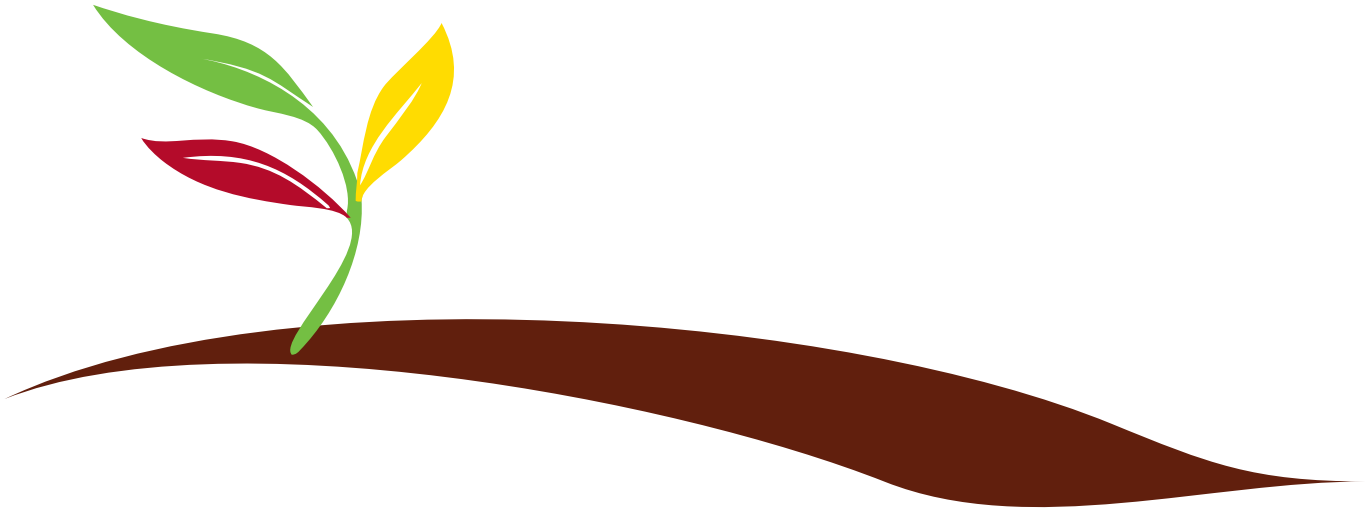
Európska únia
Európsky fond regionálneho rozvoja

Agentúra
Ministerstva školstva, vedy, výskumu a športu SR
pre štrukturálne fondy EÚ

Operačný program
VÝSKUM a VÝVOJ

„Podporujeme výskumné aktivity na Slovensku/Projekt je spolufinancovaný zo zdrojov ES“.

NOVÉ POZNATKY Z GENETIKY A ŠĽACHTENIA POĽNOHOSPODÁRSKYCH RASTLÍN



centrum výskumu rastlinnej výroby piešťany

Piešťany, 2010

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

NOVÉ POZNATKY Z GENETIKY A ŠĽACHTENIA POĽNOHOSPODÁRSKYCH RASTLÍN

Zborník zo 17. vedeckej konferencie
Piešťany, 26.−27. október 2010
1. vydanie

Názov: Nové poznatky z genetiky a šľachtenia poľnohospodárskych rastlín. Zborník zo 17. vedeckej konferencie, Piešťany, 26.-27. 10. 2010.

Zostavovateľ: **Ing. Valéria Šudyová, CSc.**
Recenzenti: **prof. RNDr. Zdenka Gálová, CSc., SPU Nitra**
Ing. Tibor Maliar, PhD., UCM Trnava

Autorský kolektív:

Al-Homssi Ayham A. 72
Al-Ouda Ayman S. 72
Bacsová Zuzana 76, 78
Balounová Marta 175
Bartáčková Veronika 122
Benediková Daniela 8
Benková Michaela 8, 62
Beránek Martin 165
Binarová Pavla 163
Bojnanská Katarína 65, 67, 102, 185
Boszorádová Eva 70, 124
Brestič Marián 72, 179
Cenklová Věra 163
Čechová Jana 74
Černý Ivan 76, 78
Čertík Milan 28, 114
Čičová Iveta 12, 159
Deáková Ľubomíra 16
Dobroviczká Terézia 80
Dragúňová Marta 130
Drahovská Hana 152
Dubas Ewa 84
Dvončová Daniela 20
Dvořáková Zdislava 82
Dvořáková Zdislava 161
Faragó Juraj 57, 86, 90
Faragová Natália 86, 90
Fejér Jozef 93
Ferencová Jana 118
Filová Angelika 96
Fráterová Lenka 98, 163
Gajdošová Alena 116, 142
Gavurníková Soňa 100, 183
Gregová Edita 42, 110, 170
Gruľová Daniela 93
Gubiš Jozef 67, 102, 104, 108, 185
Gubišová Marcela 102, 106, 108, 185
Hajšlová Jana 122
Halouzková Eva 181
Hauptvogel Pavol 62, 170, 183
Havel Ladislav 146
Havelová Jana 102
Havrlentová Michaela 16, 20, 112, 114, 185
Henychová Alena 49, 148
Hlásná-Čepková Petra 82, 165
Hlásná-Čepková Petra 161
Hlinková Andrea 114
Holleinová Věra 74
Horáčková Simona 150
Hozlár Peter 16, 20
Hricová Andrea 116
Hudcovicová Martina 104, 172
Hunková Elena 118, 120
Ivasiuková Natália 144
Jakúbeková Miroslava 152
Jančich Miroslav 118, 120
Janovská Dagmar 82
Ježek Josef 49
Jirsa Ondřej 122
Jonáš Martin 25
Jopčík Martin 70, 124
Jureková Zuzana 130
Kiššová Oľga 72
Kizeková Miriam 31
Klempová Tatiana 28, 42
Knotová Daniela 53, 126
Kollárová Eva 90
Kovár Marek 120
Kraic Ján 28, 42, 154
Krivosudská Eleonóra 118, 128
Križanová Klára 102
Krofta Karel 57
Krzewska Monika 84
Leišová-Svobodová Leona 104
Libantová Jana 70, 84, 124
Libiaková Gabriela 116
Lichtnerová Helena 130
Lichvárová Mária 144
Lojka Bohdan 161
Malovcová Ľubica 120
Márová Ivana 150
Martincová Janka 31
Martinek Petr 35, 122, 168, 181
Masár Štefan 65,67, 102, 185
Matušíková Ildikó 70, 80, 98, 124, 132
Matušinský Pavel 104
Mendeľ Ľubomír 62
Meszáros Klára 46
Mészáros Patrik 132
Mihalčík Peter 86
Mihálik Daniel 28, 42, 112
Mikulíková Renata 150
Milotová Jarmila 135, 175
Moravčíková Jana 70, 84, 124
Múdry Pavol 140, 142
Muchová Darina 144
Murín Richard 46
Musilová Milena 146
Nesvadba Vladimír 49, 57, 148
Nesvadba Zdeněk 150
Obert Bohuš 152
Olšovská Katarína 72
Ondreičková Katarína 42, 154
Ondrejčák František 144
Pandolfi Camilla 165
Pastirčák Martin 67, 102, 157, 159
Pelikán Jan 53, 126
Petrovská Beáta 163
Piršelová Beáta 80, 132
Pokorová Petra 35
Polončíková Zděnka 49, 148
Preininger Daniel 161
Preťová Anna 152
Pšenáková Ivana 57
Raddová Jana 74
Roháčik Tibor 67
Rollo Alexandr 161
Rovná Katarína 96
Salaj Ján 124, 163
Salaj Terézia 98
Salaj Terézia 163
Sleziak Ľudovít 102
Svitáčková Běla 25
Svobodová Eva 161
Svobodová Eva 165
Svobodová Ilona 168
Šalamon Ivan 93
Šliková Svetlana 42, 100, 110, 112, 168, 170
Šlímar Pavel 35
Šudyová Valéria 170, 172
Trojan Václav 146
Uhliar Stanislav 120
Uvačková Ľubica 152
Vaculová Kateřina 135, 175
Valigurová Andrea 179
Vaňová Marie 35, 122
Věchet Lubomír 168
Veverková Alexandra 76, 78
Viehmannová Iva 161
Vyhnánek Tomáš 126, 146, 181
Zirkelbachová Katarína 100, 183
Żur Iwona 84
Živčák Marek 72, 120
Žofajová Alžbeta 16, 67, 102, 108, 185

© CVRV Piešťany - Výskumný ústav rastlinnej výroby Piešťany

ISBN 978-80-89417-23-0

O b s a h

Prednášky

Benediková, D. – Benková, M.: Prínos Génovej banky SR a Národného programu ochrany genetických zdrojov rastlín pre ochranu biodiverzity a šľachtenie rastlín..... 8

Čičová, I.: Poľné hodnotenie genetických zdrojov láskavca (*Amaranthus* L.) na pestovanie v rastlinnej výrobe. 12

Deáková, Ľ. – Havrlentová, M. – Žofajová, A. – Hozlár, P.: Vplyv teplotného stresu a obsahu ß-D-glukánu na životaschopnosť semien ovsa siateho..... 16

Hozlár, P. – Havrlentová, M. – Dvončová, D.: Súčasné trendy vo výskume a šľachtení ovsa v Európe a vo svete..... 20

Jonáš, M. – Svitáčková, B.: Kvalita zdravotného stavu klonov novošľachtenia mečíkov..... 25

Klempová, T. – Mihálik, D. – Čertík, M. – Kraic, J.: Charakterizácia delta-6-desaturázy ako prvý krok v príprave rastlín so zvýšeným hospodárskym významom..... 28

Martincová, J. – Kizeková, M.: Hodnotenie genetických zdrojov tráv a ďatelinovín vo vzťahu k morfologickým a produkčným vlastnostiam..... 31

Martinek, P. – Pokorová, P. – Šlímar, P. – Váňová, M.: Produktivita linií ozimé pšenice s dlouhým plevami, mnohořadým klasem a normálním klasem v i rozdílných pěstebních systémech..... 35

Mihálik, D. – Klempová, D., Šliková, S. – Gregová, E. – Ondreičková, K. – Kraic, J.: Identifikácia nových podjednotiek vysokomolekulárnych glutenínov pri rode *Triticum*..... 42

Murín, R. – Meszáros, K.: Optimalizácia genetickej transformácie nezrelých embryí pšenice letnej (*Triticum aestivum* L.) pomocou *Agrobacterium tumefaciens*. 46

Nesvadba, V. – Henychová, A. – Polončíková, Z. – Ježek, J.: Šlechtění chmele (*Humulus lupulus* L.) zakrslého typu chmele pro nízké konstrukce..... 49

Pelikán, J. – Knotová, D.: Uplatnění planých druhů čeledi *Fabaceae* v travních spoločenstvech..... 53

Pšenáková, I. – Faragó, J. – Krofta, K. – Nesvadba, V.: Vplyv pestovateľských podmienok a genotypu na obsah vybraných biologicky aktívnych látok v chmeli obyčajnom..... 57

Postery

Benková, M. – Mendel, Ľ. – Hauptvogel, P.: Hodnotenie vybraných znakov a vlastností ovplyvňujúcich úrodu zrna jačmeňa siateho f. ozimnej..... 62

Bojnanská, K. – Masár, Š.: Hodnotenie nešpecifickej a špecifickej odolnosti novošľachtených kmeňov pšenice letnej voči patogénom múčnatke trávovej na pšenici a hrdzi pšenicovej..... 65

Bojnanská, K. – Masár, Š. – Gubiš, J. – Žofajová, A. – Pastirčák, M. – Roháčik, T.: Špecifická odolnosť vybraných genotypov pšenice letnej voči obligátnym patogénom..... 67

Boszorádová, E. – Moravčíková, J. – Jopčík, M. – Matušíková, I. – Libantová, J.: Príprava marker-free transgénnych rastlín repky olejky (*Brassica napus* L.)..... 70

Brestič, M. – Živčák, M. – Olšovská, K. – Kiššová, O. – Ol-Ouda, A. – Alhomssi, A.: Hodnotenie citlivosti na vysokú teplotu na úrovni fotosyntetického aparátu sýrskych novošľachtencov jačmeňa..... 72

Čechová, J. – Holleinová, V. – Raddová, J.: Svinutka révy 1 (GLRaV-1) v České republice a její detekce..... 74

Černý, I. – Bacsová, Z. – Veverková, A.: Variabilita úrody a kvality slnečnice ročnej vplyvom rôzneho biologického materiálu..... 76

Černý, I. –Veverková, A. – Bacsová, Z.: Vplyv organizácie porastu a foliárneho ošetrenia Atonikom na úrodovo – kvalitatívne parametre slnečnice ročnej (*Helianthus annuus* L.)..... 78

Dobroviczka, T. – Piršelová, B. – Matušíková, I.: Fyziologické aspekty účinkov iónov kadmia a arzénu na vybrané odrody sóje fazuľovej..... 80

Dvořáčková, Z. – Hlásná-Čepková, P. – Janovská, D.: Rancidity development of selected millet species under different storing conditions..... 82

Dubas, E. – Moravčíková, J. – Libantová, J. – Żur, I. – Krzewska, M.: *Agrobacterium* – mediated trasformation of microspores and microspore – derived embryos of *Brassica napus* L..... 84

Faragová, N. – Faragó, J. – Mihalčík, P.: Hodnotenie vplyvu transgénnej Bt-kukurice na pôdne bakteriálne spoločenstvá..... 86

Faragó, J. – Kollárová, E. – Faragová, N.: Indukcia adventívnej organogenézy v *in vitro* kultúre chmeľu obyčajného (*Humulus lupulus* L.)..... 90

Fejér, J. – Šalamon, I. – Gruľová, D.: Klonové šľachtenie mäty priepornej – *Mentha* × *piperita* L..... 93

Filová, A. – Rovná, K.: Súčasné trendy a možnosti aplikácie pletivových kultúr pre produkciu okrasných rastlín..... 96

Fráterová, L. – Matušíková, I. – Salaj, T.: Potenciálna úloha chitináz v procese somatickej embryogenézy *Pinus nigra* Arn..... 98

Gavurníková, S. – Zirkelbachová, K. – Šliková, S.: Technologická kvalita pšenice rodičovských genotypov pri tvorbe izogénnych línií s novou glutenínovou alelou z genotypu Kotte..... 100

Gubiš, J. – Križanová, J. – Žofajová, A. – Bojnanská, K. – Gubišová, M. – Pastirčák, M. – Masár, Š. – Sleziak, Ľ. – Havelová, J.: Poľná odolnosť odrôd jačmeňa siateho f. jarná voči vybraným patogénom..... 102

Gubiš, J. – Hudcovicová, M. – Leišová-Svobodová, L. – Matušinský, P.: Laboratórny test pre diagnostiku patogéna *Ramularia collo-cygni* v pletivách jačmeňa..... 104

Gubišová, M.: Regeneračná schopnosť odrôd jačmeňa jarného pestovaných na Slovensku..... 106

Gubišová, M. – Gubiš, J. – Žofajová, A.: Explantátová kultúra ako nástroj pre rozmnožovanie *Arundo donax* L. – netradičnej energetickej rastliny..... 108

Gregová, E. – Šliková, S.: Charakterizácia genotypov kolekcie zrna pšenice pomocou glutenínov a gliadínov. 110

Havrlentová, M. – Šliková, S. – Mihálik, D.: Variabilita v obsahu ß-D-glukánu v druhoch rodu *Avena*..... 112

Hlinková, A. – Čertík, M. – Havrlentová, M.: Obsah lipidov a profil mastných kyselín v semene slovenských odrôd maku (*Papaver somniferum* L.)..... 114

Hricová, A. – Kečkešová, M. – Gálová, Z. – Suhaj, M. – Libiaková, G. – Gajdošová, A.: Radiačná mutagenéza v šľachtení láskavca..... 116

Jančich, M. – Hunková, E. – Krivosudská, E. – Ferencová, J.: Význam rastovej analýzy v skríningu genotypov kapusty repkovej pravej..... 118

Jančich, M. –Živčák, M. – Kovár, M. – Uhliar, S. – Hunková, E. – Malovcová, Ľ.: Architektúra porastu kapusty repkovej pravej vyjadrená prostredníctvom vybraných rastových parametrov..... 120

Jirsa, O. – Bartáčková, V. – Martinek, P. – Váňová, M. – Hajšlová, J.: Studie obsahu akrylamidu v praženém zrnu ječmene, pšenice a žita..... 122

Jopčík, M. – Libantová, J. – Matušíková, I. – Salaj, J. – Boszorádová, E. – Moravčíková, J. : Aktivita rastlinných pletivovo špecifických promótorov v prokaryotických bunkách..... 124

Knotová, D. – Pelikán, J. – Vymyslický, T.: Studium podobnosti původů české kolekce jetele perského (*Trifolium resupinatum* L.)..... 126

Krivosudská, E.: Význam osmotického prispôsobenia u vybraných genotypov hrachu siateho počas prehlbujúceho sa sucha..... 128

Lichtnerová, H. – Jureková, Z. – Dragúňová, M.: Mikrorozmnožovanie pivonky lekárskej..... 130

Meszáros, P. – Piršelová, B. – Matušíková, I.: Odpovede koreňov sóje fazuľovej (*Glycine max* L.) na ióny ťažkých kovov..... 132

Milotová, J. – Vaculová, K.: Charakteristika a hodnocení nových odrůd a linií ječmene jarního zařazených do kolekce genetických zdrojů..... 135

Múdry, P.: Dvadsať rokov výskumu polymorfizmu enzýmov poľnohospodárskych plodín na Slovensku – výsledky, ich aplikácia a perspektívy..... 140

Múdry, P. – Gajdošová, A.: Vplyv radiomutagénu na polymorfizmus vybraných enzýmov v dvoch druhoch láskavca..... 142

Muchová, D. – Ondrejčák, F. – Lichvárová, M. – Ivasiuková, N.: Hodnotenie vybraných genotypov maku siateho z hľadiska obsahu alkaloidov a úrody makovíc..... 144

Musilová, M. – Trojan, V. – Vyhnánek, T. – Havel, L.: Aplikace metod molekulární biologie u genetických zdrojů pšenice seté (*Triticum aestivum* L.)..... 146

Nesvadba, V. – Polončíková, Z. – Henychová, A.: Hodnocení variability hlávek chmele u českých odrůd 148

chmele.....

Nesvadba, Z. – Márová, I. – Mikulíková, R. – Horáčková, S.: Studium enzymatické aktivity vybraných genotypů jarního sladovnického ječmene..... 150

Obert, B. – Uváčková, Ľ. – Jakúbeková, M. – Preťová, A.: Získavanie haploidných, diploidných a tertaploidných rastlín kukurice z peľnicovej kultúry..... 152

Ondreičková, K. – Drahovská, H. – Kraic, J.: Vplyv geneticky modifikovaných rastlín na pôdne baktérie.... 154

Pastirčák, M.: Významnosť semenom prenosných húb obilnín v životnom cykle rastlín..... 157

Pastirčák, M. – Čičová, I.: Významnosť húb spôsobujúcich listové škvrnitosti vybraných druhov rodu láskavec (*Amaranthus*) a mrlík (*Chenopodium*)..... 159

Rollo, A. – Lojka, B. – Hlásná-Čepková, P. – Svobodová, E. – Dvořáková, Z. – Viehmannová, I. – Preininger, D.: Morphological diversity among geographically distant populations of indigenous fruit tree species *Inga edulis* Mart. (*Fabaceae*) in cultural landscape of Peruvian Amazon..... 161

Salaj, J. – Petrovská, B. – Fráterová, L. – Cenklová, V. – Binarová, P. – Salaj, T.: Lokalizácia cytoskeletárnych bielkovín v somatických embryách *Pinus nigra* Arn. po kryoprezervácii..... 163

Svobodová, E. – Hlásná-Čepková, P. – Pandolfi, P. – Beránek, M.: Artificial neural networks – a cheap alternative to molecular markers in grapevine varieties descrimination..... 165

Svobodová, I. – Martinek, P. – Věchet, L. – Šliková, S.: Odolnost vybraných odrůd pšenice a donorů na umělou infekci braničnatky pšeničné (*Mycosphaerella graminicola*) v polních podmínkách..... 168

Šliková, S. – Šudyová, V. – Hauptvogel, P. – Gregová, E.: Reakcia slovenských odrôd pšenice po umelej infekcii hubou *Fusarium culmorum* Sacc..... 170

Šudyová, V. – Hudcovicová, M.: Nové línie jačmeňa ozimného po prenose génu *RYM4*..... 172

Vaculová, K. – Balounová, M. – Milotová, J.: Prebreeding výchozích materiálů ječmene jarního s diferencovaným obsahem přirozených škodlivých látek v zrně pro šlechtění odrůd nesladovnického typu.... 175

Valigurová, A. – Brestič, M.: Hodnotenie termostability starých a nových odrôd pšenice letnej formy ozimnej (*Triticum aestivum* L.) a jej divoko rastúcich predchodcov druhu *Aegilops* metódou fluorescencie chlorofylu A..... 179

Vyhnánek, T. – Halouzková, E. – Martinek, P.: Molekulární markery pro HMW podjednotky gluteninů u tritikale..... 181

Zirkelbachová, K. – Gavurníková, S. – Hauptvogel, P.: Výber slovenských odrôd pšeníc vhodných pre prenos glutenínových alel..... 183

Žofajová, A. – Gubiš, J. – Gubišová, M. – Masár, Š. – Bojnanská, K. – Havrlentová, M.: Hodnotenie populácií pšenice letnej f. ozimná pre tvorbu dihaploidov..... 185

PRÍNOS GÉNOVEJ BANKY SR A NÁRODNÉHO PROGRAMU OCHRANY GENETICKÝCH ZDROJOV RASTLÍN PRE OCHRANU BIODIVERZITY A ŠĽACHTENIE RASTLÍN
CONTRIBUTION OF GENE BANK OF THE SR AND NATIONAL PROGRAM FOR BIODIVERSITY CONSERVATION AND PLANT BREEDING

Daniela BENEDIKOVÁ – Michaela BENKOVÁ

Gene bank of the SR began its activity in the year 1997 in Piešťany. All the activities are performed by the national and international legislative. Storage capacity is 50 000 seed accessions at four cool chambers in two temperature schedules (-17 °C and +4°C). In the space of years 1997 till 2009 have been saved at Gene bank SR 15 814 accessions in the active collection and 3 444 accessions in the base collection. The Safety duplicate collection includes 3 448 seeds accession from the most valuable Slovak genetic resources and is located in Gene bank of the Czech Republic at Prague. Within the frame of genetic resources exploitation has been provided 2 904 seed samples for research works and projects realization. We provided 286 seed samples for breeding purposes and 259 samples for education. Abroad for research subjects we have been send 537 seed accessions. Monitoring of testing germinative activity and viability of the seeds after 5 years period of conservation was doing for 6 646 accessions. The seed of the grasses species Agrostis stolonifera L., which was collected on collecting expedition was utilised into grasses breeding program and in the year 2006 was register as variety "Akcent".
Key words: Gene bank SR, National program, conservation, plant genetic resources

Úvod

Svetový plán akcií uchovávania a trvalo udržateľného využívania genetických zdrojov rastlín predstavuje hlavný program organizácie FAO, týkajúci sa práce s genetickými zdrojmi rastlín. Svojich dvadsať priorít má rozčlenených do štyroch oblastí a jednou z nich je i využívanie genetických zdrojov rastlín. Efektívne využívanie genofondu predpokladá čo najdokonalejšiu znalosť existujúcej genetickej variability druhov, biologických vlastností širokých súborov odrôd a šľachtiteľsky rozpracovaných materiálov. Základom pre riešenie uvedenej problematiky v každej krajine je tvorba národného programu a v rámci neho je cieľavedomé vyhľadávanie, zhromažďovanie, uchovávanie a štúdium geneticky cenných odrôd, ekotypov, krajových odrôd, polokultúrnych foriem a iných genetických zdrojov (Jarvis et al. 2007). Genetické zdroje rastlín, ako také, sú hospodársky a politicky významnou zložkou majetku štátu, nakoľko majú priamy vplyv na potravinovú bezpečnosť každej krajiny. Každá krajina si uchováva svoje genetické zdroje rastlín a využíva ich podľa medzinárodných štandárd (FAO/IPGRI,1994). Uchovávanie semenných druhov sa realizuje v génových bankách, vegetatívne rozmnožované druhy sa uchovávajú v poľných kolekciách týchto bánk (Rao et al. 2006; Engels & Visser 2003).

Genetické zdroje sa využívajú nielen v pestovateľskej praxi, ale najmä v šľachtiteľských programoch, pri riešení vedeckých a výskumných projektov a tiež pri propagačných a vzdelávacích aktivitách pre odbornú a laickú verejnosť (Benediková et al. 2009).

Cieľom príspevku je zhodnotiť prínos Génovej banky SR a Národného programu ochrany genetických zdrojov rastlín pre využívanie v šľachtení a výskume a pre ich dlhodobé uchovávanie pri ochrane biodiverzity.

Materiál a metódy

Základným legislatívnym rámcom pre všetky domáce aktivity týkajúce sa genetických zdrojov rastlín pre výživu a poľnohospodárstvo je Národný program ochrany genetických zdrojov rastlín pre výživu a poľnohospodárstvo (ďalej len Národný program), zákon NR SR č. 215/2001 Z. z. o ochrane genetických zdrojov rastlín pre výživu a poľnohospodárstvo a vykonávacia vyhláška č. 283/2006 Z.z. k uvedenému zákonu.

Génová banka SR počas svojej existencie vykonáva všetky činnosti vyplývajúce z jej štatútu, ktorý ako súčasť Národného programu ochrany genetických zdrojov rastlín na roky 2010 - 2014 bol zverejnený dňa 23.11.2009 vo Vestníku MP SR čiastka 24, bod 66. Riešiteľské pracoviská Národného programu sa zriaďujú zmluvne podľa § 8 a 9, kurátori vykonávajú svoju činnosť podľa § 10 uvedeného zákona a podľa §22 ministerstvo financuje všetky aktivity s genetickými zdrojmi rastlín pre výživu a poľnohospodárstvo.

Génová banka SR má sídlo v Centre výskumu rastlinnej výroby (CVRV) Piešťany v Piešťanoch a slúži na uchovávanie semenných druhov genetických zdrojov rastlín. Rastlinné druhy rozmnožujúce sa vegetatívne sa uchovávajú v poľných kolekciách na riešiteľských pracoviskách Národného programu. Kapacita Génovej banky SR je 50 000 vzoriek semien. Dlhodobé skladovanie semien je v základnej kolekcii pri teplote -17°C na dobu skladovania až 50 rokov a viac. Strednodobé skladovanie semien pri +4°C je v aktívnej kolekcii na dobu 10 rokov.

Distribúcia vzoriek semien genetických zdrojov sa vykonáva na základe požiadavky žiadateľa a možností kapacity semien génovej banky. Semená sa poskytujú bezplatne, v množstve maximálne 200 semien. Pre užívateľov je prístupných asi 80 % uskladnených vzoriek semien. Podľa medzinárodných predpisov je každá

vzorka zasielaná len so súhlasom kurátora kolekcie alebo šľachtiteľa a je sprevádzaná štandardnou dohodou o presune materiálu (sMTA - Standard Material Transfer Agreement) v súlade s Dohovorom o biologickej diverzite a Medzinárodnou zmluvou. Vzorky semien genetických zdrojov rastlín sa zasielajú len na nekomerčné účely pre šľachtiteľov, na výskumné a vedecké účely a na výmenu s inými génovými bankami.

Výsledky, diskusia

Genetické zdroje rastlín sa využívajú v ostatnom čase hlavne pri riešení výskumných projektov zameraných na rozširovanie pestovania netradičných plodín, rozšírenie druhovej pestrosti lúčnych a pasienkových porastov, výber vhodných druhov a odrôd pre alternatívne využívanie produkcie, zlepšovanie pôdnej úrodnosti a iné účely. Užívateľom genetických zdrojov je k dispozícii pasportná databáza Génovej banky SR uverejnená na www.cvrv.sk. V súčasnosti je v databáze evidovaných 181 kolekcií udržiavaných *ex situ*, 2 kolekcie *in vitro* a 1 *in situ* o celkovom počte 24 537 vzoriek. V spolupráci s jednotlivými kurátormi je možné získať informácie i z popisnej databázy jednotlivých genetických zdrojov. Tieto databázy sú vypracované v súlade s medzinárodnými štandardami.

Dôležitosť využívania genetických zdrojov rastlín vidíme i v tom, že sa využívajú v šľachtiteľských programoch, pri riešení výskumných úloh a vo výukových programoch stredných a vysokých škôl a univerzít, propagačných a vzdelávacích aktivitách múzeí a v trvalých výsadbách rôznych inštitúcií.

Šľachtenie rastlín realizujú na Slovensku najmä privátne firmy a akciové spoločnosti, situácia v tejto oblasti nie je veľmi priaznivá, pôsobí tu približne 15 šľachtiteľských subjektov. Ich aktivity sú zamerané na tvorbu nových genotypov najmä obilnín (pšenica, jačmeň, raž), zeleniny, viniča a ovocných druhov s rezistenciou k významným patogénom. Šľachteniu ostatných rastlinných druhov sa venuje pozornosť len okrajovo.

Pri vzniku Génovej banky SR bolo v roku 1997 uskladnených prvých 1 842 vzoriek semien do aktívnej kolekcie a 582 vzoriek do základnej kolekcie. Väčšina vzoriek bola tvorená najmä obilninami a strukovinami. Aktivity pokračovali veľmi intenzívne a tak v roku 2010 je už zaevidovaných do aktívnej kolekcie 16 053 vzoriek semien a do základnej kolekcie 3 448 vzoriek semien. Prehľad stavu napĺňania kolekcií v jednotlivých rokoch je uvedený v tabuľke 1. a 2. Ďalej bola vytvorená tzv. bezpečnostná kolekcia, ktorá v súčasnosti obsahuje 3448 vzoriek semien najvzácnejších domácich genetických zdrojov. Táto kolekcia je z hľadiska bezpečnosti uložená v zahraničí, v Génovej banke Českej republiky na VÚRV v.v.i. Praha Ruzyňe.

Jednou z dôležitých aktivít každej génovej banky je poskytovanie vzoriek semien pre užívateľov. Vzorky semien sa poskytujú len z aktívnej kolekcie. Počas existencie Génovej banky SR za roky 1997 až 2009 bolo z aktívnej kolekcie vydaných 9 521 vzoriek semien (tabuľka 3). Z tohto počtu až 2 875 vzoriek bolo poskytnutých na riešenie výskumných úloh a projektov, pre účely šľachtenia a výskumu a tiež pre účely vzdelávania na univerzitách a stredných školách (ŠVOČ, diplomové a doktorandské práce). Nakoľko program evidencie génovej banky eviduje každý pohyb so semenom ako výdaj, zostatok 7 313 vzoriek bolo vydaných na monitoring klíčivosti a regeneráciu semien aktívnej kolekcie po uplynutí doby skladovania 5 rokov. Z celkového počtu vydaných vzoriek Génová banka SR poskytla do zahraničia 537 vzoriek semien.

Územie Slovenska je charakterizované vysokou diverzitou. Pôvodne pestované krajové odrody a populácie je možné zhromažďovať, uchovávať pre budúce generácie a využiť v šľachtení nových odrôd. V rámci zberových aktivít pracovníci Génovej banky SR zorganizovali alebo sa zúčastnili na viac ako 45 expedíciách na území Slovenska a v zahraničí. Z týchto zberových expedícií sa zhromaždilo vyše 6 500 vzoriek semien, zahrňujúcich krmoviny, strukoviny, trávy, ovocné druhy, aromatické a liečivé druhy, olejniny, zeleniny, obilniny a divorastúcich predchodcov kultúrnych druhov. Systematické zbery vo vybraných oblastiach Slovenska boli zamerané na záchranu autochtónnych krajových odrôd pestovaných plodín a ich divorastúcich predchodcov. Hlavným cieľom zberových expedícií bol prieskum lokalít, zber, inventúra unikátnych vzoriek tradičných odrôd a krajových odrôd, ako aj ekotypov divorastúcich populácií, široko rozšírených v rôznych oblastiach Slovenska a reprezentujúcich významnú časť prírodných zdrojov našej krajiny a kultúrneho dedičstva našich ľudí. Jednou z posledných odrôd, ktoré boli v minulosti registrované v rámci tráv je i odroda psinčeka poplazového (*Agrostis stolonifera* L.), pri vzniku ktorej boli využité zdroje tráv získané zo zberových expedícií pracovníkov VÚRV Piešťany. Táto odroda bola registrovaná v Listine registrovaných odrôd v roku 2006.

Národný program ochrany genetických zdrojov rastlín začal vyvíjať svoju koordinovanú a systematickú aktivitu v roku 1991 riešením vedecko-technického projektu 05-514-31 pod názvom „Zhromažďovanie, štúdium a ochrana genofondu kultúrnych rastlín“. Dovtedy sa kolekcie uchovávali decentralizovane na riešiteľských pracoviskách. Koordinačnú činnosť vyvíjal vtedajší VÚRV Piešťany. Do riešenia problematiky bolo zapojených 19 pracovísk v rámci celého Slovenska, ktoré uchovávali 16 200 vzoriek. Riešenie problematiky ochrany genetických zdrojov rastlín pokračovalo ďalej v rôznych formách, vytvárala sa legislatíva, vstupovalo sa do riešenia medzinárodných aktivít. Dnes v Národnom programe evidujeme 32 910 genetických zdrojov udržiavaných na 18 riešiteľských pracoviskách v rámci celej Slovenskej republiky.

V roku 2009 bola aktualizovaná databáza pasportných údajov zaslaných do informačného katalógu EURISCO. Je to centrálna európska databáza ktorá zahŕňa viac ako milión pasportných informácií z 32 krajín. Databáza pasportných dát Slovenska v súčasnosti pozostáva zo 16 822 položiek.

Tabuľka 1: Vývoj stavu aktívnej kolekcie vo vybraných rokoch podľa skupín plodín

Plodiny	1997	1999	2000	2002	2003	2005	2006	2008	2009
Obilniny	1088	3197	3407	4887	5204	6908	7588	8263	8410
Zelenina	139	194	208	228	236	251	253	255	257
Strukoviny	223	1043	1378	1867	2107	2683	2927	3072	3072
Olejniny	126	220	233	257	319	353	429	505	518
Krmoviny	0	450	562	722	739	796	839	892	892
Aromat. a liečivé rast.	26	69	94	111	112	146	171	204	204
Repa	51	51	52	52	108	109	114	123	123
Kvety	10	10	10	10	10	16	20	24	24
Trávy	1	45	61	93	93	106	117	128	159
Kukurica	31	66	231	418	535	743	820	822	822
Priemyselné plodiny	147	169	188	334	334	396	424	433	447
Iné obilniny	0	15	26	61	80	137	161	210	210
CELKOM	1842	5529	6450	9040	9877	12644	13863	14931	15138

Tabuľka 2: Vývoj stavu základnej kolekcie vo vybraných rokoch podľa skupín plodín

Plodiny	1997	1999	2000	2002	2003	2005	2006	2008	2009
Obilniny	26	418	620	745	752	902	1067	1101	1103
Zelenina	54	105	121	132	132	133	133	133	133
Strukoviny	131	523	569	749	779	942	961	961	961
Olejniny	136	136	136	138	195	204	207	248	248
Krmoviny	2	67	67	73	73	77	79	83	83
Aromat. a liečivé rast.	9	23	23	28	28	40	42	42	42
Repa	17	17	17	17	49	50	56	56	56
Kvety	26	61	61	61	61	61	61	61	61
Trávy	2	29	45	60	60	63	63	63	63
Kukurica	33	84	129	221	248	410	416	416	416
Priemyselné plodiny	146	148	148	239	239	239	239	239	239
Iné obilniny	0	6	11	14	16	16	16	16	16
CELKOM	582	1617	1947	2477	2632	3137	3340	3419	3421

Tabuľka 3: Výdaj vzoriek semien z aktívnej kolekcie vo vybraných rokoch

Plodiny	1997	1999	2000	2002	2003	2005	2006	2008	2009	Celkom
Obilniny	1	87	66	362	156	2430	910	633	973	5618
Zelenina	0	0	2	76	26	76	48	101	59	388
Strukoviny	0	0	46	28	33	139	126	236	457	1065
Olejniny	0	0	0	36	15	231	30	93	63	468
Krmoviny	0	40	54	112	28	475	81	69	71	930
Arom.a liečivé ras.	0	0	0	0	6	14	38	27	58	143
Repa	0	0	0	0	7	57	8	69	0	141
Kvety	0	0	0	0	16	15	4	2	0	37
Trávy	1	0	0	0	0	52	53	0	24	130
Kukurica	0	0	0	3	1	14	56	54	92	220
Priem. plodiny	0	6	4	13	18	29	42	141	12	265
Iné obilniny	0	0	0	5	4	14	22	25	46	116
Celkom	2	133	172	635	310	3546	1418	1450	1855	9521

Závery

Rozhodujúci prínos Génovej banky SR spočíva v tom, že sa realizujú aktivity vyplývajúce z medzinárodného Dohovoru o biologickej diverzite a plní sa Aktualizovaný akčný plán pre implementáciu Národnej stratégie ochrany biodiverzity na Slovensku. V rámci činnosti riešiteľských pracovísk Národného programu pre ochranu GZR sa plnia ďalšie dôležité úlohy ochrany genetických zdrojov rastlín. S novými genetickými zdrojmi sa neustále pracuje, hodnotia sa podľa príslušných klasifikátorov plodín podľa fenologických, morfologických a agronomických znakov a vlastností. Na základe týchto hodnotení nachádzajú uplatnenie v šľachtení, prípadne v základnom, alebo aplikovanom výskume ako experimentálny biologický materiál.

V oblasti vzdelávania, výchovy a propagácie genetických zdrojov rastlín sa organizujú odborné konferencie a semináre, publikuje sa informačný spravodajca GENOFOND, listovka o Génovej banke SR, poskytujú sa konzultácie, exkurzie a prednášky pre odbornú i laickú verejnosť.

Aktívnou účasťou na medzinárodných akciách, zaoberajúcich sa problematikou ochrany genofondu, propagujú sa dosiahnuté výsledky pri riešení Národného programu v SR. Kurátori plodín pracujú i v rámci Bioversity International v pracovných skupinách ECPGR kde prezentujú výsledky dosiahnuté pri riešení Národného programu.

V súlade s kritériami FAO a Bioversity International sa dodržiava manažment semenných vzoriek genetických zdrojov rastlín v génovej banke podľa kritérií FAO a Bioversity International, plnia sa príslušné metodické pokyny a normy pre zabezpečenie správneho riadenia všetkých aktivít súvisiacich s prácami v Génovej banke SR, aktualizujú sa popisné a pasportné databázy kolekcií. SR, aktualizujú sa popisné a pasportné databázy kolekcií.

Pri výskumných aktivitách spojených s rozširovaním pestovania netradičných plodín sa riešia projekty, v ktorých sa okrem iného využívajú viaceré minoritné plodiny a propaguje sa ich používanie v zdravej výžive.

Príspevok bol pripravený na základe dlhoročných výsledkov dosiahnutých pri riešení Národného programu, ktorý bol financovaný z prostriedkov MPŽPRR SR.
Propagačné aktivity súvisiace s ochranou biodiverzity pre širokú verejnosť boli tiež financované i z projektu v rámci Európskeho regionálneho a rozvojového fondu INTERREG IVC: REVERSE „Regionálna výmena a tvorba politiky pre ochranu a hodnotenie biodiverzity v Európe“.

Poďakovanie: Príspevok bol pripravený na základe dlhoročných výsledkov dosiahnutých pri riešení Národného programu, ktorý bol financovaný z prostriedkov MPŽPRR SR.
Propagačné aktivity súvisiace s ochranou biodiverzity pre širokú verejnosť boli tiež financované i z projektu v rámci Európskeho regionálneho a rozvojového fondu INTERREG IVC: REVERSE No.0500R2 „Regionálna výmena a tvorba politiky pre ochranu a hodnotenie biodiverzity v Európe“.

Literatúra

Benediková D. et al. 2009. Zhromažďovanie, hodnotenie a uchovávanie genetických zdrojov rastlín pre výživu a poľnohospodárstvo. ZS úlohy odbornej pomoci MP SR , CVRV- VURV Piešťany, 152 s.

ENGELS, J. M. M., VISSER, L. 2003 A guide to effective management of germplasm collection. IPGRI Handbooks for Genebanks No.6. IPGRI, Rome, Italy.

FAO/IPGRI. 1994. Genebank Standards, FAO Rome, Italy and IPGRI, Rome, Italy, 13 pp.

JARVIS, D.I., PADOCH, C., COOPER, H. D. Managing biodiversity in agricultural ecosystems, Bioversity International Rome, Italy,2007, ISBN-13: 976-0- 231-13648-8

RAO, N.K., HANSON, J., DULLO, M.E., GHOSH, K., NOWELL, D., LARINDE, M. Manual of seed handling in genebanks. Handbook for genebanks No.8 Bioversity International, Rome, Italy, ISBN 978-92-9043- 740-6, 2006

Adresa autorov:
doc. Ing. Daniela Benediková, PhD., Ing. Michaela Benková, PhD.
Centrum výskumu rastlinnej výroby Piešťany, Bratislavská cesta 122, 921 68 Piešťany benedikova@vurv.sk

POĽNÉ HODNOTENIE GENETICKÝCH ZDROJOV LÁSKAVCA (*AMARANTHUS* L.) NA PESTOVANIE V RASTLINNEJ VÝROBE
FIELD EVALUATION OF AMARANTH (*AMARANTHUS* L.) PLANT GENETIC RESOURCES FOR GROWING IN THE PLANT PRODUCTION

Iveta ČIČOVÁ

Fifteen genetic resources of amaranth (Amaranthus L.) were grown for plant production. The aim of this study is characterize and evaluate phenologically, morphological and agronomic traits of varieties of Amaranthus by used descriptor list: G. J. H. Grubben: Genetic Resources of Amaranths (IBPGR 1981). The variability present morphological traits of amaranth: plant height, stem diameter, leaf number and colour, leaf length and width, leaf shape and margin, stem colour and pubescence, inflorescence length stalk and laterals, inflorescence shape and colour, inflorescence density index, seed colour and shape, branch number. We have evaluated species of amaranth and found out its large variability in plant height (245 – 1645 mm), leaf width (9 - 108 mm), leaf length (66-180 mm) and inflorescence length (485 – 657 mm).
Key words: genetic resources, evaluation, variability, Amaranthus L.

Úvod

Výskum láskavca je zameraný na možnosti jeho využitia v inovácii rastlinnej výroby, v potravinárstve, ale i v energetike. Z viac ako 60 druhov je v našich podmienkach využívané na semeno *A. hypochondriacus, A. cruentus, A. caudatus,* na krmovinárske účely a na nepotravové účely najmä *A. hybridus i A. mantegazzianus,* ako zelenina *A. graecizans*, ako okrasná plodina *A. tricolor* alebo *A. caudatus*. Láskavec je jednoročná rastlina, v závislosti od druhu, odrody a podmienok dorastie do výšky 0,5 - 3,0 i viac metrov. Plodom je tobolka, semeno je malé s hmotnosťou tisícich semien 0,6-1,1g zlatožltej, krémovej až bielej farby, ale i ružovej a čiernej farby. Na Slovensku poznáme láskavec predovšetkým ako burinu alebo ako okrasnú rastlinu, väčšina burinových i okrasných druhov bola k nám zavlečená z Ameriky.

Medzi druhmi ale i genotypmi rodu *Amaranthus* L. sú veľké rozdiely v habite (výška rastlín, vetvenie, výška nasadenia kvetenstva, hmotnosti semien), rozdielna citlivosť na dĺžku dňa, rozdielna tolerancia na sucho, odolnosť voči chorobám a škodcom, vyrovnanosť v dozrievaní a vypadávaní semien. Tieto vlastnosti rozhodujú o vhodnosti genotypu pre určité pestovateľské podmienky, spôsobe pestovania a spôsobe využitia. Úrody zrna láskavca sú vysoko variabilné a závisia od mnohých faktorov.

Zo štúdia literárnych prameňov chorôb rodu *Amaranthus* L., láskavec napádajú tieto choroby: poruchy vzchádzania a padanie mladých rastlín spôsobujú parazitické huby rodu *Pythium, Rhizoctonia, Fusarium, Aphanomyces.* Tieto huby poškodzujú korene a stonky pod povrchom pôdy. Rastliny sú potom slabé, padajú a odumierajú. K napadnutiu dochádza hlavne v ťažkých zlievavých pôdach, po vytvorení pôdneho prísušku, pri nadmernom zamokrení pôdy, alebo ak pôda nie je dostatočne prehriata. K napadnutiu odrôd láskavca hubami rodu *Fusarium* dochádza najčastejšie po vzídení rastlín až do fázy vetvenia stoniek. Na konci vegetácie je možné vidieť šedé škvrny s tmavou obrubou spôsobené hubami. Rovnaké huby môžu napádať i súkvetia. Na dozrievajúcich súkvetiach sa vyskytujú v hustých porastoch huby *Botrytis* ssp., *Fusarium* spp. a *Alternaria* ssp., ktoré môžu nepriaznivo ovplyvniť kvalitu semien.

Úlohou novej výskumnej úlohy je určiť vhodné odrody pre rastlinnú výrobu v daných klimatických podmienkach a otestovať novozískané odrody na pestovanie na zrno a na biomasu, podrobné štúdium a hodnotenie jednotlivých odrôd z hľadiska fenologických, morfologických a hospodárskych znakov v poľných pestovateľských podmienkach.

Materiál a metódy

V predloženej práci bolo hodnotených 15 genetických zdrojov láskavca, ktoré boli vysiate na pozemkoch Centra výskumu rastlinnej výroby v Piešťanoch. V sledovanom roku 2010 bol výskum zameraný na adaptáciu odrôd v poľných podmienkach a hodnotenie podľa medzinárodného klasifikátora: G. J. H. Grubben: Genetic Resources of Amaranths (IBPGR 1981).

Hodnotenie rastlín sa sústredilo na:

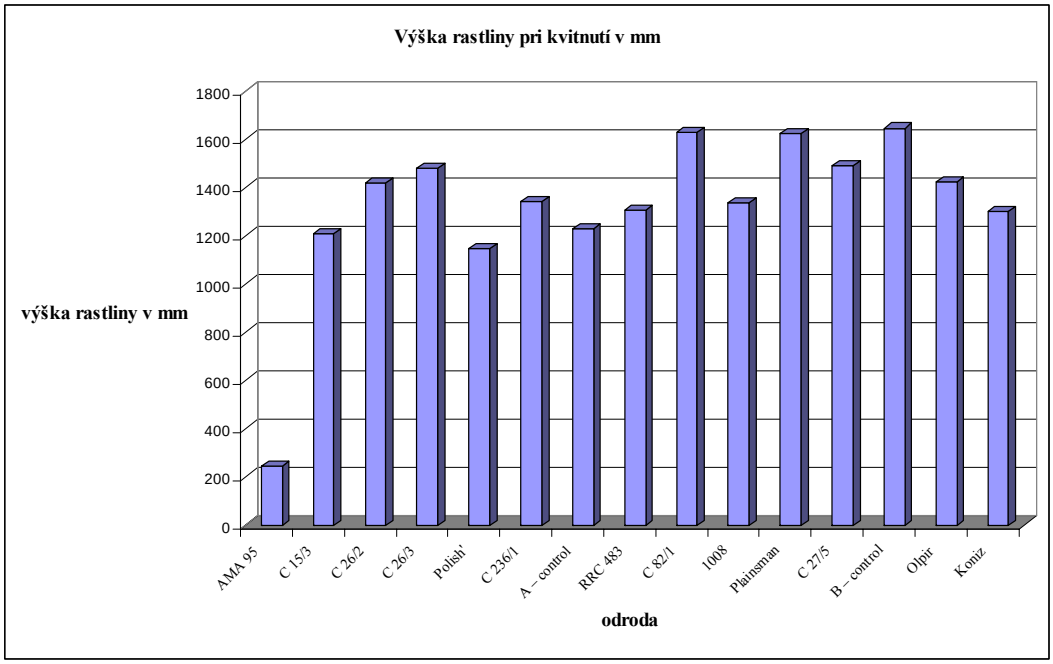
1. Nástup fenologických fáz (vzchádzanie, vytváranie pravých listov, formovanie kvetenstva, mliečna, vosková a fyziologická zrelosť).
2. Morfologické znaky (hodnotenie podľa medzinárodného klasifikátora)
3. Produkčné znaky
4. Choroby a škodcovia láskavca

Zoznam hodnotených odrôd: AMA 95 (*A. muricatus*), C 15/3 (*A.cruentus*), C 26/2 (*A.cruentus*), C 26/3 (*A.cruentus*), Polish' (*A. cruentus*), C 236/1 (*A.cruentus*), A – control (*A.cruentus*), RRC 483 (*A.cruentus*), C 82/1 (*A.cruentus*), 1008 (*A.hypochondriacus*), Plainsman (*A.hypochondriacus*), C 27/5 (*A.cruentus*), B – control (hybrid K-433), Olpir (*A.cruentus*), Koniz (*A.hypochondriacus*).

Výsledky a diskusia

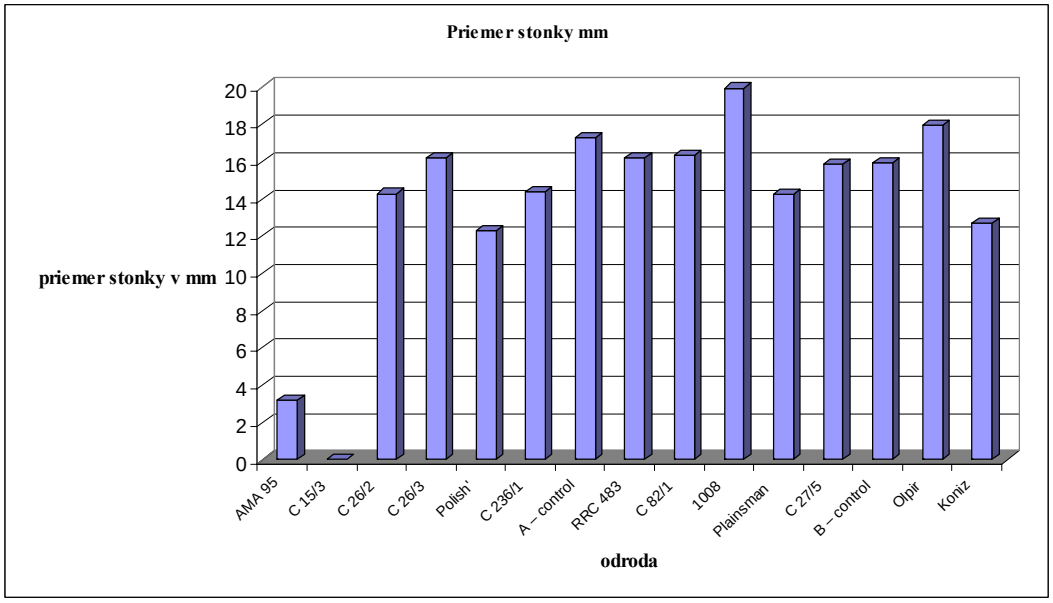
Zo sledovaných znakov v roku 2010 bola hodnotená výška rastlín. Najvyššou odrodou v roku 2010 bola B-control, ktorá dosiahla výšku 1645 mm a druhá najvyššia bola C 82/1 (1628 mm) a tretia bola odroda Plainsman (1621 mm). Najnižším genotypom bol AMA 95 (245 mm). Meranie výšky sa robilo vo fáze plného kvitnutia podľa medzinárodného deskriptora.

Graf 1.



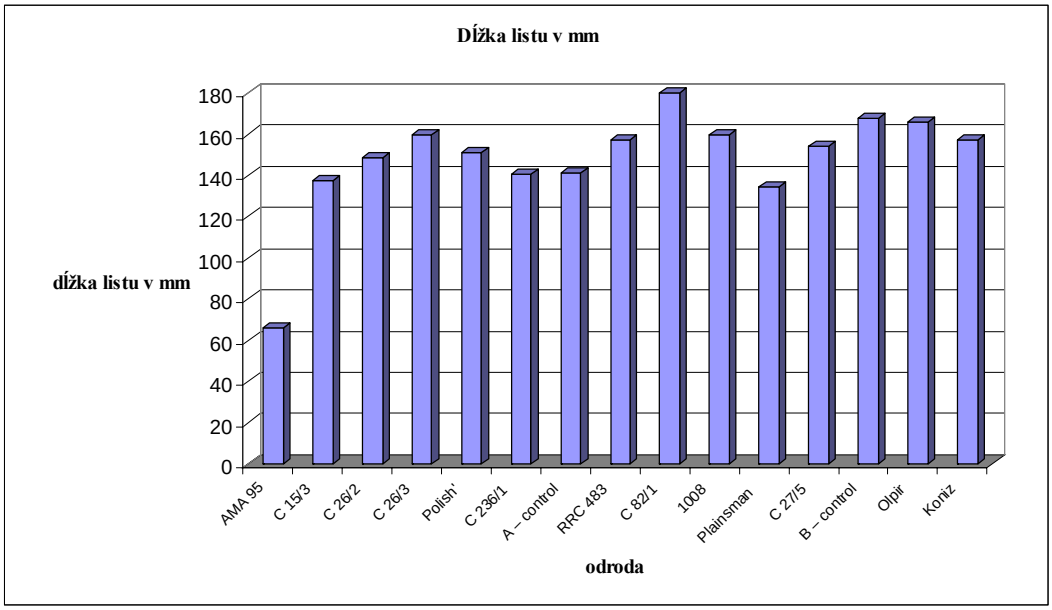
Druhým meraným znakom podľa deskriptora je priemer stonky meraný v mm. Ako vidieť z grafu 2. najhrubšiu stonku mali odrody 1008 (19,94 mm), Olpir (17,98 mm) a genetický zdroj A-control (17,3 mm). Tento znak sa meria na stonke medzi 6-8 pravým listom. Má význam hlavne u druhov určených na energetické využitie.

Graf 2.



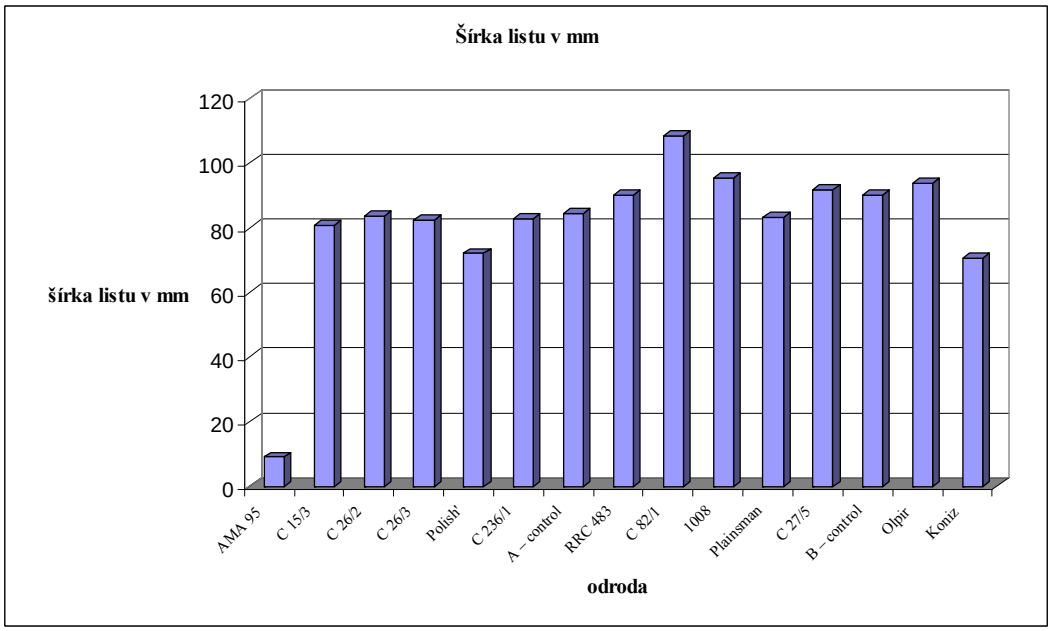
Podľa deskriptora sa meria aj list a to jeho dĺžka a šírka v milimetroch, pričom šírka listovej čepele a počet listov súvisí s veľkosťou listovej plochy. Z grafického zobrazenia výsledkov vidíme, že najdlhší list mali genetické zdroje C 82/1 (180 mm), B-control (167,5 mm) a Olpir (166 mm). Práve u tohto meraného znaku sa prejavila vysoká variabilita. Namerané hodnota sa pohybovali od 66 mm do 180 mm.

Graf 3.



Šírka listu patrí medzi merané morfologické znaky podľa grafu vidieť najširší list mal hodnotený genetický zdroj C 82/1 (182,5 mm), 1008 (95,5 mm) a Olpir (93,7 mm). Najužší list mal genetický zdroj AMA 95 (9 mm).

Graf 4.

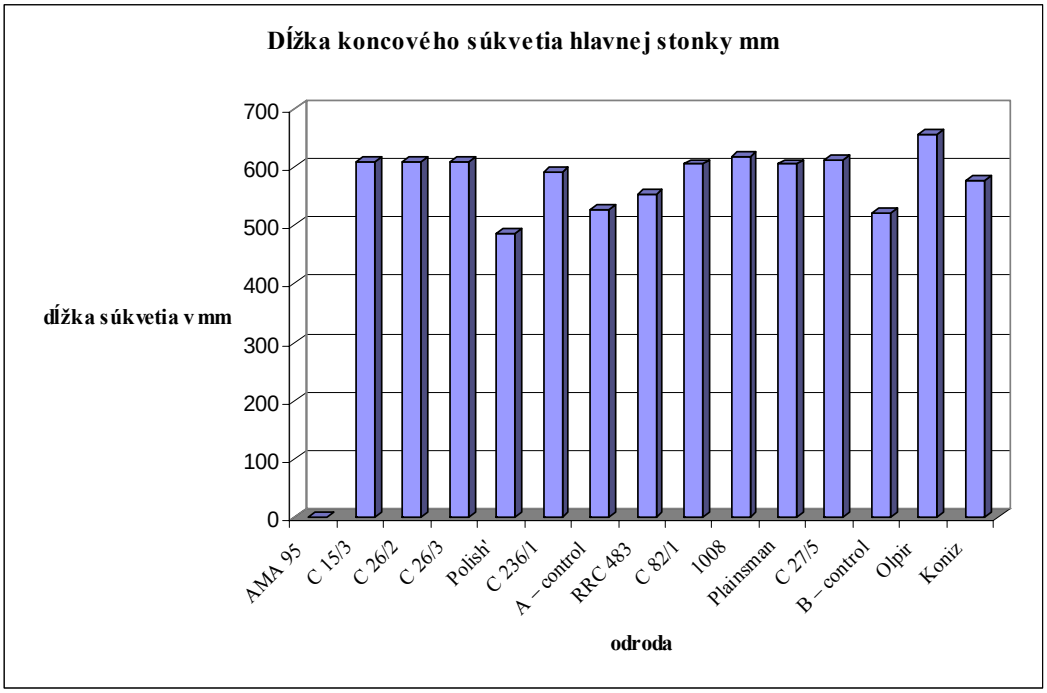


Významným znakom je dĺžka koncového súkvetia. Najväčšie súkvetie v roku 2010 mala česká odroda Olpir (657 mm), potom americká povolená odroda Plainsman (619 mm) a genetický zdroj C27/5 (612 mm).

Najvyššia variabilita sa prejavila v znaku šírka listu od 9 mm až do 182,5 mm čo je dvadsať - násobok. Vysokú variabilitu v poľnom hodnotení uvádza aj Wu et al. (2000), ktorí hodnotili 20 genetických zdrojov a zistili vysokú citlivosť na dĺžku dňa, genetické zdroje boli menej náchylné na choroby a škodcov v porovnaní s povolenými odrodami a vysokú variabilitu v agronomických znakoch v závislosti od pestovateľskej oblasti. Preto je dôležité zistiť vhodné odrody na introdukciu do rastlinnej výroby v pestovateľských podmienkach Slovenska. Výsledky výskumu Varalakshmi (2004) tiež dokazujú vysokú variabilitu poľných hodnotení, ktorý skúmal variabilitu 46 genetických zdrojov láskavca a nameral nasledovné hodnoty: výška rastlín (310-815 mm), dĺžka súkvetia (50-500 mm), šírka listov (30-120 mm). Variabilitu 11,76-57,48 % od priemerných hodnôt vo výške rastlín a v priemere stonky zistili autorský kolektív Shukla et al. (2006). Výška rastlín bola veľmi variabilná i vo výskume Berti et al. (1996), ktorí skúmali 30 genetických zdrojov vo fáze dozrievania a zistili výšky rastlín od 1110 -2470 mm. Autorský kolektív Mapes et al. (1996), merali 18 morfologických znakov 14 genetických zdrojov láskavca v poľných

podmienkach a zistili variabilitu 37,8 % pri znaku dĺžka listu.

Graf 5.



Záver

V práci sú prezentované výsledky hodnotenia láskavca v roku 2010 z hľadiska morfologických znakov na jeho vhodné využitie v rastlinnej výrobe. Z doterajších výsledkov hodnotenia vyplývajú tieto závery: vysoká variabilita láskavca sa prejavila vo výške rastlín od 245 mm do 1628 mm, priemer stonky varíroval od 3,18 mm do 19,94 mm, vysoká variabilita v šírke listov od 9 mm do 108,2 mm, pri znaku dĺžka listov bol nameraný interval od 66,2 mm do 180 mm, dĺžka koncového súkvetia sa pohybovala od 485 mm do 657 mm.

Láskavec je vhodný do podmienok slovenského poľnohospodárstva, niektoré odrody a genetické zdroje dozrievajú koncom septembra – začiatkom októbra (neskoré odrody). Počas vegetácie boli porasty láskavca ošetrované prípravkom Vaztak 10 EC (proti skočkám) a prípravok Novozir MN 80 (ošetrenie proti hubovým chorobám).

Poďakovanie: Táto práca bola podporovaná Agentúrou na podporu výskumu a vývoja na základe zmluvy č. VMSP - P - 0143 -09.

Literatúra

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.

BERTI, M. – SERRI, R. – WILCKENS, R. – FIGUEROA, I.: Field evaluation of grain amaranth in Chile. In: Progress in new crops; ASHS Press, Alexandria, 1996, p.223-226.

SHUKLA, S. – BHARGAVA, A. – CHATTERJEE, A. – SRIVASTAVA, a. – SINGH, S.P.: Genotypic variability in vegetable amaranth (Amaranthus tricolor L.) for foliage yield and its contributing traits over successive cuttings and years. In: Euphytica, 2006, vol.151, p.103-110.

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.

Adresa autora:
Iveta Čičová, CVRV Bratislavská cesta 122, 92168 Piešťany, e-mail: cicova@vurv.sk

VPLYV TEPLOTNÉHO STRESU A OBSAHU ß-D-GLUKÁNU NA ŽIVOTASCHOPNOSŤ SEMIEN OVSA SIATEHO
EFFECT OF HEAT STRESS AND CONTENT OF ß-D-GLUCAN ON OAT SEED VIABILITY

Ľubomíra DEÁKOVÁ – Michaela HAVRLENTOVÁ – Alžbeta ŽOFAJOVÁ – Peter HOZLÁR

*Cereal ß-D-glucan is a unique natural ingredient.It is a water soluble linear homopolysacharid of cell walls consisting of D-glucopyranosyl units connected with a mixture of ß-(1-3) and ß-(1-4) bonds. Its content depends on the cell development. It has an excellent functional and nutritional properties and also the broad scope sphere of action in the human and animal body. In this work, we evaluated a set of eight oat genotypes, 4 naked and 4 hulled in terms of the content of ß-D-glucan and its significance in protecting plants against thermal stress factor. At the test options, naked oat genotypes contained more ß-D-glucan in the seed (4.56%) rather than hulled genotypes (3.50%). We observed that the naked oat genotypes are better adapted to environmental conditions and responded more plastic to a higher temperature. Higher temperature in general (in both oat groups) increased the content of ß-D-glucan. By statistical evaluation of the results, we found that in the ß-D-glucan content in hulled oats duration of the heat stress (7 or 14 days), temperature (20, 30, 40, 50, and 60 °C),oat variety as well as their interactions are significant sources of variability. In naked oat, temperature and variety were parameters showing statistically highly significant variation. Also, the interaction of heat stress exposure time and temperature, as well as temperature and variety were important sources of variability. We observed a statistically highly significant negative correlation relationship (r=-0.98** for naked and r=-0.7 ** for hulled oats, P<0.05) between germination and temperature. We have noted a correlation coefficient r=+0.55 between the content of ß-D-glucan and germination in naked oats, upon which we can assume that a higher content of ß-D-glucan in naked oat seeds has a protective character in the heat stress.*
Key words: ß-D-glucan, oat, heat stress, function

Úvod

ß-D-glukán sa dostáva do povedomia ľudí najmä ako zdraviu prospešná látka izolovaná prevažne z húb, kvasiniek, baktérií alebo rias, príp. obilnín ako jačmeň a ovos. Terapeutický účinok ß-D-glukánu je pestrý, od využitia ako výživový doplnok až po konkrétne zdraviu-prospešné účinky. Menej sa už študuje ako polysacharid bunkovej steny, pritom v rastlinnej bunkovej stene plní nielen architektonickú funkciu, ale je aj významným zdrojom zásob energie (glukózy) pre vyvíjajúce sa klíčky. Jeho metabolizmus zodpovedá do značnej miery za odpoveď rastliny na environmentálne signály mierneho, fyziologického rozsahu, teda dá sa predpokladať aj jeho protektívny charakter. Najvýznamnejšími zdrojmi obilninového (1-3, 1-4) ß-D-glukánu sú ovos a jačmeň (Havrlentová & Kraic 2006). ß-D-glukánje lineárne homopolysacharid D-glukopyranózových zvyškov prepojené zmesou ß-(1-3) a ß-(1-4)-glykozidických väzieb (Wood et al. 1991). V najvyššej miere je prítomný v endosperme bunkových stien, tvorí 75% z obsahu bunkových stien neškrobového endospermu (Miller et al. 1995), pričom v subaleurónovej vrstve otrúb je ho najviac (Wood et al. 1991). Obsah ß-D-glukánu v obilninových matriciach závisí od genotypu a prostredia (Havrlentová 2009), taktiež od obsahu dusíka v pôde a zrážkových pomerov (Hlinková 2009). Využitie ovsa je široké najmä pre jeho vysokú kŕmnu a nutričnú kvalitu, fytosanitárne účinky, nízku ekonomickú náročnosť pestovania, vysoký obsah potravinovej vlákniny a ß-D-glukánu, nenasýtených mastných kyselín, vitamínov, minerálnych prvkov, prírodných antioxidantov (avenantramidov) a pod.

Materiál a metódy

V práci sme pracovali so semenami odrôd ovsa siateho, ktoré sme získali z Výskumno-šľachtiteľskej stanice (VŠS) Vígľaš - Pstruša (okres Detva, stredné Slovensko), kde boli pestované v roku 2009. Pôdno-klimatické podmienky Výskumno-šľachtiteľskej stanice Vígľaš - Pstruša predstavujú zemiakovú výrobnú oblasť, podtyp pšeničný s pôdnym typom podzolová hnedozem a nadmorskou výškou 375 m.n.m. Priemerná ročná teplota je 8,0 °C a 14,38 °C počas vegetácie. Priemerné ročné zrážky na tejto lokalite sú 666 mm, 382,5 mm počas vegetácie.Použili sme štyri genotypy nahého ovsa: Tatran, Detvan, Izak a Avenuda a štyri genotypy plevnatého ovsa: Zvolen, Vendelin, Valentin a Atego. Semená sme vystavili teplotnému stresu (20, 30, 40, 50 a 60 °C) po dobu 7 a 14 dní. Obsah β-D-glukánu sme stanovili v kontrolných vzorkách i v stresovaných pomocou analytického kitu „Mixed-linkage beta-glucan assay procedure“ (Megazyme, Ireland).Klíčivosť sme stanovili podľa „Metodiky skúšania osiva a sadiva“ (ÚKSUP 1999) a údaje sme spracovali pomocou analýzy rozptylu a metódou najmenších štvorcov (Statgraphics 5.0).

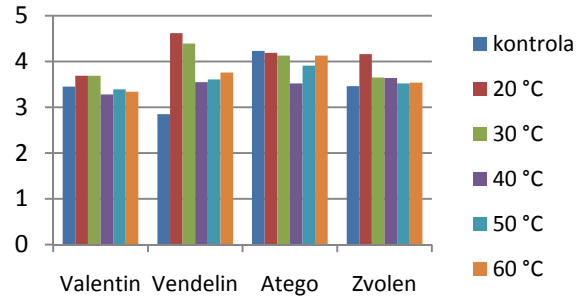
Výsledky a diskusia

Obsah sledovaného polysacharidu sme stanovili v troch analýzach a jeho priemerný obsah v jednotlivých plevnatých ovsoch bol nasledovný: Zvolen 3,46 %, Vendelin 2,85 %, Valentin 3,45 % a Atego 4,23 %.

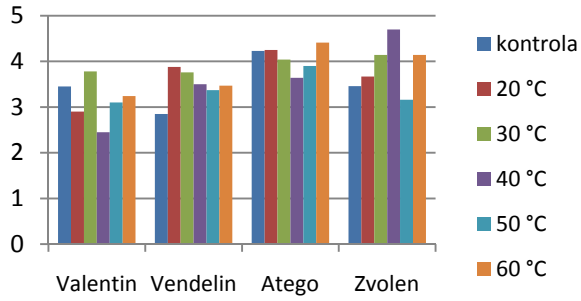
V prípade nahých ovsov bol obsah β-D-glukánu nasledovný: Tatran 4,18 %, Detvan 4,05 %, Izak 5,36 % a Avenuda 4,63 %. Priemerný obsah β-D-glukánu v plevnatých genotypoch bol 3,50 % a v nahých 4,56 %. Zistili sme, že nahý ovos disponuje v priemere vyšším obsahom β-D-glukánu ako plevnatý ovos. Obdobné výsledky získali aj iní autori (napr. Havrlentová et al. 2008). Jednotlivé genotypy ovsa, nahé i plevnaté sme vystavili teplotnému stresu a následne sme ich analyzovali na obsah β-D-glukánu. Obsah β-D-glukánu v jednotlivých meraniach (pracovali sme v dvoch paralelných meraniach) a priemerný obsah v jednotlivých teplotách je znázornený v obrázkoch 1 a 2 pre plevnaté a obrázkoch 3 a 4 pre nahé ovsy. Pre sledovanie predpokladaného protektívneho účinku sledovaného polysacharidu sme zrná po vystavení teplotnému stresu podrobili stanoveniu životaschopnosti.

Po vystavení teplotnému stresu na 7 dní, najväčšia zmena obsahu β-D-glukánu je pozorovateľná pri 40 °C (obr. 1). Pri plevnatých genotypoch Vendelin a Atego pozorujeme trend klesania obsahu po túto teplotu oproti kontrole, potom nastáva mierny nárast v obsahu. Výnimkou v tomto trende je plevnatý genotyp Zvolen, v ktorom po teplotu 40 °C obsah β-D-glukánu rastie, pričom obsah β-D-glukánu pri 40 °C je oveľa vyšší ako pri ostatných teplotách. Potom nasleduje prepad pri teplote 50 °C a následne zasa vzrast. Pri genotype Valentin tento trend narúša obsah β-D-glukánu pri 30 °C, ktorý je výrazne vyšší ako pri ostatných teplotách. V porovnaní s kontrolami obsah β-D-glukánu v skúmaných vzorkách je vyšší pri genotypoch Vendelin a Zvolen. Pri genotypoch Valentin a Atego bol obsah β-D-glukánu v kontrole vyšší ako obsah v skúmaných vzorkách vystavených teplotnému stresu. Veľmi zaujímavá je reakcia plevnatého ovsa Atego, ktorý sa v kontrolnom variante vyznačuje podstatne vyšším obsahom β-D-glukánu v porovnaní s ostatnými plevnatými ovsami. V prípade teplotného stresu pri tomto genotype pozorujeme približne ustálený stav v obsahu sledovanej látky v jednotlivých teplotách. Je možné, že práve priemerný vyšší obsah β-D-glukánu v kontrolnom variante spôsobil takúto reakciu.

Vo vzorkách vystavených teplotnému stresu po dobu 14 dní (obr. 2) je vývin obsahu β-D-glukánu v plevnatých genotypoch Vendelin a Atego porovnateľný s vývinom obsahu vo vzorkách vystavených teplotnému stresu po dobu 7 dní, tj. teplotný stres akoby nemal výrazný vplyv na obsah sledovanej látky. Pri genotype Vendelin sa obsah sledovanej látky nedostane pod úroveň obsahu danej látky v kontrole, na rozdiel od genotypu Atego, kde obsah β-D-glukánu vo vzorkách vystavených pôsobeniu teplotného stresu nenarastie nad úroveň obsahu β-D-glukánu v kontrolnej vzorke. Pri 14 dňovom teplotnom strese v genotype Zvolen obsah β-D-glukánu rastie po teplotu 40 °C, pričom pri tejto teplote je obsah β-D-glukánu oveľa vyšší ako v kontrole, nasleduje prepad pri teplote 50 °C a následne znova vzrast v obsahu danej látky. Taktiež v plevnatom genotype Valentin je výrazný vyšší obsah β-D-glukánu oproti kontrole pri teplote 30 °C po vystavení vzorky teplotnému stresu počas 14 dní, pri ostatných teplotách je obsah sledovanej látky nižší ako v kontrole.

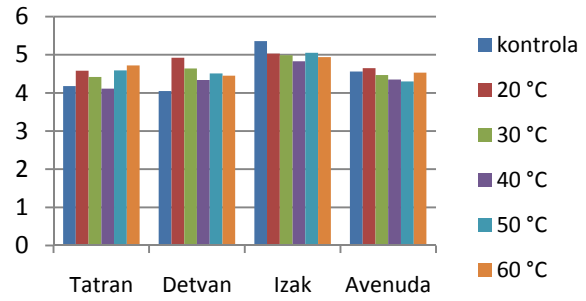


Obr. 1: Obsah β-D-glukánu vo vzorkách plevnatých genotypov po vystavení teplotnému stresu na 7 dní

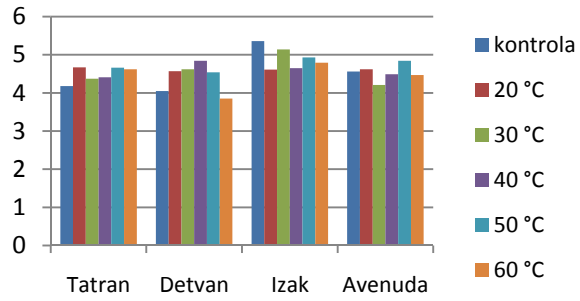


Obr. 2 : Obsah β-D-glukánu vo vzorkách plevnatých genotypov po vystavení teplotnému stresu na 14 dní

Celkovo môžeme zhodnotením obsahu β-D-glukánu pri nahých ovsoch (obr. 3) a teplotných stresoch pôsobiacich po dobu 7 dní konštatovať, že všetky hodnotené ovsy okrem genotypu Izak mali najvyšší obsah danej látky pri teplote 20 °C a najnižší pri teplote 40 °C. Izak, ktorý sa vyznačoval najvyšším obsahom sledovanej látky pri kontrolnom variante, sa vyznačoval viac-menej vyrovnaným obsahom sledovaného polysacharidu pri jednotlivých teplotných stresoroch.



Obr. 3: Obsah β-D-glukánu vo vzorkách nahých genotypov po vystavení teplotnému stresu na 7 dní



Obr. 4: Obsah β-D-glukánu vo vzorkách nahých genotypov po vystavení teplotnému stresu na 14 dní

Celkovo môžeme konštatovať, že obsah β-D-glukánu v nahých ovsoch je viac stabilný a menej variabilný v porovnaní s plevnatými pri vystavení teplotným stresorom. Ku trendu, akým reagovali nahé ovsy môžeme zaradiť aj plevnatý ovos Atego, ktorý sa z plevnatých ovsov vyznačoval najvyšším obsahom sledovaného metabolitu. Na základe tohoto môžeme predpokladať, že β-D-glukán chráni rastlinu, chráni semeno pred abiotickými stresormi prostredia. Túto skutočnosť dokázali viacerí autori (napr. Hoson 1998; Buckeridge et al. 2004; Farrokhi et al. 2006). Determinovali β-D-glukán ako plysacharid bunkovej steny druhov radu Poales, ktorý sa vyskytuje v epidermálnych vrstvách buniek, kde pôsobia stresy vonkajšieho prostredia (Buckeridge et al. 2004).

Semená ovsa sme po vystavení teplotnému stresu naklíčili. Takisto sme pracovali v dvoch paralelkách. Priemerná klíčivosť plevnatých genotypov bola pri 20 °C celkovo 99,44 %, pri 30 °C 98, 75 %, pri 40 °C 98,06 %, pri 50 °C 97,69 % a pri najvyššej teplote 60 °C bola 97,31 %. Celková priemerná klíčivosť plevnatých genotypov bola 98,20 %. Môžeme konštatovať, že celková klíčivosť s rastúcou teplotou klesala, tj. zvýšená teplota sa prejavila ako negatívny stresový faktor pôsobiaci na životaschopnosť semien ovsa plevnatého typu. Priemerná klíčivosť nahých genotypov bola pri 20 °C 98,13 %, pri 30 °C 98,69 %, pri 40 °C 98,19 %, pri 50 °C 97,50 % a pri 60 °C 94,13 %. Celková priemerná klíčivosť nahých genotypov ovsa siateho bola 97,33 %. Klíčivosť nahých genotypov ovsa sa držala približne na rovnakej hladine pri teplotách od 20 °C po 50 °C a pri teplote 60 °C nastal následne výrazný pokles klíčivosti. Aj tieto výsledky nám môžu čiastočne evokovať, že vyšší obsah β-D-glukánu, ktorým sa semená nahých ovsov vyznačujú, môže mať istý protektívny charakter.

Štatistickým vyhodnotením získaných výsledkov na základe analýzy rozptylu sme zistili, že pre obsah β-D-glukánu je v prípade plevnatých ovsov významným zdrojom premenlivosti doba a vysoko významnými zdrojmi premenlivosti sú teplota a odroda (tab. 1). Takisto sú podľa analýzy rozptylu štatisticky vysoko významné vzájomné interakcie medzi dobou, teplotou a odrodou. V prípade nahých ovsov sú teplota a odroda parametre, ktoré sa prejavili štatisticky vysoko významne na variabilite v obsahu sledovaného metabolitu. Taktiež interakcie doba pôsobenia teplotného stresu (7 alebo 14 dní) a teplota, tiež teplota a odroda sú vysoko významným zdrojom premenlivosti (tab. 2).

Dedivosť obsahu β-D-glukánu je v rozmedzí 0,27 až 0,58 (Holthaus et al. 1996) a teda jeho celkový obsah je ovplyvnený ako genetickými, tak i ekologickými činiteľmi (Ames 2002). Mnohí autori dokázali, že interakcia genotyp x prostredie je významne preukazným zdrojom variácie v obsahu danej látky (Havrlentová 2009; Hlinková 2009 a ďalší), aj keď genotyp je prostrediu nadradený (Peterson et al. 1995). Práve aj teplotný stres v našom prípade sa mohol prejaviť ako faktor prostredia vplývajúci na obsah sledovanej látky.

Záver

Nahé genotypy obsahovali 4,56 % β-D-glukánu a plevnaté 3,50 %. Nahé genotypy sa lepšie prispôsobovali podmienkam prostredia, plastickejšie reagovali na vyššiu teplotu a vyššia teplota zvyšovala obsah β-D-glukánu. Pre obsah β-D-glukánu v plevnatých ovsoch je významným zdrojom premenlivosti doba a vysoko významnými zdrojmi premenlivosti sú teplota, odroda a vzájomné interakcie medzi dobou, teplotou a odrodou. Pre obsah β-D-glukánu v nahých ovsoch sú vysoko významnými zdrojmi premenlivosti teplota, odroda a vzájomné interakcie medzi dobou a teplotou a teplotou a odrodou. Čo sa týka korelačných vzťahov medzi obsahom β-D-glukánu a klíčivosťou, v prípade nahých ovsov sme zaznamenali hodnotu r = 0,55 a v prípade plevnatých 0,10. na základe toho môžeme predpokladať, že vyšší obsah β-D-glukánu v semenách nahých ovsov má ochranný charakter pri teplotnom strese.

Tabuľka 1: Analýza rozptylu klíčivosti plevnatých odrôd ovsa

Zdroje premenlivosti	Suma štvorcov	Df	Priemerné štvorce	P-hodnota
Hlavné efekty				
A:doba	115,2	1	115,2	0,0010
B:teplota	216,175	4	54,0438	0,0007
C:odroda	211,45	3	70,4833	0,0003
D:opakovanie	0,2	1	0,2	0,8852
Interakcie				
AB	41,675	4	10,4188	0,3677
AC	36,9	3	12,3	0,2859
BC	131,925	12	10,9938	0,3373
Chyba	484,025	51	9,49069	
Spolu (korigované)	1237,55	79		

Tabuľka 2: Analýza rozptylu klíčivosti nahých odrôd ovsa

Zdroje premenlivosti	Suma štvorcov	Df	Priemerné štvorce	P-hodnota
Hlavné efekty				
A:doba	11,25	1	11,25	0,1391
B:teplota	43,05	4	10,7625	0,0868
C:odroda	112,3	3	37,4333	0,0003
D:opakovanie	1,8	1	1,8	0,5505
Interakcie				
AB	21,0	4	5,25	0,3890
AC	13,85	3	4,61667	0,4347
BC	65,45	12	5,45417	0,3846
Chyba	254,1	51	4,98235	
Spolu (korigované)	522,8	79		

Poďakovanie: Úloha bola realizovaná s finančnou podporou projektu „BIFUGEN - Biologická a funkčná diverzita genofondu rastlín pre zvýšenie pridanej hodnoty poľnohospodárskej produkcie“ zo zdrojov MP SR.

Literatúra

AMES, N. The effect of genotype, environment, and genotype by environment interaction on oat processing and end product quality characteristics: výskumná správa. Manitoba : ARDI Project: #98-204. Manitoba Agriculture, Food and Rural Initiatives. 2002, p. 10.

BUCKERIDGE, M. S., RAYON, C., URBANOWICZ, B., TINÉ, M. A. S., CARPITA, N. C. Mixed linkage (1→3),(1→4)-β-D-glucans of grasses. In Cereal Chemistry. ISSN 0009-0352, 2004, 81, 1, p.115-127

FARROKHI, N., BURTON, R. A., BROWNFIELD, L., HRMOVA, M., WILSON, S. M., BACIC, A., FINCHER, G. B. Plant cell wall biosynthesis: genetic, biochemical and functional genomics approaches to the identification of key genes. In Plant Biotechnology Journal. ISSN 1467-7652, 2006, 4, p. 145-167

HAVRLENTOVÁ, M. Variabilita v obsahu polysacharidovej bunkovej steny a v dĺžke mikrosatelitnej DNA ovsa siateho: doktorantská dizertačná práca. Nitra: UKF, 2009. 131 s.

HAVRLENTOVÁ, M. ČERTÍK, M., KRAIC, J. (1→3)(1→4)-β-D-glucan: Variability and factors affecting its content in oat grain. In Chemické listy. ISSN 0009-2770, 2008, 102, p. 649-650

HAVRLENTOVÁ, M., KRAIC, J. Content of beta-D-glucan in cereal grains. In Journal of Food Research and Nutrition. ISSN 1336-8672, 2006, 45, 1, p. 97-103

HLINKOVÁ, A. Vplyv dusíka a selénu na obsah β-D-glukánu v zrne ovsa siateho (Avena sativa L.): diplomová práca. Trnava: UCM, 2009, 84 s.

HOLTHAUS, J. F., HOLLAND, J. B., WHITE, P. J., FREY, K. J. Inheritance of β-glucan content of oat grain. In Crop Science. ISSN 1435-0653, 1996, 36, p. 567-572

HOSON, T. Apoplast as the site of response to environmental signals. In Journal of Plant Research. ISSN 0918-9440, 1998, 111, p. 167-177

MILLER, S. S., FULCHER, R. G., SEN, A., ARNASON, J. T. Oat endosperm cell walls: I. Isolation, composition, and comparison with other tissues. In Cereal Chemistry. ISSN 0954-3007, 1995, 72, p. 421–427

PETERSON, D. M., WESENBERG, D. M., BURRUP, D. E. β-Glucan content and its relationship to agronomic characteristics in elite oat germplasm. In Crop Science. ISSN 1435-0653, 1995, 35, p. 965-970

WOOD, P. J., WEISZ, J., FEDEC, P. 1991. Potential for b-glucan enrichment in brans derived from oat (Avena Sativa L) cultivars of diferent (1→3), (1→4)-beta-D-glucan concentrations. In Cereal Chemistry. ISSN 0954-3007, 1991, 68 p.48-51

Adresa autorov:
Bc. Ľubomíra Deáková, Katedra biotechnológií FPV UCM Trnava, Námestie J. Herdu 2, 917 01 Trnava, Slovenská republika, deuska11@gmail.com
RNDr. Michaela Havrlentová, PhD., Ing. Alžbeta Žofajová, PhD., Centrum výskumu rastlinnej výroby Piešťany – Výskumný ústav rastlinnej výroby Piešťany, Bratislavská cesta 122, 921 68 Piešťany, Slovenská republika, havrlentova@vurv.sk, zofajova@vurv.sk
Ing. Peter Hozlár, PhD., Výskumno-šľachtiteľská stanica Vígľaš-Pstruša, 962 12 Detva, Slovenská republika, hozlar@vurv.sk

SÚČASNÉ TRENDY VO VÝSKUME A ŠĽACHTENÍ OVSA V EURÓPE A VO SVETE
PRESENT TRENDS IN OAT RESEARCH AND BREEDING IN EUROPE AND WORLD

Peter HOZLÁR – Michaela HAVRLENTOVÁ – Daniela DVONČOVÁ

The main goal of oat breeding is the release of human and animal quality oat varieties with high ecostability for all zones of European oat cropping. In human consumption is main goal oat varieties with high betaglucan and avenananthramides content and low trichothecens content. In animal consumption is main goal high metabolised energy varieties (husked low lignin oats and naked high oil oats).
Key words:oat research and breeding, food and feed quality, beta-glucans, metabolized energy.

Úvod

Ovos a raž sú jedinými majoritnými svetovými plodinami, ktoré zaznamenali za posledných 50 rokov taký dramatický pokles produkcie. Napriek tomu produkcia ovsa je za posledných 10 rokov stabilná a dokonca vykazuje mierny nárast. Najväčším svetovým producentom je EÚ nasledovaná Ruskom, Kanadou, USA, Austráliou a Čínou (Agri-Food Canada 2010). V súčasnosti 9 krajín zabezpečuje 80% svetového obchodu s ovsom. 85% exportu zabezpečuje Kanada, Švédsko, Fínsko a Austrália a 77% importu USA, Nemecko, Španielsko a Mexiko (Strychar 2010). Hlavné trendy v produkcii ovsa sú nasledovné: najväčšie investície do produkčných a spracovateľských technológií mimo EÚ sú zaznamenávané v Kanade, USA a Austrálii. Vysoká a stabilná produkcia je v západnej Európe (Írsko, Veľká Británia, Francúzsko, Nemecko), ale s vysokou konkurenciou ostatných plodín. Veľmi stabilná je produkcia v severnej Európe s pomaly klesajúcou tendenciou a dlho stagnujúcimi úrodami (Nórsko, Švédsko, Fínsko), ale masívnymi investíciami vo všetkých aspektoch produkcie ovsa. Stabilnú produkciu vykazuje východná Európa (Poľsko, Česko, Slovensko), ale s tendenciou poklesu úrod, čo vytvára predpoklad na vstup moderných produkčných a spracovateľských technológií. Stabilné pestovateľské plochy s tendenciou vyšších investícií do produkcie a spracovania ovsa vykazuje južná Európa (Španielsko, Turecko) (Beuch 2010).

Základne predpoklady na smerovanie výskumu a šľachtenia ovsa pre ľudskú výživu a spotrebu.

V súčasnosti, keď kardiovaskulárne ochorenia sú na prvom mieste ochorení vo svete a spôsobujú až tretinu úmrtí, celkovo 17,5 mil. ročne (2005) už nikto nespochybňuje úlohu betaglukánu v redukcii rizika srdcovocievnych chorôb. Po mnohých štúdiách potvrdzujúcich, že denný príjem 3g betaglukánu znižuje hladinu cholesterolu a súčasne upravuje aj krvnú glukózu boli tieto odporúčania potvrdené významnými autoritami v roku 1997 FDA (Food and Drug Administration, následne mnohými národnými autoritami a v roku 2006 aj EFSA (European Food Safety Autority). Mnohé štúdie v zahraničí ale aj nedávna štúdia pilotného experimentu v SR na OKL-VVÚCHP Nová Polianka v roku 2007 (Edenpharma 2009) potvrdzujú vyššiu účinnosť cereálneho betaglukánu oproti fungálnemu. Pre získavanie cereálneho betaglukánu z ovsa oproti jačmeňu nahráva fakt, že pri ovse je tento koncentrovaný v povrchových vrstvách endospermu, ale pri jačmeni býva rovnomerne rozložený v rámci celého endospermu. Takto sa vysoký obsah betaglukánu v odrodách ovsa stáva jedným zo základných šľachtiteľských cieľov pre ovos v humánnej výžive.

Z hľadiska ľudskej výživy menej významnými ale nemenej dôležitými cieľmi sú možnosti zvýšenia obsahu fytosterolov (avenanthramidov), pri konzume ktorých EFSA (2009) konštatovala rovnako signifikantné zníženie hladiny cholesterolu.

Ďalším cieľom v ľudskej výžive je tvorba materiálov s nižšími obsahmi avenínov, ktoré by sa uplatňovali v GF (gluten free) diétach. Po mnohých štúdiách bolo dokázané, že aveníny v ovse sú podstatne menej imunologicky aktívne a prevažná väčšina pacientov toleruje ovos vo výžive. Základným problémom bývajú len prímesi pšenice, raže a jačmeňa v týchto výrobkoch a na základe toho vyšlo aj nariadenie EÚ č. 41/2009, podľa ktorého musí byť ovos produkovaný podľa vybraných kritérií a nesmie obsahovať viac ako 20 $mg.kg^{-1}$ gluténu pšenice, raže, jačmeňa alebo ich krížencov. Veľmi účinná metóda (R5 ELISA) na detekciu prolamínov bola vyvinutá už v roku 2000 Mendezom et al., ktorá účinne detekovala prolamíny pšenice, raže a jačmeňa, ale nie aveníny (Salovaara 2010).

Dôležitou problematikou v ľudskej výžive ale v tomto prípade aj výžive zvierat sú obsahy trichotecénov v ovse. Vieme, že tieto toxinogénne produkty húb, predovšetkým rodu *Fusarium,* spôsobujú inhibíciu syntézy DNA, RNA, proteínov, sú vysoko cytotoxické, majú hemolytický efekt na erytrocyty, redukujú počty lymfocytov a účinnú imunologickú ochranu a majú ďalšie toxické účinky. Legislatíva EÚ v nespracovanom ovse udáva limity pre ľudskú spotrebu (2006) nasledovné: DON 1750 ppb, zearalenon 100ppb, HT2 a T2 500ppb (odporúčaný limit). Väčšina európskych spracovateľov ovsa má podstatne prísnejšie interné limity a pri spracovaní ovsa používa technológie, ktoré pri ovse ako jednej z mála obilnín veľmi významne znižujú podiel napadnutých zŕn (samotné čistenie na sitách 2,1 mm znižuje významne HT2 a T2, nasledovné lúpanie znižuje podiel trichotecénov o 70-95 % a väčšina spracovateľov má technológiu na vytriedenie olúpaných sfarbených zŕn, kde sa opäť významne zníži obsah HT2 a T2) (Pettersson 2010).

Napriek týmto prednostiam pri spracovaní ovsa ostáva výskum a šľachtenie na rezistenciu proti hubám rodu *Fusarium* veľmi dôležitým smerom.

Minoritnou oblasťou je tvorba materiálov a spotreba pre kozmetický priemysel, kde táto predstavovala 33,159 mil. EUR (Lehtomäki 2010). Ovsené zrno predstavuje jemný elastický produkt s vysokým obsahom vlákniny, proteínov a tukov. Zrno má výborné fyzikálne charakteristiky pre kozmetický priemysel, vysoký obsah malých čiastočiek škrobov a proteínov, vitamínu E, antioxidantov a vlákniny s imunostimulačnými, antidráždivými účinkami nevyvolávajúcimi alergické prejavy.

Tabuľka 1: Porovnanie vybraných znakov STN 46 1100-7: Zrno potravinárskeho ovsa a požiadavky spracovateľského priemyslu v EU.

Parameter	STN 46 1100-7			Mlynárske spracovanie EU (Buhler 2010)
	Ovos siaty trieda kvality		Ovos nahý	
	A	B		
Vlhkosť max.(%)	14	14	13	13,5
Objemová hmotnosť min. ($g.l^{-1}$)	530	-	650	550
HTZ min. (g)	-	-	-	30
HTZ (lúpaný alebo nahý) min. (g)	-	-	-	22
Podiel plevy max. (%)	-	-	-	26
Podiel predného zrna nad sitom 2mm (%)	-	-	-	90
Nečistoty spolu hmot. (%) max.	6	9	6	-
Z toho a/ zlomky zŕn max. (%)	3	5	3	-
b/ zrnové nečistoty max. (%)	5	9	5	2
c/ naklíčené semená max. (%)	2	3	2	2
d/ ostatné nečistoty max. (%)	1	5	0,5	0,5

Základné šľachtiteľské požiadavky na zrno ovsa pre ľudskú výživu a kŕmenie

Pri zameraní výskumu a šľachtenia pre ľudskú výživu a kŕmenie pri ovse existujú v rámci tejto problematiky odlišné fyzikálne ale aj chemické atribúty na konečný produkt šľachtenia odrodu. Genotyp teda determinuje konečný účel požitia. Tabuľka 2 uvádza požiadavky niektorých znakov, ktoré sú požadované v humánnej výžive, versus požiadaviek pre animálnu výživu.

Tabuľka 2: Porovnanie šľachtiteľských kvalitatívnych cieľov pre humánnu a animálnu výživu

Znak	Humánna výživa	Animálna výživa
Fyzikálne atribúty		
objemová hmotnosť	vysoká	vysoká
plevnatosť	nízka	nízka
výťažnosť čistého zrna	vysoká	vysoká
farba zrna	výrazná	výrazná
jas zrna	vysoký	vysoký
tvrdosť zrna	vysoká	-
jednoduchosť odplevenia	vysoká	-
podiel predného zrna sitá 2mm (%)	vysoký	vysoký
Chemické atribúty		
obsah proteínov	vysoký	vysoký
obsah tukov	nízky	vysoký
obsah beta glukánov	vysoký	nízky
škrob želatitinizácia	vysoká	-
pleva obsah lignínu	-	nízka
chuť	Nie horká	-

Základne predpoklady na smerovanie výskumu a šľachtenia ovsa pre animálnu výživu a spotrebu.

Ovos predstavuje kŕmnu obilninu, ktorá sa vyrába s najnižšími energetickými a environmentálne rizikovými vstupmi (chemická ochrana , hnojenie, použitie rastových regulátorov) spomedzi všetkých obilnín.

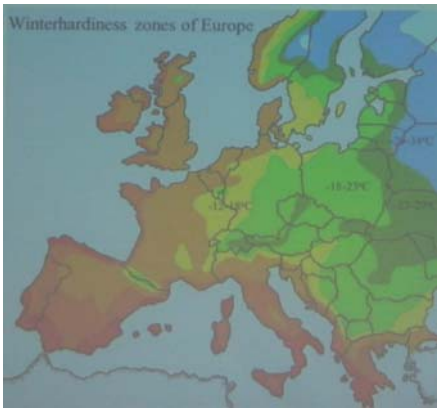
Kŕmna kvalita zrna:

Plevnatý ovos má vždy nižšiu energetickú hodnotu ako iné obilniny s vysokým obsahom vlákniny a pre prežúvavce je pomalšie stráviteľný. Z toho vyplýva jeho podstatne nižšie riziko jedovatosti, ktoré sa môže prejaviť hlavne pri výžive koní a mladých prežúvavcov inými obilninami.

Napriek tomu hlavným šľachtiteľským cieľom pri nahom aj plevnatom ovse zostáva množstvo metabolizovateľnej energie v $MJ.kg^{-1}$, ktoré je možné získať z jednotky krmiva. Tu sa však cesty uplatnenia šľachtenia pri nahom a plevnatom ovse rozchádzajú. Zvyšovanie metabolizovateľnej energie pri plevnatých ovsoch pre prežúvavce sa uplatňuje cez genetické a šľachtiteľské metódy znižovania lignínu v nových odrodách plevnatého ovsa. Lignín je po celulóze druhý najrozšírenejší polysacharid. Hemicelulózu a čiastočne aj celulózu dokážu prežúvavce stráviť, ale lignín nie. Medzi súčasnými odrodami plevnatého ovsa sú veľmi veľké rozdiely v obsahoch lignínu a tým aj metabolizovateľnej energie, ktoré predstavujú až 2 $MJ.kg^{-1}$ (Valentine et al. 2004). Zaujímavosťou je, že čiernoplevnaté ovsy vykazujú nižšie obsahy lignínu a tým viac metabolizovateľnej energie. Druhú nemenej významnú cestu vo výskume a šľachtení ovsa predstavuje tvorba línií a odrôd vysokoolejnatého nahého ovsa s nižšími obsahmi betaglukánu, ktorý vykazuje jednoznačne najvyššiu metabolizovateľnú energiu spomedzi všetkých obilnín. Použitie takýchto odrôd sa už začína masívnejšie uplatňovať vo Veľkej Británii v hydinárskom priemysle ale aj výkrme ošípaných. Tieto odrody dosahujú podiel tuku až do 14 % a metabolizovatelná energia je napríklad oproti pšenici vyššia až o 2,5 $MJ.kg^{-1}$ (Marshall 2010). Pre porovnanie môže slúžiť genotyp nahého ovsa 100026CN, ktorý vykazoval najvyšší obsah tuku zo slovenskej kolekcie *Avena* v slovenských podmienkach, kde dosahoval len úroveň 9 % obsahu tuku. Pritom prevažné obsahy tukov pri nahých ovsoch zo slovenskej kolekcie *Avena* sa pohybovali od 4,5-8 % (Čertík et al. 2007).

Menší dôraz pri šľachtení ovsa na kŕmne účely sa kladie na kvalitu sena a na tvorbu materiálov s vysokými úrodami zelenej hmoty. V Číne sú napríklad preferované veľmi skoré odrody ovsa, ktoré po zbere na zrno vytvoria ešte do zimy dostatočné množstvo zelenej hmoty na kŕmenie (Changzhong 2010).

Iné smery v šľachtení ovsa



Hlavnou výzvou pri tvorbe nových materiálov však stále zostáva rentabilita produkcie, ktorá je životne závislá od výšky úrod. S týmto znakom súvisí aj ďalší znak : šľachtenie na odolnosť proti hubovým a vírusovým patogénom. Ak dosiahneme všetky horeuvedené vlastnosti pri tvorbe nových odrôd, tieto by mali mať i požadovaný úrodový potenciál, v ktorom ovos v porovnaní hlavne ozimných obilnín výraznejšie zaostáva. Zimovzdornosť ovsa a s ním súvisiace zvýšenie úrodového potenciálu preto tvorí podstatnú časť šľachtiteľských programov. Pozoruhodné v tomto smere sú medzidruhové hybridy *Avena sativa* × *Avena macrostachya* (Lapinski 2010) vykazujúce vysoký stupeň zimuvzdornosti v podmienkach Kanady aj Európy.

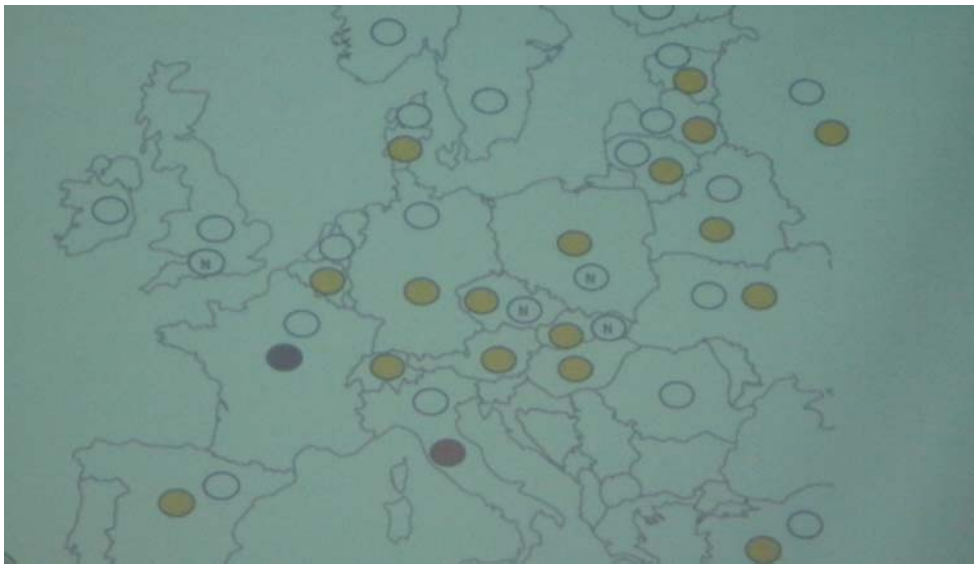
Obr. 1: zóny zimovzdornosti v Európe

Základné požiadavky pre registráciu odrôd ovsa v Európe

Tabuľka 3: Základné podmienky pre testovanie a registráciu odrôd ovsa v Európe 2009 (Beuch 2010)

Štát	Počet lokalít	Počet ošetrení	Počet rokov testovania	Počet hodnotených znakov
Irsko	5	2	3	15
Rakúsko	8	2	2	16
Nemecko	14	2	3	84
Česko	8	1	3	24
Slovensko	4	1	2	20
Nórsko	8	1	3	24
Francúzko	8/9	2	2	32
Estónsko	4	1	2	8
Maďarsko	5	1	2	10
Litva	4	1	2	8
Švédsko	6	2	2	24
Veľká Británia	4/3	2	2	16

Štát	Počet lokalít	Počet ošetrení	Počet rokov testovania	Počet hodnotených znakov
Dánsko	4	1	2	8
Lotyšsko	3	1	2	6
Fínsko	8	1	2	24
Poľsko	14	1	2	28



Obr. 2: Preferovaná farba plevy odrôd ovsa v Európe (Beuch 2010)

Závery

1. Zvýšenie produkcie ovsa znamená viac investícií do európskych produkčných technológií (hlavne v Severnej a Východnej Európe).
2. Pestovaniu ovsa v Európe dominuje lokálne podmienené pestovanie odrôd (preferuje sa farba plevy, pestovanie bez rastových regulátorov, pestovanie ozimných odrôd atď.). Šance pre jasný a vyšší šľachtiteľský pokrok prostredníctvom nových odrôd existujú vo všetkých regiónoch.
3. V Európe je príjem súkromných šľachtiteľských firiem financujúcich šľachtenie ovsa podstatne nižší ako pri iných obilninách. Napriek tejto negatívnej špirále šľachtitelia zohrávajú kľúčovú úlohu pri zvyšovaní kvality a kvantity ovsa. Preto treba tieto obmedzené prostriedky na výskum a šľachtenie využívať veľmi rozumne.
4. Hlavným cieľom by mala byť tvorba odrôd s vysokou kvalitou pre humánnu a animálnu spotrebu s vysokou ekostabilitou pre všetky hlavné produkčné zóny v Európe.
5. Klimatické zmeny môžu podmieniť zvýšenie tlaku na pestovanie ovsa. Dlhšie vegetačné obdobie môže byť v budúcnosti využité na zvýšenie úrod a lepšiu kvalitu zrna.
6. Biotechnologické metódy, medzinárodná spolupráca a čiastočné financovanie spracovateľským priemyslom môžu zlepšiť potenciál praktického šľachtenia.

Literatúra

AGRI-FOOD CANADA: Market outlook report. Oats: Situation and outluook. August 3, 2010.

BEUCH, S.: Oat breeding for Europe-Impossibility or Challenge ? In: More Oats . Ystad. Sweeden , 2010.

ČERTÍK, M. et al.: Štúdium vybraných biochemických parametrov vo vzťahu k agronomicko-morfologickým znakom v súbore ovsa. In: Nové poznatky z genetiky a šľachtenia rastlín. Piešťany, 2007, s. 49-51.

EDENPHARMA: Betaglukány a ich pôsobenie na organizmus. Edenpharma 1/2009, s.4-5.

EFSA: Scientific option on the substantion of health claims related to bete glucans and maitenance of normal blood cholesterol concentrations and maitenance or achievement of a normal body weight pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006.

EFSA: Blood cholesterol reduction health claims on phytosterols can now be judged against EFSA new scientific advice, July 31, 2009.

CHANGZHONG, R.: The development of oats in China. In: More Oats . Ystad. Sweeden , 2010.

LAHTOMAKI, I.: Oat characteristics as a base for product and process development. In: More Oats . Ystad. Sweeden , 2010.

LAPINSKI, B.: Octoploids with Avena macrostachya Bal. Genome as an alternative option for winter oat improvment. In: More Oats . Ystad. Sweeden , 2010.

MARSHALL, A.: Progress in breeding oats as a high quality animal feed with enviromental benefits. In: More Oats . Ystad. Sweeden , 2010.
PETTERSSON, H: Trichotecenes in Oats-Occurrence, Toxicity and Risks. In: More Oats . Ystad. Sweeden , 2010.
SAALOVAARA, H.: Oat products in gluten-free diet. In: More Oats . Ystad. Sweeden , 2010.
SANTSHI, U.: Oat milling proces-Technological update. In: More Oats . Ystad. Sweeden , 2010.
STRYCHAR, R.: Food and feed markets for oat. In: More Oats . Ystad. Sweeden , 2010.
VALENTINE, J.et al.: Breeding oats for milling, feed and possible new food and industrial market. IGER, Aberystwyth, UK, 2004).

Adresa autorov:
Ing. Peter Hozlár, PhD., Ing. Daniela Dvončová, CVRV Piešťany, Výskumno-šľachtiteľská stanica, Vígľaš-Pstruša. E-mail: hozlar@vurv.sk.
RNDr. Michaela Havrlentová, PhD., CVRV Piešťany, Výskumný ústav rastlinnej výroby, Bratislavská cesta 122, 921 68 Piešťany

KVALITA ZDRAVOTNÉHO STAVU KLONOV NOVOŠĽACHTENIA MEČÍKOV
QUALITY OF HEALTH CLONAL SELECTIONS OF GLADIOLI

Martin JONÁŠ – Běla SVITÁČKOVÁ

In the field trial 16 clones of gladioli were evaluated resistance to fusarium rot caused by the pathogen Fusarium oxysporum Schlecht. f. sp. gladioli emend. Snyd. et Hans in 2009. Just resistence to this pathogen is now a priority task in breeding gladioli. Among clones candivar was found high variability in the resistance, which is due to the use of parental components bearing different degrees of resistance. The highest resistance were assigned clones K2-6/00, K2-175/1, L1-31/2, L68-127/2 – Tadžmahál and N34-5/4 – Citrín.
Keywords: gladioli, fusarium rot, evaluation, clones candivar

Úvod

Negativní vliv chorob na kvalitu růstu a následného kvetení mečíků je zřejmý už v počátečních stádiích infikování rostliny. V nepříznivých pěstitelských podmínkách se choroby velmi rychle rozšiřují a dochází až k předčasnému úhynu celé rostliny a degradaci podzemní hlízy. Mečíky jsou rostliny množené vegetativně, a proto je zdravotní stav prioritní. Všechny choroby se přenáší přes množitelský materiál. Nejvážnější jsou houbové choroby (Westcott & Horst 2008).

Mezi nejvážnější houbové choroby patří fuzariová hniloba způsobené patogenem *Fusarium oxysporum* Schlecht. f. sp. *gladioli* emend. Snyd. et Hans způsobující žloutnutí, následné hnědnutí a předčasné odumření listové plochy. Hlízy nemusí zpočátku vykazovat vnější symptomy napadení. Obvykle však jsou jejich kořeny černé, postupně hnijí a na hlízách se objevují hnědočerné vpadlé skvrny (Agrios 2005). Během skladování se nepravidelné, kruhovité vpadlé skvrny rozšiřují a infekce se postupně rozšiřuje až k celkové mumifikaci hlízy. Infekce je přenosná z mateřské hlízy, proniká skrze bazální část a střed nové hlízy do nadzemní části rostliny (Sigee 2005). Mezi další závažné houbové choroby patří suchá hniloba způsobena patogenem *Stromatinia gladioli* (Dray.) Whetz. Na hlízách se objevují načervenalé skvrny s tmavým ohraničením. Skvrny se zvětšují a středy hlíz jsou vpadlé s hnědými skvrnami. Na povrchu hlízy a uhynulém stonku se vytvářejí velmi malá černá sklerocia. Mečíky na stanovišti žloutnou a dochází k předčasnému úhynu. (Westcott & Horst 2008). Plíseň mečíková – *Botritis gladiolorum* Timm. způsobuje na listech a stoncích větší hnědé skvrny, kulaté až oválné, případně menší světlehnědé skvrny s načervenalým okrajem. Ve vlhkém počasí mohou celé květy hnědnout a slizovatět. Po řezu květenství se infekce rozšíří na bazální část stonku a hlízu. Zde vznikají tmavohnědé skvrny nepravidelného tvaru a velikosti, nejpočetnější na horní straně hlízy (Westcott & Horst 2008). Hlízy mohou být měkké a houbovité s bělavou plísní, na postižených tkáních se tvoří šedohnědá plíseň (Stevens 1998). Hlavními symptomy tvrdé hniloby – *Septoria gladioli* Pass. jsou hnědé nebo černé strupovité léze na hlízách, které následně nekrotizují a celé hlízy mohou mumifikovat (Stevens 1998) . Na listech se zprvu vytváří malé žlutavé skvrny, které se rozšiřují a hnědnou. Velikost skvrn je od 10 do 20 mm v průměru. Na skvrnách se mohou objevovat malé černé piknidie velikosti tečky. Choroba nejprve napadá bazální listy a postupuje vzhůru. Rychlost infekce je závislá na vnějších podmínkách, zejména na vlhkosti (Agrios 2005). Poslední důležitou houbovou chorobou je Penicilinová hniloba – *Penicillium gladioli* (Mc. Cull.) Thom., která se vyskytuje na hlízách pouze během skladování. Může být podpořena nevhodnými skladovacími podmínkami nebo poraněním hlíz. Léze se vytvářejí přímo na skvrnách od jiných chorob. Léze jsou načervenalé až hnědé, pravidelného i nepravidelného tvaru a velikosti, hlízy jsou měkké a vlhké (Scopes & Stables 1989).

Materiál a metody

Pokus byl založen 1.5. 2009 na pozemcích výzkumného pracoviště Mendelea Zahradnické fakulty v Lednici, Mendelovy univerzity v Brně. Lednice je situována do nížinné oblasti Jihomoravského kraje. Lokalita se nachází v nadmořské výšce 172 m. n. m.,patří do kukuřičné výrobní oblasti a do teplého, suchého klimatického regionu. Pedologicky se jedná o černozem na spraši, zrnitostně středně těžkou půdu.

Pěstebním materiálem bylo vybraných 16 klonů novošlechtění mečíků (Tab. 1). Materiál poskytl Výzkumný ústav Silva Taroucy pro krajinu a okrasné zahradnictví v Průhonicích. Od každého klonu novošlechtění bylo vysazeno 30 kusů hlíz. Vysazované hlízy byly 1. a 2. velikostní třídy.

Výsadbový materiál byl ošetřen mořením proti třásněnce (*Taeniothrips simplex*) a proti botrytidě (*Botrytis cinerea*). Výsadba byla provedena do vyhloubených řádků, ve sponu 0,1 m x 0,5 m a do hloubky 0,12 m – 0,15 m. Do jednotlivých řádků byly vsypány podrcené hlízy mečíků infikované fuzariovou hnilobou FOG (*Fusarium oxysporum f. sp. gladioli*). Cílem této aplikace bylo infikovat zdravé hlízy mečíků. V průběhu vegetace i během skladování byla hodnocena odolnost rostlin i hlíz vybraných klonů vůči fuzáriové hnilobě.

Tabulka 1: Vybrané klony

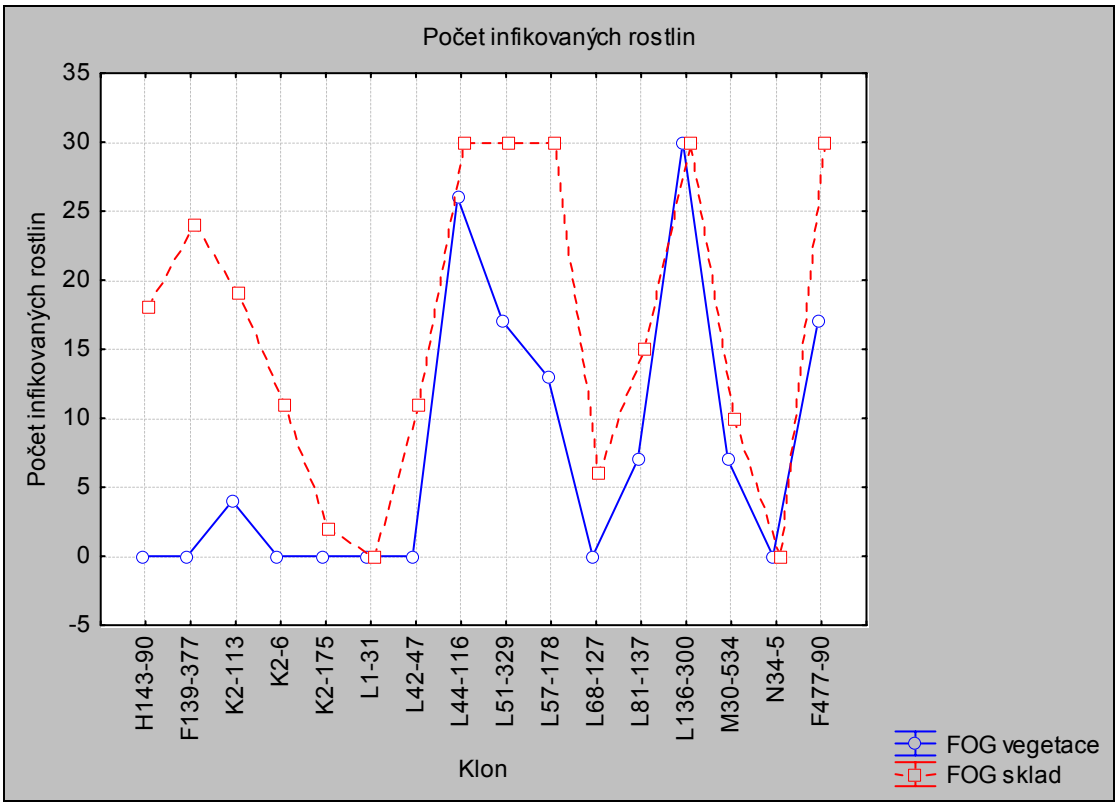
Klon	Rodičovská kombinace
F477-90/98 - Tyfón	401/90 x Černý Drahokam
N34-5/4 - Citrín	43/87 x 218/00
F139-377/99 - Chiméra	Maysnow x 608/93
H143-90/99 - Eris	428/94 x Stáňa sport
M30-534/2 - Adéla	428/94 x Giallo Antico
L68-127/2 - Tadžmahál	Maysnow x 622/93
L42-47/2 - Majolika	Albenga x 227/99
L1-31/2	1/95 x Applause
K2-175/1	Showwinner x 529/88
K2-6/00	Showwinner x 529/88
K2-113/1	Showwinner x 529/88
L136-300/2	127/94 x 299/99
L81-137/2	608/93 x Albenga
L57-178/2	Amsterdam x 127/98
L51-329/2	Amsterdam x 889/94
L44-116/2	Albenga x 287/99

Výsledky a diskuze

Hodnocení zdravotního stavu bylo soustředěno na infekci fuzáriovou hnilobou, která byla hodnocena ve dvou časových obdobích. Infekce během vegetace a během doby skladování. V některých případech se infekce projevila usychání porostu již během vegetace, následnou destrukcí a celkovou mumifikací hlíz během skladování (Graf 1). Kvalitní zdravotní stav je prioritou a dokáže zvýšit kvalitu a kvantitu množitelského koeficientu. Hodnocené znaky jsou odrůdově závislé. U jednotlivých klonů se tyto mohou velmi lišit, i bez negativního vlivu špatných pěstebních a skladovacích podmínek.

Fuzariové vadnutí je podle Sigee (2005) nejvážnější chorobou mečíků, která způsobuje usychání rostlin a hnilobu hlíz. Toto potvrdily i výsledky pokusu konaného v Lednici v období 2009-2010. Podle Agrios (2005) může infekce probíhat ve všech fázích růstu i během skladování, kdy se infekce na napadených hlízách rozšiřuje a způsobuje celkovou destrukci a mumifikaci hlíz. Rozsah poškození závisí především na vnějších růstových podmínkách, teplotě a vlhkosti.

Na klonech L44-116/2, L51-329/2, L57-178/2, L136-300/2 a F477-90/98 – Tyfón se během vegetace velmi silně projevilo napadení fuzariózou, což mělo za následek uhynutí 25–60% rostlin. U těchto klonů se následně v průběhu skladování infekce rozšířila na všechny hlízy a způsobila úhyn 50–100% všech hlíz, celkovou destrukci a mumifikaci. Tento jev byl podpořen i poněkud nevhodnými skladovacími podmínkami, které byly k dispozici. Zejména absencí rychlého osušení hlíz při teplotě 28–30 ºC následně po vyrytí z půdy. Právě Sigee (2005) zdůrazňuje osušení hlíz po vyrytí jako primární preventivní způsob ochrany před infekcí patogenem fuzariového vadnutí. Summerell (2002) uvádí výskyt symptomů latentní infekce, které se během vegetace a ani po bezprostředním vyrytí na hlízách nevyskytuje. Symptomy se mohou projevit na hlízách až během skladování a způsobit výrazné zhoršení zdravotního stavu výsadbového materiálu. Výskyt latentní infekce, jejíž symptomy se na hlízách projevují až v průběhu skladování, se objevily v průběhu hodnocení pokusu v dubnu 2010. Výskyt latentní infekce byl zjištěn u klonů H 143-90/99 – Eris, F 139-377/99 – Chimera, K2-6/00, K2-175/1, L42-47/2 – Majolika a L68-127/2 – Tadžmahál. Infekce se projevila u 10–80 % hlíz ve formě oválných lézí o velikosti 5–30 mm v průměru. Odolnost hodnocených klonů byla velmi odlišná, což je zřejmě dáno výběrem rodičovských komponentů, které nesou různý stupeň odolnosti, jak udává Sigee (2005).



Graf 1: Počet rostlin infikovaných fuzariovou hnilobou

Závěr

Hodnocení vybraných novošlechtění klonů mečíků se zaměřilo na kvalitu zdravotního stavu rostlin, především na odolnost vůči fuzáriové hnilobě způsobené patogenem *Fusarium oxysporum* Schlecht. f. sp. *gladioli* emend. Snyd. et Hans. Právě cílené novošlechtění mečíků na odolnost vůči fuzariové hnilobě je dnešní hlavní šlechtitelskou prioritou. Odolnost klonů vůči patogenu je dána především správným výběrem rodičovských kombinací (Tab 1). Jako nejodolnější vůči infekci patogenem fuzariové hniloby se jeví klony K2-6/00, K2-175/1, L1-31/2, L68-127/2 – Tadžmahál a N34-5/4 – Citrín. Nejcitlivější klony jsou F477-90/98 – Tyfón, L136-300/2, L57-178/2, L51-329/2 a L44-116/2.

Literatura

AGRIOS, G. N. *Plant pathology.* 5. vyd. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2005. 922 s. ISBN 0-12-044565-4.

SCOPES, N. E. A.; STABLES, L. *Pest and disease control handbook.* 3. vyd. Croydon, England: BCPC Publications, 1989. 732 s. ISBN 0948404280.

SIGEE, D. C. *Bacterial plant pathology : cell and molecular aspects.* 1. vyd. Cambridge: Cambridge University Press, 2005. 325 s. ISBN 0-521-61967-X.

STEVENS, A. B. *Field Grown Cut Flowers - A Practical Guide and Sourcebook : Commercial Field Grown, Fresh and Dried Cut Flower Production.* 2. vyd. Edgerton: Avatar's World, 1998. 395 s. ISBN 0-9653065-0-X.

SUMMERELL, B. A. a kol. *Fusarium : Paul E. Nelson Memorial Symposium.* 2. vyd. St. Paul, Minnesota: APS Press, 2002. 392 s. ISBN 0-89054-268-6.

WESTCOTT, C.; HORST, R. K. *Westcott's plant disease handbook.* 7. vyd. Berlin: Springer, 2008. 1317 s. ISBN 978-1-4020-4584-4.

Adresa autorů:
Ing. Martin Jonáš, Ing. Běla Svitáčková, CSc., Mendelova univerzita v Brně, Zahradnická fakulta v Lednici
Valtická 337, 691 44 Lednice, Česká republika, email: xjonas0@node.mendelu.cz, svitackova@zf.mendelu.cz

CHARAKTERIZÁCIA DELTA-6-DESATURÁZY AKO PRVÝ KROK V PRÍPRAVE RASTLÍN SO ZVÝŠENÝM HOSPODÁRSKYM POTENCIÁLOM
CHARACTERIZATION OF DELTA-6-DESATURASE AS FIRST STEP IN PREPARATION OF PLANT WITH INCREASED ECONOMICAL POTENTIAL

Tatiana KLEMPOVÁ – Daniel MIHÁLIK – Milan ČERTÍK – Ján KRAIC

The lack of polyunsaturated fatty acids is problem that causes many diseases such cardiovascular, inflammatory, oncologic etc. Preparation of plants that content these essential metabolites is one the way for better availability.
Key words: Delta-6-desaturase, PUFA, cereals, gene

Úvod

Hospodársky význam obilnín možno zvýšiť nielen zvyšovaním kvantitatívnych znakov, ale i kvalitatívnych. Medzi takéto možno zaradiť zvyšovanie ich nutričnej hodnoty. Jednou z možností je zvyšovanie obsahu polynenasýtených mastných kyselín (PNMK). Obilniny neobsahujú dostatočné množstvo n-6 a n-3 PNMK. Výživa založená prednostne na obilninách tak môže spôsobiť nerovnováhu v organizme. Polynenasýtené mastné kyseliny sú dôležité z lekárskeho, farmakologického a potravinárskeho hľadiska ako nezastupiteľné zložky zdravého fungovania ľudského organizmu. Sú štrukturálnymi komponentmi membrán buniek, zásobárňou chemicky viazanej energie vo vakuolách cytosolu, prekurzormi signálnych molekúl a regulátormi mnohých fyziologických bunkových dejov, kontrolujú expresiu viacerých génov zapojených do procesov biosyntézy mastných kyselín a transportu cholesterolu v tele. V súčasnosti sú v centre záujmu najmä kyseliny: gama-linolénová (C 18:3 n-6; GLA), dihomo-gama-linolénová (C 20:3 n-6; DGLA), arachidónová (C 20:4 n-6; AA), eikosapenténová (C 20:5 n-3; EPA) a dokosahexaénová (C 22:6 n-3; DHA). Bežným zdrojom PNMK sú:

- rastliny: prvosienka, borák, čierne ríbezle (GLA)
- ryby: sleď, tuniak, losos (EPA, DHA)
- kôrovce a lastúrniky: modrý krab, homár, ustrice (EPA, DHA)

Aktívnymi producentmi sú takisto nižšie vláknité huby, morské baktérie a riasy (Radwan 1991; Ratledge & Wilkinsin 1989; Čertík & Shimizu, 1999).

V súčasnosti sú PNMK získavané najmä z rýb alebo zo submerzných kultivácií mikroorganizmov. Tieto spôsoby sú však limitované dostupným množstvom (ryby) alebo cenou (mikroorganizmy). Genetická modifikácia vyšších rastlín zameraná na biosyntetickú dráhu PNMK je preto perspektívnou možnosťou na získavanie PNMK, ale aj na zmiernenie ich deficientu vo výžive (Drexler 2003; Singh 2005; Domergue 2005). Výborným zdrojom génov pre takéto modifikácie sú nižšie vláknité huby (*Zygomycetes*), najmä rad *Mucorales*. V tejto práci sme sa zamerali na charakterizáciu gény kódujúceho enzým delta-6-desaturáza z vláknitých húb *Thamnidium elegans, Mucor circinelloides, Mucor petrinsularis a Mucor hiemalis*, ktoré nám pri predchádzajúcich experimentoch potvrdili prítomnosť metabolitu, ktorý vzniká reakciou katalyzovanou práve týmto enzýmom.

Materiál a metódy

V práci boli použité kmene vláknitých húb CCF 1456 *Thamnidium elegans*, CCF 2617 *Mucor circinelloides f. lusitanicus*, CCF 2409 *Mucor petrinsularis*, CCF 2698 *Mucor hiemalis f. hiemalis* ktoré pochádzajú z Czech Collection of Fungi.

Izolácia génu delta-6-desaturázy

Na izoláciu kódujúcej sekvencie génu bola použitá cDNA získaná z izolovanej RNA pomocou First Strand cDNA synthesis kit (Fermentas, Nemecko). RNA sa vyizolovala z 500 mg čerstvého mycélia pomocou Trizolu (Invitrogen, USA). Pomocou programov CLC Main Workbench 5.0, Bioedit 7.0.9 boli navrhnuté sekvencie dvoch degenerovaných primerov: R-5'- GAYCAYCCYGGWGGWCT – 3' a L-5'- ACRGGCATWCCGTTRTGGTT – 3'.

Zloženie reakčnej zmesi pre cDNA *Thamnidia elegans* bolo: 20 µl 2XPCR Master Mix (Fermentas, Nemecko), 10 pmol z každého primeru, 25 ng templátovej cDNA. Cyklus pozostával z 2 minútovej iniciačnej denaturácie pri 94°C, nasledovalo 40 cyklov s 1 minútovou denaturáciou pri 94°C, 18 sekundovým annealingom primerov pri 57,5°C, 1 minútovej extenznej reakcie pri 72°C, záverečná syntetická časť cyklu trvala 10 minút pri 72°C.

Zloženie reakčnej zmesi pre cDNA ostatných kmeňov bolo: 0,4 µl Taq polymerase 5U (Invitrogen USA), 5 µl reakčného pufru, 1,5 µl 50mM $MgCl_2$, 10 pmol z každého primeru, 25 ng templátovej cDNA. Cyklus pozostával z 2 minútovej iniciačnej denaturácie pri 94°C, nasledovalo 40 cyklov s 1 minútovou denaturáciou pri 94°C, 30 sekundovým annealingom primerov pri 60°C (*Mucor circinelloides f. lusitanicus* a *Mucor*

petrinsularis), a 57,5°C (*Mucor hiemalis f. hiemalis*), 1 minútovej extenznej reakcie pri 72°C, záverečná syntetická časť cyklu trvala 10 minút pri 72°C.

Produkty PCR boli analyzované pomocou 1 % agarózového gélu farbeným pomocou ethidium bromidu. Separácia prebehla cez noc pri napätí 10V/cm vzdialenosti medzi elektródami v roztoku 0.5xTBE. Ako štandard molekulovej veľkosti DNA fragmentov bol použitý 100 bp DNA-Leiter, extended (Carl Roth, Nemecko).

Výsledky a diskusia

Pomocou hore uvedených podmienok PCR reakcie sa nám podarilo izolovať fragmenty z jednotlivých kmeňov o veľkosti 932 bp z *Thamnidia elegans*, 941 bp z *Mucor circinelloides f. lusitanicus, Mucor hiemalis f. hiemalis* a *Mucor petrinsularis*, ktoré pri porovnaní nukleotidových sekvencií vykázal vysoký stupeň homológie s doteraz popísanými génmi pre delta-6-desaturázy. Podobne pri nájdení čítacieho rámca a translácií do sekvencií aminokyselín, sa ukázala vysoká homológia s týmito génmi a to najmä v oblasti konzervovaných domén (obr. 1). Na obr. 2 je znázornený fylogenetický strom vypočítaný pomocou programu BLAST, ktorý sekvenciu z *Thamnidia elegans* zaradil do rodiny fungálnych delta-6-desaturáz. Rovnaký výsledok sme získali aj pri ostatných kmeňoch.

Záver

Charakterizácia génov kódujúcich biosyntézu polynenasýtených mastných kyselín u nižších vláknitých húb prináša možnosti produkcie týchto esenciálnych metabolitov aj prostredníctvom hospodárskych rastlín. Takéto rastliny majú zvýšený hospodársky potenciál, nakoľko esenciálne mastné kyseliny sú v súčasnosti žiadané produkty pre ochranu ľudského zdravia. Táto práca prináša prvotné poznatky, ktoré môžeme ďalej rozvíjať až do podoby prípravy cielených transgénnych rastlín produkujúcich požadované esenciálne mastné kyseliny.

Poďakovanie. Táto práca vznikla vďaka podpore v rámci OP Výskum a vývoj pre projekt: Vývoj nových typov rastlín s geneticky upravenými znakmi hospodárskeho významu. ITMS: 26220220027, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja a projektu APVV VVCE-0064-007. Zároveň patrí poďakovanie Dr. Alene Kubátovej z katedry botaniky, Prírodovedeckej fakulty Karlovej univerzity v Prahe za poskytnutie kmeňov vláknitých húb.

Literatúra

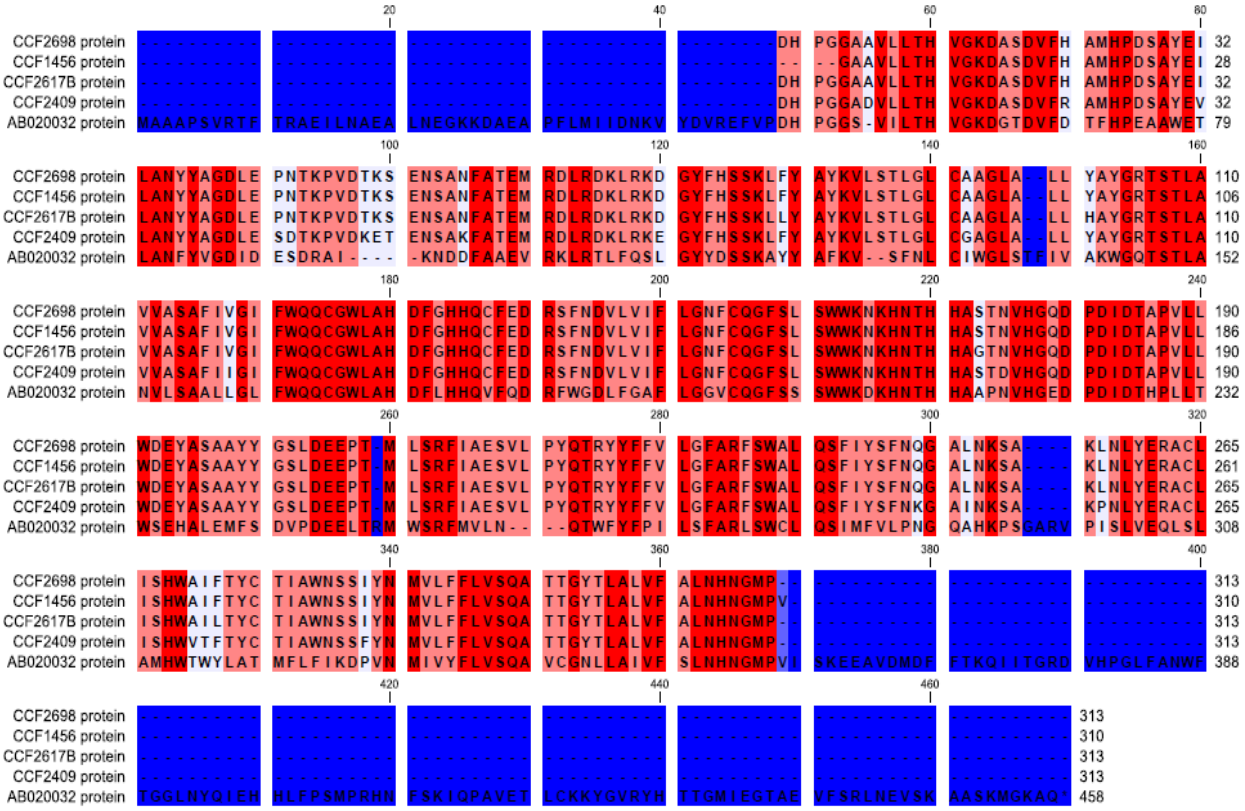
ČERTÍK, M. SHIMIZU, S.: Biosynthesis and regulation of microbial polyunsaturated fatty acid production. J. Biosci. Bioeng., 1999, 87, 1-14

DOMERGUE, F., ABBADI, A., HEINZ, E.: Relief for fish stocks: oceanic fatty acids in transgenic oilseeds, Trends Plant Sci., 2005, 10 (3), 112–116

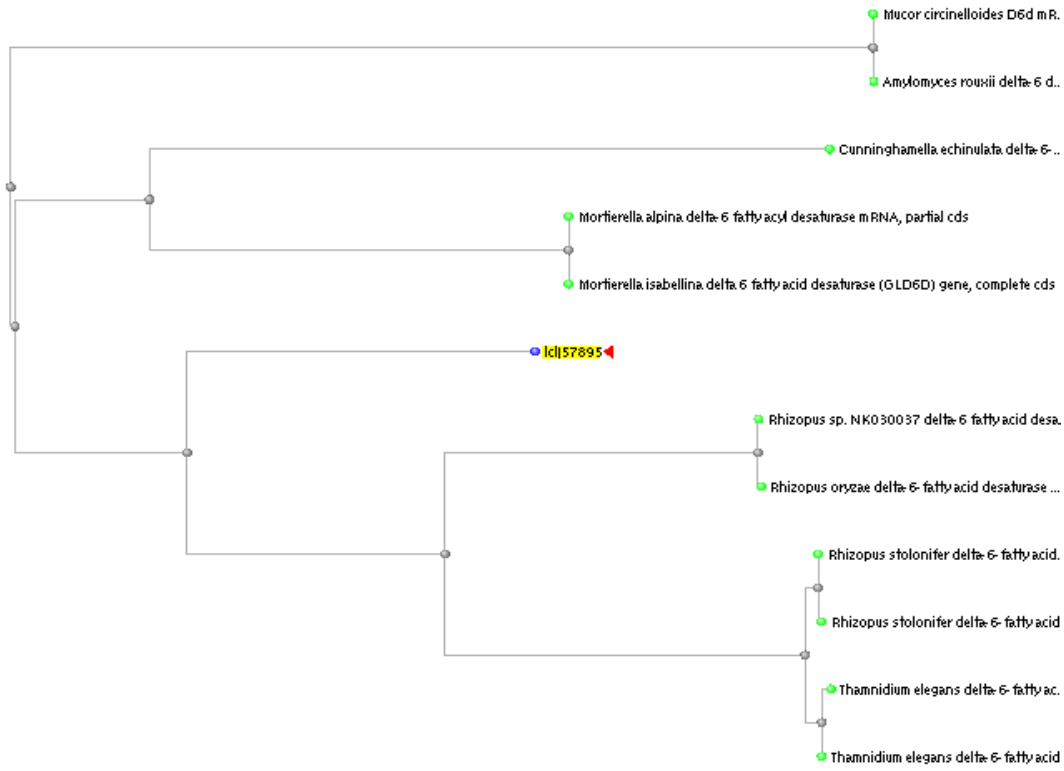
DREXLER, H., SPIEKERMANN, P., MEYER, A., DOMERGUE, F., ZANK, T., SPERLING, P., ABBADI, A., HEINZ, E.: Matabolic engineering of fatty acid for breeding of new oilseed crops: strategies, problems, and first results, J. Plant Physiol., 2003, 160, 779–802

RATLEDGE, C. AND WILKINSON, S.G. (1989): Microbial lipids, vol.1. Academic Press, London

Adresa autorov:
Tatiana KLEMPOVÁ[1], Daniel MIHÁLIK[2], Milan ČERTÍK[1], Ján KRAIC[2]
[1] Oddelenie biochemickej technológie, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, STU, Radlinského 9, 812 37 Bratislava
[2] Centrum výskumu rastlinnej výroby, Výskumný ústav rastlinnej výroby, Bratislavská cesta 122, 921 68 Piešťany



Obr. 1: Porovnanie proteínových sekvencií nami získaných a už známych sekvencií delta-6-desaturázy; AB020032 – GenBank accession – Mortierela alpina 1S-4, delta-6-desatuáza; modrá – bez zhody, červená – maximálna zhoda



Obr. 2: Fylogenetický strom vypočítaný prostredníctvom programu BLAST – šípkou označenie nášho fragmentu

HODNOTENIE GENETICKÝCH ZDROJOV TRÁV A ĎATELINOVÍN VO VZŤAHU K MORFOLOGICKÝM A PRODUKČNÝM VLASTNOSTIAM
EVALUATION OF GRASS AND LEGUME GENETIC RESOURCES IN RELATION TO MORPHOLOGICAL AND AGRONOMICAL TRAITS

Janka MARTINCOVÁ – Miriam KIZEKOVÁ

During 2005–2007 (1st - 3rd harvest years), the basic morphological, biological, and agronomic parameters were investigated in wild ecotypes as well as in selected cultivars of grasses and legumes at a site in Banská Bystrica. The research trial comprised 18 accessions of 8 grass species (Festuca rubra, Festuca valesiaca, Poa pratensis, Trisetum flavescens, Phleum pratense, Phleum phleoides, Bromus erectus, Bromus inermis) and 14 accessions of 6 legume species (Anthyllis vulneraria, Coronilla varia, Onobrychis viciifolia, Lotus corniculatus, Medicago lupulina, Trifolium repens). The differences between the ecotypes were not significant, but there were statistically significant differences between the ecotypes and the cultivars. The spring growth intensity, the regrowth rate, the plant height and dry matter (DM) yield were higher in the cultivars than the ecotypes. The highest DM yield was recorded in Bromus inermis cv. Tabrom (10.29 t ha $^{-1}$) among the grasses and Onobrychis viciifolia cv. Taja (12.72 t ha $^{-1}$) among the legumes. The content of crude protein (CP) was higher in the legumes than in the grasses (192.8 and 150.8 g kg $^{-1}$ DM, respectively).
Key words: grasses, legumes, ecotypes, morphological traits, dry matter yield, crude protein

Úvod

Meniace sa podmienky prostredia spôsobené klimatickými zmenami si vyžadujú neustále zlepšovanie a šľachtenie plodín zameraných na tvorbu odrôd s vyššou toleranciou k biotickým a abiotickým faktorom prostredia, zvlášť voči suchu. Genetická diverzita rastlinných druhov predstavuje jediný a nenahraditeľný zdroj pri šľachtení rastlín ako aj pre ďalšie zvyšovanie diverzity. Lúčne ekosystémy predstavujú najväčšiu diverzitu druhov a biotopov. Práve reintrodukcia divých foriem rastlín do trávnych porastov podporuje biologickú diverzitu a ekologickú hodnotu porastu, čo je dôležité aj z hľadiska udržania alebo zlepšenia ochrany prírody (Hopkins & Hrabě 2001). Podobný názor prezentujú aj Šrámek a Ševčíková (2005), ktorí tvrdia, že trávne porasty s vysokou druhovou diverzitou tvoria významnú súčasť krajiny a celospoločenského genofondového bohatstva. Zachovalé poloprirodzené trávne porasty s bohatým druhovým zložením pôvodných druhov predstavnujú zdroj hodnotného materiálu pre založenie nových lokalít s vysokou prírodnou hodnotou (Kizeková & Pollák 2010; Krautzer & Pötsch 2009) a sú predmetom medzinárodného projektu SALVERE pod názvom „*Semi-natural grassland as a source of biodiversity improvement"* (Poloprírodné trávne porasty ako zdroj zlepšenia biodiverzity), ktorého partnerom je aj CVRV Piešťany - VÚTPHP Banská Bystrica. Predložený príspevok hodnotí výsledky pokusu s divorastúcimi ekotypmi tráv a ďatelinovín z hľadiska základných morfologických a produkčných vlastností s cieľom odporučiť najvhodnejšie ekotypy pre ďalšie využitie.

Materiál a metódy

V roku 2004 bol na pokusnom stanovišti v areáli VÚTPHP v Banskej Bystrici (stredné Slovensko, nadmorská výška 420 m, priemerná ročná teplota 8,1ºC a priemerný úhrn zrážok 693 mm) založený pokus s divorastúcimi ekotypmi a vyšľachtenými kontrolnymi odrodami tráv a ďatelinovín. Do pokusu bolo zaradených 18 položiek 8 druhov tráv (*Festuca rubra*, *Festuca valesiaca, Poa pratensis, Trisetum flavescens,Phleum pratense,Phleum phleoides, Bromus erectus, Bromis inermis*) a 14 položiek 6 druhov ďatelinovín (*Anthyllis vulneraria, Coronilla varia, Onobrychis viciifolia, Lotus corniculatus, Medicago lupulina, Trifolium repens*) (Tab.1,2). Orientovali sme sa predovšetkým na výber suchovzdorných druhov. Získaný východiskový materiál tráv sme zozbierali počas zberových expedícií v Krkonošiach, Nízkych Tatrách, Slovenskom krase a ďatelinoviny pochádzali z oblasti Poľany, Považia, Beskýd. Pokus sme založili metódou s náhodným usporiadaním pokusných členov v 2 opakovaniach pre semenárske a produkčné využitie. Po predpestovaní boli rastliny vysadené individuálne na parcelky o ploche 0,5 x 2m vo vzdialenosti 0,25 m, medziriadková vzdialenosť 0,50 m. Pre produkčné využitie boli vysadené 2 riadky po 14 rastlín v každom opakovaní. U ďateliny plazivej sme volili širšiu medziriadkovú vzdialenosť 0,80 m. Počas rokov 2005-2007 boli zhodnotené viaceré morfologické, biologické a hospodárske znaky. V príspevku sa zameriavame na hodnotenie základných hospodárskych znakov: výška rastliny, rýchlosť jarného rastu, rýchlosť obrastania po kosbe, úroda sušiny a obsah N- látok. Získané výsledky boli štatisticky vyhodnotené analýzou variancie, významnosť rozdielov sa posúdila LSD- testom programom Statgraphics.

Výsledky a diskusia

Počas rokov 2005–2007 boli vo všetkých sledovaných znakoch (výška rastliny, intenzita jarného rastu, rýchlosť obrastania po kosbe, úroda sušiny) zistené preukazné rozdiely medzi divorastúcimi ekotypmi a ich vyšľachtenými odrodami ako u tráv tak aj u ďatelinovín (Tab. 1, 2). Odrody vo všetkých sledovaných znakoch prevýšili divorastúce ekotypy, medzi ekotypmi v rámci druhu prevažne neboli významné rozdiely.

Hodnotením výšky rastlín sa potvrdilo, že rastliny s najvyššou výškou dosahovali aj najvyššiu úrodu sušiny. Výška rastliny sa pohybovala u tráv v rozpätí od 419,4 do 977,2 mm (priemer 637,5 mm) a u ďatelinovín od 184,5 do 731,0 mm (priemer 401,5 mm). Z výsledkov vyplýva, že kontrolné odrody prekonali výšku divorastúcich ekotypov, až na *Trisetum flavescens* a *Poa pratensis,* u ktorých sme vyššie hodnoty namerali u ekotypov. Ekotyp lipnice lúčnej z Hontianskych Nemiec (618,4 mm) prevýšil odrodu Lea (419,4 mm) až o 199 mm a ekotyp trojštetu žltkastého z Čiech bol o niečo vyšší než odroda Horal (674,2 resp. 671,8 mm). V priemere rokov najvyššiu výšku rastliny dosiahla z tráv odroda Tabrom druhu *Bromus inermis* (977,2 mm) a z ďatelinovín odroda Taja druhu *Onobrychis viciifolia* (731,0 mm). Z ekotypov medzi najvyššie patrila skupina druhu *Bromus erectus,* z nich najvyššiu výšku rastliny dosiahol ekotyp (SVKGEM02-54) z lokality Soroška (830,0 mm). V rámci druhu *Bromus erectus* medzi ekotypmi pochádzajúcimi z Gemera neboli rozdiely, výška rastliny u ekotypov dosahovala od 798,7 do 830,0 mm (priemer 817,1 mm).

Predpokladom dobrej úrodnosti je aj rýchle obrastanie po kosbách. Rýchlym jarným rastom a vyššou rýchlosťou obrastania po kosbe sa vyznačovali druhy *Bromus erectus, Trisetum flavescens, Phleum pratense*, najmenšiu rýchlosť obrastania mali ekotypy kostravy červenej. V intenzite jarného rastu a rýchlosti obrastania po kosbe najviac vynikal ekotyp z lokality Bôrka druhu *Bromus erectus* (SVKGEM02-43) (349,6 mm resp. 388,2 mm) a ekotyp z lokality Vrchlabí druhu *Trisetum flavescens* (334,6 resp. 374,5 mm). V skupine tráv rodu *Bromus* vyššiu rýchlosť obrastania mali divorastúce ekotypy (359,2-388,2 mm) v porovnaní s odrodou Tabrom (339,0 mm). U ďatelinovín vyššiu rýchlosť obrastania mali odrody v porovnaní ekotypmi, s výnimkou *Anthyllis vulneraria*. Najlepšiu schopnosť obrastania a intenzitu rastu mala odroda Taja druhu *Onobrychis viciifolia* (275,6 mm resp. 241,4 mm) a odroda Eroza *Coronilla varia* (175,3 mm resp. 153,7mm). Aj Drobná (2006) potvrdzuje vyššiu vyššiu rýchlosť obrastania u vyšľachtených druhov *Lotus corniculatus* v porovnaní s divorastúcimi druhmi a tiež u genetických zdrojov ďateliny lúčnej (*Trifolium pratense* L.). Podobne aj Kelman et al. (1997) a Sareen a Dev (2003) zistili u divorastúcich populácii *L. corniculatus* vysokú genetickú variabilitu a Martincová (2003) u genetických zdrojov kostravy trsťovníkovitej (*Festuca arundinacea* Schreb.).

V celkovom hodnotení najvyššia variabilita sa zistila v produkcii sušiny. Na variabilitu výšky úrod štatisticky významne vplývali všetky hodnotené faktory: rok, kosba, genotyp. Rozhodujúcou mierou sa na produkcii nadzemnej biomasy, najmä u ďatelinovín podieľal rok. Celková úroda sušiny sa pohybovala od 2,34 do 10,29 $t.ha^{-1}$ sušiny u tráv a od 0,59 do 12,72 $t.ha^{-1}$ sušiny u ďatelinovín. Najvyššiu úrodu sušiny sme zaznamenali u odrôd s najvyššou výškou rastliny *Bromus inermis* cv. Tabrom, (10,29 $t.ha^{-1}$) a *Onobrychis viciifolia* cv. Taja (12,72 $t.ha^{-1}$). Vzrastom najvyššie odrody mali aj najvyššiu úrodu krmu. Kontrolné odrody dosiahli vyššie úrody v porovnaní s ekotypmi. Uvedené pozorovania súhlasia s výsledkami Boller at al. (2004), ktorý zaznamenal vyššie úrody u odrôd *Trifolium pratense* L. v porovnaní s krajovými odrodami. Naopak Anesse et al. (2006) poukazuje na preukazne vyššiu produkciu sušiny a výšku rastliny u ekotypov druhu *Dactylis glomerata*. Kontrolné odrody dosiahli vyššiu úrodu sušiny v porovnaní s ekotypmi, medzi ekotypmi v rámci druhu neboli preukazné rozdiely. Medzi výškou rastliny a úrodou sušiny sa potvrdil silný korelačný vzťah, u tráv $r = 0,82^{++}$ a u ďatelinovín $r = 0,71^{++}$. Priebeh poveternostných faktorov počas vegetačného obdobia mal vysoko preukazný vplyv na výšku úrody. V extrémne suchom a na zrážky nepriaznivom v 2.úžitkovom roku (2006) veľká časť ďatelinovín vypadla a v poraste sa udržali len tie najsuchovzdornejšie a najtrvácnejšie druhy ako *Onobrychis viciifolia* a *Coronilla varia*. Trávy reagovali na sucho nižšími úrodami, no v pokuse sa udržali. Aj dlhotrvajúca zima na prelome rokov 2005/06, keď v mesiaci december boli namerané vysoké úhrny vo forme snehových zrážok (124,1 mm) nepriaznivo pôsobila na vytrvalosť, zvlášť u ďatelinovín. Z tráv najlepšie prezimovali druhy rodu *Bromus*, ktoré sa vyznačujú vysokým stupňom olistenia a vysokou zimuvzdornosťou.

V obsahu N- látok variabilita medzi ekotypmi a odrodami bola nízka, pričom ekotypy mali v priemere vyšší obsah N- látok než odrody. Medzi jednotlivými druhmi sme nezistili výrazné rozdiely. Výrazné rozdiely boli medzi floristickými skupinami, pričom vyšší obsah bol u ďatelinovín v porovnaní s trávami (192,8- 150,8 $g.kg^{-1}$ sušiny), čím sa potvrdilo, že ďatelinoviny obsahujú viac N- látok než trávy. Z tráv najvyšší obsah N- látok bol zaznamenaný pri lipnici lúčnej (*Poa pratensis*) a najnižší u druhu *Trisetum flavescens*. Obsah N- látok stúpal v poradí: *Trisetum flavescens<Bromus erectus<Phleum pratense< Bromus inermis<Phleum phleoides< Festuca rubra< Festuca valesiaca<Poa pratensis*. Z ďatelinovín najvyšší obsah dusíkatých látok počas sledovaného obdobia mal ranostaj pestrý (*Coronilla varia*) a najnižší lucerna ďatelinová (*Medicago lupulina*). Nízky obsah dusíkatých a minerálnych látok u populácii *Medicago* uvádza aj Drobná a Bieliková (2008).

Hodnotením divorastúcich ekotypov a kontrolných odrôd sa ukázalo, že sledované genotypy sa vyznačovali dobrým úrodotvorným potenciálom a dobrými agronomickými a kvalitatívnymi parametrami. Získané výsledky boli publikované v prácach (Martincová et al. 2007; Martincová 2009; Martincová & Kizeková 2010).

Tabuľka 1: Charakteristika morfologických a hospodárskych znakov u tráv – priemer rokov 2005–2007

Var.	Druh	Ekotyp/Odroda	Výška rastliny (mm)	Rýchlosť jar. rastu (mm)	Rýchlosť obrastania (mm)	Úroda sušiny ($t.ha^{-1}$)	Obsah N- látok ($g.kg^{-1}$)
1.	*Festuca rubra*	SVKNTAT01-454	446,8	155,7	163,3	2,94	147,5
2.	*Festuca rubra*	SVKNTAT01-371	487,8	180,9	157,3	2,93	166,9
3.	*Festuca rubra*	SVKNTAT01-198	470,5	185,8	152,8	2,34	155,2
4.	*Festuca valesiaca*	SVKGEM 02-18	455,5	202,8	160,2	3,73	153,6
5.	*Festuca rubra*	Levočská	598,4	266,0	238,7	5,85	140,6
6.	*Poa pratensis*	Hontianske Nemce	618,3	225,3	233,0	3,79	165,2
7.	*Poa pratensis*	Čierny Balog	407,1	158,6	180,0	2,98	169,3
8.	*Poa pratensis*	Lea	419,4	144,3	191,2	3,61	167,2
9.	*Trisetum flavescens*	CZE KRK 01-77	674,2	334,6	374,5	3,43	128,2
10.	*Trisetum flavescens*	Horal	671,8	321,9	169,5	5,06	148,2
11.	*Phleum pratense*	SVKNTAT01-433	749,2	249,8	254,0	3,77	154,2
12.	*Phleum pratense*	SVKNTAT01-193	562,2	213,6	229,1	3,52	144,7
13.	*Phleum phleoides*	Biele Karpaty	650,9	263,1	228,1	3,86	148,5
14.	*Phleum pratense*	Levočská	814,7	332,2	248,5	3,70	139,4
15.	*Bromus erectus*	SVKGEM02-43	798,7	349,6	388,2	7,33	143,9
16.	*Bromus erectus*	SVKGEM02-74	811,4	313,6	359,2	6,68	142,7
17.	*Bromus erectus*	SVKGEM02-54	830,0	330,3	359,5	6,71	150,8
18.	*Bromus inermis*	Tabrom	977,2	370,2	339,0	10,29	148,4
$\bar{x}$			637,5	255,5	245,9	4,58	150,8
LSD 0,05			130,8	66,0	74,7	1,38	26,51

Tabuľka 2: Charakteristika morfologických a hospodárskych znakov u ďatelinovín – priemer rokov 2005–2007

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

Záver

V rámci výskumnej úlohy „Opatrenia zohľadňujúce adaptáciu na klimatické zmeny v oblasti lúkarstva, pasienkárstva a pestovania poľných plodín “ sme v rokoch 2005-2007 sledovali kolekciu tráv a ďatelinovín. Odrody sa všeobecne vyznačovali rýchlejším jarným rastom, mali rýchlejšiu schopnosť obrastania, vyššiu výšku rastliny a taktiež dosahovali aj vyššiu produkciu sušiny v porovnaní s ekotypmi. Najvyššiu úrodu sušiny sme zaznamenali u odrôd s najvyššou výškou rastliny *Bromus inermis* cv. Tabrom (10,29 $t.ha^{-1}$) a *Onobrychis viciifolia* cv. Taja (12,72 $t.ha^{-1}$). V obsahu N- látok sa dosiahol vyšší obsah u ďatelinovín v porovnaní s trávami (192,8- 150,8 $g.kg^{-1}$ sušiny). Dosiahnuté výsledky poukazujú na možnosť uplatnenia vhodných divorastúcich ekotypov pri šľachtení nových odrôd adaptabilných voči suchu a tiež ako

komponent do lúčnych porastov na zvýšenie diverzity trávnych porastov. Ako vhodný komponent do lúčnych porastov a pre ďalšie využitie vo výskume a v šľachtení z hľadiska prispôsobeniu sa daným podmienkam a vyznačujúcimi sa dobrými agronomickými vlastnosťami a vysokou produkčnou schopnosťou odporúčame vičenec vikolistý, ranostaj pestrý a z tráv stoklas vzpriamený.

Literatúra

ANESSE, V. *et al.* 2006. Quantitative and Qualitative Traits of Natural Ecotypes of Perennial Grasses (*Dactylis glomerata,* L., *Festuca arundinacea* Schreb., *Phalaris tuberosa*. L., *Brachypodium rupestre* (Host) R.et. S.) Collected in Southern Italy. In *Genetic Resources and Crop Evolution*. 53 (2): 431-441

BOLLER, B. *et al.* 2004. Mantklee landraces a valuable source of genetic variation for red clover breeding. In *Grassland Science in Europe* 9: 386-388.

DROBNÁ, J. 2006. Hodnotenie morfologických a agronomických znakov divorastúcich populácií ľadenca rožkatého (*Lotus corniculatus* L.). In *Aktuální poznatky v pěstovaní, šlechtění a ochraně rostlin*. Brno. 23-24.11.2006: 181-185. ISBN 80-86908-03-8

DROBNÁ, J. 2008. Obsah dusíkatých a minerálnych látok u divorastúcich populácii a odrôd druhov *Medicago.* In *Hodnotenie genetických zdrojov rastlín pre výživu a poľnohospodárstvo*: zborník abstraktov z 5.vedeckej konferencie s medzinárodnou účasťou , Piešťany. 6-7.5.2008: str.31. ISBN 978-80-88872-74-0

HOPKINS, A., HRABĚ,F. 2001. Organic grasssland farming and nature conservation. In *Organic grassland Framing: Proceedings of the International Occasional Symposium of the European Grassland Federation*, Witzhausen ,2001, ISBN 3-932 752-75-9, pp. 91-106

KIZEKOVÁ, M., POLLÁK, Š. 2010. SALVERE Semi- natural grassland as a source of biodiversity improvement : *proceedings of the 3 rd Regional Workshop Banská Bystrica*, Slovakia, 22-23. september 2010, Banská Bystrica

KRAUTZER,B., PÖTSCH, E.M. 2009. The use of semi-natural grassland as a donor sites fot the restoration of high nature value areas. In Cagaš, B., Macháč, R. Nedělník, J. (ed.). *Alternative functions of grassland: proccedings of the 15th European grassland federation symposium* , 7-9 september 2009, Brno.- Brno: Organising committee of the 15 th EGF symposium, *Grassland Science in Europe,* vol.14, 2009. ISBN 978-80-86908-15-1. p. 478-492

KELMAN, W. M. *et al.* 1997. Genetic variation for seasonal herbage yield, growth habit, and condensed tannis in *Lotus pedunculatus* Cav.and *Lotus corniculatus* L. Australian Journ. of Exp. Agric. 48 (7): 959-968

MARTINCOVÁ, J. 2003. Evaluation of genetic resources of tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.). *Proc. 25th EUCARPIA Fodder Crop and Amenity Grasses Section Meeting*. In Czech J. Genet. Plant Breed., 39 (*Special Issue*): 215-217. ISSN 1212-1975

MARTINCOVÁ, J., DROBNÁ, J., KIZEKOVÁ, M. 2007. Štúdium agronomických znakov vybraných odrôd a divorastúcich populácií tráv a ďatelinovín In *Ekológia trávneho porastu VII: zborník abstraktov z medzinárodnej vedeckej konferencie pri príležitosti 45. výročia vzniku VÚTPHP a životného jubilea prof. Ing. Vladimíra Krajčoviča.* SCPV- VÚTPHP Banská Bystrica. 28-30. november 2007, str. 73-74. ISBN 978-80-88872-68-9

MARTINCOVÁ, J. 2009. Assessment of genetic resources of wild ecotypes and a range of cultivars of grasses and forage legumes. In Cagaš, B., Macháč, R. Nedělník, J. (ed.). *Alternative functions of grassland: proccedings of the 15th European grassland federation symposium* , 7-9 september 2009, Brno.- Brno: Organising committee of the 15 th EGF symposium, *Grassland Science in Europe* , vol.14, 2009. ISBN 978-80-86908-15-1. p. 531-534

MARTINCOVÁ J., KIZEKOVÁ, M. 2010. Hodnotenie morfologických a biologických vlastností divorastúcich ekotypov a vyšľachtených odrôd tráv a ďatelinovín vo vzťahu k ich stanovištným podmienkam. In *Vliv abiotických a biotických stresorů na vlastnosti rostlin 2010. (Sbornik příspevků*): Praha: VÚRV Praha- Ruzyňe, ČZU, 10.2-11.2. 2010, s. 293-298

SARREN, S., DEV. 2003. A prelimary study to explore potential of *Lotus corniculatus* L. in Palampur. (Himachal Pradesh. India). *Lotus Newsletter*. 33: 3-5

ŠRÁMEK, P., ŠEVČÍKOVÁ, M. 2005. Využití genofondu trav v lučních porostech neprodukčního charakteru. In *Konzervace a regenerace genetických zdrojů vegetativne množených druhů rostlin a Dostupnost a využívaní genetických zdrojů vegetativne množených druhů rostlin a podpora biodiverzity: Sborník referátů,* Praha, 2005, ISBN 80-86555-71-2, s. 75-81.

Adresa autorov:
Ing. Janka Martincová, Ing. Miriam Kizeková, Centrum výskumu rastlinnej výroby Piešťany- Výskumný ústav trávnych porastov a horského poľnohospodárstva Banská Bystrica, Mládežnícka 36, 974 21 Banská Bystrica email: martincova@vutphp.sk

PRODUKTIVITA LINIÍ OZIMÉ PŠENICE S DLOUHÝMI PLEVAMI, MNOHOŘADÝM KLASEM A NORMÁLNÍM KLASEM V ROZDÍLNÝCH PĚSTEBNÍCH SYSTÉMECH
PRODUCTIVITY OF WINTER WHEAT LINES WITH LONG GLUMES, MULTIROW SPIKE, AND STANDARD SPIKE GROWN UNDER DIFFERENT CROPPING SYSTEMS

Petr MARTINEK – Petra POKOROVÁ – Pavel ŠLÍMAR – Marie VÁŇOVÁ

A set of winter wheat (Triticum aestivum L.) genotypes comprising six lines with long glumes (LG), six lines with multirow spike (MRS) and six check cultivars with different grain quality (Federer - E, Iridium - A, Bakfis - A, Bohemia - A, Baletka - B and Biscay - C) with normal spike (NS) were grown under different cropping systems in 2009/2010. The objective of the study was to assess responses of cultivar groups with different spike morphology (and thus with modified spike sink capacity) to increasing nitrogen doses, fungicidal treatment and growth regulators. The genotypes were grown after preceding crop oilseed rape in 10-m^2 plots, three times replicated. Four treatments were used: K0 – no fungicides and growth regulators, and F0, F100, F200 – application of fungicides and growth regulators with different nitrogen doses 0, 100 and 200 kg.ha^{-1}. The highest average yields were obtained in check wheat cultivars with NS (8.25 t.ha^{-1}), slightly lower in lines with LG (7.83 t.ha^{-1}) and the lowest in MRS (6.31 t.ha^{-1}). The lines with LG and especially with MRS were supposed to exhibit positive responses to supplied energy inputs (fertilization and pesticides) as compared with common cultivars with NS. However, higher spike assimilation capacity determined by larger area of chaffs and glumes in LG and higher reproductive spike capacity conditioned by an increased spikelet number in MRS did not show statistically significant increase in grain yield for treatments with higher nitrogen doses in comparison with the cultivar group with NS. The cause of this effect is discussed. Perspective donors for breeding use are considered those with LG. Donors with MRS seem to need further improvement of their genetic background.
Key words: winter wheat, long glumes, multirow spike, spike productivity, cropping systems, nitrogen, pesticides

Úvod

Pokrok ve šlechtění pšenice je spojován s velikostí sklizňového indexu (HI) (Calderini et al. 1999), ale sama jeho velikost je pokládána za limitovanou teoretickou veličinu, která může maximálně dosahovat hodnot okolo 60% (Austin et al. 1980). Proto další možnost zvyšování výnosu je silně ovlivňováno schopností produkovat co nejvíce biomasy na jednotku plochy porostu. To však je problém. Přestože se v současnosti hledají účinné genetické nástroje pro zvyšování výkonnosti fotosyntézy, tak zatím nejsou k disposici.

Ukazuje se, že vyšší výnos může být dosahován snadněji, pokud je tvořen větším podílem polysacharidové (škrobové) složky, kdy na biosyntézu jejího jednotkového hmotnostního množství je zapotřebí méně metabolické energie než na biosyntézu složky bílkovinné. Budoucí odrůdy zřejmě budou dosahovat vysokých výnosů vyšším podílem škrobů v zrnu a nižším podílem bílkovin. K tomuto jevu zřejmě již dochází a tomu odpovídá změna výkupní normy ČSN 46 1100-2 pro potravinářskou pšenici v České republice, kdy v roce 2001 došlo ke snížení nejnižšího přípustného limitu pro obsah bílkovin v zrnu pro výkup potravinářské pšenice z původních 12,5 % na 11,5 %. Pšenice, určené pro potravinářské (především pekárenské) využití, by mohly v budoucnu eliminovat nižší obsah bílkovin optimalizací složení bílkovinných alel (především HMW gluteninů), které by zajišťovaly nezbytné technologické parametry.

Zvyšování výnosů je spojováno se zvyšováním genetického výnosového potenciálu (YP), který je definován jako výnos odrůdy adaptované na dané prostředí za ideálních podmínek růstu, neomezující zásoby živin, vody, za vyloučení škůdců, chorob, plevelů, poléhání a ostatních stresových faktorů, které jsou pod účinnou kontrolou (Evans & Fischer 1999). Doposud byl vzestup výnosů dosahován především změnami proporcí rostliny (zkrácením délky stébla a zvýšením produktivity klasu) a změnami architektury porostů (zvýšení hustoty porostu) a prodloužením životnosti asimilačního aparátu (Austin et al. 1980). Současné odrůdy pšenice se již výrazně přibližují optimu adaptace na dané podmínky prostředí i délkou stébla (Int. Workshop on Incereasing Wheat Yield Potential, CIMMYT, Mexiko, 2006) a lze očekávat, že na úrodných půdách a při použití intenzivních pěstebních technologií bude sehrávat důležitou roli limitace úložnou kapacitou (sinkem) klasu. Ta stimuluje přísun asimilátů do zrna v období po antezi (Wang et al. 1998). Proto jsou hledány genové zdroje (GZ) umožňující zvyšování počtu reprodukčních orgánů (Miralles & Slafer 2007), jakými je například počet klásků v klasu, počet zrn v klásku nebo počet zárodků v kvítku (Reynolds et al. 2005).

Práce se zabývá možností využití pšenice seté (*Triticum aestivum* L.) s dlouhými plevami (LG - long glumes) a s mnohořadým klasem (MRS - multirow spike). Jejich vzhled je na obrázku 1. Znaky LG a MRS byly přeneseny do běžné hexaploidní pšenice z příslušných donorů na pracovišti Zemědělského výzkumného ústavu v Kroměříž, s.r.o. a Agrotest fyto, s.r.o. v Kroměříži. LG jsou řízeny genem *P* na chromosomu 7AL (Watanabe & Imamura 2002; Akond et al. 2008), MRS je podmíněn genem *mrs1* na chromosomu 2DS (Dobrovolskaya et al. 2009). Uvažuje se, že LG by mohly zvyšovat asimilační schopnost klasu na konci dozrávání a MRS by mohl zvyšovat úložnou kapacitu klasu v důsledku vyššího počtu klásků v klasu a tím i

založených obilek v klasu (Martinek et al. 2006, 2010). Je studována reakce linií pšenice s LG a MRS v různě intenzivních pěstebních systémech v porovnání se skupinou kontrolních odrůd s normálním klasem (NS - normal spike).

Obr.1: Klasy testovaných linií: vlevo dlouhé plevy (LG), vpravo mnohořadý klas (MRS)

Materiál a metody

Materiál

Jsou uvedeny výsledky dvou pokusů sklizených v roce 2010: a) pokus s rozdílnými intenzitami pěstování, který byl proveden v Kroměříži a b) odrůdový pokus při intenzivní pěstební technologii, který byl na pozemcích zemědělské firmy Rostěnice, a.s. v Rostěnicích u Vyškova.

Pro polní pokus v Kroměříži byly použity tři skupiny genotypů lišících se morfologií klasu. Skupina s LG obsahovala šest linií: KM 103-09LG, KM 101-09LG, KM 105-09LG, KM 99-09LG, KM 55-09LG, KM 77-09LG, skupina s MRS šest linií: KM 121-09MRS, KM 59-09MRS, KM 52-09MRS, KM 68-09MRS, KM 53-09MRS, KM 71-09MRS a skupina kontrolních odrůd s NS představovala současné registrované odrůdy zařazené do rozdílné kategorie kvality zrna: Federer - E, Iridium - A, Bakfis - A, Bohemia - A, Baletka - B a Biscay - C. Linie s LG a MRS byly vybrány pro pokusy tak, aby se nelišily příliš od běžných odrůd délkou stébla a aby měly rozdílný původ.

Pro polní pokus v Rostěnicích byly vybrány perspektivní odrůdy a novošlechtění ozimé pšenice za účelem prezentace odrůd v rámci polního dne. Celkem bylo v Rostěnicích vyseto 30 genotypů, mezi kterými rovněž byly zařazeny dvě linie s MRS: KM 52-09MRS, KM 53-09MRS, které byly rovněž vysety v pokusu v Kroměříži. Seznam genotypů vysetých v Rostěnicích je zřejmý z tabulky 5.

Metody

Oba výše uvedené pokusy byly vysety na pozemcích půdního typu černozem hnědozemní po předplodině ozimé řepce v řepařské výrobní oblasti v první polovině agrotechnické lhůty roku 2009. Setí bylo provedeno po předchozím diskování do hloubky 10-12 cm. Pozemek v Kroměříži byl před setím vyhnojen zásobním hnojením 100 $l.ha^{-1}$ DAM + 200 $kg.ha^{-1}$ Amofos, čímž se dostalo do půdy celkem 54 $kg.ha^{-1}$ N a 104 $kg.ha^{-1}$ P_2O_5. Setí bylo provedeno secím strojem Amazone se záběrem 2m vybaveným rotačními branami, schopnými optimálně připravit seťové lůžko. Byl použit výsevek 4 miliony klíčivých zrn. V Rostěnicích byl jako zásobní hnojení použit síran amonný 200 $kg.ha^{-1}$ (= 40 $kg.ha^{-1}$ N + 48 $kg.ha^{-1}$ S) a 100 $kg.ha^{-1}$ Amofos (= 12 $kg.ha^{-1}$ N + 52 $kg.ha^{-1}$ P_2O_5). Setí bylo provedeno strojem Väderstadt se záběrem 6m. Výsevek byl 3,70 milionu klíčivých zrn na hektar (u hybridních odrůd v zařazených do pokusu byl výsevek 2 mil. klíčivých zrn). Herbicidní ochrana proti plevelům byla prováděna s ohledem na aktuální výskyt plevelů.

Výsev jednotlivých genotypů se v Kroměříži uskutečnil na vyrovnaný pozemek do pásů, které byly následně rozděleny na pokusné parcely o velikosti $10m^2$. Každý vysetý materiál byl zastoupen 12 parcelami. Byly zkoušeny čtyři varianty hnojení a chemického ošetření proti chorobám (0K - bez hnojení a bez fungicidů, 0F - bez hnojení a s fungicidy, 100F - 100 kg dusíku a fungicidy, 200F - 200 kg dusíku a fungicidy), které byly zvoleny pro posouzení vlivu hnojení (především dávky dusíku) a fungicidního ošetření (ochrana proti chorobám, zkrácení délky) na výnosové a produkční charakteristiky zkoumaných genotypů. Varianty 0F, 100F a 200F se nelišily fungicidním ošetřením. Přehled použitých ošetření je uveden v tabulce 1. Rozsah pokusu tedy představoval 216 parcel (18 genotypů x 4 varianty ošetření x 3 opakování). Výsledky

byly zpracovány pomocí analýzy variance a rozdíly mezi variantami byly otestovány pomocí Tukeyova testu při P = 0,05.

Tabulka 1: Varianty hnojení a chemického ošetření během vegetace roku 2010 v Kroměříži

Zásah	Varianta			
	0K - bez hnojení a bez fungicidů	0F - bez hnojení a s fungicidy	100F - 100 kg dusíku a fungicidy	200F - 200 kg dusíku a fungicidy
Regenerační přihnojení			110 kg.ha^{-1} LAV (30 kg.ha^{-1} N)	Močovina 140 kg.ha^{-1} N (66 kg.ha^{-1}) 110 LAV kg.ha^{-1} (30 kg.ha^{-1} N)
Konec odnožování		Retacel (0,75 l.ha^{-1})	Retacel (0,75 l.ha^{-1})	Retacel (0,75 l.ha^{-l})
Produkční hnojení			110 kg.ha^{-1} LAV (30 kg.ha^{-1} N)	145 kg.ha^{-1} LAV (40 kg.ha^{-1} N)
Začátek sloupkování			DAM 390 75 l.ha^{-1} (30 kg.ha^{-1} N)	DAM 390 75 l.ha^{-1} (30 kg.ha^{-1} N)
Začátek sloupkování		Retacel (1,0 l.ha^{-1})	Retacel (1,0 l.ha^{-1}) + Moddus (0,15 l.ha^{-1})	Retacel (1,0 l.ha^{-1}) + Moddus (0,15 l.ha^{-1})
Sloupkování		Acanto prima (1,5 kg.ha^{-1}) + Talius (0,15 l.ha^{-1})	Acanto prima (1,5 kg.ha^{-1}) + Talius (0,15 l.ha^{-1})	Acanto prima (1,5 kg.ha^{-1}) + Talius (0,15 l.ha^{-1})
Kvalitativní přihnojení			55 kg.ha^{-1} LAV (15 kg.ha^{-1} N)	145 kg.ha^{-1} LAV (40 kg.ha^{-1} N)
Konec sloupkování		Prosaro 0,75 l.ha^{-1}	Prosaro 0,75 l.ha^{-1}	Prosaro 0,75 l.ha^{-1}
Metání		Caramba 0,8 l.ha^{-1}	Caramba 0,8 l.ha^{-1}	Caramba 0,8 l.ha^{-1}

Hnojiva byla navažována zvlášť na jednotlivé parcely a aplikována většinou ručně. Pesticidy byly aplikovány pomocí zádových postřikovačů. Během vegetace byly hodnoceny základní vegetační charakteristiky. Ve zralosti byly odebrány vzorky klasů (40 klasů z každé parcely) pro určení charakteristik produktivity klasu a snopky pro určení HI.

V Rostěnicích byly jednotlivé odrůdy vysety na ploše 0,2 ha bez opakování. Použitá technologie pěstování je uvedena v tabulce 2.

Tabulka 2: Přehled hnojení a chemického ošetření během vegetace roku 2010 v Rostěnicích

Datum	Operace	Množství
3.3.	Regenerační hnojení	230 kg.ha^{-1} LAV 27 = 62 kg.ha^{-1} N
7.4.	Produkční hnojení	150 l.ha^{-1} ha močovina = 69 kg.ha^{-1} N
7.4.	Morforegulátor	1,0 l.ha^{-1} Retacel
23.4.	Hnojení	200 kg.ha^{-1} DAM = 60 kg.ha^{-1} N
28.4.	Morforegulátor	0,3 l.ha^{-1} Moddus + 0,5 l.ha^{-1} Retacel
22.5.	Fungicidy	1,0 l.ha^{-1} Alert S + 0,1 l.ha^{-1} Vaztak

Výsledky a diskuse

Analýzami variance byl prokázán vliv ošetření a ve většině případů i morfotypu klasu na výnos a dílčí prvky produktivity klasu. Skupina odrůd s NS poskytla výnos v průměru 8,25 t.ha^{-1}, za ní následovala skupina genotypů s LG s výnosem 7,83 t.ha^{-1} a nejnižší výnos byl zaznamenán u MRS 6,31 t.ha^{-1}.

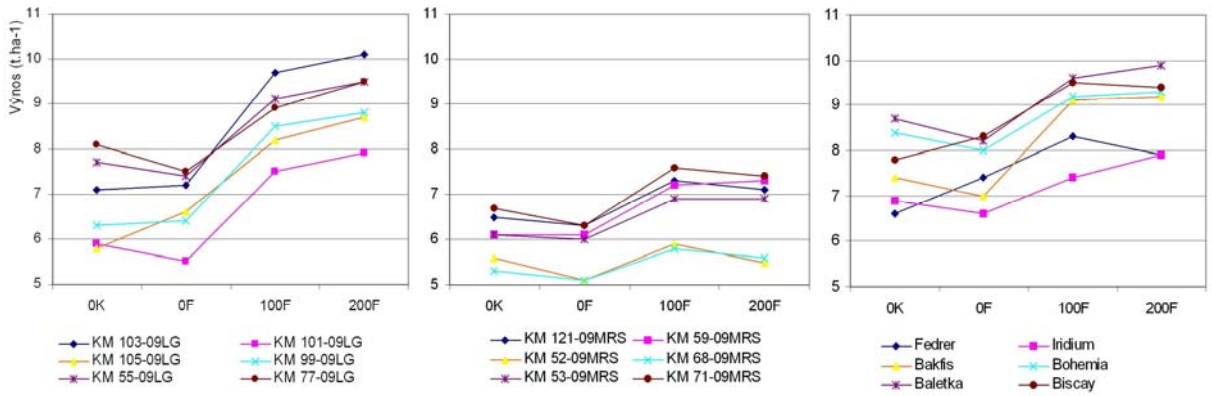
Nejvyšší průměrná hmotnost zrna klasu byla překvapivě u LG - 2,25 g, nižší byla u MRS - 2,15 g a nejnižší u NS 2,03 g. Jednotlivé skupiny hodnocených genotypů se nevyznačovaly průkaznými rozdíly v počtu zrn klasu (LG - 44,7, MRS - 46,2, NS - 43,9). To naznačuje, že zvětšená plocha plev u linií s LG by skutečně mohla mít pozitivní vliv na přísun asimilátů do vyvíjejících se obilek. Poměrně vysoká průměrná hmotnost 1000 zrn u LG (47,3 g) ve srovnání s NS (42,1 g) a i MRS (44,5 g) by tuto hypotézu mohla potvrzovat. Za normálního průběhu dozrávání postupně přestávají jako první asimilačně fungovat listy ve spodních patrech porostu, potom horní listy, na konci dozrávání zasychá stéblo a nakonec klas. Zvětšená velikost plev, která je typická pro některé druhy pšenice (tetraploidní *T. polonicum* L a hexaploidní *T. petropavlovskyi* Udacz. et Migusch) zřejmě má u těchto druhů nějaký evoluční význam. Domníváme se, že význam LG by mohl spočívat v prodloužení asimilační činnost klasu na a ve schopnosti produkovat větší

množství asimilátů klasu ve prospěch tvorby obilek. To by mohlo představovat výhodu zvláště na konci dozrávání oproti běžným klasům s normální velikostí plev. Průměrná velikost HI se výrazně nelišila mezi soubory hodnocených genotypů. Rozdíly v průměrných výnosech jednotlivých skupin lišících se morfotypy klasu tedy nebyly způsobeny podstatnými změnami v proporcích mezi stéblem a klasem ale spíše hustotou porostu, danou počtem klasů na jednotku plochy. Zřetelné je to u MRS, kde bylo zjištěno v průměru jen 470 klasů na m^2, zatímco u LG bylo zjištěno 530 a u NS dokonce 601 klasů na m^2. U MRS pravděpodobně bude nutné dál zlepšovat architektoniku porostu a dosáhnout vyšší produktivní hustoty porostu. Robustnější klasy linií s MRS, dané výrazně zvýšeným počtem klásků (obr. 1 vpravo), vyrůstají na silnějších stéblech a jsou doprovázeny širšími listy, které zřejmě zabírají v porostech více místa na úkor produktivních stébel.

Tabulka 3: Produkční charakteristiky hodnocených genotypů (průměry 0K, 0F, 100F, 200F)

Odrůda (linie)	Výnos ($t.ha^{-1}$)	Hmotnost zrna klasu (g)	Počet zrn v klasu	Počet klasů na $1m^2$	Výška porostu (cm)	Sklizňový index	Hmotnost 1000 zrn (g)	Objemová hmotnost ($kg.hl^{-1}$)
KM 103-09LG	8,53 a-c	2,20 b-e	45,1 b-e	591 a-c	81 a-c	0,48 a	46,2 c	73,8 f
KM 101-09LG	6,68 ef	2,18 b-e	45,6 b-e	452 e-g	90 ab	0,43 c	45,2 c-e	75,7 b-e
KM 105-09LG	7,34 c-e	2,17 b-e	46,3 b-d	501 de	94 a	0,46 ab	43,7 ef	75,8 b-e
KM 99-09LG	7,47 c-e	2,24 a-d	46,2 b-d	465 e-g	92 a	0,44 b	44,8 c-e	75,8 b-e
KM 55-09LG	8,41 a-c	2,33 a-c	41,6 d-f	569 b-d	85 a-c	0,45 b	52,0 a	75,7 c-e
KM 77-09LG	8,52 a-c	2,36 ab	43,4 b-f	604 a-c	86 a-c	0,47 ab	52,0 a	75,8 b-e
LG průměr	*7,83*	*2,25*	*44,7*	*530*	*88*	*0,46*	*47,3*	*75,4*
KM 121-09MRS	6,80 e	2,21 b-e	44,4 b-f	414 fg	92 ab	0,41 c-e	49,0 b	71,4 h
KM 59-09MRS	6,67 ef	1,94 d-f	44,8 b-e	503 de	83 a-c	0,42 cd	40,8 g	75,0 e
KM 52-09MRS	5,51 fg	2,53 a	54,8 a	400 g	83 a-c	0,36 f	43,9 d-f	73,2 fg
KM 68-09MRS	5,42 g	2,04 c-f	44,3 b-f	413 fg	81 a-c	0,39 e	44,4 c-e	72,4 gh
KM 53-09MRS	6,47 e-g	1,97 d-f	39,0 f	497 d-f	88 a-c	0,43 c	48,6 b	71,8 h
KM 71-09MRS	7,01 de	2,19 b-e	50,0 ab	596 a-c	84 a-c	0,41 c-e	40,6 g	75,2 de
MRS průměr	*6,31*	*2,15*	*46,2*	*470*	*85*	*0,40*	*44,5*	*73,1*
Iridium	7,17 de	2,10 b-e	48,7 bc	550 b-d	76 c	0,46 ab	41,8 fg	76,8 ab
Bakfis	8,19 a-d	1,76 f	43,3 b-f	673 a	76 c	0,49 a	37,5 h	76,3 a-c
Baletka	9,09 a	1,93 ef	42,3 d-f	658 a	85 a-c	0,45 b	40,2 g	77,1 a
Biscay	8,74 ab	2,22 b-e	45,1 b-e	634 ab	79 bc	0,47 ab	43,4 ef	72,1 gh
Bohemia	8,72 ab	2,18 b-e	43,5 b-f	523 c-e	93 a	0,40 de	45,9 cd	75,6 c-e
Fedrer	7,56 b-e	2,01 d-f	40,3 ef	571 b-d	91 ab	0,35 f	44,0 c-e	76,2 a-d
Kontroly prům.	*8,25*	*2,03*	*43,9*	*601*	*83*	*0,44*	*42,1*	*75,7*
Celkový průměr	*7,46*	*2,14*	*44,9*	*534*	*85*	*0,43*	*44,7*	*74,7*

Byla zjištěna rozdílná reakce jednotlivých skupin testovaných genotypů na varianty pěstování, především na odstupňované dávky dusíku ve variantách 0F, 100F a 200F (obr. 2, tab. 4). Je evidentní, že se stoupající dávky dusíku se nejvíce projevily vzestupem výnosů u LG (0F - 6,76; 100F - 8,66 a 200F 9,07 $t.ha^{-1}$), zatímco tento nárůst u MRS byl velmi malý (0F - 5,81; 100F - 6,77 a 200F 6,64 $t.ha^{-1}$). U většiny linií došlo dokonce ve variantě 0F ke snížení výnosů oproti variantě 0K vlivem stresu, který byl navozen spolupůsobením fungicidů, morforegulátorů a nedostatku živin. Poměrně výrazná kladná výnosová odezva na hnojení dusíkem u linií s LG naznačuje že LG by se mohly uplatnit ve šlechtění odrůd pro intenzivní pěstební podmínky. Naopak linie s MRS se jeví zatím jako málo šlechtitelsky využitelné vzhledem ke stávajícím nízkým výnosům a malé odezvě na hnojení dusíkem. Dokonce u MRS ve variantě s 200 kg dusíku došlo ke snížení výnosů oproti variantě se 100 kg dusíku. Bylo by zajímavé odhalit příčinu těchto diametrálních odlišností v chování linií s LG a MRS. Podle našeho předpokladu by vyšší úložná kapacita u MRS měla poutat více asimilátů v podmínkách jejich nadbytku (který byl podpořen vyššími energetickými vstupy v podmínkách s vyššími dávkami hnojiv a s fungicidy). To se mělo projevit vyšším nárůstem výnosů oproti liniím s normálními klasy pěstovanými za stejných podmínek. Příčiny této neočekávané reakce zřejmě lze hledat ve vyšší míře redukce počtu obilek v průběhu růstu, jejíž příčinou může být zhoršený transport asimilátů. Ten mohl být ovlivněn výrazně odchylným průběhem počasí od normálu (například enormními srážkami během května, které představovaly 330 % dlouhodobého normálu), rozdílnou mírou transpirace (podmíněným rozdílný výparným povrchem jednotlivých typů iklasů) nebo odchylkami v uspořádání a průřezu cévních svazků nezbytných pro transport asimilátů do obilek. U linií s LG zřejmě růst obilek nebyl tak závislý na transportu asimilátů z vegetativních orgánů rostliny, neboť u nich se na tvorbě zrna mohl výrazněji podílet samotný klas.



Obr. 2: Výnosy hodnocených genotypů při rozdílných variantách pěstování - vlevo dlouhé plevy, uprostřed mnohořadý klas a vpravo normální klas kontrolních odrůd.

Tabulka 4: Charakteristiky skupin genotypů s rozdílnými morfotypy klasu (průměry 0K, 0F, 100F, 200F)

Morfotyp	LG				MRS				NS			
Ošetření	0K	0F	100F	200F	0K	0F	100F	200F	0K	0F	100F	200F
Výnos (t.ha^{-1})	6,82	6,76	8,66	9,07	6,04	5,81	6,77	6,64	7,65	7,58	8,84	8,91
Hmotnost zrna klasu (g)	1,99	2,13	2,36	2,50	2,11	2,10	2,21	2,17	1,83	2,10	2,09	2,10
Počet zrn v klasu	40,9	42,9	45,9	49,0	46,5	46,1	46,4	45,8	40,8	45,3	44,5	44,9
Počet klasů na 1m^2	498	462	588	574	495	427	480	480	611	552	605	638
Výška porostu (cm)	100	80	85	87	101	76	80	83	96	78	79	80
Sklizňový index	0,44	0,46	0,46	0,47	0,40	0,41	0,40	0,36	0,44	0,45	0,46	0,44
Hmotnost 1000 zrn (g)	46,4	47,5	48,3	47,1	43,4	44,4	45,8	44,6	41,0	42,8	42,9	41,8
Objemová hmot. (kg.hl^{-1})	75,4	74,7	75,9	75,7	73,6	72,8	73,1	73,0	75,7	75,2	76,0	75,9
Poléhání (9-1)	9,0	9,0	9,0	9,0	8,3	9,0	9,0	9,0	9,0	9,0	9,0	9,0
Metání (dní od 1.1.2010)	152	153	155	156	154	155	157	158	152	154	155	156
Zralost (dní od 1.1.2010)	201	203	202	204	200	202	201	202	201	203	202	203
Padlí travní (9-1)	7,7	8,8	8,7	8,8	6,7	8,7	8,6	8,8	7,1	8,9	8,7	8,8
Fuzárium v klasu (9-1)	7,3	8,7	8,8	9,0	6,5	8,0	8,0	8,0	6,9	8,3	8,5	8,5
Rez pšeničná (9-1)	4,7	7,7	8,8	8,5	5,2	8,2	9,0	8,7	4,7	8,2	8,5	8,5

Výše uvedené výsledky svědčí spíše v neprospěch využívání MRS. Výnosové výsledky dvou linií KM 52-09MRS, KM 53-09MRS (obr. 3) na větší ploše v konkurenci s 28 předními současnými odrůdami ukazují, že tyto se výnosově umístily na 21. a 23. místě (tab. 5). Vzhledem k tomu, že se jedná o dosud málo prošlechtěné linie, které nevznikly na specializovaném šlechtitelském pracovišti to není výrazně špatný výsledek, zvláště pokud se přihlédne k jejich poměrně vysokým hodnotám obsahu bílkovin a Zelenyho sedimentačního testu.

Pro exaktní studium významu změněných morfotypů klasu by bylo vhodné vytvořit téměř izogenní linie, lišící se pouze v daném předmětném znaku, přičemž ostatní znaky genetického pozadí porovnávaných linií by byly shodné. Prezentované výsledky je nutné chápat jako dílčí. Pokus bude nezbytné opakovat ve více letech aby se mohl vyhodnotit vliv ročníku a počasí na specifiku tvorby výnosu hodnocených genotypů.

Obr. 3: Porosty pšenice s mnohořadým klasem v Rostěnicích: vlevo KM 52-09MRS, vpravo KM 53-09MRS

Tabulka 5: Výsledky pokusu s ozimou pšenicí v ZD Rostěnice u Vyškova 2010

Odrůda	Třída kvality	Výnos ($t.ha^{-1}$)	Výška porostu (cm)	Objemová hmot. ($kg.hl^{-1}$)	N-látky (%)	Obsah škrobu (%)	Obsah mokrého lepku (%)	Zelenyho test (ml)	Pořadí výnosu
Bagou	C	9,79	70	69,0	13,2	57,0	30,3	39,9	1
Midas		9,56	80	75,0	13,6	57,6	30,6	44,3	2
RW Nadal	B	9,35	80	73,0	14,2	57,1	32,0	47,4	3
Csillag		9,20	65	78,0	14,5	56,2	35,7	53,7	4
Helmut	A	8,95	80	73,0	13,8	56,5	31,7	41,8	5
Bekés		8,75	75	74,0	14,7	55,8	34,7	45,5	6
Potenzial	A	8,66	80	75,0	13,6	57,3	30,6	43,9	7
Biscay	C	8,65	75	66,5	12,9	57,0	28,2	31,8	8
Dromos	C	8,61	85	70,5	12,8	56,8	29,1	35,1	9
Fény		8,55	70	76,5	13,1	57,4	28,8	38,5	10
Holló		8,37	85	75,0	14,0	57,6	33,1	48,0	11
Hatyü		8,30	60	72,5	14,2	57,4	32,2	46,5	12
Pentadur (*T. durum*)		8,21	80	73,0	13,6	57,0	30,3	42,9	13
Mulan	A	8,18	75	74,0	13,8	56,3	30,9	38,6	14
JB Asano		8,17	85	74,0	13,8	56,9	31,8	44,0	15
Iridium	A	8,10	75	74,5	14,6	56,1	33,9	52,3	16
Federer	E	8,04	80	74,0	13,7	56,9	32,1	44,4	17
Bakfis	A	8,03	70	74,0	14,1	57,1	32,7	43,1	18
Hymack (hybridní)		7,97	85	70,0	13,3	56,8	30,0	36,3	19
IS Agape		7,89	80	76,5	14,7	55,8	34,7	48,9	20
KM 52-09MRS		7,76	85	73,0	14,7	56,3	35,1	50,7	21
Baletka	A	7,72	80	74,5	14,0	57,7	31,3	43,9	22
KM 53-09MRS		7,72	85	69,0	15,1	55,9	33,9	46,1	23
Axis		7,67	75	76,0	13,8	56,1	31,5	43,7	24
IS Bonnet		7,61	70	74,5	15,0	56,4	35,1	54,7	25
Josef		7,34	70	75,5	15,3	54,8	37,2	54,0	26
Hybnos 1 (hybridní)		7,27	85	66,5	13,8	56,1	31,3	37,9	27
Alacris		7,24	75	74,0	14,5	56,2	33,0	49,5	28
Karpatia		7,17	75	74,0	14,5	56,6	34,0	50,2	29
IS Median		6,51	70	72,5	14,2	56,5	32,5	41,2	30

Závěr

Byla zjištěna reakce linií s dlouhými plevami (LG), mnohořadým klasem (MRS) a normálním klasem (NS) na rozdílné systémy pěstební technologie, především na odstupňované dávky dusíku a fungicidní ochranu.

Jako šlechtitelsky perspektivní se jeví LG, které byly přeneseny do pšenice seté z *Triticum polonicum* L. Linie s LG měly příznivou výnosovou odezvu na intenzitu hnojení dusíkem. Mohly by pozitivně ovlivňovat asimilační kapacitu klasu na konci dozrávání a ve prospěch tvorby zrna.

Jako šlechtitelsky méně perspektivní se zatím jeví linie s MRS, které se vyznačují vyšším počtem klásků vyrůstajících z jednotlivých nodů klasového vřetena. Oproti očekávání linie s MRS neměly příznivou výnosovou odezvu na zvyšující se intenzitu hnojení dusíkem.

Poděkování: Práce byla podpořena projektem česko-slovenské spolupráce KONTAKT-mobilita MEB0810001 (na Slovensku APVV-SK-CZ-0007-09) a projektem česko-čínské spolupráce KONTAKT ME10063 Ministerstva školství mládeže a tělovýchovy České republiky.

Literatura

AKOND, A. S. M. G. M. – WATANABE, N. – FURUTA, Y.: Comparative genetic diversity of *Triticum aestivum* -*Triticum polonicum* introgression lines with long glume and *Triticum petropavlovskyi* by AFLP-based assessment Genet. Res. Crop. Evol., 55, 2008: 133-141.

AUSTIN, R. B. – BINGHAM, J. – BLACKWELL, R. D. – EVANS, L. T. – FORD, M. A. – MORGAN, C. L. – TAYLOR, M.: Genetic improvements in winter wheat yields since 1900 and associated physiological changes. J. Agric. Sci. Camb., 94, 1980: 675-689.

CALDERINI, D. F. – REYNOLDS, M. P. – SLAFER, G. A.: Genetic gains in wheat yield and main physiological changes associated with them during the 20th century. In: Satorre E.H., Slafer G.A., eds. Wheat: ecology and physiology of yield determination, New York, Food Products Press, 1999.

DOBROVOLSKAYA, O. B. – MARTINEK, P. – VOYLOKOV, A. V. – KORZUN, V. – RÖDER, M. S. – BÖRNER, A.: Microsatellite mapping of genes that determine supernumerary spikelets in wheat (*T. aestivum*) and rye (*S. cereale*). Theor. Appl. Genet., 119(5), 2009: 867-874.

EVANS, L. T. – FISCHER, R. A.: Yield potential: Its definition, measurement, and significance Crop Science, 39(6), 1999: 1544-1551.

MARTINEK, P. – DOBROVOLSKAYA, O. B. – PENG, Z-S. – WATANABE, N.: Breeding changes in wheat and their relation to spike sink capacity and morphology. The International Conference "Plant Genetics, Genomics, and Biotechnology", 2010: 21.

MARTINEK, P. – ULLMANNOVÁ, K. – MIKULCOVÁ, J.: Vlastnosti pšenice (*Triticum aestivum* L.) s mnohořadým klasem. Nové poznatky z genet. a šľach. poľnohospodárskych rastlín, Piešťany, 2006: 188-189.

MIRALLES, D. J. – SLAFER, G. A.: Sink limitations to yield in wheat: how could it be reduced? J. Agric. Sci., 145(2), 2007: 139-149.

REYNOLDS, M. P. – PELLEGRINESCHI, A. – SKOWMAND, B.: Sink-limitation to yield and biomass: a summary of some investigations in spring wheat. Annals Appl. Biol., 146(1), 2005: 39-49.

WANG, Z-L. – YIN, Y-P. – HE, M-R. – CAO, H-M.: Source-sink manipulation effects on postanthesis photosynthesis and grain setting on spike in winter wheat. Photosynthetica, 35(3), 1998: 453-459.

WATANABE, N. – IMAMURA, I.: Inheritance and chromosomal location of a gene for long glume phenotype in *Triticum petropavlovskyi* Udacz. et Migusch. J. Genet. Breed., 56(3), 2002: 221-227.

Adresy autorů:
Ing. Petr Martinek, CSc., Ing. Marie Váňová, CSc., Agrotest fyto, s.r.o., Havlíčkova 2787, 767 01 Kroměříž, Česká republika, Tel.: +420 573317158, e-mail: martinek.petr@vukrom.cz;
Bc. Petra Pokorová, studentka, Mendelova univerzita v Brně, AF - Ústav biologie rostlin, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika, tel.: +420 233 022 361, fax: +420 233 022 286, e-mail: xadamcov@node.mendelu.cz;
Ing. Pavel Šlímar, hlavní agronom, Rostěnice, a.s., čp. 49, 68 201Rostěnice (okres Vyškov), Česká republika, tel.: +420 517 326 911, e-mail: rosagro@seznam.cz.

IDENTIFIKÁCIA NOVÝCH PODJEDNOTIEK VYSOKOMOLEKULÁRNYCH GLUTENÍNOV PRI RODE *TRITICUM*
IDENTIFICATION OF THE NEW HIGH MOLECULAR WEIGHT GLUTENINS AT THE GENUS *TRITICUM*

Daniel MIHALIK – Tatiana KLEMPOVÁ – Svetlana ŠLIKOVÁ – Edita GREGOVÁ – Katarína ONDREIČKOVÁ – Ján KRAIC

The basic area of molecular marker usage is plant genotype identification. Till this time a broad range of DNA markers for particular plant genome locus is known. The most exact way how to describe the plant genome is the level of DNA nucleotide sequence, eventually by expression of proteins coded by individual genes.
Key words: DNA, PCR, HMW-GS, marker

Úvod

V závislosti od rastlinného druhu je možné pre rozlišovanie genotypov efektívne využívať polymorfizmus v sekvencii nukleotidov DNA v kódujúcej i nekódujúcej časti génu. V rastlinnom organizme sa vyskytujú bielkoviny v každej bunke a sú zastúpené molekulami rôznych veľkostí, vlastností a funkcií. Rastliny obsahujú desiatky tisícok rôznych typov molekúl bielkovín. Medzi základné typy bielkovín patria zásobné bielkoviny, sú evolučne mladším typom bielkovín a sú vhodné pre genetické markerovanie rastlín. Jednotlivé genotypy (odrody, hybridy, populácie) poľnohospodárskych plodín sa vzájomne čiastočne líšia niektorými morfologickými a agronomickými znakmi a vlastnosťami. Genotypy je však potrebné vedieť navzájom odlišovať a diferencovať a hodnoverne identifikovať. Vysokomoleklárne glutenínové podjednotky (HMW-GS) sú kódované alelami lokusov *Glu-1* lokalizovanými na dlhých ramenách chromozómov 1 homologickej skupiny (*Glu-1A, Glu-1B, Glu-1D*). Lokusy majú podobu tzv. komplexných lokusov, každý lokus obsahuje dva gény kódujúce typ podjednotky x s nižšou relatívnou molekulovou hmotnosťou a typ y s vyššou relatívnou molekulovou hmotnosťou. Hexaploidná pšenica môže preto teoreticky obsahovať až šesť rôznych HMW-GS, v skutočnosti je v dôsledku zoslabenia niektorých génov počet HMW-GS päť a menej. Štruktúra HMW-GS je tvorená centrálnou oblasťou, ktorá obsahuje repetície aminokyselín glutamín a prolín, N- a C-terminálne oblasti obsahujú nerepetitívne sekvencie, ktoré sú bohaté na aminokyselinu cysteín, ktorá umožňuje vznik intermolekulových disulfidických väzieb pri tvorbe veľkých polymérov. Zaujímavým faktom je, že doteraz popísané gény HMW-GS pšenice vo svojej štruktúre neobsahujú žiadne intróny. Štruktúry typickej podjednotky typu x a y publikoval Shewry et al. (1992), ktorí podrobne analyzovali podjednotky x-typ (1Dx5) a y-typ (1Dy10). Rozdiely vo veľkosti podjednotiek sú dôsledkom rozdielneho počtu opakujúcich sa nona- a hexa-peptidov v type y a nona-, hexa- a tripeptidov v type x vo vnútri centrálnej domény. Na úrovni sekvencie DNA, respektíve aminokyselín boli porovnávané niektoré HMW-GS. Sekvencie DNA kódujúcich častí jednotlivých HMW-GS majú vyšší stupeň homológie ako nekódujúce sekvencie, najmä N- a C- terminálne časti HMW-GS, ktorých sekvencie sú veľmi konzervatívne (De Bustos et al. 2000), aj preto sa na identifikáciu HMW-GS alel využívajú sekvencie z nekódujúcich oblastí. Charakterizáciou a identifikáciou jednotlivých génov kódujúcich HMW-GS pomocou PCR sa zaoberal aj Ahmad (2000).

V tejto práci popisujeme marker, primery ohraničujúce PCR produkt, ktorým odlišujeme podjednotku HMW-GS 1Dy12.3 (Genebank, EF472958) pochádzajúcu zo starej francúzskej odrody Noe od doposiaľ popísaných podjednotiek 1Dy10 a 1Dy12. Presne popisujeme podmienky polymerázovej reťazovej reakcie a taktiež aj optimálne podmienky separácie amplifikovaných fragmentov.

Materiál a metódy

V práci boli použité vybrané genotypy hexaploidnej pšenice letnej formy ozimnej (*Triticum aestivum* L.) Všetky vzorky genotypov boli získané z kolekcie genetických zdrojov pšenice *Génovej banky semenných druhov Slovenskej republiky* vo Výskumnom ústave rastlinnej výroby v Piešťanoch.

PCR na odlíšenie Dy-podjednotiek vysokomolekulárnych glutenínov

Na selekciu jednotlivých Dy-podjednotiek HMW-GS na úrovni DNA sme využili produkty polymerázovej reťazovej reakcie. Templátová genomická DNA bola izolovaná z 200 mg rastlinného materiálu pomocou DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Pomocou programu Clone Manager Basic version 8(Scientific and Educational Software, USA) a softvéru BioEdit 7.0.9 Sequence Alignment Editor boli navrhnuté nasledovné sekvencie primerov: R-5´-GGA CAA GGG CAA CAA GGA TA-3´ a L-5´-ATG GTA TGG GC TGT CGT AGC-3´. Zloženie reakčnej zmesi bolo:
0.5 U Platinum® Taq DNA polymeráza (Invitrogen Corp., Carlsbad, California), 2.5 µl 10x reaction buffer, 2.5 µl 50mM $MgCl_2$,10 pmol z každého primeru, 0.125 µl 10 mM dNTP, 25 ng DNA-templátu,.
Ako zdroje templátových DNA boli použité nasledovné genotypy:
- podjednotka 1Dy12 – genotyp Chinese Spring

- podjednotka 1Dy10 – genotyp Marquis
- podjednotka 1Dy12.3 – genotyp Noe

Cyklus PCR pozostával z 5 minútovej iniciačnej denaturácie pri 94°C, nasledovalo 30 cyklov s 1 minútovou denauráciou pri 94°C, 1 minútovým annealingom primerov pri 60°C, 1 minútovej extenznej reakcie pri 72°C, záverečná syntetická časť cyklu trvala 7 minút pri 72°C. Produkty PCR boli analyzované pomocou 8% akryalmidového gélu vyfarbeným pomocou ethidium bromidu. Separácia prebehla cez noc pri napätí 10V/cm vzdialenosti medzi elektródami v roztoku 0.5xTBE. Ako štandard molekulovej veľkosti DNA fragmentov bol použitý 100 bp DNA-Leiter, extended (Carl Roth, SRN).

Výsledky

Odlíšenie Dy-podjednotiek HMW glutenínov pri Triticum aestivum L.

Porovnaním sekvencií DNA kódujúcich Dy-podjednotky HMW-GS pri *Triticum aestivum* L. sme navrhli hraničné úseky DNA, ktoré boli identické pre všetky podjednotky – Dy10, Dy12 a Dy12.3, avšak dĺžka fragmentov medzi týmito hraničnými úsekmi bola pre každú podjednotku rozdielna (Thompson et al. 1994, X03041; Anderson et al. 1989, X12929).

Dané úseky pri všetkých Dy-podjednotkách kódovali časť centrálnej domény génu (obr. 1). Fragmenty polymerázovej reťazovej reakcie boli najprv separované v agarózovom géli (nepublikované výsledky), avšak rozdiely v mobilite fragmentov neboli dostatočne markantné, preto sme použili na separáciu týchto fragmentov 8% akrylamidový gél (obr. 2), kde sme dosiahli požadované rozdiely v migrácii fragmentov. Analyzované fragmenty dosahovali tieto veľkosti:
Dy12.3 - 581 bp, Dy10 – 599 bp, Dy12- 605 bp.

Diskusia

Šľachtiteľská prax vyžaduje na selekciu vhodných genotypov markery, ktoré sa dajú využiť v rannom štádiu ontogenetického vývoja. K biosyntéze HMW-GS podjednotiek dochádza až vo finálnych fázach vývoja, čo je pre včasne požadovanú selekciu nevhodné. Pre bežnú šľachtiteľskú prax je výhodné mať markery, pomocou ktorých môžeme rýchlo selektovať daný genotyp. Vychádzajúc z vysokej homológie podjednotiek HMW-GS, sme analyzovali konzervatívne domény Dy-podjednotiek HMW-GS na úrovni genomickej DNA.

Po navrhnutí primerov, ktoré boli súčasťou týchto konzervatívnych úsekov, sme pomocou PCR tieto úseky amplifikovali. Predpokladané rozdiely vo veľkostiach fragmentov jednotlivých Dy-podjednotiek sa nám potvrdili, a tak sme získali veľmi praktické a využiteľné markery na genotypizáciu hexaploidnej pšenice a potvrdili sme tým tiež originalitu novej podjednotky 1Dy12.3 z kultivaru Noe.

Konkrétne sme využili fakt, že nová podjednotka má v centrálnej doméne na úrovni DNA deléciu kódujúcu dipeptid, resp. hexapeptid v porovaní s podjednotkami 1Dy12 a 1Dy10. Tým sme dosiahli jednoduchú, jednoznačnú a rýchlu identifikáciu novej podjednotky. Optimalizovali sme detekciu PCR produktov. Malou nevýhodou detekcie však je, že dané rozdiely veľkostí sme nemohli pozorovať pomocou elektroforetickej separácie DNA v prostredí agarózy, dané rozdiely však boli evidentné v 8 % akrylamidovom géli. Vzhľadom k progresu v separačných metodikách DNA, akými sú napríklad analýzy „lab on chip"(Agilent, USA), bude možné využiť tieto markery k presnej a veľmi rýchlej genotypizácii.

Každopádne sme dokázali prítomnosť novej podjednotky, ktorá má blízky evolučný vzťah ku podjednotke 1Dy12, čo môžeme potvrdiť na základe analýzy evolučných vzťahov. Hoci diverzita D časti genómu pekárskej hexaploidnej pšenice je veľmi nízka v porovnaní s B časťou genómu, identifikácia novej podjednotky HMW glutenínu kódovanej lokusom *Glu-1D* však túto hladinu zvyšuje a podporuje fakt, že štúdium historických genotypov hexaploidných pšeníc môže byť zdrojom nových génov pri zlepšovaní pekárskych vlastností dnešných genotypov.

Záver

Identifikácia tohto selekčného markeru je jedným z dôkazov potvrdzujúcich originalitu novoobjavenej podjednotky1Dy12.3 hexaploidnej pšenice (*T. aestivum* L.) pri kultivare Noe. Daná práca poukazuje na dôležitosť štúdia historických materiálov génových bánk, čo je dôležité k spoznaniu diverzity genetických zdrojov a jeho využitia v šľachtiteľskom procese.

Poďakovanie. Táto práca vznikla vďaka podpore v rámci OP Výskum a vývoj pre projekt: Vývoj nových typov rastlín s geneticky upravenými znakmi hospodárskeho významu. ITMS: 26220220027, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

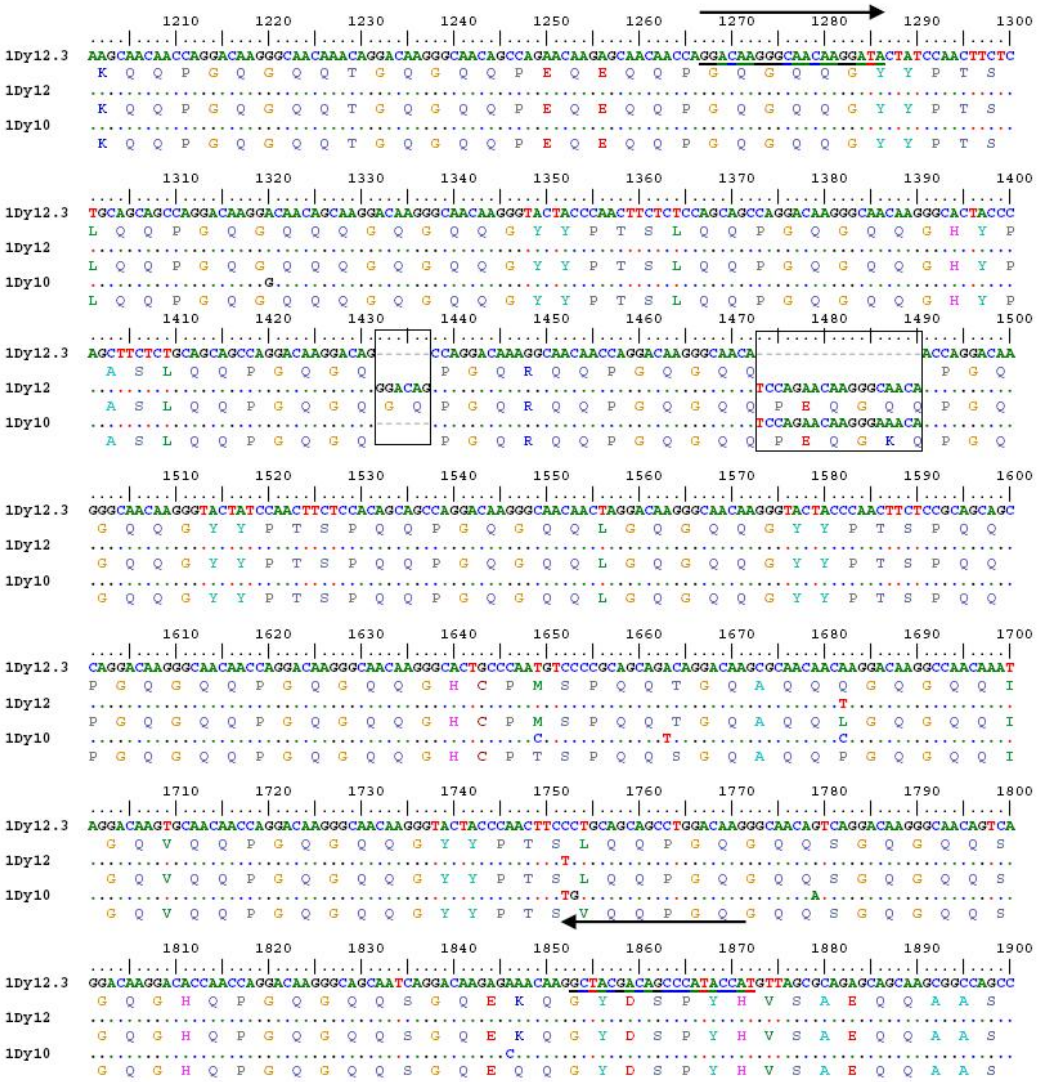
AHMAD, M.(2000): Molecular marker-assisted selection of HMW glutenin alleles related to wheat bread quality by PCR-generated DNA markers. In: Theoretical and Applied Genetics, vol. 101, N. 5, 2000, pp.892-896.

ANDERSON, O. D. – GREENE, F.C. – YIP, R. E. – HALFORD, N. G. – SHEWRY, P. R. – MALPICA-ROMERO, J.-M.(1989): Nucleotides sequences of the two high-molecular-weight glutenin genes from D-genome of hexaploid wheat, *Triticum aestivum* L. cv. Cheyenne. In: Nucleic Acid Research, vol. 17, N. 1, 1989, pp. 461-462.

DE BUSTOS, A. – RUBIO, P. – JOUVE, N.(2000): Molecular characterisation of the inactive allele of the gene Glu-A1 and of a set of AS-PCR markers for HMW glutenins of wheat. In: Theoretical and Applied Genetics, vol. 100, N. 5, 2000, pp. 1085-1094.

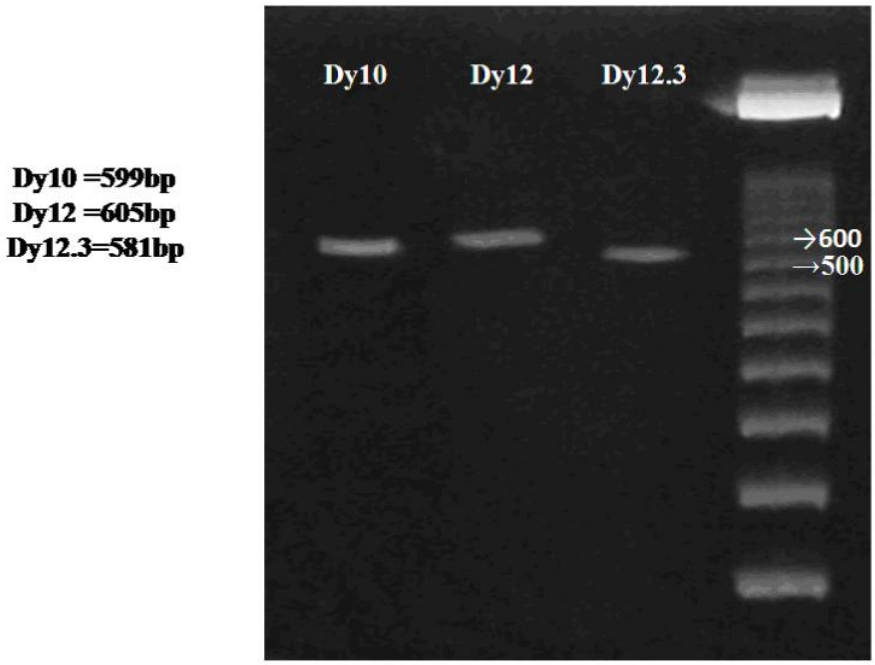
SHEWRY, P. R. – HALFORD, N. G. – TATHAM, A. S.(1992): High molecular weight subunit of wheat glutenin. In: Journal of Cereal Science, vol. 15, N. 2, 1992, pp. 105-120.

THOMPSON, R. D. – HIGGINS, D. G. – GIBSON, T. J.(1994): Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. In: Nucleic Acids Research, vol. 22, N. 22, 1994, pp. 4673-4680.



Obr. 1: Porovnanie sekvencií HMW gluteninov s vyznačením pozície primerov

Porovnanie Dy-podjednotiek pomocou PCR, použité primery: R-5´-GGACAAGGGCAACAAGGATA-3´ a L-5´-ATGGTATGGGCTGTCGTAGC-3´, teoretická veľkosť produktov PCR: Dy12.3 - 581 bp, Dy10 – 599 bp, Dy12- 605. Šípky znázorňujú polohu primerov a sekvencie v rámčekoch vyjadřuju rozdiely v sekvenciách.



Obr. 2: Odlíšenie Dy-podjednotiek pri *Triticuum aestivum* pomocou PCR, elektroforetická separácia fragmentov DNA

Separácia PCR produktov v 8% akrylamidovom géli vyfarbovanom pomocou roztoku ethídium bromidu. Templátové DNA:
- podjednotka 1Dy12 – genotyp Chinese Spring
- podjednotka 1Dy10 – genotyp Marquis
- podjednotka 1Dy12.3 – genotyp Noe

Adresa autorov:
Daniel Mihalik, Tatiana Klempová, Svetlana Šliková, Edita Gregová, Katarína Ondreičková, Ján Kraic
Centrum výskumu rastlinnej výroby, Výskumný ústav rastlinnej výroby, Piešťany

OPTIMALIZÁCIA GENETICKEJ TRANSFORMÁCIE NEZRELÝCH EMBRYÍ PŠENICE LETNEJ (*TRITICUM AESTIVUM* L.) POMOCOU *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS*

OPTIMALISATION OF GENETIC TRANSFORMATION OF IMMATURE EMBRYOS OF COMMON WHEAT (*TRITICUM AESTIVUM* L.) MEDIATED BY *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS*

Richard MURÍN – Klára MESZÁROS

Three different varieties of common wheat (Triticum aestivum L.) were transformed by Agrobacterium tumefaciens strain AGL1containing plasmids pAL 154/156 which included bar and gus genes under the control of Ubi 1 promoter. As explants we used immature embryos isolated from plants cultivated in greenhouse conditions (Bobwhite, Csárdás) and field conditions (Astella). In this work we evaluated percentage of positive explants for histochemical analysis GUS, percentage of regenerants and putative T_0 transformants.
Key words: Agrobacterium tumefaciens, Triticum aestivum L., immature embryo

Úvod

Genetická transformácia rastlín pomocou vektora, ktorým je *Agrobacterium tumefaciens* predstavuje metódu nepriameho transferu cudzorodého génu do genómu hostiteľského rastlinného organizmu. *Agrobacterium tumefaciens* je pôdna baktéria, ktorá za normálnych okolností napáda koreňové bunky rastlín a časť svojho Ti-plazmidu, T-DNA zabudováva do rastlinného genómu (Janakiraman a kol., 2002). V konečnom dôsledku tak dochádza k nádorovému bujneniu napadnutých rastlinných buniek. Nahradením tzv. onkogénov v T-DNA oblasti génmi záujmu (GOI, angl. *gene of interest*) sa podarilo vytvoriť biologický systém pre prenos a zabudovanie cudzorodých génov do rastlinných buniek (Faragó 2003). Ako uvádza Vasil (2007), počiatočné ťažkosti spojené s transformáciou obilnín vrátane pšenice pomocou *Agrobacteria* boli prekonané využitím supervirulentných kmeňov *A. tumefaciens* v prítomnosti acetosyringónu. Prvá správa o získaní *Agrobacteriom* úspešne transformovanej pšenice pochádza od Chenga et al. (1997), ktorí ako explantát využili práve nezrelé embryá. Od prvej úspešnej transformácie pšenice pomocou *A.tumefaciens* síce uplynulo už vyše desaťročie a bolo vykonaných množstvo transformácii tohto typu s použitím jeho rôznych modifikácií, o čom referuje množstvo autorov, napr. Wu et al. (2003); Khanna a Daggart (2003); Hu et al. (2003); Przetakiewicz et al. (2004), no možnosti vylepšovania tohto transformačného systému ešte ani dnes nie sú vyčerpané.

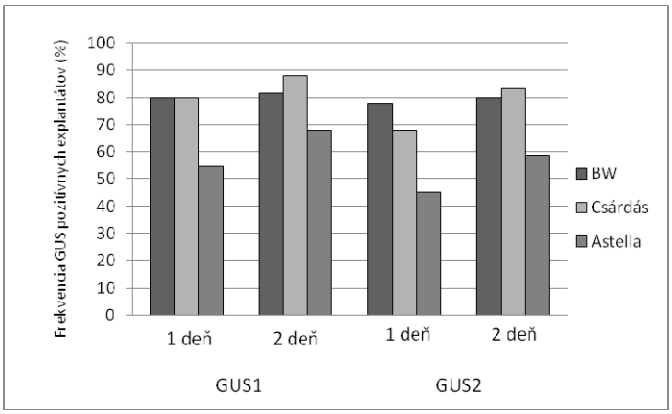
Materiál a metódy

Východiskovým materiálom na genetickú transformáciu boli nezrelé embryá troch variet pšenice letnej f. ozimnej (*Triticum aestivum* L.): slovenská odroda Astella poskytnutá firmou ISTROPOL SOLARY a.s. Horné Mýto, dopestovaná v poľných podmienkach a maďarská odroda Csárdás poskytnutá z génových zdrojov Poľnohospodárskeho inštitútu Maďarskej akadémie vied v Martovásári. Ako kontrola nám poslúžila jarná odroda Bobwhite. Odrody Csárdás a Bobwhite boli dopestované v skleníkových podmienkach v Poľnohospodárskom inštitúte MAV. Na transformáciu sme použili bakteriálny kmeň AGL1 obsahujúci plazmidy pAL 154/156 obsahujúce gény *bar* a *gus,* ktoré sú pod kontrolou promótora génu *Ubi*1 z kukurice (*Zea mays* L.). Po povrchovej sterilizácii nezrelých zŕn sme v rámci každého genotypu odoberali vyše dvesto explantátov umiestnených na pevné živné médiá v počte 30 na jednu Petriho misku. Podrobný popis prípravy živných médií, ako i metodiky našej práce od izolácie explantátov cez transformáciu, kokultiváciu, regeneráciu a selekciu je popísaný v protokole od Jonesa et al. (2005), podľa ktorého sme postupovali. V rámci experimentu sme uskutočnili dve histochemické GUS analýzy, prvú 5 dní po transformácii (GUS^1), ktorá vypovedá o prechodnej expresii transgénov a druhú 10 dní po transformácii (GUS^2), ktorá vypovedá o stabilnej expresii transgénov. V rámci týchto analýz sme z každej Petriho misky odobrali 5 explantátov určených na farbenie. V práci sme hodnotili frekvenciu explantátov pozitívne reagujúcich na GUS vzhľadom na počet farbených explantátov, frekvenciu regenerantov ako i frekvenciu domnelých transformantov, t.j. explantátov, ktoré prežili proces selekcie, v prepočte na 20 zostávajúcich explantátov v Petriho miskách.

Výsledky a diskusia

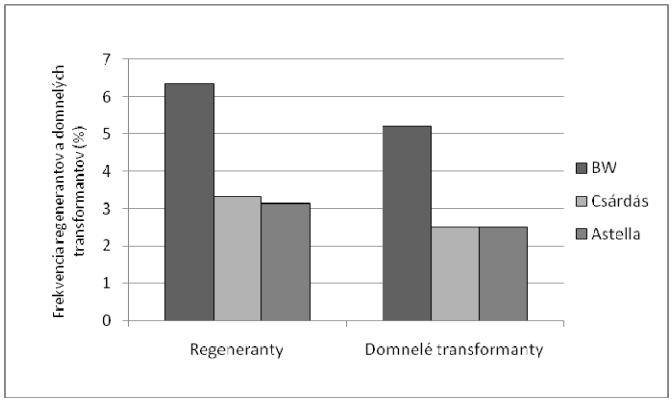
V rámci jednotlivých genotypov sme najvyššiu hodnotu v rámci GUS^1 zaznamenali pri odrode Csárdás druhý deň po farbení (87,777 %), rovnako aj pri GUS^2 opäť dosiahla najvyššiu hodnotu varieta Csárdás druhý deň po farbení (83,333 %), ako uvádza obrázok 1. Výsledky poukazujú tiež na to, že pri všetkých troch použitých varietách bola konečná hodnota frekvencie GUS pozitívnych explantátov v rámci GUS^1 v druhý deň po farbení vždy vyššia než konečná hodnota GUS^2 v druhý deň po farbení. U odrody Bobwhite

tak poklesla frekvencia GUS[2] pozitívnych explantátov oproti frekvencii GUS[1] pozitívnych explantátov o 1,538%, u odrody Csárdás o 4,444% a u odrody Astella dokonca o 9,259 %. Z uvedeného teda vyplýva, že hodnota prechodnej expresie génov je porovnateľne vyššia než hodnota stabilnej expresie génov.



Obr 1. Frekvencia GUS pozitívnych explantátov

V rámci hodnotenia regenerácie dosiahla najvyššiu hodnotu odroda Bobwhite (6,346 %), zvyšné dve variety dosiahli hodnotu regenerácie 3,333 % (Csárdás) a 3,148 % (Astella) (Obr. 2). Rovnako aj v rámci hodnotenia percentuálneho podielu domnelých transformantov, t.j. explantátov, ktoré prežili proces selekcie, najvyššiu hodnotu dosiahla varieta Bobwhite (5,192 %), hodnoty zvyšných dvoch variet boli u oboch 0,25 %, ako uvádza obrázok 2.



Obr 2. Frekvencia regenerantov a domnelých transformantov (%)

Napriek celkovo vyššiemu počtu regenerantov i domnelých transformantov u variety Bobwhite oproti zvyšným dvom varietam, nemožno ani tieto výsledky považovať za uspokojivé. Nad nie príliš uspokojivou hodnotou regenerácie možno polemizovať. Jej úspešnosť a tiež úspešnosť transformácie môže byť ovplyvnená jednak výberom explantátu, kultivačnými podmienkami, správnosťou identifikácie transgénnych rastlín (Nadolska-Orczyk et al. 2000; Bhalla 2006) a tiež od rastových podmienok a veku donorových rastlín (Vasil 2007). Pastori et al. (2001) priamo zistili koreláciu medzi frekvenciou transformácie a vekom donorových rastlín, kde obnova transgénnych rastlín odvodených od nezrelých embryí z mladších rastlín bola vyššia než pri embryách odvodených zo starších rastlín.

Záver

Danými zisteniami o hodnotách GUS, percente regenerantov a domnelých transformantov naša práca v rámci daného experimentu nekončí, nakoľko na reálne zistenie počtu skutočných transformantov je potrebné uskutočniť poslednú – tretiu histochemickú GUS analýzu a taktiež molekulárno-biologickú analýzu PCR z T_0 rastlín, ktoré sú momentálne v štádiu vernalizácie. Do budúcna ostáva stále otvorená otázka zvýšenia frekvencie GUS[2], ako i zvýšenie počtu regenerantov, nakoľko od ich počtu priamo závisí aj počet transformantov.

Poďakovanie: Ďakujeme Ing. Gyulovi Zalabaiovi, PhD., riaditeľovi ISTROPOL SOLARY a.s. Horné Mýto za poskytnutie pšenice odrody Astella. Práca bola vypracovaná v rámci riešenia projektu *APVV LPP-0125-07.*

Literatúra

BHALLA, P.L.; OTTENHOF, H.H.; SINGH, M.B.: Wheat transformation – an update of recent progress. In: Euphytica, 149, 2006, s. 353-366.

FARAGÓ, J.: Explantátové kultúry a rastlinné biotechnológie. Učebné texty, UCM Trnava, 2003.

HU, T.; METZ, S.; CHAY, C.; ZHOU, H.P.; BIEST, N.; CHEN, G.; CHENG, M.; FENG, X.; RADIONENKO, M.; LU, F.; FRY, J.: *Agrobacterium*-mediated large-scale transformation of wheat (*Triticum aestivum* L.) using glyphosate selection. In: Plant Cell Reports, 21, 2003, s. 1010-1019.

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.

JANAKIRAMAN, V.; STEINAU, M.; McCOY, S.B.; TRICK, H.N.: Recent advances in wheat transformation.
In: In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant, 38, 2002, s. 404-414.

JONES, H.D.; DOHERTY, A.; WU, H.: Review of methodologies and a protocol for the *Agrobacterium*-mediated transformation of wheat. 2005, URL: http://www.plantmethods.com/content/1/1/5

KHANNA, H.K.; DAGGART, G.E.: *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of wheat using a superbinary vector and a polyamine-supplemented regeneration medium. In: Plant Cell Reports, 21, 2003, s. 429-436.

NADOLSKA-ORCZYK, A.; ORCZYK, W.; PRZETAKIEWICZ.: *Agrobacterium-mediated* transformation of
cereals- from technique development to its application. In: Acta Physiologiae Plantarum, 22, 2000, s. 77-88.

PASTORI, G.M.; WILKINSON, M.D.; STEELE, S.H.; SPARKS, C.A.; JONES, H.; PARRY, M.A.J.: Age-dependent transformation frequency in elite wheat varieties. In: Journal of Experimental Botany, 52, 2001, s. 857-863.

PRZETAKIEWICZ, A.; KARAŚ, A.; ORCZYK, W.; NADOLSKA-ORCZYK, A.: *Agrobacterium*-mediated transformation of polyploid cereals. The efficiency of selecton and transgene expression in wheat. In: Cellular and Molecular Biology Letters, 9, 2004, s. 903-917.

VASIL, I.K.: Molecular genetic improvement of cereals: transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.), In: Plant Cell Reports, 26, 2007, s. 1133-1154.

WU, H.; SPARKS, C.; AMOAH, B.; JONES, H.D.: Factors influencing successful *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of wheat. In: Plant Cell Reports, 21, 2003, s. 659-668.

Adresy autorov:
Mgr. Richard MURÍN, Katedra botaniky a genetiky, FPV UKF, Nábrežie mládeže 91, 949 74 Nitra, e-mail: richard.murin@ukf.sk
Klára MESZÁROS, PhD., Magyar Tudományos Akadémia Mezőgazdasági Kutatóintézete, Brunszvik u. 2., H-2462 Martonvásár, e-mail: meszarosk@mail.mgki.hu

ŠLECHTĚNÍ CHMELE (*Humulus lupulus* L.) ZAKRSLÉHO TYPU PRO NÍZKÉ KONSTRUKCE
HOP OF DWARF HOPS (*Humulus lupulus* L.) FOR LOW TRELLIS GROWING

Vladimír NESVADBA – Alena HENYCHOVÁ – Zděnka POLONČÍKOVÁ – Josef JEŽEK

Hop Research Institute in Žatec is engaged in hop breeding of hop material suitable for cultivation under low trellis system. The main objective is to develop hop plants with short internodes, which should not be longer than 10 cm. The common distance between nodes in commercially grown tall hops is 20-35 cm. We have managed to develop six dwarf genotypes from the original selections. New selections "4900" and "5021" seem to be the most suitable ones for low trellis system. They have their origin in Czech (Sládek), resp. English cultivars (First Gold). Within goal-directed breeding we have been able to develop 49 dwarf hop genotypes with characteristics good for low trellises. Bitter genotypes prevail among them. Two of them show high alpha bitter contents (14%).
Key words: dwarf hops, Humulus lupulus L., low trellis, hop breeding, new genotypes, internodes, bitter acids.

Úvod

V České republice se v polovině 90. let poprvé testovala možnost pěstování chmele na nízké konstrukci. V roce 1996 byl tento pokus po tříletém hodnocení ukončen. Testování bylo prováděno pouze na českých odrůdách Žatecký poloraný červeňák (ŽPČ), Sládek a Premiant, které nejsou vhodné pro tento způsob pěstování. Bohužel technologie včetně strojního vybavení nebyla do té doby, ani v průběhu pokusu téměř řešena. Po ukončení tohoto sledování se vedení českého chmelařství a výzkumu shodlo, že tato technologie nemá pro naše chmelařství perspektivu. Vývoj technologie pro pěstování chmele byl řešen pouze v Anglii a v USA (Darby 2001). Důvod byl jasný a to nízká potřeba lidské práce. Tyto země do výzkumu vložily značné finanční prostředky a využitím této technologie se zabývají více jak 20 let (Glendinning 2009). Česká republika jako téměř všechny ostatní chmelařské země nepreferovaly tento směr možnosti pěstování chmele. Ale v posledních letech, kdy byl v České republice značný problém získat pracovní síly na sezónní práce ve chmelu, se zahájila výsadba chmele do nízkých konstrukcí (Ježek & Křivánek 2010). Z tohoto důvodu bylo šlechtění chmele též zaměřeno na nízké konstrukce. Současně jsou ve šlechtění využívány i genotypy pro farmaceutické využití, kde jsou preferovány prenylované flavonoidy a další látky (Miranda 2000).

Šlechtění chmele na nízké konstrukce má několik cílů. Hlavním cílem jsou krátká internodia, kde je požadavek vzdálenosti internodií 8 až 12 cm. Další cíle jsou shodné s odrůdami pro vysoké konstrukce – odolnost k chorobám a škůdcům, vysoký výnos, stabilita výkonnosti, agrotechnické aspekty, kvalitativní pivovarské vlastnosti dle skupin chmelů - aromatické až superalfa (Nesvadba & Krofta 2003). Základním výchozím materiálem pro šlechtění na nízké konstrukce jsou genotypy z Anglie a to jak samičí rostliny (odrůdy First Gold, Admiral atd.), tak i samčí rostliny z anglického šlechtitelského genofondu.

Metodika

Pro křížení na nízké konstrukce byly využity matečné rostliny Žatecký poloraný červeňák (česká odrůda) – H38 a H39, Agnus (česká odrůda) – H7 a Taurus (německá odrůda) – H36, z unikátní polní kolekce genetických zdrojů chmele (MZe 33083/03-300 6.2.1. – MZe ČR). Samčí rostliny byly vybrány z anglické a české kolekce samčích genotypů. Potomstva z realizovaných křížení byla získána dle metodiky šlechtění chmele Chmelařského institutu Žatec. Získané rostliny byly vysazeny do hybridní školky. Následně byly hodnoceny všechny genotypy v rámci těchto potomstev. Měření internodií bylo prováděno u náhodného souboru rostlin o min. počtu 113 genotypů z potomstva (omezeno maximálním počtem rostlin v potomstvu). Hodnocení chmelových hlávek bylo provedeno dle metodiky pro šlechtění chmele. Z každého testovaného genotypu byl získán průměrný vzorek chmelových hlávek. Tyto hlávky byly před analýzami usušeny při konstantní teplotě 55 °C po dobu 8 hodin. Chemické analýzy pro stanovení obsahu i složení chmelových pryskyřic v chmelových hlávkách byly provedeny HPLC metodou /EBC 7.7/, (Analitica, 1997). Chmelové silice byly stanoveny plynovou chromatografií.

Pro hodnocení byly vybrány základní statistické parametry: průměr pro variabilitu, směrodatná odchylka a stonásobek variačního koeficientu. Pro stanovení průkaznosti rozdílu mezi jednotlivými genotypy v rámci potomstev byl použit t-test. Výsledky byly zpracovány statistickým programem STATISTICA – StatSoft.

Výsledky a diskuse

Na základě měření vzdálenosti internodií u genotypů pro vysoké konstrukce (české odrůdy Premiant a Sládek) a nízké konstrukce (anglická odrůda First Gold a české novošlechtění 5021) byla pomocí t-testu stanovena statická průkaznost rozdílu s 99 % pravděpodobností mezi uvedenými skupinami genotypů. V tabulce 1 je patrné, že genotypy pro vysokou konstrukci vykazují vzdálenost internodií 0,277 m (Premiant) a 0,237 m (Sládek) a genotypy zakrslého typu mají průměrnou vzdálenost internodií 0,075 m (First Gold) a 0,092 m (Nšl. 5021). Nejnižší variabilitu vykazuje odrůda Premiant (16,59 %) a naopak nejvyšší variabilitu má anglická odrůda First Gold (24,88 %).

Tabulka 1: Variabilita vzdálenosti internodií u genotypů vysokého a zakrslého růstu

Odrůda	Premiant	Sládek	First Gold	5021
Průměr (m)	0,277	0,237	0,075	0,092
Směr. odchylka	4,589	5,219	1,876	2,180
Var. koeficient (%)	16,59	21,99	24,88	23,73
Min. délka (m)	0,160	0,130	0,025	0,022
Max. délka (m)	0,350	0,350	0,112	0,145

Potomstva F_1 generace H37 až H39 byla získána po samčím anglickém genotypu zakrslého typu. Potomstvo H7 je po rodičovské kombinaci pro vysoké konstrukce. V tabulce 2 jsou uvedeny statistické parametry hodnocených potomstev. Potomstva pro nízké konstrukce vykazují oba typy genotypů (pro nízké a vysoké konstrukce) což charakterizuje vyšší variabilita (Vk = 40,42 až 51,61 %). Pomocí t-testu byla stanovena 99 % pravděpodobnost rozdílu v délce internodií potomstva H7 k ostatním potomstvům pro nízké konstrukce.

Tabulka 2: Variabilita vzdálenosti internodií u genotypů vysokého a zakrslého růstu u potomstev F_1 generace

Odrůda	H 37	H 38	H 39	H 7
Průměr (m)	0,067	0,069	0,067	0,168
Směr. odchylka	32,016	27,986	34,730	37,208
Var. koeficient (%)	47,48	40,42	51,61	22,04
Min. délka (m)	0,026	0,026	0,020	0,087
Max. délka (m)	0,186	0,154	0,218	0,257

Z šlechtitelského materiálu získaného v předešlých letech bylo vybráno 5 genotypů (tab. 3), které vykazovaly nižší vzrůst (předpoklad pro nízké konstrukce), odolnost k houbovým chorobám a dobré kvalitativní parametry chmelových hlávek. U označení genotypu je uvedena i matečná rostlina, která poukazuje na možné pivovarské zařazení. Genotypy po vysokoobsažných odrůdách Agnus a Taurus budou patřit do skupiny s vyšším obsahem alfa kyselin (4903 a 5059) a genotypy po odrůdách Sládek a First Gold se řadí do skupiny hořkých chmelů (5019) až aromatických chmelů (4900, 5020 a 5021). Dosažené výsledky jsou z klasické vysoké konstrukce šlechtitelských školek.

Tabulka 3: Složení chmelových pryskyřic u genotypů se zakrslým charakterem růstu (Stekník, 2007 – 2009)

Označení genotypu	Alfa kys. (% hm.)	Beta kys. (% hm.)	Poměr (alfa/beta)	Kohumulon (% rel.)
4900 (Sládek)	6,0 – 7,5	2,5 – 3,5	1,7 – 2,1	26 - 29
4903 (Agnus)	9,0 – 12,0	4,5 – 6,0	1,8 – 2,2	26 - 31
5019 (F. Gold)	4,5 – 6,0	3,5 – 5,0	1,3 – 1,7	32 - 36
5020 (F. Gold)	5,5 – 8,5	5,0 – 6,5	1,1 – 1,7	30 - 33
5021 (F.Gold)	6,0 – 8,0	5,5 – 7.5	0,9 – 1,2	27 - 32
5059 (Taurus)	8,0 – 13,0	5,0 – 6,5	1,5 – 2,5	23 - 30

V rámci šlechtění na nízkou konstrukci semenáčů Sm08 (po dvouletém hodnocení) celkem získáno 14 genotypů (tab. 4). Genotyp 5282 je velmi perspektivní pro své aromatické vlastnosti (poměr alfa/beta kyselin = 1,4). Genotyp 5285 vykazuje velmi vysoký obsah jak alfa kyselin (15,2 %), tak i beta kyselin (7,4 %). Všechny získané genotypy byly vysazeny společně s výběry Sm09 (výběry též pro nízkou konstrukci) do šlechtitelské nízké konstrukce (výška 3 m – klasická nízká konstrukce). Zde jsou rostliny vysazeny výhradně k drátkům (nepoužívá se síť), aby bylo možné stanovit výnos každého genotypu odděleně. Sklizeň se provádí ručním strháváním a jednotlivé rostliny jsou strojově česány (Wolf), aby byly všechny výsledky šlechtitelského materiálu porovnatelné (shodné ztráty při sklizni). Jako standardní odrůda byla do této chmelnice vysazena anglická odrůda First Gold. Pro šlechtitelské účely bude tato školka označena HŠKMNK (hybridní školka kmenových matek pro nízké konstrukce).

Z šlechtění chmele na nízkou konstrukci se v roce 2009 získalo 32 nadějných genotypů chmele z potomstev Sm09. Vzhledem k tomu, že se jedná o genotypy hodnocené v prvním roce pěstování nebyl stanoven výnos chmele. Jako standardní odrůda byla vybrána anglická odrůda First Gold. Řada genotypů vykazuje výrazně vyšší obsah alfa hořkých kyselin než First Gold. Nejvyšší obsah alfa kyselin vykazuje genotyp H27/75 (14,2 %), další dva genotypy H24/28 a H27/65 vykazují obsah alfa kyselin na úrovni 12 %. Dle obsahu beta kyselin je zřejmé, že žádný genotyp nesplňuje aromatické parametry. Pouze genotypy H24/37 a H17/78 mají poměr alfa/beta kyselin 1,5. Genotypy H24/28, H24/38, H24/4 a H24/37 vykazují nejnižší podíl kohumulonu, který je pod hranicí 20 % rel. Tento znak je sledován řadou pivovarů a to z hlediska vlivu na charakter hořkosti. Ovšem negativní hranice je nad 40 % rel., což žádný genotyp nevykazuje.

Tabulka 3: Chemické analýzy pryskyřic u výběrů Sm08 pro nízké konstrukce (2009)

Číslo genotypu	Výnos (rost/kg^{-1})	alfa kys. (%hm.)	beta kys. (%hm.)	poměr (alfa/beta)	Kohumulon (%rel.)
5285	3,5	15,2	7,4	2,0	27,9
5295	1,9	11,1	3,8	2,9	23,0
5288	3,2	10,8	3,8	2,9	25,2
5287	5,6	10,1	3,4	2,9	25,3
5292	2,1	9,6	4,0	2,4	25,3
5284	3,3	9,0	3,2	2,9	37,0
5282	1,2	7,9	5,6	1,4	34,8
5283	4,0	7,7	3,3	2,3	29,2
5293	1,4	7,5	3,8	2,0	25,1
5296	1,8	7,5	3,9	1,9	33,5
5290	1,5	7,2	3,2	2,2	29,4
5286	3,3	7,1	3,5	2,0	32,2
5289	ručně	7,0	3,5	2,0	33,9
5294	3,6	6,1	2,8	2,2	26,0

Závěr

Z dosažených výsledků je patrné, že při použití rodičovských zakrslých genotypů vykazují potomstva průkazně kratší internodia než po rodičovské kombinaci na vysoké konstrukce. Tento poznatek je velmi důležitý pro šlechtění chmele. Zakrslost je založena jedním genem (ověření zahraniční publikace). První získané genotypy pro nízké konstrukce vykazují parametry hořkých až vysokoobsažných chmelů. Z hlediska obsahu a složení chmelových pryskyřic jsou získané genotypy nejvíce podobné české odrůdě Premiant. V roce 2010 budou vyhodnocena potomstva aromatického i vysokoobsažného typu. Lze předpokládat, že se získá nová řada nadějných genotypů chmele. Na základě získaných genotypů a potomstev lze předpokládat, že se podaří získat první české genotypy pro pěstování na nízkých konstrukcích do 5 let..

Obr. 1: Genotyp pro vysokou konstrukci (internodia 0,35m)

Obr. 2: Genotyp pro nízkou konstrukci (internodia 0,008m)

Poděkování: Tento příspěvek byl zpracován v rámci výzkumného záměru MSM 1486434701 a výzkumného projektu 2B06011 Vývoj genotypů chmele pro biomedicinální a farmaceutické účely, které podporuje MŠMT ČR.

Literatura

Analytica EBC, Metod 7.7, 1997: European Brewery Convention, Getränke Fachverlang,

DARBY P.; 2001: Single gene trails in hop breeding. International Hop Growers Convention, Proceedings of the Scientific Commission, Canterbury, Kent, England, 5 - 7 Auguste 2001: 76 – 80

GLENDINNING, P., 2009: Současný stav pěstování chmele na nízké konstrukci ve Velké Británii**.** Chmelařství, 2009, roč. 82, č. 5-6, s. 46-47.

JEŽEK, J., KŘIVÁNEK, J., 2010: Návrat k pokusům s pěstováním chmele na nízkých konstrukcích a pěstování chmele na nízké konstrukci v roce 2009 na Stekníku. Chmelařství, 2010, roč. 83, č. 7-8, s. 93-100.

MIRANDA, C. l. et al., 2000: Prenyladet chalkones and flavanones as inducers of quinone reductase in mouse Hepa 1c1c7 cells. Cancer Letters 149.

NESVADBA, V., KROFTA, K., 2003: Practical knowledge and criteria influencing effectivity of breeding process in the CR. International Hop Growers Convention, Proceedings of the Scientific Commission, Dorna - Žalec, Slovenia 24 - 27 June 2003: 101 – 105.

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

UPLATNĚNÍ PLANÝCH DRUHŮ ČELEDI *FABACEAE* V TRAVNÍCH SPOLEČENSTVECH
THE APLICATION OF WILD SPECIES OF THE FAMILIES *FABACEAE* IN GRASSLANDS

Jan PELIKÁN – Daniela KNOTOVÁ

The possibility of cultivation of selected wild species of the families Fabaceae as grassland components has been tested seven years on the locality in Troubsko. It can be pointed, that most of the tested species is able to persist in the grasslands. However, it is necessary to decide which type is suitable for the concrete conditions of the habitat. Prerequisite for their practical application is successful seed technology to ensure sufficient seed and sowing rate of the species.
Keywords: Diversity, wild species, Fabaceae, clover-grass mixtures.

Úvod

V rámci sběrových expedicí v České republice i zahraničí, konaných naším pracovištěm při řešení Národního programu konzervace a využívání genetických zdrojů rostlin a agro-biodiversity, je pozornost věnována vedle sběrů planých forem kulturních rostlin čeledi *Fabaceae*, také dalším druhům této čeledi. Aby tyto sběry nebyly samoúčelné, jsou hledány cesty k využití těchto materiálů v polních podmínkách. V České republice již v padesátých letech minulého století přezkoušel Vacek (1963) celou škálu planých druhů čeledi *Fabaceae* a některé z nich doporučil k pěstování. Také ve světě jsou v současné době shromažďovány a zkoušeny plané druhy (Jansone & Jansons 2007; Martincová et al. 2007; aj.). O výsledcích dosažených při řešení dané problematiky průběžně informovali Pelikán et al. (2005) a Marková et al. (2009). Příspěvek shrnuje výsledky dosažené v průběhu let 2004 – 2010.

Materiál a metodika

Pro ověření možnosti uplatnění planých forem v travních společenstvech byl v roce 2004 na lokalitě Troubsko (nadmořská výška 280 m, průměrná roční teplota 8,5°C, roční úhrn srážek 547 mm) založen polní pokus se standardní travní směsí, do níž bylo přidáno v každé variantě 50 semen zkoušeného druhu čeledi *Fabaceae* (bez ohledu na množství tvrdých semen). Zkoušeno bylo 20 planých druhů čeledi *Fabaceae*. Standardní travní směs byla tvořena kostřavou luční, jílkem vytrvalým a lipnicí luční (po 23 %) a dále bojínkem lučním a festucoidním hybridem (po 15,5 %). V přepočtu činil výsevek travní směsi 26 kg.ha^{-1}. Vlastní pokus byl založen metodou znáhodněných bloků ve třech opakováních při velikosti parcel 5 m^2. V průběhu vegetace byl v jednotlivých rocích zkoušení na parcelách zjišťován v několika termínech počet rostlin zájmového druhu. Na porostu byly každoročně realizovány dvě seče. Ze všech pozorování daného roku byl pro příslušný druh vypočítán průměrný výskyt rostlin. Průměrné počty rostlin daného druhu v jednotlivých rocích jsou znázorněny graficky.

Výsledky a diskuse

Veškeré dosažené výsledky jsou soustředěny do grafů. V grafu 1 jsou shromážděny průměrné výskyty zástupců rodu *Trifolium* za jednotlivé roky sledování. U všech druhů tohoto rodu dochází více, či méně k postupnému nárůstu jedinců. Největší postupný nárůst je zaznamenán u druhu *Trifolium medium*, a to díky jeho rozrůstání pomocí podzemních výběžků. U druhů *Trifolium alpestre*, *Trifolium dubium* a *Trifolium campestre* dochází k nárůstu do šestého roku vegetace a v sedmém roce se začíná projevovat úbytek rostlin. Přestože druhy *Trifolium dubium* a *Trifolium campestre* jsou jednoleté, v porostu se udržují. Je to dáno tím, že oba druhy jsou poměrně nízké a v době 1. seče nejsou kvetoucí rostliny zcela pokoseny, takže semena dozrají a z nich se vytvoří nové rostliny. Druhy *Trifolium montanum* a *Trifolium fragiferum* se vyskytovaly v porostu v menší míře, což je dáno tím, že podmínky pokusného místa nejsou pro tyto druhy zcela ideální. *Trifolium fragifeum* preferuje vlhčí podmínky a *Trifolium montanum* půdy bohaté vápnem.

Druhou zájmovou skupinou byly druhy rodu *Vicia*, jejichž výsledky jsou uvedeny v grafu 2. Ze zástupců tohoto druhu se nejvíce uplatnila *Vicia cracca*. Její vysoký výskyt však způsobuje problémy při sklizni zelené hmoty pro její dlouhé lodyhy a dále potlačuje travní komponenty ve směsce. Výskyt druhů *Vicia pisiformis*, *Vicia angustifolia* a *Vicia tenuifolia* (5 až 10 rostlin na 5 m^2) byl uspokojivý. Druh *Vicia villosa* se uplatnil v roce výsevu, v dalších letech však došlo k poklesu počtu rostlin.

V grafu 3 jsou uvedeny výsledky zástupců rodu *Lathyrus* a dále druhů *Lotus uliginosus* a *Lupinus polyphyllus*. Z této skupiny se velice dobře uplatnil druh *Lathyrus sylvestris*, avšak jeho vysoké zastoupení v porostu způsobuje problémy při sklizni hmoty, stejně jako u druhu *Vicia cracca*. Druh *Lathyrus tuberosus* se v porostu uplatnil velmi dobře. *Lupinus polyphyllus* byl dobře zastoupen v roce výsevu, ale se stárnutím porostu postupně ustupoval. *Lotus uliginosus* neměl na pokusném místě vhodné podmínky (preferuje vlhká stanoviště), přesto se v porostu vyskytoval po celou dobu trvání pokusu.

Výsledky posledních čtyř zkoušených druhů jsou uvedeny v grafu 4. Ze zástupců rodu *Astragalus* se velmi dobře uplatnil *Astragalus cicer*, a to opět díky podzemním výběžkům, kterými se druhotně rozmnožuje. I když literatura uvádí, že všechny druhy rodu *Astragalus* jsou jedovaté, v Americe a Kanadě je tento druh šlechtěn (Townsend 1988, 1990) a využíván do pastevních směsí pro ovce (Johnston et al. 1975). Stejný trend jako u druhu *Astragalus cicer* byl zjištěn také u druhu *Medicago falcata*. Druhy *Melilotus officinalis* a *Astragalus excapus* se uplatnily pouze v roce založení a 1. užitkovém roce, v dalších letech z porostu vymizely.

Závěr

Monitoring výskytu přisetých druhů a sukcese jetelovinotravních společenstev je dlouhodobá záležitost. Po sedmi letech zkoušení na lokalitě v Troubsku lze konstatovat, že většina zkoušených planých druhů čeledi *Fabaceae* může být přidávána do směsí určených pro zvýšení biodiverzity druhově chudých travních porostů. V příznivých stanovištních podmínkách se zástupci čeledi i při minimálním zastoupení ve směsi v porostu nejen objeví, ale jsou schopni se zde i udržet. Je však nutno uvážlivě rozhodnout, který druh je vhodný pro konkretní podmínky daného stanoviště. Předpokladem jejich uplatnění v praxi je také úspěšná semenářská technologie zajišťující dostatek osiva a dále stanovení výsevného množství příslušného druhu.

Poděkování: *Výsledky byly dosaženy při řešení Národního programu konzervace a využití genetických zdrojů kulturních rostlin a agrobiodiverzity financovaného MZe ČR , výzkumného projektu č. 2B06101 Optimalizace zemědělské a říční krajiny ČR s důrazem na rozvoj biodiverzity, financovaného MŠMT ČR.a Výzkumného záměru MSM 2629608001 financovaného MŠMT ČR.*

Literatura

MARKOVÁ, H., PELIKÁN, J., ŠEVČÍKOVÁ, M., KAŠPAROVÁ, J., GOTTWALDOVÁ, P., VYMYSLICKÝ, T.(2009): The soving of some wild meadow plants into grass mixture as a tool for increasing the diversity of grasslands. In: Alterrnative functions of grassland. Proceedings of the 15th of the European Grassland Federation Symposium, Brno, p. 528 – 530

JANSONE, B., JANSONS, A. (2007): Collection and evaluation of genetic resources of forage grasses and legumes in Latvia wild. In: Book of abstracts 18th EUCARPIA, Genetic resources section meeting, Piešťany: 90

JOHNSTON, A., SMOLIAK, S., HANNA, M.R., HIRONAKA, R. (1975): Cicer milkveth for western Canada. Agric. Can., Publ. 1536, 1-16

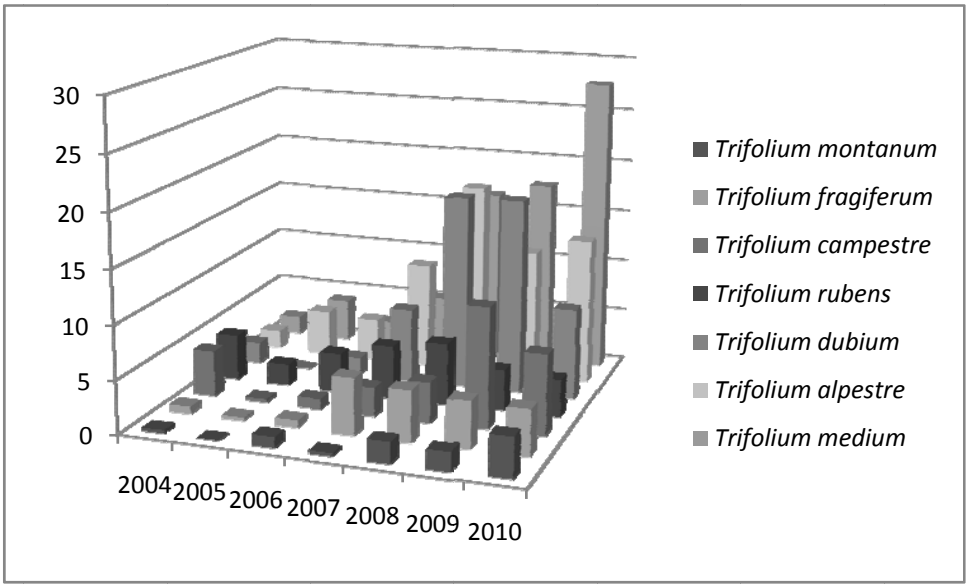
MARTINCOVÁ, J., KIZEKOVÁ, M., DROBNÁ, J. (2007): Evaluation of morphological and production traits at genetic resources od grasses and legumes. In: Book of abstracts 18th EUCARPIA, Genetic resources section meeting, Piešťany: 97

PELIKÁN, J., VYMYSLICKÝ, T., NEDĚLNÍK, J., GOTTWALDOVÁ, P., ROTREKL, J. (2005): Increasing the diversity of forage crop communities. In: Grassland Science in Europe, Vol 10: Integrating efficient grassland farming and biodiversity. Tartu, Estonia: 569-572

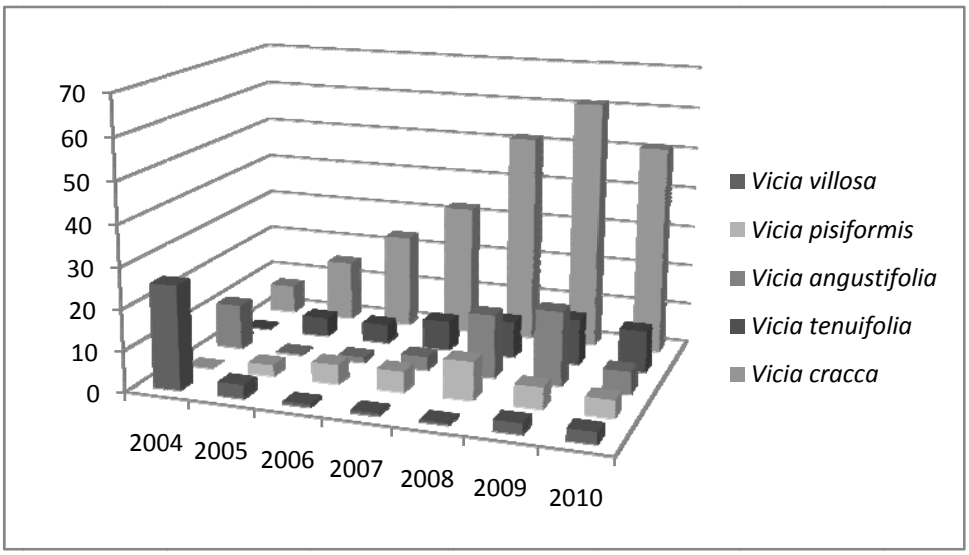
TOWNSEND, C.E. (1988): Registration of Monarch cicer milkveth (Reg. No. 20). Crop Sci., 11: 133

TOWNSEND, C.E. (1990): Registration of four Germplasm lines of cicer milkveth. Crop Sci. 30(2): 428-429

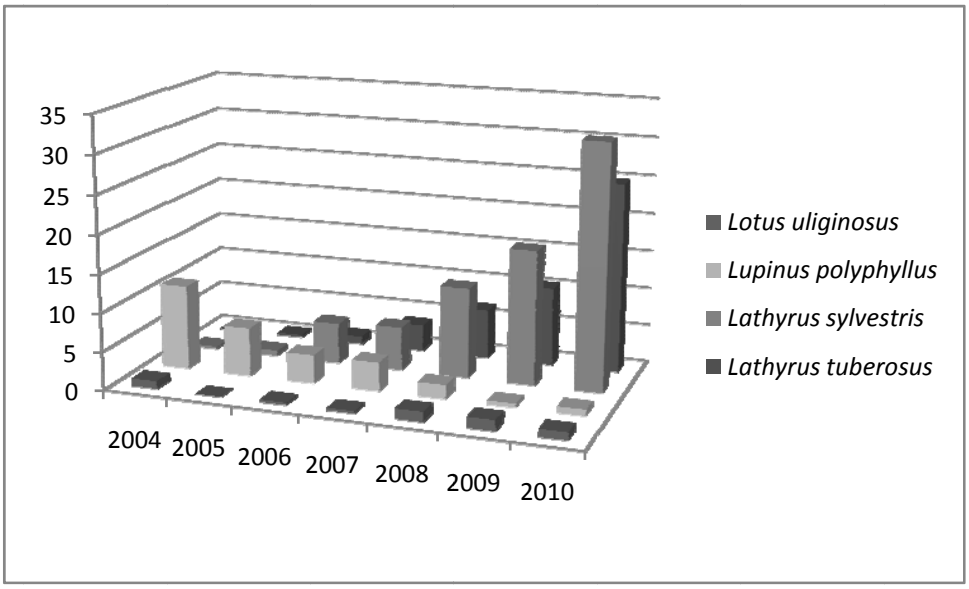
VACEK, V.(1963): Studium, udržování a využití světových sortimentů pícních rostlin, I. Planá flóra, A. Čeleď motýlokvěté (*Papilionaceae*). Dílčí záv. zpráva. Výzkumná stanice pícninářská Troubsko



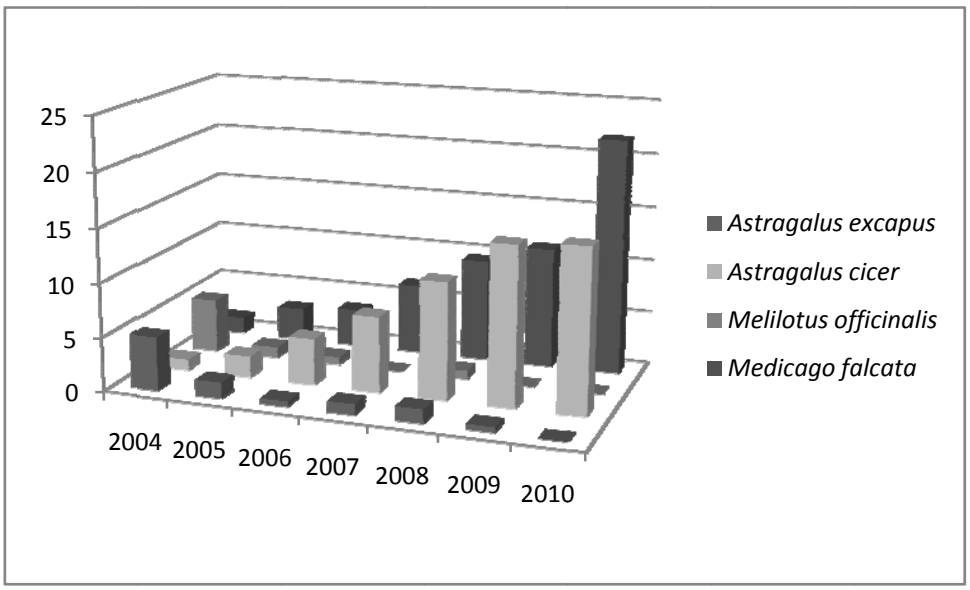
Graf 1: průměrné výskyty počtu rostlin u druhů rodu *Trifolium*



Graf 2: průměrné výskyty počtu rostlin u druhů rodu *Vicia*



Graf 3: průměrné výskyty počtu rostlin u druhů rodů *Lotus*, *Lupinus* a *Lathyrus*



Graf 4: průměrné výskyty počtu rostlin u druhů rodů *Astragalus*, *Melilotus* a *Medicago*

Adresa autorů:
Ing. Jan Pelikán, CSc., Výzkumný ústav pícninářský, spol. s r.o., Zahradní 1, 66441 Troubsko, ČR, pelikan@vupt.cz
Ing. Daniela Knotová, Zemědělský výzkum, spol. s r.o., Zahradní 1, 66441 Troubsko, ČR, knotova@vupt.cz

VPLYV PESTOVATEĽSKÝCH PODMIENOK A GENOTYPU NA OBSAH VYBRANÝCH BIOLOGICKY AKTÍVNYCH LÁTOK V CHMELI OBYČAJNOM
EFFECT OF GROWING CONDITIONS AND GENOTYPE ON THE CONTENT OF SELECTED BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS IN HOPS

Ivana PŠENÁKOVÁ[1,2] * – Juraj FARAGÓ[1] – Karel KROFTA[3]– Vladimír NESVADBA[3]

In the work, we analyzed the total polyphenol and flavonoid content in leaves of 16 different genotypes of hops (Humulus lupulus L.*) grown in different cultivation conditions in field collections of genetic resources in Žatec (Czech republic) and Piešťany (Slovak republic). The genotypes included 7 cultivars and nine wild type hops of different provenience. We observed significant differences in contents of bioactive compounds in hop leaf extracts, mainly due to growing conditions in Czech Republic vs. Slovakia and genotypes. However, marked differences were also registered between the group of cultivated genotypes and wild type plants, with increased variability detected among genotypes of wild type plants. The antioxidative abilities of hop leaf extracts, determined using the DPPH radical scavenging assay, were correlated more with the total polyphenolic content than with the total flavonoid content.*
Key words: Humulus lupulus, wild type, polyphenols, flavonoids, antioxidant activity, genetic variability, cultivation

Úvod

Chmeľ obyčajný (*Humulus lupulus* L.) je trváca a dvojdomá rastlina, kde samičie rastliny tvoria chmeľové hlávky, v ktorých sú lupulínové žliazky s vysokým obsahom chmeľových živíc. Chmeľ je významnou hospodárskou plodinou, ktorá je využívaná v rade oblastí. Hlavné používanie je v pivovarníctve, pretože chmeľové hlávky obsahujú živice, ktoré sú základom pri výrobe piva. Najvýznamnejšie zložky chmeľových živíc, α- a β-horké kyseliny, dodávají pivu intenzitu horkosti a ich vzájomný pomer ovplyvňuje charakter horkosti (Nesvadba & Krofta 2007).

Výskum pri chmeli sa v poslednom desaťročí zaoberá do značnej miery biologickou aktivitou jednotlivých zložiek chmeľu, najmä xantohumolu a izoxantohumolu medzi prenylflavonoidmi (Miranda et al. 2000; Vanhoecke et al. 2005; Zhao et al. 2005; Ho et al. 2008; Vogel & Heilman 2008) a humulónu medzi horkými kyselinami (Piendl & Biendl 2000; Tagashira et al. 2004; Mikyška et al. 2008; Yamaguchi et al. 2009). Ich protizápalová, antioxidačná, antilipoperoxidačná aktivita, ako aj antimikrobiálne, antitrombózne, antiangiogenetické, antiproliferatívne, antimutagénne a apoptotické účinky, stanovené najmä v *in vitro* štúdiách, mierne naznačujú možnosť chemopreventívnej aktivity (Milligan et al. 1999; Miranda et al. 2000; Zanoli & Zavatti 2008). Vzrastajúci počet informácií o využití týchto látok k liečbe viacerých nádorov a civilizačných ochorení ponúka využitie v chemoprevencii týchto chorôb (Hofta 2004). Chemopreventívny účinok xantohumolu pri karcinogenéze väčšinou spočíva v inhibícii metabolickej aktivácie prokarcinogénov, zvýšení aktivity karcinogén-detoxifikačných enzýmov alebo inhibícii rastu nádorov v ranom štádiu. Xantohumol a niektoré chmeľové prenylflavonoidy môžu inhibovať enzýmy cytochrómu P-450. Získané poznatky naznačujú, že chmeľové prenylflavonoidy môžu byť efektívnymi protinádorovými liečivami, aj v prípade indukcie karcinogén-detoxifikačného enzýmu chinónreduktázy (Henderson et al. 2000). Xantohumol spoločne s niektorými zložkami chmeľových živíc tiež pôsobia inhibične pri vzniku osteoporózy (Milligan et al. 1999).

Cieľom našej práce bolo zistiť obsah polyfenolov a flavonoidov a ich vzťah k antioxidačnej aktivite v extraktoch izolovaných z listov 16 genotypov (génových zdrojov kultúrnych odrôd a divorastúcich rastlín) chmeľu pestovaných v rôznych podmienkach na dvoch lokalitách, v Žatci (ČR) a v Piešťanoch (SR).

Materiál a metódy

Rastlinný materiál

Jednotlivé vzorky listov divorastúcich a kultúrnych chmeľov boli poskytnuté génovou bankou Chmelařského institutu s.r.o. v Žatci (CHI, ČR) a Génovou bankou SR pri CVRV v Piešťanoch (CVRV, SR) resp. zberom v určených lokalitách. Vzorky dodané CHI v Žatci boli poskytnuté z kolekcie génových zdrojov chmeľu (MZe 33083/03-300 6.2.1.). Všetky české odrody a divorastúce chmele sú pestované na rovnakej lokalite v spone 1,3 x 1 m, výška 6m. Pri testovaných genotypoch boli zabezpečené štandardné postupy a rovnaká technológia pestovania a ošetrovania v priebehu rastu rastlín. Stanovená variabilita na danej lokalite nie je ovplyvnená prostredím, ale genotypom vybraného chmeľu. Génové zdroje v CVRV sú pestované v improvizovanej chmeľnici v rovnakom spone ako v Žatci a výške 2m, avšak s minimom ošetrovaní (herbicídy, pesticídy, fungicídy) počas rastu.

Spracovanie rastlinného materiálu

Odber vzoriek v ČR (10 genotypov) bol vykonaný v rovnakom termíne (júl 2010) a po usušení pri laboratórnej teplote bol rastlinný materiál odoslaný pre laboratórne analýzy na UCM Trnava. V CVRV (7 genotypov) bol odber listových vzoriek uskutočnený 9.8.2010. K homogenizovanému vysušenému rastlinnému materiálu bol pridaný metanol v pomere 1:20 (w/v). Zmes bola 1 hodinu zahrievaná pod spätným chladičom pri teplote ~70°C. Po vychladnutí bola zmes prefiltrovaná. V oddeľovacom lieviku

bol k filtrátu pridaný hexán v pomere 1:1 (v/v) a následne destilovaná voda v pomere 1:2 (v/v). Po rozdelení fáz bola vodná vrstva odparená na rotačnej vákuovej odparke pri teplote 50°C a odparok bol následne rozpustený v ekvivalentnom množstve metanolu. Získaný extrakt bol zbavený chlorofylu pomocou SPE kolónky. Extrakty boli uchovávané do doby analýz v chladničke pri 4°C.

Stanovenie obsahu celkových polyfenolov

Obsah celkových polyfenolov bol stanovený podľa metódy opísanej Singletonom a Rossim (1965). Metóda je založená na spektrofotometrickom meraní farebných produktov reakcie hydroxylových skupín fenolových zlúčenín s Folin-Ciocalteau činidlom. Celkový obsah polyfenolov bol vyjadrený ako ekvivalent kyseliny galovej v 1g vysušeného rastlinného materiálu (d.w.). K výpočtom bola použitá lineárna rovnica regresie y =0,04335+0,00731x, (R^2=0,999).

Stanovenie obsahu flavonoidov

Flavonoidy v chmeľových extraktoch boli stanovené spektrofotometrickou metódou podľa Rakotoarisona et al. (1997). Celkový obsah flavonoidov bol vyjadrený ako ekvivalent kvercetínu v 1g vysušeného rastlinného materiálu. K výpočtom bola použitá lineárna regresia y =0,014x-0,0052, (R^2=0,999).

Stanovenie antioxidačnej aktivity pomocou vychytávania DPPH radikálu in vitro

Antioxidačná aktivita chmeľových extraktov bola stanovená spektrofotometricky podľa metódy popísanej Yen a Chen (1995). Antioxidačná aktivita bola vypočítaná podľa vzťahu:

$$m(DPPH) = m(DPPH)_{start} \times IC \times DF$$

pričom $IC=[(Abs_{kontrola}-Abs_{vzorka})/Abs_{kontrola}]$, $DF=10 \times D \times V_{extraktu}/m_{extr.mat}$, kde D je riedenie vzorky. Antioxidačná aktivita bola vyjadrená ako mg inhibovaného DPPH radikálu 1g suchého rastlinného materiálu.

Výsledky a diskusia

Celkový obsah polyfenolov v listových vzorkách rastlín 16 genotypov chmeľu obyčajného sa pohyboval od 1,5 mg/g d.w. (divorastúci genotyp D2, SR) po 10,3 mg/g d.w. (divorastúci genotyp P68, USA) (Tab. 1). Rozdiely boli štatisticky signifikantné ako medzi genotypmi (ANOVA, P<0,001), tak aj medzi rastlinami pestovanými v Žatci, alebo v Piešťanoch (ANOVA, P<0,001) a medzi divorastúcimi rastlinami a odrodami (ANOVA, P<0,01). Vo všeobecnosti vyššie hodnoty obsahu polyfenolov boli zaznamenané pri divorastúcich genotypoch (priemer 6,9 mg/g d.w., rozsah 1,5-10,3 mg/g d.w.) ako pri odrodách chmeľu (priemer 5,0 mg/g d.w., rozsah 2,4-6,8 mg/g d.w.). Napriek relatívne nízkemu počtu analyzovaných genotypov boli koeficienty variácie pre obsah polyfenolov pri divorastúcich rastlinách signifikantne vyššie (17,4% pre genotypy P8-P123; 49,8% pre genotypy D1-D3), než pri odrodách (8,7% pre Žatecké odrody a 32,0% pre génové zdroje pestované v Piešťanoch), čo naznačuje vyššiu genetickú variabilitu pre tento znak pri divorastúcich rastlinách chmeľu (Stevens et al. 2000; NESVADBA et al. 2009). Zaznamenali sme tiež rozdiely v obsahoch polyfenolov v listoch rastlín pestovaných v Žatci (intenzívna agrotechnická starostlivosť) a v Piešťanoch (minimum agrotechnických zásahov a ošetrení). Obsahy polyfenolov boli pri odrodách 1,6-krát a divorastúcich genotypoch pestovaných v Žatci 3,0-krát vyššie než pri rastlinách pestovaných alebo divorastúcich v Piešťanoch. Svedčí to o silnom vplyve pestovateľských podmienok na celkový obsah polyfenolov v zelených častiach rastlín chmeľu obyčajného. Veľmi dobre svedčí v prospech tejto hypotézy napr. porovnanie odr. Sládek pestovanej v ČR (6,8 mg/g d.w.) a SR (3,2 mg/g d.w.).

Celkový obsah flavonoidov v listových vzorkách rastlín 16 genotypov chmeľu obyčajného ukazoval podobný vzor ako obsah polyfenolov, čo je možné čiastočne vysvetliť tým, že flavonoidy samotné patria medzi zlúčeniny fenolického charakteru (Stevens et al. 1998). Flavonoidy tvorili od 1,6 mg (ekv. kvercetínu)/g d.w. (Sirem, SR) do 6,6 mg/g d.w. (P64, USA) (Tab. 1). Rozdiely v obsahu flavonoidov boli štatisticky významné medzi genotypmi (ANOVA, P<0,0001), kultúrnymi vs. divorastúcimi rastlinami (ANOVA, P<0,01) a rastlinami z ČR a SR (ANOVA, P<0,01). Koeficient variácie obsahu flavonoidov celkového súboru genotypov chmeľu bol nižší (33,8 %), než pri obsahu polyfenolov (44,5 %). Priemerný obsah flavonoidov bol pri divorastúcich genotypoch o 33% vyšší než pri kultúrnych genotypoch. Ako pri polyfenoloch, v ČR pestované odrody aj divorastúce genotypy mali vyššie obsahy flavonoidov o 14 %, resp. o 36 %. Koeficienty variácie pre obsah flavonoidov boli pri rastlinách pestovaných v ČR vyššie pri divorastúcich genotypoch (31,9 %), než pri odrodách (7,9 %), naopak pri rastlinách pestovaných v SR boli pri génových zdrojoch (42,1%) oproti divorastúcim rastlinám (33,4 %). Podobne ako pri obsahu polyfenolov, aj na celkový obsah flavonoidov výrazným spôsobom vplývali aj podmienky, v ktorých boli rastliny chmeľu pestované v SR a ČR.

Antioxidačná aktivita extraktov z listových vzoriek 16 genotypov chmeľu obyčajného varírovala v širokom rozsahu od 0,6 do 11,4 mg DPPH g d.w. (Tab. 1). Koeficienty variácie pre tento znak boli pomerne vysoké pri všetkých podsúboroch genotypov, tj. „českých“ odrodách (46,2 %), „českých“ divorastúcich genotypoch (52,7 %), „slovenských“ génových zdrojoch (23,5 %) a „slovenských“ divorastúcich rastlinách (52,0 %), čo svedčí o vysokej variabilite pre tento znak. Najvyššia antioxidačná aktivita bola zaznamenaná pri divorastúcom genotype P8 pôvodom zo Švajčiarska (11,4 mg DPPH/g d.w.) a najnižšia pri divorastúcom genotype D1 rastúcom pri rieke Váh v Piešťanoch (0,6 mg DPPH/g d.w.). Pri tomto znaku boli zaznamenané štatisticky významné rozdiely medzi genotypmi (ANOVA,

P<0,0001) a rastlinami z ČR vs. SR (ANOVA, P<0,0001), ale nie medzi kultúrnymi rastlinami a divorastúcimi genotypmi. Z hľadiska porovnania antioxidačnej aktivity extraktov z rastlín pestovaných v SR vs. ČR, vykazovali rastliny pestované v ČR až 4,8-krát vyššie hodnoty (priemer 6,4 mg DPPH/g d.w.) než rastliny pestované v SR (2,6 mg DPPH/g d.w.), čo tiež svedčí o silnom vplyve podmienok pestovania rastlín (podnebie, pôda, hnojivá, pesticídy atď.) na sledovaný znak. Potvrdzuje to aj o 43 % nižšia hodnota antioxidačnej aktivity odrody Sládek pestované v kolekcii génových zdrojov v SR (Piešťany) oproti tej istej odrode pestovanej v Chmelařskom Institute v Žatci (ČR).

Ako ukazuje obrázok 1, diskriminačná analýza použitím údajov celkového obsahu polyfenolov a flavonoidov jasne oddelila divorastúce rastliny rastúce v SR od všetkých genotypov pestovaných v ČR, génových zdrojov pestovaných v SR od divorastúcich genotypov pestovaných v ČR, odrôd pestovaných v ČR od divorastúcich genotypov pestovaných v SR a divorastúcich genotypov pestovaných v ČR od všetkých genotypov pestovaných v ČR.

Pre posúdenie vzťahov medzi obsahom polyfenolov a flavonoidov a antioxidačnou aktivitou extraktov sme vykonali korelačnú analýzu, ktorej výsledky sú znázornené na obrázku 2A,B. Z obrázku vyplýva, že vyššia korelácia bola medzi obsahom polyfenolov a antioxidačnou aktivitou (obr. 2A), než medzi obsahom flavonoidov a antioxidačnou aktivitou (obr. 2B), čo súhlasí s literárnymi údajmi (KANEDA a kol., 1995). Zaznamenali sme tiež vysokú koreláciu medzi obsahom polyfenolov a obsahom flavonoidov v zelených listoch chmeľu (výsledky neuvedené).

Záver

V práci sme analyzovali obsahy polyfenolov a flavonoidov v zelených listoch 16 rôznych genotypov chmeľu pestovaných v odlišných podmienkach v kolekciách génových zdrojov v CHI v Žatci (ČR) a CVRV v Piešťanoch (SR), vrátane divorastúcich genotypov. Zaznamenali sme rozdiely v obsahoch bioaktívnych látok najmä plyvom odlišných kultivačných podmienok a genotypov, ale tiež rozdiely medzi kultúrnymi odrodami a divorastúcimi genotypmi. Antioxidačná aktivita extraktov z listov rastlín viac korelovala s obsahom polyfenolov, ako s obsahom flavonoidov.

Poďakovanie: Táto práca vznikla čiastočne s podporou projektu VEGA 1/0436/08 „Štúdium tvorby sekundárnych metabolitov s biocídnym účinkom v rôznych odrodách chmeľu“. Poďakovanie patrí aj Mgr. M. Gubišovej z CVRV Piešťany, za umožnenie odberu vzoriek z ex vitro kolekcie génových zdrojov chmeľu.

Literatúra

HENDERSON, M. C.; MIRANDA, C. L.; STEVENS, J. F.; DEINZER, M. L.; BUHLER, D. R. *In vitro* inhibition of human P450 enzymes by prenylated flavonoids from hop, *Humulus lupulus*. In *Xenobiotica*. ISSN 0049-8254, 2000, 3, 30, p. 235-251.

HO,Y-C.; LIU, C.H.; CHEN, C.N.; DUAN, K.J.; LIN, M.T. Inhibitory effects of xanthohumol from hops (*Humulus lupulus* L.) on human hepatocellular carcinoma cell lines. In *Phytotherapy Research*. ISSN 0951-418X, 2008, 22, 11, p. 1465-1468.

HOFTA, P.; DOSTÁLEK, P.; BASAŘOVÁ, G. Xantohumol-chmelová pryskyřice nebo polyfenol? In *Chemické listy*. ISSN 1213-7103, 2004, 98, 9, p. 825-830.

KANEDA, H.; KOBAYASHI, N.; FURUSHO, S.; SAHARA, H.; KOSHINO, S. Reducing activity and flavor stability of beer. In *MBAA Quarterly*. 1995, 32, 2, p. 90-94.

MILLIGAN, S. R; KALITA, J.; HEYERICK, A.; RONG, H.; DE COOMAN, L.; DE KEUKELEIRE, D. Identification of a potent phytoestrogen in hops and beer. In *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. ISSN 0021-972X, 1999, 6, 84, p. 2249- 2252.

MIRANDA, C.L., STEVENS, J.F., IVANOV, V., McCALL, M., FREI, B., DEINZER, M.L., BUHLER, D.R. Anioxidant and prooxidant actions of prenylated and nonprenylated chalcones and flavanones *in vitro*. In *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* ISSN 0021-8561, 2000, 48, 9, p. 3876-3884.

MIKYŠKA, A., HAŠKOVÁ, D., KROFTA, K. Evaluation of antioxidant properties of raw hop and hop products. In *Acta Horticulturae.* ISSN 0567-7572, 2008, 778, p. 97-111.

NESVADBA V.; KROFTA K.: Aspects of breeding aroma hops. In *Proceedings of the Scientific Commission, IHGC, Tettnang, Germany, 24.-28.6.2007*, ISSN 1814-2206, 2007, p. 14-17.

NESVADBA, V.; PATZAK, J.; KROFTA, K. Variability of wild hops. In *Proceedings of the Scientific Commission, IHGC, León, Spain, 21.-25.6.2009*, ISSN 1814-2206, 2009, p. 13-15.

PIENDL, A.; BIENDL, M. Physiological significance of polyphenols and hop bitters in beer. In *Brauwelt International*. ISSN 0934-9340, 2000, 4, p. 310-317.

RAKOTOARISON, D.; GRESSIER, B.; TROTIN, F.; BRUNET, C.; DINE, T.; LUYCKX, M.; VASSEUR, J.; CAZIN, M.; CAZIN, J. C.; PINKAS, M. Antioxidant activites of polyphenolic extracts from flowers, *in vitro* callus and cell suspension cultures of *Crataegus monogyna*. In *Pharmazia*. ISSN 0031-7144, 1997, 1, 52, p. 60-63

SINGELTON, V.L.; ROSSI, J.A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. In *American Journal of Enology and Viticulture*. ISSN 0002-9254, 1965, 3, 16, p. 144–158.

STEVENS, J.F.; TAYLOR, A.W.; NICKERSON, G.B.; IVANCIC, M.; HENNING, J.; HAUNOLD, A.; DEINZER, M.L. Prenylflavonoid variation in *Humulus lupulus*: distribution and taxonomic significance of xanthogalenol and 4'-O-methylxanthohumol. In *Phytochemistry*. ISSN: 0031-9422, 2000, 53, 7, p. 759-775.

STEVENS, J.F.; MIRANDA, C.L.; BUHLER, D.R.; DEINZER, M.L. Chemistry and biology of hop flavonoids. In *Journal of the American Society of Brewing Chemists*. ISSN 0361-0470, 1998, 56, 4, p. 136-145.

TAGASHIRA, M.; WATANABE, M.; UEMITSU, N. Antioxidative activity of hop bitter acids and their analogues. In *Bioscience, Biotechnology & Biochemistry*. ISSN 0916-8451, 1995, 59, 4, p. 740-742.

VANHOECKE, B.; DERYCKE, L.; VAN MARCK, V.; DEPYPERE, H.; DE KEUKELEIRE, D.; BRACKE, M. Antiinvasive effect of xanthohumol, a prenylated chalcone present in hops (*Humulus lupulus*, L.) and beer. In *International Journal of Cancer*. ISSN 0898-6924, 2005, 6, 117, p. 889-895.

VOGEL., S.; HEILMAN, J. Synthesis, cytotoxicity, and antioxidative activity of minor prenylated chalcones from *Humulus lupulus*. In *Journal of Natural Products.* ISSN 0163-3864, 2008, 71, 7, p. 1237-1241.

YAMAGUCHI, N.; SATOH-YAMAGUCHI, K.; ONO, M. *In vitro* evaluation of antibacterial, anticollagenase, and antioxidant activities of hop components (*Humulus lupulus*) addressing acne vulgaris. In *Phytomedicine*. ISSN 0944-7113, 2009, 16, 4, p. 369-376.

YEN, G.C.; CHEN, H.Y. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. In *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. ISSN 1520-5118, 1995, 1, 43, p. 27-32.

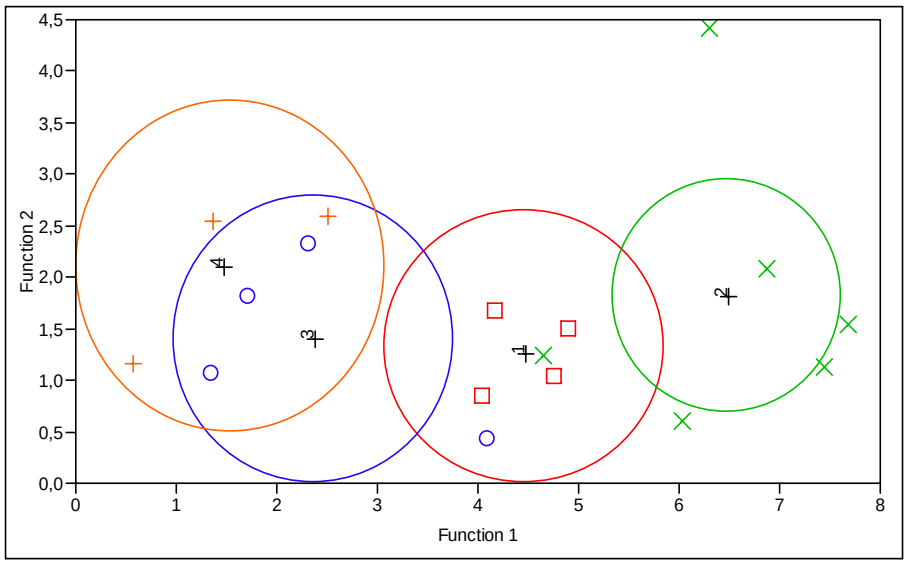
ZANOLI, P.; ZAVATTI, M. Pharmacognostic and pharmacological profile of *Humulus lupulus* L. In *Journal of Ethnopharmacology.* ISSN 0378-8741, 2008, 116, 3, p. 383-396.

ZHAO, F.; WATANABE, Y.; NOZAWA, H.; DAIKONNYA, A.; KONDO, K.; KITANAKA, S. Prenylflavonoids and phloroglucinol derivatives from hops (*Humulus lupulus*). In *Journal of Natural Products*. ISSN 0163-3864, 2005, 1, 68, p. 43-49.

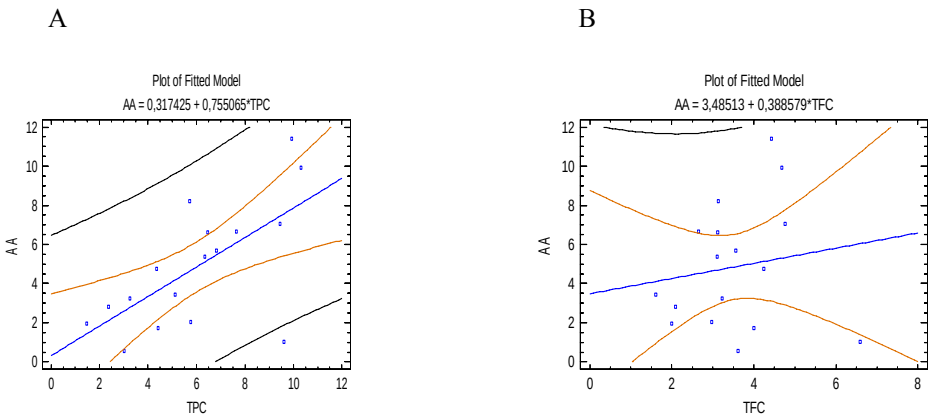
Tabuľka 1: Sumárne výsledky analýzy celkového obsahu polyfenolov, flavonoidov a antioxidačnej aktivity extraktov z listov 16 rôznych genotypov chmeľu obyčajného

Genotyp	Pôvod	Polyfenoly (mg kys. gallovej / g d.w.)	Flavonoidy (mg kvercetínu / g d.w.)	Antioxidačná aktivita (mg DPPH / g d.w.)
Vital	odroda, CZ	6,47±0,05	3,12±0,07	6,64±0,11
Harmonie	odroda, CZ	5,77±0,04	2,98±0,06	2,05±0,08
Sládek	odroda, CZ	6,82±0,06	3,56±0,06	5,70±0,08
Rubín	odroda, CZ	5,73±0,04	3,13±0,09	8,20±0,16
K/71 (Sládek)	GZ, SK	3,25±0,04	3,22±0,01	3,25±0,03
K/114	GZ, SK	4,36±0,05	4,24±0,08	4,74±0,18
Sířem	GZ, SK	5,11±0,06	1,62±0,02	3,43±0,06
Aromat	GZ, SK	2,37±0,05	2,09±0,01	2,80±0,04
P8	DRG, CH	9,94±0,03	4,43±0,04	11,39±0,38
P18+19	DRG, FR	6,35±0,07	3,11±0,03	5,37±0,30
P42	DRG, CZ (Teplice)	7,64±0,04	2,65±0,08	6,66±0,18
P 64	DRG, US	9,61±0,05	6,59±0,07	1,03±0,06
P 68	DRG, US	10,30±0,06	4,68±0,14	9,91±0,24
P123	DRG, RU (Kaukaz)	9,46±0,05	4,76±0,07	7,05±0,19
D1 (Váh)	DRG, SK (Piešťany)	3,02±0,06	3,62±0,02	0,580±13
D2 (Kaufland)	DRG, SK (Piešťany)	1,47±0,32	1,99±0,02	1,96±0,35
D3 (Sládkovičova PN)	DRG, SK (Piešťany)	4,43±0,06	4,01±0,01	1,73±0,16
Priemery	Odrody CZ	6,20±0,47	3,19±0,22	5,65±2,26
	DRG (Svet)	8,88±1,41	4,37±1,27	6,90±3,32
	GZ SK	3,77±1,04	2,79±1,01	3,55±0,72
	DRG (SK)	2,97±1,21	3,20±0,87	1,42±0,60
	Priemer CZ	7,81±1,74	3,90±1,15	6,40±3,00
	Priemer SK	3,43±1,19	2,97±0,98	2,64±1,25
Priemer celkom		6,01±2,64	3,52±1,18	4,85±3,06

Legenda: DRG = divorastúce genotypy; GZ = génové zdroje



Obr. 1: Diskriminačná analýza celkového obsahu polyfenolov a flavonoidov v listových extraktoch 16 genotypov chmeľu obyčajného (1 = odrody, ČR; 2 = divorastúce genotypy, ČR; 3 = génové zdroje, SR; 4 = divorastúce genotypy, SR)



Obr. 2: Korelačná analýza vzťahov medzi obsahom polyfenolov (**A**, TPC) a flavonoidov (**B**, TFC) a antioxidačnou aktivitou (AA) listových extraktov 16 genotypov chmeľu obyčejného.

Adresy autorov:
[1]Katedra biotechnológií, Fakulta prírodných vied, Univerzita sv. Cyrila a Metóda v Trnave, Námestie J. Herdu 2, Trnava, 917 01, SK;
[2]Katedra botaniky a genetiky, Fakulta prírodných vied, Univerzita Konštantína a Filozofa v Nitre, Trieda A. Hlinku 1, 949 74 Nitra, SK;
[3]Chmelařský Institut s.r.o., Kadaňská 2525, 438 46 Žatec, ČR; *E-mail: ivana.psenakova@ucm.sk

HODNOTENIE VYBRANÝCH ZNAKOV A VLASTNOSTÍ OVPLYVŇUJÚCICH ÚRODU ZRNA JAČMEŇA SIATEHO F. OZIMNEJ
THE EVALUATION OF SELECTED TRAITS AFFECTING THE YIELD OF WINTER BARLEY

Michaela BENKOVÁ – Ľubomír MENDEĽ – Pavol HAUPTVOGEL

Variability for agronomic traits was determined in 20 winter barley genetic resources evaluated on experimental basis of PPRC Piešťany in 2007/2008 – 2008/2009. The data obtained were evaluated by variance analysis. The results have shown on differences between two- and six- row winter barley. The six-row winter barley achieved higher mean yield of grain than two-row barley. The results of variance analysis have shown high significant effect of the year on variability of the all traits except grain mass per a spike. Of the set we can choose the genotypes with permanent yield in our condition: Lomerit (DEU), Nord 02611 (DEU), BE 650503 (NLD, Mascara (FRA), Barcelona a Premuda (NLD).
Key words: winter barley, genetic resources, evaluation, variance analysis

Úvod

Jačmeň siaty je neodmysliteľnou súčasťou obilnín, ktorý sa z hľadiska svetovej produkcie zaraďuje na 4. miesto za pšenicu, ryžu a kukuricu. Na Slovensku mu patrí v zastúpení po pšenici druhé miesto, kde sa pestuje ako surovina pre potravinársky priemysel, na kŕmenie zvierat a na výrobu sladu. V súčasnosti je na Slovensku registrovaných 56 odrôd jačmeňa siateho formy jarnej a 23 f. ozimnej (Listina registrovaných odrôd, 2010). Všetky ozimné formy boli vyšľachtené v zahraničí. Súčasné registrované odrody majú biologicko-hospodárske znaky, ktoré spĺňajú podmienky intenzívneho pestovania, majú primeranú rezistenciu proti listovým chorobám a dobrú sladovnícku kvalitu. Prvoradou podmienkou na vyšľachtenie kvalitných odrôd jačmeňa siateho je výber vhodných genetických zdrojov. Pri forme ozimnej sa šľachtenie zameriava hlavne na kŕmnu kvalitu, zimuvzdornosť, odolnosť proti poliehaniu a zdravotný stav. Šesťradové ozimné jačmene majú vyššiu zimuvzdornosť, sú adaptabilnejšie k podmienkam prostredia a menej náročné na predplodinu a pôdu. Dvojradové ozimné jačmene sú v poslednej dobe perspektívne aj na výrobu sladu.

Ozimný jačmeň je úrodnejší ako jarný jačmeň a na pôdach menej úrodných, ľahších prekonáva aj ozimnú pšenicu a raž. Je suchovzdornejší, takže sa uplatňuje aj v suchých oblastiach, kde svojou skorosťou a skorším zberom nie je až tak poškodzovaný prísuškami a vysokými letnými teplotami (Zimolka 2006).

Výkonnosť, teda úroda jačmeňa siateho f. ozimnej závisí od biologických daností odrody, ale tiež od podmienok prostredia, genetického vybavenia odrody a tiež od vložených energetických vkladov. Cieľom našej práce bolo zhodnotiť a porovnať vybrané zahraničné 6-radové a 2-radové genotypy jačmeňa siateho f. ozimnej v našich podmienkach z hľadiska znakov a vlastností ovplyvňujúcich celkovú úrodu zrna.

Materiál a metódy

Na experimentálnom poli Centra výskumu rastlinnej výroby Piešťany v Piešťanoch sme v rokoch 2007/2008 až 2008/2009 hodnotili 20 genotypov jačmeňa siateho f. ozimnej zahraničného a domáceho pôvodu.

Pokus sa vysieval strojom na parcelky so zberovou plochou 2,5 m^2, v dvoch v opakovaniach. Do hodnotenia boli zaradené genotypy dvojradové: Carrero, Emily, Verticale (DEU), Boreale, Mascara (FRA), Finesse (GBR), Nure (ITA), Amsterdam, CEB06204, CEB 05212, Cebeco 20254, Barcelona, Premuda, Graciosa (NLD), RD-H-1 (SVK). Zo šesťradových genotypov to boli: Heidy (AUT), Alinghi, Campil, Fridricus, GW 2207, Lomerit, Nord 02611 (DEU), BE 650 503, Gerlach (NLD), Luran, Luxor (CZE) V poľnom experimente bola hodnotená dĺžka vegetačnej doby (VD) v dňoch, výška rastliny (VR) v mm, z chorôb odolnosť voči múčnatke trávovovej - *Blumeria graminis* (BG), s bodovým ohodnotením 9-1 bod, odolnosť voči poliehaniu (POL) s bodovým ohodnotením 9-1 bod, počet klasov na m^2 (PK/m2), váha zrna z klasu (VZ/klas) v g, hmotnosť 1000 zŕn (HTZ) v g a úroda zrna (Ú) v g na m^2. Súbor bol vyhodnotený základnými štatistickými charakteristikami pomocou štatistického balíka SPSS 8,1 pre Windows (SPSS, 1998).

Výsledky a diskusia

Klimatické podmienky v roku 2008 boli lepšie a vyrovnanejšie pre pestovanie jačmeňa ako v roku 2009, avšak zaznamenali sme väčší výskyt múčnatky trávovej, ktorý sa začal prejavovať už na jeseň v roku 2007 a zvýraznil sa v jarnom období nasledujúceho roka.

Výskyt tejto listovej choroby ovplyvnil hmotnosť 1000 zŕn a následne aj priemernú úrodu. Vegetačné obdobia v sledovaných rokoch neboli markantne rozdielne, avšak výkyvy teplôt a zrážok sme zaznamenali. Aprílové sucho v roku 2009 spôsobilo slabšie odnožovanie, čím sa znížil počet produktívnych klasov na jednotku plochy. Počet klasov v tomto roku bol v priemere o 97 klasov nižší pri šesťradových genotypoch a o 159 klasov pri dvojradových genotypov, v porovnaní s rokom 2008. Napriek tomu vyššie teploty a dostatočné zrážky v ďalších mesiacoch ovplyvnili nalievanie zŕn v klasoch, čím sa dosiahla vyššia HTZ. V konečnom dôsledku celková priemerná úroda zrna genotypov bola v roku 2009 vyššia ako v roku 2008.

Súbor sme analyzovali na základe rozdelenia jačmeňov typu dvojradového a šesťradového. Na základe analýzy rozptylu (tab. 1) sme zistili štatisticky vysoko preukazný vplyv (P<0,05) ročníka na všetky sledované znaky pri obidvoch typoch, okrem znaku váha zrna na klas.

Tabuľka 1:

Faktory	df[a]	ZNAKY							
		VD (dni)	VR (mm)	PK/m2	VZ/klas	Ú (g/m2)	HTZ	BG (9-1b)	POL (9-1b)
		MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS
Dvojradové typy									
Roky	1	96,10**	909947**	570732**	0,82	1532290**	343,4**	72,90**	6,40**
Genotyp	14	8,16*	7726**	17330**	1,49	29907,00	14,5**	7,07**	0,42
Roky x Genotyp	14	3,36	3952**	7152*	1,5	50623**	18,6**	4,04**	0,69
Reziduál	60	4,31	1099	3597	2,49	18138	1,3	0,18	0,69
celkový Ø		256,23	900,56	833,77	1,90	1100	56,03	7,26	8,73
Sm.odchýlka (%)		2,41	113,14	112,65	0,33	0,21	3,16	1,64	0,82
V%		0,94	12,56	13,51	17,64	18,70	5,64	22,59	0,37
Ø za rok 2008		257,27	1001,11	913	1,98	970	54,08	6,36	8,47
Ø za rok 2009		255,20	800,01	754	1,77	1227	57,98	8,16	9,00
Šesťradové typy									
Roky	35	35**	727020**	153411**	0,1426	1490004**	62,1**	82,970**	11,045**
Genotyp	6	6	3035*	10998**	0,3695**	48780**	47,2**	4,276**	3,279**
Roky x Genotyp	4	4	1997	13620**	0,7732**	12920	9,4**	3,403**	3,279**
Reziduál	4	4	1462	3833	0,1230	17107	0,7	0,136	0,212
celkový Ø		255,55	927,17	774,52	2,73	1240	52,82	6,94	8,59
Sm.odchýlka (%)		2,16	113,79	93,50	0,53	209,75	3,18	1,60	1,15
V%		0,85	12,27	12,07	19,42	16,89	6,02	23,01	13,38
Ø za rok 2008		256,27	1032,12	823	2,77	1090	51,85	5,82	8,18
Ø za rok 2009		254,82	822,21	726	2,67	1391	53,78	8,06	9,00

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

Vysoko preukazný (P<0,05) vplyv genotypu pri obidvoch typoch sme zaznamenali pri znakoch počet klasov na m^2, hmotnosť 1000 zŕn a odolnosť voči múčnatke trávovej. Rozdielne výsledky porovnávaním dvojradových a šesťradových typov sme zaznamenali pri znakoch váha zrna na klas, celková úroda zrna na m^2 a odolnosť voči poliehaniu. Tieto znaky a vlastnosti boli vysoko preukazne (P<0,05) ovplyvňované genotypom len pri šesťradových typoch jačmeňa. Preukazný (P<0,01) až vysoko preukazný (P<0,05) vplyv interakcie roky x genotyp pri obidvoch typoch sme zaznamenali na znaky hmotnosť 1000 zŕn, odolnosť voči múčnatke trávovej a počet klasov na m^2 (tab. 1).

Z hodnotených chorôb sme zaznamenali v obidvoch sledovaných rokoch výskyt múčnatky trávovej (*Blumeria graminis*), najmä v roku 2008, s celkovým priemerom 6,36 bodov pri dvojradových genotypoch a 5,82 bodov pri šesťradových genotypoch, ostatné sledované choroby mali minimálny výskyt, preto neboli ani vyhodnocované. Hodnoty odolnosti voči múčnatke trávovej mali pri obidvoch typoch vysoký stupeň variability s variačným koeficientom od 22 – 23% (tab. 1).

Úroda zrna je znak súhrnný, na ktorom sa podieľa počet a hmotnosť zrna hlavného klasu, dĺžka klasu a počet produktívnych odnoží. Genetická podmienenosť sa preto určuje obtiažne (Holková 2003). Pri tomto znaku sme tiež zaznamenali vysoko preukazný vplyv ročníka (P<0,05) a vplyv genotypu len pri šesťradových typoch. V roku 2008 vykázali sledované genotypy nižšiu celkovú úrodu zrna v porovnaní s rokom 2009. Priemerná úroda zrna šesťradových jačmeňov bola vyššia (1240 $g.m^2$) v porovnaní s dvojradovými jačmeňmi (1100 g. m^2).

Hmotnosť 1000 zŕn (g) je charakterizovaný ako najstabilnejší úrodotvorný prvok s najnižšou variabilitou v závislosti od vplyvu prostredia (Holková 2003). Variačný koeficient tohto znaku bol síce nízky, avšak v našom experimente na hmotnosť 1000 zŕn pri obidvoch typoch mal vysokopreukazný vplyv ročník (tab. 1). Priemerná hmotnosť 1000 zŕn bola vyššia v roku 2009 v porovnaní s rokom 2008 pri obidvoch typoch genotypov jačmeňa.

Dôležitým prvkom úrodnosti je počet klasov na plochu. V súčasnom šľachtení na základe morfotypu rastliny sa počet produktívnych odnoží stáva stredobodom pozornosti, pretože zvyšuje produktivitu rastliny a tým celkové narastanie hektárových úrod. Genetické zlepšenie úrody zrna prostredníctvom zvýšenia počtu klasov súčasných odrôd potvrdil aj Grausgruber (2002). Napriek tomu, že počet klasov bol pri obidvoch typoch v roku 2008 vyšší ako v roku 2009, na úrode zrna sa to neprejavilo, pretože v tomto roku bol značný výskyt múčnatky trávovej.

Záver

Z výsledkov analýzy rozptylu sme zistili štatisticky vysoko preukazný vplyv (P<0,05) ročníka na všetky sledované znaky pri dvojradových ako aj pri šesťradových typoch jačmeňa siateho f. ozimnej, okrem znaku váha zrna na klas. Vysoko preukazný (P<0,05) vplyv genotypu pri obidvoch typoch sme zaznamenali pri znakoch počet klasov na m^2, hmotnosť 1000 zŕn a odolnosť voči múčnatke trávovej. Napriek tomu, že v roku 2008 sa dosiahol v sledovanom súbore vyšší počet klasov na jednotku plochy a vyššia váha zrna na klas pri dvojradových ako aj pri šesťradových typoch jačmeňa, výskyt múčnatky trávovej v tomto roku zredukoval úrodu, ktorá bola v konečnom dôsledku nižšia ako úroda v pestovateľskom roku 2009, ktorý bol ovplyvnený suchom. Priemerná úroda zrna šesťradových jačmeňov bola vyššia v porovnaní s dvojradovými jačmeňmi o 12%. V našich podmienka sa najlepšie adaptovali šesťradové genotypy: Lomerit (DEU), Nord 02611 (DEU), BE 650503 (NLD) a dvojradové genotypy Mascara (FRA), Barcelona a Premuda (NLD).

Poďakovanie: Táto štúdia vznikla vďaka podpore v rámci Operačného programu Výskum a vývoj pre projekt: Transfer, využitie a diseminácia výsledkov výskumu genofondu rastlín pre výživu a poľnohospodárstvo (ITMS: 26220220058), spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja

Literatúra

GRAUSGRUBER, H. - BOINTNER, H. - TUMPOLD, R. - RUCKENBAUER, P.: Genetic improvement of agronomic and qualitative traits of spring barley. In: Plant Breeding, 2002, vol.121, p. 411-416.

HOLKOVÁ, S.: Šľachtenie a semenárstvo jačmeňa. In.: Jačmeň, biológia, pestovanie, využívanie. Nitra, 2003, s.51 – 71, ISBN 80-969068-2-8

Vestník MP SR, ročník XLII, 12.júl 2010, čiast. 14: Listina registrovaných odrôd. Bratislava : AT Publishing, 2010, s. 21-22.

ZIMOLKA et al.: In: Ječmen, formy a užitkové směry v České republice. Profi Press Praha, 2006, s.48-49.

Adresa autorov:
Ing. Michaela Benková, PhD., Ing. Ľubomír Mendel, Ing. Pavol Hauptvogel, PhD., Centrum výskumu rastlinnej výroby Piešťany, Bratislavská cesta 122, 921 68 Piešťany. E-mail: benkova@vurv.sk

HODNOTENIE NEŠPECIFICKEJ A ŠPECIFICKEJ ODOLNOSTI NOVOŠĽACHTENÝCH KMEŇOV PŠENICE LETNEJ VOČI PATOGÉNOM MÚČNATKE TRÁVOVEJ NA PŠENICI A HRDZI PŠENICOVEJ
ASSESSMENT NONSPECIFIC AND SPECIFIC RESISTANCE OF NEW WHEAT BREEDING LINES TO POWDERY MILDEW AND LEAF RUST

Katarína BOJNANSKÁ – Štefan MASÁR

Resistance of 98 wheat breeding lines to powdery mildew and to leaf rust was evaluated in 2010. The evaluation was done at the field conditions. The range of the attack of wheat leaf rust under field conditions was expressed by AUDPC values. Significantly differences were found among the AUDPC values of breeding lines. The feature Leaf tip necrosis – Ltn was observed at some breeding lines. These lines have had significantly the lowest leaf rust AUDPC values and they were simultaneously detected by the non-specific resistance to leaf rust. Specific resistance genes to wheat powdery mildew Pm4b and Pm8 were found in several varieties and breeding lines.
Key words: wheat, powdery mildew, leaf rust, Blumeria graminis, Puccinia recondita, resistance

Úvod

Odolnosť rastlín voči patogénom je tvorená nešpecifickou a špecifickou odolnosťou. Nešpecifická odolnosť je podmienená viacerými génmi malého účinku a môže mať rôznu úroveň. Vyhodnocuje sa predovšetkým v poľných podmienkach, kde jej prítomnosť v testovaných genotypoch signalizujú hodnoty nameraných epidemiologických parametrov (Broers et al. 1996). Špecifická odolnosť je podmienená samostatnými génmi veľkého účinku. V súčasnosti sú známe špecifické gény rezistencie voči múčnatke trávovej, *Pm1 – Pm43* a približne 66 *Lr* špecifických génov rezistencie voči hrdzi pšenicovej. V poľných podmienkach bola sledovaná odolnosť novošľachtených kmeňov pšenice letnej (*Triticum aestivum* L.) 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 pšenicovej). U vybraných novošľachtených kmeňoch bola hodnotená špecifická rezistencia voči uvedeným patogénom v laboratórnych podmienkach.

Materiál a metódy

V poľných podmienkach CVRV - VÚRV v Piešťanoch bolo v roku 2010 hodnotených 98 novošľachtených kmeňov (ďalej len kmene) pšenice letnej formy ozimnej (*Triticum aestivum* L.) pochádzajúcich z VŠS Vígľaš – Pstruša (59 kmeňov), z VŠS Malý Šariš (26 kmeňov) a zo spoločnosti HORDEUM s.r.o. zo Sládkovičova (13 kmeňov). Rozsah vizuálnych symptómov napadnutia na listoch bol vyjadrený percentuálne. Získané hodnoty napadnutia z dvoch opakovaní boli použité na výpočet AUDPC (plochy napadnutia pod krivkou vývoja choroby) podľa Shanera a Finneya (Shaner & Finney 1977).

Špecifická rezistencia kmeňov voči patogénom bola hodnotená po umelej infekcii vybranými diferenčnými rasami a patotypmi patogénov *Puccinia recodita* f. sp. *tritici* a *Blumeria raminis* f. sp. *tritici* v kontrolovaných laboratónych podmienkach. Hlavné infekčné typy pre hrdzu pšenicovú boli hodnotené podľa McIntosha et al. (1995) a pre múčnatku trávovú na pšenici podľa Királyho (1970).

Výsledky a diskusia

Napadnutie múčnatkou trávovou v poľných podmienkach bolo hodnotené v troch termínoch. Stagnácia vývoja patogéna spôsobená nevhodnými poveternostnými podmienkami, mala za dôsledok, že neboli zásadné rozdiely v ploche napadnutia medzi kmeňmi a nebolo možné stanoviť hodnoty AUDPC pre múčnatku trávovú.

Medzi kmeňmi z VŠS Vígľaš-Pstruša boli v hodnotách AUDPC hrdze pšenicovej zistené významné rozdiely ($P \leq 0,01$). Hodnoty AUDPC varírovali od 31,5 do 810,25. Štatisticky významne najnižšie ($P \leq 0,05$) hodnoty AUDPC kmene V2-15 a V2-17. Kmene V2-15, V2-17, V2-18, V2-23, V2-24, V2-33, V2-37 a V2-40 mali nekrózu na konci najmladších listov (Leaf tip necrosis – Ltn). Korelácia medzi znakom Ltn a hodnotami AUDPC bola významná ($P \leq 0,01$). Percentuálne hodnoty listovej plochy napadnutia múčnatkou sa pohybovali od 0-15 %. Kmene V2-15, V2-33, V2-57, V2-58 a V2-59 mali 0 % výskytu symptómov múčnatky na listoch.

Medzi genotypmi z VŠS Malý Šariš boli v hodnotách AUDPC hrdze pšenicovej zistené významné rozdiely ($P \leq 0,01$). Hodnoty AUDPC varírovali od 36,75 do 842,00. Štatisticky významne najnižšie hodnoty AUDPC ($P \leq 0,05$) mali kmene K 2089-49, K 2089-51, K 2089-58, MS 1588 V2 4, MS 1782, K 1750-184-107-8, MS 1588 V2 5, MS 1953 a odroda Venistar. Kmene K 2089-49, K 2089-51, K 2089-58, K 1750-184-107-8 a K 1750-184-115-1 mali nekrózu na konci najmladších listov (Leaf tip necrosis – Ltn). Korelácia medzi znakom Ltn a hodnotami AUDPC bola $r=0,39$ a bola štatisticky významné ($P \leq 0,01$). Najnižšie plochy napadnutia múčnatkou trávovou (0-5 %) mali kmene K 1750-184-115-1, MS 1997, MS 2123 a MS 1782. U vybraných kmeňov bola analyzovaná špecifická odolnosť voči múčnatke trávovej. U kmeňov MS 1744-1,

MS 1744-2, MS 1997, MS 2123, K 1744-7-5-58, K 1744-7-6-55 a MS 1782 nebol detegovaný ani jeden zo sledovaných špecifických génov. U kmeňov MS 1732, MS 1953, MS 1375, MS 1588 V2 4 a MS 1588 V2 5 bol detegovaný špecifický gén *Pm4b*.

V poľnom a laboratórnom pokuse bolo na rezistenciu proti hrdzi pšenicovej analyzovaných 13 kmeňov pôvodom z Hordeum Sládkovičovo spol. s.r.o. Medzi genotypmi boli v hodnotách AUDPC hrdze pšenicovej zistené významné rozdiely (P≤0,01). Hodnoty AUDPC varírovali od 5,25 do 332,50. Štatisticky významne najnižšie hodnoty AUDPC (P≤0,05) mali kmene SK-173 a SK-172. Kmene SK-173, SK-172, SK-171 a SK-174 mali nekrózu na konci najmladších listov (Leaf tip necrosis – Ltn). Ltn bola pozorovaná v genotypoch s génmi rezistencie *Lr34* a *Lr46* (Schnurbusch et al. 2004; Rosewarne et al. 2006). Korelačný koeficient hodnôt AUDPC a detekcie mal hodnotu r=0,6 a bol štatisticky významný (P≤0,01). Genotypy SK-170 a SK-175, ktoré nemali špecifickú rezistenciu voči žiadnemu patotypu *Puccinia triticina* , ale mali nízku hodnotu AUDPC, majú pravdepodobne rezistenciu dospelých rastlín - Adult Plant Resistance - APR (Pathan & Park 2006). Laboratórnou analýzou pomocou špecifických patotypov *Puccinia triticina* sme zistili, že genotypy SK-169 a SK-176 majú špecifickú rezistenciu voči siedmym rasám *Puccinia triticina*. Z toho možno usudzovať na základe hodnôt AUDPC hrdze pšenicovej, že špecifická rezistencia týchto genotypov bola prekonaná novou virulentnou rasou v poslednom období. Genotyp SK-174 má pravdepodobne gén rezistencie *Lr26*. Hodnoty plochy napadnutia múčnatkou trávovou sa pohybovali od 0-25 %. Najnižšie hodnoty napadnutia múčnatkou mali kmene SK-168, SK-170, u ktorých boli detegované špecifické gény *Pm4b+Pm8.* Najnižšiu plochu napadnutia mal aj kmeň SK-171, avšak nebola u neho potvrdená špecifická rezistencia. Možno predpokladať, že odolnosť toho kmeňa v poľných podmienkach je podmienená nešpecifickou rezistenciou. Špecifická rezistencia nebola potvrdená ani u kmeňov SK-167, Sk-169, SK-174, SK-176, SK-177 a SK-178. Špecifický gén rezistencie *Pm4b* bol nájdený u kmeňov SK-172, SK-173 a SK-175. Kmeň SK-179 má špecifický gén *Pm8*.

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.

Záver

V hodnotených odrodách a kmeňoch bola analyzovaná špecifická rezistencia voči múčnatke trávovej. Boli detegované špecifické gény rezistencie *Pm4b* a *Pm8*. Pri hodnotení odolnosti kmeňov voči hrdzi pšenicovej bol pozorovaný znak nekróza na konci najmladších listov (Leaf tip necrosis – Ltn). Vyskytoval sa u kmeňov V2-15, V2-17, V2-18, V2-23, V2-24, V2-33, V2-37, V2-40, K 2089-49, K 2089-51, K 2089-58, K 1750-184-107-8, K 1750-184-115-1, SK-173, SK-172, SK-171 a SK-174. Tieto mali významne najnižšie hodnoty AUDPC hrdze pšenicovej a znak koreloval s detegovanou nešpecifickou rezistenciou voči hrdzi pšenicovej.

Poďakovanie: Táto práca bola podporovaná finančnými prostriedkami APVV VMSP-P-0047-09 a MP SR v rámci rezortnej úlohy VaV na roky 2010 – 2012 s názvom "Využitie biotechnologických metód pri tvorbe nových typov rastlín".

Literatúra

BROERS, L.H.M. - SUBIAS, C.X. - ATILANO, L.R.M. 1996. Field assessment of qantitative resistance to yellow rust in ten spring bread whet cultivars. In: Euphytica Vol. 90, N. 1, 1996, pp. 9-16.

KIRÁLY, Z., KLEMENT, Z., SOLYMOSY, F., VÖRÖS, J.: Methods in plant pathology. Budapest, 1970, 509.

McINTOSH R.A.,WELLINGS C.R.,PARK R.F. Wheat rust. An atlas of resistance genes. Australia: CSIRO. 1995. 200 p.

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.

PATHAN, A.K. - PARK, R.F. 2006. Evaluation of seedling and adult plant resistance to leaf rust in European wheat cultivars. *Leaf rust resistance in European wheat cultivar.* In: Euphytica, Vol. 149, 2006, pp. 327–342.

ROSEWARNE, G. - SINGH, R.P. - HUERTA-ESPINO, J. - WILLIAM, H.M. - BOUCHET, S., - CLOUTIER, S. - MCFADDEN, H. - LAGUDAH, E. S. 2006. Leaf tip necrosis, molecular markers and *b*1-proteasome subunits associated with the slow rusting resistance genes Lr46/Yr29. In: Theor Appl Genet (2006) 112: 500–508.

SHANER, G. – FINNEY, R.E. 1977. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in Knox wheat. In: Phytophatology, Vol. 67, N. 8, 1977, pp. 1051-1056.

SCHNURBUSCH, T. - PAILLARD, S. - SCHORI, A. - MESSMER, M. - SCHACHERMAYR, G. - WINZELER, M. - KELLER,B. 2004. Dissection of quantitative and durable leaf rust resistance in Swiss winter wheat reveals a major resistance QTL in the Lr34 chromosomal region. In: TAG, Vol. 108, 2004, pp. 477–484.

Adresa autorov:
Ing. Katarína Bojnanská; Ing. Štefan Masár, CSc.; CVRV – Výskumný ústav rastlinnej výroby, Oddelenie aplikovanej genetiky, Bratislavská cesta 122, 921 68 Piešťany, e-mail: bojnanska@vurv.sk, masar@vurv.sk

ŠPECIFICKÁ ODOLNOSŤ VYBRANÝCH GENOTYPOV PŠENICE LETNEJ VOČI OBLIGÁTNYM PATOGÉNOM
SPECIFIC RESISTANCE TO OBLIGATE PATHOGENS OF SELECTED WHEAT GENOTYPES

Katrína BOJNANSKÁ – Štefan MASÁR – Jozef GUBIŠ – Alžbeta ŽOFAJOVÁ – Martin PASTIRČÁK – Tibor ROHÁČIK

Wheat varieties and breeding lines originated from SELEKT Research and Breeding Institute Bučany, Inc. were evaluated in the character of resistance to powdery mildew and leaf rust in 2010. The range of the attack of wheat leaf rust under field conditions was expressed by AUDPC values. Significantly differences were found among the AUDPC values of varieties and breeding lines. Varieties Eva, Ignis and Stanislava and breeding lines BU-117, BU-144, BU-152, BU-153, BU-158, BU-159, BU-160, BU-161, BU-164 and BU-166 have had significantly the lowest leaf rust AUDPC values and they were simultaneously detected by the nonspecific resistance to leaf rust. Specific resistance genes to wheat powdery mildew Pm1, Pm4b and Pm8 were found in several varieties and breeding lines.
Key words: wheat, powdery mildew, leaf rust, Blumeria graminis, Puccinia recondita, resistance

Úvod

Obligátne patogény *Puccinia triticina* Eriks. (syn. *Puccinia recondita* Rob,. ex Desm. f. sp. *tritici*) a *Blumeria graminis* (DC) Speer f. sp. *tritici* Marchal spôsobujú listové hubové choroby pšenice. Listové ochorenie múčnatka trávová sa môže počas priaznivých podmienok pre vývoj vyskytovať už na mladých jesenných porastoch pšenice. Škodlivosť patogénov spočíva v redukcii asimilačnej plochy rastlín. To má za následok redukciu počtu a hmotnosti zŕn v klase, čo môže spôsobiť až 48 % straty (Everts & Leath 1992; Shtienberg 1992). Takisto sa významne znižuje výťažnosť múky a sú nepriaznivo ovplyvnené aj iné parametre kvality zrna (Perugini et al. 2008). Najčastejšie je odolnosť rastlín pšenice podmienená špecifickými génmi rezistencie. Špecifické gény rezistencie zabezpečujú obranu rastlín počas celého vývoja rastlín. V súčasnosti sú známe špecifické gény rezistencie voči múčnatke trávovej, *Pm1 – Pm43* (HE et al. 2009) a približne 66 *Lr* špecifických génov rezistencie voči hrdzi pšenicovej (McIntosh et al. 2009).

Materiál a metódy

V poľných podmienkach CVRV - VÚRV v Piešťanoch bolo v roku 2010 hodnotených 9 registrovaných odrôd a 22 novošľachtených kmeňov pšenice letnej formy ozimnej (*Triticum aestivum* L.) pôvodom zo SELEKT Bučany a.s. Rozsah vizuálnych symptómov napadnutia na listoch bol vyjadrený percentuálne. Získané hodnoty napadnutia z dvoch opakovaní boli použité na výpočet AUDPC (plochy napadnutia pod krivkou vývoja choroby) podľa Shanera a Finneya (Shaner & Finney 1977). Hodnoty AUDPC boli použité na analýzu variancie. Na štatistické spracovanie bol použitý štatistický program SPSS® (13.0).

Špecifická odolnosť odrôd a novošľachtených kmeňov voči patogénom bola hodnotená po umelej infekcii vybranými diferenčnými rasami a patotypmi patogénov *Puccinia recodita* f. sp. *tritici* a *Blumeria raminis* f. sp. *tritici* v kontrolovaných laboratórnych podmienkach. Hlavné infekčné typy pre múčnatku trávovú na pšenici boli hodnotené podľa Királyho (Király 1970) a pre hrdzu pšenicovú podľa McIntosha (McIntosh et al. 1995).

Výsledky a diskusia

Napadnutie listovej plochy múčnatkou trávovou v poľných podmienkach bolo hodnotené v troch termínoch. Poveternostné podmienky počas vegetačného obdobia pšenice boli nevhodné pre rozvoj patogéna *Blumeria* graminis f. sp. *tritici* a spôsobili stagnáciu jeho vývoja. Plocha napadnutia sa po prvom termíne hodnotenia vôbec nemenila a bola rovnaká počas celého obdobia hodnotenia. Nebolo možné stanoviť hodnoty AUDPC. Percentuálne hodnoty sa pohybovali v rozsahu od 0 - 15 %. V oboch opakovaniach mala 0 % odroda Klaudia a kmeň BU 153; 0 – 5 % hodnotu mali odrody Ilona, Eva, Šarlota a Stanislava a kmene BU-130, BU-142, BU-154, BU-156, BU-157, BU-158, BU-159, BU-162, BU-164 a BU-166. Analyzovaná bola špecifická odolnosť voči múčnatke trávovej podmienená špecifickými génmi *Pm1, Pm2, Pm3, Pm4b, Pm8, Pm9* a *Mld*. Gény *Pm9* a *Mld* patria medzi efektívne. Ostatné gény sú prekonané a niektoré z nich majú reziduálny účinok na nešpecifickú rezistenciu (Paillard et al. 2002). V odrodách Ignis, Blava, Klea, Ilona, Eva a Šarlota, ani v kmeňoch BU-138, BU-154, BU-160, BU-161, BU-165 nebol nájdený žiadny z detegovaných špecifických génov. Odroda Ilona má zabudovaný špecifický gén *pm5* (LUTZ et al. 1992), ktorý však použitými diferenčnými patotypmi nebolo možné detegovať. U odrôd Blava a Klea bola potvrdená neprítomnosť špecifických génov rezistencie (Bartoš & Hanušová 1993; Švec et al. 1999). Kmene BU-153 a BU-157 majú špecifickú rezistenciu, ktorú nebolo možné analyzovať použitými izolátmi. Na všetky testovacie izoláty mali rezistentnú reakciu. Oba kmene mali takisto najnižšie hodnoty napadnutia v poľných podmienkach, čo pravdepodobne poukazuje, na to, že zabudované špecifické gény rezistencie sú efektívne a chránia rastliny počas celého vývoja. Zo sledovaných génov rezistencie boli v genotypoch

detegované gény *Pm1, Pm4b* a *Pm8*. Samostatné gény *Pm4b* boli detegované v odrodách Viginta a Stanislava a v kmeňoch BU-117, BU-144, BU-152, BU-156, BU-158, BU-159, BU-162, BU-164 a BU-166; *Pm8* bol detegovaný u kmeňa BU-163. Kombinácia génov *Pm4b+8* bola u odrody Klaudia a kmeňov BU-130, BU-142 a BU-155. Kombinácia génov *Pm1+4b+8* bola u kmeňov BU-149 a BU-150. Podľa autorov Bartoš a Hanušová (1993) a Lutz et al. (1992) nie je odolnosť odrody Viginta podmienená špecifickým génom rezistencie, avšak v našej práci Viginta reagovala zhodne s odrodou testovacieho sortimentu Armada, ktorá má v genóme gén rezistencie *Pm4b* obsiahnutý. Malá diverzita detegovaných špecifických génov rezistencie voči múčnatke trávovej potvrdzuje poznatky, ktoré prezentujú BARTOŠ et al. (2002). Autori zistili, že len veľmi málo génov je zabudovaných v genómoch európskych pšeníc. Najfrekventovanejšie uvádzajú gény *Pm2, Pm4b, pm5, Pm6* a *Pm8*.

Hodnoty AUDPC hrdze pšenicovej varírovali od 5,25 do 329,00. Medzi hodnotami AUDPC boli medzi genotypmi zistené významné rozdiely ($P \leq 0,01$). Štatisticky významne najnižšie hodnoty AUDPC ($P \leq 0,05$) mali kmene BU-142, BU-144, BU-149, BU-150, BU-155, BU-156, BU-157, BU-158, BU-159, BU-160, BU-162, BU-163, BU-166 a odrody Stanislava a Šarlota. Laboratórnou analýzou pomocou izolátov špecifických patotypov *Puccinia triticina* sme zistili, že kmene BU-142, BU-149, BU-150, BU-155, BU-156, BU-157 a BU-162 majú špecifickú rezistenciu voči najmenej piatim rasám *Puccinia triticina*. Reakcie týchto kmeňov na patotypy *Puccinia triticina* boli zhodné s rekciami izogénnych línií odrody Thatcher s génmi rezistencie *Lr9, Lr19*, čiastočne *Lr1, Lr24, Lr29 a LrW*. Kmene BU-117, BU-144, BU-152, BU-153, BU-158, BU-159, BU-160, BU-164, BU-166 a odrody Eva, Ignis a Stanislava mali nekrózu na konci najmladších listov (Leaf tip necrosis – Ltn). Tento znak bol pozorovaný najmä na genotypoch so štatisticky významne najnižšími hodnotami AUDPC (BU-144, BU-158, BU-159, BU-160 a BU-166). Ltn bola pozorovaná v genotypoch s génmi rezistencie *Lr34* a *Lr46* (ROSEWARNE et al. 2006). Fenotypové alebo molekulárne markery týchto génov môžu pomôcť pri identifikácii a lokalizácii génov, ktoré sú príčinou pomalého hrdzavenia pšenice. Ďalšie genotypy s Ltn Ignis, Eva, Stanislava, Bu-117, BU-152, BU-153, BU-161 a BU-164 s identifikovaným znakom Ltn mali tiež štatisticky významne nízke hodnoty AUDPC. Korelačný koeficient hodnôt AUDPC a morfologických pozorovaní Ltn mal hodnotu $r=0,24$ a bol štatisticky významný ($P \leq 0,05$). V kmeňoch BU-158 a BU-160 bol na základe reakcií na patotypy *Puccinia triticina* detegovaný gén *Lr26*, v genotype BU-163 gén *Lr28*. Odroda Viginta má gén rezistencie *Lr3a* a odroda Blava *Lr3ka* (Pathan & Park 2006; Winzeler et al. 2000). Odroda Klaudia mala špecifickú rezistenciu voči všetkým patotypom *Puccinia triticina*, napriek tomu mala najvyššiu hodnotu AUDPC. Možno z toho usudzovať, že špecifická rezistencia tejto odrody bola prekonaná novou virulentnou rasou v poslednom období a bolo by potrebné ju identifikovať.

Záver

V hodnotených registrovaných odrodách a novošľachtených kmeňoch bola analyzovaná špecifická rezistencia voči múčnatke trávovej. Boli detegované špecifické gény rezistencie *Pm1, Pm4b* a *Pm8* samostatne alebo v kombináciách. Pri hodnotení odolnosti genotypov voči hrdzi bol pozorovaný znak nekróza na konci najmladších listov (Leaf tip necrosis – Ltn). Tento znak sa vyskytoval u odrôd Eva, Ignis a Stanislava a kmeňov BU-117, BU-144, BU-152, BU-153, BU-158, BU-159, BU-160, BU-161, BU-164 and BU-166, ktoré mali významne najnižšie hodnoty AUDPC a koreloval s detegovanou nešpecifickou rezistenciou voči hrdzi pšenicovej.

Poďakovanie: Táto práca bola podporovaná finančnými prostriedkami Agentúry na podporu výskumu a vývoja VMSP-P-0056-09.

Literatúra

BARTOŠ, P. - HANUŠOVÁ, R. 1993. Genes for resistance to rusts and powdery mildew in Czech and Slovak wheat cultivars. In: Agriculture, Vol. 39, 1993, pp. 287-291.

EVERTS, K.L. – LEATH, S.:Effect of early season powdery mildew on development, survival, and yield contribution of tillers of winter wheat. In: Phytopathology, Vol. 82, 1992, N. 11, pp. 1273-1278.

HE, R. – CHANG, Z. – YANG, Z. – YUAN, Z. – ZHAN, H. – ZHANG, X. – LIU, J. 2009. Inheritance and mapping of powdery mildew resistance gene *Pm43* introgressed from *Thinopyrum intermedium* into wheat. In: TAG 118, 2009, s. 1173-1180.

KIRÁLY, Z., KLEMENT, Z., SOLYMOSY, F., VÖRÖS, J.: Methods in plant pathology. Budapest, 1970, 509.

LUTZ, J. - LIMPERT, F.J. - BARTOŠ, P. - ZELLER, F.J. 1992. Identification of owdery mildew resistance genes in common wheat (Triticum aestivum L). I. Czechoslovakian cultivars. In: Plant Breeding vol. 108, 1992, N. 1, pp. 33-39.

MCINTOSH, R.A. – DUBCOVSKY, J. – ROGERS, W.J. – MORRIS, C. - APPELS, R. – XIA, X.C. 2009 Catalogue of gene symbols for wheat: 2009 supplement.http://www.shigen.nig.ac.jp/wheat/ komugi/genes/ macgene/supplement2009.pdf

McINTOSH R.A.,WELLINGS C.R.,PARK R.F. Wheat rust. An atlas of resistance genes. Australia: CSIRO. 1995. 200 p.

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.

PATHAN, A.K. - PARK, R.F. 2006. Evaluation of seedling and adult plant resistance to leaf rust in European wheat cultivars. *Leaf rust resistance in European wheat cultivar.* In: Euphytica, Vol. 149, 2006, pp. 327–342.

PERUGINI, L.D. - MURPHY, J.P. - MARSHALL, D. - BROWN-GUEDIRA, G. 2008. *Pm37*, a new broadly effective powdery mildew resistance gene from *Triticum timopheevii*. In: TAG 116, 2008, s. 417-425.

ROSEWARNE, G. - SINGH, R.P. - HUERTA-ESPINO, J. - WILLIAM, H.M. - BOUCHET, S. - CLOUTIER, S. - MCFADDEN, H. - LAGUDAH, E. S. 2006. Leaf tip necrosis, molecular markers and *b*1-proteasome subunits associated with the slow rusting resistance genes Lr46/Yr29. In: TAG, Vol. 112, 2006, pp. 500–508.

SHANER, G. – FINNEY, R.E. 1977. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in Knox wheat. In: Phytophatology, Vol. 67, N. 8, 1977, pp. 1051-1056.

SHTIENBERG, D.: Effects of foliar diseases on gas exchange processes: a comparative study. In: Phytopathology, Vol. 82, 1992, N. 7, pp. 760-765.

ŠVEC, M. - MIKLOVIČOVÁ, M. - BERNÁTHOVÁ, T. - TISOVÁ, V. 1999. Identifying powdery mildew resistance genes in weat varieties registered in the Slovak Republic in 1994 – 1997. In: Agriculture, Vol. 45, 1999, pp. 379 – 387.

WINZELER, M. - MESTERHÁZY, Á. - PARK, R. F. - BARTOŠ, P. - CSÖSZ, M. - GOYEAU, H. - ITTU, M. - JONES, E. - LÖSCHENBERGER, F. - MANNINGER, K. - PASQUINI, M. - RICHTER, K. - RŮBIALES, D. - SCHACHENMAYR, G. - STRZEMBICKA, A. - TROTTET, M. - UNGER, O. - VIDA, G. - WALTHER, U. 2000. Resistance of European winter wheat germplasm to leaf rust. In: Agronomie, Vol. 20, 2000, pp. 783-792.

Adresa autorov:
Ing. K. Bojnanská; Ing. Š. Masár, CSc.; Ing. A. Žofajová, PhD.; Mgr. M. Pastirčák, Phd., CVRV – Výskumný ústav rastlinnej výroby, Oddelenie aplikovanej genetiky, Bratislavská cesta 122, 921 68 Piešťany, e-mail: bojnanska@vurv.sk, masar@vurv.sk; gubis@vurv.sk, zofajova@vurv.sk; pastircak@vurv.sk; Doc. T. Roháčik, PhD., SELEKT Výskumný a šľachtiteľský ústav, a.s., 919 28 Bučany 591, rohacik.t@stonline.sk

PRÍPRAVA MARKER-FREE TRANSGÉNNYCH RASTLÍN REPKY OLEJKY (*BRASSICA NAPUS* L.).
PREPARATION OF MARKER-FREE TRANSGENIC OILSEEDRAPE PLANTS (*BRASSICA NAPUS* L.).

Eva BOSZORÁDOVÁ – Jana MORAVČÍKOVÁ – Martin JOPČÍK – Ildikó MATUŠÍKOVÁ – Jana LIBANTOVÁ

We have tested the efficiency of self-excision Cre recombinase mediated removal of antibiotic marker gene from transgenic oilseed rape plants (Brassica napus L.). In the preparared vector construct, the Cre recombinase gene was under the control of seed-specific cruciferin C promoter from Arabidopsis thaliana. Antibiotic marker gene linked with cre gene were placed between two loxP sites in direct orientation. Gene of interest (beta-glucuronidase gene) was localized out of the lox sites embedded sequence. This system was introduced into B. napus by Agrobacterium-mediated transformation. The premature activation of Cre-mediated excision in T_0 generation of transgenic oilseed rape plants was found. Progeny of transgenic line Heros-14 was subjected to PCR analysis. The complete elimination of antibiotic marker gene was detected in 1 out of 30 assayed plants.
Key words: Agrobacterium tumefaciens, Brassica napus, Cre/lox, marker-free plants

Úvod

Repka olejka (*Brassica napus* L.) patrí medzi hospodársky najvýznamnejšie zdroje oleja využívaného pre potravinárske účely ako aj zdroje krmiva bohatého na proteíny. Repka sa v poslednom desaťročí čoraz častejšie pestuje aj za účelom využitia jej biomasy pre výrobu biopaliva. S ohľadom na tieto skutočnosti je veľmi žiaduce zlepšovať vlastnosti už existujúcich elitných odrôd prípadne pripravovať nové kultivary s vylepšenými vlastnosťami. Nedávne objavy v bunkovej a molekulárnej biológii otvorili nové cesty ako možno dosiahnuť zlepšenie požadovaných vlastností u odrôd rýchlejšie ako klasickým šľachtením. Keďže repka patrí medzi rastliny, ktoré pri transformácii ťažšie integrujú cudziu DNA do svojho genómu, je nevyhnutné použitie selekčných markerových génov, ktoré následne na selekčnom médiu umožnia rast len transformovaných buniek. Na tento účel sa najčastejšie využívajú gény rezistencie voči antibiotikám. Po úspešnej selekcii transgénnych rastlín je však prítomnosť takýchto génov v rastlinných bunkách nepotrebná, ba až nežiaduca aj vzhľadom na legislatívu SR (Zákon č. 151/2002 Z.z. v znení Zákona 77/2005 Z.z.), podľa ktorej nie je možné uvoľňovať do životného prostredia geneticky modifikované rastliny nesúce gény rezistencie voči antibiotikám. Jedným z najčastejšie využívaných spôsobov odstránenia génu rezistencie voči antibiotikám je použitie miesto-špecifických rekombinačných systémov, medzi ktoré patrí aj Cre/lox rekombinačný systém.

Cieľom našej práce je príprava marker-free transgénnych rastlín repky olejky prostredníctvom pletivovo-špecificky riadenej autoexcízie Cre rekombinázy a génu rezistencie voči kanamycínu vo vyvíjajúcich sa semenách F_1 generácie repky po samoopelení.

Materiál a metódy

Semená jarných odrôd repky olejky (*Brassica napus* L.) Topas a Westar sme získali od spoločnosti SW AB, Svalöv, Weibull, Švédsko; odrody Heros a Hunter z firmy SUPEROSEV s.r.o., Piešťany, odrody Campino a Haydn z Norddeutsche Pflanzenzucht, Hans-Georg Lembke KG, Holtsee, Nemecko.

Genetickú transformáciu rastlín repky oleky sme uskutočnili podľa protokolu Moloney et al. (1989) s malými modifikáciami pomocou *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404/pEV2. Rastlinný transformačný vektor pEV2 (Vaculková et al. 2007) obsahoval medzi hranicami T-DNA β-glukuronidázový (*gus*) gén pod kontrolou dvojitého *CaMV 35S* promótora a samovystrihujúcu sa kazetu, v ktorej medzi dvoma *loxP* sekvenciami orientovanými ako priame opakovania sa nachádzali selekčný neomycínfosfotransferázový (*nptII*) gén riadený *nos* promótorom a *cre* rekombinázový gén pod kontrolou semeno-špecifického kruciferínového *cruC* promótora.

-RB – d*CaMV35S*/GUS – *loxP* – *cru*/CRE – *nos*/NPTII – *loxP* – LB-

Transgénny charakter získaných výhonkov sme zisťovali pomocou histochemickej detekcie aktivity *gus* génu podľa Jeffersona et al. (1987). Genómovú DNA z listov rastlín repky sme izolovali podľa metódy Chena et al. (1992). Štandardnú PCR sme robili v termocykleri Primus 25 (MWG-BIOTECH AG) v reakčnej zmesi obsahujúcej 20 ng genómovej DNA, 20 pmol každého primeru, 200 μM dNTP, 1 x RB pufru a 1,25U FIREPOL DNA polymerázy (Solid BioDyne, Estónsko). Na detekciu prítomnosti *gus* génu sme použili sadu primerov P1 5'-GTT CCT GAT TAA CCA CAA ACC-3' a P2 5'-TGC ACA CTG ATA CTC TTC A-3' na amplifikáciu cca 750 bp DNA fragmentu, na potvrdenie prítomnosti *npt*II génu primery P3 5'-GAT GGA TTG CAC GCA GGT TCT-3' a P4 5'-ATG GGT CAC GAC GAG ATC ATC-3' na amplifikáciu približne 550 bp PCR produktu. Na overenie funkčnosti Cre/*lox* rekombinačného systému boli navrhnuté sekvencie primerov P5 5'-ATA TTG CGC GTT GGC GGT AAC AAG-3' a P6 5'-TCC GGC TCG TAT GTT GTG

TGG AAT-3' pre amplifikáciu DNA fragmentu o veľkosti ≈ 550 bp. Profil PCR reakcie bol: prvý krok 95˚C 4 minúty, následne 38 cyklov: 95˚C 45 sekúnd, 61˚C pre *gus* (62˚C *npt*II a 64˚C zostrih) 45 sekúnd, 72˚C 1 minúta a posledný krok 72˚C 10 minút. Výsledný PCR produkt sme detekovali elektroforeticky v 1 % agarózovom géli.

Výsledky a diskusia

Genetickou transformáciou repky olejky pomocou *Agrobacterium tumefaciens* sme získali u každej odrody sadu transgénnych rastlín. Transformačná účinnosť sa u jednotlivých odrôd líšila a bola v rozhraní od 0.6% (odroda Campino) do 4.8% (Hunter). Odrodovo špecifické výsledky transformačnej účinnosti u repky zaznamenali viacerí autori (Damgaard et al. 1996; Khan et al. 2003). Získané transgénne rastliny sme podrobili molekulárno-biochemickým analýzam. U 25 výhonkov, u ktorých sme histochemicky zistili prítomnosť aktívneho *gus* génu, sme prítomnosť tohto génu ako aj *nptII* génu potvrdili pomocou PCR metódy. Pri použití daného systému pri transformácii tabaku sme zaznamenali, že už v T_0 generácii transgénnych rastlín dochádzalo k čiastočnému zostrihu *npt*II génu (Moravčíková et al. 2008). PCR reakciou sme potvrdili, že aj v rastlinách repky dochádza k aktivácii systému a tým k čiastočnému odstránenie *npt*II génu už v parentálnej generácii rastlín. Rastliny boli prenesené do *in vivo* podmienok za účelom získania semenného materiálu po samoopelení. Tridsať rastlín F_1 generácie línie Heros-14 bolo analyzovaných na úspešnosť odstránenia antibiotikového *npt*II génu pomocou PCR, pričom úplný zostrih selekčného markerového (*npt*II) génu ako aj *cre* rekombinázového génu sme potvrdili v prípade 1 rastliny (3.3%).

Záver

Účinnosť transformácie u šiestich použitých odrôd repky olejky sa líšila. Aj u repky sme pozorovali predčasnú aktiváciu Cre/lox rekombinačného systému už v T_0 generácii transgénnych rastlín. PCR analýzami F_1 generácie transgénnej línie Heros-14 sme potvrdili, že z 30-tich analyzovaných rastlín, u jednej rastliny došlo k úplnému odstráneniu *npt*II génu a možno ju vyhodnotiť ako „marker-free“.

Poďakovanie: Táto práca bola financovaná z EEA grantu SAV-FM-EHP-2008-02-01 a projektu VEGA 2/0011/08.

Literatúra

CHEN, Z. - GREENBLATT, I.M. - DELLAPORTA, S.L. 1992. Molecular analysis of *Ac.* transposition and DNA replication. In: Genetics 130, 1992, p. 665–676

DAMGAARD, O. – JENSEN, L.H. – RASMUSSEN, O.S. 1997. Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of Brassica napus winter cultivars. In: Transgenic Res 6, p. 279–288

JEFFERSON, R.A. – KAVANAGH, T.A. – BEVAN, M.W. 1987. GUS fusion: β-glucuronidase as sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. In: EMBO J 6, 1987, p. 3901–3908

KHAN, M.R. – RASHID, H. – ANSAR M. – CHAUDRY, Z. 2003. High frequency shoot regeneration and Agrobacterium-mediated DNA transfer in Canola (Brassica napus). In: Plant Cell Tissue Org Cult, Vol. 75, p. 223–231

MOLONEY, M.M. – WALKER, J.M. – SHARMA, K.K. 1989. High efficiency transformation of Brassica napus using Agrobacterium vectors. In: Plant Cell Rep 8, p. 238–242

MORAVČÍKOVÁ, J. – VACULKOVÁ, E. – BAUER, M. – LIBANTOVÁ, J. 2008. Feasibility of the seed specific cruciferin C promoter in self excision Cre/*lox*P strategy focused on generation of marker-free transgenic plants. In: Theor. Appl. Gen. 117(8), p. 1325–1334

VACULKOVÁ, E. – MORAVČÍKOVÁ, J. – MATUŠÍKOVÁ, I. – BAUER, M. – LIBANTOVÁ J. 2007. A modified low copy number binary vector pUN for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. In: Biologia Plantarum 51(3), p.538–540

Adresa autorov:
Ing. Eva Boszorádová, PhD., Ing. Jana Moravčíková, PhD., Ing. Martin Jopčík, Mgr. Ildikó Matušíková, PhD., Ing. Jana Libantová, CSc., Ústav genetiky a biotechnológií rastlín SAV, Akademická 2, P.O.Box 39A, 950 07 Nitra, e-mail: eva.boszoradova@savba.sk

HODNOTENIE CITLIVOSTI NA VYSOKÚ TEPLOTU NA ÚROVNI FOTOSYNTETICKÉHO APARÁTU SÝRSKYCH NOVOŠĽACHTENCOV JAČMEŇA
ASSESSMENT OF HEAT SUSCEPTIBILITY OF PHOTOSYNTHETIC APPARATUS IN NEWLY-BREEDED SYRIAN LINES OF BARLEY

Marián BRESTIČ – Marek ŽIVČÁK – Katarína OLŠOVSKÁ – Oľga KIŠŠOVÁ – Ayman S. AL-OUDA – Ayham A. AL-HOMSSI

During pot experiments in growth chamber conditions the heat susceptibility and acclimation capacity of newly-breeded Syrian barley lines were tested using measurements of rapid fluorescence kinetics and high temperature test in plants grown at moderate temperature (non-acclimated) and in plants exposed to 42°C for app. 8 hours. We found similar sensitivity of genotypes if measured in non-acclimated plants; however, after high temperature exposure, the differences among genotypes were obvious suggesting differences in acclimation capacity of observed genotypes. High temperature test combined with rapid increase of ambient temperature realized in controlled conditions seems to be useful tool for evaluation of photosynthetic sensitivity and acclimation capacity in screening for heat tolerance.
Key words: heat stress, barley, chlorophyll fluorescence

Úvod

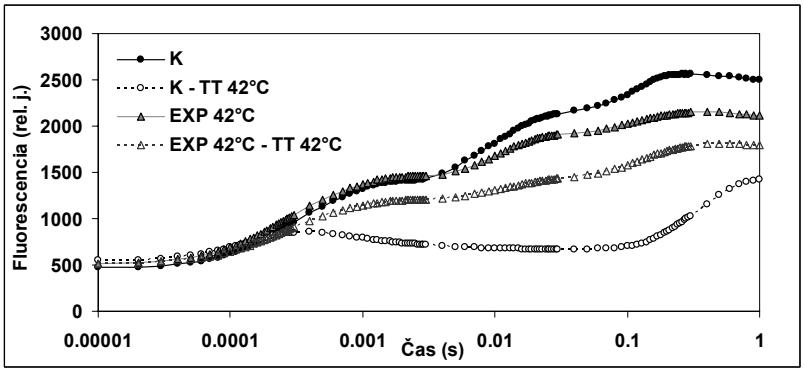
Pri vytváraní nových genotypov existuje dlhodobo snaha zahrnúť do programov aj kontrolu a zvyšovanie termostability a plasticity odrôd, obzvlášť pre podmienky s pravidelným výskytom nadoptimálnych teplôt. V tomto kontexte sme v spolupráci so Sýrskymi šľachtiteľmi realizovali testovanie novošľachtencov pre overenie a dopracovanie metód hodnotenia citlivosti a aklimačnej schopnosti genotypov.

Materiál a metódy

Rastliny 15 novošľachtencov jačmeňa boli pestované v nádobách naplnených štandardným substrátom Klassmann TS-3 v klimatizovanom boxe pri teplotnom režime 23/20°C, fotoperióde 14/10 hodín (deň/noc), relatívnej vlhkosti vzduchu 60 % a intenzite osvetlenia 250 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$, rastliny boli pravidelne zalievané. Na piatom plne vyvinutom liste bolo realizované hodnotenie termostability fotosyntetického aparátu teplotným testom založenom na meraniach rýchlej kinetiky fluorescencie chlorofylu a a ich analýze JIP-testom s výpočtom parametrov podľa Strassera et al. (2000) V prvom slede boli realizované merania na rastlinách aklimovaných na mierne teploty (23°C, kontroly), pričom bola zmeraná fluorescencia chlorofylu pred (K) a po expozícii listových segmentov na 42°C po dobu 30 minút v tme (K-TT 42°C). Následne boli celé rastliny v klimatizovanom boxe exponované teplote vzduchu 42°C po dobu minimálne 8 hodín na svetle (EXP 42°C) a následne bola opäť meraná fluorescencia pred a po teplotnom ošetrení listu pri 42°C po dobu 30 minút v tme (teplotný test, EXP 42°C-TT 42°C).

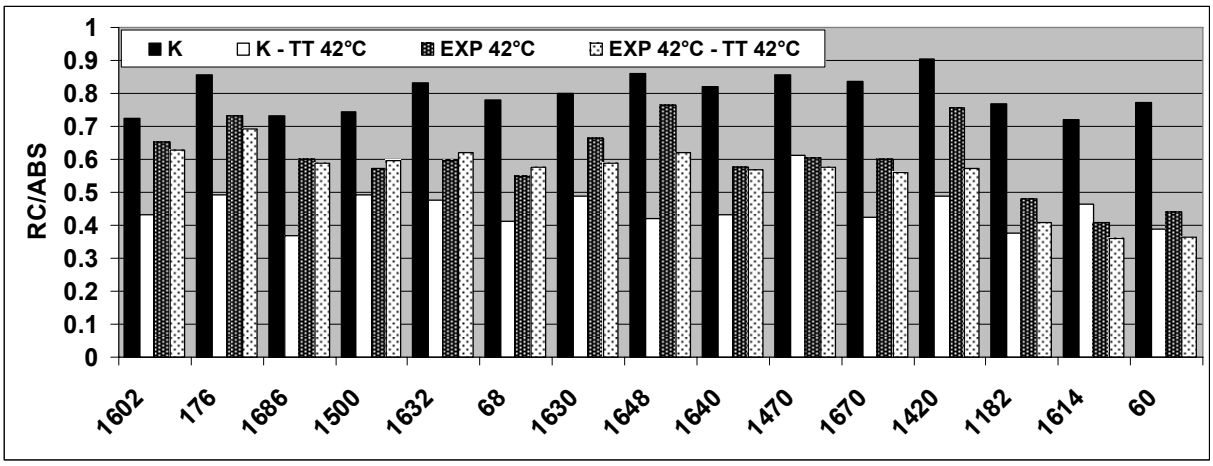
Výsledky a diskusia

- Expozícia listov pri 42°C v tme v rámci teplotného testu spôsobila podstatnú zmenu priebehu fluorescenčných kriviek (obr. 1) poukazujúcu na výraznú inhibíciu primárnych procesov fotosyntézy.



Obr. 1: Priebeh nameraných hodnôt rýchlej kinetiky fluorescencie chlorofylu a zobrazený na logaritmickej časovej ose pre genotyp 1640. Krivka nameraná po aklimácii na vysokú teplotu nezaznamenáva tak výrazný pokles pri teplotnom teste v porovnaní s rastlinami pestovanými pri miernych teplotách.

- Zmena podmienok v klimatizovanom boxe a zvýšenie teploty na 42°C na svetle nepôsobila tak výrazne inhibične, čo sa dá čiastočne vysvetliť nižšou teplotou listu oproti prostrediu vplyvom transpirácie (Bunce 2000), ale predovšetkým spustením aklimačných reakcií ako následok expresie génov spúšťaných vysokou teplotou na svetle (Kotak et al. 2007). Svedčí o tom aj následný teplotný test, kde nie je zreteľná taká miera inhibície ako pri rastlinách neaklimovaných na vysokú teplotu (obr. 1).
- Pri sledovaných genotypoch aklimovaných na mierne teploty (23°C) sme pozorovali približne rovnakú mieru inaktivácie počtu reakčných centier, s výnimkou genotypu 1470, ktorý sa vyznačoval nižšou citlivosťou (obr 2).
- Väčšie rozdiely medzi genotypmi sme zaznamenali pri účinku zvýšenej teploty prostredia a následného teplotného testu, kde genotypy prejavili rôznu mieru aklimácie, pričom sme identifikovali genotypy so značným nárastom termostability na úrovni reakčných centier (viac než polovica genotypov), ale aj genotypy, pri ktorých výsledný počet reakčných centier bol na úrovni neaklimovaných rastlín, teda môžeme u nich konštatovať slabú aklimačnú kapacitu (genotypy 1182, 1614, 60).



Obr. 2**:** Počet plne funkčných reakčných centier prepočítaných na jednotku absorbovaného žiarenia (RC/ABS) vypočítané podľa Strasser et al. (2000) pri jednotlivých hodnotených genotypoch pri rastlinách pestovaných pri 23/20°C pred (K) a po teplotnom teste pri 42°C (K-TT 42°C); po zvýšení teploty prostredia na 42°C po dobu minimálne 8 hodín (EXP 42°C) a po teplotnom teste na týchto rastlinách pri 42°C (EXP 42°C-TT 42°C).

Záver

Využitím teplotného testu založeného na meraní rýchlej kinetiky fluorescencie chlorofylu a v kombinácii so zmenou teplotného režimu využitím presne regulovaného klimatizovaného boxu sme schopní stanoviť termostabilitu a aklimačnú kapacitu rastlinného materiálu na úrovni fotosyntetického aparátu. Väčšina hodnotených novošľachtencov sýrskej proveniencie preukazovala pomerne vysokú aklimačnú kapacitu na vysokú teplotu, čo dáva predpoklad ich využiteľnosti v podmienkach ovplyvňovaných vysokými teplotami.

Poďakovanie: Práca vznikla vďaka prostriedkom z projektu štrukturálnych fondov ministerstva školstva ECOVA, projektu VEGA 1/0803/08 a na základe MVTS medzi SPU v Nitre a ACSAD, Damascus, Syria

Literatúra

BUNCE, J. A. 2000. Responses of stomatal conductance to light, humidity and temperature in winter wheat and barley grown at three concentrations of carbon dioxide in the field. In: Global Change Biology, 2000, 6, s. 371–382.

KOTAK, S. – LARKINDALE, J. – LEE, U. – VON KOSKULL-DÖRING, P. – VIERLING, E. – SCHARF, K. D. 2007. Complexity of the heat stress response in plants. In: Current Opinion in Plant Biology, 2007, 10, 3, s. 310-326.

STRASSER, R. J. – SRIVATSAVA, A, - TSIMILLI-MICHAEL, M. 2000. The fluorescence transient as a tool to characterise and screen photosynthetic samples. In: Probing Photosynthesis. London: Taylor and Francis, 2000, 25, 445-483.

Adresa:
Prof. Ing. M. Brestič, CSc., Doc. Ing. K. Olšovská, PhD., Ing. M. Živčák, PhD., Ing. O. Kiššová, Katedra fyziológie rastlín, SPU Nitra, Tr. A. Hlinku 2., 949 76 Nitra, e-mail: marek.zivcak@uniag.sk; Prof. A. Al-Ouda, Prof. A. Al-Homssi, Arab Centre for the Studies of Arid Zones and Dry Lands (ACSAD), Damascus, Syria

SVINUTKA RÉVY 1 (GLRaV-1) V ČESKÉ REPUBLICE A JEJÍ DETEKCE
THE DETECTION OF GRAPEVINE LEAFROLL-ASSOCIATED VIRUS – 1 (GLRAV-1) IN THE CZECH REPUBLIC

Jana ČECHOVÁ –Věra HOLLEINOVÁ – Jana RADDOVÁ

Grapevine leafroll associated virus 1 (GLRaV-1) is one of the most spread viral pathogen of grapevine in the Czech Republic. Mostly used methods for detection are serological method ELISA or RT-PCR as molecular genetic method. The methodology of RT-PCR-based and ELISA detection of this patogen are described in this work.
Key words: grapevine, viral pathogen GLRaV-1, RT-PCR, ELISA

Úvod

GLRaV-1 je virový patogen rodu *Ampelovirus* patřící mezi komplex devíti dosud známých svinutek na révě (Gugerli 2003). Je rozšířen ve vinařských oblastech po celém světě (Büchen-Osmond 2006). V České republice (ČR) byl zjištěn u 24 % sledovaných rostlin vybraných z ploch udržovacího šlechtění révy (Holleinová 2010). Je přenášen červci (Sforza et al. 2003) a především vegetativním množením révy. Komplex svinutek je považován za nejškodlivější virové onemocnění na révě. Způsobuje opožděné rašení, snížení plodnosti až totální neplodnost, snížení cukernatosti bobulí, jejich horší vybarvení, zpožděné zrání, předčasné zbarvení listů a jejich opad postupující od paty rostliny k vrcholu. Listy modrých odrůd červenají a zůstává zelený lem podél žilek 1. a 2. řádu. Podvinují se okraje listů. Čepel se stává křehkou a později nekrotizuje. U bílých odrůd mezižilní pletivo předčasně žloutne (Bovey et al. 1980). U amerických podnožových odrůd révy se viry svinutky často vyskytují latentně, reakce na infekci jsou málo znatelné (kromě *V. riparia*) a je nezbytné laboratorní testování (Martelli 1993).

V ČR, stejně jako v ostatních zemích Evropské unie, je povinné testování rozmnožovacího materiálu révy na přítomnost virů dle vyhlášky č. 332/2006 Sb. Testy lze provádět na biologických indikátorech a rovněž laboratorními metodami sérologickými a molekulárními. Nejčastěji je využívána imunoenzymatická metoda dvojitého sendviče protilátek DAS-ELISA (Clarc & Adams 1977), vhodná pro velké série vzorků. Molekulární detekční metody jsou považovány za citlivější (Weber et al., 2002) a použitelné pro menší série vzorků a pro přesnější diagnostiku virů.

Cílem práce bylo optimalizovat diagnostickou metodu RT-PCR k detekci GLRaV-1 tak, aby byl omezen výskyt falešně pozitivních výsledků při testování révy.

Materiál a metody

Testování rostlin révy vinné (*Vitis vinifera* L.) na přítomnost GLRaV-1 bylo prováděno ze vzorků réví odebraných na přelomu roku 2009/2010 z vinohradů v Boršicích a Perné, které spadají do slovácké a mikulovské vinařské podoblasti. Vzorky byly testovány sérologickou metodou DAS-ELISA (Clarc & Adams 1977), za použití diagnostik od firmy Bioreba a za dodržení metodických pokynů výrobce diagnostik. Vzorky s negativním výsledkem testu byly retestovány molekulárními metodami.

Dvoukroková RT-PCR

Pro dvoukrokovou RT-PCR byla použita RNA izolovaná z lýka révy vinné komerčním kitem Spectrum™ Plant Total RNA Kit. Následně byla provedena reverzní transkripce pomocí reverzní transkriptázy M-MuLV (Fermentas). Do první reakce bylo přidáno 12 µl DEPC vody; 0,5 µl random primeru – $p(dN)_6$ (Roche) a 2 µl RNA izolátu z testovaného vzorku. Následně byl vzorek denaturován v termocykleru po dobu 5 minut při 95 °C. Po ukončení denaturace byly vzorky ihned zchlazeny na 4 °C. Po vychlazení bylo do každého vzorku přidáno 10 µl směsi obsahující 3,25 µl DEPC vody; 5 µl RT pufru (5x; Fermentas); 1,25 µl dNTP (10 mM; Invitek); 0,5 µl reverzní transkriptázy M-MuLV (200 U/µl; Fermentas). Dále následovala inkubace po dobu 1 hodiny při 42 °C. Takto připravená jednořetězcová cDNA (ss cDNA) byla použita do PCR reakce, ve které byly použity primery k detekci GLRaV-1 dle Gambino a Gribaudo (2006). Složení PCR reakce: 13,6 µl HPLC voda; 2,5 µl pufr (10x; Finnzyme); 0,4 µl dNTP (10 mM; Invitek); 0,5 µl primer F (10 µM) (GLRaV-1 F - TCTTTACCAACCCCGTAGATGAA); 0,5 µl primer R (10 µM) (GLRaV-1 R - GTGTCTGGTGACGTGCTAAACG); 0,5 µl polymeráza (2U/µl; Finnzyme) a 2 µl ss cDNA templátu. Cyklování bylo provedeno v termocykleru T1 (Biometra) za použití teplotního progamu: 94 °C 4 min; 35 cyklů 94 °C 30 s, 56 °C 45 s, 72 °C 1 min; 72 °C 10 min. Elektroforetická separace byla provedena na 1,2% agarózovém gelu s přidaným barvivem GelRed (Biotium) v dávce 5 µl/100 ml gelu.

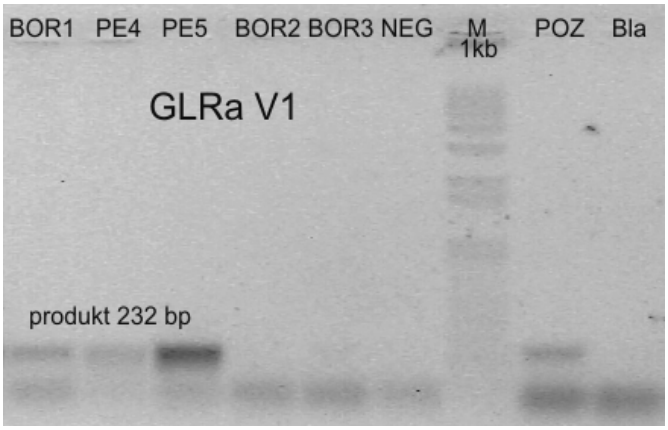
Výsledky a diskuze

Bylo vyzkoušeno několik pracovních postupů RT-PCR. Jednoznačných výsledků testu bylo dosaženo za použití primerové kombinace dle Gambino a Gribaudo (2006) za podmínek popsaných výše, a to na skupině testovaných rostlin révy označených BOR1, PE4, PE5, BOR2, BOR3, NEG (obr. 1). Pozitivní vzorky byly identifikovány viditelným pruhem o velikosti 232 bp, zatímco u vzorků negativních pruh přítomen nebyl. Pro

100% potvrzení přítomnosti virového patogena v testovaných vzorcích, byla provedena sekvenace amplikonů ze vzorků BOR1, PE4 a PE5. Po srovnání získaných nukleotidových sekvencí z těchto vzorků s nukleotidovými sekvencemi v elektronické databázi NCBI se ukázalo, že sekvencované amplikony byly shodné s již popsanými sekvencemi svinutky révy 1 (GLRaV-1), což potvrzuje přítomnost infekce. Následné rutinní testování dalších vzorků potvrdilo vhodnost tohoto protokolu pro identifikaci viru GLRaV-1 v infikovaných pletivech révy.

Závěr

Pro účely testování rostlin révy na přítomnost viru GLRaV-1 metodou RT-PCR bylo vyzkoušeno několik protokolů. Jako nejvhodnější byl vybrán protokol, v kterém bylo použito primerů dle Gambino a Gribaudo (2006) a který je možné doporučit pro rutinní testování GLRaV-1 s jednoznačnou interpretací výsledů detekce. Detekce patogena byla spolehlivější než u metody DAS-ELISA za použití antisér Bioreba.



Obr. 1: Detekce GLRaV-1 pomocí dvoukrokové RT-PCR s použitím primerů dle Gambino a Gribaudo (2006).

Literatura

BOVEY, R., GARTEL, W., HEWITT, W. B. et al., 1980. *Virus and virus-like diseases of grapevines*. Lausanne, Payot. 181 s.

BÜCHEN-OSMOND, C. (Ed), 2006. Index to ICTVdB virus descriptions. In: *ICTVdB - The Universal Virus Database*, version 4. ICTVdB Management, Mailman School of Public Health, Columbia University, New York, NY, USA, 2006 . [on-line]. [cit. 2007-01-09]. Dostupný z WWW jako: *ICTVdB - The Universal Virus Database*, version 4, April 2006. < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/ >.

CLARK, M.F., ADAMS, A.N., 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. J. Gen. Virol., 34, 3, 475-483.

GAMBINO, G. A GRIBAUDO, I., 2006. Simultaneous detection of nine grapevine viruses by multiplex RT-PCR with coamplification of a plant RNA internal control. Phytopathology, 96, 1223–1229.

GUGERLI, P., 2003. Grapevine leafroll and related viruses. In: *Extended abstracts 14th Meeting of the International council for the study of virus and virus-like diseases of the grapevine,* Locorotondo (Bari), Italy, 12-17 September: 25-31.

HOLLEINOVÁ,V., 2010. Testování rozmnožovacího materiálu révy vinné na přítomnost virových patogenů. *Zahradnictví*, IX, 7, 54-56.

MARTELLI, G.P., 1993. *Graft-transmissible diseases of grapevines. Handbook for detection and diagnosis.* [on-line]. [cit. 2006-01-25]. Dostupný z WWW: <http://www.fao.org/docrep/T0675E/T0675E00.htm#Contents>. ISBN 92-5-1 03245-9.

SFORZA, R., BOUDON-PADIEU, E.**,** Greif, C., 2003. New mealybug species vectoring Grapevine leafroll associated viruses-1 and 3 (GLRaV1 and -3). *European Journal of Plant Pathology*, 109, 9, 975 - 981.

WEBER, E., GOLINO, D., ROWHANI, A., 2002. Laboratory testing for grapevine diseases. *Practical winery & Vineyard magazine,* Jan./Feb. [on-line]. [cit. 2007-01-02]. Dostupný z WWW: < http://www.practicalwinery.com/janfeb02p13.htm >.

Kontaktní adresa:
Ing. Jana Čechová, Ing. Věra Holleinová, Ph.D., Mgr. Jana Raddová, Ph.D.
Mendelova univerzita Brno, Zahradnická fakulta, Ústav Mendeleum, Valtická 334, 691 44 Lednice; holleinova@zf.mendelu.cz

VARIABILITA ÚRODY A KVALITY SLNEČNICE ROČNEJ VPLYVOM RÔZNEHO BIOLOGICKÉHO MATERIÁLU
VARIABILITY OF SUNFLOWER YIELD AND QUALITY INFLUENCED OF DIFFERENT BIOLOGICAL MATERIALS

Ivan ČERNÝ – Zuzana BACSOVÁ – Alexandra VEVERKOVÁ

The field polyfactorial experiment was established in Dolná Malanta in 2009. In the experiment were observed five hybrids of sunflower (NK Brio,NK Alexandra, NK Simfoni NK Ferti, NK Alego) From the biological materials was hybrid Brio the most fertile. Hybrids which reached the highest yield parameters were lowest achenes production and oil contents.
Key words: hybrids, biological materials

Úvod

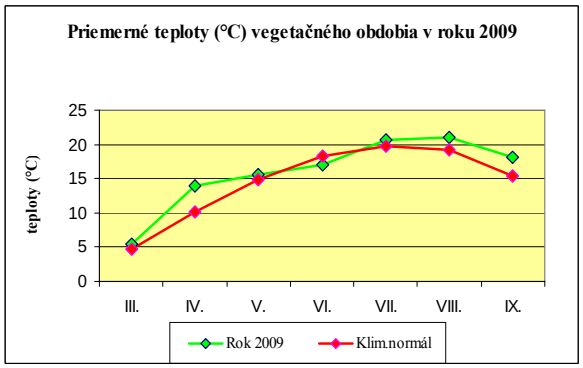
Rod *Helianthus* reprezentuje v rozličných oblastiach našej zemegule asi 260 jednoročných a viacročných druhov, z ktorých najrozšírenejší je druh *Helianthus annuus* L. (Hraška 1989). Úspešnosť pestovania slnečnice ročnej je priamo úmerne závislá od výberu hybridu. Hybrid je jedným z najdôležitejších faktorov pestovania slnečnice ročnej (Ferreras et al. 2000). Podľa Bearda a Genga (1982) hybridy ovplyvňujú nielen úrodu a olejnatosť, ale aj jednotlivé úrodotvorné prvky.

Materiál a metódy

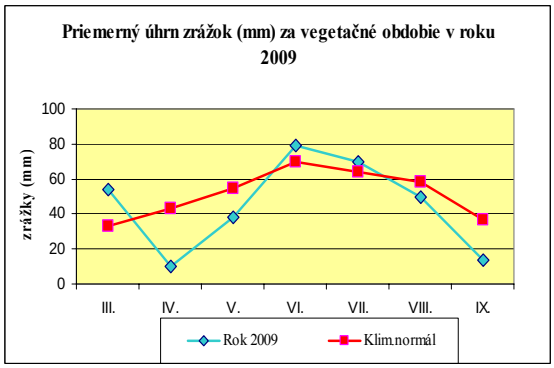
Cieľom experimentu bolo zhodnotiť úrodovú výkonnosť (priemer úboru, hmotnosť úboru, HTN úroda nažiek) a olejnatosť sledovaných hybridov slnečnice ročnej.
Hlavné ukazovatele hodnotenia pokusu:

- úroda nažiek z každého variantu (t.ha^{-1})
- obsah oleja (%) – extrakčná metóda (extrakčný prístroj Soxhled)

Poľný polyfaktorový pokus bol realizovaný v roku 2009 na experimentálnej báze SPU - Dolná Malanta v Nitre. Základné meteorologické údaje (teploty a zrážky) daného pestovateľského roku boli získané z Agrometeorologickej stanice Katedry biometeorológie a hydrológie Fakulty záhradníctva a krajinného inžinierstva SPU v Nitre.



Graf 1



Graf 2

Pokus bol riešený metódou delených dielcov v troch opakovaniach, pričom jednotlivé varianty pokusu boli v náhodnom usporiadaní.

Predsejbová príprava pôdy a spôsob založenia porastu boli uskutočnené v súlade so zásadami konvenčnej technológie pestovania slnečnice ročnej. Základné hnojenie bolo vykonané bilančnou metódou na základe agrochemického rozboru pôdy na predpokladanú výšku úrody 3 t.ha^{-1}.

V pokuse bol použitý vysoko výkonný biologický materiál slnečnice ročnej NK Brio, NK Alexandra, NK Simfoni, NK Ferti, NK Alego.

Výsledky a diskusia

Úrodový potenciál súčasných hybridov je na úrovni 4,8-5,7 t.ha^{-1}. Jeho využitie v našich agroekologických podmienkach je 60-70 %, čo predstavuje úrodu 2,8-4 t.ha^{-1} (Mirrales 1997). Takúto produkciu z hektára možno dosiahnuť iba za veľmi priaznivých agroekologických podmienok. V nami sledovanom experimentálnom roku 2009 bola dosiahnutá priemerná úroda 2,36 t.ha^{-1} a priemerná olejnatosť 40,82 %. V rámci hybridov bola najvyššia úroda dosiahnutá pri hybride NK Brio (2,88 t.ha^{-1}) a naopak najnižšia úroda nažiek bola dosiahnutá hybridom NK Simfoni (1,69 t.ha^{-1}) čo je až 1,19 t rozdiel. Najvyššiu olejnatosť mal taktiež hybrid NK Brio (42,78 %) a o 4,29 % nižšia olejnatosť bola zaznamenaná na hybride

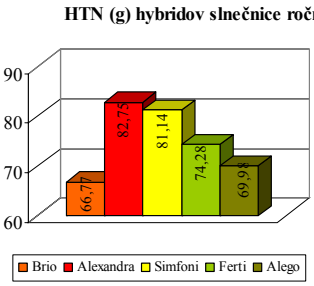
NK Alego. Steera a Seilera (1990) tvrdia, že olejnatosť a zloženie oleja je do značnej miery ovplyvnené genotypom. Potvrdzujú to aj nami dosiahnuté výsledky.

Hybrid	Úroda (t.ha^{-1})	Obsah oleja (%)
Brio	**2,88**	**42,78**
Alexandra	**2,61**	**41,32**
Simfoni	**1,69**	**41,03**
Ferti	**2,03**	**40,48**
Alego	**2,58**	**38,49**

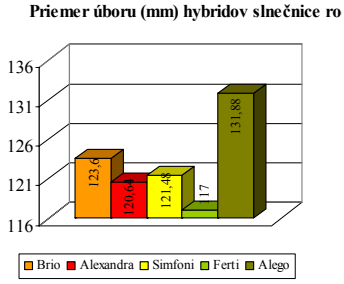
Hmotnosť 1000 nažiek sa môže pohybovať u súčasných hybridov v intervale 30-80 g, optimum 40-60 g (Mirrales 1997). Pri hodnotení HTN (g) boli najlepšie výsledky zaznamenané pri hybride Alexandra (82,7 g), najnižšiu HTN (g) mal hybrid NK Brio (66,77 g) (graf 3). Marinkovic (1992) pokladá za hlavný úrodotvorný komponent HTN. Na druhej strane Egli (1998) za hlavný úrodotvorný prvok pokladá počet nažiek. Tvrdí, že silne závisí od genotypu, environmentálnych a pestovateľských faktorov.

Najvyššiu hmotnosť úboru (g) mal hybrid NK Ferti (144,14 g), najnižšia hmotnosť úboru bola pozorovaná pri hybride NK Brio (128,76 g) (graf5).

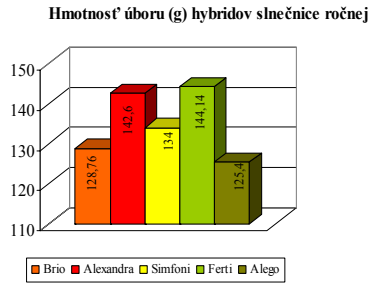
Najvyšší priemer úboru (mm) bol nameraný pri hybride NK Alego (131,88 mm) a najnižší priemer úboru bol nameraný pri hybride NK Ferti (117 mm) (graf 4)



Graf 3



Graf 4



Graf 5

Záver

Z priebežných jednoročných výsledkov poľného pokusu realizovaného v teplej a suchej oblasti vyplývajú nasledovné závery:

- najvyššia hektárová úroda nažiek bola zistená na hybride NK Brio, ktorý mal až o 1,19 t vyššiu úrodu ako najslabší hybrid NK Simfoni,
- najvýraznejší rozdiel v obsahu oleja bol medzi hybridmi NK Brio (42,78%) a hybridom NK Alego (38,49%),
- variabilita v hodnotách jednotlivých úrodotvorných parametrov. Hybridy ktoré dosiahli najvyššie úrodotvorné parametre mali najslabšiu produkciu nažiek a obsah oleja.

Poďakovanie: Príspevok bol vypracovaný za podpory projektu Vega **1/0388/09/8** „Racionalizácia pestovateľského systému slnečnice ročnej (*Helianthus annuus L.*) v podmienkach globálnej zmeny klímy.“

Literatúra

BEARD, B.H. – GENG, S., 1982. Interrelationship of morforogical and economic characrets of sunflower, Crop Science, Vol. 22, pp. 817 – 822.

EGLI, D.B., 1998: Seed biology and the yield of grain crops. In Vega C. R. C., NADRAS, V. O., 2001: Seed Number as Function of growth. A comperative study in Soybean, Sunflower, and Maize, Crop Science, Vol. 41, pp. 748 – 754.

FERRERAS, L. A. – COSTA, J. L. – GARCÍA, F. O. – PECORARI, C., 2000: Effectof no-tillage on some soil physical properties of a structural degraded PetrocalcicPaleudoll of the southern „Pampa“ of Argentina, Soil and Tillage Research, Vol. 54,pp. 31-39.

MARINKOVIC, R., 1992: Path-coefficient analysis of some yield components of sunflower (Helianthus annuus L.). Euphytica, Vol. 60, pp. 201 – 205.

MIRALLES, O.B. – VALERO, J.A.D. – OLALLA, F.M.D., 1997: Gtowth, development, and yield of five sunflower hybrids, European Journal of Agronomy, Vol.6, Iss 1-2, pp. 47 – 59.

STEER, B.T.,- SEILER, G. J., 1990. Changes in fatty acid composition of sunflower seeds in response to time of nitrogen application, supply rates and defoliation. Journal Science Food Agriculture, Vol. 51, pp.11 – 26.

Kontaktná adresa:
doc. Ing. Ivan Černý, PhD; Ing. Zuzana Bacsová; Ing. Alexandra Veverková; Katedra rastlinnej výroby, Slovenská poľnohospodárska univerzita, Tr. Andreja Hlinku 2, 942 76 Nitra, e-mail: ivan.cerny@uniag.sk; zuzana.bacsova@uniag.sk; alexandra.veverkova@uniag.sk

VPLYV ORGANIZÁCIE PORASTU A FOLIÁRNEHO OŠETRENIA ATONIKOM NA ÚRODOVO – KVALITATÍVNE PARAMETRE SLNEČNICE ROČNEJ (*Helianthus annuus* L.)

INFLUENCE OF GROWTH ORGANIZATION AND FOLIAR APPLICATION OF ATONIK ON THE YIELD AND QUALITY PARAMETERS OF SUNFLOWER (*Helianthus annuus* L.)

Ivan ČERNÝ – Alexandra VEVERKOVÁ – Zuzana BACSOVÁ

The aim of experiment was evaluate the influence of the growth organization and foliar application on the quantity and quality parameters of sunflower. In the experiment were used three hybrids of sunflower (NK Brio, NK Armoni, NK Ferti). Influence of hybrids was statistically high significant on the oiliness. The year and preparation influenced selected parameters statistically high significant. Growth organization was statistically high significant influence on the yield of sunlower.
Key words: hybrids, growth organization, Atonik, yield, oiliness

Úvod

Slnečnica má v podmienkach Slovenska krátku pestovateľskú minulosť a preto sú dôležité všetky nové poznatky pre optimalizáciu systému jej pestovanie (Zubal 2003). Jedným z najdôležitejších faktorov ovplyvňujúcich úspešnosť pestovania slnečnice ročnej je správny výber hybridu. V ostatnom čase sa začína uplatňovať prispôsobovanie technológie pestovania jednotlivým typom hybridov (Karaba 2005).

Bežná organizácia porastu slnečnice ročnej je 55-65 tisíc nažiek na hektár. V závlahových podmienkach možno počet jedincov zvýšiť až o 10 % (Pospišil 2007).

Jankowski a Dubis (2008) uvádzajú, že biostimulátory ako biologicky aktívne látky obsahujúce hormóny, enzýmy, proteíny, aminokyseliny, mikroelementy a iné komponenty, ktoré keď sa aplikujú v malých dávkach, aktivujú metabolizmus zameraný hlavne na zlepšenie rastu a vývinu rastlín. Hlavná úloha spočíva v regulácii životných procesov na úrovni bunky, jednotlivých orgánov a organizmu v celku.

Cieľom experimentu bolo zhodnotiť vplyv organizácie porastu a foliárne aplikovaného prípravku Atonik na úrodu a olejnatosť slnečnice ročnej.

Materiál a metódy

Poľný polyfaktorový pokus sme realizovali v PD Nitrianska Blatnica v rokoch 2007–2009.

Pokus sme založili metódou delených blokov v 4 opakovaniach, pričom stupne faktorov boli v náhodných usporiadaniach. Výsledky experimentu boli vyhodnocované v štatistickom programe Statgraphics Plus pomocou viacfaktorovej analýzy rozptylu.

Priemerné teploty a zrážky za jednotlivé ročníky sme získali zo stanice Veľké Ripňany.

Do pokusu sme zaradili tri hybridy slnečnice ročnej: NK Brio (stredne neskorý), NK Armoni (stredne neskorý), NK Ferti (stredne skorý).

Z hľadiska organizácie porastu bol použitý výsev:

- 56 000 nažiek na hektár,
- 65 000 nažiek na hektár.

Úrovne ošetrenia Atonikom:

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

Výsledky a diskusia

Kováčik (2000) a iní autori konštatujú, že poveternostné podmienky ročníka majú podmieňujúco významný vplyv na tvorbe úrody slnečnice ročnej. Uvedený názor potvrdzujú nami dosiahnuté výsledky, v ktorých ročník mal štatisticky vysoko preukazný vplyv na sledované ukazovatele hodnotenia pokusu (Tab. 3).

Odroda ovplyvnila štatisticky nepreukazne úrodu nažiek, ale štatisticky vysoko preukazne ovplyvnila obsah oleja. Jednotlivé hybridy ovplyvnili výšku úrody štatisticky nepreukazne (Tab. 1). Všetky sledované hybridy mali štatisticky vysoko preukazný vplyv na obsah oleja v nažkách (Tab. 2).

Tabuľka 1: Vplyv hybridu na úrodu (Tukey test)

Hybrid	Úroda	1
NK Armoni	3,661667	****
NK Brio	3,691806	****
NK Ferti	3,718333	****

Tabuľka 2: Vplyv hybridu na olejnatosť (Tukey test)

Hybrid	Obsah oleja	1	2	3
NK Ferti	40,23556	****		
NK Armoni	42,22708		****	
NK Brio	43,49139			****

Tabuľka 3: Analýza rozptylu (ANOVA) sledovaných parametrov slnečnice ročnej

Sledovaný parameter	Faktor			
	p-hodnota			
	Rok	Odroda	Organizácia porastu	Preparát
Úroda nažiek	0,0000**	0,3809	0,0000**	0,0000**
Olejnatosť	0,0000**	0,0000**	0,7268	0,0000**

** štatisticky vysoko preukazný vplyv faktora na sledovaný parameter

Organizácia porastu sa prejavila štatisticky vysoko preukazne na úrode nažiek ale vplyv na olejnatosť bol štatisticky nepreukazný (Tab. 3).

V rámci sledovania vplyvu rastového stimulátora Atonik, uvedené výsledky korešpondujú so závermi viacerých autorov (Černý et al. 2001; Černý 2002), ktorí dospeli k záveru, že Atonik je významný intenzifikačný faktor pri pestovaní poľných plodín. Pri aplikácii foliárneho prípravku bol zaznamenaný štatisticky vysoko preukazný vplyv na výšku úrody a obsah oleja slnečnice ročnej.

Záver

- Z hľadiska pôdno-klimatických podmienok sa v experimente počas rokov 2007-2009 prejavil vplyv ročníka štatisticky vysoko preukazne.
- Odroda ovplyvnila štatisticky vysoko preukazne obsah oleja v nažkách.
- Vplyv organizácie porastu sa štatisticky vysoko preukazne prejavil na úrode nažiek.
- Rastový stimulátor Atonik ovplyvnil štatisticky vysoko preukazne oba sledované parametre produkcie slnečnice ročnej.

Poďakovanie: Práca bola financovaná Vedeckou grantovou agentúrou Ministerstva školstva Slovenskej republiky, číslo projektu VEGA 1/0388/09/8 „Racionalizácia pestovateľského systému slnečnice ročnej (*Helianthus annuus L.*) v podmienkach globálnej zmeny klímy.“

Literatúra

ČERNÝ, I. et al. 2002. 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. 2001. Intenzívne pestovanie repy cukrovej vplyvom aplikácie Atoniku a Samppi no. 3. In: *IV. celoslovenská vedecká repárska konferencia*. Nitra: VES SPU, 2001, s. 123-125

JANKOWSKI, K. - DUBIS, B. 2008. Biostimulators for field crops. In *Biostimulators in modern agriculture*. Warsaw: Wieś jutra Sp. Z.o.o., 2008, p.24 ISBN 83-89503-50-6

KARABA, S. 2005. *Racionalizácia pestovania slnečnice ročnej (Helianthus annus L.) v podmienkach Slovenska.* Autoreferát dizertačnej práce Nitra: SPU. 2005, s.7.

KOVÁČIK, A. 2000. *Slunečnice*. Výskumný ústav rostlinné výroby Praha. 1 vydanie, Praha: Agrospoj, 2000, s.108.

POSPIŠIL, R., et al. 2007. *Integrovaná rastlinná výroba*., vydanie 2, Nitra: SPU Nitra,2007, s.127-129.ISBN 978-80-8069-856-0.

ZUBAL, P. 2003. Vplyv súčasného počasia na tvorbu úrod vybraných plodín. In *Agrochémia*, roč. VII. (43), 2003, č. 4, s. 21-24.

Kontaktná adresa:
doc. Ing. Ivan Černý, PhD; Ing. Zuzana Bacsová; Ing. Alexandra Veverková; Katedra rastlinnej výroby, Slovenská poľnohospodárska univerzita, Tr. Andreja Hlinku 2, 942 76 Nitra, e-mail: ivan.cerny@uniag.sk; zuzana.bacsova@uniag.sk; alexandra.veverkova@uniag.sk

FYZIOLOGICKÉ ASPEKTY ÚČINKOV IÓNOV KADMIA A ARZÉNU NA VYBRANÉ ODRODY SÓJE FAZUĽOVEJ
PHYSIOLOGICAL ASPECTS OF REACTION OF CADMIUM IONES ON CHOOSEN VARIETIES OF SOYBEAN

Terézia DOBROVICZKÁ – Beáta PIRŠELOVÁ – Ildikó MATUŠÍKOVÁ

Different plant species show different levels of tolerance to ions of heavy metals. However, this variability is not only between different species, but it is present also between individual genotypes. This work is focused on observation of physiological aspects of cadmium and arsenic impact on chosen varieties of soybean. After 10 days of plant growth in contaminated soil (5 mg.kg^{-1} As^{3+}, 50 mg.kg^{-1}Cd^{2+}) shoots were separated from roots and subsequently their length, weight of fresh biomass, dry mass and size of leaf area were determined. The soybean varieties responded to iones of cadmium and arsenic differently. The roots of both varieties reacted most sensitively to arsenic iones. We observed statistically significant decrease of length (by 20,56 %) and fresh weight (by 47,82 %) in the case of variety Bólyi 44, while in variety Cordoba fresh weight decreased by 40 %. Dry mass contents declined by 34,88 % (cv. Bólyi 44) and by 25 % (cv. Cordoba). Roots of both varieties were also sensitive to ions of cadmium; we detected decrease of fresh weight by 28,26 % (cv. Bólyi 44) and by 40 % (cv. Cordoba), as well as decrease of dry mass by 39,53 % (cv. Cordoba). Concerning shoots, we only observed growth retardation due to metal presence in variety Bólyi 44 (by 17,5 %). Knowledge on metal impact on other physiological, structural and biochemical parameters might contribute to revealing possible mechanisms of soybean tolerance against ions of cadmium and arsenic.
Key words: soybean, cadmium, arsenic

Úvod

Problematika znečisťovania životného prostredia sa začala rozvíjať od počiatkov priemyselnej výroby. Ide najmä o primárne znečisťovanie zložiek životného prostredia (voda, pôda, ovzdušie), ktoré sekundárne vplýva i na biotu a v konečnom dôsledku i na človeka. Za hlavné kontaminanty, ktoré znečisťujú životné prostredie môžeme považovať viaceré chemické látky (oxidy dusíka, oxid uhoľnatý, čiastočky prachu, rádionuklidy, dusičnany, organické zlúčeniny), medzi nimi aj ťažké kovy.

Ťažké kovy predstavujú pre rastliny významný stresový faktor, ktorý vyvoláva početné fyziologické zmeny vedúce k inhibícií rastu a v konečnom dôsledku i zániku rastlín. Toxické kovy sú ľahko prijímané z pôdy koreňmi, práve v nich sa i najviac hromadia, časť je prenášaná do nadzemných orgánov. Najviac však ovplyvňujú fyziologické procesy v listoch, v prvom rade fotosyntézu (Procházka et al. 2003). Cieľom našich experimentov bolo zhodnotiť fyziologické aspekty odpovede vybraných odrôd sóje fazuľovej (*Glycine max* L. (Merill.) cv. Bólyi 44 a cv. Cordoba) na ióny kadmia a arzénu v podmienkach nádobového pokusu.

Materiál a metódy

Z testovaného súboru 19 odrôd sóje fazuľovej sme vyselektovali odrody s relatívne vysokou a nízkou toleranciou k iónom kadmia a arzénu (cv. Cordoba, cv. Bólyi 44). Vysterilizované semená vybraných odrôd sme nechali naklíčiť na Petriho miskách (Ø 12 cm) s dvojitou vrstvou filtračného papiera. Naklíčené semená sme vysadili do plastových črepníkov (Ø 25 cm, objem 1 500 ml) do zmesi rašelinovej zeminy BORA (pH 5 – 7; vlhkosť 65 %) a perlitu (v pomere 4:1), a zaliali sme ich destilovanou vodou, ktorej množstvo zodpovedalo maximálnej sorpčnej kapacite pôdy (~700 ml). Na rastliny v štádiu prvých asimilačných listov (10. deň nádobového pokusu) sme aplikovali roztoky kovov (5 mg.kg^{-1} pôdy As^{3+}, 50 mg.kg^{-1} pôdy Cd^{2+}) vo forme roztokov As_2O_3 a $Cd(NO_3)_2.4H_2O$ resp. destilovanú vodu (kontrola) v objeme 100 ml. Nádobové pokusy sme uskutočnili v rastovej komore (s kontrolovanou klímou) pri teplote 23 °C, vlhkosti vzduchu 60 – 70 %, svetelnej perióde 12 hodín svetlo/12 hodín tma, pri intenzite žiarenia maximálne 800 μmol.m^{-2}.s^{-1}. Po 10 dňoch rastu sme výhonky oddelili od koreňov a stanovili ich dĺžku, čerstvú hmotnosť, hmotnosť sušiny a veľkosť listovej plochy. Údaje sme štatisticky vyhodnotili Studentovým t-testom v programe Microsoft Excel.

Výsledky a diskusia

Pri zvolených dávkach ťažkých kovov (5 mg.kg^{-1} pôdy As^{3+}, 50 mg.kg^{-1} pôdy Cd^{2+}) vykazovali sledované odrody sóje fazuľovej určité rozdiely v tolerancii (Tab. 1). Najcitlivejšie reagovali korene oboch odrôd na ióny arzénu. V prípade odrody Bólyi 44 došlo k štatisticky významnému poklesu dĺžky o 20,56 %, čerstvej hmotnosti o 47,82 % a v prípade odrody Cordoba došlo k poklesu čerstvej hmotnosti o 40 %. Obsah sušiny sa znížil o 34,88 % (cv. Bólyi 44) a o 25 % (cv. Cordoba). Citlivo reagovali korene oboch odrôd aj na ióny kadmia. Zaznamenali sme zníženie čerstvej hmotnosti o 28,26 % (cv. Bólyi 44) a o 40 % (cv. Cordoba), hmotnosti sušiny o 39,53 % (cv. Cordoba). Zvýšená citlivosť rastlín na ióny kadmia a arzénu je pravdepodobne daná ich ukladaním v koreňoch, ako na to poukázal aj Procházka et al. (2003). Vplyv iónov kovov na rast výhonkov sme zaznamenali iba v prípade dĺžky iónmi kadmia u odrody Bólyi 44 (zníženie o

17,5 %). Viacerí autori poukázali na inhibíciu rastu koreňov aj výhonkov vplyvom iónov ťažkých kovov (Cataldo et al.1981; Lozano-Rodríguez et al. 1997; Choudhury 2008; Vázquez et al. 2009), pričom bola popísaná aj variabilita v tolerancii rôznych rastlinných odrôd (Metwally et al. 2005). Inhibíciu rastu koreňov a výhonkov pravdepodobne spôsobuje spomalené bunkové delenie a pomalý rast buniek do dĺžky (Godbold et al. 1985). Veľkosť listovej plochy spodných a vrchných listov nebola ovplyvnená prítomnosťou iónov kadmia a arzénu v pôdnom substráte (Tab. 1).

Tabuľka 1: Vplyv účinkov iónov kadmia a arzénu na fyziologické parametre sóje fazuľovej (*Glycine max* (L.) Merill. cv. Bólyi 44 a cv. Cordoba)

Sledovaný parameter	Kontrola		As 5 mg.kg^{-1} pôdy		Cd 50 mg.kg^{-1} pôdy	
	Bólyi 44	Cordoba	Bólyi 44	Cordoba	Bólyi 44	Cordoba
	korene					
dĺžka (cm)	20,75 ± 4,68	22,32 ± 6,37	21,11 ± 3,75	17,73 ± 3,92 *	18,44 ± 4,39	21,63 ± 4,78
čerstvá hmotnosť (g)	0,46 ± 0,18	0,4 ± 0,14	0,24 ± 0,08 ***	0,20 ± 0,07 ***	0,33 ± 0,24 *	0,24 ± 0,08 ***
sušina (g)	0,043 ± 0,012	0,04 ± 0,011	0,028 ± 0,011 ***	0,03 ± 0,007 **	0,026 ± 0,0076 ***	0,04 ± 0,0076
	výhonky					
dĺžka (cm)	20,55 ± 1,9	29,33 ± 4,94	21,94 ± 2,83	30,94 ± 5,63	21,91 ± 3,47	30,61 ± 4,71
čerstvá hmotnosť (g)	1,2 ± 0,32	1,70 ± 0,39	1,13 ± 0,27	1,53 ± 0,60	0,99 ± 0,34 *	1,69 ± 0,27
sušina (g)	0,13 ± 0,04	0,24 ± 0,06	0,15 ± 0,04	0,24 ± 0,06	0,12 ± 0,05	0,25 ± 0,05
	spodný list					
listová plocha (mm^2)	1349,9 ± 42,5	1293,3 ± 108,5	1347,7 ± 159,2	1384 ± 192,8	1357,3 ± 148,9	1233,8 ± 207,3
	vrchný list					
listová plocha (mm^2)	827,9 ± 81,5	1040,3 ± 128,4	887,6 ± 70,35	1048,6 ± 107,9	886,9 ± 62,5	1024,2 ± 106,5

Hodnoty zodpovedajú aritmetickému priemeru ± smerodajná odchýlka (n > 20). Hladiny významnosti rozdielov: * P<0,05; ** P<0,01; *** P<0,001.

Záver

V našej práci sme zhodnotili účinky kadmia a arzénu na vybrané fyziologické parametre rastlín sóje fazuľovej (*Glycine max* (L.) Merill. cv. Bólyi 44 a cv. Cordoba) v podmienkach nádobového pokusu. Z testovaných fyziologických parametrov boli najviac ovplyvnené iónmi kovov parametre koreňa (dĺžka, čerstvá hmotnosť a sušina), pričom na ióny arzénu citlivejšie reagovali korene odrody Cordoba a na ióny kadmia korene odrody Bólyi 44. Ďalšie hlbšie fyziologické, biochemické a molekulárno-biologické analýzy sú potrebné k odhaleniu možných mechanizmov odolnosti týchto odrôd sóje voči iónom kadmia a arzénu.

Poďakovanie: Práca bola vypracovaná v rámci riešenia projektov *APVV LPP-0125-07*, *COST FA 0605 a UGA - VII/6/2010.*

Literatúra

CATALDO, D. A. – GARLAND, T. R. – WILDUNG, R. E. (1981). Cadmium distribution and Chemical Fate in Soybean Plants. In: Plant Physiology, 68, 835-839.

CHOUDHURY, M. R. Q. – ISLAM, S. T. – ALAM, R. – AHMAD, I. – ZAMAM, W. – SEN, R. – ALAM, M. N. (2008). Effects of arsenic on Red Amaranth (*Amaranthus retroflexus* L.). In: American-Eurasian Journal of Scientific Research, 3 (1), 48-53.

GODBOLD, D. L. – HÜTTERMANN, A., 1985. Effect of zinc, cadmium and mercury on root elongation on *Picea abies* (Karst.) seedlings and the significance of these metals to forest die-back. In: Environmental Pollution, 38, 375-381.

LOZANO-RODRÍGUEZ, E. – HERNÁNDEZ, L. E. – BONAY, P. – CARPENA-RUIZ, R.O. (1997). Distribution of cadmium in shoot and root tissues of maize and pea plants: physiological disturbances. In: Journal of Experimental Botany, 48, 306, 123-128

METWALLY, A. – SAFRONOVA, V. I. – BELIMOV, A. A. – DIETZ, K. J. (2005). Genotypic variation of the response to cadmium toxicity in *Pisum sativum* L. In: Journal of Experimental Botany, 56, 167 – 178

PROCHÁZKA, S. – MACHÁČKOVÁ, I. – KREKULE, J. – ŠEBÁNEK, J. (2003). Fyziologie rostlin. Praha: Academia, 2003. 484 p. ISBN 80-200-0586-2

VÁZQUEZ, S. – GOLDSBROUGH, P. – CARPENA, R.O. (2009). Comparative analysis of the distribution of phytochelatins to cadmium and arsenic tolerance in soybean and white lupin. In: Plant Physiology and Biochemistry, 47, 63-67.

Adresy autorov:

Terézia DOBROVICZKÁ, Beáta PIRŠELOVÁ: Katedra botaniky a genetiky, Fakulta prírodných vied, Univerzita Konštantína Filozofa v Nitre, Nábrežie mládeže 91, 949 74 Nitra, e-mail: terezia.dobroviczka@ukf.sk

Ildikó MATUŠÍKOVÁ: Ústav genetiky a biotechnológií rastlín SAV, Akademická 2, P.O. Box 39A, 950 07 Nitra, e-mail: ildiko.matusikova@savba.sk

RANCIDITY DEVELOPMENT OF SELECTED MILLET SPECIES UNDER DIFFERENT STORING CONDITIONS

Zdislava DVOŘÁKOVÁ – Petra HLÁSNÁ ČEPKOVÁ – Dagmar JANOVSKÁ

Rancidity development was studied in selected millet varieties (Panicum miliaceum L., Setaria italica (L.) P.Beauv. Pennisetum americanum (L.) K.Schum., Echinochloa frumentacea Link, Eleusine coracana Gaertn.). Changes in whole grains during the 12-week storage period were evaluated as titratable acidity. Slightly modified Czech State Norm (CSN) 56 0512-9 was used as a standard method for titration. Significant differences were found among tested millet species. The highest changes appeared in pearl millet (Pennisetum americanum (L.) K.Schum.). The titratable acidity did not change in foxtail millet variety (Setaria italica (L.) P.Beauv. convar. Maxima). Titratable acidity was significantly affected by variety.
Keywords: Millet species, lipid content, free fatty acids, rancidity, storing conditions

Introduction

Millets are some of the oldest cultivated crops (McKevith 2004). Millet refers to a number of different species, all of which are small-grained, annual cereal grasses that are native to many parts of the world. There are two broad categories of the various millet species; these are pearl millet *Pennisetum glaucum* (L.) R.Br. and the small or minor millets (Belton and Taylor 2003); i.e. foxtail millet (*Setaria italica* (L.) P.Beauv.), proso millet (*Panicum miliaceum* L.), finger millet (*Eleusine coracana* Gaertn.) and barnyard millet (*Echinochloa crus-galli* (L.) P.Beauv.). Millets are high energy, nutritious foods recommended especially for infants, lactating mothers, elderly and reconvalescent (Lasztity, 1996).

Millet grains have higher lipid content, high ratio of unsaturated fatty acids and high enzymatic activity which are particularly sensitive to decreasing the quality and lead to rancidity (Galliard 1983). The foods made from them rancid after few days (Lasztity 1996). Storing conditions (especially temperature conditions) are one of the factors affect development of rancidity (Malekian et al. 2000). Rancidity is defined as averse quality factors, arising directly or indirectly from reactions of endogenous lipids, producing undesirable tastes and odour or unacceptable functional properties (Galliard 1983).

The main objective of this experiment was to find out whether or not the level of free fatty acids raises in selected millet grains during storage.

Material and Methods

Fifteen selected samples of millet from the Crop Research Institute (CRI) in Prague and from greenhouses of Institute of Tropics and Subtropics (ITS) of Czech University of Life Sciences Prague (CUA) were obtained. For the experiment were used whole grains which were stored in paper bags in laboratory conditions. Method used for the experiment was based on Czech state norm CSN 56 0512-9 –´Determination of titratable acids´, originally designed for wheat and rye. This method consisted in the simple titration of a flour suspension with phenolphthalein as an indicator of the end point.

For the free fatty acids evaluation, acidity of suspension of samples was determined by a slightly modified titration standard method (CSN 56 0512-9). The experiment conducted in two repetitions for each variety. Due to lower yield and insufficient amount of selected species, for the titration was used 5g of flour. Evaluation of millet storage changes carried out in 12 weeks interval in two repetitions for each sample in 2008/2009.

Results and Discussion

Rancidity of millets was evaluated as titratable acidity caused by increasing free fatty acids. This is commonly used analytical technique for determining rancidity in fats and oils (Gray 1986). Titration method used for the experiment was slightly modified because of suspensions non transparency and discoloured. Modification included using a reference electrode instead of phenolphthalein as an indicator of the end point. The endpoint pH 9.5 was determined on the basis of repeated blank experiments with phenolphthalein as the indicator.

The results are shown in Table 1. They demonstrated that the tropical species incline to rapid development of titratable acidity during storage period. The mean titratable acidity of whole grains during the whole period of storage was approximately 66.3 mg of NaOH/100g of dry matter (at the beginning it was 61.18±20.47 mg of NaOH/100g of dry matter and 71.33±24.30 at the end of the storage period). The lowest mean titratable acidity was in variety *Setaria italica* ´01Z2300002´ (46.80±8.63 mg of NaOH/100 g of dry matter) whilst the highest mean titratable acidity appeared in variety *Pennisetum americanum* (139.98±14.19 mg of NaOH/100 g of dry matter).

Table 1: Mean titratable acidity of millet varieties

Specie	Mean Titr load±SD	Specie	Mean Titr load±SD
P.miliaceum Omskoe 2	59.98±4.47^{bc}	*S. italica* 01Z2300016	61.29±2.89^{bc}
P. miliaceum Irtyskoe 5	62.06±2.54^{bc}	*S. italica* 01Z2300036	51.23±7.10^{ab}
P. miliaceum Lug Shuno 16	63.13±11.47^{bcd}	*Pennisetum americanum*	139.98±14.19^{f}
P. miliaceum Unikum	60.16±2.54^{bc}	*Echinochloa frumentacea*	72.52±10.26^{cde}
P. miliaceum Minerva 10	55.78±7.50^{ab}	*Setaria italica*	54.20±4.18^{ab}
S. italica 01Z2300002	**46.80±8.63^{a}**	*Setaria italica* conv. Maxima	**52.85±2.35**^{ab}
S. italica 01Z2300007	75.87±9.31^{de}	*Eleusine coracana*	80.87±7.50^{e}
S. italica 01Z2300004	57.14±8.33^{ab}		

Different letters in the same row are statistically significant at p less than 0.05.

Generally, differences between two measurements of titratable acidity were higher in *Setaria italica* varieties. The greatest differences between two measurements of titratable acidity were in *Pennisetum americanum* and *Echinochloa frumentacea*. The titratable acidity of *P. americanum*, was at the beginning of the experiment, approximately 127.9 and 152.1 mg of NaOH/100g of dry matter after 12 weeks storage. The titratable acidity of *E. frumentacea* was 63.9 mg of NaOH/100g of dry matter at the beginning of experiment and 81.1 mg of NaOH/100g of dry matter at the end of the experiment. In comparison to the rest, remarkably stable was *Setaria italica* convar. maxima, i.e. 52.85±2.35 in both measurements.

Results of Kaced *et al*. (1984) experiments show that pearl millet can be stored for long periods with deterioration in quality if the kernels are intact. Over the results of these experiments, our results showed significant changes in whole pearl millet grains during the storage period. Also Hansen and Rose (1996) published that ordinary room temperature contributes to development of rancidity, which also showed in some of our millet varieties.

Conclusion

Degradation of oils was caused by increasing acidity due to increasing free fatty acids. The highest mean titratable acidity appeared in *Pennisetum americanum* (L.) K.Schum., thus this species cannot be recommended for storing in room temperatures. Higher differences between measurements of titratable acidity were found by *Setaria italica* varieties. In general, titratable acidity was significantly affected by variety. The experiment showed that the tropical species incline to rapid development of titratable acidity during storage period.

Acknowledgement . This study was supported by grant of NAZV QG60130 ´Minoritní plodiny pro specifické využití v potravinářství´.

References

BELTON, P. S. and TAYLOR, J. R. N. (2003). Sorghum and millets: protein sources for Africa. *Trends in Food Science & Technology*, 15(2): 94-98.

GALLIARD, T. (1983). Rancidity in cereal products. In: Allen, J. C.; Hamilton, R. J. (Eds.), *Rancidity in Foods*. London, Applied Science Publisher: 109-130.

GRAY, J. I. (2007). Measurement of lipid oxidation: A review. *Journal of the American Oil Chemists' Society,* 55(6): 539-546.

HANSEN, L.; ROSE, M. S. (1996). Sensory acceptability is inversely related to development of fat rancidity in bread made from stored flour. *Journal of the American Dietetic Association*, 96(8): 792-793.

KACED, I.; HOSENEY, R. C.; VARRIANO-MARSTON, E. (1984). Factors affecting rancidity in ground pearl millet (*Pennisetum americanum* L. Leeke). *Cereal Chemistry*, 61(2): 187-192.

LASZTITY, R. (1996). Millet proteins.In: Lasztity, R. (Ed.), *The Chemistry of Cereal Proteins*. USA, CRC Press: 295-308.

MALEKIAN, F.; RAO, R M.; PRINYAWIWATKUL, W.; MARSHALL, W. E.; WINDHAUSER, M.; AHMEDNA, M. (2000). Lipase and lipoxygenase functionality and nutrient losses in rice bran during storage. *Bulletin 870*, LSU AgCenter.

MCKEVITH, B. (2004), Nutritional aspects of cereals. *Nutrition bulletin*, 29 (2): 257–268.

Authors:
Zdislava Dvořáková[1], Petra Hlásná Čepková[1], Dagmar Janovská[2]
[1] Department of Crop Sciences and Agroforestry in Tropics and Subtropics, Institute of Tropics and Subtropics, Czech University of Life Sciences Prague, Kamýcká 129, 165 21, Prague 6-Suchdol, Czech Republic
[2] Department of Gene Bank, Crop Research Institute, Drnovská 507, 161 06 Prague 6-Ruzyně, Czech Republic

AGROBACTERIUM- MEDIATED TRANSFORMATION OF MICROSPORES AND MICROSPORE-DERIVED EMBRYOS OF *BRASSICA NAPUS* (L.).

Ewa DUBAS – Jana MORAVČÍKOVÁ – Jana LIBANTOVÁ – Iwona ŻUR – Monika KRZEWSKA

Haploid microspore-derived embryos (MDEs) constitute a unique material for the introduction of new traits into oilseed rape (Brassica napus L.*). MDEs have been transformed with Agrobacterium tumefaciens LBA4404, carrying the binary vector pED1 containind glucuronidase gene under control of auxin promoter. Putative transgenic microspores were subjected to histochemical GUS activity assays. Transformation of oilseed rape MDEs facilitates the obtaining of homozygote for the introduced gene.*
Keywords: Agrobacterium tumefaciens, auxin sensitive promoter, β-glucuronidase gene, microspores, microspore-derived embryos, oilseed rape

Introduction

Production of doubled haploid (DH) crop plants through microspore embryogenesis induction is high of importance in breeding programmes as well as in many areas of basic research. Isolated microspore culture can be used as a convenient system in genetic manipulations (Jähne & Lörz 1995). Transformation of microspores avoids hemizygosis and chimerism, generating embryos and plants with homozygotic expression of the introduced transgene in all cells (Dormann et al. 2001). Moreover fertile homozygous plants within one generation can developed with stable integrated into their genome foreign DNA. Till now, *Agrobacterium*-mediated transformation method was successfully applied on the broad range of plants. However, thick cell wall of the microspores has been considered as the main obstacle for *Agrobacterium* to penetrate the cell (Dormann et al. 2001). *Brassica napus* microspores are haploid cells that can be obtained during isolation procedure in a large quantity. Stress factors can influence the level of endogenous hormones in the treated microspores (Żur et al. 2007) that can cause high androgenic potential and high regeneration capability. Androgenesis could be regulated by differential distribution of the plant hormone auxin. However, the significant role of auxin, in this system still remains not identified. Because of the similarity between developmental pathways of embryogenic microspores and zygotic embryos, microspore culture system can be also used as excellent model in studies on early plant embryogenesis.

The aim of presented research is the auxin gradient localization using reporter *gus* gene in the microspores and microspore-derived embryos (MDEs) of *Brassica napus* at the early developmental stages.

Materials and methods

Plant material

Plants of *Brassica napus* L. cv. Topas line DH 4079 were used for the experiments and they were grown according to Custers (2003). When plants just started to flower, flower buds of 3.2–3.5 mm in length were selected and divided over three bud length classes (3.2–3.3, 3.3–3.4 and 3.4–3.5 mm), and from each class 15–20 buds were used for the isolation of microspores.

Preparation of microspores and transformation procedure

Prior to transformation experiments, microspores were isolated according to Custers (2003) with modifications by Joosen et al. (2007) and cultured in Petri dishes at the density of 40 000 ml in NLN medium with 13% sucrose (NLN-13) medium (Lichter, 1982). Embryogenic cultures were obtained by applying 32±0.2˚C heat stress followed by transfer to 25˚C in darkness. Prior the transformation procedure, microspore suspension cultures were continuously kept in NLN-13 up to 7^{th} or 21^{st} day of culture.

The microspore cultures were transformed using *A. tumefaciens* LBA4404 carrying binary vector DR5::GUS. The construct *DR5::GUS* consists of seven-copy tandem direct repeats of the ARF-binding site from the soybean G3 promoter placed upstream of a minimal cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S promoter and the β-glucuronidase (GUS)-coding sequence (Ulmasov et al. 1997). Standard cloning techniques were used to introduce the expression unit DR5-GUS (kindly provided by Prof. Tom Guilfoyl, Department of Biochemistry, University of Missouri, Columbia) into binary vector pBINPLUS (van Engelen et al. 1995). The NLN-13 medium for co-cultivation was supplemented with 0.01 mol/l D-glucose and 20 µmol/l acetosyringone. After 2 days of co-cultivation (at 27˚C in darkness), the microspores were washed three times using NLN medium supplemented with 500 mg/l cefotaxime and the final culture of microspore suspension in NLN-13 was supplemented with 100 mg/l cefotaxime.

Histochemical GUS assay

To assay GUS activity, samples (microspores and MDEs) were incubated with 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronide (X-Gluc) solution as described by Jefferson (1987). Samples were vacuum infiltrated in the X-Gluc solution for 10 min at room temperature and then incubated at 37°C in the dark for 24 hrs. Next to this, samples were whole mounted on microscope slides in a clearing solution of chloral-hydrate:glycerol:water (8:1:2 [v/v]) as described by Berleth and Jurgens (1993). The samples were covered analyzed under Nikon Eclipse E-600 microscope and digitally recorded.

Results and discussion

GUS assay in microspores as well as in MDEs was conducted 1 month after *Agrobacterium* inoculation. It showed the expression of the introduced gene. We describe a GUS-based auxin biosensor to monitor endogenous auxin during *B. napus* microspore embryogenesis at the earliest stages of MDE formation at cellular resolution. Synthetic auxin response reporter constructs known as *DR5::GUS* is an important tool to localize regions of auxin responsiveness, in which the *GUS* are a reporter gene, and DR5 is a promoter that responds to auxin. So, in microspores as well as in the MDEs transformed with the *DR5::GUS*, construct can follow presence of auxin by visualizing the distribution of GUS.

Acknowledgment. The research was supported by the IPP PAS - IPGB SAS bilateral project (”Molecular analysis of auxin distribution in oilseed androgenic embryos”), VEGA 2/0011/08 and by the EEA Financial Mechanism SAV-EHP-2008-02-01.

Literature

BERLETH T & JÜRGENSG. 1993. Development 118, 575–587.
CUSTERS JBM. 2003. In: Maluszynski M, Kasha KJ, Forster B, Szarejko I, eds. Doubled haploid production in crop plants; a manual. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 185–193.
DORMANN M, WANG HM, OELCK M. 2001. USA Patent US 6,316,694 B1
JEFFERSON R. 1987. Plant Mol. Biol. Reporter 5, 387-405
JÄHNE A & LÖRZ H. 1995. Plant Science 109(1), 1-12.
JOOSEN R, CORDEWENER J, VORST O, et al. 2007. Plant Physiology 144, 155–172.
LICHTER R. 1982. Zeitschrift für Pflanzenphysiologie 105, 427–433.
ULMASOV T, MURFETT J, HAGEN G, GUILFOYLE TJ. 1997. The Plant Cell 9, 1963–1971.
Van ENGELEN FA , MOLTHOFF JW, CONNER AJ et al. 1995. Trans Res 4, 288-90.
ŻUR I, DUBAS E, GOLEMIEC E et al. 2007. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 94 (3), 319-328.

Adresa autorov:
Ewa DUBAS, Iwona ŻUR, Monika KRZEWSKA
Institute of Plant Physiology, Polish Academy of Sciences, Niezapominajek 21, 30-239 Krakow, Poland; dubas@ifr-pan.krakow.pl
Jana MORAVČÍKOVÁ, Jana LIBANTOVÁ
Institute of Plant Genetics and Biotechnology, Slovak Academy of Sciences, Akademicka 2, P.O.B. 39a, 95 007 Nitra 1, Slovak Republic

HODNOTENIE VPLYVU TRANSGÉNNEJ BT-KUKURICE NA PÔDNE BAKTERIÁLNE SPOLOČENSTVÁ
EVALUATION OF EFFECTS OF TRANSGENIC BT-MAIZE ON BACTERIAL COMMUNITIES IN SOIL

Natália FARAGOVÁ[1] – Juraj FARAGÓ[2] – Peter MIHALČÍK[1]

We evaluated the effect of two hybrids of transgenic Bt-maize, tested experimentally in field conditions at the Experimental research station Borovce, on the abundance of active and sporeforming microflora, metabolic diversity and utilization of C-sources by microbial community of rhizosphere and bulk soil. No transgenic material was collected besides the rhizosphere and bulk soil samples around the roots of transgenic and non-transgenic plants. The abundance of active forms of microorganisms differed slightly (by 0.5%) between transgenic and non-transgenic plants, with higher counts for the transgenic hybrids. The total counts of bacterial spores were by 6 to 20% higher in transgenic hybrids, however no significant differences were observed. Contrary, statistically significant differences between samples collected from the rhizosphere and bulk soil of transgenic hybrids and non-transgenic control maize were detected in metabolic diversity and average utilization of C-sources. The highest metabolic diversity of microbial communities was observed in samples taken from the surrounding of non-transgenic control maize, exceeding by 4% that of transgenic Bt-hybrids. An opposite result was obtained for the average utilization of C-sources, where the transgenic hybrids exceeded the non-transgenic control by 10%. However, similar statistically significant differences in metabolic diversity and utilization of C-sources by soil microorganisms were observed between samples collected from the field release site before sowing and from the surrounding free area without plants. Based on the results it can be concluded, that the selected transgenic plants have no negative effect on the soil microorganisms, and the observed differences were in the frame of natural variability expected in conventional agricultural systems.
Key words: average metabolic response, Bt-maize, community metabolic diversity, culturable soil microbiota

Úvod

Široké spektrum využitia a vysoká potenciálna úrodnosť zaraďuje kukuricu siatu medzi rozhodujúce poľnohospodárske plodiny. Jej pestovateľské stanovište sa stále rozširuje, a to i do menej priaznivých oblastí. Optimálne využitie jej produkčného potenciálu sa stáva rozhodujúcim atribútom ekonomiky jej pestovania v praxi. Efektívnosť pestovania kukurice siatej ovplyvňuje celý rad objektívnych i subjektívnych faktorov. Na základe doterajších analýz ekologických podmienok a technologických charakteristík kukurice siatej rozhoduje o výške dosiahnutej úrody technológia pestovania (40 %), správne zvolený hybrid (30 %) a podmienky prostredia (30 %) (Pospíšil 2001).

Zvyšovanie požiadaviek na úrodový potenciál a znižovanie nákladov na chemickú ochranu pred škodcami viedlo k vývoju geneticky modifikovanej kukurice s rezistenciou proti víjačke kukuričnej (*Ostrinia nubilalis*) s vloženým génom z pôdnej baktérie *Bacillus thuringiensis*. Gény *Cry* z *Bacillus thuringiensis* zabezpečujú tvorbu δ-endotoxínov (Bt toxínov) v rastline, v podstate tých istých ako sú v postrekoch. V porovnaní s používanými insekticídmi je tak užitočný hmyz uchránený (Icoz & Stotzky 2008).

Rastliny kukurice s inkorporovaným génom, menej napadnuté víjačkou kukuričnou sú aj menej napadnuté fuzáriami, producentmi nebezpečných mykotoxínov. Insekt rezistentná Bt kukurica s označením MON 810 je jedinou geneticky modifikovanou plodinou, ktorá je pestovaná v Európskej únii vrátane Slovenska (James 2009). Vzájomný vzťah geneticky modifikovaných rastlín s mikrobiálnymi spoločenstvami v rizosfére je jedným z dôležitých aspektov hodnotenia potenciálneho rizika pestovania týchto rastlín (Weinert et al. 2009).

Materiál a metódy

Do experimentov boli zaradené geneticky modifikované hybridy kukurice MON 810 s vneseným Bt-génom proti vijačke kukuričnej, produkujúcimi proteín *Cry*1Ab, ktorý sa prirodzene vyskytuje v pôdnej baktérii *Bacillus thurigiensis* a kontrolné nemodifikované hybridy kukurice. Transgénne (DKC 4627YG, DKC 3946YG) i netransgénne (DKC 3511) hybridy kukurice siatej sa pestujú na pozemkoch Výskumnej stanice Borovce. Okrem rizosférnych vzoriek sa odoberali i vzorky z okolitej pôdy v dvoch termínoch odberu (1. predkultivačný termín – pred výsevom kukurice z pestovateľskej pôdy a voľnej plochy bez porastu; 2. jarný termín v čase nasadenia ôsmych listov – V4). Odber rizosférnych vzoriek bol uskutočnený tak, aby sa zabránilo súčasnému odberu rastlinného materiálu. Vzorky sa spracovávali mikrobiologickými postupmi podľa Ikeda et al. (2006). Po homogenizácii a preosiatí pôdnych vzoriek cez 2 mm sito bola časť vzorky vysušená za účelom stanovenia sušiny a časť pripravená na biochemické a mikrobiologické analýzy. Pôdne vzorky sa homogenizovali v 10 mM fosfátovom roztoku na laboratórnej trepačke pri otáčkach 200 rpm. Po centrifugácii a riedení vzoriek sa supernatant pipetoval na selekčné živné média a do GN (pre gramnegatívne baktérie) a GP (pre grampozitívne baktérie) mikroplatničiek obsahujúcich 95 rozličných zdrojov C (Biolog™, Inc., USA). Po inkubácii v biologickom termostate sa v 24-hodinových intervaloch stanovovala početnosť kolónií, utilizácia jednotlivých zdrojov C a optická hustota v komôrkach pri vlnovej dĺžke 590 nm.

Mikrobiologické analýzy:

a) celkový počet aeróbnych mikroorganizmov tvoriacich kolónie na Thortonovom agare vyjadrením počtu kolónietvoriacich jednotiek (KTJ) v prepočte na 1 g sušiny pôdy

b) množstvo bakteriálnych spór po pasterizácii vzorky v KTJ/ 1 g sušiny

Biochemické analýzy (identifikačné kity Biolog ™, Inc., USA):

a) priemerná respiračná aktivita C-zdrojov mikrobiálnych spoločenstiev (AMR)

b) funkčná hustota mikrobiálnych spoločenstiev (CMD).

Biologické analýzy:

a) celkový fyziologický profil GN a GP baktérií (CLPP) v rizosfére geneticky modifikovaných a nemodifikovaných hybridov kukurice pestovaných v poľných podmienkach v kukuričnej agroekologickej oblasti

b) celkový fyziologický profil GN a GP baktérií (CLPP) v pôde z okolia koreňov geneticky modifikovaných a nemodifikovaných hybridov kukurice pestovaných v poľných podmienkach v kukuričnej agroekologickej oblasti.

Výsledky a diskusia

Variabilita celkového počtu sporulujúcich a nesporulujúcich aeróbnych mikroorganizmov nebola štatisticky významne ovplyvnená hybridom kukurice (transgénna Bt-kukurica, netransgénna konvenčná kukurica) a opakovaním. Štatisticky významné rozdiely ($p < 0,001$) boli pozorované iba pri pôvode pôdnych vzoriek (rizosférna a nerizosférna pôdna vzorka). Početnosť aktívnych foriem mikroorganizmov sa medzi transgénnymi a netransgénnymi hybridmi nepatrne líšila (o 0,5 %) v prospech línií Bt-kukurice. Početnosť bakteriálnych spór bola pri Bt-kukuriciach vyššia od 6 do 20 % v porovnaní s nemodifikovaným hybridom DKC 3511.

Oliveira et al. (2008) počas dvojročného experimentu hodnotili zmeny v pôdnych mikrobiologických charakteristikách pôdy spôsobené pestovaním dvoch línií transgénnej Bt-kukurice a ich izogénnych netransgénnych línií. Rozdiely v kľúčových mikrobiologických parametroch, zahŕňajúcich kultivovateľné aeróbne baktérie, aktinomycéty a mikromycéty, neboli štatisticky potvrdené. Signifikantné rozdiely boli pozorované medzi rizosférnymi a nerizosférnymi pôdnymi vzorkami.

Pri hodnotení metabolickej diverzity mikrobiálnych spoločenstiev (CMD) a priemernej utilizácie C-zdrojov mikrobiálnou komunitou (AMR) v pôdnych vzorkách geneticky modifikovaných a nemodifikovaných rastlín kukurice siatej boli zaznamenané štatisticky významné rozdiely medzi jednotlivými hybridmi (DKC 3511, DKC 4627YG, DKC 3946YG), typom pôdnych vzoriek (rizosférna a okolitá pôda) a použitou mikroplatničkou (GP, GN) Biolog™ systému ($p < 0,01$; $p < 0,001$).

Najvyššou metabolickou diverzitou mikrobiálnych spoločenstiev sa vyznačovali vzorky pochádzajúce z okolia koreňov netransgénneho hybridu DKC 3511, ktoré prevýšili oba transgénne hybridy Bt-kukurice o 4 %. Naopak, priemerná utilizácia C-zdrojov baktérií odvodených zo vzoriek transgénnych hybridov Bt-kukurice DKC 4627YG a DKC 3946YG prevýšila netransgénny hybrid o 10 %. Podobné výledky boli získané z mikrobiologických analýz pôdnych vzoriek geneticky modifikovaných hybridov kukurice na zrno DK440Bt, nemodifikovaných hybridov DK440 a z voľnej plochy bez porastu v rokoch 2006 a 2007 na pozemkoch Výskumnej stanice Borovce, kde sa najvyšším počtom utilizovaných substrátov vyznačovala baktériocenóza izolovaná z rizosféry transgénnej Bt-kukurice (Faragová et al. 2007).

Vo všeobecnosti môžeme konštatovať, že metabolická diverzita mikroorganizmov v rizosfére bola vyššia o 37 % v porovnaní s metabolickou diverzitou pôdnej bioty v okolitej pôde. Priemerná utilizácia C-zdrojov v rizosférnych spoločenstvách prevyšovala o 82 % utilizáciu C nerizosférnymi mikrobiálnymi spoločenstvami.

Preukazne významné rozdiely ($P < 0,001$) boli sledované aj pri funkčnej hustote a respiračnej aktivite gramnegatívnych a grampozitívnych baktérií. Pri všetkých rizosférnych i neriziosférnych vzorkách pochádzajúcich či už z transgénnych alebo netransgénnych rastlín kukurice siatej boli namerané vyššie hodnoty oboch znakov v prospech gramnegatívnych baktérií. Tieto údaje korešpondujú aj s výsledkami získanými pri monitorovaní vplyvov troch typov geneticky modifikovaných rastlín lucerny siatej s vnesenými *Ov*, *AMV*-cp-s, *npt*II a *gus* génmi na pôdne bakteriálne spoločenstvá, kde funkčná hustota gramnegatívnych spoločenstiev prevýšila grampozitívne spoločenstvá o 70 až 92 % (Faragová et al. 2010).

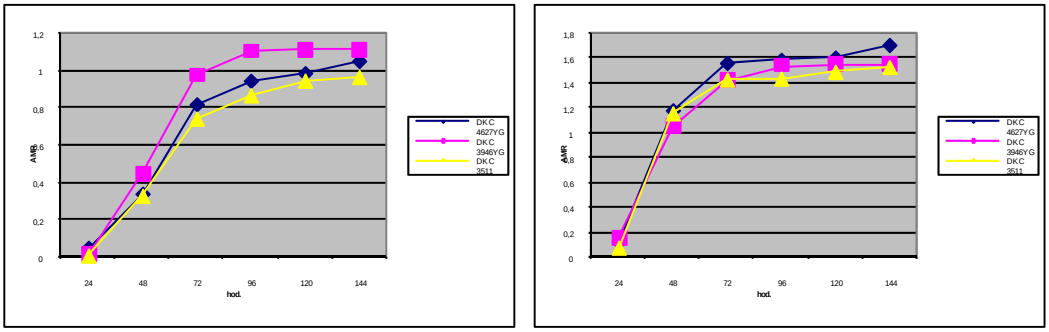
Pestovaním transgénnych rastlín Bt-kukurice sa zvýšila metabolická diverzita mikrobiálnych spoločenstiev o 25 % a priemerná utilizácia C-zdrojov o 83 % v porovnaní s predkultivačným rozborom. Pestovanie geneticky nemodifikovaných hybridov kukurice DKC 3511 zvýšilo metabolickú diverzitu o 31 % a utilizáciu C-zdrojov mikrobiálnou komunitou o 67 % v porovnaní s rozborom pôdy vykonaným pred výsevom rastlín.

Štatisticky významné rozdiely v metabolickej diverzite a priemernej utilizácii zdrojov C v pôdnych vzorkách boli zaznamenané medzi transgénnym hyridom Bt-kukurice DKC 4627YG a netransgénnym hybridom DKC 3511 a taktiež medzi transgénnym hybridom DKC 3946YG a DKC 3511 ($P < 0,001$). Podobné štatisticky významné rozdiely v metabolickej diverzite a utilizácii C-zdrojov ($P < 0,001$) boli zaznamenané aj medzi pôdnymi vzorkami pochádzajúcimi z pozemku pred výsadbou rastlín kukurice a z

blízkej voľnej plochy bez porastu, čo korešponduje s vysokou dynamikou a heterogenitou pôdnej bioty (Dobler et al. 2001). Preto je často veľmi obtiažna determinácia zloženia mikrobiálnych spoločenstiev pôdy a ich odpoveď na porušenie daného ekosystému (Icoz & Stotzky 2008). Kolektív autorov Cortet et al. (2007) porovnávali vzájomný vplyv Bt-kukurice s rôznymi konvenčnými odrodami kukurice na pôdnu mikroflóru. Bol zistený určitý signifikantne negatívny vplyv Bt-kukurice na mikroartropódy v pôdach s vysokým obsahom ílu. Signifikantne vyššie odlišnosti boli však pozorované medzi rôznymi konvenčnými odrodami kukurice. Preto je diskutabilné, či vplyv Bt-kukurice je odrazom Bt-toxínu alebo len odrody. Na základe výsledkov bol sformulovaný záver, že vplyv Bt-kukurice na pôdne mikroorganizmy bol malý a zapadal do rámca variability, ktorá je očakávaná v konvenčných poľnohospodárskych systémoch.

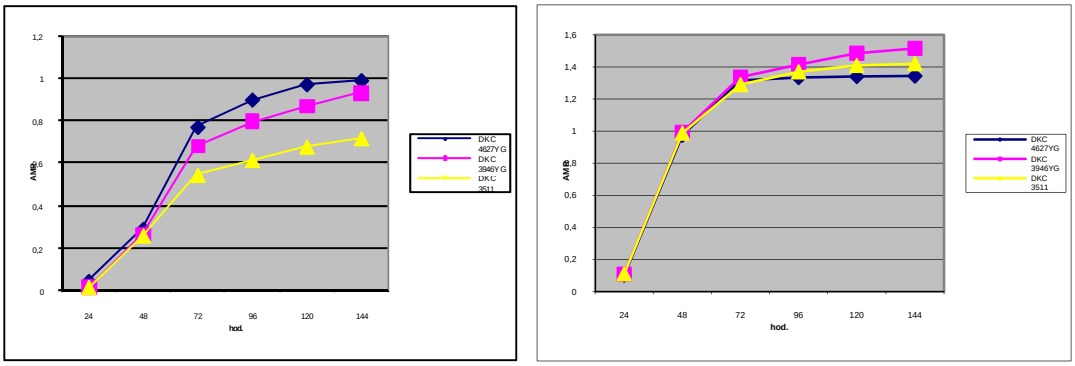
Funkčná hustota mikrobiálnych spoločenstiev a utilizácia C-zdrojov sa zvyšovala priamoúmerne s časom bez ohľadu na typ pôdnej vzorky pri všetkých transgénnych i netransgénnych rastlinách kukurice siatej, čoho výstupom je vypracovanie celkového fyziologického profilu pre gramnegatívne i grampozitívne bakteriálne spoločenstvá.

A B



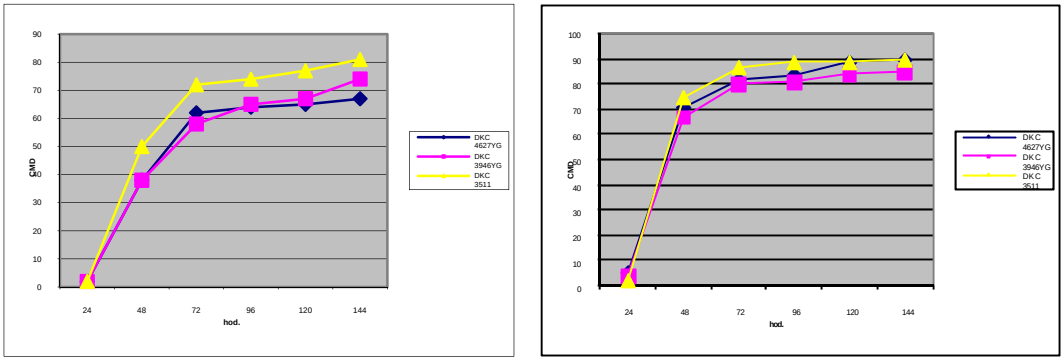
Obr. 1: Celkový fyziologický profil mikrobiálnej komunity porovnávajúci priemernú utilizáciu C-zdrojov (AMR) grampozitívnych (A) a gramnegatívnych (B) pôdnych baktérií v rizosfére transgénnych (DKC 4627YG, DKC 3946YG) a netransgénnych (DKC 3511) hybridov kukurice siatej.

C D



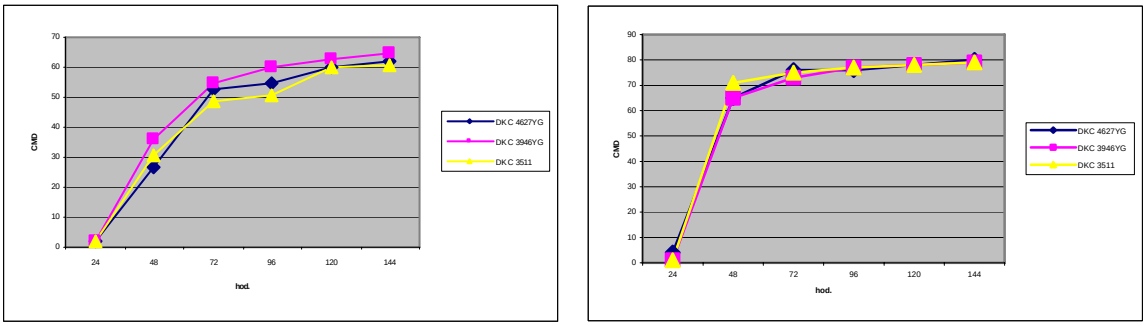
Obr. 2: Celkový fyziologický profil mikrobiálnej komunity porovnávajúci priemernú utilizáciu C-zdrojov (AMR)grampozitívnych (C) a gramnegatívnych (D) pôdnych baktérií z okolia koreňového systému transgénnych (DKC 4627YG, DKC 3946YG) a netransgénnych (DKC 3511) hybridov kukurice siatej.

E F



Obr. 3: Celkový fyziologický profil mikrobiálnej komunity porovnávajúci metabolickú diverzitu (CMD) grampozitívnych (E) a gramnegatívnych (F) pôdnych baktérií z rizosféry transgénnych (DKC 4627YG, DKC 3946YG) a netransgénnych (DKC 3511) hybridov kukurice siatej.

G H



Obr. 4: Celkový fyziologický profil mikrobiálnej komunity porovnávajúci metabolickú diverzitu (CMD) grampozitívnych (G) a gramnegatívnych (H) pôdnych baktérií z okolia koreňového systému transgénnych (DKC 4627YG, DKC 3946YG) a netransgénnych (DKC 3511) hybridov kukurice siatej.

Záver

Štatisticky významné rozdiely v početnostiach aktívnych a neaktívnych sporulujúcich formách mikrobiálnych spoločenstiev medzi transgénnymi Bt-kukuricami a netransgénnymi líniami neboli pozorované. Signifikantné rozdiely v počte kultivovateľných mikroorganizmov boli sledované iba medzi rôznymi typmi vzoriek (rizosférna a okolitá pôda). Najvyššou metabolickou diverzitou mikrobiálnych spoločenstiev sa vyznačovali vzorky pochádzajúce z okolia koreňov netransgénneho hybridu DKC 3511, ktoré prevýšili oba transgénne hybridy Bt-kukurice o 4 %. Naopak, priemerná utilizácia C-zdrojov baktérií odvodených zo vzoriek transgénnych hybridov Bt-kukurice DKC 4627YG a DKC 3946YG prevýšila netransgénny hybrid o 10 %. Štatisticky významné rozdiely v metabolickej diverzite a priemernej utilizácii zdrojov C v pôdnych vzorkách boli zaznamenané medzi transgénnym hyridom Bt-kukurice DKC 4627YG a netransgénnym hybridom DKC 3511 a taktiež medzi transgénnym hybridom DKC 3946YG a DKC 3511, avšak podobné štatisticky významné rozdiely v metabolickej diverzite a utilizácii C-zdrojov boli zaznamenané aj medzi pôdnymi vzorkami pochádzajúcimi z pozemku pred výsadbou rastlín kukurice a z blízkej voľnej plochy bez porastu.

Literatúra

CORTED, J. – GRIFFITHS, B.S. – BOHANEC, M. – DEMSAR, D. – ANDERSEN, M.N. – CAUL, S. – BIRCH, A.N.E. – PERNIN, C. – TABONE, E. – VAUFLEURY, A. – KE, X. – KROGH, P.H. 2007. Evaluation of effects of transgenic Bt maize on microarthropods in a European multi-site experiment. In: *Pedobiologia,* 51, 2007, s. 207-218.

DOBLER, R. – BURRI, P. – GRUIZ, K. – BRANDL, H. – BACHOFEN, R. 2001. Variability in microbial populations in soil highly polluted with heavy metals on the basis of substrate utilization pattern analysis. In: *Journal of Soils & Sediments,* 1, 2001, s. 151-158.

FARAGOVÁ, N. – DOBROTOVÁ, D. – FARAGÓ, J. 2010. Functional diversity of bacterial communities in the rhizosphere of genetically transformed alfalfa. In: *Zb. z 25. kongresu ČSSM „Mikroorganizmy a kvalita*“, Stará Lesná, 2010, s. 116.

FARAGOVÁ, N. – FARAGÓ, J. – BUŠO, R. 2007. Početnosť aeróbnych baktérií a respiračný profil mikroorganizmov v rizosfére transgénnej kukurice. In: *Zb. z odborného seminára „Nové poznatky z genetiky a šľachtenia poľnohospodárskych rastlín*“, VÚRV Piešťany, 2007, s. 119-120.

ICOZ, I. - STOTZKY, G. 2008. Fate and effects of insect-resistant Bt crops in soil ecosystems. In: *Soil Biology & Biochemistry*, 40, 2008, s. 559-586.

IKEDA, S. - YTOW, N. - EZURA, H. - MINAMISAWA, K. - FUJIMURA, T. 2006. Soil microbial community analysis in the environmental risk assessment of transgenic plants. In: *Plant Biotechnology,* 23, 2006, s. 137-151.

OLIVEIRA, A.P. – PAMPULHA, M.E. – BENNETT, J.P. 2008. A two-year field study with transgenic *Bacillus thuringiensis* maize: Effects on soil microorganisms. In: *Science of the Total Environment*, 405, 2008, s. 351-357.

POSPÍŠIL, R. 2001. Agroekobiologická produktivita stanovišťa – základný predpoklad tvorby stabilných úrod kukurice siatej. In : *Farmář*, 7, 2001, s. 36-37.

WEINERT, N. - MEINCKE, R. - GOTTWALD, CH. - HEUER, H. - GOMES, N.C.M. – SCHLOTER, M. - BERG, G. - SMALLA K. 2009. Rhizosphere communities of genetically modified zeaxanthin-accumulating potato plants and their parent cultivar differ less than those of different potato cultivars. In: *Applied And Environmental Microbiology*, 75, 2009, s. 3859-3865.

Kontaktná adresa: [1]Ing. Natália Faragová, CVRV Piešťany, Výskumný ústav rastlinnej výroby Piešťany, Bratislavská cesta 122, 921 68 Piešťany, e-mail: faragova@vurv.sk; [2]Katedra biotechnológií, Fakulta prírodných vied, Univerzita sv. Cyrila a Metóda v Trnave, Námestie J. Herdu 2, Trnava, 917 01, SK

INDUKCIA ADVENTÍVNEJ ORGANOGENÉZY V *IN VITRO* KULTÚRE CHMEĽU OBYČAJNÉHO (*HUMULUS LUPULUS* L.)
INDUCTION OF ADVENTITIOUS ORGANOGENESIS IN *IN VITRO* CULTURE OF HOP (*HUMULUS LUPULUS* L.)

Juraj FARAGÓ[1] – Eva KOLLÁROVÁ[1] – Natália FARAGOVÁ[2]

We evaluated the in vitro organogenic abilities of two types of explants (internode segments vs. leaf-blade segments) of 12 genotypes of hop (Humulus lupulus L.) cultured on two different culture media differing in the sugar content (glucose vs. maltose). Statistically significant differences in in vitro organogenic ability were observed for all the factors, i.e. plant genotype, explant type, and sugar content of media. The highest frequency of adventitios shoot regeneration was observed for internode segments of genotype Zlatan/1/2/T cultured on media containing maltose. In general, media containing maltose and internode explants proved to be the best for induction of adventitious organogenesis in hop genotypes tested.
Key words: adventitious plant regeneration, in vitro organogenesis, hops, explant type, genotype, maltose

Úvod

Chmeľ obyčajný (*Humulus lupulus* L.) je dvojdomá popínavá trváca rastlina z čeľade konopovitých (*Cannabinaceae*). Najvýznamnejšou zložkou chmeľu sú samičie šištice, ktoré obsahujú živice a esenciálne oleje dôležité z pivovarníckeho hľadiska. *Alfa*-horké kyseliny zo živíc sú zdrojom horkosti piva, zatiaľ čo esenciálne oleje poskytujú pivu arómu a chuť (Hornsey 1999). V poslednej dobe sa zistilo, že chmeľ obsahuje aj rôzne iné látky s biologickými účinkami, napr. antioxidačne aktívne látky s protirakovinnými účinkami (Stevens et al. 1997). K týmto biologicky aktívnym látkam chmeľu patria flavonoidy, najmä ich deriváty prenylované flavonoidy (prenylflavonoidy) (Moir 2000; Zanoli & Zavatti 2008).

Biotechnologické metódy sú lákavou alternatívou či doplnkom bežných šľachtiteľských metód podobne ako pri iných plodinách, tak aj pri chmeli obyčajnom. Mnohé aplikácie biotechnologických metód v šľachtení vyžadujú použitie takzvaných *in vitro* techník. Regenerácia rastlín z explantátov neobsahujúcich meristémy je preferovaným *in vitro* regeneračným systémom pri mnohých biotechnologických aplikáciách (Phillips 2004). Výhodou týchto metód je kultivácia rastlinného materiálu v kontrolovaných podmienkach nezávisle od enviromentálnych vplyvov. Napriek tomu prác referujúcich o regenerácii rastlín z nemeristémových explantátov je pomerne málo (napr. Rakouský & Matoušek 1994; Fortes & Pais 2000).

Vhodným spôsobom indukcie regenerácie rastlín pri chmeli sa ukazuje byť indukcia adventívnej organogenézy z nemeristémových explantátov (Rakouský & Matoušek 1994; Horlemann et al. 2003; Batista et al. 2008). Preto sme sa v našej práci snažili vyvinúť vysoko účinný *in vitro* regeneračný systém založený na kultivácii internodálnych a listových explantátov na špecifických regeneračných živných médiách. V práci sme sledovali vplyv druhu explantátu, sacharidu a genotypu na parametre adventívnej organogenéze v *in vitro* kultúre chmeľu.

Materiál a metódy

Rastlinný materiál

Explantáty dvanástich genotypov (K-31/3/7, K-70/4/2, K-71/4/1, K-72/6/13, K-72/6/13M, K-114/24/1, K-114/24/1M, Sířem/15/4, Aromat/4/6T, Lučan/4/3M, Zlatan/1/2T, PRM/3) chmeľu obyčajného (*Humulus lupulus* L.) boli získané z *in vitro* kultivovaných výhonkových kultúr z kolekcie bezvírusových génových zdrojov chmeľu v Centre výskumu rastlinnej výroby, Výskumnom ústave rastlinnej výroby v Piešťanoch (CVRV-VÚRV). Explantáty v *in vitro* kolekcii boli uchovávané na udržiavacom živnom médiu MSW_0A (Faragó et al. 2008) a subkultivované na čerstvé živné médiá v intervaloch 12-18 týždňov. Explantáty boli izolované z výhonkových kultúr udržiavaných na živnom médiu MSW_0A približne 10 týždňov.

Živné médiá

Na kultiváciu explantátov chmeľu boli použité dva druhy živných médií: B2N2G a B2N2M. Obe médiá obsahovali minerálne zložky MS (Murashige & Skoog 1962) a vitamíny podľa Wetmorea a Sorokina (Wetmore & Sorokin 1955). Ďalšími zložkami živných médií boli glycín (2 $mg.l^{-1}$), *myo*-inozitol (100 $mg.l^{-1}$), glukóza (20 $g.l^{-1}$) alebo maltóza (30 $g.l^{-1}$), phytagel (2,5 $g.l^{-1}$), 6-benzylaminopurín (BAP, 2 $mg.l^{-1}$) a kyselinu α-naftyloctová (NAA, 2 $mg.l^{-1}$). Médiá B2N2G a B2N2M sa líšili obsahom sacharidov: médium B2N2G obsahovalo 20 $g.l^{-1}$ glukózy a médium B2N2M 30 $g.l^{-1}$ maltózy. Médiá boli autoklávované 20 minút pri 121 ℃ a tlaku 100 atm a asepticky rozliate po 25 ml do Petriho misiek s priemerom 10 cm.

Pracovný postup

Na povrch živných médií B2N2G a B2N2M boli uložené dva druhy explantátov: stonkové segmenty (StS) dlhé približne 6-8 mm, a segmenty listových čepelí (LS) o veľkosti približne 5x5 mm. Časti listových čepelí boli nasádzané na povrch živného média adaxiálnou (spodnou) stranou v kontakte so živným médiom a časti stoniek vodorovne. Každá Petriho miska (PM) so živným médiom obsahovala 12 explantátov StS a 12 explantátov LS. Petriho misky s explantátmi boli kultivované v kultivačnej miestnosti vo fotoperióde 16 h

svetlo/8 h tma pri teplotách približne 22-23 ℃ (deň) a 19-20 ℃ (noc). Intenzita osvetlenia bola 3500 luxov. Parametre rastu a morfogenézy kultúr boli vyhodnotené po 6 týždňoch kultivácie explantátov.

Výsledky a diskusia.

Vysoká frekvencia *in vitro* regenerácie je predpokladom úspešnej aplikácie techník prenosu génov pri chmeli (Horlemann et al. 2003; Batista et al. 2008). V našom experimente bolo testovaných na *in vitro* organogénnu schopnosť spolu 1728 explantátov (864 stonkových segmentov a 864 listových čepelí) dvanástich genotypov chmeľu obyčajného kultivovaných na dvoch živných médiách, líšiacich sa obsahom sacharidu (glukóza vs. maltóza).

Sumárne výsledky experimentu sú uvedené v tab. 1. Všetky genotypy tvorili okolo rezných rán kalusové pletivo po 1-2 týždňoch kultivácie. Po 2-3 týždňoch pri niektorých explantátoch začali regenerovať krátke výhonky. Najvyššia frekvencia regenerácie adventívnych výhonkov bola pozorovaná pri StS explantátoch genotypu Zlatan/1/2T na médiu B2N2M (52,8%). Frekvencia regenerácie adventívnych výhonkov sa pohybovala od 0% (K-72/6/13, K-114/24/1, K-114/24/1M, B2N2G pri LS a StS, B2N2M pri LS) do 52,8% (Zlatan/1/2T, B2N2M, StS). Na frekvenciu indukcie adventívnych výhonkov mal signifikantný vplyv genotyp (ANOVA, $P<0,01$), typ explantátu ($P<0,001$) a obsah sacharidu v médiu ($P<0,001$).

Okrem regenerácie adventívnych výhonkov sme sledovali aj tvorbu organogénnych nodúl, ktoré môžu byť indikátorom a predstupňom regenerácie adventívnych výhonkov pri chmeli (Fortes & Pais 2000). Najvyššia schopnosť tvorby organogénnych nodúl bola zistená pri genotype Zlatan/1/2T, čo je v súlade s hypotézou vzťahu medzi tvorbou organogénnych nodúl a schopnosťou regenerovať adventívne výhonky.

Najdôležitejšími parametrami z hľadiska použitia explantátovej kultúry chmeľu je okrem frekvencie regenerácie výhonkov aj priemerný počet regenerantov na jeden explantát. Všetky tri sledované faktory (genotyp, druh sacharidu a druh explantátu) silne ovplyvňovali tento parameter (ANOVA, $P<0,001$).

Záver

Zistili sme, že z testovaných 12 genotypov najvyššiu schopnosť *in vitro* regenerácie adventívnych výhonkov dosahoval genotyp Zlatan/1/2T pri použití stonkových segmentov kultivovaných na médiu s obsahom maltózy (médium B2N2M, 52,8 %). V tomto prípade dosahoval najvyššiu hodnotu aj priemerný počet regenerovaných výhonkov na jeden explantát (2,60 výhonkov/explantát) a pri StS explantátoch genotypu Zlatan/1/2/T kultivovaných na médiu B2N2M bola tiž zaznamenaná najvyššia frekvencia tvorby organogénnych nodúl (66,7 %). Indukcia regenerácie rastlín chmeľu v *in vitro* kultúre adventívnou organogenézou bola závislá od druhu explantátu (vyššia regeneračná schopnosť StS explantátov) a druhu sacharidu v živnom médiu (vyššia indukcia regenerácie na médiu obsahujúcom maltózu). Aj pri týchto podmienkach však bola schopnosť explantátov chmeľu v *in vitro* kultúre regenerovať adventívne výhonky genotypovo závislá.

Literatura

BATISTA, D., FONNNSECA, S., SERRAZINA, S., FIGUEIREDO, A., PAIS, S.M.: Efficient and stable transformation of hop (*Humulus lupulus* L.) var. *Eroica* by particle bombardment. Plant Cell Rep., 27, 2008, s. 1185–1196.

FARAGÓ, J., HUDCOVICOVÁ, M., LAJCHOVÁ, Z., VIDOVÁ, B., VOJTEKOVÁ, P., FARAGOVÁ, N.: *In vitro* storage of hop (*Humulus lupulus* L.) germplasm derived from meristem culture. Proc. Int. Sci. Meeting „Use of Genetic Resources of Cultivated Plants.“, Žatec, Czech Republic, 2008, s. 22-25

FORTES, A.M., PAIS, M.S.: Organogenesis from internode-derived nodules of *Humulus lupulus* var. Nugget: histological studies and changes in the starch content. Am. J. Bot., 87, 2000. s. 971–979.

HORLEMANN, C., SCHWEKENDIEK, A., HÖHNLE, M.: Regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation of hop (*Humulus lupulus* L.). Plant Cell Rep, 22, 2003, s. 210-217.

HORNSEY, I.: Hops. In: Hornsey, I. (Ed.): Brewing. The Royal Society of Chemistry, 1999, s. 58-84.

MOIR, M.: Hops – A millenium review. In: J. Am. Soc. Brew. Chem., 58, 2000, s. 131-146.

MURASHIGE, T., SKOOG, F.: A resived medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant, 15, 1962, s. 473-497.

PHILLIPS, G.C.: *In vitro* morphogenesis in plants – recent advances. In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant, 40, 2004, s. 342-345

RAKOUSKÝ, S., MATOUŠEK, J.: Direct organogenesis in hop - a prerequisite for an application of *A. tumefaciens*-mediated transformation. Biologia Plantarum, 36, 1994, s. 191-200.

STEVENS, J.F., IVANCIC M., HSU V.L., DEINZER, M.L.: Prenylflavonoids from *Humulus lupulus*. Phytochemistry, 8, 1997, s. 1575-1585.

WETMORE, R.H., SOROKIN, S.: On the differentiation of xylem. J. Am. Arbor. 36, 1955, s. 305-317

ZANOLI, P., ZAVATTI, M.: Pharmacognostic and pharmacological profile of *Humulus lupulus* L. J. Ethnopharmacol., 116, 2008, s. 383-396.

Tabuľka 1: Porovnanie morfogénnej reakcie dvoch druhov explantátov (stonkových segmentov, StS a segmentov listových čepelí, LS) dvanástich genotypov chmeľu obyčajného (K-31/3/7, K-70/4/2, K-71/4/1, K-72/6/13, K-72/6/13M, K-114/24/1, K-114/24/1M, Sířem/15/4, Aromat/4/6T, Lučan/4/3M, Zlatan/1/2T a PRM/3) na dvoch druhoch indukčných živných médií (B2N2G a B2N2M) líšiacich sa v zložení sacharidu.

Genotyp	Médium	Explt	Počet	%	%	%	%	%	%	%	%	pr.poč.	%
			explt.	K	N	HE	kalog.	*	**	***	reg. v.	výh.	rizog.
K-31/3/7	B2N2G	LS	36	0	0,0	100	77,8	85,7	14,3	0,0	0,00	0	0,0
	B2N2G	StS	36	0	0,0	100,0	100,0	25,0	61,1	13,9	2,78	2,00	5,6
	B2N2M	LS	36	0	0,0	100,0	100,0	83,3	16,7	0,0	0,00	0	16,7
	B2N2M	StS	36	0,0	0,0	100,0	100,0	55,6	44,4	0,0	2,78	3,00	19,4
K-70/4/2	B2N2G	LS	36	0,0	0,0	100,0	97,2	88,6	11,4	0,0	0,00	0	0,0
	B2N2G	StS	36	0,0	0,0	100,0	100,0	36,1	50,0	13,9	2,78	3,00	11,1
	B2N2M	LS	36	0,0	0,0	100,0	97,2	77,1	22,9	0,0	0,00	0	0,0
	B2N2M	StS	36	0,0	0,0	100,0	100,0	52,8	41,7	5,6	11,11	1,75	0,0
K-71/4/1	B2N2G	LS	36	66,7	0,0	33,3	83,3	70,0	30,0	0,0	0,00	0	0,0
	B2N2G	StS	36	66,7	0,0	33,3	100,0	25,0	75,0	0,0	0,00	0	16,7
	B2N2M	LS	36	0,0	0,0	100,0	94,4	97,1	2,9	0,0	2,78	1,00	25,0
	B2N2M	StS	36	0,0	0,0	100,0	100,0	38,9	52,8	8,3	13,89	2,00	0,0
K-72/6/13	B2N2G	LS	36	0,0	0,0	100,0	86,1	93,5	6,5	0,0	0,00	0	0,0
	B2N2G	StS	36	0,0	0,0	100,0	97,2	57,1	37,1	5,7	0,00	0	0,0
	B2N2M	LS	36	0,0	0,0	100,0	100,0	83,3	16,7	0,0	0,00	0	0,0
	B2N2M	StS	36	0,0	0,0	100,0	100,0	58,3	41,7	0,0	13,89	3,00	0,0
K-72/6/13M	B2N2G	LS	36	16,7	0,0	83,3	86,7	92,3	7,7	0,0	0,00	0	0,0
	B2N2G	StS	36	5,6	0,0	94,4	100,0	38,2	55,9	5,9	0,00	0	2,9
	B2N2M	LS	36	0,0	0,0	100,0	97,2	82,9	17,1	0,0	2,78	1,00	27,8
	B2N2M	StS	36	0,0	0,0	100,0	100,0	38,9	50,0	11,1	19,44	2,43	19,4
K-114/24/1	B2N2G	LS	36	66,7	0,0	33,3	75,0	77,8	22,2	0,0	0,00	0	8,3
	B2N2G	StS	36	66,7	0,0	33,3	100,0	16,7	75,0	8,3	0,00	0	16,7
	B2N2M	LS	36	0,0	2,8	97,2	94,3	78,8	21,2	0,0	0,00	0	0,0
	B2N2M	StS	36	0,0	0,0	100,0	100,0	33,3	63,9	2,8	11,11	1,75	2,8
K-114/24/1M	B2N2G	LS	36	0,0	0,0	100,0	94,4	94,1	5,9	0,0	0,00	0	36,1
	B2N2G	StS	36	0,0	0,0	100,0	100,0	19,4	80,6	0,0	0,00	0	25,0
	B2N2M	LS	36	2,8	0,0	97,2	100,0	91,4	8,6	0,0	0,00	0	22,9
	B2N2M	StS	36	0,0	0,0	100,0	100,0	25,0	66,7	8,3	22,22	2,38	2,8
Sířem/15/4	B2N2G	LS	36	0,0	2,8	97,2	94,3	78,8	21,2	0,0	0,00	0	20,0
	B2N2G	StS	36	0,0	0,0	100,0	100,0	47,2	52,8	0,0	2,78	1,00	36,1
	B2N2M	LS	36	2,8	0,0	97,2	97,1	79,4	20,6	0,0	0,00	0	5,7
	B2N2M	StS	36	0,0	0,0	100,0	100,0	19,4	58,3	22,2	25,00	3,56	2,8
Aromat/4/6T	B2N2G	LS	36	0,0	0,0	100,0	97,2	97,1	2,9	0,0	0,00	0	0,0
	B2N2G	StS	36	0,0	0,0	100,0	100,0	16,7	80,6	2,8	2,78	1,00	8,3
	B2N2M	LS	36	5,6	0,0	94,4	100,0	82,4	17,6	0,0	0,00	0	5,9
	B2N2M	StS	36	0,0	0,0	100,0	100,0	16,7	72,2	11,1	13,89	1,80	0,0
Lučan/4/3M	B2N2G	LS	36	0,0	0,0	100,0	88,9	90,6	9,4	0,0	2,78	2,00	11,1
	B2N2G	StS	36	0,0	0,0	100,0	100,0	19,4	75,0	5,6	2,78	1,00	30,6
	B2N2M	LS	36	0,0	2,8	97,2	91,4	68,8	31,3	0,0	8,57	1,33	8,6
	B2N2M	StS	36	0,0	0,0	100,0	100,0	22,2	63,9	13,9	27,78	1,60	0,0
Zlatan/1/2T	B2N2G	LS	36	0,0	0,0	100,0	94,4	94,1	5,9	0,0	2,78	1,00	13,9
	B2N2G	StS	36	0,0	0,0	100,0	100,0	11,1	61,1	27,8	5,56	3,00	22,2
	B2N2M	LS	36	0,0	0,0	100,0	100,0	63,9	36,1	0,0	8,33	1,00	2,8
	B2N2M	StS	36	0,0	0,0	100,0	100,0	0,0	58,3	41,7	52,78	2,89	2,8
Prm/3	B2N2G	LS	36	16,7	0,0	83,3	86,7	96,2	3,8	0,0	0,00	0	0,0
	B2N2G	StS	36	2,8	0,0	97,2	100,0	14,3	77,1	8,6	0,00	0	28,6
	B2N2M	LS	36	0,0	0,0	100,0	97,2	68,6	31,4	0,0	5,56	1,50	5,6
	B2N2M	StS	36	0,0	0,0	100,0	100,0	25,0	66,7	8,3	5,56	3,00	8,3

Legenda k tab 4: B2N2G = médium MSWS s prídavkom 2 mg.l-1 BAP a 2 mg.l-1 NAA s prídavkom sacharidu glukóza (20 $g.l^{-1}$); B2N2M = médium MSWS s prídavkom 2 mg.l-1 BAP a 2 mg.l-1 NAA s prídavkom sacharidu maltóza (30 $g.l^{-1}$); LS = segmenty listových čepelí, StS = stonkové segmenty; Počet explt. = počet kultivovaných explantátov; % K = frekvencia kontaminovaných explantátov; % N = frekvencia nekrotizovaných explantátov; % HE = percentuálny podiel explantátov hodnotených na morfogenetické reakcie, t.j. nekontaminovaných a nenekrotizovaných explantátov; % kalog. = frekvencia kalus tvoriacich explantátov; % *, % **, % *** = vizuálne hodnotená intenzita kalogenézy * = slabá, ** = priemerná, *** = intenzívna; % reg. v. = frekvencia regenerujúcich výhonkov; Pr. Poč. výh. = priemerný počet výhonkov na regenerujúci explantát; % rizog. = frekvencia korene tvoriacich explantátov

Adresa autorov:
[1]Katedra biotechnológií, Fakulta prírodných vied, Univerzita sv. Cyrila a Metóda v Trnave, Námestie J. Herdu 2, Trnava, 917 01, SK; [2]CVRV – VÚRV, Sekcia Biológia rastlín, Bratislavská cesta 122, 921 68 Piešťany; Kontaktná adresa: RNDr. Juraj Faragó, CSc., e-mail: juraj.farago@ucm.sk

KLONOVÉ ŠĽACHTENIE MÄTY PIEPORNEJ - *MENTHA X PIPERITA* L.
CLONAL BREEDING OF MENTHA - *MENTHA X PIPERITA* L.

Jozef FEJÉR – Ivan ŠALAMON – Daniela GRUĽOVÁ

Research and breeding of medicinal and spice plants are carried out at experimental fields at the Prešov University in Prešov, Slovakia. The plant material with a high content of menthol, as a component of essential oil was obtained during our selection of peppermint clones. The new cultivar is accumulated in plant herbal tops from 67 to 70% menthol. Plant leaves are contained from 80 to 85 % of this active component, as a secondary metabolite. Menthol content is significantly higher than showed available resources of scientific literature. The comparison of morphological characteristics have been presented differences in order to the variety Perpeta, which is registered in Slovakia.. The valuable commercial properties (high menthol content, distinctness, uniformity and stability) are a supposition for registration of this material as a new variety.
Key words: clonal breeding, selection, Mentha x piperita, secondary metabolities, menthol,

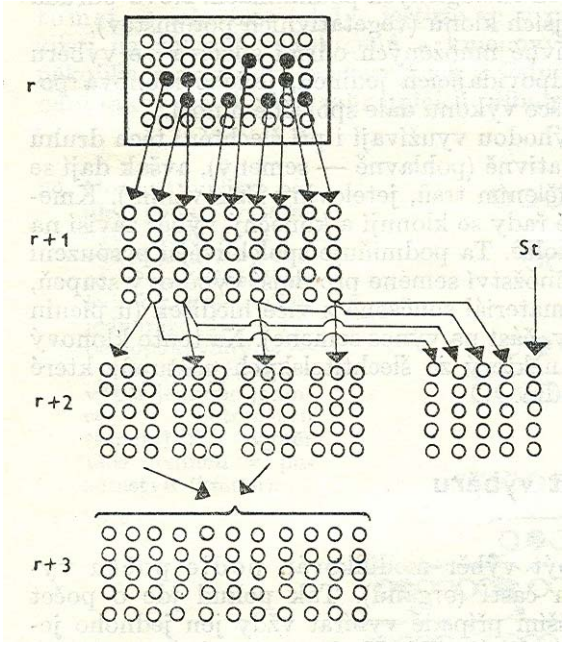
Úvod

Na Slovensku má spotreba a dopyt po liečivých rastlinách vzrastajúcu tendenciu. V praxi to znamená, že je nevyhnutné zamýšľať sa nad významom, dôležitosťou a použitím týchto rastlín, ako aj o zabezpečení dostatočného množstva žiadaných druhov v potrebnej kvalite. Rod *Mentha* L. patrí medzi najvýznamnejšie rody čeľade *Lamiaceae.* Mäta pieporná (*Mentha* × *piperita* L.) je jedna z najviac využívaných a pestovaných druhov tohto rodu, najmä pre produkciu silice. Má široké uplatnenie ako zložka čajových zmesí, podstatne širšie využitie však našla v kozmetike, vo farmaceutickom a najmä v potravinárskom priemysle. Silica z tejto rastliny patrí medzi najpopulárnejšie a najviac používané pre jej hlavné zložky mentol a menton. Mäta je trváci bylinný druh u ktorého sa predpokladá, že vznikol krížením druhov mäta vodná *Mentha aquatica* L. a mäta klasnatá *Mentha spicata* L.

Pre získanie drogy vysokej kvality má vplyv celý rad pôdno-klimatických a agrotechnických faktorov. Kľúčovým prvkom v technológii pestovania je vhodná odroda s vysokým produkčným potenciálom žiadaných sekundárnych metabolitov.

Materiál a metódy

Mentha × *piperita* L. je hybrid, u ktorého sa uvádza počet chromozómov 2n = 66 alebo 2n = 72 (Gobert et al., 2002). Východiskový materiál (PO-MENTH_PIP-1) pre šľachtiteľskú prácu bol získaný z Výskumného ústavu agropriemyselnej výroby vo Veľkej Bakte, Zakarpatie, na Ukrajine. Tento druh nevytvára generatívne orgány. Množenie sa realizuje vegetatívne. S ohľadom na túto skutočnosť sa pristúpilo k šľachteniu metódou klonového výberu podľa schémy na obr. 1, ktorá zobrazuje sled selekčných škôlok. Hlavným cieľom šľachtiteľskej práce bolo vytvorenie odrody so schopnosťou produkovať vysoký obsah žiadaných sekundárnych metabolitov. Hlavná pozornosť sa venovala dominantnej obsahovej zložke v silici mäty mentolu. Genotyp z Ukrajiny bol introdukovaný do pestovania na Školskom pozemku Prešovskej univerzity v Prešove, kde boli založené základné výberové škôlky (r = rok 2007, obr. 1). V ďalších rokoch (r+1 až r+3, obr. 1) sa uskutočňovalo množenie pomocou koreňových výbežkov. Selektovaly sa klony, t.j. vegetatívne potomstvá vybraných jedincov s vysokým obsahom mentolu v silici. Súčasne s tým sa hodnotil zdravorný stav klonov a morfologické znaky podľa testovacej príručky UPOV TG 229/1. Hodnotenia sa porovnávali na odrodu Perpeta, ktorá je registrovaná ako jediná v Slovenskej republike.



Obr. 1: Schéma klonový výber (Rod et al. 1982)

Výsledky a diskusia

Väčšina pestovaných odrôd rastlín bolo vytvorených konvenčnými selekčnými metódami. Bernáth (2002) uvádza pri čeľadi *Lamiaceae* použitie individuálneho výberu klonov a línní ako veľmi časté. Selekciou klonov bola vyšľachtená odroda s vysokým obsahom carvonu z druhu *Mentha spicata.* V šľachtiteľskej práci je pri liečivých rastlinách veľmi často využívané medzidruhové kríženie, resp. využitie prirodzených

hybridov vzniknutých spontánnym prekrížením. Jedným z príkladov, pri ktorom sa predpokladá vznik spontánnym medzidruhovým krížením, je *Mentha* × *piperita* L. Hlavnými obsahovými látkami silice tohto druhu sú mentol a menton. V literatúre sa uvádza rôzny obsah mentolu a mentonu v silici. Sústriková a Šalamon (2004) zistili analýzou vzoriek mäty piepornej z piatich rôznych lokalít z východnej časti Slovenska obsah mentolu 38,4 % - 49,6 %. Menton varíroval v rozpätí od 0,4 % do 30,1 %. Gardiner (2000) uvádza obsah mentolu 29 % a mentonu 20 – 30 %. V listoch mäty piepornej pôvodom z Maroka bol stanovený obsah mentolu 5,58 % a mentonu 29,01 % (Derwich et al. 2010). Z údajov vyplýva, že obsahové látky silice značne kolíšu v závislosti od pôvodu. Parametre kvality nového šľachtenia mäty piepornej sú uvedené v tab. 1.

Tabuľka 1: Obsahové látky mäty piepornej v % (lokalita Školský pozemok PU v Prešove, rok 2010

Zloženie	Mäta pieporná (*Mentha xpiperita*L.)	
	Vňať	Listy
Éterický olej	1,5 ± 0,1	0,8 ± 0,1
Limonem	2 - 3	2 - 3
Cineol	stopy	stopy
Menton	17 - 19	3 - 4
Mentofuran	*	*
Isomenton	2 - 3	1 - 2
Metylacetat	1 - 2	2 - 3
Mentol	67 - 70	80 - 85
Pulegon	do 0,5	do 0,5
Piperitol	*	*
Carvon	do 0,5	do 0,5

Metóda stanovenia: plynová chromatografia GC/FID

Ako bolo vyššie popísané, šľachtenie je zamerané na tvorbu odrody s vysokým obsahom mentolu v silici. Vňať novošľachtenca mäty piepornej obsahuje 67–70 % mentolu. Obsah v listoch je 80–85 %. Toto množstvo je výrazne vyššie, ako sú uvádzané údaje v literárnych prameňoch. Okrem uspokojivej hospodárskej hodnoty (v našom prípade vysoký obsah žiadaného sekundárneho metabolitu) je podmienkou registrácie odlišnosť, vyrovnanosť a stálosť odrody. Homogenita a stálosť morfologických znakov boli ustálené v priebehu selekcie klonov. Posudzovanie sa uskutočnilo podľa testovacej príručky UPOV TG 229/1. Hodnotením jednotlivých deskriptorov a stupňov prejavu jednotlivých znakov sa porovnávala aj odlišnosť novej odrody s registrovanou odrodou Perpeta. Znaky, v ktorých sa nový kultivar odlišuje od registrovaného sú uvedené v tab. 2.

Tabuľka 2: Odlišnosť novej odrody od registrovanej

Č.	Znak	PO-MENTH_PIP-1	Perpeta
4.	STONKA – antokyánové sfarbenie	Silné - 7	Slabé – 3
10. (*)	LIST – intenzita zelenej farby	Stredná - 5	Tmavá – 7
13 (+)	LIST – hĺbka zárezov okraja listu	Stredné - 5	Plytké – 3
19. (*)	SÚKVETIE - dĺžka	Dlhé - 7	Krátke - 3

Záver

Individuálnou selekciou klonov druhu mäta pieporná *Mentha* × *piperita* L., ktorý je považovaný za hybrid vzniknutý spontánnym krížením druhov mäta vodná (*Mentha aquatica* L.) a mäta klasnatá (*Mentha spicata* L.) bol získaný klon, ktorý je odlišný od odrody Perpeta registrovanej v Slovenskej republike. Hospodársky cennou vlastnosťou tohto materiálu je vysoký obsah mentolu v silici. Jeho obsah sa pohybuje od 67 % do 70 % vo vňati a 80 % až 85 % v listoch. Získaný klon bude ďalej testovaný a následne prihlásený do registračného konania.

Poďakovanie. Príspevok bol vypracovaný v rámci riešenia projektu ITMS 2622020013 s názvom „Využitie výskumu a vývoja na vyšľachtenie nových kultivarov (prototypov) liečivých rastlín a ich odrodová registrácia“ financovaného prostredníctvom Agentúry MŠ SR pre štrukturálne fondy EÚ v trvaní od 10/2009 do 03/2112, v rámci opatrenia 2.2 Prenos poznatkov a technológií získaným výskumom a vývojom do praxe.

Literatúra

BERNÁTH, J.,: Strategies and Recent Achievements in Selection of Medicinal and Aromatic Plants. In: Acta Hort., 576, 2002, ISBN 90 6605 8757, p. 115 – 128.

DERWICH, E. - BENZIANE, Z. - TAOUIL, R. - SENHAJI, O. AND TOUZANI, M.,: Aromatic Plants of Morocco: GC/MS Analysis of the Essential Oils of Leaves of *Mentha piperita.* In: Advances in Environmental Biology, 2010, 4(1), p. 80-85.

GARDINER, P.,: Mentha (*Mentha* × *piperita*). 2000, dostupné na: http://www.mcp.edu/herbal/

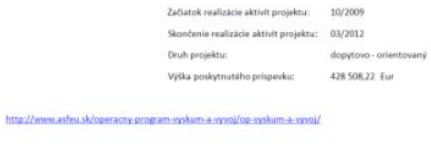
GOBERT, V.; MOJA, S.; COLSON, M. and TABERLET, P.,: Hybridisation in the Section *Mentha* (*Lamiaceae*) Inferred from AFLP Markers. In. American Journal of Botany, 2002, 89(12), p. 2017 – 2023.

CHLOUPEk, O.,: Genetická diverzita, šlechtení a semenářství. Academia Praha, 2000, s. 143 - 144.

MIKA, K,: Fytoterapia pre lekárov. Vydavateľastvo Osveta, 1991, ISBN 80-217-0349-0, s. 160 – 161.

ROD, J. A kol.,: Šlechtění rostlin. Státní zemnědelské nakladatelství Praha, 1982, s. 62 – 68.

SÚSTRIKOVÁ, A. – ŠALAMON, I.,: Esential oil of pepermint (*Mentha* × *piperita* L.) from fields in Eastern Slovakia. In: HORT. SCI. (PRAGUE), 2004, 31(1), p. 31 – 36.



Prílohy

Obr. 1 škôlka mäty

Obr. 2 súkvetie, vľavo novošľachtenec, vpravo Perpeta

Obr. 3 okraj listovej čepele – novošľachtenie

Obr. 4 okraj listovej čepele – Perpeta

Adresy autorov:
Jozef Fejér[1], Ivan Šalamon[2], Daniela Gruľová[1]
[1]Katedra ekológie, Fakulta humanitných a prírodných vied, Prešovská univerzita v Prešove, 17. Novembra 1, 081 16 Prešov, Slovenská republika, fejer@unipo.sk.
[2]Centrum excelentnosti ekológie živočíchov a človeka, Prešovská univerzita v Prešove, 17. Novembra 1, 081 16 Prešov, Slovenská republika, salamon@fhpv-unipo.sk

SÚČASNÉ TRENDY A MOŽNOSTI APLIKÁCIE PLETIVOVÝCH KULTÚR PRE PRODUKCIU OKRASNÝCH RASTLÍN
ACTUAL TRENDS AND POSSIBILITIES OF APLICATION OF PLANT TISSUE CULTURES FOR PRODUCTION OF ORNAMENTAL PLANTS

Angelika FILOVÁ[1] – Katarína ROVNÁ[2]

The goal of experiment was screening of 6 species Rosa L. focused on multiplication and long-term preservation of tissue culture. By in vitro methods, we obtained multiplying culture species Rosa L.: Rosa L.: Rosa rugosa, Rosa canina, Rosa pendulina, Rosa multiflora, Rosa chinensis and Rosa pomifera. Selected species of Rosa L. were cultivated on modification WPM medium with 1,0 mg.l^{-1} BA (6-benzylaminopurine). Process of rhizogenesis arises on modified medium WPM with auxine and sucrose (5 mg. l^{-1} IAA and 30g.l^{-1} sacharosis). The highest regeneration and multiplication ability was observed by Rosa multiflora. Multiplication can be express as proportion 5:1. The best rooting results were reached with species Rosa canina. First roots formed between 30. – 45. day after set up of the shoot tissue culture.

Key words: plant tissue cultures, Rosa L.,micropropagation, genetic diversity

Úvod

Dnes už je mnoho dôkazov, že pletivové kultúry predstavujú najrýchlejší a najspoľahlivejší spôsob rozmnožovania rastlín. To, čo priťahuje pozornosť pestovateľov je najmä rýchlosť, akou je možné množiť rastlinný materiál v *in vitro* podmienkach. Nemenej zaujímavý je aj obrovský potenciál pletivových kultúr, ktoré sa využívajú na skvalitnenie rastlín. Dnes je už ťažké nájsť rastliny, ktoré by sa pestovatelia nepokúšali pestovať v *in vitro* podmienkach. Za posledné desaťročie sa vytvorili zásadné podmienky na využívanie explantátových kultúr ako novej metódy množenia a šľachtenia rastlín. Tieto techniky môžu byť využité na prípravu veľkého počtu rastlín pri zachovaní nezmeneného rastlinného genómu. Z toho vyplýva, že rastliny budú mať presne tie isté charakteristiky ako má východzia rastlina. Na druhej strane je možné využitím týchto techník a základných znalostí získať rozšírenie a vyššiu plasticitu rastlinného genómu (napr. vyššia tolerancia k ochoreniu, zasoleniu a pod. (Preťová 2006).

Metodické postupy pre proces mikropropagácie najmä ekonomicky významných druhov boli dobre zvládnuté už v polovici minulého storočia, ale na technológie pre rozmnožovanie a obnovu vzácnych druhov rastlín sa pozornosť sústredila až v posledných rokoch (Kyte 2005). Program záchrany ohrozených druhov v aridných oblastiach za pomoci metód pletivových kultúr uvádza napr. Cooke (1996), spôsoby generatívnej a vegetatívnej reprodukcie pereniálnych bylín a drevín pre zachovanie cenných populácií a udržanie potenciálnej biodiverzity Sudhersan et al. (2003), Kumar, Sharma (2008) a ďalší. Technológiám pletivových kultúr sa v uvedenom kontexte venujú svetové laboratória v Európe aj v Ázii, ktoré intenzívne pracujú na uchovávaní genetických zdrojov a záchrane vzácnych a ohrozených druhov rastlín. Rozšírené sú najmä meristémové kultúry, ktoré umožňujú získať a rozmnožovať úplne sterilné, vírusov, baktérií a húb zbavené rastlinné druhy, čo má význam v pestovaní kvetov /ruže, gerbery, ľalie, tulipány, tropické kvety, orchidey/, liečivých a aromatických rastlín, ale aj technických plodín (Obert 2005). V laboratóriu explantátových kultúr Fakulty agrobiológie a potravinových zdrojov SPU sú vo forme protokolov vypracované techniky kultivácie semien, púčikov, meristémov, embryokultúr a orgánových kultúr pre reprodukciu rastlín až po aklimatizáciu regenerantov schopných reintrodukcie do prirodzeného prostredia.

Pre množstvo druhov okrasných aj liečivých rastlín už boli vyvinuté mikropropagačné metódy. Napriek platnosti určitých všeobecných princípov v kultivácii a regenerácii rastlinných pletív treba konštatovať, že neexistuje všeobecne použiteľné kultivačné médium, ale naopak, optimálne podmienky kultivácie pre jednotlivé rastlinné druhy, kultivary a dokonca jednotlivé genotypy je potrebné zistiť experimentálne.

Zvyšovaním populácie a nárokov ľudí na úroveň života narastajú negatívne dopady na prirodzené prostredie. Prejavujú sa aj poškodením stanovíšť a poklesom genetickej, druhovej a ekosystémovej diverzity.

Otázkam záchrany biodiverzity je preto venovaná rozsiahla pozornosť s cieľom zachovať druhy pre ďalšiu evolúciu v prirodzenom prostredí, neustále ovplyvňovanom meniacimi sa environmentálnymi podmienkami. Vzhľadom k tomu, že mnohé druhy sú v súčasných ekologických a environmentálnych podmienkach ohrozené a ich prirodzená obnova často nie je možná aj v dôsledku nízkeho reprodukčného potenciálu, hľadajú sa technológie pre efektívnu regeneráciu a reprodukciu v umelých podmienkach *in vitro*.

Cieľom experimentálnych prác v predkladanom príspevku bol screening 6 druhov *Rosa L.* zameraný na multiplikáciu a ich dlhodobé uchovávanie v podmienkach *in vitro*. Základnými parametrami výskumu divorastúcich ruží v podmienkach „on farm“ sú floristický prieskum, zber – uskladnenie – klíčivosť semien, vegetatívne rozmnožovanie, vplyv antropickej činnosti a suchovzdornosti jednotlivých druhov divorastúcich ruží.

Materiál a metódy

Ruže sú staré kultúrne rastliny. Ich výskyt v prírode je v posledných rokoch stále vzácnejší, pritom divorastúce druhy sú pestovateľsky cenným materiálom pre obohatenie sortimentu kultúrnych ruží. Na odber

primárnych explantátov boli vybrané donorové rastliny pochádzajúce z Malokarpatskej oblasti, lokalita Vrbové – Baraní dvor. Boli použité rastové meristémy z pučiacich výhonov druhov rodu *Rosa L.*: *Rosa rugosa, Rosa canina, Rosa pendulina, Rosa multiflora, Rosa chinensis a Rosa pomifera.* Kultúry sa kultivujú na modifikovanom médiu WPM (Lloyd, McCown, 1980) obohatenom o 1,0 $mg.l^{-1}$ BA (6-benzylaminopurine), pri teplote 25°C, hustote ožiarenia 35 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$, studené biele fluorescenčné svetlo a fotoperióde: 16 hodín svetlo, 8 hodín tma. Proces rizogenézy prebieha na modifikovanom kultivačnom médiu WPM obohatené o auxín a sacharózu (5 mg. l^{-1} IAA a 30$g.l^{-1}$ sacharózy).

V 3-týždňových intervaloch sa vizuálne hodnotili nasledovné parametre: celkový zdravotný stav explantátov, počet novovytvorených púčikov na explantáte, počet novovytvorených výhonov (ich farba, dĺžka), počet novovytvorených listov (ich farba), tvorba kalusu a jeho vlastnosti (podľa klasifikátora), počet novovytvorených koreňov (ich dĺžka), vitrifikácia, prítomnosť fenolov v médiu.

Výsledky a diskusia

Indukcia, založenie a proliferácia výhonov závisia od rastlinného druhu, od kultivovanej časti rastlinného tela, zloženia kultivačného média a kultivačných podmienok a genetickej výbavy. Úspešnosť založenia *in vitro* kultúry závisí z časti aj od kvality použitého explantátu. Z tohto hľadiska je dôležité: druh orgánu, z ktorého je explantát izolovaný, ako aj stupeň jeho diferenciácie, fyziologický a ontogenetický vek orgánu, veľkosť explantátu, vlastnosti materskej rastliny (Nunez-Palenius & Ochoa-Alejo1999) .

Už prvé výsledky experimentálnych prác potvrdili, že *in vitro* rozmnožovanie rodu *Rosa L.* pomocou orgánových kultúr možno považovať za výhodné z hľadiska zabezpečenia dostatočne vysokého koeficientu multiplikovaných výhonkov. Dosiahnutie vysokého koeficientu rozmnožovania značne ovplyvňuje koncentrácia, dĺžka pôsobenia a vzájomný pomer rastových regulátorov v kultivačnom médiu.

Pri kultivácii výhonkov ako primárnych explantátov na modifikovanom WPM médiu obohatenom o rastový regulátor BA, bola pozorovaná tvorba kalusu na báze výhonkov a následne tvorba adventívnych výhonkov. Prítomnosť rastovej regulačnej látky BA výrazne stimulovala multiplikačnú schopnosť v závislosti od konkrétneho genotypu. Najvyššiu regeneračnú a multiplikačnú schopnosť sme pozorovali pri *Rosa multiflora*, pri použití WPM média obohateného o 1,0$mg.l^{-1}$ BA. Multiplikáciu môžeme vyjadriť pomerom 5:1.

Pri zakoreňovaní výhonkov sme najlepšie výsledky dosiahli u druhu *Rosa canina* na WPM médiu s aplikáciou 5 mg. l^{-1} IAA a 30$g.l^{-1}$ sacharózy, pričom k tvorbe koreňov dochádza medzi 30. – 45. dňom po založení kultúry výhonkov. Príprava protokolu pre aklimatizáciu je v štádiu riešenia.

Záver

Súčasné trendy vo výskume a využití rastlín smerujú k hľadaniu možností kultivácie izolovaných rastlinných buniek, pletív a orgánov s cieľom produkcie veľkého množstva rastlín z jediného explantátu ako východiskového materiálu pre vegetatívne rozmnožovanie rastlín. Využitie metód pletivových kultúr je teda potenciálnym a otvoreným priestorom pre výskum a praktickú aplikáciu metód pre záchranu biodiverzity. Z výsledkov experimentov môžeme uzatvárať, že metódy pletivových kultúr rozširujú konvenčné spôsoby rozmnožovania rastlín, sú jedinečným prostredím pre uchovávanie zbierok genetických zdrojov.

Poďakovanie. Práca bola podporená vďaka finančnej podpore projektu VEGA č. 1/0205/08 – Prieskum a zhromaždenie genetických zdrojov autochtónnych divorastúcich druhov rodu *Rosa* vo vybraných regiónoch Slovenska.

Literatúra

COKE, J.E., 1996. Basal nutrient medium for in vitro cultures of loblolly pine. United States Patent #5, 534,434.July 9, 1996.

KUMAR, U.- SHARMA, A. 2008. Plant Biotechnology and Biodiversity conservation, Agrobios (India), 2008, p. 778, ISBN 9798177541686

KYTE, L.- KLEYN, J. 2005. Plants from test tubes: an introduction to micropropagation. Timber Press, Inc. ISBN 0-88192-361-3

LLOYD, G. – MCCOWN, B. 1980. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoott-tip culture. Proceeding of the International Plant Propagators´Society 30:421-427.

NUNEZ-PALENIUS, H.G., OCHOA-ALEJO, N.1999. In vitro mass cultivation of cells and tissues. In: PAREDES-LOPEZ, O. (ed.): Molecular biotechnology for plant production. Lancaster: Technomic Publishing Company, Inc., 1999, s. 89-130.

PREŤOVÁ, A. 2006. Some aspects of embryo development in vitro. In: Acta Horticulturae 725: 83-88

OBERT, B. – PREŤOVÁ, A. 2005. Európska technologická platforma "Rastliny pre budúcnosť". (European Technological Platform "Plants for the Future"). Proceedings, November 2005, IPGB SAS, Nitra Slovak Republic

SUNDERSAN,C.-AboEL-NIL, M. -HUSSAIN, J. 2003. Tissue culture technology for the conservation and propagation of certain native plants.In: Journal of Arid Environments Vol. 54, Issue 1, 2003.

Adresa autorov

[1]Ing. Angelika Filová, PhD., Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, Fakulta agrobiológie a potravinových zdrojov, Katedra fyziológie rastlín, Tr. A. Hlinku 2, 949 01 Nitra, Slovensko, angela.filova@uniag.sk

[2]Ing. Katarína Rovná, PhD., Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, Fakulta záhradníctva a krajinného inžinierstva, Katedra biotechniky zelene, Tulipánová 7, 949 01 Nitra, Slovensko, katarina.miklasova@uniag.sk

POTENCIÁLNA ÚLOHA CHITINÁZ V PROCESE SOMATICKEJ EMBRYOGENÉZY *PINUS NIGRA* Arn.
POTENTIAL ROLE OF CHITINASES IN THE PROCESS OF SOMATIC EMBRYOGENESIS OF *PINUS NIGRA* Arn.

Lenka FRÁTEROVÁ – Ildikó MATUŠÍKOVÁ – Terézia SALAJ

The aim of this work was detection and comparison of chitinolytic activity in cell suspension cultures of embryogenic cell lines of Pinus nigra Arn. with application of SDS-PAGE method. We investigated secreted extracelullar proteins of four embryogenic cell lines – E235 with minimal and L14, E323, L71 with high embryogenic potential. Embryogenic lines were cultivated 8 and 16 days in DCR liquid medium. In embryogenic cell line with minimal embryogenic potential we detected overall 4 isoforms of chitinases whereas in three embryogenic lines with high embryogenic potential there were 8 isoforms detected. Chitinase profile of three embryogenic lines with high embryogenic capacity was identical with exception of three isoforms with molecular weights of ~23, 20 and 19 kDa. Chitinases isoforms with molecular weight ~53 kDa had comparable activities in all examined cell lines. On the other hand isoform with molecular weight ~33 kDa was detected only in lines with high embryogenic potential. This indicate that given chitinase isoform can play an important role in process of somatic embryogenesis in Pinus nigra Arn.
Keywords: SDS-PAGE, chitinase, suspension cultures, Pinus nigra Arn.

Úvod

In vitro kultivácia predstavuje pre rastliny určitý stres. Preto väčšina rastlinných explantátov kultivovaných v *in vitro* podmienkach vylučuje do kultivačného média bielkoviny, ktoré súvisia s ich obranným mechanizmom. Predpokladá sa, že tieto extracelulárne bielkoviny majú dôležitý význam aj v aktivácii alebo inhibícii somatickej embryogenézy (SE) (Quiroz-Figueroa et al. 2006). Dôležitú úlohu vo vývine somatických embryí krytosemenných (Helleboid et al. 2000; Tchorbadjieva & Pantchev 2006), ale aj nahosemenných rastlín (Dong & Dunstan 2000) zohrávajú chitinázy a glukanázy. Helleboid et al. (2000) pozoroval zmeny v bielkovinovej skladbe embryogénnych kultúr čakanky, ktoré súviseli s indukciou SE. Okrem β-1,3-glukanáz identifikovali aj chitinázy a osmotínu podobné bielkoviny, ktoré sa akumulovali v médiu embryogénnych kultúr vo vyššej hladine v porovnaní s kultúrami neembryogénnej variety čakanky. Proces SE bol indukovaný aj u mnohých ihličnatých druhov, napr. *Pinus nigra* Arn. (Salajová & Salaj 2005), *Pinus brutia* TEN. (Yldirim et al. 2006) a iných. U *Picea abies* ako modelovom systéme na štúdium regulácie vývinu somatických embryí u ihličnanov sa zistilo, že somatické embryá z rozdielnych bunkových línií dosiahli rôzne vývinové štádiá, čo sa odzrkadlilo aj v skladbe prítomných extracelulárnych bielkovín. Proliferujúce embryogénne línie *Picea abies* boli rozdelené do dvoch skupín na základe morfológie somatických embryí a ich dozrievacej schopnosti. Do skupiny A sa zaraďujú bunkové línie obsahujúce dobre vyvinuté somatické embryá schopné dozrievania, zatiaľ čo v skupine B sa nachádzajú embryogénne línie obsahujúce slabšie vyvinuté somatické embryá, ktoré vo všeobecnosti nedozrievajú (Egertsdotter 1996). Sekrécia bielkovín do kultivačného média je charakteristická pre obe skupiny embryogénnych línií *Picea abies* (Egertsdotter et al. 1993).

Cieľom našej práce bolo detekovať a porovnať chitinázovú aktivitu v embryogénnych bunkových líniách *Pinus nigra* Arn. s minimálnou embryogénnou kapacitou a v embryogénnych líniách s vysokým embryogénnym potenciálom.

Materiál a metódy

Chitinázovú aktivitu sme detekovali v suspenzných kultúrach 4 embryogénnych bunkových línií *Pinus nigra* Arn.: E235, L14, E323 a L71. Po 8 a 16 dňoch kultivácie sme odobrali tekuté médium obsahujúce eluát kultivovaných buniek a centrifúgovali 20 min pri 14 000 rpm a 4°C. Supernatant sme zmrazili v tekutom dusíku a vzorky uskladnili pri -80 °C. Extracelulárne bielkoviny obsiahnuté v supernatante z rôznych embryogénnych bunkových línií boli elektroforeticky separované na denaturačných polyakrylamidových géloch. Ako substrát pre chitinázy sme do separačného gélu pridali 1 % glykolchitín. Na detekciu chitinázovej aktivity sme gély farbili roztokom fluorescenčného farbiva Fluorescent Brightener 15 minút pri izbovej teplote. Aktivitu chitináz sme detekovali po iluminácii gélu UV svetlom, pričom pozície bielkovín s chitinázovou aktivitou zodpovedali tmavým škvrnám na fluoreskujúcom pozadí. Po detekcii chitinázovej aktivity sme gély farbili roztokom 0,05 % Coomassie Brilliant Blue R-250, 40 % metanolu a 10 % kyseliny octovej. Molekulárne hmotnosti separovaných bielkovín boli odhadnuté porovnaním s bielkovinovým markerom MARK 12 ^{TM} (2,5 – 200 kDa).

Výsledky a diskusia

V našom experimente sme indukovali tvorbu embryogénneho pletiva z nezrelých zygotových embryí *Pinus nigra* Arn. Po testovaní maturačnej schopnosti jednotlivých embryogénnych línií sme identifikovali línie s vysokým ako aj minimálnym embryogénnym potenciálom. Zo suspenzných kultúr (po 8 a 16 dňovej

kultivácii) sme alikvóty média nanášali na polyakrylamidové gély a detekovali sme aktivitu proteínových frakcií s chitinázovou aktivitou. V embryogénnej línii s minimálnym embryogénnym potenciálom E235 sme detekovali celkovo 4 izoformy chitináz, kým v troch embryogénnych líniách s vysokým embryogénnym potenciálom celkovo až 8 izoforiem. Profil chitináz troch embryogénnych línií bol s výnimkou troch izoforiem o veľkosti ~23, 20 a 19 kDa identický. Chitinázové izoformy o veľkosti približne ~53 kDa mali porovnateľné aktivity vo všetkých skúmaných líniách. Na druhej strane, izoformu o veľkosti ~33 kDa sme detekovali výlučne v líniách s vysokou embryogénnou kapacitou avšak nie v línii s minimálnou embryogénnou kapacitou. To naznačuje, že daná izoforma chitinázy môže zohrávať dôležitú úlohu v embryogénnom procese u *Pinus nigra* Arn. Podobné pozorovanie uskutočnili aj Domon et al. (2000) v suspenzných kultúrach *Pinus caribaea*, ktorým sa podarilo identifikovať chitináze podobnú bielkovinu, ktorá sa iónovo viaže k povrchom preglobulárnych somatických embryí. Egertsdotter et al. (1993) zistili**,** vzájomný vzťah medzi extracelulárnymi bielkovinami vylučovanými embryogénnymi líniami *Picea abies* a morfológiou somatických embryí. Následne Mo et al. (1996) potvrdili úzky vzájomný vzťah medzi prítomnosťou špecifických extracelulárnych chitináz a morfológiou somatického embrya u *Picea abies*. Prítomnosť špecifických izoforiem chitináz by teda mohla slúžiť ako markér pre embryogénny potenciál embryogénnych línií. Iné údaje podporujúce názor, že chitinázy regulujú vývin somatického embrya pochádzajú z experimentov s embryogénnymi kultúrami *Picea abies* (Wiweger et al. 2003) a *Picea glauca* (Dong & Dunstan 1996).

Záver

Naše výsledky naznačujú, že v profile chitináz embryogénnych kultúr s vysokým a minimálnym embryogénnym potenciálom sú nielen kvantitatívne, ale aj kvalitatívne rozdiely. Prítomnosť izoformy chitinázy o veľkosti ~ 33 kDa zrejme súvisí s vysokým embryogénnym potenciálom embryogénnych línií u *Pinus nigra* Arn. Na potvrdenie tejto súvislosti budú uskutočnené ďalšie experimenty s cieľom identifikácie vhodného markéra pre embryogénnu kapacitu bunkových línií potenciálne využiteľného v biotechnologických programoch.

Literatúra

DOMON, JM. - NEUTELINGS, G. - ROGER, D. - DAVID, A. - DAVID, H.: A basic chitinase-like protein secreted by embryogenic tissues of *Pinus caribaea* acts on arabinogalactan proteins extracted from the same cell lines. In: *Journal of Plant Physiology*, roč. 156, 2000, s. 33-39

DONG, J. Z. - DUNSTAN, D. I.: A reliable method for extraction of RNA from various conifer tissues. In: *Plant Cell Reports*, roč. 15, 1996, s. 516-521

DONG, J.Z. - DUNSTAN, D. I., 2000. Molecular biology of somatic embryogenesis in conifers. In: JAIN, S.M., MINOCHA, S. C.: *Molecular Biology of Woody Plants*, The Netherlands, Kluwer Academic Publishers, roč. 1, 2000, s. 51-87

EGERTSDOTTER, U.: Regulation of somatic embryo development in Norway spruce (*Picea abies*)**.** In: *Agronomie: Plant Genetics and Breeding*, roč. 16, 1996, s. 603-608

EGERTSDOTTER, U. - MO, L. H. - VON ARNOLD, S.: Extracellular proteins in embryogenic suspension cultures of Norway spruce (*Picea abies*). In: *Physiologia Plantarum*, roč. 88, č. 2, 1993, s. 315-321

HELLEBOID, S. - HENDRIKS, T. - BAUW, G. - INZE, D. - VASSEUR, J. - HILBERT, J. L.: Three major somatic embryogenesis related proteins in *Cichorium* identified as PR proteins. In: *Journal of Experimental Botany*, roč. 51, 2000, s. 1189-1200

MO, L. H. - EGERTSDOTTER, U. - VON ARNOLD, S.: Secretion of specific extracellular proteins by somatic embryos of *Picea abies* is dependent on embryo morphology. In: *Annals of Botany*, roč. 77, 1996, s. 143-152

QUIROZ-FIGUEROA, F. R. - ROJAS-HERRERA, R. - GALAZ-AVALOS, R. M. - LOYOLA-VARGAS, V. M.: Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. In: *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, roč. 86, 2006, s. 285-301

SALAJOVÁ, T. - SALAJ, J.: Somatic embryogenesis in *Pinus nigra*: Embryogenic tissue initiation, maturation and regeneration ability of establish cell lines. In: *Biologia Plantarum*, roč. 49 (3), 2005, s. 333-339

TCHORBADJIEVA, M. I. - PANTCHEV, I. Y.: Secretion of chitinase-like protein in embryogenic suspension cultures of *Dactylis glomerata* L. In: *Biologia Plantarum*, roč. 50 (1), 2006, s. 142-145

WIWEGER, M. - FARBOS, I. - INGOUFF, M. - LAGERCRANTZ, U. - VON ARNOLD, S.: Expression of *Chia4-Pa* chitinase genes during somatic and zygotic embryo development in Norway spruce (*Picea abies*): similarities and differences between gymnosperm and angiosperm class IV chitinases. In: *Journal of Experimental Botany*, roč. 54, č. 393, s. 2691-2699

YILDIRIM, T. - KAYA, Z. - ISIK, K.: Induction of embryogenic tissue and maturation of somatic embryos in *Pinus brutia* TEN. In: *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, roč. 87, 2006, s. 67-76

Adresa autorov:

Mgr. Lenka Fráterová. Ústav genetiky a biotechnológií rastlín SAV v Nitre, Akademická 2, 950 07. Tel.: 037 6943 329, E-mail: nrgrfrat@pribina.savba.sk

Mgr. Ildikó Matušíková, PhD. Ústav genetiky a biotechnológií rastlín SAV v Nitre, Akademická 2, 950 07. Tel.: 037 6943 110, E-mail: nrgrimat@savba.sk

RNDr. Terézia Salaj, CSc. Ústav genetiky a biotechnológií rastlín SAV v Nitre, Akademická 2, 950 07. Tel.: 037 6943 325, E-mail: terezia.salaj@savba.sk

TECHNOLOGICKÁ KVALITA PŠENICE RODIČOVSKÝCH GENOTYPOV PRI TVORBE IZOGÉNNYCH LÍNIÍ S NOVOU GLUTENÍNOVOU ALELOU Z GENOTYPU KOTTE
WHEAT TECHNOLOGICAL QUALITY OF PARENTS GENOTYPES FOR CREATION ISOGENIC LINES WITH NEW GLUTENIN ALLEL FROM GENOTYPE KOTTE

Soňa GAVURNÍKOVÁ – Katarína ZIRKELBACHOVÁ – Svetlana ŠLIKOVÁ

Wheat quality depends on protein composition and grain protein content. High molecular weight glutenin subunits (HMW-GS) play an important role in determining the viscoelastic properties of gluten. The aim of our study was evaluate 6 slovak wheat genotypes and sweden genotypes Kotte/n and Kotte/6+8 for technological quality and bakery properties. This genotypes will use for transfer of new HMW-GS subunits N+N (Glu-1B) from genotype Kotte to slovak genotypes. The most highest technological quality had slovak genotypes Elpa and Simona. Kotte had low technological quality.
Key words: wheat, slovak wheat genotypes, technological quality, farinograf, Kotte

Úvod

Na kvalitu múky pšenice a jej konečné použitie má vplyv typ aj množstvo individuálnych glutenínových podjednotiek. Hou et al. (1996) stanovili pomocou súboru amerických, tzv. „soft“ pšeníc kvantitatívny podiel celkových glutenínov na celkových bielkovinách na asi 25 % a podiel individuálnych HMW-GS na celkových bielkovinách na približne 7 %. Značný je rozdiel v podiele HMW-GS medzi genotypmi so štyrmi a piatimi HMW-GS, teda napríklad medzi genotypmi s HMW-GS 0, respektíve genotypmi s podjednotkami 1 alebo 2*. Tento rozdiel je asi 2% (Seilmeier et al. 1991). Vysoký obsah celkových bielkovín môže preto maskovať vplyv HMW-GS na kvalitu. Kladný alebo záporný vplyv jednotlivých HMW-GS je určiť obtiažné, pretože k rekombináciám v rámci komplexných alel prakticky nedochádza. Podarilo sa však zistiť, aký vplyv na pekársku kvalitu pšeničnej múky majú príslušné páry HMW-GS. Stále sú ešte objavované aj alely nové, neznáme alebo nepublikované. Ich zdrojmi bývajú často krajové odrody, zvlášť z menej vyspelých a na diverzitu pšenice bohatších štátov (napr. Afganistan, Pakistan, Turkmenistan a pod.). Na našom pracovisku sme v doterajších elektroforetických analýzach odrôd, krajových odrôd a línií pšenice našli nový, doteraz nepopísaný alelický pár kódovaný lokusom *Glu-1B* v jednej z línií švédskej krajovej odrody Kotte, ktorého vplyv na pekársku kvalitu nie je známy.

Cieľom našej práce bolo zhodnotiť technologickú kvalitu a pekárske vlastnosti slovenských odrôd pšenice a švédskej krajovej odrody Kotte, ktoré budú použité ako rodičovské genotypy pre prenos nových vysokomolekulárnych glutenínových podjednotiek N+N (*Glu-1B*) z genotypu Kotte do slovenských odrôd.

Materiál a metódy

Na hodnotenie technologickej kvality sme použili 4 slovenské odrody pšenice letnej formy ozimnej (*Triticum aestivum* L.) – Torysa, Simona, Danubia, Elpa a švédsku krajovú odrodu Kotte (Kotte/n, Kotte/6+8). Hodnotenie sme robili v 2 opakovaniach. Kvalitatívne parametre boli stanovené podľa nasledovných metód: objemová hmotnosť podľa STN 46 1011 časť 5, obsah dusíkatých látok (Nx5,7) Dumasovou metódou, obsah mokrého lepku a napúčavosť podľa STN 46 1011 časť 9, sedimentačný index, Zelenyho test podľa STN ISO 5529, číslo poklesu podľa STN ISO 3093, farinografické ukazovatele (väznosť vody, vývin cesta, stabilita cesta, mäknutie cesta po 10 min., mäknutie cesta po 12 min., číslo kvality) podľa ICC–Standard Nr. 115/1. U všetkých genotypov sme vykonali pekársky test, kde sme hodnotili špecifický objem bochníka. Podľa dosiahnutých hodnôt jednotlivých parametrov, ktoré sú súčasťou normy STN 46 1100-2: Zrno potravinárskej pšenice letnej sme odrody pšenice zatriedili do príslušných tried kvality.

Výsledky a diskusia

Tabuľka 1 uvádza namerané základné technologické parametre. Podľa STN 46 1100-2: Zrno potravinárskej pšenice letnej zrno potravinárskej pšenice letnej zaraďujeme do 4 tried kvality:
E – elitná, A – štandardná, B – ustanovuje minimálne požiadavky na kvalitu pre intervenčný nákup pšenice, P – pečivárenská.

Odrody Simona a Elpa sa vyznačovali triedou kvality E podľa hodnotenia STN 46 1100-2. Odrody Danubia a Kotte/6+8 sa vyznačovali triedou kvality A a odroda Torysa triedami kvality A/B. Odroda Kotte/n vykazovala triedu kvality B s nízkou hodnotou sedimentačného indexu. Z hľadiska farinografických ukazovateľov odrody Torysa, Simona a Danubia môžeme priradiť k stredným múkam, odroda Elpa sa vyznačovala hraničnými hodnotami medzi strednou a silnou múkou a k slabým múkam môžeme priradiť odrody Kotte/n a Kotte/6+8. Tabuľka 2 uvádza namerané hodnoty farinografických ukazovateľov a pečenia. Z pekárskeho hľadiska najvyššie hodnoty špecifického objemu bochníka dosiahli odrody Elpa a Simona.

Záver

Na základe celkového hodnotenia technologickej a pekárskej kvality analyzovaných odrôd pšenice letnej najvyššiu kvalitu dosiahli odrody Elpa a Simona, odrody Danubia a Torysa sa vyznačovali strednou kvalitou a odrody Kotte/6+8 a Kotte/n dosiahli z pekárskeho hľadiska najnižšiu kvalitu.

Tabuľka 1: Základné technologické parametre hodnotených odrôd pšenice

Odroda	Objemová hmotnosť [g/l]	Obsah bielkovín [%]	Mokrý lepok v sušine [%]	Napúčavosť lepku [ml]	Sedimentačný index podľa Zelenyho [ml]	Číslo poklesu [s]	Trieda kvality podľa STN 46 1100-2
Danubia I.	805	13,5	29,6	7,5	27	363	A
Danubia II.	812	13,7	31,2	7	27	358	A
Elpa I.	807	12,6	30,1	11,5	49	383	E
Elpa II.	794	12,9	30,7	12	47	391	E
Torysa I.	750	12,2	29,6	7	33	266	B
Torysa II.	762	12,6	30,2	7,5	35	246	A
Simona I.	791	13,0	32,3	5	27	284	E
Simona II.	788	13,3	34,3	5,5	33	303	E
Kotte/n I.	783	14,2	34,6	2	22	323	B
Kotte/n II.	793	13,2	32,1	4	20 N	303	N
Kotte/6+8 I.	779	14,0	36,8	3,5	26	307	A
Kotte/6+8 II.	785	13,9	34,9	3,5	27	269	A

Tabuľka 2: Farinografické a pekárske hodnoty odrôd pšenice

Odroda	Väznosť vody [%]	Vývin cesta [min]	Stabilita cesta [min]	Mäknutie cesta po 10 min.od začiatku testu [FJ]	Mäknutie cesta po 12 min.od dosiahnuti a maxima [FJ]	Far. číslo kvality	Špecif. objem bochníka [ml/100g]	Sila múky podľa far.	Kvalita múky podľa objemu bochníka
Danubia I.	55,5	3,9	4,6	50	93	69	308	stredná	slabá
Danubia II.	55,8	3,0	3,9	67	107	60	288	stredná	slabá
Elpa I.	58,7	4,3	5,0	57	85	70	314	stredná/silná	dobrá
Elpa II.	58,9	4,0	5,6	49	74	74	299	stredná/silná	slabá
Torysa I.	58,8	2,7	2,2	97	120	40	298	stredná	slabá
Torysa II.	58,7	2,7	2,2	91	115	43	308	stredná	slabá
Simona I.	59,4	2,3	2,1	110	134	43	291	stredná	slabá
Simona II.	59,6	3,0	2,3	101	127	49	317	stredná	dobrá
Kotte/n I.	55,7	1,7	1,0	190	209	24	270	slabá	slabá
Kotte/n II.	55,3	1,7	1,0	167	184	25	289	slabá	slabá
Kotte/6+8 I.	55	1,9	1,3	168	187	28	279	slabá	slabá
Kotte/6+8 II.	55,3	2,2	1,3	148	170	30	292	slabá	slabá

Poďakovanie: Táto štúdia vznikla vďaka podpore v rámci OP Výskum a vývoj pre projekt: Vývoj nových typov rastlín s geneticky upravenými znakmi hospodárskeho významu ITMS: 26220220027, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

HOU, G. – YAMAMOTO, H. – NG, P. K. W.: Relationships of quality of glutenin subunits of selected U.S. soft wheat flours to rheological and baking properties. Cereal Chem., 73, 1996, s. 358-363

SEILMEIER, W. - BELITZ, H.-D. - WIESER, H.: Separation and quantitative determination of high-molecular-weight subunits of glutenin from different wheat varieties and genetic variants of the variety Sicco. Z. Lebensm. Unters. Forsch., 192, 1991, s. 124-129

STN 46 1100-2 Potravinárske obilniny: Časť 2: Zrno potravinárskej pšenice letnej. SÚTN, Bratislava, 2003, s.8

Adresa autorov:
Ing. Soňa Gavurníková, Ing. Katarína Zirkelbachová, Ing. Svetlana Šliková, PhD., Centrum výskumu rastlinnej výroby Piešťany, Výskumný ústav rastlinnej výroby, Bratislavská cesta 122, 921 68 Piešťany
e-mail: gavurnikova@vurv.sk, zirkelbachova@vurv.sk, slikova@vurv.sk

POĽNÁ ODOLNOSŤ ODRÔD JAČMEŇA SIATEHO F. JARNÁ VOČI VYBRANÝM PATOGÉNOM
FIELD RESISTANCE OF SPRING BARLEY CULTIVARS TO SELECTED PATHOGENS

Jozef GUBIŠ – Klára KRIŽANOVÁ – Alžbeta ŽOFAJOVÁ – Katarína BOJNANSKÁ – Marcela GUBIŠOVÁ – Martin PASTIRČÁK – Štefan MASÁR – Ľudovít SLEZIAK – Jana HAVELOVÁ

In 2010, 46 cultivars of spring barley were assessed for resistance to powdery mildew, net blotch and leaf rust in adult stage. Field resistance was evaluated in locality Piešťany. Several cultivars were resistant to individual pathogens and some of them were resistant to all pathogens together. Such genotypes are suitable for creation of new cultivars adapted for agro climatic conditions of Slovakia.
Keywords: barley, net blotch, powdery mildew, leaf rust

Úvod

Medzi najzávažnejšie patogény jačmeňa siateho f. jarná patria múčnatka trávová na jačmeni (*Blumeria graminis* (DC.) Golovin ex Speer f. sp. *hordei* Em. Marchal) (ďalej len múčnatka na jačmeni), hrdza jačmenná (*Puccinia hordei* Otth), hnedá škvrnitosť (*Pyrenophora teres* Drechs.) a v poslednom období aj ramulária škvrnitosť listov jačmeňa (*Ramularia collo-cygni* Sutton & Waller). Múčnatka na jačmeni je považovaná za jednu z najvýznamnejších chorôb asimilačných orgánov jačmeňa a ročné straty na úrode predstavujú v priemere asi 10 % (Czembor 2001), v prípade silných epidémií môžu byť zaznamenané straty až do 40 %. Druhou významnou chorobou napadajúcou asimilačné orgány jačmeňa je hrdza jačmenná. Hrdza jačmenná, ktorú spôsobuje patogén *Puccinia hordei* Otth je závažná, široko rozšírená choroba jačmeňa v Austrálii, Európe, Severnej a Južnej Amerike (Clifford 1985), ktorá môže spôsobovať straty nad 32 % (Park & Karakousis 2002). Medzi nekrotrofné hubové ochorenia, ktoré napádajú jačmeň patrí hnedá škvrnitosť, ktorej pôvodcom je *Pyrenophora teres* (Drechs.). Choroba je prenosná osivom a vyskytuje sa vo všetkých mierne vlhkých oblastiach sveta, kde významne vplýva na redukciu úrody a kvalitu jačmeňa (Serenius et al. 2007).

Cieľom práce bolo zhodnotenie poľnej odolnosti súboru odrôd jačmeňa siateho f. jarná voči vybraným listovým patogénom.

Materiál a metódy

V roku 2010 sme hodnotili odolnosť 46 registrovaných odrôd a kontrolných genotypov - SK 13-991 a CI 9819 jačmeňa siateho f. jarná. Poľnú odolnosť voči *Pyrenophora teres, Blumeria graminis* f. sp. *hordei*, *Puccinia hordei* sme hodnotili na lokalite Piešťany v dvoch opakovaniach. V poľných podmienkach bolo napadnutie patogénmi hodnotené podľa Babajanca (1988) v dvoch, resp. troch termínoch v štádiu BBCH 37 - BBCH 75. Percentuálne hodnoty sme transformovali použitím arcsin $\sqrt{x}$. Pre analýzu variancie získaných hodnôt (ANOVA pre $P \leq 0,05$) s následným LSD testom sme použili štatistický program SPSS (13.0).

Výsledky a diskusia

V poľných podmienkach bolo uskutočnené hodnotenie poľnej odolnosti na lokalite Piešťany voči hnedej škvrnitosti na jačmeni, múčnatke trávovej na jačmeni a hrdze jačmennej. Analýzou variancie sme zistili štatisticky významné rozdiely ($P \leq 0,05$) medzi odrodami pri napadnutí múčnatkou trávovou a hnedej škvrnitosti (Tab. 1). Štatisticky významné rozdiely neboli zaznamenané medzi opakovaniami. Priemerná bodová hodnota napadnutia voči hnedej škvrnitosti bola 8. Väčšie rozdiely sme zaznamenali pri infekcii hrdzou jačmennou, kde bodové hodnoty sa pohybovali v rozsahu 7 – 4. Avšak priemerná bodová hodnota bola 6. Hrdzou najviac napadnutými odrodami boli Xanadu a Donaris. Naopak, až 8 odrôd sa vyznačovalo rezistenciou. Najväčšie rozdiely v reakcii na poľnú infekciu sme zistili pri napadnutí múčnatkou trávovou na jačmeni. Bodové hodnoty sa pohybovali v rozsahu od 9 až po 4. Zo sledovaných odrôd až 21 vykazovalo úplnú odolnosť voči múčnatke trávovej. Najviac citlivé boli odrody Annabell, Celinka, Kango, Madonna, Mesinna, Pax a Tolar. Kombinovanou odolnosťou voči múčnatke trávovej a hnedej škvrnitosti sa vyznačovali odrody Aktív, Argument, Donaris, Levan, Nitran, Radegast a Xanadu.

Väčšina výskumov rezistencie obilnín k hubovým chorobám v poľných podmienkach je zameraných na skríning rezistencie k jednému patogénu. Zriedkavo publikácie analyzujú celý komplex listových chorôb (AL- Naimi et al. 2005). Ak sa robí skríning odrôd jarného jačmeňa na rezistenciu k nejakej chorobe pri prirodzenej infekcii bez ohľadu na sledovanie možného negatívneho alebo pozitívneho vplyvu iných chorôb, skutočná úroveň rezistencie môže byť maskovaná vplyvom iných patogénov.

Záver

Medzi hodnotenými 46 odrodami jačmeňa siateho f. jarná boli nájdené odrody odolné voči samostatným patogénom, ale boli identifikované aj odrody s odolnosťou voči všetkým sledovaným patogénom súčasne. Priemernú reakciu odrôd voči sledovaným patogénom je možné vo všeobecnosti hodnotiť ako odolnú. Genotypy s vyhovujúcou odolnosťou sú potencionálne vhodné do kontinuálneho procesu tvorby nových odrôd dobre adaptovaných pre pestovateľské podmienky Slovenska.

Poďakovanie: *Táto práca bola podporovaná finančnými prostriedkami Agentúry na podporu výskumu a vývoja VMSP-P-0047-09 a MP SR v rámci rezortnej úlohy VaV "Využitie biotechnologických metód pri tvorbe nových typov rastlín".*

Literatúra

AL-NAIMI F.A. – GARRETT K.A. – BOCKUS W.W. (2005): Competition, facilitation, and niche differentiation in two foliar pathogens. Oecologia, 143, 2005, 449–457.

BABAJANC L. (1988): Metody sekcii i ocenki ustojčivosti pšenicy i jačmenja k boleznjam v stranach - členach SEV. Praha, 1988, p. 321

CZEMBOR J. H. 2001. Sources of resistance to powdery mildew (Blumeria graminis f. sp. hordei) in Moroccan barley land races. Canadian Journal of Plant Pathology, 23, 2001, pp. 260–269.

CLIFFORD, B. C. (1985): Barley leaf rust. In: Roelfs AP, Bushnell WR (eds) The cereal rusts. Academic, Orlando, 1985, pp. 173–205

PARK, R. F. – KARAKOUSIS, A. (2002): Characterization and mapping of gene *Rph19* conferring resistance to *Puccinia hordei* in the cultivar 'Reka 1' and several Australian barleys. Plant Breed 121, 2002, pp. 232–236.

SERENIUS, M. – MANNINEN, O. – WALLWORK, H. – WILLIAMS, K. (2007): Genetic differentiation in *Pyrenophora teres* populations measured with AFLP markers. Mycological Research, 111, 2007, pp. 213–223.

Tabuľka 1: Analýza variancie napadnutia listových segmentov registrovaných odrôd jačmeňa siateho f. jarná v roku 2010 v poľných podmienkach

Pyrenophora teres					
Zdroj	df	SS	MS	F	Sig.
Model	1	45,028	45,028	115,346	0
Odroda	46	30,510	0,663	1,699	0,012*
Opakovanie	1	0,532	0,532	1,3626	0,246
Odroda*Opakovanie	46	14,266	0,310	0,794	0,810
Chyba	116	45,283	0,390		
Celkom	209	92,424			
Puccinia hordei					
Zdroj	df	SS	MS	F	Sig.
Model	1	42240,91	42240,91	128,513	0
Odroda	46	13785,08	299,676	0,912	0,630
Opakovanie	1	383,274	383,274	1,166	0,283
Odroda*Opakovanie	46	2624,453	57,053	0,174	1
Chyba	98	32211,5	328,689		
Celkom	191	48992,33			
Blumeria graminis f. sp. *hordei*					
Zdroj	df	SS	MS	F	Sig.
Model	1	14337,04	14337,04	493,599	0
Odroda	46	20479,74	445,212	15,328	0,000*
Opakovanie	1	2,371	2,371	0,082	0,776
Odroda*Opakovanie	46	1635,453	35,553	1,224	0,201
Chyba	98	2846,5	29,046		
Celkom	191	24963,99			

Adresa autorov:
Ing. Jozef Gubiš, Phd.; Ing. Alžbeta Žofajová, PhD.; Ing: Katarína Bojnanská; Mgr. Marcela Gubišová; Mgr. Martin Pastirčák, PhD.; Ing. Štefan Masár, CSc.; – Centrum výskumu rastlinnej výroby Piešťany, Bratislavská cesta 122, 921 68 Piešťany, (e-mail: gubis@vurv.sk); Ing. Klára Križanová, PhD.; Ing. Ľudovít Sleziak, CSc.; Mgr. Jana Havelová – HORDEUM s.r.o., Nový Dvor 1052, 925 21 Sládkovičovo, (e-mail: krizanova@hordeum.sk)

LABORATÓRNY TEST PRE DIAGNOSTIKU PATOGÉNA *RAMULARIA COLLO-CYGNI* V PLETIVÁCH JAČMEŇA
DIAGNOSTIC LABORATORY TEST FOR *RAMULARIA COLLO-CYGNI* PATHOGEN IN BARLEY TISSUE

Jozef GUBIŠ – Martina HUDCOVICOVÁ – Leona LEIŠOVÁ-SVOBODOVÁ – Pavel MATUŠINSKY

Ramularia collo-cygni (RCC) is a pathogen of spring and winter barley which causes disease Ramularia leaf spot. In presented study the method based on quantitative PCR diagnosis of pathogen was developed. PCR primers and a TaqMan probe were designed to target a RCC-specific DNA sequence. The potential of the real-time PCR assay for quantification of RCC infection was investigated by examining seeds and leaves of barley cultivated in glasshouse and in field experiment plots.
Key words: Ramularia leaf spot, TaqMan probe, molecular diagnostics, barley leaf diseases

Introduction

Ramularia collo-cygni (Sutton & Waller) is a pathogen which causes Ramularia leaf spot. Over the past 15 years, not only in Europe, *R. collo-cygni* has become recognized as an important pathogen of barley (Walters et al. 2008). The pathogen was described at the end of 80´s of the last century, while the first occurrence in Slovakia was published by Plant Production Research Center Piešťany in 2008 (Gubis et al. 2008) and in Czech Republic in 1998 (Amelung & Sachs 1999). The course of the disease on barley during favourable conditions is very fast and pathogen attacks whole plant from leaves through stalks and spikes to seeds. Pathogen is able to reduce thousand kernel weight, yield and malting barley quality. Yield losses range from 15% to 25%. RCC is a pathogen which is difficult to diagnose visually in the field condition because it can be easily confused with physiological spotting or other pathogens such as *Pyrenophora teres* and *Cochliobolus sativus*. Early techniques of pathogen identification were based on agar plate methods (Sachs 2004). Enzyme-linked immunosorbent assay has also been used as a diagnostic method (Ward et al. 2004). Today, rapid PCR techniques are available for the detection of pathogens (Havis et al. 2006; Frei et al. 2007, Pinnschmidt & Justesen 2009). These techniques have led to a greater understanding of the life cycle of *R. collo-cygni* pathogen, including the presence of a seed-borne stage.

The aim of this study was to develop test for qualitative and quantitative determination of important barley pathogen RCC.

Material and Methods

The isolates were obtained from barley leaves with visible symptoms of Ramularia leaf spot originated from Slovak and Czech fields. Other isolates of RCC used in this study was kindly provided by Dr. P. Frei (Agroscope Changins- Wädenswil Research Station ACW, Nyon, Switzerland) and by Dr. N.D. Havis (Crop and Soil Research Group, Scottish Agricultural College, Edinburgh, Scotland, UK), isolates of *Rhynchopsorium secalis* by Dr. S. Salamati (Kvithamar Research Center, Stjørdal, Norway), isolate of *Septoria tritici* by Prof. W.W. Bockus (Kansas State University, USA), isolate of *Drechslera tritici-repentis* and *Stagonospora nodorum* by Dr. M. Jalli (MTT Agrifood Research Finland). Mycelia of RCC were harvested from Petri dishes, ground to a fine powder in a cooled mortar using liquid nitrogen, homogenized, and total genomic DNA was extracted using the DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Germany). The same methods were used for DNA extractions from naturally and artificially infected samples of leaves and naturally infected barley seeds. Real-time PCR assay was performed using the cycler ABI PRISM® 7000 in MicroAmp optical 96-well plates (Applied Biosystems, Foster City, USA).

Results and Discussion

Our work contains development and verification of specific primers and Taq Man probe for reliable diagnostics and quantification of RCC in experimental biological material. Method based on quantitative PCR allows rapid and accurate diagnosis of pathogen´s attack on the crop already in the stage before the appearance of the first symptoms of the disease. These primers and probe for quantitative PCR developed in our laboratories are protected as "Utility model no. 20883" by Industrial Property Office of the Czech Republic. The topic of a technical solution is the probe (TaqMan) for real-time PCR and primers that were designed in specific regions of ribosomal DNA (5.8 rRNA) and internal transcribed spacer regions (ITS2) of pathogen RCC DNA. Real-time PCR with probe RccSON and primers Rccj1-F and Rccj3-R, allows to amplify a fragment of the size 63 bp of

pathogen DNA and quantification of the starting amount of pathogen DNA through fluorescently labelled probe that hybridizes with the amplified target sequence.
Quantitative detection of RCC in naturally and artificially infected materials has been studied in more laboratories. The first report about quantitative detection was published in Havis et al. (2006), who used primers with size of amplified product 256 bp. Later study was Frei et al. (2007). Primers developed by us fulfil conditions for quantitative detection. Primers Rccj1- Rccj3 were tested on biological material of various origin for verification of their particularity. By the use of real-time PCR we examined samples collected from the fields. We tested dry barley leaves collected from different localities in Slovak republic and also seed samples from Czech Republic, in which the presence of RCC was detected by microscope. In tested material we found the highest variability in pathogen DNA amount in dry leaves. Considerably lower amounts of pathogen DNA we found in 8 tested seed samples. Non-detectable amount of pathogen DNA was in control samples.
Today there are few studies about quantification of RCC. Pinnschmidt and Justesen (2009) in their study about artificial infection of barley genotypes with RCC in field conditions found the maximum attack between repetitions in range 20 – 40 %. For quantification of RCC in leaves they also used TaqMan probe.

Conclusion

In conclusion, this study has shown that RT-Q-PCR is an excellent tool for quantitative pathogen diagnosis and can also be used to accurately monitor the colonization and development of RCC in plants throughout a growing season. Described probe and primers have utilization in molecular biology and plant protection.

Acknowledgement: This work was supported by the by Science and Technology Assistance Agency under the contract APVV VMSP-P-0047-09 and Ministry of Agriculture of the Czech Republic, project No. QH91054 and QH71242.

Reference

AMELDUNG, D., SACHS, E., HUSS, H. (1999): Ramularia-Blattfleckenkrankheit der Gerste – eine neue Krankheit in Deutschland. In: Getreidemagazin, 1999, 99, pp. 47.

GUBIS, J., HUDCOVICOVA, M., KLCOVA L. (2008): First report of *Ramularia collo-cygni* in Slovakia. In: J. Plant Pathol., 2008, 90, pp. 149.

FREI, P., GINDRO, K., RICHTER, H., SCHÜRCH, S. (2007): Direct-PCR detection and epidemiology of *Ramularia collo-cygni* associated with barley necrotic leaf spots. In: Journal of Phytopathology, 2007, 155, pp. 281–288.

HAVIS, N.D., OXLEY, S.J.P., PIPER, S.R., LANGRELL, S.R.H. (2006): Rapid nested PCR-based detection of *Ramularia collo-cygni* direct from barley. In: FEMS Microbiol Lett, 2006, 256, pp. 217–223.

NYMAN, M., HAVIS, N.D., OXLEY, S.J.P. (2009): Importance of seed-borne infection of *Ramularia collo-cygni*. In: The 2nd European Ramularia Workshop „A new disease and challenge in barley production“, University of Edinburgh 7-8 April 2009, Edinburgh, Aspects of Applied Biology, 2009, 92, pp. 91-96.

PINNSCHMIDT, H.O., JUSTESEN, A.F. (2009): Methods for artificial inoculation of *Ramularia collo-cygni* on barley and quantitative disease assessment by real-time PCR. In: The 2nd European Ramularia Workshop „A new disease and challenge in barley production“, University of Edinburgh 7-8 April 2009, Edinburgh, Aspects of Applied Biology, 2009, 92, pp. 49-55.

SACHS, E. (2004): A ‘new’ leaf spot disease of barley, caused by *Ramularia collo-cygni*: diagnosis and comparison with other leaf spots. In: Meeting the Challenges of Barley Blights ed. Yahyaoui, A. H., Brader, L., Tekauz, A., Wallwork, H. and Steffenson, B. pp 365–369, Aleppo, Syria: Proceedings of the Second International Workshop on Barley Leaf Blights, (ICARDA), April 2002.

WALTERS, D.R., HAVIS, N.D., OXLEY, S.J.P. (2008): *Ramularia collo-cygni*: the biologyofan emerging pathogen of barley. In: FEMS Microbiol Lett, 2008, 279, pp. 1–7.

Adresa autorov:
Ing. Jozef Gubiš, PhD.; Mgr. Martina Hudcovicová, PhD. – Plant Production Research Center Piestany, Bratislavska cesta 122, 921 68 Piestany, Slovak Republic, e-mail: gubis@vurv.sk, hudcovicova@vurv.sk
Mgr. Leona Leišová-Svobodová, PhD. – Crop Research Institute, Drnovska 507, 161 06 Prague 6 – Ruzyne, Czech Republic, e-mail: leisova@vurv.cz
Mgr. Pavel Matušinsky, PhD. – Agricultural Research Institute Kromeriz, Havlickova 2787, 767 01 Kromeriz, Czech Republic, e-mail: matusinsky@vukrom.cz

REGENERAČNÁ SCHOPNOSŤ ODRÔD JAČMEŇA JARNÉHO PESTOVANÝCH NA SLOVENSKU
PLANT REGENERATION EFFICIENCY OF SPRING BARLEY CULTIVARS GROWN IN SLOVAKIA

Marcela GUBIŠOVÁ

The aim of experiment was to evaluate regeneration ability of modern agronomically important Slovak spring barley cultivars from immature embryos and to select cultivar which can be used for transformation experiments. According to our results, cv. Levan is the most recommended for following experiments, although had lower regeneration ability in comparison with the most widely used cv. Golden Promise.
Key words: barley cultivars, Hordeum vulgare, immature scutellum, in vitro regeneration

Úvod

Regenerácia celistvých rastlín z explantátov jačmeňa v *in vitro* kultúre je jedných z limitujúcich faktorov ovplyvňujúcich efektivitu genetickej transformácie. Jačmeň (*Hordeum vulgare* L.) je v explantátových kultúrach označovaný za rekalcitrantný druh, pričom schopnosť regenerácie je genotypovo závislá. Ako modelová odroda pre genetické transformácie sa používa odroda Golden Promise vyznačujúca sa dobrou regeneračnou schopnosťou. Pre praktické využitie genetickej transformácie a iných *in vitro* techník v šľachtení rastlín je však potrebné nájsť vhodnú lokálnu, ekonomicky výhodnú odrodu. Ďalšími významnými faktormi ovplyvňujúcim regeneráciu rastlín jačmeňa v *in vitro* kultúre je výber východiskového explantátu a zloženie živného média. Hoci viaceré typy explantátov sú použiteľné pre založenie *in vitro* kultúr jačmeňa (apikálne meristémy, nezrelé súkvetia, zrelé embryá, mikrospóry), nezrelé embryá boli prvé úspešne transformované a naďalej ostávajú najvyužívanejšími explantátmi pre genetické transformácie. Čo sa týka zloženia živného média, významné zvýšenie regeneračnej schopnosti sa pozorovalo zvýšením koncentrácie $CuSO_4$ v regeneračnom médiu (Castillo 1998) a zaradením medzikroku – živného média pre indukciu regenerácie s prídavkom BAP v kombinácii s 2,4-D (Cho et al. 1998). Na indukciu kalogenézy sa najčastejšie odporúča Dicamba, prípadne 2,4-D (Castillo et al. 1998; Cho et al. 1998; Harwood & Smedley 2009). Nakoľko Golden Promise je stará a pre naše podmienky absolútne nezaujímavá odroda, bolo cieľom experimentu vybrať spomedzi sledovaných lokálnych odrôd takú, ktorá sa vyznačuje dobrou regeneračnou schopnosťou v podmienkach *in vitro* s perspektívou jej využitia pri genetickej transformácii.

Materiál a metódy

Do experimentov boli zaradené vybrané slovenské odrody jačmeňa jarného pochádzajúce a poskytnuté z Hordeum s.r.o. Sládkovičovo povolené po r. 2002 a vyznačujúce sa vyhovujúcimi agronomickými vlastnosťami (vysoké a stabilné úrody, sladovnícka kvalita, dobrá odolnosť proti hubovým chorobám): Donaris, Ezer, Levan, Ludan, Nitran, Pribina, Sladar, odrody Orbit a Pax na základe ich popísanej dobrej regeneračnej schopnosti (Klčová et al. 2004) a modelový genotyp Golden Promise (GP). Nezrelé semená jednotlivých genotypov boli odoberané 14-18 dní po antéze a sterilizované v 4 % NaOCl (SAVO). Zo sterilizovaných semien boli asepticky odoberané nezrelé štítky (192 explantátov/odroda), ktoré boli nasádzané na kalus indukujúce živné médium (BCIm), po 4 týždňoch prenesené na médium pre indukciu regenerácie (Jt) a napokon po 2 týždňoch na regeneračné médium (Jr) podľa metodiky Harwood a Smedley (2009) modifikovanej zvýšeným obsahom $CuSO_4$ v BCI médiu. Zloženie živných médií je popísané v tabuľke 1. Indukcia kalogenézy prebiehala v tme pri 25°C, regenerácia pri fotoperióde 16h svetlo / 8h tma a teplote 25/20°C. V regeneračnom experimente bola hodnotená frekvencia kalogenézy (%) a regenerácie (%), počet regenerantov na regenerujúci kalus a efektivita regenerácie vyjadrená počtom regenerantov na nasadený explantát po 3 týždňoch na regeneračnom médiu. Dáta boli spracované jednofaktorovou analýzou rozptylu ANOVA a následným testom LSD (α=0,05). Percentuálne dáta boli pred analýzou transformované $\arcsin\sqrt{x}$.

Výsledky a diskusia

Podľa výsledkov znázornených v tabuľke 2 sa frekvencia kalogenézy pri všetkých genotypoch blížila k 100%. Pri frekvencii regenerácie a počte regenerantov na regenerujúci, resp. nasadený explantát boli zistené štatisticky významné rozdiely. Frekvencia regenerácie sa pohybovala v rozmedzí 24,13% pri odrode Orbit až 83,68% pri odrode Golden Promise. Odroda Orbit bola na základe výsledkov skupiny Klčová et al. (2004) vybraná ako dobre regenerujúca odroda, ale podľa našich výsledkov patrila medzi najslabšie regenerujúce aj pri hodnotení efektivity regenerácie, t.j. počte regenerantov na nasadený explantát. Slabšiu regeneračnú schopnosť odrody Orbit popisujú aj Halámková et al. (2004) a Šerhantová et al. (2004). Pri odrode Pax (predtým Kosan) popisujú Halámková et al. (2004) priemernú regeneračnú schopnosť, čo sme potvrdili aj v našom experimente. Odroda GP štandardne vykazovala najlepšie výsledky pri všetkých hodnotených parametroch a štatisticky sa líšila od ostatných odrôd. Z novo testovaných odrôd najlepšie regenerovala odroda Levan, prípadne Pribina, ktoré sa signifikantne odlišovali v počte regenerovaných

výhonkov na regenerujúci kalus od ostaných odrôd. Pri zhodnotení efektivity regenerácie sa len odroda GP štatisticky líšila od ostaných odrôd, najlepšie hodnoty z nich opätovne dosahovala odroda Levan (1,48 výhonku na nasadený explantát v porovnaní s 2,39 pri GP).

Tabuľka 1: Zloženie živných médií; [a] 3,6-dichlór-o-anízová kys., [b] 2,4-diclórfenoxyoctová kys., [c] 6-benzylaminopurín

BCIm	Jt	Jr
4,3 g l^{-1} MS (Murashige a Skoog, 1962) soli (Duchefa) 30 g l^{-1} maltóza 1 g l^{-1} kazeín hydrolyzát 1,25 mg l^{-1} CuSO4.5H2O 350 mg l^{-1} myo-inozitol 690 mg l^{-1} prolín 1 mg l^{-1} tiamín HCl 2,5 mg l^{-1} Dicamba [a] 3,5 g l^{-1} Gelrite	2,7 g l^{-1} modifikované MS soli bez NH4NO3 (Duchefa) 20 g l^{-1} maltóza 165 mg l^{-1} NH4NO3 1,25 mg l^{-1} CuSO4.5H2O 750 mg l^{-1} glutamín 100 mg l^{-1} myo-inozitol 0,4 mg l^{-1} tiamín HCl 2,5 mg l^{-1} 2,4D [b] 0,1 mg l^{-1} BAP [c] 3,5 g l^{-1} Gelrite	2,7 g l^{-1} modifikované MS soli bez NH4NO3 (Duchefa) 20 g l^{-1} maltóza 165 mg l^{-1} NH4NO3 750 mg l^{-1} glutamín 100 mg l^{-1} myo-inozitol 0.4 mg l^{-1} tiamín HCl 3,5 g l^{-1} Gelrite

Tabuľka 2: Regenerácia genotypov jarného jačmeňa z nezrelých štítkov

odroda	% kalogenézy		% regenerácie		Reg./RK [1]		Reg./NE [2]	
Donaris	100,00	*a*	64,48	*bc*	1,94	*b*	1,25	*b*
Ezer	100,00	*a*	56,99	*bc*	1,70	*b*	0,99	*b*
Levan	99,48	*a*	67,19	*bc*	2,13	*ab*	1,48	*b*
Ludan	99,48	*a*	69,76	*b*	1,68	*b*	1,31	*b*
Nitran	100,00	*a*	57,01	*bc*	1,94	*b*	1,26	*b*
Pribina	99,48	*a*	53,13	*bc*	2,28	*ab*	1,30	*b*
Sladar	98,44	*a*	57,81	*bc*	1,88	*b*	1,21	*b*
Orbit	100,00	*a*	51,13	*c*	2,02	*b*	1,02	*b*
Pax	99,48	*a*	57,81	*bc*	1,88	*b*	1,21	*b*
GP	100,00	*a*	83,68	*a*	2,75	*a*	2,39	*a*

[1]počet regenerantov na regenerujúci kalus, [2]počet regenerantov na nasadený explantát
a-c –štatisticky významné rozdiely, LSD test, α=0,05

Záver

Na základe získaných výsledkov môžeme pre ďalšie využitie pri genetickej transformácii zo slovenských odrôd odporučiť odrodu Levan, ktorá dosahovala uspokojivé výsledky pri všetkých hodnotených parametroch.

Poďakovanie: *Táto úloha bola podporená MP SR, projekt* „Agrobiotechnológie a molekulárna diagnostika ochorení vybraných hospodársky významných plodín“.

Literatúra

CASTILLO, A.M.; EGAÑA, B.; SANZ, J.M.; CISTUÉ, L. (1998): Somatic embryogenesis and plant regeneration from barley cultivars grown in Spain. Plant Cell Rep., 17: 902-906

HALÁMKOVÁ, E.; VAGERA, J.; OHNOUTKOVÁ, L. (2004): Regeneration capacity of calli derived from immature embryos in spring barley cultivars. Biologia Plantarum, 48 (2): 313-316

HARWOOD, W.A.; SMEDLEY, M.A. (2009): Barley transformation using biolistic techniques. In: Jones H.D. a Shewry, P.R. (eds.): Methods in Molecular Biology, Transgenic Wheat, Barley and Oats, vol. 478: 125-136

CHO, M.J.; JIANG, W.; LEMAUX, P.G. (1998): Transformation of recalcitrant barley cultivars through improvement of regenerability and decreased albinism. Plant Sci. 138:229–244

KLČOVÁ, L.; HAVRLENTOVÁ, M.; FARAGÓ, J. (2004): Cultivar and environmental conditions affect the morphogenic ability of barley *(Hordeum vulgare)* scutellum-derived calli. Biologia, Bratislava, 59: 501-504,

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. (1962): A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. Physiol. Plantarum, 15: 473–479.

ŠERHANTOVÁ, V.; EHRENBERGEROVÁ, J.; OHNOUTKOVÁ, L. (2004): Callus induction and regeneration efficiency of spring barley cultivars registered in Czech Republic. Plant Soil Environ., 50(10): 456-462

Adresa autorov:
Mgr. Marcela Gubišová, CVRV Piešťany, Výskumný ústav rastlinnej výroby Piešťany, Bratislavská cesta 122, 921 68 Piešťany, e-mail: gubisova@vurv.sk

EXPLANTÁTOVÁ KULTÚRA AKO NÁSTROJ PRE ROZMNOŽOVANIE *ARUNDO DONAX* L. – NETRADIČNEJ ENERGETICKEJ RASTLINY
EXPLANT CULTURE AS A TOOL FOR MULTIPLICATION OF *ARUNDO DONAX* L. – NONTRADITIONAL ENERGETIC PLANT

Marcela GUBIŠOVÁ – Jozef GUBIŠ – Alžbeta ŽOFAJOVÁ

The aim of this work was establishment of in vitro culture of Arundo donax L. (cv. Variegata), rooting of micropropagated shoots and acclimatization of plants to ex vitro conditions. Axillary buds taken from grass-blade were inoculated on MS media supplemented with 4 mg.l^{-1} BAP or TDZ in combination with 0.4 mg.l^{-1} NAA or IAA. Regarding to our results, BAP showed better multiplication activity than TDZ. No statistical differences were observed between auxins NAA and IAA. Up to 97 % of multiplicated shoots rooted in liquid MS medium and all plants survived after transplantation to soil.
Key words: Arundo donax, axillary bud, BAP, explant culture, giant reed, multiplication, Thidiazuron

Úvod

Arundo donax L. (trsteník obyčajný) patrí medzi vytrvalé trávy s potenciálom jeho využitia ako obnoviteľného zdroja energie. Okrem toho, že je aj okrasnou rastlinou, má mnohoraké využitie pri výrobe hudobných nástrojov, papiera a celulózy, udíc, chodeckých palíc, rohoží a stavebného materiálu. Tiež má význam pri redukcii erózie pôdy a je vhodný aj pre fytoremediáciu. Ajurvéda uznáva trsteník ako liečivú rastlinu s protirakovinovým účinkom, čo potvrdili Kaur et al. (2005), ktorí izolovali z rizómov tejto rastliny špecifický lektín s antiproliferatívnou aktivitou. Druh pochádza z východnej Ázie a napriek tomu, že kvitne aj v našich podmienkach, zriedka tvorí fertilné semená. Vegetatívne sa rozmnožuje rizómami, ale z dôvodu, že tvorba rizómov je pomalá, je zatiaľ jeho využitie na energetické účely v našich podmienkach limitované nedostatkom sadbového materiálu. Tento problém môže riešiť mikropropagácia rastlín v podmienkach *in vitro*. Mikropropagáciou trsteníka sa zaoberali Longsian et al. (1998), ktorí na mikropropagáciu použili MS médium s prídavkom 2-5 mg.l^{-1} BAP (6-benzylaminopurín) a 0,5-1 mg.l^{-1}IBA (kys. 3-indolylmaslová).

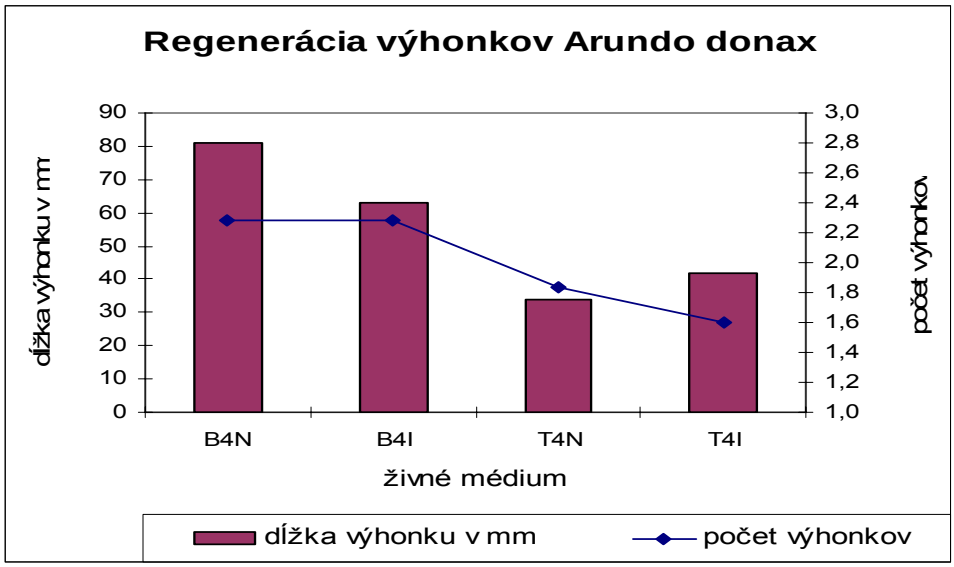
Cieľom experimentov bolo založenie *in vitro* kultúry z donorových rastlín *Arundo donax* cv. *Variegata* pre mikropropagáciu, zakorenenie výhonkov a aklimatizácia rastlín na *ex vitro* podmienky.

Materiál a metódy

In vitro kultúry *Arundo donax* cv. *Variegata* boli založené z axilárnych púčikov na steble odoberaných v marci 2010. Východiskový rastlinný materiál bol opláchnutý v etanole, následne sterilizovaný v 0,1% $HgCl_2$ (10 min.) a opláchnutý v sterilnej destilovanej vode. Nodálne segmenty o dĺžke 0,5 cm boli inokulované na živné médiá na báze MS (Murashige, Skoog 1962) s prídavkom 30 g.l^{-1}sacharózy, 2,5 g.l^{-1} Gelrite, cytokinínu BAP alebo TDZ (thidiazuron) v koncentrácii 4 mg.l^{-1} a auxínu NAA (kys. α-naftyloctová alebo IAA (kys. 3-indolyloctová) v koncentrácii 0,4 mg.l^{-1} NAA. Na zakoreňovanie bolo použité tekuté MS médium alebo pevné MS obsahujúce Gelrite a prídavok 0,4 mg.l^{-1} NAA a 1 g.l^{-1} aktívneho uhlia.

Výsledky a diskusia

Po 8 týždňoch od nasadenia explantátov bol hodnotený počet regenerujúcich výhonkov a dĺžka najdlhšieho výhonku. Pri zhodnotení regenerácie výhonkov z axilárnych púčikov na indukčných médiách sme zistili pozitívny vplyv BAP na tvorbu a multiplikáciu výhonkov. Výhonky lepšie regenerovali na živnom médiu obsahujúcom BAP v porovnaní s TDZ, kde bol pri dĺžke výhonkov zistený štatisticky významný rozdiel. Pri porovnaní vplyvu NAA a IAA nebol ani pri jednom znaku zistený štatisticky významný rozdiel. Z toho dôvodu bola v ďalšej pasáži používaná len NAA. Aj tu sme zistili po 5-tich týždňoch kultivácie vyšší počet výhonkov na živnom médiu s BAP – 2,9 oproti 2,45 výhonku / explantát na živnom médiu s TDZ, hoci rozdiel nebol štatisticky významný. Z toho dôvodu odporúčame na indukciu tvorby výhonkov pri zakladaní kultúr a multiplikácii výhonkov *Arundo donax* BAP. Longxian et al. (1998) rovnako použili na multiplikáciu výhonkov *Arundo donax* BAP, pričom v kombinácii s IBA udávajú multiplikačný koeficient 3,2-7, ktorý bol lepší, ak ponechávali pri subkultivácii 2 výhonky spolu. V našich experimentoch sme však tento fakt nepotvrdili. Taktiež Schwott (1999) odporúča živné médium s BAP v kombinácii s PAA (fenyloctová kyselina), udáva však problémy so zakoreňovaním výhonkov. Je známe, že rastové regulátory ovplyvňujú rast rastlín aj v nasledujúcich pasážach, rovnako aj ich zakoreňovanie, čo sa potvrdilo aj v našich experimentoch. Frekvencia zakoreňovania výhonkov bola na pevných živných médiách 60 % pri výhonkoch regenerovaných na živných médiách s BAP a 37,5 % pri výhonkoch zo živného média s TDZ. V tekutom MS médiu bez rastových regulátorov zakoreňovalo 97 % výhonkov pochádzajúcich z média s BAP a 90 % s TDZ. Prežívanie rastlín po presadení do pôdy a aklimatizácii na *ex vitro* podmienky postupným znižovaním vlhkosti bolo 100 %.



B4N – MS + 4 mg.l^{-1}BAP, 0,4 mg.l^{-1} NAA,
B4I – MS + 4 mg.l^{-1}BAP, 0,4 mg.l^{-1} IAA,
T4N – MS + 4 mg.l^{-1}TDZ, 0,4 mg.l^{-1} NAA,
T4I – MS + 4 mg.l^{-1}TDZ, 0,4 mg.l^{-1} IAA

Obr. 1: Regenerácia výhonkov *Arundo donax* cv. *Variegata* z axilárnych púčikov na živných médiách s prídavkom cytokinínov (BAP, TDZ) a auxínov (NAA, IAA):

Záver

Na základe našich experimentov môžeme odporučiť pre zakladanie *in vitro* kultúr *Arundo donax* cytokinín BAP, ktorý bol efektívnejší pri tvorbe nových výhonkov a je aj ekonomicky výhodnejšou alternatívou v porovnaní s TDZ. V ďalšom období by bolo vhodné stanoviť optimálnu koncentráciu BAP pre efektívnejšiu indukciu tvorby a multiplikáciu výhonkov v kombinácii s NAA a tiež porovnať efektivitu regenerácie z axilárnych púčikov a rizómov ako východiskového materiálu pre založenie *in vitro* kultúry. Keďže pri využití rizómov očakávame podľa predchádzajúcich skúseností vysokú frekvenciu kontaminácií, čo sťažuje zakladanie explantátových kultúr, javí sa indukcia výhonkov z axilárnych púčikov vhodnou alternatívou. Výhodou použitia axilárnych púčikov je dostupnosť materiálu počas celej sezóny (marec-október) bez nutnosti invazívnych zásahov do celistvosti rastliny.

Poďakovanie: *Táto úloha bola podporená MP SR, projekt „Využitie biotechnologických metód pri tvorbe nových typov rastlín“.*

Literatúra

KAUR, A.; SINGH, J.; KAMBOJ, S.S.; SEXANA, A.K.; PANDITA, R.M.; SHAMNUGAVEL, M. (2005): Isolation of an N-acetyl-D-glucosamine specific lectin from the rhizomes of Arundo donax with antiproliferative activity. Phytopathology 66(16):1933-40.

LONGXIAN, R.; SHIZHI, W.; YURONG, X. (1998): Nonwood Forest Research, 2, http://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTotal-JLYJ199802003.htm

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. (1962): A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. Physiol. Plantarum, 15: 473–479.

SCHWOTT, P. (1999): http://plant-tc.cfans.umn.edu/listserv/1999/log9910/msg00105.html

Adresa autorov:
Mgr. Marcela Gubišová, Ing. Jozef Gubiš, PhD., Ing. Alžbeta Žofajová, PhD., CVRV Piešťany, Výskumný ústav rastlinnej výroby Piešťany, Bratislavská cesta 122, 921 68 Piešťany, e-mail: gubisova@vurv.sk

CHARAKTERIZÁCIA GENOTYPOV KOLEKCIE ZRNA PŠENICE POMOCOU GLUTENÍNOV A GLIADÍNOV
CHARACTERIZATION OF GENOTYPES OF GRAIN WHEAT COLLECTION BY GLUTENINS AND GLIADINS

Edita GREGOVÁ – Svetlana ŠLIKOVÁ

High molecular weight glutenin and 1BL.1RS translocation employing the standard sodium dodecylsulphate (SDS-PAGE) and acid (A-PAGE) polyacrylamide gel electrophoresis method were classified in 24 wheat cultivars. There were observed 14 different HMW-GS encoded by 11 alleles or allelic pairs in genetic resources collection wheat genotypes. The most frequent HMW-GS alleles were "1" for Glu-1A, 7+8 for Glu-1B and 5+10 for Glu-1D, respecively. The Rye-score in the accessions varied in broad range, three of the genotypes (Bohemia, GK Hunyad and MV Suba) reached the maximum value 10.
Keywords: glutenin, gliadin, SDS-PAGE, A-PAGE

Úvod

Bielkovinová frakcia hrá najdôležitejšiu úlohu pri výrobe chleba. Hlavnými bielkovinami endospermu zrna pšenice tvoriacimi lepok sú gluteníny a gliadíny. Gluteníny sú kódované lokusom *Glu-1* lokalizovanom na dlhých ramenách chromozómov homeologickej skupiny 1 (*Glu-1A*, *Glu-1B*, *Glu-1D*). Lokusy majú podobu tzv. komplexných lokusov. Každý lokus obsahuje dva gény kódujúce x-typ podjednotky s nižšou relatívnou molekulovou hmotnosťou a y-typ podjednotky s vyššou relatívnou molekulovou hmotnosťou. Hexaploidná pšenica môže preto teoreticky obsahovať 6 rôznych HMW glutenínových podjednotiek. V skutočnosti, v dôsledku zoslabenia niektorých génov je počet HMW-GS päť a menej. Dokázané bolo, že jednotlivé podjednotky, resp. ich páry ovplyvňujú chlebopekársku kvalitu rôzne. Produkcia gliadínov je kontrolovaná hlavne alelami *Gli-1* a *Gli-2*, lokalizovanými na krátkych ramenách chromozómov homeologickej skupiny 1 a 6. Lokusy *Gli-1* kontrolujú expresiu všetkých ω-gliadínov, väčšiny γ-gliadínov a niektorých β-gliadínov. Lokusy *Gli-2* zase expresiu všetkých α-gliadínov, väčšiny β-gliadínov a niektorých γ-gliadínov.

Materiál a metódy

Pre elektroforetické analýzy zásobných bielkovín boli použité vzorky dodané z Génovej banky Piešťany, celkom 24 genotypov. Analýza profilov zásobných bielkovín zrna - gliadínov chromozómu 1B a glutenínov bola uskutočnená pomocou polyakrylamidovej gélovej elektroforézy v prítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE) a kyslej polyakrylamidovej gélovej elektroforézy (A-PAGE). Extrakciu glutenínov sme robili podľa štandardnej metódy ISTA (Wrigley 1992). Pre extrakciu v alkohole rozpustných bielkovín – prolamínov sme použili štandardnú referenčnú metódu ISTA v kyslom prostredí (Draper 1987). Bodová hodnota predikcie pekárskej akosti bola stanovená podľa publikovaných výsledkov (Payne & Lawrence 1983). Chlebopekársku akosť zrna vyjadruje bodové hodnotenie tzv. *ražné-skóre*, ktoré je odvodené od prítomnosti, resp. neprítomnosti špecifických vysokomolekulových glutenínov a *1B/1R* translokácie. Jej najvyššia hodnota môže byť 10.

Výsledky a diskusia

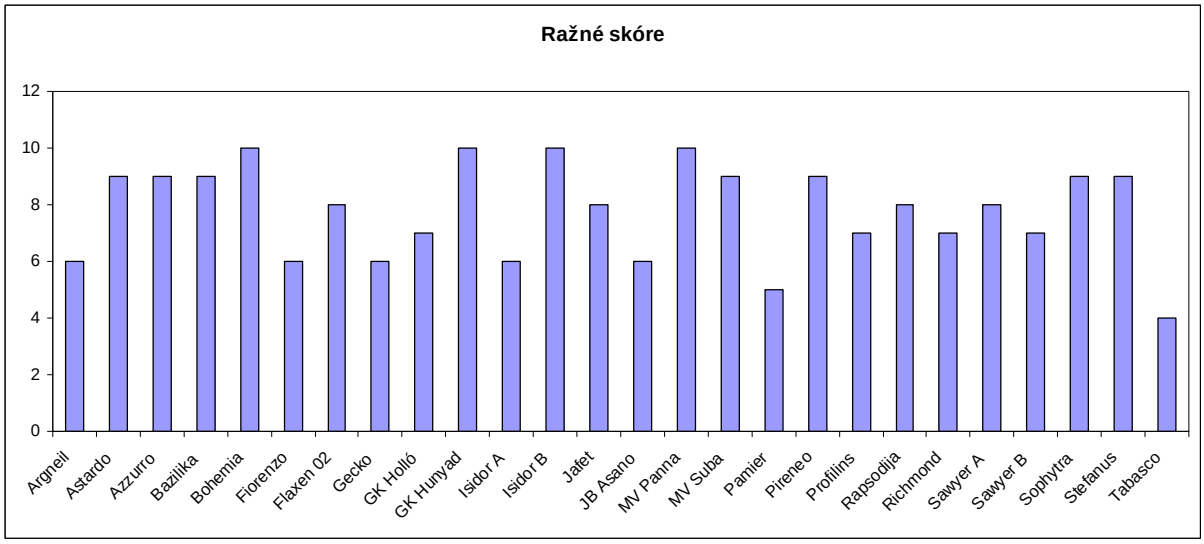
Výsledkami bielkovinových analýz sú údaje o prítomnosti jednotlivých HMW-GS resp. HMW-GS alel lokusov *Glu-1A*, *Glu-1B*, *Glu-1D*, ktoré kódujú a tiež údaj o prítomnosti resp. neprítomnosti hospodársky významného gliadínového bloku *Gli-1B3*. *1B/1R* translokácie však na chlebopekársku kvalitu nemajú priaznivý účinok. Cesto vyrobené z takejto múky je nežiaduco lepivé, čo spôsobuje technologické problémy vo výrobe. Bolo dokázané, že tento problém nespôsobuje koncentrácia ražných bielkovín, ale prítomnosť určitých typov ražných bielkovín – sekalínov, kódovaných génmi lokalizovanými na chromozóme 1R raže. Zvýšenú lepivosť cesta spôsobuje narušenie rovnováhy v zostave bielkovín. V odrodách s takouto translokáciou je znížená koncentrácia LMW-GS, kódovaných chýbajúcim chromozómom 1B, ktoré sú nahradené monomérnymi sekalínmi z 1R chromozómu raže. Odrody s 1B/1R translokáciou malú vyšší obsah bielkovín, ale štatisticky významne nižšiu SDS-sedimentačnú hodnotu. To, čo v dôsledku translokácie 1B/1R nevyhovuje pri výrobe chleba, teda zvýšená lepivosť cesta, nie je prekážkou pri výrobe pečiárenských a cukrárenských výrobkov. Pšenice používané pre tieto účely by mali mať dobrú výmelnosť múky, nízku koncentráciu bielkovín a nízku schopnosť viazať vodu. Vplyv na chlebopekársku kvalitu má aj kvantitatívne a kvalitatívne zastúpenie HMW-GS, teda počet a množstvo HMW-GS zastúpených v genotype. Genotypy so štyrmi HMW-GS majú oproti genotypom s piatimi HMW-GS asi o 2% nižší podiel HMW-GS na celkových bielkovinách zrna a tým aj nižšie zastúpenie vysokomolekulových glutenínových polymérov. Kvalitatívny vplyv na kvalitu múky vyplýva z rozdielov v štruktúre HMW-GS a ich schopnosti formovať polyméry s inými HMW-GS a LMW-GS. Jedným z faktorov kvality sú aj LMW-GS a ich interakcie s HMW-GS a gliadínmi. Za podjednotky s najpozitívnejším vplyvom na chlebopekársku kvalitu sa považuje pár HMW-GS 5+10. Podjednotky Glu 1A 1 a 2* sú lepšie ako Glu 1A 0, ale iba v kombinácii s Glu 1D 5+10. Alelický

blok Glu 1A 1, prítomný v 12 genotypoch, bol kombinovaný s Glu 1D 5+10 v 10 prípadoch. Väčšina genotypov, až 66,6 %, mala v lokuse Glu 1A podjednotky 2* alebo 1, t.j. vzťah k monitorovaniu lepšej pekárskej akosti. V hodnotenom súbore až 58,3 % genotypov malo priaznivú kombináciu Glu 1B 7+9, Glu 1B 7+8 resp. Glu 1B 17+18 a Glu 1D 5+10. Maximálnu hodnotu *ražného skóre* (10) dosiahli genotypy Bohemia, GK Hunyad, Mv Panna a Isidor línia B.

Záver

Elektroforetická analýza je odporúčanou, široko používanou a uznávanou metódou predikcie chlebopekárskej kvality pšenice na celom svete a je zaradená do šľachtiteľských programov. Využitie molekulárnych markerov umožňuje racionalizovať systém výberu genetických zdrojov do šľachtenia na kvalitu a rozšírenie genetickej diverzity v našich odrodách.

Poďakovanie: Tato štúdia vznikla vďaka podpore v rámci Operačného Programu Výskum a vývoj pre projekt: Vývoj nových typov rastlín s geneticky upravenými znakmi hospodárskeho významu ITMS: 26220220027, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.



Graf 1: Hodnotenie Ražné skóre v genetických zdrojov pšenice

Literatúra

DRAPER, S.R. (1987): ISTA variety committee report of the working group for biochemical tests for cultivar identification 1983-1986. Seed Sci. Technol., 15, 431-434.

PAYNE P. I., LAWRENCE G. A. (1983): Catalogue of alleles for the complex gene loci, Glu-A1, Glu-B1, and Glu-D1, which code for high-molecular-weight subunits of glutenin in hexaploid wheat. Cereal Res. Commun., 11: 29-34.

WRIGLEY C. W. (1992): Identification of cereal varieties by gel electrophoresis of the grain proteins. Heidelberg, Springer-Verlag, 17-41.

Kontaktná adresa autora :
Ing. EDITA GREGOVÁ, PhD., Centrum výskumu rastlinnej výroby Piešťany, Bratislavská 122, 921 68 Piešťany, Slovenská republika
Ing. SVETLANA ŠLIKOVÁ, PhD., Centrum výskumu rastlinnej výroby Piešťany, Bratislavská 122, 921 68 Piešťany, Slovenská republika
Tel: +421 33 7722311, e-mail : gregova@vurv.sk

VARIABILITA V OBSAHU β-D-GLUKÁNU V DRUHOCH RODU *AVENA*
VARIABILITY IN THE β-D-GLUCAN CONTENT IN *AVENA* SPECIES

Michaela HAVRLENTOVÁ – Svetlana ŠLIKOVÁ – Daniel MIHÁLIK

The aim of our work was to evaluate the variability of β-D-glucan in Avena species. In two consecutive years (2008 and 2009) genotypes of 8 Avena species (A. strigosa, A. abyssinica, A. ludoviciana, A. sterilis, A. byzantina, A. marphyi and A. sativa hulled and naked) were grown in the experimental fields of the CVRV. Using the commercial analytical kit by the cpmpany Megazyme, the content of β-D-glucan was determined. Our preliminary results indicate higher levels of monitored polysaccharide in warmer and drier year 2009 and in naked oat genotypes. A. strigosa, A. byzantina, A. abyssinica, and A. sterilis are suitable sources of β-D-glucan for the purpose of new plant material creation.
Key words: oat, Avena, β-D-glucan

Úvod

Rod *Avena* (skratka *A*.) má štyri genómy: A, B, C a D a genómové kombinácie AA, CC, AABB, AACC a AACCDD. Kultúrny ovos (*A. sativa* L.) je obilninou s dlhým genómom (1C DNA obsahuje približne 1,4 x 10^{10} bázových párov). Je to samoopelivý hexaploid so základným počtom chromozómov 7, ktorý pozostáva z troch základných genómov A, C a D. A a D sú si príbuzensky veľmi blízke a C je vzdialenejší.

Li a kol. (2000a; b) študovali 13 druhov rodu *Avena* a na základe výsledkov utvorili fylogenetický strom. Tvoria ho 3 základné vetvy: 1/ dva A-genómové diploidné druhy (*A. longiglumis* a *A. strigosa*), 2/ druh *A. abyssinica* (AABB) a 3/ tetraploidný *A. murphii* (AACC) a hexaploidné druhy. Autori predpokladajú nasledovnú cestu fylogenézy ovsa siateho:

- prvá cesta: *A. strigosa* (AsAs), *A. longiglumis* (A1A1) → *A. abyssinica* (AABB) a
- druhá cesta: *A. canariensis* (AcAc), *A. wiestii* (AsAs) → *A. maroccana*, *A. murphyi*, *A. insularis* (AACC), *A. barbata* (AABB) → *A. sterilis* → *A. sativa*, *A. byzantina* (AACCDD).

A. sterilis je viac rozšírený a vykazuje vyššiu variabilitu, Coffman (1946) ho považuje za pôvodcu kultúrnych druhov ovsa. *A. fatua* je pre kultúrny ovos zdrojom niektorých znakov ako sú odolnosť voči chladu a rezistencia voči chorobám. Na druhej strane, existujú dôkazy, že *A. fatua* má pôvod v *A. sterilis* (Leggett & Thomas 1995).

Záujem o kultúrny ovos siaty (*A. sativa L.*) sa zvyšuje, pretože vedecké práce neustále dokazujú jeho nutričný a dietetický význam. Americký vládny úrad pre výživu a liečivá v Rockville (Maryland, USA) v roku 1997 zaradil ovsené plevy medzi funkčné potraviny, pretože obsahujú ako štrukturálnu zložku β-D-glukán, ktorý významne znižuje hladinu cholesterolu v sére a pozitívne pôsobí na hladiny glukózy a inzulínu. Význam ovsenej vlákniny spočíva aj v prevencii mnohých civilizačných chorôb vrátane srdcovo-cievnych a onkologických.

Vývoj odrôd ovsa s vyšším podielom β-D-glukánu je významnou celosvetovou prioritou (Rampitsch et al. 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).

Materiál a metódy

V práci sme použili genotypy nasledovných druhov rodu *Avena*: *A. strigosa, A. abyssinica, A. ludoviciana, A. sterilis, A. byzantina, A. marphyi* a *A. sativa*. Rastlinné materiály boli vysiate v dvoch po sebe nasledujúcich rokoch (2008 a 2009) na pokusných plochách CVRV – Výskumný ústav rastlinnej výroby Piešťany. Po dozretí boli zrná vysušené a tesne pred analýzami boli pomleté na ultracentrifugačnom mlyne na hrúbku 0,5 mm.

Pomocou analytického kitu „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.) bol stanovený obsah β-D-glukánu. Metóda je odporúčaná AOAC (metóda 995.16), AACC (metóda 32-23) a ICC (štandartná metóda č. 168). Obsah β-D-glukánu bol prepočítaný na obsah sušiny, ktorá bola stanovená v deň analýzy na automatickom analyzátore.

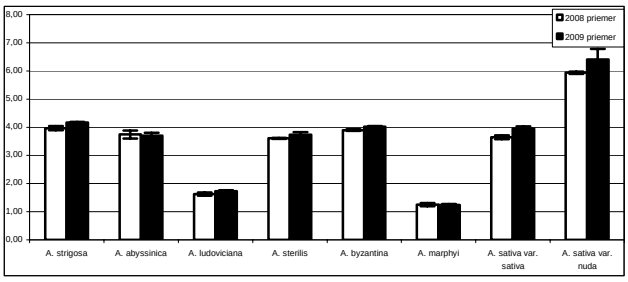
Výsledky a diskusia

Sledovaním priemerného obsahu hodnoteného súboru ovsov môžeme konštatovať, že v oboch hodnotených rokoch sme sledovali obdobný trend v obsahu β-D-glukánu (obr. 1), pričom rok 2009 sa vyznačoval mierne vyšším obsahom v danom polysacharide vo všetkých vzorkách okrem *A. abyssinica* a *A. marphyi*, rozdiely však boli nepatrné (o 0,03 % v prvom prípade a o 0,01 % v druhom). Naše výsledky poukazujú, že v roku 2009, ktorý sa vyznačoval vyššou priemernou teplotou počas vegetácie a nižším úhrnom zrážok v porovnaní s rokom 2008 (dáta neuvádzame), práve vyššia teplota a nižšie zrážky mohli byť príčinou vyššieho obsahu daného polysacharidu. Podobne aj iní autori zistili, že teplejšie a suchšie podmienky pestovania vedú k vyšším výťažkom β-D-glukánu v ovsenom zrne (Lazaridou et al. 2008;

Havrlentová 2009) a v zrne jačmeňa (Swanston 1995), čo súvisí so skutočnosťou, že vplyvom sucha dochádza k pretransportu látok v rastline smerom do zrna (Dupont & Altebach 2003).

Priemerný najvyšší obsah daného polysacharidu bol vo vzorkách nahých ovsov *A. sativa* (6,18 %). Z ďalších hodnotených materiálov rodu *Avena* bol trend nasledovný: *A. strigosa* (4,08 %) > *A. byzantina* (3,96 %) > *A. sativa var. sativa* (plevnaté druhy kultúrneho ovsa, 3,81 %) > *A. abyssinica* (3,73 %) > *A. sterilis* (3,68 %). Najnižšie obsahy sme sledovali vo vzorkách *A. ludoviciana* a *A. marphyi*, 1,68 a 1,25 %. Nie sú známe práce, ktoré by sledovali obsah daného polysacharidu v takom rozsahu druhov rodu *Avena*. Avšak čo sa týka kultúrnych ovsov, naše výsledky sú v zhode s výsledkami iných autorov (napr. Šterba 2002; Grausgruber et al. 2004). Swanston (1995) zistil, že zvýšený obsah β-D-glukánu je asociovaný s prítomnosťou nud génu pre bezplevnatý typ zrna. Podobný trend popísali aj iní autori (Faustnaught et al. 1996; Ehrenbergerová et al. 2003) v semenách jačmeňa.

Naše doterajšie výsledky ukázali, že materiály druhov *A. strigosa, A. byzantina, A. abyssinica* a *A. sterilis* sú vhodné ako potenciálna germaplazma pre tvorbu nových rastlinných materiálov ovsa siateho s vyšším obsahom zdraviu prospešného β-D-glukánu. Viac výskumu sa však plánuje realizovať na danej problematike.



Obr. 1: Priemerný obsah β-D-glukánu vo vzorkách druhov rodu *Avena* v dvoch po sebe nasledujúcich rokoch.

Poďakovanie: Táto štúdia vznikla vďaka podpore v rámci OP Výskum a vývoj pre projekt: Vývoj nových typov rastlín s geneticky upravenými znakmi hospodárskeho významu ITMS: 26220220027, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

COFFMAN, F. A. 1946. Origin of cultivated oats. In Journal of the American Society of Agronomy, roč. 38, s. 983-1002.

DUPONT, F. M., ALTENBACH, S. B. 2003. Molecular and biochemical impacts of environmental factors on wheat grain development and protein synthesis. In Journal of Cereal Science, roč. 38, s. 133-146.

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.

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.

HAVRLENTOVÁ, M. 2009. Variabilita v obsahu polysacharidovej bunkovej steny a v dĺžke mikrosatelitnej DNA ovsa siateho: doktorantská dizertačná práca. Nitra: UKF, 2009. 131 s.

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.

LEGGETT, J. M., THOMAS, H. 1995. Oat evolution and cytogenetics. In: WELCH, W.: The oat crop: Production and utilization. London : Chapman & Hall, s. 121-149.

LI, C. D., ROSSNAGEL, B. G., SCOLES, G. J. 2000a. The development of oat microsatellite markers and their use in identifying relationship among Avena species and oat cultivars. In Theoretical and Applied Genetics, roč. 101, s. 1259-1268.

LI, C. D., ROSSNAGEL, B. G., SCOLES, G. J. 2000b. Tracing the phylogeny of the hexaploid oat Avena sativa with satellite DNAs. In Crop Science, roč. 40, s. 1755-1763.

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.

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, textute 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 egroekologických podmínek na kvalitu bezpluchého ovsa : autoreferát dizertačnej práce. Školiteľ J. Moudrý. České Budejovice : Zemědelská fakulta Jihočeskej univerzity. 22 s.

Adresa autorov: RNDr. Michaela Havrlentová, PhD., Ing. Svetlana Šliková, PhD., Mgr. Daniel Mihálik, PhD., Centrum výskumu rastlinnej výroby Piešťany – Výskumný ústav rastlinnej výroby Piešťany, Bratislavská cesta 122, 921 68 Piešťany, Slovenská republika, havrlentova@vurv.sk, slikova@vurv.sk, mihalik@vurv.sk

OBSAH LIPIDOV A PROFIL MASTNÝCH KYSELÍN V SEMENE SLOVENSKÝCH ODRÔD MAKU (*PAPAVER SOMNIFERUM* L.)
LIPID CONTENT AND FATTY ACIDS COMPOSITION IN POPPY SEEDS OF SLOVAK ORIGIN (*PAPAVER SOMNIFERUM* L.)

Andrea HLINKOVÁ – Milan ČERTÍK – Michaela HAVRLENTOVÁ

The cultivation of poppy (Papaver somniferum L.) has a long-term tradition in the Slovakia. Slovak poppy was historically used for production of edible seed and consequently was this fact covered in breeding of poppy. From chemical point of view, poppy seeds contain 55% lipids, 25-30% proteins, vitamin E, F, and pantothenic acid, calcium, and phosphorus. The nutritional value of lipids depends on the content of mono- and poly-unsaturated fatty acids. Dominating acids are oleic, linoleic, palmitic, linolenic, and stearic. Profile of fatty acids is important in protection against the heart-vascular diseases in humans. The lipid content and fatty acids composition in 8 poppy-seed genotypes of Slovak origin registered on the List of Registered Species in the Slovak Republic were measured in this study. The lipid content ranged from 44.97% to 51.2%. The highest lipid content was in Bergam and the lowest one in Albín.
Key words: poppy seed, oil, fatty acids, lipid

Úvod

Mak siaty (*Papaver somniferum* L.) je v súčasnosti veľmi zaujímavou plodinou, ktorá prenikla na naše územie pravdepodobne pri sťahovaní národov v 4 – 5. storočí. Pôvod tejto plodiny siaha do Turecka, ale je pestovaná v mnohých krajinách ako India, Japonsko a Austrália najmä pre medicínske aplikácie. V súčasnosti sa oblasť pestovania maku orientuje najmä na farmaceutické využitie tejto olejniny z hľadiska obsahu alkaloidov. Druhou alternatívou je však konzumný potravinársky mak a pre tento účel sú naše odrody exportované najmä do Čiech, Maďarska a Ruska.

Makové semená majú vysokú nutričnú hodnotu a nakoľko nemajú narkotické účinky, používajú sa v pekárstve a cukrárstve. Mak je všeobecný názov pre jednotlivé druhy rodu *Papaver*, čelade makovitých *Papaveraceae.* Je to diploidná (2n= 2x=22) plodina, v subtropickej klíme je to jednoročná rastlina. Je prednostne samoopelivá (Kumar 2007), avšak 10-37 % predstavuje cudzie opelenie (Patra et al. 1992). Makový olej (*Oleum Papaveris seminis*) je mnohoúčelová surovina využívaná v ľudskej výžive z dôvodu jeho jedinečnej chuti a vône. Ozcana a Atalay (2006) poukazujú, že obsah oleja v makových semenách závisí od typu odrody a je v rozpätí od 32,4-45,5 %. Všeobecne sa však uvádza obsah oleja v maku okolo 50 % (Singh a kol., 1990). Obsah oleja je ovplyvnený farbou semena, Eklund a Agren (1975) dokumentovali, že biele odrody obsahovali 40 % oleja, zatiaľ čo modré obsahovali značne nižšiu hodnotu (33 %). Schopnosť oleja vysychať na základe obsahu nenasýtených mastných kyselín bola historicky využívaná v priemysle náterov a taktiež jeho potenciálne využitie ako pohonná látka pre dieselové motory je možnou technickou aplikáciou (Altin et al. 2001).

Nutričná hodnota lipidov je založená na zastúpení mono- a poly- nenasýtených mastných kyselín. Nergiz a Otles (1994) poukazujú, že kilogram oleja z maku obsahuje 891 g nenasýtených a 108 g nasýtených mastných kyselín, pričom olej obsahuje 50-60 % linolovej kyseliny, 30 % olejovej kyseliny a 6-9 % kyseliny palmitovej. Murphy (1993) poukazuje na pomer nenasýtených kyselín k nasýteným 2:1, prípadne pomer 1:1:1 (nasýtené, mononenasýtené a polynenasýtené mastné kyseliny). Azcan et al. (2004) poukazuje, že okrem vysokých obsahov kyseliny linolovej, palmitovej a olejovej obsahuje olej i veľmi malé množstvo kyseliny stearovej a linolénovej. Makové semeno môže byť vhodnou surovinou pre potravinársky priemysel práve z dôvodu vysokého obsahu linolovej kyseliny a nízkeho obsahu linolénovej, nakoľko tá je nežiadúca z dôvodu jej prítomnosti v procese autooxidácie, kedy vznikajú peroxidy mastných kyselín. Tieto procesy vznikajú mechanicky, napríklad poškodením semena pri zbere a spôsobujú nežiadúcu horkú chuť.

Semeno maku je surovina, ktorá predstavuje bohaté spektrum obsahových látok. Dominujúce sú okrem mastných kyselín i steroly (kampesterol, stigmasterol, sitosterol a 5-avenasterol), tokoferoly a tokotrienoly, skvalén, zvyšky po extrakcii sú taktiež bohatým zdrojom proteínov a sacharidov. Zlúčeniny 1-pentanol (s obsahom v zrne 3,3-4,9 %), 1-hexanal (10,9-30,9 %), 1-hexanol (5,3-33,7 %), 2-pentylfurán (7,2-10 %) a kyselina kapronová (2,9-11,5 %) boli identifikované ako hlavné prchavé látky vo všetkých skúmaných vzorkách makového oleja (Krist a kol., 2005). Ópium, čo v preklade znamená šťava (grécky opion) sa získava z narezaných toboliek nezrelých makovíc a obsahuje viac ako 50 % alkaloidov, hlavne morfínu, známeho pre svoj silný analgetický účinok. Z ostatných alkaloidov sú najvýznamnejšie kodeín a noskapín (antitusický účinok), tebaín a papaverín (smazmolytikum).

Syntéza a metabolizmus mastných kyselín sú veľmi komplexné procesy, zahrňujúce množstvo enzýmov a regulovaných dráh. Vo vyšších rastlinách sú PUFA (polynenasýtené mastné kyseliny) syntetizované prokaryotickými (chloroplast) i eukaryotickými (endoplazmatické retikulum) dráhami (Roughan et al. 1980, Browse et al. 1986). Syntéza ‹18C mastných kyselín v bunkovom matrixe prebieha za prítomnosti NADPH ako esenciálneho donoru vodíka prevažne z pentózofosfátového cyklu. Všetky rastlinné bunky produkujú mastné kyseliny z acetyl-CoA spoločnou dráhou lokalizovanou v plastidoch.

Nasýtené tuky a cholesterol reprezentujú najviac uznávaný rizikový faktor v našej strave, zatiaľ čo monoény a PUFA sú pravdepodobne najdôležitejšie lipidy, ktoré by mohli poskytovať zdraviu-prospešný, príp. preventívny terapeutický účinok, ak je ich príjem v potrave zvýšený. Prevládajúce zdroje n-3 mastných kyselín sú rastlinné oleje (ALA) a ryby (EPA a DHA). Majú pozitívny vplyv na aterosklerózu, ischemickú chorobu srdca, zápalové ochorenia, a pravdepodobne i na poruchy správania (Connor 1989). A práve tu sa otvára priestor aj pre využitie semena maku ako zdroja rastlinných mastných kyselín.

Materiál a metódy

Ako materiál sme použili 8 odrôd maku slovenského pôvodu, sedem modrosemenných (Opal, Major, Maratón, Malsar, Bergam, Gerlach, Lazur) a jednu bielosemennú (Albín), ktoré sú zapísané v Listine registrovaných odrôd SR pre rok 2009. Materiály boli vysiate na pokusných políčkach Výskumno-šľachtiteľskej stanice Malý Šariš a dodané v množstve cca 50 g. Vzorky boli následne uskladnené v chlade a tesne pred analýzou pomleté. Analýzy boli realizované v štyroch opakovaniach, pričom pre každú vzorku bola v deň analýzy stanovená suchá hmotnosť. Obsah lipidov sa stanovil extrakciou hexánom Soxhletovým extraktorom. Metóda je uznaná AOAC (Association of Official Analytical Chemists) ako štandardná metóda pre analýzu hrubého tuku. Vzorka bola najskôr pomletá, navážená v množstve 5 g a vložená do extrakčnej patróny a následne podrobená extrakcii v 100 ml hexánu v trvaní 12 hodín. Po skončení extrakcie bol extrakt prefiltrovaný cez bezvodý síran sodný do suchej a vopred zváženej banky. Rozpúšťadlo bolo odparené na rotačnej vákuovej odparke do sucha a z rozdielov hmotností sa stanovil percentuálny podiel lipidov vo vzorke. Z lipidov boli pripravené metylestery mastných kyselín (podľa postupu Christoperson & Glass 1969). Profil mastných kyselín bol realizovaný analyticky plynovou chromatografiou (GC6890 N, Agilent Technologies, kapilárna kolóna DB-23 a FID), ktorý bol vyhodnotený softvérom Chemstation B0103 na základe retenčných časov známych štandardov.

Výsledky a diskusia

Výsledky extrakcie lipidov poukazujú, že obsah lipidov v semenách maku varíroval v rozmedzí od 44,97-51,2%. Ozcana a Atalay (2006) dokumentujú obsah lipidov v rozpätí 32,4-45,5 % a taktiež sa uvádza všeobecný obsah lipidov v maku 50 % (Singh et al.1990). Obsah lipidov je závislý na farbe semena maku, čo potvrdili aj naše výsledky. Bielosemenná odroda obsahovala značne nižšie percento lipidov v porovnaní s modrosemennými odrodami. Tento výsledok je však v protiklade s výsledkom Eklund a Agren (1975), ktorí vyhodnotili vyšší obsah lipidov v bielosemenných odrodách v porovnaní s modrosemennými. Najvyšším obsahom celkových lipidov sa vyznačovala odroda Bergam (52,1 %), na druhej strane najmenej lipidov obsahovala bielosemenná odroda Albín (44,97 %). Poradie obsahu lipidov v ostatných odrodách bolo nasledovné: Gerlach (51,01 %) > Lazur (50,88 %) > Major (49,44 %) > Malsar (49,38 %) > Maraton (47,5 %) > Opal (46,32 %). Profil mastných kyselín bude zverejnený formou posteru priamo na konferencii.

Poďakovanie. Úloha bola realizovaná s finančnou podporou projektu „BIFUGEN - Biologická a funkčná diverzita genofondu rastlín pre zvýšenie pridanej hodnoty poľnohospodárskej produkcie“ zo zdrojov MP SR.

Literatúra

AZCAN, N., OZTUR, B., KALENDER, K., KARA, M. (2004): Chemistry of Natural Compounds, 40, 370
KUMAR, B. (2007): Study on genetic architecture of opium poppy (*Papaver somniferum* L.) in relevance to yield improvement. Ph.D. THESIS, Lucknow University, Lucknow, India.
NERGIZ, C., QTLES, S. (1994): Journal of the Science of Food and Agriculture, 66, 17
ÖZCANA, M. M., ATALAY, C. (2006): Grasasv Aceites, 57, 169
PATRA, N. K., RAM, R. S., CHAUHAN, S. P., SINGH, A. K. (1992): Theoretical and Applied Genetics, 84, 299
EKLUND, A., AGREN, G. (1975): Journal of the American Oil Chemists Society, 56, 188
ALTIN, R., CETINKAYA, S., YÜCESU, H. S. (2001): Energy Conversion and Management, 42, 529
MURPHY, D. J. (1993): Designer Oils Crops: Breeding, Processing and Biotechnology, Weinhein, Germany and New York, USA.
BROWSE, J., WARWICK, N., SOMERVILLE, C. R., SLACK, C. R. (1986): Biochemistry Journal, 235, 25
ROUGHAN, P. G., HOLLAND, R., SLACK, C. R (1980): Biochemistry Journal, 188, 17
CONNOR, W. E. (1989): American Journal of Clinical Nutrition, 49, 448
KRIST, S., STUEBIGER, G., UNDERWEGER, H., BANDION, F., BUCHBAUER, G. (2005): Journal of Agricultural Food Chemistry, 53, 8310

Adresa autorov:
RNDr. Andrea Hlinková, Katedra biotechnológií FPV UCM Trnava, Námestie J. Herdu 2, 917 01 Trnava, CVRV-VÚRV Piešťany, Bratislavská cesta 122, 921 68 Piešťany, hlinkova@vurv.sk; RNDr. Michaela Havrlentová, PhD., CVRV-VÚRV Piešťany, Bratislavská cesta 122, 921 68 Piešťany, havrlentova@vurv.sk, doc. Ing. Milan Čertík, PhD., Doc. Ing. Milan Čertík, PhD., Ústav biotechnológie a potravinárstva FCHPT STU Bratislava, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Milan.certik@stuba.sk.

RADIAČNÁ MUTAGENÉZA V ŠĽACHTENÍ LÁSKAVCA
RADIATION MUTAGENESIS IN AMARANTH BREEDING

Andrea HRICOVÁ – Monika KEČKEŠOVÁ – Zdenka GÁLOVÁ – Milan SUHAJ – Gabriela LIBIAKOVÁ – Alena GAJDOŠOVÁ

The aim of our work was to improve by radiation mutagenesis two selected amaranth cultivar - Amaranthus cruentus „Ficha“ and hybrid „K-433“.We analyzed and compared amaranth mutant lines obtained by radiation with controls on the base of some biochemical traits and have found several lines to be promising. Four lines (C82/1, D279/1, C15/3, C27/5) showed higher coefficient of nutritive quality in comparison with controls. Oxalic acid as an antinutritional factor was lowest in D282/1 followed by C236/1.Considering overall nutritional values, line C82/1 is most promising mutant line that could be used in breeding program.
Key words: amaranth, mutagenesis, nutrition quality, protein fractions,SDS PAGE, oxalic acid

Úvod

V súčasnosti sa veľká pozornosť venuje obnoveniu záujmu o podceňované druhy, medzi ktoré patria aj pseudocereálie. V porovnaní s konvenčnými obilninami sa pseudocereálie, medzi ktoré patrí aj láskavec (*Amaranthus* L.), vyznačujú vysokým podielom nutrične plnohodnotných protoplazmatických bielkovín a ich najväčší význam spočíva v tom, že je ich možno využiť pri bezlepkovej diéte. Semená láskavca majú tiež vysoký obsah bielkovín, škrobu, tukov a sú významným zdrojom vitamínov, minerálnych látok a vlákniny.

Ciele v šľachtení láskavca sú podobné ako pri obilninách, zamerané najmä na zvýšenie odolnosti voči biotickým a abiotickým faktorom a stabilizáciu príp. zvýšenie úrod. Cieľom práce bolo pomocou radiačnej mutagenézy zlepšiť dve vybrané odrody láskavca a na základe niektorých biochemických ukazovateľov vyhodnotiť nutričnú kvalitu semien získaných mutantných línií a porovnať ju s neožiarenými formami.

Materiál a metódy

Semená dvoch genotypov *A. cruentus* „Ficha“ a hybrida „K-433“, pochádzajúceho z medzidruhovej hybridizácie *A. hypochondriacus x A. hybridus* (GB VÚRP, ČR), boli ožiarené dávkou 175 Gy (Gajdošová et al., 2007). V poľných experimentoch bolo založených 10 mutačných generácií, niektoré na dvoch lokalitách Slovenska (Nitra, Malý Šariš). Počas jednotlivých vegetačných období boli uskutočňované fenologické pozorovania a pozitívna selekcia rastlín pre žiadané morfologické vlastnosti a HTS.

Pre vyhodnotenie nutričnej kvality sme na základe štatistického vyhodnotenia HTS vybrali 9 mutantných línií, ktorých semená sme následne analyzovali a porovnávali s 2 kontrolnými, neožiarenými formami.

Celkový obsah dusíka sme stanovili podľa Kjeldahla, frakčnú skladbu bielkovín podľa Golenkova (ICC metóda) a percentuálne zastúpenie hrubých bielkovín sme vypočítali z obsahu dusíka vynásobeného prepočítavacím koeficientom (% N x 5,7). Zo zastúpenia bielkovinových frakcií sme určili koeficient nutričnej kvality - KNK [((albumíny + globulíny + zvyšok)/gliadíny)x 100]. Elektroforetickú separáciú zásobných bielkovín sme uskutočnili v systéme diskontinuálnej SDS-PAGE podľa modifikovanej metodiky ISTA (Wrigley, 1992). Ako štandardy sme použili odrody pšenice letnej Marquis a Chinese Spring. Načítané bielkovinové gély sme vyhodnotili pomocou dokumentačného a vyhodnocovacieho systému Grab-It a GelWorks 1D pre Windows a štatistické vyhodnotenie sme realizovali pomocou programu Statgraphic 5.0.

Obsah kyseliny šťavelovej ($mg.kg^{-1}$) sme stanovili metódou kapilárnej izotachoforézy (Karovičová et al. 2007). Na štatistickú analýzu celkových výsledkov sme použili multivariačnú štatistickú metódu hlavných komponentov pomocou programu Unistat® v. 5.6 (Unistat Ltd., London, England).

Výsledky a diskusia

Výsledkom radiačnej mutagenézy je zbierka mutantných línií s preukazne zvýšenou HTS, ktorú považujeme na základe výsledkov analýz desiatich mutačných generácií za geneticky fixovaný znak (Gajdošová et al. 2008).

Pri hodnotení nutričnej kvality semena je dôležitý obsah bielkovín, ktorý bol v analyzovaných vzorkách mutantov o 4,6% menej oproti kontrole. Najvyšší obsah hrubých bielkovín dosiahla línia D54/1 (13,6 %), naopak najnižší bol stanovený v línii C26/2 (10 %). Pri hodnotení koeficienta nutričnej kvality, ktorý má výpovednú hodnotu vo vzťahu k výživnej kvalite semena, možno konštatovať, že jeho priemerná hodnota bola vo vzorkách mutantov o 4% nižšia v porovnaní s kontrolami. Štyri línie (C82/1, D279/1, C15/3, C27/5) dosiahli v porovnaní s neožiarenými formami semien vyššiu hodnotu. Na základe uvedeného možno semená analyzovaných línií hodnotiť ako semená s porovnateľnou až vyššou výživnou kvalitou v porovnaní s kontrolou.

Láskavec, tak ako aj väčšina pseudocereálií, sa v porovnaní s konvenčnými obilninami vyznačuje vysokým podielom nutrične plnohodnotných albumínov a globulínov a súčasne nízkym podielom zásobných bielkovín glutelínov a prolamínov (Bressani et al. 1990; Michalík et al. 2006). Z našich výsledkov vyplýva, že obsah albumínov a globulínov sa pohyboval v rozmedzí od 48,93 % do 59,54 %, čo je o 1,4% menej v porovnaní s kontrolou. Tri línie (C15/3, C27/5, C82/1) dosiahli oproti kontrole vyššiu hodnotu. Na druhej

strane zastúpenie neplnohodnotných zásobných bielkovín sa pohybovalo v rozsahu od 30,29 % do 37,43 %, čo je o 6,3 % viac oproti neožiarenej kontrole. Podľa Muchovej et al. (2000), Michalíka et al. (2006) a ďalších, obsah zásobných bielkovín v semenách láskavca je v porovnaní so pšenicou v priemere o 50 % nižší. Zastúpenie frakcie prolamínov bolo v semenách v priemere 3,3 %, čo je v súlade so závermi Michalíka et al. (2006), ktorý stanovil ich obsah v kolekcii láskavca v priemere 2,93 %, čo vyhovuje potrebám pre prípravu potravín bezlepkovej diéty.

Elektroforetickou separáciou zásobných bielkovín sme identifikovali vysokomolekulárne a nízkomolekulárne gluteníové podjednotky, z ktorých je možné detegovať rôzne vlastnosti genotypov. Zastúpenie vysokomolekulárnych gluteníových podjednotiek, ktoré ovplyvňujú technologickú kvalitu semena, bolo v líniách o 0,24 % viac v porovnaní s kontrolami. V zastúpení nízkomolekulárnych gluteníových podjednotiek línie C 26/2, C27/5, C 236/1 a D 279/1 dosiahli oproti kontrole vyššiu hodnotu.

Celkovo možno konštatovať, že nutričná kvalita mutantných línií sa v porovnaní s neožiarenými formami vplyvom mutagenézy významne nezvýšila. Najzaujímavejšou zo získaných línií je línia C82/1, ktorá dosiahla najvyššiu nutričnú hodnotu v porovnaní s ožiarenými ako aj neožiarenými vzorkami. Uvedené je v súlade s prácou Gálovej et al. (2006), ktorá študovala vplyv chemomutagénu N–nitrozo-N-etylmočoviny na zrno pšenice Astella, pričom priemerný obsah albumínov, globulínov a gliadínov bol vyšší v porovnaní s nemutovanou vzorkou, kým percentuálne zastúpenie gluteníov bolo nižšie.

Dôležitým ukazovateľom výživovej hodnoty je aj obsah kyseliny šťaveľovej, ako jedného z hlavných antinutričných faktorov, pričom nežiaduce sú jej rozpustné formy, ktoré v organizme s Ca^{2+} tvoria nerozpustné soli ukladajúce sa v obličkách. Metódou hlavných komponentov sme vyhodnotili vplyv rozpustných foriem oxalátov na diferenciáciu vzoriek, pričom oxaláty mali zo všetkých deskriptorov najväčší vplyv na rozlíšenie vzoriek. Zníženie obsahu oxalátov v mutantoch sa prejavilo významnou segregačnou transpozíciou takmer všetkých vzoriek mutantov v porovnaní s kontrolnými vzorkami. Najnižší obsah bol stanovený v líniách C236/1 a D282/1, a bol znížený oproti kontrolám o viac ako 50, resp. 70 %.

Záver

Na základe predbežných výsledkov je možno konštatovať, že sme z nutričného hľadiska získali pomocou indukovanej radiačnej mutagenézy niekoľko zaujímavých línií láskavca. Najvýznamnejšie sa vplyv radiácie prejavil v mutantnej línii C82/1, v ktorej sme zistili v porovnaní s neožiarenými formami vyšší koeficient nutričnej kvality ako aj vyšší podiel albumínov a globulínov, ktoré sa vyznačujú optimálnym zložením esenciálnych aminokyselín a charakterizované sú ako plnohodnotné frakcie bielkovín. Dve línie (C236/1 a D282/1) majú významne nižší obsah rozpustných oxalátov, ktoré predstavujú v semenách nežiaduci antinutričný faktor.

Z hľadiska využitia mutagenézou získaných línií v šľachtiteľskom programe láskavca, sa v ďalšom štúdiu budeme zaoberať ich detailnejšou charakteristikou a získaním poznatkov o iných dôležitých biochemických vlastnostiach ako je obsah vitamínov A, C, E, ako najdôležitejších antioxidantov, zastúpenie aminokyselín, obsah skvalénu či profil lipidov v semenách.

Poďakovanie: Táto práca bola riešená v rámci grantovej výskumnej úlohy VEGA č. 2/0109/09 a VEGA č. 1/0471/09.

Literatúra

BRESSANI, R. – GARCIA-VELA, L.A. 1990. Protein fractions in amaranth grain and their chemical characterization. In *J.Agric. Food Chem*., vol. 38, pp. 1205-1209.

GAJDOŠOVÁ, A. et al. Improvement of selected Amaranthus cultivars by mean of mutation induction and biotechnological approaches. *In* Ochatt, S., Jain, S.M. *Breeding of neglected and under-utilized crops, spices, and herbs*. Dijon: INRA, 2007. ISBN 10: 1578085098, pp. 151–169.

GÁLOVÁ, Z. – ŠVEC, M. – CHŇAPEK, M. 2006. Cielená mutagenéza vo vzťahu ku kvalite bielkovín zrna pšenice letnej. In *Sborník vedeckých prác Výživa zvierat 06 - Proteiny.* Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, s.72-75. ISBN 80-7157-954-8.

KAROVIČOVÁ, J. et al. Stanovenie náhradných sladidiel a doznievanie sladkej chuti nealkoholických nápojov. In Chem. Listy, ISSN 0009-2770, 2007, roč.101, č. 02, s. 171–175.

MICHALÍK, I. et al. *Výživná a technologická kvalita rastlinných produktov a ich potravinárske využitie*. 1. vyd. Nitra: SPU, s. 8–98. ISBN 80-8069-780-9.

WRIGLEY, C. W. 1992. Identification of cereal varieties by gel electrophoresis of the grain proteins. In *Seed Analysis*, 1992, s. 17 – 41

Adresa autorov:
Andrea Hricová, Gabriela Libiaková, Alena Gajdošová, Ústav genetiky a biotechnológií rastlín SAV, Akademická 2, 950 07, Nitra, e-mail: andrea.hricova@savba.sk
Monika Kečkešová, Zdenka Gálová, FBP SPU v Nitre, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra
Milan Suhaj, Výskumný ústav potravinársky, Priemyselná 4, 824 75 Bratislava

VÝZNAM RASTOVEJ ANALÝZY V SKRÍNINGU GENOTYPOV KAPUSTY REPKOVEJ PRAVEJ
GROWTH ANALYSIS IMPORTANCE IN RAPESEED OIL GENOTYPES SCREENING

Miroslav JANČICH – Elena HUNKOVÁ – Eleonóra KRIVOSUDSKÁ – Jana FERENCOVÁ

Breeders all over the world are atempting to find high yield rapeseed genotypes. It is important to get information about correlation between plant habitus and economic yield. It is possible to describe winter rapeseed growth periods by precise calculation some of growth parameters. That can be useful in relation to seed yield. By now, we can allege that there is no agreement between autors in habitus components assesment in relation to yield. Only relation of 1000-seed weight and number of pods per plant to yield is well known.
Key words: growth analysis, genotype selection, number of pods, seed yield,

Úvod

Šľachtitelia sa pri danej rastline zaujímajú v pokusoch o komplex vlastností daného genotypu, ktoré sú výsledkom množstva faktorov. Porozumenie vzťahov medzi úrodou a jej komponentmi je najdôležitejším faktorom v smerovaní k optimálnemu využitiu týchto informácií (Sarawgi et al. 1997). Množstvo celkovej sušiny plodiny je priestorovým a časovým prepojením všetkých procesov v rastline a preto je sušina najrelevantnejším parametrom porastu plodiny. Rýchlosť akumulácie sušiny sa mení počas životného cyklu plodiny. Rovnako sa mení aj listová plocha, ktorá je buď výsledkom pôsobenia environemntálnych činiteľov alebo genotypových rozdielov medzi jednotlivými kultivarmi. Základnými vstupnými údajmi pre rastovú analýzu sú listová plocha a hmotnosť sušiny, resp. hmotnosť sušiny vybraných častí rastlinného habitusu, z ktorých je možné vypočítať rastové parametre. V tabuľke 1 uvádzame vybrané používané parametre. (Tuncturk a Vahdetin 2007).

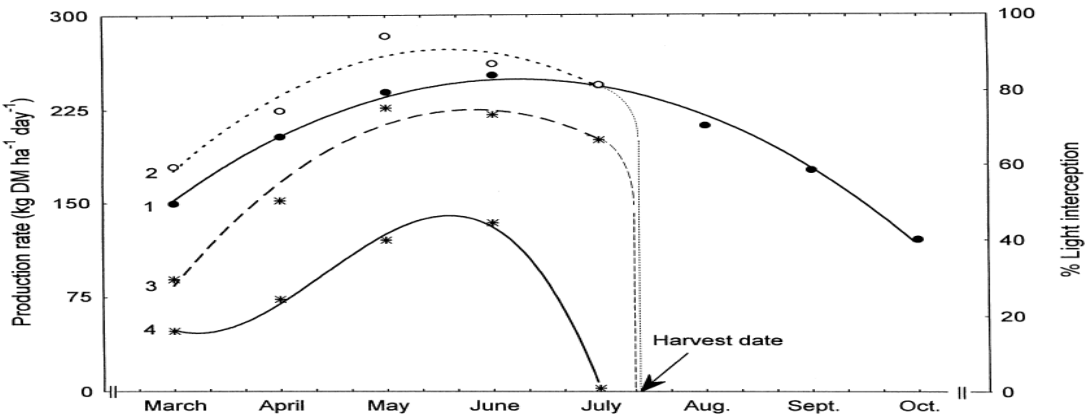
Tabuľka 1: Vybrané rastové parametre

Parameter	Symbol	Jednotka
Rýchlosť rastu porastu	CGR	g (plodina).m^{-2} d^{-1}
Index listovej pokryvnosti	LAI	m^2 (list).m^{-2} (jednotková plocha pôdy)
Špecifická listová plocha	SLA	m^2 (list). g^{-1} (list)
Relatívna rýchlosť rastu	RGR	g (plodina). g^{-1} (plodina). d^{-1}
Rýchlosť čistej asimilácie	NAR	g (plodina). m^{-2} (list). d^{-1}

Materiál a metódy

Teoreticky má model rýchlosti rastu porastu repky olejnej tvar sigmoidnej krivky. Z nej možno odčítať tri základné fázy (exponenciálny rast, konštantná rýchlosť akumulácie sušiny a fáza klesajúcej rýchlosti rastu). Nárast LAI a teda aj nárast hmotnosti sušiny sa proporcionálne premieta v hodnote rýchlosti čistej asimilácie na jednotku listovej plochy. Počas prvej fázy vývoja porastu vedie nárast hodnoty LAI ku nárastu rýchlosti akumulácie sušiny. Rýchlosť akumulácie sušiny sa stáva konštantnou v momente, keď zmena v LAI neovplyvňuje absorbanciu žiarenia-fáza konštatného rastu. Najvhodnejším parametrom na popísanie rastu v tejto fáze je CGR. Pôsobenie abiotických stresorov na rastlinu spôsobuje redukciu tohto parametra. Keďže CGR je počas tejto fázy relatívne konštantné, je aj akumulácia sušiny priamoúmerná dĺžke tejto periódy. V konečnej fáze ontogenézy klesá denný prírastok sušiny v dôsledku funkčnej aj vizuálnej senescencie fotosyntetických orgánov (Maiorana et al. 1997).

S uvedenými ukazovateľmi možno spájať i ďalšie údaje, ktoré sa získavajú pri primárnom zbere údajov pre rastovú analýzu. Sheikh et al. **(**1997) našiel významný vzťah medzi úrodou semien a primárnymi a sekundárnymi odnožami, hmotnosťou semien a šešúľ na rastlinu. Tento záver sa zhoduje s Özerom et al. (1999). Avšak počet semien na šešuľu, priemer šešúľ a dĺžka šešúľ nie sú podľa uvedeného autora vhodným selekčným kritériom. Rovnako ďalší autori (Algan & Aygün 2001; Çalışkan et al. 1998) sa zhodujú, že najvhodnejším kritériom na selekciu je zberový index, počet šešúľ na rastlinu, hmotnosť tisíc semien. V počte semien na šešuľu nepanuje medzi autormi zhoda.



Obr. 1: Potenciálna rýchlosť produkcie sušiny (krivka 1), percentuálne vyjadrenie intercepcie svetla porastom (krivka 2), kalkulované CGR (krivka 3) a reálne CGR (krivka 4) repky olejnej ozimnej v hercýnskom regióne v centrálnom Nemecku (Diepenbrock 2000).

Záver

Presným kalkulovaním vybraných rastových parametrov je možno popísať rastové fázy repky olejnej formy ozimnej. Tento poznatok je využiteľný vo vzťahu k tvorbe asimilátov a ich alokácii tak v čase ako aj v rámci rastlinného habitusu. Podnes nebola medzi autormi dosiahnutá zhoda v názoroch na väčšinu komponentov ovplyvňujúcich úrodu repkového semena. Za doriešený je považovaný jedine vzťah zberového indexu a počtu šešúľ na rastlinu k úrode. Sú považované za pozitívne úrodotvorné komponenty. Šľachtitelia repky olejnej by sa okrem ďalších významných selekčných kritérií, ktoré môžeme súhrnne nazvať odolnosť voči environmentálnym stresorom, mali zamerať na výber genotypov s uvedenými vlastnosťami.

Literatúra:

ALGAN, N. , AYGÜN, H. (2001): Correlation between yield and yield components in some winter rape genotypes (In Turkish). The journal of Ege University, Agricultural Faculty, 38(1): s.9.

ÇALIŞKAN, M.E. , MERT, M.A. , İŞLER, N. (1998): Important agronomic characters of some rapeseed cultivars and effects of these characters on yield formation in Hatay ecological conditions. J. Agricultural Faculty MKU, 3(2): s. 127

DIEPENBROCK, W. (2000): Yield analysis of winter oilseed rape (*Brassica napus* L.): a review. Field Crops Research 67: s.35

MAIORANA, M. , STELLUTI M, A. , FERRI, D. (1997): Functional analysis of dry matter accumulation in pure artificial meadows. In: 9. Meeting of the Mediterranean Sub-Network of the FAO-CIHEAM Inter-Regional Cooperative Research and Development Network on Pastures and Fodder Crops, Badajoz (Spain), 26-29 Nov 1997

ÖZER, H. , ORAL, E. A. , DOĞRU. Ü. (1999): Relationships between yield and yield components on currently improved spring rapeseed cultivars. Tr. J.of Agriculture and Forestry, 23: s.603

SHEIKH, F.A. , RATHER A.G. , WANI, S.A. (1999): Genetic variability and inter-relationship in toria (Brassica campestris L. var. Toria). Advances in Plant Sciences, 12(1): s.139

TÜNCTÜRK, M. , VAHDETIN, C. (2007): Relationship between yield and some yield components in rapeseed (Brasica napus) by using correlation and path anlysis. Pakistan Journal of Botany 39(1): s.81

Adresa autorov:
Ing. Miroslav Jančich, Ing. Elena Hunková PhD. , Ing. Eleonóra Krivosudská PhD., Ing. Jana Ferencová
Katedra fyziológie rastlín, Fakulta agrobiológie a potravinových zdrojov Slovenskej poľnohospodárskej univerzity v Nitre, Trieda A. Hlinku 2 946 76 Nitra

ARCHITEKTÚRA PORASTU KAPUSTY REPKOVEJ PRAVEJ VYJADRENÁ PROSTREDNÍCTVOM VYBRANÝCH RASTOVÝCH PARAMETROV
OILSEED RAPE CROP ARCHITECTURE DESCRIBED BY SOME GROWTH PARAMETERS

Miroslav JANČICH – Marek ŽIVČÁK – Marek KOVÁR – Stanislav UHLIAR – Elena HUNKOVÁ – Ľubica MALOVCOVÁ

Oilseed rape became a one of the most important oilseed crop. Improving in crop architecture is one of the tools how to get higher yields. Leaf area index and other growth parameters are helpful. Two varietes of oilseed rape were grown under the the same condition. One variety, wich reached optimum LAI much sooner than another had higher yield. We investigated if sooner reached optimum LAI influences yield quantity.
Key words: LAI, CGR, oilseed rape, yield

Úvod

Repka olejná je najdôležitejšia olejnina, ktorá musí na poli ekonomiky produkcie súťažiť s obilninami a preto je potrebné do budúcnosti výrazne zvýšiť jej úrodnosť. Intenzívny rast listovej plochy začína v jarnom období už začiatkom apríla. Tieto údaje uvádzajú viacerí autori (Diepenbrock 2000; Kostrej 1998). Určenie optimálneho indexu listovej pokryvnosti LAI (leaf area index) pre jednotlivé odrody repky olejnej je jedným z hlavných faktorov stanovenia hustoty porastu do budúcnosti (Hongxin 2009) a tým optimalizovania produkčnej výkonnosti plodiny.

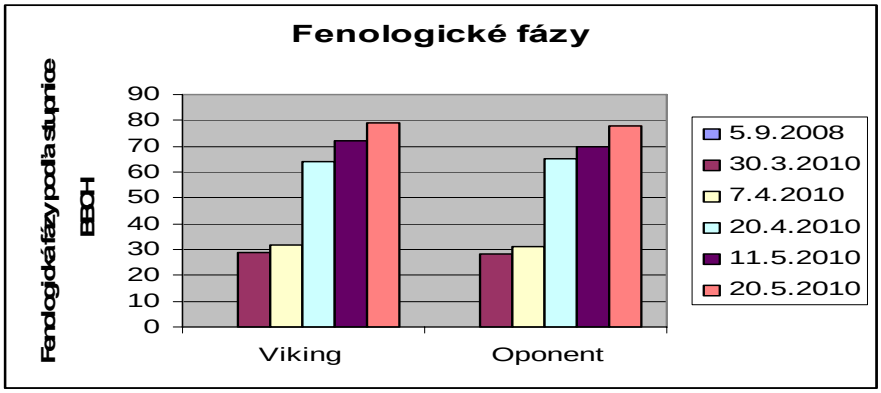
Materiál a metódy

Katedrou fyziológie rastlín SPU v Nitre (ďalej len KFR) bol založený pokus s kapustou repkovou pravou (*Brassica napus*), ktorý sa uskutočnil na experimentálnej báze SCPV - VÚRV v Borovciach (167m n.m.) pri Piešťanoch. Podnebie je kontinentálneho charakteru. Priebeh počasia počas vegetačného obdobia vysiateho porastu charakterizuje úhrn zrážok na úrovni 358mm s priemernou teplotou 15,5 °C. Pôda je černozem hnedozemná s 1,8-2,0 % obsahom humusu, pH 6,35 – 7 (Babulicová 2007).

Vo vegetačnom období 2008-2009 boli pestované odrody Oponent (líniová odroda, Česká republika) a Viking (líniová odroda, Nemecko). Boli vybrané na základe rozdielov deklarovaných ÚKSUP-om a distribučnými semenárskymi spoločnosťami (rozdiely v dĺžke vegetačného obdobia, habitus rastliny, suchovzdornosť, zimovzdornosť, proveniencia). Porast bol pestovaný za účelom sledovania rastovo-produkčných parametrov a analýzy úrody podľa príslušnej metodiky Šesták a Čatský (1966). Na základe metodiky BBCH pre stanovenie rastových fáz repky olejnej podľa Weber a Bleiholder (1990) a Lancashire et al. (1991) (In: Meier 2001) sme určili rastové fázy jednotlivých odrôd a rozdiely medzi nimi.

Výsledky a diskusia

Na obrázku 1 sú uvedené grafy, ktoré popisujú nástup fenologických fáz repky olejnej oboch sledovaných odrôd. Zistili sme, že v nástupe fenofáz neboli medzi genotypmi významnejšie rozdiely. Teda medziodrodové rozdiely v architektúre porastu nemožno pripisovať rôznym rastovým fázam.



Obr. 1: Grafy popisujúce vývoj fenologických fáz sledovaných odrôd Viking a Oponent

Ako možno vidieť z tabuľky 1, priemerné prírastky sušiny za sledované obdobie vyjadrené vybranými ukazovateľmi medzi odrodami boli rozdielne. Natu a Ghildiyal (2005) považujú architektúru porastu ako úrodotvorný faktor za dôležitú v momente, keď LAI prekročí hodnotu 3. Obe sledované odrody prekročili danú hodnotu na začiatku kvitnutia (BBCH 60) k dňu odberu 15.4.2009.

Tabuľka 1: Vybrané rastovo-produkčné parametre odrôd repky olejnej Viking a Oponent

Parameter	Viking	Oponent
LAI (3.4.-13.5.2009)	9,37	7,27
LAI väčšie ako 3 (dátum)	8,00 (15.4.2009)	4,99 (15.4.2009)
LAI pri max. CGR (dátum)	16,68 (13.5.2009)	10,13 (22.4.2009)
NAR (3.4.-13.5.2009)	6,87 $g.m^{-2}.deň^{-1}$	2,01 $g.m^{-2}.deň^{-1}$
CGR (3.4.-13.5.2009)	73,19 $g.m^{-2}.deň^{-1}$	50,88 $g.m^{-2}.deň^{-1}$
RGR (3.4.-13.5.2009)	0,0529 $g.m^{-2}$	0,0412 $g.m^{-2}$
Hospodárska úroda (8% vlhkosť)	2,99 $t.ha^{-1}$	3,34 $t.ha^{-1}$
Výška rastliny	0,145m	0,163m

Podľa uvedených autorov môžeme za dôležitejší ukazovateľ považovať hodnotu LAI v momente, kedy porast dosiahne maximum CGR (rýchlosť prírastku sušiny na plochu pôdy). Táto hodnota LAI (LAI optimum) popisuje stav porastu, kedy sa asimiláty využívajú prednostne na akumuláciu v hospodársky cenných orgánoch. Obe odrody dosiahli maximum CGR v rozdielnych rastových fázach a nie na udržanie nepotrebných listov (Natu & Ghildiyal 2005).

Kým odroda Oponent dosiahla optimálne LAI vo vzťahu k maximu CGR počas fenofázy 64 (40 % kvitnúcich kvetov na hlavnej stonke), pri odrode Viking bolo optimálne LAI dosiahnuté v rastovej fáze 79 (takmer všetky šešule dosiahli konečnú veľkosť). Ako bolo vyššie uvedené, odrody sa v jednotlivých fenologických fázach nelíšili, takže možno konštatovať, že odroda Oponent produkovala fotosyntetické asimiláty aj na udržanie nepotrebných („useless“) listov v tridsaťdňovom predstihu v porovnaní s odrodou Viking.

Záver

Architektúra porastu je významným faktorom ovplyvňujúcim úrodu plodiny. Napriek tomu, že odrody použité v experimente sa vyznačovali rovnakým priebehom fenologických fáz, pozorovali sme, že odroda Oponent dosiahla optimálne LAI v porovnaní s odrodou Viking o 30 dní skôr. Za vyššou úrodou bol fakt, že v porovnaní s odrodou Viking, bolo väčšie množstvo asimilátov vytvorených vo fotosyntetickom procese využité pre biosyntézu mastných kyselín, ktorých tvorba je kľúčová v produkcii repkového oleja. Zvolením správnej hustoty porastu a dosiahnutím optimálnej hodnoty LAI v predstihu môžeme prispieť k vyššej úrode odrody v porovnaní s konkurenčnými odrodami.

Literatúra

BABULICOVÁ, M. (2007) Úroda zrna, úrodotvorné prvky a aktuálna zaburinenosť jačmeňa siateho jarného pri rôznej koncentrácii obilnín v osevných postupoch. In: Zborník vedeckých prác SCPV – ÚAE v Michalovciach, 2007, s. 55 – 63, ISBN 978-80-88872-70-2.

DIEPENBROCK, W. (2000): Yield analysis of winter oilseed rape (Brassica napus L.): a review. Field Crops Research 67. s. 35

HONGXIN, C. et al (2009): Researches of optimum Leaf Area Index: Dynamic models for rape (*Brassica Napus* L.). Computer and Computing Technologies in Agriculture II, Volume 3, Volume 295. ISBN 978-1-4419-0212-2. Springer-Verlag. s.1585

MEIER, U. et al. (2001): Growth stages of mono- and dicotyledonous plants. BBCH Monograph. German federal biological centre for agriculture and forestry. Germany

NATU, P.S. , Ghildiyal, M.C.(2005): Potential targets for improving photosynthesis and crop yield- a review article, Current Science 12, Vol. 88, s.1918

ŠESTÁK, ČATSKÝ et al. ,(1966): Metódy studia fotosyntetické produkce rostlin. Praha, Academia

Adresa autorov:
Ing. Miroslav Jančich, prof. Ing. Marián Brestič CSc., Ing. Marek Živčák PhD., Ing. Marek Kovár, Stanislav Uhliar, Ing. Elena Hunková PhD., Katedra fyziológie rastlín, Fakulta agrobiológie a potravinových zdrojov Slovenskej poľnohospodárskej univerzity v Nitre, Trieda A. Hlinku 2 946 76 Nitra

STUDIE OBSAHU AKRYLAMIDU V PRAŽENÉM ZRNU JEČMENE, PŠENICE A ŽITA
A STUDY ON THE ACRYLAMIDE CONTENT IN ROASTED GRAIN OF BARLEY, WHEAT, AND RYE

Ondřej JIRSA – Veronika BARTÁČKOVÁ – Petr MARTINEK – Marie VÁŇOVÁ – Jana HAJŠLOVÁ

Foods treated with high temperatures during processing include roasted cereals. Therefore, there is a risk of acrylamide (AA) production in them. The aim of this work was to determine the effect of raw material and roasting parameters on AA content in grain of roasted cereals. Cultivars of spring barley, winter wheat, and rye grown under two management practices (low and high) in two years were evaluated. Grain was roasted in a laboratory roaster from a starting temperature of 150 °C to maximum temperature of 190 °C. The lowest amount of AA by roasting was produced in barley. A slight increase in AA along with the temperature as well as the time of roasting was not significant (P > 0.05). A considerable decrease in AA with the time and temperature of roasting was observed in rye. There were great differences among cultivars; the AA increase was pronounced in cv. Rapsodia (feeding quality) and it was small to zero in cv. Ebi (high breadmaking quality).
Keywords: roasted cereals, acrylamide, wheat, barley, rye

Úvod

Akrylamid (AA) je považovaný za pravděpodobný karcinogen pro člověka a navíc i účinný neurotoxin. Jeho přítomnost byla potvrzena v mnoha druzích tepelně zpracovaných potravin, zejména v kávě, cereálních produktech (pražené slady, kávoviny, chlebová kůrka) a smažených bramborových výrobcích.

Ke vzniku AA v potravinách dochází v průběhu tepelného zpracování. Množství vzniklého AA je závislé na množství asparaginu a dostupnosti a typu redukujících sacharidů. V cereálních produktech je limitujícím krokem množství asparaginu. Důležitý je také teplotní režim.

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

Materiál a metody

Polní pokus byl proveden ve dvou vegetačních sezónách (2006–2008) na pokusné stanici v Kroměříži. Celkem 12 variant zahrnovalo dvě odrůdy jarního ječmene, dvě odrůdy ozimé a odrůda ozimého žita. Ječmen byl pěstován po různých předplodinách, pšenice a žito po obilovině. Všechny plodiny byly pěstovány ve dvou režimech ošetření (nízký a vysoký vstup). Hlavní rozdíly mezi systémy spočívaly v zásobování dusíkem. Úrovně dusíku činily 90 a 220 kg/ha s aplikací ve třech termínech během vegetačního období. Ve vzorcích zrna byly stanoveny následující charakteristiky: hmotnost 1000 zrn (HTZ, g), objemová hmotnost (OH, kg/hl) a obsah dusíkatých látek (N × 5,7), obsah volného asparaginu (HPLC-FLD), v praženém zrnu obsah AA (LC-MS/MS).

Pražení vzorků bylo provedeno na pražiči PRE 1 Z (Probat). Časová závislost byla sledována pro 15, 30, 45 a 60 min při teplotě pražení 150 °C. Teplotní závislost byla stanovena při 150, 160, 170, 180 a 190 °C a době pražení 15 min.

Výsledky a diskuse

V obsahu N-látek (15,6 % – 9,9 %) nebyly rozdíly mezi plodinami. V obsahu volného Asn (157 mg/kg až 600 mg/kg) se plodiny lišily: pšenice < ječmen < žito. Byla nalezen záporný vztah mezi Asn a OH, N-látkami a HTZ a naopak kladný vztah mezi Asn a HTZ.

Tabulka 1: Korelace mezi charakteristikami zrna ječmene a pšenice a obsahem akrylamidu po pražení (15 min, 150 °C)

Rok	N-látky	HTZ	OH	Asn
2007	0,332	–0,886***	0,862**	–0,647*
2008	–0,031	–0,651*	0,815**	–0,861**

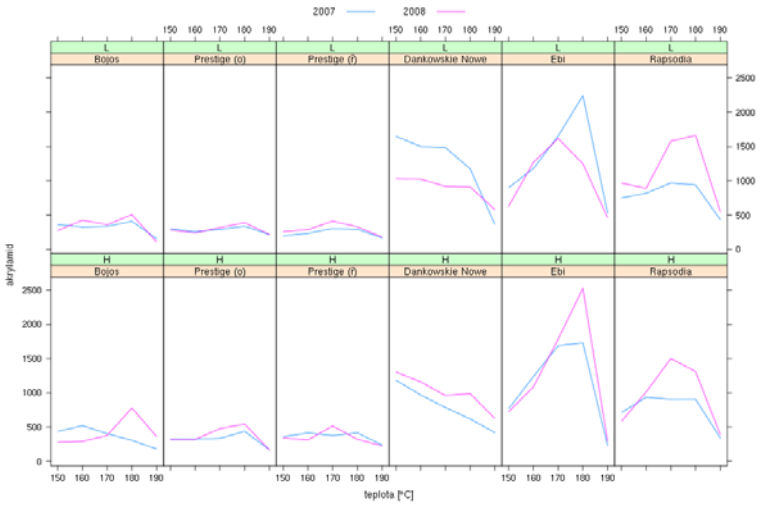
Jednotlivé plodiny a odrůdy reagovaly specificky na teplotu a dobu pražení. U ječmene se pražením vytvářelo nejméně AA ze všech plodin, což by mohlo souviset s pluchatostí zrn, neboť plucha může představovat tepelnou bariéru během pražení na rozdíl od bezpluchého zrna žita a pšenice. Kromě jedné varianty ječmene (Bojos H v roce 2007) lze pozorovat setrvalý až mírně růstový trend obsahu AA do 180 °C s následným poklesem. Časová závislost byla mírně růstová až mírně klesající. Vliv teploty však nebyl statisticky průkazný stejně jako vliv doby. Významný vliv na teplotní závislost byl zjištěn v průměru pro intenzitu, kdy vyšší intenzita pěstování vedla k vyšším koncentracím AA. Rozdíl mezi odrůdami byl významný pro teplotní i časovou závislost, vyšší obsah AA měla odrůda Bojos.

Žito se vyznačuje výrazně vyšším obsahem volného asparaginu než ječmen a pšenice. Obsah AA byl obecně nejvyšší po pražení 15 minut při teplotě 150 °C a dále s rostoucí teplotou i časem klesal. Tento pokles u žita ukazuje na určitou podobnost s průběhem pražení kávy. Statisticky významný vliv měla teplota. Nebyl pozorován rozdíl mezi intenzitami pěstování. Pšenice má obsah asparaginu nižší než ječmen. Mezi odrůdami Ebi a Rapsodia byl zjištěn velký rozdíl v reakci na podmínky pražení při srovnatelných výchozích hodnotách, což svědčí o silné interakci odrůdy s teplotou i dobou pražení. U nepotravinářské odrůdy Rapsodia byl nárůst obsahu AA výrazný, a dosáhl i více než 2000 µg/kg (při 180 °C a 60 min), u potravinářské odrůdy Ebi mírně rostoucí až setrvalý trend. Vliv intenzity pěstování nebyl významný.

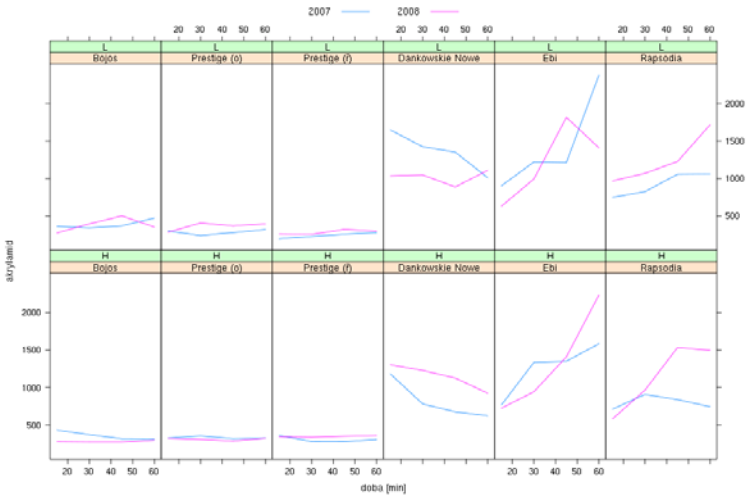
Závěry

Pražené obiloviny nacházejí uplatnění například jako náhražky kávy, přísady do pečiva (barvení) nebo součást dalších cereálních výrobků. Proto je žádoucí sledovat možné škodlivé vlivy na zdraví spotřebitele z hlediska samotné suroviny nebo technologie zpracování. Změny koncentrací AA během pražení zrna ukázaly na výrazný vliv analyzovaných genotypů (plodiny a odrůdy). Vliv předplodiny a pěstitelské technologie se nejevil jako průkazný. Specifické závislosti mezi analyzovanými genotypy a teplotou či dobou pražení ukazují na složitost vztahů mezi genotypem, obsahem prekursorů AA, podmínkami pražení a výsledným obsahem AA. Tyto vztahy nejsou dosud objasněny. Obecně při teplotě pražení 190 °C převažovala degradace vzniklého AA.

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



Obr. 1: Vliv teploty pražení na obsah akrylamidu.



Obr. 2: Vliv doby pražení na obsah akrylamidu.

Adresa autorů:
Ondřej Jirsa, Petr Martinek, Marie Váňová: Agricultural Research Institute Kromeriz, Ltd., Havlickova 2787, 767 01 Kroměříž, ČR, jirsa@vukrom.cz
Veronika Bartáčková, Jana Hajšlová: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 3, 166 28 Praha 6, ČR

AKTIVITA RASTLINNÝCH PLETIVOVO ŠPECIFICKÝCH PROMÓTOROV V PROKARYOTICKÝCH BUNKÁCH
THE ACTIVITY OF PLANT TISSUE SPECIFIC PROMOTERS IN PROKARYOTIC CELLS

Martin JOPČÍK – Jana LIBANTOVÁ – Ildikó MATUŠÍKOVÁ – Ján SALAJ – Eva BOSZORÁDOVÁ – Jana MORAVČÍKOVÁ

Despite the fact that transcription machinery from prokaryotes and eukayotes differs in many aspects, the functionality of some viral and plant eukaryotic promoters was confirmed in bacteria. Whereas production of recombinant proteins in eukaryotic cells requires vector construction in bacteria, unexpected eukaryotic promoter activity in prokaryotic cells should be considered in terms of biosafety. In our experiments, the recognition of four plant tissue specific promoter sequences by the bacterial RNA polymerase was studied in A. tumefaciens using fluorimetric GUS assay. The results showed that three out of four tested promoters (APRS, ESL,MXL) showed low activity in bacteria, however activity of pollen specific DLL promoter was high, even 20 times higher than the activity of other tested promoters.
Key words: Agrobacterium tumefaciens, plant specific promoter, safety measures, transcription

Úvod

Produkcia rekombinantých proteínov v eukaryotických bunkách vyžaduje fúziu príslušného génu s promótorom funkčným v eukaryotických bunkách. Technikami rekombinantnej DNA sa potrebné konštrukcie pripravujú v baktériách, predovšetkým v kmeňoch *E. coli*. Navyše, v prípade rastlín sa upravené kmene agrobaktérií využívajú na transfer génov do rastlinného genómu. Hoci je veľa rozdielov medzi transkripčnou mašinériou eukaryotov a prokaryotov, zistila sa určitá sekvenčná konzervovanosť RNA polymeráz. Značná homológia sa našla medzi veľkými podjednotkami eukaryotických RNA polymeráz a β, β´ podjednotkami eubakteriálnej RNA polymerázy a medzi RNA polymerázami eukaryotov a archebaktérií. Navyše TATA box eukaryotov a archebaktérií vykazuje podobnosť ku -10 konsenzus oblasti eubaktérií (TATAAT). Pravdepodobne aj to sú dôvody, prečo sú niektoré eukaryotické promótory rozoznávané v prokaryotických systémoch (Lewin et al. 2005).

Materiál a metódy

DNA fragmenty rastlinných promótorov sme amplifikovali z genómovej DNA arábkovky thálovej podľa protokolu odporúčanom výrobcom polymerázy Expand High Fidelity PCR System (Roche). Ich sekvenciu sme určili sekvenovaním pomocou kitu Prism Big Dye™ FS Terminator Cycle Sequencing Ready (Applied Biosystems). Vektorové konštrukty sme pripravili zámenou CaMV35S promótora, jednotlivými izolovanými rastlinnými pletivovo špecifickými promótormi tak, aby boli vo fúzii s *gfp:gus* reportérovými génmi v plazmide pCambia 1304 (Obr. 1). Pripravené konštrukty sme preniesli z *E. coli* do *A. tumefaciens* LBA 4404 "heat-shock" transformačnou metódou (Höfgen & Willmitzer, 1988). Kvantitatívne meranie GUS aktivity sme uskutočnili fluorimetricky podľa Kaufusiho et al. (2004) a vyhodnotili sme ju ako množstvo vytvoreného produktu (MU) za hodinu na ml kultúry *A. tumefaciens* s vektorom obsahujúcim testovaný promotor (OD_{600nm} 1).

Tabuľka 1

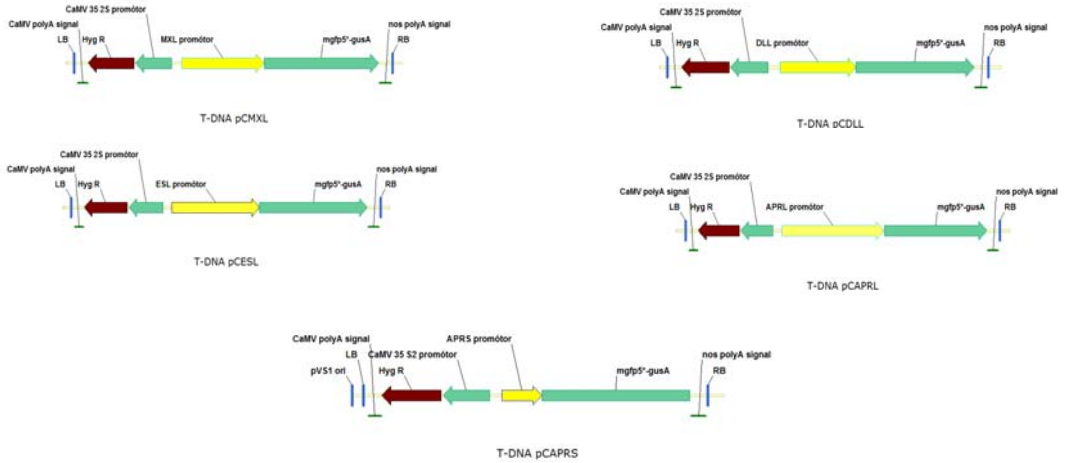
Vektorový konštrukt	Pletivová špecificita v rastlinách	Označenie príslušného génu v TAIR databáze[a]	Funkcia testovaného promótora v rastlinách	Veľkosť fragmentu izolovaného promótora (bp)
CESL	Embryo	At2g02515	gén pre proteín neznámej funkcie	2082
CMXL	Embryo	At5g38170	gén pre proteázový inhibítor/zásobný proteín v semenách/lipid transferový proteín	1846
CDLL	Peľ	At4g16160	gén pre mitochondriálnu translokázu	1644
CAPRS	Peľ	At5g20390	gén pre β-1,3-glukanázu	684
CAPRL	Peľ	At5g20390	gén preβ-1,3-glukanázu	2561

[a]TAIR databáza, Sequence Viewer (htpp://www. Arabidopsis. org)

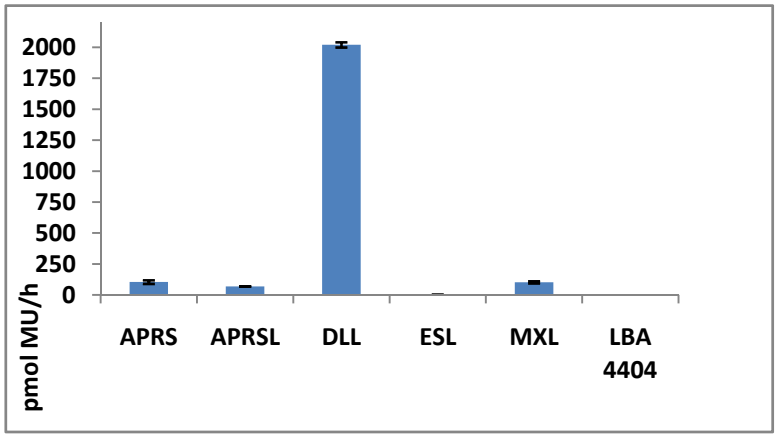
Výsledky a diskusia

Z genómovej DNA sme izolovali DNA sekvencie ako fragmenty dĺžky od 684 bp do 2561bp štyroch rastlinných pletivovo špecifických promótorov, ktoré sú aktívne v peli a vyvíjajúcom sa embryu rastlín arábkovky (Tab. 1). Aby sme preskúmali funkčnosť eukaryotických promótorov v prokaryotických bunkách, po prenose pripravených vektorových konštruktov do *A. tumefaciens* sme testovali ich aktivitu prostredníctvom *gus* génu, ktorého expresiu v jednotlivých konštruktoch riadili. Výsledky ukázali, že

spomedzi testovaných promótorov, rastlinný promótor DLL mal najvyššiu aktivitu, približne 20x vyššiu ako ďalšie tri analyzované promótory. Promótor APR sme testovali v dvoch verziách kratšej (APRS-684bp) a dlhšej (APRL-2561bp), pričom pri dlhšej verzii sme aktivitu v baktériách nezaznamenali. Z predbežných výsledkov predpokladáme, že aktivitu príslušného promótora mohla ovplyvniť aj vzdialenosť jeho transkripčného štartu od CaMV35S promótora, ktorý obsahuje enhancer. Expresná jednotka CaMV35S - hygromycínový gén je prítomná v pripravenom binárnom vektore z dôvodu zabezpečenia selekcie v transformovaných rastlinných bunkách. V ďalších experimentoch, po príprave kontrolných konštruktov bez prítomného CaMV35S promótora v testovaných konštruktoch sa pokúsime určiť jeho vplyv na aktivitu testovaných eukaryotických promótorov v prokaryotických bunkách.



Obr. 1: Schematické znázornenie T-DNA pripravených vektorových konštruktov



Záver

Výsledky experimentov ukázali, že hoci pri transgenóze rastlín sa prokaryotické systémy využívajú iba na prípravu a prenos expresných jednotiek do cieľového eukaryotického organizmu možná expresia v prokaryotoch musí byť dôsledne zvážená hľadiska biobezpečnosti, predovšetkým v prípadoch, kedy eukaryotický promótor riadi gén pre toxín.

Obr. 2: Aktivita GUS génu nameraná v dôsledku funkčnosti pletivovo špecifických promótorov v baktériách

Poďakovanie: Práca bola vypracovaná v rámci projektov EEA grant SAV-FM-EHP-2008-02-01 a VEGA 2/0011/08.

Literatúra

LEWIN A et al. (2005) Viral promoters can initiate expression of toxin genes introduced into *E. coli* *In*: BMC Biotechnology Vol. 5, p.1-9

HOFGEN R, WILLMITZER L. (1988) Storage of competent cells for *Agrobacterium* transformation. *In*: Nucleic acids research Vol. 16 p. 9877-9877

KAUFUSI et al. (2004) Regulation of exopolysaccharide synthesis in Rhizobium sp strain TAL1145 involves an alternative sigma factor gene, rpoH2. *In*: Microbiology- SGM, Vol: 150, p. 3473-3482

Adresa autorov:
Ing. Jana Libantová, CSc., Ing. Jopčík, Ing. Jana Moravčíková PhD., Mgr. Ildiko Matušíková, PhD., RNDr. Ján Salaj CSc., Ing. Eva Boszorádová, PhD. Ústav genetiky a biotechnológií rastlín SAV, Akademická 2, P.O.Box 39A, 95007 Nitra, e-mail: jana.libantova@savba.sk

STUDIUM PODOBNOSTI PŮVODŮ ČESKÉ KOLEKCE JETELE PERSKÉHO (*TRIFOLIUM RESUPINATUM* L.)
THE STUDY OF SIMILARITIES AMONG *TRIFOLIUM RESUPINATUM* L. ACCESSIONS

Daniela KNOTOVÁ – Jan PELIKÁN –Tomáš VYMYSLICKÝ

In the individual outplanting of 16 accessions of Trifolium resupinatum L. of the Czech collection 34 morphological, yield and qualitative characters were evaluated on 10 plants of each origin. In this collection were 16 varieties of world origin. Point estimations of middle values created matrix were elaborated by the method of cluster analysis. Basing on these results origins with the biggest similarities were determined.
Key words: Trifolium resupinatum, Czech collection, similarity

Úvod

Trifolium resupinatum je jednoletý druh, který lze úspěšně pěstovat v teplých oblastech s dostatečným množstvím srážek. Jedná se o ekologicky plastickou pícninu poskytující vysoký výnos s dobrou kvalitou. Jako nevýhoda při pěstování je uváděna poléhavost a obtížné pěstování na semeno. Tento druh je nenáročný na půdu, snáší půdy těžké i zasolené. Zelená píce obsahuje v porovnání s jinými jetelovinami zvýšené množství vody, což ji dělá šťavnatější a zvyšuje oblibu v příjímatelnosti zvířaty. V katalogu OECD je uvedeno 29 odrůd, v ČR je registrována 1 odrůda, odrůda Pasat.

Vzhledem k rozrůstajícím se kolekcím genetických zdrojů je popisování a přehledné rozčlenění těchto materiálů pro snadnou orientaci uživatelů zcela nezbytné. Pouze takto zpracované kolekce nám podají informace o její genetické diverzitě a upozorní na možné duplicity (Dotlačil 2005). Variabilita genetických zdrojů je posuzována na základě hodnocení morfologických, výnosových a kvalitativních deskriptorů.

Materiál a metodika

V průběhu roku 2009 bylo v individuální výsadbě v polních podmínkách hodnoceno 16 odrůd světového sortimentu tvořících českou kolekci druhu *Trifolium resupinatum*. V průběhu vegetace bylo na deseti rostlinách každého původu zhodnoceno 34 morfologických, výnosových a kvalitativních deskriptorů. Průměrné hodnoty deskriptorů u jednotlivých původů byly ohodnoceny dle platného klasifikátoru (Užík et al. 1985) a dosažené body vytvořily vstupní matici pro zhodnocení metodou shlukové analýzy.

Výsledky a diskuse

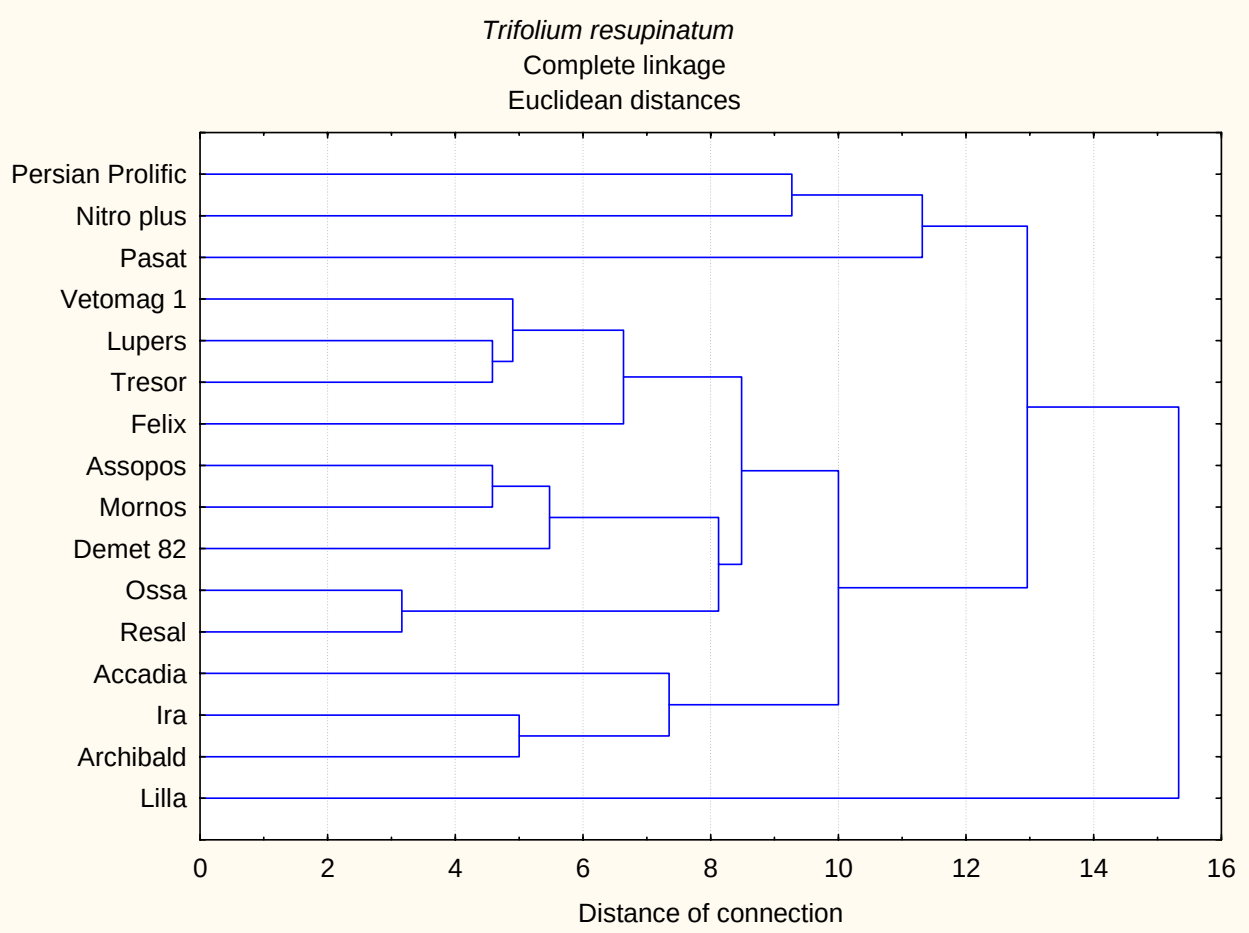
Graf 1 uvádí dendrogram kolekce *Trifolium resupinatum*. Největší podobnost mezi zkoušenými původy byla zjištěna mezi řeckou odrůdou Ossa a portugalskou Resal. Dále vykázaly vysokou podobnost francouzská odrůda Lupers a německá Tresor a dále řecké odrůdy Assopos a Mornos, pocházející z jednoho pracoviště. Celý materiál vytvořil v podstatě čtyři větší shluky. První z nich je tvořena australskými odrůdami Persian Prolific a Nitro plus, k nimž se přiřazuje česká odrůda Pasat. Druhý shluk tvoří maďarská odrůda Vetomag 1, francouzská odrůda Lupers a německé odrůdy Tresor a Felix. Ve třetím shluku jsou soustředěny řecké odrůdy Assopos, Mornos a Ossa, německá odrůda Demet 82 a portugalská Resal. V posledním shluku se nacházejí italská odrůda Accadia, polská Ira a německá Archibald. Největší odlišnost od ostatních původů vykázala maďarská odrůda Lilla. Lze konstatovat, že v české kolekci *Trifolium resupinatum* nebyla zjištěna žádná duplicita.

Dedikace: *Výsledky byly dosaženy při řešení Výzkumného záměru MSM 2629608001 financovaného MŠMT ČR a Národního programu konzervace a využití genetických zdrojů kulturních rostlin a agrobiodiverzity financovaného MZe ČR.*

Literatura

DOTLAČIL, L. (2005) : Cíle a metody pro lepší management a využití kolekcí. In: Racionalizace managementu a využívání genetických zdrojů zemědělských plodin. Agritec Plant Research, s.r.o. Šumperk a VÚRV Praha – Ruzyně. Genetické zdroje č. 93, 4- 12

UŽÍK, M., VACEK, V., TOMAŠOVIČOVÁ, A., BAREŠ, I., SEHNALOVÁ, J., BLAHOUT, J. (1985): Klasifikátor genus *Trifolium* L. VÚRV Praha-Ruzyně, Genové zdroje č. 23



Adresy autorů:
Ing. Daniela Knotová, Výzkumný ústav pícninářský, spol. s r.o., Zahradní 1, 66441 Troubsko, ČR, knotova@vupt.cz
Ing. Jan Pelikán, CSc., Výzkumný ústav pícninářský, spol. s r.o., Zahradní 1, 66441 Troubsko, ČR, pelikan@vupt.cz
Mgr. Tomáš Vymyslický, Zemědělský výzkum, spol. s r.o., Zahradní 1, 66441 Troubsko, ČR, vymyslicky@vupt.cz

VÝZNAM OSMOTICKÉHO PRISPÔSOBENIA U VYBRANÝCH GENOTYPOV HRACHU SIATEHO POČAS PREHLBUJÚCEHO SA SUCHA
SIGNIFICANCE OF THE OSMOTIC ADJUSTMENT OF PEA SELECTED GENOTYPES DURING INCREASING DROUGHT CONDITIONS

Eleonóra KRIVOSUDSKÁ

Negative effects of climate change can be mitigated throught appropriate choice of plant species, improving water management and irrigation systems. One of the solution is to use genotypes that even in difficult conditions will result in yield with reasonable quality. Therefore the aim study was to monitor the physiological parameters of four genetic resources of pea (Xantos, Svit, Novozélandský, Debrecényi Galamb). The influence of water stress was tested on some physiological parameters - stomatal closure, relative water content in leaf, osmotic potential and osmotic adjustment. Among tested genotypes , the leaf cultivars (Novozélandský, Debrecényi Galamb) showed the lower capacity for osmotic adjustment during increasing drought conditions.
Key words: pea, drought, gemotypes, osmotic adjustment,

Úvod

V posledných rokoch dochádza k tomu, že zastúpenie strukovín na ornej pôde sa znižuje. Príčinou sú ich nízke odbytové ceny na medzinárodných trhoch. Ponuka strukovín na domácom trhu sa výrazne mení vplyvom poklesu osevných plôch a nízkych priemerných hektárových úrod (Tibenská 2007).

K odstráneniu niektorých faktorov sa snažia prispieť aj šľachtiteľské firmy. Trend v šľachtení sa uberá smerom k dosiahnutiu čo najmenších zberových strát. Príkladom je vyšľachtenie nového typu hrachu s redukovanou listovou plochou, ktorá je nahradená úponkami (Puchríková 2004). Aj Slaměna (2002) považuje bezlistové odrody, označované ako úponkové alebo semileafless typy za vývojove vyšší stupeň šľachtenia hrachu. Pri týchto odrodách boli genetickou mutáciou premenené lístky na silné a aktívne úponky. Palist zloženého listu zostal zachovaný. Rastliny týchto odrôd sa spájajú úponkami a vytvárajú pevný, kompaktný ale vzdušný porast. Byľ týchto odrôd je pevnejšia. Úponkové odrody v čase zrelosti spravidla nepoliehajú. Ich vzdušný porast prispieva k lepšiemu zdravotnému stavu rastlín, za veľkého sucha však dochádza k rýchlejšiemu vysušovaniu pôdy. Napriek redukcii listovej plochy sa ich úrodový potenciál šľachtením stále zvyšuje.

S meniacou sa klímou sa čoraz väčšou hrozbou stávajú sucho a vysoká teplota a to aj pre oblasti, kde sa ich škodlivý význam objavoval iba sporadicky. Na celom svete patrí sucho k najzávažnejším faktorom znižovania úrod hlavných poľnohospodárskych plodín.

Cieľom príspevku je preto zhodnotiť význam osmotického prispôsobenia u rôznych genotypov hrachu siateho (i úponkových) počas dehydratácie a poukázať na význam výberu tolerantného genotypu.

Materiál a metódy

V rámci experimentov boli v rokoch 2005-2006 na Katedre fyziológie rastlín SPU sledované vybrané genetické zdroje hrachu siateho (*Pisum sativum* L.), ktoré nám poskytla Šľachtiteľská stanica, a. s. v Hornej Strede. Pre posúdenie odolnosti voči deficitu vody boli testované domáce genotypy (Xantos, Svit), vyšľachtené na uvedenej šľachtiteľskej stanici a dva zahraničné genetické zdroje Novozélandský a Debrecényi Galamb. Genotypy Svit a Xantos patria k semileafless – typom s redukovanou listovou plochou a ďalšie dva k olisteným typom.

Na dehydratovaných aj kontrolných rastlinách boli v ranných hodinách odobraté plne vyvinuté dospelé listy, pri ktorých boli sledované fyziologické parametre ako je relatívny obsah vody v listoch a osmotický potenciál. Gravimetrickou metódou bol stanovený relatívny obsah vody (v %). Osmotický potenciál (v MPa) bol stanovený psychrometricky (Wescor, Logan, Utah, USA).

Z vyššie spomenutých hodnôt osmotického potenciálu listov (kontrolných aj dehydratovaných rastlín), prepočítaného na plne hydratovaný stav, sme mohli určiť osmotické prispôsobenie podľa Wilsona et al. (1979). Vychádzali sme samozrejme aj z údajov relatívneho obsahu vody v listoch a korekcie (B=18%) pre apoplastickú vodu (Babu et al. 1999). Experimentálne merania sa realizovali v prirodzených klimatických podmienkach.

Na stanovenie osmotického prispôsobenia (OA) sme pri rastlinách hrachu v nádobových pokusoch použili metódu odhadu OA ako rozdielu osmotických potenciálov kontrolných a dehydratovaných rastlín, prepočítaných na plné nasýtenie vodou podľa Wilsona et al. (1979). Okrem toho boli v dopoludňajších hodinách realizované merania difúznej vodivosti (g_c) na adaxiálnej i abaxiálnej strane listov porometrom Delta-T-Devices (Cambridge, England).

Po ukončení postupnej dehydratácie boli opäť všetky genetické zdroje hrachu naďalej zalievané až do zberu.

Výsledky a diskusia

Osmotická adjustácia zvyšuje toleranciu k dehydratácii, čím sa predlžuje trvanie prežitia rastlín v podmienkach silného sucha (Sinclair 2000). Zabezpečuje zachovanie turgoru a jeho stratu až pri nižších hodnotách vodného potenciálu. To je potrebné napr. pre otváranie prieduchov, priebeh fotosyntézy a predlžovací rast (Blum 1996; Gonzales et al. 1999).

Rozpätie hodnôt pre osmotické prispôsobenie nami sledovaných genotypov (Xantos, Svit, Novozélandský, Debrecényi Galamb) bolo 0,01 až 0,69 MPa, čo je v súlade s hodnotami publikovanými viacerými autormi pre rastliny pri výraznejšom deficite vody. Pri porovnávaní genotypov (tabuľka 1) možno jednoznačne konštatovať, že výrazne vyššia schopnosť osmotickej adjustácie sa prejavila u tzv. semileafless foriem – odroda Xantos (0,69, resp. 0,61 MPa) a odroda Svit (0,41, resp. 0,63 MPa) v porovnaní s olistenými typmi (Novozélandský, Debrecényi Galamb).

Tabuľka 1: Osmotické prispôsobenie v listoch sledovaných genotypov hrachu

Genotyp	Osmotické prispôsobenie [MPa]	
	2005	2006
Xantos	0,69	0,61
Svit	0,41	0,63
Novozélandský	0,15	0,19
Debrecényi Galamb	0,01	0,04

Záver

Negatívne javy klimatických zmien môžu byť zmiernené napr. vhodným výberom rastlín, zlepšením hospodárenia s vodou i zavlažovacími systémami. Riešením môže byť i využitie genotypov, ktoré nám aj v sťažených podmienkach prinesú spoľahlivé úrody v primeranej kvalite.

Z uvedeného dôvodu cieľom práce bolo počas obdobia dehydratácie u rôznych genotypov hrachu sledovať niekoľko fyziologických parametrov - zatváranie prieduchov, relatívny obsah vody v listoch, osmotický potenciál a osmotické prispôsobenie. Z výsledkov vyplynuli jednoznačné závery, že olistené genotypy hrachu majú nižšiu schopnosť osmotického prispôsobenia počas dlhšietrvajúceho sucha ako semileafless typy, ktoré sa vyznačovali vyššou schopnosťou osmoticky sa prispôsobiť a mohli by zároveň poslúžiť pri výbere tolerantných genotypov a byť jednou z alternatív pestovania hrachu v budúcnosti.

Poďakovanie: Práca bola riešená v rámci VTP aplikovaného výskumu číslo 1109/2004 MŠ SR G – 201.

Literatúra

BABU, R.C. - PATHAN, M.S. – BLUM, A. - NGUYEN, H.T. 1999. Comparison of measurement methods of osmotic adjustment in rice cultivars. In *Crop science,* 1999, 39, 150-158.

BLUM, A. 1996. Crop responses to drought and the interpretation of adaptation. In *Plant Growth Regulation,* 1996, Vol. 20 (2), 135-148.

GONZALES, A. – MARTIN, I. – AYERBE, L. 1999. Barley yield in water – stress conditions. The influence of precocity, osmotic adjustment and stomatal conductance. In *Field Crop Research,* 1999, Vol. 62, p. 23-34.

PUCHRÍKOVÁ, Z. 2004. Pestovanie hrachu vyžaduje viac pozornosti. In *Naše pole*, roč. 12, č. 3, s. 22.

SINCLAIR, T.R. 2000. Model analysis of plant traits leading to prolonged crop survival during severe drought. In *Field Crop Research,* 2000, Vol. 68, 211-217.

SLAMĚNA, Z. 2002. Význam hrachu siateho a jeho agrotechnika. In *Naše pole*, roč. 6, 2002, č. 3, s. 38-39.

TIBENSKÁ, H. 2007. Strukoviny: Situačná a výhľadová správa k 30.6. 2007. VÚEPP Bratislava, 2007, s. 29, ISSN 1337- 4559.

WILSON, J.R:- FISHER, M.J. – SCHULTZE, G.R. – DOLBY, G.R. – LUDLOW, M.M. 1979. Comparison between pressure – volume and dew point hygrometry techniques for determining the water relations characteristics of grass and legume leaves. In *Oecologia,* 1979, 41, s. 77-88.

Adresa autorov:
Ing. Eleonóra Krivosudská, PhD., Katedra fyziológie rastlín, Fakulta agrobiológie a potravinových zdrojov, Slovenská poľnohospodárska univerzita, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, SR, +421 37 641 44 56, e-mail: Eleonora.Krivosudska@uniag.sk

MIKROROZMNOŽOVANIE PIVONKY LEKÁRSKEJ
MICROPROPAGATION OF *PAEONIA OFFICINALIS* L.

Helena LICHTNEROVÁ – Zuzana JUREKOVÁ – Marta DRAGÚŇOVÁ

Paeonias are one of the hardest to multiply among garden perenials. Cunducting a method of in vitro multiplication would enable us to multiply faster, to get blooming plants faster and also to acquirea healthy and virus free plant material. In this study, the effect of growth regulators for inducing the adventitious shoots of Paeonia officinalis L. in culture medium is described. On MS ((MURASHIGE-SKOOG, 1962) medium supplemented with 1,0 mg.l^{-1} BAP (6-benzylaminopurine) and 0,1 mg.l^{-1} NAA (1-Naphthalene Acetic acid) the multiplication coefficient reached the maximum value 6,4 per explant. The BAP concentration increased the number of adventitious shoots significantly. Higher concentrations of BAP increase the number of vitrified shoots in „in vitro" culture.
Key words*: micropropagation, in vitro, multiplikation, growth regulators*

Úvod

Pivonky sú staré kultúrne rastliny. Sú to vytrvalé byliny, polokry a kry. Oddávna sa pestovali v záhradách nielen ako rastliny liečivé, ale aj ako rastliny vysoko dekoratívne. Sú jedným z najvyužívanejších rodov okrasných trvaliek v kultúre i pri šľachtení. Výskyt pivoniek v prírode v posledných rokoch je stále vzácnejší, pritom divorastúce druhy sú pestovateľsky cenným materiálom pre obohatenie sortimentu kultúrnych pivoniek.

Klasické metódy množenia bylinných aj drevitých pivoniek sú známe, dobre prepracované, ale žiaľ málo efektívne a náročné na prácu a manipuláciu. Trvá pomerne dlho, než sa získajú kvitnúce rastliny vhodné na výsadbu. Pivonky patria k najhoršie množiteľným záhradným trvalkám.

Napriek perspektíve *in vitro* produkcie rodu *Paeonia*, technologické postupy mikropropagácie pivoniek zatiaľ nie sú dostatočne preskúmané. Problematické sú rôzne fázy rozmnožovania, od odberu explantátov až po aklimatizáciu celistvých jedincov.

Vypracovanie metodiky množenia pivoniek *in vitro* by umožnilo urýchliť množenie, získať kvitnúce rastliny za kratší čas a tiež získať zdravý a bezvirózny rastlinný materiál.

Z uvedených dôvodov sme sa zamerali na mikropropagáciu bylinných druhov pivoniek, konkrétne sme vybrali druh *Paeonia officinalis* L. Sledovali sme vplyv rastových regulačných látok BAP (6-benzylaminopurine) a NAA (1-Naphthalene Acetic acid), na indukciu adventívnej organogenézy a proliferáciu adventívnych výhonkov.

Materiál a metódy

Na odber primárnych explantátov boli vybrané donorové rastliny, ktoré pochádzajú z Botanickej záhrady SPU v Nitre. Pri výbere explantátu sme brali do úvahy pozíciu explantátu na rastline, jeho veľkosť a čas odberu.

Odber explantátov bol realizovaný koncom marca, z vybraných rastlín boli odobraté pučiace výhony. V laboratórnych podmienkach následne po povrchovej sterilizácii a po odstránení jednotlivých šupín z výhonov boli izolované pomocou binokulárnej lupy jednotlivé púčiky veľkosti približne 1–2 mm.

Púčiky boli sterilizované štandardným spôsobom a zavedené na kultivačné médium MS (MURASHIGE-SKOOG, 1962).

V druhej etape boli pre našu prácu použité ako primárne explantáty regenerované výhony a najmladšie vyvinuté listy, odobraté zo stabilnej sterilnej kultúry a subkultivované na modifikované kultivačné médium.

Na indukciu adventívnej organogenézy boli použité tieto varianty kultivačného média:

Variant 1 MS + 0,5mg.l^{-1} BAP; Variant 2 MS + 1,0mg.l^{-1} BAP; Variant 3 MS + 0,5mg.l^{-1} BAP + 0,1mg.l^{-1} NAA; Variant 4 MS + 1,0mg.l^{-1} BAP + 0,1mg.l^{-1} NAA.

Kultivácia sa realizovala v definovaných podmienkach:

- teplota 21˚C/ deň a 19˚C/ noc,
- hustota ožiarenia 35 µmol. m^{-2}. s^{-1}, biele svetlo,
- fotoperióda: 16 hodín svetlo, 8 hodín tma.

Jednotlivé varianty sme vyhodnocovali postupne. Zaznamenávali sme intenzitu tvorby kalusu, intenzitu tvorby výhonkov a predlžovací rast počas 5 mesiacov.

Výsledky a diskusia

Tvorbu adventívnych výhonov pri druhoch rodu Paeonia zaznamenali viacerí autori (Buchheim 1992; Meyer 1992; Beruto 2004 a iní).

Z faktorov, ktoré ovplyvňujú úspešnosť regenerácie je dôležité nielen zloženie kultivačného média, ale aj vybraný druh, konkrétny genotyp a výber primárneho explantátu, čo potvrdzujú aj naše výsledky. Potvrdila sa regeneračná schopnosť púčikov, prevažne sme pozorovali tvorbu adventívnych výhonov nepriamou cestou, cez etapu tvorby kalusu. Regeneračná schopnosť pletiva listov sa nepotvrdila.

Úspešnosť navodenia morfogénneho procesu je závislá od faktorov pôsobiacich v kultúre *in vitro*. Najdôležitejšia je prítomnosť rastových regulačných látok, rozhoduje typ a koncentrácia použitej rastovej

látky, čo potvrdzujú aj pozorovania autorov (Beruto 2004; Hosoki et al. 1989; Bouza 1994). Z rastových regulačných látok autori uvádzajú ako vhodný na indukciu organogenézy cytokinín BAP, čo sa potvrdilo aj v našich experimentoch.

V prípade variantov 1 a 2 sa zaznamenala extrémna tvorba kalusu, ale s minimálnou tvorbou výhonov. Výsledok bol pravdepodobne spôsobený nízkou koncentráciou cytokinínu BAP a absenciou rastovej regulačnej látky NAA.

Pri použití MS média obohateného o 0,5mg.l^{-1} BAP + 0,1mg.l^{-1} NAA (variant 3) bola zaznamenaná nevýznamná multiplikacia 2:1. Pri experimentoch, kde bolo MS médium obohatené o vyššie koncentrácie BAP ako 1,0 mg.l^{-1}, sa pozorovala tvorba kalusu a znížená tvorba výhonov. Vyššie koncentrácie BAP spôsobujú aj značný výskyt vitrifikácie. K podobným zisteniam dospela aj autorka Bouza (1993), ktorá uvádza, že vyššie koncentrácie BAP spôsobujú vitrifikáciu a znižujú množiteľský koeficient.

Preukazne najvyššia regeneračná a multiplikačná schopnosť sa pozorovala pri použití MS média obohateného o 1,0mg.l^{-1} BAP + 0,1mg.l^{-1} NAA (variant 4), zaznamenali sme multiplikáciu v pomere 6,4:1. (tab.1)

Tabuľka 1: Hodnoty Kruskal-Wallis testu pre počet výhonov *Paeonia officinalis* L. pri rozdielnej koncentrácii BAP v kultivačnom médiu

Kultivač. médium	*Count*	Median	*Average Rank*	*Standard deviation*	*Coeff. of variation*	*Minimum*	*Maximum*	*Homogeneous Groups*
0	10	1	10,5	0,0	0,0%	1,0	1,0	X
1	10	1	12,1	0,316228	28,748%	1,0	2,0	X
2	10	2	27,9	0,632456	28,748%	1,0	3,0	X
3	10	2,5	31,5	0,527046	21,0819%	2,0	3,0	X
4	10	6,5	45,5	1,3499	21,0921%	4,0	9,0	X
Total	50			2,10694	79,8082%	1,0	9,0	

Test statistic = 43,3988 P-Value = 8,55252E-9

Záver

Z výsledkov experimentálneho riešenia vplyvu biologických, chemických a fyzikálnych faktorov na morfogenézu *Paeonia officinalis* L. v podmienkach *in vitro* môžeme urobiť nasledovné závery:

- Pre morfogenézu botanických bylinných druhov rodu *Paeonia* v podmienkach *in vitro,* z našich experimentov vyplývajú ako vhodné explantáty – púčiky z pučiacich výhonov,
- Počet multiplikovaných adventívnych výhonov je pozitívne ovplyvnený prítomnosťou rastovej regulačnej látky BAP v kultivačnom médiu. Najvyššia multiplikácia sa zaznamenala pri použití kultivačného média MS + 1.0 mg.l^{-1} BAP + 0.1 mg.l^{-1} NAA,
- Vyššie koncentrácie cytokinínu BAP v kultivačnom médiu spôsobujú vitrifikáciu a znižujú množiteľský koeficient.

Poďakovanie: Príspevok vznikol s podporou grantového projektu VEGA 1/0426/09 Adaptabilita a vitalita rastlín ako kritérium ich použitia v urbanizovanom prostredí

Literatúra

ALBERS M.R.J. - KUNNEMAN B.P.A.M. 1992: Micropropagation of paeonia, Acta Horticulturae, 1992 314,pp.85-92

BERUTO, M. - LANTERI, L. - PORTOGALLO, C. 2004: Micropropagation of tree peony (Paeonia suffruticosa), Plant Cell, Tissue and Organ Culture 2004, pp. 249-255

BOUZA, L. et al. 1993**:** The diferential effect of N6-benzyl-adenin and N6-(2-isopentenyl)-adenin on in vitro propagation of Paeonia suffruticosa Andr. is correlated with different hormone contens. In: Plánt Celí Rep. 12, 1993, pp. 593-596

BOUZA, L. et al. 1994: In vitro propagation of *Paeonia suffruticosa* Andr.cv. „ Mme de Vatry": developmental effects of exogenous hormones during the multiplication phase, Scientia Horticulturae 57, 1994, pp. 241-251

BUCHHEIM, J.A.T. - MEYER, M.M. 1992: Micropropagation of peony (Paeonia spp.). In: Bajaj, Y.P.S. : Biotechnology in Agriculture and Forestry 20, Berlin, pp. 269-285

ČERNÁ K. - DEDIČOVÁ B. - BORBÉLYOVÁ D. 2001: Micropropagation of *Paeonia arborea* Donn., syn. *P. suffruticosa* Andr., SPU,80-7137-959-X., 2001, pp. 51-54

HOSOKI, T., et al. 1989**:** In vitro propagation of herbaceous peony (*Paeonia lactoflora* Pall.) by a longitudinal shoot-split method, Plant Cell Reports, 1989, pp. 243-246

KIM H.M. - SHIN J.H. - SOHN J.K. 2006: Cryopreservation of somatic embryos of the herbaceus peony (*Paeonia lactiflora* Pall.) by air drying. Cryobiology, Vol.53, Issue 1, 2006, pp.69-74

STANYS V. - MAŽEIKIENE I. - STANIENE G. - ŠIKŠNIANAS T. 2007: Effect of phytohormones and stratification on morphogenesis of *Paeonia lactiflora* Pall. isolated embryos. Biologija , Vol. 18, No. 1.,2007, pp. 27-30

MURASHIGE, T. - SKOOG, F. 1962: A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. In: Physiologia Plantarum, 15, 1962, pp. 473-497

Adresa autorov:
Helena Lichtnerová, Ing. Marta Dragúňová, KBPKU FZKI SPU, Tulipánova 7, 949 01 Nitra, e-mail: helena.lichtnerova@uniag.sk
prof. RNDr. Zuzana Jureková, CSc., Katedra ekológie FEŠRR, Mariánska 10, 949 01 Nitra

ODPOVEDE KOREŇOV SÓJE FAZUĽOVEJ (*GLYCINE MAX* L.) NA IÓNY ŤAŽKÝCH KOVOV
RESPONSE OF SOYBEAN ROOTS TO HEAVY METAL IONS

Patrik MÉSZÁROS – Beáta PIRŠELOVÁ – Ildikó MATUŠÍKOVÁ

Two genotypes with contrasting sensitivity/tolerance to ions of cadmium and arsenic (both at concentrations of 5 mg.l^{-1}) were selected from a set of 17 soybean (Glycine max L.) genotypes grown in Slovakia, Ukraine and Hungary. In the two genotypes, Kyivska 98 and Chernyatka, a significantly enhanced lipid peroxidation could be observed after exposure to heavy metals. Furthermore, altered levels of hydrogen peroxide were detected in the cv. Kyivska roots (enhancement by both metals), while decreased (though not significant) levels were measured in Chernyatka. Protein extracts from the plants tested were separated on polyacrylamide gels. The subsequent staining for chitinase activities revealed genotype-specific chitinase accumulation as a component of plant defense against heavy metal stress. The involvement of detected chitinase isoforms in metal tolerance/sensitivity will be further studied.
Key words: metal toxicity, plant defense

Úvod

Ťažké kovy môžeme zaradiť medzi hlavné kontaminanty životného prostredia. Väčšina rastlín je citlivá na ťažké kovy, na ich toxicitu reagujú hlavne inhibíciou rastu koreňa a výhonkov a zníženou produkciou biomasy (Peralta et al. 2001). Ťažké kovy sú schopné reagovať so zložkami membrán, pričom môžu zmeniť ich permeabilitu, membránový potenciál a enzymatickú aktivitu. Ovplyvňujú aj príjem živín a homeostázu a sú často akumulované poľnohospodársky dôležitými plodinami (Sanitá di Toppi & Gabrielli 1999). Rastliny vyvinuli rôzne obranné mechanizmy voči toxickým účinkom ťažkých kovov. Tieto mechanizmy spočívajú napr. v syntéze fytochelatínov a metalotioneínov, v akumulácii kataláz, peroxidáz (Sandalio et al. 2001) a PR-proteínov. Účinným mechanizmom je tiež zvýšenie hladiny iónov vápnika v cytosole a zvýšená aktivita proteínov teplotného šoku (Poschenrieder et al. 2006).

Tolerancia rastlín k ťažkým kovom je geneticky daná, avšak jednotlivé rastlinné druhy a aj odrody prejavujú veľkú variabilitu v tolerancii k ťažkým kovom (Metwally et al. 2005). V tejto práci študujeme senzitivitu/toleranciu 17 odrôd sóje fazuľovej pestovaných na Slovensku, Ukrajine a Maďarsku voči iónom arzénu a kadmia.

Materiál a metódy

Semená 17 odrôd sóje fazuľovej (*Glycine max* L.) sme získali z nasledovných zdrojov: odrody *Color*, *Cordoba*, *Essor*, *Merlin* a *Kent* zo Saatbau Linz Slovensko; odrody *Chernyatka*, *Ustya*, *Kyivska 98* a *Vorskla* z Poľnohospodárskeho ústavu Ukrajinskej Poľnohospodárskej Akadémie Vied; odrody *Crusader*, *Bóbita*, *BS 31*, *Borostyán*, *Bólyi 44*, *Bólyi 56*, *Evans*, *Boróka* z Bóly Zrt., Maďarsko.

Semená sme sterilizovali v 0,5% roztoku chlórnanu sodného (Savo) a nakličovali v Petriho miskách na dvojitej vrstve navlhčených filtračných papierov v tme pri 23°C, kým korene dosiahli dĺžku 3-8 mm. Korene klíčiacich semien sme následne vystavili účinkom iónov arzénu (5 mg.l^{-1} As^{3+}) a kadmia (5 mg.l^{-1} Cd^{2+}) vo forme roztokov: As_2O_3 a $Cd(NO_3)_2.4H_2O$ po dobu 48 hodín. Po inkubácii sme korene oddelili od semien a odvážili ich čerstvú hmotnosť. Toleranciu koreňov k iónom arzénu a kadmia sme vyjadrili tolerančným indexom (TI) na základe čerstvej hmotnosti koreňov:

$$\text{TI (\%)} = \frac{priemerná\ hodnota\ znaku\ stresovanej\ rastliny}{priemerná\ hodnota\ znaku\ nestresovanej\ rastliny} \times 100$$

Analýzam sme podrobili najmenej 50 semien z každej odrody nakličovaných v troch nezávislých opakovaniach experimentu.

Peroxidáciu lipidov sme stanovili meraním množstva malondialdehydu (MDA) podľa Dhindsa et al. (1981).

Hladinu peroxidu vodíka sme merali podľa Velikovej et al. (2000).

Proteíny izolované podľa Hurkmana a Tanaka-u (2003) sme separovali pomocou SDS-PAGE a farbili na chitinázovú aktivitu podľa Pana et al. (1991). Obrázky gélov sme analyzovali softvérom Scion Image.

Štatistické analýzy pomocou Studentovho t-testu sme vykonali na údaje z 3-6 repetícií.

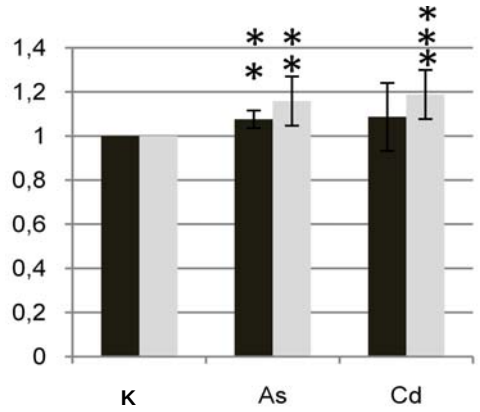
Výsledky a diskusia

Aplikované dávky ťažkých kovov spôsobili inhibíciu rastu koreňov všetkých genotypov sóje. Tolerančné indexy pritom naznačujú, že jednotlivé odrody sóje prejavujú vysokú variabilitu v tolerancii voči ťažkým kovom. Vnútrodruhová variabilita medzi inými rastlinnými odrodami v odpovedi na ťažký kov bola opísaná aj autormi Belimov et al. (2003) a Metwally et al. (2005).

Arzén prejavil vyššiu toxicitu ako kadmium pre väčšinu genotypov a spôsobil viac ako 50%-nú inhibíciu rastu koreňov v prípade odrody *Kyivska 98*, ktorá bola najviac citlivá odroda k testovaným dávkam arzénu

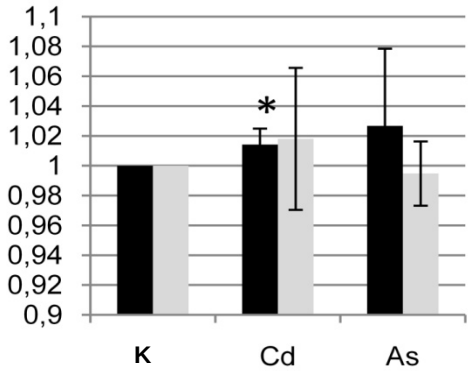
a kadmia. Najväčšiu toleranciu pritom prejavila odroda *Chernyatka*. Semená týchto odrôd boli podrobené ďalším analýzam.

Zvýšenie hladiny MDA ako signál zvýšenej peroxidácie lipidov a poškodenia membrán bolo preukázané vo všetkých koreňoch vystavených účinkom kovov. Z výsledkov našich analýz vyplýva, že bazálna hladina peroxidácie lipidov bola štatisticky preukazne vyššia v prípade tolerantnejšej odrody *Chernyatka*. Zvýšenú peroxidáciu lipidov v porovnaní s kontrolou sme pozorovali v odrode *Chernyatka* vplyvom Cd^{2+} ($p<0,001$) aj As^{3+} ($p<0,01$) (Obr. 1). V prípade odrody *Kyivska 98* zmeny v peroxidácii lipidov boli pozorovateľné v koreňoch stresovaných arzénom ($p<0,01$). Zvýšená peroxidácia lipidov vplyvom ťažkých kovov bola pozorovaná aj Metwallym et al. (2005), ktorí podobné rozdiely pripisovali rôznym schopnostiam niektorých odrôd vyrovnať sa s následkami oxidatívneho stresu.



Obr. 1: Relatívna miera peroxidácie lipidov v koreňoch senzitívnejšej odrody Kyivska 98 (čierne stĺpce) a tolerantnejšej odrody Chernyatka (sivé stĺpce) vplyvom aplikovaných dávok arzénu (As) a kadmia (Cd) vzhľadom ku kontrole (K). Chybové úsečky znázorňujú štandardnú odchýlku hodnôt z 3-6 repetícií. Hladiny významnosti rozdielov: ** P≤0,01; *** P≤0,001.

Zmeny v akumulácii peroxidu vodíka sme merali v koreňoch oboch vybraných odrôd. Naše výsledky ukazujú, že (podobne ako hladina peroxidácie lipidov) hladina peroxidu vodíka je všeobecne vyššia v tolerantnejšej *Chernyatke* v porovnaní so senzitívnejšou *Kyivskou 98*.

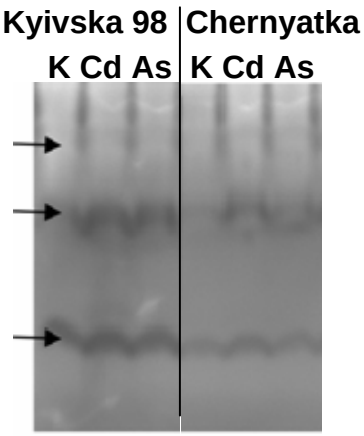


Obr. 2: Relatívne množstvo peroxidu vodíka v kadmiom (Cd) a arzénom (As) stresovaných koreňoch senzitívnejšej odrody Kyivska 98 (čierne stĺpce) a tolerantnejšej odrody Chernyatka (sivé stĺpce) vzhľadom ku kontrole (K). Chybové úsečky znázorňujú štandardnú odchýlku hodnôt z 3-6 repetícií. Hladiny významnosti rozdielov: * P≤0,05.

Stúpanie obsahu peroxidu vodíka v stresovaných koreňoch odrody *Kyivska 98* v porovnaní s kontrolou sme zistili iba po expozícii kadmiom, podobne ako to pozorovali aj Meharg et al. (1994) a Sandalio et al. (2001). Jeho obsah však klesal v koreňoch vystavených arzénu (Obr. 2). Tento pokles môže byť dôsledkom zvýšenej aktivity antioxidatívnych enzýmov (Velikova et al. 2000), ich aktivity však neboli stanovené v tomto experimente.

Expozícia koreňov iónom As^{3+} a Cd^{2+} viedla k štatisticky významnému zvýšeniu obsahu bielkovín v porovnaní s kontrolou ($p\leq0,05$), čo môže naznačovať zvýšenú syntézu (obranných) proteínov, ale aj dehydratáciu tkaniva v dôsledku toxicity ťažkých kovov (napr. poškodenie membrán). Niektoré znaky degradácie v extraktoch (vzoriek vystavených Cd a As) bolo možné pozorovať po separácii a farbení celkových proteínov v polyakrylamidových géloch.

Celkové proteíny sme separovali na polyakrylamidových géloch obsahujúcich špecifický substrát pre chitinázy. Po farbení sme študovali aktivitu rôznych izoforiem chitináz v koreňoch kontroly a stresovaných rastlín každého genotypu. Identifikovali sme tri izoformy chitináz (Obr. 3). Intenzitu jednotlivých proteínových frakcií sme vyhodnotili a výsledky podrobili štatistickým analýzam. Niektoré izoformy neprejavili závislosť na prítomnosti kovu. Naopak, akumulácia niektorých iných bola zrejme ovplyvnená



Obr. 3: Detekované izoformy chitináz (šípky) z extraktu stresovaných koreňov. Izolované proteíny z koreňov exponovaných kadmiom (Cd) a arzénom (As) boli separované na polyakrylamidových géloch.

stresom vyvolaným kovom. Identifikovali sme izoformy so štatisticky preukaznou zmenenou akumuláciou (zvýšenie v každom prípade). V odrode *Kyivska 98* najväčšie izoformy chitináz ukázali významne zvýšenú ($p \leq 0,01$) akumuláciu v prípade kadmia a výrazne zníženú ($p \leq 0,05$) akumuláciu v prípade arzénu v porovnaní s kontrolou. Izoformy strednej veľkosti odhalili zvýšenú akumuláciu v koreňoch oboch odrôd vystavených kadmiu, ale štatisticky významnú iba v prípade arzénu v odrode *Chernyatka*. Chitinázové izoformy najmenšej veľkosti neprejavili v akumulácii chitináz výraznú reakciu na testované ťažké kovy ani v jednom genotype.

Záver

Testované odrody sóje prejavili veľkú variabilitu v citlivosti k iónom arzénu a kadmia. Odrody s najkontrastnejšou mierou tolerancie (*Kyivska 98* a *Chernyatka*) odhalili rozdiely v miere poškodenia membrán ako aj v tvorbe stresových molekúl. Naše výsledky potvrdzujú, že chitinázy pravdepodobne patria medzi obranné zložky rastlín vystavených ťažkým kovom (Békésiová et al., 2008). Ich úloha a mechanizmus pôsobenia v rastlinných bunkách je však stále neznáma. Ďalšie analýzy týchto molekúl umožnia nielen pochopiť obranné mechanizmy rastlín alebo niektoré aspekty toxicity/tolerancie, ale pomôžu tiež identifikovať proteínové markéry pre konkrétne environmentálne stresy vrátane ťažkých kovov.

Poďakovanie. *Práca bola vypracovaná v rámci riešenia projektov UGA VII/24/2010 a APVV LPP-0125-07.*

Literatúra

BELIMOV, A.A. et al. 2003. Genetic variability in tolerance to cadmium and accumulation of heavy metals in pea (*Pisum sativum* L.). In *Euphytica*, 2003, vol. 131, p. 25-35.

BÉKÉSIOVÁ, B. et al. 2008. Heavy-metal stress induced accumulation of chitinase isoforms in plants. In *Molecular Biology Report*, 2008, vol. 35, p. 579-588.

DHINDSA, R.S. - MATOWE, W. 1981. Drought tolerance in two mosses: correlated with enzymatic defense against lipid peroxidation. In *Journal of Experimental Botany*, 1981, vol. 32, p. 79-91.

HURKMAN, W.J. – TANAKA, C.K. 1986. Solubilization of plant membrane proteins for analysis by twodimensional gel electrophoresis. In *Plant Physiology*, 1986, vol. 81, p. 802-806.

MEHARG, A.A. 1994. Integrated tolerance mechanisms: constitutive and adaptive plant responses to elevated metal concentrations in the environment. In *Plant, Cell and Environment,* 1994, vol. 17, p. 989–993.

METWALLY, A. et al. 2005. Genotypic variation of the response to cadmium toxicity in *Pisum sativum* L. In *Journal of Experimental Botany*, 2005, vol. 56, p. 167-178.

PAN, S.Q. – YE, X.S. – KUC, J. 1991. A technique for detection of chitinase, β-1,3-glucanase and protein patterns after a single separation using polyacrylamide gel electrophoresis or isoelectrofocusing. In *Phytopathology*, 1991, vol. 81, p. 970-974.

PERALTA, J.R. et al. 2001. Study of the effects of heavy metals on seed germination and plant growth in alfalfa (*Medicago sativa* L.) grown in solid media. In *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 2001, vol. 66, p. 727–734.

POSCHENRIEDER, C.H. – Tolra, R. - Barcelo´, J. 2006. Can metals defend plants against biotic stress? In *Trends in Plant Science*, 2006, vol. 11, p. 288–295.

SANDALIO, L. M. et al. 2001. Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. In *Journal of Experimental Botany*, 2001, vol. 52, p. 2115-2126.

SANITA` di TOPPI, L. – GABBRIELLI, R. 1999. Response to cadmium in higher plants. In *Environmental and Experimental Botany*, 1999, vol. 41, p. 105–130.

VELIKOVA, V. – YORDANOV, I. – EDREVA, A. 2000. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants. In *Plant Science*, 2000, vol. 151, p. 59–66.

Adresa autorov:
Patrik Mészáros, Mgr., Beáta Piršelová, RNDr., PhD., Katedra botaniky a genetiky FPV UKF, Nábrežie mládeže 91, 949 74 Nitra, patrik.meszaros@ukf.sk; bpirselova@ukf.sk
Ildikó Matušíková, Mgr., PhD., Ústav genetiky a biotechnológií rastlín SAV, Akademická 2, 950 07 Nitra, ildiko.matusikova@savba.sk

CHARAKTERISTIKA A HODNOCENÍ NOVÝCH ODRŮD A LINIÍ JEČMENE JARNÍHO ZAŘAZENÝCH DO KOLEKCE GENETICKÝCH ZDROJŮ CHARACTERIZATION AND EVALUATION OF NEW CULTIVARS AND LINES OF SPRING BARLEY IN A COLLECTION OF GENETIC RESOURCES

Jarmila MILOTOVÁ[1] – Kateřina VACULOVÁ[2]

The presented communication summarizes results of the study of agronomic and biological traits of spring barley cultivars and advanced breeding lines evaluated in a collection of spring barley genetic resources in the years 2008-2010. Modern cultivars were characterized by high yield potential, resistance to powdery mildew and from moderate to lower resistance to net blotch and leaf rust. A special position is occupied by cultivars from Slovakia with a shorter vegetation period and significantly smaller grain in comparison with other accessions of the barley collection. The unfavourable crop year 2010 has markedly influenced grain yield, a total level of and interrelationships among yield components. New directions of barley breeding have been recorded emphasizing the development of cultivars which form grain yield not only by productive tillering but mainly by higher ear productivity. In the last years new accessions of spring barley with hulless type of grain have been included and evaluated.
Key words: spring barley, genetic resources, new accessions, agronomic and biological traits, yield components, impact of crop years

Úvod

V Kolekci genetických zdrojů ječmene jarního, udržované při Zemědělském výzkumném ústavu Kroměříž, s.r.o., jsou průběžně hodnoceny nově získané odrůdy a v posledních letech i perspektivní nové pokročilé šlechtitelské linie ječmene jarního. V rámci plnění aktivit Národního programu využívání genetických zdrojů rostlin a agro-biodiversity jsou tyto odrůdy vedeny v tříletých cyklech. Studium a hodnocení se zaměřuje jak na hospodářsky významné znaky, tak i biologické charakteristiky. Obdobně jak uvádí Stehno et al. (2008) je hlavním záměrem hodnocení genetických zdrojů ječmene jarního poskytnout aktuální informace nejen šlechtitelům, ale i dalším uživatelům a celé zemědělské veřejnosti. Vzorky vybraných a prozkoušených odrůd ječmene a v posledních 3 letech i perspektivních rozpracovaných donorů specifických znaků a vlastností lze na požádání získat pro šlechtitelské a výzkumné účely. Hodnocení odrůd a linií ječmene jarního poskytuje nejen přehled o jejich užitných vlastnostech, ale je i nástinem zaměření tvorby nových kultivarů v různých státech, především v rámci Evroy. Po ukončení tříletých cyklů hodnocení jsou získaná data průběžně doplňována do databázového informačního systému EVIGEZ (http://genbank.vurv.cz/genetic/resources/).

Příspěvek uvádí výsledky hodnocení výnosových a biologických znaků a vlastností zkoušených materiálů ječmene jarního v lokalitě Kroměříž.

Materiál a metody

V letech 2008-2010 byly v polních podmínkách Kroměříže pěstovány a hodnoceny 3 soubory nových přírůstků kolekce genetických zdrojů ječmene jarního. První soubor, který ukončil 3-letý cyklus hodnocení, obsahoval současné moderní odrůdy (celkem 20), hodnocení druhého (celkem 8) a třetího souboru (celkem 50) je uvedeno pouze pro poskytnutí informačního přehledu o vývoji a směrech šlechtění ječmene v západní a střední Evropě. Seznamy odrůd, jejichž zkoušení bylo zahájeno v letech 2008 a 2009 jsou uvedeny v Tab. 1 a 2.

Genetické zdroje ječmene byly pěstovány na parcelách o výměře 3 x 2,5 m^2, standardní pěstební technologií po vhodné předplodině, bez použití fungicidů. Byly hodnoceny významné hospodářské (výnos zrna v $t.ha^{-1}$, hmotnost 1000 zrn (HTZ v g), počet produktivních odnoží na m^2 (PPO), počet zrn/klas (PZK) a hmotnost zrna na klas (HZK v g) a biologické znaky a vlastnosti - délka vegetační doby, rezistence poléhání a chorobám (padlí travní, hnědá skvrnitost a rez ječná) ve stupnicí 1 – 9 (kde je 1= nejnižší a 9= nejvyšší úroveň daného znaku) podle klasifikátoru pro rod Hordeum (Lekeš 1986).

Výsledky byly vyhodnoceny programem Statistica 8.0 (StatSoft, Inc.).

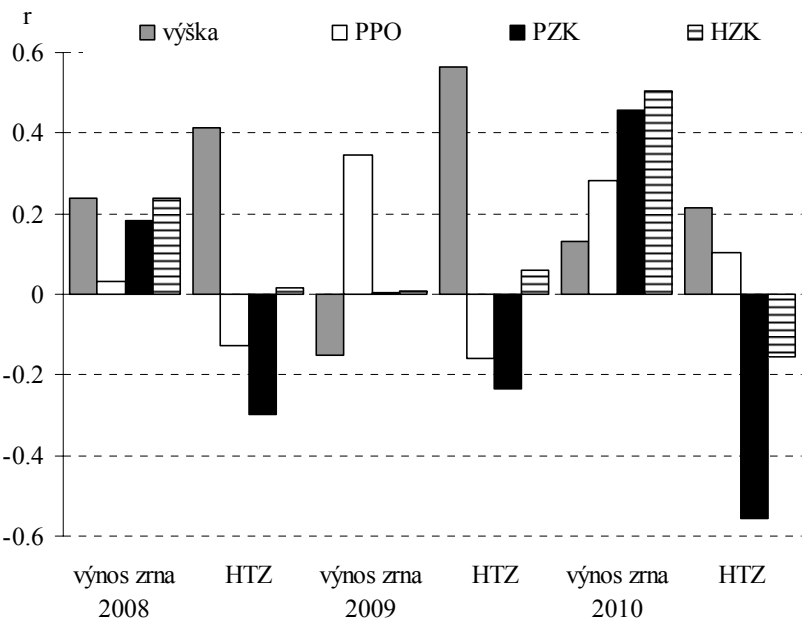
Výsledky a diskuse

Soubor odrůd hodnocených v letech 2008-2010 je představen v Tab. 1. Jsou zde shrnuty výsledky průměrných hodnot a variability výšky porostu, délky vegetační doby, výnosu zrna i výnosotvorných prvků (PPO, HTZ, PZK a HZK). Z hlediska délky vegetační doby se odrůdy vzájemně průkazně nelišily, nicméně diference ve směru kratší vegetační doby byly v průměru 3 let zřejmé u odrůd původem ze Slovenska. Tyto materiály se rovněž diferencovaly kratší délkou stébla. Z hlediska úrovně biologických znaků se nové odrůdy vyznačují převážně vysokou odolností padlí travnímu (především díky přítomnosti genu mlo), k odrůdám s nižší odolností padlí patřily odrůdy Nadir a Progres (SVK) a odrůda Kangoo (NLD). Obdobně, jako při hodnocení souboru odrůd ječmene jarního, zkoušeného v cyklu zahájeném v roce 2007 (Milotová a Vaculová 2010), i tyto nové přírůstky kolekce ječmene charakterizuje poměrně nízká odolnost dalším houbovým

chorobám. Mediány hodnot odolnosti hnědé skvrnitosti kolísaly od 3 do 7 a rzi ječné od 4 do 7, přičemž k nejnáchylnějším odrůdám patřila česká odrůda Aktiv. K odrůdám s nejvyšší úrovní odolnosti houbovým chorobám se řadí německé odrůdy Stine a Streif a slovenský kultivar Slaven.

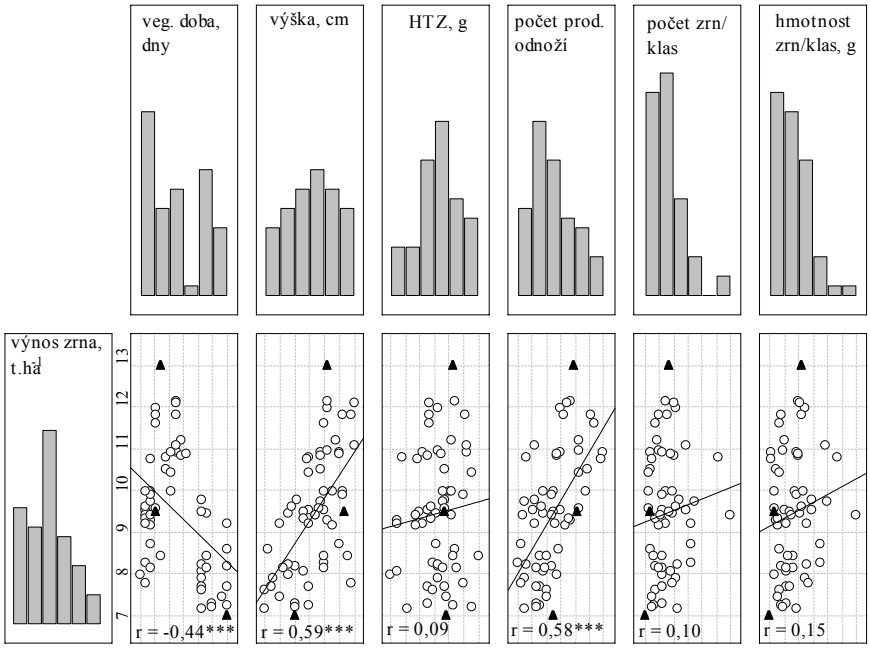
Tab. 1
Vybrané znaky a ukazatele produktivních odrůd ječmene jarního
(Kroměříž, 2008-2010, soubor I)

odrůda	stát původu	veg. doba, dny	výška, cm		výnos zrna, t.ha^{-1}		HTZ, g		počet prod. odnoží		počet zrn/klas		hmotnost zrna/klas, g	
		medián	průměr	s_x	průměr	s_x	průměr	s_x	průměr	s_x	průměr	s_x	průměr	s_x
Acrobat	GBR	108	83.7	4.7	8.4	0.7	47.4	0.7	640.3	136.4	29.5	4.9	1.4	0.2
Aktiv	CZE	110	88.3	4.4	9.2	1.3	48.1	1.1	617.0	90.3	31.5	4.3	1.5	0.2
Argument	SVK	108	82.3	3.2	9.8	0.4	47.8	0.8	658.7	100.8	32.3	3.3	1.5	0.2
Azit	CZE	110	78.3	6.2	9.8	1.0	50.2	0.5	795.3	38.8	24.7	2.1	1.2	0.1
Conchita	DEU	109	81.7	6.0	8.7	1.0	50.8	0.9	650.3	44.2	26.2	1.3	1.3	0.1
Cropton	GBR	111	86.0	5.6	9.0	0.8	48.9	0.8	662.7	34.6	27.6	1.6	1.4	0.1
Flavour	DEU	110	80.0	5.0	9.6	0.5	44.1	1.4	843.3	95.8	26.1	1.7	1.2	0.1
Henrike	DEU	107	90.0	2.6	9.8	0.9	52.9	0.7	689.0	33.3	26.8	1.5	1.4	0.1
Jennifer	DEU	108	78.7	4.1	9.3	0.6	50.7	1.3	704.3	77.8	26.5	2.6	1.3	0.1
Kangoo	NLD	110	78.3	5.7	9.2	0.8	48.1	0.9	591.0	64.5	32.9	3.6	1.6	0.2
Levan	SVK	106	74.7	4.8	8.9	1.0	43.1	1.0	689.0	158.6	31.7	4.5	1.4	0.2
Ludan	SVK	106	81.0	2.1	9.3	1.0	46.6	0.2	783.0	104.9	25.7	1.0	1.2	0.1
Nadir	SVK	106	79.3	5.9	8.9	0.6	47.3	1.6	556.7	65.8	38.4	7.9	1.8	0.3
Poprad	SVK	107	77.0	2.1	8.8	0.8	41.4	0.5	615.0	61.4	35.7	6.8	1.5	0.3
Progres	SVK	106	75.0	6.1	9.5	1.2	47.3	0.3	664.3	37.1	30.1	2.6	1.4	0.1
Signora	FRA	108	87.3	7.2	8.9	0.9	50.9	1.5	511.7	25.8	33.8	1.4	1.7	0.1
Slaven	SVK	107	80.7	1.8	9.6	0.3	46.8	1.2	782.0	66.3	26.6	2.0	1.2	0.1
Stine	DEU	108	84.0	5.6	9.9	0.8	46.3	0.9	775.7	93.8	27.9	1.8	1.3	0.1
Streif	DEU	109	84.3	5.0	9.6	1.6	49.5	0.4	787.0	49.5	24.4	2.9	1.2	0.2
Victoriana	DEU	109	82.0	4.0	9.1	1.1	51.1	1.1	707.7	83.4	25.1	1.1	1.3	0.1



Obr. 1: Vzájemné vztahy mezi výnosem a hmotností zrna odrůd ječmene a dalšími hodnocenými znaky a ukazateli v jednotlivých letech.

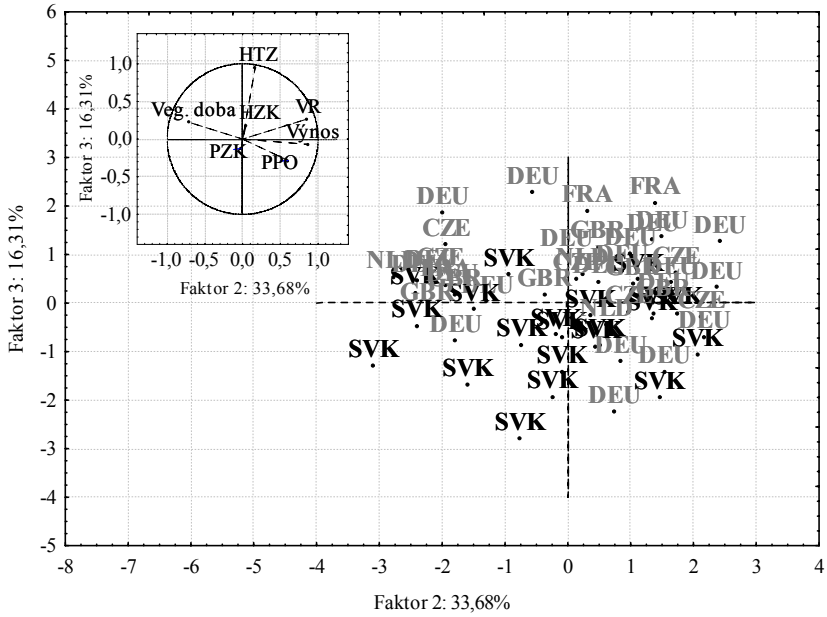
Výnosovou úroveň významně ovlivnily vegetační podmínky, zejména srážky v měsíci květnu roku 2010. I když průměrný výnos zrna kolísal od 8,4 (Acrobat-GBR) po 9,9 t.ha^{-1} (Stine-DEU), z Obr. 1 je zřejmý negativní vliv tohoto ročníku na výnos i jednotlivé výnosové prvky a vzájemné vztahy mezi nimi. Vliv ročníku se projevil i při posuzování vlivu délky vegetační doby na výnos zrna. Paradoxně byla naměřena negativní korelace mezi těmito ukazateli. Z Obr. 2 je ovšem patrné, že délka vegetační doby není v jednotlivých letech v záporném vztahu s výnosem zrna, naopak se jeví tento vztah jeko neutrální až mírně pozitivní.



Obr. 2
Maticový kategorizovaný graf výnosu zrna odrůd ječmene jarního (Kroměříž, 2008-2010; ▲ je označen výnos odrůdy Streif v jednotlivých letech)

Byl potvrzený známý vliv počtu produktivních odnoží na výnos zrna (r=0,58***) i když z grafu hlavních komponent vyplývá, že tento výnosový prvek není rozhodujícím ve všech zemích, kde se šlechtí nové odrůdy jarního ječmene. Jak je zřejmé z uvedeného grafu na Obr. 3, ze skupiny zkoušených odrůd se vyčlenily zejména materiály ze Slovenska, které bez ohledu na ročník vytvářely skupinu odrůd s dobrým výnosovým potenciálem, nižší HTZ, kratší vegetační dobou a středním až silnějším odnožováním.

V letech 2009-2010 byl zkoušen malý sobor nových odrůd původem z Německa (soubor označený II). Obdobně jako v předchozím hodnoceném souboru, také zde (Tab. 2) se odrůdy vyznačovaly delší vegetační dobou, vysokým výnosem zrna a odolností padlí travnímu (kromě odrůdy Grace). Jejich potenciální šlechtitelská hodnota bude spočívat v přizpůsobivosti lokálním pěstitelským podmínkám a hlavně úrovní sledovaných parametrů sladovnické kvality, která je každoročně hodnocena ve Výzkumném ústavu pivovarském a sladařském Praha, a.s., Sladařském ústavu Brno.



Obr. 3
Projekce charakteristik odrůd, členěných podle státu původu, do faktorové roviny (analýza hlavních komponent, 2008-2010)

Soubor III, jehož zkoušení započalo v roce 2010 obsahoval kromě pluchatých materiálů také sérii nových perspektivních liní ječmene jarního s bezpluchým typem zrna. Některé z těchto rozpracovaných šlechtitelských materiálů patří ke genotypům s odlišným poměrem dvou základních polysacharidů škrobu. Celkově je uvedený soubor III nejobsáhlejší, má 50 položek. V Tab. 3 jsou uvedeny průměrné hodnoty a variabilita sledovanýcgh znaků a ukazatelů. Tyto charakteristiky a vlastnosti budou sledovány v dalších dvou letech. Vzhledem k průběhu počasí v roce 2010 nebyly diference mezi jednotlivými položkami souboru výrazné.

Závěr

Studium rozsáhlejší kolekce vzájemně odlišných materiálů umožňuje lépe postihnout existující diference mezi studovanými genetickými zdroji a provést porovnání z pohledu známých, v dřívější době podrobně prostudovaných odrůd (Dotlačil 2003). Pokud porovnáváme současné produktivní odrůdy pluchatého ječmene jarního, je zřejmé jejich přibližování ve znacích, požadovaných producenty i zpracovateli, tedy ve výnosu zrna a hlavních kvalitativních sladovnických parametrech.

Tab. 2
Vybrané znaky a ukazatele produktivních odrůd ječmene jarního
(Kroměříž, 2009-2010, soubor II)

odrůda	stát původu	veg. doba, dny	E.g.[1)]	P.t.[1)]	P.h.[1)]	výnos zrna, t.ha^{-1}		počet prod. odnoží	
		medián	medián	medián	medián	průměr	s_x	průměr	s_x
Advent	CZE	108	9.0	4.5	7.0	7.6	0.1	707.0	9.0
Propino	DNK	110	9.0	4.0	7.5	8.0	0.5	565.5	66.5
Steward	DEU	108	9.0	4.0	5.0	8.6	0.5	685.0	31.0
Sunshine	DEU	110	9.0	5.5	7.0	8.9	0.9	673.5	34.5
Grace	DEU	109	5.5	6.5	6.5	9.1	0.8	721.5	42.5
Yukata	DEU	111	9.0	7.0	6.5	9.3	1.4	585.5	17.5
Kontiki	DNK	110	9.0	5.5	6.0	8.7	1.5	681.5	2.5
Vista	NLD	107	9.0	6.0	6.0	7.7	1.1	757.5	98.5

odrůda	odol. poléh.[1)]	výška, cm		HTZ, g		počet zrn/klas		hmotnost zrna/klas, g	
	medián	průměr	s_x	průměr	s_x	průměr	s_x	průměr	s_x
Advent	7.5	82.0	12.0	45.5	3.4	23.9	1.5	1.1	0.1
Propino	7.0	83.5	9.5	45.4	2.7	31.2	0.1	1.4	0.1
Steward	7.5	85.0	12.0	45.7	2.1	27.7	1.7	1.3	0.1
Sunshine	7.5	87.0	10.0	46.6	1.1	28.4	2.2	1.3	0.1
Grace	7.5	77.5	7.5	48.3	0.6	26.2	1.2	1.3	0.1
Yukata	7.5	86.0	2.0	49.1	0.1	32.7	5.9	1.6	0.3
Kontiki	9.0	80.0	8.0	47.4	0.6	26.8	4.2	1.3	0.2
Vista	8.0	75.0	7.0	49.0	0.4	20.8	0.5	1.0	0.1

[1)] - viz. Materiál a metodika

Podrobnější studium ovšem ukazuje, že evropské šlechtitelské trendy tvorby moderních odrůd ječmene vycházejí i z výrazně odlišných konstrukcí jednotlivých výnosotvorných prvků. Oproti dlouhá léta uplatňovanému směru tvorby výnosu vysokým počtem odnoží se v posledních letech dostávají do popředí odrůdy se středním počtem odnoží, avšak vysoce produktivním klasem. Jak prokazují naše výsledky, jsou tyto odrůdy mnohdy lepší v záverečné fázi hodnocení výnosu, tedy výnosu předního zrna. Kolísaní povětrnostních podmínek v posledních letech často vyúsťuje v předčasné dozrávání, zejména u pozdnějších genotypů, což se projevuje zvýšeným propadem a ztrátou potenciálního zisku z produkce takových odrůd.

V sortimentu odrůd jarního ječmene se v posledních letech objevují i genotypy ječmene s bezpluchým zrnem, jejichž využití je směrováno pro krmení a potravinářství. Nové výchozí zdroje pro šlechtění odrůd bezpluchého ječmene sice nemohou v důsledku ztráty pluchy při dozrávání dosáhnout stejné výnosové úrovně jako moderní odrůdy s pluchatým zrnem. Jsou však již v řadě hospodářských znaků plně srovnatelné s pluchatými odrůdami, což vede ke stále lepší perspektivě jejich uplatnění v praxi.

Tab. 3
Vybrané znaky a ukazatele pluchatých a bezpluchých odrůd a perspektivních nových linií ječmene jarního
(Kroměříž 2010, soubor III)

odrůda	N	ukazatel	veg. doba, dny	odol. poléh.[1)]	E.g.[1)]	P.t.[1)]	P.h.[1)]
bezpluché	13	medián	113	9	8	7	7
		kvantil 25%	112	9	8	7	6
		kvantil 75%	114	9	9	8	8
pluchaté	37	medián	117	9	9	7	7
		kvantil 25%	114	9	9	6	7
		kvantil 75%	118	9	9	8	8

odrůda		výška, cm	počet prod. odnoží	výnos zrna, t.ha^{-1}	HTZ, g	počet zrn/klas	hmotnost zrna/klas, g
bezpluché	průměr	73.2	650.9	5.3	40.8	20.5	0.8
	s_x	1.9	16.2	0.2	1.1	1.7	0.10
	V, %	9.4	9.0	16.5	9.0	19.7	16.5
pluchaté	průměr	70.8	654.1	7.0	46.6	23.1	1.1
	s_x	1.1	11.0	0.3	0.7	0.9	0.1
	V, %	9.1	10.2	25.2	8.6	22.2	24.0

[1)] - viz. Materiál a metodika

Poděkování: Práce byla podpořena projektem NAZV QH72251, Národním programem konzervace a využití genetických zdrojů rostlin Ministerstva zemědělství České republiky a projektem MSM2532885901 Ministerstva školství mládeže a tělovýchovy ČR.

Literatura

DOTLAČIL L.: Konzervace a regenerace genetických zdrojů vegetativně množených druhů rostlin – současné problémy a přístupy k jejich řešení. Sborník referátů ze seminářů Konzervace a regenerace genetických zdrojů vegetativně množených druhů rostlin Konzervace a Dostupnost a využívání genetických zdrojů rostlin a podpora biodiversity, konaného 26.listopadu 2003, CHI s.r.o. Žatec a 24. listopadu 2004, Oseva PRO s.r.o. VST Zubří.

MILOTOVÁ J., VACULOVÁ K. 2010. Hodnocení nových přírůstků kolekce genetických zdrojů ječmene jarního. Obilnářské listy, 3, ISSN 1212-138X, v tisku.

LEKEŠ, J. et al.,1986: Klasifikátor genus Hordeum L.

STEHNO Z., DOTLAČIL L., FABEROVÁ I. 2008. Evaluation of Czech wheat, triticale and winter barley collections of genetic resources aimed at their use in breeding, pp.38-42, In: Proceedings of the International Scientific Meeting "Use of Genetic Resources of Cultivated Plants", Žatec, Česká republika.

Adresa autorů:
Jarmila MILOTOVÁ, [1]Zemědělský výzkumný ústav Kroměříž, s.r.o., Havlíčkova 2787/121, 767 01 Kroměříž, Česká republika, e-mail: milotova.jarmila@vukrom.cz
Kateřina VACULOVÁ, [2]Agrotest fyto, s.r.o., Havlíčkova 2787/121, 767 01 Kroměříž, Česká republika

DVADSAŤ ROKOV VÝSKUMU POLYMORFIZMU ENZÝMOV POĽNOHOSPODÁRSKYCH PLODÍN NA SLOVENSKU – VÝSLEDKY, ICH APLIKÁCIA A PERSPEKTÍVY
TWENTY YEARS OF ENZYME POLYMORPHISM RESEARCH OF AGRICULTURAL CROPS IN SLOVAKIA – RESULTS, THEIR APPLICATIONS AND PERSPECTIVES

Pavol MÚDRY

The history of the enzyme polymorphism research of agricultural crops in Slovakia has begun in the year 1990 on Maize research institute (Trnava) and continued in Zeainvent, Sempol holding (both in Trnava) and several last years on Department of Biology, Faculty of Education, Trnava University. During these two decades the attention was devoted to adapt standardised methodologies of enzyme polymorphism analyses of agricultural crops – maize, sunflower, soybean, pea, chickpea, grass pea, tall fescue, rye grass, clover, chamomile and amaranth. The polymorphism of ACP, ADH, CAT, DIA, GLU, GOT, IDH, MDH, PGD, PGI and PGM to know dimensions of their diversity in genetic resources of Slovak provenience was mostly studied. The knowledge of enzyme polymorphism diversity was utilised in mapping of genetic resources, in crop breeding and seed management improvement. In relation to maize and chamomile enzyme multiplicity study was oriented to effect of different doses of cadmium ions on their polymorphism. Our present streaming is oriented on research of enzyme diversity of amaranth genetic resources and to enter effectively into breeding of new amaranth varieties.
Key words: agricultural crops, isoenzymes, starch gel electrophoresis, perspectives

Úvod

Už v osemdesiatych rokoch minulého storočia bolo známe, že nové odrody poľnohospodárskych plodín budú čoraz ťažšie prekonávať kvantitatívne a kvalitatívne parametre odrôd pestovaných v praxi. Na zvýšenie kvality šľachtenia a semenárstva využívali významní producenti mnohých plodín poznanie rozsahu diverzity ich zárodočnej plazmy na báze polymorfizmu enzýmov. Za týchto okolností sme začali v roku 1990 oficiálne riešiť polymorfizmus enzýmov aj v bývalom Výskumnom ústave kukurice v Trnave. Počas rokov transformácie ústavu (1990-2002) sa problematika riešila v ZEAINVENT a. s. a v SEMPOL Holding a. s. Mojím príchodom na nové pracovisko v roku 2003 pokračuje výskum na Katedre biológie, Pedagogickej fakulty Trnavskej univerzity. Hlavné ciele dvadsaťročného výskumu boli: a) introdukovať a adaptovať štandardizované metodológie analýzy polymorfizmu enzýmov, b) zvládnuť genetickú interpretáciu polymorfizmu enzýmov, c) zostaviť katalógy izozymogramov – fingerprintov, d) vytvoriť elektronickú databázu izozymogramov odrôd kukurice, e) publikovať a prezentovať dosiahnuté výsledky a g) výchovávať študentov a mladých vedeckých pracovníkov pre riešenie metodologických a aplikačných problémov súvisiacich s polymorfizmom enzýmov.

Materiál a metódy

Používali sme výhradne metódu horizontálnej elektroforézy na škrobovom géle. Je dôležité zdôrazniť, že nejestvuje jedna univerzálna metóda pre všetky poľnohospodárske plodiny. Nami riešené metodologické postupy najviac ovplyvnili práce autorov Bourgoin-Greneche et al. (1993, 1998), Cardy et al. (1980), Stuber et al. (1988). Riešili sme polymorfizmus enzýmov kukurice siatej (*Zea mays* L.), slnečnice ročnej (*Helianthus annuus* L.), sóje fazuľovej (*Glycine max.* [L.] Merr.), hrachu siateho (*Pisum sativum* L.), cícera baranieho (*Cicer arietinum* L.), hrachora siateho (*Lathyrus sativus* L.) repy cukrovej (*Beta vulgaris* L.), kostravy trsteníkovitej (*Festuca arundinacea* Schreb.), mätonohu trváceho (*Lolium perenne* L.), ďateliny plazivej (*Trifolium repens* L.), rumančeka kamilkového [*Chamomilla recutita* (L.) Rauschert], láskavca metlinatého (*Amaranthus cruentus* L.) a odrody *D 279* (*A. hypochondriacus* L. x *A. hybridus* L.). Analyzovaný bol polymorfizmus enzýmov - kyslej fosfatázy (ACP), alkoholdehydrogenázy (ADH), katalázy (CAT), diaforázy (DIA), ß-glukozidázy (GLU), glutamát-oxaloacetáttransaminázy (GOT), izocitrátdehydrogenázy (IDH), malátdehydrogenázy (MDH), jablčného enzýmu (ME), 6-fosfoglukonátdehydrogenázy (PGD), fosfoglukoizomerázy (PGI), fosfoglukomutázy (PGM), mannózofosfátizomerázy (MPI), peroxidázy (PRX) a šikimátdehydrogenázy (SAD).

Výsledky a diskusia

Etapa 1990-1994 bola významná spoluprácou troch výskumných pracovísk na adaptácii metodologických postupov analýzy polymorfizmu enzýmov kukurice (ZEAINVENT a. s., Trnava), zásobných bielkovín (ÚKSÚP – Bratislava, RNDr. Ľubomír Horváth) a genomiky (VÚRV – Piešťany, RNDr. Ján Kraic) pre účely testovania odrodovej identity a homogenity analyzovaných vzoriek osív. Sústredili sme štandardné vzorky rôznych línií (public lines) univerzít z USA, bola zvládnutá metodológia analýzy polymorfizmu ACP, ADH, IDH, MDH, PGI, PGD, PGM. Katalóg fingerprintov obsahoval osemnástich povolených hybridov.

Etapa 1995-1998 – riešenie metodológie analýzy polymorfizmu enzýmov slnečnice, sóje, hrachu. Na báze polymorfizmu ACP, GOT, MDH, ME, PGD, PGI, PGM a SAD bolo zmapovaných 52 odrôd slnečnice,

ACP, DIA, IDH, MPI, PGD, PGM, PRX šesť odrôd sóje, IDH a PGD 35 odrôd hrachu a vytvorený katalóg ich fingerprintov. Bola riešená metodológia analýzy polymorfizmu ADH, MDH, PGD a PGM dvadsiatich odrôd cícera baranieho a desatich hrachora siateho pre účely VÚTPHP Banská Bystrica.

Etapa 1999-2002 riešila rozšírenie analýzy polymorfizmu enzýmov kukurice siatej zo siedmich druhov enzýmov (ACP, ADH, IDH, MDH, PGI, PGD, PGM) na jedenásť (plus CAT, DIA, GLU, GOT) a dosiahli sme štandard Francúzska pre testovanie odrodovej identity, čistoty a stability. Zmapovali sme 62 krajových populácií, 41 samoopelivých línii, 24 dvojlíniových hybridov - tvorba elektronickej databázy fingerprintov. Realizoval sa výskum polymorfizmu enzýmov kostravy trsteníkovitej, mätonohu trváceho a ďateliny plazivej (pre VÚTPHP) a pletív explantátových kultúr repy cukrovej (IDH, MDH, PGD, PGI a PGM).

Etapa 2003-2005 znamená pokračovanie v proteomickej klasifikácii odrôd kukurice. Zmapovali sme 31 krajových populácií, 18 samoopelivých línií a 13 dvojlíniových hybridov. Pokračovali sme v tvorbe elektronickej databázy ich fingerprintov. Do tejto etapy spadá aj naša spolupráca s Ústavom genetiky a biotechnológií rastlín SAV v Nitre. Podieľali sme sa na riešení identifikácie dihaploidov mikrospórových explantátových kultúr kukurice analýzou polymorfizmu enzýmov.

Etapa 2006-2008 – riešenie metodológie analýzy polymorfizmu enzýmov (ACP, ADH, IDH, MDH, PGD, PGI, PGM) v listoch a koreňoch štyroch kultivarov rumančeka kamilkového kultivovaných pri rôznych koncentráciách iónov kadmia v živnom médiu. Analýzy vylúčili vplyv iónov kadmia na polymorfizmus analyzovaných enzýmov aj pri jeho vysokých koncentráciách v živnom médiu. Analogicky reagovali aj klíčiace rastliny kukurice siatej. Ekofyziologický výskum sa realizoval v spolupráci s Chemickým ústavom, Prírodovedeckej fakulty, Univerzity Komenského.

Etapa 2009-2011 je etapou pokračujúcej spolupráce s Ústavom genetiky a biotechnológií rastlín SAV v Nitre. Pracovisko sa už niekoľko rokov venuje šľachteniu, genetickému a biotechnologickému výskumu láskavcov. Naša participácia na týka výskumu časti proteomiky láskavcov. Doteraz sme vyriešili a prezentovali metodológiu analýzy polymorfizmu jedenástich enzýmov pre analýzu semien, klíčiacich rastlín a listov láskavcov pre účely štúdia vplyvu rádiomutagénu na rozsah variability enzýmov dvoch vyšľachtených odrôd.

Záver

Z našich experimentálnych výsledkov a skúseností z pestovateľskej praxe vyplýva, že najväčšie praktické využitie polymorfizmu enzýmov je v oblasti popisu odrôd pre testovanie ich odrodovej identity, homogenity a stability. Ďalej pre dokonalejšiu garanciu autorských práv šľachtiteľa, kvalitatívnych parametrov výrobcu a distribútora a garanciu práv spotrebiteľa. Najintenzívnejšie testovanie kvality partií osiva kukurice z výrobných plôch sa realizovalo v rokoch najväčšieho rozmachu šľachtenia a výroby osív (1995-1999). Riešili sme identitu našich odrôd kukurice pred vyradením v druhom roku testovania výkonnosti v Maďarsku. Na základe našich analýz ich Maďarsko povolilo pre pestovanie v praxi. Aj v súčasnosti sporadicky analyzujeme vzorky z partií osív podozrivých na nedostatočnú kvalitu výroby na základe požiadania šľachtiteľa alebo výrobcu. V tomto roku sme riešili expertíznou analýzou identitu a pôvod vzoriek kukurice aj z trestnej činnosti. Intenzívnejšie využívanie polymorfizmu enzýmov v praxi by zabezpečila právna norma, ktorá by podmieňovala povolenie novej odrody aj popisom na báze molekulárnych markerov tak, ako je to v mnohých poľnohospodársky vyspelých krajinách. Napriek prenikaniu popisu a právnej ochrany odrôd na základe genomických prístupov, naďalej zostáva v platnosti aj popis odrôd na základe polymorfizmu enzýmov. K využívaniu polymorfizmu enzýmov by pomohla aj obnova zrušeného šľachtenia mnohých zo spomenutých plodín. Najväčšie perspektívy v súčasnosti a v blízkej budúcnosti má vzhľadom na mnohé špecifiká riešenie polymorfizmu enzýmov ekonomicky významných druhov a genofondu láskavca.

Poďakovanie: Ďakujem RNDr. Ľubošovi Juráčkovi (1990-2002), Mgr. Mariánovi Dragúňovi, CSc. (2003-2009), technikom, študentom a doktorandom, ktorý so mnou spolupracovali na riešení a všetkým inštitúciám, ktoré finančne podporili riešenie štátnych výskumných úloh, grantu, projektov a zvlášť Vedeckej grantovej agentúre, MŠ SR a Slovenskej akadémii vied, ktoré financujú súčasné riešenie projektu VEGA (projekt č. 2/0109/09).

Literatúra

BOURGOIN-GRENECHE, M., LALLEMAND, J. (1993): GEVES-La Miniére, 1993, 1-63.

BOURGOIN-GRENECHE, M., LALLEMAND, J., POUGET, R. (1998): Ed. by: GEVES - La Miniére – F 78285 GUYANCOURT Cedex, p. 73.

CARDY, B.J., STUBER, C.W., GOODMAN, M.M. (1980): Institute of Statistics Mimeograph Series No. 1317, North Carolina State University, Raleigh, 1980, p. 87.

STUBER, C.W., WENDEL, J.F., GOODMAN, M.M., SMITH, J.S.C. (1988): Technical Bulletin 286, North Carolina Agric. Res. Service, North Carolina State University, Raleigh, 1-87.

Adresa pracoviska: RNDr. Pavol Múdry, CSc., Trnavská univerzita, Pedagogická fakulta, Katedra biológie, Priemyselná 4, P.O. Box č.9, 918 43 Trnava, tel.: 033/5514618, fax: 033/551 60 47, e-mail:pmudry@truni.s

VPLYV RÁDIOMUTAGÉNU NA POLYMORFIZMUS VYBRANÝCH ENZÝMOV V DVOCH DRUHOCH LÁSKAVCA
EFFECT OF RADIOMUTAGEN ON POLYMORPHISM OF CHOSEN ENZYMES IN TWO AMARANTH SPECIES

Pavol MÚDRY – Alena GAJDOŠOVÁ

Increasing demand for the breeding, proteomic, genomic and metabolomic study in Amaranthus species led us to map two species - Amaranthus cruentus L. (genotype Ficha), genotype K-433(A. hypochondriacus L. x *A. hybridus* L.*) and theirs lines improved by mutagenesis (gamma rays) which are characterized by a good seed quality and quantity, suitable for food production. For the mapping on the basis of enzyme (ACP, ADH, CAT, DIA, GLU, GOT, IDH, MDH, PGD, PGI and PGM) polymorphism horizontal starch gel electrophoresis was used. All genotypes, to be analyzed, possessed the same polymorphism besides lines derived by mutagenesis from genotype K-433. These lines differ from others genotypes in PGM polymorphism. The results support idea of interspecies sensitivity of amaranths to mutagenesis by means of enzyme polymorphism. Gamma rays mutagenesis is one of the ways which may to change enzyme polymorphism in amaranth species, too.*
Key words: *Amaranthus sp., isoenzymes, horizontal starch gel electrophoresis, molecular markers, isozymograms*

Úvod

V roku 2009 sme si pripomenuli päťdesiate výročie výskumu polymorfizmu enzýmov. Presne v roku 1959 Markert a Möller uviedli na vedeckú scénu pojem izozým-izoenzým, ktorý bol vyjadrením existencie polymorfných foriem enzýmov alebo mnohotných foriem enzýmov (multiplicita enzýmov). Genetická podmienenosť syntézy bielkovín, a teda aj enzýmov a prevažne ich kodominantný prejav fenotypu predurčili praktické využitie poznania polymorfizmu enzýmov poľnohospodárskych plodín hlavne v oblasti genetiky, šľachtenia a semenárstva. O úrovni poznania a využívania polymorfizmu enzýmov v poľnohospodárskej praxi rozhoduje hlavne ekonomický význam plodiny, tradícia jej pestovania a rozsah variability polymorfizmu enzýmov v zárodočnej plazme, resp. jej vhodné rozloženie v analyzovaných vzorkách. V predošlých prácach (Múdry, Gajdošová 2009; Múdry et al. 2010) sme uviedli, že napriek ekonomickému významu mnohých druhov rodu láskavec (*Amaranthus* sp.), vedecké práce, ktoré by charakterizovali ich polymorfizmus enzýmov sú sporadické. Významne tento stav poznania mohla ovplyvniť práca publikovaná autormi Jain et al. (1980), v ktorej sa uvádza, že rozsah variability polymorfizmu enzýmov láskavcov je úzky. K danému stavu mohlo prispieť aj to, že tradície pestovania a využívania láskavcov hlavne v poľnohospodársky vyspelých krajinách Európy nie je na úrovni iných tradične pestovaných plodín. V priebehu troch desaťročí na poli výskumu polymorfizmu enzýmov láskavcov sa striedajú práce, ktoré sú nejednotné, čo sa týka názorov na rozsah variability polymorfizmu enzýmov a jeho využitia v praxi.

Hlavným cieľom experimentálnej práce bolo zmapovať na báze analýzy polymorfizmu enzýmov dva rodičovské druhy láskavca a ich perspektívne mutantné línie vyvinuté šľachtením s využitím radiačnej mutagenézy. Vyhodnotiť rozsah diverzity polymorfizmu analyzovaných vzoriek a posúdiť možnosť zvýšenia rozsahu polymorfizmu enzýmov radiačnou mutagenézou.

Materiál a metódy

Experimentálnu prácu sme zrealizovali v rokoch 2009-2010. Do analýz polymorfizmu enzýmov sme zaradili dva genotypy láskavca – láskavec metlinatý (*Amaranthus cruentus* L.), odroda Ficha (HTS 0.85 g) a odroda K-433 (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. Z týchto kontrolných materiálov v spolupráci s Medzinárodnou atómovou agentúrou vo Viedni boli pripravené radiomutanty (γ-žiarenie, 400 Gray), z ktorých boli vyvinuté mutantné línie – z odrody Ficha sú to línie C1-C6 a z odrody K-433 sú to línie D1, D2 a D3.

Prvý experiment zahŕňal vzorky trojdňových klíčiacich rastlín a druhý vzorky suchých semien. Klíčenie semien a rast klíčencov prebiehal v termostate na mokrom filtračnom papieri sýtenom deionizovanou vodou v Petriho miskách v tme, pri teplote 25 °C a relatívnej vlhkosti 95 %. Rozmer knôtov (Whatman 2) bol uniformný - 11 x 1,5 mm. Pre porovnanie mobility zón enzymatickej aktivity láskavcov s mobilitou zón aktivity enzýmov časti koleoptily bol použitý extrakt z päťdňovej koleoptily dvojlíniového hybrida kukurice (Sc 3098 x 3150, Sempol Holding, Trnava, Slovenská republika) pestovanej za tých istých kultivačných podmienok.

Pre štúdium polymorfizmu enzýmov sme mierne modifikovali a experimentálne overenú metódu horizontálnej elektroforézy na škrobovom géle (Múdry, Gajdošová 2009), ktorá vychádza zo štandardizovanej metódy pre analýzy polymorfizmu enzýmov v koleoptilách kukurice publikovanej autormi Stuber et al. (1988). Uskutočnili sme analýzy polymorfizmu kyslej fosfatázy (ACP, E.C. 3.1.3.2), alkoholdehydrogenázy (ADH, E.C. 1.1.1.1), diaforázy (DIA, E.C. 1.6.99.2), 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), fosfoglukoizomerázy (PGI, E.C. 5.3.1.9) a fosfoglukomutázy (PGM, E.C. 2.7.5.1). Pomer extrakčného činidla ku vzorke bol: - 20 µl na časť koleoptily kukurice jedenásť mm dlhej a 100 µl /200 mg vzorky láskavca. Elektroforetická separácia prebiehala v chladničke pri teplote 4 °C. Zloženie extrakčného činidla, tlmivých roztokov na prípravu škrobových gélov, vyfarbovacích roztokov a parametre režimu konštantného výkonu boli podľa hore uvedených metodík.

Výsledky a diskusia

Využívanie radiačnej mutagenézy nie je neznámym prístupom v šľachtení poľnohospodárskych plodín. Existujú práce, ktoré pojednávajú o vplyve radiačnej mutagenézy na poľnohospodárske plodiny od úrovne cytologickej, cez explantátové kultúry až po produkčnú výkonnosť porastov, napr. aj láskavcov s pozitívnym efektom (Gómez et al. 2006). Vplyv radiačnej mutagenézy na polymorfizmus enzýmov je často publikovaný vo vzťahu k EST (esteráza), PER (peroxidáza), ACP, CAT, GOT a DIA. Zatiaľ sme nezaevidovali žiadnu prácu s láskavcami, ktorá by riešila polymorfizmus enzýmov vo vzťahu k radiačnej mutagenéze. Z našich experimentálnych výsledkov vyplýva, že polymorfizmus analyzovaných enzýmov všetkých vzoriek je monomorfný s výnimkou enzýmu PGM mutantných línií odrody K-433, kde došlo k zníženiu počtu izoforiem zo štyroch na tri. Tieto výsledky naznačujú druhovú citlivosť na radiačnú mutagenézu polymorfizmom PGM. Polymorfizmus ostatných enzýmov je stabilný, čo môže súvisieť s ich významom v metabolizme. Experimentálna práca inšpiruje k riešeniu nových otázok vzhľadom na to, že výsledky boli získané na zmesných vzorkách. I napriek tomu, že hlavnú úlohu pri opeľovaní láskavcov má autogamia (až 25 percentná alogamia), zostáva otvorená otázka vnútrodruhovej variability polymorfizmu (okrem ADH, kde je zdetekovaná vo všetkých vzorkách iba jedna izoforma). Tieto výsledky potvrdzujú, že aj pri láskavcoch je možná zmena rozsahu variability enzýmov použitím radiačnej mutagenézy.

Záver

Práca prináša poznatok o druhovej odlišnosti v citlivosti analyzovaných láskavcov na radiačnú mutagenézu zmenou polymorfizmu PGM, a tým aj možnosť meniť rozsah variability polymorfizmu. Vzhľadom na veľmi malý súbor analyzovaných druhov nepotvrdzuje, avšak ani nevyvracia tvrdenie o úzkej alebo dostatočnej variabilite zárodočnej plazmy láskavcov na báze polymorfizmu enzýmov. Na vyriešenie nezodpovedaných otázok je nevyhnutný ďalší výskum.

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

Literatúra

GÓMEZ, P.L., HEROS, A.E., DE LA BARRA, A.E. (2006): Mejoramiento genético de la kiwicha (*Amaranthus caudatus*) empleando inducción de mutaciones. Agro Enfoque, **21**, 32-37.

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., GAJDOŠOVÁ, A. (2009): 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. In: *Nové poznatky z genetiky a šľachtenia poľnohospodárskych rastlín.* Zb. zo 16. vedeckej konferencie. Piešťany, SCPV, Výskumný ústav rastlinnej výroby, 27-30, ISBN 978-80-89417-04-09.

MÚDRY, P., HRICOVÁ, A., CHALÁNYOVÁ, M. (2010): Adaptácia metodologických postupov analýzy polymorfizmu enzýmov v listoch láskavca (*Amaranthus* sp. L.) pre štúdium vnútrodruhovej variabilitya interorgánových vzťahov. In: *Hodnotenie genetických zdrojov rastlín pre výživu a poľnohospodárstvo*. Zb. zo 6. vedeckej konferencie s medzinárodnou účasťou. Piešťany, Centrum výskumu rastlinnej výroby, 158-159, ISBN 978-80-89417-13-1.

STUBER, C.W., WENDEL, J.F., GOODMAN, M.M., SMITH, J.S.C. (1988): 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.

Adresa pracoviska:
RNDr. Pavol Múdry, CSc., Trnavská univerzita, Pedagogická fakulta, Katedra biológie, Priemyselná 4, P.O. Box č.9, 918 43 Trnava, tel.: 033/5514618, fax: 033/551 60 47, e-mail: pmudry@truni.sk,
RNDr. Alena Gajdošová, CSc., Ústav genetiky a biotechnológií rastlín SAV, Akademická 2. P.O. Box 39A, 950 07 Nitra, tel.: 037/733 66 61, fax: 037/733 66 60, e-mail: alena.gajdosova@savba.sk.

HODNOTENIE VYBRANÝCH GENOTYPOV MAKU SIATEHO Z HĽADISKA OBSAHU ALKALOIDOV A ÚRODY MAKOVÍC
EVALUATION OF SELECTED OPIUM POPPY GENOTYPES BY THEIR ALKALOID CONTENT AND CAPSULE YIELD

Darina MUCHOVÁ – František ONDREJČÁK – Mária LICHVÁROVÁ – Natália IVASIUKOVÁ

The increased alkaloid content in dry capsules is the main aim of poppy breeding oriented for pharmaceutical purpose. A set of 19 lines of opium poppy, Papaver somniferum L., were examined for the alkaloids by HPLC analysis and yield in dry capsules. Our results showed that the ratio of the alkaloids, morphine, codeine and thebaine ranged from 0.47 to 1.37%, 0.03 to 0.11%, 0.0 to 0.11%, respectively, in the selected 19 poppy genotypes. According to their alkaloid content, 9 lines had significantly higher morphine (>1.0%), three lines had moderately higher codeine (≥0.10%), and one line had moderately higher thebaine (≥0.10%) levels. From investigated alkaloids the wide variability was noted only in morphine with the highest morphine content 1.43 % in check variety Buddha. Due to big differences among evaluated genotypes in the yield of dry capsuels there were recorded also big differences in the yield of morphine per area unit. Eight genotypes were comparable in yield of morphine with check varieties Buddha and Lazur.
Key words: opium poppy, morphine, codeine, thebaine, yield of dry capsules

Úvod

Snáď žiadna z liečivých rastlín nedosahuje tak vysokú potravinársku hodnotu spolu s vynikajúcimi farmaceutickými vlastnosťami ako práve mak siaty (*Papaver somniferum* L.). V súčasnosti je známych viac ako 100 rôznych alkaloidov produkovaných makom siatym, z ktorých morfínany (morfín, kodeín a tebaín), ale aj papaverín a sanguinarín majú nezastupiteľné miesto vo farmaceutickej praxi. Syntetická príprava morfínanov je ekonomicky nezaujímavá, a to pre ich zložitú chemickú štruktúru (Bilková et al. 2006). Ich jediným zdrojom tak naďalej zostávajú rastliny maku. Zvýšený obsah alkaloidov, predovšetkým morfínu v suchých tobolkách je jedným z hlavných cieľov šľachtenia maku siateho orientovaného na tvorbu nových typov rastlín pre farmaceutické využitie.

Cieľom práce bolo zhodnotiť novo vyvíjané genotypy maku siateho z hľadiska ich alkaloidného spektra a dosiahnutej úrody makovíc na jednotku plochy.

Materiál a metódy

V hodnotenom súbore bolo zaradených 19 genotypov maku siateho z VŠS Malý Šariš, ktoré boli porovnávané s 2 kontrolnými odrodami so stredným obsahom morfínu, určenými predovšetkým na potravinárske využitie – Major a Opal a 2 odrodami s vysokým obsahom morfínu v tobolkách – Lazur a Buddha. Obsah alkaloidov bol stanovený HPLC metódou vo VSO Opava. Úroda makovíc, ako jeden zo základných faktorov dosiahnutia vysokej úrody alkaloidov bola hodnotená v poľných podmienkach v maloparcelkových pokusoch na lokalite VŠS Malý Šariš v roku 2009. Rastliny maku boli pestované v spone 250 x 100 mm.

Výsledky a diskusia

V súbore 19 vyselektovaných genotypov maku siateho sa obsah jednotlivých alkaloidov – morfínu, kodeínu a tebaínu pohyboval v rozmedzí od 0,47 do 1,37%; 0,03 do 0,11%; resp. od 0,0 do 0,11%. Na základe stanoveného obsahu alkaloidov 9 línií malo významne vyšší morfín (>1,0%), 3 línie mali mierne vyšší kodeín (≥0,10%) a 1 línia mala mierne vyšší tebaín (≥0,10%).

Ako hlavný alkaloid bol v skúmanom súbore genotypov analyzovaný morfín s najvyššou hodnotou 1,43 %, ktorú dosiahla kontrolná odroda Buddha. Naopak, najnižší obsah morfínu, 0,47 % dosiahol genotyp ZB-7. Obsah tohto základného alkaloidu je závislý od genotypu a je podmienený polygénne. Jeho celkový obsah v suchých tobolkách je ovplyvnený pôdnymi a klimatickými podmienkami ako aj priebehom poveternostných podmienok počas vegetačného ročníka, hlavne v druhej polovici vegetácie. Zrážky vyplavujú morfín z jednotlivých makovíc. Ani jeden z vybraných genotypov neprekonal v obsahu morfínu odrodu Buddha. Odrodu Lazur s obsahom 1,29 % prekonali 2 genotypy. Čo sa týka úrody morfínu z jednotky plochy determinujúcim faktorom je nielen samotný obsah tohto alkaloidu, ale aj úroda jeho zdrojovej suroviny, makoviny. VLK et al. (2009) zistili pri hodnotení 30 odrôd maku siateho, zapísaných v Spoločnom katalógu odrôd EU, že odrody s vyšším obsahom alkaloidov dosahovali nižšiu úrodu semena aj makoviny. Záporný vzťah medzi úrodou makovíc a obsahom morfínu, uvádzaný ďalšími autormi, bol potvrdený aj v nami analyzovanom súbore korelačným koeficientom s hodnotou -0,34. Jedine genotyp K 430-75 dosahoval vysokú úrodu makovíc 1,32 t.ha^{-1} pri vysokom obsahu morfínu 1,13 %.

Veľké rozdiely v dosiahnutej úrode makovíc, pohybujúcej sa od 0,80 do 1,44 t.ha $^{-1}$ sa premietli aj do úrody morfínu. Z hľadiska úrody morfínu 8 genotypov je porovnateľných s kontrolnými odrodami Buddha a Lazur.

Tabuľka 1: Hodnotenie obsahu alkaloidov, úrody makovíc a úrody morfínu vybraných genotypov maku siateho

Genotyp	Koncentrácia alkaloidov vo vzorke (%)			Úroda makovíc		Úroda morfínu	
	Morfín	Kodeín	Tebaín	$t.ha^{-1}$	%	$kg.ha^{-1}$	%
K 409-8	1,02	0,03	st.	0,98	89,7	9,98	98,8
K 412-24	1,06	0,04	st.	1,03	94,8	10,96	108,5
K 412-25	0,77	0,04	-	0,97	88,8	7,45	73,8
K 413-60	1,08	0,05	st.	0,92	84,6	9,96	98,7
K 414-33	0,97	0,04	-	0,98	90,3	9,54	94,5
K 430-75	1,13	0,06	0,01	1,32	120,7	14,87	147,2
K 418-11	1,22	0,11	0,11	1,04	95,4	12,69	125,6
K 478-93	0,73	0,05	0,02	1,23	113,0	8,99	89,0
MS ZB-3	0,79	0,08	0,01	1,27	116,9	10,06	99,6
MS 387	0,89	0,07	st.	1,44	131,9	12,80	126,7
MS 423	0,61	0,04	st.	1,19	109,5	7,28	72,1
MSB 2	0,52	0,05	0,01	0,80	73,7	4,17	41,3
MRF 2	1,32	0,10	0,02	0,86	78,6	11,31	112,0
MRF 4	1,37	0,10	0,01	1,04	95,2	14,21	140,7
MRF 5	1,22	0,09	0,07	0,92	84,3	11,21	111,0
ZB-1	0,57	0,05	-	1,42	129,9	8,07	79,9
ZB-7	0,47	0,06	-	1,14	104,8	5,37	53,1
K 410	1,06	0,08	-	0,95	86,8	10,03	99,3
K 412	0,98	0,08	st.	1,30	118,8	12,69	125,7
Major	0,56	0,06	0,01	1,19	109,2	6,66	66,0
Opal	0,66	0,04	st.	1,06	97,4	7,01	69,4
Buddha	1,43	0,09	0,01	1,01	92,7	14,44	143,0
Lazur	1,29	0,10	0,02	1,04	95,6	13,44	133,1
Priemer	**0,94**	**0,07**	**0,03**	**1,09**	**100,0**	**10,31**	**100,0**

Záver

Z hodnotenia 19 novo vyvíjaných genotypov maku siateho vyplynuli tieto závery: analýza HPLC odhalila, že v testovanom súbore sa nachádzajú genotypy, ktoré sa vyznačujú zvýšeným obsahom morfínu, ale nízkou úrovňou alkaloidov kodeín a tebaín s výnimkou 3 línií s vyšším obsahom kodeínu a 1 línie s vyšším obsahom tebaínu. Vďaka primeranej úrode makovíc v kombinácii s vysokým obsahom morfínu je predpoklad zvýšenej produkcie morfínu na jednotku plochy pri 8 sledovaných genotypoch. Genotyp K 418-11 ako jediný z hodnoteného súboru vykazoval pri všetkých troch sledovaných alkaloidoch výrazne nadpriemerné hodnoty.

Poďakovanie: Táto práca je podporovaná rezortnou úlohou výskumu a vývoja MP SR, úloha č. 2 kontraktu č. 353/2009-940-K „Využitie biotechnologických metód pri tvorbe nových typov rastlín“.

Použitá literatúra

BILKOVÁ, A. – BALAŽOVÁ, A. – OBLOŽINSKÝ, M. – BILKA F. 2006. Biochemický aspekt tvorby sekundárnych metabolitov v rastline maku siateho. In Farmaceutický obzor, 75, 6, s. 152-158.

VLK, R. – KOSEK, Z. – ŠIMEK, P. 2009. Odrůdy máku ze společného katalogu EU – výnosy a spektrum alkaloidů. In Prosperujicí olejniny, Sborník z konference, 10.-11.12.2009, ČZU v Praze, s. 74-78.

Adresy autorov

RNDr. Darina Muchová, RNDr. František Ondrejčák, Ing. Mária Lichvárová, Ing. Natália Ivasiuková, CVRV Piešťany - Výskumno-šľachtiteľská stanica Malý Šariš, muchova@vurv.sk

APLIKACE METOD MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE U GENETICKÝCH ZDROJŮ PŠENICE SETÉ (*TRITICUM AESTIVUM* L.)
APPLICATION OF MOLECULAR BIOLOGICAL METHODS IN GENETIC RESOURCES OF COMMON WHEAT (*TRITICUM AESTIVUM* L.)

Milena MUSILOVÁ – Václav TROJAN – Tomáš VYHNÁNEK – Ladislav HAVEL

The collection of 24 genotypes of wheat (Triticum aestivum L., 2n = 6x = 42, BBAADD), which have purple, blue or yellow grain pigmentation, and one genotype Thinopyrum ponticum (Podp.) Barkworth & D. R. Dewey (2n = 10x = 70, JJJJJJJˢJˢJˢJˢ) was assessed using the SSR markers to detect their genetic relationship. . The chosen 15 SSR markers are localized on chromosomes of A and B genome where also genes responsible for mentioned pigmentation are localized. Based on these SSR markers a dendrogram was calculated. The results showed that Thinopyrum ponticum is highly significantly isolated even if this species is supposed to be a donor of genes for blue pigmentation. The high degree of differences showed 3 genotypes from the group of wheat with purple pericarp, especially the cvs. Abyssinskaya Arraseita, the Purple and the Purple feed. Remaining genotypes are split into two sub-clusters. The minor sub-cluster contained only genotypes with blue aleuron layer. There was identified a high genetic similarity of isogenic lines of wheat cv. Novosibirskaya 67 and ANK genotypes with red grain in the major sub-cluster. The genotypes with yellow endosperm gathered into the major sub-cluster show the high genetic similarity. The results suggest that selected SSR markers can be used for the detection of the level of variability and purity of the samples in breeding programs.
Key words: wheat, genetic variability, polymorphism of DNA, SSR marker, coloured grain

Úvod

U pšenice byly popsány donory netradičního zabarvení obilky (např. purpurového, modrého, žlutého a bílého), které mohou být a jsou využívány pro získání suroviny k rozšíření sortimentu cereálních výrobků. Pšeničná obilka se zvýšeným obsahem přírodních barviv by mohla být vhodná pro výrobu funkčních potravin, které by měly mít kromě prosté výživné hodnoty i příznivý účinek na zdraví konzumenta. V případě barevných pšenic se jedná zejména o antioxidační aktivitu (Trojan et al. 2010). Technologické využití barevných pšenic je spojeno s nutností poznání genetické determinace odchylek v zabarvení a následného využití ve šlechtitelském procesu. V rámci šlechtění je důležitým krokem studium genetické variability donorů požadovaných vlastností. K tomuto účelu je možné využít morfologické markery, proteinové markery a DNA markery.

Materiál a metody

Kolekce pšenic s nestandardním zabarvením obilek čítající 24 genotypů pšenice (*Triticum aestivum* L.) byla doplněna o jeden genotyp planého druhu trávy *Thinopyrum ponticum* (donor genu modrého zabarvení obilky). Těchto 25 genotypů bylo podrobeno analýzám genetické variability pomocí 15 SSR (mikrosatelitních) markerů (*Xbarc163, Xbarc195, Xbarc003, Xbarc077, Xgwm861, Xbarc176, Xbarc170, Xgwm122, Xgwm294, Xgwm445, Xgwm328, Xgwm356, Xwmc428, Xgwm666b, Xcfa2134*) lokalizovaných v místech genů determinující odchylky ve zbarvení obilek, které byly popsány v literatuře u pšenice a tritikale (Khlestina et al. 2004; Kuelung et al. 2006). 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). Reakční směs o celkovém objemu 25 µl obsahuje: 30 ηg templátové DNA, 0,5 U *Taq* polymerázy (Promega, USA), 1x odpovídající pufr, 7,5 µM každého primeru a 100 µM každého dNTP. Teplotní a časový profil reakce byl: 1 cyklus 93°C – 120 s; 30x (93°C – 60 s, 54°C – 120 s, 72°C – 120 s). Pro vizualizaci produktů bylo použito barvení dusičnanem stříbrným (0,2 %) po proběhlé vertikální elektroforéze (při 300 V) na 8 % nedenaturovaném polyakrylamidovém (PAA) gelu v TBE pufru. Výsledky molekulárních analýz byly vyhodnoceny pomocí binární matice, kde 1 znamená přítomnost produktu a 0 absenci produktu. Následně byly tyto hodnoty statisticky zpracovány pomocí programu FreeTree a graficky zpracovány do podoby dendrogramu pomocí programu TreeView. Pro jednotlivé SSR markery byly vypočteny statistické hodnoty DI (index diversity), PI (pravděpodobnost identity) a PIC (polymorfní informační obsah) (Russell et al. 1997).

Výsledky a diskuse

Celkem bylo SSR markery specifickými pro chromozómy A a B detekováno 73 alel, v průměru tedy připadána 5 alel na jeden mikrosatelitní lokus. Velikost amplifikovaných produktů se pohybovala v rozmezí od 100 do 260 bp. Khlestkina et al. (2004); Kuelung et al. (2006) uvádějí přítomnost nulových alel, tu jsme zaznamenali i my v případě čtyř mikrosatelitů (*Xbarc003*, *Xbarc077*, *Xbarc163, Xbarc170*).

Průměrná hodnota DI byla 0,48; průměr PI 0,32 a pro ukazatel PIC byla vypočítána průměrná hodnota 0,47 (tab. 1). Hodnoty vyjadřují vysoký stupeň variability téměř srovnatelný s Holtonem et al. (2004). Při použití 15 SSR markerů bylo získáno množství molekulární dat, která umožňují podrobnější charakteristiku celé kolekce.

Tabulka 1: Statistické zhodnocení analyzovaných SSR markerů

SSR marker	*Lokalizace*	*Počet alel*	*DI*	*PI*	**PIC**
Xbarc163	4B	8	0,52	0,23	0,52
Xbarc195	6A	4	0,51	0,3	0,44
Xbarc003	6A	6	0,64	0,09	0,64
Xbarc077	3B	6	0,72	0,05	0,72
Xgwm861	7A,7B	6	0,67	0,11	0,65
Xbarc176	7B	7	0,59	0,16	0,58
Xbarc170	4A	7	0,56	0,22	0,52
Xgwm122	2A	7	0,52	0,23	0,51
Xgwm294	2A	4	0,65	0,16	0,60
Xgwm445	2A	6	0,60	0,17	0,58
Xgwm328	2A	1	0,07	0,86	0,07
Xgwm356	2A	1	0,07	0,86	0,07
Xwmc428	2A	5	0,69	0,09	0,68
Xgwm666b	3A	3	0,41	0,37	0,39
Xcfa2134	2A	2	0,20	0,65	0,19
Průměr		**5**	**0,48**	**0,32**	**0,47**

Na základě statistického vyhodnocení byl sestaven dendrogram podobnosti analyzovaných genotypů barevných pšenic (UPGMA, Jaccardův koeficient). Z dendrogramu je patrné odlišení genotypu *Thinopyrum ponticum*. Vysoký stupeň odlišnosti jsme zaznamenali i v případě pšenice s purpurovým perikarpem, genotypy *Abyssinskaya Arraseita, Purple* a *Purple feed* vytvořily samostatný klaster. Zbývající genotypy jsou rozděleny do dvou subklasterů, z nichž menší subklaster zahrnuje jen genotypy pšenice s modrou aleuronovou vrstvou. Izogenní linie genotypů s červeným zbarvením obilek pozorujeme ve větším ze dvou subklasterů, přičemž dva genotypy (*ANK-1A* a *ANK-1E)* se podařilo odlišit od zbývajících izogenních linií ANK. Skupina genotypů se žlutým endospermem nacházející se také ve větším subklasteru vykazuje vyšší stupeň podobnosti. V případě odrůd Citrus a Luteus je to dáno společnými předky v rodokmenu. Obě odrůdy pochází od prof. dr. Wilhelma Jahn-Deesbacha z Německa a mají následující rodokmen: Citrus /(Sunnan x Monopol) x Stamm GI 912/, Luteus /(Sunnan x Monopol) x Giessener Stamm/ (ÚKZÚZ, ústní sdělení).

Závěr

Pomocí SSR markerů se podařilo statisticky významně rozlišit tři genotypy pšenice s purpurovými obilkami od ostatních genotypů. Byla také potvrzena příbuznost pšenic se žlutým endospermem. Rozložení dalších analyzovaných genotypů v dendrogramu potvrzuje genetickou podobnost pšenic s modrými obilkami, nevykazují však takovou podobnost s genotypem *Thinopyrum ponticum,* jak se předpokládalo.

Poděkování: Práce vznikla za finanční podpory projektů IGA AF MENDELU č. IP 1/2010 a TP 1/2010, GAČR 204/09/H002.

Literatura

HOLTON, T.A, CHRISTOPHER, J.T., MCCLURE, L., HARKER, N., HENRY, R. J.: Identification and mapping of polymorphic SSR markers from expressed gene sequences of barley and wheat. Mol. Breed., *9*: 63-71.

KHLESTKINA, E.K., THAN, M.H.M., PESTSOVA, E.G., RÖDER, M.S., MALYSHEV, S.V., KORZUN, V., BÖRNER, A. (2004) Mapping of 99 new microsatellite-derived loci in rye (*Secale cereale* L.) including 39 expresed sequences tags. Theor. Appl. Genet., *109*: 725-732.

KUELUNG, C., BAEZINGER, P.S., KACHMAN, S.D., DWEIKAT. I. (2006) Evaluating the genetic diversity of triticale with wheat and rye SSR markers. Crop Sci., *46*: 1692-1700.

RUSSELL, J., FULLER, J., YOUNG, G., THOMAS, B., TARAMINO, G., MACAULAY, M., WAUGH, R., POWELL, W. (1997) Discriminating between barley genotypes using microsatellite markers. Genome, *40*: 442-450.

TROJAN, V., BARTL, P., MUSILOVÁ, M., VYHNÁNEK, T., MARTINEK, P., TREMLOVÁ, B. (2010) Barevné pšenice - genetika, šlechtění a potravinářské využití. In HYGIENA ALIMENTORUM XXXI. 1. vyd. Košice, Slovensko: Univerzita veterinárského lekárstva a farmácie v Košiciach, 5. – 7. 5. 2010: 335-337.

Adresa autorů: Ing. Milena Musilová, MVDr. Ing. Václav Trojan, Ing. Tomáš Vyhnánek, Ph.D., Prof. RNDr. Ladislav Havel, CSc. Ústav biologie rostlin, Agronomická fakulta, Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika, e-mail: milena.musilova@mendelu.cz

HODNOCENÍ VARIABILITY HLÁVEK CHMELE U ČESKÝCH ODRŮD CHMELE
ASSESSMENT OF VARIABILITY IN CONES OF CZECH HOP CULTIVARS

Vladimír NESVADBA – Zděnka POLONČÍKOVÁ – Alena HENYCHOVÁ

Average length of hop cones in Vital is 35 mm with 30% variability if they are grown either just one year or in older plants. Average weight of cones in plants older than two years is 0.8 g. Age of plants has probably no effect on this parameter. Variability of weight is higher in older plants (Vc = 60.7%) than in one-year-old ones (50.7%). Vital shows high density of hop cones at first in plants older than two years as 61.8% of all the cones is in the upper parts of plants in the height of 6 m and more.
Key words: hops, Humulus lupulus L., hop breeding, Vital, variability, hop cones.

Úvod

Výnos chmele je dán počtem hlávek na rostlině a jejich hmotností. Počet hlávek je ovlivněn řadou faktorů, jako je délka plodonosných pazochů, hustota nasazení hlávek na pazochu, výška nasazení plodonosných pazochů atd. Tyto faktory ovlivňují distribuci chmelových hlávek na rostlině, která je v produkčních porostech 7 m vysoká. Hmotnost hlávek je především ovlivněna délkou hlávky. Délka hlávky a především její variabilita má velký význam při sušení chmele. Velké hlávky vyžadují vyšší náklady na sušení. Pokud je délka hlávky vysoce variabilní tak dochází k velkým ztrátám při sušení chmele. Pro usušení velkých hlávek je nutné zvýšit čas sušení (teplota je vždy stabilní vzhledem k zachování barvy lupulinu) a tím dochází k rozpadu (rozplevelení) menších hlávek.

Metodika

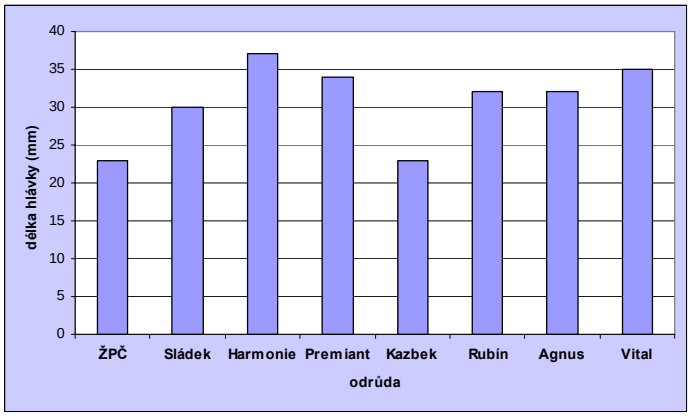
Pro charakterizaci rostliny byly prováděny rozbory rostlin v rámci jedné lokality (Stekník), proto nejsou výsledky ovlivněny půdními nebo povětrnostními podmínkami, nadmořskou výškou, hnojením, agrotechnickými zásahy atd. Jedná se o zjištění variability, která je dána genotypem a tu pěstitel nemůže ovlivnit. Pro hodnocení charakterizace odlišnosti českých odrůd chmele bylo nutné realizovat podrobné rozbory rostlin, které byly prováděny ručně. Všechny dosažené výsledky jsou uvedeny v čerstvém stavu. Chmelová rostlina má vysoký turgor (osmotický tlak) a po odstřihnutí dochází k rychlému úbytku vody (vadnutí) a tím se výrazně snižuje hmotnost. Z tohoto důvodu byla každá rostlina hodnocena do 2 hodin po odstřihnutí. Délka a hmotnost hlávek byla měřena resp. vážena u 100 náhodně vybraných hlávek z rostliny a to u souboru 5 rostlin od každé odrůdy. Hmotnost hlávek na rostlině byla stanovena ručním očesáním a vážením v čerstvém stavu.

Výsledky a diskuse

Průměrná délka hlávky

Z grafu 1 je patrné, že nejdelší průměrnou délku hlávky má odrůda Harmonie a to 37 mm. Odrůda Vital vykazuje druhou průměrnou délku hlávek. Z grafu je dále patrné, že nejnižší průměrnou délku hlávek mají Žatecký poloraný červeňák a Kazbek (obě odrůdy shodně 23 mm).

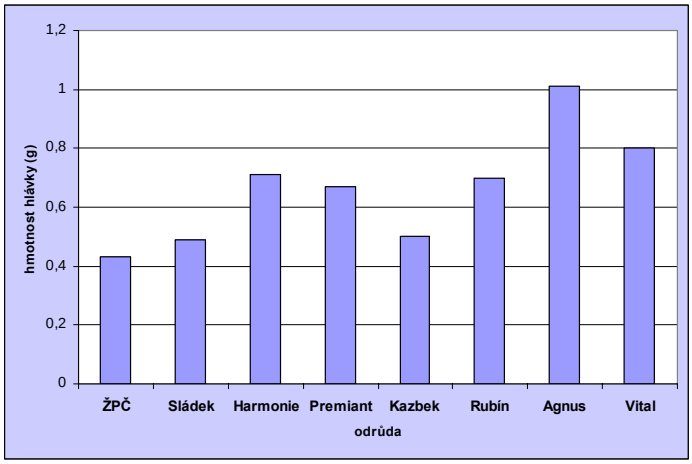
Graf 1: Průměrná délka chmelových hlávek u českých odrůd chmele



Průměrná hmotnost hlávky

Z grafu 2 je zřejmé, že nejvyšší průměrnou hmotnost jedné hlávky v produkčních porostech vykazuje odrůda Agnus (1,01 g) a pak odrůda Vital (0,80 g). Naopak nejnižší hmotnost má Žatecký poloraný červeňák (0,43 g), dále Sládek (0,49 g) a Kazbek (0,50 g).

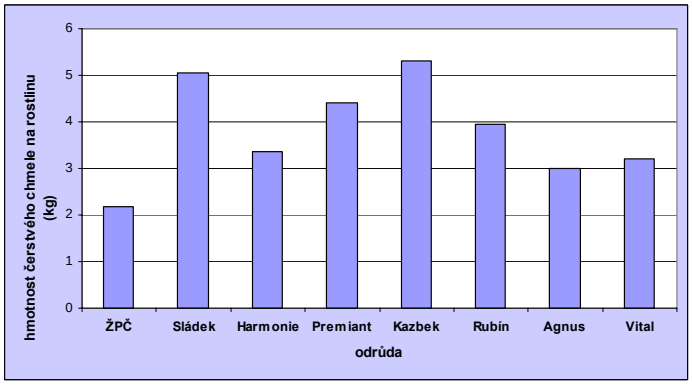
Graf 2: Průměrná hmotnost chmelové hlávky u českých odrůd chmele



Hmotnost hlávek na rostlině

V grafu 3 jsou uvedeny průměrné výnosy čerstvého chmele u českých odrůd. Je zřejmé, že nejvyšší výnos (nad hranicí 5 kg čerstvého chmele/rostlinu) vykazují odrůdy Kazbek a Sládek a naopak nejnižší výnos na rostlinu má Žatecký poloraný červeňák (pouze 2,2 kg čerstvého chmele/rostlinu).

Graf 3: Výnos čerstvého chmele na rostlinu u českých odrůd chmele (2009)



Závěr

Z dosažených výsledků je patrné, že nejdelší hlávky vykazuje odrůda Harmonie a nejtěžší hlávky odrůda Agnus. Nejvyšší výnos chmele dosahují aromatické odrůdy chmele Kazbek a Sládek, které v přepočtu na plochu 1 ha dosahují výnosu nad 3,5 t suchého chmele. Naopak nejnižší výnos suchého chmele na 1 ha dosahuje Žatecký poloraný červeňák a to 1,8 t.

Poděkování: Tento příspěvek byl zpracován v rámci výzkumného projektu 2B06011 „Vývoj genotypů chmele pro biomedicinální a farmaceutické účely“, které podporuje MŠMT ČR.

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

STUDIUM ENZYMATICKÉ AKTIVITY VYBRANÝCH GENOTYPŮ JARNÍHO SLADOVNICKÉHO JEČMENE
STUDY OF ENZYMATIC ACTIVITY IN CHOSEN GENOTYPES OF SPRING MALTING BARLEY

Zdeněk NESVADBA – Ivana MÁROVÁ – Renata MIKULÍKOVÁ – Simona HORÁČKOVÁ

The Czech Republic is a traditional producer of barley, malt and beer. Systematic breeding of spring barley for malting quality began already in 1870. In spite of that, enzymatic activity has still been an unexplored and underestimated area. Lipoxygenase-1(LOX-1) ranks among enzymes whose increased activity in barley and malt is undesirable. This enzyme affects the stability of beer flavour and foam. It negatively influences the malting process and, therefore, there is an effort to reduce its activity. Barley quality impaired by lipoxygenase is characterized by scratchy, bitter and rancid flavour. Flavour instability increases along with a longer storage period. It is very difficult to inactivate the enzyme that is active even at low temperatures. Therefore, ways to influence the activity of LOX-1are looked for. One of alternatives is an option of barley cultivar.
Keywords: Spring barley, malt, enzymatic activity, lipoxygenase, lipids, fatty acids

Úvod

Česká republika je tradiční výrobce ječmene, sladu a piva. Již od roku 1870 dochází k systematickému šlechtění jarního ječmene na sladovnickou kvalitu. Přesto stále neprobádanou a nedoceněnou oblastí zůstává u ječmene enzymatická činnost. K enzymům, jejichž zvýšená aktivita v ječmeni a ve sladu není žádoucí, patří enzym lipoxygenasa-1(LOX-1). Tento enzym ovlivňuje stabilitu chuti a pěny piva. Negativně působí na proces sladování a proto je snaha redukovat jeho aktivitu. Jakost ječmene zhoršená působením lipoxygenasy se projevuje škrablavou, hořkou a žluklou chutí. Chuťová nestabilita se zvětšuje s prodloužením délky skladování. Lipoxygenasa se velmi obtížně inaktivuje a zůstává aktivní i při nízkých teplotách. Proto se hledají způsoby ovlivnění aktivity LOX-1. Jedna z alternativ je volba odrůdy ječmene.

Enzym lipoxygenasa katalyzuje oxidaci nenasycených mastných kyselin s více dvojnými vazbami, obsahujícími cis-1,4 pentadienovou skupinu, molekulovým kyslíkem. Tím vznikají řetězovou reakcí přechodně peroxidy nenasycených mastných kyselin, které se štěpí na karbonylové sloučeniny (aldehydy, ketony) nebo mastné kyseliny s krátkými řetězci (Gardner 1970, Lulai et al. 1981, Doderer et al. 1991, Meyna 2005), a vytvářejí se tak sloučeniny s charakteristickými vůněmi a chutěmi. Mezi substráty patří nutričně významné esenciální mastné kyseliny jako linolová, linoleová a arachidonová. Mohou být oxidovány i acylglyceroly a další estery zmíněných mastných kyselin.

Materiál a metody

Polní pokusy byly vedeny na pozemcích fy Agrotest fyto, s.r.o. v Kroměříži. Odrůdy jarního ječmene byly vysety dne 7.4. 2009 v jednom opakování do parcel o velikosti 10 m^2. Během vegetace byla prováděna polní pozorování. Předplodinou byla ozimá řepka. Pokus byl veden v základní intenzitě, tzn. že dusík byl aplikován předseťově na podzim. Sklizeň byla provedena dne 31.7. 2009 maloparcelkovým kombajnem Osevan. Sklizené zrno bylo zváženo, přečištěno, výnos přepočten na 14 % vlhkost. Byly stanoveny podíly na sítě 2,5 mm a 2,2 mm a hmotnost tisíce zrn.

Sladování vzorků probíhalo v mikrosladovně fy KVM (ČR) ve VÚPS Brno. Pro laboratorní sladování byl použit postup standardně používaný na tomto pracovišti, který je v podstatě totožný s metodikou MEBAK. Ve vzorcích vyšlechtěných odrůd ječmene a v připraveném sladu byla stanovena aktivita enzymu LOX-1 spektrofotometrickou metodou v UV oblasti. Analýzy byly provedeny v čerstvě homogenizovaných vzorcích uchovávaných pří 8° C na pracovišti FCH VUT v Brně.

Pro stanovení obsahu lipidů v obilce ječmene a ve sladu byla zavedena a optimalizována metoda extrakce s použitím fluidního extraktoru fexIKA® dive-in kontrol. Optimalizovanou metodou extrakce byly stanoveny obsahy lipidů u vzorků 20 odrůd ječmene a 20 sladů z nich vyrobených. Z vyextrahovaných lipidů bylo stanoveno zastoupení mastných kyselin v obilce ječmene a sladu. Zastoupené mastné kyseliny byly stanoveny jako metyl estery připravené transesterifikační reakcí. Pro separaci jednotlivých mastných kyselin byly použity dvě kapilární chromatografické kolony Supelcowax a SLB-IL 100.

Výsledky a diskuze

Jednotlivé vzorky odrůd jarního ječmene se lišily v hodnotě aktivity LOX poměrně značně, hodnoty kolísaly v rozmezí 1 řádu. Nejvyšší hodnoty aktivity LOX-1 byly nalezeny zejména ve vzorcích č. 15 (Xanadu), 19 (Tepelský 421), 14 (Muzikant) a dále č. 16 (Jersey), 18 (Binder) a č. 11 (Marthe). Nízká aktivita byla zaznamenána u vzorků č. 6 (Mauritia), 9 (Westminster), 17 (Malvaz) a č. 20 (Ratbořský). Pro orientaci a posouzení změn aktivity LOX-1 v průběhu uchovávání homogenizovaných vzorků byly opakované analýzy aktivity LOX-1 v uchovaném mletém ječmeni provedeny po 1 měsíci a též po 3 měsících skladování. Bylo zjištěno, že aktivita LOX-1 v homogenizovaných vzorcích poměrně značně klesá, což je nejpravděpodobněji způsobeno inaktivací enzymu v rozrušených tkáních (Graf 1). V orientačně ověřených

vzorcích nehomogenizovaného ječmene prakticky nedošlo ke změně aktivity LOX-1, enzym je tedy nějakým způsobem vazby stabilizován v původní biologické struktuře neporušeného zrna. Je zajímavé, že pokles aktivity enzymu byl výraznější ve vzorcích s vyšší původní aktivitou.

Aktivita lipoxygenázy ve sladu byla asi 2-3x vyšší než v obilce ječmene (Graf 2). Nejvyšší aktivita byla zjištěna ve vzorcích č. 15 (Xanadu), 18 (Binder), 19 (Tepelský 421), naopak nízká aktivita byla pozorována ve vzorcích č. 6 (Mauritia), 9 (Westminster), 17 (Malvaz) a č. 20 (Ratbořský). Slady připravené z ječmenů o vyšší aktivitě LOX-1 obvykle obsahovaly rovněž vyšší aktivitu enzymu LOX-1, což je třeba zohlednit zejména při výběru odrůd pro další technologické zpracování.

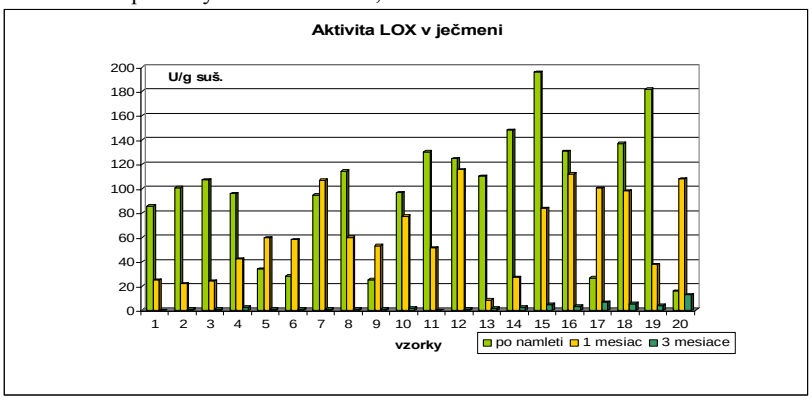
Obsah tuků v analyzovaných vzorcích ječmene a sladu se pohyboval v rozmezí 1,3 až 2,5 % v sušině, což odpovídá běžným hodnotám obsahu tuků v obilce ječmene uváděných v literatuře (BASAŘOVÁ a kol., 2010).

Ve všech vzorcích obilek ječmene byly identifikovány a stanoveny tyto mastné kyseliny: kyselina laurová (C12:0), myristová (C14:0), pentadekanová (C15:0), palmitová (C16:0), stearová (C18:0), olejová (C18:1c), linolová (C18:2), linoleová (C18:3), arachová (C20:0), eikosadienová (C20:2), behenová (C22:0), eruková (C22:1), trikosanová (C23:0), lignocerová (C24:0) a nervonová (C24:1). Ve sladu byl zjištěn až desetinásobný pokles obsahu kyseliny olejové (C18:1c), způsobený pravděpodobně její autooxidací. Zastoupení ostatních mastných kyselin v obilce ječmene bylo velmi podobné profilu mastných kyselin ve sladu.

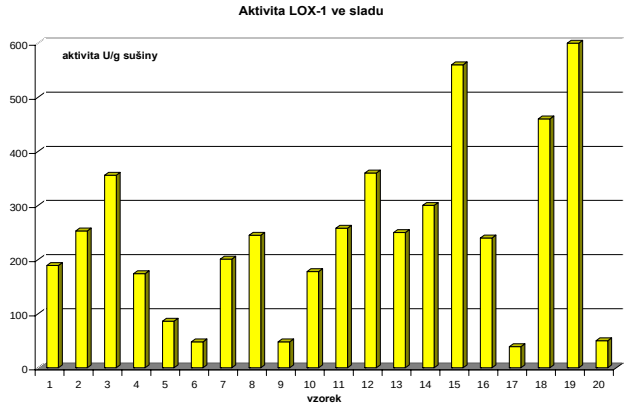
Poděkování: Práce vznikla za finanční podpory projektu NAZV QH 81056.

Literatura

BASAŘOVÁ, G., a kol., (2010): Pivovarství, VŠCHT Praha: 863 s.
DODERER, A., et al., (1991): Proc. Eur. Brew. Conv. Congr., Lisbon: 109
GARDNER, H. W. (1970): J.Lipid Res, 11: 311
LULAI, E. C., et al., (1981): Plant Physiol., 68: 950
MEYNA, S., (2005): Proceeding of 30th Congress of the EBC Prague, Czech Republic, 14-19 May
PSOTA, V. (2005): Závěrečná zpráva výzkumného úkolu, VÚPS Brno



Graf 1: Změny aktivity LOX-1 po namletí a v průběhu uchovávání vzorků (U/g sušiny)



Legenda: 1-Wikinget, 2-Troon, 3-Cruiser, 4-Bellevue, 5-Biatlon, 6-Mauritia, 7-Ebson, 8-NFC Tipple, 9-Westminster, 10-Publican, 11-Marthe, 12-Maltasia, 13-Lissane, 14-Musikant, 15-Xanadu, 16-Jersey, 17- Malvaz, 18-Binder, 19-Tepelský 421, 20-Ratbořský

Graf 2: Aktivita LOX-1 ve sladu (U/g sušiny)

Kontaktní adresy:
Ing. Zdeněk Nesvadba Ph.D, Ing. Simona Horáčková – Agrotest fyto, s.r.o., Havlíčkova 2787, 767 01 Kroměříž, Česká republika, nesvadba.zdenek@vukrom.cz, horackova.simona@vukrom.cz
Doc. RNDr. Ivana Márová, CSc. – Fakulta chemická, Vysoké učení technické v Brně, Antonínská 548, 601 90 Brno, Česká republika, marova@fch.vutbr.cz
RNDr. Renata Mikulíková – Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a.s., Sladařský ústav Brno, Mostecká 7, 614 00 Brno, Česká republika, mikulikova@brno.beerresearch.cz

ZÍSKAVANIE HAPLOIDNÝCH, DIPLOIDNÝCH A TERTAPLOIDNÝCH RASTLÍN KUKURICE Z PEĽNICOVEJ KULTÚRY
INDUCTION OF HAPLOID, DIPLOID AND TETRAPLOID PLANTS IN MAIZE ANTHER CULTURE

Bohuš OBERT – Ľubica UVÁČKOVÁ – Miroslava JAKÚBEKOVÁ – Anna PREŤOVÁ

Androgenesis represents an important tool for research in plant genetics and breeding, since the androgenic embryos can germinate into completely homozygous (di)haploid plants. These plants can be used in genetic studies or as a source for homozygous lines important for breeders. We have investigated various structures induced during anther cultures of maize (Zea mays L.) Our studies were focused on induction, regeneration and ploidy level of regenerated structures and plants.
Key words: androgenesis, maize, colchicine, ploid,

Úvod

Hoci je gametogenéza precízne kontrolovaná genómom a cytoplazmou, je možné v *in vitro* podmienkach genetický program prepnúť a indukovať alternatívnu vývinovú cestu, ktorá vedie k vzniku (di)haploidných embryí (androgenéza, gynogenéza), alebo kalusov. Indukciou embryogenézy alebo organogenézy z kalusov získaných z gamét je možné získať rastliny s (di)haploidným počtom chromozómov. Blokovanie gametofytického vývinu a spúšťanie androgenézy je zvyčajne dosiahnuté pôsobením stresu (Obert et al. 2009, 2010).

V našich pokusoch sme sa zamerali na morfológiu štruktúr odvodených z mikrospór, ich regeneračnú schopnosť a na ploidiu regenerovaných rastlín.

Materiál a metódy

Peľnicové kultúry

Na pokusy sme použili genotypy kukurice (*Zea mays* L.) NR 17 a NR 24, ktoré boli vyšľachtené na Ústave genetiky a biotechnológií rastlín SAV v Nitre. Donorné rastliny sme pestovali na experimentálnych políčkach ÚGBR SAV v Nitre. Metliny sme odoberali v čase, keď bola väčšina mikrospór v neskorom jednojadrovom vývinovom štádiu. Donorný materiál sme ošetrili chladom 7 °C počas 10 dní (Barnabás et al. 1999). Pri zakladaní a kultivovaní peľnicových kultúr sme postupovali podľa Dieu a Beckert (1987). Peľnice na médiu sme kultivovali v tme pri 28 °C . Počet a typ indukovaných štruktúr sme zaznamenali po 30 dňoch kultivácie na indukčnom médiu. Vyvíjajúce sa štruktúry sme klasifikovali podľa farby a konzistencie. Štruktúry sme preniesli na modifikované N6 médium obohatené o 0.5 mg.l^{-1} NAA. Regenerácia rastlín prebiehala pri 26 °C, osvetlení 80 µmol.m^{-2}s^{-1} a svetelnom režime 16/8 hod.

Analýza ploidie

Regenerované rastliny sme analyzovali na úroveň ploidie. Jadrá sme izolovali pomocou žiletky do NBI pufru pri 0 °C. Na izoláciu sme použili približne 1 cm^2 kúsok najmladšieho listu regenerovanej rastliny. Na farbenie jadier sme použili farbičku propidium jodid (25 µg.l^{-1}). Po nameraní obsahu DNA v 2000 jadrách sme vyhodnocovali výsledky pomocou programu Becton Dickinson CellQuest.

Výsledky a diskusia

V prezentovaných experimentoch s peľnicovými kultúrami sme dosiahli indukciu androgenézy a tvorbu štruktúr ako aj regeneráciu rastlín. Frekvencia indukovaných peľníc bola 34 %, čo znamená, že 34 % peľníc izolovaných z donorných rastlín vykázalo indukciu aspoň jednej štruktúry. Prepočítaná frekvencia štruktúr bola 135 %, keďže vo viacerých peľniciach sme zaznamenali indukciu štruktúr z viac ako jednej mikrospóry. Dosiahnutá regenerácia rastlín bola na úrovni 19 %.

Štruktúry a kalusy odvodené z mikrospór sme klasifikovali do nasledujúcich kategórií: biela rozpadavá, biela kompaktná, žltá rozpadavá a žltá kompaktná. Pri oboch sledovaných genotypoch bolo možné zaradiť najviac štruktúr do kategórie biela rozpadavá.

Najvyššia regeneračná schopnosť bola dokumentovaná v prípade štruktúr zaradených do kategórie biely kompaktný. Analýza ploidie rastlín regenerovaných z bielych rozpadavých štruktúr, ktoré mali najnižšiu regeneračnú schopnosť ukázala, že 80 % regenerovaných rastlín bolo aneuploidných a mixoploidných. V prípade bielych kompaktných štruktúr, ktoré vykazovali najvyššiu regeneračnú kapacitu bolo 43 % regenerovaných rastlín diploidných. V ostatných kategóriách sme analýzou ploidie zistili zastúpenie dihaploidov 20 % pri žltých kompaktných štruktúrach a 13% v prípade bielych alebo žltých rozpadavých štruktúr. Zastúpenie haploidných

rastlín bolo najvyššie (15 %) v prípade rastlín regenerovaných zo žltých rozpadavých štruktúr, kde bolo zároveň najmenej tetraploidných rastlín (1 %). V prípade rastlín regenerovaných z bielych štruktúr bola frekvencia haploidných rastlín 4 % (rozpadavý) a 5 % (kompaktný) a tetraploidných rastlín 14 % (rozpadavý) a 15 % (kompaktný)

Záver

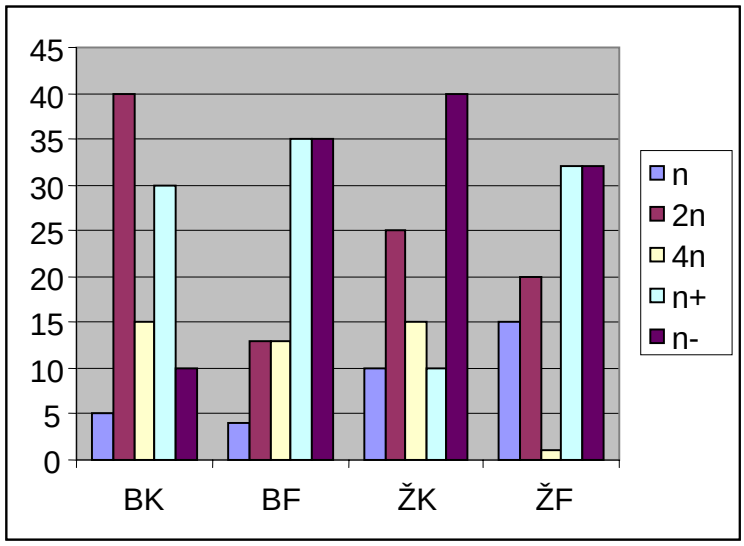
V našich pokusoch s peľnicovými kultúrami kukurice sme dosiahli androgenézu, t.j. tvorbu embryám podobných štruktúr odvodených z mikrospór. Analyzovali sme zastúpenie jednotlivých typov štruktúr, ich regeneračnú schopnosť a úroveň ploidie regenerovaných rastlín. V súčasnosti prebieha proteomická analýza jednotlivých typov štruktúr, ktorá nám pomôže identifikovať faktory ovplyvňujúce regeneračnú schopnosť a schopnosť regenerovať spontánne dihaploidné a tetrahaploidné rastliny kukurice.

Poďakovanie: Práca bola vypracovaná v rámci riešenia projektov VEGA 2/0114/09 a APVV-0115-97.

Literatúra

BARNABAS, B. – OBERT, B. – KOVACS, G. (1999): In: Plant Cell Reports, 18, p. 858-862.
DIEU, P. – BECKERT, M. (1987): In: Maydica, 31, p. 245-259.
OBERT, B. – UVÁČKOVÁ, Ľ. – PREŤOVÁ, A. (2009) In: DANFORTH, A.T. : Corn crop Production: Growth, Fertilization and Yield. Nova Science Publisher, Hauppauge New York, USA, ISBN 978-1-60741-955-6.
OBERT, B. – PREŤOVÁ, A. – ŠAMAJ, J. (2010): Somatic and gametic embryogenesis in maize: Cell biology and applications. In: KUMAR, A. – SOPORY, S.K. : Applications of plant biotechnology: In vitro propagation, plant transformations and secondary metabolite production. I.K. International Publishing House Pvt. Ltd. , pp. 468-481.

Príloha:



Graf: Determinácia ploidie rastlín regenerovaných z rôznych typov štruktúr v peľnicovej cultúre kukurice NR 24

Adresa autorov:
Bohuš OBERT, Ľubica UVÁČKOVÁ, Miroslava JAKÚBEKOVÁ, Anna PREŤOVÁ: Ústav genetiky a biotechnológií rastlín SAV, Akademická 2, P.O. Box 39/A, 950 07 Nitra

VPLYV GENETICKY MODIFIKOVANÝCH RASTLÍN NA PÔDNE BAKTÉRIE
IMPACT OF GENETICALLY MODIFIED PLANTS ON SOIL BACTERIA

Katarína ONDREIČKOVÁ – Hana DRAHOVSKÁ – Ján KRAIC

The introduction of genetically modified plants into agricultural ecosystems has raised a number of questions, including the ecological impact of these plants on soil ecosystems. We studied the impact of Bt maize (MON 810), which were modified to express insecticidal Cry-protein (Bt-toxins) from Bacillus thuringiensis, on soil bacterial community by T-RFLP.
Key words: Bt maize, MON 810, soil bacteria, T-RFLP

Úvod

Mnoho vedcov a odborníkov považuje geneticky modifikované (GM) rastliny ako nevyhnutnú súčasť pre budúce poľnohospodárstvo. Štúdie vykonávané na GM plodinách prispievajú k lepšiemu pochopeniu ich vplyvu na prostredie. Vplyv týchto rastlín na pôdne mikroorganizmy však patrí k málo prebádaným oblastiam.

Cudzorodá DNA vnesená do rastliny je exprimovaná do nového proteínu, ktorý môže byť uvoľňovaný do pôdneho ekosystému. Pôdne mikrobiálne spoločenstvá majú niekoľko možností ako prísť do kontaktu s novým génovým produktom. Po žatve nastáva rozklad rastlinných zvyškov, ktoré môžu uvoľňovať cudzorodý proteín do pôdy (Donegan et al. 1997). Obrábaním pôdy dochádza k premiešavaniu transgénu s pôdou, ktorý sa potom dostáva do hlbších vrstiev pôdy. Týmto dochádza k zrieďovaniu koncentrácie transgénu, ale zároveň je väčšia šanca, že dôjde k interakciám s väčším počtom mikroorganizmov (Angle 1994). Ak nedochádza k aktívnemu obrábaniu pôdy, transgén je koncentrovaný na povrchu pôdy, kde dochádza k interakciám s baktériami, nachádzajúcimi sa na povrchu príp. tesne pod povrchom pôdy. Tu je koncentrácia transgénu najvyššia (Angle 1994). Okrem toho dochádza k uvoľneniu trasgénu aj koreňovými exudátmi do rizosféry, kde dochádza ku kontaktu s rizosférnymi mikroorganizmami (Dunfield & Germida 2004). Existuje mnoho faktorov, ktoré môžu ovplyvňovať akumuláciu transgénneho proteínu v pôde. Je to napr. množstvo transgénu, ktorý je obsiahnutý v rastlinných pletivách, rezistencia proteínov na degradáciu a aj pôdne chemické, fyzikálne a environmentálne podmienky môžu mať vplyv na schopnosť zotrvania nového proteínu v pôde (Liu et al. 2005). Množstvo transgénneho proteínu v pôde závisí od umiestnenia proteínu v rastlinnom pletive aj od schopnosti tohto pletiva uvoľňovať tento proteín do pôdy.

Na detekciu diverzity pôdneho mikrobiálneho spoločenstva sú v čoraz väčšej miere využívané molekulárne metódy. Jednou z najviac využívaných je Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP; Polymorfizmus dĺžky terminálnych restrikčných fragmentov). Princíp metódy spočíva v určení dĺžky koncového restrikčného fragmentu markerového génu amplifikovaného metódou PCR (Marsh 1999). Izolovaná DNA z environmentálnych vzoriek je použitá ako templát v PCR na amplifikáciu markerového génu. Používajú sa primery amplifikujúce vysoko konzervatívne sekvencie, ktoré sa nachádzajú vo všetkých baktériách (napr. 16S rDNA gén) alebo gén špecifický pre určité bakteriálne taxóny (Amann et al. 1995). Priamy primer je na 5´ konci fluorescenčne značený. Následne po PCR sú produkty štiepené jednou alebo viacerými restrikčnými endonukleázami súčasne, ktoré rozpoznávajú 4 bp sekvenciu. Po štiepení sa fragmenty dajú na kapilárnu elektroforézu kde budú zaznamenané iba koncové restrikčné fragmenty obsahujúce fluorescenčne značený primer. Výsledkom TRFLP analýzy je profil pozostávajúci z T-RF (Terminal-Restriction Fragment) píkov, ktoré sú následne identifikované porovnávaním s veľkosťami DNA štandardov. Každý pík reprezentuje špecifický rod mikroorganizmov.

Geneticky modifikovaná kukurica MON 810 nesie gén *cry 1Ab* z pôdnej baktérie *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1. Táto genetická modifikácia zabezpečuje rastline rezistenciu k vijačke kukuričnej (*Ostrinia nubilalis*). Cieľom práce bolo zistiť vplyv geneticky modifikovanej kukurice MON 810 (Bt kukurica) na diverzitu pôdnych baktérií.

Materiál a metódy

V práci boli použité 2 rôzne odrody transgénnej kukurice MON 810: DKC 3512 YG a MEB 483 BT od firmy Dekalb a 1 kontrolná kukurica bez genetickej modifikácie DKC 3511 (Dekalb). Tieto kukurice boli vysiate na poli Výskumného pracoviska Borovce, každá na parcele o šírke 4 riadky a dĺžke 300 m. Zber pôdnych vzoriek prebehol v dvoch termínoch a to koncom júla 2009 a koncom septembra 2009.
T-RFLP analýza:

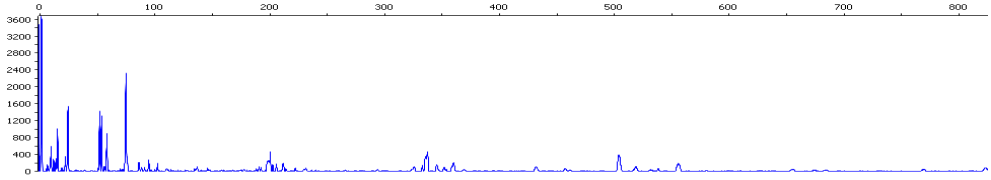
- Izolácia DNA z pôdnych vzoriek pomocou kitu Power Soil DNA Isolation Kit (MoBio)
- Amplifikácia génu 16S rDNA pomocou primerov – 8f FAM a 926r
  PCR program: 2 min.-95°C; + 35 x: 30s-94°C+30s-47°C+1 min.-72°C; + 7 min.- 72°C
- Restrikčné štiepenie PCR fragmentu restrikčnou endonukleázou CfoI (Roche)
  štiepenie: 5U enzýmu na 37°C na 3 hod.
- Kapilárna elektroforéza na automatickom sekvenátore ABI 3100 Prism Avant (Applied Biosystem) a vyhodnotenie získaných výsledkov pomocou GeneMapper 3.5 software (Applied Biosystem)

Výsledky a diskusia

Získané výsledky neukazujú významné kvalitatívne zmeny v zložení bakteriálneho spoločenstva, ale poukazujú na výkyvy v kvantitatívnom zložení jednotlivých druhov baktérií.

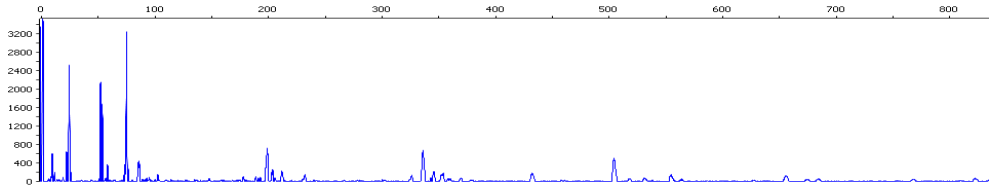
Kapilárna elektroforéza vzoriek z júla 2009 (Obr. 1, 2, 3):

DKC 3511 (kontrolná kukurica)



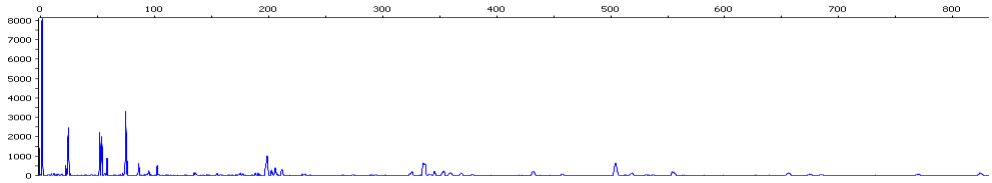
Obr. 1: Obrázok znázorňuje elektroforetogram vzorky DKC 3511, môžeme tu detegovať asi 27 T-RF píkov.

DKC 3512 YG (MON 810)



Obr. 2: Obrázok znázorňuje elektroforetogram vzorky DKC 3512, môžeme tu detegovať asi 24 T-RF píkov.

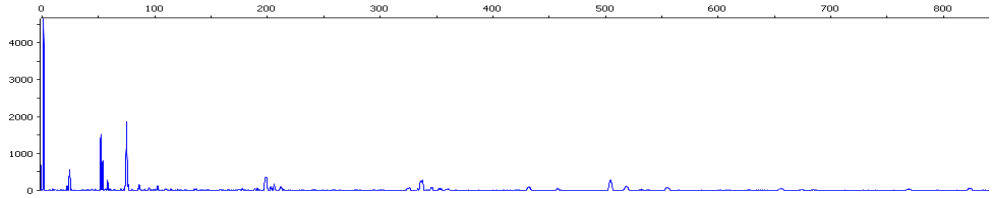
MEB 483 BT (MON 810)



Obr. 3: Obrázok znázorňuje elektroforetogram vzorky MEB 483 BT , môžeme tu detegovať asi 32 T-RF píkov.

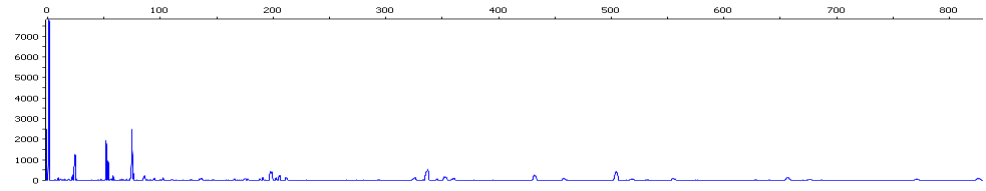
Kapilárna elektroforéza vzoriek zo septembra 2009 (Obr. 4, 5, 6):

DKC 3511 (Kontrolná kukurica)



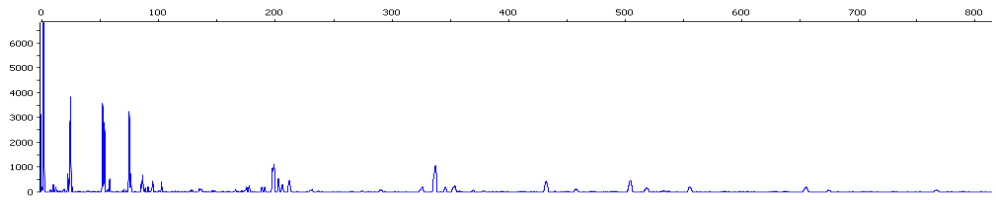
Obr. 4: Obrázok znázorňuje elektroforetogram vzorky DKC 3511, môžeme tu detegovať asi 15 T-RF píkov.

DKC 3512 YG (MON 810)



Obr. 5: Obrázok znázorňuje elektroforetogram vzorky DKC 3512, môžeme tu detegovať asi 21 T-RF píkov.

MEB 483 BT (MON 810)



Obr. 6: Obrázok znázorňuje elektroforetogram vzorky MEB 483 BT,môžeme tu detegovať asi 36 T-RF píkov.

Z uvedených výsledkov vyplýva, že sa mení kvantitatívne zastúpenie bakteriálnych taxónov pri jednotlivých odrodách transgénnej kukurice aj pri kontrole. Zmeny v počte baktérií sme zaznamenali aj medzi zberom z júla a septembra 2009. Chceli sme zistiť, či dochádza k preukázateľnej zmene diverzity vplyvom genetickej modifikácie medzi letným obdobím, keď kukurice boli v kvitnúcom období a medzi jeseňou, tesne pred zberom. Hoci sme zaznamenali kvantitatívne zmeny v zložení bakteriálneho spoločenstva, ale tieto zmeny nemôžeme považovať iba ako dôsledok genetickej modifikácie, pretože zmena sa týkala aj kontrolnej kukurice. Dospeli sme viacmenej k rovnakému výsledku ako Ikeda et al. (2006) , ktorí zistili, že vplyv transgénnych rastlín na pôdne mikroorganizmy je menej významný v porovnaní so zmenami, ktoré môžu zapríčiniť faktory vonkajšieho prostredia, keďže rizosféra vplýva na zvyšovanie mikrobiálnej hustoty a aktivity, v porovnaní s pôdou mimo rizosféry a spôsobuje selektívny tlak na špecifické mikroorganizmy. To má za následok, že viacmenej akákoľvek zmena v zložení koreňových exudátov môže indukovať zmeny v štruktúre mikrobiálnych spoločenstiev (Ikeda et al. 2006).

Záver

V práci sme sledovali možný vplyv transgénnej kukurice MON 810 na diverzitu pôdnych baktérií. Zistili sme zmeny v počte jednotlivých bakteriálnych taxónov medzi transgénnymi kukuricami a medzi kontrolou. Zmeny sme zaznamenali aj medzi zbermi z júla a septembra 2009, ale tieto zmeny nie sú zapríčinené iba genetickou modifikáciou. Väčšie zmeny v diverzite spôsobujú faktory vonkajšieho prostredia.

Poďakovanie: Táto štúdia vznikla vďaka podpore v rámci OP Výskum a vývoj pre projekt: Vývoj nových typov rastlín s geneticky upravenými znakmi hospodárskeho významu ITMS: 26220220027, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

AMANN, R. I. – LUDWIG, W. – SCHLEIFER, K. H. (1995): Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. In: Microbiol. Rev., vol. 59, pp 143-169.

ANGLE, J. S. (1994): Release of transgenic plants: Biodiversity and population-level consideration. In: Mol. Ecol., vol. 3, pp 45-50.

DONEGAN, K. K. – Seidler, R. J. – Fieland, V. J. – Schaller, D. L. – Palm, C. J. – Ganio, L. M. – Cardwell, D. M. – Steinberger, Y. (1997): Decomposition of genetically engineered tobacco under field conditions: Persistence of the proteinase inhibitor I product and effects on soil microbial respiration and protozoa, nematode and microarthropod populations. In: J. Appl. Ecol., vol. 34, pp 767-777.

DUNFIELD, K. E. – Germida, J. J. (2004): Impact of genetically modified crops on soil and plant associated microbial communities. In: J. Environ. Qual., vol. 33, pp 806-815.

IKEDA, S. – ROBERTS, D. M. – WATANABE, K. Z. – YTOW, N. (2006): Microbial community analyses using a simple rapid detection method for DNA fingerprints with a fluorescence scanner. In: J. Bioscience and Bioengineering, vol. 98, pp 500-503.

LIU, B. – ZENG, Q. – YAN, F. - XU, H. – XU, Ch. (2005): Effects of transgenic plants on soil microorganisms. In: Plant and soil, vol. 271, pp 1-13.

MARSH, T. L. (1999): Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP): an emerging method for characterizing diversity among homologous populations of amplification products. In: Curr. Opin. Microbiol., vol. 2, pp323-327.

Adresa autorov:
Katarína Ondreičková, Ján Kraic: Centrum výskumu rastlinnej výroby, Výskumný ústav rastlinnej výroby, Bratislavská cesta 122, 921 68 Piešťany
Hana Drahovská: Prírodovedecká fakulta UK, Katedra molekulárnej biológie, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava

VÝZNAMNOSŤ HÚB SPÔSOBUJÚCICH LISTOVÉ ŠKVRNITOSTI VYBRANÝCH DRUHOV RODU LÁSKAVEC (*AMARANTHUS*) A MRLÍK (*CHENOPODIUM*)
IMPORTANCE OF LEAF SPOT FUNGI ON *AMARANTHUS* AND *CHENOPODIUM*

Martin PASTIRČÁK – Iveta ČIČOVÁ

The objective of this study was to identify and quantify fungi on symptomatic Amaranthus and Chenopodium plants grown in cultivated plots, and determine the species composition in different plant parts. Eleven fungal species were found to be associated with leaves of two host genera. The most common fungal species isolated from leaves, stems and fruits belonged to genus Ascochyta, Phoma and Alternaria. Alternaria alternata was the most common species. Its frequency in the fungal community amounted to 85%. Epicoccum purpurascens and Cladosporium cladosporioides were also common fungi on leaves, occuring usually with local or temporal peaks.
Key words: biodiversity, pathogenic fungi, Amaranthus, Chenopodium, leaf spot diseases

Úvod

Láskavec (*Amaranthus*) a mrlík (*Chenopodium*) patria medzi nepravé obilniny (pseudoobilniny), ktoré boli pestované už počas existencie starých Májov, Aztékov a Inkov. V porovnaní s obilninami má láskavec a mrlík vyššiu výživovú hodnotu. Obsahujú vyšší podiel bielkovín, olejov, vlákniny a škrobu, naopak neobsahujú lepok. Semená týchto rastlín obsahujú vysoký podiel proteínov v porovnaní s klasickými obilninami. V posledných rokoch rastie záujem o pestovanie tejto plodiny aj v našich geografických podmienkach a to hlavne pre semená a pre využitie ako krmivo pre hospodárske zvieratá. Rozšírenie pestovania týchto druhov v nových podmienkach prostredia prináša aj na území Slovenska so sebou zvýšenie výskytu škodcov a ochorení spôsobených najmä hubami. Mikroskopické huby sa priamo podieľajú na redukcii kvantity a znižovaní kvality rastlinnej produkcie. Približne 72 % organizmov, ktoré atakujú rastliny tvoria mikroskopické huby (Richardson 1996). Cieľom tohto príspevku je štúdium húb napádajúcich rastliny rodov *Amaranthus* a *Chenopodium* (*Amaranthus* sp., *Chenopodium quinoa*) a ich podiel na tvorbe listových škvrnitostí na území Slovenska.

Materiál a metodika

Na štúdium mikroskopických húb nekultivačnými metódami sme použili rastlinný materiál (listy, stonky, plody) vybraných druhov rodu láskavec (*Amaranthus*) a mrlík (*Chenopodium*) rastúcich na produkčných plochách na území Slovenska. Huby sme determinovali priamo na listoch, stonkách a plodoch týchto druhov pomocou štandardnej svetelnej mikroskopie (OLYMPUS BX51, OLYMPUS SZ61) na základe makroskopických a mikroskopických charakteristík s použitím manuálov v súčasnosti používaných pre identifikáciu húb – rod *Phoma* (Boerema et al., 2004), rod *Septoria* (Teterevnikova-Babajan, 1987), *Mycosphaerella* (Tomilin, 1979; Sivanesan, 1984) a rod *Colletotrichum* (Sutton, 1980). Identifikované druhy mikroskopických húb boli uložené do fytopatologického herbáru VÚRV Piešťany pre účely ďalšieho mykologického výskumu.

Výsledky a diskusia

Výskyt mikroskopických húb bol študovaný na vybraných druhoch rodu láskavec (*Amaranthus*) a mrlík (*Chenopodium*) v roku 2010. Spektrum mykoflóry pozostávalo z parazitických a saprofytických druhov húb. Všetky druhy boli determinované s využitím mikroskopických nekultivačných metód identifikácie húb. Frekvencia druhov bola v zbieraných vzorkách odlišná. Na listoch a stonkách boli pozorované početné tmavo-sfarbené škvrny, na ktorých sme pozorovali pyknidy a pseudotéciá. Väčšina druhov húb zaznamenaných na listov a stonkách rastlín boli neskôr identifikované ako pôvodcovia ochorenia rastlín počas vegetačného obdobia.

Huby rodu *Ascochyta* a *Phoma* spôsobujúce listové škvrnitosti predstavujú hlavnú súčasť komplexu listových patogénov. Z rodu *Ascochyta* na láskavci parazitujú dva druhy: *Ascochyta hyalospora* a *A. caulina*, ktorá napáda aj samotné súkvetie. Dřímalková (2003) zaznamenala tento druh na semenách a klíčnych rastlinách, kde spôsoboval padanie klíčnych rastlín. Rod *Phoma* je ekonomicky významný a na uvedených hostiteľoch parazituje niekoľko druhov: *P. huancayensis*, *P. dimorphospora*, *P. heteromorphospora*, *P. foveata* a *P. chenopodii* (Boerema et al., 2004). Huby rodu *Ascochyta* patria medzi ekonomicky závažné patogény spôsobujúce škvrnitosť listov a hnilobu stoniek láskavca a mrlíka. Výskyt tejto huby sme zaznamenali aj na plodoch, čím sa zvyšuje aj pravdepodobnosť infekcie semien.

Tabuľka 1: Prehľad identifikovaných mikroskopických húb na rastlinách vybraných druhov rodu láskavec (*Amaranthus*) a mrlík (*Chenopodium*).

Huba	Literárny zdroj	Výskyt na Slovensku	
		Amaranthus	*Chenopodium*
Alternaria sp.	Dřímalková, 2003	x	x
Ascochyta sp.	Boerema et al., 1977	x	x
Botrytis cinerea	–	x	x
Camarosporium sp.	–	x	x
Colletotrichum sp.	Sutton, 1980	x	x
Fusarium sp.	–	x	x
Mycosphaerella sp.	Tomilin, 1979	–	x
Phoma sp.	Boerema et al., 2004	x	x
Phomopsis sp.	Rosskopf et al., 2000	x	–
Phyllosticta sp.	Aa,Vanev, 2002	x	–
Stemphylium sp.	–	x	x

Značné druhové spektrum húb bolo na listoch zastúpené výskytom húb rodu *Stemphylium* a *Phyllosticta* s viditeľnými symptómami listovej škvrnitosti. Huby rodu *Phyllosticta* spôsobujú listové škvrnitosti na širokom spektre rastlinných druhov. Na rode *Amaranthus* boli opísané druhy *Phyllosticta hirriensis* a *P. amaranthi*. Komplex listových patogénov dopĺňajú húby rodu *Botrytis*, *Camarosporium*, *Colletotrichum, Fusarium* a *Phomopsis*. K významným rodom fytopatogénnych húb spôsobujúcich odumieranie listov patria aj huby rodu *Mycosphaerella* s anamorfnými štádiami rodu *Septoria*, *Stagonospora* a *Cercospora*. Na druhoch rodu *Chenopodium* bolo opísaných viacero druhov rodu *Mycosphaerella* s anamorfným štádiom *Cercospora chenopodii*. Na vzorkách listov sme zaznamenali taktiež skupinu hubových saprofytov z rodov *Alternaria*, *Cladosporium* a *Penicillium*. Huba *Epicoccum purpurascens* bola identifikovaná na všetkých študovaných vzorkách vo zvýšenej miere. Pozberové zvyšky predstavujú potencionálny zdroj inokula a v jarnom období sa podieľajú na primárnej infekcii listov týmito patogénmi.

Záver

Nekultivačnými mykologickými metódami sme charakterizovali druhové spektrum húb spôsobujúcich listové škvrnitosti rastlín rodu láskavec (*Amaranthus*) a mrlík (*Chenopodium*) na území Slovenska. Hlavná časť komplexu listových patogénov pozostávala z húb rodu *Ascochyta* a *Phoma*, ktoré sú často spájané s tvorbou listových škvrnitosti.

Poďakovanie: Táto práca bola finančne podporená Agentúrou na podporu výskumu a vývoja na základe zmluvy číslo VMSP - P - 0125-09.

Literatúra

AA, H.A. van der, VANEV, S., 2002: A revision of the species described in *Phyllosticta*. CBS, Utrecht. 510 p.

BOEREMA, G.H., MATHUR, S.B., NEERGAARD, P., 1977: *Ascochyta hyalospora* (Cooke & Ell.) comb. nov. in seeds of *Chenopodium quinoa*. Neth. J. Pl. Path. 83: 153-159.

BOEREMA, G.H., GRUYTER, J. de, NOORDELOOS, M.E., HAMERS, M.E.C., 2004: *Phoma* identification manual. Differentiation of specific and infra-specific taxa in culture. CABI. 470 p.

DŘÍMALKOVÁ, M. 2003: Mycoflora of *Chenopodium quinoa* Willd seeds. Plant Protect. Sci. 39: 146-150.

RICHARDSON, M.J., 1996. Seed mycology. Mycol. Res. 100(4): 385-392.

ROSSKOPF, E.N., CHARUDATTAN, R., SHABANA, Y.M., BENNY, G.L., 2000: *Phomopsis amaranthicola*, a new species from *Amaranthus* sp. Mycologia 92(1): 114-122.

SIVANESAN, A., 1984: The bitunicate Ascomycetes and their anamorphs. J. Cramer, Vaduz. 701 p.

SUTTON, B.C., 1980: The Coelomycetes. Fungi imperfecti with pycnidia, acervuli and stromata. CMI, Kew. 696 p.

TETEREVNIKOVA-BABAJAN, D.N. 1987. Griby roda *Septoria* v SSSR. Izd. AN Armenskej SSR, Jerevan. 478 p.

TOMILIN, B.A., 1979: Key to fungi of the genus *Mycosphaerella* Johans. Nauka, Leningrad. 318 p.

Adresa autorov:
Mgr. Martin Pastirčák, PhD.; Ing. Iveta Čičová
CVRV VÚRV Piešťany, Bratislavská cesta 122, 921 68 Piešťany; e-mail: pastircak@vurv.sk, uefemapa@hotmail.com, cicova@vurv.sk

VÝZNAMNOSŤ SEMENOM PRENOSNÝCH HÚB OBILNÍN V ŽIVOTNOM CYKLE RASTLÍN
IMPORTANCE OF SEED-BORNE FUNGI OF CEREALS IN THE LIFE CYCLE OF PLANTS

Martin PASTIRČÁK

The seed mycoflora of winter wheat was determined by using two methods for investigation of fungal contamination in samples collected from conventional farming system. In total 18 genera of micromycetes were found on winter wheat seeds. The prevalence of seed-borne fungi in winter wheat seeds was Alternaria, Bipolaris, Drechslera, Epicoccum, Papularia, Nigrospora and Penicillium. Five Fusarium species (F. avenaceum, F. culmorum, F. graminearum, F. poae, F. sporotrichioides) were isolated. The majority of these fungi were identified as fungi sporulating on glume of ears.
Key words: biodiversity, pathogenic fungi, seed, Triticum

Úvod

Pšenica letná forma ozimná (*Triticum aestivum* L.) patrí medzi základné plodiny pestované pre účely potravinárstva a výživu človeka. Pre produkciu zdravotne nezávadných primárnych produktov pre potravinársky priemysel je potrebné zabezpečiť zdravý rastlinný materiál počas vegetačného obdobia. K hlavným faktorom, ktoré prispievajú k splneniu tejto podmienky je správna identifikácia biotických faktorov (mikroskopické huby), ktoré sa podieľajú priamo na redukcii kvantity a znižovaní kvality rastlinnej produkcie. Kontaminácia hubami sa prejavuje širokým spektrom symptómov (padanie klíčnych rastlín, hniloba listov, stoniek, súkvetí a zrna). V procese kontaminácie primárnej produkcie významnú úlohu zohráva prenos patogéna počas reprodukčného procesu: prenos patogéna z klasu obilnín na semeno. Približne 72 % organizmov, ktoré atakujú zrno pšenice patrí k mikroskopickým hubám (Richardson 1996). Zrno pšenice je kolonizované mnohými druhmi mikroskopických húb, medzi najčastejšie patria huby rodov *Alternaria*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Helminthosporium*, *Mucor*, *Penicillium*, *Pythium*, *Rhizopus*, *Septoria* alebo *Stagonospora* (Dawood 1982). Cieľom tejto práce je charakterizovať mykoflóru zrna pšenice ozimnej zbieranej na území Slovenska v roku 2009.

Materiál a metódy

Na štúdium mikroskopických húb sme použili 36 vzoriek zrna pšenice letnej formy ozimnej (*Triticum aestivum* L.) rastúcej v roku 2009 na produkčných plochách na území Slovenska. Zber zrna bol uskutočnený od 15.7. do 3.8. 2009 z týchto lokalít: Andač, Bánov, Brestovany, Čakajovce, Dvory nad Žitavou, Giraltovce, Horná Streda, Chmeľov, Jalšové, Kluknava, Koniarovce, Koplotovce, Kuková, Lehota, Markušovce, Michalovce, Nitra, Olcnava, Ondochov, Oponice, Piešťany, Podhorany, Považany, Smižany, Spišské Tomašovce, Spišské Vlachy, Strekov, Šariské Michaľany, Šurany, Topoľčany, Veľké Bedzany, Veľké Bielice, Víťaz, Vranov nad Topľou, Vydrník, Železník. Vzorky zrna boli hodnotené na prítomnosť mikroskopických húb v *in vitro* podmienkach (PDA agar, teplota 22±2°C). Izoláty mikroskopických húb boli identifikované pomocou štandardnej svetelnej mikroskopie (OLYMPUS BX51, OLYMPUS SZ61) na základe makroskopických a mikroskopických charakteristík s použitím manuálov v súčasnosti používaných pre identifikáciu húb – rod *Fusarium* a *Gibberella* (Nelson et al. 1983) a semenom prenosné huby (Malone & Muskett 1997; Watanabe 2002).

Výsledky a diskusia

Biologický materiál môže byť kolonizovaný viacerými skupinami mikroskopických húb – hubami saprofytickými, parazitickými alebo endofytickými. Malone, Muskett (1997) poukazujú na existenciu viac ako 70 druhov semenom prenosných húb. Z tohto množstva väčšina druhov predstavuje zástupcov saprofytických húb. V súčasnosti existujú komplexné mykologické štúdie (Champion 1997; Malone & Muskett 1997; Watanabe 2002), v ktorých je systematicky spracované spektrum semenom prenosných húb. Súhrné údaje o spektre rodov mikroskopických húb izolovaných zo zrna pšenice ozimnej z územia Slovenska v roku 2009 sú uvedené v tabuľke 1. Medzi najvýznamnejšie izolované mikroskopické huby zo zrna pšenice patrili: *Alternaria* (33%), *Cladosporium* (0,3%), *Epicoccum* (26%), *Fusarium* (7%), *Nigrospora* (4,5%), *Papularia* (7,7%), *Penicillium* (0,5%), *Pyrenophora* (14%), *Rhizopus* (0,4%) a *Sordaria* (2,4%). Huby rodu *Fusarium* (teleomorfné štádium *Gibberella*) patria k najčastejšie sledovaným hubovým patogénom napádajúcich obilniny, kde spôsobujú hnilobu klasov *Fusarium head blight* (FHB), jedno z najväžnejších ochorení pšenice ozimnej (Parry et al. 1995). Zo vzoriek zrna z roku 2009 sme izolovali najčastejšie 5 druhov rodu *Fusarium* : *F. poae* (39%), *F. avenaceum* (18%), *F. graminearum* (13%), *F. culmorum* (10%), *F. sporotrichioides* (3%)]. Na Slovensku bolo druhové spektrum mikroskopických húb na zrnách pšenice, vrátane výskytu druhov rodu *Fusarium*, študované už v minulosti viacerými autormi (Šrobárová 2001; Tančinová et al. 2001). Hudec a Roháčik (2003) na základe sledovania výskytu druhov rodu *Fusarium* a *Microdochium nivale* na pšenici ozimnej v rokoch 1999-2000 zistili na území Slovenska ako najčastejšie sa vyskytujúci druh na zrne hubu *Fusarium poae*. Najčastejším druhom izolovaným z klasov a zrna pšenice

v roku 2003 bola huba *F. graminearum* (Pastirčák 2004). Teleomorfné štádium huby zohráva významnú úlohu pri primárnej infekcii na začiatku vegetačného obdobia. Okrem anamorfného štádia sme na 13 lokalitách zaznamenali prítomnosť huby *Gibberella zeae* už v štádiu plnej zrelosti klasu, čo predstavuje 24,5 % výskytu tejto huby v roku 2009.

Tabuľka 1: Spektrum rodov mikroskopických húb izolovaných zo vzoriek zrna pšenice ozimnej formy letnej v roku 2009 (N – počet analyzovaných vzoriek, PI – celkový počet izolátov, % – priemerná hodnota napadnutia vzorky, min-max – minimálna a maximálna hodnota napadnutia zrna daným rodom mikroskopických húb v študovanom súbore, P – počet vzoriek, v ktorých bol identifikovaný daný rod mikroskopických húb)

rod	N	PI	%	min	max	P
Alternaria	36	640	33,0	13,0	47,1	36
Aspergillus	36	4	0,2	1,5	5,5	2
Bipolaris	36	11	0,6	1,7	7,8	5
Botrytis	36	5	0,3	1,9	3,9	3
Cladosporium	36	5	0,3	1,4	1,9	5
Drechslera	36	3	0,2	1,5	3,2	2
Epicoccum	36	512	26,0	6,0	42,3	36
Fusarium	36	136	7,0	1,8	11,1	31
Chaetomium	36	7	0,4	1,6	7,3	4

rod	N	PI	%	min	max	P
Nigrospora	36	87	4,5	3,2	17,4	21
Papularia	36	150	7,7	2,9	34,0	19
Penicillium	36	10	0,5	1,8	6,1	5
Phomopsis	36	8	0,4	1,9	12,0	3
Pyrenophora	36	272	14,0	1,9	30,3	35
Rhizopus	36	8	0,4	3,7	9,1	3
Sordaria	36	46	2,4	4,2	33,3	5
Stemphylium	36	1	0,1	1,9	1,9	1
Trichoderma	36	2	0,1	3,0	3,0	1

Záver

V tomto príspevku prinášame výsledky štúdia výskytu semenom prenosných mikroskopických húb na zrnách pšenice letnej formy ozimnej. Kultivačnou analýzou sme charakterizovali rodové spektrum mikroskopických húb 36 zrnových vzoriek zozbieraných v roku 2009 z územia Slovenska. K najvýznamnejším rodom z hľadiska fytopatológie patrili huby rodu *Alternaria*, *Bipolaris*, *Fusarium* a *Pyrenophora,* často spájané s hnilobou klíčnych rastlín.

Poďakovanie: Táto práca vznikla za finančnej podpory Ministerstva pôdohospodárstva SR, grant č. SP 27/028 0E 02/028 0E 02 a čiastočne bola podporená projektami APVT-27-009904, VSMP-P-0056-09 a VMSP-P-0047-09.

Literatúra

DAWOOD, M.K.M., 1982: Seed-borne fungi, especially pathogens, of spring wheat. Acta Mycol. 18(1): 83-112.

HUDEC, K., ROHÁČIK, T., 2003: *Fusarium* spp. and *Microdochium nivale* infestation of asymptomatic wheat kernels in Slovakia. Cereal Res. Commun. 31(3-4): 415-420.

CHAMPION, R., 1997: Identifier les champignons transmis par les semences. INRA, Paris, 398 pp.

MALONE, J.P., MUSKETT, A.E., 1997: Seed-borne fungi. Description of 77 fungus species. ISTA, 191 pp.

NELSON, P.E., TOUSSON, T.A., MARASAS, W.F.O., 1983: *Fusarium* species. An illustrated manual for identification. Pennsylvania State University Press. 193 pp.

PARRY, D.W., JENKINSON, P., McLEOD, L., 1995: Fusarium ear blight (scab) in small grain cereals-A review. Plant Pathol. 44: 207-238.

PASTIRČÁK, M., 2004: Vláknité huby kolonizujúce klas a semeno pšenice letnej f. ozimnej (*Triticum aestivum*). In: Nové poznatky z genetiky a šľachtenia poľnohospodárskych rastlín: Zborník z 11. odborného seminára, 24.-25. novembra 2004 / Ed. M. Užík. - Piešťany: VÚRV, s. 137-138.

RICHARDSON, M.J., 1996: Seed mycology. Mycol. Res. 100(4): 385-392.

ŠROBÁROVÁ, A., 2001: *Fusarium* spp. on cereals in Slovakia. In: COST Action 835. Occurrence of toxigenic fungi and mycotoxins in plants, food and feed in Europe. / Ed. A. Logrieco. - Luxemburg: Office for Official Publications of European Communities, Brusel, Belgium, p. 158-160.

TANČINOVÁ, D., KAČÁNIOVÁ, M., JAVOREKOVÁ, S., 2001: Natural occurrence of fungi in feeding wheat after harvest and during storage in the agricultural farm facilities. Biologia 56(3): 247-250.

WATANABE, T., 2002: Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi. CRC Press, 432 pp.

Adresa autora:
Mgr. Martin Pastirčák, PhD.
CVRV Piešťany, Výskumný ústav rastlinnej výroby Piešťany, Bratislavská cesta 122, 921 68 Piešťany; e-mail: pastircak@vurv.sk, uefemapa@hot

MORPHOLOGICAL DIVERSITY AMONG GEOGRAPHICALLY DISTANT POPULATIONS OF INDIGENOUS FRUIT TREE SPECIES *Inga edulis* Mart. (*Fabaceae*) IN CULTURAL LANDSCAPE OF PERUVIAN AMAZON

Alexandr ROLLO – Bohdan LOJKA – Petra HLÁSNÁ-ČEPKOVÁ – Eva SVOBODOVÁ – Zdislava DVOŘÁKOVÁ – Iva VIEHMANNOVÁ – Daniel PREININGER

The genus Inga (Fabacaeae) is an ubiquitous component of lowland and mountain rainforest throughout the humid tropical zones from Mexico to Uruguay. Inga edulis Mart. is one of the most widely distributed and economically useful in the whole Amazon region. Due to the fact of domestication, which has been improved through the history by the human selection of the species in the agricultural landscapes of the region, it is said to show growth variability on different environmental sites. An understanding of the level, structure and origin of morphological variation within and among populations is essential for devising optimum management strategies for sustainable utilization and conservation of I. edulis. Objective of the study is to indicate, if there exist any morphological variability between trees, which are cultivated, according to its altitude and latitude in highland and lowland regions of Peruvian Amazon. The field work was conducted from November 2009 to April 2010 in departments of Pasco, Junin, Huanuco, Ucayali and Loreto. In total 170 cultivated trees in different urbanized areas, or agricultural landscapes. All trees were randomly selected and morphologicaly evaluated by using special descriptor focused on quantitative features, developed especially for I. edulis species. The results indicate variability of quantitative features, within cultivated populations of I. edulis in lowland and highland jungle of Peruvian Amazon. The trees are prospering better in the lowland, but it can be grown also in the highlands of the Peruvian Amazon, which is corresponding on different ecological and environmental conditions of the area of interest. We have found that the parameter number of seed per pot is quite stable, it shows that this feature should be geneticaly based and so, in all cases, there are no differences betwenn cultivated populations in different parts of Peruvian Amazon.
Key words: Inga, population, lowland, highland, altitude, latitude, morphological variability

Introduction

Peruvian Amazon is a mosaic of ecosystems associated with the Andes cordillera, where are born the streams which form the river Amazon. The Andean Amzonia presents a range of ecosystems with biophysical and environmental changes related to each other, which are the cause and origin of high biodiversity, with incalculable potential for genetic resources, which Peru shares with Colombia, Ecuador and Bolivia. Peruvian Amazon is divided into three subregions according to its climatic conditions, topography and altitude. Peruvian lowland jungle (Selva baja): up to 500 masl , it has hot and humid clemate, with heavy annual rainfall not exceeding 3000 mm per year; relief is almost flat with some elevation. Depending on geographic location, it can be distinguished a tropical lowland in northern and central regions (Loreto, San Martin and Ucayali), and a subtropical lowland in the south (Madre de Dios, Cusco and Puno). Peruvian highland jungle (Selva alta): between 500 and 1900 masl with hot and humid weather, heavy rainfall in the rainy season from November to April and a dry season from May to October, the relief is hilly, tropical highland in north and centre of the country (regions Loreto, San Martin, Ucayali, Amazonas and Cajamarca) and a subtropical highland in the south (Madre de Dios, Ayacucho, Apurimac, Cusco and Puno) [4]. The genus *Inga* (*Fabacaeae*) is an ubiquitous component of lowland and highland rainforest throughout the humid tropical zones from Mexico to Uruguay. *Inga edulis* Mart. is one of the most widely distributed and economically useful in the whole Amazon region. The highest species diversity is concentrated in the Andean foothills of Peru, Ecuador, Colombia and in southern Central America [3]. Each region has its preferred species of edible *Inga* and in fruiting season they are sold in large quantities in markets. *Inga edulis* Mart. is one of the most widely distributed and economically useful species in the whole Amazon region, but the origin of the cultivated forms is uncertain, though probably Amazonian [2]. It has been introduced across most of tropical South and Central America. It grows in hot, humid climates between 26°S and 10°N with temperatures higher than 20°C where no frost occurs and up to 1600 masl. It is most widespread in areas with minimum annual rainfall of around 1200 mm, but it can tolerate short period of drought. Even though seedlings often establish themselves in the shade, *I. edulis* tolerates various types of soil - from acidic (pH 4.0) to alkaline soils even with high saturation of aluminium, although prefers sandy soils along watersides. *I. edulis* can also withstand temporal floods and high rate of soil skeleton [5]. The species has been improved through the history by human selection focusing on edible fruit [2]. The useful part is the pulp (sarcotesta) that surrounds the seeds in the long pod. It is watery, soft, slightly sweet, generally white tissue that is used for household consumption or sold on the local market. Due to the fact of domestication, which has been improved through the history by the human selection of the species in the agricultural landscapes of the region, *I. edulis* is said to show growth variability on different environmental sites. The understanding of the level, structure and origin of morphological variation within and among populations is essential for devising optimum management strategies for sustainable utilisation and conservation of this species [1].

Objectives of the study
To determine morphological diversity, within cultivated populations of *I.edulis* in different ecological conditions of cultural landscape. To determine differences between pod quantatative features of trees cultivated in highlands and lowlands parts of Peruvian Amazon.

Materials and methods
The study area was divided into several parts due to its altitude and geographical location: north and middle lowland (up to 500 masl) and highland jungle (between 500 and 1900 masl) of Peruvian Amazon. Lowland was divided as mid lowland (Ucayali region), north lowland (Loreto region) and mid highland (Pasco, Junin and Huanuco region). The field work was conducted from November 2009 to April 2010. To determine the species, it was used the botanical description [3]. The survey was conducted on the basis of a suitable descriptor based on quantitative characteristics such as pod length, perimeter and weight, number of seeds per pod and weight of hundred seeds. To describe the differences between quantitative features of pods from trees cultivated in highland and lowland parts of Peruvian Amazon, it was used two-sample T^2 test. For further assessment of genetic diversity the young healthy undamaged leaflets of each growth expression were collected and conserved in silicagel. The samples will be analyzed in the laboratory of the Institute of Tropics and Subtropics in Prague (Czech Republic) and genetic polymorphism will be detected using molecular analysis of DNA.

Results and discussion
We have found no difference between number of seeds per pod in Amazonian highland and lowland. Number of seeds per pod is also statisticaly the same in mid highland, mid lowland and north lowland of Peruvian Amazon. Length of pod shows significant differences between populations in highland and lowland areas. The pods from mid highland population and its length (76cm) are about 10 cm smaler than those from mid (81cm) and north (90cm) lowlands. Pod perimeter is statisticaly the same in both populations, but for example the mean perimeter in mid higland is about 9 cm and in mid lowland almost 10 cm. Weight of pod show significant difference between pods cultivated in mid highalnd (300g) and in mid lowland (360g). Weight of houndred seeds (WHS) shows significant differences between populations in highland and lowland areas. WHS is (340g) in case of highland population and (470g) in lowland populations. WHS shows no differences between mid lowland and north lowland populations.

Conclusion
We have found that the parameter: number of seed per pot is quite stable, which shows that this feature should be geneticaly based and so, in all cases there are no differences between cultivated populations in different parts of Peruvian Amazon. On the other hand the rest of measured parameters refers to different ecological and environmental conditions such as different altitude and latitude, different amount of precipitation and varying periods of drought. The results indicate that the trees are prospering better in the lowland, but can be grown also in the highlands of the Peruvian Amazon.

References
[1] JAMNADASS, R., LOWE, A,. AND DAWSON, I.K. 2009. Molecular Markers and the Management of Tropical Trees: the Case study of Indigenous Fruits. *Tropical Plant Biology*, 2: 1-12.
[2] LEÓN, J. 1998. History of the utilization of *Inga* as fruittrees in the Mesoamerica and Peru. In: *The Genus Inga: Utilization* (eds Pennington TD, Fernandes ECM), pp. 5-13. The Royal Botanic Gardens, Kew, London United Kingdom
[3] PENNINGTON T.D. 1997. *The genus Inga botany*. The Royal Botanic Gardens, Kew, London, United Kingdom. ISBN 1 900347 12 1
[4] IIAP 2004. Estrategia Regional de la Diversidad Biológica Amazónica, Documento Técnico N° 01. BIODAMAZ, Iquitos, Perú ISBN 9972 667 09
[5] REYNEL, C., PENNINGTON R..T., PENNINGTON T.D., FLORES, C., DAZA, A. 2003.
Árboles útiles de la Amazonía Peruana: 261-270. Tarea Asociación Gráfica Educativa, Lima, Peru.

Authors:
Alexandr Rollo, Bohdan Lojka, Hlásná Čepková Petra, Svobodová Eva, Dvořáková Zdislava,
Viehmannová Iva, Preininger Daniel
Czech Univerzity of Life Sciences Prague – Institute of Tropics and Subtropics,
Kamýcká 165 21, Prague 6, Czech Republic

LOKALIZÁCIA CYTOSKELETÁRNYCH BIELKOVÍN V SOMATICKÝCH EMBRYÁCH PINUS NIGRA ARN. PO KRYOPREZERVÁCII
LOCALIZATION OF CYTOSKELETAL PROTEINS IN SOMATIC EMBRYOS OF PINUS NIGRA ARN. AFTER CRYOPRESERVATION

Ján SALAJ – Beáta PETROVSKÁ – Lenka FRÁTEROVÁ – Věra CENKLOVÁ – Pavla BINAROVÁ – Terézia SALAJ

Embryogenic suspension cultures of Pinus nigra Arn. after storage in liquid nitrogen have been used in our experiments. Two ways of visualization of cytoskeletal proteins in these cultures have been used – fluorescent visualization by rhodamine-labeled phaloidin, and fluorescent visualization using antibodies. The use of rhodamine-phaloidin approach seems to be much more convenient for our purposes because of its simplicity and relatively fast procedure.
Keywords: actin, cryopreservation, fluorescent labeling, suspension culture, microtubules, somatic embryos

Úvod

Somatická embryogenéza (SE) predstavuje ideálny systém pre štúdium procesov diferenciácie a regenerácie rastlín. Jedným zo spôsobov rýchlej produkcie somatických embryí (SEs) je aj využívanie suspenzných kultúr, ktoré spolu s protoplastovými kultúrami poskytujú aj vhodný experimentálny materiál na riešenie základných problémov bunkovej biológie, ako je napr. štruktúra a funkcia cytoskeletu rastlinnej bunky (Fowke et al. 1995).

Na polarizácii a vývine embrya sa podieľajú dve základné zložky cytoskeletonu – mikrotubuly a aktínové mikrofilamenty. Pri tvorbe mitotického aparátu hrá dôležitú úlohu tubulín, ktorý je hlavnou zložkou cytoskeletu. Práve polarita, ako základný prvok vznikajúceho embrya, sa zakladá pomocou presne kontrolovaného delenia embryogénnych buniek a predĺžovania podporných suspenzorových a kalusových buniek. Pri ďalších štádiách vývinu embrya v podmienkach *in vitro* majú základnú regulačnú úlohu cytoskeleton a bunkové steny (Šamaj et al. 2006). Bunkové delenie je závislé na cytoskeletálnej štruktúre – fragmoplaste, podieľajúcom sa na vytváraní bunkovej platničky. Počas tvorby fragmoplastu v embryogénnych bunkách kukurice bolo pozorované zvýšené množstvo mikrotubulov a aktínu. Mikrotubuly boli lokalizované po celej dĺžke fragmoplastu, kým aktínové filamenty sa viac nachádzali v jeho rohoch, čo naznačuje, že aktín sa podieľa na presnom umiestnení bunkových platničiek, čo je dôležité pre vývin embrya (Šamaj et al. 2006). Dôležitú úlohu aktínu vo vývine somatických embryí rôznych druhov rastlín potvrdili experimenty s jeho depolymerizáciou účinkom lantrunkulinu B, ktorý inhiboval tvorbu somatických embryí ako aj ich ďalší vývin (Baluška et al. 2001; Smertenko et al. 2003; Briere et al. 2004). V prípade SEs jedle sme zistili, že latrunkulin B bránil predĺžovaniu suspenzorových buniek, čo viedlo k tvorbe trpasličích somatických embryí (Baluška et al. 2001), kým v embryogénnych kultúrach smreka dochádzalo k rozrušovaniu mikrotubulov, zatiaľ čo výrazné aktínové zväzky sa objavovali počas apoptózy suspenzorových buniek (Smertenko et al. 2003). U ihličnanov boli cytoskeletárne štruktúry študované a popísané aj v prácach Hakman et al. (1987), Fowke et al. (1995), Binarová et al. (1996), Cenklová et al. (2003), Schwarzerová et al. (2010).

Cieľom práce bolo otestovať niektoré metódy farbenia a vizualizácie cytoskeletárnych štruktúr v embryogénnych bunkách borovice, ktoré sa využijú pri ďalšom štúdiu zmien v cytoskeletone embryogénnych kultúr ihličnatých drevín po dlhodobom pôsobení nízkych teplôt.

Materiál a metodika

Použili sme embryogénne suspenzné kultúry borovice čiernej (*Pinus nigra* Arn.), línie E224, E303 a E235 (Salaj et al. 2007), ktoré mali rôznu regeneračnú kapacitu po zmrazení v tekutom dusíku (Salaj et al. 2010). Embryogénne kultúry boli udržiavané v 5 cm^3 tekutého DCR média v Erlenmayerových bankách na trepačke v tme pri teplote 24 ^oC (Cenklová et al. 2003).

Na imunofluorescenčnú vizualizáciu aktínových mikrofilamentov v nefixovaných embryogénnych bunkách sme použili farbenie pomocou rodamín-phaloidínu (Binarová et al. 1996). Jadrá boli vizualizované pomocou farbenia s DAPI (10 mg $.dm^{-3}$). Na imunofluorescenčnú vizualizáciu mikrotubulov boli použité monoklonálne protilátky - anti-α-tubulín DMA1 (Sigma) a sekundárne protilátky („goat anti-mouse“) konjugované s FITC (Sigma) v trvaní 45 minút (Cenklová et al. 2003) a pozorované motorizovaným IX81 CellR (Olympus), vybavenom DSU (Disk Scanning Unit) za použitia digitálnej monochromatickej CCD kamery CCD-ORCA/ER.

Výsledky a diskusia

Naše doterajšie experimenty s dlhodobým uskladňovaním embryogénnych kultúr ihličnatých drevín ukázali, že tieto kultúry sú schopné prežívať nielen krátkodobé, ale aj dlhodobé (mesiace/rok) skladovanie v tekutom dusíku a potom regenerovať nové rastliny (Salaj et al. 2010). Avšak nie všetky sledované embryogénne línie po zmrazení v tekutom dusíku sú schopné zachovať si 100% regeneračnú kapacitu a dať

vznik novým jedincom. Jedným z faktorov, ktoré ovplyvňujú regeneračnú schopnosť zmrazovaných embryogénnych línií môžu byť zmeny v štruktúre cytoskeletu bunky. Niektoré výsledky naznačujú, že účinky nízkych teplôt môžu vyvolať rozrušenie mikrotubulov (Abdrakhamanova et al. 2003), v konečnom dôsledku vedúce k zníženému prežívaniu somatických embryí.

Aj keď zmeny cytoskeletárnych štruktúr v SEs ihličnanov už študované boli (napr. Fowke et al. 1995; Cenklová et al. 2003; Smertenko et al. 2003), neboli tieto štúdia zamerané na pôsobenie nízkych teplôt. Preto sme si museli metodicky overiť, aký je najlepší spôsob vizualizácie jednotlivých zložiek cytoskeletárneho aparátu embryogénnych buniek pred a po dlhodobom uschovávaní pri teplote tekutého dusíka. V deliacich sa embryogénnych bunkách borovice, ktoré sú charakteristické prítomnosťou veľkého jadra a hustej cytoplazmy, sa nachádza jemná hustá sieť náhodne orientovaných aktínových mikrofilamentov. V týchto bunkách sa nachádzala aj hustá sieť náhodne orientovaných kortikálnych a cytoplazmatických mikrotubulov. Nedarilo sa nám dobre vizualizovať aktínové a mikrotubulárne pre-profázné zväzky (PPBs, pre-prophase bands), ktoré boli charakteristické pre deliace sa embryogénne bunky smreka (Cenklová et al. 2003).

V tubulárnych suspenzorových bunkách borovice boli prítomné početné hrubé zväzky pozdĺžne orientovaných aktínových mikrofilamentov, kým v izodiametrických bunkách embryonálnej „hlavy“ bolo pozorovaných iba niekoľko rozptýlených aktínových mikrofilamentov.

Porovnanie oboch spôsobov vizualizácie cytoskeletárnych bielkovín embryogénnych buniek borovice ukázalo, že na porovnanie zmien v štruktúre aktínu je vhodnejšia metóda fluorescenčného značenia rodamín-phaloidínom, ktorá je jednoduchá a relatívne rýchla. Značenie protilátkami sa ukázalo pre naše účely zdĺhavé a nákladné.

Domnievame sa, že zvládnutie aj týchto metodických postupov pri štúdiu procesu SE na našom pracovisku nám napomôže pri jej ďalšom využívaní a aplikácii do praxe - zvlášť keď SE a kryoprezervácia sú považované za dve kľúčové technológie, ktoré umožňujú klonálne množenie rastlín v praxi.

Poďakovanie: Ďakujeme pani M. Mazurovej za udržiavanie suspenzných kultúr a ČSAV za poskytnutie pobytového grantu pre J. S. Projekt bol financovaný Grantovou agentúrou VEGA, proj. č. 2-0025-08.

Literatúra

ABDRAKHAMANOVA, A., WANG, Q.Y., KHOKHLOVA, L., NICK, P., 2003. Is microtubule disassembly a trigger for cold acclimation? Plant Cell Physiol., vol. 44, pp. 676-686.

BALUŠKA, F., JÁSIK, J., EDELMANN, H.G., SALAJOVÁ, T., VOLKMANN, D., 2001. Lantrunculin-B induced plant dwarfism: plant cell elongation is actin-dependent. Developmental Biology, vol. 231, pp. 113-124.

BINÁROVÁ, P., ČIHALÍKOVÁ, J., DOLEŽEL, J., FOWKE, L.C., 1996. Actin distribution in somatic embryos and embryogenic protoplasts of white spruce (Picea glauca). In Vitro Cell. Develop. Biol. – Plant, vol. 32, pp. 59-65.

BRIERE, C., BARTHOU, H., JAUNEAU, A., ALIBERT, G., PETIPREZ, M., 2004. The actin cytoskeleton is involaved in signalling protoplast embryogenesis induced by agarose embedding. Physiologia Plantarum, vol. 122, pp. 115-122.

CENKLOVÁ, V. – BINÁROVÁ, P. – HAVEL. L., 2003. Actin distribution in mitotic apparatus of somatic embryo cells of Norway spruce. Biologia Plantarum, vol. 46, pp. 167-174.

FOWKE, L.C., ATTREE, S.M., BINAROVÁ, P., GALWEZ, M.E., WANG, H. 1995. Conifer somatic embryogenesis for studies of plant cell biology. In Vitro Cell. Develop. Biol. – Plant, vol. 31, pp. 1-7.

HAKMAN, I., RENNIE, P., FOWKE, L.C., 1987. A light and electron microscopy study of Picea glauca (white spruce) somatic embryos. Protoplasma, vol. 140, pp. 100-109.

SALAJ, T., BLEHOVÁ, A., SALAJ, J., 2007. Embryogenic suspension cultures of Pinus nigra Arn.: Growth parameters and maturation ability. Acta Physiologiae Plantarum, vol. 29, pp. 138-145.

SALAJ, T., MATUSIKOVA, I., PANIS, B., SWENNEN, R., SALAJ, J., 2010. Long-term storage of Pinus nigra Arn. embryogenic tissues through cryopreservation. CryoLetters, vol. 31, pp. 76-76.

SMERTENKO, A.P., BOZHKOV, P.V., FILONOVA, L.H., VON ARNOLD, S., HUSSEY, P.J., 2003. Re-orientation of the cytoskeleton during developmental programmed cell detath in Picea abies embryos. Plant Journal, vol. 33, pp. 813-824.

SCHWARZEROVÁ K, VONDRÁKOVÁ Z, FISCHER L, BOŘÍKOVÁ P, BELLINVIA E, ELIÁŠOVÁ K, HAVELKOVÁ L, FIŠEROVÁ J, VÁGNER M, OPATRNÝ Z.: The role of actin isoforms in somatic embryogenesis in Norway spruce. BMC Plant Biology, vol. 10, pp. 89-101.

ŠAMAJ, J., BOBÁK, M., BLEHOVÁ, A., PREŤOVÁ, A., 2006. Importance of cytoskeleton and cell wall in somatic embryogenesis. In Mujib, A., Šamaj, J. Somatic Embryogenesis. Springer Verlag – Berlin, Heidelberg 2006, pp. 35-50.

VON ARNOLD, S., SABALA, I., BOZHKOV, P., DYACHOK, J., FILONOVA, L. 2002. Developmental pathways of somatic embryogenesis. Plant Cell, Tissue and Organ Cult.,vol. 69, pp. 233-249.

Adresa autorov:
doc. RNDr. Ján Salaj, DrSc., Ing. Beata Petrovská, PhD., Mgr. Lenka Fráterová, RNDr. Terézia Salaj, CSc.: Ústav genetiky a biotechnológií rastlín SAV, Akademická 2, 950 07 Nitra, e-mail: jan.salaj@savba.sk
RNDr. Věra Cenklová, PhD., doc. RNDr. Pavla Binarová, CSc., Laboratoř bunečného cyklu a cytoskeletonu rostlin , Ústav experimentálni botaniky AV ČR, Sokolovská 6, CZ - 77200 Olomouc, Česká republika
Ing. Beata Petrovská, PhD.: Centrum regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výskum, Ústav experimentálni botaniky AV ČR, Sokolovská 6, CZ - 77200 Olomouc, Česká republika

ARTIFICIAL NEURAL NETWORKS – A CHEAP ALTERNATIVE TO MOLECULAR MARKERS IN GRAPEVINE VARIETIES DISCRIMINATION

Eva SVOBODOVÁ – Petra HLÁSNÁ ČEPKOVÁ – Camilla PANDOLFI – Martin BERÁNEK

Eight selected Vitis vinifera L. varieties were analysed in 2008 using an objective discrimination method – artificial neural networks, with the aim to assess the relationship between the varieties cultivated in Czech Republic. Fifty healthy, fully expanded leaves were collected from each variety, scanned using an optical scanner and then elaborated by computer programs. The comparative frames were constructed for each variety and the relation between the varieties was assessed using either the UPGMA method. Position of some varieties confirmed the already known parentage while other varieties (like White and Red Chasselas) resulted further than expected.
Keywords: artificial neural networks, leaves, variety discrimination, Vitis vinifera.

Introduction

Grapes and wine have always been popular and important products in whole history since Ancient times. Production of either grapes or wine is still very high and also wines from less known countries start to appear on the world markets. Nowadays, there are thousands of varieties of grapevine, although only of them are of a commercial importance (This et al. 2006). There have been established many methods for their identification, beginning from the traditional ampelography, to the biochemical analysis of isoenzymes and other chemical compounds present especially in berries. The most precise, but also the most expensive methods, are those with the molecular approach. The traditional ampelography, however, is always a very important tool, because it serves for the preliminary, fast and cheap varietal identification, before doing any molecular or biochemical analysis (Martínez et al. 2003). The most important and significant organ is a leaf (Fregoni 2005). Leaf morphology is an ampelographic feature that allows some varieties to be easily distinguished and it is commonly used for identification (Santiago et al. 2005). The origin of grapevine varieties, their heterogenity and the frequent cases of homonymy and synonymy makes important to define good shape measures that can be effectively applied to leaf shapes, so they can be compared and analysed by meaningful and objective criteria (Mancuso et al. 2001). Thus, another method, based on morphological characteristics, has been employed – the artificial neural network. Even though it is based on the evaluation of morphological traits, it does not suffer for the subjectivity, since whole analysis is done by the mathematical models. An ANN is an information processing paradigm structured as biological nervous system, such as the brain, composed of a large number of highly interconnected processing elements working in unison to solve specific problems. An ANN is configured for a specific application, such as pattern recognition or data classification, through a learning process (Mugnai et al. 2008). Although the vine leaves lack the self-similarity of the theoretical fractals, they are candidates for characterization using fractal analysis because of their highly complex structure (Mancuso 1999). All backpropagation related paradigms require supervised training. This means that they must be taught using a set of training data where known solutions are supplied (Mancuso et al. 1998). The artificial neural networks can be effectively used to differentiate varieties and accessions through phyllometric and fractal parameters. A great advantage of the ANN is low-cost equipment consisting of an optical scanner, personal computer and special software (Mugnai et al. 2008). Collecting the samples from different environments also confirmed the theory of the environmental independence of the fractal parameters (Mancuso 2002). The results showed that the ANN allows a rapid and objective comparison of a theoretically unlimited number of genetic entities. This would, theoretically, allow the creation of the database of different varieties and their further comparison of the unknown variety (Mancuso et al. 1998). In past the ANN analysis was applied on grapevine by e.g. Mancuso et al. (1998) and Çoban (2004).

Material and methods

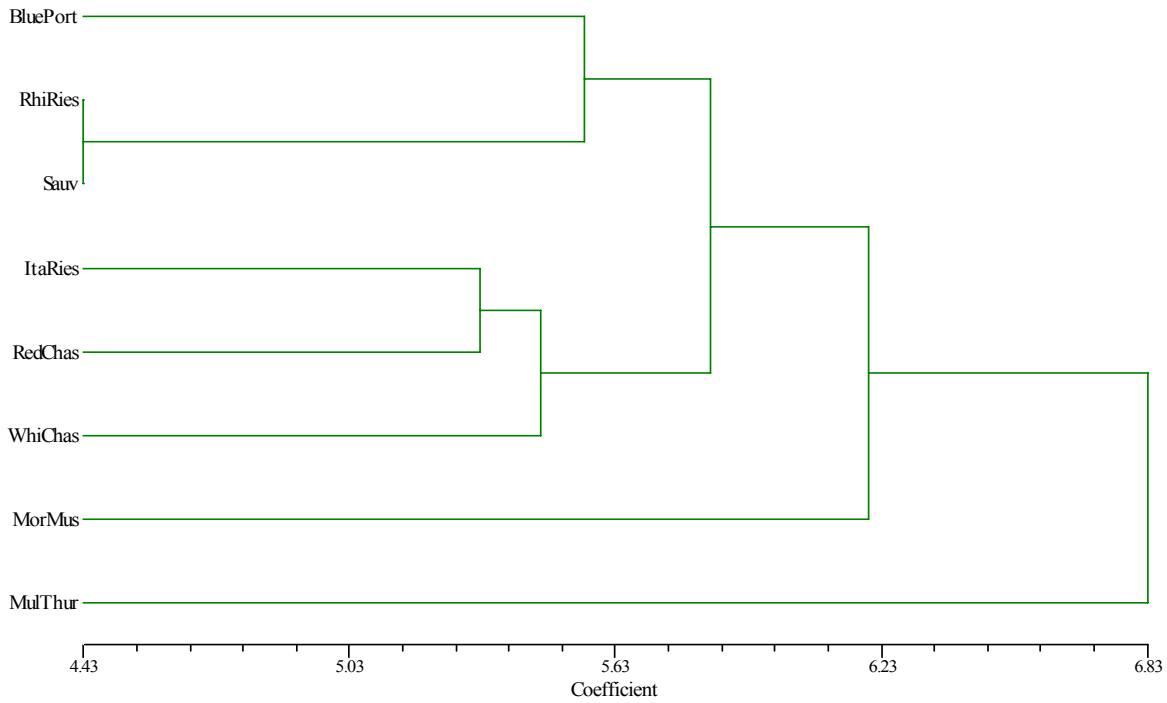
All the leaves were collected at St. Claire's vineyard located in the part of Prague, at Trója. It is a part of Prague Botanic Garden. The harvested area is 3.56 hectares. The varieties analysed were following: 'Müller Thurgau', 'Rhine Riesling', 'Italian Riesling', 'Moravian Muscat', 'Sauvignon', 'Blue Portugal', 'White Chasselas' and 'Red Chasselas'. From each variety, fifty healthy, fully expanded leaves from ten randomly selected plants were collected in the late spring 2008. Leaf images were acquired at 200 dpi. 256 grey scale, by using an optical scanner. Fourteen phyllometric parameters previously described by Mancuso and Nicese (1999) were determined for each leaf using image-analysis software (UTHSCSA Image Tool Program 3.0). The fractal spectrum of the leaves was obtained using the box-counting method; which means that the each channel of the grey is threshold for a colour value between 0 and 255; and the fractal dimension for each value was calculated using the program HarFa (Harmonic and Fractal Image Analysis). The value of the fractal dimension, that separates non-fractal zone of spectrum from the fractal one, is 1. The five fractals parameters, which serve for the construction of fractal spectrum, were then calculated using the program GraphPadPrism, which then also constructed the fractal spectrum. Afterwards, BPNNs was constructed using the aiNet program. It was created with the Image Tool outputs together with the fractal parameters, which is

more precise exactly for the use of the highest number of parameters. There were used data from 25 leaves in a training phase. According to the outputs from the aiNet a dendrogram was constructed using the data obtained from BPNN and fractal analysis. For its construction was used the calculation of the Euclidean distance in program NTSYS.

Results and discussion

The first results were comparative frames for each variety. Each frame is dedicated to a specific accession and shows the BPNN output for the input represented by the phyllometric parameters and fractal parameters of 50 leaves. The level of similarity is expressed by number, which ranged between 0 (false) and 1 (true). However, this was only a theoretical situation. Due to the natural variability among leaves, the output of the expected class tend to report a value close to 1, but less than 1, while the others should be close to 0 (Mugnai et al. 2008). In all eight cases, the neural network was able to discriminate the selected accession without difficulties. The highest value was obtained for 'Müller Thurgau', where the mean output arrived up to 0.810. Another quite high mean output occurred in 'Moravian Muscat' (0.657). All other accessions showed the mean output in the range from 0.541 ('Rhine Riesling') to 0.597 ('White Chasselas'). However, in all cases there was a clearly defined peak for the selected accession; therefore the varieties were well-separated one from each other. The dendrogram (Graph 1) formed two clusters, and left two varieties more ('Müller Thurgau') or less ('Moravian Muscat') separated from the others. Two varieties, 'Rhine Riesling' and 'Sauvignon' were indicated at the same level, so as the closest ones, however, they still remained quite distant, with the coefficient 4.43. Later they were clustered with 'Blue Portugal'. The second main cluster is formed by 'Italian Riesling' and 'Red Chasselas', together with the 'White Chasselas'. The results showed closer relationship between 'Italian Riesling' and 'Red Chasselas', than the relation between both 'Chasselas', even though they are considered to be the colour variation of the same variety. The most distant and separated from all other resulted 'Müller Thurgau'. The artificial neural networks were able to recognise all the accessions presented in the learning phase, like presented for example Mancuso (2002). The highest level of similarity was present in 'Müller Thurgau' (0.810), which also showed the lowest degree of similarity with the other varieties, and this was confirmed by the UPGMA graph, where 'Müller Thurgau' remained completely separated from all other varieties. This result was quite surprising, because Dettweiler et al. (2000) found out that 'Müller Thurgau' was descendant of 'Rhine Riesling'. However, 'Rhine Riesling' remained distant from 'Müller Thurgau', and was assessed close to 'Sauvignon', which corresponded with the data published by Moravcová et al. (2004). Another interesting result was the position of both 'Chasselas' either in the neural network graph or in the final dendrogram. As reported Moravcová et al. (2004), 'Red Chasselas' is only a mutation of berry colour of 'White Chasselas'. In the dendrogram, 'Red Chasselas' was closer related to 'Italian Riesling' than to 'White Chasselas'.

Graph 1: Dendrogram obtained by UPGMA cluster analysis



Conclusion

The neural network profiles of selected varieties were assessed. The neural network was able to discriminate without any problems between all grapevine accessions. 'Müller Thurgau' was found out to have the lowest level of similarity with all other varieties, whilst the highest similarity was found surprisingly between 'Rhine Riesling' and 'Sauvignon'. The UPGMA dendrogram obtained from the ANN, was able to confirm the relationship between 'Red Chasselas' and 'White Chasselas', moreover, the ANN put 'Red Chasselas' close to 'Italian Riesling'. However, all the graphs obtained from the research are usable for the creation of the variety database.

References

ÇOBAN, H. 2004. Application of an Artificial Neural Network (ANN) for the Identification of Grapevine (*Vitis vinifera* L.) Genotypes. Asian Journal of Plant Sciences 3: 340-343.

DETTWEILER, E., JUNG, A., ZYPRIAN, E., TÖPFER, R. 2000. Grapevine variety 'Müller-Thurgau' and its true-to-type descent. Vitis 39 (2): 63-65.

FREGONI, M., 2005. Viticoltura di Qualità. 2. ed. Phytoline s.r.l., Affi. 819 pp.

MANCUSO, S. 1999. Fractal geometry-based image analysis of grapevine leaves using the box-counting algorithm. Vitis 38 (3): 97-100.

MANCUSO, S. 2002. Discrimination of grapevine (*Vitis vinifera* L.) leaf shape by fractal spectrum. Vitis 41 (3): 137-142.

MANCUSO, S., BOSELLI, M., MASI, E. 2001. Distinction of 'Sangiovese' clones and grapevine varieties using Elliptic Fourier Analysis (EFA), neural networks and fractal analysis. Advances in Horticultural Sciences. 15 (1-4): 61-65.

MANCUSO, S., NICESE, F.P. 1999. Identifying Olive (*Olea europaea*) Varieties Using Artificial Neural Networks. Journal of the American Society of Horticultural Science 124 (5): 527-531.

MANCUSO, S., PISANI, P.L., BANDINELLI, R., RINALDELLI, E. 1998. Application of an artificial neural network (ANN) for the identification of grapevine genotypes. Vitis 37 (1): 27-32.

MARTÍNEZ, L., CAVAGNARO, P., MASUELLI, R., RODRÍGUEZ, J., 2003. Evaluation of diversity among Argentine grapevine (*Vitis vinifera* L.) varieties using morphological data and AFLP markers. Electronic Journal of Biotechnology 6 (3): 244-253.

MORAVCOVÁ, K., BARÁNEK, M., PIDRA, M. 2004. The use of RAPD markers for differentiation of grapevine varieties registered in the Czech Republic. Horticultural Science (Prague) 31 (3): 96-101.

MUGNAI, S., PANDOLFI, C., AZZARELLO, E., MASI, E., MANCUSO, S. 2008. *Camellia japonica* L. genotypes identified by an artificial neural network based on phyllometric and fractal parameters. Plant Systematics and Evolution 270: 95-108.

SANTIAGO, J-L., BOSO, S., MARTÍNEZ, M.C., PINTO-CARNIDE, O., ORTIZ, J.M. 2005a. Ampelographic Comparison of Grape Varieties (*Vitis vinifera* L.) Grown in Northwestern Spain and Northern Portugal. American Journal of Enology and Viticulture 56 (3): 287-290.

THIS, F., LACOMBE, T., THOMAS, M. R. 2006. Historical origins and genetic diversity of wine grapes. Trends in genetics 22 (9): 511-519.

Authors:
Eva Svobodová[1], Petra Hlásná Čepková[1], Camilla Pandolfi[2], Martin Beránek[3]
[1] Department of Crop Sciences and Agroforestry in Tropics and Subtropics, Institute of Tropics and Subtropics, Czech University of Life Sciences Prague, Kamýcká 129, 165 21, Prague 6-Suchdol, Czech Republic
[2] Department of Horticulture, Univrsity of Florence, viale delle Idee 30, 500 19 Sesto Fiorentino (FI), Italy
[3] Prague Botanic Garden, Nádvorní 134, 171 00, Praha 7 - Trója

ODOLNOST VYBRANÝCH ODRŮD PŠENICE A DONORŮ NA UMĚLOU INFEKCI BRANIČNATKY PŠENIČNÉ (*Mycosphaerella graminicola*) V POLNÍCH PODMÍNKÁCH
RESISTANCE OF SELECTED WHEAT CULTIVARS AND GENE RESOURCES TO ARTIFICIAL INFECTION WITH SEPTORIA LEAF BLOTCH (*Mycosphaerella graminicola*) IN FIELD TESTS

Ilona SVOBODOVÁ[1] – Petr MARTINEK[1] – Lubomír VĚCHET[2] – Světlana ŠLIKOVÁ[3]

Tests for resistance to three different isolates of Septoria leaf blotch (Mycosphaerella graminicola /Fuckel/ J. Schröt.) were carried out in 20 cultivars of spring wheat (Triticum aestivum L.), 10 lines of spring hexaploid tritordeum (X Tritordeum Ascherson et Graebner) and 19 lines of hexaploid synthetic wheat in the year 2010. Responses of the genotypes to three different Septoria leaf blotch isolates used for inoculation were compared with a check variant without inoculation. A level of virulence was rated as an average infection of four upper leaves in per cent. The infection was affected by virulence of the used isolate. The average infection was 4.30 % (check 0.00) in spring wheat, 0.00 % (check 0.00) in hexaploid tritordeum and 0.10 % (check 0.00) in synthetic wheat. Our results confirmed a high level of resistance in tritordeum and also in synthetic wheat. Selected synthetic wheats and tritordeum lines can be used as potential donors of resistance to Septoria leaf blotch for breeding use.
Key words: Septoria leaf blotch, synthetic wheat, tritordeum, field infection

Úvod

U pšenice existují donory odolnosti k braničnatce pšeničné (*Mycosphaerella graminicola*), u nichž jsou známy jednotlivé *Stb* geny rezistence. Tyto způsobují specifickou reakci na jednotlivé izoláty. Vzhledem k velmi vysoké variabilitě patogena je velmi důležité vyhledávání nových zdrojů rezistence, jejichž výskyt lze však očekávat spíše u planých nebo syntetických forem. Kromě běžných odrůd jarní pšenice seté *Triticum aestivum* L. (2n = 6x = 42, BBAADD) byly pro testování vybrány i některé netradiční obiloviny, jakými jsou tritordeum a syntetická pšenice.

Tritordeum (X *Tritordeum* Ascherson et Graebner) je uměle vytvořený obilní druh, odvozený z křížení planého ječmene *Hordeum chilense* Roemer et Schultese (2n = 2x = 14; $H^{ch}H^{ch}$) s hexaploidní nebo tetraploidní pšenicí. Syntetická pšenice (2n = 6x = 42, $BBAAD^tD^t$) vznikla křížením *Triticum durum* Desf. (2n = 4x = 28, BBAA) s *Aegilops squarrosa* L. /syn. *Triticum tauschii* (Coss.) Schmalh./ (2n = 2x = 14, D^tD^t). Od pšenice seté se odlišuje genomem D^t, který může nést geny nových významných vlastností. V našem pokuse byly použity hexaploidní formy tritordea (2n = 6x = 42; $H^{ch}H^{ch}BBAA$) a syntetické pšenice z CIMMYT v Mexiku.

Cílem práce bylo otestovat virulenci tří odlišných izolátů *M. graminicola* a míru rezistence známých odrůd ve srovnání s kontrolní variantou, ponechanou bez umělé infekce.

Materiál a metody

V infekční školce pracoviště Agrotest fyto, s.r.o. byla provedena infekce jarních obilovin (jejichž seznam je zřetelný z tab. 1) třemi izoláty (1. Meritto 2008, 0324, 10.05.2010; 2. Bardotka 2008, 0,324, 10.05.2010; 3. CHUL, 2006, VURV; C8; 1.list S1(12), CRI 0266, 20.5.10.) připravenými ve Výzkumném ústavu rostlinné výroby v Praze. Izoláty, namnožené na maltoso-dextrátovém substrátu, byly rozprášeny na rostliny ručním rozprašovačem na konci odnožování. Napadení bylo hodnoceno vizuálně u čtyř horních listů na 15 náhodně vybraných stéblech jako průměr dvou termínů hodnocení: období kvetení, období mléčné zralosti.

Výsledky a diskuse

Rok 2010 se vyznačoval poměrně vysokým výskytem braničnatky vzhledem k příznivým teplotám a vysokým srážkám během května. Na neošetřené kontrole byl jen nepatrný výskyt choroby z přirozené infekce. Jednotlivé odrůdy jarní pšenice reagovaly různě na rozdílné izoláty, což ukazuje na jejich specifickou reakci (tab. 1). Běžné odrůdy pšenice byly nejvíce napadeny izolátem č. 2 (5,8 %), izoláty 1 a 3 měly podobnou průměrnou virulenci, ovšem specifickou k jednotlivým genotypům. U testovaných genotypů tritordea a u syntetické pšenice byl nalezen velmi nízký nebo žádný výskyt infekce. Výsledky potvrdily předpoklad, že nové geny rezistence lze s velkou pravděpodobností nalézat u planých forem.

Závěry

- Nejúčinnějším izolátem použitým pro umělou infekci byl izolát č. 2.
- Byla nalezena vysoká úroveň rezistence u tritordea, syntetických pšenic.
- Výběr potenciálních donorů odolnosti bude nutné provést na základě víceletých výsledků a s ohledem k případným dalším významným vlastnostem, kterých by bylo možné využít ve šlechtění.

Poděkování: Práce byla podpořena projektem česko-slovenské spolupráce KONTAKT-mobilita MEB0810001 (na Slovensku APVV-SK-CZ-0007-09) Ministerstva školství a mládeže České republiky a projektem NAZV: QH81284 Ministerstva zemědělství České republiky.

Tabulka 1: Rezistence vybraných genotypů ke třem izolátům braničnatky pšeničné v procentech

Č. vzorku	Genotyp	Rok registrace	Izolát č. 1	2	3	Průměr	Kontrola
pšenice (*Triticum aestivum* L., 2n=6x=42, BBAADD)							
1	Amaretto	2006	1	6,7	22	9,9	0
2	Aranka	1998	0,1	6	20	8,7	0
3	Brawura	2007	0,1	2,4	0,7	1	0
4	Corso	2001	0,9	0,7	0	0,5	0
5	Granny	2004	11,1	7,7	0	6,3	0
6	Leguan	1998	0,7	5,3	0	2	0
7	Munk	1995	1,1	9,7	0	3,6	0
8	Sandra	1984	3,8	28,1	1,3	11,1	0
9	Saxana	1990	0	3,8	20	7,9	0
10	Septima	2008	2,5	26,3	0,3	9,7	0
11	Sirael	2005	5,9	9	0	5	0
12	SW Kadrijl	2006	13,2	6,5	0	6,6	0
13	SW Kronjet	2005	28	3,4	0,3	10,6	0,1
14	Trappe	2007	0	0,3	5	1,8	0
15	Triso	2002	2,3	0,1	0,3	0,9	0
16	Vánek	2004	0,1	0	0	0	0
17	Vinjett	2001	0,4	0	1	0,5	0
18	Zuzana	2003	1,3	0	0	0,4	0
19	Nobeoka Bozu	(zdroj odolnosti k fuáriu)	0	0	0	0	0
20	Sumai 3	(zdroj odolnosti k fuáriu)	0	0	0	0	0
	průměr		*3,6*	*5,8*	*3,5*	*4,3*	*0*
tritordeum (X *Tritordeum* Ascherson et Graebner, 2n = 6x = 42, $H^{ch}H^{ch}$BBAA)							
21	HT 135a (DH)		0	0	0	0	0
22	HT 135b (DH)		0	0	0	0	0
23	HTC 1323 (DH)		0	0	0	0	0
24	HTC 1331a (DH)		0	0	0	0	0
25	HTC 1331b (DH)		0	0	0	0	0
26	HTC 1331c (DH)		0	0	0	0	0
27	HTC2060		0	0	0	0	0
28	HTC2071		0	0	0	0	0
29	HTC2083		0,1	0	0	0	0
30	HTC2084		0	0	0	0	0
	průměr		*0*	*0*	*0*	*0*	*0*
syntetické pšenice (původy)							
31	ALTAR 84/AE.SQUARROSA(502)		0,1	0	0	0	0
32	ALTAR84/AE SQUARROSA(188)		0,1	1,6	0,1	0,6	0
33	ALTAR84/AE SQUARROSA(188)		0	0	0	0	0
34	ALTAR84/AE SQUARROSA(192)		0	0	0	0	0
35	ALTAR84/AE SQUARROSA(192)		0	0	0	0	0
36	D67.2/P66.270//AE.SQUARROSA(659)		0,3	0	0	0,1	0
37	D67.2/P66.270//AE.SQUARROSA(659)		0,2	0	0	0,1	0,1
38	D67.2/P66.270//AE.SQUARROSA(213)		0	0	0	0	0
39	D67.2/P66.270//AE.SQUARROSA(213)		0	0	0	0	0
40	D67.2/P66.270//AE.SQUARROSA(217)		0	0	0	0	0
41	D67.2/P66.270//AE.SQUARROSA(217)		0	0	0	0	0
42	D67.2/P66.270//AE.SQUARROSA(218)		0	0	0	0	0
43	D67.2/P66.270//AE.SQUARROSA(218)		0	0	0	0	0
44	DOY1/AE.SQUARROSA(188)		0,8	0	0,8	0,6	0
45	GREEN/AE.SQUARROSA(458)		0	0	0	0	0
46	SCA/AE.SQUARROSA(518)		0	0	0	0	0
47	SCA/AE.SQUARROSA(518)		0	0	0	0	0
48	SNIPE/YAV79//DACK/TEAL/3/AE.SQ.(629)		0	0	0	0	0
49	YUK/AE.SQUARROSA(217)		0	0	0	0	0
	průměr		*0,1*	*0,1*	*0*	*0,1*	*0*

Adresy autorů
[1]RNDr. Ilona Svobodová, Ing. Petr Martinek, CSc., Agrotest fyto, s.r.o., Havlíčkova 2787, 767 01 Kroměříž, tel.: +420 573 317 152, fax: +420 573 339 725, e-mail: svobodova.ilona@vukrom.cz, martinek.petr@vukrom.cz
[2]Ing. Lubomír Věchet, CSc., Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Drnovská 507, 161 06 Praha 6 - Ruzyně, tel.: +420 233 022 361, fax: +420 233 022 286, e-mail: vechet@vurv.cz
[3]Ing. Světlana Šliková, Ph.D., Centrum výskumu rastlinnej výroby Piešťany, v.v.i, Bratislavská cesta 122, 921 68 Piešťany, Slovenská republika, e-mail: slikova@vurv.sk

REAKCIA SLOVENSKÝCH ODRÔD PŠENICE PO UMELEJ INFEKCII HUBOU *FUSARIUM CULMORUM* SACC.
REACTION OF SLOVAK WHEAT CULTIVARS AFTER INOCULATION WITH FUNGI *FUSARIUM CULMORUM* SACC.

Svetlana ŠLIKOVÁ – Valéria ŠUDYOVÁ – Pavol HAUPTVOGEL – Edita GREGOVÁ

Slovak cultivars were sown in October in field conditions of Piešťany and inoculated with highly-virulent pathogen isolate Fusarium culmorum Sacc. in 2008 and 2009. The AUDPC (under disease progress curves) was computed, DON (deoxynivalenol) content in grains was determined by Ridascreen® Fast DON assay kit. Old Slovak cultivars had lower AUDPC and DON than modern Slovak cultivars.
Key words: Slovak cultivars, Fusarium culmorum Sacc.

Úvod

Intenzita napadnutia klasov pšenice fuzáriami je závislá od mnohých faktorov. 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 steblom a tiež vyššia intenzita poškodenia bola pozorovaná na porastoch pšenice ošetrenej rastovým regulátorom. Vyššiu náchylnosť možno pozorovať v hustejších porastoch, viac zásobených dusíkom. S výskytom choroby súvisí i kumulácia rôznych typov mykotoxínov v klasoch. Výskumy odhalili, že najfrekventovanejším je deoxynivalenol (DON alebo vomitoxín) patriaci medzi trichotecény, ktoré inhibujú v eukaryotických bunkách proteosyntézu (McLaughlin et al. 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 a už dávka 2 mg kg^{-1} DON v krmive prasiat zapríčiní nechutenstvo a nízky prírastok váhy (Rotter et al. 1996). 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}). Na Slovensku bol vykonaný monitoring výskytu DON vo vzorkách pšenice, ktoré pochádzali z rôznych pestovateľských lokalít. Zistilo sa, že 9,3 % vzoriek obilnín pochádzajúcich z kukuričnej výrobnej oblasti, 5 % z repárskej výrobnej oblasti a 14,3 % zo zemiakárskej výrobnej oblasti prekročilo povolený limit obsahu DON stanovený EÚ počas troch sledovaných rokoch (Šliková et al. 2008). V súčasnosti medzi pestovateľmi a šľachtiteľmi pšenice je záujem o informácie, ktoré sa týkajú rezistencie registrovaných odrôd a genetických zdrojov resp. vyhľadávania nových zdrojov rezistencie proti tomuto ochoreniu. Poznatky o náchylnosti starých slovenských odrôd na umelú infekciu hubou *F. culmorum* zatiaľ nie sú známe.

Materiál a metódy

Materál: staré slovenské odrody pšenice (Šamorínska, Bučianska červenoklasá, Bučianská V.T. 16, Bučianská 316, Košútská, Radošinská Dorada, Radošinská Karola, Radošinská Norma, Radošinská poloranná 562, Radošinská ranná 594, Slovenská B, Slovenská 2, Slovenská 777, Trebišovská 76, Vígľašská Červenoklasá, Vrakúnská) a moderné slovenské odrody (Ilona, Ignis, Viador, Pavlína, Torysa, Zerda, Veldava, Markola, Stanislava, Venistar, Verita, Solara, Vanda, Alacris and Genoveva)

Izolát: Fusarium. culmorum (W. G. Sm.) Sacc. (RA/02) pochádzajúci z lokality Radošina .

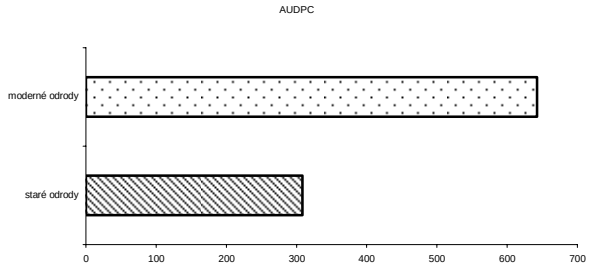
Poľný experiment: Experiment bol založený v rokoch 2008 a 2009 v dvoch opakovaniach. Klasy jednotlivých odrôd boli počas kvitnutia umelo infikované sprayovou metódou spórami huby *F. culmorum*. Po objavení prvých symptómov (10 dní po inokulácii) boli urobené 4 vizuálne hodnotenia napadnutia klasov. Sledovaná bola výška rastlín, vegetačná doba rastlín až po termín umelej infekcie t.j. úplné kvitnutie. Počas zberu bolo zozbieraných 25 klasov z každej odrody v dvoch opakovaniach s infekciou a rovnaký rozsah aj z kontrolného variantu bez infekcie. Primárne výsledky (% napadnutia) boli prepočítané na AUDPC (plocha pod krivkou vývoja choroby).

Kvantitatívne stanovenie obsahu DON: Na stanovenie bola použitá ELISA metóda pomocou komerčného kitu (Ridascreen Fast DON, RBiopharm, Germany). Absorbancie vzoriek boli merané spektrofotometrom pri vlnovej dĺžke 450 nm (MRX II, Dynex Technologies, USA). DON koncentrácia bola vypočítaná v $mg.kg^{-1}$.

Výsledky a diskusia

Priemerná hodnota AUDPC celého testovaného súboru bola o 34,3 % vyššia ako priemerné AUDPC starých slovenských odrôd a o 36,6 % nižšia ako moderných slovenských odrôd. Staré slovenské odrody mali AUDPC o 51,9 % nižšie ako moderné slovenské odrody. Vysoké AUDPC v súbore slov. moderných odrôd bolo pri genotypoch Ignis a Vanda, medzi slovenskými starými odrodami pri Vígľašskej červenoklasej, Radošinskej poloranej a Bučianskej 316. Nízke AUDPC v súbore slovenských moderných odrôd bolo zistené pri genotypoch Zerda a Solara, v súbore starých slovenských odrôd pri genotypoch

Radošinská Norma, Radošinská Karola a Radošinská ranná 594. Priemerná kontaminácia zŕn testovaného súboru na obsah mykotoxínu DON bola 33,9 mg.kg^{-1}. Staré odrody mali priemerný obsah DON v zrnách o 67,4 % nižší ako moderné odrody. Kumulácia DON sa vo vzorkách starých odrôd pohybovala v rozpätí medzi 1,6 mg.kg^{-1} a 48,6 mg.kg^{-1}. V prípade moderných odrôd sa hodnoty pohybovali od 20,2 mg.kg^{-1} do 143,1 mg.kg^{-1}. Medzi hodnotenými znakmi boli zistené pozitívne korelácie medzi AUDPC a obsah DON (r = 0,86). Pri starých odrodách medzi AUDPC a obsah DON bol r = 0,81 a pri moderných odrodách medzi AUDPC a obsah DON bol r = 0,82. V súčasnosti je známe, že mnohé krajové a staré odrody sú zdrojom hospodársky významných génov. Medzi pšeničnými krajovými a starými odrodami pochádzajúcimi hlavne z Číny a Japonska boli nájdené nové potenciálne zdroje rezistencie, ktoré nesú gény rezistencie proti fuzarióze klasov a kumulácii mykotoxínu DON v zrnách odlišných od genotypu Sumai využívaného v mnohých šľachtiteľských programoch ako zdroj rezistencie proti fuzarióze klasov (Yu et al. 2008). Podobne i medzi starými maďarskými odrodami bola objavená línia BKT9086, ktorá sa vyznačuje zvýšenou rezistenciou proti fuzarióze klasov a súčasne boli odhalené neznáme genetické faktory, ktoré zodpovedajú za vyššiu úroveň rezistencie proti fuzáriam (Laszlo et al. 2008).



Obr. 1: Priemerné hodnoty AUDPC moderných a starých slovenských odrôd získané po umelej infekcii hubou *F. culmorum*

Záver

Porovnanie napadnutia starých slovenských odrôd s modernými slovenskými odrodami po umelej infekcii hubou *F. culmorum* na základe AUDPC a obsahu DON ukázalo, že staré odrody boli menej napadnuté ako moderné slovenské odrody. Zistené boli pozitívne korelácie medzi AUDPC a obsahom DON ako pri starých tak i moderných pšeniciach. V súčasnosti sú tieto odrody zaradené do tretieho roku testovania. Odrody, ktoré ukázali najvyššiu úroveň odolnosti proti *F. culmorum* budú zaradené do šľachtiteľského programu pšenice.

Poďakovanie: Tato štúdia vznikla vďaka podpore v rámci OP Výskum a vývoj pre projekt: Vývoj nových typov rastlín s geneticky upravenými znakmi hospodárskeho významu ITMS: 26220220027, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

BETINA, V. 1990. Mykotoxíny chémia, biológia, ekológia. Bratislava: Vydavateľstvo Alfa, 1990. ISBN 80-05-00631-4.

LASZLO E., KARSAI I., VIDA G. BEDO Z., VEISZ O. 2008. Analysis of Fusarium head blight resistance in a Bankuti 1201/MV Magvas population using molecular tools. Cereal Research Communications. Supplement: Suppl. B 36: 289-290.

McLAUGHLIN, C.S., VAUGHAN, M.H. CAMPBELL, I.M., WEI, C.M., STAFFORD, M. E., HANSEN, B.S. 1997. 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. 1996. Toxicology of deoxynivalenol (vomitoxin). Journal of toxicology and environmental. Health 48, 1-31.

ŠLIKOVÁ, S., ŠUDYOVÁ, V., GREGOVÁ, E. 2008. Deoxynivalenol in wheat from the growing areas of Slovakia. Cereal research Communications 36: 279-287.

YU, J.B., BAI, G.H., CAI, S.B., DONG, Y.H., BAN, T. 2008. New Fusarium head blight-resistant sources from Asian wheat germplasm. Crop Science 48: 1090-1097.

Adresa autorov:
Svetlana ŠLIKOVÁ, Valéria ŠUDYOVÁ, Pavol HAUPTVOGEL, Edita GREGOVÁ: Centrum výskumu rastlinnej výroby – Výskumný ústav rastlinnej výroby, Bratislavská cesta 122, 921 68 Piešťany; email: slikova@vurv.sk

NOVÉ LÍNIE JAČMEŇA OZIMNÉHO PO PRENOSE GÉNU *RYM4*
NOVEL LINES OF WINTER BARLEY AFTER TRANSFER OF *RYM4* GENE

Valéria ŠUDYOVÁ – Martina HUDCOVICOVÁ

Barley mosaic virus complex (BaMMV, BaYMV) causes an economically important yellow mosaic disease of barley. Lines were created by classical hybridization between varieties Tiffany and Romanze as the donor of rym4 gene. Lines in F_2 and BC_3 were selected by molecular marker. By lines with working designation number 4 and 5 we recorded similar value of the thousand kernel weight (TKW) by compare with variety Tiffany. All lines are the bearers of rym4 gene in homozygous composition and would be perspective for integrated into breeding program.
Keywords: winter barley lines, BaYMV/BaMMV, molecular marker, TKW

Úvod

Významnou chorobou jačmeňa hlavne v západnej Európe a Ázii je vírusové ochorenie žltá a mierna mozaika jačmeňa (BaYMV/BaMMV). Vektorom vírusu je pôdna huba *Polymyxa graminis* Led. Vírusy prežívajú v kľudovom štádiu v pôde, literárne pramene uvádzajú zamorenie pozemku na 30 a viac rokov (Prokinová 2002). Ako hostiteľská rastlina je doteraz známy iba jačmeň. Typickým príznakmi infikovaných rastlín sú predĺžené listy s bledo zelenými alebo žltými škvrnami, pozorovanými najmä na najmladších listoch. Napadnuté rastliny tvoria menej odnoží, zrno je drobné a úroda môže byť znížená až o 30%. Chemický zásah proti chorobe je neúčinný a preto jedinou efektívnou ochranou je ochrana genetická. Odrody so zabudovanými génmi rezistencie sú vhodné najmä pre ekologické poľnohospodárstvo. Doteraz je objavených štrnásť génov s rôznym stupňom rezistencie k žltej mozaike (Hofinger et al. 2008). Veľmi účinné sú gény *rym5* a *rym11* zabezpečujúce rezistenciu proti kmeňu 2 BaYMV (Bauer et al. 1997). Vírus je nebezpečný aj tým, že má rozdielne kmene, medzi ktorými sú možné vzájomné interakcie a ľahko sa môžu objaviť nové kmene. Gén *rym4* využívali najmä v Nemecku a Francúzsku, je inkorporovaný do viacerých pestovaných 2-radových i 6-radových odrôd ozimného jačmeňa majúcich vhodné agronomické charakteristiky. Pre stabilizáciu rezistencie je vhodné kombinovanie génov do jednej šľachtiteľskej línie (Ordon et al.1999, Pellio et al. 2000, Werner et al. 2000). 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 (Ježewska 2009, nepublikované) a záznamy sú aj z Mironovského regiónu (Snihur 2008).

Cieľom práce bol vývoj nových línií sladovníckeho ozimného jačmeňa introdukciou recesívneho génu rezistencie *rym4* a po multiplikácii línií po spätnom krížení v poľných podmienkach hodnotenie niektorých úrodotvorných prvkov.

Materiál a metódy

Biologický materiál

Pre inkorporáciu génu rezistencie *rym4* bola použitá odroda Tiffany, donorom génu *rym4* bol genetický zdroj získaný z GB Gatersleben odroda Romanze. Populácie boli vytvorené klasickou hybridizáciou, nepriama selekcia F_2 sa uskutočnila molekulárnym markerom. Prítomnosť resp. neprítomnosť inkorporovaného génu rezistencie *rym4* bola overovaná v generácii F_4BC_3 a opätovne v F_6BC_3.

Multiplikácia línií

Hybridné línie boli multiplikované v poľných podmienkach v roku 2008 a 2009 na parcelke 0,45x100 cm v dvoch opakovaniach, v roku 2010 na parcelke 100x100 cm v dvoch opakovaniach. V priebehu vegetácie bola hodnotená celková zapojenosť porastu, políhavosť a výskyt listových chorôb (múčnatka trávová na jačmeni, hnedá škvrnitosť, hrdza jačmenná). V laboratórnych podmienkach bola vyhodnotená v roku 2008 výška rastlín, celková hmotnosť zrna z parcelky a hmotnosť tisíc zŕn (HTZ) porovnávaná k obom rodičom. Z týchto údajov bol vypočítaný index IUV (pomer medzi úrodou a výškou rastliny, %) a index IAV (pomer medzi HTZ a výškou rastliny, %).

Analýzy DNA

Genomická DNA bola izolovaná zo segmentov mladých listov o hmotnosti 30mg pomocou tekutého dusíka a Plant DNAzol reagentu (Invitrogen). Detekcia prítomnosti, resp. neprítomnosti génu *rym4* bola kodominantným STS markerom odvodeným z RFLP markera MWG838 majúceho blízku väzbu s týmto génom. Amplifikačné produkty boli následne štiepené restrikčným enzýmom RsaI podľa Tuvesson et al. (1998).

Elektroforetická separácia amlifikovaných segmentov prebiehala v 3 % agarózovom géli v tlmivom TBE v prítomnosti etídiumbromidu. Následná vizualizácia bola pod UV lampou.

Výsledky a diskusia

V poľných podmienkach boli testované línie jačmeňa ozimného vytvorené klasickou hybridizáciou sladovníckej 2-radovej odrody Tiffany a donorom génu rezistencie *rym4* odrodou Romanze. V roku

2007/2008 bolo v pokuse zaradených 14 línií (tab. 1). Najkratšie steblo mala línia pod pracovným označením 2V (78 cm), ale v ďalších parametroch nedosiahla hodnoty kontrolnej rodičovskej odrody Tiffany a v nasledujúcom roku bola z ďalších experimentov vyradená. Vysoká náchylnosť k listovým chorobám a nízke hodnoty HTZ a indexov IUV a IAV boli príčinou vyradenia aj línie 3V, 6V, 8V, 9V, 10V, 11V, 12V a 13V. Hodnotenie stupňa náchylnosti na múčnatku trávovú na jačmeni bolo 4 -5. Predpoklad náchylnosti na múčnatku trávovú pri zvýšenom tlaku patogéna vyplýva z náchylnosti odrody Tiffany. Najvyššiu HTZ (52,8 g) v roku 2008 dosiahla línia pod označením 1V, ale v roku 2010 bol zaznamenaný pokles o 3,8g. Porast bol zapojený, výškovo vyrovnaný. Línie, ktoré boli multiplikované v roku 2010 majú molekulárnym markerom overenú prítomnosť génu rezistencie *rym4* v homozygotnom stave (obr. 1). Celkove bol rok 2010 nepriaznivý nielen pre ozimný jačmeň vzhľadom k vývoju počasia v priebehu vegetácie (časté prívalové dažde, v čase kvitnutia nízke teploty**,** v čase dozrievania naopak vysoké teploty, zvýšený tlak patogénov), čo v konečnom dôsledku ovplyvnilo formovanie základných úrodotvorných prvkov testovaných línií. Línie pod označením 4V a 5V dosiahli v znaku HTZ aj napriek týmto nepriaznivým podmienkam úroveň odrody Tiffany (52,0g a 53,0g). Na týchto líniach je potrebné analyzovať obsah bielkovín, betaglukánu a ďalšie akostné parametre, ktoré doteraz nebolo možné vzhľadom na malé množstvo osiva komplexnejšie posúdiť. Odroda Tiffany bola registrovaná v roku 1999 ako prvá 2-radová odroda ozimného jačmeňa. Hodnotenie úrodových a kvalitatívnych parametrov v porovnaní so sladovníckou odrodou jarného jačmeňa Akcent a Tolar prebiehalo v rokoch 1999 až 2001 (Špunar et al. 2002). Porovnaním jednotlivých parametrov vyplynulo, že medzi odrodami Tiffany, Akcent a Tolar neboli výrazné rozdiely.

Na prenose génov rezistencie účinných proti BaYMV a BaMMV pracujú na viacerých pracoviskách v Českej republike (Sedláček 2008, Mařík et al. 2008), jedná sa o prenos génov *rym5* a *rym11*, hoci tu doteraz nebola zaznamenaná prítomnosť vírusového ochorenia. V Nemecku, kde je toto ochorenie rozšírené a lokality s infikovanou pôdou sú využívané ako testovacie polia pre poľné fytopatologické testy žiadna nová odroda bez prítomnosti génu rezistencie *rym4* nemôže byť registrovaná. V prospech pestovania kvalitných odrôd ozimných jačmeňov sladovníckeho typu je aj predpokladaný vývoj klímy, ktorý zhorší podmienky pre pestovanie jarných obilnín s C3 systémom fotosyntézy.

Záver

Molekulárne markery sú nástroje nepriamej selekcie znakov v šľachtiteľských populáciách, pretože majú blízku väzbu na konkrétne gény. Určenie prítomnosti markera sledovaného génu sa robí už v F_2 generácii, čo šetrí čas a počet línií, s ktorými sa bude ďalej pracovať. Cesta nepriamej selekcie je jediná možná v prípade, ak nie je k dispozícii patogén pre fytopatologické testovanie. Rozpracované línie by mohli byť perspektívnym šľachtiteľským materiálom.

Poďakovanie: Táto štúdia vznikla vďaka podpore v rámci OP Výskum a vývoj pre projekt: Vývoj nových typov rastlín s geneticky upravenými znakmi hospodárskeho významu ITMS: 26220220027, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

BAUER, E. - GRANER, A. (1995): Basic and applied aspects of the genetic analysis of the *ym4* virus resistance locus in barley. In: Agronomie, 15: 469-473.

HOFINGER, B. J. - BASS, CH. - BALDWIN, T. a kol.: Discovery of novel EIF4E alleles conferring broad spectrum resistance to bymoviruses by exploiting genetic diversity of natural barley germplsm. In: 7th IWGPVFV Symposium Quedlinburg, September 1-4, 2008, J. Kűhn – Institute, Erwin-Baur-Strasse 27, s. 25.

JEŽEWSKA, M. - TRZMIEL, K.: First report of *Barley yellow mosaic virus* infecting barley in Poland (akceptované na publikovanie apríl 2009).

MAŘÍK, P. - CHRPOVÁ, J. - PRÁŠIL, I. T. a kol. : Šlechtění ozimého ječmene na rezistenci k biotickým a abiotickým stresům.In: Šlecht. seminář 2008, Praha, 28.února 2008, s. 21-26.

ORDON, F. - SCHIMANN, A. - PELLIO, B. a kol. (1999): Application of molecular markers in breeding for resistance to the Barley yellow mosaic virus complex. In: J. Plant Dis. Protect., 106: 256-264.

PELLIO, B. - WERNER, K. - FRIEDT, W. a kol. (2000): Resistance to the barley yellow mosaic virus complex- from Mendelian genetics towards map based cloning. In: Czech J. genet. Plant Breed., 36: 84-87.

PROKINOVÁ, E. (2002): Virové onemocnění ozimého ječmene v roce 2002. In: AGRO, 7: 16-17.

SEDLÁČEK, T. (2008): Vývoj CAPS markeru rozlišujíciho alely *rym4*/*rym5* pro šlechtění ozimého ječmene na rezistenci k BaYMV. In: Nové poznatky z genet. a šľacht. poľnohosp. rastlín, zb. z 15. ved. konf., Piešťany, 2008, s. 67-70.

SNIHUR, H. - POLISCHUK, V. - BUDZANIVSKA, I. - KASTIRR, U.: Detection of cereal soil-borne viruses in agroecosystems of Ukraine. In: 7th IWGPVFV Symposium Quedlinburg, September 1-4, 2008, J.Kűhn-Institute, Erwin-Bauer Strasse 27, s .25.

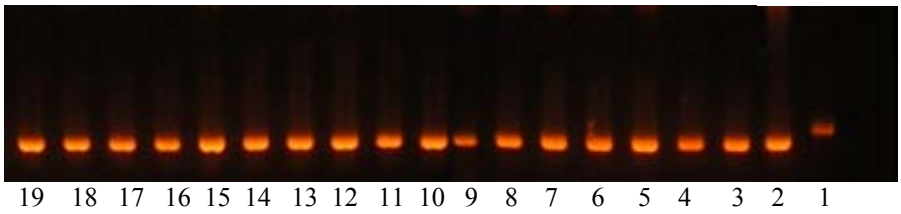
ŠPUNAR, J. - NESVADBA, Z. - OBORNÝ, J. (2002): Výnos a sladovnická kvalita odrůdy Tiffany a sladovnických jarních ječmenů. In: Obilninářske listy, 10, 2002, s. 10-12.

TUVESSON, S. - POST, L. - ÖHLUND, R. a kol. (1998): Molecular breeding for the BaMMV/BaYMV resistance gene *ym4* in winter barley. In: Plant Breeing, 117: 19-22.

Tabuľka 1: Hodnotenie línií jačmeňa ozimného v poľnom pokuse v roku 2008 a HTZ v roku 2010

Línia	Výška rastlín (cm)	Celková hmotnosť zrna (g)	Index IUV %	Index IAV %	HTZ	
					2008	2010
1V	95,0	226,3	0,23	0,56	52,8	49,0
2V	78,0	100,3	0,12	0,56	43,6	-
3V	92,5	261,9	0,28	0,49	44,9	-
4V	89,5	209,6	0,23	0,53	47,2	52,0
5V	85,5	209,1	0,24	0,53	45,1	53,0
6V	87,0	185,6	0,21	0,57	49,7	-
7V	91,0	225,3	0,24	0,51	46,7	44,3
8V	82,5	161,2	0,19	0,50	41,0	-
9V	86,0	231,6	0,26	0,50	42,9	-
10V	83,5	153,0	0,18	0,52	43,8	-
11V	84,0	199,6	0,23	0,55	45,9	
12V	86,5	163,5	0,18	0,49	42,7	-
13V	85,0	242,2	0,28	0,49	41,5	-
14V	84,5	146,6	0,17	0,55	46,4	49,1
Tiffany					51,8	52,1
Romanze					49,8	52,3

Index IUV- úroda/výška; index IAV- HTZ/výška



Obr. 1: Detekcia prítomnosti génu rezistencie *rym4* v homozygotnom stave pomocou molekulárneho PCR markera. Vzorky: 1- Tiffany, 2- Romanze, 3 – 19 línie (Tiffany x Romanze)F_4BC_3

Adresa autorov:
Ing.Valéria ŠUDYOVÁ, PhD., Mgr. Martina HUDCOVICOVÁ, PhD., Centrum výskumu rastlinnej výroby – Výskumný ústav rastlinnej výroby, Bratislavská cesta 122, 921 68 Piešťany
email: sudyova@vurv.sk, hudcovicova@vurv.sk

PREBREEDING VÝCHOZÍCH MATERIÁLŮ JEČMENE JARNÍHO S DIFERENCOVANÝM OBSAHEM PŘIROZENÝCH ŠKODLIVÝCH LÁTEK V ZRNĚ PRO ŠLECHTĚNÍ ODRŮD NESLADOVNICKÉHO TYPU
PREBREEDING OF SPRING BARLEY INITIAL MATERIALS WITH DIFFERENTIATED CONTENT OF NATURAL HARMFUL COMPOUNDS IN GRAIN FOR BREEDING OF NON-MALTING TYPE CULTIVARS

Kateřina VACULOVÁ[1] – Marta BALOUNOVÁ[1] – Jarmila MILOTOVÁ[2]

Variability in the content of natural harmful compounds with ambivalent nutritional effects in spring barley grain could be used for the development of new cultivars with increased nutritional grain quality for non-malting, feeding and/or food applications. Based on the study of initial resources and assessment of nutritionally significant compounds in grain (N-substances, starch, non-starch polysaccharides, phytate, selected phenolic acids, etc.), application of appropriate screening methods, prebreeding of new donors, characterization of vegetative, biological and agronomic traits of newly developed genotypes, bases for recommendations and further exploitation of these barley materials in breeding and research have been obtained.
Key words: spring barley, natural harmful compound, ambivalent nutritional effects, prebreeding, non-malting use of grain

Úvod

Bez ohledu na to, že doposud nejsou jednoznačně stanoveny obecně akceptovatelné požadavky na hodnotu zrna ječmene pro krmivářské využití, existuje poměrně jednoznačný názor na přítomnost látek, které mají minimální výživnou hodnotu, snižují krmnou kvalitu zrna nebo dokonce působí toxicky (Kalač a Míka 1997). Ječmen, obdobně jako další obiloviny, obsahuje celou řadu nežádoucích, přirozeně škodlivých látek, které se v zrně vyskytují jako produkty sekundárního metabolismu nebo meziprodukty základních metabolických reakcí, případně jako stavební látky buněk. K těmto látkám se řadí fytáty, neškrobové polysacharidy a celá skupina fenolických látek. Na druhou stranu ale neškrobové polysacharidy, hlavně jejich rozpustná forma, a různé skupiny polyfenolických látek působí prokazatelně příznivě v prevenci mnohých civilizačních chorob (Alvarez et al. 2006; Graf & Eaton 1993; Vaculová et al. 2000 aj.), takže pro výživu lidí jsou v rostlinných produktech naopak látkami žádoucími (Prugar et al. 2008). Jejich role je tedy ambivalentní a mění se podle toho, zda je zrno zkrmováno nebo je využito k přímé lidské výživě, tedy podle konečného spotřebitele.

Využití vhodných genetických zdrojů jako donorů výše uvedených látek je limitováno jejich nevhodnými hospodářskými vlastnostmi. Pro šlechtění nových odrůd s vysokou nutriční hodnotou a přijatelnou úrovní pěstitelsky požadovaných znaků a vlastností jsou užitečné rozšlechtěné výchozí materiály. Dílčí výsledky prebreedingu takových výchozích donorů jsou diskutovány v předloženém příspěvku.

Materiál a metody

Vybraný soubor sestavený z výchozích donorů s waxy typem škrobu (dále jen waxy se sníženým podílem polysacharidu amylózy - viz. Vaculová et al. 2006), vlastních nových linií s různým typem zrna (pluchaté vs. bezpluché) i diferencovaným obsahem polyfenolických látek, resp. nízkým obsahem fytátu (dále jen lpa) a 2 standardních (kontrolních) pluchatých sladovnických odrůd byl pěstován v letech 2008-2009 na lokalitě Kroměříž a v roce 2009 na lokalitě Žabčice. V průběhu vegetace byly porosty hodnoceny z hlediska hospodářsky významných znaků a vlastností, zejména napadení chorobami (stupnicí, kde 1= min. a 9= max. rezistence). Po sklizni byl stanoven výnos zrna (v $t.ha^{-1}$ a v % k průměru kontrol Annabell a Xanadu), přepad zrna na sítě 2,0 mm (v % a v % ke kontrolním odrůdám) a hmotnost 1000 zrn (HTZ, v g).

Výběr nových linií s perspektivou pro další využití byl proveden na základě chemických analýz, jejichž vyhodnocení je součástí publikací Běláková et al. 2010; Březinová Belcredi et al. 2010; Vaculová et al. 2010; aj. U studovaných materiálů byl sledován: obsah škrobu (v %, metodou podle Ewerse - ČSN EN ISO 10520), obsah N-látek (=6,25. N, v %, metodou podle Dumase, ICC 167), β-glukanů (BG v %, metodou FIA dle EBC 8.13.2), obsah pentozanů (v %, spektrometricky podle Douglase), obsah fytátu a fosfátu (metodou kapilární isotachoforesy dle Blatný et al. 1995), kyseliny ferulové (metodou UPLC a PDA detekcí). Screeningové kolorimetrické stanovení volného fosforu v zrně bylo provedeno podle metodiky Chen et al. (cit. Raboy, 2002 - písemné sdělení).

Ke zpracování výsledků byl použit software STATISTICA 8.0 (StatSoft, Inc., Tulsa, Oklahoma, USA).

Výsledky a diskuse

Obsahu neškrobových polysacharidů (NSP) a dalších chemických látek ve vztahu k typu zrna a typu škrobu v daném souboru genotypů je vyhodnocen v publikaci Vaculová et al. (2010). Zjistili jsme, že se skupiny nově vytvořených genotypů s bezpluchým a pluchatým zrnem vzájemně statisticky průkazně lišily obsahem všech sledovaných látek, přičemž bezpluché měly více BG, N-látek i škrobu a pluchaté více

pentozanů. Vysoký obsah pentozanů byl ve všech případech v kladné korelaci s přítomností kyseliny ferulové, která byla dominantní polyfenolickou sloučeninou v zrně ječmene (Běláková et al. 2010).

Konfrontace s výsledky hodnocení hospodářsky významných znaků ukazuje, že vybrané materiály s nejvyšším obsahem BG a pentozanů – tedy potomstva linie KM1057 a nová linie KM2619.413.4.03 patří z hlediska výnosu zrna k nejméně výkonným materiálům (Tab. 1). Jak plyne z uvedené tabulky, mezi waxy typy nových linií (tedy typy se zvýšeným obsahem BG) lze vybrat materiály, jejichž průměrný výnos zrna vůči pluchatým kontrolám je vyšší než 100%, bude ovšem nezbytné počítat s tím, že obsah NSP v zrně nebude maximální. Dílčí výsledky ukázaly, že dokonce i mezi genotypy s bezpluchým zrnem byly takové, jejichž výnos byl vyšší než v případě pluchatých standardních materiálů (například KM2642.416.4.5.03 a KM2645.355/1.03).

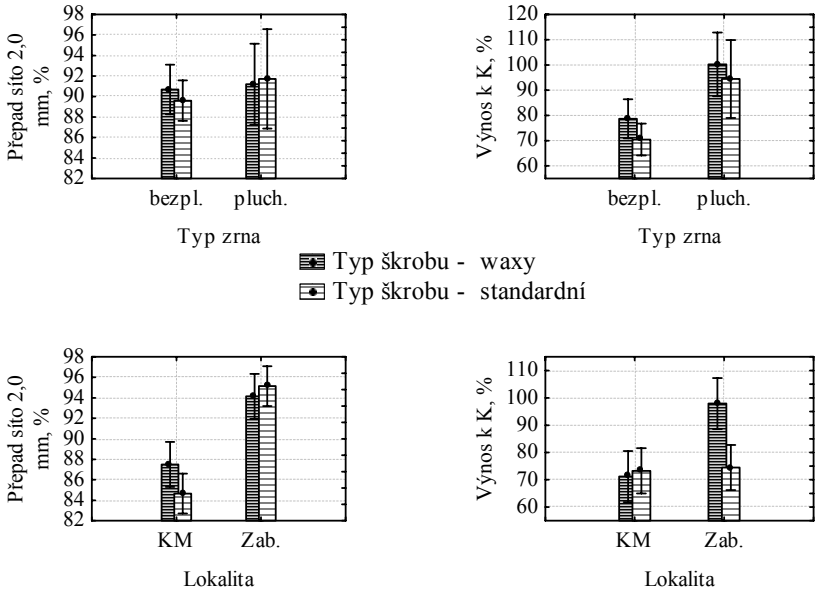
Tab. 1
Průměrné hodnoty a homogenní skupiny výnosu zrna a přepadu na sítě (Kroměříž, Žabčice 2008-2009)

odrůda, komb.	pedigree	typ zrna	typ škrobu	výnos, % ke K[1)]	HS[2)]	přepad na sítě, % ke K	HS[2)]
KM2640.411.7.2.11	No94609D7 x CDC Candle	pluch.	waxy	119,3	hi	101,6	bcdefg
KM2645.412.1.1.4.03	Nordus x CDC Candle	pluch.	waxy	118,7	hi	104,3	defg
KM2460.312.00.494.3.02	(Wabet x Washonubet) x Washonubet	pluch.	waxy	117,1	i	99,5	bcdefg
KM2666.644.05[3)]	KM2311 x M635	pluch.	stand	112,7	fghi	103,6	defg
KM2642.416.4.5.03	No94609D7 x Merlin	pluch.	waxy	111,9	fghi	100,6	bcdefg
KM2454.439.99.496.4.02-2	Wanubet x KM1057	bezpl.	stand	111,0	fghi	101,8	cdefg
KM2283	1576EMM x KM2012-2703/92	bezpl.	stand	110,4	efghi	100,9	bcdefg
KM2645.355/1.03	Nordus x CDC Candle	bezpl.	waxy	109,5	efghi	104,7	fg
KM2678.287.7.05	KM2084 x A-84/99	bezpl.	stand	109,4	efghi	97,4	abcdef
KM2645.412.1.1.1.03	Nordus x CDC Candle	bezpl.	waxy	107,9	ghi	99,3	bcdefg
KM2691.290.1.05[3)]	M422 x KM2311	pluch.	stand	107,6	defghi	104,6	efg
KM2454.439.99	Wanubet x KM1057	bezpl.	waxy	103,4	cdefghi	96,8	abcdef
KM2620.352/9.03	CDC Candle x Nordus	bezpl.	waxy	101,9	cdefghi	103,8	defg
KM2283.694/6.05	1576EMM x KM2012-2703/92	bezpl.	stand	101,8	cdefghi	103,5	defg
Xanadu		pluch.	stand	101,6	cdefghi	99,1	abcdefg
KM2283.654/4.05	1576EMM x KM2012-2703/92	bezpl.	stand	101,3	cdefghi	103,7	defg
Annabell		pluch.	stand	98,5	bcdefghi	100,9	bcdefg
KM2283.653/9.05	1576EMM x KM2012-2703/92	bezpl.	stand	96,5	bcdefghi	105,1	fg
KM2283.654/6.05	1576EMM x KM2012-2703/92	bezpl.	stand	96,3	bcdefghi	101,1	bcdefg
KM2696.648.13.0[3)]	M635 x KM2283/279skl.01	bezpl.	stand	96,1	bcdefghi	103,8	defg
KM 2084	KM1628C-23/90 x CE599	bezpl.	stand	95,7	cdefghi	101,1	cdefg
KM2646.417/2.03	Nordus x HB803	bezpl.	waxy	95,7	bcdefghi	104,9	fg
KM2642.416/5.03	No94609D7 x Merlin	bezpl.	waxy	90,7	abcdefghi	107,6	g
KM2665	KM2311 x KM1910	bezpl.	stand	89,6	abcdefghi	102,5	cdefg
KM2642.74.04	No94609D7 x Merlin	bezpl.	waxy	86,9	abcdefghi	103,2	defg
KM2640.411.7.3.12.03	No94609D7 x CDC Candle	bezpl.	waxy	84,6	abcdefghi	101,0	bcdefg
KM 1910	KM1057 x Galan	bezpl.	stand	84,6	bcdefgh	101,6	defg
Wanubet		bezpl.	waxy	83,1	abcdefghi	97,3	abcdef
KM2642.416.4.3.03	No94609D7 x Merlin	bezpl.	waxy	80,5	abcdefghi	103,9	defg
KM2645.412.5.1.12.03	Nordus x CDC Candle	bezpl.	waxy	80,4	abcdefghi	99,4	abcdefg
KM2624.102.04	HB803 x Nordus	pluch.	waxy	80,0	abcdefghi	103,3	defg
KM2551.469.1/02	HB803 x No92K0015D22	bezpl.	waxy	75,4	abcdefghi	101,2	bcdefg
KM1057-1906.223.1.05	KM1282 x Hiproly	bezpl.	stand	73,6	abcdefgh	100,6	bcdefg
KM2454.439.99.496.4.02-1	Wanubet x KM1057	bezpl.	waxy	72,0	abcdefgh	92,0	ab
KM1057-1906.224.5.05	KM1282 x Hiproly	bezpl.	stand	69,6	abcdefg	100,9	bcdefg
KM1057-1906.225.1.05	KM1282 x Hiproly	bezpl.	stand	68,7	abcdefg	97,3	abcdef
KM1057-1906-262-06	KM1282 x Hiproly	bezpl.	stand	66,7	abcdefg	94,6	abcd
KM1057-1906-257-06	KM1282 x Hiproly	bezpl.	stand	62,6	abcdef	94,9	abcde
KM2646.415/4.03	No94609D7 x HB803	bezpl.	waxy	61,8	abcde	104,7	fg
Nudimelanocrithon		bezpl.	stand	60,3	abcd	100,4	bcdefg
KM1057-1906.225.2.05	KM1282 x Hiproly	bezpl.	stand	58,4	abc	89,7	a
KM2619.413.4.03	CDC Candle x No94609D7	bezpl.	waxy	57,1	abc	95,4	abcdef
KM1057-1906.227.1.05	KM1282 x Hiproly	bezpl.	stand	54,8	abc	98,3	abcdefg
KM1057-1906.227.2.05	KM1282 x Hiproly	bezpl.	stand	50,0	ab	95,8	abcdef
Abyssinian 1139		bezpl.	stand	42,4	a	92,8	abc

[1)] - K-průměr standardních odrůd; [2)] - HS - homogenní skupiny označené odlišnými písmeny ve sloupci se průkazně liší (P<0.05); [3)] - linie se zvýšeným obsahem volného fosfátu

Uvádí se, že podstatným negativním jevem provázejícím tvorbu a selekci bezpluchého ječmene s waxy typem škrobu je nižší hmotnost obilek (Vaculová et al. 2006). Naše dílčí výsledky získané při hodnocení vybrané skupiny genetických zdrojů, nových linií a standardních odrůd ale tyto závěry nepodporují (Obr. 1). Přepad zrna na sítě u bezpluchých linií byl vyšší v případě waxy materiálů a to zejména na lokalitě Kroměříž. Zde sice linie se standardním typem zrna překonaly waxy genotypy, avšak na lokalitě Žabčice tomu bylo právě naopak. Je možné, že se na daných výsledcích podepsal suchý ročník 2009, který působil ve směru redukce celkového výnosového potenciálu. Naše zkušenosti ukazují, že v letech s méně příznivým průběhem vegetace pro růst a vývoj jarního ječmene je pokles produktivity u bezpluchého typu mnohem menší než u

ječmene s pluchatým zrnem. Výsledky naopak ukázaly, že waxy typy reagovaly dokonce lépe než genotypy se standardním složením škrobu, bez ohledu na to, zda měly bezpluché nebo pluchaté zrno.



Uvedené výsledky vyžadují potvrzení v dalších pěstebních letech. Nicméně víceleté pozorování prokazuje, že využití konkrétních donorů jako mateřského nebo otcovského formy při hybridizaci přináší odlišné výsledky, a to nejen u výnosových znaků, ale i v případě kvality zrna.

Obr. 1 - Variabilita průměrných hodnot výnosu zrna (% ke K) a přepadu zrna na sítě (%) u genotypů s waxy a standardním typem škrobu v závislosti na typu zrna a pěstební lokalitě

Hodnocení variability výnosu zrna vůči standardním odrůdám, přepadu na sítě, HTZ, obsahu NL a škrobu způsobené faktory proměnlivosti (tedy lokalitou a mateřským, resp. otcovským genotypem) ukázalo, že volba vhodného genotypu do křížení může ovlivnit všechny sledované znaky a ukazatele (Tab. 2).

Tab. 2
Vliv zdrojů proměnlivosti na variabilitu hospodářsky významných znaků a chemické složení zrna

zdroj proměnlivosti	df	MS				
		výnos zrna[1)]	přepad	HTZ	N-látky	škrob
lokalita	1	14267,0***	526,9***	37,08*	10,18**	8,56
matka	13	1649,0***	39,8**	93,29***	2,98**	55,15***
lokalita x matka	13	546,2*	71,3***	7,87	0,81	1,92
chyba	62	264,00	14,00	9,25	0,95	3,61
lokalita	1	14152,5***	544,0***	27,19	11,61***	9,05
otec	16	1542,8***	38,3**	73,00***	4,13***	47,44***
lokalita x otec	16	555,7**	60,5***	6,81	0,70	1,96
chyba	56	202,30	13,00	10,93	0,55	3,17

[1)] - viz. Tab. 1; *P≤0.5; **P≤0.01; ***P≤0.001

Zejména v případě škrobu to byl nejvýznamnější a jediný průkazný zdroj proměnlivosti. Vzájemné interakce s lokalitou se projevily jak v případě výnosu zrna, tak i podílu předního zrna, avšak specifickou kvalitu nových materiálů zřejmě nejvýrazněji ovlivňovaly genetické faktory.

V případě platnosti kladného vztahu mezi HTZ, obsahem BG a škrobu, jak uvádějí Vaculová et al. (2010), by byl reálný prebreeding genotypů s bezpluchým zrnem, standardním typem škrobu a dobrým podílem předního zrna, což naše dílčí výsledky potvrzují. Při další práci s novými liniemi je ale nutné věnovat pozornost i úrovni dalších hospodářky významných znaků, zejména odolnosti vůči nežádoucím biotickým i abiotických faktorům. Přesto, že byl vyšlechtěním série linií bezpluchého ječmene, jež mají ve svém genotypu gen rezistence vůči padlí mlo, dosažen významný posun v řešení otázky odolnosti padlí travnímu, další choroby (jako rez ječná, hnědá skvrnitost, ramulária, apod.) stále představují významné riziko při pěstování ječmene jarního.

Pro další krmné využití jsou v souboru zahrnuty i nové genotypy (viz. Tab. 1), které byly vytvořeny hybridizací s lpa donory. Jejich výběr byl proveden screeningovou kolorimetrickou metodou, která stanovuje volný anorganický fosfor v zrně (viz. např. Vaculová et al. 2003) a potvrzen analýzami obsahu fytátu a fosfátu kapilární isotachoforesou (Kvasnička 2009, písemné sdělení). I když u těchto materiálů je doposud problémem úroveň morfologické vyrovnanosti, ukazuje se, že budou dobrými výchozími zdroji pro další tvorbu krmných genotypů ječmene jarního s pluchatým i bezpluchým zrnem.

Závěr

Výsledky hodnocení úrovně hospodářsky významných znaků a vlastností nově vytvořených genotypů s variabilním obsahem přirozeně škodlivých i dalších látek zrna s ambivalentním nutričním účinkem ukázaly, že byl vytvořen soubor výchozích zdrojů, vhodných pro další šlechtitelskou nebo výzkumnou práci. Obdobně jako v klasickém šlechtění hraje i v prebreedingu donorů pro šlechtění nesladovnického ječmene roli jak volba rodičovských donorů, tak i zkušební lokalita. Přenos specifických kvalitativních vlastností je ovšem téměř výhradně genetickou záležitostí. Prebreeding donorů s geneticky determinovaným sníženým nebo naopak zvýšeným obsahem sledovaných chemických látek zlepšuje jejich potenciální využitelnost v lokálních pěstebních podmínkách a znamená významnou časovou a finanční úsporu pro šlechtění nových odrůd nesladovnického typu ječmene.

Poděkování: Tento příspěvek byl vypracovaný s využitím výsledků řešení projektů MZe-NAZV č. QH91053 a QH72251 a MŠMT - projekt MSM2532885901.

Literatura

ÁLVAREZ, P., ALVARADO, C., MATHIEU, F., JIMÉNEZ, L., la FUENTE, M. (2006): Diet supplementation for 5 weeks with polyphenol-rich cereals improves several functions and the redox state of mouse leucocytes. Eur J Nutr. 2006 December; 45(8): 428–438.

BĚLÁKOVÁ, S., MIKULÍKOVÁ, R., SVOBODA, Z. (2010): Sledování změn obsahu ferulové kyseliny v pivovarských surovinách metodou UPLC a PDA detekcí. Kvasný průmysl: Journal for Brewing, Malting & Beverage Industry, 56, 2010, 6: 266-269.

BLATNÝ, P.; KVASNIČKA, F., KENNDLER, E. (1995): Determination of Phytic Acid in Cereal Grains, Legumes and Feeds by Capillary Isotachophoresis, J. Agric. Food Chem., 43, 129 – 133, 1995.

BŘEZINOVÁ BELCREDI, N., EHRENBERGEROVÁ, J., BĚLÁKOVÁ, S., VACULOVÁ, K. (2010): Variability of arabinoxylans in spring barley grain. Proceedings of the 5th International Congress Flour - Bread `09, 7th Croatian Congress of Cereal Technologists : Opatija, October 21-23, 2009 / Review Editor: Žaneta Ugarčič-Hardi, Osijek 2010: 198-203.

GRAF, E., EATON, JW. (1993): Suppression of colonic cancer by dietary phytic acid. Nutr Cancer. 1993;19(1):11-9.

KALAČ, P., MÍKA, V. (1997: Přirozené škodlivé látky v rostlinných krmivech, ÚZPI Praha, 1997, 316 s.

PRUGAR, J. et al. (2008): Kvalita rostlinných produktů na prahu 3. tisíciletí, VÚPS 2008: 326 s. ISBN 978-80-86576-28-0.

VACULOVÁ, K., EHRENBERGEROVÁ, J., POUCH, M. (2008): Breeding of waxy barleys using molecular markers. In: Cereal Science and Technology for Feeding Ten Billion People. Genomic Era and Beyond. Proceedings to the Meeting of the Eucarpia Cereal Section, Lleida (Spain), 13-17 November 2006, Eds.. J.L. Molina Cano et al, Zaragoza, CIHEAM 2008, 289-293. ISBN. 2-85352-404-3, ISSN. 1016-121X. Options méditerranéennes, SERIE A. Séminaires Méditerranéens, Numéro 81.

VACULOVÁ, K., POLÁKOVÁ K., POLIŠENSKÁ I. (2003): Šlechtění obilovin na snížený obsah fytátů v zrně – alternativní cesta ke zlepšení využitelnosti fosforu (Breeding cereals for a reduced phytate content in grain – an alternative way toward improvement of phosphorus availability). Nové poznatky z genetiky a šl´achtenia pol´nohospodárskych rastlín. Piešťany 2003, ISBN 80-88790-29-8, 49-52.

VACULOVÁ, K., EHRENBERGEROVÁ, J., PSOTA, V., HAVLOVÁ, P., ŠPUNAROVÁ, M. (2000): Variability of β-glucan in early generations of barley hybrids, Mendel Centenary Congress, 5. GPZ-Tagung, March 7-10, 2000, Brno, Czech Republic, Poster Abstracts, Vorträge für Pflanzenzüchtung, 47, 2000: 149.

Kontaktní adresy autorů
Kateřina Vaculová, Marta Balounová – Agrotest fyto, s.r.o., Havlíčkova 2787/121, 767 01 Kroměříž, Česká republika
Jarmila Milotová – Zemědělský výzkumný ústav Kroměříž, s..r.o., Havlíčkova 2787, 767 01 Kroměříž, Česká republika

HODNOTENIE TERMOSTABILITY STARÝCH A NOVÝCH ODRÔD PŠENICE LETNEJ FORMY OZIMNEJ (*TRITICUM AESTIVUM* L.) A JEJ DIVOKO RASTÚCICH PREDCHODCOV
THERMOSTABILITY ASSESSMENT OF OLD LANDRACES AND NEW GENOTYPES OF WINTER WHEAT (*TRITICUM AESTIVUM* L.) AND ITS WILD-GROWING ANCESTORS

Andrea VALIGUROVÁ – Marián BRESTIČ

The temperature is a significant abiotic environmental factor, which negatively influences protection mechanisms of plants in its natural ecosystems. The aim of the work was to determine thermal limits of photosynthesis in 23 winter species of Triticum and Aegilops landraces, which were cultivated in the field conditions of CVRV Piešťany, Slovak republic. We devided this species to 3 groups: 1st wild-growing relatives of wheat, 2nd old slovak original varieties of wheat and 3th new slovak and foreign varieties of wheat. In laboratory conditions were the leaf segments exposed to graded temperatures (38 °C and advanced), 30 minutes on each centigraded level. Before and after exposure measurements of fast chlorophyll a fluorescence kinetics were made with fluorimeter Handy Pea (Hansatech, GB). Results have proved evident differences in thermostability of photosynthetic apparatus between the measured species and ecotypes, which could be addition in improvement process for more ecostabile wheat genotypes against climatic fluctuation demonstrative in latter centuries.
Key words: Aegilops L., Triticum L., thermotolerance, high temperature effect, photosynthetic performance

Úvod

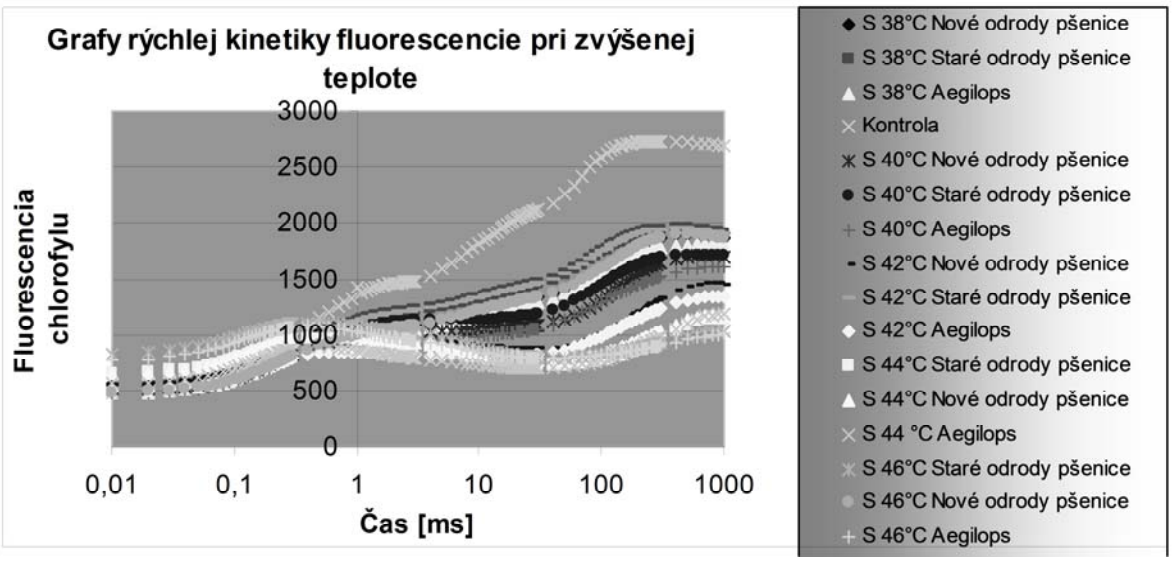
Vysoké teploty môžu poškodiť fotosyntetický aparát na rôznych štrukturálnych úrovniach. Niektoré poznatky poukazujú na citlivosť, napr. fotosystému II (PS II), resp. fotosystému I (PS I), na úrovni prenášačov elektrónov, aktivity Calvinovho cyklu a pod. (Sharkey 2005). V poslednom čase bolo publikované množstvo prác konštatujúcich zvýšenú citlivosť kyslík uvoľňujúceho komplexu, tzv. OEC, na donorovej strane PSII (Yamane et al. 1998). Vysoká teplota môže taktiež viesť k rôznym funkčným poruchám, napr. k fyzikálnej separácii svetlo zberného komplexu (LHCII) z jadrového komplexu PSII. Cieľom našej práce bolo zhodnotiť termálnu stabilitu fotosyntetického aparátu starých a nových odrôd pšenice letnej formy ozimnej a jej divoko rastúcich predchodcov druhu *Aegilops* po exponovaní zvýšeným teplotám.

Materiál and metódy

Fotosyntetické reakcie na vysoké teploty boli študované na 23 kultivovaných genotypoch ozimín (10 nových odrôd a 5 starých odrôd pšenice letnej formy ozimnej (*Triticum aestivum*) a 8 odrôd jej divoko rastúcich predchodcov druhu *Aegilops*, s očakávaním, že niektoré budú relatívne citlivé k vysokým teplotám a niektoré z nich relatívne termotolerantné. Merania boli realizované metódu rýchlej kinetiky fluorescencie chlorofylu *a* (Handy Pea, Hansatech, GB), aplikáciou tzv. OJIP testu (Strasser et al. 2000). Listové segmenty boli exponované na vysoké teploty (38-40-42-44-46 °C), 30 minút na každej teplotnej úrovni. Segmenty listov boli adaptované na tmu, merania rýchlej kinetiky fluorescencie boli realizované pred a po expozícii každej teplotnej úrovni (38 °C a vyššie). Merania na všetkých teplotných úrovniach boli zopakované štyrikrát s tromi opakovaniami na každej odrode na kontrolných a stresovaných listoch.

Výsledky a diskusia

Zvýšenie listovej teploty a fotosyntetickej hustoty prúdenia fotónov ovplyvňuje termotolerančné prispôsobenie PSII, naznačuje potenciál optimalizovať fotosyntézu počas meniacich sa environmentálnych podmienok tak dlho, až kým nie sú dosiahnuté termálne limity (Salvucci and Crafts- Brandner, 2004; Marchand et al. 2005). Z mnohých publikovaných prác vyplýva, že PSII je vysoko termolabilný a jeho aktivita je veľmi redukovaná alebo čiastočne zastavená počas vysokých teplôt (Camejo et al., 2005). Teplotný stres môže viesť k disociácii kyslík uvoľňujúceho komplexu (OEC-Oxygen Evolving Complex), vyplývajúc z porušenia rovnováhy medzi elektrónovým tokom z OEC na stranu akceptora PSII v smere reakčného centra PSI (De Ronde et al., 2004), čo sa prejavuje zvýšením hodnôt minimálnej fluorescencie (F_0). Tieto zmeny boli sledované taktiež pri našich pokusných meraniach fluorescencie chlorofylu *a* pri jednotlivých teplotných stupňoch od 38 °C po 46 °C (Obr. 1).



Obr. 1: Analýza kinetiky fluorescencie chlorofylu *a* (OJIP – test) kontrolných a teplom stresovaných rastlín *Triticum* a *Aegilops*

Z obrázku 1 vyplýva, že vysoká teplota významne ovplyvnila primárne procesy fotosyntézy. Merania uskutočnené už pri 38 °C teplotách ukázali na inhibíciu kyslík uvoľňujúceho komplexu (OEC). Pri 40 °C je možno vidieť výraznejšiu separáciu časti svetlo zberného komplexu z PSII pokles maximálnej fotochemickej efektívnosti PSII (finálny bod priebehu fluorescencie chl *a* v čase 1000 ms). Vyššie teploty (42, 44 a 46 °C) spôsobili výraznejšiu inhibíciu primárnych fotosyntetických procesov. Medzi novými a starými odrodami pšenice boli nepreukazné rozdiely; nové odrody však dokázali lepšiu termotoleranciu ako staré odrody pšenice. Na základe predbežných výsledkov môžeme predpokladať, že druh *Aegilops* má o niečo lepšiu termotoleranciu ako druh *Triticum*. Potvrdzujú to aj ďalšie nepublikované výsledky kvantifikácie maximálnej fotochemickej efektívnosti PS II (*Fv/Fm*), ako aj na tzv. nulovej fluorescencii (F_0). Tieto sa ukazujú ako vhodné parametre pre determináciu vplyvu teplotného stresu a rozdielov v termostabilite fotosyntetického aparátu.

Záver

Výsledky preukázali rozdiely v termostabilite fotosyntetického aparátu medzi meranými druhmi a ekotypmi. Tieto výsledky by mohli prispieť k výberu vlastností použiteľných v šľachtiteľských programoch pre zlepšovanie tolerancie pšenice voči abiotickým stresom a tvorbu ekostabilnejších genotypov voči stále meniacim sa podmienkam prostredia.

Poďakovanie: Práca bola podporená projektom VEGA 1/0807/09 a projektom APVV-0770-07

Literatúra

CAMEJO, D., RODRIGUEZ, P., MORALES, M.A., DELL'AMICO, J.M., TORRECILLAS, A., ALARCON, J.J. (2005). High temperature effects on photosynthetic activity of two tomato cultivars with different heat susceptibility. In *J. Plant Physiol.*, 2005, 162, 281–289.

DE RONDE, J.A.D., CRESS, W.A., KRUGER, G.H.J., STRASSER, R.J., STADEN, J.V. (2004). Photosynthetic response of transgenic soybean plants containing an *Arabidopsis P5CR* gene, during heat and drought stress. In *J. Plant Physiol.*, 2005, 61, 1211–1244.

MARCHAND, F.L., MERTENS, S., KOCKELBERGH, F., BEYENS, L., NIJS, I. (2005). Performance of high arctic tundra plants improved during but deteriorated after exposure to a simulated extreme temperature event. In *Global Change Biol.,* 2005, 11, 2078–2089.

SALVUCCI, M.E., CRAFTS-BRANDNER, S.J. (2004). Inhibition of photosynthesis by heat stress: the activation state of Rubisco as a limiting factor in photosynthesis. In *Physiol. Plant.*, 2004, 120, 179–186.

SHARKEY, T.D. (2005). Effects of moderate heat stress on photosynthesis: importance of thylakoid reactions, rubisco deactivation, reactive oxygen species, and thermotolerance provided by isoprene. In *Plant, Cell and Environment*, 2005, 28, 269–277.

STRASSER, R.J. – SRIVASTAVA, A. – TSIMILLI-MICHAEL, M. (2000). The fluorescence transient as a tool to characterise and screen photosynthetic samples. In *Probing Photosynthesis Mechanisms, Regulation and Adaptation.* London and New York: Taylor and Francis, 2000, 25, 445-483.

YAMANE, Y., Y. KASHINO, H. KOIKE, & SATOH K. (1998). Effects of high temperatures on the photosynthetic systems in spinach: oxygen-evolving activities, fluorescence characteristics, and the denaturation process. In *Photosynthesis Research*, 1998, 57, 51–59.

Adresa autorov: Ing. Andrea Valigurová, prof. Ing. Marián Brestič, CSc., SPU, FAPZ, Katedra fyziológie rastlín, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovensko, e-mail: Andrea.Valigurova@uniag.sk, Marian.Brestic@uniag.sk

MOLEKULÁRNÍ MARKERY PRO HMW PODJEDNOTKY GLUTENINŮ U TRITIKALE
MOLECULAR MARKERS FOR HMW GLUTENIN SUBUNITS IN TRITICALE

Tomáš VYHNÁNEK[1] – Eva HALOUZKOVÁ[1] – Petr MARTINEK[2]

The allele constitution for high-molecular-weight (HMW) glutenin subunits was analysed in 15 genotypes of winter triticale (varieties and breeding lines). Amplified DNA frangments of HMW glutenin subunits Glu-1 alleles were separated by agarose slab-gel electrophoresis. Differences among all three alleles at the locus Glu-A1 (1a, 1b and 1c) were found by primers PS1 – PS3. Five allelic combinations (1a+2o, 1a+2s, 1a+2z, 1b+2a and 1b+2o) were detected at the locus Glu-B1 by pimers PS4 – PS7. The allele Glu-D1d (HMW subunits 5+10 – marker good bread-making quality) was detected in breeding lines that carried translocations of segments of wheat chromosome 1D to rye chromosome 1R only. We would like to optimise allele-specific DNA markers for detection of alleles for good bread-making quality. The identifocation of wheat Glu-1 alleles using DNA markers can be used for early marker-assisted selection (MAS) of triticale genotypes with good bread-making quality
Key words: triticale, HMW glutenin subunits, Glu-1, DNA markers

Úvod

Standardně vyskytující se odrůdy tritikale nejsou vhodné pro pekárenské zpracování. V posledních deseti letech byly nalezeny donory a geneticko-šlechtitelské postupy, které by mohly umožnit zásadní zlepšení technologických parametrů zrna tritikale a tím přispět k rozšíření jeho využitelnosti v potravinářském průmyslu (Matějková et al. 2009). Z tohoto důvodu se domníváme, že je důležité zabývat se šlechtěním tritikale a výzkumem jeho gluteninových alel, které jsou zodpovědné za technologickou jakost zrna.

V rámci šlechtitelského programu tritikale na pekařskou kvalitu roste význam selekčních metod umožňujících predikci technologické kvality. Mezi tyto metody patří polyakrylamidová elektroforéza zásobních proteinů obilky (SDS-PAGE a A-PAGE) (Payne & Lawrence 1983), případně jejich chromatografické stanovení (RP-HPLC) (Wieser et al. 1998) a kapilární elektroforéza (Bean & Lookhard 2000). Stále více se rozvíjí i aplikace molekulárních markerů na úrovni polymorfizmu DNA (Salmanowicz a Dylewicz 2007).

Cílem práce bylo pomocí molekulárních (DNA) markerů charakterizovat alelické složení lokusu *Glu-1* u vybraných genotypů tritikale.

Materiál a metody

Identifikace alel lokusu *Glu-1* determinující HMW podjednotky gluteninů byla stanovena u 15 genotypů tritikale (tab. 1). Směsné vzorky osiva byly získány z firmy Agrotest fyto, s.r.o. Kroměříž. Pro molekulární analýzy byla genomická 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 zjištěna spektrofotometricky (Picodrop). Pro detekci jednotlivých alel lokusu *Glu-1* byly použity primerové kombinace PS1 až PS7 (Lafianrda et al. 1997; De Bustos et al. 2000). Reakční směs o celkovém objemu 25 μl obsahuje 30 ng templátové DNA, 0,5 U Taq polymerázy (Promega, USA). 1x odpovídající pufr, 7,5 μM každého primeru a 0,1 mM každého dNTP. Teplotní a časový profil vycházel z práce Salmanowicz a Dylewicz (2007). Pro primerovou kombinaci PS3 byla optimalizována teplota annelingu (nasedání primerů) (Vyhnánek et al. 2009). Elektroforetická separace probíhala na 1-1,5 % agarosovém gelu (barvení ethidium bromidem) a výsledné produkty byly srovnány s velikostními standardy.

Tabulka 1: Analyzované genotypy tritikale

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 diskuze

U většiny analyzovaných genotypů (86,7 %) byla detekována alela *Glu-1Ab* (kódující Glu-1Ax2*) (tab. 2). Výjimkou byly odrůdy Pawo s alelou *Glu-1Aa* (Glu-1Ax1) a odrůda Leontino s alelou *Glu-1Ac* (Glu-1AxNull). V případě odrůdy Palomino byly v různých izolacích detekovány dvě různé alely. Jednalo se o alely *Glu-A1b* a *Glu-1Ac*. Využití směsných vzorků pro izolaci genomické DNA neumožňuje konstatovat zda se jedná o příměs cizího genotypu nebo o heterozygotní konstituci. Pro tyto účely by byla nutná analýza z jednotlivých rostlin. Největší zastoupení v lokusu *Glu-B1* měla alela *Glu-B1a+2s* (60 %), která kóduje bílkovinné HMW podjednotky Glu Bx7+By18*. Dále byly detekovány alely *Glu-B1a+2z* (x7+y20*), *Glu-B1a+2o* (x7+y8*), *Glu-B1b+2a* (x7*+y8), a *Glu-B1b+2o* (x7*+y8*). Stejných výsledků u odrůd Baltiko a Pawo dosáhli Salmanowicz a Dylewicz (2007). Alela *Glu-D1d* (s HMW podjednotkami 5+10) byla detekována pouze u šlechtitelských linií z Kroměříže. Vyznačují přítomností translokovaných segmentů z 1D v chromosomech 1R.

Tabulka 2: Alelické složení v lokusu *Glu-1*

Genotyp	Alely v lokusu *Glu-1*		
	Glu-A1	*Glu-B1*	*Glu-D1*
Agrano	*b*	*1a+2o*	-
Baltiko	*b*	*1a+2s*	-
Benetto	*b*	*1a+2z*	-
Leontino	*c*	*1a+2s*	-
Madilo	*b*	*1a+2z*	-
Mungis	*b*	*1a+2o/2a*	-
Nazaret	*b*	*1a+2s*	-
Palomino	*b/c*	*1b+2a*	-
Pawo	*a*	*1b+2o/2a*	-
SW Talentro	*b*	*1a+2s*	-
V2-18-08	*b*	*1a+2s*	*d*
V2-36-08	*b*	*1a+2s*	*d*
V2-45-08	*b*	*1a+2s*	*d*
V3-6-08	*b*	*1a+2s*	*d*
V3-41-08	*b*	*1a+2s*	*d*

Závěr

Jsou identifikovány alely lokusu *Glu-1* pro vysokomolekulární bílkovinné (HMW) podjednotky gluteninů u 15 genotypů tritikale. U běžných odrůd tritikale s kompletním žitným genomem jsou zpravidla přítomny pouze HMW gluteninové alely na chromosomech 1A a 1B, přičemž chromosom 1R nese sekalinové lokusy (*Sec-1* a *Sec-3*), které jsou spojovány s obtížnou využitelností tritikale pro pekařské účely. Linie s translokacemi chromosomu 1R obsahující alelu *Glu-D1d* se projevují přítomností podjednotek 5x+10y, které jsou markerem výborné pekařské jakosti u pšenice. Dobrá znalost jednotlivých gluteninových a sekalinových alel u tritikale a jejich dílčího vlivu na pekařskou jakost alel (gluteninové skóre) může být cíleně využita ke šlechtitelskému zlepšování pekárenských vlastností tritikale.

Poděkování: Práce vznikla za finanční podpory Ministerstva školství mládeže a tělovýchovy České republiky MSM2532885901.

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.
LAFIANDRA, D., TUCCI, G.F., PAVONI, A., TURCHETTA, T., MARGIOTTA, B. (1997) Theor. Appl. Genet., *94*: 235-240.
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.
VYHNÁNEK, T., HALOUZKOVÁ, E., MARTINEK, P. (2009) In. Nové poznatky z genetiky a šlachtenia poľnohospodarskych rastlín, VÚRV Piešťany, 137-138.

Kontaktní adresa autorů:
Ing. Tomáš Vyhnánek, Ph.D., Eva Halouzková, [1]Ústav biologie rostlin, Agronomická fakulta, Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika, e-mail: vyhnanek@mendelu.cz, e.halouzkova@seznam.cz; Ing. Petr Martinek, CSc., [2]Agrotest fyto, s.r.o. Kroměříž, Havlíčkova 2787/121, 767 01 Kroměříž, Česká republika, e-mail: petr.martinek@vukrom.cz

VÝBER SLOVENSKÝCH ODRÔD PŠENÍC VHODNÝCH PRE PRENOS GLUTENÍNOVÝCH ALEL
SELECTION OF SLOVAK WHEAT GENOTYPES CONVENIENT FOR TRANSFER OF GLUTENIN ALLELS

Katarína ZIRKELBACHOVÁ – Soňa GAVURNÍKOVÁ – Pavol HAUPTVOGEL

Wheat quality depends on protein composition and grain protein content. High molecular weight glutenin subunits (HMW-GS) play an important role in determining the viscoelastic properties of gluten. The aim of our study was evaluate 11 slovak wheat genotypes for technological quality and select genotypes convenient for transfer of glutenin allels with unknown effect. Slovak wheat genotypes convenient for transfer of glutenin allels are Bona Dea and IS Karpatia (the most high technological quality, class E and strong flour) and genotypes Pavlina and Venistar (class B, weak flour).
Key words: wheat, slovak wheat genotypes, technological quality, farinograf

Úvod

Glutenínové bielkoviny tvoria 35-40% bielkovín pšeničnej múky. HMW-GS sú tvorené z podjednotiek s vysokou relatívnou molekulovou hmotnosťou ($M_r > 10^6$), stabilizovaných medzimolekulovými disulfidickými väzbami. HMW-GS sú významné z hľadiska ich vzťahu k pekárskej kvalite múky. Sledovaním vzťahu jednotlivých HMW-GS a pekárskej kvality pšenice bolo zistené, že existuje medzi nimi súvislosť. Zásadný vplyv na kvalitu múky má aj kvalitatívne zastúpenie jednotlivých HMW-GS a ich kombinácie. Kolster et al. (1991) tvrdí, že HMW-GS zodpovedajú za 20% celkovej variability objemu bochníka. Podľa tých istých autorov k variabilite objemu bochníka prispieva epistatický efekt lokusu *Glu-1*, teda vplyv alelickej variability v lokusoch *Glu-1A* a *Glu-1B* závisí od prítomnosti alel lokusu *Glu-1D*.

Cieľom našej práce bolo zhodnotiť technologickú kvalitu slovenských odrôd pšenice a vybrať vhodné slovenské genotypy pre prenos glutenínových alel s neznámym efektom.

Materiál a metódy

Na hodnotenie technologickej kvality sme použili 11 slovenských odrôd pšenice letnej formy ozimnej (*Triticum aestivum* L.) – Alacris, Astella, Bona Dea, Genoveva, Ilona, IS Karpatia, Markola, Pavlina, Šarlota, Torysa, Venistar. Kvalitatívne parametre boli stanovené podľa nasledovných metód: objemová hmotnosť podľa STN 46 1011 časť 5, obsah dusíkatých látok (Nx5,7) spektrofotometricky (NIRSystem 6500, Silver Spring, MD), obsah mokrého lepku a napúčavosť podľa STN 46 1011 časť 9, sedimentačný index, Zelenyho test podľa STN ISO 5529, číslo poklesu podľa STN ISO 3093, farinografické ukazovatele (väznosť vody, vývin cesta, stabilita cesta, mäknutie cesta po 10 min., mäknutie cesta po 12 min., číslo kvality) podľa ICC– Standard Nr. 115/1. Ukazovatele, ktoré sú súčasťou normy STN 46 1100-2: Zrno potravinárskej pšenice letnej, sme porovnávali s minimálnymi, resp. maximálnymi hodnotami pre jednotlivé spôsoby využitia.

Výsledky a diskusia

Tabuľka 1 uvádza namerané základné technologické parametre. Podľa STN 46 1100-2: Zrno potravinárskej pšenice letnej zrno potravinárskej pšenice letnej zaraďujeme do 4 tried kvality:
E – elitná, A – štandardná, B – ustanovuje minimálne požiadavky na kvalitu pre intervenčný nákup pšenice, P – pečivárenská.

Na základe nami získaných hodnôt do triedy kvality E môžeme zaradiť odrody Bona Dea a IS Karpatia. Triedou kvality A sa vyznačovali 4 odrody (Alacris, Genoveva, Ilona, Markola) a triedu kvality B vykazovali odrody Astella, Pavlina, Šarlota, Torysa, Venistar.

Z hľadiska farinografických ukazovateľov odrody Ilona a IS Karpatia môžeme priradiť k silným múkam, odrody Alacris a Bona Dea sa vyznačovali hraničnými hodnotami medzi strednou a silnou múkou a k slabým múkam môžeme priradiť odrody Pavlína a Venistar. Tabuľka 2 uvádza namerané hodnoty farinografických ukazovateľov.

Silná múka je taká, ktorá pri spracovaní na cesto viaže veľké množstvo vody, optimum svojich fyzikálnych (reologických) vlastností dosahuje pomaly, cesto si dobre uchováva svoj pôvodný tvar (nerozplýva sa). Opakom je múka slabá, ktorá má menšiu väznosť, rýchlo dosahuje optimum, ale ho aj rýchlo stráca. Výrobok má sklon k rozplývaniu, senzorické vlastnosti sú často nevyhovujúce (Hampl & Příhoda 1985).

Záver

Na základe zhodnotenia technologickej kvality analyzovaných 11 slovenských odrôd pšenice letnej, odporúčame pre prenos glutenínových alel s neznámym efektom použiť odrody Bona Dea, IS Karpatia, ktoré sa vyznačujú triedou kvality E a patria k silným múkam a naopak pre porovnanie sú vhodné pre prenos

glutenínových alel s neznámym efektom odrody Pavlina a Venistar, ktoré sa vyznačujú triedou kvality B a patria k múkam slabým (nízka väznosť vody, krátky čas vývinu cesta, nízke číslo kvality).

Tabuľka 1: Základné technologické parametre hodnotených slovenských odrôd pšenice

Odroda	Objemová hmotnosť [g/l]	Obsah bielkovín [%]	Mokrý lepok v sušine [%]	Napúčavosť lepku [ml]	Sedimentačný index podľa Zelenyho [ml]	Číslo poklesu [s]	Trieda kvality podľa STN 46 1100-2
Alacris	783	12,0	30,8	7	45	338	A
Astella	771	11,4	27,7	7	35	272	B
Bona Dea	789	12,8	34,1	6	42	333	E
Genoveva	795	11,9	29,0	5	30	291	A
Ilona	786	11,7	29,2	7	40	344	A
IS Karpatia	798	12,6	32,1	7	50	350	E
Markola	777	12,2	27,6	7	35	252	A
Pavlina	784	11,1	26,6	5	24	299	B
Šarlota	789	11,5	27,4	6	32	326	B
Torysa	736	11,1	26,2	6	26	319	B
Venistar	795	10,9	26,3	5	24	322	B

Tabuľka 2: Farinografické hodnoty slovenských odrôd pšenice

Odroda	Väznosť vody [%]	Vývin cesta [min]	Stabilita cesta [min]	Mäknutie cesta po 10 min.od začiatku testu [FJ]	Mäknutie cesta po 12 min.od dosiahnutia maxima [FJ]	Farinogr. číslo kvality	Sila múky podľa Farinografu
Alacris	60,1	3,9	5,6	44	68	78	stredná/silná
Astella	54,9	2,5	5,6	49	68	69	stredná
Bona Dea	60,8	3,8	3,9	52	80	70	stredná/silná
Genoveva	60,8	3,9	3,5	74	118	64	stredná
Ilona	59,0	4,2	5,1	43	63	80	silná
IS Karpatia	60,4	4,4	5,7	40	63	85	silná
Markola	56,3	2,2	3,9	77	95	54	stredná
Pavlina	53,1	1,2	1,3	110	120	21	slabá
Šarlota	53,7	1,4	4,3	66	76	56	stredná
Torysa	61,0	2,0	2,4	100	113	40	stredná
Venistar	52,9	1,4	1,8	87	101	28	slabá

Poďakovanie: Táto štúdia vznikla vďaka podpore v rámci OP Výskum a vývoj pre projekt: Vývoj nových typov rastlín s geneticky upravenými znakmi hospodárskeho významu ITMS: 26220220027, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

HAMPL, J. – PŘÍHODA, J.: Cereální chemie a technologie II. Praha: SZN, 1985. 248 s.
KOLSTER P. - VAN EEUWIJK, F. A. - VAN GELDER, W. M. J.: Additive and epistatic effects of allelic variation at the high molecular weight glutenin subunit loci in determining the bread-making quality of breeding lines of wheat. Euphytica, 55, 1991, s. 227-285
STN 46 1100-2 Potravinárske obilniny: Časť 2: Zrno potravinárskej pšenice letnej. SÚTN, Bratislava, 2003, s.8

Adresa autorov:
Ing. Katarína Zirkelbachová, Ing. Soňa Gavurníková, Ing. Pavol Hauptvogel, PhD., Centrum výskumu rastlinnej výroby Piešťany, Výskumný ústav rastlinnej výroby, Bratislavská cesta 122, 921 68 Piešťany
e-mail: zirkelbachova@vurv.sk, gavurnikova@vurv.sk, hauptvogel@vurv.sk

HODNOTENIE POPULÁCIÍ PŠENICE LETNEJ F. OZIMNÁ PRE TVORBU DIHAPLOIDOV
EVALUATION OF WINTER WHEAT POPULATIONS FOR DIHAPLOID PRODUCTIONS

Alžbeta ŽOFAJOVÁ – Jozef GUBIŠ – Marcela GUBIŠOVÁ – Štefan MASÁR – Katarína BOJNANSKÁ – Michaela HAVRLENTOVÁ

Grain yield formation traits in 8 F3 and F4 winter wheat populations (as donor plants for anther culture) were evaluated in the field experiment in 2009/10. Due to high within population variability mainly in plant height and awns, positive selection was recommended before in vitro technique application. By simple rapid test, plants with grain colour comparable to control cultivar Indigo (purple pericarp) were detected.
Key words: grain yield formation traits, grain colour, anther culture

Úvod

Tvorba dihaploidných línií technikou peľnicových kultúr po spontánnom alebo indukovanom zdvojení chromozómov je rýchlou metódou pre získanie homozygotných línií v šľachtiteľských programoch pšenice. Proces šľachtenia sa stáva efektívnejším a skracuje sa doba pri oziminách o 3 až 7 rokov (Tuvesson et al. 2007). Ako donorové sú odporúčané selektované rastliny počnúc generáciou F2 (Pauk et al. 2003). Cieľom výberov je eliminovať negatívne faktory ako sú najmä výška a náchylnosť na choroby. Preto v závislosti od rodičovských odrôd a od nutnosti negatívnej selekcie v skorých generáciách po krížení ako vhodnými pre tvorbu dihaploidov sa javia aj generácie F3 a F4.

Cieľom výskumu bolo zhodnotiť populácie pšenice letnej f. ozimná v základných úrodotvorných znakoch a vo farbe zrna a technikou peľnicových kultúr získať dihaploidy.

Materiál a metódy

Vo vegetácii 2009/10 sme v poľnom pokuse bez opakovania hodnotili 8 populácií pšenice letnej f. ozimná generácií F3 (6 populácií) a F4 (2 populácie), ktoré pochádzali zo šľachtiteľského programu z VŠS Vígľaš-Pstruša, ktorý je zameraný na tvorbu farebného zrna. V priebehu vegetácie sme pozorovali bežné fenologické znaky, z ktorých uvádzame základné úrodotvorné znaky, ktoré sme zistili rozborom klasov. Jednotlivé populácie boli nevyrovnané vo výške porastu a v ostitosti klasov. Zber klasov a následné rozbory a analýzy sme uskutočnili podľa tried znakov a ich kombinácií (rastliny – vysoké, nízke, klasy – ostinaté, bezostinaté) (tab. 1). Vytvorili sme „subpopulácie“ s 20 až 30 klasmi. Pre získanie dihaploidov technikou peľnicových kultúr sme využili postup podľa Pauk et al. (2003). Farbu zrna sme stanovili pomocou rýchleho testu, ktorý publikovali Ram et al. (2002), pričom ako referenčné odrody sme použili Indigo (purpurová farba zrna) a Heroldo (biela farba zrna). Subjektívne hodnotenie farby bolo v rozsahu 1 (Heroldo) až 9 (Indigo).

Výsledky a diskusia

Vzhľadom na diverzifikované rodičovské odrody väčšina populácií bez ohľadu na generáciu bola nevyrovnaná vo výške a pri 4 populáciách sa vyskytovali klasy ostinaté a bezostinaté (tab. 1). Populáciu F3 pod označením 111 sme podľa farby zrna ešte pred sejbou rozdelili do dvoch kategórií a pod číslom 1 je vedená populácia, ktorá pochádzala zo zrna svetlejšej farby a pod 2 tmavšej farby (na základe vizuálneho posúdenia). Pri populáciách, ktorých rastliny mali rozdielnu len výšku sa variačné rozpätie pohybovala od 7 cm (F3 48) do 31 cm (F4 7). Naopak, pri ďalšej populácii F4 8 bol rozdiel vo výške rastlín iba 9 cm, čo bolo očakávané, vzhľadom na generáciu šľachtenia. Rastliny s výškou menej ako 100 cm bolo možné selektovať z populácií F3 48, F3 52 a F4 7. Výška rastlín je vo väzbe s produktivitou zrna, čo sa potvrdilo aj pri hodnotených populáciách – vysoké rastliny mali vyšší počet a hmotnosť zŕn na klas. Najvyššia diferencia v počte zŕn v prospech vyšších rastlín bola pri populácii F3 52 (33,2 zŕn) a v hmotnosti zrna pri F4 8 (1,827 g). Pri väčšine rastlín populácií sme zistili vyšší počet a hmotnosť zŕn pri bezostinatých formách, pričom diferencie v porovnaní s ostinatými klasmi neboli tak významné ako pri výške rastlín, s výnimkou populácie F3 110.

Pomocou jednoduchého testu, pri ktorom sme aplikovali 20 % NaOH sa zvýšila rozlišovacia schopnosť hodnotenia farby zrna. Bola potvrdená opodstatnenosť rozdelenia osiva populácie 111 (3 body verzus 6 a 4). Pri troch subpopuláciach – F3 111/2 (ostinaté aj bezostinaté rastliny) a F3 108 (rastliny nízke, ostinaté) sme medzi klasmi pozorovali variabilitu vo farbe zrna. Identifikovali sme minimálne 2 subpopulácie, ktoré mali rovnakú alebo takmer rovnakú farbu zrna ako kontrola Indigo, s purpurovým perikarpom. V súbore sa nachádzajú tiež populácie, s modrou aleurónovou vrstvou. V prípade širšieho využívania testu je vhodné zaradiť medzi referenčné odrody tiež genotyp s modrou aleurónovou vrstvou.

Z hodnotenia úrodotvorných znakov sa javí, že doterajšia selekcia v rámci populácií z hľadiska výšky, prípadne ďalších znakov bola nedostatočná, resp. bola vykonaná vo vegetáciách, kedy nedošlo k plnému prejavu znaku, v dôsledku poveternostných podmienok. Enormné zrážky v čase intenzívneho rastu pšenice

vo vegetácii 2009/10 umožnili plnú manifestáciu týchto znakov. Vzhľadom na materiálové a pracovné náklady spojené s *in vitro* technikou peľnicových kultúr pri populáciách, ktoré pochádzajú z kríženia veľmi rozdielnych rodičovských genotypov je potrebné uplatniť pozitívnu selekciu už v skorých generáciách po krížení a ako donorovú využívať generáciu F3, resp. F4.

Pri technike peľnicových kultúr sme v priemere použili 13 donorových klasov na populáciu. Prebiehajúci proces indukcie a regenerácie sa javí byť úspešný najmä pri populáciách F3 111 a F4 8.

Záver

V 8 populáciách pšenice letnej f. ozimná generácií F3 a F4 sme zistili významnú variabilitu vo vybraných úrodotvorných znakoch, pričom rozdiely boli najviac podmienené výškou rastlín. Potvrdili sme, že v skorých generáciách po krížení pre identifikáciu farby zrna je vhodným test, založený na aplikácii roztoku NaOH. Pre *in vitro* tvorbu dihaploidov je potrebná pozitívna selekcia vnútri populácií, najmä v tých, ktoré pochádzajú z geneticky nepríbuzných rodičov.

Literatúra

PAUK, J. – MIHÁLI, R. – PUOLIMATKA, H.: Protocol of wheat (*Triticum aestivum* L.) anther culture. In: Double haploid production in crop plants. Maluszynski et al.(Ed.) Kluwer academic publishers, Dordrecht, 2003, s. 59-64.

RAM, M.S. – DOWELL, F.E. – SEITZ, L. – LOOKHART, G.: Development of standard procedures for a simple, rapid test to determine wheat color class. In: Cereal Chemistry, 79, 2002, 230-237.

TUVESSON, S. – DAYTEG, CH. – HAGBERG, CH. – MANNINEN, O. – TANHUANPAA, P. – TENHOLA-ROININEN, T. – KIVIHARJU, E. – WEYEN, J. – FORSTER, J. – SCHONDELMAIER, J. – LAFFERTY, J. – MARN, M. – FLECK, A.: molecular markers and doubled haploids in European plant breeding programmes. In: Euphytica, 158, 2007, 305-312

Tabuľka 1: Úrodotvorné znaky a farba zrna populácií pšenice letnej f. ozimná hodnotených vo vegetácii 2009/10 v Piešťanoch

Generácia, číslo populácie	Rastliny	Počet zŕn / klas	Hmotnosť zŕn/ klas (g)	HTS (g)	Výška (cm)	Farba zrna (1–9)
F3 48	nízka	42,8	1,060	24,77	94	8
F3 48	vysoká	44,2	1,093	24,72	101	7
F3 52	nízka	25,4	0,520	20,46	84	7
F3 52	vysoká	58,6	1,694	28,90	105	7
F3 110	ostinatá	36,4	1,095	30,08	118	7
F3 110	bezostinatá	62,2	2,178	35,01		7
F3 111/1	ostinatá	46,4	1,487	32,06	122	3
F3 111/1	bezostinatá	47,0	1,711	36,41		3
F3 111/2	ostinatá	43,4	1,319	30,40	126	6
F3 111/2	bezostinatá	43,0	1,648	38,32		4
F3 112	vysoká, ostinatá	43,0	1,500	34,88	133	6
F3 112	vysoká, bezostinatá	49,2	1,635	33,24		6
F3 112	nízka, ostinatá	29,8	0,811	27,21	116	3
F3 112	nízka bezostinatá	36,8	1,020	27,73		5
F4 7	nízka	43,2	1,187	27,49	90	7
F4 7	vysoká	57,8	2,318	40,10	121	8
F4 8	nízka	46,2	1,175	25,44	113	7
F4 8	vysoká	61,4	3,002	48,90	122	9
F3 108	vysoká ostinatá	56,6	2,531	44,71	133	6
F3 108	vysoká bezostinatá	54,6	2,196	40,22		6
F3 108	nízka ostinatá	40,2	1,479	36,79	113	4
F3 108	nízka bezostinatá	39,6	1,540	38,89		4
$\bar{x}$		45,8	1,555	33,94	116	-

Poďakovanie: Ing. Ľubomírovi Ruckschlossovi z VŠS Vígľaš – Pstruša za poskytnutie osiva populácií. Práca bola realizovaná za finančnej podpory MP SR v rámci úloh „Využitie biotechnologických metód pri tvorbe nových typov rastlín“ a „Biologická a funkčná diverzita genofondu rastlín pre zvýšenie pridanej hodnoty poľnohospodárskej produkcie“.

Adresa autorov:
Ing. Alžbeta Žofajová, PhD., Ing. Jozef Gubiš, PhD., Mgr. Marcela Gubišová, Ing. Štefan Masár, PhD., Ing. Katarína Bojnanská, RNDr. Michaela Havrlentová, PhD., CVRV Piešťany - Výskumný ústav rastlinnej výroby, Bratislavská 122, 921 01 Piešťany, zofajova@vurv.sk

Názov: **Nové poznatky z genetiky a šľachtenia poľnohospodárskych rastlín zborník zo 17. vedeckej konferencie.**
Editor: Valéria Šudyová
Recenzenti/typografia/technická úprava: prof. RNDr. Zdenka Gálová, CSc., SPU Nitra
Ing. Tibor Maliar, PhD., UCM Trnava, Jarmila Poništová
Vydanie: prvé
Vydavateľ: Centrum výskumu rastlinnej výroby Piešťany
Bratislavská 122, 921 68 Piešťany
Rok vydania: 2010
Počet strán: 186 strán
Tlač: CVRV Piešťany
Formát: A4
Náklad: 25 ks
Nepredajné/Určené pre vlastnú potrebu.

ISBN 978-80-89417-23-0

9 788089 417230