ 1 g sušiny pôdy
- početnosť natívnych rizóbií na selekčnom živnom médiu (Biomark Laboratories) v KTJ/ 1 g sušiny pôdy
- 5.) početnosť nitrifikačných a denitrifikačných baktérií v KTJ/ 1 g sušiny pôdy
- 6.) množstvo bakteriálnych spór po pasterizácii vzorky v KTJ/ 1 g sušiny
- 7.) početnosť aktinomycét na selekčnom živnom médiu (Biomark Laboratories) v KTJ/ 1 g sušiny pôdy
- 8.) početnosť mikromycét kultivovaných na Czapek-Doxovom agare v KTJ/ 1 g sušiny pôdy.

Výsledky a diskusia

Variabilita početností vybraných skupín mikroorganizmov bola štatisticky významne podmienená použitým substrátom pri amonizačných baktériách, celkovom počte kolónietvoriacich mikroorganizmov, celulolytických baktériách, rizóbiách, aktinomycétach a mikromycétach v rizosfére pochádzajúcej

z neutrálnej pôdy a pri amonizačných baktériách a celkovom počte mikroorganizmov v kyslej pôde (ANOVA, $p < 0,001$, $p < 0,05$).

Kultiváciou rastlín lucerny v neutrálnej pôde sa zvýšila početnosť amonizačných a rizobiálnych baktérií, množstvo bakteriálnych spór, aktinomycét a mikromycét v porovnaní s predkultivačným rozborom. V kyslej pôde bolo v rizosfére klonov lucerny zaznamenané zvýšenie početností rovnakých kultivačných skupín s výnimkou celulolytických baktérií a aktinomycét.

Prítomnosť *Azotobacter* spp. bola zistená len v rizosfére rastlín, bez ohľadu na genetickú modifikáciu, pestovaných v nesterilnej pôde, pričom najviac fertílých zrníčok (43 %) z celkového počtu bolo pozorovaných pri nemodifikovaných klonoch SE/22-GT-2 v neutrálnej pôde a pri transgénnych klonoch s AMVcp-s génom GTL4/402-2 (15 %) v kyslej pôde.

Rizosféra geneticky nemodifikovaných línií pestovaných v neutrálnej pôde sa vyznačovala vyššou početnosťou amonizačných baktérií a kolónietvoriacich mikroorganizmov v porovnaní s rizosférou transgénnych klonov. Početnosť amonizačných baktérií pozorovaná v kyslej pôde v rizosfére línie GTL4/404-1 presiahla celkový priemer o 21 %.

Rizosféra selektovaného klonu A5-3-3 sa vyznačovala zvýšenými početnosťami rizóbií, mikromycét a celkového počtu kolónietvoriacich mikroorganizmov v kyslom pôdnom substráte a celulolytickými a denitrifikačnými baktériami v neutrálnej pôde v porovnaní s ostatnými sledovanými klonmi.

V kyslej pôde sa najvyššou početnosťou rizobiálnych baktérií vyznačovala rizosféra selektovaného klonu A5-3-3 (o 15 % viac v porovnaní s celkovým priemerom). V neutrálnej pôde sa najviac rizóbií izolovalo z rizosféry klonu GTL4/402-2, a to o 130 % viac oproti celkovému priemeru. Z neutrálnej pôdy sa vyzískovalo niekoľkonásobne viac rizóbií a aktinomycét ako z kyslej pôdy, avšak kyslá pôda obsahovala o $442,14 \text{ KTJ} \cdot 10^{-4}$ na gram suchej pôdy viac mikromycét.

Ak porovnáme rizosféru geneticky modifikovaného klonu lucerny GTL4/404-1 s izogénnou nemodifikovanou líniou SE/22-GT2 zistíme, že vyššie početnosti dosahovala v množstve bakteriálnych spór, nitrifikačných a rizobiálnych baktériách, aktinomycétach a mikromycétach v neutrálnej pôde a v celkovom počte kolónietvoriacich mikroorganizmov, amonizačných, celulolytických a denitrifikačných baktériách v kyslej pôde. Avšak štatisticky významné rozdiely medzi transgénnymi a netransgénnymi klonmi (ANOVA, $p < 0,001$, $p < 0,01$, $p < 0,05$) boli pozorované len pri aktinomycétach v neutrálnej pôde a aktinomycétami, celulolytickými a nitrifikačnými baktériami v kyslej pôde.

Početnosti mikroorganizmov v rizosfére geneticky modifikovaného klonu GTL4/402-2 prevýšili počet KTJ v porovnaní s nemodifikovanou líniou SE/22-GT2 až na amonizačné, celulolytické a denitrifikačné baktérie a celkový počet kolónietvoriacich mikroorganizmov v neutrálnej pôde a amonizačných, celulolytických, denitrifikačných baktérií, rizóbií a mikromycét v kyslej pôde. Štatisticky významná variabilita medzi týmito klonmi (ANOVA, $p < 0,001$, $p < 0,05$) bola potvrdená v množstve bakteriálnych spór a rizóbií v neutrálnej pôde a množstve bakteriálnych spór a celkovom počte kolónietvoriacich mikroorganizmov v kyslej pôde.

V rizosfére geneticky modifikovaného klonu A5-3-3, pestovaného v neutrálnej pôde, bola v porovnaní s kontrolnou nemodifikovanou líniou vyššia početnosť celulolytických, denitrifikačných, nitrifikačných baktérií a aktinomycét, štatisticky preukazné rozdiely sa prejavili len pri celulolytických baktériách (ANOVA, $p < 0,05$). V kyslej pôde v rizosfére transgénneho klonu A5-3-3 bola v porovnaní s rizosférou netransgénneho klonu zvýšená početnosť všetkých kultivačných skupín mikroorganizmov, okrem aktinomycét, nitrifikačných a denitrifikačných baktérií, pričom štatisticky významné rozdiely boli zaznamenané pri celulolytických a denitrifikačných baktériách (ANOVA, $p < 0,01$, $p < 0,05$).

V súčasnosti sa dajú rozoznať tieto dva druhy scenárov, v ktorých transgénne plodiny môžu mať vplyv na mikrobiálne spoločenstvá v rizosfére a okoloitej pôde:

1. keď štruktúrne a funkčné zloženie pôdných mikrobiálnych spoločenstiev v blízkosti koreňov sa mení ako výsledok odlišnej exudácie koreňov alebo transgénneho produktu s antifungálnymi, antibakteriálnymi alebo inými aktivitami,

2. keď bakteriálne populácie rizosféry môžu byť schopné prijať a stabilne zabudovať transgénnu rastlinnú DNA, zvlášť gény pre rezistenciu k antibiotikám, používané ako markery v transgénnych plodinách.

Šľachtenie klasickými metódami, ako aj transgénna modifikácia, môžu vplývať na štruktúrne a funkčnú diverzitu mikrobiálnych spoločenstiev rizosféry prostredníctvom napr. odlišnej morfológie a fyziológie koreňov a exudáciou rastliny, a tak môžu vplývať na vyváženosť mikroorganizmov užitočných a škodlivých pre rastlinu (LYNCH a kol., 2004).

Záver

Štatisticky významné rozdiely medzi geneticky modifikovanými klonmi lucerny sietej s vneseným AMVcp-s génom a izogénnymi nemodifikovanými líniami SE/22-GT2 v početnostiach kultivačných skupín boli sledované medzi aktinomycétami (GTL4/404-1), celulolytickými baktériami (A5-3-3), rizóbiami (GTL4/402-2) a v množstve bakteriálnych spór (GTL4/402-2) v neutrálnej pôde a aktinomycétami (GTL4/404-1), celulolytickými baktériami (GTL4/404-1a A5-3-3), nitrifikačnými baktériami (GTL4/404-1),

denitrifikačnými baktériami (A5-3-3) a v celkovom počte kolónietvoriacich mikroorganizmov (GTL4/402-2) v kyslej pôde.

Literatúra

- BRUINSMA, M. – KOWALCHUK, G. A. – VAN VEEN, J. A. 2003. Effects of genetically modified plants on microbial communities and processes in soil. In: *Biol. Fertil. Soils*, 37, 2003, s. 329-337.
- DONEGAN, K.K. – PALM, C.J. – FIELAND, V.J. – PORTEOUS, L.A. – GANIO, L.M. – SCHALLER, D.L. – BUCAO, L.Q. – SEIDLER, R.J. 1995. Changes in levels, species and DNA fingerprints of soil microorganisms associated with cotton expressing the *Bacillus thuringiensis* var. *Kurstaki* endotoxin. In: *Appl. Soil Ecol.*, 2, 1995, s. 111-124.
- FARAGÓ, J. – HAUPTVOGEL, P. – KRAIC, J. 1997. Development of a breeding material of alfalfa with high regeneration ability by recurrent somatic embryogenesis. In: *Chloupek, O. – Simon, U. (Eds.): Seed Production of Lucerne. Academia Prague*, 1997, s. 38-39.
- KÚDELA, O. – GALLO, J. 1995. Characterization of the alfalfa mosaic virus strain T6. In: *Acta Virologica*, 39, 1995, s. 131-135.
- LYNCH, J.M. – BENEDETTI, A. – INSAM, H. – NUTI, M.P. – SMALLA, K. – TORSVIK, V. – NANNIPIERI, P. 2004. Microbial diversity in soil: ecological theories, the contribution of molecular techniques and the impact of transgenic plants and transgenic microganis. In: *Biol. Fertil. Soils*, 40, 2004, s. 363-385.
- SAXENA, D. – STOTZKY, G. 2001. *Bacillus thuringiensis* (Bt) toxin released from root exudates and biomass of Bt corn has no apparent effect on earthworms, nematodes, protozoa, bacteria, and fungi in soil. In: *Soil Biol. Biochem.*, 33, 2001, s. 1225-1230.
- WIDMER, F. 2007. Assessing effects of transgenic crops on soil microbial communities. In: *Adv. Biochem. Engin. Biotechnol.*, 107, 2007, s. 207-234.
- WU, W.X. – YE, Q.F. – MIN, H. – DUAN, X.J. – JIN, W.M. 2004. Bt-transgenic rice straw affects the culturable microbiota and dehydrognase and phosphatase activities in a flooded paddy soil. In: *Soil Biol. Biochem.*, 36, 2004, s. 289-295.

TECHNOLOGICKÁ KVALITA VYBRANÝCH EURÓPSKÝCH ODRÔD PŠENICE LETNEJ TECHNOLOGICAL QUALITY OF CHOSEN EUROPEAN VARIETIES OF BREAD WHEAT

Soňa GAVURNÍKOVÁ – Pavol HAUPTVOGEL – Ľubomír MENDEL – Katarína ZIRKELBACHOVÁ – Magdaléna BIELIKOVÁ

In this study, we analysed 96 genotypes of wheat, especially from European origin. We determined protein content, wet gluten content, sedimentation index (Zeleny), falling number and rheological properties of dough by farinograph. Wheat origin from Russia, Ukraine, Austria, Hungary and Italy show the highest values of wheat technological quality.

Key words: wheat, genetic resources, technological quality

Úvod

Technologická kvalita je všeobecný faktor, ktorý zvyšuje úžitkovú hodnotu zrna obilnín a určuje jeho ďalšie využitie, pričom je v závislosti na jeho chemickom zložení (Hauptvogel a kol., 2003). Európske odrody pšenice, ktoré vznikli kombináciou prírodnej selekcie a selekcie vykonanej pestovateľmi, majú niektoré vzácne vlastnosti, ktoré môžu významne prispieť k zlepšeniu nových chlebových odrôd a rozšíreniu ich diverzity. Európske krajové a staré odrody reprezentujú veľmi hodnotnú časť genetickej zásoby, pretože pokrývajú najväčšiu časť vnútrodruhej genetickej diverzity plodín (Dotlačil, Hermuth, Stehno, 2003).

Doterajšie poznatky ukazujú, že výsledky štúdia genofondu môžeme spoľahlivo využiť pri znakoch s nízkou interakciou s prostredím. Pri časti biologických znakov, z ktorých niektoré spolu určujú hospodársky charakter a význam odrody, je potrebné využívať výsledky hodnotenia z domácich ekologických podmienok, najlepšie z oblastí, kde sa zdroje šľachtiteľsky využívajú, alebo sa predpokladá ich využitie pre praktické pestovanie. Potrebné je zdôrazniť, že máme niekoľko skupín cereálnych výrobkov, ktoré si vyžadujú špecifické vlastnosti. Kvalitné pekárске, cukrárske, pečivárenské a cestovinárske výrobky získame najmä z kvalitného biologického materiálu vytvoreného v šľachtiteľskom procese.

Cieľom práce bolo hodnotiť technologickú kvalitu genotypov pšenice a zistiť vplyv krajiny pôvodu týchto genotypov na jednotlivé hodnotené technologické parametre.

Materiál a metódy

Hodnotili sme súbor 96 genotypov pšenice letnej f. ozimnej (*Triticum aestivum* L.) z hľadiska technologických vlastností. Sledované genotypy boli pestované v Borovciach vo vegetačnom období 2007/2008. Súbor genetických zdrojov pozostával prevažne z európskych odrôd pšenice, 5 genotypov pochádzalo z USA. Vybrané genotypy sme začlenili do 7 skupín podľa krajiny pôvodu. Členenie skupín bolo nasledovné: 1. skupina – Belgicko, Nemecko, Holandsko (14 genotypov), 2. skupina – Dánsko, Veľká Británia (11 genotypov), 3. skupina – Česko, Poľsko, Slovensko (13 genotypov), 4. skupina – Spojené štáty americké (5 genotypov), 5. skupina – Rusko, Ukrajina (7 genotypov), 6. skupina – Rakúsko, Maďarsko, Taliansko (22 genotypov), 7. skupina – Francúzsko (24 genotypov).

Kvalitatívne parametre sme stanovovali podľa nasledovných metód: obsah bielkovín, obsah mokrého lepku a sedimentačný index boli stanovené infračervenou spektroskopiou na prístroji NIRS system 6500, číslo poklesu podľa STN ISO 3093, farinografické ukazovatele (vážnosť vody, vývin cesta, stabilita cesta, mäknutie cesta, farinografické číslo kvality) podľa ICC-Standard Nr. 115/1.

Štatisticky sme súbor vyhodnotili analýzou rozptylu a LSD testom programom Statistika (Stat Soft).

Výsledky a diskusia

Medzi veľmi významné parametre technologickej kvality pšenice patrí obsah bielkovín, nakoľko podľa ich obsahu sa posudzuje kvalita zrna. Obsah bielkovín z pohľadu množstva je kvantitatívny polygénny znak, pričom jeho syntézu je podmienená agroekologickými podmienkami prostredia. Obsah bielkovín je úzkom v kladnom vzťahu k objemu pečiva. Lepok má viskoelastické vlastnosti, ktoré v procese kysnutia umožňujú zadržiavať oxid uhličitý a tým zvyšovať objem pečiva. Lepok podmieňuje reologické vlastnosti cesta a charakterizuje silu múky.

Z analýzy rozptylu vyplynul vysoko preukazný vplyv jednotlivých skupín genotypov na reologické vlastnosti cesta (vážnosť vody, stabilita cesta, mäknutie cesta, číslo kvality) a preukazný vplyv skupín genotypov na obsah bielkovín a na hodnoty čísla poklesu (tabuľka 1).

Tabuľka 2 udáva priemerné, maximálne a minimálne hodnoty sledovaných parametrov v príslušných skupinách genotypov a vyhodnotenie LSD testu. Zo sledovaných skupín, skupiny č. 5 a 6, čo boli genotypy, ruského (Delta, Echo, Juna, Knyzhna, Lira a Moldavska L 1052), ukrajinského (Mirleben), rakúskeho (Adam, Augustus, Bonitum, Danubius, Dominus, Edison a Exquisit), maďarského (GK Kalaka, KO-IN, MV

Kodmon a MV Suveges) a talianskeho (Ariete, Conte Marzotto, Dorico, Genio, Glutinoso, Golia, Lampo, Libellula, Mieti, Pippo a Villanova) pôvodu, vykazovali najvyššie hodnoty zo všetkých sledovaných parametrov.

Veľmi vysoké hodnoty farinografického čísla kvality mali odrody Exquisit (191), Delta (163), Passarinho (148), Lira (138), Bardotka (133) Knyzhna (125) a Astella (120). Veľmi nízku hodnotu farinografického čísla kvality mali odrody Witington (29) a Vercors (22).

Záver

V závere môžeme konštatovať, že na technologickú kvalitu pšenice majú vplyv genotypy aj na základe ich krajiny pôvodu. Najviac krajina pôvodu pšeníc ovplyvňovala reologické vlastnosti cesta, hodnoty obsahu bielkovín a čísla poklesu. Pšenice pochádzajúce z Rakúska, Maďarska, Talianska, ale aj Ruska a Ukrajiny, vykazujú najvyššie hodnoty technologických parametrov.

Literatúra

- DOTLAČIL, L. – HERMUTH, J. – STEHNO, Z.: Earliness, spike productivity and protein content in European winter wheat landraces and obsolete cultivars. In: Plant, soil and environment, roč. 49, 2003, č. 2, s. 67-74
- HAUPTVOGEL, P. – ČIČOVÁ, I. – TISOVÁ, V.: Zhodnotenie kvality odrôd pšenice letnej (*Triticum aestivum* L.). In: Nové poznatky z genetiky a šľachtenia poľnohospodárskych rastlín. Zborník zo 10. Odborného seminára, Piešťany : VÚRV, 2003, s. 93-96

Tabuľka 1: Analýza rozptylu sledovaných parametrov genetických zdrojov pšenice

Parameter	Zdroj variability	d.f.	F	P
Obsah bielkovín	skupina	6	2,34	+
Mokrý lepok	skupina	6	0,581	-
Sedimentačný index	skupina	6	0,901	-
Číslo poklesu	skupina	6	2,687	+
Väznosť vody	skupina	6	4,21	++
Vývin cesta	skupina	6	2,1473	-
Stabilita cesta	skupina	6	4,6461	++
Mäknutie cesta	skupina	6	4,3418	++
Farinografické číslo kvality	skupina	6	4,7992	++

d.f. – stupne voľnosti, F – vypočítaná F- hodnota, P – vplyv faktora preukazný na hladine $\alpha = 0,05$ alebo $\alpha = 0,01$

Tabuľka 2: Priemerné, minimálne a maximálne hodnoty sledovaných kvalitatívnych parametrov, vyhodnotenie LSD testu, $\alpha = 0,05$

Skupina	N	Obsah bielkovín (%)			Mokrý lepok (%)			Sedimentačný index (ml)		
		priemer	min	max	priemer	min	max	priemer	min	max
1. BEL-DEU-NLD	14	14,0 b	12,2	15,5	28,2	21	35,3	51	35	66
2. DNK-GBR	11	13,5 ab	12,3	15,1	26,5	22,9	30,5	48	33	66
3. CZE-POL-SVK	13	13,2 a	12	14,2	27	19,6	35,9	54	43	71
4. USA	5	13,8 ab	12,2	15,2	27,6	20,8	34,8	46	28	62
5. RUS-UKR	7	13,2 a	12,1	14	28,9	26,1	33,7	50	36	69
6. AUT-HUN-ITA	22	14,0 b	13	16,6	28,3	22,3	38,6	55	33	78
7. FRA	24	13,6 ab	12,3	15,4	26,8	19,3	36,9	52	37	66
		Číslo poklesu (s)			Väznosť vody (%)			Farinografické číslo kvality		
1. BEL-DEU-NLD	14	377 abc	323	415	57,2 ab	53,3	60,3	48 c	29	71
2. DNK-GBR	11	379 abcd	263	437	57,7 ab	48,8	62,5	51 ac	33	108
3. CZE-POL-SVK	13	370 ab	319	419	56,2 a	53,2	61	72 ab	32	120
4. USA	5	337 a	235	418	56,5 ab	53,6	60,1	68 abc	33	117
5. RUS-UKR	7	420 d	363	461	59,1 bc	53	62	112 d	53	163
6. AUT-HUN-ITA	22	393 bcd	248	503	60,6 c	54,8	70	81 b	39	191
7. FRA	24	402 cd	358	461	58,2 ab	52,7	62,4	71 ab	22	148

n – počet genotypov

Pod'akovanie. Táto práca bola podporovaná Agentúrou na podporu výskumu a vývoja na základe zmluvy č. APVV-0770-07.

***IN VITRO* REGENERÁCIA LÁSKAVCA (*AMARANTHUS SP.*) *IN VITRO* REGENERATION OF AMARANTH (*AMARANTHUS SP.*)**

Andrea HRICOVÁ – Gabriela LIBIAKOVÁ – Pavol MÚDRY – Alena GAJDOŠOVÁ

Research in amaranth cultivation and breeding has been reinitiated as part of the recent renewed interest in nutritional and economic potential of underutilized crops. The goal of the research was to improve in vitro regeneration system of specific amaranth genotypes in order to benefit the conventional and /or molecular plant breeding work. The genotypes selected for the work were Amaranthus cruentus genotype 'Ficha' and hybrid K-433. To improve the in vitro regeneration and multiplication system different explants and plant hormone combinations were tested. The great capacity of amaranth explants to form callus and low shoot multiplication response suggest that most probably high endogenous auxin level occurs in the tissue and therefore either higher cytokinin : auxin rate or stronger cytokinin type, i.e. TDZ, in a higher concentration is required for multiple shoot formation.

Key words: amaranth, in vitro regeneration, plant hormone

Introduction

Neglected and under-utilised species, among them amaranth belongs, have either not been, or have only marginally been, the subject of research. As a consequence, they cannot compete with improved cultivars of the major crops upon which global food production is essentially based. However, these species have potential for contributing to food security for a growing human population, income generation and poverty alleviation. They can markedly contribute to the protection of agricultural sustainability, biodiversity and to renewable energy sources. They are often low-input crops with tolerances to drought, salinity, high temperature, adapted to marginal lands with low-quality soils.

To improve the quality and quantity of production in neglected species, it is necessary to apply and adapt existing technology, already developed for major crops. The use of emerging biotechnology techniques, such as *in vitro* culture and gene transfer techniques, will facilitate evaluation and exploitation of the genetic reservoir of neglected and under-utilised species, the introduction of novel characters and unique genes of agronomic interest and will also help to unravel the genetic determinism of several stress resistance responses.

Materials and Methods

The putative mutant lines of *Amaranthus cruentus* genotype 'Ficha' and hybrid K-433 with increased seed size obtained after γ radiation were selected for the study.

In vitro cultivation

For establishment of *in vitro* cultures the different explants of 10 day-old seedlings were used.

Seed were sterilized by treatment with 30 % SAVO (commercial bleach) with 3 drops of Tween 20 for 5 min, followed by washing with sterile distilled water for 3 x 15 min.

Seeds germinated under sterile conditions in Erlenmayer flasks containing the Murashige and Skoog (1962) basal medium with MS vitamins (Duchefa) supplemented with 20 g l⁻¹ sucrose and solidified with 0.8% Phyto agar.

In the first experiment the initial explants - epicotyls with cotyledons, hypocotyl and root segments 10 mm in length from 10 day-old seedlings were cut and cultivated horizontally on MS medium containing 30 g l⁻¹ sucrose and 8 g l⁻¹ Phyto agar at pH 5.7-5.8. The following combinations of plant growth regulators were added to this medium with the aim to study their influence on shoot induction: BAP, zeatin and TDZ in concentrations 1, 3 and 5 mg l⁻¹ plus NAA 0.01 mg.l⁻¹ (or without).

In the second experiment the leaves of *in vitro*-derived plants excised 2 weeks after subculture were used to initiate adventitious shoot regeneration. The leaf laminae were several times cut by scalpel and placed by adaxial side on MS medium containing 30 g.l⁻¹ sucrose and 8 g.l⁻¹ Phyto agar at pH 5.7-5.8. The cultures were maintained in the growth chamber at 23 ± 2°C under 16/8 light and dark photoperiod and light intensity 50 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ provided by white fluorescent lamps. The following combinations of plant growth regulators were added to this medium for adventitious shoot induction: BAP, zeatin and TDZ in concentrations 3 and 5 mg l⁻¹ plus NAA 0.01 mg l⁻¹.

Results and discussion

In vitro regeneration

Epicotyls on media with BAP, TDZ and zeatin (1, 3 and 5 mg l⁻¹) + NAA (0.01 mg l⁻¹)

Intensive growth of the shoot was observed from the epicotyls characterized by intensive elongation growth. This shoot was regenerated from the apical meristem already present in the original explant. No shoot multiplication was found in epicotyl explants on any of the tested media after 4 weeks in culture indicating the presence of strong apical dominance, like it was mentioned in the paper of Jofre-Garfias *et al.*

(2001). Inflorescence formation was observed on the top of these shoots in 30% of tested explants. In all cases, the flowering occurred without any special light treatment. Precocious flowering *in vitro* is mentioned also by Arya *et al.* (1993) and Bui van Le *et al.* (1998). Dense roots were developed and massive callus was formed on the base of the shoots. When the shoot segments with the leaves were transferred to the same medium after 4 weeks again the massive callus developed on the base of the shoots and weak shoot multiplication occurs on media with TDZ with average number of 2-3 shoots/explant.

Epicotyls on medium with TDZ 1 mg l⁻¹ without auxin

The dense clumps of buds and shoots with short internodes initiated from epicotyls in *A. cruentus* due to the suppression of apical dominance. In order to stimulate internode elongation the clumps were transferred onto media containing 1 mg l⁻¹ BAP. Numerous vital shoots (7-13) with good elongation growth were developed from the clump. A subsequent supply of 2 mg l⁻¹ IBA promoted extensive root induction.

Hypocotyl and root segments on media with BAP, TDZ and zeatin (1, 3 and 5 mg l⁻¹) + NAA (0.01 mg l⁻¹)

The intensive callus formation was visible also on hypocotyl segments, while root segments showed lower callus formation after 4 weeks of cultivation. No differences were observed between genotypes and cytokinins used. The high frequency of callus formation in amaranth was mentioned also in the paper of Bennici *et al.* (1997).

Adventitious shoot formation on the leaves of in vitro-derived plants on media with BAP, TDZ and zeatin (3 and 5 mg l⁻¹) + NAA (0.01 mg l⁻¹)

After 4 weeks of cultivation the explants became thick and after 8 weeks of cultivation callus with green globular structures was observed in *A. cruentus* L. and red globular structures in K-433 on the media with 3 and 5 mg l⁻¹ TDZ and BAP with 0.01 mg l⁻¹ NAA. The structures later underwent elongation and grew further, but neither shoots nor somatic embryos were finally formed from them. Similar response of leaf explants in *A. cruentus* observed Flores *et al.* (1982) on medium with auxin 2,4-D at concentration 0.1-1.0 mg l⁻¹. The explants underwent strong curling and formed numerous cell colonies on the adaxial surfaces which did not develop further. In our experiment limited adventitious shoot formation (on 5% of explants) was observed on the leaf explants of *A. cruentus* on medium supplemented with 3 mg l⁻¹ TDZ plus 0.01 mg l⁻¹ NAA. After several weeks of cultivation the calli derived from *A. cruentus* explants were still green and growing, however without shoot regeneration, while the calli of hybrid K-433 necrotized.

Conclusion

The great capacity of amaranth explants to form callus and low shoot multiplication response suggest that most probably high endogenous auxin level occurs in the tissue and therefore either higher cytokinin : auxin rate or stronger cytokinin type, i.e. TDZ, in a higher concentration is required for multiple shoot formation.

Acknowledgement. This work was supported by grant agency VEGA project no. 2/0109/09.

References

- Arya, I.D. – Chakravarty, T.N. – Sopory, S.K. 1993. Development of secondary inflorescences and *in vitro* plantlets from inflorescence cultures of *Amaranthus paniculatus*. In: Plant Cell Reports, vol.12, p. 286 - 288.
- van Le, B. - Do my, N.T. – Jeanneau, M. – Sadik, S. – Tu, S. – Vidal, J. - Tran Thanh Van, K. 1998. Rapid plant regeneration of a C4 dicot species: *Amaranthus edulis*. In: Plant Science, vol. 132, p. 45-54.
- Bennici, A. – Grifoni, T. – Schiff, S. – Bovelli, R. 1997. Studies on callus growth and morphogenesis in several species and lines of *Amaranthus*. In: Plant Cell, Tissue and Organ Culture, vol. 49, p. 29 - 33.
- Flores, H.E. – Their, A. – Galston, A.W. 1982. *In vitro* culture of grain and vegetable Amaranths (*Amaranthus* spp.). In: American Journal of Botany, vol. 69, p. 1049 - 1054.
- Jofre-Garfias, A.E. - Villegas-Sepúlveda, N. - Cabrera-Ponce, J.L. - Adame-Alvarez, R.M. - Herrera-Estrella, L. - Simpson, J. 1997. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Amaranthus hypochondriacus*: light- and tissue-specific expression of a pea chlorophyll a/b-binding protein promoter. In: Plant Cell Reports, vol. 16, 1997, p. 847 - 852.
- Murashige, T. – Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. In: Physiologia Plantarum, vol. 15, 1962, p. 473 – 497.

DETEKCIA PATOGÉNA *DRECHSLERA TRITICI REPENTIS* A ANALÝZA JEHO GENETICKEJ DIVERZITY POUŽITÍM DNA MARKEROV

DETECTION OF *DRECHSLERA TRITICI REPENTIS* AND ANALYSIS OF ITS GENETIC DIVERSITY BY USE OF DNA MARKERS.

Martina HUDCOVICOVÁ – Jozef GUBIŠ – Marcela GUBIŠOVÁ

PCR metódy boli už úspešne použité na detekciu mnohých rastlinných patogénov, vrátane patogénov pšenice. V našej práci sme vyvinuli špecifické PCR primery na detekciu patogéna *Drechslera tritici-repentis* v listových a semenných vzorkách pšenice. Navrhli sme tiež 8 SSR primerových párov na hodnotenie genetickej diverzity v skupine 24 slovenských a fínskych izolátov tohto patogéna. Len 5 z použitých mikrosatelitných primerov bolo polymorfických, priemerný počet bandov na primer bol 4.2 a priemerný index diversity na primer bol 0.45. Dendrogram neukázal súvislosť medzi geneticou diverzitou izolátov a lokalitou, z ktorej izoláty pochádzali.

Key words: *Drechslera tritici-repentis*, PCR marker, SSR polymorphism

Introduction

The fungus *Drechslera tritici-repentis* (Died) Shoem. (Shoemaker 1962) (telemorph *Pyrenophora tritici-repentis* (Died.) Drech.) is one of the main wheat pathogens which causes tan spot of wheat and can cause yield losses from 3% to 53%. Besides this pathogen reduces quantity and quality of wheat grain (total yield, kernel weight, number of grains per head, total biomass, red-smudge symptoms), it also produces 4 known host specific toxins (Ptr Tox A, B, C, D), which can be important from the point of healthy food production. According to high morphological and physiological variability of this pathogen, as well as to its difficult differentiation from another important wheat pathogen - *Stagonospora nodorum* – based on visual symptoms, correct, fast and precise diagnostic test for *Drechslera tritici-repentis* in various plant life stages is needed. Such diagnostic tests for pathogens are based on detection of pathogen DNA in plant material by DNA markers using PCR (Taylor, 1993 and others). In case of *Drechslera tritici-repentis*, DNA markers (RAPD, AFLP, ISSRs) were used for detection of intraspecific genetic diversity among isolates of this pathogen (Santos et al., 2002 and others). The main objective of this work was the development of specific primers for PCR detection of *Drechslera tritici-repentis* in wheat leaf and seed samples. The aim of this study was also to develop microsatellite (SSR) primers and use them for study of genetic diversity in group of Slovak and Finish isolates.

Material and methods

In years 2005-2008 we isolated 14 isolates of *Drechslera tritici-repentis* from primary wheat leaves collected in different regions of Slovakia, one isolate from Czech Republic and Dr. M. Jalli (MTT Agrifood Research, Finland) has provided 10 isolates of *Drechslera tritici-repentis* from Finland. Total genomic DNA was extracted using the Adgen DNA Extraction System (Adgen Ltd.) and Wizard DNA Clean-Up system (Promega).

For specific PCR detection of *Drechslera tritici-repentis* we designed PCR primer pair DTR1-F (5'-ACCAATATGAAGCCGGACTG-3') and DTR1-R (5'-CTCGGGAGAGACAAGACG-3') to amplify 382 bp long amplicon, of the target nucleotide sequence from ITS 1-ITS 2 regions of ribosomal RNA gene of this pathogen (GenBank accession number [AF163060](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/AF163060)). The nucleotide sequence of pathogen was derived from the GenBank nucleic acid database for sequences (www.ncbi.nlm.nih.gov). We designed these primers using online programme Primer3 (Rozen and Skaletsky, 2000) and specificity of primers was tested using BLAST. We used this database and programme also to design 8 SSR primer pairs. Electrophoretic detection of PCR products after amplifications with DTR1 primer pair was performed in 1.4% agarose gels stained by ethidium bromide. Electrophoretic detection of PCR products after amplifications with SSR primer pairs was performed in 6% denatured polyacrylamide gels. SSRs were stained by silver staining method (Bassam et al., 1991). Polymorphic DNA segments amplified with each SSR primer were considered as different bands, assigned a size and each band was scored as present (1) or absent (0). Based on the frequencies of bands index of diversity (DI), the probability of identity (PI), and polymorphic information context (PIC) were calculated. The UPGMA was used for grouping of genotypes and dendrograms were constructed based on Jaccard's similarity coefficient by the statistic software package SPSS 8.0 (SPSS Inc., USA).

Results and discussion

PCR methods were successfully used for detection of many pathogens of various plants, including wheat pathogens such as *Blumeria graminis*, *Fusarium* spp., *Gaeumannomyces graminis*, *Microdochium nivale* spp., *Puccinia* spp., *Rhizoctonia cerealis*, *Septoria tritici*, *Septoria nodoum* (*Stagonospora nodorum*), *Tapesia* spp., *Tilletia tritici* (Mc Cartney et al., 2003). In our work we have developed PCR primers for detection of *Drechslera tritici-repentis* in leaf and seed samples of wheat. After optimization of PCR reaction, primer pair DTR1-F and DTR1-R was proven to be specific with a PCR product of 382 bp amplified for all *Drechslera tritici-repentis* isolates tested. To test its specificity we screened DNA samples

from other fungal pathogens and healthy wheat leaves for amplification with this primer pair. Primer pair DTR1-F and DTR1-R didn't cross-react with DNA of other pathogens or healthy wheat used in this study (Fig. 1.). Figure 2. shows PCR detection of this pathogen by DTR1-F and DTR1-R in wheat cultivars eleven days after artificial infection of juvenile leaves with *Drechslera tritici-repentis* and also its detection in naturally infected wheat seed from field conditions. The specific primer pair correctly amplified diagnostic band from both - infected leaves and also seed.

Fig. 1 and Fig. 2: Amplification with primer pair DTR1. In Fig. 1: Line 1. ladder 50 bp, 2. *Drechslera tritici-repentis* (SK), 3. *Drechslera tritici-repentis* (SK), 4. negative control, 5. *Drechslera tritici-repentis* (Finland), 6. healthy wheat leaves, 7. *Pyrenophora graminea*, 8.-10. *Pyrenophora teres*, 11.-12. *Septoria tritici*, 13.-15. *Stagonospora nodorum* (SK + Finland), 16.-18. *Rhynchosporium secalis*, 19. *Fusarium graminearum*, 20. *Fusarium poe*, 21. *Fusarium avenaceum*, 22. *Fusarium culmorum*. In Fig. 2: Line 1. *Drechslera tritici-repentis* (SK), 2. ladder 25 bp, 3. negative control., 4.- 7. wheat leaves infected with *Drechslera tritici-repentis*, 8.-11. wheat seeds naturally infected



The study of genetic diversity in pathogen populations is important for evaluation of pathogen capability to rapidly response to changing environments and to overcome host resistance and fungicides (Peltonen et al., 1996). The success of local breeding programs for resistance to the disease depends to a large extent especially on the genetic variation within the pathogen population (Moreno et al., 2008). In our study, we designed 8 SSR primer pairs for assessment of genetic diversity in group of 24 mainly Slovak and Finish isolates of *Drechslera tritici-repentis*. Only 5 out of 8 used SSR primers showed polymorphism and altogether 21 bands were detected with these 5 primers. The number of bands per primer varied from 8 (primer DTR7 with gene diversity 0.545) to 2 (primers DTR9 and DTR101 with gene diversity 0.079 and 0.485), with an average of 4.2 bands and average gene diversity 0.454 per primer. 7 isolates (2 Slovak and 5 Finish) were not differentiated each from others and they differed from two other non-differentiated Finish isolates only by one band. Since these loci displayed not so high polymorphism, more SSR primers may be required to discriminate between all genotypes. To our knowledge, until now genetic diversity of *Drechslera tritici-repentis* isolates was studied with the use of various DNA markers, but not SSR markers. High levels of genetic polymorphism were found with the use of RAPD, AFLP and ISSRs markers, but often without correlation with geographic origin, toxin production, pathogenicity or race classification of the isolates (Santos et al., 2002; Friesen et al., 2005; Singh and Hughes, 2006; Iram and Ahmad, 2007; Leišová et al., 2008; Moreno et al., 2008). Also in our work, by cluster analysis of SSR data, we did not detect association between genetic diversity of the isolates and the area from which the isolates were collected.

References

- Bassam B.J., Caetano-Anolles G., Gresshoff P.M. (1991): Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Anal. Bioch.*, **196**: 80–88.
- Friesen T.L., Ali S., Klein K.K., Rasmussen J.B. (2005): Population genetic analysis of a global collection of *Pyrenophora tritici-repentis*, causal agent of tan spot of wheat. *Phytopathology* **95**: 1144-1150.
- Iram S. and Ahmad I. (2007): Foliar blight spectrum and genetic variability of *Pyrenophora tritici-repentis*. *Archives Of Phytopathology And Plant Protection*, **40** (2): 105 – 112.
- Mccartney H.A., Foster S.J., Fraaije B.A., Ward E. (2003): Molecular diagnostics for fungal plant pathogens. *Pest Manag. Sci.*, **59**: 129-142.
- Leišová L., Hanzalová A., Kučera L. (2008): Genetic diversity of *Pyrenophora tritici-repentis* isolates as revealed by AFLP analysis. *Journal of Plant Pathology*, **90** (2): 233-245.
- Moreno M. V., Stenglein S. A., Balatti P. A., Perelló A. E. (2008): Pathogenic and molecular variability among isolates of *Pyrenophora tritici-repentis*, causal agent of tan spot of wheat in Argentina. *Eur J Plant Pathol.* **122**: 239-252.
- Rozen, Skaletsky (2000): <http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3> www.cgi
- Santos A.M.P.V., Matsumura A.T.S., van der Sand S.T. (2002): Intraspecific genetic diversity of *Drechslera tritici-repentis* as detected by random amplified polymorphic DNA analysis. *Genetics and Molecular Biology* Singh P.K., Hughes G.R. (2006): Genetic similarity among isolates of *Pyrenophora tritici-repentis*, causal agent of tan spot of wheat. *Journal of Phytopathology* **154**: 178-184. **25**: 243-250.
- Taylor J.L. (1993): A simple, sensitive, and rapid method for detecting seed contaminated with highly virulent *Leptosphaeria maculans*. *Appl. and Environ. Microbiol.*, **59**: 3681-3685.

VYUŽITIE VYBRANÝCH ODRÔD REPKY OLEJNEJ NA BIOENERGETICKÉ ÚČELY EXPLOITATION OF SOME RAPESEED VARIETIES FOR BIOENERGY PURPOSES

Miroslav JANČICH

During last two decades we have seen an increase in rapeseed cropping. This increase was caused by growth of fatty acid methyl ester (FAME or biodiesel) production. Farmers have a wide option in rapeseed varieties seeds supply. In order to achieve higher benefits in cropping farmers have to choose more environmental-stress tolerant varieties of rapeseed. However, these have to answer quality and yield (seed and total biomass) requirements like total fat content in rapeseed oil. Except rapeseed oil use for biodiesel production we are able to use whole plant (excluding roots). Nowadays are available facilities capable burn a rapeseed straw. This is joined with high energy profit. Another way how to use whole plant including rapeseed cake and straw is biogas production. Rapeseed straw burning and biogas production from rapeseed is not extended in Slovak republic. So if we choose capable varieties properly we can use them with high level of benefits.

Key words: rapeseed quality, rapeseed straw burning, biogas production, energy content

Úvod

Od 1. januára 2009 musí byť podiel biologickej zložky v palivách v SR na úrovni 3,4% - tzv. indikatívny cieľ. I keď v tomto roku SR splňa tento cieľ, v roku 2010 nedosiahne stanovenú úroveň 5,75% a podľa najnovších predpokladov najvyšší možný dosiahnutý podiel bude u nás na úrovni 4 % (MIKULEC, 2009). Napriek odhadovanému poklesu v odbere repkového oleja je možné do budúcnosti predpokladať nárast jeho využitia na výrobu biokomponentu do nafty. Zo stanovených indikatívnych cieľov vyplýva, že produkciu MERO bude perspektívne možné pokryť z vlastnej produkcie (MASAROVICOVÁ *et al.*, 2008).

Vzhľadom k tomu, že do dnešného dňa sa neuskutočnil komplexný fyziologický výskum úrodovného potenciálu repky olejnej na výrobu MERO v podmienkach Slovenska (BRESTIČ *et al.*, 2008) zostáva úlohou výskumu i praxe vyhodnotenie a následný výber odrôd tolerantných na stresy, ktoré svojimi kvalitatívnymi i kvantitatívnymi parametrami zodpovedajú požiadavkám na kvalitu a výšku úrod semien i nadzemnej biomasy. Keďže produkcia MERO nie je jedinou možnosťou ako využiť repku olejnú v energetike, zostáva v SR otvorenou otázkou bioenergetické využitie rastlinných zvyškov po zbere a spracovaní repky.

Materiál a metódy

V roku 2007 bol Katedrou fyziológie rastlín SPU v Nitre (ďalej len KFR) založený maloparcelový pokus s repkou olejnou (kapusta repková pravá, *Brassica napus* subsp. *napus*), na experimentálnej báze SCPV - VÚRV v Borovciach (167m n.m.) pri Piešťanoch. Podnebie je kontinentálneho charakteru. Priebeh počasia počas vegetačného obdobia vysiataho porastu charakterizuje spád zrážok na úrovni 358mm s priemernou teplotou 15,5°C. Pôda je černoziem hneдозemná s 1,8-2,0% obsahom humusu, pH 6,35 - 7,2 (ŽÁK *et al.*, 2006). Na desiatich odrodách boli pracovníkmi KFR urobené analýzy rastovo - produkčných parametrov podľa metodiky ŠESTÁK - ČATSKÝ (1966). Z týchto odrôd sme za účelom vyhodnotenia bioenergetického potenciálu vybrali tri: Manitoba (Francúzsko), Californium (Francúzsko) a Oponent (Česká republika). Pre potreby analýzy oleja vybraných odrôd boli odobraté vzorky a podrobené fyzikálno-chemickej analýze (MASAROVICOVÁ, 2008).

Dôležitým parametrom kvality repkového oleja na výrobu MERO je jódové číslo (JČ), číslo zmydelnenia (ČZ), obsah fosforu a obsah polynenasýtených mastných kyselín. JČ nesmie prekročiť hodnotu 120g I₂.100g⁻¹ nenasýtenej mastnej kyseliny a množstvo kyseliny linolénovej nesmie prekročiť 12hm.% (STN EN 14214). Energetický obsah repkovej slamy bol meraný kalorimetricky (IKA System C 200, Germany) a bol vyjadrený vo forme spalného tepla.

Výsledky a diskusia

Z tab. 1 vyplýva, že medzi jednotlivými odrodami sú významné rozdiely v kvalitatívnych parametroch obsahu oleja v semene (rozdiel medzi odrodami Californium a Oponent bol 5,7%). Podľa Šrojtovej (2003) pre produkciu MERO je dôležité, aby semená obsahovali olej v intervale 43 – 47 hm. %, čo značí, že odroda Manitoba by mala byť na základe tohto parametra považovaná za menej vhodnú pre tento účel. Repka olejná zanecháva po zbere významné množstvo slamy, ktorej využitie má nezanedbateľný energetický potenciál. Priamym spaľovaním repkovej slamy v špeciálnych kotloch skonštruovaných pre tento účel by sa mohol tento v energetickom sektore doteraz nevyužitý potenciál využiť. Na základe kalorimetrických meraní uskutočnených na KFR bolo zistené, že medzi odrodami rozdiely v obsahu energie na hmotnostnú jednotku zo slamy nie sú významné. Priemerná hodnota spalného tepla repkovej slamy je 15,14 MJ.kg⁻¹ (ENGLER, nepublikované). Významné sú rozdiely medzi odrodami v celkovom množstve vyprodukovanej nadzemnej biomasy, ktoré v konečnom dôsledku určujú energetický zisk daný celkovou hmotou rastliny. Podľa

BARÁKOVEJ (2006) je maximum využiteľnosti energie slamy olejní 40% z celkovej produkcie slamy (tab. 2).

Tabuľka 1: Odrodové rozdiely vybraných parametrov semien a oleja repky olejnej (podľa MASAROVIČOVÁ *et al.*, 2008)

Odroda	Úroda semena (t .ha ⁻¹)	Obsah tuku (%)	Produkcia oleja (t .ha ⁻¹)	ČZ (mgKOH.kg ⁻¹)	Fosfor (mg.kg ⁻¹)	JČ	Kys. olejová (%)	Kys. linolová (%)	Kys. linolénová (%)
Californium	4,54 ± 0,84	42,2	1,916	217,00	6,30	114	64,04	18,64	9,22
Manitoba	5,00 ± 0,72	47,9	2,395	206,00	7,03	116	64,60	18,88	8,33
Oponent	5,48 ± 0,85	44,3	2,428	209,00	6,23	116	62,12	20,08	9,31

Tabuľka 2: Hmotnosť sušiny repkovej slamy, hmotnosť sušiny šesúľ pri zbere (HUNKOVÁ *et al.*, 2008, 2009) a ich energetická hodnota na m² prepočítaná podľa BARÁKOVEJ (2006)

Odroda	Celk. sušina 1 rastliny pri zbere (g)	Sušina šesúľ pri zbere (g)	Sušina slamy pri zbere (g)	Max. energ. zisk zo slamy pri 50r.m ² (MJ.m ⁻²)	Využitelná energia slamy (MJ.m ⁻²)
Californium	90,57	56,91	33,66	25,48	10,19
Manitoba	81,72	50,70	31,02	23,48	9,39
Oponent	60,20	38,81	21,39	16,19	6,48

Ďalšou z možností ako využiť repku olejnú po zbere a spracovaní je výroba bioplynu. V drivej väčšine existujúcich bioplynových staníc nedochádza k vyvíjaniu bioplynu z jedného substrátu, ale dochádza k miešaniu substrátov viacerých plodín so živočíšnymi exkrementami alebo s čistiarenským kalom. Repkové výlisky (cca 15%) a repková slama (% sa neuvádza) tvoria v súčasnosti minoritnú zložku pri výrobe bioplynu (HUTŇAN a BODÍK, 2009).

Záver

Možnosti priemyselného využitia repky olejnej v SR sú široké. V záujme vyššieho energetického i finančného výnosu z repky olejnej bude potrebné sa zamerať na možnosti priameho spaľovania repkovej slamy a tiež na vývoj bioplynu zo zmesi rôznych plodín s repkovou slamou a repkovými výliskami a ich zmesi so živočíšnymi exkrementami a čistiarenským kalom. V tomto smere je v SR oproti susedným krajinám viditeľné výrazné zaostávanie. Najvýznamnejšou možnosťou je stále rastúca potreba výroby MERO ako biokomponentu do nafty. Na tento účel by mali byť vyberané odrody vyznačujúce sa tolerantnosťou voči environmentálnym stresom. Odolnosť odrôd voči stresom by mala byť v pozitívnej korelácii s kvalitatívnymi a kvantitatívnymi parametrami, aby boli pestované odrody konkurencieschopné na trhu.

Literatúra:

- Baráková, A. 2006: Slama ako ekonomicky priaznivý zdroj biomasy z poľnohospodárstva, SPU v Nitre, http://www.agroporadenstvo.sk/oze/biomasa/biomasa_slama.pdf
- Brestič, M. *et al.*, 2008: Štúdium fyziologicko-produkčného potenciálu repky olejky v klimatických podmienkach Slovenska z hľadiska využitia biopalív. Priebežná správa k výskumnému projektu, Projekt AV MŠ SR 13s
- Hunková, E., *et al.* 2008: Využitie rastovej analýzy pre hodnotenie genotypových rozdielov kapusty repkovej pravej (*Brassica napus* subsp. *napus*). In: Nové poznatky z genetiky a šľachtienia poľnohospodárskych rastlín. Piešťany s.76-78
- Hunková, E., *et al.*, 2009: Ekofyziologické prístupy hodnotenia produkčného procesu kapusty repkovej pravej (*Brassica napus* subsp. *napus*). In: Vplyv abiotických a biotických stresorů na vlastnosti rastlín 2009. Praha, strany 299-303
- Hutňan, M., Bodík, I. 2009. Možnosti produkcie bioplynu z obnoviteľných zdrojov energie. In: 44-th Petroleum conference 2009, Bratislava. SR
- Masarovičová, E. *et al.*, 2008. Genotypové rozdiely repky olejky z hľadiska obsahu oleja , kvality oleja a produkcie semien. In: Nové poznatky z genetiky a šľachtienia rastlín. Piešťany. strany 19-22
- Masarovičová, E. *et al.*, 2008. Produkčný potenciál repky olejnej v environmentálnych podmienkach Slovenska z hľadiska využitia vo FAME. In: 8-th International symposium, Tatranské matliare. strany 520-536
- Mikulec, J., 2009: Biopalivá – aktuálny stav používania biozložiek v palivách v SR, Autotec 2009 , Brno.
- Šrojtová, G., 2003. Vplyv rôzneho spôsobu obrábania na úrodu a úrodovtné prvky repky olejnej ozimnej. In: Zborník vedeckých prác OVÚA Michalovce.
- Žák, Š *et al.*, 2006: Bilancia pôdnej organickej hmoty v konvenčnom a bezorbovom obrábaní pôdy. In: Zborník vedeckých prác SCPV – Úae Michalovce. Strany 183-192

Pod'akovanie: Príspevok bol podporený grantom VEGA 1/0803/08 a VEGA 1/0807/09

COEXISTENCE OF GENETICALLY MODIFIED AND CONVENTIONAL MAIZE: PRACTICAL EXPERIENCE ON-FARM IN SLOVAKIA

KOEXISTENCIA GENETICKY MODIFIKOVANEJ A KONVENČNEJ KUKURICE: PRAKTICKÉ SKÚSENOSTI Z PESTOVANIA NA SLOVENSKU

Ján KRAIC – Peter MIHALČÍK – Martin SINGER – Anna PLAČKOVÁ

Príslušná legislatíva v Slovenskej republike vyžaduje od pestovateľa geneticky modifikovanej kukurice dodržanie izolačnej vzdialenosti 200 metrov od najbližšej konvenčnej kukurice, ktoré môžu byť nahradené obsevom konvenčnej kukurice na základe princípu, že 1 riadok konvenčnej kukurice môže nahradiť 2 metre izolačnej vzdialenosti. GM-kukurica MON 810 bola vysiatá v roku 2006 v troch lokalitách Slovenska. Počas zberu boli pozberané vzorky zo susediacich parciel konvenčnej kukurice a pomocou RT-PCR bola v nich stanovená prítomnosť MON 810. Získané údaje potvrdzujú, že koexistencia konvenčnej a GM kukurice je naozaj možná. Izolačná vzdialenosť 200 metrov, resp. 100 riadkov obsevu konvenčnej kukurice je 3-4 násobkom potrebnej efektívnej izolačnej vzdialenosti, ktorá má zabrániť prenosu GM materiálu do žiadanej úrovne 0,9 %.

Kľúčové slová: koexistencia, izolačné vzdialenosti, prenos peľu

Introduction

The year 2006 was the first year of Bt-maize cultivation in the Slovakia. National coexistence law on growing of GM-plants in agriculture was enforced also in that year. Relevant regulation decree was issued in the spring 2007. An outcrossing in GM-maize is also considered in this law - isolation distances between conventional and GM-maize were established to 200 m, between organic and GM-maize to 300 m. Farmers can also replace isolation distance by border rows of conventional maize (1 row replaces 2 m of isolation distance). The objective of our study was to study efficiency of isolation distances for GM-maize in relation to requirement of current legislation. The results should provide more rational view on coexistence regulations used in agricultural practice.

Material and Methods

The maize hybrid DKC4442YG containing the event MON 810 (Bt-maize) was drilled in 3 locations – Bajč, Lipové, and Naciná Ves. Bt-maize in Lipové was surrounded by 36 rows of non-GM near-isogenic maize (DK440), in Naciná Ves by 36 rows from 3 sides and by 6 rows from the fourth side, and in Bajč only from the downwind side with 126 rows. Grain samples for DNA analyses were taken from conventional maize in strips during harvest. At Lipové and Naciná Ves samples were sampled from strips of rows: 1-6 (distance 0.7-4.2 m from the GM-plot), 7-12 (4.9-8.4 m), 13-18 (9.1-12.6 m), 19-24 (13.3-16.8 m), 25-30 (17.5-21.0 m) and 31-36 (21.7-25.2 m). Higher number of downwind samples was taken at Bajč (up to rows 121-126, i.e. 84.7-88.2 m from the GM-field). The influence of wind direction was taken into account by sampling all four sides at two locations (Lipové, Naciná Ves). DNA analyses were performed by Real-Time PCR. Results of adventitious presence were expressed as seed percentage.

Results and Discussion

Adventitious presence of MON 810 event, irrespective of wind direction, did not exceed 0.25 % of DNA at distance greater than 19-24 rows, i.e. 13.3-16.8 m from the MON 810 plot. Wind direction impact was most pronounced in location Lipové. The calculated and measured results carried out on the bulk grain samples collected from the entire 36 rows (25.2 m) of the conventional field sections neighbouring the central plot of MON 810 fulfilled the legal food and feed labelling threshold of 0.9 % of DNA for grain in all cases. We also observed that required and regulated isolation with 100 border rows of conventional maize (instead of 200 m of isolation distance) exceed the actual need for at least 3-4 times. Moreover adventitious presence of extraneous DNA in harvested conventional grain in practice is further decreased due to simple dilution effects.

Conclusions

Relevant legislation in Slovakia requires farmers to comply with an isolation distance of 200 m, which can be replaced by border rows of non-GM maize according to the principle that 1 border row replaces 2 m of isolation distance. GM-maize containing the MON 810 event, was drilled at 3 different locations over the Slovakia in the 2006 and during harvest, samples were collected from neighbouring the conventional maize. Real-Time PCR was used to detect potential levels of MON 810 in samples. Data obtained indicate that coexistence of GM and conventional maize planted under defined conditions is possible. An isolation distance of 200 m, respectively 100 border rows of conventional maize represents 3-4 times the effective isolation distance actually needed.

Much lower number of conventional maize rows is necessary for effective isolation between GM and other maize fields than is required by current regulation. This confirms results of Gustafson et al. (2006), Devos et al. (2007), and Sandivo et al. (2007) that maize pollen flow and pollen mediated gene flow decline rapidly by distance. Moreover higher isolation distances between GM and conventional maize are not convenient in smaller fields. Reduction of these distances could allow to access benefit of coexistence in agricultural practice for more such farmers in Slovakia.

References

- Devos, Y., Reheul, D., Thas, O., De Clercq, E. M., Cougnon, M., Cordemans, K.: Implementing isolation perimeters around genetically modified maize fields. *Agron. Sustain. Dev.*, 27, 2007, 155-165.
- Gustafson, D. I., Brants, I. O., Horak, M. J., Remund, K. M., Rosenbaum, E. W., Soteres, J. K.: Empirical modelling of genetically modified maize grain production practices to achieve European Union labelling thresholds. *Crop Sci.*, 46, 2006, 2133-2140.
- Sanvido, O., Widmer, F., Winzeler, M., Streit, B., Szerencsits, E., Bigler, F.: Definition and feasibility of isolation distances for transgenic maize cultivation, *Transgenic Res.*, 2007, DOI 10.1007/s11248-007-9103-1.

ÚČINOK POSTUPNEJ DEHYDRATÁCIE NA FYZIOLOGICKÉ PARAMETRE VYBRANÝCH GENOTYPOV CÍCERA BARANIEHO (*CICER ARIETINUM L.*) THE EFFECT OF GRADUAL DEHYDRATION ON PHYSIOLOGICAL PARAMETERS OF SELECTED GENOTYPES OF CHICKPEA (*CICER ARIETINUM L.*)

Eleonóra KRIVOSUDSKÁ – Elena HUNKOVÁ – Jana FERENCOVÁ – Gabriela
ANTALÍKOVÁ

*In this work, free proline concentration and relative water content (RWC) were evaluated in plants of three chickpea (*Cicer arietinum L.*) genotypes (PK 51814- Syria, type „desi“, CM-7-1/85- Syria, type „desi“, Knoor 91- Turkey, type „kabuli“), which were submitted to controlled dehydration at the beginning of flowering stage. Among tested genotypes, genotype Knoor 91 Turkey (type „kabuli“), showed the highest free proline content and RWC values after 20 days without watering.*

Key words: Chickpea, drought, water stress

Úvod

Medzi najstaršie pestované plodiny patria strukoviny. A cícer je po fazuli a hrachu treťou najvýznamnejšou strukovinou na svete. Genetické centrum jeho vzniku leží pravdepodobne v juhovýchodnom Turecku a priľahlých oblastiach Sýrie.

Existujú dva hlavné typy cícera baranieho – „desi“ a „kabuli“. Vyše 80 % svetovej produkcie cícera tvorí typ „desi“. Vyčleniť možno ešte tretí typ cícera s guľatými semenami podobnými hrachu, ktorý je najmenej rozšírený a vyskytuje sa hlavne v strednej Európe. Sem patria aj všetky slovenské genotypy cícera (Gáborčík, Pastucha, 1996).

Na území Slovenska je táto prastará strukovina málo pestovanou plodinou. Patrí medzi plodiny „malovýroby“ – jej pestovanie vo veľkom je zriedkavé (Pospíšil, Dančák, 2007).

Významným agronomickým znakom cícera je suchovzdornosť a celková nenáročnosť na vodu (Beluský, 2004). Za najvýznamnejšie vlastnosti cícera sa považujú veľké nároky na teplo a značná suchovzdornosť (Pastucha, 1992). Ide o komplexnú adaptačnú vlastnosť rastlín, vďaka ktorej odolávajú vodnému stresu vyvolanému deficitom vody (Olšovská, Brestič, Živčák, Kmeť, 2008).

Cieľom experimentu preto bolo posúdenie suchovzdornosti cícera (*Cicer arietinum L.*) s tým, že sme sledovali zmeny fyziologických parametrov počas deficitu vody.

Materiál a metódy

Počas trvania experimentu v roku 2006 boli sledované rôzne genetické zdroje cícera : PK 51814 a CM-7-1/85 (Sýria, typ „desi“), Knoor 91 (Turecko, typ odrody „kabuli“). Výsev semien cícera sa uskutočnil v druhej dekáde apríla do nádob s objemom 10 l po 9 ks semien na nádobu. Osivo zabezpečila Génová banka Výskumného ústavu rastlinnej výroby v Piešťanoch. Rastliny boli pestované v prirodzených klimatických podmienkach s pH pôdy 6,47.

V ontogenéze rastlín sa vyskytujú obdobia, kedy sú rastliny mimoriadne citlivé na nedostatok vody. Pretože pre strukoviny je takým kritickým obdobím v požiadavkách na vodu obdobie kvitnutia, v tejto fenofáze bol u 50% rastlín indukovaný vodný stres pozastavením zálievky. Zvyšné rastliny (50 %) slúžili ako kontrola a boli zalievané počas celého obdobia trvania experimentu.

Na stresovaných aj kontrolných rastlinách (v najmladších plne vyvinutých dospelých listoch) boli sledované nasledovné parametre: relatívny obsah vody v listoch (RWC), obsah voľného prolínu v listoch, osmotický potenciál (Ψ_s). Relatívny obsah vody v % bol stanovený gravimetricky a obsah voľného prolínu v listoch refraktometricky podľa Bates et al. (1973) spektrofotometricky ninhydrínovou metódou. Osmotický potenciál bol stanovený psychometricky (Wescor, Logan, Utah, USA). V pravidelných časových intervaloch sa merala aj difúzna vodivosť (g_c) individuálnych (vrchných) listov porometrom Delta-T-Devices (Cambridge, England) – tzv. konduktancia prieduchov, ktorej hodnoty korelujú s otvorenosťou prieduchov.

Výsledky a diskusia

Vodný stres je typom stresu, následkom ktorého dochádza k poklesu mnohých fyziologických procesov v rastlinách. Táto inhibícia fyziologických funkcií nie je však okamžitá a priamočiara. Rastliny majú vyvinuté adaptačné mechanizmy, udržiavajú v činnosti tie základné procesy, ktoré sú nevyhnutné pre prežitie a reprodukciu. Vodný stres, indukujúci početné biochemické a fyziologické reakcie rastlín, vedie k postupnej strate vody a k zníženiu turgoru (Brestič, Olšovská, 2001).

Pre podrobnejšie štúdium účinku vodného stresu sme realizovali nádobové pokusy v prirodzených klimatických podmienkach. V závislosti od výkyvov počasia sa následne menili aj podmienky dehydratácie.

Na 20. deň dehydratácie výraznejšie poklesol obsah vody v listoch (RWC) pri genotypy PK 51814. V porovnaní s ním si najvyšší obsah vody v listoch udržal genotyp Knoor 91 (67,96 %).

Prolín (Pro) je dominantná organická molekula akumulovaná v mnohých organizmoch, vrátane vyšších rastlín, eubaktérií, morských rias, ako odpoveď na environmentálne stresy ako sucho, zasolenosť, vysoké teploty, mraz, UV žiarenie a ťažké kovy. Mnoho štúdií poukazyvalo na úlohu Pro ako obranný mechanizmus počas osmotického stresu. Osmotický stres je najlimitujúcejším faktorom. Počas osmotického stresu slúži Pro ako mediátor osmotickej adjustácie, ako stabilizér subcelulárnych štruktúr, zberač voľných radikálov, ako sink energie a ako signál o strese. Mnoho výskumov poukázalo na pozitívnu koreláciu medzi akumuláciou Pro a osmotoleranciou rastlín a iné, že stúpajúca hladina Pro je výsledkom stresu (Tokihiko et al., 1999).

V našich experimentoch bola zaznamenaná najvýraznejšia akumulácia voľného prolínu pri genotypy Knoor 91 (47,0 $\mu\text{mol.g}^{-1}\text{ČH}$ v prepočte na 100 % RWC).

Záver

V pokusnom období 2006 bol sledovaný vplyv postupnej dehydratácie (fenofáza kvitnutia) na relatívny obsah vody (RWC) a obsah voľného prolínu rôznych genotypov cícera : PK 51814 a CM-7-1/85 (Sýria, typ „desi“), Knoor 91 (Turecko, typ odrody „kabuli“). Z výsledkov nameraných pri jednotlivých genotypoch sme zistili, že najvyšší obsah vody v listoch si v období na konci dehydratácie (20. deň) udržal genotyp Knoor 91. Akumulácia voľného prolínu bola tiež najvýraznejšia pri danom genotypy, čo naznačuje vyššiu schopnosť osmotickej adjustácie.

PodĎakovanie. Táto práca bola podporená Agentúrou na podporu vedy a techniky prostredníctvom finančnej podpory č. APVT – 27 – 028704.

Literatúra

- BATES, L. S. – WALDREN, R. P. – TEARE, J. D. 1973. Rapid determination of proline for water stress studies. In: *Plant and Soil*, roč. 39, 1973, s. 205 – 207.
- BELUSKÝ, J. 2004. Pestovanie malotonážnych strukovín. In *Naše pole*, roč. 8, 2004, č. 3, s. 44. ISSN 1335-2466
- BRESTIČ, M. – OLŠOVSKÁ, K. 2001. Vodný stres rastlín: príčiny, dôsledky, perspektívy. Nitra : SPU v Nitre, 2001. 149 s. ISBN 80-7137-902-6
- GÁBORČÍK, N. - PASTUCHA, Ľ. 1996. Hodnotenie svetového sortimentu cícera baranieho na Slovensku. In: *Cícer baraní na Slovensku – stav a perspektívy*. Banská Bystrica: Výskumný ústav trávnych porastov a horského poľnohospodárstva, 1996, s. 42 – 44.
- OLŠOVSKÁ, K. – BRESTIČ, M. – ŽIVČÁK, M. – KMEŤ, J. 2008. Fyziológia a ekofyziológia rastlín (*Systematický výkladový slovník*). Nitra: SPU v NITRE, 2008. 160 s. ISBN 978- 80- 552- 0089- 7
- PASTUCHA, Ľ. 1992. Menej známe strukoviny cícer baraní a hrachor siaty. In *Súčasný trendy v pestovaní strukovín*. Nitra: Dom techniky, 1992, s. 46 – 51. ISBN 80-236-0036-2
- POSPIŠIL, R. – DANČÁK, I. 2007. Pestovanie suchovzdorných a teplomilných rastlín. Nitra: ÚVTIP – NOI, 2007. 63 s. ISBN 978- 80- 89088- 54- 6
- TOKIHIKO, N. – MASATOMO, K. – YOSHU, J. – YUKIKA, S. 1999. Biological functions of proline in morphogenesis and osmotolerance revealed in antisense transgenic *Arabidopsis thaliana* L. In *The Plant Journal*, Vol. 18, 1999, s. 185 – 193 ISSN 0960-7412

STABILITA ÚRODY ZRNA GENOTYPOV JAČMEŇA SIATEHO F. JARNÁ STABILITY OF GRAIN YIELD OF SPRING BARLEY GENOTYPES

Klára KRIŽANOVÁ – Alžbeta ŽOFAJOVÁ – Ľudovít SLEZIAK – Jozef GUBIŠ

In 2009, 20 spring barley genotypes were evaluated in field experiments established in 5 localities on the territory of Slovakia. Cultivar response on environments in grain yield was evaluated by simple regression model. Different genotype responses on environments were found from positive to adapt ones. For evaluation of cultivar response on environments besides regression coefficient, standard deviation and coefficient of variation appeared as suitable.

Key words: spring barley, cultivar, response, environment

Od novej odrody sa vyžaduje nielen vysoká produktivita, ale aj schopnosť poskytovať relatívne stabilnú úrodu pri meniacich sa podmienkach prostredia, čo je dôležitým cieľom šľachtiteľských programov.

Úroda je silne ovplyvnená podmienkami prostredia, ktoré všeobecne vedú k veľkej variabilite jednak medzi rokmi v rámci lokality a medzi lokalitami v roku a dokonca medzi lokalitami a rokmi. Pričom nie sú nezvyčajnými situácie, že selekcia založená na stabilite úrody spôsobí zníženie priemerných úrod (Finley, Wilkinson 1963) a naopak selekcia na vyšší priemer spôsobí nižšiu stabilitu (Simmonds 1991). Avšak Holland et al. (2002) uviedli, že selekcia na širokú adaptáciu k rôznym prostrediam pri ovse spôsobila významné zvýšenie v priemernej úrode populácie.

Cieľom práce bolo v úrode zrna zhodnotiť reakciu genotypov jačmeňa siateho f. jarná na pestovateľské prostredie.

Materiál a metódy

V roku 2009 bolo v poľných pokusoch na 5 lokalitách (Borovce, Sládkovičovo, Spišská Belá, Solary, Trebišov) hodnotených 17 genotypov jačmeňa siateho f. jarná a 3 kontrolné odrody (1- Xanadu, 2 – Nitran, 3 - Slaven). Pokusy boli založené metódou znáhodnených blokov v štyroch opakovaniach v rámci skúšobnej fázy programu šľachtienia. Uvádzame hodnotenie úrody zrna. Reakciu genotypov sme odhadli pomocou lineárneho regresného koeficienta (bi) (Finley, Wilkinson 1963), t.j. regresiou hodnôt x_{ij} na priemer prostredia $x.j$.

Štatistické analýzy boli realizované pomocou balíka programov *Statgrafics plus for Windows*.

Výsledky a diskusia

Významným zdrojom premenlivosti boli oba sledované faktory (genotypy, lokality) a ich interakcia (tabuľku analýzy rozptylu neuvádzame). Podľa lokalít úroda zrna kolísala od 4,802 t.ha⁻¹ (Solary) po 6,988 t.ha⁻¹ (Spišská Belá). Jednofaktorovou analýzou rozptylu na lokalitách Solary a Borovce bola zistená vysoká experimentálna chyba pokusov v dôsledku čoho boli nevýznamné rozdiely medzi genotypmi. V poradí druhá najvyššia úroda zrna bola na lokalite Sládkovičovo (6,622 t.ha⁻¹). V porovnaní s ostatnými lokalitami v Trebišove bola priemerná úroda zrna (5,949 t.ha⁻¹).

Variačné rozpätie medzi genotypmi v úrode zrna bolo od 5,592 t.ha⁻¹ (genotyp 8, ďalej len číslo) po 6,079 t.ha⁻¹ (17 a 19) (tab. 1). Medzi 10 genotypmi s najvyššou úrodou zrna vrátane dvoch kontrol (Nitran a Slaven) neboli významné rozdiely. S nižšou úrodou zrna si boli podobné dve trojice genotypov (14, 13 a kontrola Xanadu, $\bar{x}=5,831$ t.ha⁻¹) (5, 9 a 16, $\bar{x}=5,622$ t.ha⁻¹).

Regresný koeficient je považovaný za parameter reakcie odrôd na prostredie, pričom odrody s $bi>1$ sú považované za pozitívne reagujúce na podmienky prostredia a s $bi<1$ za prispôbené na podmienky prostredia. Ideálnou je odroda s maximálnou úrodou a s maximálnou fenotypovou stabilitou (Užík 1995). Najúrodnejší genotyp 19 mal priemernú reakciu na prostredie ($b=0,946$). Z 10 najúrodnejších genotypov, medzi ktorými neboli štatisticky významné rozdiely genotyp 10 bol najviac prispôbený prostrediam v ktorom bol skúšaný ($b=0,689$), v úrode zrna boli najnižšie rozdiely medzi lokalitami ($s=0,702$). Z kontrolných odrôd najúrodnejšou a stabilnú reakciu na prostredie mala odroda Slaven, odroda Xanadu bola v tomto súbore klasifikovaná ako priemerne a odroda Nitran ako pozitívne reagujúca na podmienky prostredia (najvyšší b koeficient z celého súboru).

Z ďalších ukazovateľov variability sa ako vhodné pre odhad reakcie odrody na prostredie ukázali smerodajná odchýlka (s) a variačný koeficient (v), ktoré boli vo významnom vzťahu s regresným koeficientom ($r=0,983^{++}$, $r=0,944^{++}$, jednotlivo). Naopak korelačný koeficient medzi priemernou úrodou genotypu v jednotlivých lokalitách a priemerom celého súboru v jednotlivých lokalitách ($n=5$) nebol takmer v žiadnom vzťahu s ďalšími ukazovateľmi.

Záver

Medzi 20 genotypmi jačmeňa siateho f. jarná boli významné rozdiely v úrode zrna a tiež medzi 5 lokalitami v ktorých boli skúšané. Zistili sme rôzne typy reakcie genotypov od pozitívnej cez priemernú až po prispôsobenie sa na podmienky prostredia. Pre hodnotenie reakcie odrôd na prostredie okrem regresného koeficienta (*bi*) sa ako vhodnými javili smerodajná odchýlka (*s*) a variačný koeficient (*v*).

Tabuľka 1: Úroda zrna a ukazovatele reakcie genotypov jačmeňa siateho f. jarná na prostredie

Genotyp	Úroda zrna (t.ha ⁻¹)	b	SE	r	s	v
1 Xanadu	5,858 abcd	1,092	0,121	0,982	1,074	18,34
2 Nitran	5,934 d	1,313	0,187	0,97	1,306	22,02
3 Slaven	6,000 d	0,855	0,237	0,901	0,917	15,28
4	5,597 ab	1,036	0,237	0,929	1,077	19,25
5	5,612 abc	1,142	0,300	0,909	1,212	21,61
6	5,889 cd	0,908	0,101	0,981	0,893	15,18
7	5,998 d	1,111	0,085	0,991	1,083	18,06
8	5,592 a	0,903	0,145	0,963	0,905	16,20
9	5,616 abc	1,075	0,135	0,976	1,063	18,94
10	5,943 d	0,689	0,133	0,948	0,702	11,82
11	5,985 d	0,894	0,911	0,984	0,877	14,67
12	6,025 d	0,919	0,205	0,932	0,952	15,80
13	5,835 abcd	1,139	0,035	0,998	1,102	18,89
14	5,802 abcd	0,783	0,153	0,946	0,798	13,77
15	5,881 bcd	1,001	0,19	0,949	1,018	17,31
16	5,638 abc	0,819	0,085	0,984	0,804	14,27
17	6,079 d	1,290	0,157	0,978	1,273	20,96
18	6,072 d	0,819	0,215	0,910	0,869	14,32
19	6,079 d	0,946	0,085	0,988	0,925	15,22
20	5,974 d	1,252	0,204	0,962	1,257	21,05
\bar{x}	5,871	0,999	0,196	0,959	1,005	17,15
LSD _{0,05}	0,285	-	-	-	-	-

Medzi priemermi označenými rovnakými písmenami nie sú štatisticky významné rozdiely ($P < 0,05$)

Pod'akovanie. Práca bola realizovaná za finančnej podpory projektu VMSP-P-0047-09 „Tvorba rezistentných typov rastlín jačmeňa siateho f. jarná a pšenice letnej f. ozimná so zlepšenými vlastnosťami genómu pre zvýšenie pridanej hodnoty“.

Literatúra

- FINLAY, R.W. – WILKINSON, G. N. (1963): The analysis of adaptation in a plant breeding programme. In: Aust. J. Agric. Res., vol. 14, 1963, pp. 742–754.
- HOLLAND, J. B. – BJONSTAD, A. – FREY, K. J. – GULLORD, M. – WESENBERG, D. M. (2002): Recurrent selection for broad adaptation affects stability of oat. In: Euphytica, 126, 2002, 265–274.
- SIMMONDS, N. W. (1991): Selection for local adaptation in a plant breeding programme. In: TAG, 82, 1991, 363–367
- UŽÍK, M. (1995): Parametre stability a ich aplikácia v šľachtení rastlín [Stability parameters and its application in plant breeding]. In: Genet. a Šlecht., vol. 31, 1995, N. 4, pp. 305–315.

REAKCIA ODRÔD PŠENICE S RÔZNYMI ALELAMI *RHT* GÉNOV NA *F. CULMORUM*, *F. GRAMINEARUM* A *F. POAE* REACTION OF WHEAT VARIETIES WITH VARIOUS ALLELES OF *RHT* GENES ON *F. CULMORUM*, *F. GRAMINEARUM* AND *F. POAE*

Štefan MASÁR – Alžbeta ŽOFAJOVÁ – Martin PASTIRČÁK – Tibor ROHÁČIK

Fusarium head blight is one of the most destructive wheat diseases, frequently caused by Fusarium graminearum and F. culmorum. Reduced height (Rht) genes are used in wheat (Triticum aestivum L.) breeding throughout the world. Objectives of this study were to analyze the effects of specific Rht alleles on FHB involved by Fusarium graminearum, Fusarium culmorum and Fusarium poae, using of set of sixteen wheat varieties carrying rht, Rht-B1b, Rht-D1b, Rht-B1b+Rht-D1b and RhtB1b+Rht8c dwarfing alleles. Rht-B1b+Rht-D1b, RhtD1b and RhtB1b significantly increased visual FHB symptoms and AUDPC value respectively. Fusarium graminearum and Fusarium culmorum significantly caused the greatest FHB damage.

Key words: FHB, Fusarium head blight, Rht, plant high reduced genes

Úvod

V šľachtení pšenice sa využívajú gény redukujúce výšku rastliny (*Rht*). Tieto gény mali historický význam vo zvyšovaní úrody pšenice pri jej intenzívnom pestovaní (Borojevič a Borojevič, 2005). Závažné ochorenie pšenice – fuzariózu klasov (FHB) spôsobujú najčastejšie druhy *Fusarium graminearum*, *F. culmorum*, *F. poae* a *F. avenaceum*. Najrozšírenejšie vo svete je *F. graminearum*, výskyt *F. culmorum* bol zaznamenaný hlavne v chladnejších regiónoch (Šíp et al., 2008). *Fusarium poae* sa najčastejšie vyskytovalo na zrnách bez viditeľných symptómov ochorenia na rôznych lokalitách Slovenska v rokoch 1999-2003 (Roháčik a Hudec, 2005).

Materiál a metódy

Poľný pokus bol založený v roku 2008 v záhrade CVRV-VÚRV Piešťany. Šestnásť genotypov pšenice s rôznymi *Rht* alelami boli vysiate v dvoch opakovaníach na parcelkách 1m², výsev 400 semien.m⁻². Po desať klasov z každej odrody bolo infikovaných konidiálnou vodnou speneziou *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum* a *Fusarium poae* v štádiu kvitnutia vo forme spreja (rezistencia voči FHB, typ 1). Symptómy ochorenia boli hodnotené po 14, 21 a 28 dňoch po inokulácii škálou 1-9, (skóre symptómov FHB). Hodnotili sme vplyv alel *Rht* génov a druhov rodu *Fusarium* na skóre symptómov FHB a hodnotu plochy pod úrovňou rozvoja choroby (AUDPC) štatistikou SPSS 11.5.

Výsledky a diskusia

Na skóre symptómov FHB a hodnoty AUDPC mali významný ($P \leq 0,01$) vplyv model (skóre $r^2=0,61$, AUDPC $r^2=0,67$) druhy rodu *Fusarium*, alely *Rht* génov a interakcia alely *Rht* génov \times *Fusarium* spp. (tab. 1). Alely *Rht* génov *Rht-D1b+Rht-B1b*, *Rht-D1b* a *Rht-B1b* významne ($P \leq 0,05$) zvyšovali skóre symptómov FHB a hodnoty AUDPC (tab. 2). Významne ($P \leq 0,05$) vyššie hodnoty skóre a AUDPC mali *Fusarium graminearum* a *Fusarium culmorum* oproti *Fusarium poae* (tab. 3). Pri hodnotení interakcie alel *Rht* génov a druhov rodu *Fusarium*, najvyššie skóre a hodnoty AUDPC boli pri infekcii *Fusarium culmorum* v genotypoch s kombináciou alel *Rht-B1b+Rht-D1b*, pri infekcii *Fusarium graminearum* a *Fusarium poae* v genotypoch s *Rht-D1b*. Najnižšie skóre symptómov FHB a AUDPC pri infekcii *Fusarium culmorum* mali genotypy s alelami *Rht-B1b+Rht8c*, pri infekcii *Fusarium graminearum* genotypy s alelou *rht* a pri infekcii *Fusarium poae* genotypy s kombináciou alel *Rht-B1b+Rht8c* (obr. 1). Srinivasachary, et al., (2009) zistili, že alely *Rht-B1b* a *Rht-D1b* mali podobný vplyv na citlivosť voči FHB. Pri vysokom infekčnom tlaku *Rht-B1b* a *Rht-D1b* významne znižovali rezistenciu voči FHB typu 1. *Rht-B1b* a *Rht-D1b* v izogénnych líniiach pšenice na báze odrody Mercia významne zvyšovali FHB hodnoty o 35% resp. 52% (Miedaner a Voss, 2008).

Záver

Na skóre FHB symptómov a hodnoty AUDPC významne vplývali odrody, druhy rodu *Fusarium* a alely *Rht* génov. Alely *Rht* génov *Rht-D1b+Rht-B1b*, *Rht-D1b* a *Rht-B1b* významne zvyšovali skóre symptómov FHB a hodnoty AUDPC. Významne vyššie skóre symptómov FHB a hodnoty AUDPC mali *Fusarium graminearum* a *Fusarium culmorum* oproti *Fusarium poae*. Najnižšie skóre symptómov FHB a hodnoty AUDPC mali genotypy s alelami *rht* a *Rht-B1b+Rht8c*.

Literatúra

- Borojevič, K.- Borojevič, K. (2005): The Transfer and History of “Reduced Height Genes” (*Rht*) in Wheat from Japan to Europe. In: Journal of Heredity, 96, (2005), (4), pp.455–459.
- Miedaner, T.H.- Voss, H.H.:(2008): Effect of Dwarfing *Rht* Genes on Fusarium Head Blight Resistance in Two Sets of Near-Isogenic Lines of Wheat and Check Cultivars. In: Crop Sci., 48, (2008), pp.2115-2122.

Srinivasachary- Gosman, N.- Steed, A.- Hollins, T.W.- Bayles, R.- Jennings, P.- Nicholson, P.: Semi-dwarfing *Rht-B1* and *Rht-D1* loci of wheat differ significantly in their influence on resistance to *Fusarium* head blight. In: *Theor. Appl. Genet.*, 118, (2009), (4), pp.695-702.

Šíp, V.- Chrpová, J.- Sýkorová, S.: Assessing Resistance to Head Blight in Wheat Cultivars Inoculated with Different *Fusarium* Isolates. In: *Czech J. Genet. Plant Breed.*, 44,(2008), (2), pp.43–59.

Roháčik, T.- Hudec, K.: Influence of agro-environmental factors on fusarium infestation and population structure in wheat kernels. In: *Ann. Agric. Environ. Med.*, 2005, 12, pp.39–45.

Riešenie bolo podporené APVV v rámci projektov 2006 UO 27/091 05 01/091 05 11 a VSMP-P-0056-09.

Tabuľka 1: Priemerné štvorce z analýzy všeobecného lineárneho modelu skóre symptómov a hodnôt AUDPC

Zdroj variability	Skóre		AUDPC	
	df	MS	df	MS
Model	15	1542,45**	15	7,11E+06**
Alely <i>Rht</i> génov	4	171,03**	4	1,59E+06**
<i>Fusarium</i> spp.	2	320,02**	2	2,84E+06**
Alely <i>Rht</i> génov * <i>Fusarium</i> spp.	8	29,90**	8	2,97E+05**
Chyba	2865	5,27	945	5,50E+04

** P<0,01

Tabuľka 2: Vplyv alel *Rht* génov na skóre symptómov FHB a hodnoty AUDPC

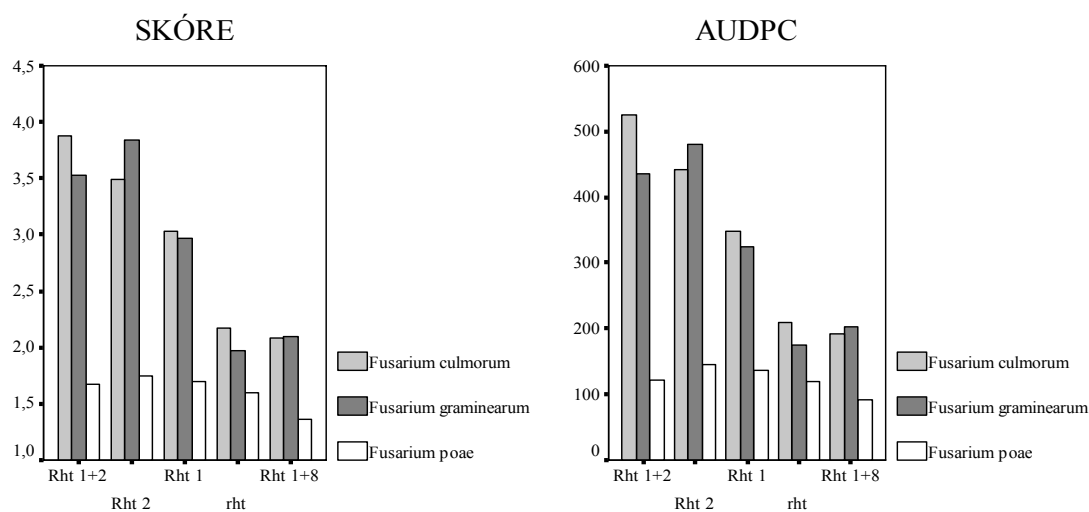
Alely <i>Rht</i> génov	N	Skóre	N	AUDPC
<i>Rht-B1b</i> + <i>Rht8c</i>	360	1,85 ^a	120	162,02 ^a
<i>rht</i>	360	1,91 ^a	120	167,56 ^a
<i>Rht-B1b</i>	360	2,57 ^b	120	269,79 ^b
<i>Rht-D1b</i>	1620	3,03 ^b	540	355,19 ^c
<i>Rht-D1b</i> + <i>RhtB1b</i>	180	3,03 ^b	60	361,38 ^c

^{a-x} P<0,05

Tabuľka 3: Vplyv druhov rodu *Fusarium* na skóre symptómov FHB a hodnoty AUDPC

<i>Fusarium</i> spp.	N	Skóre	N	AUDPC
<i>Fusarium poae</i>	960	1,67 ^a	320	132,45 ^a
<i>Fusarium culmorum</i>	960	3,12 ^b	320	374,77 ^b
<i>Fusarium graminearum</i>	960	3,26 ^b	320	384,67 ^b

^{a-x} P<0,05



Obrázok 1: Vplyv interakcie alel *Rht* génov a druhov rodu *Fusarium* na skóre symptómov FHB a hodnoty AUDPC

NOVÝ PCR MARKER DELECE V LOKUSU *Md-ACO1* OVLIVŇUJÍCÍHO MĚKNUTÍ PLODŮ JABLONÍ V PRŮBĚHU SKLADOVÁNÍ NEW PCR MARKER OF DELETION IN *Md-ACO1* LOCI CONTROLLING APPLE FRUIT SOFTENING DURING STORAGE

Martina MELOUNOVÁ – Pavel VEJL – Jana ZOUFALÁ – Jan BLAŽEK – Radek VÁVRA

Genes Md-ACO and Md-ACS, which encode enzymes in ethylene biosynthetic pathway, were studied in connection with apple softening. Apple fruit softening was also assessed by newly designed pair of PCR marker CZU-ACO-1 in collection of 178 world-wide varieties. This primer produces typical fragments of a allele (450bp) and b allele (512 bp). After sequenation of both alleles, the identical deletion of 62 bp in allele a was revealed. Homozygous constitution of mutant allele in locus CZU-ACO-1 was detected in 6 varieties, the homozygous constitution of mutant allele in Md-ACS-1 locus was revealed in 26 varieties. The mutation in both studied genes was found only in Fuji which has very low ethylene production during softening process.

Key words: Malus domestica, Md-ACO1, Md-ACS1, fruit softening, ethylen, PCR

Úvod

Délka skladování plodů jableň je výrazně ovlivněna schopností plodů odolávat předčasnému měknutí. K měknutí plodů dochází nejen v průběhu skladovacího procesu, ale zejména po vyskladnění plodů v průběhu prodeje konzumentům. Nadměrné měknutí plodů negativně ovlivňuje řadu senzorických vlastností.

Významnou roli v procesu měknutí plodů hraje fytohormon etylén, který je u vyšších rostlin syntetizován dvěma enzymaticky katalyzovanými kroky. Prekurzorem etylenu je S-adenosyl-L-methionin (SAM). V prvním kroku syntáza (ACS) cyklizuje SAM na 1-aminocyklopropan-1-karboxylovou kyselinu (ACC). Ve druhém kroku dochází v důsledku působení ACC-oxidázy (ACO) k oxidativní přeměně ACC na etylén (Kende, 1993).

Sunako *et al.* (1999) charakterizoval gen *Md-ACS*, který je zodpovědný za biosyntézu ACC-syntázy. Nalezl variabilitu v promotorové oblasti tohoto genu. Alela nesoucí inzerci byla označena jako *Md-ACS1-2*. Tato alela je zodpovědná výrazně sníženou transkripční aktivitu tohoto genu. Odrůdy s homozygotní sestavou alel *Md-ACS1-2* produkují jen velmi malé množství etylénu v porovnání s odrůdami s homozygotní sestavou původní alely *Md-ACS1-1*, která má normální transkripční aktivitu. Costa *et al.* (2005) charakterizoval delecii v lokusu *Md-ACO1* řídícího syntézu ACC-oxidázy. Alela nesoucí tuto delecii byla označena jako *Md-ACO1-1* byla rovněž zodpovědná za sníženou produkci etylénu. Zhu a Barritt (2008) provedli hodnocení vybraných odrůd jableň PCR markery detekujícími inzerci v lokusu *Md-ACS1* a delecii v lokusu *Md-ACO1*. Zoufalá *et al.* (2009) provedla hodnocení 131 světových odrůd z hlediska výskytu inzerce v promotoru lokusu *Md-ACS1*.

Materiál a metody

Rostlinný materiál a izolace DNA

Pro analýzy bylo použito 178 odrůd světového sortimentu odrůd jableň uchovávaných genovou bankou při VŠÚO Holovousy s.r.o. DNA byla izolována z listových čepelí pomocí DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen). *Nový marker pro detekci delece v lokusu Md-ACO-1*

Experimentálně bylo zjištěno, že primery navržené pro PCR detekci delece v lokusu *Md-ACO-1* (Costa *et al.*, 2005) vykazovaly nespecifické amplifikace. Na základě sekvence NCBI DQ439791, kterou publikovali Dal Cin (2007) byly pomocí programu Primer3 Output navrženy primery CZU-ACO-1-F 5'ccagttaccgactaccatt3' a CZU-ACO-1-R 5'ttcaaatcttggctcttgg3'.

Reakční směs o objemu 12,5 µl obsahovala 50 ng templátové DNA, 0,7 U *Taq* polymerázy (Fermentas) a 5 µg BSA. Koncentrace ostatních komponent PCR reakce byla následující: 10 mM Tris-HCl (pH 8,8), 50 mM KCl, 0,08%, Nonidet P40, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 µM dNTP, 0,4 µM primer F, 0,4 µM primer R a 4 mM tetramethyl amonium oxalát (Top Bio). Amplifikace probíhala podle následujícího schématu: 1x (95°C, 3 minuty), 35x (94°C 30 sekund, 63,4°C, 50 sekund, 72°C 50 sekund), 1x (72°C 10 minut). Pro ověření přítomnosti delece byly amplikony extrahovány z 1% agarózového gelu pomocí MinElute Gel Extraction Kit (Qiagen) a přímo sekvenovány na ABI PRISM®3100 (Applied Biosystems). Pro vyhodnocení sekvenčních podobnosti byla použita databáze NCBI BLAST a program ClustalX2.

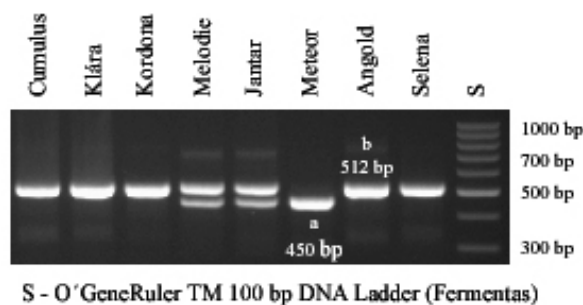
Marker pro detekci inzerce v lokusu Md-ACS-1

Přítomnost inzerce v lokusu *Md-ACS-1* byla detekována PCR markerem při použití primerů podle Sunako *et al.* (1999). Pro amplifikaci byl použit modifikovaný postup podle Zoufalá *et al.* (2009).

Výsledky a diskuse

Nově navržený marker *CZU-ACO-1* vykazoval na rozdíl od markeru navrženého Costa *et al.* (2005) specifickou amplifikaci fragmentů o velikosti 450bp (alela a) respektive 512 bp (alela b) – obrázek 1.

Obrázek 1: Amplikony PCR markeru *CZU-ACO-1* u vybraných odrůd jableň



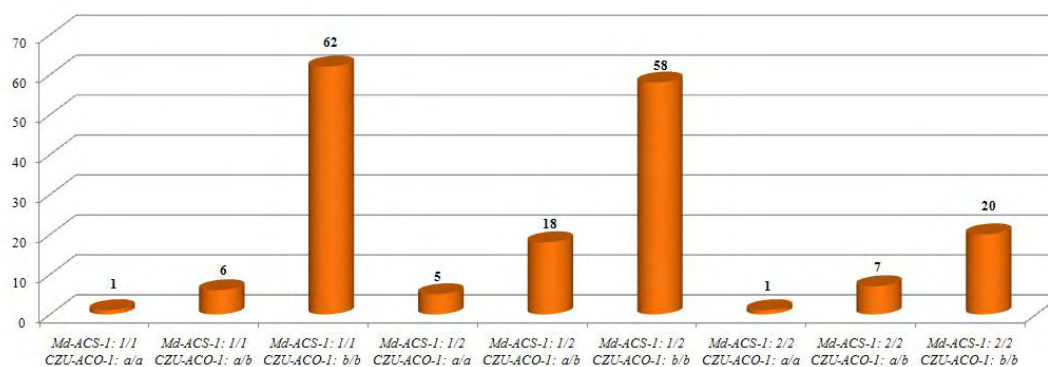
S - O'GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder (Fermentas)

Sekvenovány byly amplikony alel a i b u odrůd Meteor (aa), Melodie (ab) a Kordona (bb). U všech sekvenovaných alel a byla detekována identická delece 62 bp. U alely a byla zjištěna plná sekvenční homologie s NCBI sekvencemi AY597766.1 a AY597768.1. U alely b byla zjištěna plná sekvenční homologie s NCBI sekvencemi AY597767.1 a Y14005.1. V našich experimentech byly rovněž zařazeny odrůdy, které analyzovali Zhu a Barritt (2008). Přítomnost delece v lokusu *Md-ACO-1* se u

těchto odrůd plně shodovala s našimi výsledky.

Na grafu číslo 1 jsou znázorněny počty odrůd s kombinacemi alelických sestav markerů *Md-ACS-1* a *CZU-ACO-1*.

Graf 1: Počty odrůd s různými alelickými kombinacemi markerů *Md-ACS-1* a *CZU-ACO-1*



Závěr

Pomalé měknutí plodů je typické pro odrůdu Fuji, u které byly detekovány obě kauzální mutace v lokusech *CZU-ACO-1* i *Md-ACS-1*. Homozygotní sestava mutované alely pouze v lokusu *CZU-ACO-1* byla detekována u odrůd Meteor, Jonadel, Red Delicious, Renet Simirenka, Starking Delicious a Starkrimson. Homozygotní sestava mutované alely pouze v lokusu *Md-ACS-1* byla detekována u odrůd Akane, Alkmene, Aneta, Cornwallské hřebíčkové, Dima, Discovery, Dublet, Dukát, Fiesta, Frosta, Gala, Gloster, Gold Bohemia, Golida, Honey Gold, Jarka, Jonalord, Karmína, Melrose, Oldenburgovo červené, Otava, Rajka, Rubimeg, Rubín, Rubinstep a Rucla.

Poděkování. Prezentované výsledky byly získány za podpory grantových projektů NAZV MZe ČR QH81142 a QD1267.

Literatura

- COSTA, F. – STELLA, S. – VAN DE WEG, W. E. – GUERRA, W. – CECCHINEL, M. – DALLAVIA, J. – KOLLER, B. – SANSAVIVINI, S. (2005): Role of the genes *Md-ACO1* and *Md-ACS1* in ethylene production and shelf life of apple (*Malus domestica* Borkh). In: Euphytica, vol. 141, N. 1-2, 2005, pp. 181-190.
- KENDE, H. (1993): Ethylene biosynthesis. In: Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, vol. 44, N. 1, 1993, pp. 283-307.
- SUNAKO, T. - SAKURABA, W. - SENDA, M. - AKADA, S. - ISHIKAWA, R. - NIIZEKI, M. - HARADA, T. (1999): An allele of the ripening-specific 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase Gene (*ACS1*) in apple fruit with a long storage life. In: Plant Physiology, vol. 119, 1999, N. 1, 1999, pp. 1297-1303.
- ZHU, Y. – BARRITT, B. H. (2008): *Md-ACS1* and *Md-ACO1* genotyping of apple (*Malus x domestica* Borkh.) breeding parents and suitability for marker-assisted selection. In: Tree Genetics & Genomes, vol. 4, N. 3, 2008, pp. 469-479.
- ZOUFALÁ, J. – VEJL, P. – MELOUNOVÁ, M. – BLAŽEK, J. – KŘELINOVÁ, J. (2009): Apple genetic resources and their molecular analysis. In: Agriculture - Journal for Agricultural Sciences, vol. 55, N. 2, 2009, pp. 69-79.

ANALÝZA ŠTRUKTÚRY GÉNU GLUKANÁZY Z ROSIČKY OKRÚHLOLISTEJ (*DROSERA ROTUNDIFOLIA* L.)

STRUCTURAL ANALYSIS OF GLUCANASE GENE FROM SUNDEW (*DROSERA ROTUNDIFOLIA* L.)

Jaroslav MICHALKO – Jana LIBANTOVÁ – Jana MORAVČÍKOVÁ –
Beáta PIRŠELOVÁ – Roman KUNA – Peter BOLEČEK – Ildikó MATUŠÍKOVÁ

The insectivorous sundew (Drosera rotundifolia L.) is mixotrophic perennial plant, which might be a novel source of pathogenesis-related (PR) genes for biotechnology. These proteins are studied as part of plant defense system, because they are known to accumulate in plants after different kinds of stress. Endo-β-1,3-glucanases (EC 3.2.1.39) are induced in parts of plants infected by viral, bacterial and fungal pathogens but have also an important function in several physiological and developmental processes. In this work, a previously isolated glucanase gene DroGlu13 from sundew was analysed in silico. The sundew glucanase gene showed significant nucleotide homology (E-value = 1e-118) with a β-1,3-glucanase isolated from another carnivorous plant Nepenthes khasiana and also with glucanases from other plant species. Within the sequence it was possible to identify one compact open reading frame (ORF) indicating that no introns are present within the gene. The deduced mature protein consist of 315 amino acid residues and shares 59 % amino acid sequence identity with the Nepenthes glucanase protein. It contains all of the conservative domains characteristic for β-glucanases. There was no N-terminal sequence for signal peptide identified. The DroGlu13 glucanase lacks also a C-terminal extension which suggest its secretion to apoplast. Comparison with the characterized most homologous glucanases don't give us clear information about function of the DroGlu13 in sundew and additional in vivo analyses are needed.

Keywords: drosera, glucanhydrolases, in silico analysis,

Úvod

Rosička okrúhlostá (*Drosera rotundifolia* L.) je mixotrofná trvácna rastlina, ktorá je potenciálnym novým zdrojom PR (pathogenesis-related) génov pre biotechnológie. PR proteíny sa študujú ako súčasť obranného systému rastlín, pretože je známe, že sa v rastlinách akumulujú v dôsledku rôznych druhov stresu. Podskupina týchto proteínov, β-1,3-glukanázy, sa v rastlinách indukujú po napadnutí vírusovými, bakteriálnymi a hubovými patogénmi, ale hrajú tiež dôležitú úlohu pri viacerých fyziologických a vývinových procesoch.

Materiál a metódy

Podobnosť nukleotidovej sekvencie glukanázy *DroGlu13* s inými sekvenciami glukanáz v databáze GeneBank bola analyzovaná programom BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Prítomnosť otvoreného čítacieho rámca (ORF) v sekvencii bola identifikovaná softvérom ORF finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>). Sekvencia ORF bola manuálne doplnená na základe porovnania s najviac homologickými rastlinnými sekvenciami glukanáz v programe ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2>) a na základe popísaných konzervatívnych domén β-glukanáz (Meins et al., 1993). Získaný exón bol preložený do aminokyselinovej sekvencie použitím programu Translate Tool (<http://www.expasy.ch/tools/dna.html>) a porovnaný s inými aminokyselinovými sekvenciami glukanáz v databáze GeneBank. Štruktúra proteínu bola vyhodnotená na základe údajov z literárnych zdrojov. Pravdepodobná funkcia glukanázy bola vyhodnotená na základe charakteristiky jej štruktúry a literárnych zdrojov.

Výsledky a diskusia

Východiskom analýz bola sekvencia genómovej DNA glukanázy *DroGlu13* z rosičky okrúhlostej. Analýza štruktúry tohto génu in silico ukázala, že proteín obsahuje všetky hlavné konzervované domény charakteristické pre glukanázy a taktiež všetky aminokyseliny potrebné pre katalytickú aktivitu v patričných pozíciách Y181, E244, W247, E296, Y321 (Meins et al., 1993). To naznačuje, že sa jedná o funkčný proteín (Obr. 1). V rámci sekvencie sme zistili prítomnosť jedného kompaktného otvoreného čítacieho rámca. Pravdepodobná veľkosť funkčného proteínu je 315 aminokyselín. Táto veľkosť však nemusí byť definitívna, nakoľko nemožno vylúčiť prítomnosť ďalšieho, hoci pomerne krátkeho exónu na 5'konci sekvencie. Podobne to v prípade iných homologických glukanáz z *Arabidopsis thaliana*, At3g57240, At3g57260 a At3g57270 (Obr. 2). Tento predpoklad podporuje aj absencia aminokyseliny metionínu na prvej pozícii proteínovej sekvencie a existencia ďalších 17 N-koncových aminokyselín v sekvencii najhomologickejšej glukanázy z *Nepenthes khasiana*. Nakoľko v proteínovej sekvencii nebola zistená prítomnosť C-koncovkej domény, predpokladáme sekréciu proteínu *DroGlu13* do apoplastu.


```

drosera          -----AADIGACYGLLGDNLPSFSQVVALYNQANIQK  32
Nepenthes          -----MLIALLLGILFATINTRASQIGTCFGMMANNLPPLPDVVAQYNQYSIER  49
AT3G57260.1      MSE SRSI AS PPMIMI LLSLVI ASF FNHTAG QIGVCY QMLGDT LPS PSDVVVALYKQQN IQR  60
                                   *..**_**:*...**. ..** *:* ..**

drosera          MRTYAPLQELAQALQGSNIEVTVGVPNEDLDVLAASQDNADAWIQINLLAYPN-VNWRYP  91
Nepenthes          MRIYGPVSSLSQALSQSGIELVLGVFNQDLQAIASSQSNANSWVQDNI GAYPN-VNFRYL  108
AT3G57260.1      MRLYGPDPGALAALRGS D IEL I LDVPS S D L E R L A S S Q T E A D K W V Q E N V Q S Y R D G V R F R Y I  120
** *_*      ** *_* ..**..** ..**..** ..**..** ..**..** ..**..** ..**..**

drosera          AVGNEIRPNKYG--SEISQYVLPAMQNIQNSLHQLGLS-QVKVSTAWDMAVFASTYPPSQ  148
Nepenthes          AVGNEIRPNLNNGAAQYAQCVLPAMQNLQAINQMVGGRVKVSTAVEMGVAINTYPPSA  168
AT3G57260.1      NVGNEVKPSVGG-----FLLOAMQNIENAVSGAGLE--VKVSTAIAATDTTDTTSPPSQ  171
*****:.. .      ..**..**..**..**..**..**..** ..**..**..**..**..**..**

drosera          GTFDPAIESYTLPIVNFLVSNGLP L L L N C Y P Y F V F K - D T P S L D I N Y A L F T S P G V V W Q D G P  207
Nepenthes          GQFDPSISYFINPIVRFMRDNGSPLLLNCYPYFAYA-YSNIDLSYALFSPGTVVWDGQ  227
AT3G57260.1      GRFRDEYKSFLEPVI GF L A S K Q S P L L V N L Y P Y F S Y M G D T A N I H L D Y A L F T A Q S T V D N D P G  231
** ..: ..**..**..**..**..**..**..** ..**..**..**..**..**..**

drosera          YGYQNLLFAMVDAAYSALKEKAGATEVP IVLSETGWPTEGDVGT SV S N A Q T Y N N N L I Q K V S  267
Nepenthes          YAYQNLFDAMVDSIYSALEKADCGSV IVVSESGWPTMGKGT S I D N A K T Y N N N L I Q N V K  287
AT3G57260.1      YSYQNLFDA N L D S V Y A A L E K S G G G S L E I V V S E T G W P T E G A V G T S V E N A K T Y V N N L I Q H V K  291
*..*****:*:*:*:******.. . : ..**..**..**..**..**..**..** ..**..**..**..**..**..**

drosera          QGTPKRPGQAIE TY I F D M F D E N L K T P E L E K H W G L F T H D G T P K Y S I I L Q -  315
Nepenthes          KGT PKRPGAYLE TY I L D M Y D E D L K S S E L E Q H W G L F T A N G D L K Y P V N F N -  335
AT3G57260.1      NGS PRRPGKAIE TY I F A M F D E N K K E P T Y E K F W G L F H P D R Q S K Y E V N F N -  339
*:*:*:** ..**..**..**..**..**..**..** ..**..**..**..**..**..**
    
```

Obrázok 1: Porovnanie proteínových sekvencií glukanázy. V sekvencii drosera sú vyznačené konzervované zhodné domény charakteristické pre glukanázy (podľa Meins et al., 1993) (tučné písmo), aminokyseliny nevyhnutné pre katalytickú aktivitu (v rámečku). Úsek exónu zistený dodatočne, porovnaním s konzervatívnymi doménami iných glukanázy a s exónom glukanázy z *Nepenthes khasiana* je zvýraznený šedo.



Obrázok 2: Porovnanie intrón-exónovej štruktúry najhomologickejších glukanázy z *Arabidopsis thaliana* s exónom *DroGlu13*

Záver

Analyzovaný gén pre glukanázu *DroGlu13* z rosičky okrúhloľstvej je podobný génom pre glukanázy z iných rastlín, najviac však s génom glukanázy izolovaným s mäsožravej rastliny *Nepenthes khasiana*. Jej štruktúra naznačuje, že sa jedná o gén, ktorý sa exprimuje za podmienok stresu ako chlad a prítomnosť patogénu. Sekvencia *DroGlu13* bude východiskom pre funkčné analýzy príslušného proteínu.

Podakovanie: Práca bola vypracovaná v rámci riešenia projektov APVV LPP-0125-07 a COST FA0605.

Literatúra

MEINS, F. J. R - NEUHAUS, J. M - SPERISEN, C. et al.: The primary structure of plant pathogenesis-related glucanhydrolases and their genes. In Fritig, B., Legrand M.: Mechanisms of Plant Defense Responses. Dordrecht : Kluwer Academic Publishers, 1993, pp. 245-273.

GENETICKÁ TRANSFORMÁCIA REPKY OLEJKY POMOCOU *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS*. GENETIC TRANSFORMATION OF OILSEED RAPE USING *AGROBACTERIUM* *TUMEFACIENS*

Jana MORAVČÍKOVÁ – Eva BOSZORÁDOVÁ – Martin JOPČÍK – Ildikó
MATUŠÍKOVÁ – Jana LIBANTOVÁ

Oilseed rape (Brassica napus L.) varieties Heros, Hunter, Campino, Haydn, Westar and Topaz were used as a source of plant material in Agrobacterium-mediated transformation. For these experiments, two types of plant explants (5-day old cotyledonary petioles and 4-5-day old hypocotyls) were tested for their in vitro regeneration capacity as well as for their sensitivity to different concentration of kanamycin or G418. Genetic transformation was performed using Agrobacterium tumefaciens LBA 4404 carrying binary vector pTS2. The T-DNA region of plasmid pTS2 contained reporter β -glucuronidase and selectable neomycin phosphotransferase genes.

Key words: Agrobacterium, gus gene, nptII gene, oilseed rape

Úvod

Reпка olejka je jednou z najviac pestovaných poľnohospodárskych plodín nielen vo svete ale aj na Slovensku. Po ryži, kukurici a bavlně sa radí medzi päť ekonomicky najdôležitejších plodín. Napriek tomu, že v literatúre je viacero prác, ktoré demonštrujú úspešnosť aplikácie metódy transformácie pomocou *Agrobacterium tumefaciens*, najväčším problémom pri repke olejke je jej genotypovo závislá regeneračná schopnosť (Damgaard *a kol.* 1997; Muhaammad *a kol.* 2003; Bhalla a Sing 2008). V tejto práci sme sa zamerali na vypracovanie transformačného a regeneračného protokolu pre vybraných šesť odrôd repky olejky.

Materiál a metódy

V experimentoch sme testovali 6 odrôd repky olejky *Brassica napus L.*, ktoré sme získali od firiem Raps GbR Saatucht Lundsgaard, Nemecko (Heros a Hunter), NPZ Hans-Georg Lembke KG, Hohenlieth, Nemecko (Campino a Haydn) a Swallow Wellbull, Švédsko (Westar a Topaz). Ako východiskový materiál sme použili 5 dňové kotyledonárne petioly (regenerácia podľa Moloney *a kol.* 1989) a 5-6 dňové segmenty hypokotylov z *in vitro* rastlín repky olejky rastúce v tme (regenerácia podľa Pandian *a kol.* 2006). Regeneračnú schopnosť sme vyhodnotili v % ako počet explantátov, ktoré vytvorili aspoň 1 výhon vzhľadom na celkový počet explantátov použitých v experimente. Test citlivosti na antibiotika sme uskutočnili na regeneračných médiách s obsahom 0, 5, 10, 15, 20 a 25 mg/l kanamycínu alebo G418. Citlivosť na antibiotiká sme vyhodnotili v % ako počet explantátov, ktoré boli schopné tvoriť aspoň jeden výhon vzhľadom na celkový počet explantátov. Transformačné experimenty sme uskutočnili pomocou *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404, ktorý niesol binárny vektor pTS2 (Salaj *a kol.* 2009). Plazmid pTS2 obsahoval reportérový β -glukuronidázový (*gus*) gén a selekčný neomycín fosfotransferázový (*nptIII*) gén. Histochemickú detekciu GUS aktivity sme uskutočnili podľa Jefferona *a kol.* (1996).

Výsledky a diskusia

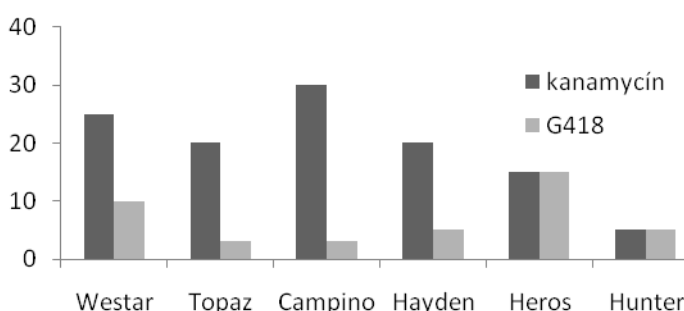
Na základe literárnych údajov sme ako východiskový materiál pre genetickú transformáciu repky olejky rozhodli použiť kotyledonárne petioly a segmenty hypokotylov z rastlín klíčiacych v tme. Regeneračná schopnosť je odrodová závislosť, ktorá môže významne ovplyvňovať transformačnú účinnosť. Z tohto dôvodu sme netransformované rastlinné explantáty testovali na ich schopnosť regenerácie v našich laboratórnych podmienkach. Výsledky ukázali, že regeneračná schopnosť sa pohybovala v rozmedzí od 0 – 80% v závislosti od odrody a použitého protokolu. Zároveň s regeneračným testom sme uskutočnili aj test citlivosti netransgénnych pletív na rôznu koncentráciu antibiotika v médiu, aby sme mohli určiť najnižšiu toxickú koncentráciu, pri ktorej netransformované pletivo odumiera, zatiaľ čo transformované bunky budú schopné regenerácie (Graf 1). Na základe týchto experimentov sme začali s transformáciou repky olejky. Napriek relatívne nízkej transformačnej účinnosti sa nám podarilo získať niekoľko transgénnych výhonov, v ktorých sme prítomnosť reportérového *gus* génu potvrdili aj histochemicky (Obrázok1).

Záver

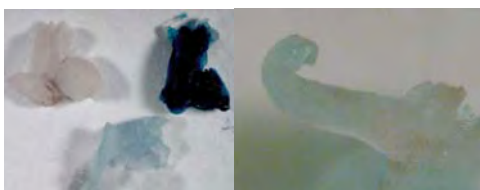
Otestovali sme regeneračnú schopnosť jednotlivých odrôd repky olejky. Na základe týchto výsledkov sme vytypovali aký regeneračný protokol budeme používať pri transformácii jednotlivých odrôd repky olejky. Určili sme najnižšiu toxickú koncentráciu antibiotika kanamycínu alebo G418, ktorú budeme používať pri regenerácii transgénneho pletiva repky olejky. Získali sme niekoľko transgénnych výhonkov, ktoré sú v procese regenerácie a budú podrobené ďalším analýzám.

Literatúra

- BHALA, P.L.–SINGH, M.B. 2008. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Brassica napus* and *Brassica oleracea*. *Nature Protocols*, 3, p.181-189.
- DAMGAARD, O.–JENSEN, L.H.–RASMUSSEN, O.S. 1997. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Brassica napus* winter cultivars. *Transgenic Research*, 6, p. 279-288
- JEFFERSON, R.A.–BURGESS, S.M.–HIRSH, D. 1986. β -glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA*, 83, p. 8447 – 8451.
- MOLONEY, M.M.–WALKER, J.M.–SHARMA, K.K. 1989. High efficiency transformation of *Brassica napus* using *Agrobacterium* vectors. *Plant Cell rep.*, 8: 238-242.
- MUHAAMMAD, R.K.–HAMID, R.–MUHAAMMAD, A.–ZUBEDA, C. 2003. High frequency shoot regeneration and *Agrobacterium* mediated DNA transfer in Canola (*Brassica napus*). *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 75, p. 223-231.
- PANDIAN, A.–HURLSTONE, C.–LIU, Q.–SINGH, S.–SALISBURY, P.–GREEN, A. 2006. *Agrobacterium*-mediated transformation protocol to overcome necrosis in elite Australian *Brassica juncea* lines. *Plant Molecular Biology Reporter*. 24: 103a-103i.
- SALAJ, T.- MORAVČÍKOVÁ, J.–VOOKOVÁ, B.–SALAJ, J. 2009. *Agrobacterium*-mediated transformation of hybrid firs (*Abies* spp.) and regeneration of transgenic emblings. *Biotech Letters* 31, 647-652



Graf 1: Koncentrácia antibiotík kanamycínu a G418 vhodná na selekciu transformovaných hypokotyllov a kotyledonárných petiol od netransformovaných.



Obrázok 1: Histochemická detekcia GUS aktivity v pletivách transgéennej (modré sfarbenie) a netransgéennej repky olejky odroda Westar.

Riešenie problematiky je podporované grantom z Islandu, Lichtenštajnska a Nórska prostredníctvom Finančného mechanizmu EHP a Nórskeho finančného mechanizmu SAV-FM-EHP-2008-02-01 a VEGA projektom č. 2/0011/08.

VÝSKYT, ROZŠÍRENIE A VÝZNAM HYPERPARAZITICKÝCH DRUHOV MIKROSKOPICKÝCH HÚB V AGROEKOSYSTÉME OCCURRENCE, GEOGRAPHICAL DISTRIBUTION AND IMPORTANCE OF HYPERPARASITIC MICROSCOPIC FUNGI IN AGROECOSYSTEMS

Martin PASTIRČÁK

Obligate biotrophic phytopathogenic fungi such as the rust fungi may themselves be susceptible to host colonization by other fungal species, an occurrence referred to as mycoparasitism or previously hyperparasitism. Verticillium lecanii and Sphaerellopsis filum (teleomorph Eudarlucia caricis) are documented as parasitic on a variety of different host rust genera and species. Other obligate biotrophs such as those causing powdery mildew may be parasitised by fungi such as Ampelomyces quisqualis and Phoma glomerata. Melanospora pyrenomycete isolates found in association with different form species of Fusarium were found in association with different crops in Slovakia. Parasites of rust, powdery mildew and Fusarium fungi often have been investigated as possible biological control agents.

Key words mycoparasitism, *Sphaerellopsis*, *Fusarium*, *Melanospora*, *Triticum*, *Elytrigia*, *Papaver*

Úvod

Huby patria medzi zaujímavé organizmy na svete, nielen pre ich aktívnu úlohu vo funkcii ekosystému, ale aj pre ich vplyv na človeka a s človekom súvisiacimi aktivitami. Fytopatogénne huby predstavujú druhovo bohatú skupinu pozostávajúcu z významných rastlinných patogénov, podieľajúcich sa na ochorení rastlín v poľnohospodárstve. Huby predstavujú druhovo bohatú skupinu organizmov s množstvom foriem vzajomného spolunažívania medzi hubami, rastlinami a živočíchmi, získavania a využívania energie. Špecifickou skupinou existencie je spolunažívanie medzi hubami a ich parazitizmu, nazývané hyperparazitizmus (mycoparazitizmus). Barnett, Binder (1973) klasifikovali mykoparazitizmus na dve skupiny. Nekrotrofný parazitizmus, pri ktorom parazit zabíja bunky hostiteľa pred alebo počas invázie a biotrofný parazitizmus, pri ktorom je parazit schopný získavať energiu zo živej buniek hostiteľa. Pri tomto vzťahu sa vytvárajú špecifické útvary – haustória a apresória, pomocou, ktorých parazit získava energiu z buniek hostiteľa. Medzi významných mykoparazitov, veľmi často aplikovateľných v praxi sú mykoparaziti hrdzí, múčnatiek a patogénnych druhov rodu *Fusarium*.

Medzi častý druh mykoparazitu hrdzí patrí huba *Sphaerellopsis filum*. *Sphaerellopsis filum* (Biv ex Fr.) B. Sutton (syn. *Darlucella fillum* (Biv.ex Fr.) Castagne anamorph *Eudarlucia caricis* (Fr.) O. Erikss. je kozmopolitný hyperparazit opísaný z viac ako 369 druhov hrdzí patriacich do 30 rodov. Výskyt tejto huby bol opísaný z viac ako 50 štátov (Kranz and Brandenburger, 1981). Najčastejšie je nachádzaný na urediách alebo menej na teliach a ecíách. Častejšie je pozorované anamorfné štádium, ktoré produkuje zhľukly čiernych guľatých picnid umiestnených medzi sporami uredií, kde odoberá výživné látky priamou penetráciou urediosór. Touto penetráciou dochádza k spomaleniu tvorby spór až k úplnému zastaveniu. Z tohto dôvodu je tento hyperparazit pokladaný za zaujímavý faktor vedúci k eliminácii patogéna (Yuan et al., 1998). Šebesta, Bartoš (1964) sledovali experimentálne efekt umelých inokulácií týmto mykoparazitom na elimináciu hrdzí na pšenice. Huba *Ampelomyces quisqualis* patrí medzi najviac známy mykoparazit múčnatiek. Parazit po kontakte hostiteľa prerastá cez apresorium a v bunkách hostiteľa vytvára pyknidy. V *in vitro* podmienkach rastie relatívne rýchle a produkuje niekoľko enzýmov, ktoré sa podieľajú na rozpustení stien buniek parazita. Má schopnosti kolonizovať aj teleomorfné štádium múčnatiek, kde môže prezimovať (Kiss 1997; Kiss 1998). Rod *Melanospora* predstavuje zoskupenie niekoľkých druhov rozdelených do štyroch skupín podľa tvaru askospór (Doguet, 1955; Harveson, Kimbrough, 2001b). Zástupcovia tohto rodu boli zaznamenaný na celom svete. Väčšina zástupcov tohto rodu su paraziti húb, prípadne boli izolovaný z pôdy (Cannon, Hawksworth, 1982). Huba *M. zamiae* bola izolovaná z rôznych graminikolných hostiteľov (*Triticum*, *Avena*, *Phleum*) v spojitosti s rôznymi druhmi rodu *Fusarium* (*F. oxysporum*, *F. culmorum*). Harveson, Kimbrough (2001a) študovali parazitizmus v testovaní interakcie medzi hubami z tohto rodu a hubou *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* ako parazita na viacerých hostiteľoch (watermelon, tomato, eggplant). Cieľom tohto príspevku je poukázať na špecifickú skupinu mikroskopických húb čoho príkladom je ich jedinečná životná stratégia – mykoparazitizmus. Výskyt mykoparazitických zástupcov mikroskopických húb druhovo predstavuje oveľa širšiu skupinu, pričom iba málo poznatkov o ich výskyte a možnostiach aplikácie v praxi je známych z územia Slovenska.

Materiál a metódy

Na štúdium sme použili rastlinný materiál zo pšenice, pýru a maku získaný na vybraných lokalitách Slovenska. Izoláty mikroskopických húb sme kultivovali a determinovali v *in vitro* (kultiváciou na umelých živných pôdach - SNA, PDA) a *in situ* (na odumretom rastlinnom materiály) podmienkach s využitím štandardnej svetelnej mikroskopie (JENAMED2, Carl Zeiss Jena) na základe makroskopických a

mikroskopických charakteristík s použitím manuálov v súčasnosti používaných pre identifikáciu mikroskopických húb (rod *Fusarium*: Booth, 1971; Gerlach, Nirenberg, 1982; Nelson et al., 1983).

Výsledky a diskusia

Biotrofný paraziti predstavujú skupinu rastlinných patogénov prosperujúcich na asimilujúcich častiach rastlín. Preto ich identifikácia je možná iba počas relatívne krátkeho času medzi samotným napadnutím rastlinného patogéna a úplným odumretím listu. Medzi častý druh mykoparazitu hrdzí, ktorý sme identifikovali na obilninách a trávach bola huba *Sphaerellopsis filum*. Ďalšou skupinou biotrofných parazitov, ktoré sú často napadané mykoparazitmi je skupina mikroskopických húb nazývaná múčnatky. Ide o pomerne druhovo bohatú skupinu mikroskopických húb napadajúcu význame skupiny ekonomicky významných hostiteľov. Na obilninách a trávach je charakteristickým druhom *Blumeria graminis* a na maku siatom *Erysiphe cruciferarum*, na ktorom sme zaznamenali výskyt mykoparazitickej huby *Ampelomyces quisqualis*. Rod *Fusarium* predstavuje významnú skupinu fytopatogenných húb. V podmienkach *in vitro* sme identifikovali huby rodu *Melanospora* (*M. zamia*) ktorých hyperparazitická aktivita je zameraná na vzťahy hýf parazita a hýf hyperparazita. Aktivita je charakteristická ovíjaním a zaškrcovaním mycélia. Na Slovensku sme zaznamenali výskyt tejto huby na hostiteľoch: *Zea mays* L., *Triticum aestivum* a *Papaver somniferum*. V tomto príspevku prinášame informácie o štúdiu výskytu hyperparazitických druhov mikroskopických húb na ekonomicky významných plodinách Slovenska. Počas štúdia sme zaznamenali výskyt troch druhov: *Ampelomyces quisqualis*, *Sphaerellopsis filum* a *Melanospora zamia*. Sledované druhy boli identifikované na obilninách (*Triticum aestivum*, *Zea mays*), divo rastúcich druhoch tráv (*Elytrigia repens*) a olejninách (*Papaver somniferum*).

Pod'akovanie. Táto práca bola podporená Agentúrou na podporu vedy a techniky na základe Zmluvy č.APVT-27-009904 a čiastočne Ministerstvom pôdohospodárstva SR grantom číslo 2006 UO 27/091 05 01/091 05 11.

Literatúra

- Barnett, H.L., Binder, F.L. 1973: The fungal host-parasite relationship. Ann. Rev. Phytopathol. 11: 273-292.
- Booth C., 1971: The genus *Fusarium*. Commonw. Mycological Institute, Kew, Surrey, England.
- Cannon P.F, Hawksworth D.L. 1982. A re-evaluation of *Melanospora* Corda and similar Pyrenomycetes, with a revision of the British species. Bot J Linn Soc 84:115–160.
- Douget, G. (1955) Le genre *Melanospora*, biologie, morphologie, developpement, systematique. Botaniste 39. 313 p.
- Gerlach W., Nirenberg H., 1982: The genus *Fusarium* – a pictorial atlas. Mittellungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Heft 209, Paul Parey, Berlin.
- Harveson, R.M., Kimbrough, J.W., 2001a: The identification of *Melanospora* and its allies from field isolations of *Fusarium oxysporum*. Int. J. Plant Sci. 162(2):403-410.
- Harveson, R.M, Kimbrough, J.W., 2001b: Parasitism and measurement of damage to *Fusarium oxysporum* by species of *Melanospora*, *Sphaerodes*, and *Persiciospora*. Mycologia, 93(2): 249-257.
- Kiss L. 1997. Graminicolous powdery mildew fungi as new natural hosts of *Ampelomyces* mycoparasites Can. J. Bot. 75: 680-683.
- Kiss, L. 1998: Natural occurrence of *Ampelomyces* intracellular mycoparasites in mycelia of powdery mildew fungi. New Phytologist. 140: 709-714.
- Kranz, J., Brandenburger, W., 1981: an amended host list of the rust parasite *Eudarluka caricis*. J. Pl. Dis. Prot. 88: 682-702.
- Nelson P. E., Tousson T. A. & Marasas W. F. O., 1983: *Fusarium* species. An illustrated manual for identification. Pennsylvania state University Press.
- Šebesta, J., Bartoš, P., 1964: Contribution the influence of the hyperparasitic fungus *Darluka filum* (Biv.-Bern.) Cast. upon the artificial infection with leaf rust of wheat (*Puccinia recondita* Rob. ex Desm.). Rostlinná výroba 10 (9): 869-878.
- Yuan, Z.W., Pei, M.H., Hunter, T., Royle, D.J., 1998: *Eudarluka caricis*, the teleomorph of the mycoparasite *Sphaerellopsis filum*, on blackberry rust *Phragmidium violaceum*. Mycol. Res. 102 (7): 866-868.

ŤAŽKÝMI KOVMI INDUKOVANÁ AKUMULÁCIA β -1,3-GLUKANÁZ V KOREŇOCH KUKURICE

HEAVY METAL INDUCED ACCUMULATION OF β -1,3-GLUCANASE IN ROOTS OF MAIZE

Beáta PIRŠELOVÁ – Jana LIBANTOVÁ – Jana MORAVČÍKOVÁ – Roman KUNA –
Peter BOLEČEK – Ildikó MATUŠÍKOVÁ

*Activity of β -1,3-glucanase in roots of maize (*Zea mays* cv. Quintal) treated with lead (500 mg.l⁻¹ Pb²⁺), cadmium (300 mg.l⁻¹ Cd²⁺) and arsenic (100 mg.l⁻¹ As³⁺) was studied in context of heavy metal tolerance of maize. Two days after application of heavy metals on roots of maize, significant root growth inhibition (8-87% of control) was observed but no changes in glucanase activity was detected. However specific accumulation of glucanase isoforms due to effect of heavy metal ions demonstrated that these enzymes have some additional function in the plant defence against this kind of stress.*
Key words: β -1,3-glucanase, heavy metals, plant defence

Úvod

β -1,3-glukanázy sú hydrolytické enzýmy zo skupiny PR bielkovín (pathogenesis related proteins) rozkladajúce β -1,3-glukán, významnú zložku bunkovej steny rastlín a húb. V rastlinách sa β -1,3-glukanázy indukujú v procese obrany rastliny proti patogénom, zohrávajú však úlohu aj pri mnohých fyziologických a vývinových procesoch neinfikovaných rastlín (Leubner-Metzger, 2003). Navyše sa zúčastňujú obranných procesov rastlín vyvolaných rôznymi abiotickými stimulmi (zranením, chladom, ozónom, UV žiarením, etylénom a kyselinou salicylovou). Ich syntézu v pletivách rastlín indukovala aj prítomnosť hliníka a lítia a pravdepodobne sa zúčastňujú modifikácie komponentov bunkovej steny za daných podmienok (Naranjo a kol., 2003; Chuanzao a kol., 2004). Cieľom našich analýz bolo poukázať na zmeny v aktivite β -1,3-glukanáz v koreňoch kukurice vystavených iónom ťažkých kovov a prispieť tak k objasneniu mechanizmov podieľajúcich sa na obrane rastlín voči tomuto typu stresora.

Materiál a metódy

Sterilizované semená kukurice siatej (*Zea mays* L. cv. Quintal) sme nakličovali na Petriho miskách v tme pri 25 °C. Korene klíčiacych rastlín s približne rovnakou dĺžkou (3-8 mm) sme preniesli do nových Petriho misiek a vystavili ich účinkom iónov olova (500 mg.l⁻¹ Pb²⁺), kadmia (300 mg.l⁻¹ Cd²⁺) a arzenu (100 mg.l⁻¹ As³⁺). Kontrolnú vzorku tvorili korene nakličované v destilovanej vode. Korene boli inkubované v roztokoch kovov 48 hodín v podmienkach uvedených pre nakličovanie semien. Toxický účinok kovov na korene kukurice sme detekovali meraním čerstvej hmotnosti koreňov. Následne sme z koreňov izolovali hrubý bielkovinový extrakt, zmerali koncentráciu proteínov a v extrakte sme merali aktivitu β -1,3-glukanáz fluorimetricky využitím substrátu laminarinu (Siefert a kol., 1997).

Na ďalšiu analýzu bielkovín boli použité elektroseparačné metódy ako vertikálna SDS-PAGE. Po delení bielkovín na SDS-PAGE boli gély povarené v alkalickom roztoku trifenylnetrázolium chloridu (TTC) za účelom detekcie celkových izoformiem β -1,3-glukanáz. Kyslé a neutrálne izoformy glukanáz boli detegované na géloch bez pridania SDS. Intenzity bandov na polyakrylamidových géloch boli vyhodnotené pomocou softvéru ScionImage (Scion Corporation, USA) z troch opakovaní experimentu. Údaje boli štatisticky vyhodnotené Studentovým t-testom v programe Excel.

Výsledky a diskusia

Toxický vplyv iónov ťažkých kovov sme testovali po 48 hodinách inkubácie koreňov v roztokoch kovov. Uvedené dávky kovov, najmä kadmia a arzenu sa ukázali ako vysoko toxické a spôsobili výrazné zníženie biomasy koreňov (Obr. 1A). Napriek vysokej toxicite týchto kovov sme v koreňoch kontrolných a stresovaných rastlín nezaznamenali štatisticky významné zmeny v celkovej aktivite β -1,3 glukanáz. Po separácii získaných bielkovín pomocou PAGE a následnej detekcii glukanáz sme však zaznamenali zmeny v akumulácii jednotlivých izoformiem. Celkove sme detekovali tri izoformy s molekulovými hmotnosťami 75, 35 a 32 kDa (Tab. 1, Obr. 2). Kým v prípade izoformy s molekulovou hmotnosťou 75 kDa došlo ku zvýšenej akumulácii oproti kontrole vplyvom iónov olova (139%), vplyvom iónov Cd²⁺ a As³⁺ došlo ku zníženej akumulácii tejto izoformy (93% a 82%). Na druhej strane izoformy s molekulovou hmotnosťou 35 a 32 kDa sa akumulovali iba vplyvom iónov kadmia a arzenu (Obr.2, Tab.1).

Gélový profil detekovaných kyslých a neutrálnych izoformiem zodpovedal profilu izoformiem celkových glukanáz (SDS PAGE), čo naznačuje, že vplyvom ťažkých kovov sa zrejme aktivujú práve kyslé a neutrálne izoformy týchto enzýmov.

Zvýšená akumulácia glukánáz bola pozorovaná aj v pletivách bôbu (Awade et al., 1991), kukurice (Didierjean et al., 1996) a sóje (Youn and Hwang, 1996) vplyvom iónov Hg^{2+} . Park et al (1992) však vplyvom týchto iónov v pletivách sóje pozoroval zníženie celkovej aktivity (4,5% kontroly) enzýmu. Celková aktivita enzýmu však nemusí zodpovedať zmenám v akumulácii jednotlivých izoformiem β -1,3-glukanáz, ako sa ukázalo aj v našich experimentoch. Celková aktivita enzýmu sa v našom prípade nemenila, avšak v akumulácii jednotlivých izoformiem sme zaznamenali určitú variabilitu v závislosti od sledovanej izoformy aj iónu kovu.

Záver

Korene kukurice citlivo reagovali na zvýšenú koncentráciu iónov olova, kadmia a arzenu, čo sa prejavilo znížením biomasy koreňov. Najcitlivejšie reagovali korene kukurice na ióny kadmia a arzenu. Kým vplyvom testovaných dávok kovov nedošlo ku zmenám v celkovej aktivite β -1,3-glukanáz, po separácii bielkovín pomocou PAGE sme zaznamenali určitú kompenzáciu v akumulácii jednotlivých izoformiem v závislosti od testovaného iónu kovu. Úloha týchto enzýmov v podmienkach so zvýšenou záťažou ťažkými kovmi nie je objasnená, avšak doterajšie experimenty naznačujú, že by mohli v obranných procesoch rastlín zohrávať oveľa špecifickejšiu úlohu ako sa doteraz predpokladalo.

Pod'akovanie: Práca bola vypracovaná v rámci riešenia projektov APVV LPP-0125-07 a COST FA0605.

Literatúra

- Awade, A., Metzboutigue, M.H., Leret, M., Genot, G., Amiri, I. and Burkard, G. (1991) The Complete Amino Acid Sequence of the Pathogenesis-Related (PR2) Protein Induced in Chemically Stressed Bean Leaves. *Biochimica et Biophysica Acta* 1077(2), 241-244.
- Didierjean, L.- Frendo, P. - Nasser, W. - Genot, G. - Marivet, J. - Burkard, G.(1996): Heavy-metal-responsive genes in maize: identification and comparison of their expression upon various forms of abiotic stress. In: *Planta*, 199, 1996, p.1-8.
- Chuanzao, M. - Keke, Y. - Ling, Y. - Bingsong, Z. - Yunrong, W. - Feiyan, L. - Ping, W.: Identification of aluminium-regulated genes by cDNA-AFLP in rice (*Oryza sativa* L.): aluminium-regulated genes for the metabolism of cell wall componets. In: *Journal of Experimental Botany*, 55, 2004, p. 1-7
- Leubner-Metzger, G. 2003. Functions and regulation of β -1,3-glucanases during seed germination, dormancy release and after-ripening. In: *Seed Science Research*, 13, 2003, 17-34.
- Naranjo, M.A. - Romero, C. - Belles, J.M. - Montesinos, C. - Vicente, O. - Serrano, R.: Lithium treatment induces a hypersensitive-like response in tobacco. In: *Planta*, 217, 2003, p. 417-424
- Ro-Dong Park, Kap-Soon Kim and Moo-Je Cho Purification and Characterization of thylene-induced β -1,3-Glucanase from Soybean [*Glycine max* (L.)] Leaves *Korean Biochem. J.*(1992), Vol.25, No. 7 pp. 597-603
- Siefert, F. - Grossmann, K. 1997. Induction of chitinase and β -1,3-glucanase activity in sunflower suspension cells in response to an elicitor from *Phytophthora megasperma* f. ap. *Glycinea*. In: *Journal of Experimental Botany*, 48, 1997, 2023-2029.
- Youn YI, S.-Kook Hwang, B. (1996): Differential induction and accumulation of β -1,3-glucanase and chitinase isoforms in soybean hypocotyls and leaves after compatible and incompatible infection with *Phytophthora megasperma* sp. *glycinea*. In: *Physiological and Molecular Plant pathology*, 48, 1996, p. 179-192

BIOLOGICKY AKTÍVNE LÁTKY V *IN VITRO* KULTÚRACH CHMEĽU OBYČAJNÉHO (*HUMULUS LUPULUS* L.) BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES IN *IN VITRO* CULTURES OF HOP (*HUMULUS LUPULUS* L.)

Ivana PŠENÁKOVÁ¹ – Juraj FARAGÓ^{1,2} – Jaroslava CHOVANÍKOVÁ¹ – Filip
KLUČIAROVSKÝ¹

In our study we determined the contents of biologically active compounds (polyphenols, flavonoids and xanthohumol) in callus and cell suspension cultures of hops (Humulus lupulus L.). Internodal and leaf blade explants of the genotype K-72/6/13 were cultured on two types of culture media containing either 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) or α-naphthylacetic acid (NAA) as an auxin in combination with a cytokinin 6-benzylaminopurine (BAP) and in two types of culture conditions, continuous darkness or 16h light/8 h dark photoperiod, respectively. In both types of cultures, the highest concentrations of bioactive compounds were determined in cultures maintained in photoperiod and cultured on media containing NAA. Higher levels of polyphenols and flavonoids, however, were obtained in calli derived from leaf blade explants, and in cell suspensions derived from internodal explants, respectively.

Key words: Humulus lupulus L., in vitro culture, flavonoids, polyphenols

Úvod

V poslednom období sa významne mení pohľad na tradičnú pivovarnícku plodinu chmeľ obyčajný (*Humulus lupulus* L.). Dôvodom zvýšeného záujmu o túto rastlinu sú objavené zlúčeniny so širokým spektrom biologických účinkov v jeho šišťiciach. Takýmito látkami sú flavonoidy a polyfenoly chalkónovej rady, z nich najmä prenylovaný flavonoid xanthohumol (MILLIGAN a kol., 1999; MIZOBUCHI a SATO, 1984; STEVENS a kol., 2000; STEVENS a PAGE, 2004; ZUURBIER a kol., 1998). Mnohí autori poukazujú na netradičný potenciál tejto plodiny (STEVENS a PAGE, 2004; FARAGÓ a kol., 2004). Bola zistená široká škála biologických účinkov, napr. antioxidačné, antiproliferatívne, antikancerogénne, estrogénne, antimikrobiálne a antivírusové (BAGCHI a kol., 2000; BUCKWOLD a kol., 2004; LIU a kol., 2007; STEVENS a kol., 2002; STEVENS a PAGE, 2004). Biologicky aktívne látky je možné popri klasickej izolácii z materskej rastliny získavať aj alternatívnymi spôsobmi s využitím rastlinných bunkových kultúr. V mnohých prípadoch *in vitro* kultúra v dôsledku vhodnej elicitácie alebo pridávania prekurzorov umožňuje oveľa vyššie výťažky, aké sa dosahujú pri pestovaní celistvých rastlín (COLLIN, 2001).

Materiál a metódy

Hlavným zdrojom pre experimenty boli v *in vitro* podmienkach uchovávané výhonky chmeľu obyčajného (*H. lupulus* L.) genotypu K-72/6/13. Genotyp K-72/6/13 je bezvírusový meriklon odvodený použitím meristémovej kultúry z odrody chmeľu 'Osvaldov klon 72' (FARAGÓ, 2000). Na založenie kalusovej kultúry boli použité dva druhy explantátov: odrezky z listových čepelí (LS) a stonkové segmenty (StS). Explantáty boli nasádzané na indukčné MS (MURASHIGE a SKOOG, 1962) živné média (B2D2: MS + 2,0 mg.l⁻¹ BAP + 2,0 mg.l⁻¹ 2,4-D a B2N2: MS + 2,0 mg.l⁻¹ BAP + 2,0 mg.l⁻¹ NAA) a inkubované v dvoch kultivačných podmienkach: v kontinuálnej tme pri teplote 27±1°C, alebo v podmienkach fotoperiody 16 h svetlo/ 8 h tma pri teplote 25±1 °C (svetlo)/20±1 °C (tma). Na založenie bunkovej suspenznej kultúry sa použili kalusy indukované z oboch druhov explantátov (LS, StS) a kultivované v tekutom MS živnom médiu (B1D1: MS + 1,0 mg.l⁻¹ BAP + 1,0 mg.l⁻¹ 2,4-D a B1N1: MS + 1,0 mg.l⁻¹ BAP + 1,0 mg.l⁻¹ NAA). Obsah celkových polyfenolov sa stanovoval spektrofotometricky podľa metódy SINGLETONA a ROSSIHO (1965) pri 765nm. Na stanovenie obsahu flavonoidov sa použila spektrofotometrická metóda podľa RAKOTOARISONA a kol. (1997) pri 394nm. Obsah xanthohumolu bol kvalitatívne aj kvantitatívne stanovený HPLC metódou.

Výsledky a diskusia

V práci venovanej biologicky aktívnym látkam v *in vitro* kultúrach chmeľu obyčajného bol sledovaný vplyv rastových regulátorov (BAP+2,4-D alebo BAP+NAA), kultivačných podmienok (kontinuálna tma vs. fotoperiód 16 h svetlo/8 h tma), druhu explantátu (stonkové segmenty vs. listové segmenty) na produkciu celkových polyfenolov, flavonoidov a xanthohumolu. Z našich výsledkov vyplývajú nasledovné závery:

- V prípade oboch živných médií MS obsahujúcich 2,0 mg.l⁻¹ BAP v kombinácii s 2,0 mg mg.l⁻¹ 2,4-D (B2D2) alebo 2,0 mg.l⁻¹ BAP v kombinácii s 2,0 mg.l⁻¹ NAA (B2N2) bol najvyšší obsah polyfenolových látok a flavonoidov stanovený vo vzorkách kalusovej kultúry odvodenej z listových segmentov (LS), kultivovaných v podmienkach fotoperiody. Namerané hodnoty boli najvyššie v 45. dni kultivácie. Pre médium B2D2 boli stanovené obsahy celkových polyfenolov 2,56 μmol.mg⁻¹ čerstvej hmotnosti vyjadrené ako ekvivalent kyseliny galovej (GAE) a flavonoidov 2,63 μmol.mg⁻¹ čerstvej hmotnosti

vyjadrené ako ekvivalent kvercetínu a pre médium B2N2 boli obsah celkových polyfenolov 2,46 $\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}$ čerstvej hmotnosti a flavonoidov 4,88 $\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}$ čerstvej hmotnosti).

- Porovnaním koncentrácií flavonoidov v kalusovej kultúre chmeľu obyčajného kultivovanej na médiu B2D2 a B2N2, je viditeľne vyššia produkcia na médiu s prídavkom rastového regulátoru NAA, obsah celkových polyfenolov v kalusoch pestovaných na oboch médiách sa výrazne nelíšil.
- Najvyšší obsah celkových polyfenolových látok a flavonoidov v bunkovej suspenznej kultúre bol stanovený v tekutom živnom médiu MS obsahujúcom 1,0 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ BAP v kombinácii s 1,0 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ NAA (B1N1) vo vzorke odvodenej zo stonkových segmentov (StS) a kultivovanej v podmienkach fotoperiody. Obsah celkových polyfenolov bol 2,41 $\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}$ odparku vyjadrený ako ekvivalent GAE a obsah flavonoidov 3,38 $\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}$ odparku vyjadrený ako ekvivalent kvercetínu.
- Najvyšší obsah xantohumulu bol stanovený vo vzorke bunkovej suspenznej kultúry odvodenej zo stonkových segmentov (StS) kultivovanej v podmienkach fotoperiody 16 h svetlo/8 h v tekutom živnom médiu MS obsahujúcom 1,0 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ BAP v kombinácii s 1,0 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ NAA na 20. deň kultivácie (3,359 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$).

Záver

Rastlinné pletivové a bunkové kultúry predstavujú ideálny modelový systém pre štúdium biosyntetických procesov v rastlinách a slúžia tiež, ako potenciálny obnoviteľný zdroj pre produkciu fytomedicínsky významných zlúčenín.

Literatúra

- BAGCHI, D. - BAGCHI, M. - STOHS, S. J. - DAS, D. K. - RAY, S. D. - KUSZYNSKI, C. A. - JOSHI, S. S. - PRUESS, H. G.: Toxicology, 148, 2000, s. 187-197.
- BUCKWOLD, V. E. - WILSON, R. J. H. - NALCA, A. - BEER, B. B. - VOSS, T. G. - TURPIN, J. A. - BUCKHEIT III, R. W. - WEI, J. - WENZEL - MATHERS, M. - WALTON, E. M. - SMITH, R. J. - PALLANSCH, M. - WARD, P. - WELLS, J. - CHUVALA, L. - SLOANE, S. - PAULMAN, R. - RUSSEL, J. - HARTMAN, T. - PTAK, R.: Antivir. Res., 61, 2004, s. 57-62.
- COLLIN, H.: Plant Growth Reg., 34, 2001, s. 119-134.
- FARAGÓ, J.: Záv. spr. ÚČ MP SR, depon. VÚRV Piešťany, 2000, 9 s.
- FARAGÓ, J. - ŠRAMKOVÁ, Z. - PŠENÁKOVÁ, I. - FARAGOVÁ, N.: Nové poznatky z genetiky a šľachtenia poľnohospodárskych rastlín, zb. 11. odborného seminára, 2004, s. 62- 65. ISBN 80-88790-34-4
- MILLIGAN, S.R. - KALITA, J.C. - HEYERICK, A. - RONG, L. - DE COOMAN, L. - DE KEUKELEIRE, D.: J. Clin. Endocrinol. Met., 83, 1999, s. 2249-2252.
- MIZOBUCHI, S. - SATO, Y.: Agric. Biol. Chem., 48, 1984, s. 2771-2775.
- MURASHIGE, T. - SKOOG, F.: Physiol. Plant., 15, 1962, s. 473-497.
- LIU, Y. - GU, X.H. - TANG, J.: J. Am. Soc. Brew. Chem., 65, 2007, s. 116-121.
- RAKOTOARISON, D.A. - GREISSER, B. - TROTIN, F. - BRUNET, C. - DINE, T. - LUYCKX, M. - VASSEUR, J. - CAZIN, M. - CAZIN, J.C. - PINKAS, M.: Pharmazie, 52, 1997, s. 60-64.
- SINGLETON, V.L. - ROSSI, J.A.: Am. J. Enol. Vitic. 16, 1965, s. 144-158.
- STEVENS, J.F. - TAYLOR, A.W. - NICKERSON, G.B. - IVANCIC, M. - HENNING, J. - HAUNOLD, A. - DEINZER, M.L.: Phytochemistry, 53, 2000, s. 759-775.
- STEVENS, J.F. - MIRANDA, C. L. - WOLTERS, K. R. - SCHIMERLIK, M. - DEINZER, M. L. - BUHLER, D. R.: J. Agric. Food. Chem., 50, 2002, s. 3435-3443.
- STEVENS, J.F. - PAGE, J.F.: Phytochemistry, 65, 2004, s. 1317- 1330.
- ZUURBIER, K.W.M., FUNG, S.-Y., SCHEFFER, J.J.C., VERPOORTE, R.: Phytochemistry, 49, 1998, s. 2315-2322.

DEOXYNIVALENOL V ZRNÁCH PŠENICE PESTOVANEJ V RÔZNYCH LOKALITÁCH SLOVENSKA

DEOXYNIVALENOL IN KERNELS OF WHEAT PLANTED IN DIFFERENT LOCATIONS OF SLOVAKIA

Svetlana ŠLIKOVÁ – Valéria ŠUDYOVÁ

The contamination level of kernel wheat samples by Fusarium mycotoxin deoxynivalenol in years 2004-2008 was investigated. DON content was analysed in 163 wheat samples which were collected from 8 locations of Slovakia. The highest mean DON content was found in 2006 year and the lowest in 2005. The limit specified by the EU 1.25 mg.kg⁻¹ DON content exceeded 11% of the samples from all analysed samples. The results show the content of Fusarium mycotoxin DON in wheat grown in Slovakia during 5 years.

Key words: winter wheat, deoxynivalenol (DON), year

Úvod

Deoxynivalenol je mykotoxín produkovaný hubami z rodu *Fusarium*, ktoré napádajú klasy obilnín počas vegetácie. Huby po napadnutí klasov produkujú rôzne typy mykotoxínov, ale výskumy odhalili, že najfrekvencovanejším je deoxynivalenol (DON alebo vomitoxín) patriaci medzi trichotecény. Trichotecény inhibujú v eukaryotických bunkách proteosyntézu (McLaughlin a kol. 1977). Pozorované boli biochemické účinky trichotecénov v bunke, ktoré môžu zapríčiniť zmeny metabolickej aktivity a regulácie (Betina 1990). Mykotoxín DON pôsobí toxicky na človeka, zvieratá a rastliny. Pokusy na zvieratách poukazujú na toxické účinky mykotoxínu, napr. už dávka 2 mg kg⁻¹ DON v krmive prasiat zapríčini nechutenstvo a nízky prírastok váhy (Rotter a kol. 1996). Podobné účinky má DON i na ďalšie druhy zvierat (Čonková a kol. 2002). Príznaky otravy spôsobené vysokým príjmom mykotoxínov u zvierat sa nelíšia od príznakov, ktoré sa prejavujú na ľuďoch. Doteraz bolo urobených málo štúdií o vplyve DON na ľudské bunky ale práca Königs a kol. (2008) dokazuje jeho cytotoxický efekt na ľudské bunky pečene. Pre všeobecnú toxicitu DONu Vedecký výbor pre potraviny v roku 2005 stanovil tolerovateľný denný príjem (TDP) vo výške 1 µg/kg telesnej hmotnosti/deň pre deoxynivalenol (DON). V roku 2006 Európska komisia stanovila maximálnu hranicu pre obsah DON v nespracovaných obilninách (1.25 mg kg⁻¹). Nariadenie komisie (ES) č. 1881/2006 z 19. decembra 2006, stanovuje maximálne hodnoty i pre ďalšie mykotoxíny: suma aflatoxínov B1 B2 G1 G2, ochratoxín A, zearalenon, T-2 toxín, HT-2 toxín.

Výskyt napadnutých klasov a ich intenzita napadnutia fuzáriami je závislá od priebehu počasia cez vegetáciu, predplodiny a spôsobu spracovania pôdy. Rozvoj infekcie nastáva pri kombinácii vlhkého a teplého počasia. Intenzívne slnečné žiarenie spomaľuje priebeh infekcie. Stupeň napadnutia má tiež odrodové súvislosti. Intenzívnejšie sú napádané odrody s krátkym stebлом a väčšie poškodenie spôsobujú na porastoch ošetrovaných rastovým regulátorom. Vyššiu náchylnosť možno pozorovať v hustejších porastoch, viac zásobených dusíkom. Cieľom práce bolo monitorovať výskyt DON v pšeničných vzorkách v pestovateľských oblastiach Slovenska počas piatich rokov.

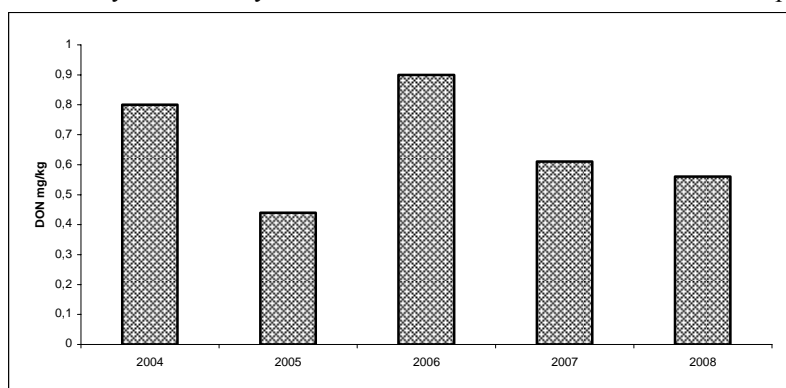
Materiál a metódy

V rokoch 2004 až 2008 boli z 8 pestovateľských lokalít Slovenska: Abrahám, Želiezovce, Veľký Meder, Beluša, V. Ripňany, Haniska, Turčiansky Ďur, Vranov nad/Topľou, Malý Šariš, Spišské Vlachy získané zrnové vzorky pšenice ozimnej v množstve 1 kg. Celkovo 163 vzoriek bolo analyzovaných na obsah mykotoxínu DON pomocou komerčného kitu Ridascreen Fast DON imunochemickou metódou ELISA. Hodnota enzymatickej aktivity bola meraná spektrofotometricky.

Výsledky a diskusia

Pomocou ELISA testu boli analyzované zrnové vzorky z pšenice na obsah mykotoxínu DON. Analýzou 163 vzoriek zozbieraných z rôznych lokalít Slovenska od pestovateľov pšenice počas piatich rokov bolo zistené, že priemerná kumulácia DON v zrnách je 0,65 mg.kg⁻¹. Najvyššia priemerná kumulácia DON vo vzorkách bola v roku 2006 a najnižšia v roku 2005 (Tab. 1). Priemerná kumulácia DON v roku 2004 bola vyššia o 23% a v roku 2006 o 38,5% ako celková priemerná kumulácia DON. V ostatných rokoch bola nižšia kumulácia DON vo vzorkách ako celková priemerná kumulácia o 32,3% (2005 rok), 6,2% (rok 2007) a v roku 2008 o 13,8%. Počas sledovaných rokov bola v 2 vzorkách zistená mimoriadne vysoká kumulácia DON (7,2 mg.kg⁻¹ a 8,7 mg.kg⁻¹) v lokalite Turčiansky Ďur. Vzorka pšenice s nadlimitnou kumuláciou DON (1,25 mg.kg⁻¹) počas sledovaných rokov nebola zistená v lokalitách Abrahám a Haniska. Kumuláciu mykotoxínu DON spôsobujú hlavne druhy *Fusarium graminearum*, ktorej vyhovuje teplota okolo 25°C a *F. culmorum*, ktoré rastie najintenzívnejšie pri teplote 21°C. Podľa Schaafsma a Hookera (2007) poveternostné podmienky ovplyvňujú výskyt mykotoxínu DON v zrnách pšenice na 48%, pestovaná odroda 27%

a pestovateľské podmienky okolo 14%-28%. Ďalej bolo zistené, že 4 až 7 pred kvitnutím a 3-10 dní po kvitnutí sú obdobia, ktoré najvýznamnejšie súvisia s kontamináciou DON vzoriek. Na základe analýzy výskytu DON vo vzorkách pšenice, ktoré boli získané priamo po zbere od pestovateľov v rokoch 2004-2007 v Srbsku bola zistená rozdielna kumulácia DON v rokoch. V roku 2004 zistili pomerne vysokú priemernú kumuláciu DON vo vzorkách $1,23 \text{ mg.kg}^{-1}$ pričom v rokoch 2005-2007 iba $0,19 \text{ mg.kg}^{-1}$ (Jajič a kol., 2008). Podobné vysoké rozdiely v kumulácii DON medzi ročníkmi boli zistené po analýze našich vzoriek.



Záver

Monitoring výskytu DON v pestovateľských oblastiach Slovenska v priebehu piatich rokov odhalil rozdiely v kumulácii DON v rokoch i lokalitách. V niektorých lokalitách kumulácia DON nepresiahla maximálnu hranicu povolenej kumulácie DON ($1,25 \text{ mg.kg}^{-1}$) v nespracovanom obilí počas sledovaných rokov (2004-2008). Na druhej strane sa ukázalo, že sú lokality, v ktorých sa pomerne pravidelne môžu vyskytovať vzorky pšenice s vysokou kumuláciou mykotoxínu DON. V takýchto lokalitách, kde sú vhodné podmienky pre rozvoj fuzárií je dôležité venovať zvýšenú pozornosť správnej organizácii porastu a dodržiavanie základných agrotechnických postupov – včasné zaoranie pozberových zvyškov, ktoré sú často zdrojom primárnej infekcie a podľa možnosti sa vyhnúť sejbe pšenice po kukurici a pšenici. Platí tiež zásada – čím dlhšie je porast na koreni na poli, tým je väčší predpoklad šírenia fuzárií a kumulácie toxínov v zrne. Na základe viacerých pokusov bolo zistené, že ďalším faktorom, ktorý môže významne ovplyvniť napadnutie klasov fuzáriami je odroda. Kombinácia výberu vhodnej odrody a fungicídneho prípravku významne ovplyvňuje výskyt fuzarióz v poraste a mykotoxínu.

Pod'akovanie: Práca vznikla za podpory APVV v rámci projektu: „VMSP-P-0055-09“.

Literatúra

- Betina, V.: Mykotoxíny chémia, biológia, ekológia. Bratislava: Vydavateľstvo Alfa, 1990. ISBN 80-05-00631-4.
- Čonková, E., Laciaková, A., Kováč, G., Seidel, H.: Review: Fusarial toxins and their role in animal diseases. The veterinary Journal 165, 2003, 214-220.
- Jajič, I., Jurič, V., Glamočič, D., Abramovič, B.: Occurrence of Deoxynivalenol in Maize and Wheat in Serbia. Int. J. Mol. Sci. 9, 11, 2008, 2114-2126.
- Königs M.; Schwerdt G.; Gekle M.; Humpf H.U.: Effects of the mycotoxin deoxynivalenol on human primary hepatocytes. Molecular nutrition & food research 2008; 52,7, 830-9.
- McLaughlin, C.S., Vaughan, M.H. Campbell, I.M., Wei, C.M., Stafford, M. E., Hansen, B.S.: Inhibition of protein synthesis by trichothecenes. In Mycotoxins in Human and Animal Health. J. V. Rodricks, C. M. Hesseltine, and M. A. Mehlman, ed. Pathotox, 1977, Park Forest South, IL, 263-273.
- Rotter, B.A. Prelusky, D.B. Pestka, J.J.: Toxicology of deoxynivalenol (vomitoxin). Journal of toxicology and environmental. Health 1996, 48, 1-31.
- Schaafsma, A.W., Hooker, D.C.: Climatic models to predict occurrence of Fusarium toxins in wheat and maize. International Journal of Food Microbiology, 119, 1-2, 20, 2007, 116-125.

ŠLECHTĚNÍ DOSEN (CANNA L.) A HISTORICKÉ SORTIMENTY (REVIEW) THE HISTORICAL ASSORTMENTS AND CANNA LILIES BREEDING

Jiří UHER – Běla SVITÁČKOVÁ

The first cannas of Canna indica-complex were introduced in the pre-linnaean age, the other (C. coccinea Mill., C. latifolia Mill., C. lutea Mill. a C. warszewiczii A.Dietr.) followed in the 1768, and 1821. The other taxa for the garden hybrids breeding were introduced in the 1788 (C. flaccida Salisb.), 1789 (C. glauca L.), and 1816 (C. iridiflora Ruiz & Pav.). The first hybrids appeared in the 1848, and these were thoroughbred in the Lobeliaeflora, Amaryllidiflora (1863), Gladioliflora (1868), and Orchidiflora (1892) Canna group.

Keywords: Canna lilies, Canna, introduction, breeding

Introdukce původních druhů

První zmínky o introdukcí dosen z antilských ostrovů lze vystopovat v Gerardově The Herbal z roku 1597: šlo o po celých amerických tropech rozšířenou "Arundo seu Canna indica", docházející v té době nebývalé obliby v italských zahradách. Snad šlo skutečně o pozdější *Canna indica* L. - zdají se tomu nasvědčovat jen o málo pozdější zmínky žlutokvětých a červenokvětých variant - exaktnější determinaci však komplikuje skutečnost, že podobné *C. coccinea* Mill. a *C. latifolia* Mill. rozlišoval teprve Philip Miller, vrchní zahradník v Chelsea Garden, v proslulém The Gardener's Dictionary (1768). Zmiňované taxony byly ostatně ještě dlouho poté zaměňovány (Aitonem roku 1810 z anglických zahrad zmiňovaná *Canna coccinea* je právě *C. indica* L.) a současně byly popisovány další drobnokvěté taxony, považované dnes jen za vnitrodruhové varianty *C. indica* L. Mnohé z těchto - z anglických zahrad už roku 1768 opět Millerem zmiňovaná *Canna lutea* Mill. a s ní nejspíš identické, o šedesát let později popisované *C. crocea* Reichenb. a *C. aurantiaca* Roscoe, především ale z Kostariky introdukovaná *C. warszewiczii* A.Dietr. (popsaná 1849, v anglických zahradách však pěstovaná snad už od roku 1821) - posloužily v půli devatenáctého století k prvním hybridizacím.

K tomuto komplexu patří dle holandských autorů (Maas-van de Kamer & Maas, 2000) také dnes po celých tropech pro škrobnaté oddenky pěstované *C. edulis* Ker.-Gawl. (v anglických zahradách od roku 1820) a *C. discolor* Lindl. - recentně zjišťovaná molekulární data (Prince & Kress, 2001) poskytují jejich závěrům značnou podporu. Nicméně, poslední monograf rodu Nobuyuki Tanaka (2001) považuje první z obou taxonů za pochybný, druhý za platný druh, blízký výše zmiňované *C. coccinea* Mill. Také mokřadní *Canna glauca* L. (Tanaka, 2001, ji shledává sesterskou mimořádně vzrůstné *C. latifolia* Mill. a také Prince a Kress, 2001, ji posouvají do těsné blízkosti *C. indica* L.), později proslulá jako jeden z nejčastěji využívaných taxonů ve šlechtění, byla Aitonem zmiňována z anglických zahrad od roku 1789 a zakrátko zplaněla v tropech po celé Asii (*C. siamensis* Kränzl.).

Horaninow (1963) zaznamenává již rovných sto druhů (Regelem však brzy redukovaných na pětadvacet), rozdělovaných tehdy ještě do rodů *Distemon*, *Canna*, *Eurystylus* a *Achirida* - Baker později redukuje všechny na podrody rodu *Canna* a počet druhů, rozšířený mezitím opět Benthamem a Hookerem, redukuje opět na 23. Z jeho podrodů akceptoval později Kränzlin (1912) pouze *Distemon*, z něhož lze ve sbírkách spatřit jen ojedinele od roku 1798 známou peruánskou *C. paniculata* Ruiz & Pav. - právě s touto (nikoli s *C. edulis* Ker.-Gawl. nebo *C. discolor* Lindl.), bývá dnes spojována *C. achiras* Gill. nebo v indexech botanických zahrad občas nabízená *C. lanuginosa* Roscoe.

Ostatní tři Bakerovy podrody spojil Kränzlin v podrodu *Eucanna* a počet druhů opět rozšířil na padesát devět. Recentně přidávají Koyama & Tanaka (2000) čtyři nové druhy a bez dalších dvou nejnověji popsáných (Ciciarelli, 2007) byl počet druhů rodu redukován na devatenáct (Tanaka, 2001), molekulární data (Prince & Kress, 2001) nicméně naznačují, že i toto číslo je nadhodnoceno. Ale právě tyto taxony se ukázaly být mnohem významnějšími v pozdějších hybridizacích: vedle výše zmiňovaného *C. indica*-komplexu (podrod *Canna* v původním Bakerově pojetí) především mokřadní *Canna flaccida* Salisb. s velkými světlivě žlutými květy (někdejší podrod *Eurystylus*, ze severoamerického jihovýchodu přivezena do anglických zahrad roku 1788), z někdejšího podrodu *Achirida* pak růžově purpurová *C. iridiflora* Ruiz & Pav., Lambertem uvedená roku 1816 (k témuž podrodu náležela též Planchonem roku 1854 uvedená *C. liliiflora* Warsz., nebývalé vzrůstný druh se smetanově bílými, vonnými a v celém rodu vůbec největšími květy).

První kříženci dosen a vznik historických sortimentů

Byl to Theodor Année, francouzský konzul ve Valparaíso, který při návratu do severofrancouzské Passy reintrodukoval *C. glauca* L. a *C. warszewiczii* A.Dietr., vzájemně je zkřížil a roku 1848 uvedl na trh první hybrid, popsáný později jako *Canna annaei* André a vysazovaný už k roku 1860 v pařížských ulicích v počtu dvaceti tisíc rostlin. Byly to listem ozdobné dosny s květy jen nepatrně většími než u planých druhů *C. indica*-komplexu - přesto jsou pěstovány dosud a ještě roku 2002 byly oceněny prestižní Award of Garden Merit. Také pozdější křížení vycházela vesměs ještě z taxonů *C. indica*-komplexu, jakými byly *C. warszewiczii*

A.Dietr., *C. coccinea* Mill., *C. lutea* Mill. nebo *C. limbata* Roscoe, a dávala vzniknout drobnokvětým "lobelkokvětým" hybridům (Sprenger, 1895).

Teprve M. Lombard a C. Huber křížili *C. warszewiczii* A.Dietr. také s *C. iridiflora* Ruiz & Pav. za vzniku "amaryllkokvěté" *Canna ehemannii* Hort.Gard. Chron. (rovněž Award of Garden Merit z roku 2002!), velikostí květů také ještě příliš nevynikající, křížené však znovu a znovu s *C. iridiflora* Ruiz & Pav. za vzniku robustních a poměrně již velkokvětých *C. bihorelii* Rév.Hort., *C. guttermannii* Rév.Hort., *C. nouttonii* Rév.Hort. nebo *C. bruantii* Hort.Bruant. Z dalšího prokřížování takových hybridů povstaly konečně "gladiolokvěté" dosny (Sprenger, 1895), jejichž velké květy vzdáleně připomínají květy mečíků; ke vzniku mnohých opět přispěla i mokřadní *Canna glauca* L. První byly uvedeny už roku 1868 (Khoshoo & Mukherjee, 1970) a dnes jsou mimořádně různorodou, odrůdově bohatou skupinou - orientaci v několika stovkách kultivarů ztěžuje ovšem skutečnost, že mnohé jsou vzájemně zaměňovány a nadto v různých školkách nabízeny pod různými jmény. Desítky takových hybridů vyšlechtil v posledních desetiletích předminulého století legendární lyonský pěstitel P.M. Crozy, následovaný A.Vilmorin-Andrieuxem. Řada jejich odrůd dodnes patří k nejpěstovanějším: šarlatové 'Centenaire de Rozain-Bourcharlat' ('Melanie'), 'Président Carnot', 'Roi Soleil' (AGM 2002!) a proslulá 'Hercule' (rozšiřovaná též jako 'Assault', 'Vainqueur', 'Lafayette'), oranžově kvetoucí 'Liberté' (známější dnes pod jménem 'Wyoming', AGM 2002), 'Rosamond Coles' s plátky žlutě lemovanými (často zaměňovaná s útlejšími 'Lucifer' nebo 'Königin Charlotte'), robustní růžová 'Louis Cayeux' (AGM 2002) anebo žlutokvěté, červenými skvrnkami zdobené 'Aimée Guillaud', 'En Avant', 'Oiseau d'Or'. A v neposlední řadě 'Florence Vaughan', chybně někdy spojovaná se záhadnou 'Mme.Crozy', vybranou neapolským pěstitелеm Sprengerem k dalším křížením s floridskou *Canna flaccida* Salisb. Tak vznikly "orchideokvěté" (nevhodně - pro existenci *C. iridiflora* Ruiz.& Pav.! - označované také jako "kosatcokvěté") dosny - první snad roku 1892 (Waugh, 1897) - s květními staminodii zvláště velkými a působivě zvláňými.

Osobitou skupinou jsou prvně roku 1884 zmiňované "strelitziokvěté" vodní dosny, povstale z křížení *C. glauca* L. s *C. flaccida* Salisb. - z těchto patří dnes k nejproslulejším žlutokvětá 'Ra' a růžová 'Erebus', dosáhnoucí před šesti lety rovněž na Award of Garden Merit. Krátce po přihlášení prvních orchideokvětých a vodních dosen publikuje Sprenger (1895) první víceúrovňovou klasifikaci dosen, exaktnější hodnocení (byť jen v několika málo sledovaných znacích) byla však prováděna až v režii RHS Wisley v letech 1908, 1916 a 2002.

Desítky nových odrůd vyšlechtili také čeští pěstitelé. Odrůdy z dob největší slávy lyonského pěstitele Crozyho, představené říčanským zahradníkem F. Thomayerem (Sprenger, 1988!) jsou bohužel stejně jako meziválečné klatovské a velvarské hybridy (Hieke, 2002) nenávratně ztraceny. Odrůdy mělnického šlechtitele K. Prachta ze sedmdesátých let minulého století jsou však dnes s podporou RGZ a VÚR Praha udržovány na zahradnické fakultě MZLU v Lednici.

Uznání a poděkování. Sledování sortimentů rodu *Canna* a jejich hodnocení je na zahradnické fakultě MZLU v Brně realizováno za podpory projektu MSM 435100002 MŠMT ČR.

Literatura

- Ciciarelli, M.M. (2007): *Canna ascendens* (Cannaceae), una nueva especie de la provincia de Buenos Aires comentarios sobre otras especies Argentinas de este género. Darwiniana 45 (2): 188-200
- Cooke, I. (2001): The gardener's guide to growing Cannas. Timber Press, Portland
- Gray, J., Grant, M. (2003): *Canna*. RHS Plant Trials and Awards. RHS Garden, Wisley, ISSN 1477-9153.
- Hieke, K. (2002): Drobnosti o českém šlechtění. *Canna indica* - dosna indická. Zahradnictví 94/27 (2): 26-27.
- Horaninow, P. (1862): Prodrum monographiae Scitaminearum. St. Peterburg
- Khoshoo, T.N., Mukherjee, I. (1970): Genetic-evolutionary studies on cultivated Cannas. TAG: Theoretical and Applied Genetics 40 (5): 204-217.
- Kränzlin, F. (1912): Cannaceae. In Engler A.: Das Pflanzenreich iv.47. Verl. Wilhelm Engelmann, Leipzig
- Maas-van de Kamer, H., Maas, P.J.M. (2003): Cannaceae. Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden 92: 384-385
- Miller, P. (1797): The gardener's and botanist's dictionary. A complete enumeration and description of all plants hitherto known with their generic and specific characters, places of growth, time of flowering, and uses both medicinal and economical. F.& C.Rivington, London
- Prince, L.M., Kress, W.J. (2001): Species boundaries in *Canna* (Cannaceae): evidence from nuclear ITS DNA sequence data. Smithsonian Institution, NMNH - Botany, MRC-166, Washington
- Sprenger, C. (1895): *Canna*. Wiener Illustrierte Gartenzeitung 20 (1): 13-29
- Tanaka, N., Koyama, T. (2000a): Three new species of the genus *Canna* (Cannaceae) from Northern Argentina. Bulletin of the National Science Museum, Tokyo, Ser. B (Botany), 26 (1) 7-13
- Tanaka, N., Koyama, T. (2000a): A new species of *Canna* (Cannaceae) from Northern Argentina. The Journal of Japanese Botany 75 (2): 89-91
- Tanaka, N. (2001): Taxonomic revision of the family Cannaceae in the New World and Asia. Makinoa, new series 1, Kochi Prefectural Makino Botanical Garden, Kawakita Press
- Waugh, F.A. (1897): Notes on the Orchid-flowering Cannas. Garden & Forest Journal 10, 501.

IDENTIFIKACE ALEL LOKUSU *GLU-A1* TRITIKALE POMOCÍ DNA MARKERŮ

IDENTIFICATION OF ALLELES AT THE LOCUS *GLU-A1* IN TRITICALE BY DNA MARKERS

Tomáš VYHNÁNEK¹ – Eva HALOUZKOVÁ¹ – Petr MARTINEK²

Molecular markers were used to identify the allele composition of loci Glu-A1 of high-molecular-weight (HMW) glutenin subunits in fifteen triticale genotypes (varieties and breeding lines). Amplified DNA fragments of HMW glutenin Glu-A1 alleles were separated by agarose slab-gel electrophoresis. Differences between all 3 alleles at the locus Glu-A1 [Glu-A1a (encoding Ax1), 1b (Ax2) and 1c (AxNull)] were revealed. We optimised of PCR reaction (annealing) of specific marker for the allele Glu-A1b in PS3 primer combination. In the variety Palomino were detected alleles Glu-A1b and Glu-A1c from different DNA isolation. DNA was isolated from a mixed sample and so it was not possible to distinguish if it was detection of admixture in a seed sample or a heterozygous constitution of the genotype.*

Key words: triticale, Glu-A1, allelic variation, allele-specific markeres, HMW glutenin subunits

Úvod

Rychlý nárůst světové populace vede ke zvyšování poptávky po zdrojích výživy lidí, zvířat a po zdrojích obnovitelné energie. Tritikale (\times *Triticosecale* Wittmack) jako produkt křížení pšenice a žita vykazuje výrazný výnosový potenciál především v marginálních oblastech a je proto atraktivní plodinou využitelnou pro zvyšování produkce z globálního pohledu. Na rozdíl od pšenice je tritikale plodinou mnohem mladší, která byla podrobena působení šlechtitelské činnosti podstatně kratší dobu než výchozí komponenty pšenice a žito. Zdá se, že u tritikale krátkost trvání allohexaploidní sestavy genomů BBAARR se ještě nestačila projevit eliminací chromosomální DNA (potažmo zkrácením délky chromosomů) jako u tetraploidní (BBAA) a hexaploidní (BBAADD) pšenice, které existují nesrovnatelně delší dobu a tudíž prošly delším evolučním vývojem (Dubcovski a Dvořák, 2006). Toto může být důvodem proč má současné hexaploidní tritikale šlechtitelskou výhodu oproti pšenici, spočívající ve schopnosti produkovat větší množství sušiny nadzemní biomasy oproti průměru výchozích rodičů (tetraploidní pšenice a žito) a i oproti běžné hexaploidní pšenici, což by mohlo být teoreticky způsobeno vlivem permanentní heteroze, vyvolané vzájemným spolupůsobením navzájem málo sbalancovaných genomů pšenice a žita (Shaked et al., 2001). Šlechtitelská výhoda současného tritikale je rovněž v delším stéble, jehož zkracováním může rychleji docházet ke zvyšování sklizňového indexu než u pšenice, kde délka stébla je již nyní dostatečně krátká a její další zkracování se jeví ekologicky málo výhodné (Lelley, 2006).

Běžné odrůdy tritikale mají slabé těsto nepoužitelné pro vysoce mechanizované pekárny. V posledním desetiletí byly nalezeny donory a geneticko-šlechtitelské postupy, které by mohly umožnit zásadní zlepšení technologických vlastností zrna tritikale a tím přispět k rozšíření jeho využitelnosti v potravinářství (Matějková et al., 2009). Proto se domníváme, že je důležité zabývat se šlechtěním tritikale a výzkumem jeho gluteninových alel, odpovědných za technologickou jakost zrna.

V rámci šlechtění tritikale na pekařskou kvalitu roste význam screeningových metod umožňující predikci technologické kvality. Mezi tyto metody patří polyakrylamidová elektroforéza zásobních proteinů obilky (SDS-PAGE a A-PAGE) (Payne a Lawrence, 1983), případně jejich chromatografická analýza (RP-HPLC) (Wieser et al., 1998) a kapilární elektroforéza (Bean a Lookhard, 2000). Rozvíjí se i aplikace DNA markerů pšenice a žita založených na PCR (Salmanowicz a Dylewicz, 2007).

Cílem práce byla identifikace alel lokusu *Glu-A1* pro gluteninové jednotky s vysokou molekulovou hmotností (HMW) u vybraných genotypů tritikale pomocí alelicky specifických DNA markerů.

Materiál a metody

Identifikace alel lokusu *Glu-A1* byla realizována u 15 genotypů tritikale (tab. 1). Směsné vzorky osiva byly získány z Agrotestu fyto, s.r.o. Kroměříž v roce 2008. Pro molekulární analýzy byla genomová DNA izolována pomocí izolačního kitu DNeasy Plant Mini Kit (f. Qiagen) z napěstovaných rostlin ve fázi jednoho listu (5-7 dní staré rostliny). Koncentrace DNA ve vzorku byla po izolaci zjištěna spektrofotometricky. Pro detekci jednotlivých alel lokusu *Glu-A1* byly použity primerové kombinace PS1 a PS2 (Lafianra et al., 1997) a PS3 (De Bustos et al., 2000). Reakční směs o celkovém objemu 25 μ l obsahuje: 30 ng templátové DNA, 0,5 U *Taq* polymerázy (Promega, USA), 1x odpovídající pufr, 7,5 μ M každého primeru a 0,1 mM každého dNTP. Teplotní a časový profil reakce vycházel z práce Salmanowicz a Dylewicz (2007). Pro primerovou kombinaci PS3 byla optimalizována teplota annealingu (nasedání primerů) pro technické vybavení laboratoře pomocí gradientové PCR. Elektroforetická separace probíhala na 1,5% agarosovém gelu (barvení ethidium bromidem) a výsledné DNA produkty byly srovnány s velikostním standardem.

Tabulka 1: Analyzované genotypy triticales

Genotyp		Firma
Agrano		Pflanzenzucht Saka, GbR (GER)
Baltiko, Benetto, Leotino, Madilo, Palomino		Danko Hodowla Roslin, Sp. z o. o. (PL)
Mungis		KWS Lochow GmbH (GER)
Nazaret		Selgen, a. s. (CZE)
Pawo		Hodowla Roslin Strzelce, Sp. z o. o. (PL)
SW Talentro		SW Seed BV (NDL)
V2-18-08, V2-36-08, V2-45-08	translokace 1R.1D ₅₊₁₀ -2	linie vytvořené v Kroměříži se zlepšenými pekařskými parametry obsahující různé typy translokací chromosomu 1R, které vytvořil A.J. Lukaszewski v USA
V3-6-08, V3-41-08	translokace Valdy	

Výsledky a diskuse

U většiny analyzovaných genotypů (86,7 %) byla detekována alela *Glu-A1b* (*Glu-1Ax2**). Výjimkou z analyzovaného souboru byla odrůda Lentiono s alelou *Glu-A1c* (*Glu-1AxNull*) a odrůda Pawo a alelou *Glu-A1a* (*Glu-1Ax1*). Stejných výsledků u odrůd Baltiko a Pawo dosáhli Salmanowicz a Dylewicz (2007). V případě odrůdy Palomino byly v různých izolacích detekovány dvě různé alely. Jednalo se o *Glu-A1b* a *Glu-A1c*. Využití směsných vzorků pro izolaci DNA neumožňuje konstatovat zda se jedná o příměs cizího genotypu nebo o heterozygotní konstituci. Pro tyto účely by byla nutná analýza z jednotlivých rostlin.

Při použití primerové kombinace PS1 je možno rozlišit na základě výsledného produktu alelu *Glu-A1b* (1400 bp) od zbývajících dvou alel (1500 bp). V našem případě byl však rozdíl, při použití teplotního a časového profilu Salmanowicz a Dylewicz (2007) mnohem menší než uváděných 100 bp. Pro lepší interpretaci a zkrácení doby analýzy je vhodné využít na základě našich zkušeností agarosový gel o nižší koncentraci, např. 0,5-1%. Pro detekci výskytu alely *Glu-A1c* (produkt o velikosti 920 bp) byla úspěšně využita primerová kombinace PS2. Pro technické vybavení laboratoře Ústavu biologie rostlin AF nebylo nutné upravit teplotní a ani časový profil reakce. Pro ověření výsledků byla využita i primerová kombinace PS3 umožňující detekci alely *Glu-A1b* (produkt o velikosti 2650 bp). Při použití teplotního a časového profilu Salmanowicz a Dylewicz (2007) vznikalo větší množství nespecifických produktů a tak byla na základě gradientové PCR zvýšena teplota annealingu z původních 57 °C na 58 °C při zachování původních časových období, což vedlo ke snížení počtu nespecifických amplikonů. Výsledky primerové kombinace PS3 korespondovaly s výsledky dosaženými při použití primerové kombinace PS1.

Závěr

V práci jsou prezentovány výsledky identifikace alel lokusu *Glu-A1* pro podjednotky gluteninů s HMW u 15 genotypů tritikale, které je možné využít v rámci šlechtitelských programů na vytvoření odrůd tritikale s lepšími parametry pekařské kvality. Předmětem dalšího studia bude optimalizace DNA markerů pro identifikaci alel v rámci lokusu *Glu-B1*.

Poděkování: Práce byla podpořena projekty Ministerstva školství mládeže a tělovýchovy České republiky MSM2532885901 etapou E a KONTAKT-mobilita MEB080827.

Literatura

- BEAN, S.R., LOOKHART, G.L. (2000) J. Agric. Food Chem., 48: 344-353.
 DE BUSTOS, A., RUBIO, P., JOUVE, N. (2000) Theor. Appl. Genet., 100: 1085-1094.
 DUBCOVSKY, J., DVOŘÁK, J. (2007) Science, 316: 1862-1866.
 LAFIANRDA, D., TUCCI, G.F., PAVONI, A., TURCHETTA, T., MARGIOTTA, B. (1997) Theor. Appl. Genet., 94: 235-240.
 LELLEY, T. (2006) In: SINGH, R.J., JAUHAR, P.P., eds. Genetic Resources, Chromosome Engineering, and Crop Improvement, Cereal, Vol. 2. CRS Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, USA: 395-430.
 MATĚJKOVÁ, P., KUČEROVÁ, J., ŠOTTNÍKOVÁ, V., VYHNÁNEK, T., MARTINEK, P. (2009) Acta Fytotech. et Zootech., Suppl., 12: 414-422.
 PAYNE, P.I., LAWRENCE, G.J. (1983) Cereal Res. Commun., 11: 29-35.
 SALMANOWICZ, B.P., DYLEWICZ, M. (2007) J. Appl. Genet., 48: 347-357.
 SHAKED, H., KASHKUSH, K., ÖZKAN, H., FELDMAN, M., LEVY, A. A. (2001) Plant Cell, 13: 1749-1759.
 WEISER, H., ANTES, S., SEILMEIER, W. (1998) Cereal Chem., 75: 644-650.

SCREENING KANDIDÁTNIČH GENŮ REZISTENCE K TĚŽKÝM KOVŮM U RODU *SILENE*

SCREENING CANDIDATE HEAVY-METALS RESITANT GENES IN GENUS *SILENE*

Tomáš VYHNÁNEK¹ – Eva NEVRTALOVÁ^{1,2} – Radim ČEGAN^{1,2} – Vojtěch HUDZIECZEK¹ – Roman HOBZA^{1,2}

Industrial revolution and technology-based economies drove a problem with an environmental pollution caused by heavy metals. Surprisingly there are several species of plants that were able to adopt their metabolism to toxic concentration of metals in soil. Screen for genes that enable heavy-metal resistance in wild growing plants and their transfer into cultural plants is a useful tool for phytoremediation techniques through higher biomass production. We focused on isolation of metallothionein genes in Silene species, because it is known that metallothioneins (MTs) play an important role related to heavy - metal resistance or accumulation. We isolated and characterized MT3 gene in several species of genus Silene.

Key words: metallothioneins, heavy metal resistance and accumulation, copper, Silene vulgaris

Introduction

There are many (mainly expensive) technologies for cleaning up contaminated soil with heavy metals. Effective and inexpensive decontamination can be achieved by relatively new technology known as phytoremediation, which uses plants to remove pollutants from the environment (Peuke and Rennenberg, 2005). But only minority of plant species can grow on metalliferous soils. The first evidence that plants can be resist and accumulate heavy metals was observed in genus *Silene* (1934). *Silene vulgaris* (Monech) Garke and *Silene dioica* L. have evolved populations with extremely high levels of copper resistance (van Hoof *et al.*, 2001). Some data show that metallothioneins (MTs) play a key role not only in a copper resistance but in metabolism of heavy metals in general. MTs are low molecular weight, Cys-rich cytoplasmatic metal-binding proteins. They play an important role in maintaining intracellular metal homeostasis, eliminating metal toxification and protecting against intracellular oxidative damages (Zhou *et al.*, 2006). Plants metallothioneins are classified into four types based on arrangement of cysteine residues. The genes encoding MTs occur both in vascular plants, animals and eukaryotic microorganism and prokaryotes. The similarity between MT genes within one species is often very high (Hudspeth *et al.*, 1996). This work was preformed to isolate and characterize MT genes of some *Silene* species and investigate their role the copper resistance.

Material and methods

Expression analysis:

Seeds were collected from Cu-hypertolerant *Silene vulgaris* and *Silene dioica* populations from smelter waste site near Spania Dolina. 7-d-old seedlings were used for test of resistance by using the hydroponic culture- Resistant and non-resistance plants were exposed to linearly increasing concentrations of copper in the test solution (control, 25 μ M, 100 μ M CuNO₃) in defined light and temperature conditions. RNA was isolated using TRIzol reagent. Single-strand cDNA was prepared from 2 μ g of RNA. The expression of MT3 genes was estimated by Northern blot hybridisation.

Preparation of probe and BAC library screening of *Silene vulgaris*:

To isolate MT genes from cDNA we used specific primers designed based on sequences from cDNA databases of several *Silene* species. The primers (5' – GGTCATGGATGCAGGAGAGT – 3', 5' – TCAACACTTGTAGGCAGTGGA – 3') were used to amplify MT3 sequence using *S. dioica* cDNA as a template. We were constructed a radioactively labelled probe of MT3 gene derived from a purification of a PCR product. We used random priming method and incorporation of [α -P³²]dATP for labeling process. The probe was used for screening of the BAC library of *S. vulgaris* and positive clones were selected. These clones were tested on presence of MT3 gene by PCR reaction with MT3 specific primers and by Southern blot hybridization with the MT3 probe. One BAC clone was finally selected and sequenced by 454 sequencing method.

Results and discussion

The part of the sequence of the BAC clone of *S. vulgaris* showed a high amino acid sequence identity with the MT3 genes in *A. thaliana*, *T. caerulescens* and *O. sativa*, particularly in the cysteine-rich N-terminal and C-terminal sectors (Fig. 1). The MT3 gene of *S. vulgaris* includes four Cys-residues in the N-terminal domain. We have characterized flanking regulatory region of the MT3 gene and found that the major difference between *A. thaliana* and *S. vulgaris* is in a presence of a retrotransposon in its promotor sequence. Surprisingly except this retrotransposon the region containing several important genes is completely collinear

with *A. thaliana* genome sequence (Fig. 2). Using Northern blot hybridization was revealed the differential expression in resistant and non-resistant species as well as in Cu treated and non-treated *Silene* plants (up to now the biggest difference in expression of the MT3 gene in the resistant and non resistant accessions was found by Hassinen *et al.* (2009) in *T. caerulescens*. Most of the type MT3 genes characterized in other plants are expressed primarily in fruit tissues, such as papaya, banana, kiwifruit. Guo *et al.* (2003) show that *Arabidopsis* MT3 gene is expressed more in leaves and it cannot be detected in seeds. This finding can suggest that this gene is not only involved in heavy metals detoxification, but in different developmental processes too. We revealed the expression of this gene in both roots and leaves.

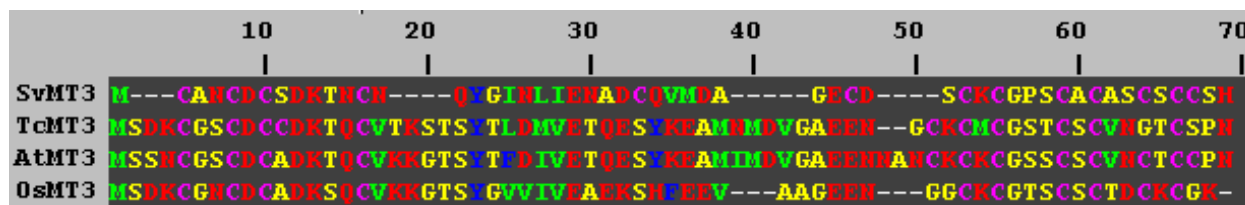


Fig.1 Alignment of *S. vulgaris*, *T. caerulescens*, *A. thaliana* and *O. sativa* MT3 amino acid sequences.

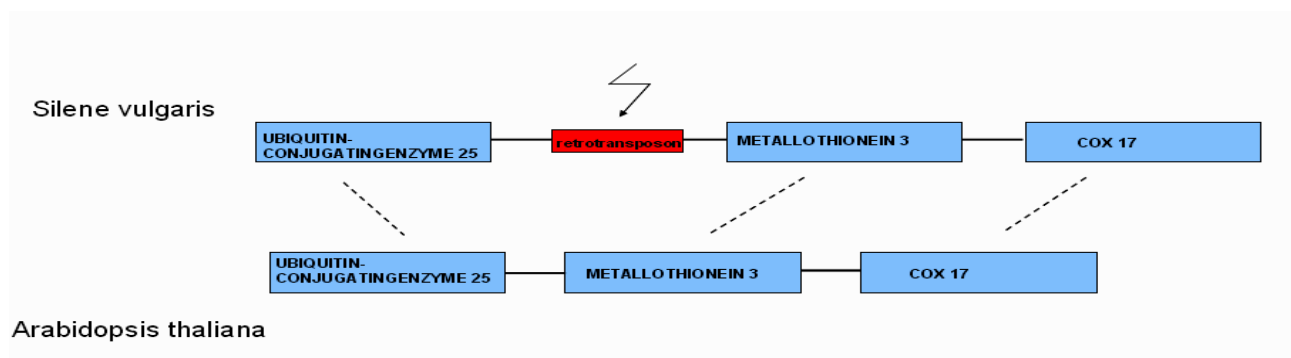


Fig.2 The comparison of the *S.vulgaris* and *A. thaliana* locus containing MT3 gene. Both loci are completely collinear except an intergenic region with the inserted retroelement in *S. vulgaris*.

Conclusion

We have isolated the MT 3 gene from heavy metal resistant plant *S. vulgaris*. We have sequenced the BAC clone containing the MT3 gene and found out that the major difference between *A. thaliana* the collinear region is a presence of a retrotransposon in the promoter of the MT3 gene in *S. vulgaris*. Another important feature of the MT3 gene in *S. vulgaris* is a presence of higher number of cysteine residues that are important parts of metal binding domains. Our aim is to answer following questions: Is the MT3 gene a key player in the metabolism of copper in *Silene* species? Can the retrotransposon influence expression of MT3 gene in stress conditions? Is the structure of isolated MT3 gene crucial for affinity of the MT3 protein to heavy metals?

Acknowledgements: The work was supported by IGA AF MUAf Brno no. DP3/2009 and AS CR grant M200040905.

References

- GOU, Woei-Jiun, MEETAM, Metha, GOLDSBROUGH, Peter B. *Plant physiology*. 2008, vol. 146, no. 10, s. 1697-1706.
- HASSINEN, V.H., et al. *Journal of Experimental botany*. 2009, vol. 60, no. 1, p. 187-196.
- HUDSPETH, Richard L., et al. *Plant Molecular Biology*. 1996, vol. 31, no. 3, p. 701-705.
- MARTINKA, Michal, LUX, Alexander. In TEIXEIRA DA SILVA, Jaime A. *Floriculture, ornamental and Plant biotechnology : Advances and topical issues*. Japan: Global Science Books, Ltd., 2006. Part 5 Phytoremediation and revegetation: techniques and applications. s. 312-316.
- PEUKE, Andreas D., RENNENBERG, Heinz. *EMBO reports*. 2005, vol. 6, no. 6, s. 497-501.
- VAN HOOFF, Nathalie A.L.M., et al. *Plant Physiology*. 2001, vol. 126, no. 126, s. 1519-1526.

PRODUKTIVITA A KVALITA VYBRANÝCH SÚČASNÝCH ZAHRANIČNÝCH A DOMÁCICH ODRÔD PŠENICE LETNEJ F. OZIMNEJ PRODUCTIVITY AND QUALITY OF SELECTED PRESENT FOREIGN AND LOCAL WINTER WHEAT CULTIVARS

Alžbeta ŽOFAJOVÁ – Martin UŽÍK – Magdaléna BIELIKOVÁ

Productivity and grain quality of 22 winter wheat foreign and local cultivars were evaluated in 2 years field experiment. Grain yield was determined mainly by grain number per area ($r=0.723^{++}$) and not by grain weight ($r=0.267$). For breeding programme the high grain yield cultivars with sufficient quality were detected.

Key words: winter wheat, cultivar, grain yield, quality

Spoločný výber rodičov pre kombinácie kríženia je veľmi dôležitý a je považovaný za prvý krok v selekcii. V ostatných rokoch pri pšenici dôraz je kladený na rôzne aspekty kvality. Pri registrovaných odrodách pšenice u nás je deklarovaná pekárská kvalita (vyjadrená bodovým hodnotením) a v zahraničí sa používa medzinárodné označenie akostnej skupiny odrôd (E, A, B, C). Zaradenie odrody nie vždy zodpovedá realite v čase jej pestovania. Príkladom je odroda Ilona (registrovaná v roku 1989), ktorá s pekárskou kvalitou 7 je u nás v oficiálnych hodnoteniach štandardom pre kvalitu. Známe sú aj opačné hodnotenia.

Cieľom výskumu bolo zhodnotiť úrodu zrna a jej znaky a kvalitu na súbore domácich a zahraničných odrôd pšenice letnej f. ozimnej ako potenciálnych rodičovských odrôd do hybridizácie. Zamerali sme sa tiež na porovnanie deklarovanej a pozorovanej kvality zrna.

Materiál a metódy

Vo vegetačných rokoch 2005/06 a 2006/07 bol na Výskumnom pracovisku v Borovciach hodnotený súbor 22 zahraničných a domácich odrôd pšenice letnej f. ozimnej. Pokus bol založený metódou znáhodnených blokov v troch opakovaniach. V priebehu vegetácie sme robili obligátne fenologické pozorovania. V klasení prístrojom Minolta SPAD 502 sme merali SPAD hodnoty, čo je nepriamy ukazovateľ obsahu chlorofylu. V zrelosti sme z dĺžky 0,5 m zapojeného porastu odobrali vzorku nadzemnej biomasy pre stanovenie základných úrodovných znakov. Prístrojom NIRS bolo zrno analyzované na obsah bielkovín a pomocou CNS analyzátor bol stanovený obsah N v zrne a v slame. Odrody patria k súčasnému sortimentu. Na základe deklarovanej pekárskej kvality sme ich pri hodnotení zatriedili do troch skupín: 1 - super kvalitné (7 – 8 podľa listiny registrovaných odrôd) (Akteur-DEU, Alana-CZK, Axis-SVK, Balada-CZK, Banquet-FRA, Bardotka-CZK, Ebi-GBR, Fridolin-AUT, Sulamit-CZK), 2 - kvalitné (6 – 7) (Alibaba-DEU, Arida-SVK, Barokko-FRA, Bosorka-CZK, Darwin-DEU, Merito-CZK, Nela-CZK, Viginta-SVK, Ilona-SVK.), 3 - nekvalitné (4 a menej) (Mladka-CZK, Rapsodia-FRA, Venistar-SVK, Torysa-SVK). Údaje boli spracované pomocou programu Statgrafics for Windows.

Výsledky a diskusia

Pri takmer všetkých hodnotených znakov boli významné rozdiely medzi rokmi (okrem počtu zŕn na m^{-2}) a medzi odrodami, pričom rok bol väčším zdrojom premenlivosti (výsledky analýzy rozptylu ani priemerné hodnoty odrôd neuvádzame).

Zatiaľ čo v roku 2006 úroda zrna bola $7,06 t \cdot ha^{-1}$, v roku 2007 poklesla na $5,52 t \cdot ha^{-1}$, t.j. o 22 % (tab. 1). V oboch rokoch z hľadiska zrážok kritickým obdobím bolo vzhádzanie, čo v roku 2006 bolo spojené tiež s vysokou priemernou teplotou v mesiaci november. Ďalšími obdobiami s nedostatkom zrážok v roku 2007 boli fáza intenzívneho rastu a nalievania zrna. Tento faktor spolu s vyššími teplotami v porovnaní s dlhodobým normálom spôsobil, že vegetácia v roku 2007 bola o 13 dní kratšia ako v roku predchádzajúcom. Vo vegetácii 2006/07 v porovnaní s dlhodobým normálom padlo iba 88 % zrážok a priemerná teplota bola vyššia až o 42 %. Vegetácia 2005/06 bola teplotne na úrovni dlhodobého normálu a padlo o 11 % viac zrážok. V roku 2007 odrody mali vyšší počet zŕn na jednotku plochy (o 3 %), avšak hmotnosť 1000 zŕn bola zredukovaná o 24 %. Poveternostné podmienky mali tiež významný vplyv na znaky kvality a na vzťah medzi úrodou zrna a obsahom bielkovín. Podľa očakávania v roku 2007 bol vyšší obsah bielkovín (o 12 %), vyšší obsah N v zrne (o 16 %) a v slame (o 33 %). Vysokému príjmu N v roku 2007 zodpovedala tiež vysoká SPAD hodnota (51,0). Neočakávane hodnotené odrody mali v priemere o 10 cm vyšší porast v menej priaznivom roku 2007.

Hoci nebol zistený vzťah medzi úrodou zrna a výškou ($r=-0,274$) (tab. 2), v dvoch skupinách odrôd (2, 3) najvyššiu úrodu zrna dosiahli odrody s najvyššou výškou (Merito $6,94 t \cdot ha^{-1}$, Torysa $6,96 t \cdot ha^{-1}$). V skupine 1 najúrodnejšou bola odroda Balada ($6,55 t \cdot ha^{-1}$) s podpriemernou výškou. Úroda zrna sa zvyšovala lineárne od skupiny 1 ($5,91 t \cdot ha^{-1}$) po skupinu 3 ($6,70 t \cdot ha^{-1}$). Najvyššou bola skupina super kvalitných odrôd (100 cm) a medzi skupinami odrôd 2 a 3 neboli rozdiely. Najnižšou bola odroda Rapsodia (85 cm), ktorej výšku determinuje gén *Rht 2*, a najvyššou odroda Fridolin (108 cm) zo skupiny super kvalitných odrôd.

Úroda zrna bola závislá od počtu zŕn na jednotku plochy ($r=0,723^{++}$) a nie od hmotnosti zrna ($r=0,267$), čo potvrdzujú aj analýzy historických sortimentov odrôd zameraných na porovnávanie, ktoré prvky úrody sa podieľali na genetickom pokroku v úrode zrna (UŽÍK et al. 2008). Počet zŕn sa pohyboval od 13131 (Alana) po 18753 (Mladka). Pri odrode Torysa úroda zrna bola viac tvorená hmotnosťou zrna ako počtom zŕn. Podobne ako pri úrode zrna v priemere najvyšší počet zŕn mali odrody nekvalitné a najvyšší super kvalitné. Medzi úrodou zrna a jeho hmotnosťou sme nezistili vzťah a ani medzi skupinami odrôd neboli významné rozdiely. Najvyššiu HTS mala odroda Balada (43,18 g) (skupina 1), avšak v každej skupine boli odrody, ktoré mali v priemere dvoch rokov vyššiu HTS ako 41 g.

Obsah bielkovín sa pohyboval od 12,63 % (Merito) po 14,68 % (Akteur) a podľa očakávania bol v zápornom vzťahu s úrodou zrna ($r=-0,487^+$) a s počtom zŕn ($r=-0,564^{++}$). Medzi skupinami odrôd boli rozdiely aj keď nevýznamné. Aj keď SPAD index ako nepriamy ukazovateľ obsahu chlorofylu a obsahu N nebol vo vzťahu s obsahom bielkovín, odrody s maximálnym obsahom v rámci skupiny 2 a 3 (Arida, Venistar) mali najvyššiu hodnotu SPAD indexu. Obsah bielkovín pri odrode Merito nezodpovedal jej zaradeniu do skupiny kvalitných odrôd. Odroda mala jeden z najvyšších obsahov N v slame, z čoho sa dá usudzovať na menej efektívnu translokáciu N, ktorá je závislá od poveternostných podmienok a od genotypu. Odroda Arida (skupina 2) s nadpriemerným obsahom bielkovín a N v zrne sa viac podobala odrodám skupiny 1. Mala tiež nízky obsah N v slame.

Záver

Úroda zrna odrôd pšenice letnej f. ozimnej s rôznym genetickým potenciálom a kvalitou zrna bola determinovaná počtom zŕn na jednotku plochy a nie hmotnosťou zrna, pričom boli pozorované medziodrodové rozdiely. Zatriedenie odrôd do troch skupín na základe deklarovanej kvality zrna pri niektorých odrodách (Merito, Arida) nezodpovedalo zisteným hodnotám najmä v obsahu bielkovín, ktorý je predpokladom, nie však zárukou vysokej kvality. Pre hybridizačné programy pšenice boli detegované odrody, ktoré na prijateľnej úrovni kombinovali vysokú úrodu zrna s jeho kvalitou (Rapsodia, Balada ai.).

Literatúra

1. UŽÍK, M. – ŽOFAJOVÁ, A. – RÜCKSCHLOSS, L.: Stabilita úrody zrna a jej prvkov pri odrodách pšenice letnej f. ozimnej pri rôznych pestovateľských podmienkach. In: Agriculture (Poľnohospodárstvo), 54, 2008, 3, pp. 99–110.

Tabuľka 1: Priemerné hodnoty znakov skupín odrôd pšenice letnej f. ozimnej za roky 2005/06 a 2006/07

Faktory – rok, skupina odrôd	n	SPAD	Úroda zrna (t.ha ⁻¹)	HTZ (g)	Počet zŕn.m ⁻²	Bielk.	N zrna	N slama	Výška (cm)
2005/06	22	46,0	7,06	44,68	15873	12,89	1,937	0,523	90
2006/07	22	51,0	5,52	33,95	16312	14,41	2,255	0,698	100
1 - super kvalitné	9	47,8	5,91	39,39	14997	13,86	2,154	0,591	100
2 - kvalitné	9	49,2	6,45	39,74	16319	13,58	2,074	0,629	93
3 - nekvalitné	4	48,7	6,70	37,96	17869	13,32	2,016	0,594	92
\bar{x} celkový	-	48,5	6,29	33,32	16093	13,69	2,096	0,611	80

Tabuľka 2: Korelácie medzi hodnotenými znakmi odrôd pšenice letnej f. ozimnej (n=22)

Znak	2	3	4	5	6	7	8
SPAD (1)	0,094	0,176	0,009	0,195	0,058	-0,309	-0,390
Úroda zrna (t.ha ⁻¹) (2)	1	0,267	0,723 ⁺⁺	-0,487 ⁺	-0,588 ⁺⁺	-0,283	-0,274
HTZ (g) (3)		1	-0,465 ⁺	0,182	0,144	-0,506 ⁺	0,065
Počet zŕn.m ⁻² (4)			1	-0,564 ⁺⁺	-0,640 ⁺⁺	0,080	-0,343
Bielkoviny (5)				1	0,849 ⁺⁺	-0,340	-0,036
N zrna (6)					1	-0,187	0,259
N slama (7)						1	-0,081
Výška (cm) (8)							1

Zborník: Nové poznatky z genetiky a šľachtenia poľnohospodárskych rastlín.

Editor: Ing. Valéria Šudyová, CSc.

Recenzent: prof. RNDr. Zdenka Gálová, CSc., SPU Nitra

Ing. Tibor Maliar, PhD. UCM Trnava

Vydavateľ: CVRV – Výskumný ústav rastlinnej výroby Piešťany

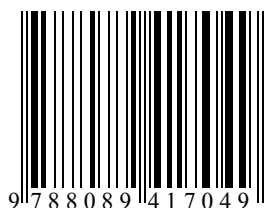
Typografia: Jarmila Poništová

Náklad: 60

Rok vydania: 2009

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

ISBN 978-80-89417-04-9



9788089417049