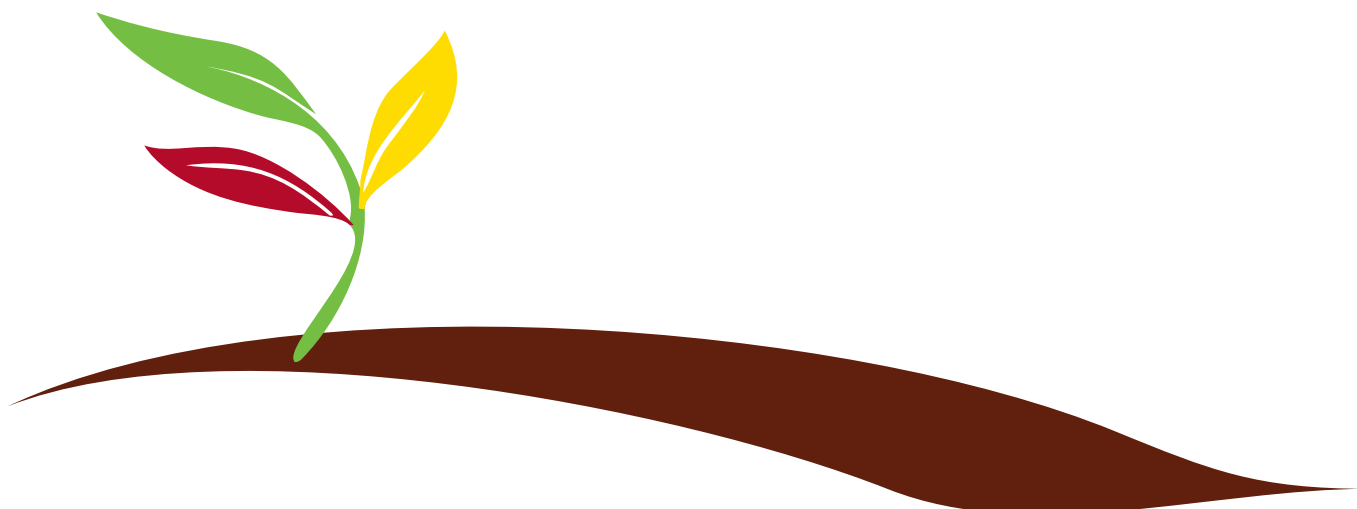




„Podporujeme výskumné aktivity na Slovensku/Projekt je spolufinancovaný zo zdrojov ES“.

NOVÉ POZNATKY Z GENETIKY A ŠL'ACHTENIA POĽNOHOSPODÁRSKÝCH RASTLÍN



centrum výskumu rastlinnej výroby piešťany

Piešťany, 2011

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 z 18. medzinárodnej vedeckej konferencie

konanej v rámci Týždňa vedy a techniky na Slovensku
a 60. výročia založenia VÚRV Piešťany

Piešťany, 8.–9. novembra 2011
1. vydanie

**Názov: Nové poznatky z genetiky a šľachtenia poľnohospodárskych rastlín.
Zborník z 18. medzinárodnej vedeckej konferencie, Piešťany, 8.-9. november 2011.**

Zostavovateľ: Ing. Valéria Šudyová, CSc.

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

© Centrum výskumu rastlinnej výroby Piešťany

ISBN 978-80-89417-29-2

Obsah

Prednášky

Golovatiuk, Y., Mészáros, P., Spieß, N., Mistríková, V., Piršelová, B., Libantová, J., Moravčíková, J., Taran, N., Matušíková, I.: Vplyv množstva dusíka na obranné mechanizmy koreňov sóje fazuľovej voči iónom kadmia	8
Musilová, M., Trojan, V., Vyhnanek, T., Martinek, P., Havel, L.: Aplikace genetických markerů z donorů pšenice s nestandardním zabarvením obilek.....	13
Bláha, L., Leskocová, M., Stehno, Z., Capouchová, I.: Vliv provenience osiva obilovin na klíčivost a efektivnost využití vody	16
Dvončová, D., Kováčik, P., Hozlár, P.: Vplyv N a Se výživy na obsah makroživín v zrne ovsa siateho.....	19
Gregová, E., Šliková, S.: Charakterizácia genotypov kolekcie zrna pšenice pomocou zásobných bielkovín.....	22
Kúdela, O., Vajciková, V.: Vírusy pšenice a jačmeňa na území Slovenska.....	25
Michalcová, V., Hauptvogel, P., Švec, M.: Taxón-špecifické molekulárne markery u tetraploidných pšeníc.....	27
Nesvadba, V., Polončíková, Z., Henychová, A.: Nové smery ve šlechtění chmele (<i>Humulus lupulus</i> L.)	30
Pšenáková, I., Faragó, J., Krofta, K., Nesvadba, V.: Bioaktívne látky v komerčných odrodách a divorastúcich genotypoch chmeľu obyčajného (<i>Humulus lupulus</i> L.).....	33
Rückschloss, L., Matúšková, K., Hanková, A., Valčuhová, D.: Nové trendy v šľachtení pšenice.....	39
Sytar, O., Brestič, M.: Toxicita niklu v divoko rastúcich predchodcoch pšenice (<i>Aegilops cylindrica</i> a <i>Aegilops geniculata</i>).....	42
Šafářová, D., Brázda, P., Navrátil, M.: Umělé dsRND molekuly – netrasgenní nástroj pro kontrolu rostlinných virů.....	46
Šafářová, D., Griga, M., Hanáček, P., Horáček, J., Navrátil, M., Pokorný, R., Reinöhl, V., Smýkal, P., Švábová, L.: Transgenozie ve šlechtění hrachu odolného vůči výrůstkové mozaice hrachu.....	49
Švec, M., Cíván, P., Ivanovičová, Z., Hauptvogel, P.: DNA polymorfizmus tetraploidných pšeníc.....	52
Martinek, P., Dobrovolskaya, O.B., Pokorová, P., Váňová, M.: Formování výnosových prvků u linií ozimé pšenice s odlišnou morfologií klasu.....	56

Postery

Benediková, D., Benková, M., Čičová, I., Mendel, L., Hauptvogel, R., Kolenová, K.: Realizácia a plnenie úloh projektu INTEREG IVC: REVERSE „Regionálna výmena a tvorba politiky pre ochranu a hodnotenie biodiverzity v Európe“.....	63
Benková, M., Mendel, L., Hauptvogel, P.: Vitalita semien vybraných druhov po 10-ročnom uchovávaní v génovej banke SR pri rôznej teplote.....	65
Bláha, L., Klíma, M., Vyvadilová, M.: Vliv vlastností semen na výnos vybraných genotypů řepky ozimé.....	69
Bojnanská, K., Gubiš, J., Žofajová, A., Roháček, T., Križanová, K., Pastirčák, M.: Dlhodobá odolnosť novošľachtených linií pšenice letnej f. ozimnej voči múčnatke trávovej na pšenici.....	72
Černý, I., Pačuta, V., Veverková, A., Bušo, R.: Produkčné parametre snečnice ročnej vo vzťahu k priebehu poveternostných podmienok a aplikácii biologicky aktívnych látok.....	75
Čičová, I., Mendel, L.: Variabilita morfológických znakov genetických zdrojov láskavca (<i>Amaranthus</i> L.).....	78
Čičová, I., Pastirčák, M.: Prirodzená mykoflóra vybraných druhov rodu <i>Amaranthus</i> na Slovensku.....	82
Dobroviczská, T., Piršelová, B., Matušíková, I.: Vplyv iónov kadmia a arzénu na rast klíčiacych rastlín sóje fazuľovej.....	85
Dubas, E., Moravčíková, J., Libantová, J., Matušíková, I., Žur, I., Maksymovicz, A.: Expresia zeleného fluorescenčného proteínového (GFP) génu v mikrosférach a v embryách indukovaných z mikrosfér <i>Brassica napus</i> (L.).....	88
Faragó, J., Zmeškalová, J., Faragová, N., Ťurgeová, E., Pšenáková, I.: Dynamika tvorby biologicky aktívnych látok v divorastúcom chmeľi obyčajnom počas vegetatívneho rastu.....	90

Faragová, N., Faragó, J., Mihalčík, P.: Dynamika vývoja metabolickej diverzity a respiračnej aktivity bakteriálnych spoločenstiev v rizosfére transgénej BT-kukurice.....	93
Fejér, J., Šalamon, I., Gruňová, D., Al-Shammari, T.: Aktuálne šľachtenie rumančeka kamilkového (<i>Matricaria recutita</i> L.) na Prešovskej univerzite v Prešove.....	96
Filová, A., Sytar, O., Ferencová, J., Hudecová, V.: Účinky brassinosteroidov na toxicitu medi u vybraných kultivarov slnečnice ročnej.....	99
Fišerová, H., Klemš, M., Vítková, H., Havel, L., Zezulka, Š., Kummerová, M., Tříška, J., Jílek, R.: Vliv FLT na růst a vývoj hrachu a okurek.....	102
Gavurníková, S., Šliková, S., Gregová, E.: Technologická kvalita izogénných línii pšenice.....	105
Glasa, M., Predajňa, L., Kúdela, O., Šubr, Z.: Variabilita a genetická štruktúra izolátov vírusu chlorotickej škvrnitosti jablone na kôstkovinách (<i>Prunus</i> spp.) na Slovensku.....	107
Glasa, M., Predajňa, L.: Molekulárna charakterizácia izolátov vírusu zvinutky viniča-1 na Slovensku.....	110
Hermuth, J., Janovská, D., Stehno, Z., Prohasková, A.: Kvalitatívni hodnocení čiroku pro biomasu.....	113
Hudcovicová, M., Mihálik, D., Šliková, S., Šudyová, V.: Diagnostika tobamovírusov v paprike ročnej a v rajčiaku jedlom pomocou DAS-ELISA metódy.....	116
Chabinová, J., Zítka, O., Húska, D., Klejdus, B., Kizek, R.: Stanovení antokyanů ve vzorcích barevné pšenice v průběhu zrání zrna.....	119
Klempová, T., Mihálik, D., Ondreičková, K., Gubišová, M., Kraic, J., Čertík, M.: Charakterizácia profilu mastných kyselín v rôznych orgánoch zrejých a nezreých pšeníc.....	122
Klemš, M., Dokoupil, J., Lónová, K., Fišerová, H., Kummerová, M., Štěpán, Z., Machálek, A., Havel, L.: Vliv fluorantenu a flurochloridonu na růst a produkční procesy hrachu.....	124
Krivosudská, E., Ferencová, J., Benková, M.: Skrining genotypov cícera baranieho (<i>Cicer arietinum</i> L.) počas vodného stresu.....	127
Kudělková, M., Čechová, J., Sasková, H.: Srovnání výsledků testování <i>in vitro</i> rostlin česneku kuchyňského na přítomnost virů odlišnými metodami.....	130
Latečková, M., Libiaková, G., Moravčíková, J., Gajdošová, A.: Genetická transformácia <i>Rubus fruticosus</i> L. a <i>Vaccinium corymbosum</i> L. pomocou <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	133
Matušinsky, P., Leišová-Svobodová, L., Gubiš, J., Hudcovicová, M., Klčová, L., Gubišová, M., Mařík, P., Tvarůžek, L., Minaříková, V.: Diagnostika <i>Ramularia collo-cygni</i> v semenách jačmeňa pomocou real-time PCR.....	136
Matúšková, K., Hanková, A., Valčuhová, D., Rückschloss, L.: Vývojové trendy šľachtenia pšenice ozimnej na VŠS Vígláš-Pstruša.....	139
Mihálik, D., Gubišová, M., Ondreičková, K., Nogová, E., Klempová, T., Čertík, M., Kraic, J.: Faktory ovplyvňujúce zvýšenie efektivity pri genetickej transformácii vybraných druhov obilnín.....	143
Moricová, P., Luhová, L., Petřivalský, M., Ondřej, V., Navrátilová, B.: Vliv stříbra na proces regenerace protoplastů.....	146
Múdry, P., Chalányová, M., Čičová, I., Hricová, A.: Analýza polymorfizmu enzýmov ekonomicky významných druhov láskavca (<i>Amaranthus</i> sp.).....	149
Nesvadba, V., Krofta, K., Marzoev, A., Marzoeva, A., Pšenáková, I., Faragó, J., Mursaliev, M., Kyrdaliev, K., Polončíková, Z., Henychová, A.: Hodnocení planých chmelů (<i>Humulus lupulus</i> L.).....	152
Olišovská, K., Hunková, E., Živčák, M., Švec, M.: Porovnanie niektorých druhov tetraploidných pšeníc z hľadiska ich fotosyntetickej výkonnosti a vybraných fyziologických kritérií.....	155
Olišovská, K., Živčák, M., Hunková, E., Brestič, M.: Hodnotenie tolerancie fotosyntetického aparátu vybraných druhov tetraploidných pšeníc na stres z vysokej teploty.....	158
Ondreičková, K., Hudcovicová, M., Hauptvogel, P.: Využitie EST-SSR markerov pri charakterizácii slovenských odrôd pšenice (<i>Triticum aestivum</i> L.).....	161
Polončíková, Z., Henychová, A., Nesvadba, V., Kudrna, T.: Hodnocení odolnosti chmele k padlí chmelovému (<i>Podosphaera macularis</i> ssp. <i>humuli</i>).....	164

Psota, V., Sachambula, L., Hartmann, J., Zajacová, V.: Kvalita sladovníckého ječmene ve Slovenské republice 1960–2009.....	166
Pšenáková, I., Žofajová, A., Havrlentová, M., Rückschloss, L., Piliarová, M.: Akumulácia antokyanínov v zrne pšenice letnej.....	169
Rohrer, M., Hanáček, P., Reinöhl, V., Procházka, S., Břusková, H.: Příprava a testování konstruktů pro indukci rezistence vůči virům a pozerovému hmyzu u hrachu.....	172
Štěpán, Z., Klemš, M., Zítka, O., Havel, L.: Vliv intoxikace kadmíem na fyziologické charakteristiky suspenze buněk tabáku BY-2.....	175
Svobodová, I., Martinek, P., Věchet, L.: Výskyt braničnatky pšeničné u odrůd pšenice jarní a vybraných genetických zdrojů.....	179
Šudyová, V., Šliková, S.: Prirodzená inokulácia pšenice fuzáriami a obsah deoxynivalenolu.....	183
Trojan, V., Musilová, M., Vyhnánek, T., Havel, L.: Detekce genů pro chalkon syntázu u pšenice (<i>Triticum aestivum</i> L.).....	186
Váňová, M., Spitzerová, D., Klemová, Z.: Výskyt snětí (<i>Tilletia caries</i> a <i>Tilletia controversa</i>) na ozimé pšenici v ČR a odrůdová náchylnost.....	188
Vejsadová, H.: Regenerace listových explantátů u podnoží révy vinné.....	191
Veverková, A., Černý, I., Pačuta, V., Bušo, R.: Vplyv ročníka a foliárnych prípravkov na produkčné parametre úrody slnečnice ročnej.....	194
Žofajová, A., Gubiš, J., Gubišová, M., Bojnanská, K., Havrlentová, M.: Tvorba dihaploidov pšenice letnej f. ozimná.....	197
Index.....	200

VPLYV MNOŽSTVA DUSÍKA NA OBRANNÉ MECHANIZMY KOREŇOV SÓJE FAZUĽOVEJ VOČI IÓNOM KADMIA

THE EFFECT OF NITROGEN DOSES ON DEFENSE MECHANISMS OF SOYBEAN ROOTS AGAINST CADMIUM

YEVGENIYA GOLOVATIUK, PATRIK MÉSZÁROS, NADINE SPIEB, VERONIKA MISTRÍKOVÁ, BEÁTA PIRŠELOVÁ, JANA LIBANTOVÁ, JANA MORAVČÍKOVÁ, NATALIA TARAN, ILDIKÓ MATUŠÍKOVÁ

Ústav genetiky a biotechnológií rastlín SAV, Akademická 2, Nitra 950 07

Heavy metal pollution represent a serious environmental problem. The uptake of metals by plants is affected by nutritional supply. Here we studied the defense mechanisms of soybean roots during heavy metal exposure (applied as $50 \text{ mg.l}^{-1} \text{ Cd}^{2+}$) when combined with different doses of nitrogen supply in a form of NH_4NO_3 (N). We have found that relatively low doses (1.2 mM) of nitrogen slightly increased, while high doses (24 mM) of N suppressed the uptake of cadmium by roots. To clarify the defense strategy in roots, total proteins were separated on SDS-PAGE and subsequently stained for activities of chitinase enzymes. These enzymes are generally involved in plant stress against pathogens, while their more specific role against heavy metals has been suggested. We found that activities of certain isoforms that typically increased during Cd exposure, dropped when high- but not 1.2 mM of N were concurrently applied. This phenomenon is discussed with regard to data on several biochemical measurements such as rate of cell death, accumulation of hydrogen peroxide and peroxidation of lipid membranes in soybean roots.

Key words: heavy metal, nitrogen, cadmium, proteins, soybean roots

ÚVOD

Jedným z neblahých účinkov antropogénnych aktivít človeka je kontaminácia životného prostredia iónmi tzv. ťažkých kovov. Patria medzi ne kovy s vysokou atómovou hmotnosťou (> 100) alebo hustotou vyššou ako 5 g.cm^{-3} , a patria k nim niektoré biogénne prvky (Fe, Mn, Cu, Zn, Mo) ale i mnohé toxické kovy ako Cd, Hg, Pb a Ag. Limitné hodnoty ťažkých kovov v poľnohospodárskej pôde sú stanovené v zmysle zákona č. 220/2004 Z. z. o ochrane a využívaní poľnohospodárskej pôdy. Napríklad najvyšším prípustným množstvom kadmia (v pôdnom výluhu NH_4NO_3 s koncentráciou 1 mol.dm^{-3}) v pôdach na Slovensku je 0.1 mg.kg^{-1} pôdy, stredné hodnoty obsahu tohto kovu sa však pohybujú okolo 1.24 mg.kg^{-1} (Hronec 1996).

Prítomnosť kadmia v pôdach má nepriaznivý dopad na biochemické a fyziologické procesy rastlín. Zároveň narúša celkový metabolizmus rastlín vrátane príjmu a distribúcie živín, čo sa odráža aj na konečnej produktivite a poľnohospodárskych výnosoch (Maier et al., 2002). Na druhej strane, v rastlinách bola popísaná pozitívna (Mitchell et al., 2000) ale aj negatívna (Bhandal and Kuar, 1992) interakcia medzi akumuláciou ťažkých kovov a dusíka. Rastliny prijímajú dusík vo forme amónneho katiónu, ktorý príjem kadmia zvyšuje, aj vo forme nitrátového aniónu, ktorý naopak príjem kadmia potláča. Preto je z hľadiska bezpečnosti potravín ale aj poľnohospodárskych výnosov veľmi dôležitý vplyv fertilizácie na akumuláciu ťažkých kovov z pôdy. Optimálny pomer dusíka a ťažkého kovu je pri tom nutné optimalizovať pre rastlinný druh (odrodu), typ kovu aj rastové podmienky (Pankovic et al., 2000). Napriek intenzívnej aplikácii hnojív v modernom poľnohospodárstve, ktoré výrazne ovplyvňuje mobilitu aj dostupnosť ťažkých kovov v pôde, sa však doteraz venovalo účinkom nadmerných množstiev dusíka v rastovom médiu len pomerne málo pozornosti.

Predmetom tejto prednášky je štúdium vplyvu aplikácie rôznych dávok NH_4NO_3 v rastovom médiu na akumuláciu a účinky kadmia v koreňoch sóje fazuľovej. Zvýšené množstvá prítomného dusíka stimulujú rast, produktivitu, aj fotosyntetickú kapacitu listov, ale aj umožňujú rastline preklenúť rôzne stresové stavy vrátane stresu ťažkými kovmi (Dietrich et al., 2004; Polesskaya et al., 2006). Študovali sme pre to vybrané rastlinné mechanizmy pri relatívne nízkych aj relatívne vysokých dávkach prítomného dusíka v rastovom médiu, a porovnali ich s mechanizmami prebiehajúcimi v prítomnosti toxickej dávky kadmia.

MATERIÁL A METÓDY

Semená vybranej odrody sóje fazuľovej (*Glycine max* L. Merr. cv. Ustya) sme sterilizovali v 5% roztoku chlórnanu sodného počas 5 minút. Následne sme semená nakličovali v Petriho miskách ($\varnothing 15 \text{ cm}$) na dvojitej vrstve filtračného papiera navlhčeného Helrigerovým roztokom [$0.708 \text{ g.l}^{-1} \text{ Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$, $0.025 \text{ g.l}^{-1} \text{ FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$, $0.075 \text{ g.l}^{-1} \text{ KCl}$, $0.136 \text{ g.l}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4$ and $0.123 \text{ g.l}^{-1} \text{ MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$] v tme pri $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Po 3 dňoch nakličovania sme približne rovnako nakličené semená (dĺžka koreňov 3-8 mm) preniesli na nový filtračný papier navlhčený Helrigerovým roztokom a to i) bez prídavku ďalšieho množstva dusíka (N), ii) s prídavkom $1,2 \text{ mM}$

dusíka (relatívne nízka dávka) a iii) s prídavkom 24 mM dusíka (relatívne vysoká dávka) vo forme roztoku NH_4NO_3 . Pri rovnakej sade semien sme do každého typu roztoku pridali do kultivačného roztoku aj kadmium o koncentrácii $50 \text{ mg.l}^{-1} \text{ Cd}^{2+}$ vo forme $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$. Prítomnosť dusíka v Helrigerovom roztoku (0,003 mM) a v tetrahydráte dusičnanu kademnatého (0,0044 mM) sme považovali za zanedbateľnú.

Po 48 hod. inkubácie sme oddelili korene od semien skalpelom a odvážili ich čerstvú hmotnosť. Analýzám sme podrobili minimálne 50 semien nakličovaných v troch nezávislých opakovaní experimentu. Zníženie hmotnosti koreňov v porovnaní s kontrolou sme vyjadrili v percentách.

Obsah kadmia sme stanovili vo vysušených koreňoch (0,2 g) použitím CEM Corporation MARSxPRESS systému. Koncentrácia kadmia bola stanovená pomocou „plameňovej“ atómovej absorpčnej spektrometrie (FAAS) (Perkin-Elmer 1100B Spectrophotometer).

Viabilitu (životaschopnosť) buniek koreňov sme zisťovali pomocou farbenia Evansovou modrou spektrofotometricky (Baker a Mock, 1994).

Mieru peroxidácie membránových lipidov sme stanovili meraním množstva vznikajúceho malondialdehydu (MDA) podľa Dhindsa et al. (1981).

Mieru oxidatívneho poškodenia koreňových buniek sme stanovili aj **meraním hladiny peroxidu vodíka** na základe vznikajúceho komplexu so xylenolovou oranžou.

Enzymovú aktivitu chitináz v proteínových extraktoch koreňov (Hurkman a Tanaka, 2003) sme detekovali na polyakrylamidových géloch (SDS PAGE) podľa Pana et al. (1991). Intenzitu proteínových pásov (bandov) zodpovedajúcej miere akumulácie chitináz sme vyhodnotili softvérom Scion Image.

Údaje získané minimálne z troch nezávislých opakovaní experimentov sme podrobili **štatistickým analýzám** využitím softvéru JMP IN 8.0.2. Štatistickú významnosť rozdielov pri porovnávaní súborov sme stanovili softvérom: ANOVA, resp. Studentovú t-test, Tukey-test (pri parametrických údajoch), Wilcoxon-test (pri neparametrických údajoch). Údaje v tabuľkách vyjadrujú priemer \pm štandardnú odchýlku.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Dusíkaté hnojivá majú vplyv na minerálne zložky v pôde a zvyšujú dostupnosť kadmia v pôde. Zároveň rastliny reagujú na nadbytok prítomnosti dusíka rozsiahlym preprogramovaním svojho primárneho aj sekundárneho metabolizmu, čo má následok aj na produkciu rastlinných obranných komponentov a teda aj intenzitu symptómov stresu.

Naše experimenty naznačili, že aplikované dávky dusíka nemali výraznejší vplyv na rast koreňov sóje alebo pôsobili stimulačne (obr. 1A). Na druhej strane, vplyv účinku kadmia sa odrazil vo výrazne potlačenom raste koreňov, ktorý pozorovali aj mnohí iní autori. Zároveň sme však pozorovali rôznu mieru akumulácie kadmia; v prítomnosti vyšších dávok prítomného dusíka bolo množstvo kovu v koreňoch výrazne nižšie ako pri malých dávkach prítomného dusíka (obr. 1B).

V koreňoch vystavených účinkom kadmia došlo aj k rôznym biochemickým prejavom stresu. Pozorovali sme zvýšenú úmrtnosť buniek koreňov (obr. 2A), ako aj mieru peroxidácie lipidov a tým aj poškodenia membrán (obr. 2B); tento efekt sme však v vyšších dávkach dusíka nepozorovali.

Ja zaujímavé, že v koreňoch analyzovaných rastlín nenastali žiadne zmeny v koncentráciách molekúl peroxidu vodíka ako typickej molekuly stresu (údaje neuvedené). Tvorba týchto molekúl teda zjavne nie je tak spoľahlivým markérom pre prebiehajúci stres ako sa doteraz predpokladalo, nakoľko tieto molekuly môžu byť veľmi efektívne odbúrané pri pôsobení efektívnych antioxidantných systémov (Fediuc and Erdei, 2002).

Prítomnosť kadmia mala výrazný efekt na profil obranných proteínov. V celkových proteínových extraktoch sme detekovali frakcie s aktivitou chitináz, čo sú jedným z typických obranných proteínov stresu v rastlinách. Hoci bola ich funkcia popisovaná pri mnohých typoch biotického stresu, v poslednom období sa poukázalo aj na ich špecifickú úlohu aj pri rôznych typoch abiotických stresov vrátane ťažkých kovov (Békésiová et al., 2008). V tejto práci zo štyroch pozorovaných izoforiem chitináz v koreňoch sóje každá bola výrazne aktivovaná v podmienkach stresu kadmium (Tab. 1). Už aj v prácach iných autorov sa poukázalo na súvislosť medzi citlivosťou rastlín na ťažké kovy a akumuláciou proteínov chitináz (Metwally et al., 2005; Békésiová et al., 2008). Naše výsledky potvrdzujú, že chitinázy sú stabilnými komponentmi rastlinnej obrany pri strese ťažkými kovmi. Ďalej sme pozorovali, že aktivita jednotlivých izoforiem pri strese kadmium bola pri relatívne vyššej dávke dusíka v rastovom médiu výrazne potlačená. Toto pozorovanie naznačuje nižšiu mieru stresu, podobne ako nižšie hladiny biochemických parametrov stresu.

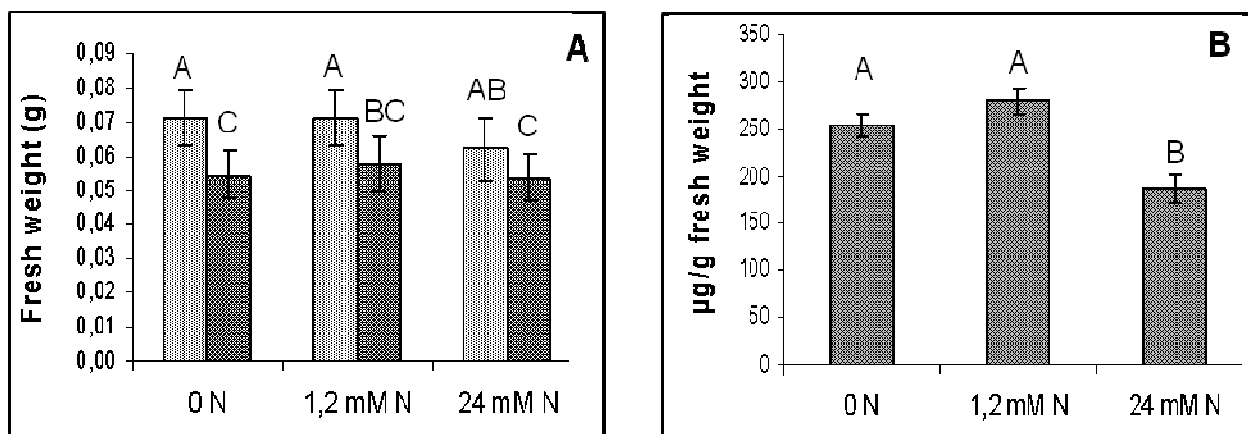
ZÁVER

Výsledky našich experimentov poukazujú na to, že akumulácia určitých obranných resp. stresových komponentov v rastline je závislá na aktuálnom množstve dostupných nutričných látok. Nízky aj vysoký prísun živín sú rastlinou citlivo vnímané a vyhodnocované z hľadiska aktuálnych preferencií rastliny. Rôzne dávky dusíka spôsobili rozdielnú akumuláciu kadmia v testovaných koreňoch sóje, čo poukazuje na potrebnosť ďalších štúdií pre interpoláciu zistení do efektívneho manažmentu pre kvalitu aj bezpečnosť poľnohospodárskych plodín.

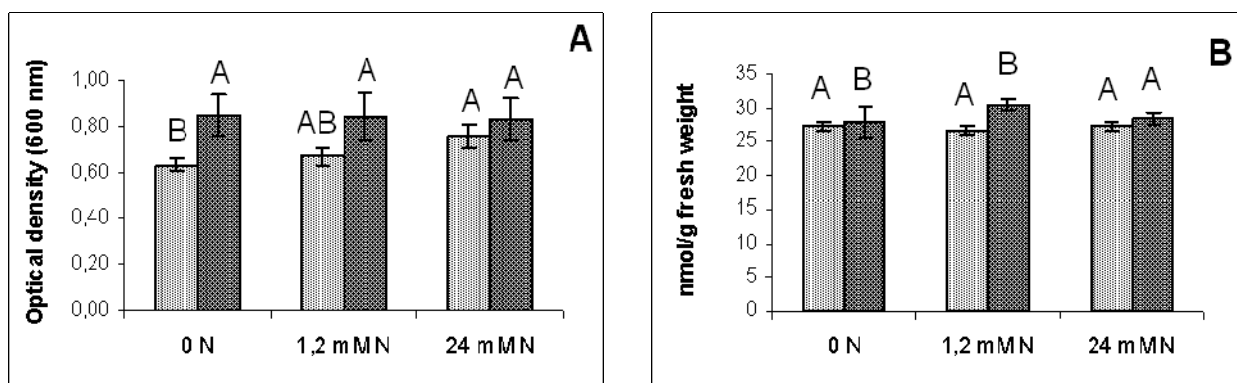
Podakovanie: Práca bola vypracovaná v rámci projektu VEGA 2/0062/11. Pobyt YG na ÚGBR SAV umožnila agentúra SAIA. Práca VM bola financovaná Operačným programom Výskum a vývoj v rámci projektu „Implementácia výskumu genetických zdrojov rastlín a jeho podpora v udržateľnom rozvoji hospodárstva Slovenskej republiky“, ITMS kód projektu: 26220220097, spolufinancovaný z Fondu regionálneho rozvoja EU.

LITERATÚRA

- BAKER, C.J. - MOCK, N.M. 1994. An improved method for monitoring cell-death in cell-suspension and leaf-disc assay using Evans Blue. In *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, vol. 39, 1994, pp.7-12.
- BEKESIOVA, B. - HRASKA, S. - LIBANTOVA, J. - MORAVCIKOVA, J. - MATUSIKOVA, I. 2008. Heavy-metal stress induced accumulation of chitinase isoforms in plants. In *Molecular Biology Reports*, vol. 35, 2008, pp.579-588, DOI 10.1007/s11033-007-9127-x
- BHANDAL, I.S. - KUAR, H. 1992. Heavy metal inhibition of nitrate uptake and in vitro nitrate reductase in roots of wheat (*Triticum aestivum* L.). In *Indian Journal of Plant Physiology*, vol. 35, pp. 281-284.
- DHINDSA, R.S. - MATOWE, W. 1981. Drought tolerance in two mosses: Correlated with enzymatic defence against lipid peroxidation. In *Journal of Experimental Botany*, vol. 32, 1981, pp.79-91.
- DIETRICH, R. - PLOSS, K. - HEIL, M. 2004. Constitutive and induced resistance to pathogens in *Arabidopsis thaliana* depends on nitrogen supply. In *Plant Cell and Environment*, vol. 27, 2004, pp.896-906.
- FEDIUC, E. - ERDEI, L. 2002. Physiological and biochemical aspects of cadmium toxicity and protective mechanisms induced in *Phragmites australis* and *Typha latifolia*. In *Journal of Plant Physiology*, vol. 159, 2002, pp. 265-271.
- HRONEC, O. 1996. *Exhaláty-pôda-vegetácia*. Monograph, Prešov (Slovakia): TOP s.r.o. a SPPK Bratislava. 325 pp. ISBN 80-967523-008
- HURKMAN, W.J. - TANAKA, C.K. 1986. Solubilisation of plant membrane-proteins for analysis by two-dimensional gel-electrophoresis. In *Plant Physiology*, vol. 81, 1986, pp.802-806.
- MAIER, N.A. - MCLAUGHLIN, M.J. - HEAP, M. - BUTT, M. - SMART, M.K. 2002. Effect of nitrogen source and calcitic lime on soil pH and potato yield, leaf chemical composition, and tuber cadmium concentrations. In *Journal of Plant Nutrition*, vol. 25, 2002, pp.523-544.
- METWALLY, A. - SAFRONOVA, V.I. - BELIMOV, A.A. - DIETZ, K.J. 2005. Genotypic variation of the response to cadmium toxicity in *Pisum sativum*. In *Journal of Experimental Botany*, vol. 56, 2005, pp.167-178.
- MITCHELL, L.G. - GRANT, C.A. - RACZ, G.J. 2000. Effect of nitrogen application on concentration of cadmium and nutrient ions in soil solution and in durum wheat. In *Canadian Journal of Soil Science*, vol. 80, 2000, pp.107-115.
- PAN, S.Q. - YE, X.S. - KUC, J. 1991. A technique for detection of chitinase, beta-1,3-glucanase, and protein-patterns after a single separation using polyacrylamide-gel electrophoresis or isoelectrofocusing. In *Phytopathology*, vol. 81, 1991, pp.970-974.
- PANKOVIC, D. - PLESNICAR, M. - ARSENIJEVIC-MAKSIMOVIC, I. - PETROVIC, N. - SAKAC, Z. - KASTORI, R. 2000. Effects of nitrogen nutrition on photosynthesis in Cd-treated sunflower plants. In *Annals of Botany*, vol. 86, 2000, pp.841-847, DOI 10.1006/anbo.2000.1250
- POLESSKAYA, O.G. - KASHIRINA, E.I. - ALEKHINA, N.D. 2006. Effect of salt stress on antioxidant system of plants as related to nitrogen nutrition. In *Russian Journal of Plant Physiology*, vol. 53, 2006, pp.186-192, DOI 10.1134/s1021443706020063



Obr. 1 Zmeny v čerstvej hmotnosti (A) a akumulácii kadmia (B) v koreňoch sóje fazuľovej pri raste na rôznych dávkach (0, 1.2 mM a 24 mM) dusíka v rastovom médiu a to bez- (sivé stĺpce) alebo v prítomnosti 50 mg.l⁻¹ Cd²⁺ (tmavé stĺpce). Údaje predstavujú stredné hodnoty so štandardnými odchýlkami z troch opakovaní. Rôzne písmená nad stĺpcami označujú signifikantné rozdiely pri p<0.05.



Obr. 2 Zmeny v úmrtnosti buniek vyjadrenej ako miera absorpcie Evansovej modrej (A) a v miere peroxidácie membránových lipidov (B) v koreňoch sóje fazuľovej pri raste na rôznych dávkach (0, 1.2 mM a 24 mM) dusíka v rastovom médiu a bez- (sivé stĺpce) alebo za prítomnosti 50 mg.l⁻¹ Cd²⁺ (tmavé stĺpce). Údaje predstavujú stredné hodnoty so štandardnými odchýlkami z troch opakovaní. Rôzne písmená nad stĺpcami označujú signifikantné rozdiely pri p<0.05.

Tabuľka 1. Akumulácia izoform chitináz detekovaných v proteínových extraktoch z koreňov sóje.

Izoforma (kDa)	-Cd			+Cd		
	0 N	1.2 mM N	24 mM N	0 N	1.2 mM N	24 mM N
35.5	1,00 ± 0,0	1,00 ± 0,02	1,00 ± 0,02	1,18 ± 0,03 ***	1,20 ± 0,03 **	1,15 ± 0,04 *
30	-	-	-	+	+	-
25	-	-	-	+	+	-
21.5	1,0 ± 0,0	1,00 ± 0,01	0,99 ± 0,02	1,15 ± 0,03 **	1,18 ± 0,03 *	1,14 ± 0,01 *

Celkové proteínové extrakty boli izolované z koreňov sójke vystavených rôznym dávkam dusíka (N), bez- (-Cd) alebo za prítomnosti (+ Cd) iónov kadmia. Izoformy boli detekované po separácii na SDS-PAGE. Intenzity chitinázových frakcií boli kvantifikované a porovnané vo vzťahu ku kontrolným vzorkám. Údaje predstavujú stredné hodnoty so štandardnými odchýlkami z troch opakovaní. Frakcie chitináz, ktoré neboli prítomné vo všetkých vzorkách, neboli kvantifikované; indikovaná je ich prítomnosť (+) alebo absencia (-) v danej vzorke. Hladiny významnosti sú uvádzané ako *** (P<0.001), ** (P<0.01) a * (P<0.05).

ZOZNAM AUTOROV**Yevgeniia Golovatiuk**Institute of Biology of Taras Shevchenko Kyiv National University, Department of Plant Physiology and Ecology, Volodymyrska Str., 64, 01601 Kyiv, Ukraine, Tel.: +380445221427, Fax: +380445266598; e-mail: golovatyuk.yevgeniya@gmail.com**Natalia Taran**Institute of Biology of Taras Shevchenko Kyiv National University, Department of Plant Physiology and Ecology, Volodymyrska Str., 64, 01601 Kyiv, Ukraine, Tel.: +380445221427, Fax: +380445266598; e-mail: tarantul@univ.kiev.ua**Patrik Mészáros**The Constantine Philosopher University, Faculty of Natural Sciences, Department of Botany and Genetics, Nábřežie mládeže 91, 949 74, Nitra, Slovak Republic, Tel: +421 37 6408 583, Fax: +421 37 6408 556, e-mail: pmeszaros@ukf.sk**Beata Piršelová**The Constantine Philosopher University, Faculty of Natural Sciences, Department of Botany and Genetics, Nábřežie mládeže 91, 949 74, Nitra, Slovak Republic, Tel: +421 37 6408 576, Fax: +421 37 6408 556, e-mail: bpirselova@ukf.sk**Nadine Spiess**AIT Austrian Institute of Technology GmbH, Konrad-Lorenz Str. 24, 3430 Tulln, Austria, e-mail: n.spiess@spiess-vienna.at**Ildikó Matušíková**Institute of Plant Genetics and Biotechnology, Slovak Academy of Sciences, P.O. Box 39A, 950 07 Nitra, Slovak Republic, Tel: +421 37-69 43 110, Fax: +421 37-733 66 60, e-mail: ildiko.matusikova@savba.sk**Jana Moravčíková**Institute of Plant Genetics and Biotechnology, Slovak Academy of Sciences, P.O. Box 39A, 950 07 Nitra, Slovak Republic, Tel: +421 37-69 43 351, Fax: +421 37-733 66 60, e-mail: jana.moravcikova@savba.sk**Jana Libantová**Institute of Plant Genetics and Biotechnology, Slovak Academy of Sciences, P.O. Box 39A, 950 07 Nitra, Slovak Republic, Tel: +421 37-69 43 351, Fax: +421 37-733 66 60, e-mail: jana.libantova@savba.sk**Veronika Mistríková**Institute of Plant Genetics and Biotechnology, Slovak Academy of Sciences, P.O. Box 39A, 950 07 Nitra, Slovak Republic, Tel: +421 37-69 43 327, Fax: +421 37-733 66 60, e-mail: veronika.mistikova@savba.sk

APLIKACE GENETICKÝCH MARKERŮ U DONORŮ PŠENICE S NESTANDARDNÍM ZABARVENÍM OBILEK

APPLICATION OF GENETIC MARKERS IN WHEAT DONORS WITH UNUSUAL KERNEL COLOUR

MILENA MUSILOVÁ¹, VÁCLAV TROJAN¹, TOMÁŠ VYHNÁNEK^{1,2}, PETR MARTINEK³,
LADISLAV HAVEL¹

¹Ústav biologie rostlin, ²CEITEC MENDELU, Mendelova univerzita v Brně, ³Agrotest fyto, s.r.o. Kroměříž

The simple sequence repeats (SSR) method was used to analyse genetic diversity in 24 wheat genotypes with different kernel colour and one genotype of *Thinopyrum ponticum*. The AS-PCR method was employed to analyse the high-molecular-weight (HMW) glutenin subunits polymorphism in 16 wheat genotypes with red, blue and purple kernel colour. The most widespread wheat (*Triticum aestivum* L.) forms have kernel colour designated as red. It is determined by bitter substances (polyphenols, tannins), which positively affect resistance to sprouting. The red kernel colour is determined by the presence of at least one of three dominant alleles R-A1a (on chromosome 3AL), R-B1b (on 3BL) and R-D1b (on 3DL). The absence of bitter substances in white kernel is determined by a homozygous set of recessive alleles. In specific wheat donors, even unusual colours determined by anthocyanins, carotenoids and flavonoids can be present. These substances are significant antioxidants and can be beneficial to consumers' health. These are wheats with purple pericarp caused by the genes *Pp1* (on 7B), *Pp2* (on 7A), *Pp3a*, *Pp3b* (on 2A), blue aleurone determined by the alleles *Ba1* (on 4BS) and *Ba2* (on chromosome disomic substitution replacing 4A) and yellow endosperm determined by a broad spectrum of alleles responsible for biosynthetic pathways of enzyme phytoene synthase. We study the genes for biochemical pathways responsible for different kernel colour.

Key words: SSR, AS-PCR, HMW glutenin subunits, flavonoid biochemical pathway, wheat, *T. aestivum* L.

ÚVOD

Cereálie a výrobky z nich, tedy pečivo, těstoviny aj., tvoří velkou část běžné lidské stravy. V rámci široké škály běžného pečiva je kladen důraz na výrobky z celozrnné mouky, neboť obilky pšenice nejsou při procesu mletí zbavovány obalových vrstev, a tak jejich vysoká nutriční hodnota přechází do hodnoty pečiva. V současnosti stoupá zájem o pšenice s purpurovým perikarpem, modrým aleuronem a žlutým endospermem (Zeven, 1991) pro rozšíření sortimentu potravinových výrobků. Pšenice s různě zbarvenou obilkou je bohatá na přírodní pigmenty, vitamíny, proteiny, aminokyseliny a prospěšné mikroelementy, a proto jsou doporučovány pro lidskou výživu (Chňápek et al., 2010). Přírodní pigmenty mají i prokazatelný vliv na užitek a kvalitu produkce hospodářských zvířat, např. slepic (Rüschschloss et al., 2010).

Červená obilka se vyskytuje u většiny běžných evropských odrůd pšenice. Je podmíněna alespoň jednou ze tří dominantních alel lokusu *R*: *R-A1* (na 3AL), *R-B1* (3BL), *R-D1* (3DL). Červená barva obilky je spojována s vyšším obsahem fenolických látek, nižší aktivitou hydrolytických enzymů a s tím spojenou lepší odolností k porůstání. Fenolické látky omezují výskyt volných radikálů, inhibují lipoxygenázu a fungují jako nesespecifické inhibitory (Lachman et al., 2003).

Bílá obilka je podmíněna sestavou recesivních alel *r-A1*, *r-B1* a *r-D1*. Pšenice s bílou obilkou má výrazně nižší obsah hořkých fenolických látek. Nepřítomnost hořkých látek způsobuje, že obilka bývá náchylnější na porůstání, a že produkt je přirozeně sladší, což může mít význam v cukrářství.

Žlutý endosperm je podmíněn dvěma lokusy *Psy1* a *Psy2*, které se nacházejí na 7. a 5. skupině homeologických chromozomů ovlivňujících biosyntetickou dráhu karotenoidů (Pozniak et al., 2007). Obsah žlutého pigmentu má v současnosti význam především v těstárenství u *T. durum* (He et al., 2008).

Purpurový perikarp je řízen geny pro purpurový perikarp *Pp*, které byly do pšenice seté přeneseny z tetraploidních pšenic pocházejících z oblasti Etiopie, Somálska a Jemenu. Vyznačuje se výskytem anthokyanů v povrchové vrstvě (perikarpu) obilek. Dosud bylo nalezeno několik genů pro purpurový perikarp: *Pp1* na chromozomu 7B, *Pp2* na 7A (Arbuzova a Maystrenko, 2000), *Pp3a* a *Pp3b* na chromozomu 2A.

Modrý aleuron může být řízen kodominantně působícím genem *Ba1*. Do pšenice se tento gen dostal přenesením celého ramena chromozomu z *Thinopyrum ponticum* Podp., které bylo zabudováno do chromozomu 4BS (Qualset et al., 2005). Zeven (1991) uvádí odlišný gen *Ba2*, který byl přenesen do pšenice disomickou substitucí chromozomu 4A jiným chromozomem neznámého původu, pravděpodobně však z *Aegilops elongatum*. Katalog genetických symbolů pšenice uvádí kromě výše uvedených dvou genů ještě gen se slabší expresí modré barvy (*half-blue*), který se vyskytl ve vzorku *T. monococcum* spp. *aegilopoides*.

Cílem práce byla aplikace různých genetických markerů u kolekcí donorů nestandardního zbarvení obilky pšenice s možností jejich aplikace v genetice a šlechtění pšenice.

MATERIÁL A METODY

Kolekce pšeníc s nestandardním zbarvením obilek čítající 24 genotypů pšenice (*Triticum aestivum* L.) byla doplněna o jeden genotyp planého druhu trávy *Thinopyrum ponticum* (donor genu modrého zbarvení obilky) (tab. 1).

Tabulka 1: Charakteristika analyzovaných genotypů

Název	Zbarvení	Forma	Získáno z:
Novosibirskaya 67, ANK-1A, ANK-1B, ANK-1C, ANK-1D, ANK-1E	červená obilka	jarní	ZVÚ Kroměříž, s.r.o.*
ANK-28A, ANK-28B, Abissinskaja arrasajta, Konini, Purple, Purple feed	purpurový perikarp	jarní	ZVÚ Kroměříž, s.r.o.
UC66049, Tschermaks Blaukörniger Sommerweizen, Tschermaks Blaukörniger	modrý aleuron	jarní	ZVÚ Kroměříž, s.r.o.
48M, RU 440-5, RU 440-6, Barevná 9, Barevná 25		ozimá	ZVÚ Kroměříž, s.r.o.
Indigo	purpurový perikarp	ozimá	ZVÚ Kroměříž, s.r.o.
Citrus, Luteus, Bona Dea	žlutý endosperm	ozimá	ZVÚ Kroměříž, s.r.o.
<i>Thinopyrum ponticum</i>	donor zbarvení modrého aleuronu	ozimá	GB VÚRV, v.v.i.**

Vysvětlivky: * Zemědělský výzkumný ústav Kroměříž, s.r.o.; ** Genová banka Výzkumného ústavu rostlinné výroby, v.v.i. Praha-Ruzyně

Těchto 25 genotypů bylo podrobeno analýzám genetické variability pomocí SSR (mikrosatelitních) markerů lokalizovaných v místech genů determinující odchylky v zbarvení obilek, které byly popsány v literatuře u pšenice a tritikale (Khlestina et al., 2004; Kuelung et al., 2006). Pro izolaci, vlastní detekci a vyhodnocení polymorfizmu SSR markerů bylo využito protokolu podle Musilové et al. (2011). Detekce přítomnosti vybraných alel pro vysokomolekulární podjednotky gluteninů u pšeníc s modrým aleuronem a purpurovým perikarpem byla prováděna pomocí DNA markerů dle Vyhnánka et al. (2010) a detekce přítomnosti nebo absence lokusu *Sec-1* metodikou dle Chai et al. (2005). Pro identifikaci genů z biosyntetické dráhy anthokyanů bylo vybráno 6 genotypů (Novosibirskaya 67, Heroldo, ANK-28B, Abissinskaja arrasajta, UC66049 a Tschermaks Blaukörniger Sommerweizen). Pro izolaci celkové RNA byl vybrán postup podle Musilové et al. (2010), následně byla RNA přepsána pomocí komerčního kitu do cDNA. Pro genomickou analýzu genu pro chalkon syntázy byl využit degenerovaný primer dle Gao et al. (2001).

VÝSLEDKY A DISKUSE

SSR analýzy – na základě statistického vyhodnocení pomocí dendrogramu (software FreeTree a FreeView) byla potvrzena podobnost pšeníc se žlutým endospermem a pšeníc s modrým aleuronem. Samostatná skupina pšeníc s červenou obilkou i přes mírnou variabilitu jednoho genotypu potvrzuje jejich téměř izogenní charakter (linie odvozené od odrůdy Novosibirskaya 67). Byly vybrány SSR markery, jejichž variabilita definovaná hodnotou polymorfního informačního obsahu (PIC) je vyšší než hodnota 0,65. Zvolených panel SSR markerů je vhodný pro determinaci variability jednotlivých donorů nestandardního zbarvení obilek naší kolekce.

AS-PCR – pomocí DNA markerů byla analyzována přítomnost vybraných alel pro vysokomolekulární podjednotky gluteninů. Perspektivnější z hlediska technologické kvality zrna se jeví odrůda Indigo (s alelami *Glu-A1b*, *Glu-D1d*), UC66049 (s alelami *Glu-A1a*, *Glu-D1d*) a RU 440-6 (s alelami *Glu-A1b*, *Glu-D1d*) v důsledku výskytu alely *Glu-D1d*, která je charakteristická výskytem gluteninových bílkovinných podjednotek 5+10). Současně u těchto materiálů nebyl nalezen sekalinový lokus *Sec-1*, který je spojován se zhoršenou technologickou kvalitou zrna, s přítomností translokace T1BL.1RS a genem rezistence ke rzi pšeničné *Lr26* (Kumar et al., 2003). U genotypů ANK-28A, ANK-28B, Abissinskaja arrasajta, Konini, Purple, Purple Feed, Tschermaks Blaukörniger Sommerweizen, 48M, Barevná 9 a Barevná 25 nebyla zjištěna přítomnost *Glu-D1d* a *Sec-1*. Vzhledem k nepřítomnosti *Glu-D1d* jsou tyto genotypy pokládány za méně výhodné donory z hlediska pekařské jakosti než Indigo, UC66049 a RU 440-6, u kterých tato alela byla prokázána. Pro upřesnění predikční hodnot technologické kvality je nutné ještě provést analýzu alelického složení v lokusu *Glu-1B*, které bude provedeno u vzorků pšeníc s modrým aleuronem a purpurovým perikarpem na přelomu roku 2011 a 2012.

Analýza biosyntetické dráhy anthokyanů – použitá primerová kombinace zveřejněná v práci Gao et al. (2001) neposkytla v našem případě vhodné PCR produkty pro další práci. Z toho důvodu jsme z databáze NCBI (*National Centre for Biotechnology Information*) zjistili přímo sekvence částí genu pro chalkon syntázu (CHS) obilnin. Pomocí aplikace BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) byly vyhledány sekvence s vysokým stupněm podobnosti. Navržené primery budou otestovány a případné specifické produkty budou podrobeny klonování a sekvenční analýze.

ZÁVĚR

V práci jsou prezentovány výsledky aplikace genetických markerů u kolekce genetických zdrojů pšenice s nestandardním zabarvením obilek, které mohou být využity pro vyšlechtění odrůd se zvýšeným obsahem zdraví prospěšných látek. Hybridizační pokusy ukazují, že je možné kombinovat geny zodpovědné za různé zabarvení obilek do jednoho genotypu. V současnosti se zabýváme studiem genů z biosyntetické dráhy flavonoidů odpovědných za tvorbu jednotlivých typů anthokyanů v obilce tak, aby byly vytvořeny předpoklady pro sledování změn jejich zastoupení v průběhu zrání obilky. Zároveň bude možné sledovat na biochemické úrovni změny v obsahu a zastoupení barviv od sklizené obilky až po finální potravinářský výrobek.

Poděkování: Práce byla podpořena projektem IGA AF MENDELU č. TP 7/2011.

LITERATURA

- ARBUZOVA, V.S. - MAYSTRENKO, O.I. 2000. Chromosomal location of genes for purple grain colour introgressed in common wheat. In *Cereal Research. Communications.*, vol. 28, 2000, no. 2, pp. 235-237.
- GAO, L. - LI, B. - LI, Z. 2001. Isolation and Purification of Functional Total RNA from Blue-grained Wheat Endosperm Tissues Containing High Levels of Starches and Flavonoids. In *Plant Molecular Biology Reporter*, vol. 19, 2001, no. 2, pp. 185a – 185i.
- HE, X.Y. - ZHANG, Y.L. - HE, Z.H. - WU, Y.P. - XIAO, Y.G. - MA, C.X. - XIAL, X.C. 2008. Characterization of phytoene synthase 1 gene (*Psy1*) located on common wheat chromosome 7A and development of a functional marker. In *Theoretical and Applied Genetics.*, vol. 116, 2008, no. 2, pp. 213-221.
- CHAI, J.F. - LIU, X. - JIA, J.Z. 2005. Homologous cloning of omega-secalin gene family in a wheat 1BL/1RS translocation. In *Cell Research*, vol. 5, 2005, no. 8, pp. 658-664.
- CHŇAPEK, M. - GÁLOVÁ, Z. - TOMKA, M - RÜCKSCHLOSS, E. 2010. Nutričná a technologická kvalita farebných genotypov pšenice letnej formy ozimnej (*Triticum aestivum* L.) [Nutrition and technological quality of color bread wheat genotypes (*Triticum aestivum* L.)]. In *Potravinárstvo*, vol. 4, 2010, no. 1, pp. 20-25.
- 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 expressed sequences tags. In *Theoretical and Applied Genetics*, vol. 109, 2004, no. 4, pp. 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. In *Crop Science*, vol. 46, 2006, no. 3, pp. 1692-1700.
- KUMAR, S. - KUMAR, N. - BALYAN, H.S. - GUPTA, P.K. 2003. 1BL.1RS translocation in some Indian bread wheat genotypes and strategies for its use in future wheat breeding. In *Caryologia*, vol. 56, 2003, no. 1, pp. 23-30.
- LACHMAN J. - DUDJAK J. - ORSÁK M. - PIVEC V. 2003. Effect of accelerated ageing on the content and composition of polyphenolic complex of wheat (*Triticum aestivum* L.) grains. In *Plant, Soil and Environment*, vol. 49, 2003, no. 1, pp. 1-7.
- MUSILOVÁ, M. - TROJAN, V. - VYHNÁNEK, T. - HAVEL, L. 2010. Izolace RNA z genetických zdrojů pšenice s nestandardním zabarvením obilek [The RNA isolation from genetic resources of coloured grain wheat]. In *MendelNet 2010 Proceedings of International Ph.D. Students Conference*, (P. Škarpa et al. Eds.) Brno (Czech Republic), 2010. ISBN 978-80-7375-453-2, pp. 826-830.
- MUSILOVÁ, M. - TROJAN, V. - VYHNÁNEK, T. - HAVEL, L. 2011. Variabilita genetických zdrojů pšenice využitelných ve šlechtění pro funkční potraviny [The variability of wheat genetic resources usable in breeding for functional foods]. In *Potravinárstvo*, vol. 5, 2011. no. Supplement, pp. 70-73.
- POZNIAK, C.J. - KNOX, R.E. - CLARKE, F.R. - CLARKE - J.M. 2007. Identification of QTL and association of a phytoene synthase gene with endosperm colour in durum wheat. In *Theoretical and Applied Genetics*, vol. 114, 2007, no. 3, pp. 525-37.
- RÜCKSCHLOSS, E. - MATÚŠKOVÁ, K. - HANKOVÁ, A. - JANČÍK, D. 2010 Vplyv pšenice s purpurovou farbou zrna na parametre úžitkovosti nosníc a kvalitu vajec [Influence of winter wheat with purple colour of the corn on latiny hens' efficiency and eggs quality]. In *Potravinárstvo*, vol. 4, 2010, no. Supplement, pp. 231-235.
- QUALSET, C.O. - SOLIMAN, K.M. - JAN, C.C. - DVOŘÁK, J. - MCGUIRE, P.E. - VOGT, H.E. 2005. Registration of UC66049 *Triticum aestivum* blue aleurone genetic stock. In *Crop Science*, vol. 45, 2005, no. 1, pp. 432.
- VYHNÁNEK, T. - HALOUZKOVÁ, E. - TROJAN, V. - MARTINEK, P. 2010. Detekce alel pro vysokomolekulární podjednotky gluteninů u tritikale pomocí DNA markerů [Detection of alleles for high-molecular-weight glutenin subunits in triticale using DNA markers]. In *Potravinárstvo*, vol. 4, 2010, no. Supplement, pp. 545-551.
- ZEVEN, A.C. 1991. Wheats with purple and blue grains: a review. In *Euphytica*, vol. 56, 1991, no. 3, pp. 243-258.

Kontaktní adresy:

Ing. Milena Musilová¹, MVDr. Ing. Václav Trojan¹, Ing. Tomáš Vyhnánek, Ph.D.^{1,2}, prof. RNDr. Ladislav Havel, CSc.¹, ¹Ústav biologie rostlin, ²CEITEC MENDELU, Agronomická fakulta, Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika, Tel.: +420 545 133 185, e-mail: milena.musilova@mendelu.cz, vaclav.trojan@mendelu.cz, vyhnanek@mendelu.cz, lhavel@mendelu.cz
Ing. Petr Martinek, CSc., ³Agrotest fyto, s.r.o., Havlíčkova 2787/121, 767 01 Kroměříž, Česká republika, Tel.: +420 573 317 152, e-mail: martinek.petr@vukrom.cz

VLIV PROVENIENCE OSIVA OBILOVIN NA KLÍČIVOST A EFEKTIVNOST VYUŽITÍ VODY

INFLUENCE OF THE SEED PROVENANCE ON THE GERMINATION AND EFFICIENCY OF WATER USING

LADISLAV BLÁHA ¹, MARTINA LESKOVCOVÁ ², ZDENĚK STEHNO ¹, IVANA CAPOUCHOVÁ ³

¹Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i. Praha-6 Ruzyně, ²Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, ³Česká zemědělská univerzita v Praze

The ecological and conventional seeds of 9 various spring cereal cultivars (bread and emmer wheat, *Triticum aestivum* L. and *T. dicoccum* Schrank, barley, *Hordeum vulgare* L. and oat, *Avena sativa* L.) with four different provenances were compared. Our results confirmed importance of the seed provenance for the seed quality especially for the germination and efficiency of water utilisation. It is very important factor because of seed biological quality is one of basic factors, which has influence on the growth and development of the filial generation.

Key words: cereals, seeds, provenance, germination, efficiency of water utilisation

ÚVOD

Nedostatek ekologicky certifikovaného osiva je velmi často nahrazován opakovanými přesevy (Konvalina, Moudrý, 2007). Cílem práce je posouzení vlivu původu osiva na klíčivost a efektivnost využití vody. Dosavadní výsledky podtrhují význam certifikovaného osiva (Bláha a kol. 2011).

MATERIÁL A METODY

V práci byly použity odrůdy, které jsou nejvíce pěstovány v ekologickém systému hospodaření a u nichž bylo získáno nejvíce hodnocených kategorií osiv: pšenice setá (SW Kadrilj), ječmen setý (Pribina), oves pluchatý (Vok), oves nahý (Izák, Saul). U všech plodin byly použity tři provenience: certifikované ekologické, konvenční nemořené a 2 x farmářské osivo (horší a lepší – určeno podle stanovištních podmínek, průběhu počasí a podle typu případných vstupů do porostu). Dále je v textu uváděno zkráceně certifikované, konvenční, farmářské lepší a farmářské horší osivo. Klíčivost byla stanovována podle platných norem, pokud se týká počtu semen, podmínek prostředí a počtu opakování. Od každé kategorie byly hodnoceny 4 vzorky po 100 semenech dle standardní metodiky stanovení klíčivosti (ISTA 2010). Pokusy byly čtyřikrát opakovány. Pro zjištění celkového obsahu vody v semenech a klíčivosti po 2, 4, až 12 hodinách máčení v deionizované vodě se u 50 náhodně vybraných semen každé pokusné varianty hodnotilo množství přijaté vody a schopnost klíčit z uvedeného množství vody. Hodnocení klíčení pak probíhalo v silikonem utěsněných váženkách o objemu 25 cm³ (detailněji Bláha, 2009).

VÝSLEDKY A DISKUSE

Z tabulky 1 vyplývá, že obecně hmotnost tisíce zrn (průměrná HTS) je největší u konvenčního a farmářského lepšího osiva. Jedná se o výpočet hmotnosti z osiva netříděného. V případě, že třídíme osivo podle velikostních kategorií určených na setí, výsledky jsou jiné. Vysvětlení je zde více. U klíčivosti (tab. 2) je vidět značný rozdíl mezi jednotlivými proveniencemi a navíc průměrné ukazatele pro jednotlivé kategorie jednoznačně vykazují lepší klíčivost u certifikovaného a konvenčního osiva. Z tabulky 3 vyplývá, že farmářská osiva, která se sejí v této podobě, většinou bez čištění obsahují nežádoucí příměsi cizích semen, což znamená riziko zaplevelování.

Tabulka 1: Hmotnost tisíce semen jednotlivých proveniencí a obsah vody

Původ osiva	Vok	Pribina	Saul	SW Kadrilj	Izák	Průměrná HTS	%vody
Certifikované	32,41	46,48	24,43	40,85	24,73	33,78	8,3
Konvenční	40,60	48,54	30,25	44,79	28,14	38,46	8,1
Farmářské lepší	31,32	47,60	32,95	45,13	29,33	37,27	8,3
Farmářské horší	32,87	41,21	26,48	44,82	26,74	34,42	8,0

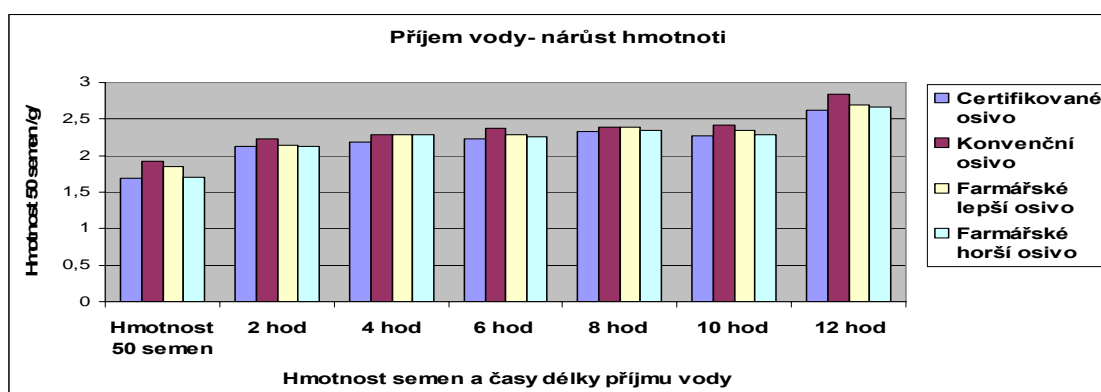
Tabulka 2: Klíčivost jednotlivých kategorií

Původ osiva	Vok	Pribina	Saul	SW Kadrilj	Izák	Průměr
Certifikované	15,50	40,50	46,50	99,00	88,00	57,90
Konvenční	69,50	45,50	51,00	89,50	92,00	69,50
Farmářské lepší	14,50	52,50	20,50	92,00	72,00	50,30
Farmářské horší	6,00	40,50	58,50	92,00	64,50	52,30

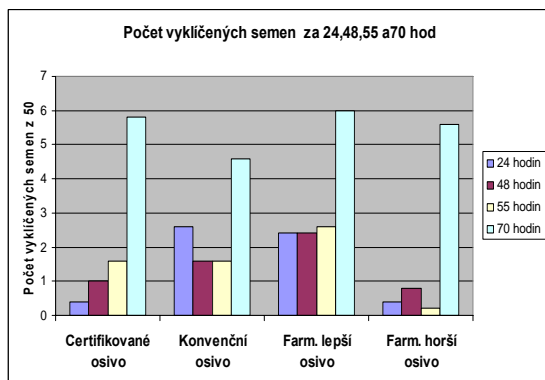
Tabulka 3: Čistota osiv jednotlivých proveniencií

Původ	Hmotnost	Druh příměsí	Původ	Hmotnost	Druh příměsí
Vok C	0,1 g	- příměs půdy		3,8 g	- cizí semena (plevele) (420 ks)
Vok K	0,0 g	- bez příměsí		0,72 g	- zem, kamení
Vok FL	0,9 g	- cizí semena (pohanka)	Saul FH	2,46 g	- úlomky zrn
Vok FH	0,77 g	- zem + cizí semena		14,33 g	- zrna v pluchách (402 ks)
Pribina C	0,0 g	- bez příměsí		3,83 g	- cizí semena (plevele) (290 ks)
Pribina K	0,76 g	- úlomky zrn (30 ks)		0,15 g	- zem, kamení
Pribina FL	0,4 g	- úlomky zrn (15 ks)	Izák C	3,3 g	- oves pluchatý (36 ks)
Pribina FH	0,9 g	- úlomky zrn (40 ks)		2,1 g	- úlomky zrn, pluchy
Kadrilj C	0,0 g	- bez příměsí	Izák K	1,01 g	- zrna v pluchách (37 ks)
Kadrilj K	0,0 g	- bez příměsí			- úlomky semen (10 ks)
Kadrilj FL	0,0 g	- bez příměsí	Izák FL	3,07 g	- zrna v pluchách (77 ks)
Kadrilj FH	0,0 g	- bez příměsí		0,52 g	- úlomky zrn (53 ks)
Saul C	0,11 g	- úlomky zrn (9 ks)			
Saul K	0,8 g	- zrna v pluchách (19 ks)	Izák FH	3,22 g	- zrna v pluchách (107 ks)
		- úlomky zrn (14 ks)		0,42 g	- cizí semena (15 ks)
Saul FL	0,47 g	- úlomky zrn		0,26 g	- úlomky zrn (22 ks)
	4,34 g	- zrna v pluchách (145 ks)			

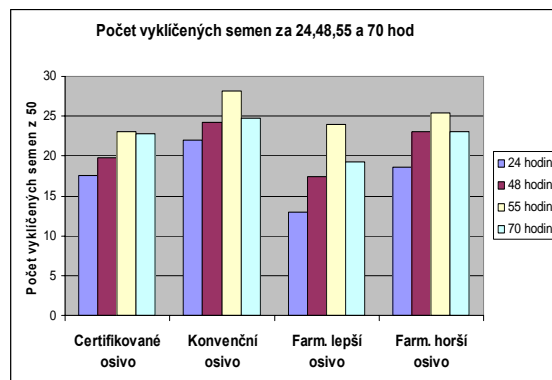
Vysvětlivky: C – certifikované osivo, K – konvenční osivo, FL – farmářské lepší osivo, FH – farmářské horší osivo



Graf 1: Postup příjmu vody v průběhu máčení



Graf 2: Klíčení po dvou hodinách „máčení“



Graf 3: Klíčení po 12 hodinách „máčení“

Z grafu 1 vyplývá, že počáteční rychlost příjmu vody je u osiv s menší HTS větší (certifikované a farmářské horší), nicméně v další fázi je rychlost příjmu vody u jednotlivých proveniencií víceméně rovnoměrná. U odrůd jsou však meziodrůdové rozdíly v příjmu vody a jejím využití (např. hladina vody, kdy již semeno klíčí). Testuje-li se schopnost klíčit již po dvou hodinách příjmu vody do semen (graf 2), je možno uvést, že rychlost klíčení po 24 až 70 hodinách nakličování (pak již nestoupla) byla evidentně nejhorší u farmářského horšího osiva. Mělo-li osivo možnost přijímat vodu 12 hodin (prakticky maximum možného příjmu vody), je evidentně horší skupina farmářských osiv (graf 3). Přehled postupného nabírání vody a klíčivosti je uveden v tabulce 4. Farmářské horší osivo je sice ve sledovaných parametrech téměř totožné s certifikovaným osivem, nicméně jak další doplňkové analýzy ukazují, mají rostliny farmářských osiv v průběhu vegetace horší kořenový systém, což se může v případě horších pěstebních podmínek projevit výnosovou depresí. Toto potvrzují i nádobové pokusy, v nichž je tato skutečnost vždy jednoznačná. Výsledky tedy potvrzují přednost kvalitních osiv. V rámci objektivnosti je nutno uvést, že většina podobných pokusů vyznívá v neprospěch farmářských osiv, číselné výsledky se však liší (vliv boxu, ročního období, náhodného driftu při výběru semen atd.).

Tabulka 4: Vliv délky příjmu vody na počet vyklíčených semen za 24, 48, 55 a 70 hodin klíčení

Původ osiva	Počet hodin od počátku máčení	Máčení 2 hod	Máčení 4 hod	Máčení 6 hod	Máčení 8 hod	Máčení 10 hod	Máčení 12hod
Certifikované	24 hodin	0,4	0,6	7,0	10,6	10,8	17,6
	48 hodin	1,0	3,4	9,8	13,2	15,2	19,8
	55 hodin	1,6	3,2	11,0	8,8	14,0	23,0
	70 hodin	5,8	4,0	14,0	14,0	18,0	22,8
Původ osiva	Počet hodin od počátku máčení	Máčení 2 hod	Máčení 4 hod	Máčení 6 hod	Máčení 8 hod	Máčení 10 hod	Máčení 12hod
Konvenční	24 hodin	2,6	3,6	5,6	12,0	9,4	22,0
	48 hodin	1,6	6,0	11,8	14,8	13,8	24,2
	55 hodin	1,6	5,6	12,4	9,6	12,4	28,2
	70 hodin	4,6	5,4	13,0	15,0	16,4	24,8
Původ osiva	Počet hodin od počátku máčení	Máčení 2 hod	Máčení 4 hod	Máčení 6 hod	Máčení 8 hod	Máčení 10 hod	Máčení 12hod
Farmářské lepší	24 hodin	2,4	2,2	9,4	10,4	9,4	13,0
	48 hodin	2,4	4,2	12,0	14,0	11,25	17,4
	55 hodin	2,6	4,4	13,0	8,0	10,0	24,0
	70 hodin	6,0	4,2	15,4	13,2	9,25	19,2
Původ osiva	Počet hodin od počátku máčení	Máčení 2 hod	Máčení 4 hod	Máčení 6 hod	Máčení 8 hod	Máčení 10 hod	Máčení 12hod
Farmářské horší	24 hodin	0,4	4,4	7,0	15,0	13,8	18,6
	48 hodin	0,8	7,0	10,8	18,8	16,4	23,0
	55 hodin	0,2	7,4	11,8	10,2	15,2	25,4
	70 hodin	5,6	7,2	11,6	15,8	17,4	23,0

ZÁVĚR

V předkládané práci se srovnávají tři provenience osiv: certifikované ekologické, konvenční nemořené a 2 x farmářské osivo. Výsledky potvrzují převažující přednosti certifikovaných ekologických a konvenčních nemořených osiv před farmářskými, zejména farmářskými horšími proveniencemi.

Poděkování. Práce vznikla za podpory projektu NAZV Q191C123 a za podpory záměru MZE 0002700604.

LITERATURA

- KONVALINA, P., MOUDRÝ, J. (2007): Volba odrůdy, struktura pěstování a výnosu hlavních obilnin v ekologickém zemědělství. In: Sborník konference "Ekologické zemědělství 2007", 6.2. – 7.2. 2007, ČZU Praha, s. 67-69, ISBN: 978-80-213-1611-9
- BLÁHA, L.: Význam vlastností semen trav pro hodnocení suchovzdornosti, Úroda 10, 2009, s. 49-51)
- BLÁHA, L., LASKAFELD, D., STEHNO, Z., CAPOUCHOVÁ, I., KONVALINA, P.: Hodnocení vlastností a praktického použití certifikovaných a farmářských osiv u obilnin. In: Osivo a sadba, sborník referátů, 10.2. 2011, X. odborný a vědecký seminář, ČZU Praha, s. 50-56., ISBN 978-80-213-2153-3

Adresy autorů:

Ing. Ladislav Bláha, CSc., Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Drnovská 507, 161 06 Praha - 6 Ruzyně, lblaha@vurv.cz; Ing. Martina Leskocová, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, Studentská 13, 370 05 České Budějovice, leskocova.martina@gmail.com; Ing. Zdeněk Stehno, CSc., Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Drnovská 507, 161 06 Praha - 6 Ruzyně, stehno@vurv.cz; doc. Ing. Ivana Capouchová, CSc., Česká zemědělská univerzita, Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, Kamýcká 129, 165 21 Praha 6, capouchova@af.czu.cz

VPLYV N A SE VÝŽIVY NA OBSAH MAKROŽIVÍN V ZRNE OVSA SIATEHO

EFFECT OF N AND SE FERTILIZATION ON THE CONTENT OF MACRONUTRIENTS IN A GRAIN OF COMMON OATS

DANIELA DVONČOVÁ¹, PETER KOVÁČIK², PETER HOZLÁR¹

¹CVRV Piešťany – VŠS Vígľaš-Pstruša, ²Katedra agrochémie a výživy rastlín, SPU Nitra

The small-plot experiment fertilization was established in the years 2007–2009 in the field Research-Breeding Station Vígľaš-Pstruša. The sowing was implemented in a sowing succession after red clover. The soil type is pseudogley. The trial has observed the effect of nitrogen and selenium fertilization on macronutrient (N, P, K, Ca, Mg) content of common oats variety Vendelin. The experiment included 9 nutritional treatments with fertilization before sowing (N) and during vegetation period – at the end of the stooling period (N and Se - form of selenate sodium). N-fertilization (independently of a dose and date of application) increased the content of N, K, Ca; reduced the content of P in an oats grain. N content in an oats grain was positively influenced by the selenium application during vegetation together with nitrogen in a common dose of 15 kg.ha⁻¹. The application of selenium reduced the content of Ca in an oats grain.

Key words: oats, fertilization, nitrogen, selenium, macronutrients

ÚVOD

Ovos je zaujímavou a svojím spôsobom jedinečnou kultúrnou plodinou, ktorá sa vďaka priaznivému chemickému zloženiu zrna, stále viac tlačí do popredia. Popri vysokému obsahu bielkovín, tukov a vlákniny sa ovos vyznačuje tiež relatívne vysokým obsahom minerálnych látok (Ca, P, Mg, Fe a i.). Obsah minerálnych látok v ovse je vyšší ako u ostatných obilnín. Podľa Čermáka a Láda (2001) obsahuje ovos plevnatý o 30 % viac popolovín v porovnaní so pšenicom. Uvádza sa, že vysoký obsah minerálnych prvkov podporuje pružnosť pokožky, zlepšuje kvalitu vlasov a zlepšuje duševnú aktivitu. Minerálne látky a vitamíny sú koncentrované predovšetkým v obalových vrstvách a zárodku zrna ovsu, ale vzhľadom k tomu, že ovos je spravidla konzumovaný v celozrnej forme, tieto látky sú v ňom zachované (Capouchová a Petr, 2004; Zhu et.al, 2004). Ich obsah v zrne je závislý od lokality a spôsobu pestovania (Dostálová, 1992).

Závislosť obsahu minerálnych látok od vplyvu prostredia a od výživy je významná, preto by sme radi touto prácou poukázali na možnosti ich ovplyvnenia.

MATERIÁL A METÓDY

Poľný pokus bol realizovaný v rokoch 2007–2009 na VŠS Vígľaš-Pstruša pri CVRV Piešťany. Pokusné stanovište je charakterizované ako zemiakovo-pšeničný výrobný typ (375 m n. m.), s priemernou ročnou teplotou 7,6 °C a ročným úhrnom zrážok 610 mm. Priemerná teplota a úhrn zrážok za vegetačné obdobie (IV. – IX.) v roku 2007 bola 15,89 °C a 337,4 mm, v roku 2008 15,37 °C a 354,2 mm a v roku 2009 16,09 °C a 277,8 mm.

V pokuse bola vysiatá žltozrná plevnatá odroda Vendelin vyšľachtená na VŠS Vígľaš – Pstruša. Sejba sa uskutočnila v oševnom slede po ďateline lúčnej s výsevom 5,0 mil. klíčivých zŕn na ha. Genetický pôdny typ pseudoglej kultizemný (tab. 1).

Tabuľka 1: Základné agrochemické parametre pôdy

Analýzy pôdy	Obsah v roku 2007 hon Kostolisko I	Obsah v roku 2008 hon Tri duby E	Obsah v roku 2009 hon Kostolisko II
pH _{KCl}	5,12	6,35	5,28
Nan (mg.kg ⁻¹)*	15,4*	14,2*	11,9*
P (mg.kg ⁻¹)	55,9	72,5	47,0
K (mg.kg ⁻¹)	130,0	119,5	105,8
Mg (mg.kg ⁻¹)	226,0	242,5	295,5
Ca (mg.kg ⁻¹)	1625,0	2437,5	2197,5
Humus (%)	1,03	1,52	1,19

pH_{KCl}-(potenciometricky vo výluhu 1,0 M KCl); Nan-[početne ako suma N-NH₄⁺ + N-NO₃⁻ (N-NH₄⁺ kolorimetricky, Nesslerovo činidlo a N-NO₃⁻ kolorimetricky, kyselina fenol 2,4-disulfónová)]; P-(kolorimetricky, Mehlich II-rok 2007; spektrofotometricky, Mehlich III-rok 2008, 2009); K-(plameňová fotometria, Mehlich II-rok 2007; plameňovú emisnú spektrofotometriou, Mehlich III-rok 2008, 2009); Ca-(plameňová fotometria, Mehlich II-rok 2007; atómovou spektrofotometriou, Mehlich III-rok 2008, 2009); Mg-(atómový absorpčný spektrofotometer, Mehlich II-rok 2007; atómovou spektrofotometriou, Mehlich III-rok 2008, 2009); humus-(ako oxidovateľný uhlík, Tjurin).

* - obsah Nan v pôde na jar tesne pred založením pokusu

Na základe obsahu N_{an} v pôde boli aplikované rôzne dávky N hnojív, pri jednotnej P a K výžive na úrovni nahradzovacieho hnojenia (aplikované jednorázovo na jeseň). Dusík vo forme LAD (27% N) bol aplikovaný pred sejbou na plánovanú úrodu 4 t.ha⁻¹ (varianty N₁, N₂; tab. 2). Vo fáze koniec odnožovania (BBCH 29) bol foliárne aplikovaný N (15 kg.ha⁻¹) vo forme DAMu-390 a Se (5–10 g.ha⁻¹) vo forme selénanu sodného.

Tabuľka 2: Dávky aplikovaných hnojív počas trojročného pokusu (2007 – 2009)

Varianty	Dávky aplikovaných hnojív												
	Rok 2007				Rok 2008				Rok 2009				
	N	Se	P	K	N	Se	P	K	N	Se	P	K	
	kg.ha ⁻¹	g.ha ⁻¹	kg.ha ⁻¹	kg.ha ⁻¹	kg.ha ⁻¹	g.ha ⁻¹	kg.ha ⁻¹	kg.ha ⁻¹	kg.ha ⁻¹	g.ha ⁻¹	kg.ha ⁻¹	kg.ha ⁻¹	
1	PK	0	0	24	96	0	0	12	96	0	0	12	96
2	N ₁ PK	47	0	24	96	54	0	12	96	56	0	12	96
3	N ₂ PK	35	0	24	96	40	0	12	96	45	0	12	96
4	N ₁ PK+N	47 + 15*	0	24	96	54 + 15*	0	12	96	56 + 15*	0	12	96
5	N ₂ PK+N	35 + 15*	0	24	96	40 + 15*	0	12	96	45 + 15*	0	12	96
6	N ₁ PK+Se	47	5*	24	96	54	5*	12	96	56	10*	12	96
7	N ₂ PK+Se	35	5*	24	96	40	5*	12	96	45	10*	12	96
8	N ₁ PK+N+Se	47 + 15*	5*	24	96	54 + 15*	5*	12	96	56 + 15*	10*	12	96
9	N ₂ PK+N+Se	35 + 15*	5*	24	96	40 + 15*	5*	12	96	45 + 15*	10*	12	96

* – dusík a selén aplikovaný počas vegetácie vo fáze koniec odnožovania (BBCH 29)

VÝSLEDKY A DISKUSIA

V zrne plevnatého ovsa odrody Vendelin v priemere celého pokusu bol stanovený nasledovný priemerný obsah živín N 1,91 %; P 0,37 %; K 0,45 %; Ca 0,15 % a Mg 0,18 %.

Aplikácia dusíka vo variantoch pokusu učebnicovo zvyšovala obsah dusíka v zrne ovsa, čím sa potvrdil vysoko štatisticky preukazný vplyv variantov na obsah dusíka v zrne ovsa. Prihnojenie dusíkom počas vegetácie v štandardnej dávke 15 kg.ha⁻¹ zvyšovalo obsah dusíka v zrne, aj keď nepreukazuje (var. 4 vers. var. 2, var. 3 vers. var. 5; tab. 3). Selén aplikovaný počas vegetácie vo fáze koniec odnožovania (BBCH 29) podporil príjem dusíka zrnom.

Tabuľka 3: Vplyv variantov výživy na obsah živín v zrne ovsa siateho v priemere troch pokusných ročníkov

Varianty výživy	N		P		K		Ca		Mg		
	mg.kg ⁻¹	Rel.%	mg.kg ⁻¹	Rel.%	mg.kg ⁻¹	Rel.%	mg.kg ⁻¹	Rel.%	mg.kg ⁻¹	Rel.%	
1	PK	17828a	100,0	3832b	100,0	4412a	100,0	1461abc	100,0	1740a	100,0
2	N ₁ PK	19069bc	107,0	3798b	99,1	4483a	101,6	1619d	110,8	1917ab	110,2
3	N ₂ PK	18825b	105,6	3804b	99,3	4478a	101,5	1557bcd	106,6	2070b	118,9
4	N ₁ PK+N	19206bcd	107,7	3736b	97,5	4481a	101,6	1570cd	107,5	1673a	96,1
5	N ₂ PK+N	19032bc	106,8	3742b	97,7	4531a	102,7	1490abc	102,0	1838ab	105,6
6	N ₁ PK+Se	18817b	105,6	3772b	98,4	4458a	101,0	1457ab	99,7	1703a	97,9
7	N ₂ PK+Se	19566cd	109,7	3498a	91,3	4431a	100,4	1433a	98,1	1706a	98,0
8	N ₁ PK+N+Se	19671cd	110,3	3859b	100,7	4571a	103,6	1452ab	99,4	1777a	102,1
9	N ₂ PK+N+Se	19888d	111,6	3678ab	96,0	4472a	101,4	1395a	95,5	1874ab	107,7
Priemer		19100	107,2	3747	97,8	4480	101,5	1493	102,2	1811	104,1
Variant DT _{0,05}		727,28		207,06		411,01		111,29		259,85	
DT _{0,01}		963,04		274,18		544,24		147,37		344,08	
Roky DT _{0,05}		419,90		119,54		237,30		64,26		150,03	
DT _{0,01}		556,01		158,30		314,22		85,08		198,66	

Poznámka: písmená (a, b, c, d) vyjadrujú štatisticky preukazný rozdiel na hladine preukaznosti $\alpha = 0,05$ (LSD test)

Vplyv variantov pokusu na obsah fosforu v zrne ovsa bol štatisticky preukazný (ANOVA). Významné zníženie obsahu fosforu v zrne, v porovnaní s nehnojenou kontrolou, bolo zaznamenané v sumári troch pokusných ročníkov len vo variante hnojenom dávkou dusíka vypočítanou podľa informácie o obsahu N_{an} v hĺbke 0,0 – 0,6 m za predpokladu 50 % využitia stanoveného anorganického dusíka z pôdy spolu s aplikáciou selénu počas vegetácie v dávke 5 a 10 g.ha⁻¹. V ostatných variantoch sa obsah fosforu v zrne nevýznamne znížil v porovnaní s nehnojenou kontrolou (var. 1).

Obsah draslíka v zrne ovsa siateho v sumári troch rokov pokusu bol štatisticky nevýznamne ovplyvnený variantami pokusu. Rovnako neboli zaznamenané štatisticky preukazné rozdiely medzi jednotlivými variantami pokusu (tab. 3). Predsejbové hnojenie dusíkom nevýznamne zvyšovalo obsah draslíka v zrne ovsa. Prihnojenie dusíkom počas vegetácie (BBCH 29) v štandardnej dávke 15 kg.ha⁻¹ zvyšovalo obsah draslíka v zrne, aj keď nepreukazuje. Obsah draslíka v zrne nebol ovplyvnený foliárnou aplikáciou selénu na konci odnožovania (BBCH 29). Z uvedených zistení vyplýva, že hnojenie dusíkom, nezávisle od výpočtu predsejbovej dávky dusíka a prihnojenia počas vegetácie zvyšovalo obsah draslíka v zrne ovsa, čo potvrdzujú aj výsledky Givensa et al. (2004), ktorí uvádzajú, že použitím optimálneho množstva dusíkatého hnojiva bolo pozorované zvýšenie koncentrácie draslíka.

Vplyv variantov pokusu mal štatisticky preukazný vplyv na obsah vápnika v zrne ovsa. Rovnako v rámci jednotlivých variantov pokusu sa zistili významné rozdiely. Hnojenie dusíkom, nezávisle od výpočtu jeho predsejbovej dávky a prihnojenia alebo neprihnojenia počas vegetácie (var. 2 – 5), zvyšovalo obsah vápnika v zrne ovsa oproti nehnojenej kontrole (var. 1), kým prihnojenie selénom počas vegetácie jednoznačne znižovalo obsah vápnika, aj keď nepreukazuje (var. 6 – 9 vers. var. 1).

Obsah horčička v zrne ovsa bol v sumári troch rokov nevýznamne ovplyvnený variantami hnojenia, čo sa zhoduje s výsledkami Eurola et al. (2004), ktorí uvádzajú, že hnojenie dusíkom nemá vplyv na obsah horčička v zrne.

Pokusom sa potvrdil vysoko štatisticky preukazný vplyv pokusného ročníka na obsah makroživín v ovsenom zrne.

ZÁVER

Hnojenie dusíkom nezávisle na dávke a termíne aplikácie, realizované samostatne alebo súčasne so suplementáciou selénom, zvyšovalo obsah N v zrne ovsa.

Najvyššie obsahy N boli zistené v tých variantoch, v ktorých, nezávisle od toho, z akej hĺbky sa odoberala vzorka pôdy pre výpočet dávok dusíka (0,0 – 0,3 m, resp. 0,0 – 0,6 m) pre základné predsejbové hnojenie, bolo vo fáze BBCH 29 vykonané i prihnojenie dusíkom v dávke 15 kg.ha⁻¹ spojené so suplementáciou selénom v dávke 5 a 10 g.ha⁻¹.

Potvrdilo sa, že hnojenie dusíkom znižuje obsah fosforu a zvyšuje obsah draslíka a vápnika v zrne ovsa.

Obsah draslíka v zrne pozitívne ovplyvnili všetky v pokuse realizované hnojenia.

Aplikácia selénu počas vegetácie, nezávisle od prihnojenia alebo neprihnojenia dusíkom mala tendenciu znižovať obsah vápnika v zrne ovsa siateho.

LITERATÚRA

- CAPOUCHOVÁ, I. – PETR, J. 2004. Kvalita ovsa a možnosti jeho využitia pro bezlepkovú diétu. In *Úroda*, 2004, č. 4, s. 30-31.
- ČERMÁK, B. – LÁD, F. 2001. Porovnaní stravitelnosti a výživné hodnoty vybraných zrnin. In *Krmovinářství*, 2001, č. 4, s. 21-22.
- DOSTÁLOVÁ, J. 1992. *Uplatnění ovsa v lidské výživě*. Praha : Ústav vědeckých informací pro zemědělství, 1992. 44 s.
- EUROLA, M. – KONTTURI, M. – TUURI, H. 2004. Effect of nitrogen fertilization on the phytic acid, mineral and trace element contents of oats. In *Proceedings 7th International Oat Conference*. Finland, 2004, 218 p. ISBN 951-729-879-X.
- GIVENS, D. I. – DAVIES, T. W. – LAVERICK, R. M. 2004. Effect of variety, nitrogen fertiliser and various agronomic factors on the nutritive value of hulled and naked oats grain. In *Animal Feed Science and Technology*, vol. 113, 2004, p. 169-181.
- ZHU, S. – ROSSNAGEL, B. G. – KAEPLER, H. F. 2004. Genetic analysis of quantitative trait loci for groat protein and oil content in oat. In *Crop Science*, vol. 44 (1), 2004, p. 254-260.

Kontaktné adresy:

Ing. Daniela Dvončová, CVRV, VÚRV Piešťany, VŠS Vígl'áš – Pstruša, 962 12 Detva, Slovakia, E-mail: dvoncova@vurv.sk

doc. Ing. Peter Kováčik, CSc., Katedra agrochémie a výživy rastlín, SPU Nitra, Tr. A. Hlinku 2, 949 01 Nitra, Slovakia, E-mail: peter.kovacik@uniag.sk

Ing. Peter Hozlár, PhD., CVRV, VÚRV Piešťany, VŠS Vígl'áš – Pstruša, 962 12 Detva, Slovakia, E-mail: hozlar@vurv.sk

CHARAKTERIZÁCIA GENOTYPOV KOLEKÍCIE ZRNA PŠENICE POMOCOU ZÁSOBNÝCH BIELKOVÍN

CHARACTERIZATION OF GENOTYPES OF GRAIN WHEAT COLLECTION BY STORAGE PROTEINS

EDITA GREGOVÁ, SVETLANA ŠLIKOVÁ

Centrum výskumu rastlinnej výroby Piešťany

Wheat endosperm storage proteins, namely gliadins and glutenins, are the major components of gluten. They play an important role in dough properties and in bread making quality in various wheat varieties. All 44 accessions originating from different geographical areas of world were evaluated for high molecular weight glutenin subunit (HMW-GS) and T1BL.1RS wheat-rye translocation using SDS-PAGE and A-PAGE. The data indicated the prevalence of the allele 0 (56%), allele 1 (25%) and allele 2* (19%) at the *Glu-1A* and eight alleles, namely 7+9 (37%), 7+9 (32%), 6+8 (9%), 7 (9%), 17+18 (7%) 14+15 (2%), 13+16 (2%) and 20 (2%) represented the *Glu-1B*. Existence of 3 alleles at the locus *Glu-1D* was revealed, in fact 64% of them showed the subunit pairs *Glu-1D* 5+10 correlated with good bread making properties. On the basis of electrophoretic separation of gliadin fraction it was found that only six genotype contained T1BL.1RS wheat-rye translocation. There were observed 20 different HMW-GS encoded by 14 alleles or allelic pairs in wheat genetic collection. The most frequent HMW-GS alleles were "0" for *Glu-1A*, 7+9 for *Glu-1B* and 5+10 for *Glu-1D*, respectively. The *Glu-score* ranged from 3 to 10. The *Rye-score* in the accessions varied in broad range, six of the genotypes (Blazer, IS Apage, Novozvesda, P2-17, Streretz and Znakhidka) reached the maximum value 10.

Keywords: glutenin, gliadin, SDS-PAGE, A-PAGE

ÚVOD

Pšenica je najpestovanejšou a ekonomicky najvýznamnejšou poľnohospodárskou plodinou v hospodársky najvyspelejších štátoch sveta. Z hľadiska ľudskej výživy má medzi cereáliami výsadné postavenie, nakoľko je základnou potravinou, a teda primárnym zdrojom živín, pre značnú časť ľudskej populácie. Preto aj úsilie šľachtiteľov vedie k stálemu zlepšovaniu vlastností pšenice, čo je spojené s vytváraním a pestovaním veľkého počtu nových odrôd. Je známe, že bielkovinová frakcia hrá najdôležitejšiu úlohu pri výrobe chleba (Gálová et al., 1998). Chlebopekárska kvalita koreluje s prítomnosťou alebo absenciou určitých bielkovín. Každý genotyp pšenice obsahuje jednu alelu, resp. tzv. komplexnú alelu (alelický pár) na každom homeologickom chromozóme skupiny 1. Genómy odrôd pšenice ponúkajú dostupný a vysoko efektívny polymorfický systém genetických markerov. Vhodnými bielkovinovými markermi pri pšenici sú zásobné bielkoviny endospermu - gliadiny a gluteníny (Bradová et al., 2005). HMW-GS sú kódované alelami lokusov *Glu-1*, lokalizovaných na dlhých ramenách chromozómov 1 homeologickej 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 podjednotky y s vyššou relatívnou molekulovou hmotnosťou. Hexaploidná pšenica môže preto teoreticky obsahovať 6 rôznych HMW-GS. V skutočnosti, v dôsledku zoslabenia niektorých génov, je počet HMW-GS päť a menej. Počet vzájomných kombinácií je relatívne pestrý.

MATERIÁL A METÓDY

Pre elektroforetické analýzy zásobných bielkovín boli použité vzorky dodané z Génovej banky Piešťany, celkom 44 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 - prolaminov, sme použili štandardnú referenčnú metódu ISTA v kyslom prostredí (Draper, 1987). Bodová hodnota predikcie pekárskej akosti bola stanovená podľa publikovaných výsledkov (PAYNE & LAWRENCE 1983).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Pomocou elektroforetických metód sme analyzovali variabilitu vysokomolekulových glutenínových podjednotiek, homogenitu bielkovinových profilov a stanovili sme hodnoty *Glu-skóre* a *Ražné skóre*, na základe ktorých bolo možné predikovať chlebopekársku kvalitu odrôd. Výsledkom bielkovinových analýz pšenice boli údaje o prítomnosti jednotlivých vysokomolekulových glutenínových podjednotiek, resp. génov lokusov *Glu-1A*, *Glu-1B*, *Glu-1D*, ktoré ich kódujú, a tiež údaj o prítomnosti, resp. neprítomnosti hospodársky významného gliadínového bloku *Gli-1B3*. Najfrekvencovanejšími alelami jednotlivých lokusov v odrodách *Triticum aestivum* L. ssp. *aestivum* tohto súboru boli : alela 0 (lokus *Glu-1A*), alela 7+9 (*Glu-1B*) a alela 5+10 (*Glu-1D*). Jednotlivé HMW-GS a ich kombinácie sa v genotypoch pšenice vyskytujú s rôznou frekvenciou. V moderných, kvalitných odrodách sa však ich spektrum zužuje a najfrekvencovanejšími sú často tie, ktoré majú najvyšší vplyv na kvalitu múky. Neplatí to však všeobecne a v pšeniciach jednotlivých štátov sú niekedy veľké rozdiely, odrážajúce jednak históriu šľachtenia pšenice a samozrejme samotnú chlebopekársku kvalitu ich pšeníc. Ražné translokácie

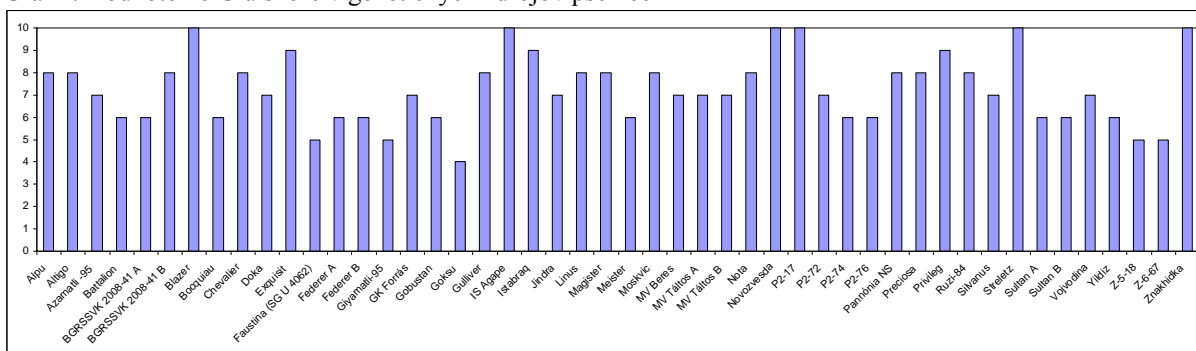
však na chlebopekársku kvalitu nemajú priaznivý účinok. Cesto vyrobené z takejto múky je nežiaduco lepivé, čo spôsobuje technologické problémy vo výrobe. Bolo dokázané, že tento problém nespôsobuje koncentrácia ražných bielkovín ale prítomnosť určitých typov ražných bielkovín - sekalínov, kódovaných 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 ražnou translokáciou majú vyšší obsah bielkovín ale štatisticky významne nižšiu SDS-sedimentačnú hodnotu. To čo v dôsledku translokácie T1BL.1RS nevyhovuje pri výrobe chleba, teda zvýšená lepivosť cesta, nie je prekážkou pri výrobe pečivárskych a cukrárenských výrobkov. Za podjednotky s najpozitívnejším vplyvom na chlebopekársku kvalitu sa považuje pár HMW-GS 5+10. Podjednotky *Glu-1A* 1 a *Glu-1A* 2* sú lepšie ako *Glu-1A* 0, ale iba v kombinácii s *Glu-1D* 5+10. Alelický blok *Glu-1A* 1, prítomný v 11 genotypoch, bol kombinovaný s *Glu-1D* 5+10 v 7 prípadoch. Väčšina genotypov, až 56 %, mala v lokuse *Glu-1A* podjednotku 0, t.j. vzťah k monitorovaniu horšej pekárskej akosti. Na základe stanovenia bielkovinových génov boli vyhodnotené genotypy a 6 genotypov (Blazer, IS Apage, Novozvesda, P2-17, Streret a Znakhodka) z nich dosiahli maximálnu hodnotu *Glu-skóre* aj *Ražné-skóre* (10).

ZÁVER

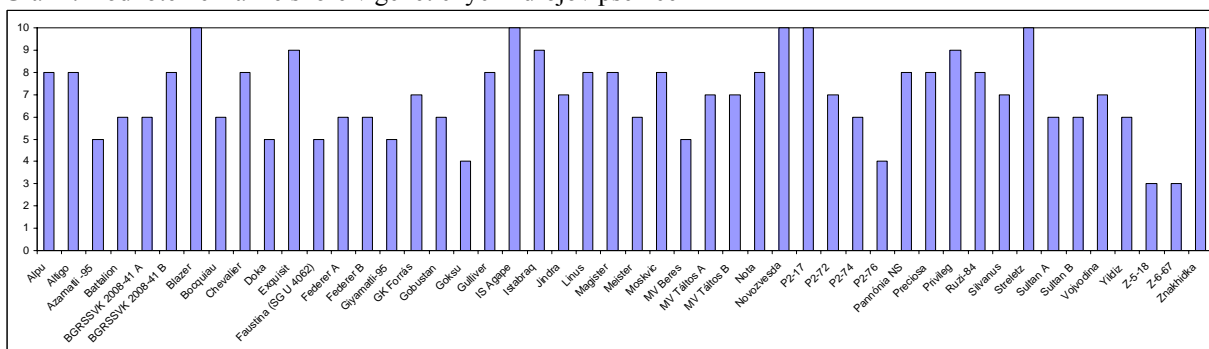
Využitie molekulárnych markerov umožňuje racionalizovať systém výberu genetických zdrojov do šľachtienia na kvalitu a na rozšírenie genetickej diverzity v nových odrodách. Začlenenie elektroforetických analýz zásobných bielkovín pšenice je vhodným pracovným nástrojom šľachtiteľov nielen pri výbere rodičovských komponentov ale i pri kontrole biologického materiálu vo vyšších stupňoch šľachtienia.

Podakovanie: Táto 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 Glu skóre v genetických zdrojov pšenice



Graf 1: Hodnotenie Ražné skóre v genetických zdrojov pšenice



LITERATÚRA

- BRADOVÁ, J., Šašek, A., 2005. Diversity of gliadins and HMW glutenin subunits in Czech registered wheat varieties. *Czech Journal of Genetic and Plant Breeding*. 41 /Special Issue/, 2005, 160-163.
- 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.
- Gálová, Z., Smolková, H., Michalík, I., Gregová, E. 1998. Predikcia pekárskej kvality zrna pšenice podľa elektroforetického spektra HMW gluteninových podjednotiek. *Rostlinná výroba*, 44, 111-116.

- 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

VÍRUSY PŠENICE A JAČMEŇA NA ÚZEMÍ SLOVENSKA.

VIRUSES OF WHEAT AND BARLEY ON THE TERRITORY OF SLOVAKIA.

OTAKAR KÚDELA, VIERA VAJCIKOVÁ¹

Virologický ústav, Slovenská akadémia vied, Dúbravská cesta 9, 84505 Bratislava

¹Ústredný kontrolný a skúšobný ústav poľnohospodársky, Matúškova 21, 83316 Bratislava

In this contribution are presented the results of monitoring and detection of the wheat and barley viruses in Slovakia. The survey was realized by means of the research projects solved by Institute of Virology and phytosanitary control of the Central Controlling and Testing Institute in Agriculture during the period 2001-2010. During this period we identified *Barley yellow dwarf virus* – PAV, *Barley yellow dwarf virus* – RMV, *Cereal yellow dwarf virus* – RPV, and *Wheat dwarf virus*. For the first time was proven the occurrence of *Wheat streak mosaic virus* (WSMV). Moreover, the molecular analysis of Slovak and other European WSMV isolates demonstrated that these isolates constitute a specific phylogenetic group. The occurrence of *Soil borne cereal mosaic virus* and *Barley yellow mosaic virus* needs to be confirmed still. The tests for the presence of *Barley mild mosaic virus*, *Soil borne wheat mosaic virus*, *Wheat yellow mosaic virus* and *Wheat spindle streak mosaic virus* were negative. By now this is the most complex information on the incidence of wheat and barley viruses on the territory of Slovakia.

Key words : viruses, wheat, barley

ÚVOD

Vírusy predstavujú trvalý rizikový faktor pre pestovateľské oblasti obilnín na celom svete. Hoci spektrum vírusových druhov zistených na území Slovenska a rozsah škôd spôsobených infekciou nie sú tak rozsiahle ako v niektorých iných krajinách, vírusy obilnín by mali byť pod trvalou kontrolou ako z dôvodu možnej introdukcie nových vírusových druhov a izolátov, vektorov a burinných hostiteľov tak i možného sezónneho premnoženia vektorov cirkulujúcich na území Slovenska.

Na území Európy sa doposiaľ zistilo početné spektrum vírusových druhov infikujúcich obilniny. Zo skupiny pôdou prenosných vírusov to boli *Soil borne cereal mosaic virus* (SBCMV), *Soil borne wheat mosaic virus* (SBWMV), *Barley yellow mosaic virus* (BaYMV), *Barley mild mosaic virus* (BaMMV), *Oat mosaic virus* (OMV), *Wheat spindle streak mosaic virus* (WSSMV) a *Wheat yellow mosaic virus* (WYMV). Ďalšou skupinou sú vírusy prenášané hmyzom (napr. vošky, cikády, roztoče) – *Barley yellow dwarf virus* (BYDV), *Cereal yellow dwarf virus* (CYDV), *Wheat dwarf virus* (WDV), *Wheat streak mosaic virus* (WSMV) a *Oat necrotic mottle virus* (ONMV) (Ordon et al., 2009). Podľa súčasnej klasifikácie sú vírusy, ktoré spôsobujú ochorenie žltej zakrpatenosti jačmeňa rozčlenené do vírusových druhov – BYDV-PAV, BYDV-MAV, BYDV-PAS (rod *Luteovirus*), BYDV-RMV, BYDV-GPV, BYDV-SGV (nezaradené druhy v rámci čeľade *Luteoviridae*), CYDV-RPV a CYDV-RPS (rod *Polerovirus*) (Ordon et al., 2009).

Na území Slovenska boli vírusy jačmeňa a pšenice zistené už v 60. rokoch minulého storočia (Dlabola, 1960, Vacke, 1961) avšak podrobnejší prieskum sa začal realizovať od r. 2001.

MATERIÁL A METÓDY

Vzorky pšenice a jačmeňa (celé rastliny) boli zozbierané v rôznych časových obdobiach (väčšinou február až júl, október a november) v rôznych okresoch a krajoch Slovenska hlavne z osiatych plôch so zvýšenou incidenciou vektorov, hostiteľských burín a výdrolov a viac či menej špecifických príznakov.

Na identifikáciu vírusov sa aplikovala metóda double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (DAS- ELISA) (Clark & Adams, 1977) použitím komerčných diagnostických súprav (Sanofi, Loewe-Biochemica, Neogen, Adgen). Časť vzoriek sme testovali technikami polymerázovej reťazovej reakcie (PCR) aplikáciou našich alebo publikovaných oligonukleotidových sond (Schubert et al., 2002, Kúdela et. al., 2008).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

DAS-ELISA testy použitím komerčných súprav na detekciu BYDV-PAV, BYDV-RMV a CYDV-RPV demonštrovali vo vyšetrených vzorkách prítomnosť všetkých troch vírusových druhov. Vo väčšine prípadov boli vírusy zistené v ozimnej pšenici a jačmeni. Infekcia sa prejavila viac či menej typickými príznakmi, hlavne

zakrpatenosťou, žltnutím listov, redukciou koreňového systému alebo červenaním vrcholu vlajkového listu. Prítomnosť vírusu sa zistila tiež v bezpríznakových vzorkách.

Viacere vzorky boli infikované 2-3 vírusovými druhmi. Vysoký výskyt BYDV druhov bol zistený napr. v r. 2002, kedy niektoré vysiate plochy museli byť na jar zaorané (Kormanová, 2003). Vysoký výskyt BYDV druhov sme zaznamenali tiež v r. 2008.

Výšetrenie vzoriek obilnín na prítomnosť vírusu zakrpatenosti pšenice (WDV) ukázalo, že frekvencia výskytu tohto vírusu bola v sledovanom období nižšia než v prípade BYDV druhov (45-58% pozitívnych vzoriek v rokoch 2001, 2007 a 2009). Typickými príznakmi pozitívnych vzoriek bola zakrpatenosť a žltnutie listov. WDV bol tiež zistený aj u bezpríznakových vzoriek a relatívne časté boli zmesné infekcie WDV-BYDV (CYDV). Zistilo sa, že WDV sa vyskytuje vo forme adaptovanej na pšenicu a vo forme adaptovanej na jačmeň (Schubert et al., 2002). Aplikáciou publikovaných primerov sme pretestovali niekoľko WDV pozitívnych vzoriek v PCR. V jednom prípade bola zistená pšeničná forma (Kúdela, nepublikované).

Významným patogénom obilnín je vírus čiarkovitej mozaiky pšenice - WSMV. Na území Slovenska sme prítomnosť tohto vírusu v DAS-ELISE a RT-PCR prvýkrát zistili v r. 2007 (Kúdela et al., 2008). Sekvenčnou analýzou fragmentu kapsidovej bielkoviny (CP) sme zistili, že slovenské izoláty sú odlišné od väčšiny doposiaľ molekulárne charakterizovaných WSMV izolátov. V rámci medzinárodnej spolupráce sa následne analyzovala kolekcia izolátov z rôznych štátov Európy a zistilo sa, že analyzované izoláty obsahujú špecifickú deléciu a tvoria tak samostatnú fylogenetickú skupinu, typickú pre územie Európy. Navyše identifikovaná delécia umožnila vyvinúť špecifickú PCR-RFLP diagnostickú metódu (Gadiou et al., 2009)

ZÁVER

V priebehu obdobia 2001 – 2010 sme na území Slovenska zistili prítomnosť troch druhov (BYDV - PAV, BYDV – RMV, CYDV – RPV) vírusov žltej zakrpatenosti jačmeňa a vírusu zakrpatenosti pšenice (WDV). Potvrdilo sa, že za vhodných podmienok (klimatické podmienky, vektory, infikované buriny a výdroy) môže dôjsť k značnému rozšíreniu týchto vírusových druhov. Zásadným poznatkom je zistenie výskytu vírusu čiarkovitej mozaiky pšenice, čo naznačuje, že aj iné vírusové patogény jačmeňa a pšenice sa môžu vyskytovať alebo vyskytnúť na našom území.

Pod'akovanie: Táto práca bola podporená grantom VEGA 02/0200/09.

LITERATÚRA

- DLABOLA, J. 1960. Pozor na novou chorobu pšenice. Za vysokou úrodu vol. 17, pp. 403-405.
- CLARK, M., F – ADAMS, A., M. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assays. In J.gen. Virol., vol. 47, pp. 509-512.
- GADIOU, S. – KÚDELA, O. – RIPL, J. – RABENSTEIN, F. – KUBDU, J. K. – GLASA, M. 2009. An amino acid deletion in *Wheat streak mosaic virus* capsid protein distinguishes a homogeneous group of European isolates and facilitates their specific detection. In Plant Dis., vol. 93, pp. 1209-1213.
- KORMANOVÁ, T. 2003. Výskyt vírusu žltej zakrpatenosti jačmeňa a vírusu zakrpatenosti pšenice na obilninách. In Agrochémia vol., 43, pp. 13-17.
- KÚDELA, O.- KÚDELOVÁ, M. – NOVÁKOVÁ, S. – GLASA, M. 2008. First report of *Wheat streak mosaic virus* in Slovakia. In Plant Dis., vol.92, pp.1365.
- ORDON, F. – HABEKUSS, A. – KASTIRR, U. – RABENSTEIN, F. AND KUHNE, T. 2009. Virus resistance in cereals: source of resistance, genetics and breeding. In J. Phytopathology vol. 157, pp. 535-54
- SCHUBERT, J. – HABEKUSS, A. – RABENSTEIN, F. 2002. Investigation of differences between wheat and barley forms of *Wheat dwarf virus* and their distribution in host plants. In Plant Protection Sci., vol. 38, pp. 43-48.
- VACKE, J. 1961. Wheat dwarf virus. In Biol. Plant. Vol. 3, pp. 228 – 233.

Adresa autora:

RNDr. Otakar Kúdela, CSc, Virologický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, 84505 Bratislava,

Otakar.Kudela@savba.sk

Ing. Viera Vajcikovė, Ústredný kontrolný a skúšobný ústav poľnohospodársky, Matúškova 21, 83316 Bratislava

TAXÓN-ŠPECIFICKÉ MOLEKULÁRNE MARKERY U TETRAPLOIDNÝCH PŠENÍC

TAXON-SPECIFIC MOLECULAR MARKERS IN TETRAPLOID WHEATS

VERONIKA MICHALCOVÁ, PAVOL HAUTPVOGEL, MIROSLAV ŠVEC

Katedra genetiky, Prírodovedecká fakulta Univerzity Komenského, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava

Molecular evolution of tetraploid wheat has not been discovered yet because of complexity of polyploid genomes. There are two lines of tetraploid wheats: line that contains genomes AAGG, and line with AABB genomes. Diploid wheat *Triticum urartu* was donor of A genome for all two of these lines, but there are no diploid wheats containing B or G genome. Most probably these two genomes evolved from *Aegilops speltoides* S genome, but this theory has not been confirmed on molecular level. It is our main objective to discover molecular evolution of tetraploid wheat and to find diploid ancestors of B and G genomes and subspecies of *Triticum timopheevii* (AAGG) and *Triticum turgidum* (AABB). For these experiments we choose PCR method TERGAP (transposon element – resistance gene analog polymorphism). In first step we were searching for polymorphic markers specific for B and G genomes and for individual subspecies of tetraploid wheat. We identified 3 polymorphisms specific for G genome and 9 for B genome, than polymorphisms specific for subspecies *Triticum timopheevii* subsp. *timopheevii*, *T. turgidum* subsp. *polonicum*, *T. turgidum* subsp. *turgidum*, *T. turgidum* subsp. *dicoccoides* and one polymorphism specific for both subspecies *T. turgidum* subsp. *dicoccum* a *T. turgidum* subsp. *ispahanicum*.

Key words: tetraploid wheat, *Aegilops*, evolution, B genome, G genome, molecular markers, TERGAP

ÚVOD

Evolúcia pšenice je dlhý a komplexný dej. Pred 500-600 tisíc rokmi došlo k tetraploidizácii divých pšeníc, čo predstavovalo veľký zlom v ich evolúcii (Dvorak a Zhang 1990). Pred asi 8000 rokmi nastala u domestikovaných tetraploidných pšeníc ďalšia polyploidizácia, ktorá zvýšila počet chromozómových sád zo štyroch na šesť, čím vznikli hexaploidné druhy (Nesbitt a Samuel 1996). Hlavný vývoj kmeňa *Triticeae* bol definovaný práve odlišením od spoločného diploidného predka na diploidnej úrovni a konvergenciou na polyploidnej úrovni, zahŕňajúcou odlišené diploidné genómy. K vzniku polyploidných pšeníc výrazne prispeli rôzne druhy rodu *Aegilops*, čo potvrdili klasické analýzy aj moderné molekulárne metódy (Cox 1998).

Jednotlivé genómy pšeníc a mnohoštetov vznikli počas evolúcie chromozómovými prestavbami. U diploidných druhov sa vykytujú genómy A (pšenica), D, S, M, C, U, N a T (*Aegilops*). U polyploidných druhov boli objavené genómy B a G, ktoré sa však nevyskytujú u žiadneho z diploidných taxónov. Za donora A genómu pre polyploidné pšenice je považovaný ich diploidný príbuzný *Triticum urartu*. Donorom B a G genómov bol pravdepodobne *Aegilops speltoides*, nositeľ genómu S, z ktorého sa tieto genómy vyvinuli chromozómovými prestavbami (Kilian a kol. 2007).

Keďže na otázky týkajúce sa evolúcie a predkov tetraploidných pšeníc zatiaľ neexistujú celkom jasné odpovede, rozhodli sme sa na molekulárnej úrovni zrekonštruovať ich evolúciu a tak zistiť, ktoré taxóny sa podieľali na ich vzniku. Naším cieľom je pomocou metódy TERGAP získať dĺžkové polymorfizmy typické pre B a G genómy a pre jednotlivé taxóny. Tieto polymorfizmy použijeme na tvorbu špecifických SCAR markerov, pomocou ktorých polymorfizmy identifikujeme v genómoch diploidných mnohoštetov. Molekulárna metóda TERGAP je na identifikáciu takýchto polymorfizmov vhodná, pretože je založená na použití dvoch primerov s rôznym zameraním. Jeden z primerov bol odvodený z génov rezistencie (alebo z ich analógov) a druhý primer bol odvodený z retrotranspozónov typu *Claudia* a *Jeli*. Výber primerov odvodených z takýchto regiónov DNA je odôvodnený tým, že každý pšeničný taxón obsahuje gény rezistencie alebo ich analógy a až 80% pšeničného genómu tvoria repetitívne sekvencie, medzi ktoré patria aj retrotranspozóny, čo spôsobuje problémy s pokrytím celého genómu pri použití klasických markerových systémov, napríklad AFLP (Kilian a kol. 2007) alebo mikrosatelitov (Salina a kol. 2006), ktoré sa bežne používajú na detekciu diverzity u obilnín. Na štúdium evolúcie jednotlivých pšeničných genómov sa dajú aplikovať taktiež cytologické metódy (Rodriguez a kol. 2000; Maestra a Naranjo 1999). Efektívne sú aj metódy využívajúce spojenie molekulárnych a cytologických markerových systémov (Zhang a kol. 2004), čo dáva možnosť vzniku množstva ďalších výskumných metód.

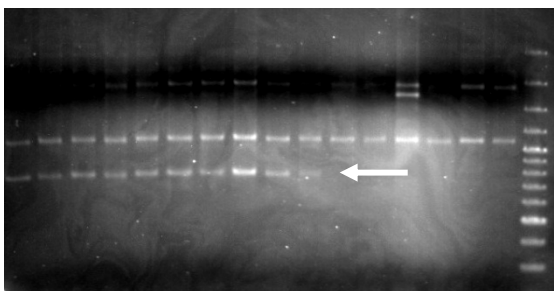
MATERIÁL A METÓDY

V experimentoch sme pracovali s 51 vzorkami tetraploidných pšeníc. Vzorky sme izolovali zo zŕn poddruhov *Triticum timopheevii* subsp. *timopheevii* (TIM), *Triticum timopheevii* subsp. *armeniicum* (ARM), *Triticum turgidum* subsp. *dicoccoides* (DCS), *Triticum turgidum* subsp. *dicoccum* (DIM), *Triticum turgidum* subsp. *ispahanicum* (ISP), *Triticum turgidum* subsp. *turgidum* (TRG), *Triticum turgidum* subsp. *carthlicum* (CAR), *Triticum turgidum* subsp. *durum* (DUR), *Triticum turgidum* subsp. *turanicum* (TRN) a *Triticum turgidum* subsp. *polonicum* (PLN).

Na analýzu vzoriek sme použili metódu TERGAP. Keďže sme sa chceli vyhnúť nešpecifickým produktom, použili sme hot start polymerázu TrueStart *Taq* (Fermentas). Reakčná zmes pre TERGAP pozostávala z nasledovných komponentov: 1 × zmes PCR pufrov 1:1 (GoTaq, Promega; TrueStart, Fermentas); 1 U *Taq* polymerázy (TrueStart, Fermentas); 2,0 mM MgCl₂; 0,25 mM dNTP; 0,4 μM primerov a 30 ng templátovej DNA v celkovom objeme 12,5 μl. Optimalizovali sme PCR cyklus s nasledovnými teplotnými charakteristikami: úvodná denaturácia pri 95°C (2 min); 34 cyklov s teplotami 94°C (45 sek), 54°C (45 sek), 72°C (2 min), záverečná polymerizácia pri 72°C (7 min). Výsledky TERGAP amplifikácie sme hodnotili elektroforeticky na 1,5% agarózovom géli, fragmenty sme separovali 2,5 h pri konštantnom napätí 100 V (3,5 V/cm vzdialenosti elektród).

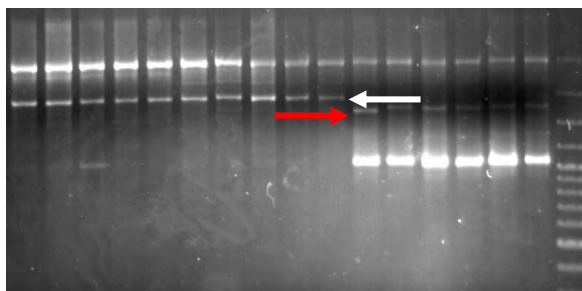
VÝSLEDKY A DISKUSIA

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 L



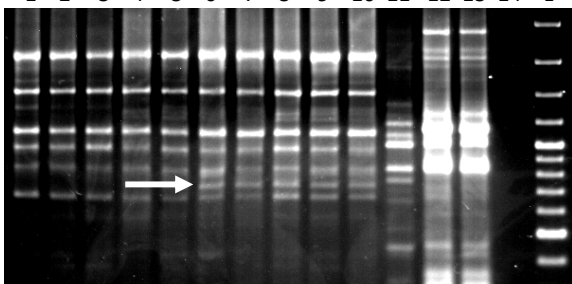
Obr. 1: Ukážka molekulárneho markera špecifického pre G genóm (šípka). Poradie vzoriek: 1-5 - *Triticum timopheevii* subsp. *armeniicum*, 6-10 - *Triticum timopheevii* subsp. *timopheevii*, 11-15 - *Triticum turgidum* subsp. *dicoccoides*, 16 - *Triticum turgidum* subsp. *dicoccum*, L - štandard molekulových hmotností.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 L



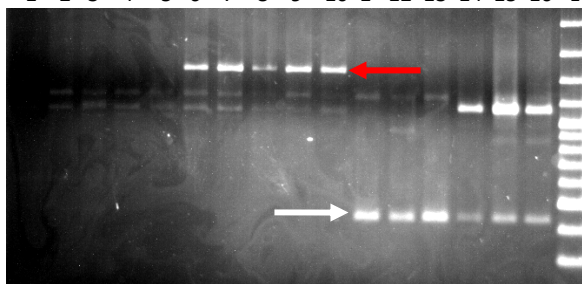
Obr. 2: Molekulárne markery špecifické pre G genóm (biela šípka) a pre B genóm (červená šípka). Poradie vzoriek: 1-5 - *Triticum timopheevii* subsp. *armeniicum*, 6-10 - *Triticum timopheevii* subsp. *timopheevii*, 11-15 - *Triticum turgidum* subsp. *dicoccoides*, 16 - *Triticum turgidum* subsp. *dicoccum*, L - štandard molekulových hmotností.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 L

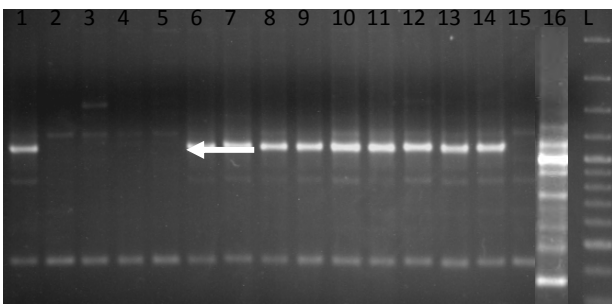


Obr. 3: Molekulárny marker špecifický pre poddruh *Triticum turgidum* subsp. *polonicum* (šípka). Poradie vzoriek: 1-4 - *T. turgidum* subsp. *turanicum* 5 - kamut, 6-10 - *T. turgidum* subsp. *polonicum*, 11 - *Aegilops cylindrica*, 12 - *T. urartu*, 13 - *T. urartu*, 14 - negat. kontrola, L - štandard molekulových hmotností.

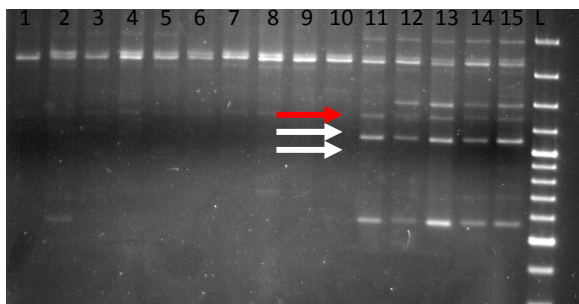
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 L



Obr. 4: Ukážka molekulárnych markerov špecifických pre B genóm (biela šípka) a pre poddruh *T. timopheevii* subsp. *timopheevii* (červená šípka). Poradie vzoriek: 1-5 - *T. timopheevii* subsp. *armeniicum*, 6-10 - *T. timopheevii* subsp. *timopheevii*, 11-15 - *T. turgidum* subsp. *dicoccoides*, 16 - *T. turgidum* subsp. *dicoccum*, L - štandard molekulových hmotností.



Obr. 5: Molekulárny marker špecifický pre poddruh *T. turgidum* subsp. *turgidum* (šípka). Poradie vzoriek: 1-5 - *T. turgidum* subsp. *turgidum*, 6-10 - *T. turgidum* subsp. *carthlicum*, 11-15 - *T. turgidum* subsp. *durum*, 16 - *T. turgidum* subsp. *turanicum*, L - štandard molekulových hmotností.



Obr. 6: Ukážka molekulárnych markerov špecifických pre B genóm (červená šípka) a pre poddruh *T. turgidum* subsp. *dicoccoides* (biela šípka). Poradie vzoriek: 1-5 - *T. timopheevii* subsp. *armeniicum*, 6-10 - *T. timopheevii* subsp. *timopheevii*, 11-15 - *T. turgidum* subsp. *dicoccoides*, L - štandard molekulových hmotností.

V našich experimentoch sme analyzovali 51 vzoriek patriacich do 10 poddruhov tetraploidných pšeníc. Celkovo sme doposiaľ vyhodnotili 17 reakcií TERGAP, pričom v každej z nich bola použitá iná kombinácia primerov. Vo vyhodnocovaných reakciách sme hľadali polymorfizmy špecifické pre B a G genómy, ako aj pre jednotlivé poddruhy. Zistili sme, že použité primerové kombinácie rozoznávajú celkovo 3 špecifické polymorfizmy pre G genóm (obr. 1, 2) a 9 špecifických polymorfizmov pre B genóm (obr. 2, 4, 6), z čoho tri polymorfizmy boli dĺžkové a 7 polymorfizmov spočívalo v prítomnosti/nepřítomnosti *bandu* určitej molekulovej hmotnosti. Tiež sa nám podarilo objaviť polymorfizmy špecifické pre poddruhy *Triticum timopheevii* subsp. *timopheevii* (obr. 4), *T. turgidum* subsp. *polonicum* (obr. 3), *T. turgidum* subsp. *turgidum* (obr. 5), *T. turgidum* subsp. *dicoccoides* (obr. 6) a špecifický polymorfizmus spoločný pre poddruhy *T. turgidum* subsp. *dicoccum* a *T. turgidum* subsp. *ispahanicum*. Zaujímavé je tiež zistenie, že dve vzorky z poddruhu *T. turgidum* subsp. *dicoccum* (pochádzajúce zo Slovenska) sa líšia od ostatných vzoriek tohoto druhu. Líšia sa práve nepřítomnosťou dvoch rôznych polymorfizmov špecifických pre B genóm. Je teda pravdepodobné, že tento polymorfizmus sa u ostatných analyzovaných vzoriek vyvinul až po oddelení slovenských genotypov. Je tiež možné, že tieto dva slovenské genotypy sú hybridné, čo by mohlo vysvetľovať ich odlišnosť od ostatných vzoriek daného poddruhu.

ZÁVER

Metóda TERGAP by mohla byť úspešná aj pri analýze vzoriek mnohoštetov (*Aegilops*), ktoré plánujeme využiť na rekonštrukciu evolúcie tetraploidných pšeníc.

Podarilo sa nám identifikovať 3 polymorfizmy špecifické pre G genóm a 9 polymorfizmov špecifických pre B genóm.

Taxón špecifické polymorfizmy sme identifikovali u štyroch z desiatich poddruhov (*Triticum timopheevii* subsp. *timopheevii*, *T. turgidum* subsp. *polonicum*, *T. turgidum* subsp. *turgidum*, *T. turgidum* subsp. *dicoccoides*) a jeden polymorfizmus bol spoločný pre dva poddruhy (*T. turgidum* subsp. *dicoccum* a *T. turgidum* subsp. *ispahanicum*).

Podakovanie. "Táto práca bola podporovaná Agentúrou na podporu výskumu a vývoja na základe zmlúv č. APVV-0770-07 a č. APVV-0197-10".

LITERATÚRA

- COX, T. S. 1998. Deepening the wheat gene pool. In *J. Crop Prod.*, vol. 1, 1998, pp. 1–25.
- DVORAK, J. – ZHANG, H. B. 1990. Variation in repeated nucleotide sequences sheds light on the phylogeny of the wheat B and G genomes. In *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 87, 1990, pp. 9640–9644.
- KILIAN, B. – OZKAN, H. – DEUSCH, O. – EFFGEN, S. – BRANDOLINI, A. – MARTIN, J. K. W. – SALAMINI, F. 2007. Independent wheat B and G genome origins in outcrossing *Aegilops* progenitor haplotypes. In *Mol. Biol. Evol.*, vol. 24, 2007, no. 1, pp. 217–227.
- MAESTRA, B. – NARANJO, T. 1999. Structural chromosome differentiation between *Triticum timopheevii* and *T. turgidum* and *T. aestivum*. In *Theor. Appl. Genet.*, vol. 98, 1999, pp. 744–750.
- NESBITT, M. – SMUEL, D. 1996. From staple crop to extinction? The archaeology and history of the hulled wheats. In PADULOSI, S. – HAMMER, K. – HELLER, J. (Ed.): *Hulled wheats. Proceedings of the First International Workshop on Hulled Wheats, vol. 4, Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops*. Rome: International Plant Genetic Resources Institute. 1996, pp. 41–100. IN: HAUNDRY, A. et al. 2007. Grinding up Wheat: A massive loss of nucleotide diversity since domestication. In *Mol. Biol. Evol.*, vol. 24, 2007, no. 7, pp. 1506–1517.
- RODRÍGUEZ, S. – PERERA, E. – MAESTRA, B. – DÍEZ, M. – NARANJO, T. 2000. Chromosome structure of *Triticum timopheevii* relative to *T. turgidum*. In *Genome*, vol. 43, 2000, pp. 923–930.
- SALINA, E.A. – LEONOVA, E. N. – EFREMOVA, T. T. – RODER, M. S. 2006. Wheat genome structure: translocations during the course of polyploidization. In *Funct Integr Genomics*, vol. 6, 2006, pp. 71–80.
- ZHANG, P. – LI, W. – FRIEBE, B. – GILL, B. S. 2004. Simultaneous painting of three genomes in hexaploid wheat by BAC-FISH. In *Genome*, vol. 47, 2004, pp. 979–987.

Adresa autorov:

Mgr. Veronika Michalčová¹, Ing. Pavol Hauptvogel, PhD², doc. RNDr. Miroslav Švec, CSc.¹

¹Katedra genetiky, Prírodovedecká fakulta Univerzity Komenského, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava

²Centrum výskumu rastlinnej výroby Piešťany, Bratislavská cesta 122, 921 68 Piešťany

Kontaktný e-mail: michalцова@fns.uniba.sk

NOVÉ SMĚRY VE ŠLECHTĚNÍ CHMELE (*HUMULUS LUPULUS* L.)

NEW TRENDS IN HOP (*HUMULUS LUPULUS* L.) BREEDING

NESVADBA VLADIMÍR, POLONCIKOVA ZDĚNKA, HENYCHOVÁ ALENA

Hop Research Institute, Co., Ltd., Kadanska 2525, Zatec, Czech Republic

Hop breeding objectives in CR can be divided into aroma and bitter hops, both being resistant to stresses, dwarf varieties for cultivation in low trellis and varieties for pharmaceutical utilization. In 2008 we managed to release Vital and Kazbek. Varieties Saaz Late and Bohemie were registered in 2010. Recently we have bred some perspective genotypes with high contents of xanthohumol or desmethylxanthohumol (DMX). In January 2011, we were awarded funding for a new four years EUREKA Project, which is an inter-governmental network that supports the development for innovations across all sectors of industry within EU. It should help us to develop new low trellis high quality aroma hops as sustainable replacements for traditional tall hops in the future.

Key words: *hop, Humulus lupulus* L., varieties, genotypes, breeding material, low trellis, EUREKA project, dwarf hops, xanthohumol, DMX.

ÚVOD

Šlechtění chmele v České republice bylo založeno Doc. Karlem Osvaldem, který byl zakladatelem klonové selekce Žateckého poloraného červeňáku. Z jeho práce jsou dosud využívány na ploše téměř 90 % v rámci České republiky klony 31, 72 a 114. Prvními odrůdami, které vznikly křížením, byly v roce 1994 Bor a Sládek. Lze konstatovat, že v současné době se ve šlechtění chmele využívá výhradně metoda křížení. Tímto způsobem byly získány další odrůdy Premiant, Agnus, Harmonie a Rubín. Z pivovarského hlediska se nejvíce uplatňují odrůdy Sládek, Premiant a Agnus. Přesto se stále šlechtí nové odrůdy aromatického i vysokoobsažného typu pro pivovarské využití. Na tvorbu nových odrůd jsou kladeny vysoké požadavky ekonomické, agrotechnické i zpracovatelské. Chmel obsahuje řadu významných látek pro farmaceutické a biomedicínské využití (De Keukeliere et al., 2003; Pšenáková a kol., 2010). Nová technologie pěstování chmele na nízkých konstrukcích vyžaduje nové odrůdy chmele, které se vyznačují krátkými internodii. Vlivem vysoké variability povětrnostních podmínek v průběhu vegetace v posledních letech se preferuje stabilita výkonnosti v průběhu pěstování chmele, tj. 10 až 15 let (Nesvadba V., Krofta K., 2007). Proto v posledních letech byly registrovány další české odrůdy chmele.

METODIKA

Základem pro šlechtění chmele jsou genetické zdroje – jedná se o rozpracovaný šlechtitelský materiál, registrované odrůdy a plané chmele. Genetické zdroje (Nesvadba V., Krofta K., 2005) jsou podporovány Českou republikou (MZe 33083/03-300 6.2.1. – MZe ČR). Šlechtění je zaměřeno na křížení vhodných rodičovských komponentů, které jsou vybírány na základě testovacích křížení. Získaná potomstva jsou následně využívána pro další šlechtění. Potomstva jsou nejdříve testována na odolnost k houbovým chorobám a vybrané genotypy jsou pěstovány na stanovišti 2 roky. Po dvou letech následuje výběr nejlepších jedinců (ostatní rostliny jsou zničeny). Ti jsou následně množeni a testováni v šlechtitelských školkách. Perspektivní genotypy jsou po důkladných testacích (5–8 let) přihlášeny do státních registračních zkoušek. Pro hodnocení potomstev, šlechtitelského materiálu a nových odrůd jsou využívány základní statistické parametry. Obsahy chmelových pryskyřic byly stanoveny kapalinovou chromatografií (Krofta K., Nesvadba V., 2007).

VÝSLEDKY A DISKUSE

Šlechtění nové odrůdy je dlouhodobá činnost, protože od křížení až po registraci nové odrůdy je časové rozpětí 15 až 20 let. Od roku 2008 byly v Česku registrovány 4 nové odrůdy chmele (tab. 1). Od roku 2000 se výrazně změnil šlechtitelské cíle. V současné době je šlechtění zaměřeno na 5 cílů. Samozřejmě, že všechny perspektivní genotypy musí vykazovat odolnost k houbovým chorobám, dobré agrotechnické parametry, a především dobré pivovarské vlastnosti, proto Chmelařský institut Žatec disponuje pokusným pivovárkem o kapacitě 50 litrů. Všechny nadějně genotypy musí vykazovat dobré pivovarské vlastnosti. Je nutné připomenout, že šlechtění chmele je podporováno výzkumnými projekty, které podporují MŠMT, MZe i MPO České republiky. Značnou finanční část hradí Chmelařský institut s.r.o. Žatec z vlastních zdrojů.

1. Šlechtění aromatických chmelů

Šlechtění aromatických chmelů je rozděleno na dva směry. První skupina je klasická – křížení aromatických rodičů a výběr potomstev. Tím byla získána odrůda Sládek, která vykazuje dobré pivovarské využití. V současné době tvoří standard kvality této skupiny aromatických chmelů. V rámci této skupiny byla v roce 2004 registrována odrůda Harmonie, v roce 2010 odrůda **Bohemie**, která byla získána z potomstva po odrůdě Sládek. Bohemie má shodné kvalitativní parametry, ale má kratší vegetační dobu. Druhou skupinu tvoří jemné aromatické chmele, to je Žatecký poloraný červeňák (ŽPČ), který je charakteristický vynikajícími

pivovarskými vlastnosťami. Dosud byla využívána jen klonová selekce v rámci Žateckého poloraného červeňáku. V posledním období se Žatecký poloraný červeňák využíval v křížení s vhodnými samčími genotypy, které mají v původu též ŽPČ. Výsledkem dlouhodobé práce je registrace nové odrůdy **Saaz Late**, která byla provedena v roce 2010. Tato odrůda vykazuje shodné složení chmelových pryskyřic i silic jako Žatecký poloraný červeňák. V současné době je pěstována na ploše 3 ha. V roce 2011 bude provedena nová výsadba na ploše 5 ha. Odrůda je testována v českých i zahraničních pivovarech a vykazuje vynikající výsledky. Z důvodu požadavků pivovarů pro další testy, je nutný nárůst plochy.

Tabulka 1: Nové české odrůdy chmele

Odrůdy	Vital	Kazbek	Saaz Late	Bohemie
Alfa kyseliny (% hm.)	12,0 – 16,0	5,0 – 8,0	3,5 – 6,0	5,0 – 8,0
Beta kyseliny (% hm.)	6,0 – 10,0	4,0 – 6,0	4,0 – 6,5	6,0 – 9,0
Kohumulon (% rel.)	21 – 26	35 – 40	20 – 25	23 – 26
Xanthohumul (% hm.)	0,70 – 1,00	0,30 – 0,45	0,30 – 0,50	0,50 – 0,75
DMX (% hm.)	0,25 – 0,40	0,10 – 0,20	0,07 – 0,12	0,10 – 0,20
Obsah silic (% hm.)	1,5 – 2,5	0,9 – 1,8	0,5 – 1,0	1,0 – 1,5
Myrcen (% rel.)	40 – 55	40 – 50	25 – 35	30 – 40
Karyophylen (% rel.)	5 – 8	10 – 15	6 – 9	7 – 10
Humulen (% rel.)	2 – 5	20 – 35	15 – 20	17 – 23
Farnesene (% rel.)	1 – 4	< 1	15 – 20	< 1
Selineny (% rel.)	7 – 15	1 – 3	3 – 4	8 – 12

2. Šlechtění vysokoobsažných chmelů

Šlechtění vysokoobsažných chmelů má pouze jedno kritérium, a to produkci alfa kyseliny z hektaru. Nové odrůdy musí vykazovat odolnost, dobré agrotechnické parametry, protože to ovlivňuje ekonomiku pěstování chmele a dále i pivovarské vlastnosti. V roce 2001 byla v České republice registrována odrůda **Agnes**, která nemá nejvyšší produkci alfa kyseliny z hektaru, ale vykazuje vynikající pivovarské parametry, a to především pozitivní vliv na stabilitu piva. Odrůda **Vital**, která byla registrována pro farmaceutické využití vykazuje vyšší obsah alfa kyseliny i vysoký obsah beta kyseliny, ale nižší výnosovou úroveň, proto pravděpodobně nebude atraktivní pro pěstitelskou praxi. V pivovarských testech vykazuje výborný vliv na kvalitu piva. V roce 2010 bylo vybráno 5 nadějných genotypů do registračních zkoušek, které vykazují obsah alfa hořkých kyselin 13 až 17 % a výnos chmele je nad 2,5 t/ha (Tabulka 2).

Tabulka 2: Obsah chmelových pryskyřic u nadějných genotypů chmele

Označení genotypu	Alfa kys. (%)	Beta kys. (%)	Xanthohumul (%)	DMX (%)
4849 ®	13,4	9,2	1,23	0,22
4914 ®	15,0	9,3	1,14	0,21
4964 ®	14,1	9,1	0,98	0,29
5166 ®	18,8	8,7	1,21	0,26
5196 ®	15,9	8,8	1,23	0,29
Agnes	11,9	7,8	0,89	0,16
Columbus	12,1	6,1	0,68	0,18
Taurus	12,3	5,6	0,90	0,10
Magnum	12,6	7,9	0,42	0,10
Herkules	15,0	5,9	0,57	0,11
Vital	15,3	9,8	0,78	0,27

3. Šlechtění odolných chmelů

Odolných odrůd k vnějším stresům není mnoho. Získat novou odrůdu, která bude odolná k suchu, vysokým teplotám, bude vykazovat vysokou stabilitu obsahu chmelových pryskyřic a výnosu chmele a současně bude mít výborné pivovarské vlastnosti, je dosti obtížné. V Česku byla v roce 2008 registrována odrůda **Kazbek**, která vykazuje vysokou stabilitu obsahu chmelových pryskyřic i výnosu chmele. Je první odrůdou, která má vyšší výnos chmele než odrůda **Sládek**, která vykazuje v praxi výnos nad 3 t/ha. V roce 2010 byla vysazena provozní plocha, která bude využívána pro pivovarské testy. Je nutné podotknout, že odrůda **Kazbek** má v původu ruský planý chmel. Právě plané chmele jsou nejvíce využívány pro tento šlechtitelský směr (Patzak J., et al., 2010; Patzak J., Matoušek J., 2010).

4. Šlechtění pro farmaceutické účely

Z realizovaných křížení se podařilo získat 90 nových genotypů s obsahem xanthohumolu nad 1 %. Tento výsledek je nutno chápat jako úspěšný, protože genotypy získané ze šlechtitelského procesu do roku 2007 vykazovaly z celkového počtu pouze 7 genotypů s obsahem xanthohumolu nad 1 %. Vyšší úspěšnost byla u šlechtění na vysoký obsah DMX, protože pouze 1 genotyp vykazoval obsah DMX nad 0,25 % a výsledkem záměrného šlechtění bylo v rámci projektu získáno 43 nových genotypů chmele s obsahem DMX nad 0,25 %. Z těchto genotypů byl odebrán sadbový materiál pro založení polního pokusu. V roce 2010 byly již 3 genotypy,

kteřé vykazují požadovaný obsah DMX, namnožený a přihlášený do registračních pokusů ÚKZÚZ. V rámci tohoto šlechtitelského cíle byla registrována v roce 2008 nová odrůda **Vital**, která vykazuje průměrný obsah DMX 0,30 % hm. v sušině. Rozpětí obsahu je 0,22 až 0,49 % hm. (Nesvadba V., Krofta K., 2009). V současné době se mapují kvantitativní znaky obsahu xanthohumolu a DMX (Patzak J., 2011).

4. Šlechtění na nízké konstrukce

V posledních letech s v ČR uplatňuje nová technologie pěstování chmele na nízkých konstrukcích. Prioritou selekce jsou krátká internodia. Na základě tohoto selekčního kritéria se vybírají nadějně genotypy a jsou dále hodnoceny. Velmi nadějně genotypy byly získány v křížení v roce 2008. Výběry z těchto potomstev Sm09 byly vysazeny do HŠKMNK v roce 2010. Chmelové hlávky byly v prvním roce sklizeny ručně a analyzovány metodou HPLC. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 3. Z výsledků je patrné, že genotypy 5281 a 5287 vykazují obsah alfa kyselin nad 10 %. Aromatickému typu dle složení chmelových pryskyřic odpovídají čtyři genotypy 5260, 5263, 5278 a 5282. Některé genotypy vykazují i vyšší podíl kohumulonu, což je způsobeno matečnou rostlinou First Gold, která je charakteristická vysokým podílem kohumulonu.

Tabulka 3: Obsah a složení chmelových pryskyřic u nadějných výběrů z HŠKMNK (2010)

Číslo genotypu	alfa. kys. (%hm)	beta.kys. (%hm)	poměr <i>alfa/beta</i>	kohumulon (% rel.)	kolupulon (% rel.)
5258	5,76	2,80	2,1	26,70	50,60
5260	5,55	4,13	1,3	26,20	47,30
5262	5,48	2,41	2,3	29,30	53,00
5263	5,50	4,08	1,3	26,10	47,30
5277	6,51	3,20	2,0	23,10	43,00
5278	7,52	5,59	1,3	38,10	58,60
5281	10,75	5,41	2,0	35,00	57,20
5282	5,57	4,68	1,2	36,80	62,00
5287	10,63	4,23	2,5	24,60	47,40
5254	4,54	3,24	1,4	31,50	59,70
5279	8,66	4,86	1,8	34,30	58,60
5252	7,81	5,37	1,5	36,00	57,00

ZÁVĚR

Šlechtění chmele je dlouhodobá činnost, proto dosažené výsledky lze hodnotit jako dílčí. Lze konstatovat, že se daří plnit zadané cíle šlechtění, byla získána řada nadějných genotypů. Úspěšnost splnění uvedených šlechtitelských cílů bude prokázána až po ověření výkonnosti, stability a především uplatnění v praxi.

Acknowledgement: This work was supported by Czech Ministry of Education within the Research Project no. 2B06011 and Eureka project (LF 11008). Samples were obtained from the field collection of genetic resources, which is a part of "National Program of Conservation and Utilization of Genetic Resources in Plants and Biodiversity" (MZe_33083/03-300 6.2.1) issued by Czech Ministry of Agriculture.

LITERATURA

- DE KEUKELEIRE, J. – OOMS, G. – HEYERICK, A. – VAN BOCKSTAELE, E. (2003): Formation and accumulation of alpha acids, beta acids, desmethylxanthohumol and xanthohumol during flowering of hops (*Humulus lupulus* L.). In: J. Agric. Food Chem., vol. 51, 2003, pp. 4436–4441.
- KROFTA K., NESVADBA V.: The contents of xanthohumol and desmethylxanthohumol in genetic sources of hop (*Humulus Lupulus* L.). International Scientific meeting Use Genetic Resource of Cultivated Plant. Žatec. 2007.
- NESVADBA, V., KROFTA, K.: Genetic sources of hops in Czech Republic. International Hop Growers Convention, Proceedings of the Scientific Commission, George, South Africa 20 – 25 February 2005: 25.
- NESVADBA, V., KROFTA, K.; 2003: Practical knowledge and criteria influencing effectivity of breeding process in the CR. International Hop Growers Convention, Proceedings of the Scientific Commission, Dorna - Žalec, Slovenia 24 - 27 June 2003: 101 – 105
- NESVADBA, V., KROFTA, K.: Variability in the contents of important compounds for pharmaceutical and brewing industries within hop gene fond. Agriculture, vol. 55, 2009, N. 1, pp 10 – 16
- PATZAK J., NESVADBA V., KROFTA K., HENYCHOVÁ, A., MARZOEV, A.I., RICHARDS, K.: Evaluation of genetic variability of wild hops (*Humulus lupulus* L.) in Canada and the Caucasus region by chemical and molecular methods. *Genome* 53: 545–557, 2010. doi:10.1139/G10-024
- PATZAK J., MATOUŠEK, J.: Analysis of molecular genome sequence variability in connection to genetic diversity and breeding of hop. EBC Hop Symposium, Wolnzach, Germany, September 12-14, 25, 2010.
- PATZAK J.: Molecular mapping of QTLs for xanthohumol and DMX contents in hop. Proceedings of Scientific Commission of IHGC, Lublin, Poland, June 19-23, 40-44, 2011.
- PŠENÁKOVÁ, I., HETEŠOVÁ, L., NEMEČEK, P., FARAGÓ, J., KRAIC, J.: Genotype and seasonal variation in antioxidant activity of hop extracts. Agriculture (Poľnohospodárstvo), vol. 56, 2010, no. 4, pp. 106–113.

BIOAKTÍVNE LÁTKY V KOMERČNÝCH ODRODÁCH A DIVORASTÚCICH GENOTYPOCH CHMEĽU OBYČAJNÉHO (*HUMULUS LUPULUS* L.)

BIOACTIVE COMPOUNDS IN COMMERCIAL CULTIVARS AND WILD TYPE PLANTS OF HOP (*HUMULUS LUPULUS* L.)

IVANA PŠENÁKOVÁ^{1,2}, JURAJ FARAGÓ¹, KAREL KROFTA³, VLADIMÍR NESVADBA³

¹Katedra biotechnológií, Fakulta prírodných vied, Univerzita sv. Cyrila a Metoda v Trnave, Námestie J. Herdu 2, SK-917 01 Trnava, SR; email: ivana.psenakova@ucm.sk;

²Katedra botaniky a genetiky, Fakulta prírodných vied, Univerzita Konštantína Filozofa, Tr. A. Hlinku 1, SK-949 74 Nitra, SR

³Chmelařský Institut s.r.o., Odd. šľachtění chmele a Odd. chemie chmele, Kadaňská 2525, 438 46 Žatec

The hop plant is well known as a raw material in the brewing industry. In recent years, however, a number of biological activities of hop compounds have been discovered, which pave a new pathway for utilization of hop as a medicinal plant. The aim of this work was to analyze the content of bitter acids, essential oils, total polyphenols, flavonoids and a prenylated chalcone xanthohumol in extracts from leaves and cones of commercial cultivars and wild type hop plants grown in two different growing conditions at the Hop Research Institute, Žatec (Czech republic), and Centre of Plant Production Research, Piešťany (Slovak republic). Seven cultivars and eight wild type genotypes were analyzed. The results showed provenience, cultivar, plant material and growing condition effects on the chemical composition of hops.

Key words: *Humulus lupulus*, wild type, polyphenols, flavonoids, antioxidant activity, genetic variability, cultivation

ÚVOD

Chmeľ obyčajný (*Humulus lupulus* L.) je trváca, dvojdómá rastlina patriaca do čeľade Cannabaceae. Samičie rastliny chmeľu tvoria hlávky (šišťice), v ktorých sú uložené žľaznaté trichómy, tzv. lupulínové žliazky. V nich sa tvorí lupulín obsahujúci chmeľové živice, silice, polyfenoly a iné zlúčeniny, dôležité z pivovarského hľadiska. Chmeľ je významnou technickou plodinou, ktorá je využívaná najmä v pivovarníctve, pretože obsahové zložky chmeľových hlávok sú základom pri výrobe piva. Najvýznamnejšie zložky chmeľových živíc (α - a β -horké kyseliny) a silíc (esenciálne oleje) dodávajú pivu intenzitu horkosti a ovplyvňujú arómu piva (NESVADBA a KROFTA, 2007).

V poslednom desaťročí sa však výskum chmeľu orientuje značnou mierou na štúdium biologických aktivít jednotlivých chemických komponentov chmeľu, najmä prenylflavonoidov xanthohumolu a izoxanthohumolu (MIRANDA a kol., 2000; VANHOECKE a kol., 2005; ZHAO a kol., 2005; HO a kol., 2008). Ich protizápalová, antioxidantná, antilipoperoxidačná aktivita, ako aj antimikrobiálne, antitrombózne, antiangiogénne, antiproliferatívne, antimutagénne a apoptotické účinky, stanovené najmä v *in vitro* štúdiách, naznačujú možnosť ich chemopreventívneho použitia (MILLIGAN a kol., 1999; MIRANDA a kol., 2000; ZANOLI a ZAVATTI, 2008). Vzrastajúci počet informácií o využití týchto biologicky aktívnych látok k liečbe viacerých nádorových a civilizačných ochorení ponúka využitie v chemoprevenii takýchto chorôb (HOFTA, 2004). Získané poznatky napr. naznačujú, že chmeľové prenylflavonoidy môžu byť efektívnymi protinádorovými liečivami (MILLIGAN a kol., 1999).

Cieľom našej práce bolo zistiť obsah najdôležitejších chemických komponentov chmeľu, a to horkých kyselín, esenciálnych olejov, polyfenolov, flavonoidov a xanthohumolu v extraktoch izolovaných z listov a šišťíc 15 genotypov (génových zdrojov kultúrnych odrôd a divorastúcich rastlín) pestovaných v rôznych podmienkach na dvoch lokalitách, v Žatci (ČR) a v Piešťanoch (SR).

MATERIÁL A METÓDY

Rastlinný materiál

Listové vzorky a vzorky šišťíc komerčných odrôd chmeľu obyčajného boli poskytnuté z poľnej kolekcie génových zdrojov chmeľu (MZe 33083/03-300 6.2.1.) v Chmelařskom institute s.r.o. v Žatci (CHI, ČR) (Vital, Sládek, Rubín a Harmonie) a Génovou bankou SR pri CVRV v Piešťanoch (CVRV, SR) (Siřem, Sládek, Aromat a Osvaldov klon 114). Rovnaké vzorky z divorastúcich genotypov chmeľu v ČR boli tiež získané z poľnej kolekcie génových zdrojov chmeľu v CHI v Žatci (P18+19, P123, P8, P42 a P68), resp. v SR zberom v určených lokalitách (D1, D2, D4). Odrody a divorastúce chmele sú v CHI Žatec pestované na rovnakej lokalite v spone 1,3 x 1 m, s výškou vedenia rastlín 6 m. Pri pestovaní testovaného súboru genotypov boli zabezpečené štandardné agrotechnické postupy a rovnaká technológia pestovania a ošetrovania v priebehu rastu a vývoja rastlín. Preto stanovená variabilita na danej lokalite je iba minimálne ovplyvnená prostredím a hlavným zdrojom variability je genotyp vybraného chmeľu. Génové zdroje chmeľu v CVRV sú pestované v improvizovanej chmeľnici v rovnakom spone ako v Žatci ale s výškou vedenia rastlín 2 m. Počas vegetačnej periódy rastu rastlín sa vykonáva iba minimum agrotechnických ošetrovaní (herbicídy, pesticídy, fungicídy).

Spracovanie rastlinného materiálu

Odber vzoriek v ČR (9 genotypov) bol vykonaný v rovnakom termíne (august 2011) 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 9.9.2011. 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 v chmeľových extraktoch bol stanovený podľa metódy opísanej SINGLETONOM a ROSSIM (1965). Metóda je založená na spektrofotometrickom meraní farebných produktov reakcie hydroxylových skupín fenolových zlúčenín s Folin-Ciocalteu činidlom. Celkový obsah polyfenolov bol vyjadrený ako ekvivalent kyseliny galovej v 1g vysušeného rastlinného materiálu (d.w.).

Stanovenie obsahu flavonoidov

Flavonoidy boli stanovované spektrofotometricky podľa metódy opísanej RAKOTOARISONOM a kol. (1997). Celkový obsah flavonoidov bol vyjadrený ako ekvivalent kvercetínu v 1g vysušeného rastlinného materiálu.

Stanovenie obsahu horkých kyselín a xantohumolu

Obsah a zloženie chmeľových živíc a obsah xantohumolu v extraktoch zo šišťíc boli stanovené metódou EBC7.7 (Analytica EBC, 1998). HPLC analýzy boli uskutočnené na chromatografach SHIMADZU LC 10A a LC20A. Šišťice boli extrahované v zmesi etyléter-metanol a alikvotné objemy éterickej fázy boli po riedení injektované do kolónky chromatografu. Látky boli detekované detektorom diódového poľa pri vlnovej dĺžke $\lambda = 314$ (α - a β -horké kyseliny) a 370 nm (xantohumol).

Stanovenie obsahu esenciálnych olejov

Izolácia esenciálnych olejov zo šišťíc bola uskutočnená destilačnou metódou. Zloženie silíc bolo analyzované plynovou chromatografiou na chromatografach VARIAN3400 v spojení s hmotnostným detektorom FINNIGAN ITD 800 a THERMO-FOCUS v spojení s hmotnostným detektorom DSQII. Obsah silíc bol stanovený ako hmotnostný podiel celkových silíc vo vodnej pare v priebehu 90 minútového varu zo 100 g vzorky šišťíc.

Štatistická analýza

Výsledky boli analyzované programom STATGRAPHICS Centurion XV Ver. 15.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Z pivovarnického hľadiska najdôležitejšími chemickými komponentmi chmeľu sú chmeľové živice, pozostávajúce najmä z humulónov (α -horké kyseliny) a lupulónov (β -horké kyseliny) (VERZELE a DE KEUKELEIRE, 1991). Ich obsah je do značnej miery závislý od konkrétnej odrody (KROFTA, 2003). Z analyzovaných 4 českých genotypov (odrod) a 4 slovenských genotypov boli najvyššie obsahy α -horkých kyselín zaznamenané pri dvoch vysokoobsažných odrodách Vital (11,6 hm. %) a Rubín (10,8 hm. %) (Tab. 1). Pri všetkých ostatných genotypoch bol obsah α -horkých kyselín nižší než 10 hm. %. Veľmi nízke hodnoty obsahu α -horkých kyselín (2,6-3,9 hm. %) boli zaznamenané v šišťiciach pozberaných z 3 génových zdrojov chmeľu z poľnej kolekcie rastlín pestovaných v CVRV Piešťany. Pri týchto troch genotypoch bol aj pomer $\alpha/\beta < 1,0$. Výnimku tvorila len odroda Sládek, ktorá mala porovnateľnú hodnotu obsahu α -horkých kyselín v ČR, ako aj v SR (Tab. 1). Obsah α -horkých kyselín v divorastúcich genotypoch zo Slovenska bol porovnateľný s génovými zdrojmi odrôd udržiavaných v poľnej kolekcii CVRV Piešťany, avšak iba približne polovičný oproti obsahom α -horkých kyselín v šišťiciach z „českých“ odrôd udržiavaných v Žatci. Rozdiely medzi „slovenskými“ a „českými“ odrodami (ANOVA, $P < 0,01$), ako aj medzi odrodami a divorastúcimi genotypmi boli štatisticky signifikantné (ANOVA, $P < 0,05$).

Na rozdiel od horkých kyselín je prenylovaný chalkón xantohumol najdôležitejšou chemickou zložkou chmeľu dôležitou z medicínskeho hľadiska (MIRANDA a kol., 2000; VANHOECKE a kol., 2005; ZHAO a kol., 2005; HO a kol., 2008; CHO a kol., 2010). Obsah xantohumolu v šišťiciach chmeľu závisí najmä od odrody a klimatických podmienok pestovania (DE KEUKELEIRE a kol., 2007) a vo všeobecnosti sa pohybuje v rozmedzí 0,2-1,1 hm. % (STEVENS a kol., 1998; HOFTA a kol., 2004). V nami analyzovaných vzorkách sa pohyboval obsah xantohumolu od 0,18 (divorastúce genotypy D1, D2 a odroda Siřem) po 0,79 hm. % pri odrode Vital (Tab. 1), ktorý je novou odrodou chmeľu vyšľachtenou v CHI Žatec (ČR) pre medicínske účely (KROFTA a kol., 2011). V obsahu xantohumolu boli zaznamenané štatisticky významné rozdiely medzi odrodami a divorastúcimi genotypmi (ANOVA, $P < 0,05$), ako aj medzi „českými“ a „slovenskými“ odrodami (ANOVA, $P < 0,01$).

Esenciálne oleje chmeľu predstavujú malú, na terpeny bohatú frakciu prchavých látok, pozostávajúcu z viac ako 300 rôznych zlúčenín (VERZELE, 1986; KOVAČEVIČ a KAC, 2001). V suchých šišťiciach chmeľu tvoria 0,5-2,0 hm. % (KOVAČEVIČ a KAC, 2001). Podľa KROFTU (2003) aromatické odrody chmeľu pestované v strednej Európe (Žatecký poloraný červeňák, Tettang, Spalter, Lubelski ai.) majú zvyčajne nižší (menej ako 1,0 hm. %) obsah esenciálnych olejov, vysokoobsažné chmele naopak majú 2-3 krát vyšší obsah silíc ako aromatické odrody. Tomu zodpovedá najvyšší (1,15 hm. %) nami nameraný obsah esenciálnych olejov v šišťiciach duálnej odrody Sládek z poľnej kolekcie génových zdrojov chmeľu v CVRV v Piešťanoch (Tab. 2). Celkový obsah silíc v šišťiciach divorastúcich rastlín bol nižší a pohyboval sa od 0,07 (genotyp D2) do 0,69 hm. % (P42). V priemere šišťice v Žatci pestovaných divorastúcich rastlín obsahovali približne 2x vyšší obsah esenciálnych olejov (0,39 hm. %), než šišťice divorastúcich rastlín zo Slovenska (0,2 hm. %). Z analyzovaných esenciálnych olejov najvyššie koncentrácie boli stanovené myrcéne, humuléne a karyofyléne. Pomerne vysoké koncentrácie boli stanovené aj pri selinénach a farnezéne (Tab. 2). České divorastúce genotypy obsahovali oproti Slovenským divorastúcim genotypom vyššie koncentrácie myrcénu, selinénov, β -pinénu, linaloolu, limonénu a geraniolu. Naproti tomu, pri slovenských divorastúcich genotypoch boli stanovené vyššie priemerné koncentrácie humulénu, karyofylénu, farnezénu, 2-undekanónu, methyl-4-decenoátu a methyloktanoát (Tab. 2). Podobne ako pri komerčných odrodách (KROFTA, 2003), aj pri divorastúcich genotypoch chmeľu boli profily esenciálnych olejov – nezávisle od pôvodu – veľmi variabilné medzi genotypmi. Obsahy esenciálnych olejov sa štatisticky významne líšili medzi genotypmi (ANOVA, $P < 0,001$), medzi odrodou a divorastúcimi genotypmi (ANOVA, $P < 0,01$) a medzi českými a slovenskými divorastúcimi rastlinami (ANOVA, $P < 0,01$).

Chmeľ obsahuje rôzne polyfenoly, z ktorých prevažnú väčšinu tvoria flavonoidy a stilbenoidy (STEVENS a kol., 1998). Flavonoidy chmeľu zahŕňajú flavonol-glykozidy a kondenzované taníny, ktoré sú intracelulárne lokalizované a prenylflavonoidy, ktoré sú vylučované najmä lupulinovými žliazkami (STEVENS a kol., 1998), ale boli o nižších koncentráciách detekované aj v listoch a samčích súkvetiach rastlín chmeľu (DE KEUKELEIRE a OOMS, 2003). Preto sme aj my spektrofotometricky analyzovali obsah polyfenolov a flavonoidov nielen v šišťiciach ale aj listoch 15 genotypov chmeľu pochádzajúcich z ČR alebo SR.

Celkový obsah polyfenolov v listových vzorkách rastlín 15 genotypov chmeľu obyčajného sa pohyboval od 1,67 mg/g d.w. (divorastúci genotyp P18+19, ČR) po 5,17 mg/g d.w. (odroda K-114, SR) (Tab. 3). Rozdiely boli štatisticky významné iba medzi rastlinami pestovanými v Žatci, alebo v Piešťanoch (ANOVA, $P < 0,001$). Vyššie hodnoty obsahu polyfenolov boli zaznamenané pre rastliny pochádzajúce zo SR ako pre odrody (priemer 4,08 mg/g d.w., rozsah 3,50-5,17 mg/g d.w. v SR a priemer 3,80 mg/g d.w., rozsah 2,21-4,88 mg/g d.w.) tak aj pri divorastúcich genotypoch (priemer 4,57 mg/g d.w., rozsah 3,80-5,10 mg/g d.w. v SR, priemer 2,32 mg/g d.w., rozsah 1,67-3,36 mg/g d.w. v ČR). Celkový obsah polyfenolov v šišťiciach pozbieraných z 15 genotypov chmeľu sa pohyboval od 16,2 mg/g d.w. (divorastúci genotyp P42, ČR) po 78,7 mg/g d.w. (odroda Harmonie, ČR) (Tab. 3), čo je rádovo viac ako boli hodnoty v listoch. Rozdiely boli štatisticky významné medzi rastlinami pestovanými v Žatci, alebo v Piešťanoch (ANOVA, $P < 0,05$) a medzi odrodami a divorastúcimi genotypmi (ANOVA, $P < 0,05$). Pri odrodách boli vyššie hodnoty obsahu polyfenolov zaznamenané pre rastliny pochádzajúce z ČR (priemer 56,4 mg/g d.w., rozsah 36,7-78,7 mg/g d.w.) než zo SR (priemer 29,4 mg/g d.w., rozsah 21,7-34,7 mg/g d.w.). Naopak pri divorastúcich genotypoch boli vyššie hodnoty obsahu polyfenolov zistené vo vzorkách zo Slovenska (priemer 28,9 mg/g d.w., rozsah 23,9-33,0 mg/g d.w.) než v z ČR (priemer 24,8 mg/g d.w., rozsah 16,2-32,9 mg/g d.w.).

Celkový obsah flavonoidov v listových vzorkách rastlín 15 genotypov chmeľu obyčajného ukazoval podobný vzor ako obsah polyfenolov, čo je možné čiastočne vysvetliť tým, že flavonoidy samotné patria medzi zlúčeniny fenolického charakteru (STEVENS a kol., 1998). Flavonoidy tvorili od 1,47 mg (ekv. kvercetínu)/g d.w. (Harmonie, ČR) do 4,86 mg/g d.w. (D1, SR) (Tab. 3). Rozdiely v obsahu flavonoidov boli štatisticky významné medzi genotypmi (ANOVA, $P < 0,05$) a rastlinami z ČR a SR (ANOVA, $P < 0,01$). Podobne ako pri polyfenoloch vyššie hodnoty obsahu polyfenolov boli zaznamenané pre rastliny pochádzajúce zo SR ako pre odrody (priemer 2,95 mg/g d.w., rozsah 1,69-4,64 mg/g d.w. v SR a priemer 1,87 mg/g d.w., rozsah 1,47-2,23 mg/g d.w.) tak aj pri divorastúcich genotypoch (priemer 3,40 mg/g d.w., rozsah 1,86-4,80 mg/g d.w. v SR, priemer 2,18 mg/g d.w., rozsah 1,50-3,30 mg/g d.w. v ČR). Celkový obsah flavonoidov v šišťiciach pozbieraných z 15 genotypov chmeľu sa pohyboval od 9,05 mg/g d.w. (divorastúci genotyp P42, ČR) po 53,4 mg/g d.w. (odroda Harmonie, ČR) (Tab. 3), čo je rádovo viac ako boli hodnoty v listoch. Rozdiely boli štatisticky významné medzi rastlinami pestovanými v Žatci, alebo v Piešťanoch (ANOVA, $P < 0,01$) a medzi odrodami a divorastúcimi genotypmi (ANOVA, $P < 0,05$). Pri odrodách boli vyššie hodnoty obsahu flavonoidov zaznamenané pre rastliny pochádzajúce z ČR (priemer 37,7 mg/g d.w., rozsah 20,6-53,4 mg/g d.w.) než zo SR (priemer 19,4 mg/g d.w., rozsah 10,0-32,0 mg/g d.w.). Naopak pri divorastúcich genotypoch boli vyššie hodnoty obsahu flavonoidov zistené vo vzorkách zo Slovenska (priemer 14,3 mg/g d.w., rozsah 9,7-18,8 mg/g d.w.) než v z ČR (priemer 13,2 mg/g d.w., rozsah 9,0-22,2 mg/g d.w.). Listy a šišťice sa líšili v zložení polyfenolov aj v tom že v listoch tvorili flavonoidy ~ 90% celkových polyfenolov, v šišťiciach to bolo 40-50%.

Pre posúdenie vzťahov medzi obsahom polyfenolmi a flavonoidmi sme vykonali korelačnú analýzu, z ktorej výsledkov vyplýva vysoká korelácia medzi obsahom polyfenolov a obsahom flavonoidov ($r = 0,9673$) v listoch a šišťiciach chmeľu.

ZÁVER

V práci sme analyzovali obsah horkých kyselín, esenciálnych olejov, polyfenolov, flavonoidov a xantohumolu v zelených listoch a šišťiacich 15 rôznych genotypov chmeľu obyčajného pestovaných v odlišných podmienkach v kolekciách génových zdrojov v CHI v Žatci (ČR) a v 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.

LITERATÚRA

- EBC: Analytica EBC, 5th edition. European Brewery Convention, Carl-Hans Verlag, Nürnberg, 1998.
- DE KEUKELEIRE, J.; JANSSENS, I.; HEYERICK, A.; GHEKIERE, G.; CAMBIE, J.; ROLDÁN-RUIZ, I.; VAN BOCKSTAELE, E.; DE KEUKELEIRE, D.: Relevance of organic farming and effect of climatological conditions on the formation of α -acids, β -acids, desmethylxanthohumol, and xanthohumol in hop (*Humulus lupulus* L.). In: *Journal of the Agricultural and Food Chemistry*, ISSN 0021-8561, 2007, 55, 1, p. 61-66.
- DE KEUKELEIRE, J.; OOMS, G.; HEYERICK, A.; ROLDAN-RUIZ, I.; VAN BOCKSTAELE, E.; DE KEUKELEIRE, D.: Formation and accumulation of α -acids, β -acids, desmethylxanthohumol, and xanthohumol during flowering of hops (*Humulus lupulus* L.). In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, ISSN 0021-8561, 2003, 51, 15, p. 4436-4441.
- 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.
- CHO, Y.-C.; YOU, S.-K.; KIM, H.J.; CHO, C.-W.; LEE, I.-S.; KANG, B.Y.: Xanthohumol inhibits IL-12 production and reduces chronic allergic contact dermatitis. In: *International Immunopharmacology*, ISSN 1567-5769, 2010, 10, 5, p. 556-561.
- HOFTA, P.; DOSTÁLEK, P.; BASAŘOVÁ, G. Xanthohumol-chmelová pryskyřice nebo polyfenol? In *Chemická listy*. ISSN 1213-7103, 2004, 98, 9, p. 825-830.
- KROFTA, K.: Comparison of quality parameters of Czech and foreign hop varieties. In: *Plant Soil and Environment*, ISSN 1214-1178, 2003, 49, 6, p. 261-268.
- KROFTA, K., NESVADBA, V., PATZAK, J.: Vital – New Czech hop variety. In: E. Seigner (Ed.): International Hop Growers' Convention (I.H.G.C.) Proceedings of the Scientific Commission, Lublin, Poland 19-23 June 2011, ISSN 1814-2206, p. 19.
- KOVAČEVIČ, M.; KAČ, M.: Solid-phase microextraction of hop volatiles - Potential use for determination and verification of hop varieties. *Journal of Chromatography A*, ISSN 0021-9673, 2001, 918 p. 159-167.
- 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. Antioxidant 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.
- 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.
- RAKOTOARISON, D.; GRESSION, B.; TROTIN, F.; BRUNET, C.; DINE, T.; LUYCKX, M.; VASSEUR, J.; CAZIN, M.; CAZIN, J. C.; PINKAS, M. Antioxidant activities of polyphenolic extracts from flowers, *in vitro* callus and cell suspension cultures of *Crataegus monogyna*. In *Pharmazie*. ISSN 0031-7144, 1997, 1, 52, p. 60-63.
- SINGLETON, 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.; 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.
- 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.
- VERZELE, M.: Centenary review: 100 years of hop chemistry and its relevance to brewing. *Journal of the Institute of Brewing*, ISSN 2011-0226, 1986, 86, 1, p. 9-14.
- VERZELE, M., DE KEUKELEIRE, D.: Chemistry and analysis of hop and beer bitter acids. Elsevier, Amsterdam-New York 1991, 417 pp., ISBN: 0444881654.
- 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: Výsledky analýzy obsahu horkých kyselín a xantohumolu v extraktoch zo šišťíc 15 rôznych genotypov chmeľu obyčajného

Genotyp	Pôvod	Obsah horkých kyselín					Obsah xantohumolu (hm. %)
		α -horké kyseliny (hm. %)	β -horké kyseliny (hm. %)	Pomer α/β	Kohumulón (% rel.)	Kolupulón (% rel.)	
Vital	odroda, CZ	11,56	7,77	1,49	25,9	48,3	0,79
Sládek (CZ)	odroda, CZ	7,50	5,72	1,31	26,4	49,4	0,70
Rubín	odroda, CZ	10,78	5,42	1,99	27,5	43,9	0,58
Harmonie	odroda, CZ	9,37	6,61	1,42	18,6	36,6	0,52
Sirem	odroda, SK	3,49	4,18	0,83	23,5	41,4	0,18
Sládek (SK)	odroda, SK	8,46	4,70	1,80	22,3	48,4	0,45
Aromat	odroda, SK	3,89	4,32	0,90	24,4	44,3	0,26
Osvaldov klon č. 114	odroda, SK	2,65	3,71	0,71	26,1	44,0	0,23
D1 (Váh)	DRG ¹ , SK (Piešťany)	4,06	2,41	1,68	23,4	43,3	0,18
D2 (Kaufland)	DRG, SK (Piešťany)	2,87	3,07	0,93	17,0	47,3	0,18
D4	DRG, SK (Vinosady)	4,52	3,51	1,29	23,9	44,9	0,21
Priemery	Odrody CZ	9,80	6,38	1,54	24,6	44,5	0,61
	Odrody SR	4,62	4,23	1,09	25,5	47,5	0,28
	DRG SK	3,82	3,00	1,27	25,6	46,4	0,19
Priemer celkom		6,29	4,67	1,34	24,8	46,5	0,39

Legenda: ¹DRG = divorastúce genotypy

Tabuľka 2: Výsledky analýzy obsahu esenciálnych olejov v extraktoch zo šišťíc 15 rôznych genotypov chmeľu obyčajného

Genotyp	Pôvod	Obsah esenciálnych olejov (% rel.)													
		Silice (hm. %)	β -pinén (% rel.)	Myrcén (% rel.)	Limonén (% rel.)	Ocimén (% rel.)	Linalool (% rel.)	Metyloktanóat (% rel.)	Geraniol (% rel.)	2-undekanón (% rel.)	methyl-4-decenoát	Karyofylén (% rel.)	Farnezen (% rel.)	Humulén (% rel.)	Selinény (% rel.)
Sládek (SK)	odroda, SK	1,15	0,29	25,3	0,09	0,22	0,17	0,32	0,06	0,43	1,12	13,1	0,10	40,8	1,46
P 18+19	DRG ¹ , FR	0,36	0,21	20,8	0,07	0,08	0,19	0,18	0,08	0,63	0,75	5,8	16,2	7,1	13,5
P 8	DRG, CH	0,18	0,16	13,2	0,05	0,04	0,15	0,07	0,03	0,22	0,59	11,9	3,4	35,5	9,5
P 42	DRG, CZ (Teplice)	0,69	0,32	26,8	0,08	0,11	0,24	0,10	0,15	0,20	0,52	6,9	2,6	5,1	16,8
P 68	DRG, US	0,34	0,90	65,5	0,25	0,02	0,44	0,05	0,09	0,06	0,29	4,7	0,95	2,45	2,66
D1 (Váh)	DRG, SK (Piešťany)	0,20	0,20	20,0	0,07	0,06	0,19	0,20	0,01	1,43	1,36	9,75	2,15	31,2	1,12
D2 (Kaufland)	DRG, SK (Piešťany)	0,07	0,10	10,2	0,04	0,05	0,14	0,06	0,01	1,62	0,58	12,6	17,4	10,3	17,9
D4	DRG, SK (Vinosady)	0,34	0,35	37,1	0,11	0,07	0,20	0,26	0,03	0,85	1,23	11,3	1,27	20,9	3,98
Priemery	Odrody SK	1,15	0,29	25,3	0,09	0,22	0,17	0,32	0,06	0,43	1,12	13,1	0,10	40,8	1,46
	DRG CZ	0,39	0,40	31,6	0,11	0,06	0,26	0,10	0,09	0,28	0,54	7,33	7,79	12,5	10,6
	DRG SK	0,20	0,22	22,4	0,07	0,06	0,18	0,17	0,02	1,30	1,06	11,2	6,94	20,8	6,67
Priemer celkom		0,30	0,34	28,8	0,10	0,06	0,23	0,12	0,05	0,73	0,76	9,53	4,63	17,6	8,66

Legenda: ¹DRG = divorastúce genotypy

Tabuľka 3: Sumárne výsledky analýzy celkového obsahu polyfenolov a flavonoidov v metanových extraktoch z listov a šišťice 15 rôznych genotypov chmeľu obyčajného

Genotyp	Pôvod	Listy		Šišťice	
		Polyfenoly (mg kys. gallovej / g d.w.)	Flavonoidy (mg kvercetínu / g d.w.)	Polyfenoly (mg kys. gallovej / g d.w.)	Flavonoidy (mg kvercetínu / g d.w.)
Vital	odroda, CZ	2,21±0,03	2,04±0,01	36,72±1,64	20,66±0,11
Sládek (CZ)	odroda, CZ	4,88±0,48	2,23±0,05	44,09±0,88	36,73±0,56
Rubín	odroda, CZ	4,08±0,20	1,76±0,03	66,10±8,18	40,24±0,41
Harmonie	odroda, CZ	4,02±0,08	1,47±0,10	78,68±1,63	53,37±0,37
Siřem	odroda, SK	3,70±0,10	3,44±0,04	27,47±0,79	15,26±0,33
Sládek (SK)	odroda, SK	3,96±0,09	1,69±0,10	34,67±1,18	31,99±0,66
Aromat	odroda, SK	3,50±0,25	2,01±0,05	33,88±0,64	20,29±0,44
Osvaldov klon č. 114	odroda, SK	5,17±0,39	4,64±0,03	21,69±0,42	10,00±0,28
P 18+19	DRG ¹ , FR	1,67±0,08	1,55±0,04	32,88±1,75	22,25±0,30
P 123	DRG, RU (Kaukaz)	2,35±0,02	2,30±0,05	na	na
P 8	DRG, CH	2,33±0,09	2,12±0,02	24,82±0,42	10,01±0,13
P 42	DRG, CZ (Teplice)	1,87±0,43	1,65±0,02	16,16±0,50	9,05±0,14
P 68	DRG, US	3,36±0,10	3,30±0,07	25,28±0,98	11,32±0,30
D1 (Váh)	DRG, SK (Piešťany)	5,10±0,10	4,86±0,18	33,05±0,90	18,76±0,94
D2 (Kaufland)	DRG, SK (Piešťany)	3,80±0,11	3,48±0,02	23,88±1,13	9,70±0,17
D4	DRG, SK (Vinosady)	4,82±0,12	1,86±0,07	29,96±1,36	14,56±0,63
Priemery	Odrody CZ	3,80±0,97	1,87±0,28	56,40±17,02	37,75±12,14
	Odrody SR	4,08±0,76	2,95±1,23	29,43±5,48	19,39±8,58
	DRG CZ	2,32±0,60	2,18±0,65	24,79±6,18	13,16±5,50
	DRG SK	4,57±0,59	3,40±1,33	28,96±4,14	14,34±4,06
Priemer celkom		3,55±0,14	2,53±0,04	35,29±1,84	21,61±0,22

Legenda: ¹DRG = divorastúce genotypy; ²na = neanalyzované

NOVÉ TRENDY V ŠĽACHTENÍ PŠENICE THE NEW TRENDS IN WHEAT BREEDING

EUBOMÍR RÜCKSCHLOSS¹, KATARINA MATÚŠKOVÁ¹, ANDREA HANKOVÁ¹, DANIELA VALČUHOVÁ¹, MARTINEK PETR²

¹CVRV Piešťany VŠS Víglaš Pstruša

²Agrotest fyto, s.r.o., Kroměříž

We evaluated three groups of winter wheat lines differing by spike morphology (a) lines with multirow spike (MRS) which is typical by multiple spikelets where more than one spikelet grows up from one individual spike rachis node, (b) lines with three pistils (TP) per floret which enable to grow up to three kernels per floret, and (c) lines with normal spike (NS) morphology as a control group. Also we evaluated fourth group of lines with NS and with different colour of grain containing the samples with purple pericarp and blue aleuron. The experiments were provided at the experimental station Víglaš Pstruša (Slovak Republic) in the period 2010-2011. It was evaluated yield, 1000 kernel weight, number of grains per squared meter and protein content. The highest yields were found in the control group with NS (1313 g), medial in the group with MRS (1089 g) and lowest in the group with TP (731 g). The highest protein content was in group with TP (14,68 %), the lowest in group with MRS (11,31%).

Key words: winter wheat, spike productivity, multirow spike, three pistils, purple pericarp, blue aleuron

ÚVOD

Šľachtenie rastlín, ako cieľavedomá ľudská činnosť, má zlepšovať hospodárske využitie jednotlivých rastlinných druhov v záujme zabezpečenia výživy zdravia a ostatných narastajúcich potrieb človeka. Zložitosť a náročnosť šľachtiteľskej práce spočíva v tom, že predstavuje syntézu výsledkov početných vedných disciplín, o ktoré sa pri tvorbe novej odrody musí šľachtiteľ opierať.

Jedným zo smerov šľachtenia na Výskumno-šľachtiteľskej stanici Víglaš - Pstruša je zvyšovanie produktivity klasu prostredníctvom geneticky zmenenej morfolologickej štruktúry klasu, vyznačujúcej sa väčším počtom kláskov vyrastajúcich z jednotlivých nódov klasového vretena, ktorý je označený názvom viac radý klas (multirow spike - MRS). Ďalšou možnou cestou je využitie čínskeho materiálu s väčším počtom piestikov v kvietku (three pistils mutant - TP-mutant), kde sa môžu vytvárať až tri plodné zrná v kvietku. Tento základný materiál pochádza od Ing. Petra Martínka, CSc. Zatiaľ je šľachtenie týmto smerom náročné, pretože pri vyššom počte zrn v klase nastupujú v zvýšenej miere klasové choroby a tiež sa znižuje HTZ. Cesta zvyšovania úrody cez počet klasov má svoje hranice a tak ostáva iba jediná cesta - zvyšovať produktivitu klasu.

MATERIÁL A METÓDY

Vytvorili sme 4 skupiny novošľachtencov predstavované vybranými líniami z potomstiev klasov piatej generácii po krížení.

V skupine TP boli zaradené línie nesúce mutáciu podmieňujúcu výskyt troch piestikov v kvietku. Ide o mutáciu ktorú pravdepodobne prvý krát popisali Chen et al. (1983), ktorí ju našli v populácii čínskej krajovej odrody a nazvali ju TP-mutant (three pistils mutant). Vyznačuje sa tým, že v kvietkoch môže vytvárať až trojicu zrn orientovaných von brušnou ryhou, a ktoré sú slabo zrastené v bazálnej časti. Za prejav TP je zodpovedná dominantná mutácia podmienená génom *Tp1* ležiacom na dlhom ramene chromozómu 2D (Martinek a Peng, 2007). Do Českej republiky priniesol vzorku Martinek v r. 2004.

V skupine MRS boli zaradené línie odvodené od donoru MRS získaného z VURV Piešťany od Ing. Rychtárika CSc., pod názvom Donor 1. S týmto donorom boli krížené odrody Meritto, Akteur a Rheia.

V skupine pšeníc s odlišnou farbou zrna boli použité ako donory modrého zfarbenia RU 440 a Barevná 9 s génmi pre modrý aleurón. Modré sfarbenie zrna môže byť u pšenice podmienené dvomi odlišnými génmi *Bal* a *Ba2* (blue aleurone). Gen *Bal* bol lokalizovaný na dlhom ramene chromozómu 4B na translokovanom segmente prenesenom z *Elytrigia pontica*. Gen *Ba2* je podmienený disomickou substitúciou chromozómu 4A, ktorá pochádza pravdepodobne z *Triticum boeoticum* (Martinek et al., 2006).

Ako donor červenej farby pericarpu boli použité jarné pšenice nesúce gény pre purpurový perikarp zrna: ANK-28A (ktorá je takmer izogénnou líniovou odvedenou od Novosibirskej 67), Purple (*Pp1Pp1Pp3aPp3a*) a Purple Feed (*Pp1Pp1Pp3bPp3b*). Tieto donory boli krížené s odrodami bez purpurového zafarbenia. V krížení pšeníc so zmeneným zafarbením zrn boli ako recipientné genotypy použité vo väčšej miere odrody: Heroldo, Akteur, Skalmeje, Turkis, Herman a Meritto.

V kontrolnej skupine s normálnym klasom (NS - normal spike) bolo hodnotených 440 línii, ktoré vznikli na základe vzájomného kríženia spolu 54 bežných komerčne využívaných odrôd.

V skupine s TP bolo hodnotených 60 línii, v skupine s MRS 82 línii, v skupine s farebným zrnom 198 línii. Boli sledované nasledujúce ukazovatele: úroda zrna, hmotnosť tisíc zrn (HTZ), počet zrn a obsah dusíkatých látok (NL) v zrne. Obsah NL bol vyhodnotený na NIRSe (near-infrared radiation spectroscopy), pri farebných

pšeniciach vyhodnotenie touto metódou nebolo možné, a preto nie je uvádzané. Parcelu predstavovalo potomstvo jedného klasu na ploche 0,25m²

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Úroda zrna na parcelku (tab.1) bola najvyššia v skupine pšeníc s normálnym klasom, naopak najnižšia v skupine s TP, kde úroda predstavovala len 56% úrody skupiny s normálnym klasom.

Medzi skupinou MRS a farebnými pšenícami neboli v hmotnosti zrna na parcelku zistené štatisticky preukazné rozdiely.

HTZ bola najnižšia v TP skupine, v skupine MRS bola vyššia a najvyššia bola v skupine normálnych klasov. Medzi skupinami boli štatisticky preukazné rozdiely.

Počet zŕn na parcelku bol najnižší u pšeníc s TP, opäť najvyšší počet sme zaznamenali v kontrolnej skupine s NS. Medzi skupinami MRS a NS nebol štatisticky preukazný rozdiel.

Najvyšší obsah bielkovín 14,67 % bol v TP skupine, najnižší v skupine MRS 11,31 % aj keď tu boli použité ako otcovské odrody s vyšším obsahom bielkovín. Ukázalo sa, že metóda hodnotenia obsahu NL, založená na meraní spektrálnej odrazivosti zrna nie je pri pšeničnom zrne s výrazne zmeneným zafarbením použiteľná.

Úroda zrna bola najvyššia pri skupine pšeníc, kde vstupovali do šľachtenia odrody vysoko úrodnej a s dostatočnou odolnosťou voči nepriaznivo pôsobiacim vonkajším faktorom prostredia (odolnosť voči chorobám, zimuvzdornosť a i.). Donory nesúce zmenenú morfológickú stavbu klasu (MRS a TP) sú neprešľachtené a preto očakávame, že vytvorenie odrôd s týmito novými znakmi bude vyžadovať ešte množstvo šľachtiteľskej práce.

Je pochopiteľné, že v skupine línií s TP je väčší počet zŕn v kvietku kompenzovaný ich nižšou hmotnosťou. Neprekvapuje ani nižšia HTZ v skupine genotypov s MRS, kde sú zrná nakopené v relatívne malom priestore a nemajú zrejme rovnakú možnosť rastu ako u NS. V budúcich prácach bude zaujímavé zistiť nakoľko veľkosť zŕn ovplyvňuje morfológia klasu a aká je schopnosť rastliny užiť vysoký počet zŕn v klase. HTZ pšeníc so zmenenou farbou zrna bola na úrovni skupiny s normálnym klasom. Zrejme je to preto, že morfológia klasu týchto skupín bola rovnaká (NS).

Najvyšší priemerný obsah NL 14,68 % bol vo skupine s TP, kde bolo tiež zistené veľké rozpätie hodnôt (12,44-17,93 %). V našom pokuse založenom za rovnakých agrotechnických podmienok predpokladáme, že obsah NL bol ovplyvnený hlavne veľkosťou zrna a úrodou. Domnievame sa, že zrná s nízkou HTZ majú relatívne väčší objem aleurónovej vrstvy a preto u nich je obsah NL obvyčajne vyšší. Samozrejme, že na obsah bielkovín má vplyv celý rad faktorov (odroda, prostredie, zdravotný stav, úroveň dusíkatej výživy, a pod.). Prekvapujúci je fakt, že počet zŕn na parcelke je najnižší v TP skupine, čo bolo pre nás prekvapením. Na túto skutočnosť však mohol mať vplyv nízkej odnožovacej schopnosti východzieho donoru z Číny a jeho výrazná skorosť, ktorá sa pravdepodobne do istej miery preniesla aj do hodnotených línií, kde pri spoločnom porovnaní hodnotených skupín mohli byť tieto vlastnosti určitou nevýhodou. Je potrebné si uvedomiť, že čínsky zdroj TP-mutant je jarná pšenica a zimuvzdornosť aj po nakrížení s ozimnými formami nie je ešte na požadovanej úrovni. Skupina MRS a normálnych pšeníc bola v počte zŕn prakticky zhodná s NS a je predpoklad, že ďalším šľachtením sa tento ukazovateľ v MRS skupine môže zvýšiť.

Šľachtenie je disciplína s behom na dlhé trate. Aj prvé tritikale bolo málo úrodné a malo veľa nedostatkov. Dnes patrí medzi najúrodnejšie obilniny. Taktiež pri vytváraní nových materiálov s netradičnou štruktúrou klasu, popr. s netradičnou farbou zrna sú šľachtitelia prakticky na štarte, aj keď vo farbe zrna sú už čiastočné úspechy (modrý aleuron: novošľachtenie RU 440-6 s nádejou na registráciu v roku 2012 v Rakúsku, ozimná pšenica s purpurovým perikarpom Indigo a novošľachtenie, PS 62/10 v štátnych skúškach na Slovensku).

ZÁVER

Najvyššie úrody boli zistené v kontrolnej skupine genotypov s normálnymi klasmi. Je to pochopiteľné pretože sa jedná o skupinu, ktorá je predstavovaná bežnými odrodami, ktoré prešli intenzívnym testovaním na úrodu a možno predpokladať, že majú oveľa lepšie genetické pozadie ako súbory línií s novými znakmi. Vyšľachtenie línií s novými znakmi meniacimi stavbu klasu a usporiadanie zŕn v kvietku bude vyžadovať ďalšie zlepšenie genetického pozadia pomocou opakovaného kríženia s vysokoproduktívnymi odrodami.

Pod'akovanie. Práca bola podporená projektom česko-slovenskej spolupráce KONTAKT-Mobilita MEB0810001 Ministerstva školstva, mládeže a telovýchovy České republiky .

Tabuľka 1: Charakteristika šľachtiteľského materiálu

Skupina	Počet hodnotených genotypov	Ukazovateľ			
		Výnos (t.ha ⁻¹)	HTZ (g)	Počet zrn na 1m ²	Obsah NL (%)
1. TP - s tromi pestíkmi v kvietku	60	7,31 c	35,6 d	20 620 b	14,7 a
2. MRS	82	10,89 b	42,4 b	26 160 a	11,3 c
3. Farebné zrná	198	10 64 b	48,9 c	22 060 b	-
4. NS (kontrolné odrody)	440	13,13 a	50,5 a	26 232 a	12,5 b

pozn.: preukaznosť pri $p=0,05\%$ (Tukey)

LITERATÚRA

- CHEN, J-S., ZHANG, L-H., WU, B-L. 1983. A preliminary report on the discovery and breeding of the "trigrain wheat". *Acta Agronomica Sinica*, 9, 69-72.
- MARTINEK, P., ULLMANNOVÁ, K., MIKULCOVÁ, J. 2006. Vlastnosti pšenice (*Triticum aestivum* L.) s mnohořadým klasem. *Nové poznatky z genetiky a šľachtenia poľnohospodárskych rastlín*. Zborník z 13. vedeckej konferencie, Piešťany, 188-189.
- MARTINEK, P., COUFALOVÁ, O., KUREČKA, R., NOVÁKOVÁ, E., MIKULCOVÁ, J. 2006. Netradiční barva obiliek pšenice (*Triticum aestivum*, L.), její genetická podmínenost a možnost využití v potravinářství. *Nové poznatky z genetiky a šľachtenia poľnohospodárskych rastlín*. Zborník z 13. vedeckej konferencie, Piešťany, 95-98.
- MARTINEK, P., PENG, Z-S. 2007. Pšenice (*Triticum aestivum* L.) se třemi pestíky v kvítku. *Nové poznatky z genetiky a šľachtenia poľnohospodárskych rastlín*. Zborník z 14. vedeckej konferencie, Piešťany, 154-157.

Adresa autorov:

- Ing. Rückschloss Lubomír CVRV Piešťany VŠS Vígľaš Pstruša , ruckschloss@vurv.sk
 Ing. Hanková Andrea PhD. CVRV Piešťany VŠS Vígľaš Pstruša , hankova@vurv.sk
 Ing. Matúšková Katarína CVRV Piešťany VŠS Vígľaš Pstruša , matuskova@vurv.sk
 Ing. Valčuhová Daniela CVRV Piešťany VŠS Vígľaš Pstruša , valcuhova@vurv.sk
 Ing. Martinek Petr CSc. Agrotest fyto, s.r.o. Kroměříž , martinek.petr@vukrom.cz

NICKEL TOXICITY IN *AEGILOPS CYLINDRICA* AND *AEGILOPS GENICULATA*, WILD RELATIVES OF COMMON WHEAT

TOXICITA NIKLU V DIVOKO RASTÚCICH PREDCHODCOCH PŠENICE (*AEGILOPS CYLINDRICA* A *AEGILOPS GENICULATA*)

OKSANA SYTAR², MARIAN BRESTIČ¹

¹Department of Plant Physiology, Slovak University of Agriculture in Nitra, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia; ²Department of Plant Physiology and Ecology, Taras Shevchenko National University of Kyiv, Volodymyrs'ka St. 64, 01601 Kyiv, Ukraine

The effects of different nickel (Ni^{2+}) concentrations on malondialdehyde (MDA), phenolics, chlorophyll *a* fluorescence parameters under stress conditions were studied in two *Aegilops* genotypes: *Aegilops cylindrica* and *Aegilops geniculata*. *Ae. cylindrica* plants at 24h exposition under different Ni^{2+} concentrations have been showed dose-dependent increasing of MDA content to Ni^{2+} effect. With increasing Ni^{2+} concentration (1, 3, 5 mmol/kg) the content of total phenolics in leaves of *Ae. cylindrica* at 24 h of exposition has been decreased which evidence that reduced total phenolics content in leaves of experimental plants under the Ni^{2+} excess was probably due to their involvement in mechanisms aiming at eliminating stress-generated reactive oxygen species (ROS).

Keywords: *Aegilops*, malonyldialdehyde, phenolics, non-photochemical quenching

INTRODUCTION

Nowadays toxic levels of some heavy metals as Ni^{2+} as a result of environmental pollution due to the removal technology of mining, heavy vehicular traffic, smelting, manufacturing, and agricultural wastes in natural and agricultural areas [12]. Ni^{2+} is essential for plants, but the concentration in the majority of plant species is very low (0.05 – 10 mg/kg dry weight) [11]. Further, with increasing Ni^{2+} pollution, excess Ni^{2+} rather than a deficiency, is more commonly found in plants. Toxic effects of high concentrations of Ni^{2+} in plants have been frequently reported, for example inhibition of mitotic activities [8], reductions in plant growth. Extremely high soil Ni^{2+} concentrations have left some farmland unsuitable for growing crops, fruits and vegetables [4].

Ion toxicity and deficiency have been poorly investigated in wheat related species. The diploid *Triticum* and *Ae. speltoides* were found by Dinev & Natcheva (1995) to be tolerant to manganese toxicity, and *Ae. tauschii* to be a high accumulator of aluminium [3]. Accessions of *T. carthlicum* have been identified by Gamzikova & Barsukova (1996) as sources of nickel and cadmium resistance [6]. For zinc deficiency, *T. dicoccoides* was found as susceptible, *Aegilops* species carrying the U genome as resistant and *Ae. tauschii* and *Ae. speltoides* as intermediate [1]. The wild *Aegilops* species are in close phylogenetic relationships with genus *Triticum*. Their wide adaptation and high genetic diversity motivated the interest in using *Aegilops* species as donors of genes for resistance and tolerance to abiotic stress factors. For example, *Ae. sharonensis* is a donor of genes for resistance to fungal diseases, and for tolerance to aluminium and boron toxicities [9]. The species is reported to carry a gametocidal gene Gs2-S11b in chromosome 4Ssh [5], which causes chromosome aberrations in hetero- or hemizygous condition, and thus is of particular interest for wheat-alien chromosome manipulations.

Therefore the aim of this work was to study MDA, phenolics contents and chlorophyll *a* fluorescence measurements to show development of adaptive reactions after treatment by spraying under different concentrations of Ni^{2+} to *Aegilops* genotypes as important source in wheat breeding process. This knowledge could be helpful to choose proper *Aegilops* genotypes tolerant or resistant to Ni^{2+} stress which can give new possibilities for breeders.

MATERIAL AND METHODS

Plant material. Seeds were germinated in the greenhouse for 14 days in 16/8 h photoperiod at 23°C at roughly 65% humidity. The Ni^{2+} under study were supplied at 0.5, 1.0, 3.0 and 5.0 mmol/kg as $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$. Nickel was applied by spraying treatment under above mentioned conditions for a period of 24, 72 h. Control plants were obtained by growing them without treatment by $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$. All the experiments were set up in triplicate and each replicate contained six plants. After 14 days harvesting, plants were washed with double distilled water, blotted and separated leaves and used for the study of various parameters.

Lipid peroxidation (LP). Plant material (200 mg of leaves) was homogenized in 3 ml 0.1 mmol/kg Tris buffer containing 0.3 mmol/kg NaCl. After that 2 ml of 20% TCA containing 0.5 % TBA and 2 ml 20% TCA were mixed. The mixture was heated to 95°C for 30 min and then homogenate was centrifuged at 10 000 rpm for 5 min. Absorbance of the supernatant was taken at 532 nm [7].

Determination of total phenolics. Total phenolics were determined by using Folin-Ciocalteu reagent [15]. 20 mg powdered sample (freeze-dried) were extracted for 10 min with 500µl of 70% methanol at 70°C. The mixture was centrifuged at 3500 rpm for 10 min and the supernatants were collected in new tubes. The pellets were re-extracted under identical conditions again. Supernatants were combined and used for total phenolics assay. For

total phenolics assay 20 μ l of extract was dissolved into 2 ml of distilled water. 200 μ l of dissolved extract was mixed with 1 ml of Folin-Ciocalteu reagent (previously diluted 10-fold with distilled water) and kept at 25°C for 3-8 min; 0.8 ml of sodium bicarbonate (75 g/l) solution was added to the mixture. After 60 min at 25°C, absorbance was measured at 765 nm. The results were expressed as gallic acid equivalents.

Statistics. Statistically significant differences between control and stressed samples were analyzed with standard deviation calculation from three to five reduplication measurements, which are presented in all graphs as error bars (Microsoft Excel).

RESULTS AND DISCUSSION

Lipid peroxidation. LP is a biochemical marker for the free radical mediated injury. Character of changes in LP depends on intensity of influence stressor and from plant sensitivity. In leaves of both experimental plants at 24h after Ni^{2+} treatment by concentration 5 mmol/kg the level of MDA content has been increased (Figure 1a, b). The MDA content has been increased on 43% for *Ae.cylindrica* and for *Ae.geniculata* on 15%, respectively. *Ae.cylindrica* plants at 24 h of exposition under different Ni^{2+} concentrations has been showed dose-dependent increasing of MDA content which can evidence about more fast development of response answer of *Ae.cylindrica* plants to Ni^{2+} effect compared to *Ae.geniculata* plants. Our results have been shown an increase in the level of lipid peroxides with high concentration of Ni^{2+} , indicating that Ni^{2+} induces oxidative stress in both *Aegilops* genotypes. But response reactions of plants to Ni^{2+} excess has been differ.

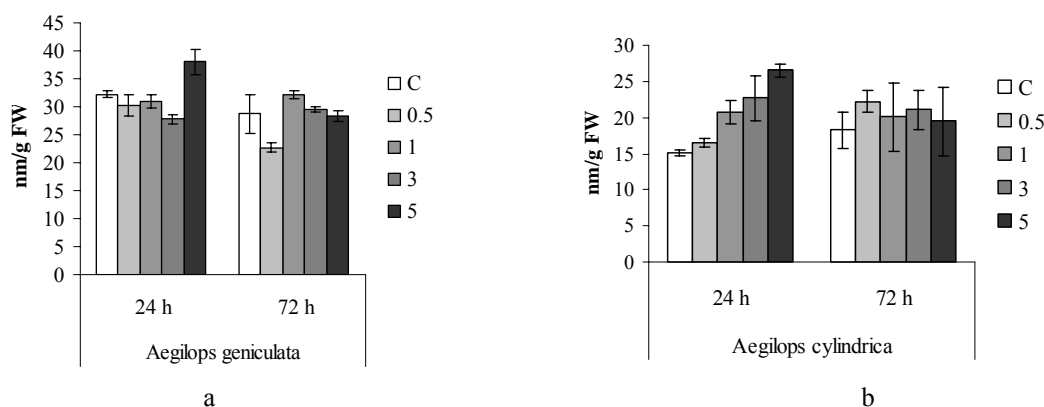


Fig. 1: MDA content in *Aegilops geniculata* (a) and *Aegilops cylindrica* (b) leaves under effect of different Ni^{2+} concentrations, where C-control, without treatment

At 72h of exposition content of MDA in the leaves of *Ae.cylindrica* and *Ae.geniculata* has been equal to control level which can be evidence about stabilisation of oxidative process in both experimental plants. Excess of Ni^{2+} promoted lipid peroxidation and production of MDA perhaps as result of generation of free radicals. Similar responses were observed in wheat plants treated with Zn^{2+} and Cr^{2+} [13]. The antioxidative defense enzymes showed increased activity in Ni^{2+} treated seedlings of drought sensitive durum wheat cultivar; this increase in activity was not observed in the drought tolerance seedlings. In this case it is possible to suggest that different wheat genotypes may markedly differ in Ni^{2+} uptake and sensitivity and that a enhanced capacity to counteract Ni^{2+} stress may be associated with drought resistance [14].

Total phenolics content. In *Ae.geniculata* at 24 h of Ni^{2+} exposition has been observed dose-dependent increasing of total phenolics content in experimental variants with different Ni^{2+} concentrations (Figure 2a). The induction of phenolic compound biosynthesis was observed in wheat in response to nickel toxicity [2] and in maize in response to aluminium [16]. The observed rise in phenolics concentration at 24 h of exposition might be explained by the increased capacity of plant cells to synthesize and store these antioxidants in vacuoles. In *Ae.cylindrica* under treatment with concentration 0.5 mmol/kg of Ni^{2+} has been shown increasing content of total phenolics to 24% compared to control (Figure 2b).

But with increasing Ni^{2+} concentration (1, 3, 5 mmol/kg) the content of total phenolics has been decreased which can be evidence together with increasing MDA content about synergetic development of response answer in *Ae.cylindrica* plants to Ni^{2+} stress at 24 h of exposition.

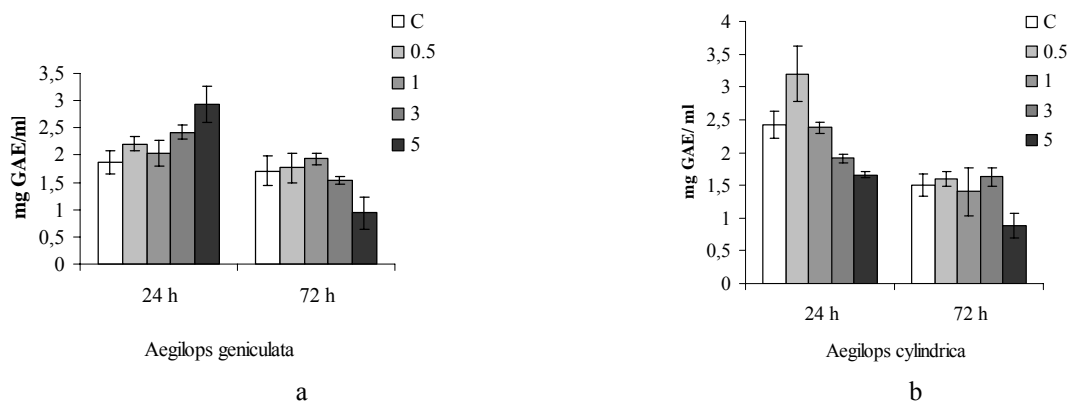


Fig. 2: Total phenolics content in *Aegilops geniculata* (a) and *Aegilops cylindrica* (b) leaves under effect of different Ni^{2+} concentrations, where C-control, without treatment

The reduced total phenolics content in leaves of experimental plants under the Ni^{2+} excess was probably due to their involvement in mechanisms aiming at eliminating stress-generated ROS [10].

At 72 h of Ni^{2+} exposition in the variant with concentration 5 mmol/kg in both *Aegilops* genotypes (Figure 2a, b) has been shown decrease of total phenolics content what can evidence about negative effect of this concentration. In the other experimental variants (0.5, 1, 3 mmol/kg of Ni^{2+} concentrations) were not found significant difference in total phenolics content compared to control.

Under Cu^{2+} excess under hydroponic culture the free phenolics content was higher in the not tolerant to Cu^{2+} excess *Aegilops* line TL5 than in more tolerant to excess Cu^{2+} *Aegilops* line TL3 [10]. In this case we can suppose that *Ae. geniculata* has response answer which is known for not tolerant to Ni^{2+} excess *Aegilops* genotype. The response reaction with dose-dependent decreasing level of total phenolics content and increasing MDA at 24 h of exposition has been shown for *Ae. cylindrica*.

CONCLUSION

Changes in MDA and total phenolics contents has been showed development of adaptive reaction in *Aegilops* species plants under Ni^{2+} excess. *Ae. geniculata* plants at 24 h of exposition just under Ni^{2+} concentration 5 mM has been showed high content of MDA in plant leaves. *Ae. cylindrica* plants at 24 h of exposition under different Ni^{2+} concentrations has been showed dose-dependent increasing of MDA content which can evidence about more fast development of response answer of *Ae. cylindrica* plants to Ni^{2+} effect compared to *Ae. geniculata* plants. With increasing Ni^{2+} concentration (1, 3, 5 mmol/kg) the content of total phenolics in leaves of *Ae. cylindrica* at 24 h of exposition has been decreased. In *Ae. geniculata* at 24 h of Ni^{2+} exposition has been observed dose-dependent increasing of total phenolics content in experimental variants. Under achieved results with investigation of adaptive reactions of both *Aegilops* genotypes under Ni^{2+} excess we suppose that *Ae. geniculata* has response answer which is known for not tolerant to Ni^{2+} excess plants.

Acknowledgements. This work was supported by the Slovak Research and Development Agency under the contract No. APVV-0197-10 and the National Scholarship Programme of the Slovak Republic (SAIA).

REFERENCES

- CAKMAK, I.-TOLAY, I.-OZKAN, H.-OZDEMIR, A.-BRAUN, H.J. 1999. Variation in zinc efficiency among and within *Aegilops* species. In *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde*, vol. 162, 1999, pp. 257-262.
- DIÁZ J.-BERNAL A.-POMAR F.-MERINO F. 2001. Induction of shikimate dehydrogenase and peroxidase in pepper (*Capsicum annum* L.) seedlings in response to copper stress and its relation to lignification. In *Plant Sci.*, vol. 161, 2001, pp. 179-188.
- DINEV, N.S.-NETCHEVA V. 1995. Plant mineral composition and tolerance to low pH in species of Tribe *Triticeae*. In *Soil Science and Plant Analysis*, vol. 26, 1995, pp. 223-235.
- DUARTE B.-DELGADO M.-CACADOR I. 2007. The role of citric acid in cadmium and nickel uptake and translocation, in *Halimione portulacoides*. In *Chemosphere*, vol.69, pp. 836 – 840.
- ENDO, T. R. 1985. Two types of gametocidal chromosome of *Aegilops sharonensis* and *Ae. longissima*. In *Jpn. J. Genet.*, vol. 60, 1985, pp. 125-135.

- GAMZIKOVA, O.I.-BARSUKOVA, V.S. 1996. Change in wheat resistance to heavy metals. In *Russian Agricultural Sciences*, vol. 3, 1996, pp. 22-25.
- HEATH, R.L.-PACKER, L. 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. In *Archives in Biochemistry and Biophysics*, 1968, vol. 125, pp. 189–198.
- MADHAVA RAO, K. V.-SRESTY, T. V. 2000. Antioxidative parameters in the seedlings of pigeonpea (*Cajanus cajan* (L.) Millspaugh) in response to Zn and Ni stresses. In *Plant Sci.*, vol. 157, 2000, pp. 113 – 128.
- MANYOWA, N.M.-MILLER, T.E. 1991. The genetics of tolerance to high mineral concentrations in the tribe *Triticeae*. In *Euphytica*, vol. 57, 1991, pp. 175–185.
- NENOVA, V.-MERAČHIYSKA, M.-GANEVA, G.-ZOZIKOVA, E.-LANDJEVA, S. 2009. Physiological responses of wheat (*Triticum aestivum* L.) – *Aegilops sharonensis* introgression lines to excess copper, In *J. Agronomy & Crop Science*, vol. 195, 2009, pp. 197–203.
- NIEMINEN, T. M.-UKONMAANAHO, L.-RAUSCH, N.-SHOTYK, W. 2007. Biogeochemistry of nickel and its release into the environment. In *Met. Ions Life Sci.*, vol. 2, 2007, pp. 1 – 30.
- ONCEL, I.-KELE, Y.-USTUN, A.S. 2000. Interactive effects of temperature and heavy metal stress on the growth and some biochemical compounds in wheat seedlings. In *Environmental Pollution*, vol. 107, 2000, pp. 315-320.
- PANDA, S.K.-CHAUDHURY, I.-KHAN M.H. 2003. Heavy metals induce lipid peroxidation and affect antioxidants in wheat leaves. In *Biologia Plantarum*, vol.46, 2003, pp. 289-294.
- PANDOLFINI, T. - GABBRIELLI, R. - CISCATO, M. 1996. Nickel toxicity in two durum wheat cultivars differing in drought sensitivity. In *Journal of Plant Nutrition*, vol.19, 1996, pp. 1611 – 1627.
- SINGLETON, V.L.-ROSSI, J.A. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic- phosphotungstic acid reagents. In *Am.J. Enol. Vitic.*, vol. 16, 1965, pp. 144-158.
- WINKEL-SHIRLEY B. 2002. Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. In *Curr. Opin. Plant Biol.*, vol. 5, 2002, pp. 218-223.

The author's name, address, phone:

Dr. Oksana Sytar, Department of Plant Physiology and Ecology, Faculty of Biology, Taras Shevchenko National University of Kyiv, 64, Volodymyrs'ka St., 01601 Kyiv, Ukraine, e-mail address: o_sytar@ukr.net
prof. Ing. Marián Brestič, CSc., Department of Plant Physiology, Faculty of agrobiology and food resources, Slovak University of Agriculture in Nitra, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, e-mail address: Marian.Brestic@uniag.sk

UMĚLÉ dsRNA MOLEKULY – NETRASGENNÍ NÁSTROJ PRO KONTROLU ROSTLINNÝCH VIRŮ

ARTIFICIAL dsRNA AS A NONTRANSGENIC TOOL IN PLANT VIRUS CONTROL

DANA ŠAFÁŘOVÁ, PAVEL BRÁZDA, MILAN NAVRÁTIL

Katedra buněčné biologie a genetiky, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci

Plant virus epidemics cause the serious damages of quality and yield of agricultural crops. Therefore their effective control is necessary for the agricultural production. With the increasing knowledge about the endogenous plant defense mechanisms the induction of RNA-silencing by application of artificial dsRNA molecules seems to be promising tools to. In this work the coat protein gene genomic fragment of PSbMV was chosen and artificial dsRNA was successfully produced.

Key words: *Pea seed-borne mosaic virus*, plášťový protein, RNA vakcína, produkce in vitro.

ÚVOD

Epidemie řady rostlinných virů mají často negativní dopad na zemědělskou produkci, vedoucí až k velmi významným ekonomickým ztrátám. Nejlepším řešením je získání rezistentních odrůd zemědělských plodin. K tomuto cíli je možné využít jak klasického šlechtění, tak indukované rezistence – tedy genotypů získaných genovými manipulacemi (GMO). Rostlinné viry však vykazují ve srovnání s jinými patogeny vyšší proměnlivost, a tedy lepší schopnost přizpůsobení se na nové ekologické podmínky a hostitele (Garcia-Arenal et al. 2003). Neznají hranice a vykazují silný potenciál šíření v případě, že nejsou fyto-sanitární opatření aplikována koordinovaně v mezinárodním měřítku. Primární strategií pro kontrolu šíření rostlinných chorob je zcela jistě prevence. Za nejtrvanlivější a nejlevnější strategii je považována hostitelská rezistence. Tradiční metoda vnášení genů rezistence do jednotlivých kultivarů prostřednictvím klasického šlechtění, je časově velmi náročná, a není vždy spojená s nejvyšší kvalitou produkce nebo růstovými vlastnostmi rostlin, navíc v řadě případů nejsou dostupné nebo známe vhodné progenitory rezistence. S pokrokem dosaženým v současnosti v oblasti geneticky modifikovaných (transgenních) rostlin se ukázalo, že rostliny odolné vůči virové infekci mohou být vytvořeny tímto způsobem. Tento molekulárně-šlechtitelský proces je rychlejší a geneticky lépe kontrolovatelný (Prins et al. 2008). Nicméně současná opatření Evropské Unie omezují využití transgenních rostlin v EU a tyto restriktce budou, vzhledem k obecnému konzervativnímu postoji společnosti, pravděpodobně uplatňovány v dlouhodobém horizontu.

V případě, že nemáme k dispozici rezistentní odrůdy, se kontrola rostlinných virů mnohdy soustředí jen na extenzivním využití agrochemikálií v boji proti virovým vektorům (např. členovci, háďátka), což jednak zvyšuje výrobní náklady, jednak vystavuje zdravotním rizikům jak zemědělce, tak konzumenty (v důsledku vyšší hladiny chemických reziduí přítomných v konečném produktu). Nezanedbatelné je i potlačení jiných prospěšných zástupců hmyzu. Je zřejmé, že je velmi žádoucí vyvinout nové metody pro rychlou a proaktivní kontrolu viru, které umožní vyhnout se výše zmíněným problémům a nevýhodám.

Rostliny na rozdíl od živočichů nemají vyvinutý imunitní systém. Současné poznatky ale potvrdily, že rostliny využívají k obraně vůči virům sekvenčně specifický mechanismus degradace mRNA (RNA-silencing). Tento mechanismus označovaný jako posttranskripční genové umlčování (PTGS) je buňkou využíván ke kontrole genové exprese u široké škály organismů. Zároveň je RNA-umlčování považováno za jeden z nejúčinnějších přirozených mechanismů obrany rostlin vůči akumulaci virů. Proces je iniciován dvouvláknovými RNA molekulami, které jsou produkovány v průběhu virové replikace. Tyto dsRNA jsou rozeznány rostlinou jako „cizí“ a následně jsou štípány rostlinou kódovanými Dicer-like enzymy za vzniku siRNA molekul o délce 21-25nt. Vzniklé siRNA pak vyvolávají sekvenčně specifickou RNA degradaci pomocí siRNA-indukovaného umlčovacího komplexu (RISC), který zničí virové RNA (Baulcombe 1996, Lin et al. 2007).

Pokroky v genovém inženýrství společně s objevem patogenem odvozené rezistence, kdy vnesení patogenu vlastního genetického materiálu může sloužit k ochraně vůči němu samotnému, otevřely cestu k použití transgenních rostlin v úspěšné kontrole rostlinných virů. Úspěšnost tohoto přístupu byla nejdříve prokázána u tabáku, kdy rostliny s vneseným genem pro plášťový protein TMV nevykazovaly příznaky infekce (Beachy 1999). Tato tzv. proteinem zprostředkovaná rezistence byla s menším nebo větším úspěchem využita i u dalších rostlinných virů a plodin. V řadě případů však u transgenních rezistentních genotypů nebylo možné detekovat přítomnost transgenního proteinu, tj.

např. plášťového virového proteinu. Při detailních analýzách bylo posléze prokázáno, že pro vyvolání rezistence je dostačující přítomnost malých interferujících RNA, a to jak siRNA, tak miRNA (Baulcombe 1996, Smith et al. 2000). V současnosti se tohoto principu RNA-zprostředkované rezistence úspěšně využívá pro konstrukci transgenů, při jejichž expresi v transgenních rostlinách dochází k tvorbě dvouvláknové RNA, které slouží jako induktory mechanismu umlčování genů, který je využit pro degradaci virové RNA a navození rezistence (Chen et al. 2004, Niu et al. 2006). Přestože mechanismus RNA-intereferencie je považován za obranný systém rostliny, je nezbytné si uvědomit, že se jedná o složitý dynamický systém, ve kterém se uplatňují vedle dalších buněčných faktorů i virové supresory umlčování genů. Indukovaná rezistence na něm založená nemusí mít stoprocentní účinek (Smith et al. 2000, Waterhouse a Helliwell 2003).

Cílem práce je vybrat genomický fragment PSbMV vhodný pro indukci rezistence vůči viru semenem přenosné mozaice hrachu, navrzení podmínek a syntéza umělých dsRNA molekul.

MATERIÁL A METODY

Fylogenetická analýza

Fylogenetická analýza byla provedena metodou neighbor-joining analýzy (MEGA 5.0) na souboru dříve charakterizovaných vlastních (Šafářová et al., 2008) a v databázi GenBank dostupných sekvencí genu pro plášťový protein (*cp*) izolátů viru PSbMV. Získaná matice izolátů příslušejících k biologickému patotypu P-1 byla využita pro analýzu DNA polymorfismu pomocí DNAsp ver. 4.0.

Návrh a analýza primerů

Ve zjištěné konzervativní oblasti *cp* genu byly pomocí programu PrimerSelect (Lasergene) navržena kombinace primerů vhodných pro syntézu dsRNA. Jejich vlastnosti byly stanoveny pomocí IDT OligoAnalyzer ver. 3.1.

Příprava umělé dsRNA

Pro syntézu cílové molekuly byl použit pGEM-T plazmid nesoucí kompletní sekvenci genu pro plášťový protein. Umělá dsRNA byla syntetizována pomocí kitu Replicator RNAi (Finnzymes), podle pokynů výrobce. Koncentrace a kvalita nasyntetizované dsRNA byla stanovena spektrofotometricky (NanoDrop 1000).

VÝSLEDKY A DISKUSE

Byla studována možnost aplikace *in vitro* syntetizovaných indukčních molekul, umělých dsRNA, s cílem navození odolnosti rostlin vůči viru. Pro experiment byl zvolen patosystém PSbMV (biologický patotyp P-1) a hostitel, hrách setý (*Pisum sativum* L.).

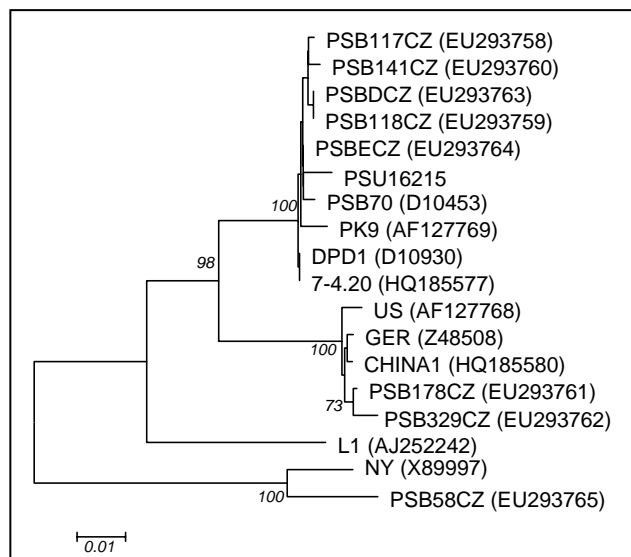
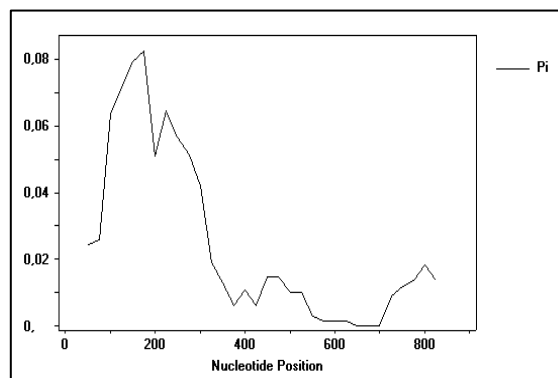
V rámci dostupných nukleotidových sekvencí izolátů PSbMV byla zjištěna variabilita genu pro plášťový protein, genomické části potenciálně vhodné pro navození odolnosti vůči viru. Fylogenetická analýza pomocí NJ-metody prokázala příbuznost mezi izoláty příslušejícími ke stejnému, v Evropě se běžně vyskytujícímu, patotypu P-1. Tyto izoláty vytvářejí dva signifikantní klastry, průkazně odlišné od izolátů zbývajících patotypů P-2 (např. izolát L1) a P-4 (např. izoláty NY a PSB58CZ) (Obr. 1). Analýza DNA polymorfismu *cp* genu původních českých a dalších izolátů PSbMV patotypu P-1 umožnila identifikaci variabilních a konzervativních částí genu. Byla zjištěna vysoká variabilita 5'oblasti a naopak identifikována konzervativní oblast ve 3'oblasti genu (Obr. 2).

Ve zjištěné konzervativní oblasti (*cp*³⁰⁰⁻⁸³⁷) byly navrženy kombinace primerů nesoucích i sekvence promotorů nezbytných pro správný průběh syntézy. Z navržených kombinací byla vybrána dvojice primerů - PSB117cp0_F a PSB117cp0_R - vhodných pro syntézu umělé dsRNA, které nevytvářely vlásenky v úseku promotorů a Gibsova volná energie vytvořených dimerů a heterodimerů byla vyšší než -8 kcal/mol (Tabulka 1). Navržené primery byly následně úspěšně použity k syntéze specifických umělých dsRNA molekul o délce ca 500 bp. Při použití 1 μg templatové DNA bylo získáno 0,97 – 3,87 μg dsRNA o koncentraci 21,6 – 86,1 ng/μl.

Studium účinku umělých dsRNA na replikační cyklus viru a jeho přenos semenem bylo zahájeno.

ZÁVĚR

Byly úspěšně připraveny umělé dsRNA molekuly vhodné pro studium indukované odolnosti rostlin vůči virové infekci a pro jejich praktické využití v ochraně rostlin.

Obr.1: Fylogenetický strom izolátů PSbMV konstruovaný na základě sekvence *cp* genu.Obr. 2: Analýza DNA polymorfismu *cp* genu izolátů PSbMV patotyp P-1

Tabulka 1: Vlastnosti primerů PSB117cp0_F a PSB117cp0_R navržených pro syntézu dsRNA

Název primeru	Délka [nt]	Obsah GC [%]	T _m [°C]	ΔG homo-dimeru [kcal/mol]	ΔG hetero-dimeru [kcal/mol]	ΔG vlásenky [kcal/mol]
PSB117cp0_F	40	50,0	66,3	-6,59 až -0,96	-6,69 až -1,34	-0,36 až 0,44
PSB117cp0_R	29	48,3	63,0	-4,64 až -1,47		-0,95

Poděkování: Tato práce byla realizována za podpory projektu MŠMT MSM6198959215 a díky spolupráci v rámci projektu COST FA0806.

LITERATURA

- BAULCOMBE, D.C. 1996. Mechanisms of Pathogen-Derived Resistance to Viruses in Transgenic Plants. In *Plant Cell* vol. 8, 1996, no. 10, pp. 1833–1844.
- BEACHY, R.N. 1999. Coat-protein-mediated resistance to tobacco mosaic virus: discovery mechanisms and exploitation. In *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B.* vol. 354, 1999, pp. 659–664.
- GARCIA-ARENAL, F. – MCDONALD, B.A. 2003. An analysis of the durability of resistance to plant viruses. In *Phytopathology* vol. 93, 2003, pp. 941–952.
- CHEN, Y.K. – LOUIS, D. – GOLDBACH, R. – PRINS, M. 2004. High frequency induction of RNA-mediated resistance against Cucumber mosaic virus using inverted repeat constructs. In *Molecular Breeding* vol. 14, 2004, pp. 215–226.
- LIN, S.S. – HENRIQUES, R. – WU, H.W. – NIU, Q.W. – YEH, S.D. – CHUA, N.H. 2007. Strategies and mechanisms of plant virus resistance. In *Plant Biotechnology Reports* vol. 1, 2007, pp. 125–134.
- NIU, Q.W. – LIN, S.S. – REYES, J.L. – CHEN, K.C. – WU, H.W. – YEH, S.D. – CHUA, N.H. 2003. Expression of artificial microRNAs in transgenic *Arabidopsis thaliana* confers virus resistance. In *Nature Biotechnology* vol. 24, 2003, pp. 1420–1428.
- PRINS, M. – LAIMER, M. – NORIS, E. – SCHUBERT, J. – WASSENEGGER, M. – TEPFER, M. 2008. Strategies for antiviral resistance in transgenic plants. In *Molecular Plant Pathology* vol. 9, 2008, pp. 73–83.
- SMITH, N.A. – SINGH, S.P. – WANG, M.B. – STOUTJESDIJK, P.A. – GREEN, A.G. – WATERHOUSE, P.M. 2000. Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs. In *Nature* vol. 47, 2000, pp. 319–320.
- SAFAROVA, D. – NAVRATIL, M. – PETRUSOVA, J. – POKORNY, R. – PIAKOVA, Z. 2008. Genetic and biological diversity of the Pea seed-borne mosaic virus isolates occurring in Czech Republic. In *Acta virologica* vol. 52, 2008, pp. 53–57.
- WATERHOUSE, P.M. – HELLIWELL, C.A. 2003. Exploring plant genomes by RNA-induced gene silencing. In *Nature Reviews Genetics* vol. 4, 2003, pp. 29–38.

Adresa autora:

Mgr. Dana Šafářová, Ph.D., Bc. Pavel Brázda, Prof. RNDr. Milan Navrátil, CSc., Katedra buněčné biologie a genetiky, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc-Holice, milan.navratil@upol.cz.

TRANSGENOZE VE ŠLECHTĚNÍ HRACHU ODOLNÉHO VŮČI VÝRŮSTKOVÉ MOZAICE HRACHU

TRANSGENOSIS IN BREEDING OF PEA PLANTS RESISTANT TO PEA ENATION MOSAIC DISEASE

DANA ŠAFÁŘOVÁ¹, MIROSLAV GRIGA², PAVEL HANÁČEK³, JIŘÍ HORÁČEK², MILAN NAVRÁTIL¹,
RADOVAN POKORNÝ⁴, VILÉM REINÖHL³, PETR SMÝKAL^{3,5}, LENKA ŠVÁBOVÁ³

¹ Katedra buněčné biologie a genetiky, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci

² Agritec – výzkum, šlechtění a služby s.r.o., Šumperk

³ Ústav biologie rostlin, Agronomická fakulta, Mendelova Univerzita v Brně

⁴ Ústav pěstování, šlechtění rostlin a rostlinolékařství, Agronomická fakulta, Mendelova Univerzita v Brně

⁵ Katedra botaniky, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci

Transgenesis and genetic engineering seems to be efficient alternative tool production of pea plants resistant to *Pea enation mosaic virus 1* (PEMV-1) in the situation when the convention breeding methods are ineffective. The strategy of pathogen derived resistance mediated by coat protein gene was applied to obtain the tolerant transgenic pea lines. Between two strategies, coat protein mediated resistance conferred by full viral coat protein gene and PTGS resistance conferred by short coat protein gene fragment, the second one led to obtaining the first generation of resistant transgenic pea lines. The propagation PEMV resistance into next generation is evaluated.

Key words: *Pea enation mosaic virus*, PEMV-1, transformace, indukovaná rezistence.

ÚVOD

Virus výrůstkové mozaiky hrachu (*Pea enation mosaic virus*, PEMV-1) patří společně s virem mozaiky hrachu přenosné semenem (*Pea seed-borne mosaic virus*, PSbMV) k nejvýznamnějším virovým patogenům hrachu v České republice (Piáková et al., 2006). Tento virus způsobuje značné ztráty ve výnosu semen a kvalitě zelené hmoty. Vzhledem k tomu, že je velmi omezená nabídka kultivarů hrachu rezistentních vůči infekci PEMV, a také s ohledem na zdlouhavost klasických šlechtitelských postupů, představuje genetická transformace alternativní a účinný způsob ochrany rostlin vůči virové infekci. Tato technologie vede ke zlepšení zdravotního stavu rostlin, zvýšení výnosového potenciálu a také k podstatnému zkrácení šlechtitelského procesu. Cílem práce je získání transgenních linií hrachu vykazujících odolnost vůči viru výrůstkové mozaiky hrachu (PEMV-1).

MATERIÁL A METODY

Příprava vektoru a transformace rostlin

Úplný gen (570bp) pro plášťový protein (cp) nebo jeho část (293 bp) byl klonován do pBluescript kazety nesoucí 35S-CaMV promotor a CaMV-polyA terminátor. Tato kazeta byla následně použita pro konstrukci plazmidu pWell, se selekčním (nptII) a reportérovým (uidA/gus-int) genem umístěným za cp inzertem. Plazmid byl následně vnesen do hypervirulentního kmene *Agrobacterium tumefaciens* EHA 105. Transformace byla provedena kokultivací klíčících semen různých kultivarů hrachu s odpovídajícím kmenem *Agrobacterium tumefaciens* a jejich následnou regenerací, se selekcí na základě exprese genů bar a gus podle Švábová et al. (2005) a Krejčí et al. (2007). Pozitivní rostliny byly následně dopěstovány a bylo získáno jejich semenné potomstvo.

Testování odolnosti transgenních linií vůči PEMV-1

Rostliny byly ve stádiu druhého až třetího pravého listů mechanicky inokulovány izolátem viru, PEMV58UP (Šafářová et al. 2008). První symptomy infekce byly pozorovány 10 dnů po inokulaci (dpi), a následně byl jejich rozvoj průběžně monitorován. Přítomnost viru byla ověřována 14 den po inokulaci DAS-ELISA testem (Loewe, Biochemica Ltd.) podle pokynů výrobce. V případě negativního výsledku byly rostliny opakovaně inokulovány stejným izolátem viru a rozvoj infekce byl testován pomocí DAS-ELISA opětovně 14 dnů po inokulaci (tj. 30dpi).

Kvantifikace virové infekce

Kvantifikace virové infekce byla provedena pomocí Verso™ SYBR® Green 1-Step QRT-PCR kitu (AB-gene) a vyhodnocena pomocí komparativní kvantifikační metody (RotorGene-6.0, Corbett Research). Z listů jednotlivých testovaných rostlin byla izolována celková RNA pomocí kitu

NucleoSpin RNA Plant (Macherey-Nagel GmbH & Co), pro amplifikaci viru pomocí QRT-PCR byla použita nově navržená kombinace primerů PEMV47.

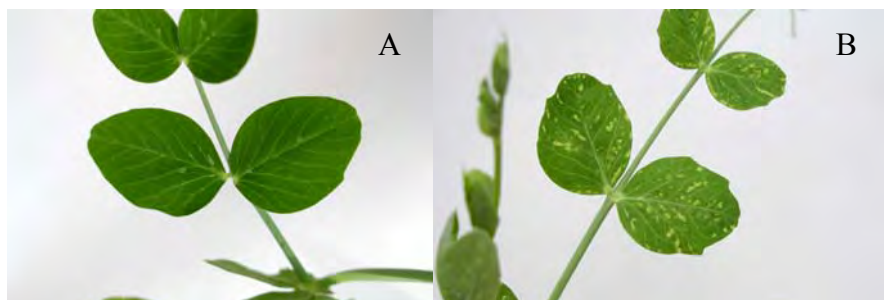
VÝSLEDKY A DISKUSE

Embryogenní segmenty (kotyledony) pěti kultivarů hrachu, Merkur, Raman, Menhir, Komet a Zekon, byly úspěšně transformovány dvěma různými konstrukty - pWell05b nesoucím celý gen pro plášťový protein (*cp*) viru výrůstkové mozaiky hrachu (tzv. CPMR – ‘coat protein mediated resistance’ strategie) anebo pWell08a nesoucím 293bp dlouhý *cp* fragment v ‘sense’ a ‘antisense’ orientaci (tzv. PTGS – ‘post transcription gene silencing’ strategie). Úspěšně transformované rostliny, PCR/GUS pozitivní a vykazující expresi GUS byly dopěstovány a bylo získáno jejich semenné potomstvo T₁. V generaci T₁ bylo provedeno testování odolnosti jednotlivých rostlin vůči výrůstkové mozaice hrachu vyvolané infekcí virem PEMV-1.

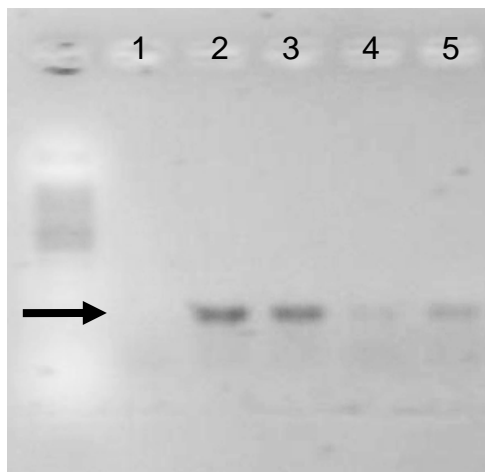
Bylo testováno 95 rostlin transformovaných konstruktem pWell05b. Biologické testy na odolnost neprokázaly účinnost vloženého transgenu. Všechny sledované rostliny vykazovaly 14 dnů po mechanické inokulaci typické příznaky infekce – prosvětlování žilek, slabou chlorotickou mozaiku listů a tvorbu typických enací (výrůstků) na spodní straně listů; jejich intenzita a rozsah odpovídaly symptomům pozorovaných na kontrolních senzitivních rostlinách. Při dlouhodobém pěstování rostlin nebyly pozorovány žádné případy ozdravení rostlin, naopak docházelo k zesílení intenzity chlorotické mozaiky, která vedla v závislosti na kultivaru hrachu až ke vzniku nekrotických skvrn. Přítomnost transgenu byla ve sledovaných rostlinách prokázána pomocí PCR (Obrázek 2). Zvolená CPMR strategie navození odolnosti prostřednictvím exprese celého genu pro plášťový protein se ukázala být nefunkční, ačkoli byla již dříve úspěšně použita (Chowrira et al., 1998).

Jako druhá možná strategie bylo zvoleno navození odolnosti vůči viru prostřednictvím PTGS, tj. exprese krátkých fragmentů genu pro plášťový protein. Dosud bylo testováno 138 rostlin T₁ generace různých kultivarů hrachu. Rostliny cv. Merkur/pWell08b, Raman/pWell08b, a Menhir/pWell08b vykazovaly typické příznaky infekce a u těchto kultivarů se nepodařilo selektovat žádnou odolnou linii. Obdobně v případě rostlin Zekon/pWell08b a Komet/pWell08b většina rostlin vykazovala obdobné symptomy infekce. V materiálu ale byly selektovány 3 linie (4 rostliny) Zekon/pWell08b a 8 linií (11 rostlin) Komet/pWell08b, které dlouhodobě nevykazovaly žádné symptomy infekce ani po opakované inokulaci virem (Obrázek 1). Testování přítomnosti viru pomocí DAS-ELISA potvrdila vizuální hodnocení, všechny rostliny vykazující symptomy infekce byly vyhodnoceny jako pozitivní, naopak u všech rostlin, které nevykazovaly příznaky infekce, nebyla přítomnost viru prokázána.

Výsledky imunochemického stanovení byly potvrzeny i pomocí QRT-PCR. Jednotlivé rostliny, jakožto perspektivní materiál, byly proto dále dopěstovány a bylo získáno jejich potomstvo. V současné době probíhá biologické a molekulární testování takto odvozených transgenních linií.



Obrázek 1: Transgenní rostliny hrachu po inokulaci virem enacní mozaiky hrachu, (A) listy odolné rostliny, (B) listy vnímavé rostliny.



Obrázek 2: Detekce transgenů v testovaných rostlinách
(dráha 1: negativní netransgenová kontrola, dráhy 2-5: transgenové rostliny; šipka označuje produkt správné velikosti)

ZÁVĚR

Transgenozou se jeví být vhodným nástrojem pro navození odolnosti hospodářsky významných rostlin vůči virové infekci v případech, kdy neexistují vhodné přirozené zdroje rezistence. Tato technika byla proto použita pro navození odolnosti hrachu vůči významnému patogenu, viru výrůstkové mozaiky hrachu (PEMV-1). Použití CPMR strategie, tj. transformace rostlin celým genem pro plášťový protein se ukázala být jako neúčinná. Naopak PTGS strategie založená na transformaci rostlin jen parciálním fragmentem *cp* genu vedla k získání v T_1 generaci perspektivních linií vykazujících odolnost vůči PEMV. Následující T_2 generace je testována s cílem získat stabilní linie vykazující odolnost vůči PEMV.

Poděkování: Tato práce byla realizována za podpory projektu NAZV QI91A229.

LITERATURA

- CHOWRIRA, G.M. – CAVILEER, T.D. – GUPTA, S.K. – LURQUIN, P.F. – BERGER, P.H. 1998. Coat protein-mediated resistance to pea enation mosaic virus in transgenic *Pisum sativum* L. In *Transgenic Research* vol. 7, 1998, pp. 265–271.
- KREJČÍ, P. – MATUŠKOVÁ, P. – HANÁČEK, P. – REINÖHL, V. – PROCHÁZKA, S. 2007. The transformation of pea (*Pisum sativum* L.): applicable methods of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer. In *Acta Physiol. Plant.* vol. 29, 2007, pp. 157–163.
- PIÁKOVÁ Z. – POKORNÝ, R. – DOSTÁLOVÁ, R. 2006. Výskyt virových patogenů hrachu na území ČR. In *Úroda* vol. 2, 2006, pp. 10–11.
- SAFAROVA, D. – NAVRATIL, M. – PETRUSOVA, J. – POKORNÝ, R. – PIAKOVA, Z. 2008. Genetic and biological diversity of the Pea seed-borne mosaic virus isolates occurring in Czech Republic. In *Acta Virol.* vol. 52, 2008, pp. 53–57.
- ŠVÁBOVÁ, L. – SMÝKAL, P. – GRIGA, M. – ONDŘEJ, V. 2005. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Pisum sativum* in vitro and in vivo. In *Biol. Plant.* vol. 49, 2008, pp. 361–370.

Adresa autorův:

prof. RNDr. Milan Navrátil, CSc., Mgr. Dana Šafářová, Ph.D.; Katedra buněčné biologie a genetiky, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc – Holice; e-mail: milan.navratil@upol.cz, dana.safarova@upol.cz.

RNDr. Miroslav Griga, CSc., Mgr. Jiří Horáček, Ph.D., Ing. Lenka Šváblová, Ph.D.; AGRITEC, výzkum, šlechtění a služby s.r.o., Zemědělská 16, 787 01 Šumperk; e-mail: griga@agritec.cz, horacek@agritec.cz, svabova@agritec.cz.

Ing. Pavel Hanáček, Ph.D., Mgr. Vilém Reinöhl, CSc.; Ústav biologie rostlin, Agronomická fakulta, Mendelova Univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno; e-mail: hanacek@mendelu.cz, reinohl@mendelu.cz.

doc. Ing. Radovan Pokorný, Ph.D., Ústav pěstování, šlechtění rostlin a rostlinolékařství, Agronomická fakulta, Mendelova Univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno.

Ing. Petr Smýkal, Ph.D., Katedra botaniky, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc – Holice; e-mail: petr.smykal@upol.cz.

DNA POLYMORFIZMUS TETRAPLOIDNÝCH PŠENÍC

DNA POLYMORPHISM IN TETRAPLOID WHEATS

MIROSLAV ŠVEC, PETER CIVÁŇ, ZUZANA IVANIČOVÁ, PAVOL HAUPTVOGEL

Katedra genetiky, Prírodovedecká fakulta Univerzity Komenského, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava

We analyzed sequential and length DNA polymorphism of the *SBEIIa* and *Lpx-A1 like* genes of 109 accessions of tetraploid wheats in our experiments. Three nucleotide substitutions in intron 10 of the *SBEIIa* locus separated *Triticum urartu* as A genome donor, wild ancestors, hulled domesticated wheats with A^uA^uBB genome and naked subspecies with the same genome each other. Variability in pseudogene of lipoxigenase indicates, that the hulled and naked wheats of the *Triticum turgidum* L. species have multiple origins. It appears, that ancient wheat hybridization of wild and domesticated forms played a substantial role in the domestication process.

Key words: tetraploid wheat, *Triticum turgidum*, *Triticum timopheevii*, wheat evolution, starch branching enzyme IIa, lipoxigenase pseudogen

ÚVOD

Súčasťou evolúcie hexaploidných druhov pšeníc *Triticum aestivum* L. a *Triticum zhukovskiyi* A.M.Menabde & Eritzjan boli aj tetraploidné pšenice, a to druhy *Triticum turgidum* L. a *Triticum timopheevii* (Zhuk.)Zhuk. V súčasnosti sme svedkami toho, že ich význam postupne rastie, najmä z pohľadu štúdia procesov ich domestikácie, ako aj z dôvodu využitia ich ohromnej genetickej diverzity. V medzinárodnom výskumnom ústave pre šľachtenie kukurice a pšenice (CIMMYT) sú rozpracované rozsiahle šľachtiteľské programy na resyntézu pšenice letnej, v ktorých sa ako donor využívajú mnohé vzorky pšenice dvojzrnovej - *Triticum turgidum* ssp. *dicoccon* (Schrang)Thell. (Zaharieva, 2009). Je pravdepodobné, že v budúcnosti sa na resyntézu pšenice letnej budú využívať aj iné poddruhy *Triticum turgidum*. Ako donory rezistencie boli v šľachtení pšenice letnej použité viaceré taxóny tetraploidných pšeníc. Štúdium domestikácie pšeníc a ostatných plodín je nemenej dôležitou súčasťou histórie poľnohospodárstva ako jej iné aspekty. Význam domestikácie spočíva hlavne v tom, že bola základom rozvoja mnohých civilizácií, medzi nimi aj civilizácie západného typu. Vo vedeckej komunite zaoberajúcou sa touto problematikou existujú dva protichodné názory na miesta a spôsob domestikácie tetraploidných pšeníc. Ozkan et al. (2011) na základe AFLP polymorfizmu tvrdia, že domestikácia sa udiala na úpätí pohoria Karacadag v okolí mesta Diyarbakir (juhovýchodné Turecko). Zároveň predpokladajú, že pôvod domestikovaných foriem bol monofyletický. Iní autori (Feldman et Kislev, 2007) hlavne na základe archeologických nálezov zastávajú názor, že domestikácia tetraploidných pšeníc sa realizovala v oblasti južného Levantu (južná Sýria, Jordánsko, Izrael, Libanon), odkiaľ sa nové formy rozšírili do ostatných častí Úrodneho polmesiaca. Autori predpokladajú domestikáciu na viacerých miestach Levantu a teda polyfyletický pôvod tetraploidných pšeníc.

Výsledkom nevedomejšej, a neskôr uvedomejšej selekcie realizovanej človekom v procese domestikácie bola rozsiahla variabilita neolitických pšeníc, z ktorých sa časť vo forme reliktných vzoriek zachovala až do súčasnosti. Botanici sa snažili túto variabilitu zatriediť do jednotlivých taxonomických úrovní. Najnovšie klasifikácie uznávajú v rámci tetraploidných pšeníc buď 2 druhy, a to *Triticum turgidum* L. a *Triticum timopheevii* (Zhuk.)Zhuk. (van Slageren, 1994), alebo 3 druhy *Triticum turgidum* L., *Triticum timopheevii* (Zhuk.)Zhuk. a *Triticum ispahanicum* Heslot (USDA,ARS, Online database). Tradičná botanická nomenklatura (Dorofeev et al., 1979) akceptuje až 14 druhov tetraploidných pšeníc. Výsledok domestikačného procesu je predmetom nielen taxonomických štúdií, ale v súčasnosti, v období rozvoja molekulárnych metód aj predmetom fylogenetických analýz. Dosiaľ však nebola fylogénéza tetraploidných pšeníc vyriešená komplexne a jednoznačne. Cieľom práce bolo na základe DNA polymorfizmu sledovať divergenciu tetraploidných taxónov pšenice, ktorá sa udiala počas neolitickej domestikácie pšenice.

MATERIÁL A METÓDY

V našich experimentoch sme ako rastlinný materiál použili po 7 vzoriek *Triticum timopheevii* subsp. *armeniicum* (Jakubz.) Slageren (sect. *Dicoccoidea*) a *Triticum timopheevii* subsp. *timopheevii* (sect. *Dicoccoidea*), 21 vzoriek *Triticum turgidum* subsp. *dicocoides* (Körn. ex Asch.&Graebn.)Thell. 25 vzoriek *Triticum turgidum* subsp. *dicoccon* (Schrang)Thell., 2 vzorky *Triticum turgidum* subsp. *paleocolchicum* Á.Löve & D. Löve (sect. *Dicoccoidea*), po 7 vzoriek z poddruhov *Triticum turgidum* subsp. *turanicum* (Jakubz.) Á.Löve & D. Löve, *Triticum turgidum* subsp. *polonicum* (L.)Thell. (sect. *Dicoccoidea*), *Triticum turgidum* subsp. *durum* (Desf.)Husn., *Triticum turgidum* subsp. *carthlicum* (Nevski) Á.Löve & D. Löve, *Triticum turgidum* subsp. *turgidum* (sect. *Dicoccoidea*), 9 vzoriek *Triticum ispahanicum* Heslot (sect. *Dicoccoidea*) a 3 vzorky *Triticum*

aestivum L. Uvedená nomenklatúra je v súlade s nomenklatúrou publikovanou na webovej stránke Génovej banky v Beltsville, USA (USDA,ARS, Online database).

U všetkých uvedených vzoriek sme uskutočnili PCR analýzy, podmienky ktorej boli nasledovné: PCR prebiehala v konečnom objeme 13 μ l, PCR zmes obsahovala: 1 x PCR pufo (HotFirePol); 1,6 mM MgCl₂; 0,2 μ M *forward* primer; 0,2 μ M *reverse* primer; 200 μ M dNTP; 0,5 U HotFirePol DNA polymerázy (Solis BioDyne); 40 ng templátovej DNA. PCR cyklus: úvodná denaturácia pri 95 °C počas 12 min; 35 cyklov: [95 °C, 45 s; 64 °C, 45 s; 72 °C, 1 min]; záverečná polymerizácia pri 72°C počas 7 minút. Pri pseudogéne *Lpx-A1-like* sme sledovali dĺžkový polymorfizmus, pri géne *SBEIIa* sme uskutočnili priamu sekvenáciu intrónu 10.

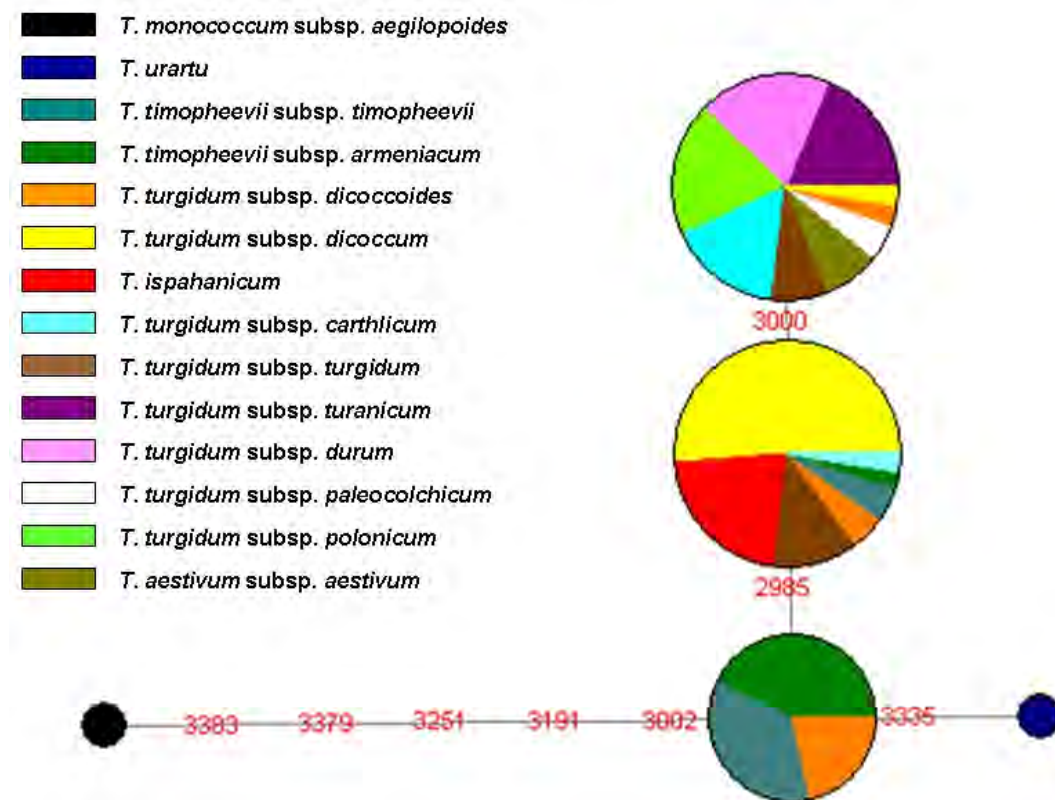
VÝSLEDKY A DISKUSIA

Donorom genómu A u tetraploidných pšeníc s genómom A^uA^uBB (*Triticum turgidum*) ako aj s genómom A^uA^uGG (*Triticum timopheevii*) je diploidné divorastúce *Triticum urartu* Tumanian ex Gandilyan (sect. *Monococcon*). Súčasťou A^u genómu je aj gén *SBEIIa*. Počas divergencie tohto genómu v diploidnom (*T. urartu*) a tetraploidných divorastúcich druhoch došlo k substitúcii iba jedného nukleotidu v pozícii 3335 génu *SBEIIa* (obr.č.1). Ďalšia substitúcia v pozícii 2985 oddelila divorastúceho predka *Triticum turgidum* subsp. *dicoccoides* od domestikovaných plevnatých poddruhov. Súčasťou zhluku (uzla) plevnatých pšeníc je aj niekoľko vzoriek nahozrnej pšenice *Triticum turgidum* subsp. *turgidum*. Vzorky tohto poddruhu sa nachádzajú aj v treťom veľkom zhluku, tvorenom prevažne nahozrnými pšenícami. Zdá sa pravdepodobné, že mutácia nukleotidu v pozícii 3000 vznikla u niektorej starobylej nahozrnej vzorky, z ktorej sa potom vyvinuli ostatné taxóny nahozrných pšeníc. Výnimkou z týchto zjednodušených predpokladov je výskyt divorastúcich dvojzrníek DCS 1 a DCS 9 v zhluku domestikovaných plevnatých pšeníc, rovnako ako aj výskyt nahozrnej CAR 3 a výskyt vzoriek ARM 35, TIM 16 a TIM 17 s genómom A^uA^uGG v tomto zhluku. Aj pre zhluk oddelený od ostatných pšeníc mutáciou v pozícii 3000 platia niektoré výnimky. Súčasťou tohto zhluku sú okrem nahozrných pšeníc aj varieta *kotchyi* z divorastúceho plevnatého predka s lámavým klasovým vretenom *Triticum turgidum* subsp. *dicoccoides*, konvarieta *maroccanum* z plevnatého domestikovaného poddruhu *Triticum turgidum* subsp. *dicoccon* a takisto aj dve vzorky plevnatého domestikovaného poddruhu *Triticum turgidum* subsp. *paleocolchicum*.

PCR analýza pseudogénu lipoxygenázy nám odhalila 3 typy alel (tab.č.1). S použitím parsimonického prístupu by sme mohli konštatovať, že nulová alela (*Lpx-0*) je typická pre taxóny s genómom A^uA^uGG (výnimky DCS 3, DCS 5, DCS 80, DIM 182), krátka alela (*Lpx-S*) je charakteristická pre nahozrnné pšenice a dlhá alela (*Lpx-L*) pre domestikované plevnaté dvojzrnky (*Triticum turgidum* subsp. *dicoccon*). Aj tu platí množstvo výnimiek, podobne ako pri géne *SBEIIa*, aj pri lipoxygenáze sa vzorky TIM 16 a TIM 17 zaradili do inej skupiny, akoby sme očakávali. Viaceré vzorky z konvariety *abyssinicum* (DIM 8, DIM 16, DIM 44, DIM 122) patriacej k plevnatému poddruhu *Triticum turgidum* subsp. *dicoccon* sa zaradili ku skupine nahozrných pšeníc.

Podľa nášho predpokladu, všetky uvedené výnimky v rámci oboch analyzovaných génov sú dôsledkom starobylých hybridizácií, ktoré sa udiali v dobe neolitu, v rámci domestikáčného procesu.

Hybridný pôvod niektorých vzoriek najmä divorastúcej pšenice dvojzrnovej uvádzajú napr. Luo et al. (2007). Predpokladaný hybridný pôvod viacerých vzoriek tetraploidných pšeníc bude nevyhnutné potvrdiť v ďalších experimentoch.



Obrázok 1: Fylogenetická sieť analyzovaných vzoriek tetraploidných pšeníc získaná sekvenovaním intrónu 10 z génu *SBEIIa*.

ZÁVER

V našich experimentoch sme analyzovali sekvenčný a dĺžkový polymorfizmus DNA u génov *SBEIIa* a *Lpx-A1-like* u 109 vzoriek tetraploidných pšeníc. Tri substitúcie nukleotidov v intróne 10 lokusu *SBEIIa* separovali od seba donora genómu A *Triticum urartu*, divorastúcich predkov, plevnaté domestikované pšenice s genómom AⁿAⁿBB a nahozrné poddruhy s tým istým genómom. Variabilita v lipoxygénázovom pseudogéne naznačuje, že plevnaté a nahozrné pšenice druhu *Triticum turgidum* L. majú mnohonásobný pôvod. Zdá sa, že starobylá hybridizácia divorastúcich a domestikovaných foriem zohrala významnú úlohu v evolúcii pšenice.

Pod'akovanie. "Táto práca bola podporovaná Agentúrou na podporu výskumu a vývoja na základe zmluvy č. APVV-0661-10".

LITERATÚRA

- FELDMAN, M., KISLEV, M. Domestication of emmer wheat and evolution of free-threshing tetraploid wheat. Israel Journal of Plant Sciences, vol. 55, 2007, pp.207-221
- LUO, M.C., YANG, Z.L., YOU, F.M., KAWAHARA, T., WAINES, J.G., DVORAK, J. The structure of wild and domesticated emmer wheat populations, gene flow between them, and the site of emmer domestication. Theor. Appl. Genet., vol. 114, 2007, pp.947-959
- DOROFEEV, V.F., FILATENKO, A.A., MIGUSHOVA, E.F., UDACZIN, R.A., AND JAKUBZINER, M.M. Wheat. vol. 1. In: *Flora of Cultivated Plants* (DOROFEEV, V.F. AND KOROVINA, O.N., Eds.) Leningrad (St. Petersburg), Russia. Kolos (in Russian), 1979, pp.346
- ÖZKAN, H., WILLCOX, G., GRANER, A., SALAMINI, F., KILIAN, B. Geographic distribution of wild emmer wheat (*Triticum dicoccoides*). Genet. Resour. Crop Evol., vol. 58, 2011, pp.11-53
- USDA, ARS, National Genetic Resources Program. *Germplasm Resources Information Network – (GRIN)* [Online Database] <http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/splist.pl?12442>
- ZAHARIEVA, M., DREISIGACKER, S., CROSSA, J., PAYNE, T., MISRA, S., HANCHINAL, R.R., MUJAHID, M.Y., TRETOWAN, R. Genetic diversity within *Triticum turgidum* L. subsp. *dicoccon* (Schrank) Thell. (cultivated emmer) and its utilization in wheat breeding, The 6th International Triticeae

Symposium (6th ITS), May 31 – June 5, 2009, International Conference Hall II & III, Clock Tower Centennial Hall, Kyoto University, Kyoto, Japan

Tabuľka 1: Dĺžkový polymorfizmus DNA v géne pre lipoxygenázu *Lpx-A1* (*Lpx - 0*: nulová alela; *Lpx - S*: krátká alela; *Lpx - L*: dlhá alela; PAL = *Triticum turgidum* ssp. *paleocolchicum*, DUR = *Triticum turgidum* ssp. *durum*, TRN = *Triticum turgidum* ssp. *turanicum*, ARM = *Triticum timopheevii* ssp. *armeniaticum*, TIM = *Triticum timopheevii* ssp. *timopheevii*, ISP = *Triticum ispahanicum*, M = vzorky z databázy University of Manchester.

Lpx alela		
<i>Lpx - 0</i> (bez amplifikácie)	<i>Lpx - S</i> (600 bp)	<i>Lpx - L</i> (1042 bp)
DCS 3,5, 80	<i>Triticum turgidum</i> ssp. <i>dicoccoides</i> (DCS): M 9, 11, 14, 19, 55, 56 DCS 1, 9, 10	<i>Triticum turgidum</i> ssp. <i>dicoccoides</i> (DCS): M 5, M 8, M 12, M 13, M 21, M 23, M 37, M 62, DCS 11
		ISP 1 - 9
DIM 182	<i>Triticum turgidum</i> ssp. <i>dicoccon</i> (DIM): DIM 8, 16, 44, 64, 122	<i>Triticum turgidum</i> ssp. <i>dicoccon</i> (DIM): M 85, M 122, M 132 DIM 66-67, 70-72, 76, 78-79, 80-87
		PAL 1, PAL 3
	DUR 1, 16-17, 21, 26-27	DUR 18
	TRN 3-5, 7, 10	TRN 13 (Etrusker Weizen) TRN 14 (Kamut)
	<i>Triticum turgidum</i> ssp. <i>carthlicum</i> (CAR): CAR 1, 3-6, 9-10	
	<i>Triticum turgidum</i> ssp. <i>polonicum</i> (PLN): PLN 1-3, 5-6, 8	
	<i>Triticum turgidum</i> ssp. <i>turgidum</i> (TRG): TRG 1-3, 15-17, 20, 50	
	<i>Triticum aestivum</i> : Diosecká 85-6 Radošínska dorada Vígľašská červenoklasá	
ARM 8, 9, 15, 19, 27, 32, 35		
TIM 1, 13-14, 18, 20		TIM 16-17

Adresy autorov:

doc.RNDr. Miroslav Švec, CSc.¹, Mgr. Peter Civián, PhD¹, Bc. Zuzana Ivaničová¹, Ing. Pavol Hauptvogel, PhD²

¹ Katedra genetiky, Prírodovedecká fakulta Univerzity Komenského v Bratislave, Mlynská dolina B1, 842 15 Bratislava

² Centrum výskumu rastlinnej výroby Piešťany, Bratislavská cesta 122, 921 68 Piešťany

Adresa kontaktnej osoby: msvec@fns.uniba.sk

FORMOVÁNÍ VÝNOSOVÝCH PRVKŮ U LINIÍ OZIMÉ PŠENICE S ODLIŠNOU MORFOLOGIÍ KLASU

FORMATION OF YIELD COMPONENTS IN WINTER WHEAT LINES WITH DIFFERENT SPIKE MORPHOLOGY

PETR MARTINEK¹, OXANA B. DOBROVOLSKAYA², PETRA POKOROVÁ³, MARIE VÁŇOVÁ¹

¹Agrotest fyto, s.r.o., Kroměříž, Česká republika

²Ústav cytologie a genetiky (Institute of Cytology and Genetics), Novosibirsk, Ruská federace

³Mendelova univerzita v Brně, AF - Ústav biologie rostlin, Brno, Česká republika

The objective of the paper was to confirm the hypothesis that the increased sink of the spike in wheat (*T. aestivum* L.) with supernumerary spikelets enables better formation of the yield under high-input growing conditions as compared to conventional cultivars with normal spike. Parameters of spike productivity were compared in three groups of winter wheat lines differing in (a) long glumes (LG) transferred from *T. polonicum* L., (b) multirow spike (MRS) with supernumerary spikelets, (c) current wheat cultivars classified into various groups of grain quality with normal spike (NS). They were grown using four cropping practices: K0 – no fungicides, growth regulators and nitrogen, F0, F100, F200 – fungicides and growth regulators with different nitrogen doses 0, 100 and 200 kg.ha⁻¹. The experiments were conducted in 2009-2010 and 2010-2011. Lines with MRS had lower yields in comparison with NS and LG. Therefore, the research hypothesis has not been confirmed. Responses to cropping treatments in lines with LG were similar to those in NS cultivars. The advantage of LG can be a higher spike assimilation capacity. A possibility of increasing the yield potential in wheat is discussed.

Key words: *Triticum aestivum*, spike morphology, long glume, multirow spike, cropping practices, yield

ÚVOD

Vzestup výnosů pšenice byl ve světě primárně podmíněn změnou proporcí rostlin, která umožnila zvyšovat podíl zrna na celkové nadzemní biomase (sklizňový index). Srovnávací pokusy starých a nových odrůd ukazují, že šlechtění nevedlo k podstatnému zvýšení množství nadzemní biomasy na jednotku plochy porostu, což naznačuje, že nedošlo k významnému zvýšení čistého výkonu fotosyntézy. V literatuře jsou sporadicky uváděny případy mírného trendu nárůstu množství nadzemní biomasy porostu, který ovšem není spojován se zlepšením schopnosti metabolického systému lépe hospodařit se sluneční energií, ale spíše se schopností zkráceného porostu lépe využívat světlo vzpřímenými listy, případně delší životností listového aparátu. V současnosti se nacházíme v období po zelené revoluci (post green revolution), které je od devadesátých let minulého století doprovázeno mírným zpomalením nárůstu průměrných výnosů pšenice ve světě a snížením jejich stability. Tento jev ukazuje na přítomnost ekologických a energetických limitů dalšího růstu. Vzhledem k obecné platnosti zákonů termodynamiky rostliny nemohou transformovat více energie, než která je jim v prostředí k dispozici. Pochopitelně to platí i na úrovni porostů, kde se tvoří zemědělská produkce. Pokud se nepodaří u pšenice zvyšovat produkci biomasy na jednotku plochy porostu (tedy zvyšovat efektivitu fotosyntézy genetickou cestou), potom nebude jiná možnost než dále pokračovat ve stávajících trendech měnění proporcí rostlin, jenž již dnes skýtají šlechtitelům poměrně malý manévrovací prostor. Určité řešení by mohlo spočívat ve využití dosud nevyužívaných znaků pro změněnou morfologickou strukturu klasu, které by mohly představovat výhodu zlepšené fotosyntetické nebo úložné kapacity klasu (Foulkes et al., 2010).

Předkládaná studie se zabývá možností využití genetických zdrojů s dlouhými plevami (LG – long glumes) a s mnohořadým klasem (MRS – multirow spike), které jsou porovnávány s běžnými odrůdami s normálním klasem (NS – normal spike) (obrázek 1).

LG jsou typickým znakem pro některé druhy tetraploidní (*T. polonicum* L., *T. ispahanicum* Heslot) a hexaploidní (*T. petropavlovskyi* Udacz. et Migusch) pšenice. Použité linie nesou gen přenesený z *T. polonicum*. Gen pro LG byl označen symbolem *P* a nachází se na dlouhém rameni chromosomu 7A (Watanabe et al., 1996). Předpokládáme, že LG s větším povrchem by mohly mít pozitivní vliv na formování obilek v průběhu jejich růstu.

MRS byl přenesen do pšenice seté z hexaploidního radiomutantního zdroje, získaného z VIR Sankt Petersburg. MRS je podmíněn recesivním genem *mrs1*, lokalizovaným na krátkém rameni chromosomu 2D (Dobrovol'skaya et al., 2009). Projevuje se zvětšeným počtem klásků vyrůstajících přisedle z jednotlivých nodů klasového větene (projev tak zvaných nadpočetných klásků – supernumerary spikelets). Předpokládáme, že zvýšený počet klásků klasu může u MRS být doprovázen zvýšením úložné kapacity klasu – tedy lepší schopností přijímat asimiláty.

Vycházíme z úvahy, že pokud tyto znaky klasu mají nějaký význam ve vztahu k výnosu, mělo by se u nich projevit zvýšení výnosů v intenzivních pěstebních podmínkách (tedy v takových, ve kterých by se co nejvíce realizoval výnosový potenciál) oproti běžným odrůdám s NS.



Obrázek 1: Pšenice s dlouhými plevami (vlevo), mnohořadým klasem (uprostřed) a normálním klasem (vpravo)

MATERIÁL A METODY

Byly analyzovány tři skupiny genotypů ozimé pšenice s bezosinným klasem, které se navzájem lišily 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 šest současných registrovaných odrůd s různou kvalitou 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 raností a aby měly rozdílný původ. Odrůdy s NS jsou registrované odrůdy v České republice a jsou považovány za kontroly. Linie se změněnou morfologickou strukturou klasu byly vyšlechtěny v Agrotest fyto, s.r.o. Kroměříž.

Polní pokusy byly založeny ve dvou vegetačních obdobích 2009-2010 a 2010-2011 v Kroměříži (235 m/m, řepařská výrobní oblast). Pokus byl reprezentován celkem 432 parcelami o velikosti 10 m² (18 genotypů × 4 ošetření × 3 opakování × 2 ročníky). V obou případech byl pokus vyset po ozimé řepce, před setím byl vyhnojen základním hnojením 100 l.ha⁻¹ DAM + 200 kg.ha⁻¹ Amofos, čímž se dostalo do půdy celkem 64 kg.ha⁻¹ N a 104 kg.ha⁻¹ P₂O₅. Setí bylo provedeno secím strojem Amazone se záběrem 2 m, vybaveným rotačními branami, schopnými optimálně připravit set'ové lůžko. Byl použit výsevek 4 miliony klíčivých zrn na hektar. Herbicidní ochrana proti plevelům byla prováděna s ohledem na aktuální výskyt plevelů.

Výsev jednotlivých genotypů se uskutečnil na vyrovnaný pozemek do pásů, které byly následně rozděleny na pokusné parcely o velikosti 10 m². Byly zkoušeny čtyři varianty pěstování: 0K – bez hnojení a bez chemického ošetření, 0F – bez hnojení + fungicidy a morforegulátor, 100F – 100 kg dusíku + fungicidy a morforegulátory, 200F – 200 kg dusíku + fungicidy a morforegulátory. Přehled provedených agrotechnických zásahů uvádí tabulka 1.

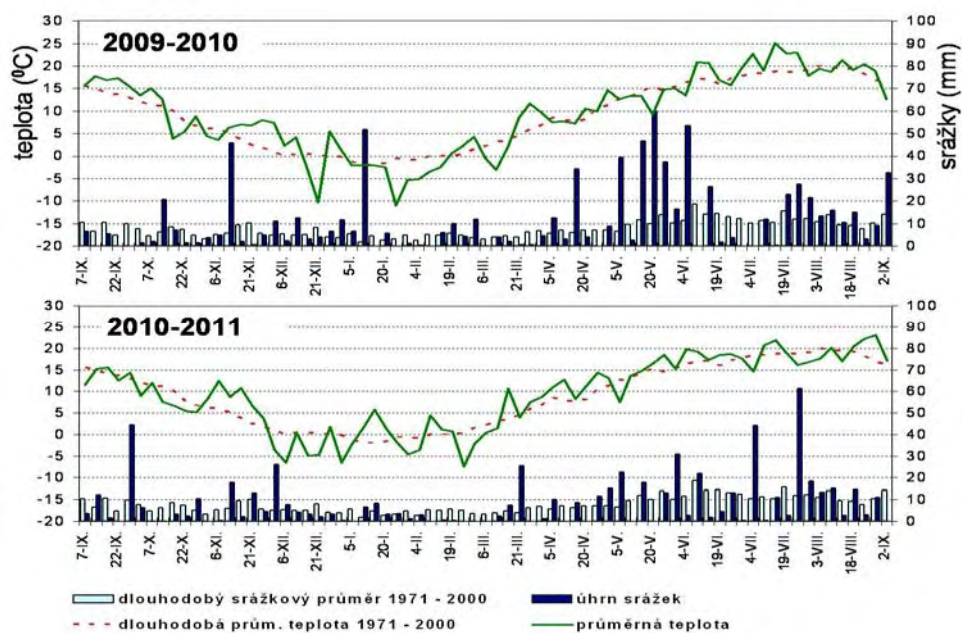
Zvolené varianty pěstování umožnily posoudit vliv hnojení (především dávky dusíku) za podmínek velmi dobrého zdravotního stavu dosaženého stejným fungicidním ošetřením (u variant 0F, 100F a 200F) a s potlačením případného vlivu poléhání pomocí morforegulátorů růstu.

Byly vyhodnoceny základní vegetační charakteristiky. Z odebraných snopků ve zralosti byla stanovena velikost sklizňového indexu (HI). Z údajů o výnosu, počtu klasů na 1 m² a hmotnosti 1000 zrn (HTS) byla vypočítána hmotnost zrna klasu a počet zrn klasu.

Ve variantách s ošetřením fungicidy a morforegulátory s vysokými dávkami dusíku (především 100F a 200F) jsme chtěli navodit podmínky, ve kterých by byl co nejlépe realizován výnosový potenciál testovaných genotypů, tedy který by se blížil hypotetickým podmínkám, vyplývajícím z definice výnosového potenciálu (Evans a Fischer, 1999). Pochopitelně reálné výnosy v pokusu byly ovlivněny specifickými půdními podmínkami a průběhem počasí v obou vegetačních obdobích (obrázek 2).

Tabulka 1: Varianty hnojení a chemického ošetření v letech 2010 a 2011

Zásah (fáze BBCH)	Varianta ošetření			
	0K – bez hnojení a chemického ošetření	0F – bez hnojení a chemické ošetření	100F – 100 kg dusíku a chemické ošetření	200F – 200 kg dusíku a chemické ošetření
Odkořování (BBCH 21-23) (BBCH 24-26)			110 kg.ha ⁻¹ LAV (30 kg.ha ⁻¹ N)	Močovina 140 kg.ha ⁻¹ N (66 kg.ha ⁻¹) 110 kg.ha ⁻¹ LAV (30 kg.ha ⁻¹ N)
Konec odkořování (BBCH 27-29)		Retacel (0,75 l.ha ⁻¹)	Retacel (0,75 l.ha ⁻¹)	Retacel (0,75 l.ha ⁻¹)
Začátek sloupkování (BBCH 30)			90 kg.ha ⁻¹ LAV (30 kg.ha ⁻¹ N)	145 kg.ha ⁻¹ LAV (40 kg.ha ⁻¹ N)
Sloupkování (BBCH 31-33) (BBCH 31-33)			DAM 390 75 l.ha ⁻¹ (30 kg.ha ⁻¹ N)	DAM 390 75 l.ha ⁻¹ (30 kg.ha ⁻¹ N)
(BBCH 31-37)		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)
		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)
Konec sloupkování (BBCH 37-39)			55 kg.ha ⁻¹ LAV (15 kg.ha ⁻¹ N)	145 kg.ha ⁻¹ LAV (40 kg.ha ⁻¹ N)
		Prosaro (0,75 l.ha ⁻¹)	Prosaro (0,75 l.ha ⁻¹)	Prosaro (0,75 l.ha ⁻¹)
Metání (BBCH 51-55)		Caramba (0,8 l.ha ⁻¹)	Caramba (0,8 l.ha ⁻¹)	Caramba (0,8 l.ha ⁻¹)



Obrázek 2: Průběh počasí ve vegetačním období 2009-2010 a 2010-2011 v Kroměříži

Charakteristika období 2009-2010

Do nástupu zimy bylo dosaženo stavu 4-5 odnoží v porostu. Během zimy nedošlo k vymrzáni z důvodu sněhové pokrývky v době výskytu kritických mrazů v prosinci a koncem ledna. Na jaře byly porosty v ideálním stavu a nebyly přehoustlé. Jarní vlhké počasí v druhé polovině dubna bránilo včasnému provádění agrotechnických zásahů. Extrémně vysoké srážky v dubnu a v květnu a v první polovině června a nízké teploty v druhé polovině května vedly k zamokření a úbytku vzduchu v půdě, které vedly k nižší hustotě porostu a opoždění doby metání asi o 9 dní a doby dozrávání asi o 4 dny. Vysoké teploty v červnu a červenci doprovázené suchem v červenci vedly ve větší míře k zasychání zrna a k nižší objemové hmotnosti zrna.

Charakteristika období 2010-2011

Podzimní vývoj porostů byl pomalý v důsledku podprůměrných teplot v říjnu. I přes teplotně nadprůměrný listopad porosty odkořovaly až v průběhu zimy a na jaře. Velmi studený prosinec a mírný výskyt plísňé sněžné nezpůsobil poškození porostů vyzimováním. V únoru a na začátku března byl zaznamenán výskyt holomrazů a současně sucha. Vzhledem k nízkému obsahu vody v pletivech rostlin nebylo zaznamenáno poškození mrazem ani u odrůd s nízkou mrazuvzdorností. Vysoké teploty v dubnu spolu s nedostatkem srážek byly vystřídány

vysokými srážkami na počátku května a příznivými teplotami s pozitivním vlivem na zakládání reprodukčních orgánů klasu, nižší redukci odnoží, ale i na vyšší rozvoj houbových chorob. Příznivější srážkové a teplotní podmínky v květnu až červenci měly pozitivní vliv na tvorbu výnosu. Vysoké úhrny srážek v poslední červencové dekádě a v první polovině srpna vyvolaly před sklizní polehnutí u intenzivně hnojených porostů a negativně ovlivnily číslo poklesu.

Výsledky byly zpracovány statisticky pomocí software Statistika, verze 8. Pro výpočet průkazných diferencí v grafech byly jako výchozí hodnoty použity průměry ze tří opakování pro jednotlivé genotypy v konkrétní variantě ošetření v příslušném roce. Byl použit Tukeyův test při $p=0,05$.

VÝSLEDKY

Nejdůležitějším znakem u pšenice je výnos. Přehled výnosů jednotlivých testovaných genotypů ukazuje tabulka 2, ze které je zřejmé, že skupina kontrolních odrůd s NS měla v průměru obou vegetačních období nejvyšší výnos $9,12 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}$, za ní následovaly genotypy s LG s $8,87 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}$ a s MRS $7,51 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}$. Nejvýnosnějšími genotypy z jednotlivých skupin byla Baletka ($9,6 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}$) s NS, KM 55-09LG ($9,4 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}$) s LG a KM 71-09MRS ($8,0 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}$) s MRS. Vlivem příznivějšího průběhu počasí byl v roce 2011 dosažen mnohem vyšší průměrný výnos ($9,5 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}$) než v roce 2010 ($7,5 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}$). Rozdíl ve výnose mezi oběma ročníky tedy činí dvě tuny. Zajímavé bylo, že v roce 2010 byla zaznamenána většinou negativní odezva na chemické ošetření v kombinaci bez hnojení, které ve variantě 0F vedlo dokonce k mírnému snížení výnosů oproti variantě 0K (zřejmě v důsledku přílišného zkrácení délky stébla Retacelem) a pozitivní výnosová reakce na přihnojení dusíkem ve variantách 100F a 200F. V roce 2011 byla reakce opačná, kdy nejvyšších výnosů bylo dosaženo ve variantě 0F, případně ve variantě 100F hnojené střední dávkou dusíku. Průměrné výnosy ve variantě s 200 kg dusíku (200F) byly většinou nižší oproti variantě se 100F. Lze se domnívat, že negativní odezvu na dávky dusíku v roce 2011 mohl vyvolat nedostatečný příjem dusíku dodaného v produkční dávce na konci odnožování a v kvalitativní dávce na konci sloupkování, ke kterému mohlo dojít v důsledku vyšších srážek během první poloviny května, kdy dodaný dusík mohl být odplaven, případně zůstal v horní vrstvě půdního profilu a mohl působit toxicky.

Tabulka 2: Výnosy ($\text{t}\cdot\text{ha}^{-1}$) jednotlivých genotypů v různých variantách ošetření 2010 a 2011

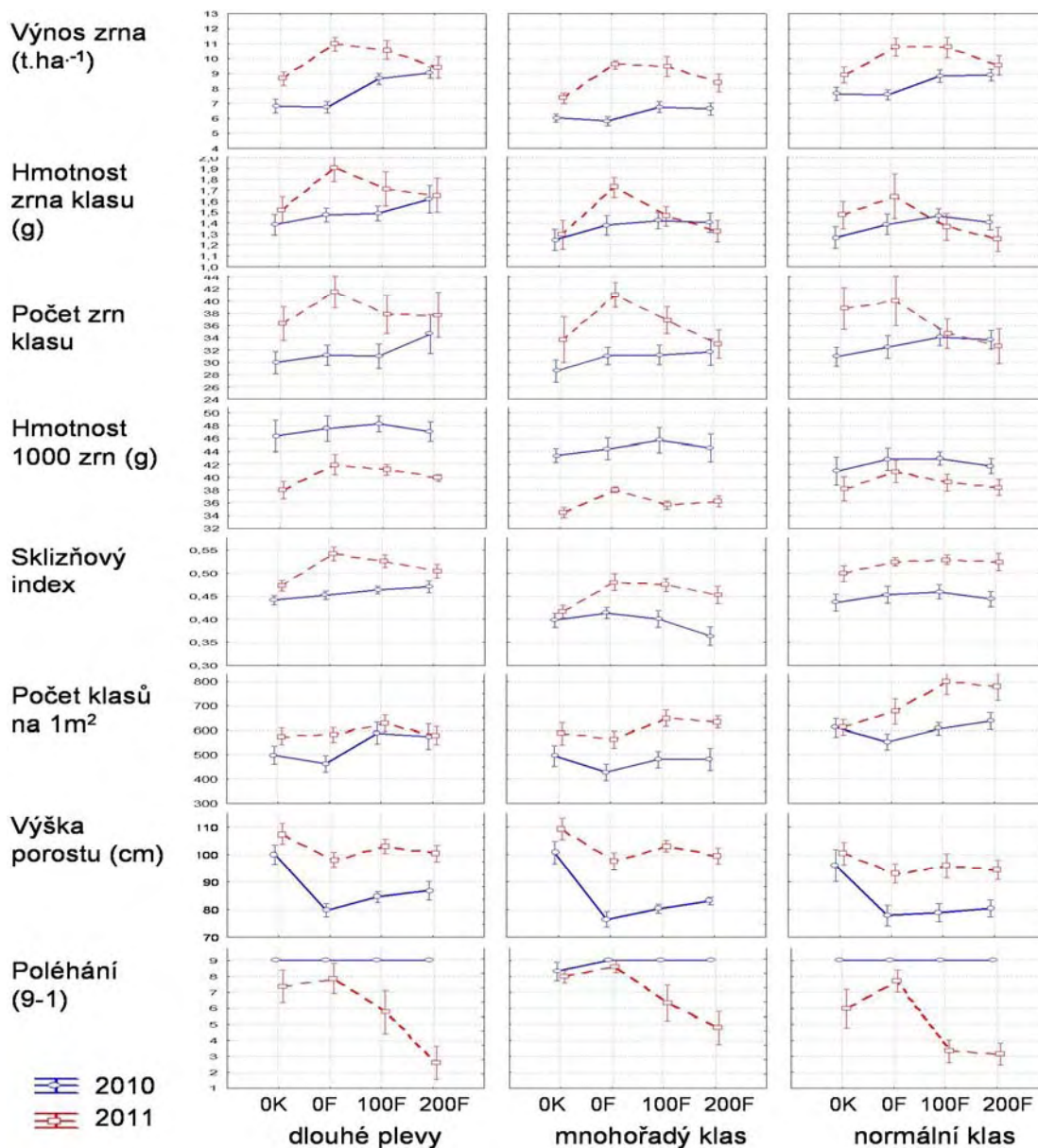
Ročník Ošetření	2010				2011				průměr
	0K	0F	100F	200F	0K	0F	100F	200F	
KM 55-09LG	7,7	7,4	9,1	9,5	8,8	11,8	11,4	9,2	9,4 a
KM 77-09LG	8,1	7,5	8,9	9,5	7,8	10,0	8,4	7,4	8,5 a-c
KM 99-09LG	6,3	6,4	8,5	8,8	9,0	11,2	11,1	9,1	8,8 a-c
KM 101-09LG	5,9	5,5	7,5	7,9	9,5	11,0	11,6	11,6	8,8 a-c
KM 103-09LG	7,1	7,2	9,7	10,1	8,4	10,3	10,4	10,1	9,2 ab
KM 105-09LG	5,8	6,6	8,2	8,7	8,5	11,6	10,7	9,1	8,7 a-c
<i>průměr LG</i>	6,8	6,8	8,7	9,1	8,7	11,0	10,6	9,4	8,9
KM 52-09MRS	5,6	5,1	5,9	5,5	7,8	9,8	11,0	8,9	7,4 c
KM 53-09MRS	6,1	6,0	6,9	6,9	7,4	9,0	7,3	7,7	7,2 c
KM 59-09MRS	6,1	6,1	7,2	7,3	7,1	10,0	9,7	7,4	7,6 bc
KM 68-09MRS	5,3	5,1	5,8	5,6	7,1	9,5	10,4	9,2	7,2 c
KM 71-09MRS	6,7	6,3	7,6	7,4	7,6	9,7	9,8	8,8	8,0 a-c
KM 121-09MRS	6,5	6,3	7,3	7,1	7,2	9,6	8,7	8,3	7,6 bc
<i>průměr MRS</i>	6,0	5,8	6,8	6,6	7,4	9,6	9,5	8,4	7,5
Federer (E)	6,6	7,4	8,3	7,9	9,1	11,0	12,0	10,6	9,1 ab
Iridium (A)	6,9	6,6	7,4	7,9	9,3	10,6	9,2	8,7	8,3 a-c
Bakfis (A)	7,4	7,0	9,1	9,2	7,4	9,4	10,8	9,2	8,7 a-c
Bohemia (A)	8,4	8,0	9,2	9,3	8,8	12,0	10,7	9,4	9,5 a
Baletka (B)	8,7	8,2	9,6	9,9	9,8	11,2	9,8	9,5	9,6 a
Biscay (C)	7,8	8,3	9,5	9,4	8,8	10,5	12,0	10,0	9,5 a
<i>průměr NS</i>	7,7	7,6	8,8	8,9	8,9	10,8	10,8	9,6	9,1

pozn. průkaznost při $p = 0,05$ (Tukey)

V roce 2011 zřejmě byla příznivá zásoba dusíku v půdě ještě ze základního hnojení na podzim, která zůstala nevyplavena ve svrchní vrstvě půdy během suchého února a března a tato zásoba byla využita pro intenzivní jarní růst porostu i v nehnojených variantách 0K a 0F, který dorostl do větší délky a hustoty než v roce 2010. Aplikace morforegulatorů pak působila na hustší a delší porosty méně účinně a vysoké dávky dusíku ve variantách 100F a zvláště 200F měly malý nebo negativní vliv. Rovněž konečný výnos mohl být ovlivněn vyšším poléháním hustých a velmi vyhnojených porostů, a to i přesto, že polehlé porosty byly bezztrátově sklizeny.

Z tabulky 2 je zřetelná specifická reakce jednotlivých genotypů na varianty ošetření. Podle nižších průměrných výnosů skupiny genotypů s MRS lze usuzovat, že tyto se jeví jako méně perspektivní pro šlechtitelské využití. Zajímavá je reakce linie KM 52-09MRS, jejíž průměrný výnos v roce 2010 byl pouze $5,5 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}$, zatímco v roce 2011 dosáhla v průměru $9,9 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}$ a ve variantě 100F dokonce $11,0 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}$ (což je dosud nejvyšší zaznamenaný výnos u pšenice s MRS). Obdobně specifické reakce ovlivněné ročníkem a ošetřením vykazují i jiné linie. Velmi vysokých výnosů dosahujících $12,0 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}$ dosáhly v roce 2011 odrůdy Biscay (100F),

Bohemia (0F) a Federer (100F). Vzhledem k tomu, že lze obtížně objasnit specifické reakce hodnocených genotypů, pokusili jsme se charakterizovat reakci jednotlivých morfotypů pomocí grafů (obrázek 3 a 4). Genotypy s MRS reagovaly svým výnosem na jednotlivé varianty ošetření poměrně málo, jejich odezva na zvyšující se hnojení byla oproti očekávání poměrně nízká. Nízké výnosy u linií s MRS byly naopak vyváženy vyšším obsahem dusíkatých látek. Jinak tomu bylo u LG, u kterých v roce 2010 došlo ve variantách s chemickým ošetřením k výraznější odezvě na intenzitu hnojení než u kontrolních odrůd pšenice s NS. V roce 2011 měly všechny skupiny hodnocených genotypů velmi podobnou reakci na agrotechnické zásahy. Z výsledků v roce 2010 se lze domnívat, že by LG mohly mít pozitivní vliv na vyšší hmotnost zrna klasu.



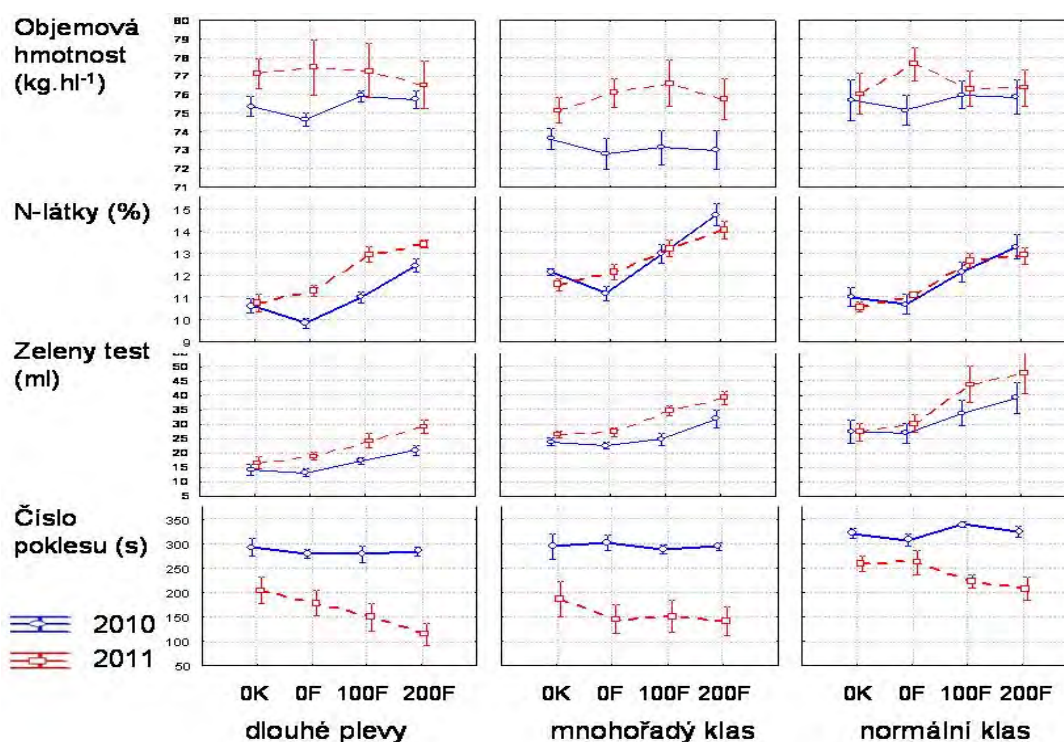
Obrázek 3: Charakteristiky produktivity hodnocených skupin genotypů v různých variantách pěstování

Jednotlivé skupiny genotypů reagovaly různě na ošetření a ročník svou hmotností zrna klasu a dílčími prvky produktivity klasu. Linie s LG dosahovaly v průměru o něco vyšší hmotnost zrna klasu (2010: OK – 1,39g, 0F – 1,47g, 100F – 1,49g, 200F – 1,69g; 2011: OK – 1,52g, 0F – 1,91g, 100F – 1,71g, 200F – 1,65g) než skupina s MRS (2010: OK – 1,25g, 0F – 1,38g, 100F – 1,42g, 200F – 1,41g; 2011: OK – 1,29g, 0F – 1,72g, 100F – 1,46g, 200F – 1,32g) a kontrolní odrůdy s NS (2010: OK – 1,27g, 0F – 1,39g, 100F – 1,46g, 200F – 1,41g; 2011: OK – 1,47g, 0F – 1,65g, 100F – 1,36g, 200F – 1,25g). Zajímavé bylo, že v roce 2011 bylo nejvyšších hodnot hmotnosti zrna klasu dosahováno u nehnojené ošetřené varianty 0F a úměrně se stoupající dávkou dusíku docházelo k poklesu. V roce 2011 se vzestupné dávky dusíku výrazněji projeví ve zvýšení počtu klasů na m², který však byl kompenzován jejich nižší hmotností. Hmotnost zrna klasu v jednotlivých variantách a ročnících více korespondovala s počtem zrn klasu než s HTS, což je zřejmé z podobnosti průběhu křivek pro tyto znaky. Vývoj počasí v roce 2010 více podpořil hmotnost obílek na úkor počtu zrn klasu, zatímco v roce 2011 tomu bylo

naopak. U linií s MRS byla zaznamenána nízká HTS zvláště v roce 2011 (2010: 0K – 43,4g, 0F – 44,4g, 100F – 45,8g, 200F – 44,6g; 2011: 0K – 34,5g, 0F – 38,1g, 100F – 35,7g, 200F – 36,2g). U linií s LG byla v roce 2010 HTS v průměru 47,3g, zatímco v roce 2011 jen 40,3g. U kontrol s NS byla v roce 2010 HTS 42,1g a v roce 2011 jen 39,2g.

Sklizňový index byl v roce 2011 vyšší než v roce 2010, což především koresponduje s výnosem a rovněž i výškou prorostu. Využitím morforegulatorů (Retacel ve variantě 0F, 100F a 200F a Moddus v 100F a 200F) se projevilo výraznějším zkrácením délky stébla v roce 2010 než v roce 2011. Delší stéblo v porostech v roce 2011 společně s vysokou hustotou zvláště u kontrolních odrůd s NS v hnojených variantách 100F (800) 200F (777 klasů na 1m²) vedly k silnému polehnutí postů. Nejmenší stupeň poléhání byl zaznamenán u prorostu s MRS. V roce 2010 bylo poléhání zcela zanedbatelné. Robustnější klasy u linií s MRS s nadpočetnými klásky vyrůstají na silnějších stéblech a jsou doprovázeny širšími listy, které zřejmě zabírají v porostech více místa na úkor ostatních stébel. Z tohoto důvodu byla u těchto materiálů nižší hustota prorostu zvláště v roce 2010.

Drobnější zrno linií s MRS zřejmě mělo souvislost s jeho nižší objemovou hmotností, která byla výrazně nižší v roce 2010, kdy došlo ve větší míře k zasychání zrna v průběhu dozrávání (obrázek 4). Nižší výnos linií s MRS byl kompenzován v průměru vyšším obsahem dusíkatých látek v zrnu (2010: LG – 11,0%, MRS – 12,8%, NS – 11,7%; 2011: LG – 12,1%, MRS – 12,8%, NS – 11,8%). Obsah dusíkatých látek stoupal podle očekávání s dávkou dusíku. U nehnojené ošetřené varianty (0F) byl zaznamenán ve všech skupinách hodnocených materiálů deficit obsahu N-látek v porovnání s nehnojenou kontrolní variantou 0K v roce 2010. Zřejmě se jednalo o projev stresu vyvolaného zkrácením stébla. Velikost dávky dusíkatého hnojení se rovněž pozitivně projevila vzestupem hodnot Zeleného testu. Deštivé počasí v průběhu žní 2011 se negativně projevilo nízkým číslem poklesu.



Obrázek 4: Charakteristiky jakosti zrna hodnocených skupin genotypů v různých variantách pěstování

Linie s MRS se vzhledem k nízkým výnosům a malé výnosové odezvě na odstupňované dávky dusíku zatím jeví jako šlechtitelsky méně využitelné. Poměrně výrazná kladná výnosová odezva na hnojení dusíkem u linií s LG naznačuje, že by se mohly uplatnit ve šlechtění odrůd pro intenzivní pěstební podmínky. Ve variantě 200F v roce 2010 dokonce linie s LG mírně výnosově překonaly linie s NS, přitom ve variantách bez hnojení dusíkem (0K a 0F) výnosy u LG byly výrazně nižší než u NS.

ZÁVĚR

Bylo provedeno vyhodnocení výnosů, komponent výnosů a vybraných znaků jakosti zrna u skupin genotypů lišících se morfologií klasu (dlouhé plevy, mnohořadý klas, normální klas) s cílem odhadnout význam jednotlivých morfotypů klasu pro realizaci výnosového potenciálu. Vycházelo se z předpokladů, že rostliny s vyšší úložnou kapacitou klasu, danou lepší schopností zakládat vyšší počet reprodukčních orgánů (obílek), budou v ideálních pěstebních podmínkách přijímat lépe asimiláty oproti běžným odrůdám s normálním klasem.

U mnohořadého klasu se vytvářejí nadpočetné (přídavné) klásky ve shlucích z jednotlivých nodů klasového

vřetena a tyto klasy proto umožňují produkovat větší počet obilek oproti normálnímu klasu. Dvouleté pokusy (2009-2010 a 2010-2011) nepotvrdily tento předpoklad. Genotypy s MRS měly nižší výnosy oproti genotypům s LG a oproti kontrolním odrůdám s NS. Nejvyšší dosažený výnos u linie s MRS KM 52-09MRS dosáhl 11,0 t.ha⁻¹ ve variantě se 100 kg dusíku a s ošetřením fungicidy a morforegulátory, byl sice poměrně vysoký, byl ale o jednu tunu nižší než u odrůd s NS (Federer, Bohemia a Biscay), které dosáhly shodně výnosu 12,0 t.ha⁻¹. Proto genové zdroje s MRS se zatím jeví jako šlechtitelsky méně perspektivní. Nižší výnosová schopnost genotypů s MRS byla kompenzována vyšším obsahem dusíkatých látek v zrna.

Klasy s LG se vyznačují pouze větší délkou a zvětšeným povrchem plev a svými výnosovými charakteristikami se více podobají kontrolním odrůdám s NS. U genotypů s LG byla zaznamenána mírně vyšší a citlivější odezva na pěstební podmínky dané chemickým ošetřením porostů a odstupňovanými dávkami dusíku. Z toho je usuzováno, že větší transpiraci plev u LG může být doprovázen vyšší asimilační schopností klasu, případně může podporovat lepší transpiraci, což by mohlo mít pozitivní vliv na tvorbu obilek.

Pokusy potvrdily výrazný vliv ročníku na výnos a rovněž i skutečnost, že výše pěstitelských vstupů (fungicidů, hnojiv) nemusí být vždy zárukou odpovídajících vyšších výnosů.

Poděkování: Práce byla podpořena projekty mezinárodní spolupráce KONTAKT ME10063 a KONTAKT Mobilita MEB0810001 Ministerstva školství mládeže a tělovýchovy České republiky a projektem N 10-04-01458-a Ruské nadace pro základní výzkum (Russian Foundation for Basic Research).

LITERATURA

- DOBROVOLSKAYA OB, MARTINEK P, VOYLOKOV AV, KORZUN V, RÖDER MS, BÖRNER A (2009). Microsatellite mapping of genes that determine supernumerary spikelets in wheat (*T. aestivum*) and rye (*S. cereale*). *Theor. Appl. Genet.*, 119(5), 867-874.
- EVANS LT, FISCHER RA (1999). Yield potential: Its definition, measurement, and significance. *Crop Sci.*, 39(6), 1544-1551.
- FOULKES MJ, SLAFER GA, DAVIES WJ, BERRY PM, SYLVESTER-BRADLEY R, MARTRE P, CALDERINI DF, GRIFFITHS S, REYNOLDS MP (2010). Raising yield potential of wheat. III. Optimizing partitioning to grain while maintaining lodging resistance. *J. Exp. Bot.*, 62(2), 469-486.
- WATANABE N, YOTANI Y, FURUTA Y (1996). The inheritance and chromosomal location of a gene for long glume in durum wheat. *Euphytica*, 91(2), 235-239.

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;

Oxana B. Dobrovolskaya, Institute of Cytology and Genetics, Lavrentieva ave. 10, Novosibirsk 630090, Russia, e-mail: oxanad@bionet.nsc.ru;

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.

REALIZÁCIA A PLNENIE ÚLOH PROJEKTU INTERREG IVC: REVERSE “REGIONÁLNA VÝMENA A TVORBA POLITIKY PRE OCHRANU A HODNOTENIE BIODIVERZITY V EURÓPE”

REALIZATION OF THE PROJECT INTERREG IVC: REVERSE "REGIONAL EXCHANGES AND POLICY MAKING FOR PROTECTING AND VALORISING BIODIVERSITY IN EUROPE"

DANIELA BENEDIKOVÁ, MICHAELA BENKOVÁ, IVETA ČIČOVÁ, LUBOMÍR MENDEL, RENÉ
HAUPTVOGEL, KATARÍNA KOLENOVÁ

Centrum výskumu rastlinnej výroby Piešťany – Výskumný ústav rastlinnej výroby Piešťany

The Project under the European Regional Development Fund INTERREG IVC: REVERSE "Regional exchanges and policy making for protecting and valorising biodiversity in Europe" is project of multilateral cooperation solved under the coordination of Conseil Régional d'Aquitaine in France. The Operational Programme is funded under the interregional cooperation in EU under the cohesion policy for the period 2007–2013. The program allows interregional cooperation by bringing together regional and local authorities from the different countries to collaborate on common projects. Regional and local authorities have the opportunity to exchange, transfer and develop its experiences in regional policy and jointly contribute to the approaches and instruments of regional policy. In the project are involved 14 international subjects from 7 countries. Within the frame of Slovakia the Research Centre of Plant Production Piešťany (PPRC), Gene bank of Slovakia participated in the solution from year 2010 under the coordination of doc. Ing. Daniela Benediková, PhD.

Key words: biodiversity conservation, regional cooperation, Gene bank SR

ÚVOD

Program INTERREG IVC spája regionálne a miestne orgány z rôznych krajín pri práci na spoločných projektoch čím umožňuje medziregionálnu spoluprácu na obdobie rokov 2007 – 2013. Nakoľko skúsenosti z programového obdobia 2000-2006 boli pozitívne v tom zmysle, že dokázali spojiť mnohých aktérov z celej EÚ pri riešení rôznych otázok vyvstala potreba kontinuity medziregionálnej spolupráce pre obdobie rokov 2007 – 2013. Program INTERREG IVC je súčasťou cieľa Európskej teritoriálnej spolupráce v rámci Štrukturálnych fondov EÚ pre programové obdobie 2007-2013. Celkovým cieľom programu INTERREG IVC je zvýšenie efektívnosti politík regionálneho rozvoja v oblasti inovácií, znalostnej ekonomiky, životného prostredia a prevencie pred nebezpečenstvami, ako aj prispieť k ekonomickej modernizácii a zvýšeniu konkurencie schopnosti Európy. Činnosti navrhované projektmi programu INTERREG IVC musia byť organizované logicky v určitom počte komponentov, ktoré sú zamerané na implementáciu (napr. „manažment a koordinácia“, „komunikácia a rozširovanie“) alebo zamerané na obsah (napr. „výmena skúseností“). Slovenským partnerom schváleného projektu regionálnej iniciatívy INTERREG IVC pod názvom REVERSE - Regionálna výmena a tvorba politiky pre ochranu a hodnotenie biodiverzity v Európe je Centrum výskumu rastlinnej výroby Piešťany. Prírodné ekosystémy sa postupne menia kvôli rozšíreniu ľudských aktivít a invázii nových druhov. To zapríčiňuje, že genetická a druhová rozmanitosť je na ústupe. Cieľom projektu REVERSE je v oblasti konzervácie a zachovania biodiverzity je zabrániť v čo najväčšej miere jej stratám a to cez medziregionálnu spoluprácu a cez zvýšenie efektivity politík regionálneho rozvoja.

MATERIÁL A METÓDY

Projekt REVERSE je medzinárodným projektom iniciatívy INTERREG IVC so 14 partnermi zo siedmich krajín Európy: Nemecko, Taliansko, Slovensko, Estónsko, Grécko, Francúzsko, Španielsko. Vedúcim partnerom je Regional Council of Aquitaine z Francúzska, hlavnou koordinátorkou projektu je Camille Massol. Doba riešenia je od 1. 1. 2010 do 31. 12. 2012. Vedúci partner v priebehu riešenia spolu s ostatnými partnermi majú za úlohu spolupracovať a poskytnúť osvedčené postupy a odporúčania pre zvrátenie straty biodiverzity. Za Slovenskú republiku sa na riešení podieľa CVRV Piešťany, Génová banka SR, koordinátor projektu doc. Ing. Daniela Benediková, PhD.. Financovanie projektu je zabezpečené z Európskeho regionálneho a rozvojového fondu (ERDF). Finančné prostriedky zatiaľ predbežne pridelené na riešenie projektu: 116 619,33 € z toho vlastné zdroje sú 17 492,90 €.

Hlavným cieľom projektu REVERSE je vďaka medziregionálnej spolupráci zvýšiť efektívnosť politík regionálneho rozvoja v oblasti ochrany biodiverzity. Zníženie straty biodiverzity napomôže k zachovaniu prírodného dedičstva európskych regiónov. Predovšetkým v nových členských krajinách existujú veľké medzery v implementácii programu prírodnej konzervácie. Preto bude menej skúseným regiónom ponúknutá spolupráca s viac pokročilými regiónmi. Jedným z hlavných cieľov je tiež identifikovať regionálne postupy (metodológie, projekty, procesy, techniky), ktoré sa ukázali ako úspešné a majú potenciál byť prenesené do rôznych

geografických oblastí. Tam, kde to bude možné, tieto dobré postupy budú prenesené a aplikované do tvorenia regionálnej politiky jednotlivých partnerov.

Riešenie prebieha v rámci troch komponentov z ktorých sa očakávajú výsledky a úspešná implementácia projektových aktivít bez žiadnych konfliktov. Riešenie projektu je priebežne vyhodnocované po polrokoch riešenia. Na záver projektu bude pripravená záverečná správa.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Doba riešenie projektu je 1.1.2010 až 31.12.2012, z toho dôvodu uvedieme len niektoré vybrané výsledky a výstupy projektu, ktoré boli a sú plánované. Riešenie prebieha v rámci troch komponentov: manažment a koordinácia, komunikácia a šírenie výsledkov a výmena skúseností a tvorba politik. V rámci aktivít manažmentu a koordinácie už bola podpísaná partnerská zmluva, a bolo zorganizovaných už päť zasadnutí Riadiaceho výboru projektu. Riešitelia priebežne riešia plánovanú problematiku a získavajú podklady pre spracovanie polročných správ za projekt. V rámci komunikácie a šírenie výsledkov boli 4 Interregionálne stretnutia. Na stretnutiach jednotliví partneri prezentujú výsledky z riešenia projektu, šírenie dobrých praktík a odporúčania. Hmatateľným výstupom celého projektu okrem iného je organizovanie pracovných seminárov(6), konferencií (2), vydávanie spravodajcov (6), organizovanie ďalších akcií pre verejnosť ako sú výstavy, dni otvorených dverí, tlačové konferencie a iné. Samostatným výstupom je webová stránka <http://reverse.cvrv.sk>, kde sú priebežne prezentované akcie a výstupy projektu. Zvýšená pozornosť je venovaná základným a stredným školám, kde sa prednáškovou formou prezentuje výchova v ochrane biodiverzity. V poslednom komponente budú na medzinárodnej úrovni vymieňané skúsenosti a praktické ukážky pomoci pre aktivity týkajúce sa ochrany biodiverzity a jej hodnotenia ako je vplyv agroturistiky, priemyslu na biodiverzitu, ochrana proti rizikám spôsobujúcim napr. záplavy či znečisťovanie pôdy a vody a podobne. Z celého projektu bude vypracovaný Európsky akčný plán ochrany biodiverzity v daných regiónoch ,kde budú identifikované dobré skúsenosti daných regiónov. Dosiahnuté výsledky sa budú implementovať cez médiá (tlačové konferencie, správy v TV a pod.) širokej verejnosti.

ZÁVER

Projekt REVERSE vďaka medziregionálnej spolupráci zvýši efektivitu politik regionálneho rozvoja v oblasti ochrany biodiverzity. Zníženie straty biodiverzity napomôže k zachovaniu prírodného dedičstva európskych regiónov. I napriek tomu, že projekt REVERSE sa začal riešiť 1. 1. 2010 zorganizovali sme už niekoľko akcií na ktorých boli prezentované problematiky ochrany a zníženia straty biodiverzity v našom regióne. Pre ďalšie riešenie je rozpracovaná problematika so základnými školami, obcami Trenčianskeho regiónu a ďalšími zodpovednými subjektmi za ochranu biodiverzity. Výstupom projektu bude vypracovaný Európsky akčný plán ochrany biodiverzity v daných regiónoch, kde budú identifikované dobré skúsenosti a praktiky daných regiónov. Dosiahnuté výsledky budú implementované cez médiá (tlačové konferencie, správy v TV a pod.).

Pod'akovanie: Propagačné aktivity súvisiace s ochranou biodiverzity pre širokú verejnosť boli financované 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

- SLÁDOK, M. a kol. : 2009. Program INTERREG IVC v rámci Cieľa Európska teritoriálna spolupráca, Interný manuál Ministerstva hospodárstva SR, 238 s.
- REVERSE guidelines: Regional exchanges and policy making for protecting and valorizing biodiversity in Europe. Created by FRONTALIZA, February 2010 France, 49 p.
- EU biodiversity strategy to 2020. EUROPEAN COMMISSION, Brussels, 3.5.2011, dostupné na:
<http://ec.europa.eu/environment/nature/biodiversity/>
- Natura 2000. EUROPEAN COMMISSION, dostupné na:
http://ec.europa.eu/environment/nature/natura2000/index_en.htm

Adresa autora:

doc. Daniela BENEDIKOVÁ, PhD.,

Plant Production Research Center Piešťany, Research Institute of Plant Production Piešťany, Bratislavská 122, 921 68 Piešťany, Slovak Republic.

(corresponding author email: benedikova@vurv.sk)

VITALITA SEMIEN VYBRANÝCH DRUHOV PO 10 ROČNOM UCHOVÁVANÍ V GÉNOVEJ BANKE SR PRI RÔZNEJ TEPLOTE

VIABILITY OF SEEDS AFTER 10-YEARS STORAGE IN THE GENE BANK OF SR AT DIFFERENT TEMPERATURES

MICHAELA BENKOVÁ, LUBOMÍR MENDEL, PAVOL HAUPTVOGEL

Centrum výskumu rastlinnej výroby Piešťany - Výskumný ústav rastlinnej výroby Piešťany

In the year 2010 the seed germination of four species *Avena L.*, *Phaseolus L.*, *Glycine max (L.) Merr.* and *Zea mays L.* was tested after ten years storage at different temperatures. Total 466 genetic resources of these species were stored in the Gene bank of Slovak republic in an active collection at +4°C (273) and in base collection at -18°C (193). Viability was monitored by conducting a germination test on a fixed sample, 100 seeds were tested in two replications. From these results the mean of percentage germination was calculated. The paired t-test was carried out using the Statistica 6.1, StatSoft, Inc., (2003). We detected statistically significant differences ($p < 0.01$) between initial seed germination values and germination after 10 years in the two species of Soybean and Corn at both collections. The largest decrease in average germination (7,98%) was recorded for soybean species in the active collection at +4°C. In the monitored species *Avena* and *Phaseolus* we detected minimum changes in germination after 10 years storage in comparison with initial germinability. The results obtained from the monitoring tests of selected plant species indicate that the storage condition at +4°C and at -18°C did not decrease average germinated activity of the species under their critical value after ten year's storage. The aim of this study was to determine which temperature gives the greatest difference in seed germination after 10 years storage.

Key words: gene bank, germination, long term storage, viability

ÚVOD

Genetické zdroje sú v Génovej banke SR uchovávané dlhodobo v dvoch kolekciami pri rôznej teplote. V základnej kolekcii pri -18°C a v aktívnej kolekcii pri +4°C. Skladovanie vysušených semien pri nízkej teplote je hlavná *ex situ* konzervačná metóda využívaná v génových bankách. Semená pred uložením do chladu musia byť vysušené na 4-8 % vlhkosť, aby sa pri dlhodobom skladovaní v nízkych teplotách predišlo k poškodeniu semena. V aktívnej kolekcii sú uskladnené duplicitne semenné vzorky, ktoré sú v základnej kolekcii, avšak táto slúži pre distribúciu semena záujemcom z radov šľachtiteľov a výskumníkov (Ellis a kol., 1985, FAO, 1997). Semená genetických zdrojov sú v nej uchovávané tak dlho, pokiaľ sa nevyčerpá ich zásoba alebo neklesne ich klíčivosť. V súčasnosti je v Génovej banke SR v aktívnej kolekcii pri teplote +4°C uchovávaných viac ako 16 400 položiek genetických zdrojov rastlín a v základnej kolekcii 3500 genetických zdrojov rastlín. Je veľmi dôležité, aby semená uložené v génovej banke mohli po zasiatí do pôdy znovu produkovať rastliny. Musia mať vysokú životnosť na začiatku skladovania, aby sa udržala aj počas dlhodobého skladovania. Semená s vysokou počiatočnou klíčivosťou vydržia uchovávanie dlhšiu dobu. Životaschopnosť semien klesá zo začiatku pomaly a starnutím semena sa rýchlo stráca. Je dôležité vedieť, kedy sa tento pokles prejaví, aby sa prijali opatrenia na regeneráciu uskladnenej položky. Nadmerné zhoršenie životaschopnosti semenného materiálu vedie k jeho strate (Rao a kol., 2006). Životnosť uchovávaných semenných vzoriek je ovplyvňovaná viacerými faktormi, ako sú klimatické podmienky počas vegetačného obdobia a počas zberu, pôvod rastliny, proces pri sušení semennej vzorky, transport a ošetrovanie vzorky pred uložením do chladiacich boxov v génovej banke (FAO, 1994). Je to len posledných 17 rokov, čo niekoľkí autori prispeli pozoruhodnými údajmi o životnosti semien po rôznej dobe uskladnenia Ellis a kol., (1993), Grzelak a kol., (1994), Stanwood a Sowa (1995). Medzi činnosť génovej banky okrem strednodobého a dlhodobého uchovávaní a distribúcií genetických zdrojov rastlín patrí aj monitoring semien, kontrola klíčivosti, resp. životaschopnosti v aktívnej a základnej kolekcii (FAO, 1994, 1997). Podľa Hamiltona a Chorltona (1997) je potrebné robiť v génovej banke v aktívnej kolekcii monitoring klíčivosti každých 5 rokov. Pri poklese klíčivosti pod II. triedu akosti osiva daného druhu sú semená regenerované. Nakoľko regenerácia je v mnohých prípadoch veľmi náročná, finančne nákladná a spôsobuje genetickú eróziu, treba striktno dodržiavať podmienky zabezpečujúce kvalitu semena určeného na uskladnenie. Cieľom výskumu bolo zistiť vplyv dlhodobého skladovania na životnosť semien vybraných rastlinných druhov pri dvoch rôznych teplotách.

MATERIÁL A METÓDY

V génovej banke bol v roku 2010 uskutočnený monitoring klíčivosti semien po 10 rokoch uskladnenia pri rôznej teplote v aktívnej kolekcii (+4°C) a základnej kolekcii (-18°C). Z monitorovaných druhov sme vybrali štyri rody resp. druhy, zastúpené rôznym počtom genetických zdrojov: ovos (*Avena L.*) - 138, fazuľa záhradná (*Phaseolus L.*) - 61, sója fazuľová (*Glycine max (L.) Merr.*) - 113 a kukurica siata (*Zea mays L.*) - 93. Genetické zdroje boli pre skladovanie do chladiacich komôr vysušené na požadovanú vlhkosť (4-8%) a spolu so

silikagélom boli uložené do sklenených kontajnerov. Test klíčivosti bol robený tak, ako vstupný test klíčivosti, podľa noriem ISTA, AOSTA a STN 46 0610 (Ellis a kol., 1993). Na test klíčivosti bolo z každej vzorky odobratých 2 x 100 semien. Vzorky s väčšími semenami, ako fazuľa, kukurica a sója boli ukladané medzi dva navlhčené filtračné papiere, ktoré sa zrolovali a vložili do mikroténového vrečka. Vzorky ovsu boli uložené na vlhký filtračný papier do plastových nádob s vekom. Všetky vzorky v dvoch opakovaní boli uložené do klíčiacej miestnosti s teplotou 20°C. Po 4-10 dňoch sa kontrolovali vyklíčené semená. Vizualizácia rozdielov medzi vstupnou klíčivosťou v roku 2000 a klíčivosťou po 10 rokoch uskladnenia pri dvoch teplotách uskladnenia bola popisovaná na základe konštrukcie *Box-plotov*. Hodnoty klíčivosti boli vyhodnotené párovým t-testom použitím štatistického programu Statistica 6.1, StatSoft, Inc., (2003).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

V priebehu roka 2010 sme monitorovali uchovávané položky genetických zdrojov, ktoré boli uložené do aktívnej a základnej kolekcie v roku 2000. Nakoľko sa monitoring vzoriek robí náhodne a každoročne sa uchováva rôzny počet vzoriek z daného druhu boli vybrané len druhy, ktoré boli zastúpené v dostatočnom množstve položiek v obidvoch kolekciách. Výsledky monitoringu klíčivosti genetických zdrojov sledovaných druhov na základe párového t-testu (tab.1 a 2) ukázali štatisticky významné preukazné rozdiely ($p < 0,01$) medzi klíčivosťou vstupnou a klíčivosťou po 10 rokoch uchovania pri druhoch *Glycine max* a *Zea mays*, a to v obidvoch kolekciách, v aktívnej (+4°C) aj v základnej kolekcii (-18°C). Štatisticky významný rozdiel ($p < 0,05$) medzi klíčivosťou vstupnou a klíčivosťou po 10 rokoch uchovávaní sme zaznamenali v aktívnej kolekcii pri druhu *Phaseolus L.* (Tab 1, 2.).

Vyhodnotením reakcie genetických zdrojov sledovaných druhov uchovávaných v obidvoch kolekciách sme zistili, že najlepšie výsledky klíčivosti po 10 rokoch uchovávaní mali vzorky ovsu (*Avena L.*). Z vizualizácie pomocou *Box-plot* grafov (Obrázok 1 a 2) je zrejmé, semenné vzorky genetických zdrojov ovsu (*Avena L.*) vykazovali podobné reakcie na teplotu uskladnenia a dosahovali po 10 rokoch uskladnenia približne rovnaké parametre klíčivosti, keď 50% všetkých genotypov malo pri +4°C klíčivosť v rozsahu 95-99% (Obrázok 1) a pri teplote -18°C klíčivosť 95-98,5% (Obrázok 2).

V porovnaní s inými plodinami si semená strukovín veľmi dobre zachovávajú klíčivosť, čo dokazujú aj výsledky uchovávaných genetických zdrojov rodu *Phaseolus L.* (tab. 2.), ktoré mali vyhovujúcu klíčivosť v celom súbore v obidvoch kolekciách, ale vyrovnanejšia klíčivosť bola v podmienkach uchovávaní pri teplote -18°C. Zo vzájomného porovnania semenných vzoriek genetických zdrojov fazule, v závislosti od podmienok uskladnenia možno konštatovať, že v podmienkach uskladnenia pri -18°C semenné vzorky reagovali na podmienky uskladnenia stabilnejšie, kde minimálny pokles klíčivosti vzoriek bol na úrovni 92% v porovnaní s reakciou semenných vzoriek uskladnených pri teplote +4°C. Pri tejto teplote bol absolútny pokles klíčivosti na úrovni 64,5%, čo už bolo pod hladinou hodnoty kritickej klíčivosti pre fazuľu 80%. Nízka minimálna hodnota klíčivosti (64,5%) v podmienkach uskladnenia pri teplote +4°C bola spôsobená len 2 genotypmi, zatiaľ čo klíčivosť 50% všetkých genotypov sa nachádzala v intervale 97,5-100% (Obrázok 3 a 4). Testovaná klíčivosť 50% všetkých genotypov v podmienkach uskladnenia pri -18°C sa nachádzala v intervale 99-100%

Je známe že semená druhov s obsahom oleja majú dobrú skladovateľnosť pri nízkych teplotách. Podľa Čuriovej (1979) zásobnou látkou pre olejiny sú tuky, ktoré sú vo vode nerozpustné a nemôžu viazať vodu, ako bielkoviny a škrob. Majú nízku tepelnú vodivosť, ktorá je v priamej súvislosti s vlhkosťou. Táto vlastnosť je pre skladovanie výhodná, pretože semeno pri nízkej vlhkosti udržuje aj nízku teplotu. Rozhodujúca je však teplota skladovania a vlhkosť, čo dokazujú aj výsledky Šimica (2007), ktorý zaznamenal pokles životaschopnosti semien sóje pri teplote 12°C až o 57% po 4 rokoch skladovania. Výrazný pokles priemernej klíčivosti semenných vzoriek genetických zdrojov sóje *Glycine max* až o 7,98% sme zaznamenali po 10 rokoch uchovávaní pri teplote +4°C, v porovnaní so vstupnou klíčivosťou (Tab.1). Lepšie výsledky sme zaznamenali pri uchovaní sóje pri -18°C, avšak aj tu sa našli rozdiely medzi jednotlivými genotypmi. Reakciu semenných vzoriek genetických zdrojov sóje na rozdielne podmienky uskladnenia ilustruje aj obrázok 5 a 6. Genetické zdroje sóje v podmienkach uskladnenia pri +4°C dosiahli najvyšší rozptyl hodnôt klíčivosti spomedzi všetkých testovaných druhov (Tab 1), kde 50% všetkých genotypov dosiahlo klíčivosť v rozsahu 86-98% (Obrázok 5). Minimálna klíčivosť bola na úrovni 34,5%, čo je pod hranicou kritickej klíčivosti, stanovenej pre sóju 70%. Celkom 5 genotypov zaznamenalo nedostatočnú klíčivosť. Naopak opačná bola reakcia genotypov sóje v podmienkach uskladnenia pri -18°C, kde 50% všetkých genotypov dosiahlo klíčivosť 96-99%. Žiadna z testovaných vzoriek v podmienkach uskladnenia pri -18°C nedosiahla kritickú hranicu klíčivosti (Obrázok 5). Pre kukuricu siatu (*Zea mays L.*) je charakteristické, že je citlivá na dlhšie skladovanie, čo dokazujú výsledky z doterajšieho monitorovania uložených vzoriek, ako aj výsledky Šimica a kol. (2007), ktorý zistil 18% zníženie klíčivosti pri uskladnení semena pri teplote 12°C. Monitoring uložených vzoriek pri +4°C z roku 2000 ukázal, že priemerná klíčivosť po 10 ročnom uchovávaní sa znížila len o 1,66 %, čo je len mierne zníženie (Tab. 1,2). V podmienkach uskladnenia pri +4°C, 50% semenných vzoriek genetických zdrojov kukurice dosiahlo rozptyl hodnôt 5% (Obrázok 7). Zaznamenaný bol pokles hodnôt klíčivosti pod kritickú hodnotu stanovenú pre kukuricu

85%, keď minimálna klíčivosť bola na úrovni 77,5%. Celkovo možno konštatovať, že bol zaznamenaný len minimálny posun v hodnotách klíčivosti z počiatočných 99,5-95,5% v roku 2000 na 99-94% v roku 2010. Pri teplote -18°C sa priemerná klíčivosť po 10 rokoch uchovania dokonca zvýšila o 1,64%, ako ilustrujú aj Box-plot grafy (Obrázok 8). Zvýšená klíčivosť je podľa niektorých autorov, napr. Ruiz (1999) a Pita (2005) spôsobená prerušenou dormanciou po jednom až dvoch rokoch uskladnenia. Počiatočný interval hodnôt klíčivosti 50% všetkých testovaných vzoriek 99,5-97% sa po 10 rokoch uskladnenia zúžil na 100-99,5% s mediánovou hodnotou 100% klíčivosti semenných vzoriek kukurice.

Tabuľka 1: Priemerná klíčivosť genetických zdrojov po 10 rokoch uskladnenia pri teplote +4°C

Genetické zdroje	Klíčivosť r.2000 (%)	s _x	Klíčivosť r.2010 (%)	s _x	Kritická klíčivosť (%)	rozdiel	t-test
ovos	97,08	2,31	97,05	2,37	85	-0,03	-0,186
fazuľa	99,16	1,38	97,29	5,85	80	1,87	2,470*
soja	97,31	3,21	89,33	12,67	70	7,97	6,290**
kukurica	97,13	2,90	95,47	4,65	85	1,66	4,051**
spolu	97,61	2,72	94,54	8,41		3,07	6,765**

** $p < 0,01$; * $p < 0,05$; s_x - štandardná odchýlka

Tabuľka 2: Priemerná klíčivosť genetických zdrojov po 10 rokoch uskladnenia pri teplote -18°C

Genetické zdroje	Klíčivosť r.2000 (%)	s _x	Klíčivosť r.2010 (%)	s _x	Kritická klíčivosť (%)	rozdiel	t-test
ovos	96,88	2,56	96,66	2,01	85	-0,22	-0,709
fazuľa	99,39	1,41	98,98	1,60	80	0,42	1,583
soja	98,90	1,92	97,30	2,58	70	1,60	4,150**
kukurica	98,13	1,54	99,77	0,37	85	-1,63	-6,196**
spolu	97,92	2,34	98,09	2,34		-0,17	-0,931

** $p < 0,01$; s_x - štandardná odchýlka

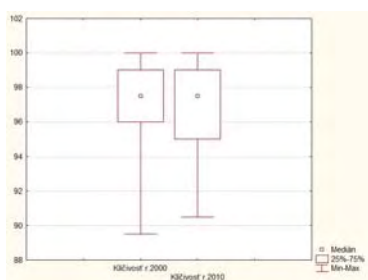
ZÁVER

Zo vzájomného porovnania vstupnej klíčivosti semenných vzoriek genetických zdrojov druhov (*Avena L.*), (*Phaseolus vulgaris L.*), (*Glycine max (L.) Merr.*) a (*Zea mays L.*) v roku 2000 a klíčivosti týchto vzoriek vykonanej v rámci monitoringu po 10 rokoch uskladnenia v génovej banke boli zistené na základe párového t-testu významné preukazné rozdiely ($p < 0,01$) medzi klíčivosťou vstupnou a klíčivosťou po 10 rokoch uchovania pri druhoch *Glycine max (L.) Merr.* a *Zea mays L.*, a to v oboch kolekciiach, v aktívnej (+4°C) aj v základnej kolekcii (-18°C). Štatisticky významný rozdiel ($p < 0,05$) medzi klíčivosťou vstupnou a klíčivosťou po 10 rokoch uchovávaní sme zaznamenali v aktívnej kolekcii pri druhu *Phaseolus vulgaris L.*. Výrazný pokles priemernej klíčivosti semenných vzoriek genetických zdrojov druhu *Glycine max (L.) Merr.* až o 7,98% sme zaznamenali po 10 rokoch uchovávaní pri teplote +4°C. The largest decrease in average germination (7,98%) was recorded for soybean species in the active collection at +4°C. Semenné vzorky sledovaných druhov si zachovali lepšiu životaschopnosť v podmienkach skladovania pri teplote -18°C. Ani pri jednom sledovanom druhu sme nezaznamenali zníženie priemernej klíčivosti pod kritickú hodnotu. Toto zníženie bolo zaznamenané len pri jednotlivých genotypov každého druhu, ktorých životaschopnosť mohla byť ovplyvnená inými faktormi, ako sú klimatické podmienky počas vegetačnej doby rastlín a počas zberu, pôvod rastliny, proces pri sušení semennej vzorky, transport a ošetrovanie vzorky pred uložením do chladiacich boxov.

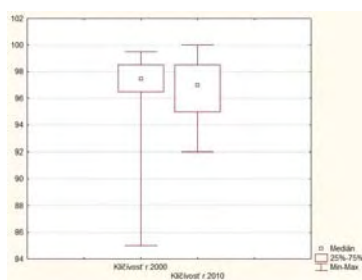
Pod'akovanie: Tato štúdia vznikla vďaka podpore v rámci Operačného programu Výskum a vývoj pre projekt: Transfer, využitie a diseminácia výsledkov výskumu genofondu rastlín pre výživu a poľnohospodárstvo (ITMS: 26220220058), spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

LITERATÚRA

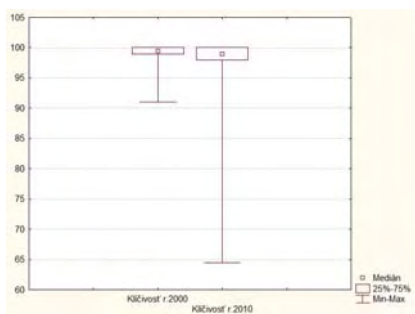
Zoznam citovanej literatúry je u autorky príspevku.



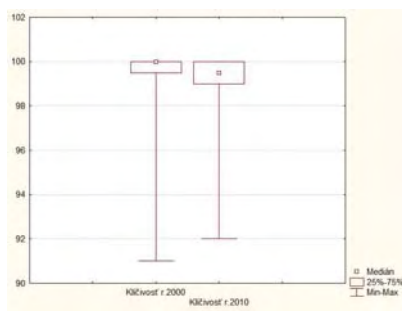
Obrázok 1: Porovnanie priemernej klíčivosti genetických zdrojov rodu *Avena* L. v percentách po 10 rokoch uskladnenia pri teplote +4°C



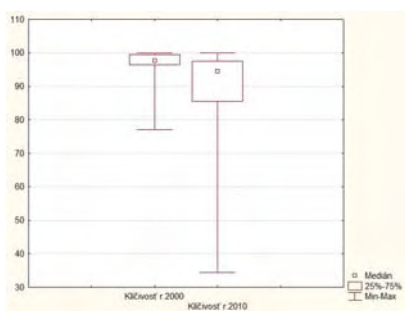
Obrázok 2: Porovnanie priemernej klíčivosti genetických zdrojov rodu *Avena* L. v percentách po 10 rokoch uskladnenia pri teplote -18°C; kritická klíčivosť 85%



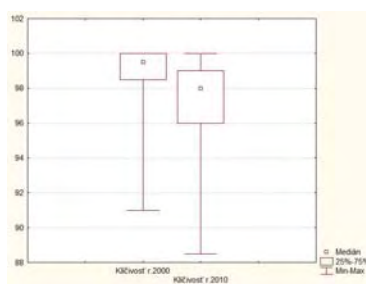
Obrázok 3: Porovnanie priemernej klíčivosti genetických zdrojov rodu *Phaseolus* L. v percentách po 10 rokoch uskladnenia pri teplote +4°C; kritická klíčivosť 80%



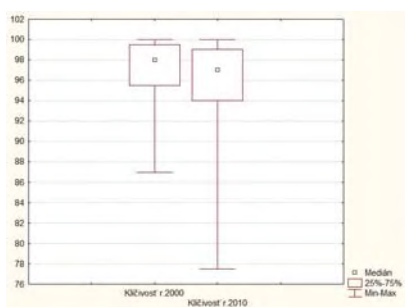
Obrázok 4: Porovnanie priemernej klíčivosti genetických zdrojov rodu *Phaseolus* L. v percentách po 10 rokoch uskladnenia pri teplote -18°C



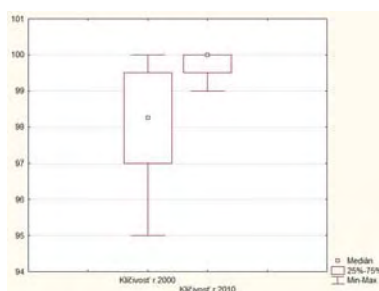
Obrázok 5: Porovnanie priemernej klíčivosti genetických zdrojov druhu *Glycine max* (L.) Merr. v percentách po 10 rokoch uskladnenia pri teplote +4°C; kritická klíčivosť 70%



Obrázok 6: Porovnanie priemernej klíčivosti genetických zdrojov druhu *Glycine max* (L.) Merr. v percentách po 10 rokoch uskladnenia pri teplote -18°C



Obrázok 7: Porovnanie priemernej klíčivosti genetických zdrojov druhu *Zea mays* L. v percentách po 10 rokoch uskladnenia pri teplote +4°C; kritická klíčivosť 85%



Obrázok 8: Porovnanie priemernej klíčivosti genetických zdrojov druhu *Zea mays* v percentách po 10 rokoch uskladnenia pri teplote -18°C

Ing. Michaela BENKOVÁ PhD, Ing. Ľubomír MENDEL, PhD., Ing. Pavol HAUPTVOGEL, PhD. Plant Production Research Center Piešťany, Research Institute of Plant Production Piešťany, Bratislavská 122, 921 68 Piešťany, Slovak Republic. (corresponding author email: benkova@vurv.sk)

VLIV VLASTNOSTÍ SEMEN NA VÝNOS VYBRANÝCH GENOTYPŮ ŘEPKY OZIMÉ

THE INFLUENCE OF THE SEED TRAITS ON YIELD OF SELECTED GENOTYPES OF WINTER RAPE

LADISLAV BLÁHA, MIROSLAV KLÍMA, MIROSLAVA VYVADILOVÁ

Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Drnovská 507, 161 06 Praha 6- Ruzyně

There are several ways to improve the adaptability of plants to the variable environmental stress conditions. Physiological studies of plant integrity have shown that the plant responds to stressors by modifying of more than 100 physiological traits. The presented results confirmed that early seed and plant vigour are in significant correlation with yield. Selected basic traits of seeds (vigour, germination percent, emergence) and especially stress tolerance of germinated seeds to the high and low temperature during day and night has significant influence on the yield of winter oilseed rape varieties Californium, Labrador, Grizzly, Viking, Navajo, Cadeli and initial breeding materials OP4947/07 and ČŽL 20.

Key words: Stress; seed traits, yield, winter oilseed rape

ÚVOD

Existuje více možností jak zvýšit adaptabilitu rostlin ke stále více se měnícím vnějším podmínkám prostředí (Bláha *et al.* 2008, Vyvadilová *et al.* 2007, 2008). U ozimé řepky byla identifikována tři důležitá růstová a vývojová stádia, která mohou výrazně ovlivnit její budoucí výnos - vzcházení po setí, přezimování a období od počátku jarní regenerace, kdy průběh počasí může, vzhledem k rozdílné reakci rostlin v jednotlivých růstových fázích, silně ovlivnit jak výnos tak kvalitu sklizených semen. V naší dřívější práci se potvrdilo, že velký vliv na vývoj a růst kořenové soustavy má kromě přípravy půdy a její kvality, odrůdy a průběhu počasí též odolnost vůči abiotickým stresorům na počátku klíčení (Bláha *et al.* 2009a). Výsledky potvrdily, že genotypy, které jsou odolnější vůči stresorům již při klíčení (nedostatek vody, sucho, vysoká teplota) mají i kvalitnější kořenový systém a uvedený jev je znatelný i po zimním období. V další práci jsme prokázali že je možný výběr na suchovzdornost pomocí laboratorních testů se semeny (Bláha *et al.* 2009b). V této práci jsme se pokusili zjistit, zda je možné nalézt vztah mezi vybranými parametry osiva, odolností vůči stresům při klíčení a následným výnosem. Důvodem pro to je skutečnost, že výkonnější genotypy mají efektivnější úroveň metabolismu po celou vegetaci.

MATERIÁL A METODY

Do pokusů byly zařazeny následující kontrastní odrůdy ozimé řepky: Californium (Francie, Monsanto SAS), Viking (Německo, Norddeutsche Pflanzenzucht), Navajo (Velká Británie, CPB Twyford Ltd), OP4947/07 (ČR, Oseva PRO, s.r.o., novošlechtění), Cadeli (Francie, Monsanto SAS), Grizzly (Francie, Société RAGT 2n), ČŽL 20 (Čína, šlechtitelský materiál), Labrador (Francie, SCA Adrien Momont et Fils). Blokově uspořádané třikrát opakované pokusy byly s výše uvedenými odrůdami založeny na Šlechtitelské stanici Chlumeck nad Cidlinou a Slapy u Tábora. Zde byla z izolovaných rostlin sklizena semena a stanoven výnos. Klíčivost a vitalita byla hodnocena podle standardní metodiky ISTA: Zhoršené podmínky pro zasetí byly simulovány v termostatu extrémním rozdílem mezi noční a denní teplotou (0°C noc a 40°C den)

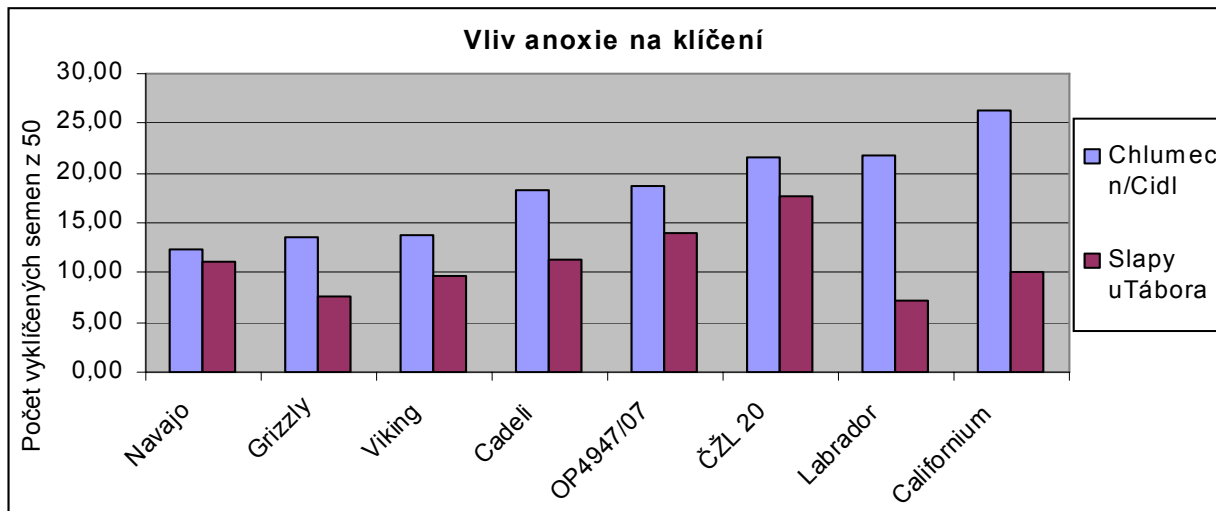
V laboratorních podmínkách byla hodnocena klíčivost jednotlivých proveniencí a ročníků osiva jak ve standardních podmínkách tak i za nedostatku kyslíku (simulace anoxie zamokřením). U varianty simulující zamokření bylo osivo máčeno 5 dní v deionizované vodě a osušeno na filtračním papíře. 50 ks semen od každé varianty bylo poté přemístěno do váženek o objemu 40 cm³ se silikonovým těsněním a udržováno při teplotě den/noc-25/10°C. Klíčivost byla stanovena po 5-ti dnech. Všechny laboratorní pokusy byly 5x opakovány.

Laboratorní vzcházkivost byla testována v kontejnerech 40x60x15 cm, naplněných homogenizovanou ornici s konstantním obsahem živin a vody. Obsah vody byl kontrolován elektronickým čidlem. Semena byla vysévána do řádků do hloubky 5 mm. Pro udržení konstantní vlhkosti byly kontejnery zakryty sklem a výsev udržován při teplotě den/noc 25°C/15°C. Třetí den po vzejití prvních rostlin byl kryt sejmut a výsev průběžně dle potřeby zvlhčován postřikem deionizovanou vodou. Vzcházkivost byla vyhodnocena ihned po sejmutí krytu a dále ve 24-hodinových intervalech až do vzejití všech rostlin.

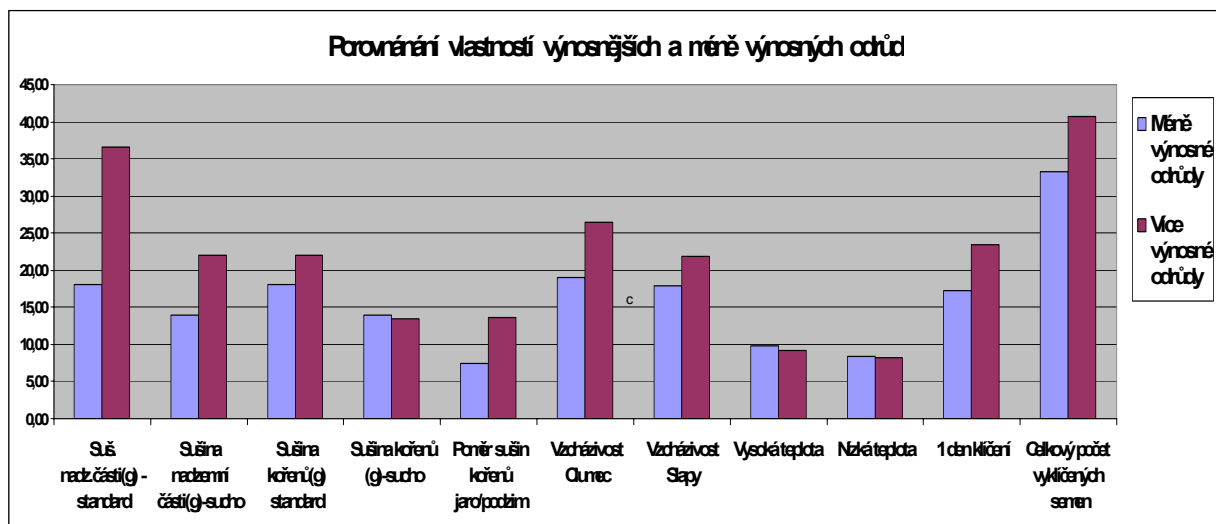
VÝSLEDKY A DISKUSE

Graf 1 ukazuje vliv lokality na klíčivost semen po 5 dní trvajícím stresu vlivem zamokření. U lokality Chlumeck nad Cidlinou, tj. u pěstitelsky lepší lokality (výrobní oblast řepařská) je velká shoda mezi výnosem a schopností klíčit po ukončení stresu, na rozdíl od horší lokality Slapy u Tábora (výrobní oblast bramborářská). Genotypy odolnější vůči tomuto stresu jsou většinou i odolnější vůči negativním vlivům v průběhu vegetace a tím i výnosnější. Pro případnou predikci výkonu odrůd na základě uvedené fyziologické vlastnosti je tedy možno

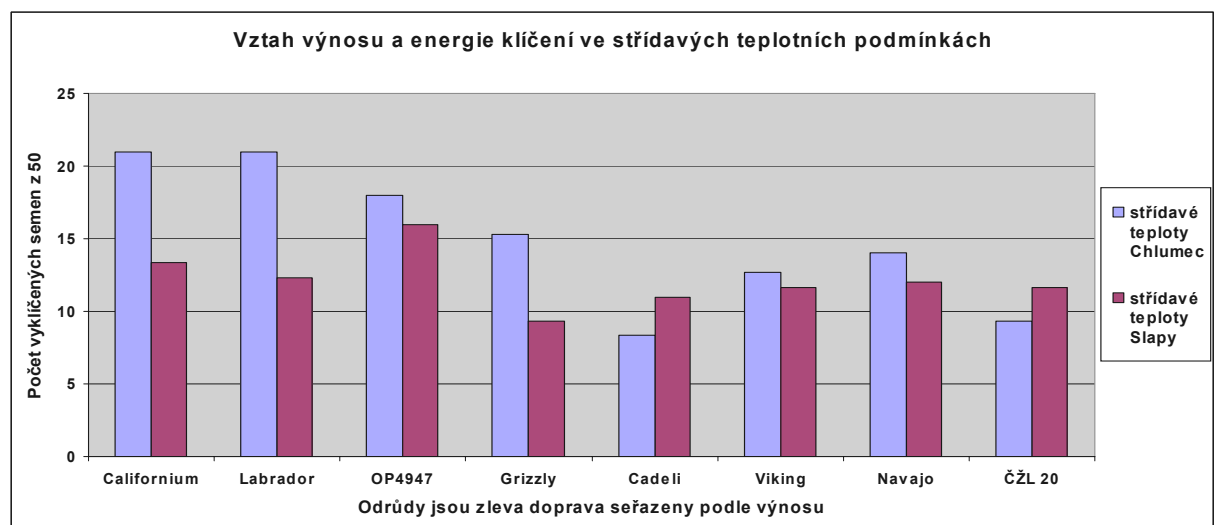
používať jen semena kvalitní proveniencie. Semena z horší lokality majú u jednotlivých odrúď značné rozdíly v klíčivosti mezi ročníky.



Graf 1: Vliv 5 dní trvající anoxie (zamokření) na klíčivost osiva ze dvou pěstitelsky odlišných lokalit



Graf 2: Porovnání vlastností výnosnějších odrůď s rychlejší jarní regenerací kořenů (Californium, Labrador, OP4947 a Grizzly) s odrůďami relativně méně výnosnými (Cadeli, Navajo, Viking a ČŽL 20). U prvých 5-ti znaků je uveden relativní poměr, vzhledem k velikosti těchto odlišných hodnot. U ostatních znaků se jedná o celkový počet klíčících rostlín vzešlých z 50 ks semen



Graf 3: Vztah mezi výnosem a energií klíčení u dvou proveniencí za střídavých teplotních podmínek (40°C den a 0°C noc)

Z grafu 2 vyplývá, že více výkonné odrůdy mají větší energii klíčení, lepší vzcháživost a lepší poměr sušín kořenů jaro/ podzim. Naopak odolnost semen při klíčení za nízké a vysoké teploty nemá vliv ani na výnos, ani na další vybrané vlastnosti rostlin na počátku vegetace. Větší význam má efektivnost využití vody (zde není uvedena). Graf 2 zobrazuje průměr z obou lokalit. Pro lokalitu lepší, tj. pro Chlumec jsou výsledky výraznější a naopak.

Opačná je však situace, kdy je v řízených podmínkách simulováno extrémní kolísání teplot mezi dnem a nocí, tedy situace v přírodě častá. Graf č. 3 zobrazuje vztah mezi výnosem a energií klíčení při extrémním kolísání teplot po zasetí (40°C - povrch půdy během dne - a 0°C noc) u dvou proveniencí osiv. Odrůdy jsou v grafu seřazeny zleva doprava od nejvýnosnější odrůdy. Test klíčivosti po týdenním působení extrémních podmínek opakovaně potvrdil, že odolnější genotypy, tj. ty, které mají zachování původní metabolické aktivity (tj. aktivitu enzymů) jsou i výnosnější. Korelace mezi výnosem a energií klíčení po tomto typu stresu ($r=0,863^*$) je statisticky významná u lepší lokality. U horší lokality (Slapy) byl zjištěn vztah na 10% hladině významnosti. Zde však také hraje roli občasná mezerovitost porostů a její vliv na proměnlivost vlastností semen. Je však nutno uvést, že na rozdíl od jiných plodin (obiloviny), je vliv lokality na fyziologické vlastnosti semen řepky značný, i v případě malých rozdílů v hmotnosti tisíce semen.

ZÁVĚR

V předchozích pracích byl prokázán vliv hmotnosti kořenového systému na suchovzdornost a výši výnosu. Významný je rychlý nástup růstu kořenového systému po ukončení zimního období a zvýšení poměru hmotnosti kořenů a nadzemní části ve prospěch kořenové hmoty. Výsledky v této práci potvrzují význam proveniencí osiva a zdůrazňují potřebu preferovat kvalitní osivo. Vitální osivo dobré proveniencí zaručuje nejen lepší vzcháživost, růst a vývoj kořenové soustavy a celkovou odolnost vůči nejvýznamnějším stresorům, ale zároveň má – v této práci potvrzený – významný vliv i na konečný efekt pěstitelského úsilí, tj. na výnos semene.

Dedikace: Práce vznikla za podpory projektů MZe ČR 0002700604 a QH82285.

LITERATURA

- BLÁHA, L., VYVADILOVÁ, M., JANÁČEK J. 2009a. Vliv genotypu a lokality na růst a vývoj kořenového systému řepky ozimé. Sborník referátů z konference Aktuální poznatky v pěstování, šlechtění, ochraně rostlin a zpracování produktů, Brno 12. - 13. 11. 2009, Vědecká příloha časopisu Úroda: 13 – 18 (CD ROM).
- BLÁHA, L., VYVADILOVÁ, M., KLÍMA, M. 2009b. Výběr genetických zdrojů řepky ozimé se zvýšenou suchovzdorností pomocí laboratorních testů. Sborník referátů z konference Vliv abiotických a biotických stresorů na vlastnosti rostlin, Praha 4. – 5.3. 2009, s. 383-386. ISBN 978-80-87011-91-1.
- BLÁHA, L., ZELENKOVÁ, S., VYVADILOVÁ, M. 2008. Vrstující význam klimatických změn na produkci zemědělských plodin. Sborník příspěvků ze semináře Zabezpečení potravin ve světě, výzvy klimatických změn a bioenergie, MZe, str. 3-11. ISBN 978-80-86909-03-5.
- VYVADILOVÁ, M., KLÍMA, M., KUČERA, V., PRÁŠIL, I.T., BLÁHA, L. 2008. Výběr genetických zdrojů řepky ozimé se zvýšenou odolností ke stresovým faktorům vnějšího prostředí. In: Aktuální poznatky v pěstování, šlechtění a ochraně rostlin, Sborník referátů z konference, Brno 6. – 7. 11. 2008, Vědecká příloha časopisu Úroda. ISSN 0139-6013.
- VYVADILOVÁ, M., KLÍMA, M., KUČERA, V., PRÁŠILOVÁ, P., PRÁŠIL, I.T, KOPRNA, R. 2007. Šlechtění řepky ozimé na toleranci ke stresovým faktorům vnějšího prostředí. In: Sborník prací z 24. vyhodnocovacího semináře "Systém výroby řepky, Systém výroby slunečnice", Hluk, 21.-22.11.2007: 127-133. ISBN 978-80-87065-03-7.

Adresa autorov:

Ing. Ladislav Bláha, CSc. e-mail: lblaha@vurv.cz

Ing. Miroslav Klíma, PhD. e-mail: klima@vurv.cz

Ing. Miroslava Vyvadilová, e-mail: vyvadilova@vurv.cz

Výzkumný ústav rostlinné výroby v.v.i., Drnovská 507, 16106 Praha 6-Ruzyně, Česká republika

DLHODOBÁ ODOLNOSŤ NOVOŠĽACHTENÝCH LÍNIÍ PŠENICE LETNEJ F. OZIMNEJ VOČI MÚČNATKE TRÁVOVEJ NA PŠENICI

DURABLE RESISTANCE OF NEWLY BRED WINTER WHEAT LINES AGAINST WHEAT POWDERY MILDEW

BOJNANSKÁ KATARÍNA¹, GUBIŠ JOZEF¹, ŽOFAJOVÁ ALŽBETA¹, ROHÁČIK TIBOR², KRIŽANOVÁ KLÁRA³, PASTIRČÁK MARTIN¹

¹Centrum výskumu rastlinnej výroby – Výskumný ústav rastlinnej výroby Piešťany, Bratislavská cesta 122, 921 68 Piešťany

²SELEKT Výskumný a šľachtiteľský ústav, a.s., 919 28 Bučany 591

³HORDEUM s.r.o., Nový Dvor 1052, 925 21 Sládkovičovo

Breeding for resistance is the most economical approach to disease control. Twenty six newly bred winter wheat lines originated from SELEKT Research and Breeding Institute Bučany (11 lines), Inc. and HORDEUM Ltd Sládkovičovo (15 lines) were evaluated in resistance to wheat powdery mildew. The range of the attack of wheat powdery mildew under field conditions was expressed by AUDPC values (Area Under Disease Progress Curve). The breeding lines with effective specific resistance were found and ineffective specific resistance genes were detected in laboratory conditions. Also the range of the pathogen attack on the leave segments was evaluated in laboratory. Significant differences were found among the AUDPC values and among the range of the pathogen attack on the leave segments. Breeding lines had significant influence on variability of pathogen attack values under field conditions and in laboratory too. Breeding lines with effective specific resistance with small range of pathogen attack and breeding lines with ineffective specific resistance genes with small range of pathogen attack were found too. Also AUDPC values of these breeding lines were low. Specific resistance genes, effective or ineffective, together with non-specific resistance shown by low range of the pathogen attack are the base of durable resistance against wheat powdery mildew.

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

ÚVOD

Múčnatka trávová na pšenici, ktorú spôsobuje patogén *Blumeria graminis* (DC) Speer f. sp. *tritici* Marchal, patrí medzi najrozšírejšie listové choroby pšenice. Škodlivosť patogéna spočíva v redukcii asimilačnej plochy rastlín. To má za následok redukcii počtu a hmotnosti zŕn v klase, čo môže spôsobiť straty 25 až 40 % (Satorre, Slafer, 2000). Takisto sa významne znižuje výťažnosť múky a sú nepriaznivo ovplyvnené aj iné parametre kvality zrna (Perugini et al. 2008). Odolnosť voči patogénovi je väčšinou zabezpečená efektívnymi génmi špecifickej rezistencie, ktoré po zavedení do praxe bývajú často patogénom prekonané v krátkom časovom úseku. Z časového hľadiska dlhodobjšie účinnú ochranu dokážu zabezpečiť gény nešpecifickej rezistencie. Gény nešpecifickej rezistencie nezabránia napadnutiu rastliny patogénom, ale redukujú výskyt a vývoj patogéna na hostiteľskej rastline. Nakoľko nešpecifická rezistencia je polygénne podmienená a rasovo nešpecifická vo vzťahu k patogénovi, metódy hodnotenia majú kvantitatívny charakter. V poľných podmienkach sa používajú na hodnotenie metódy, ktoré vyjadrujú úroveň napadnutia patogénom (stupeň napadnutia, AUDPC – plocha napadnutia pod krivkou vývoja patogéna). V laboratórnych podmienkach sme na hodnotenie rezistencie novošľachtených línií pšenice použili vybrané izoláty patogéna *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*. Cieľom výskumu bolo hodnotenie a identifikácia odolnosti novošľachtených línií pšenice voči múčnatke trávovej na pšenici.

MATERIÁL A METÓDY

V roku 2011 sme hodnotili 26 novošľachtených línií pšenice letnej formy ozimnej (*Triticum aestivum* L.) pôvodom zo SELEKT Bučany a.s. (11 línií) a HORDEUM Sládkovičovo s.r.o. (15 línií). V poľných podmienkach bola úroveň napadnutia vyjadrená hodnotou AUDPC podľa Broersa (Broers et al., 1996). Na analýzu špecifickej rezistencie sme použili metódu listových segmentov podľa autorov Hsam a Zeller (Hsam, Zeller, 1997). Na inokuláciu bolo použitých 20 izolátov so spektrom virulencie voči najfrekvencovanejším špecifickým génom rezistencie (*Pm1*, *Pm2*, *Pm3a*, *Pm3b*, *Pm3c*, *Pm3d*, *Pm3f*, *Pm4a*, *Pm4b*, *pm5a*, *pm5b*, *Pm6*, *Pm7*, *Pm8*, *Pm9*, *Pm17*, *Mld*). Výsledná reakcia (infekčné typy) na listových segmentoch línií po infekcii boli konfrontované s infekčnými typmi testovacích línií pšenice so známymi špecifickými génmi rezistencie. Na základe empirického pozorovania sme vybrali sedem zbierkových izolátov, po infekcii ktorými bol zaznamenaný výskyt patogéna na listových segmentoch všetkých hodnotených línií. Stupeň napadnutia línií bol vyjadrený percentom napadnutia plochy listových segmentov (ďalej len PLS). Hodnoty PLS boli pre štatistické spracovanie transformované arcus sinusovou transformáciou. Hodnoty napadnutia v poľných aj laboratórnych podmienkach boli analyzované programom SPSS® (13.0).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Analýzou variancie hodnôt AUDPC a tiež hodnôt PLS sme zistili významné rozdiely medzi líniami (tabuľka 1 a 2). Línia vysoko významne vplývala na oba hodnotené parametre. Pri parametri PLS mal vysoko významný podiel na variabilite hodnôt aj izolát a tiež interakcia línia x izolát (tabuľka 1). Korelačný koeficient parametrov AUDPC a PLS bol $r = 0,499$ pri hladine významnosti $\alpha = 0,01$.

Na základe vyhodnotenia infekčných typov línii boli detegované špecifické gény rezistencie *Pm4b*, *pm5b* a *Pm8* (tabuľka 3), ktoré nie sú v súčasnosti efektívne. Špecifická rezistencia línii BU 9, BU 1, BU 2, BU 8 a BU 10 je podmienená génmi alebo kombináciou génov, ktoré nebolo možné použitými izolátmi detegovať a výsledná reakcia indikovala špecifickú rezistenciu podmienenú efektívnymi špecifickými génmi. Napriek tomu, že línie BU 3, BU 11 a SK 1 nemali detegovaný žiadny špecifický gén rezistencie, mali významne nižšiu hodnotu PLS ako kontrolné odrody, ktoré tiež špecifické gény rezistencie nemajú. Línie s najmenšou hodnotou PLS majú v genóme obsiahnuté efektívne špecifické gény. Línie SK 7, BU 6, a BU 5 s prekonanými špecifickými génmi rezistencie nemali významne odlišnú hodnotu PLS v porovnaní s líniami s efektívnymi špecifickými génmi. Hodnoty AUDPC línii s účinnou špecifickou rezistenciou neboli významne odlišné v porovnaní s hodnotami AUDPC línii, pri ktorých boli detegované neúčinné špecifické gény rezistencie. Tento jav podporuje poznatok o reziduálnom účinku neefektívnych špecifických génov v prejave nešpecifickej rezistencie (Paillard *et al.* 2002; Zeller, Hsam 2002). Selektia genotypov s dlhodobou odolnosťou proti múčnatke trávovej je časovo náročný proces zahrňujúci extenzívne a precízne kvantitatívne merania, pretože len na základe fenotypu je ťažké identifikovať polygénne založenú rezistenciu (Liu *et al.* 2000). Tento autor zhodne s Paillardom *et al.* (2002) odporúča zamerať sa v tvorbe odolných odrôd voči múčnatke trávovej na „kompletnú rezistenciu“. Čo znamená, že v genóme sú obsiahnuté okrem špecifických génov, aj keď už neefektívnych, aj nešpecifické gény rezistencie.

Tabuľka 1: Analýza variancie transformovaných hodnôt plochy napadnutia listových segmentov novošľachtených línii pšenice letnej formy ozimnej

Zdroj variability	Stupne voľnosti	Priemerné štvorce
Model	196	2,804 ⁺⁺
Genotyp (línie a kontroly)	27	1,504 ⁺⁺
Izolát	6	1,906 ⁺⁺
Genotyp x Izolát	162	0,144 ⁺⁺
Chyba	784	0,024
Celkom	980	

⁺⁺P<0,01

Tabuľka 2: Analýza variancie hodnôt AUDPC novošľachtených línii pšenice letnej formy ozimnej

Zdroj variability	Stupne voľnosti	Priemerné štvorce
Model	26	214427 ⁺⁺
Línia	26	214427 ⁺⁺
Chyba	26	9133
Celkom	52	

⁺⁺P<0,01

Tabuľka 3: Hodnoty napadnutia plochy listových segmentov (PLS), hodnoty AUDPC novošľachtených línii pšenice letnej formy ozimnej a detegované gény špecifickej rezistencie voči múčnatke trávovej na pšenici (*Pm*).

Línia	AUDPC	PLS v %	<i>Pm</i>	Línia	AUDPC	PLS v %	<i>Pm</i>
BU 9	31 ^a	6 ^a	neurčené*	SK 9	244 ^{a-d}	48 ^{h-j}	<i>Pm4b</i>
BU 1	288 ^{a-d}	9 ^{ab}	neurčené	SK 15	441 ^{cd}	50 ^{h-k}	Ø
BU 2	244 ^{a-d}	16 ^{bc}	neurčené	SK 4	261 ^{a-d}	51 ^{h-k}	Ø
BU 8	45 ^{ab}	16 ^{bc}	neurčené	SK 6	409 ^{a-d}	54 ^{h-l}	<i>Pm4b</i>
SK 7	150 ^{a-c}	17 ^{b-d}	<i>Pm4b</i> + <i>Pm8</i>	SK 5	208 ^{a-d}	55 ^{i-l}	Ø
BU 6	207 ^{a-d}	21 ^{c-e}	<i>Pm4b</i> + <i>pm5b</i>	SK 8	501 ^{cd}	57 ^{i-l}	Ø
BU 5	181 ^{a-d}	21 ^{c-e}	<i>Pm4b</i> + <i>pm5b</i>	SK 2	324 ^{a-d}	57 ^{i-l}	Ø
BU 7	264 ^{a-d}	28 ^{d-f}	<i>pm5b</i>	SK 10	563 ^d	58 ^{i-l}	<i>Pm4b</i>
BU 4	376 ^{a-d}	30 ^{ef}	<i>Pm8</i>	Kanzler-K2	-	58 ^{j-l}	Ø
BU 3	433 ^{cd}	33 ^{fg}	Ø**	SK 12	339 ^{a-d}	59 ^{j-l}	Ø
BU 10	151 ^{a-c}	41 ^{f-h}	neurčené	SK 13	396 ^{a-d}	60 ^{j-l}	<i>Pm4b</i>

Línia	AUDPC	PLS v %	<i>Pm</i>	Línia	AUDPC	PLS v %	<i>Pm</i>
BU 11	378 ^{a-d}	44 ^{g-i}	∅	Carsten-K1	-	64 ^{kl}	∅
SK 1	256 ^{a-d}	44 ^{g-i}	∅	SK 14	397 ^{a-d}	66 ^l	∅
SK 3	304 ^{a-d}	48 ^{h-j}	∅	SK 11	433 ^{cd}	67 ^l	<i>Pm4b</i>

^a - priemery v rámci stĺpca s rozdielnymi písmenami sú štatisticky významné na hladine $\alpha = 0,05$

* - špecifické gény rezistencie nebolo možné použiťmi izolátmi patogéna detegovať

** - novošľachtená línia nemá špecifický gén rezistencie

ZÁVER

Na základe hodnotenia odolnosti voči múčnatke trávovej na pšenici v poľných aj laboratórnych podmienkach sme našli odolné novošľachtené línie pšenice letnej f. ozimnej. Identifikovali sme línie s účinnou špecifickou odolnosťou, línie s nešpecifickou odolnosťou a línie s odolnosťou, ktorá je podmienená nešpecifickou odolnosťou s reziduálnym vplyvom neefektívnych génov špecifickej rezistencie.

Pod'akovanie. Táto práca bola podporovaná finančnými prostriedkami Agentúry na podporu výskumu a vývoja pre projekty VMSP-P-0056-09 a VMSP-P-0047-09.

LITERATÚRA

- BROERS, L.H.M. – CUESTA SUBIAS, X. – LÓPEZ ATILANO, R.M.: Field assessment of quantitative resistance to yellow rust in ten spring bread wheat cultivars. *Euphytica* 90, 1996, s. 9-16.
- HSAM, S.L.K. – ZELLER, F.J. 1997: Evidence of allelism between genes *Pm8* and *Pm17* and chromosomal location of powdery mildew and leaf rust genes in the common wheat cultivar Amigo. In: *Plant Breeding*, vol. 116, p. 119-122.
- HSAM, S.L.K. – ZELLER, F.J. 2002. Breeding for powdery mildew resistance in common wheat (*Triticum aestivum* L.). In: Bélanger: *The powdery mildews. A comprehensive treatise*. Minnesota, USA, 2002, 292 pp. ISBN 0-89054-291-0
- LIU, J. - LIU, D. - TAO, W. - LI, W. - WANG, S. - CHEN, P. - CHENG, S. - GAO, D. 2000. Molecular marker-facilitated pyramiding of different genes for powdery mildew resistance in wheat. *Plant Breeding* vol. 119, 2000, N. 1, pp. 21-24.
- 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.
- 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.
- SATORRE, E.H. - SLAFER, G.A. 2000. *Wheat: ecology and physiology of yield determination*. Binghamton, USA, Food products press, 2000. 503 pp. ISBN 1-56022-874-1.

Adresa autorov:

Ing. Katarína Bojnanská; Ing. Jozef Gubiš, PhD., Ing. Alžbeta Žofajová, PhD.; Mgr. Martin Pastirčák, Phd.; Centrum výskumu rastlinnej výroby – Výskumný ústav rastlinnej výroby, Sekcia biológie rastlín, Bratislavská cesta 122, 921 68 Piešťany, e-mail: bojnanska@vurv.sk, gubis@vurv.sk, zofajova@vurv.sk; pastircak@vurv.sk; Doc. Tibor Roháčik, PhD., SELEKT Výskumný a šľachtiteľský ústav, a.s., 919 28 Bučany 591, rohacik.t@stonline.sk; Ing. Klára Krížanová, PhD., HORDEUM s.r.o., Nový Dvôr 1052, 925 21 Sládkovičovo, krizanova@hordeum.sk

PRODUKČNÉ PARAMETRE SLNEČNICE ROČNEJ VO VZŤAHU K PRIEBEHU POVETERNOSTNÝCH PODMIENOK A APLIKÁCII BIOLOGICKY AKTÍVNYCH LÁTOK

THE PRODUCTION PARAMETERS OF SUNFLOWER IN RELATION TO THE COURSE OF WEATHER CONDITIONS AND APPLICATION OF BIOLOGIC ACTIVE SUBSTANCES

IVAN ČERNÝ, VLADIMÍR PAČUTA, ALEXANDRA VEVERKOVÁ, RASTISLAV BUŠO

Katedra rastlinnej výroby, Fakulta agrobiológie a potravinových zdrojov, SPU Nitra

The statistically non-significant influence of weather conditions, hybrids and applications of Atonik and Pentakeep V on achenes yield of sunflower was found in experimental fields Center of Plant Biology and Ecology FAFR SUA in Nitra during two experimental years. The yield stability was in 2010, hybrid NK Brio and Alexandra PR and application of Pentakeep - V in dose 0.1 l ha⁻¹. The oiliness formation was high statistically significantly influenced by course of weather conditions, hybrids and application of preparations with biological active substances. In the range of this, dominant year was 2010, hybrid NK Brio and application of Pentakeep V in dose 0.5 l ha⁻¹.

Key words: sunflower, weather conditions, Atonik, Pentakeep - V, yield, quality

ÚVOD

Formovanie produkcie poľných plodín je proces komplexný, podmienený funkčnosťou a početnosťou faktorov, ktoré vo vzájomných interakciách vytvárajú zložitú štruktúru rastových, fyziologických a biochemických procesov. V rastových pochodoch sa v plnej miere odzrkadľujú vývinové procesy organizmu a procesy látkovej premeny, pričom závislosť jednotlivých článkov tohto reťazca od podmienok vonkajšieho prostredia je rôzna (Bajči, Pačuta, Černý, 1997).

Jedným z dominujúcich faktorov, významne ovplyvňujúcich produkciu poľných plodín je výživa, resp. mimokoreňová aplikácia živín. Viaceré výsledky experimentov (Černý, Pačuta, Adamčinová, Kováčik, Kozak, 2010) potvrdzujú, že listová aplikácia hnojív, resp. príjem živín listami je považovaný za doplnkový.

Listová aplikácia hnojív nachádza svoje uplatnenie predovšetkým v obdobiach sucha, keď je príjem živín z pôdy sťažený, v období intenzívneho rastu plodín, pri nedostatočnom prevzdušnení pôdy, pri symptómoch chlorózy, ale aj latentných fyziologických poruchách rastlín (Josefyová, Pulkrábek, Urban, 2008).

V súvislosti s problematikou mimokoreňovej aplikácie hnojív a v nadväznosti na pôdnoklimatické podmienky prostredia sa v systéme pestovania poľných plodín odporúčajú využívať i niektoré iné alternatívy navýšenia potenciálnej produkcie. Takouto alternatívou môže byť aplikácia prípravkov vyrobených na báze biologicky aktívnych látok. Biologicky aktívne látky sa svojim zložením podieľajú na regulácii rastových a vývojových procesov v rastline, ovplyvňujú dynamiku tvorby úrody a podporujú zvýšenie využitia genetického potenciálu odrôd. Ovplyvňujú nielen fyziologické pochody v rastline, ale pôsobia i na oživenie pôdneho prostredia, ktoré následne ovplyvňuje produkčný proces rastliny a tým i celého porastu. Ich aplikácia je možná nielen foliárne na list, ale aj na pôdu (Pidgeon, Jaggard, Lister et al. 2001).

Biostimulátory rastu niektorí autori (Jankowski, Dubis, 2008; Šrojtová, 2006) definujú ako biologicky aktívne látky obsahujúce hormóny, enzýmy, proteíny, aminokyseliny, mikroelementy. Ich optimálnym využitím dochádza k pozitívnej aktivácii metabolizmu rastlín. Ich dominantná úloha spočíva v regulácii životných procesov na úrovni bunky, jednotlivých orgánov a organizmu ako celku. Ďalej ovplyvňujú rast a vývin rastliny a zúčastňujú sa priamo alebo nepriamo na základných procesoch prebiehajúcich v rastline, akými sú fotosyntéza, príjem a transport vody a tiež príjem živín.

Cieľom príspevku bolo v agroekologických podmienkach teplej kukuričnej výrobnjej oblasti zistiť, vplyv rastového stimulantu Atonik a listového hnojiva Pentakeep V na produkčné parametre slnečnice ročnej.

MATERIÁL A METÓDY

Experimentálna úloha bola riešená v rokoch 2009–2010 formou poľných polyfaktorových pokusov, založených v teplej kukuričnej výrobnjej oblasti (klimatická oblasť: teplá; klimatická podoblasť: suchá; klimatický okrsk: teplý, suchý s miernou zimou a dlhým slnečným svitom, hnedozem kultizemná) na pozemkoch Strediska biológie a ekológie rastlín FAPZ SPU v Nitre Dolná Malanta.

Pokusy boli založené blokovou metódou, s náhodným usporiadaním pokusných členov, s počtom opakovaní 3. V rozsahu pokusu boli sledované hybridy Alexandra PR, NK Alego, NK Brio.

Predplodinou bola pšenica letná forma ozimná (*Triticum aestivum* L.) Technologický systém pestovania slnečnice ročnej (*Helianthus annuus* L.) bol konvenčný (dvojarbové obrábanie pôdy, spon pestovania 0,20 . 0,70 m). Hnojenie bolo uskutočnené na základe agrochemického rozboru pôdy.

V experimentoch boli hodnotené varianty foliárnej aplikácie Atoniku: 0,8 l.ha⁻¹ (termín aplikácie: BBCH 22 a 32) a Pentakeepu V: 0,10 l.ha⁻¹, 0,25 l.ha⁻¹, 0,50 l.ha⁻¹ (termín aplikácie: BBCH 18, 22 a 32). Atonik je rastový

stimulátor obsahujúci aromatické nitrozlučieniny 2-nitrofenolát sodný, 4-nitrofenolát sodný a nitroguajakolát sodný. Účinnou zložkou hnojiva Pentakeep - V je 5 - amino - levulová kyselina (ALA).

Biometrické a grafické vyhodnotenie výsledkov bolo realizované prostredníctvom programov Statgraphics Plus (viacfaktorovej analýzy rozptylu) Microsoft Excel.

Poveternostné charakteristiky experimentálneho miesta boli získané z Agrometeorologickej stanice FZKI SPU v Nitre (tabuľka 1. - 2.).

Tabuľka 1: Priemerné teploty v rokoch 2009 a 2010

Mesiac	Normál teplôt (°C)	2009			2010		
		Teploty (°C)	Odchýlka Δt	Charakteristika mesiaca	Teploty (°C)	Odchýlka Δt	Charakteristika mesiaca
IV.	10,40	11	0,6	normálny	10,60	-0,5	normálny
V.	15,10	16	0,9	normálny	15,20	-0,36	normálny
VI.	18,00	19,9	1,9	teplý	20,10	-1,84	veľmi studený
VII.	19,80	20,4	0,6	normálny	23,00	-3,31	mimoriadne studený
VIII.	19,30	20,5	1,2	teplý	19,50	-0,31	normálny
IX.	15,60	15,4	-0,2	normálny	14,00	1,36	teplý

Tabuľka 2: Priemerný úhrn zrážok v rokoch 2009 a 2010

Mesiac	Normál zrážok (mm)	2009			2010		
		Zrážky (mm)	% n	Charakteristika mesiaca	Zrážky (mm)	% n	Charakteristika mesiaca
IV	39,00	36,4	93,33	normálny	95,3	244,36	mimoriadne vlhký
V	58,00	55,4	95,52	normálny	156,3	269,48	mimoriadne vlhký
VI	66,00	86,2	130,61	vlhký	158,3	239,84	mimoriadne vlhký
VII	52,00	90	173,1	veľmi vlhký	51,9	99,81	normálny
VIII	61,00	9,8	16,1	mimoriadne suchý	103,3	169,34	veľmi vlhký
IX	40,00	51,5	128,75	vlhký	73,7	184,25	veľmi vlhký

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Stupeň adaptability slnečnice ročnej na konkrétne agroekologické podmienky prostredia je variabilný. Pulkrábek et al. (2007) konštatujú, že poveternostné podmienky ročníka predstavujú významný faktor podieľajúci sa na tvorbe úrody všetkých plodín. Z pohľadu experimentálne definovaných zámerov je potrebné zdôrazniť, že poveternostné podmienky ročníka jednotlivých experimentálnych rokov boli značne nevyrovnané. Znamená to, že reálna teplotná a zrážková bilancia v priebehu jednotlivých rokov bola diferencovaná, čo sa prejavilo v nesúlade medzi reálnym stavom a fyziologickými požiadavkami plodiny na teplotné a vlhové zabezpečenie. Poveternostne priaznivejším, z hľadiska celkového formovania úrody, bol ročník 2009. Pre ročník 2010 bol typický nadpriemerný úhrn zrážok a to v rozsahu celého vegetačného obdobia. V priebehu sledovaných dvoch rokov bola dosiahnutá priemerná úroda nažiek 2,7 t.ha⁻¹. Aj napriek značne diferencovanému priebehu poveternostných podmienok v sledovanom období, v rokoch 2009 a 2010 boli zaznamenané vyrovnané úrody, ktoré sa pohybovali v hodnotách na úrovni 2,6 t.ha⁻¹ v roku 2009, resp. 2,7 t.ha⁻¹ v roku 2010.

V rozsahu hodnotenia obsahu oleja konštatujeme tendenciu preukaznosti opačnú, t. j. vysoko preukaznú. Za 2 - ročné obdobie bol priemerný obsah oleja v nažkách slnečnice ročnej 42,26 %. V roku 2009 bola hodnota olejnatosti 41,7 %, v roku 2010 bola analyzovaná hodnota 42,82 %.

Vplyv hybridov na úrodu nažiek bol nesignifikantný. V rozsahu obsahu oleja bol vplyv hybridov vysoko preukazný. Z použitého biologického materiálu boli najvyššie hodnoty úrody a olejnatosti nažiek dosiahnuté pri hybridoch NK Brio a Alexandra PR. Sledované hybridy dosiahli priemernú úrodu na úrovni 3,0 t.ha⁻¹ a obsah oleja 44,3 %, resp. 43,4 %.

Dosiahnuté úrody nažiek a olejnatosť, vzhľadom na metodicky zvolené varianty aplikácie prípravku a hnojiva, boli ovplyvnené štatisticky nepreukazne. Najvyššia úroda nažiek bola na variante s Pentakeepom V (dávka 0,1 l.ha⁻¹) a to v priemere pokusného obdobia 3,55 t.ha⁻¹. Najnižšia úroda nažiek za sledované obdobie (2,70 t.ha⁻¹) bola na variante s dvojnásobnou aplikáciou Atoniku. Obsah oleja pri metodicky stanovených variantoch ošetrovania bol najvyšší na variante s Pentakeepom V (dávka 0,5 l.ha⁻¹) a to v priemere pokusného obdobia 44,73 %. Najnižšia olejnatosť bola typická, rovnako ako pri úrode nažiek, na variante ošetrovania Atonikom.

Tabuľka 1: Úroda a obsah oleja slnečnice ročnej

Hybrid	Rok/merná jednotka		kontrola	Atonik	Pentakeep -V		
					0,10 l .ha ⁻¹	0,25 l .ha ⁻¹	0,50 l .ha ⁻¹
Alexandra PR	2009	t.ha ⁻¹	2,6	3,2	3,3	2,8	2,7
		%	41,3	41,6	47,5	42,6	44,1
	2010	t.ha ⁻¹	3,7	2,1	3,4	2,8	2,8
		%	46,1	41,3	44,7	42,4	45,7
NK Alego	2009	t.ha ⁻¹	2,6	3,3	2,6	2,5	2,7
		%	38,5	38,0	37,8	45,5	42,4
	2010	t.ha ⁻¹	3,3	2,0	2,9	2,3	2,1
		%	40,2	38,8	42,7	39,1	42,7
NK Brio	2009	t.ha ⁻¹	2,9	2,9	2,8	2,9	3,8
		%	42,8	42,7	47,7	42,8	47,4
	2010	t.ha ⁻¹	3,1	2,6	3,7	3,0	2,8
		%	41,1	42,5	47,1	41,1	46,1

ZÁVER

Z dvojročných maloparcelkových pokusov, realizovaných na experimentálnych pozemkoch Strediska biológie a ekológie rastlín FAPZ SPU v Nitre, bol zistený štatisticky nesignifikantný vplyv poveternostných podmienok ročníka, hybridov a aplikácie Atoniku a Pentakeepu - V na úrodu nažiek slnečnice ročnej. Úrodovo stabilnejším bol rok 2010, hybrid NK Brio a Alexandra PR a aplikácia Pentakeepu V v dávke 0,1 l.ha⁻¹.

Formovanie olejnatosti bolo vysoko preukazne ovplyvnené priebehom poveternostných podmienok ročníka, hybridmi a aplikáciou prípravkov na báze biologicky aktívnych látok. V uvedenom rozsahu bol dominujúci ročník 2010, hybrid NK Brio a aplikácia Pentakeepu - V v dávke 0,5 l.ha⁻¹.

Podakovanie: 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

- BAJČI, P., PAČUTA, V., ČERNÝ, I. 1997. Cukrová repa. *Nitra: ÚVTIP NOI*, 1997, 111 s., ISBN 80 - 85330 - 35 - 0.
- ČERNÝ, I., PAČUTA, V., ADAMČINOVÁ, B., KOVÁČIK, P., KOZAK, M. 2009. Produkčné parametre repy cukrovej vplyvom cielenej aplikácie Atoniku a listového hnojiva Campofort. *Listy cukrovarnícké a řepařské*, roč. 125, 2009, 4, pp. 259 – 264.
- JANKOWSKI, K., DUBIS, B. 2008. Biostimulators for field crops. In *Biostimulators in modern agriculture*. Warsaw: Wieś jutra Sp. 2008, pp. 24, ISBN 83 - 89503 - 50 - 6.
- JOSEFYOVÁ, L., PULKRÁBEK, J., URBAN, J. 2008. The influence of harvest date and crop treatment on two different sugar beet variety types. *Plant, Soil and Environment*, roč. 49, 2008, č.11, s. 492 - 498.
- PIDGEON, J. D., JAGGARD, K. W., LISTER, D. H., RICHTER, et al. 2001. Climatic impact on the productivity of sugar beet (*Beta vulgaris L.*) in Europe. *Zuckerindustrie*, roč. 129, 2001, č. 1, p. 20 - 25.
- PULKRÁBEK, J., URBAN, J., BEČKOVÁ, L. 2007. Atonik utilization for acceleration of poststress regeneration and lessening impact of herbicide stress on sugar beet plants. *Listy cukrovarnícké a řepařské*, 2007, 123, 2, pp. 43 - 46.
- ŠROJTOVÁ, G. 2006. Závislosť úrod slnečnice od poveternostných podmienok. In *Bioklimatológia a voda v krajine*. Nitra: SPU, 2006, s. 69 - 78, ISBN 80 - 89186 - 12 - 2.

Kontaktná adresa:

doc. Ing. Ivan Černý, PhD., Katedra rastlinnej výroby FAPZ SPU Nitra, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, e-mail: ivan.cerny@uniag.sk; prof. Ing. Vladimír Pačuta, PhD., Katedra rastlinnej výroby FAPZ SPU Nitra, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, e-mail: vladimir.pacuta@uniag.sk; Ing. Alexandra Veverková, Katedra rastlinnej výroby FAPZ SPU Nitra, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, e-mail: alexandra.veverkova@uniag.sk; Ing. Rastislav Bušo, PhD., Centrum výskumu rastlinnej výroby Piešťany, e-mail: buso@vuvr.sk

VARIABILITA MORFOLOGICKÝCH ZNAKOV GENETICKÝCH ZDROJOV LÁSKAVCA (*AMARANTHUS L.*)

VARIABILITY OF MORPHOLOGICAL TRAITS OF GENETIC RESOURCES OF AMARANTH (*AMARANTHUS L.*)

IVETA ČIČOVÁ, ĽUBOMÍR MENDEL

Centrum výskumu rastlinnej výroby Piešťany

The aim of this study was to evaluate and compare selected varieties of amaranth (*Amaranthus L.*) terms of phenological, morphological and agronomic characteristics by international descriptors list. Significant morphological and agronomic characteristics allow a detailed assessment of a variety of other uses such as in breeding new varieties. Another important objective was to monitor the incidence of diseases and pests the cultural amaranth species. Different use of amaranth and also like food went to use the evaluation and comparison of the nutritional and rheological properties of amaranth flours. The high nutritional quality of flours mixtures with the addition amaranth flour was found by detailed chemical evaluation. The result of this thesis was based on all the ratings to choose appropriate varieties of amaranth for special use in crop production.

Key words: genetic resources, amaranth, evaluation, variability

ÚVOD

Cieľom práce bolo hodnotiť a porovnať vybrané odrody láskavca (*Amaranthus L.*) z hľadiska fenologických, morfológických a hospodárskych znakov podľa medzinárodných klasifikátorov. Významné morfológické a hospodárske znaky umožňujú podrobne hodnotiť odrody pre ďalšie využitie napríklad v šľachtení nových odrôd. Ďalším dôležitým cieľom bolo monitorovať výskyt chorôb a škodcov na kultúrnych druhoch láskavcov. Využitie láskavca aj na potravinárske využitie smerovalo ku hodnoteniu a porovnaniu nutričných a reologických vlastností múk. Podrobným chemickým hodnotením múk sa zistila vysoká nutričná kvalita zmesi s prídavkom láskavcovej múky. Výsledkom práce bolo na základe všetkých hodnotení vybrať vhodné odrody láskavca na využitie v špeciálnej rastlinnej výrobe.

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.

MATERIÁL A METÓDY

Maloparcelkové poľné pokusy s odrodami láskavca boli založené v rokoch 2010-2011 v Centre výskumu rastlinnej výroby v Piešťanoch blokovou metódou. Pokusná lokalita sa nachádza v kukuričnej výrobnjej oblasti, subtyp kukurično-pšeničný. Pôda na pozemku je ílovito-hlinitá, s obsahom ílovitých častí okolo 50 %, s obsahom humusu v ornici 18-20 g.kg⁻¹, so strednou zásobou P a K a s neutrálnou až slabou kyslou pôdnou reakciou. Klimaticky je región charakterizovaný ako teplý, mierne suchý, suma teplôt nad 10°C je 3000-2500°C. Podľa dlhodobého priemeru je priemerná ročná teplota 9,2°C a priemerný ročný úhrn zrážok 595 mm. Zrážky sú rozložené rovnomerne počas celého roku. Tieto klimatické a pôdne podmienky sú predurčené na pestovanie láskavca.

V rámci pokusu bolo hodnotených 15 genetických zdrojov láskavca. V sledovaných rokoch bol výskum zameraný na adaptáciu odrôd v poľných podmienkach a hodnotenie podľa medzinárodného klasifikátora: G. J. H. Grubben: Genetic Resources of *Amaranthus* (IBPGR 1981).

Hodnotenie rastlín sa sústredilo na:

1. Nástup fenologických fáz (vzchádzanie, vytváranie pravých listov, formovanie kvetenstva, mliečna, vosková a fyziologická zrelosť).
2. Morfológické 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*).

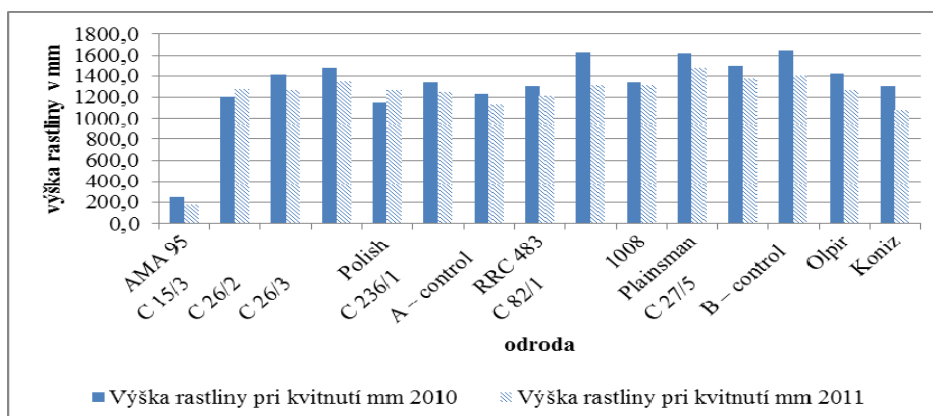
Vizualizácia rozdielov medzi reakciou morfológických znakov genetických zdrojov láskavca vo vegetačných ročníkoch 2010 a 2011 bola popisovaná na základe konštrukcie *Box-plotov*. Rozdiely medzi reakciou morfológických znakov genetických zdrojov láskavca vo vegetačných ročníkoch 2010 a 2011 boli testované párovým t-testom použitím štatistického programu Statistica 6.1, StatSoft, Inc., (2003).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Tabuľka 1: Základné popisné štatistické ukazovatele variability genetických zdrojov láskavca spolu za vegetačné ročníky 2010 a 2011

Znaky	N	Priemer	Medián	Min.	Max.	Rozptyl	Štandardná odchýlka
Výška rastliny pri kvitnutí (mm)	30	1265,6	1307,5	176,0	1645,0	101743,2	319,0
Priemer stonky (mm)	30	14,9	15,7	2,6	19,9	14,4	3,8
Dĺžka listu (mm)	30	129,2	131,8	50,1	180,0	879,4	29,7
Šírka listu (mm)	30	70,8	71,2	9,0	108,2	461,4	21,5
Dĺžka koncového súkvetia hlavnej stonky (mm)	30	553,8	584,0	0,0	840,0	27326,8	165,3

Zo sledovaných morfológických znakov v roku 2010 bola hodnotená výška rastlín. Najvyššou odrodou v roku 2010 bola B-control, ktorá dosiahla výšku 1645 mm a v roku 2011 to bola odroda Plainsman (1480 mm) (Graf 1).



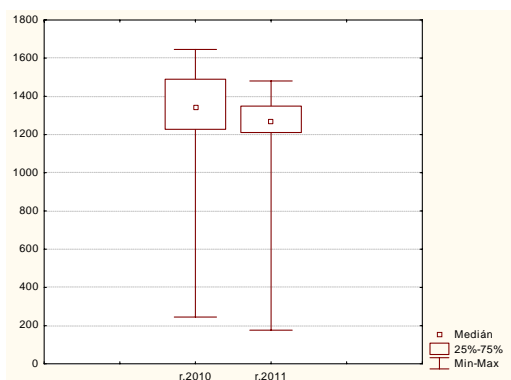
Graf 1: Porovnanie výšky rastlín v sledovaných rokoch

Druhým meraným znakom podľa deskriptora je priemer stonky meraný v mm. Ako sme zistili v roku 2010 mali najhrubšiu stonku odrody 1008 (19,94 mm), Olpir (17,98 mm) a v roku 2011 to boli odrody 1008 (19 mm) a C 15/3 (18,3 mm).

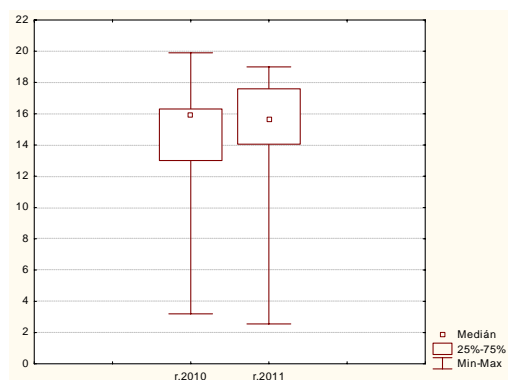
Podľa deskriptora sa meria aj list a to jeho dĺžka a šírka v milimetroch. Zo zistených výsledkov vyplýva, že najdlhší list mali genetické zdroje C 82/1 (180,0 mm), B-control (167,5 mm) a Olpir (166,0 mm) v roku 2010 a v roku 2011 to boli odrody Olpir (129,0 mm) a RRC 483 (135,5 mm). Práve u tohto meraného znaku sa prejavila vysoká variabilita. Namerané hodnoty sa pohybovali od 66,0 mm do 180,0 mm.

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). V roku 2011 najdlhšie súkvetia mali odrody Plainsman (840 mm) a Polish (724 mm).

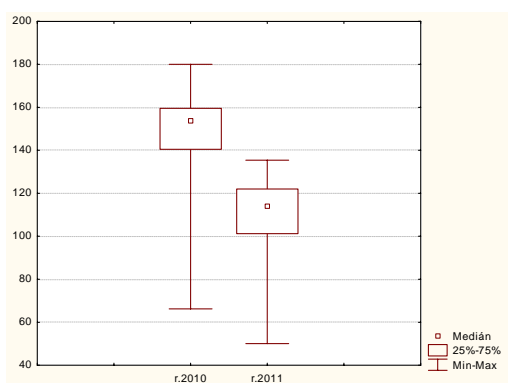
Výsledky výskumu Varalakshmi (2004) tiež dokazujú vysokú variabilitu poľných hodnotení, ktorý skúmal variabilitu 46 genetických zdrojov láskavca a nameril nasledovné hodnoty: výška rastlín (310-815 mm), dĺžka súkvetia (50-500 mm), šírka listov (30-120 mm). Vysokú variabilitu v poľnom hodnotení uvádza aj Wu a kol. (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 taktiež vysokú variabilitu v agronomických znakoch v závislosti od pestovateľskej oblasti. Preto je dôležité zistiť vhodné odrody na introdukciiu do rastlinnej výroby v pestovateľských podmienkach Slovenska. Variabilitu 11,76-57,48% od priemerných hodnôt vo výške rastlín a v priemere stonky zistili autorský kolektív (Shukla a kol., 2006). Výška rastlín bola veľmi variabilná i vo výskume Berti a kol. (1996), ktorí skúmali 30 genetických zdrojov vo fáze dozrievania a zistili výšky rastlín od 1110-2470 mm. Autorský kolektív Mapes a kol. (1996) merali 18 morfológických znakov 14 genetických zdrojov láskavca v poľných podmienkach a zistili variabilitu 37,8% pri znaku dĺžka listu.



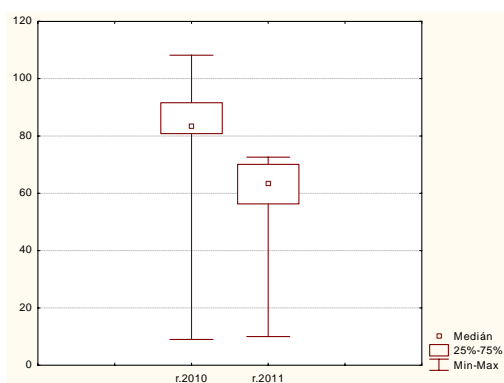
Obrázok 1 Porovnanie dĺžky súkvetia (mm) genetických zdrojov láskavca vo vegetačných ročníkoch 2010 a 2011



Obrázok 2: Porovnanie priemeru stonky (mm) genetických zdrojov láskavca vo vegetačných ročníkoch 2010 a 2011



Obrázok 3 Porovnanie dĺžky listu (mm) genetických zdrojov láskavca vo vegetačných ročníkoch 2010 a 2011



Obrázok 4 Porovnanie šírky listu (mm) genetických zdrojov láskavca vo vegetačných ročníkoch 2010 a 2011

Tabuľka 2: Porovnanie reakcie morfológických znakov genetických zdrojov láskavca vo vegetačných ročníkoch 2010 a 2011 párovým t-testom

Morfologické znaky	r.2010	s_x	r.2011	s_x	rozdiel	t-test
Výška rastliny pri kvitnutí (mm)	1320,53	335,18	1210,67	303,22	109,87	3,807**
Priemer stonky (mm)	14,62	3,80	15,11	3,90	-0,49	-0,797
Dĺžka listu (mm)	148,02	25,76	110,37	19,97	37,65	10,523**
Šírka listu (mm)	81,14	22,02	60,37	15,49	20,77	9,062**
Dĺžka koncového súkvetia hlavnej stonky (mm)	545,52	157,37	562,04	178,03	-16,52	-0,643

** $p < 0,01$; s_x - štandardná odchýlka

Z výsledkov párového t-testu výšky rastlín pri kvitnutí (mm), dĺžky a šírky listu (mm) genetických zdrojov láskavca vo vegetačných ročníkoch 2010 a 2011 možno konštatovať, že medzi genotypmi v sledovaných ročníkoch boli zistené štatisticky významné rozdiely ($p < 0,01$) (Tabuľka 2). V prejave genetických zdrojov láskavca medzi vegetačných ročníkmi 2010 a 2011 neboli zistené štatisticky významné rozdiely ($p > 0,05$) v priemere stonky a dĺžke koncového súkvetia hlavnej stonky.

Z vizualizácie pomocou Box-plot grafov je zrejme, že v ročníku 2011 genetické zdroje láskavca dosahovali pri kvitnutí nižší vzrast v priemere 1210,67 mm a 50% všetkých genotypov v roku 2011 dosahovalo výšku rastlín pri kvitnutí v intervale 1211,0-1349,0 mm.

Reakcia genetických zdrojov láskavca vo vegetačných ročníkoch 2010 a 2011 v priemere stonky bola v oboch hodnotených ročníkoch približne rovnaká. Vo vegetačnom ročníku 2011 z celkového množstva 50% hodnotených genotypov dosahovalo priemer stonky v intervale 14,05-17,59 mm v porovnaní s ročníkom 2010, kde 50% všetkých genotypov dosiahlo len 13,0-16,3 mm (Obrázok 2).

Obdobná reakcia genetických zdrojov láskavca bola v dĺžke koncového súkvetia hlavnej stonky (Obrázok 1). Naopak, rozdielna bola reakcia genetických zdrojov láskavca v dĺžke a šírke listov, kde genotypy dosiahli

štatisticky významne ($p < 0,01$) dlhšie a širšie listy v ročníku 2010 ako aj 50% všetkých hodnotených genotypov dosahovalo dlhšie a širšie listy v porovnaní s ročníkom 2010 (Obrázok 3 a 4).

ZÁVER

Z doterajších výsledkov hodnotenia láskavca v rokoch 2010 a 2011 vyplývajú tieto závery: vysoká variabilita láskavca sa prejavila vo výške rastlín od 176 mm do 1645 mm, priemer stonky varíroval od 2,6 mm do 19,9 mm, vysoká variabilita v šírke listov od 9 mm do 108,2 mm, pri znaku dĺžka listov bol nameraný interval od 50,1 mm do 180 mm, dĺžka koncového súkvetia sa pohybovala od 485 mm do 840 mm.

V práci sú prezentované výsledky hodnotenia láskavca pestovaného na CVRV Piešťany v roku 2010 a 2011 z hľadiska morfológických znakov z hľadiska jeho vhodnosti využitia v rastlinnej výrobe. Z poľných experimentov v rokoch 2010 a 2011 vyplýva, že láskavec je vhodný do podmienok slovenského poľnohospodárstva, niektoré odrody a genetické zdroje dozrievajú koncom septembra - začiatkom októbra (neskoré odrody), nevyhnutnosť rajonizácie pre podmienky južného Slovenska. Počas vegetácie boli porasty láskavca ošetrované prípravkom Vaztak 10 EC (proti skočkám) a prípravok Novozir MN 80 (ošetrenie proti hubovým chorobám).

Podakovanie: 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:

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

Ing. Ľubomír Mendel, PhD., CVRV Bratislavská cesta 122, 92168 Piešťany, e-mail: mendel@vurv.sk

PRIRODZENÁ MYKOFLÓRA VYBRANÝCH DRUHOV RODU *AMARANTHUS* NA SLOVENSKU

NATURAL MYCOFLORA OF SELECTED SPECIES OF GENUS *AMARANTHUS* IN SLOVAKIA

IVETA ČIČOVÁ, MARTIN PASTIRČÁK

Centrum výskumu rastlinnej výroby Piešťany – Výskumný ústav rastlinnej výroby Piešťany

In the present study, the occurrence and species diversity of *Amaranthus* spp. (*A. hypochondriacus* and *A. retroflexus*) - associated fungi on plants collected mainly from agroecosystems habitats in different regions of Slovakia were studied. Isolated fungi were defined to include known plant pathogenic fungi, opportunistic pathogens and secondary colonizers isolated from the *A. hypochondriacus* and *A. retroflexus*. Plant-associated fungi were detected in all studied plants samples. A total of 16 fungal genera were isolated and identified. Among them, 13 species were known opportunistic pathogens and 4 were secondary colonizers. A total of 6 fungal species viz. *Alternaria alternata*, *Ascochyta* sp., *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum* sp., *Microsphaeropsis amaranthi* and *Stemphylium* sp. were frequently isolated. Among the saprophytic flora, *Epicoccum* and *Cladosporium* were the most prominent genera.

Key words: mycoflora, plant pathogenic fungi, *Amaranthus*

ÚVOD

Rod *Amaranthus* pozostáva s približne 70 druhov, z ktorých asi 40 druhov pochádza z Ameriky a ostatných 30 druhov rastie v Austrálii, Afrike, Ázii a Európe (Costea, DeMason, 2001). Niektoré z nich boli pestované v oblasti Strednej a Južnej Ameriky pred viac ako 5000 rokmi pre ich semená (*A. caudatus*, *A. cruentus*, *A. hypochondriacus*) alebo listy v oblasti Strednej Európy (*A. blitum/lividus*), Strednej Ameriky (*A. dubius*) alebo v Indii/ Južnej Číne (*A. tricolor*) (Dehmer, 2003).

Okrem pestovaných druhov pre účely výživy človeka alebo hospodárskych zvierat sa na poľnohospodárskych produkčných plochách vyskytujú pôvodne rastúce burinné druhy rodu *Amaranthus* (*A. retroflexus*), ktoré spôsobujú ekonomické straty. Buriny spôsobujú škody v poľnohospodárstve najmä redukciou úrody a kvality plodín odobieraním vody, výživných látok, samotným zatienením pestovaných rastlín a rozširovaním pôvodcov ochorení. Niektorí pôvodcovia hubových ochorení sa šíria priamo rozptýlením spór v ovzduší, na druhej strane buriny môžu byť medzihostiteľmi húb, ktoré spôsobujú ochorenia pestovaných plodín. Samostatnú skupinu predstavujú fytopatogény špecializované na prenos semenami (Richardson, 1996). S introdukciou a intenzívnym pestovaním najmä amerických druhov rodu *Amaranthus* v agroekologických podmienkach Slovenska sa začala venovať pozornosť aj monitoringu škodcov a parazitických húb ovplyvňujúcich produkciu semien (Bürki et al., 2001).

Mykoflóre jednotlivých vegetatívnych a generatívnych častí rastlín druhov *Amaranthus* bolo venovaných niekoľko vedeckých štúdií, pričom k najčastejším hubám identifikovaných na listoch patrili huby rodu *Alternaria* – *A. tenuissima*, *A. alternata* (Blodgett et al., 2000; Ghorbani et al., 2000). Škvrnitosť listov spôsobujú aj huby *Albugo bliti* a *Microsphaeropsis amaranthi*, pričom oba druhy majú schopnosť spôsobiť odumretie celého napadnutého jedinca (Heiny et al., 1992). Zo semien vybraných druhov rodu *Amaranthus* bolo identifikovaných 18 druhov mikroskopických húb, pričom k najčastejšie identifikovaným druhom patrila huba *A. alternata* (Pusz, 2009).

Cieľom tohto príspevku je sumárne spracovať spektrum prirodzenej mykoflóry dvoch druhov rodu *Amaranthus* (*A. hypochondriacus* a *A. retroflexus*) na základe publikovaných údajov a výsledkov z mykologických analýz infikovaných rastlín na území Slovenska.

MATERIÁL A METÓDY

Na štúdium mikroskopických húb nekultivačnými metódami sme použili rastlinný materiál (listy, stonky, plody) z vybraných druhov rodu láskavec (*Amaranthus* sp.) rastúcich na produkčných plochách na území Slovenska. Mikroskopické 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 mikroskopických húb – rod *Phoma* (Boerema et al., 2004), rod *Phomopsis* (Roskopf et al., 2000), rod *Mycosphaerella* (Tomilin, 1979) a rod *Colletotrichum* (Sutton, 1980). Identifikované druhy mikroskopických húb boli uložené do fytopatologického herbára CVRV Piešťany pre účely ďalšieho mykologického výskumu.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Amaranthus hypochondriacus je v agroekologických podmienkach Slovenska považovaný za netradičnú plodinu, pričom *Amaranthus retroflexus* veľmi často doprevádza tento druh na produkčných plochách ako

burina. Vo všeobecnosti sa parazitickým hubám na burinách venuje menšia pozornosť. Práve táto časť fytopatológie je zaujímavá z pohľadu vyhľadávania parazitických húb vhodných pre využitie v biologickej ochrane rastlín (Te Beest et al., 1992). Počas študovaného obdobia na území Slovenska sme identifikovali 17 druhov húb patriacich do 4 tried podľa modernej taxonómie – Ascomycetes (*Leptosphaeria*, *Mycosphaerella*, *Ophiobolus*, *Pleospora*, *Sclerotinia*), Hyphomycetes (*Alternaria*, *Botrytis*, *Fusarium*, *Ramularia*, *Stemphylium*), Coelomycetes (*Ascochyta*, *Colletotrichum*, *Microsphaeropsis*, *Phoma*, *Phomopsis*) a Oomycetes (*Albugo*) parazitujúcich na vybraných druhoch rodu *Amaranthus*. Zoznam identifikovaných húb na jednotlivých druhoch rodu *Amaranthus* je uvedený v tabuľke 1. Rastlinných patogénov – *Albugo bliti*, *Alternaria* sp., *Ascochyta* sp., *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp., *Phoma* sp., *Phomopsis* sp., *Ramularia* sp., *Stemphylium* sp. a *Sclerotinia sclerotiorum* sme identifikovali na základe symptómov, ktoré spôsobovali na listoch a stebľoch. Na základe symptómov pozorovaných na rastlinách vybraných druhov rodu *Amaranthus* môžeme ochorenia rozdeliť do troch hlavných skupín: 1. nekrotické listové škvrnitosti, 2. biela hrdza, 3. hniloba súkvetia.

Tabuľka 1: Prehľad identifikovaných mikroskopických húb na rastlinách vybraných druhov rodu láskavec (*Amaranthus hypochondriacus* a *A. retroflexus*)

Rod huby	Literárny zdroj	Výskyt na Slovensku	
		<i>A. hypochondriacus</i>	<i>A. retroflexus</i>
<i>Albugo bliti</i>	Costea et al., 2004	-	x
<i>Alternaria</i> sp.	Blodgett et al., 2000; Ghorbani et al., 2000	x	x
<i>Ascochyta</i> sp.	–	x	x
<i>Botrytis cinerea</i>	–	x	x
<i>Colletotrichum</i> sp.	Costea et al., 2004	-	x
<i>Fusarium</i> sp.	Costea et al., 2004	-	x
<i>Leptosphaeria</i> sp.	–	-	x
<i>Microsphaeropsis amaranthi</i>	Mintz, Weidmann, 1991	x	x
<i>Mycosphaerella</i> sp.	Tomilin, 1979	x	x
<i>Ophiobolus</i> sp.	–	-	x
<i>Ophiobolus rubellus</i>	Shoemaker, 1976	-	x
<i>Pleospora</i> sp.	Wehmeyer, 1961	-	x
<i>Phoma</i> sp.	Boerema et al., 2004	x	x
<i>Phomopsis</i> sp.	Roskopf et al., 2000	x	x
<i>Ramularia</i> sp.	Costea et al., 2004	-	-
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Costea et al., 2004	x	-
<i>Stemphylium</i> sp.	Costea et al., 2004	x	x

Parazitické druhy spôsobili na listoch infikovaných rastlín charakteristické nekrotické škvrny šedo-žltej farby, na ktorých sme mykologickou analýzou preukázali prítomnosť sporulačných útvarov. Symptómy napadnutia označované ako „biela hrdza“ sme pozorovali pri infekcii rastlín druhu *A. retroflexus* hubou *Albugo bliti*. Na listoch infikovaných jedincov sme pozorovali prítomnosť chlorotických škvŕn a pod pokožkou hostiteľa sa vytvárali vankúšikovitú ložiská s husto navrstvenými spórangiami v retiazkach. Listy boli morfológicky deformované a rastliny vzrastom zaostávali v porovnaní so zdravými jedincami. Huba *Microsphaeropsis amaranthi* spôsobovala v skorých štádiách infekcie listovú škvrnitosť na oboch študovaných druhoch rodu *Amaranthus*, neskôr však lézie bolo možné pozorovať aj na stonkách a koreňoch infikovaných rastlín. Počas vegetačného obdobia sme pozorovali prítomnosť parazitických húb aj na súkvetí sledovaných druhov rodu *Amaranthus*. K najčastejším druhom parazitujúcim na súkvetí *A. hypochondriacus* patrila huba *Botrytis cinerea* a k najčastejším parazitom súkvetia druhu *A. retroflexus* patrili huby *Alternaria* sp. a *Microsphaeropsis amaranthi*. Endofytická mykoflóra bola zastúpená druhmi rodu *Leptosphaeria* a *Ophiobolus* (*O. rubellus* a *O. sp.*).

ZÁVER

Počas študovaného obdobia sme zistili prítomnosť 16 rodov mikroskopických húb na listoch a stebľoch dvoch vybraných druhov rodu *Amaranthus* (*A. hypochondriacus* a *A. retroflexus*) na Slovensku. Huby rodov *Alternaria*, *Ascochyta*, *Botrytis* a *Phoma* boli najčastejšie identifikované na symptomatických listoch s listovou škvrnitosťou. Huba *Albugo bliti* patrila k najrozšírenejšiemu druhu parazitujúcemu na rastlinách *A. retroflexus*. Najväčším nebezpečenstvom pre pestovanie druhu *A. hypochondriacus* predstavuje prítomnosť druhu *A. retroflexus* na produkčných plochách a vzájomný potenciálny prenos parazitických húb (Heiny et al., 1992).

Podakovanie: Táto práca bola podporovaná Agentúrou na podporu výskumu a vývoja na základe zmluvy číslo VMSP - P - 0125 -09.

LITERATÚRA

- BOEREMA, G.H., GRUYTER DE, J., NOORDELOOS, M.E., HAMERS, M.E.C., 2004: *Phoma* Identification manual. Differentiation of specific and infra-specific taxa in culture. CABI. 470 p.
- BLODGETT, J.T., SWART, W.J., LOUW, S.VDM., WEEKS, W.J., 2000: Species composition of endophytic fungi in *Amaranthus hybridus* leaves, petioles, stems, and roots. *Mycologia* 92(5), s. 853-859.
- BÜRKI, H.M., LAWRIE, J., GREAVES, M. P., DOWN, V. M., JÜTTERSONKE, B., CAGÁŇ, L., VRÁBLOVÁ, M., GHORBANI, R., HASSAN, E. A., SCHROEDER, D., 2001: Biocontrol of *Amaranthus* spp. in Europe: state of the art. *BioControl* 46(2), s. 197-210.
- COSTEA, M., DEMASON, D., 2001: Stem morphology and anatomy in *Amaranthus* L. (*Amaranthaceae*) – Taxonomic significance. *Journal of the Torrey Botanical Society* 128 (3), s. 254-281.
- COSTEA, M., WEAVER, S.E., TARDIF, J.F., 2004: The biology of Canadian weeds. 130. *Amaranthus retroflexus* L., *A. powellii* S. Watson and *A. hybridus* L. *Canadian Journal of Plant Science* 84, s. 631-668.
- DEHMER, K.J., 2003: Molecular diversity in the genus *Amaranthus*. *Schriften zu Genetischen Ressourcen* 22, s. 208-215.
- GHORBANI, R., SEEL, W., LITTERICK, A., LEIFERT, C., 2000: Evaluation of *Alternaria alternata* for biological control of *Amaranthus retroflexus*. *Weed Science* 48 (4), s. 474-480.
- HEINY, D.K., MINTZ, A.S., WEIDMANN, G.J., 1992: Redisposition of *Aposphaeria amaranthi* in *Microsphaeropsis*. *Mycotaxon* 44 (1), s. 137-154.
- MINTZ, A.S., WEIDMANN, G.J., 1991: Evaluation of *Aposphaeria amaranthi* as a bioherbicide for pigweed (*Amaranthus* spp.). *Proceedings Arkansas Academy of Science* 45, s. 66-67.
- PUSZ, W., 2009: Fungi from seeds of *Amaranthus* spp. *Phytopathologia* 54, s. 15-21.
- 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.
- RICHARDSON, M.J., 1996. Seed mycology. *Mycological Research* 100(4), s. 385-392.
- SUTTON, B.C., 1980: The Coelomycetes. Fungi imperfecti with pycnidia, acervuli and stromata. CMI, Kew.
- Te BEEST, D.O., Yang, X.B., Cisar, C.R., 1992: The status of biological control of weeds with fungal pathogens. *Annual Revue of Phytopathology* 30, s. 637-657.
- TOMILIN, B.A., 1979: Key to fungi of the genus *Mycosphaerella* Johans. Nauka.
- WEHMEYER, L.E., 1961: A world monograph of the genus *Pleospora* and its segregates. The University of Michigan Press, Ann Arbor.

Adresa autorov:

Ing. Iveta Čičová, PhD., Mgr. Martin Pastirčák, PhD.

CVRV VÚRV Piešťany, Bratislavská cesta 122, 921 68 Piešťany; e-mail: cicova@vurv.sk, pastircak@vurv.sk, uefemapa@hotmail.com

EFFECT OF CADMIUM AND ARSENIC IONS ON THE GROWTH OF GERMINATING SOYBEAN PLANTS

VPLYV IÓNOV KADMIA A ARZÉNU NA RAST KLÍČIACICH RASTLÍN SÓJE FAZUĽOVEJ

TERÉZIA DOBROVICZKÁ, BEÁTA PIRŠELOVÁ, ILDIKÓ MATUŠÍKOVÁ

Constantine the Philosopher University in Nitra

Heavy metals belong to significant pollutants of the environment since they accumulate in organisms and are not degradable. The goal of our experiments was to assess the impact of applied doses of cadmium and arsenic on the growth of soybean roots (*Glycine max* (L.) Merr. cvs. Bólyi 44 and Cordoba) in the early stage of development. Already after 48 hours of incubation in the solutions of heavy metals we have observed growth inhibition of roots of both varieties. On the last day of the experiment the applied dose of cadmium decreased the fresh weight of roots by 15,63% (cv. Bólyi 44) and 20,54% (cv. Cordoba). In roots of both cultivars exposed to arsenic we recorded a decrease of fresh weight by 30,00%. Since dry weight of roots exposed to cadmium and arsenic was more affected in cv. Bólyi 44 (reduction by 23,07% and 30,77% respectively) than in cv. Cordoba (reduction by 16,67%), we did not observe intervarietal differences in tolerance of tested soybean varieties to tested metal ions. Knowledge on impacts of metals 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, primary roots, germination

INTRODUCTION

Pollution by heavy metals is one of the key environmental problems in the world today. Secondly heavy metals get to the environment, especially by the mining and industrial processing of metal ores. Agricultural production contributes to significant increasing of their content in soil (Dich et al., 2005). High concentrations of heavy metals in plants induce changes in the physiological, morphological and biochemical level.

Soybean is one of the oldest cultivated crops, and even today is among the most important agricultural crops. It is also one of the most valuable leguminous plants due to the high content of protein, minerals and oil in the seeds. At the world level it occupies the largest cultivated area of all the leguminous plants and ranks among the so called strategic crops. However, it is relatively sensitive to heavy metals (Ferreira et al., 2002). Heavy metals induce changes in the anatomy of vegetative organs, wilting and necrosis of the leaves, limiting of the growth and development of plants. Furthermore they cause changes in enzyme activity, changes in photosynthetic activity, membrane damage and eventually death of plants. Some plant species have evolved mechanisms for controlling the intake, distribution and detoxification of heavy metals (Kochian, 1995). Although interspecific variability in plant tolerance to heavy metals has previously been demonstrated, there is still limited knowledge about the defense mechanisms which the variability between varieties of the species makes. Understanding the physiological and biochemical bases of these differences is important for breeding as well as bioengineering, as detailed knowledge of plant defense mechanisms against different metal ions allows for effective and specific use of natural tolerance of plant species in organic farming.

The goal of our experiments was to assess the impact of applied doses of cadmium and arsenic on the growth of soybean plants (*Glycine max* (L.) Merr. cvs. Bólyi 44 and Cordoba) in the early stages of individual development.

MATERIALS AND METHODS

Seeds of soybean (*Glycine max* L. (Merr.) cv. Bólyi 44 and cv. Cordoba) were surface-sterilized in 0,05% (v/v) sodium hypochlorite solution (SAVO) and allowed to germinate in the Petri dish (Ø 12 cm) in the dark at 25°C. When the roots reached a length of 5-8 mm, they were exposed to the ions of cadmium ($50 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ Cd}^{2+}$) and arsenic ($5 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ As}^{3+}$) in the form of $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ and As_2O_3 . Plants were incubated for 4 days, and in 24 hour intervals we scored their fresh weight. The tolerance of germinating plants to cadmium and arsenic ions was determined by Wilkins (1978). Weight was determined by digital analysis balance (Explorer Pro EP 114 CM). Tolerance of the plants was also evaluated on the basis of fresh and dry weight of primary roots at the end of the experiment (after 96 hours of incubation). For analysis, we subjected at least 50 plants in each variant in three independent biological repetitions of the experiment. The data were statistically analysed with Students t-test using the Microsoft Excel program.

RESULTS AND DISCUSSION

Changes in the growth dynamics of roots of plants are one of the primary indicators of sensitivity to various stress factors. Therefore, upon 48 h of incubation in the solutions with heavy metals we recorded the changes in

weight of control and stressed plants in case of both varieties (Fig. 1). We observed visual symptoms of toxicity included thickening and browning of roots. Similar symptoms of metals toxicity on germinating plants described also Belimo et al. (2003). On the toxic effects of metals on germinating plants of crops also pointed Liu et al. (2005) and Li et al. (2007).

Despite of presence of heavy metals, plants continued growing suggesting to existence of a functional tolerance and/or defense mechanisms involved in the early stages of growth under conditions of stress. The existence of such mechanisms have shown by several authors (Ferreira et al. 2002, Liu et al., 2005). Despite the changes in the growth of stressed plants of studied varieties during the experiment (Fig. 1) we did not detect any significant intervarietal differences in tolerance to metal ions (Tab. 1).

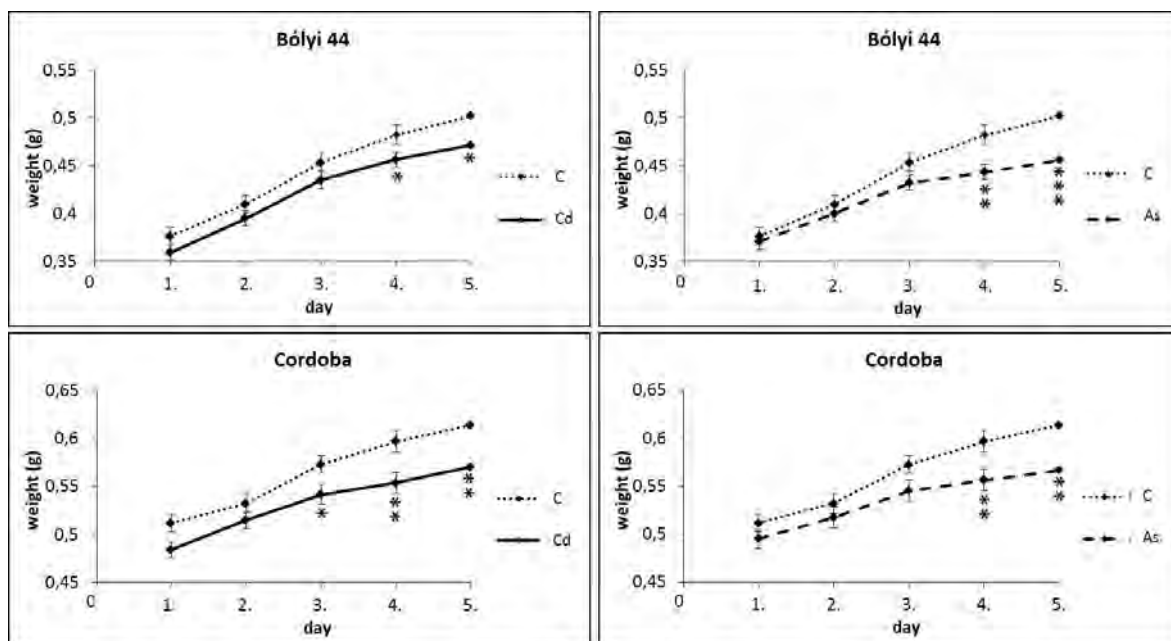


Figure 1: Growth dynamics of soybean plants germinated in solution of cadmium (50 mg.dm^{-3}) and arsenic (5 mg.dm^{-3}) or water (C – control sample). Values correspond to the arithmetic mean \pm standard error ($n > 50$). Levels of significance differences: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$. Heavy metal solutions were applied on the day 1.

Table 1: Tolerance indexes (%) determined on the basis of fresh weight of germinated soybean plants upon exposure to cadmium (50 mg.dm^{-3}) and arsenic (5 mg.dm^{-3}) ions. Heavy metal solutions were applied on the day 1.

	Bólyi 44					Cordoba				
	1. day	2. day	3. day	4. day	5. day	1. day	2. day	3. day	4. day	5. day
As 5	100	97,64	95,39	91,93	90,86	100	97,25	95,23	93,21	92,32
Cd 50	100	96,45	96,02	94,62	93,96	100	96,72	94,54	92,74	92,91

The tolerance of studied varieties to cadmium and arsenic we also evaluated on the basis of the changes in fresh and dry weight of roots measured after 96 hours of exposure to metal ions (day 5). We have recorded highly significant reduction of fresh weight and dry weight of primary roots exposed to both metals for both the studied soybean varieties. The applied dose of cadmium decreased the fresh weight of roots by 15,63% (cv. Bólyi 44) and by 20,54% (cv. Cordoba). For roots exposed to arsenic we recorded a decrease of fresh weight in the case of the cv. Bólyi 44 by 30,47%, and the cv. Cordoba by 30,00%.

Dry weight of roots exposed to cadmium and arsenic was more affected in cv. Bólyi 44 (reduction by 23,07% and 30,77% respectively) than in cv. Cordoba (reduction by 16,67%). Luan et al. (2008) also confirmed the inhibitory effect of arsenic on the growth of soybean and also assigned it as sensitive to arsenic. Despite these changes, however, we revealed no statistically significant intervarietal differences in heavy metal tolerance.

In contrast with our results, genotypic variability in response to legume plants has been described by several authors (Metwally et al., 2005; Golovatiuk et al., 2010). Comparing the results of different analysis is, however, rather difficult because the results depend not only on analysis of tested varieties, but also from the individual developmental stage of plants and the experimental conditions. Generally it can be concluded that the varieties in the early stages of germination showed a relatively high tolerance to tested metals, the dose of which were in our experiment higher than the average values in soils of Slovakia (Granec and Šurina, 1999). Nevertheless, the fairly rapidly emerging changes that occur in plants exposed to toxic effects of heavy metals for longer time should not be underestimated since can have negative impact on the overall productivity of plants.

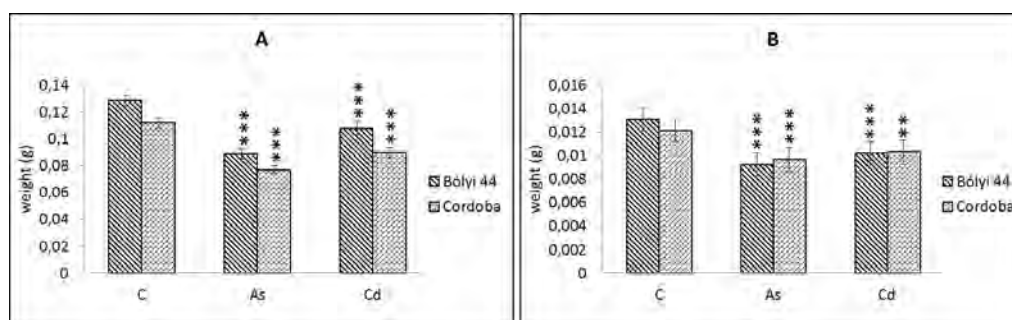


Figure 2: Fresh weight (A) and dry weight (B) of roots of germinated soybean plants of the chosen varieties on the day 5 upon exposure to cadmium ($50 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$) and arsenic ($5 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$) ions or water (C - control sample). Values correspond to the arithmetic mean \pm standard error ($n > 50$). Levels of significance differences: ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

CONCLUSION

The effects of cadmium and arsenic ions on the growth of germinating plants of two soybean varieties (*Glycine max* (L.) Merr. cv. Bolyi 44 and cv. Cordoba) were evaluated. The growth of the germinating plants was affected by both the tested metals, while inhibition was observed after 48 hours of metal application. We have observed no statistically significant intervarietal differences in soybean root responses to cadmium and arsenic ions. Other additional physiological, biochemical and molecular-biological analysis are needed to detect the possible mechanisms of tolerance of the studied soybean varieties against cadmium and arsenic ions.

Acknowledgment: This work was supported by VEGA 2/0062/11 and UGA VII/11/2011.

REFERENCES

- BELIMOV, A. A. – SAFRONOVA, V. I. – TSYGANOV, V. E. – BORISOV, A. Y. – KOZHEMYAKOV, A. P. – STEPANOK, V. V. – MARTENSON, A. M. – GIANINAZZI - PEARSON, V. – TIKHONOVICH, I. 2003. Genetic variability in tolerance to cadmium and accumulation of heavy metals in pea (*Pisum sativum* L.). In *Euphytica*, vol. 131, pp. 25 – 35.
- DICH, J. – ZAHM, S. H. – HANVERG, A. – ADAMI, H. O. 1997. Pesticides and cancer. In *Cancer Causes and Control*, vol. 8, pp. 420 – 443.
- FERREIRA, R. R. – FORNAZIER, R. F. – VITÓRIA, A. P. – LEA, P. J. – AZEVEDO, R. A. 2002. Changes in antioxidant enzyme activities in soybean under cadmium stress. In *Journal of plant nutrition*, vol. 25, no. 2., pp. 327-342.
- GOLOVATIUK, I., MÉSZÁROS, P., PIRŠELOVÁ, B., LIBANTOVÁ, J., MORAVČÍKOVÁ, J., MATUŠÍKOVÁ, I. 2010. Intraspecific variability of soybean (*Glycine max* L.) roots in response to heavy metals. The Proceedings of 15th International Conference on Heavy Metals in the Environment, Gdansk : University of Technology, 2010, pp. 334-337.
- GRANEC, M. – ŠURINA, B. 1999. Atlas pôd SR. Bratislava: Výskumný ústav pôdoznanectva a ochrany pôdy, 1999. 60 pp.
- KOCHIAN, L. V. 1995. Cellular mechanisms of aluminium toxicity and resistance in plants. In *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, vol. 46, p. 237-260.
- LI, CH. X. – FENG, S. L., SHAO, Y. – JIANG, L. N. – LU, X. Y. – HOU, X. L. 2007. Effects of arsenic on seed germination and physiological activities of wheat seedlings. In *Journal of Environmental Sciences*, vol. 19, pp. 725 – 732.
- LIU, X. – ZHANG, S. – SHAN, X. – ZHU, Y. G. 2005. Toxicity of arsenate and arsenite on germination, seedling growth and amylolytic activity of wheat. In *Chemosphere*, vol. 61, pp. 293 – 301.
- 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*, vol. 56, pp. 167 – 178.
- WILKINS, D. A. 1978. The measurement of tolerance to edaphic factors by means of root length. In *The New Phytologist*, vol. 80, pp. 623 – 633.

Adresy autorov:

Terézia DOBROVICZKÁ, Beáta PIRŠELOVÁ: Department of Botany and Genetics, Faculty of Natural Sciences, Constantine the Philosopher University in Nitra, Nábřežie mládeže 91, 949 74 Nitra, e-mail: terezia.dobroviczka@ukf.sk

Ildikó MATUŠÍKOVÁ: Institute of Plant Genetics and Biotechnology SAS, Akademická 2, P.O. Box 39A, 950 07 Nitra, e-mail: ildiko.matusikova@savba.sk

EXPRESSION OF GREEN FLUORESCENT PROTEIN (GFP) GENE IN MICROSPORES AND MICROSPORE-DERIVED EMBRYOS OF TRANSGENIC *BRASSICA NAPUS* (L.)

EXPRESIA ZELENÉHO FLUORESCENČNÉHO PROTEÍNOVÉHO (GFP) GÉNU V MIKROSPÓRACH A V EMBRYÁCH INDUKOVANÝCH Z MIKROSPÓR TRANSGÉNNEJ *BRASSICA NAPUS* (L.)

EWA DUBAS¹, JANA MORAVČÍKOVÁ², JANA LIBANTOVÁ², ILDIKÓ MATUŠÍKOVÁ², IWONA ŻUR¹,
ANNA MAKSYMOWICZ¹

¹ Institute of Plant Physiology, Polish Academy of Sciences, ² Institute of Plant Genetics and Biotechnology,
Slovak Academy of Sciences

Microspore suspension culture offers an excellent system for improvement of *Brassica* crops and study cell differentiation with focus on auxin as a main regulatory factor. In this work, microspores and haploid microspore-derived embryos (MDEs) of oilseed rape (*Brassica napus* L.) have been transformed with *Agrobacterium tumefaciens* carrying binary vector pDR5:GFP. The T-DNA region of the binary vector contained the *gfp* reporter gene under control of the auxin (DR5) promoter. Putative transgenic microspores were detected by GFP expression under fluorescence microscope. PCR analysis confirmed the integration and transmission of T-DNA into microspores and MDEs. Transformation of oilseed rape microspores and MDEs facilitates the obtaining of homozygote for the introduced gene.

Keywords: *Agrobacterium tumefaciens*, auxin sensitive promoter, *gfp* gene, microspores, microspore-derived embryos, oilseed rape

INTRODUCTION

The plant hormone auxin has been identified as a factor controlling major cell specific events in the process of embryo formation and differentiation (Möller and Weijers 2009; Hays et al. 2001). For many years, *A. thaliana* zygotic embryo development was used as the ideal model for studies of auxin action (Benkova et al. 2003, Friml et al. 2003, Sauer and Friml 2004, Weijers and Jürgens 2005). The limited number of experimental models came from difficulties in the access to the embryo inside maternal tissues. Moreover the youngest stages of embryogenesis suffered from external manipulation. Therefore, the role of auxin in the earliest stages of this process remained still not well elucidated. *Brassica napus* (L.) microspore embryogenesis in suspension gives us alternative model for deep studies of the role of auxin in successive stages of embryo development including the very early ones. Because of the similarity between developmental pathways of embryogenic microspore and fertilized egg cell (Dubas et al. 2011) and unlimited possibility of monitoring and external manipulations with plenty of embryos, microspore suspension could be used as a convenient system in genetic transformation (Jähne et al 1995). *Agrobacterium*-mediated transformation is a method for transient and stable integration of introduced marker genes into the microspore/pollen grain genome. To our knowledge, there is no report concerning the analysis of an endogenous auxin distribution in microspores induced to embryogenesis in the absence of any sporophytic tissue.

The aim of presented research is to localize places of endogenous auxin responsiveness at the cellular resolution, by visualizing the distribution of GFP in transformed microspores and MDEs of *B. 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. Donor plants were grown in the conditions described by Custers (2003).

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 per ml in NLN medium with 13% sucrose (NLN-13) medium (Lichter, 1982). Embryogenic cultures were obtained by applying 32±0.2°C heat stress for 24 hours followed by transfer to 25°C in darkness.

Microspore suspension cultures were continuously cultured in NLN-13 up to 7th or 21st day *post* isolation, when the agroinfiltration was started.

The microspore cultures were transformed using *A. tumefaciens* GV3101 carrying binary vector DR5:GFP (kindly provided by Dr. Dolf Weijers, Laboratory of Biochemistry, Wageningen University, Wageningen, The Netherlands). The construct pDR5:GUS consists of nine repeats of the auxin-response element (TGTCTC) fused in inverse orientation to the CaMV minimal 35S promoter and the nuclear localised 3xGFP (GIIK DR5rev-

SV40-3xGFP) (Weijers et al. 2006). 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-13 medium supplemented with 500 mg/l cefotaxime and the final culture of microspore suspension in NLN-13 was supplemented with 100 mg/l cefotaxime.

GFP expression analysis

The GFP expression was detected by the exposition of microspores and MDEs to the blue light (Ex 480/40nm /BA 510nm). GFP exhibits bright green fluorescence when a FITC excitation light was provided together with optimized filters.

PCR analysis

DNA was isolated from microspores and MDEs using the DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen). Internal PCR primers for detections of the *nptII* gene were P1 (5'-GAT GGA TTG CAC GCA GGT TCT-3') and P2 (5'-ATG GGT CAC GAC GAG ATC ATC-3'). The PCR reaction mixture of 25 µl contained isolated DNA as a template, 20 pmol of each primer, 0.2 mmol l⁻¹ dNTPs, 1 × PCR buffer, 2.5 mmol.l⁻¹ MgCl₂ and 1U FIREPol Taq DNA polymerase (Solid Biodyne, Estonia). The first PCR step 95°C for 4 minutes was followed by 35 cycles of 95°C for 45 seconds, 64°C for 45 seconds and 72°C for 90 seconds. The last step was performed at 72°C for 10 minutes.

RESULTS AND DISCUSSION

GFP fluorescence in microspores as well as in MDEs was analyzed 2-4 weeks after *Agrobacterium* inoculation. Cultured *in vitro* transformed microspores and androgenic MDEs of *Brassica napus* showed similar pattern of DR5 promoter activity as it was previously described in zygotic embryogenesis of *A. thaliana*. GFP signal has been detected in broad range of embryo developmental stages starting from the microspore/pollen grain to the cotyledon stage of embryo. Expression of GFP was visualized in many cell domains and tissues: suspensor-like structure cells, in the apex of globular embryo, in the hypophysis, in the apex of torpedo and cotyledons, in cotyledon provasculature and in the root pole as well.

Summarizing, it was demonstrated, that tested marker based on GFP reporter, which have been used in this study to analyze auxin distribution during embryo development, could be used for different types of physiological studies. Presented results show that *B. napus* isolated microspore system is suitable for genetic manipulation and provides a unique possibility to study auxin action during androgenic embryo development.

Acknowledgment: The research was supported by the IPP PAS - IPGB SAS bilateral project ("Molecular analysis of auxin distribution in oilseed androgenic embryos") and VEGA 2-0062-11.

LITERATURE

- BENKOVÁ E, MICHNIEWICZ M, SAUER M, TEICHMANN T, SEIFERTOVÁ D, JÜRGENS G, FRIML J. 2003. Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. *Cell* 115:591-602.
- 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
- DUBAS E, CUSTERS J, KIEFT H, WĘDZONY M, van LAMMEREN AAM. 2011. Microtubule configurations and nuclear DNA synthesis during initiation of suspensor-bearing embryos from *Brassica napus* cv. Topas microspores. *Plant Cell Rep*, doi: 10.1007/s00299-011-1117-8.
- FRIML J, VIETEN A, SAUER M, WEIJERS D, SCHWARZ H, HAMANN T, OFFRINGA R, JÜRGENS G. 2003. Efflux-dependent auxin gradients establish the apical-basal axis of *Arabidopsis*. *Nature* 426:147-153.
- HAYS D, MANDEL R, PHARIS R. 2001. Hormones in zygotic and microspore embryos of *Brassica napus*. *Plant Growth Regul* 35(1):47-58.
- JÄHNE A, BECKER D, LÖRZ H. 1995. Genetic engineering of cereal crop plants: a review. *Euphytica* 85:35-44.
- JOUSEN R, CORDEWENER J, VORST O, et al. 2007. *Plant Physiol* 144:155-172.
- LICHTER R. 1982. *Z Pflanzenphysiol* 105:427-433.
- MÖLLER B, WEIJERS D. 2009. Auxin Control of Embryo Patterning. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1:a001545.
- SAUER M, FRIML J. 2004. *In vitro* culture of *Arabidopsis* embryos within their ovules. *Plant J* 40, 835-843.
- WEIJERS D., SCHLERETH A., KIENZ M., JURGENS G. 2006. Auxin triggers transient, local signalling for cell specification in *Arabidopsis* embryogenesis. *Developmental Cell* 10, 265-270
- WEIJERS D, JÜRGENS G. 2005. Auxin and embryo axis formation: the ends in sight? *Curr Opin Plant Biol* 8(1):32-37.

Adresa autorov:

Ewa DUBAS, Iwona ŻUR, Anna MAKSYMOWICZ

Institute of Plant Physiology, Polish Academy of Sciences, Niezapominajek 21, 30-239 Krakow, Poland; dubas@ifr-pan.krakow.pl

Jana MORAVČIKOVÁ, Jana LIBANTOVÁ, Ildikó MATUŠÍKOVÁ

Institute of Plant Genetics and Biotechnology, Slovak Academy of Sciences, Akademická 2, P.O.B. 39a, 95 007 Nitra 1, Slovak Republic, jana.moravcikova@savba.sk

DYNAMIKA TVORBY BIOLOGICKY AKTÍVNYCH LÁTOK V DIVORASTÚCOM CHMELI OBYČAJNOM POČAS VEGETATÍVNEHO RASTU

FORMATION OF BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS IN WILD HOPS DURING VEGETATIVE GROWTH

JURAJ FARAGÓ¹, JANA ZMEŠKALOVÁ¹, NATÁLIA FARAGOVÁ², EVA ÜRGEOVÁ¹, IVANA
PŠENÁKOVÁ^{1,3}

¹Katedra biotechnológií, Fakulta prírodných vied, Univerzita sv. Cyrila a Metoda v Trnave, Námestie J. Herdu 2,
SK-917 01 Trnava, SR; email: juraj.farago@ucm.sk

²CVRV – VÚRV, Sekcia Biológia rastlín, Bratislavská cesta 122, SK-921 68 Piešťany, SR;

³Katedra botaniky a genetiky, Fakulta prírodných vied, Univerzita Konštantína Filozofa, Tr. A. Hlinku 1, SK-
949 74 Nitra, SR

Wild hops constitute a valuable source of genes for hop breeding as well as they may serve as sources of pharmacologically interesting or biocide compounds. In the present study we evaluated during the vegetative growth period the total polyphenol and flavonoid contents of hop extracts derived from leaves of wild grown plants from six different localities in western Slovakia, and tested their potential antimicrobial activity against selected phytopathogenic bacteria using a BiologTM microtitre plate method. Total polyphenol contents in leaf extracts ranged from 8.8 mg.g⁻¹ to 64.8 mg.g⁻¹ DM in the period of 2010 June to September. Flavonoid contents in extracts ranged from 0.05 mg.g⁻¹ to 0.20 mg.g⁻¹ DM. The BiologTM assay showed antimicrobial activities against GN bacteria *Rhizobium radiobacter* strain CCM 2928 and *Xanthomonas vesicatoria* strain CCM 2102, but not against the GP species *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* strain 1032.

Key words: wild hop, polyphenols, flavonoids, antimicrobial activity

ÚVOD

Chmeľ obyčajný (*Humulus lupulus* L.) je dvojdomá popínava trváca rastlina z čeľade konopovitých (*Cannabaceae*). V poľnohospodárskej výrobe sa pestujú iba samičie rastliny chmeľu, pretože ich kvetenstvá (nazývané šišťice alebo hlávky) obsahujú živice a esenciálne oleje dôležité z pivovarnického hľadiska. Alfa-horké kyseliny zo živíc sú zdrojom horkosti piva, zatiaľ čo esenciálne oleje poskytujú pivu arómu a chuť (RYBÁČEK a kol., 1999).

Divorastúci chmeľ je rozšírený v oblastiach Severného mierneho pásma od Japonska, Ázie a Európy až po Severnú Ameriku. Pre Európu je charakteristický a aj u nás rastie vo voľnej prírode chmeľ obyčajný európsky (*H. lupulus* var. *lupulus*). Je to trváca bylina, ktorá rastie prevažne vo vlhkých krovinách, na okrajoch lesov, v lužných lesoch, jelšínach, pozdĺž vodných tokov a v mokrych priekopách na hlinitých a dusíkatých pôdach prevlhčených spodnou vodou. Divorastúce rastliny chmeľu predstavujú dôležitý zdroj génov pre šľachtenie (NESVADBA a KROFTA, 2009) a sú aj potenciálnym zdrojom zaujímavých prírodných zlúčenín pre farmakologické ako aj iné netradičné využitia chmeľu (STEVENS a kol., 2000).

Viacere chemické komponenty chmeľu sú známe svojou antimikrobiálnou aktivitou. Okrem horkých kyselín zo šišťíc (Tillman a kol., 2011) k nim patria aj polyfenoly a flavonoidy (SHINADA a kol., 2007; CHOI a kol., 2011), ktoré sa vyskytujú ako v šišťiciach, tak aj v zelených častiach rastlín. Cieľom našej práce bolo stanoviť obsah celkových polyfenolov a flavonoidov v listových extraktoch vybraných divisorastúcich rastlín chmeľu pozberaných z rôznych lokalít západného Slovenska a otestovať možnosť stanovenia antimikrobiálnej aktivity týchto extraktov voči vybraným fytopatogénnym mikroorganizmom pomocou BiologTM mikroplatničkovej metódy.

MATERIÁL A METÓDY

Rastlinný a mikrobiologický materiál

V práci bolo použitých 6 genotypov divisorastúceho chmeľu obyčajného (*H. lupulus* L.) pozberaného v r. 2010 zo 6 rôznych lokalít západného Slovenska: lokalita 1 – Bernolákovo extravilán, lokalita 2 – Bernolákovo Čierna voda, lokalita 3 – Leopoldov extravilán, lokalita 4 – Piešťany Váh, lokalita 5 – Piešťany intravilán, 6 – Svätý Jur – extravilán. Listové vzorky z rastlín voľne rastúcich v prírode boli odobrané v 4 termínoch, zodpovedajúcich štyrom vývinovým štádiám rastlín: tvorba bočných výhonkov (jún), začiatok butonizácie (júl), začiatok tvorby kvetenstiev (august) a štádium zrelých šišťíc (september).

Metanolové extrakty z vysušených listov boli pripravené postupom podľa PŠENÁKOVÁ a kol. (2010).

Na testovanie vplyvu chmeľových extraktov na fytopatogénne mikroorganizmy boli použité gram-negatívne baktérie *Rhizobium radiobacter* kmeň CCM 2928, *Xanthomonas vesicatoria* kmeň CCM 2102 a gram-positívna baktéria *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* kmeň 1032. Všetky použité baktérie boli zo zbierky fytopatogénnych a referenčných mikroorganizmov CPPB Výskumného ústavu rastlinnej výroby v Prahe – Ruzyně (ČR).

Stanovenie polyfenolov

Obsah celkových polyfenolov v metanolvých extraktoch z listov divorastúceho chmeľu bol stanovený modifikovaným postupom podľa SINGLETONA a ROSSIHO (1965) a vyjadrený ako ekvivalent kyseliny gálovej na 1g suchej hmoty (DM) listov.

Stanovenie flavonoidov

Obsah celkových flavonoidov v metanolvých extraktoch z listov divorastúceho chmeľu bol stanovený modifikovaným postupom podľa RAKOTOARISONA a kol. (1997) a vyjadrený ako ekvivalent kvercetínu na 1g suchej hmoty rastlinného materiálu.

Stanovenie antimikrobiálnej aktivity

Na vyjadrenie antimikrobiálnej aktivity extraktov z listov divorastúceho chmeľu bol otestovaný nový postup použitím mikrotitračných platničiek GP a GN systému BiologTM (Biolog, Inc., Hayward, USA). Do komôrok GP a GN mikroplatničiek obsahujúcich rôzne zdroje uhlíka boli napipetované 10^{-2} a 10^{-3} riedenia metanolvých extraktov chmeľu, pridaná suspenzia 10^8 buniek testovaného mikroorganizmu a mikroplatničky boli inkubované 96 h v termostate pri 28°C. V 24 h intervaloch bol stanovovaný počet utilizovaných substrátov (parameter CMD) a priemerná absorbanca v komôrkach pri OD = 590 nm (parameter AMR) (KASSEM a kol., 2008). Antimikrobiálna aktivita chmeľových extraktov bola odhadovaná podľa stupňa poklesu oboch parametrov (CMD a AMR) voči dvom kontrolám (bez prídavku extraktu a s prídavkom iba metanolu).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Obsahy celkových polyfenolov v listových vzorkách 6 genotypov divorastúceho chmeľu obyčajného z rôznych lokalít západného Slovenska počas ich vegetačného vývoja (od júna do septembra 2010) (obr. 1A) sa pohybovali od 8,8 mg.g⁻¹ (lokalita 1, júl) do 64,8 mg.g⁻¹ DM (lokalita 3, august). Koefficienty variácie pre obsah polyfenolov boli najvyššie v júli (CV = 44,5%) a v auguste (CV = 37,0%) a najnižšie v júni (CV = 16,6%) a septembri (18,6%). ŪRGEOVÁ a POLÍVKA (2009) publikovali obsahy celkových polyfenolov v listoch 6 komerčných odrôd z poľnej kolekcie génových zdrojov chmeľu v CVRV Piešťany v rozmedzí 3,0 – 14,3 mg.g⁻¹ DM, keď vzorky boli z júna a septembra 2008. Podľa ČEH a kol. (2007) najvyššie obsahy polyfenolov v listoch komerčných odrôd chmeľu sú v období júl až august. Pri divorastúcom chmeli naše výsledky takýto trend nepotvrdili.

Obsahy celkových flavonoidov v listových vzorkách 6 genotypov divorastúceho chmeľu z vybraných lokalít západného Slovenska v období od júna do septembra 2010 (obr. 1B) sa pohybovali od 0,05 mg.g⁻¹ (lokalita 5, júl) do 0,20 mg.g⁻¹ DM (lokalita 1, júl), čo sú hodnoty nižšie než zistili ŪRGEOVÁ a POLÍVKA (2009) pri 6 komerčných odrodách chmeľu počas vegetačnej periódy v r. 2008 (0,10 – 6,37 mg.g⁻¹ DM). Koefficienty variácie pre obsah flavonoidov boli, podobne ako pri obsahu polyfenolov, najvyššie v júli (CV = 58,5%) a v auguste (CV = 23,7%) a najnižšie v júni (CV = 14,9%) a septembri (3,9%).

Extrakt z listov divorastúceho chmeľu v riedení 10^{-2} a 10^{-3} pôsobil inhibične na oba testované GN baktérie (Obr. 2), s výnimkou extraktov z lokalít 2 a 3 na bunky *R. radiobacter*, a z lokality 4 na *X. versicatoria*. Vhodnejšie na zachytenie účinkov látok obsiahnutých v extraktoch chmeľu na testované GN mikroorganizmy bolo riedenie 10^{-2} . Testovanie účinkov chmeľových extraktov z listov divorastúcich rastlín na GP baktériu *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* pomocou BiologTM systému nepotvrdilo antimikrobiálnu aktivitu voči tomuto GP mikroorganizmu.

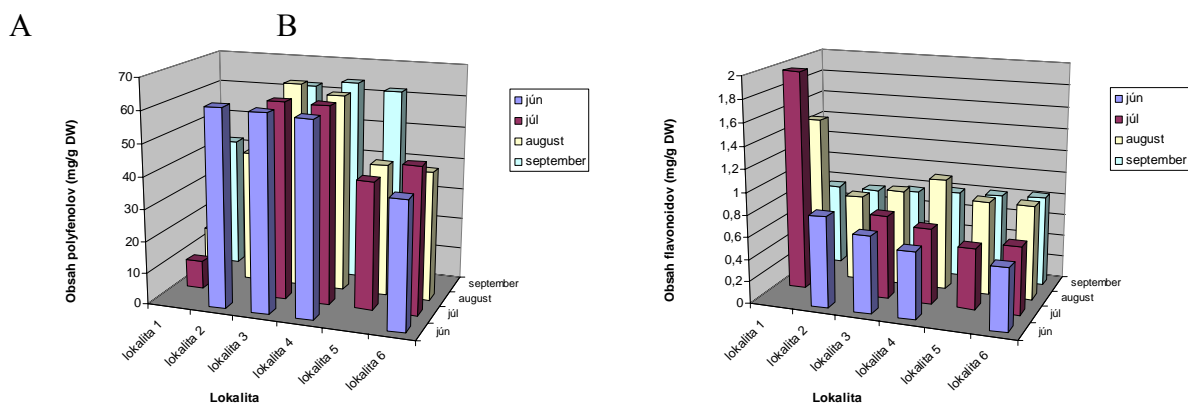
ZÁVER

Stanovenie obsahov celkových polyfenolov a flavonoidov v listových extraktoch 6 genotypov divorastúceho chmeľu obyčajného z rôznych lokalít západného Slovenska naznačujú vyšší obsah celkových polyfenolov než bolo stanovené v listoch komerčných odrôd chmeľu z porovnateľného obdobia vegetačného rastu, ale nižší obsah celkových flavonoidov. Variabilita v obsahu týchto biologicky aktívnych látok pri divorastúcom chmeli bola vyššia v období najaktívnejšieho rastu rastlín (júl, august), než v období na začiatku (jún) a na konci (september) vegetačnej periódy. Systémom BiologTM bola stanovená antimikrobiálna aktivita chmeľových extraktov voči GN fytopatogénnym mikroorganizmom *R. radiobacter* a *X. versicatoria*, ale nie GP baktérii *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*.

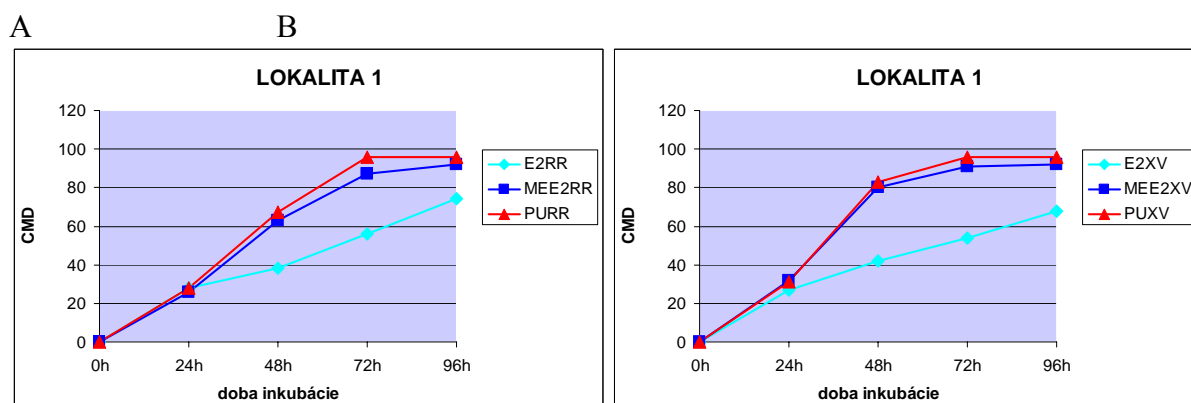
LITERATÚRA

- ČEH, B., KAČ, M., KOŠIR, I.J., ABRAM, V.: Relationships between xanthohumol and polyphenol content in hop leaves and hop cones with regard to water supply and cultivar. *Int. J. Mol. Sci.*, 8, 2007, s. 989-1000.
- KASSEM I.I., JOSHI P., SIGLER V., HECKATHORN S., WANG Q.: Effect of elevated CO₂ and drought on soil microbial communities associated with *Andropogon gerardii*. *J. Integr. Plant Biol.*, 50, 2008, s. 1406-1415.
- NESVADBA, V.; KROFTA, K.: Variability in the contents of important compounds for pharmaceutical and brewing industries within hop gene pool. *Agriculture*, 55, 2009, s. 10-16.
- PŠENÁKOVÁ, I., HETEŠOVÁ, L., NEMEČEK, P., FARAGÓ, J., KRAIC, J.: Genotype and seasonal variation in antioxidant activity of hop extracts. *Agriculture*, 56, 2010, s. 106-113.

- RAKOTOARISON, D., GRESSIER, B., TROTIN, F., BRUNET, C., DINE, T., LUYCKX, M., VASSEUR, J., CAZIN, M., CAZIN, J.C., PINKAS, M.: Antioxidant activities of polyphenolic extracts from flowers, *in vitro* callus and cell suspension cultures of *Crataegus monogyna*. *Pharmazie*, 52, 1997, s. 60–63.
- RYBÁČEK, V. a kol.: Chmelařství. Státní zemědělské nakladatelství Praha, 1980, 426 s., ISBN: 07-068-80.
- SHINADA, K.; TAGASHIRA, M.; WATANABE, H.; SOPAPORNAMORN, P.; KANAYAMA, A.; KANDA, T.; IKEDA, M.; KAWAGUCHI, Y.: Hop bract polyphenols reduced three-day dental plaque regrowth. *J. Dental Res.*, 86, 2007, s. 848–851.
- SINGLETON, V.L., ROSSI, J.A.: Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enology & Viticult.*, 16, 1965, s. 144–158.
- STEVENS, J.; 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. *Phytochemistry*, 53, 2000, s. 759–775.
- ÜRGEOVÁ, E.; POLÍVKA, L.: Secondary metabolites with antibacterial effects from leaves of different hop cultivars during vegetal periods. *Nova Biotechnologica*, 9(3), 2009, pp. 327–332.
- TILLMAN, G.E.; HAAS, G.J.; WISE, M.G.; OAKLEY, B.; SMITH, M.A.; SIRAGUSA, G.R.: Chicken intestine microbiota following the administration of lupulone, a hop-based antimicrobial. *FEMS Microbiol Ecol.*, 77, 2011, s. 395–403.
- CHOI, Y.; JERMIHOV, K.; NAM, S.J.; STURDY, M.; MALONEY, K.; QIU, X.; CHADWICK, L.R.; MAIN, M.; CHEN, S.N.; MESECAR, A.D.; FARNSWORTH, N.R.; PAULI, G.F.; FENICAL, W.; PEZZUTO, J.M.; VAN BREEMEN, R.R.: Screening natural products for inhibitors of quinone reductase-2 using ultrafiltration LC-MS. *Anal. Chem.*, 83, 2011, s. 1048–1052



Obrázok 1: Obsah celkových polyfenolov (A) a flavonoidov (B) v listových extraktoch divorastúceho chmeľu obyčajného zo 6 rôznych lokalít západného Slovenska v 4 termínoch odberu vzoriek počas vegetačného obdobia. Legenda: lokalita 1 – Bernolákovo extraviľán, lokalita 2 – Bernolákovo Čierna voda, lokalita 3 – Leopoldov extraviľán, lokalita 4 – Piešťany Váh, lokalita 5 – Piešťany intraviľán, 6 – Svätý Jur – extraviľán.



Obrázok 2: Vplyv listových extraktov divorastúceho chmeľu z lokality 1 (Bernolákovo, extraviľán) na profil využitia C-substrátov (CMD) mikroorganizmami *Rhizobium rhizogenes* CCM2928 (A) a *Xanthomonas vesicatoria* CCM2102 (B). Legenda: E2RR - použité riedenie chmeľového extraktu 10^{-2} (E2) a testovaný mikroorganizmus *R. rhizogenes* (RR); E2XV - použité riedenie chmeľového extraktu 10^{-2} (E2) a testovaný mikroorganizmus *Xanthomonas vesicatoria* (XV); MEE2RR – použité riedenie metanolu 10^{-2} (MEE2) a testovaný mikroorganizmus *R. rhizogenes* (RR); MEE2XV – použité riedenie metanolu 10^{-2} (MEE2) a testovaný mikroorganizmus *X. vesicatoria* (XV); PURR – použitý pufor (PU) a testovaný mikroorganizmus *R. rhizogenes* (RR); PUXV – použitý pufor (PU) a testovaný mikroorganizmus *X. vesicatoria* (XV).

RNDr. Juraj Faragó, CSc, Katedra biotechnológií, Fakulta prírodných vied, Univerzita sv. Cyrila a Metoda v Trnave, Námestie J. Herdu 2, SK-917 01Trnava, SR; e-mail: juraj.farago@ucm.sk, Ing. Natália Faragová, PhD, CVRV – VÚRV, Sekcia Biológia rastlín, Bratislavská cesta 122, SK-921 68 Piešťany, SR; e-mail: faragova@vurv.sk, Ing. Eva Ťurgeová, PhD, Katedra biotechnológií, Fakulta prírodných vied, Univerzita sv. Cyrila a Metoda v Trnave, Námestie J. Herdu 2, SK-917 01Trnava, SR; e-mail: eva.urgeova@ucm.sk, Ing. Ivana Pšenáková, Katedra biotechnológií, Fakulta prírodných vied, Univerzita sv. Cyrila a Metoda v Trnave, Námestie J. Herdu 2, SK-917 01Trnava, SR; e-mail: ivana.psenakova@ucm.sk

DYNAMIKA VÝVOJA METABOLICKEJ DIVERZITY A RESPIRAČNEJ AKTIVITY BAKTERÁLNYCH SPOLOČENSTIEV V RIZOSFÉRE TRANSGÉNEJ BT-KUKURICE

METABOLIC DIVERSITY AND RESPIRATION ACTIVITY DEVELOPMENT OF BACTERIAL COMMUNITIES IN THE RHIZOSPHERE OF TRANSGENIC BT-MAIZE

NATÁLIA FARAGOVÁ¹, JURAJ FARAGÓ², PETER MIHALČÍK¹

¹Plant Production Research Center Piešťany

²Univerzita sv. Cyrila a Metóda v Trnave

We evaluated the development of metabolic diversity and respiration activities of microbial communities in the rhizosphere of two genetically modified hybrids of maize (DKC 4627YG, DKC 3946YG) containing a *Bt*-gene conferring resistance to European corn borer, in comparison to the non-modified counterpart (DKC 3511). The transgenic as well as non-transgenic maize hybrids were grown in field conditions at the Research station Borovce of RIPP Piešťany. For microbiological analyses using the GN- and GP-microtitre plates of BiologTM system, soil samples from the rhizosphere and bulk soil were collected in three time-points: before sowing, in spring (development of the 8th leaf stage), and in autumn (full maturity stage). The growing of maize plants increased metabolic diversity and respiration activities of soil microorganisms in spring compared to the pre-sowing level by 25% and 83%, respectively, in *Bt*-maize. The average respiration activity of bacteria in rhizosphere samples of transgenic *Bt*-maize exceeded those of nontransgenic genotype by 10%. At full maturity stage, decrease of both, metabolic diversity and respiration activity of microbial communities were recorded. In transgenic plants, both the parameters decreased below the pre-sowing level, contrary to non-transgenic plants, where the decrease of both parameters were less prominent.

Key words: *Bt*-maize, metabolic diversity, microbial community, respiration activity, rhizosphere

ÚVOD

Zvyšovanie požiadaviek na úrodový potenciál a znižovanie nákladov na chemickú ochranu pred škodcami viedlo k vývoju geneticky modifikovanej kukurice sietej s rezistenciou proti vijačke 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 insekticidmi je tak užitočný hmyz uchránený (ICOZ a STOTZKY, 2008).

Rastliny kukurice s inkorporovaným génom, menej napadnuté vijačkou 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). Pre zabezpečenie ekonomického a agronomického úspechu pestovania týchto geneticky modifikovaných plodín je však potrebné posúdiť riziká, ktoré môžu predstavovať pre ľudské zdravie a životné prostredie (LEE a kol., 2011; LILLEY a kol., 2006; HEINK a kol., 2010; SANVIDO a kol., 2006). Ekologická stabilita geneticky modifikovaných plodín môže závisieť od dynamiky vzťahov rastlín s mikrobiálnymi spoločenstvami v pôde. Rastliny prejavujú silný vplyv na podzemné mikrobiálne spoločenstvá exudáciou organických zlúčenín, odumieraním koreňov (SMALLA a kol., 2001) a pravdepodobne aj inými mechanizmami (VIEBAHN a kol., 2005).

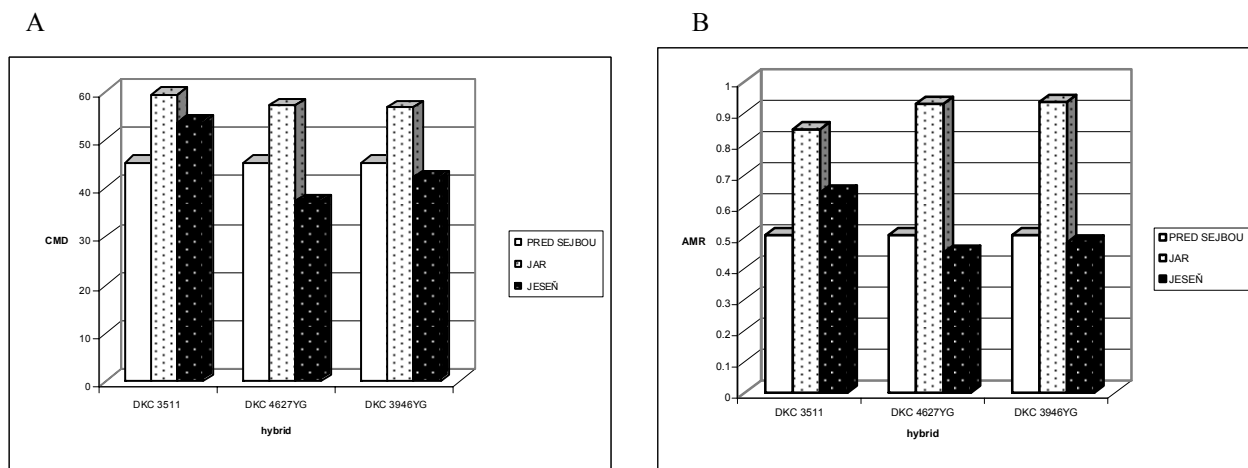
MATERIÁL A METÓDY

V experimente sme využili geneticky modifikované hybridy kukurice MON 810 (DKC 4627YG, DKC 3946YG), s vneseným *Bt*-génom proti vijačke kukuričnej, produkujúcimi proteín *Cry1Ab*, ktorý sa prirodzene vyskytuje v pôdnej baktérii *Bacillus thuringiensis* a kontrolný nemodifikovaný hybrid kukurice (DKC 3511). Transgénne i netransgénne hybridy kukurice sietej sa pestovali na pozemkoch Výskumnej stanice Borovce. Pôdne vzorky z okolia koreňov a rizosféry sa odoberali v troch termínoch (1. predsejbový termín – pred výsevom kukurice z pestovateľskej pôdy; 2. jarný termín - v čase nasadenia ôsmich listov; jesenný termín - v čase plnej zrelosti). Pôdne vzorky sa spracovávali mikrobiologickými postupmi podľa IKEDA a kol. (2006). Po homogenizácii a preosiatí pôdnych vzoriek cez 2 mm sito bola časť vzorky vysušená za účelom stanovenia sušiny a časť pripravená na biochemické 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 do GN (pre gramnegatívne baktérie) a GP (pre grampozitívne baktérie) mikroplatničiek obsahujúcich 95 rozličných zdrojov C (BiologTM, Inc., USA). Po inkubácii v biologickom termostate sa v 24-hodinových intervaloch stanovovala metabolická diverzita mikrobiálnych spoločenstiev (CMD) a priemerná respiračná aktivita C-zdrojov mikrobiálnych spoločenstiev (AMR).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Pri hodnotení metabolickej diverzity (CMD) a respiračnej aktivity (AMR) mikrobiálnych spoločenstiev v pôdnych vzorkách geneticky modifikovaných a nemodifikovaných rastlín kukurice siatej boli pri jarom i jesennom termíne odberu zaznamenané štatisticky významné rozdiely medzi jednotlivými hybridmi (DKC 3511, DKC 4627YG, DKC 3946YG), typom pôdnych vzoriek (rizosféra a okolitá pôda) a použitou mikroplatničkou (GP, GN) BiologTM systému ($p < 0,01$; $p < 0,001$).

Pestovaním transgénnych rastlín *Bt*-kukurice sa zvýšila metabolická diverzita mikrobiálnych spoločenstiev o 25 % v porovnaní s predsejbovým rozborom. Najvyššou metabolickou diverzitou mikrobiálnych spoločenstiev sa pri oboch termínoch odberu vyznačovali pôdne vzorky pochádzajúce z okolia koreňov netransgénneho hybridu DKC 3511, ktoré prevýšili oba transgénne hybridy *Bt*-kukurice o 4 až 5 %. Metabolická diverzita mikroorganizmov v rizosfére bola vyššia pri oboch termínoch odberu v porovnaní s metabolickou diverzitou pôdnej bioty v okolitej pôde. Vo všeobecnosti bol v rizosférych vzorkách odoberaných v jesennom termíne zaznamenaný pokles metabolickej diverzity o 20 % v porovnaní so vzorkami odoberanými na jar. Podobne bol medzi týmito dvoma termínmi odberu zaznamenaný pri jesennom odbere aj pokles diverzity grampozitívnych baktérií o 45 % a gramnegatívnych baktérií o 20 %. Dynamika vývoja metabolickej diverzity bakteriálnych spoločenstiev v rizosfére geneticky modifikovaných hybridov *Bt*-kukurice MON 810 (DKC 4627YG, DKC 3946YG) a kontrolného nemodifikovaného hybridu kukurice (DKC 3511) je naznačená na obrázku 1A. Z obrázku 1A je zrejmé, že pestovanie transgénnych hybridov kukurice DKC 4627YG a DKC 3946YG, na rozdiel od netransgénneho hybridu, spôsobilo pokles metabolickej diverzity pod úroveň predsejbovej diverzity.



Obrázok 1: Dynamika vývoja metabolickej diverzity (CMD) (A) a priemernej respiračnej aktivity (AMR) (B) bakteriálnych spoločenstiev v rizosfére transgénnych (DKC 4627YG, DKC 3946YG) a netransgénnych (DKC 3511) hybridov kukurice siatej podľa rôznych termínov odberu.

Priemerná respiračná aktivita baktérií, odvodených zo vzoriek transgénnych hybridov *Bt*-kukurice DKC 4627YG a DKC 3946YG, pri jarom termíne odberu, prevýšila netransgénny hybrid o 10 %. Zvýšenie respirácie baktérií pochádzajúcich z pôdnych vzoriek netransgénneho hybridu DKC 3511 oproti transgénnym hybridom bolo zaznamenané pri jesennom termíne odberu. Pestovaním transgénnych rastlín *Bt*-kukurice sa zvýšila priemerná respiračná aktivita pôdnych mikroorganizmov o 83 % v porovnaní s predsejbovým rozborom. Pestovanie geneticky nemodifikovaných hybridov kukurice DKC 3511 zvýšilo respiračnú aktivitu mikrobiálnej komunity o 67 % v porovnaní s rozborom pôdy vykonaným pred výsevom rastlín. Preukazne významné rozdiely ($p < 0,001$) boli sledované aj pri respiračnej aktivite medzi gramnegatívnymi a grampozitívnymi baktériami. Pri všetkých rizosférych i nerizosférych vzorkách pochádzajúcich či už z transgénnych alebo netransgénnych rastlín kukurice siatej boli namerané vyššie hodnoty oboch znakov pri jarom aj jesennom termíne odberu v prospech gramnegatívnych baktérií. V jesennom termíne odberu sme zaznamenali pokles priemernej využitia C-zdrojov od 32 (DKC 3511) do 105 (DKC 4627YG) % oproti jarnému termínu. Na obrázku 1B môžeme vidieť podobný pokles jesennej respiračnej aktivity pod úroveň predsejbovej využitia, spôsobený pestovaním transgénnych hybridov kukurice, ako to bolo pozorované pri mikrobiálnej metabolickej diverzite.

Kolektív autorov CORTET a kol. (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.

Diverzita a aktivita bakteriálnych spoločenstiev sa mení aj počas vývoja rastliny (HOULDEN a kol., 2008). Navyše, v mnohých prípadoch rozdiely medzi rizosférymi mikrobiálnymi spoločenstvami spojenými s transgénymi a parentálnymi netransgénymi rastlinami sa ukázali byť dočasné a závislé na prítomnosti živých rastlín (DUNFIELD a GERMIDA, 2003). Tieto tvrdenia sú v súlade s výsledkami BONADEI a kol. (2010), podľa ktorých vplyvy na mikroorganizmy obývajúce pôdy s pestovanými geneticky modifikovanými rastlinami sú vo všeobecnosti prechodné a spojené so špecifickými rastovými štádiami rastlín.

ZÁVER

Pestovanie transgénnych rastlín *Bt*-kukurice zvýšilo metabolickú diverzitu pôdnych mikroorganizmov o 25 a ich respiračnú aktivitu o 83 % v porovnaní s predsejbovým rozborom pôdy.

Najvyššou metabolickou diverzitou mikrobiálnych spoločenstiev sa pri oboch termínoch odberu (jarný aj jesenný) vyznačovali vzorky pochádzajúce z okolia koreňov netransgénneho hybridu DKC 3511, ktoré prevýšili oba transgénne hybridy *Bt*-kukurice o 4 až 5 %.

Naopak, v jarnom termíne odberu vzoriek, priemerná respiračná aktivita baktérií odvodených zo vzoriek transgénnych hybridov *Bt*-kukurice DKC 4627YG a DKC 3946YG prevýšila netransgénny hybrid o 10 %.

Pestovanie transgénnych hybridov kukurice DKC 4627YG a DKC 3946YG, na rozdiel od netransgénneho hybridu, spôsobilo pokles metabolickej diverzity a respiračnej aktivity bakteriálnych spoločenstiev pod úroveň predsejbovej diverzity.

LITERATÚRA

- BONADEI, M. – CALVIO, C. – CARBONERA, D. – GALIZZI, A. – QUATTRINI, E. – BALESTRAZZI, A. 2010. Spore-forming bacteria in soil cultivated with GM white poplars: Isolation and characterization. In: *Folia Microbiologica*, 55, 2010, s. 39-46.
- CORTED, J. – GRIFFITHS, B.S. – BOHANEK, 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.
- DUNFIELD, K.E. – GERMIDA, J.J. 2003. Seasonal changes in the rhizosphere microbial communities associated with field-grown genetically modified canola (*Brassica napus*). In: *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 2003, s. 7310-7318.
- HEINK, U. – BARTZ, R. – KOWARIK, I. 2010. How useful are the concepts of familiarity, biological integrity, and ecosystem health for evaluating damages by GM crops? In: *Journal of Agricultural and Environmental Ethics. Early View*, 2010. DOI10.1007/s10806-010-9289-8.
- HOULDEN, A. – TIMMS-WILSON, T.M. – DAY, M.J. – BAILEY, M.J. 2008. Influence of plant development stage on microbial community structure and activity in the rhizosphere of three field crops. In: *FEMS Microbiology Ecology*, 65, 2008, s. 193-201.
- 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.
- JAMES, C. 2009. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2009. ISAAA Brief 41-2009: Executive Summary. URL: <http://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/41/executivesummary/pdf>, 23.4.2010
- LEE, S.H. – KIM, C.G. – KANG, H. 2011. Temporal dynamics of bacterial and fungal communities in a generally modified (GM) rice ecosystem. In: *Microbial Ecology*, 61, 2011, s. 660-668.
- LILLEY, A.K. – BAILEY, M.J. – CARTWRIGHT, C. – TURNER, S.L. – HIRSCH, P.R. 2006. Life in earth: The impact of GM plants on soil ecology? In: *Trends in Biotechnology*, 24, 2006, s. 9-14.
- SANVIDO, O. – Widmer, F. – Winzeler, M. – Bigler, F.: A framework for the design of general surveillance of genetically modified crops based on a concept for environmental post-market monitoring. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*, 1, 2006, s. 5-10.
- SMALLA, K. – WIELAND, G. – BUCHNER, A. – ZOCK, A. – PARZY, J. – KAISER, S. – ROSKOT, N. HEUER, H. – BERG, G. 2001. Bulk and rhizosphere soil bacterial communities studied by denaturing gradient gel electrophoresis: plant-dependent enrichment and seasonal shifts revealed. In: *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 2001, s. 4742-4751.
- VIEBAHN, M. – VEENMAN, C. – WERNARS, K. – VAN LOON, L.C. – SMIT, E. – BAKKER, P.A. 2005. Assessment of differences in ascomycete communities in the rhizosphere of field-grown wheat and potato. In: *FEMS Microbiology Ecology*, 53, 2005, s. 245-253.

Adresy autorov: ¹CVRV – VÚRV, Sekcia Biológia rastlín, Bratislavská cesta 122, 921 68 Piešťany, Kontaktná adresa: ¹Ing. Natália Faragová, e-mail: faragova@vurv.sk; ²Katedra biotechnológií, Fakulta prírodných vied, Univerzita sv. Cyrila a Metóda v Tnave, Námestie J. Herdu 2, 917 01 Tnava

AKTUÁLNE ŠĽACHTENIE RUMANČEKA KAMILKOVÉHO (*MATRICARIA RECUTITA* L.) NA PREŠOVskej UNIVERZITE V PREŠOVE

CURRENT BREEDING OF GERMAN CHAMOMILE (*MATRICARIA RECUTITA* L.) IN UNIVERSITY OF PREŠOV IN PREŠOV

JOZEF FEJÉR¹, IVAN ŠALAMON², DANIELA GRUĽOVÁ¹, TALEB AL-SHAMMARI¹

¹Katedra ekológie, Fakulta humanitných a prírodných vied, Prešovská univerzita v Prešove, 17. Novembra 1, 081 16 Prešov, Slovenská republika, fejer@unipo.sk

²Centrum excelentnosti ekológie živočíchov a človeka, Prešovská univerzita v Prešove, 17. Novembra 1, 081 16 Prešov, Slovenská republika, salamon@fhpv-unipo.sk

Prešov University in Prešov, Slovakia has experimental fields where the research and breeding of medicinal and spice plants are carried out. *Matricaria recutita* L. cultivated and selected on this field representate the plant material with a high content of γ -bisabolol and low content of bisabololoxide as components of essential oil. The content of γ -bisabolol is significantly higher than showed available resources of scientific literature. Comparison of morphological characteristics have been presented differences in order to the variety of Bona, which is registered in Slovakia. The valuable commercial properties (high content of γ -bisabolol, low content of bisabololoxide, distinctness, uniformity and stability) are a supposition for registration of this material as a new variety.

Key words: breeding, selection, *Matricaria recutita*, γ -bisabolol, bisabololoxide

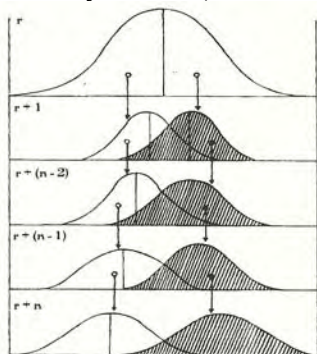
ÚVOD

Rumanček kamilkový (*Matricaria recutita* L.) patrí k jedným z najrozšírenejších a najvýznamnejších druhov čeľade astrovitých (*Asteraceae*) (Šalamon 1992). Rumančekový čaj pripravený z jeho kvetných úborov sa tradične využíva v ľudovom liečiteľstve. Existuje viacero odrôd rumančeka alebo iných rastlín, s ktorými si môžeme ten pravý pomýliť. Rumanček kamilkový (*Matricaria recutita* L.) sa dá rozpoznať podľa vypuklej a dutej strednej časti kvetu s lupienkami smerujúcimi mierne nadol. Je považovaný za všeliek a vďaka obsahu silíc pôsobí sťahujúco, protizápalovo a dezinfekčne (Golparvar a kol. 2011). Bolo identifikovaných približne 120 zložiek prítomných v sekundárnych metabolitoch rumančeka vrátane 28 terpenoidov, 36 flavonoidov a 52 ďalších látok, ktoré preukázali farmakologické účinky (Mann a Staba 1992; Golparvar a kol. 2011). Najdôležitejšie komponenty éterického oleja extrahovaného z kvetných úborov sú terpenoidy γ -bisabolol a jeho oxidy a azulény vrátane chamazulénu. V stredoveku ho dokonca šľachtili na odrody so zdvojeným kvetom. V súčasnosti sa veľmi ľahko rozmnožuje semenami.

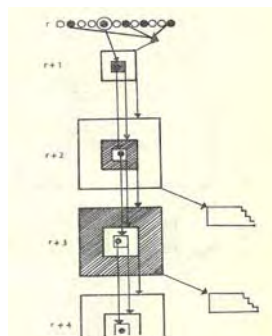
Na Školskom pozemku Prešovskej univerzity v Prešove dlhodobo prebieha výskum a šľachtenie rôznych druhov liečivých, aromatických a koreninových rastlín. Jednou z nich je aj rumanček kamilkový (*Matricaria recutita* L.). Šľachtiteľská práca pri tomto druhu bola zameraná na vytvorenie novej diploidnej odrody rumančeka s vysokým obsahom γ -bisabololu a nízkym obsahom bisabololoxidov A a B, pri súčasne vysokej úrode kvetných úborov.

MATERIÁL A METÓDY

Východiskový materiál pre šľachtiteľskú prácu bol vyselektovaný z diploidnej odrody BONA. Pre dosiahnutie stanovených cieľov - vysoký obsah γ -bisabololu a nížky obsah bisabololoxidov A a B, boli zvolené konvenčné metódy - individuálny výber a skúšanie potomstiev rastlín s najlepšimi požadovanými vlastnosťami metódou strednej hriadky (obr. 1 a 2). Na základe laboratórnych testov sa vybrali najvhodnejšie rastliny pre zvolený smer šľachtienia na testovanie v poľných podmienkach. Pokusy sa vyhodnotili na základe úrodnosti, obsahu silice a v nej γ -bisabololu a bisabololoxidov A a B z rastlín – potomstiev vyselektovaných individuálnych rastlín (kmeňových matiek).



Obr. 1 Rozklad populácie cudzoopelivých rastlín na rodiny



Obr. 2 Schéma metódy strednej hriadky

Na pokusných rastlinách sa uskutočnili hodnotenia morfológických znakov na posúdenie odlišnosti, vyrovnanosti a stálosti, ktorá je podmienkou registrácie novej odrody. Znaky boli posudzované podľa testovacej príručky UPOV TG 152/4. Zber kvetných úborov sa konal vo fáze plného kvitnutia. Kvetné úbory sa zbierali ručne z celej parcelky. Nasledovalo ich váženie a sušenie. Z vysušených kvetov sa odoberali vzorky na analýzu obsahových látok. Podobne sa postupovalo pri druhom zbere, ktorý sa uskutočnil 16 dní po prvom. Z každého variantu boli založené množenia s plochou 2 m² za účelom získania osiva.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

V dôsledku zvyšujúcej sa požiadavky farmaceutického a kozmetického priemyslu je dôležité zabezpečiť dostatočné množstvo žiadaných druhov liečivých rastlín v potrebnej kvalite. Štúdie diverzity genetických zdrojov predstavujú základný a nevyhnutný krok v programe šľachtienia rumančeka kamilkového (*Matricaria recutita* L.). Určenie požadovaných vlastností a ich vzťah k produkcii a zloženiu éterického oleja je dôležité pri šľachtení rumančeka (Golparvar a kol. 2011).

Pri hodnotení novošľachtenca s porovnanou odrodou Bona sa okrem morfológických znakov (Tab. 1) pozornosť sústredila najmä na obsahové látky prítomné v éterickom oleji rumančeka (Tab. 2). Obsah silice bol u kandidátskej odrody ako aj kontrolnej v priemere dvoch rokov rovnaký v množstve 0,67 %. U obidvoch dosahoval rozsah uvádzaný v literatúre ako optimálny od 0,2 – 1,9 % (Bradley 1992, Mann a Staba 1992). Chamazulen, α -bisabolol, bisabolol oxid A a B a farnezen sú najdôležitejšie zložky éterického oleja (Pirzad a kol. 2006; Gosztola a kol.2006). Kandidátska odroda dosiahla v roku 2011 pri jednom pokusnom variante najvyššiu hodnotu α -bisabololu až 61,2 %, kým porovnávací odrody Bona len 41,1 %. Obsah bisabolooxidov (A aj B) bol zas výrazne nižší u novošľachtenca (v priemere do 3,0 %) v porovnaní s odrodou Bona (v priemere 8,3 a 12,3 %). Obsahy chamazulenu a farnezeny boli v oboch odrodách porovnateľné.

Tabuľka 1: Hodnotenie morfológických znakov novošľachtenca a porovnávací odrody podľa testovacej príručky UPOV TG/152/4

Číslo znaku	Hodnotený znak	Stupeň prejavu	
		Bona	PO-MATRI_REC-1
5.	Stonka: antokyánové sfarbenie	Stredné 5	Slabé 3
7.	List: intenzita zelenej farby	Stredná 2	Svetlá 1
12.	Kvetný úbor – obsah α -bisabololu	Vysoký 3 38 - 40 %	Vysoký 3 50 – 55%

Poznámka: Znaky boli hodnotené podľa testovacej príručky UPOV TG/152/4. Znak 12. Kvetný úbor – obsah α -bisabololu v éterickom oleji je pri porovnávací odrode Bona a kandidátskej odrode hodnotený stupňom prejavu 3 – vysoký. Podľa testovacej príručky je pre tento znak pri stupni prejavu vysoký stanovená hodnota obsahu α -bisabololu v éterickom oleji nad 30 %. Obsah tejto významnej zložky rumančekovej silice bol v priebehu testovania pri odrode Bona zistený v rozmedzí 38 – 40 %. Pri kandidátskej odrode PO-MATRI_REC-1 bola nameraná hodnota v rozsahu 50 – 55 %.

ZÁVER

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.

Na základe výsledkov doterajších experimentov a po celkovom morfológickom zhodnotení pokusného rastlinného materiálu rumančeka kamilkového (*Matricaria recutita* L.) bola vypracovaná technická dokumentácia potrebná pre prihlásenie novej odrody do registračného konania, ktorá je pri tomto rastlinnom druhu dobrovoľná. Na základe výsledkov chemických analýz, úrody kvetných úborov a morfológických hodnotení boli vybrané najlepšie kmene, ktoré tvoria základ osiva pre registračné konanie, ďalšie množenie a udržiavacie šľachtienie.

Tabuľka 2: Priemerný obsah komponentov éterického oleja v % v novošľachtenci a porovnávací odrode Bona v roku 2010 a 2011 stanovené analýzou GC/FID, GC/MS

Obsahové zložky éterického oleja	r. 2011				r. 2010			
	Bona		PO-MATRI_REC-1		Bona		PO-MATRI_REC-1	
	GC/FID	GC/MS	GC/FID	GC/MS	GC/FID	GC/MS	GC/FID	GC/MS
α -bisabolol	42,2	40,0	52,3	52,2	38	40	53,5	58,5
chamazulen	23,5	17,0	19,1	18,9	17	13	19	17
bisabolooxid – A	6,1	7,6	1,7	1,7	14	17	3,5	3,5
bisabolooxid – B	10,1	12,0	1,9	2,1	6,5	7,5	3,5	4,5
cis - spiroeter	7,3	12,0	10,8	15,0	8,5	11	9,5	11
farnesen	1,9	1,7	5,9	4,9	2,5	4,5	2,5	2,5

PRÍLOHY



Obrázok 3: pokusy rumančeka – jeseň 2010



Obrázok 4: Pokusy rumančeka, začiatok kvitnutia (2011)

Podakovanie: 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

- GOLPARVARI, A.R. – PIRBALOUTI, A.G. – KARIMI M. 2011. Determination of the effective traits on essence percent and dry flower yield in German chamomile (*Matricaria recutita* L.) populations. *Journal of Medicinal Plants Research*, vol. 5, 2011, no.14, ISSN 1996-0875, pp. 3242-3246,
- GOSZTOLA, B.- NÉMETH, É.- SÁROSI, SZ.- SZABÓ, K.- KOZAK, A. 2006. Comparative evaluation of chamomile (*Matricaria recutita* L.) populations from different origin. *International Journal of Horticultural Science*, vol.12, 2006, no. 1, ISSN 1585-0404, pp. 91–95
- MANN, C.- STABA, E.J. 1992. Chemistry, pharmacology and commercial formulations of Chamomile. In: Craker, L.E. – Simon J.E.: *Herbs, Spices and Medicinal plants. Recent advances in Botany, Horticulture and Pharmacology*. New York, USA: Food Product Press, 1992, pp. 235 – 280
- PIRZAD, A. – ALYARI, H. – SHAKIBA, M.R.-ZEHTAB-SALMASI, S. – MOHAMMADI, A. 2006. Essential oil content and composition of German chamomile (*Matricaria recutita* L.) at different Irrigation Regimes. *Journal of Agronomy*, vol.3, 2006, no. 5, pp. 451- 455
- ŠALAMON, I. 1992. Production of Chamomile, *Chamomilla recutita* (L.) Rauschert, in Slovakia. In *Journal of Herbs and Spices and Medicinal Plants*, vol. 1, 1992, pp. 37 – 45.

Adresy autorov:

- Ing. Jozef Fejér PhD. - Katedra ekológie, Fakulta humanitných a prírodných vied, Prešovská univerzita v Prešove, 17. Novembra 1, 081 16 Prešov, Slovenská republika, fejer@unipo.sk
- Doc. RNDr.Ivan Šalamon CSc. - Centrum excelentnosti ekológie živočíchov a človeka, Prešovská univerzita v Prešove, 17. Novembra 1, 081 16 Prešov, Slovenská republika, salamon@fhpv-unipo.sk
- Mgr. Daniela Grul'ová - Katedra ekológie, Fakulta humanitných a prírodných vied, Prešovská univerzita v Prešove, 17. Novembra 1, 081 16 Prešov, Slovenská republika, dgrulova@gmail.com
- Ing. Taleb Al-Shammari - Katedra ekológie, Fakulta humanitných a prírodných vied, Prešovská univerzita v Prešove, 17. Novembra 1, 081 16 Prešov, Slovenská republika.

ÚČINKY BRASSINOSTEROIDOV NA TOXICITU MEDI U VYBRANÝCH KULTIVAROV SLNEČNICE ROČNEJ

EFFECTS OF BRASSINOSTEROIDS ON COPPER TOXICITY OF SUNFLOWER CULTIVARS SELECTED

ANGELIKA FILOVÁ¹, OKSANA SYTAR², JANA FERENCOVÁ¹,
VLASTA HUDECOVÁ¹

Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre

The goal of experiment was screening of 6 cultivars sunflower plants (*Helianthus annuus* L. Cv. Belinda, cv. Codiwer, cv. ESPrim, cv. MAS 95, cv. MAS 97 and cv. Spirov) on copper toxicity with the possibility of elimination by brassinosteroids. Lipid peroxidation is a biochemical marker for the free radical mediated injury. Character of changes in lipid peroxidation (LP) depends on intensity of influence stressor and from plant sensitivity. In leaves of experimental plants cultivars MAS 97 and SPIROV after Cu treatment by concentration 5 mM the level of malondialdehyde (MDA) content has been increased on 11% and 30% respectively. The higher MDA content has been observed in leaves of cultivar ESPrim. In the other experimental variants under Cu treatment content of MDA was on control level which evidence about more less sensitivity these cultivars to Cu treatment. The combination of Cu+ BRs has been shown MDA content in leaves of all experimental plants on control level which can evidence about protection effect of BRs under Cu treatment on the leaves of experimental cultivars of sunflower plants.

Key words: copper, brassinosteroids, *Helianthus annuus* L., chlorophylls, carotenoids, MDA

ÚVOD

Rastliny sú v priebehu svojho života vystavené pôsobeniu mnohých stresových faktorov biotickej a abiotickej povahy (napr. ťažké kovy), ktoré môžu nielen spomaľovať ich životné funkcie, ale takisto poškodzovať jednotlivé orgány a v krajnom prípade viesť k uhynutiu rastlín. Pôsobenie stresových faktorov môže vyvolať u rastlín oxidatívny stres, charakteristický prudkou prechodnou tvorbou veľkého množstva aktívnych foriem kyslíka (AFK) a k porušeniu rovnováhy medzi produkciou a odbúraním AFK. Malondialdehyd (MDA) je produkt oxidačného poškodenia lipidov a je najlepšie preskúmaný marker oxidačného stresu.

Meď je aktivátorom enzýmov, ktoré sa zúčastňujú na metabolizme N a syntéze bielkovín. Pri nedostatku medi sa zvyšuje v bunkách obsah voľných dusíkatých látok na úkor tvorby bielkovín. Preto najmä pri intenzívnom hnojení dusikom je nevyhnutné, aby rastlina mala dostatok medi. Najvyššia zásoba medi je v chloroplastoch, v ktorých pôsobí ako stabilizátor chlorofylu. Nedostatok medi spôsobuje narušenie procesu fotosyntézy a dochádza k obmedzeniu intenzity rastu. Napriek fyziologickej dôležitosti medi, na druhej strane sa nadmerné množstvo tohto prvku v pôde stáva stresovým faktorom pre rastliny. Toxicita medi voči rastlinám je skutočne preukázateľná. Hoci mnohé aspekty toxického účinku medi na rastliny sú objasnené, výsledky niektorých fyziologických a biochemických analýz sú kontroverzné. Zmeny v procesoch fotosyntézy a vodného režimu ovplyvnené účinkom medi u rastlín z čeľade *Asteraceae* sa napríklad výrazne odlišujú [1], [3]. Vysokú variabilitu v klíčení semien napr. zaznamenali aj u rôznych hybridov slnečnice. Veľká variabilita v reakcii rastlín na ťažké kovy prináša stále nové otázky, ktorých riešenie môže zohrávať dôležitú úlohu z hľadiska zachovania čistoty životného prostredia a zdravia človeka. Slnečnica vďaka veľkej biomase je vhodnou rastlinou na dekontamináciu pôd (fytoremediáciu), nakoľko akumuluje značnú časť ťažkých kovov v koreňoch.

Brassinosteroidy (BRs) sú steroidné fytohormóny so širokým spektrom účinkov. Pri vystavení rastlín stresu suchom ako aj ťažkým kovom zlepšujú ich prežitie a zvyšujú odolnosť, a tým aj výnos. Odpoveď rastlín regulujú priamo (syntézou metabolitov) alebo nepriamo (indukciou antioxidantných zlúčenín a enzýmov), často v interakcii s inými fytohormónami. Experimenty študujúce vplyv brassinosteroidov na reakciu rastlín stresovaných napr. vodným deficitom a toxicitou ťažkými kovmi sa líšia v rôznych parametroch. Ich správna interpretácia je preto zložitá. Vďaka lepšiemu pochopeniu mechanizmov ich pôsobenia, môžeme objaviť nové možnosti pre ich využitie v poľnohospodárskych biotechnológiách. Zároveň by malo pokračovať skúmanie iných aspektov, ako sú príjem, transport a stabilita BRs, rovnako ako vývoj analógov BRs s vysokou aktivitou. Len so znalosťou unikátnych mechanizmov odolnosti rastlín na stres a s predpovedateľnými účinkami v poľných podmienkach, bude možné v praxi využívať plný potenciál BRs. Vo väčšine štúdií demonštrujúcich antistresové účinky BRs sa používa exogénne ošetrovanie. Exogénna aplikácia BRs je v súčasnosti bežnou poľnou metódou v Japonsku, Číne, Rusku a Bielorusku [2].

Cieľom našich experimentov bolo posúdiť citlivosť vybranej kultivarov slnečnice voči iónom medi s možnosťou eliminácie pomocou brassinosteroidov na základe fyziologických charakteristík (obsah sušiny, množstvo asimilačných pigmentov ako aj MDA) a poukázať na možné mechanizmy rezistencie tejto rastliny na ióny medi.

MATERIÁL A METÓDY

Pre našu prácu sme použili 6 hybridov slnečnice ročnej (*Helianthus annuus* L.): Belinda (FRA), Codiwer (FRA), ESPrim (FRA), MAS 95 (SVK), MAS 97 (HUN) a Spirov (BUL), ktoré nám poskytla firma FINAGRO spol. s.r.o. Bratislava. Sterilizované semená sme nechali napučiať 24 hodín v destilovanej vode a následne nakličovali na Petriho miskách (Ø 15 cm) s navlhčeným filtračným papierom v tme. Po 3 – 4 dňoch nakličovania sme približne rovnako naklíčené semená zasiali do 15 l plastových nádob so zmesou rašeliny a perlitu (v pomere 4:1), zaliatej destilovanou vodou, ktorá zodpovedala maximálnej sorpčnej kapacite pôdy (~1000 ml). Rastliny sme nechali rásť do štádia začiatku butonizácie – hviezdičky (32 deň). Následne sme ich zaliali destilovanou vodou (rastliny kontrolného variantu) alebo roztokmi obohatené o meď o koncentrácii 80 µM CuSO₄ ·5H₂O a posledný variant bola zvolená kombinácia Cu +BRs (80 µM CuSO₄ ·5H₂O + 100 µM BRs). Zálievky v ďalších štádiách pokusu už neobsahovali kov a ani brasinosteroidy. Aplikovali sme podľa potreby iba destilovanú vodu, ktorej množstvo zodpovedalo polovičnej dávke maximálnej sorpčnej kapacity substrátu (500 ml). Po 10 dňoch sme výhonky oddelili od koreňov, korene očistili od pôdy a dôkladne premyli vodou. Následne sme odmerali ich dĺžku, čerstvú a suchú hmotnosť. Obsah chlorofylov a karotenoidov sme stanovili podľa Lichtenthaler a Wellburn [7] a prepočítali na 1 g listov. Pokus sme uskutočnili v troch opakovaniach. Získané údaje sme analyzovali matematicko-štatistickými metódami pomocou programu MS Excel. Signifikantnosť rozdielov pri porovnávaní súborov sme stanovili Studentovým testom.

Analýza peroxidácie lipidov

Malondialdehyd (MDA) bol meraný spektrofotometricky reakciou s kyselinou tiobarbiturovou. Rastlinný materiál (korene 500mg a listy 200mg) sme homogenizovali v 3 ml 0.1 M trichlóroctovej kyseliny (TCA). Zmes bola zahriata na teplotu 95 °C po dobu 30 min a následne centrifugovaná pri 10,000 × g za 5 min. Množstvo MDA sme určili podľa Heath a Packer [6] pri vlnovej dĺžke 532 nm a konverzii pomocou molárneho extinkčného koeficientu 155 m.M⁻¹.cm⁻¹.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Testované kultivary slnečnice ročnej vykazovali na základe testovaných parametrov, akými sú dĺžka a hmotnosť výhonkov a čerstvá hmotnosť koreňov, pomerne vysokú mieru tolerancie. Napriek tomu, že žiadne výrazné vizuálne symptómy toxického účinku kovu neboli zreteľne viditeľné, detekovali sme zníženie obsahu sušiny v koreňoch (o 25 až 39 % menej v porovnaní s kontrolou pri dvoch testovaných kultivároch ošetrovaných Cu cv. MAS 97 a cv. SPIROV). Z hľadiska posúdenia morfológických parametrov jednotlivých kultivarov sa javia ako najviac odolné, resp. tolerantné voči toxicite Cu cv. Belinda, cv. Codiwer a cv. MAS 95.

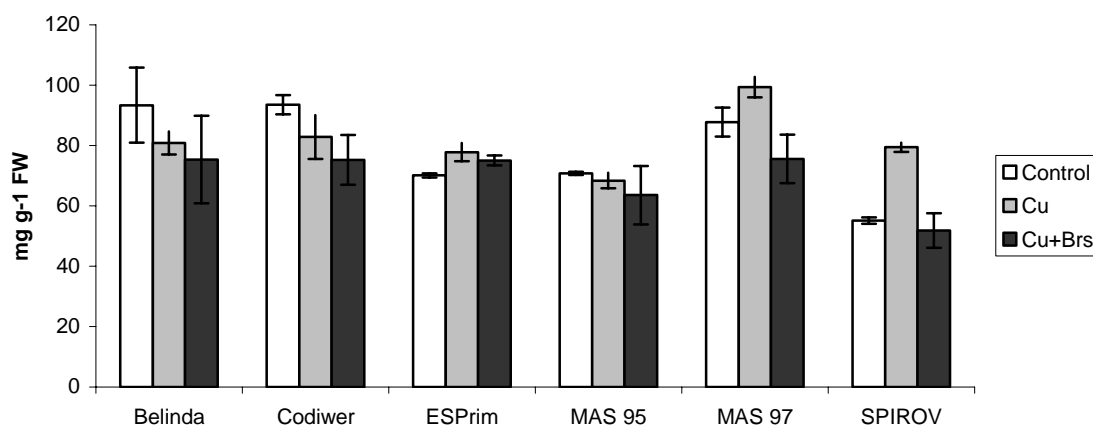
Ošetrovanie BRs plne kompenzovalo redukciu biomasy, zapríčinenú toxicitou Cu. Zaznamenali sme zlepšenie rastu koreňa u ošetrovaných rastlín, v porovnaní s neošetrovanými rastlinami (kontrola a Cu stres). Yu et al. [8] a ZHANG et al. [10] pozorovali, že aplikácia BRs zlepšila asimiláciu uhlíku a dusíku stabilizáciou membránových štruktúr v stresových podmienkach, a tým aj celkový rast a fotosyntézu rastlín.

Najcitlivejšie reagoval na dávky medzi fotosyntetický aparát cv. MAS 97, cv. SPIROV a cv. ESPrim, čo sa prejavilo redukcii obsahu najmä chlorofylu a (o 41%), chlorofylu b (o 22%) a karotenoidov (o 29 %). Negatívny dopad na efektivitu fotosyntetického aparátu je jedným z typických znakov účinku mnohých abiotických stresov ako sucho, vysoká teplota, a taktiež ťažké kovy.

Brasinosteroidy indukujú zlepšenie účinnosti fotosyntézy, ktoré môže byť spôsobené stomatálnymi alebo nestomatálnymi faktormi, alebo ich kombináciou. Vplyv BRs na vodivosť prieduchov zaznamenali napríklad Hayat et al. [5] a Fariduddin et al. [4]. Nestomatálne limitácie účinnosti fotosyntézy môžu súvisieť s fotosyntetickými pigmentmi, koncentráciou a aktivitou enzýmu ribulóza-1,5-bisfosfát-karboxyláza/oxygenáza (RuBisCO) a využitím asimilačných produktov. Yuan et al. [9] považujú za prijateľné vysvetlenie, že exogénna aplikácia BRs zvyšuje kapacitu asimilácie oxidu uhličitého v Calvinovom cykle prostredníctvom zvýšenia počiatkovej aktivity RuBisCO. V ďalších experimentoch ošetrovanie BRs zmiernilo znižovanie obsahu chlorofylu a asimilačnej rýchlosti, zvýšilo efektivitu fotosystému II a aktivitu enzýmov ako RuBisCO, nitrátreduktáza a glutamín syntáza [10]. Karotenoidy sú pigmenty chrániace chlorofyly pred foto-oxidačným poškodením. Ich obsah klesá so stúpajúcou úrovňou oxidačného stresu zapríčinenou toxicitou Cu u všetkých kultivarov slnečnice ročnej a je výrazne vyšší v rastlinách ošetrovaných BRs, v porovnaní s kontrolnými.

Na základe meraní hladiny MDA je pravdepodobné, že BRs napomáhajú efektívnemu vychytávaniu ROS zvýšením aktivity systému antioxidantných enzýmov. Tvorba MDA a iných aldehydov v rastlinách vystavených toxickému stresu meďou, je spoľahlivým indikátorom vzniku voľných radikálov v pletivách rastlín a v súčasnosti slúži ako indikátor peroxidácie lipidov a zároveň miery poškodenia stresom ako sú ťažké kovy na bunecnej úrovni [2]. Kultivary odolné toxicite medi sú schopné vychytávať voľné radikály a so znižujúcim sa obsahom peroxidu vodíka, je produkované menej MDA, v porovnaní s citlivými kultivarmi [5]. Na základe získaných údajov môžeme tvrdiť, že medzi citlivé kultivary slnečnice patria MAS 97, SPIROV a ESPrim, ktoré produkovali zvýšené množstvo MDA (o 11 až 30% v porovnaní s kontrolou).

Na druhej strane medzi tolerantné kultivare slnečnice voči toxicite Cu patria Belinda, Codiwer a MAS 95. Uvedené kultivary produkovali nižší podiel MDA v porovnaní s kontrolným variantom.



Obrázok 1: Obsah MDA v listoch slnečnice ročnej v podmienkach stresu Cu a ošetrené brassinosteroidmi
Figure 1. MDA content in sunflower leaves under effect of Cu stress and of Brassinosteroids treatment

Kombináciou Cu + BRs sme zaznamenali znížený obsah MDA v listoch všetkých kultivaroch slnečnice ročnej, čo naznačuje možnú elimináciu toxicity medi u rastlín slnečnice použitím exogénnej aplikácie brassinosteroidmi.

ZÁVER

Mnohé aspekty toxického účinku medi na rastliny sú objasnené, výsledky niektorých fyziologických a biochemických analýz sú však kontroverzné. Zároveň vysoká variabilita reakcií rastlín na ióny ťažkých kovov v závislosti od genotypu komplikuje jednoznačnosť záverov. Hlbšie biochemické a molekulárno-biologické analýzy môžu prispieť k odhaleniu ďalších možných mechanizmov odolnosti slnečnice ročnej voči iónom medi popr. iných ťažkých kovov. Široké spektrum účinkov BRs, na rastliny stresované ťažkými kovmi, podnecuje pátrať po mechanizmoch a súvislostiach, ktoré vyvracajú staré koncepty a motivujú vývoj nových metód.

LITERATÚRA

- [1] BAJGUZ, A.- HAYAT, S. 2009. Effects of brassinosteroids on the plant responses to environmental stresses. *Plant Physiology and Biochemistry* 47: 1-8
- [2] BEHNAMNIA, M.- KALANTARI K.M.- REZANEJAD, F. 2009. Exogenous application of brassinosteroid alleviates drought-induced oxidative stress in *Lycopersicon esculentum*. *General and Applied Plant Physiology* 35(1-2): 22-34
- [3] DIVI, U.K.- KRISHNA, P. 2009. Brassinosteroid: a biotechnological target for enhancing crop yield and stress tolerance. *New Biotechnology* 26: 131-136
- [4] FARIDUDDIN, Q.- YUSUF, M.- HAYAT, S.- AHMAD, A. 2009. Effect of 28-homobrassinolide on antioxidant capacity and photosynthesis in *Brassica napus* plants exposed to different levels of copper. *Environmental and Experimental Botany* 66: 418-424
- [5] HAYAT, S.- AHMAD, A.- MOBIN, M.- HUSSAIN, A.- FARIDUDDIN, Q. 2000. Photosynthetic rate, growth and yield of mustard plants sprayed with 28-homobrassinolide. *Photosynthetica* 38: 469-471
- [6] HEATH RL -PACKER L. 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives in Biochemistry and Biophysics* 125, 189-198
- [7] LICHTENTHALER, H. K - WELLBURN, A. R. 1983. Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. In *Biochem Soc Trans*, roč. 11, 1983, s. 591-592.
- [8] YU, J.Q.-HUANG, L.F.- HU, W.H.- ZHOU, Y.H.- MAO, W.H.- YE, S.F.- NOGUES, S. 2004. A role of brassinosteroid in regulation of photosynthesis in *Cucumis sativus*. *Journal of Experimental Botany* 55: 135-143
- [9] YUAN, G.F.- JIA, CH.J.- ZHEN, L.- SUN, B.- ZHANG, L.P.- LIU, N.- WANG, Q.M. 2010. Effect of brassinosteroids on drought resistance and abscisic acid concentration in tomato under water stress. *Scientia Horticulturae* 126: 103-108
- [10] ZHANG, M.- ZHAI, Z.- TIAN, X.- DUAN, L.- LI, Z. 2008. Brassinolide alleviated the adverse effect of water deficit on photosynthesis and the antioxidant of soybean (*Glycine max* L.). *Plant Growth Regulation* 56: 257-264

Adresa autorov

¹Ing. 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

VLIV FLT NA RŮST A VÝVOJ ROSTLIN HRACHU A OKUREK

EFFECT OF FLUORANTHENE ON GROWTH AND DEVELOPMENT OF PEA AND CUCUMBER PLANTS

HELENA FIŠEROVÁ¹, MAREK KLEMŠ¹, HELENA VÍTKOVÁ¹, LADISLAV HAVEL¹, ŠTĚPÁN ZEŽULKA², MARIE KUMMEROVÁ², JAN TRÍŠKA³, RUDOLF JÍLEK³

¹Department of Plant Biology, Faculty of Agronomy, Mendel University, Zemědělská 1, 613 00 Brno

²Department of Plant Physiology and Anatomy, Institute of Experimental Biology, Faculty of Science, Masaryk University, Kotlářská 2, 611 37 Brno

³Laboratory of Metabolomics and Isotopic Analysis, Global Change Research Centre AS CR, Branišovská 31, 370 05 České Budějovice

Pea (*Pisum sativum* L.) and cucumber (*Cucumis sativus* L.) plants were cultivated with a supplement of fluoranthene. During their growth and development, the following parameters were monitored: production of stress factors, i.e. ethylene, carbon dioxide and abscisic acid, quantum yields of photosynthesis, and yield-forming components. Contents of FLT in fruit and seeds were estimated as well. It was found out that stress markers reflected the response of pea and cucumber plants to the presence of FLT in a different manner and that FLT showed a negative effect on yield-forming components under study. Cucumbers accumulated up to hundred times more FLT than pea seeds.

Key words: ethylene, abscisic acid, quantum yield of photosynthesis, yield-forming components

ÚVOD

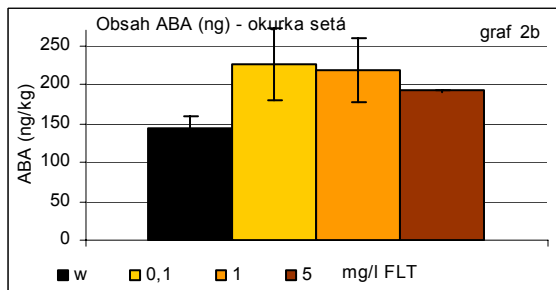
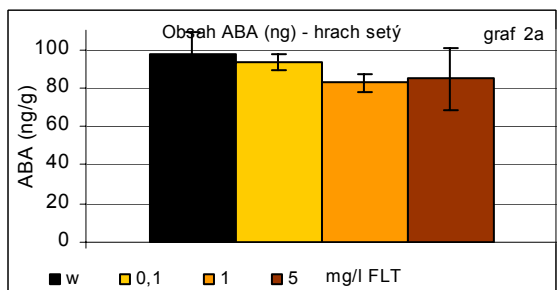
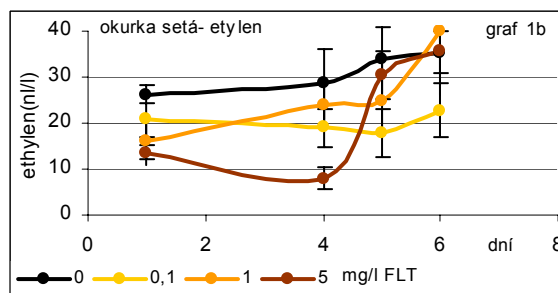
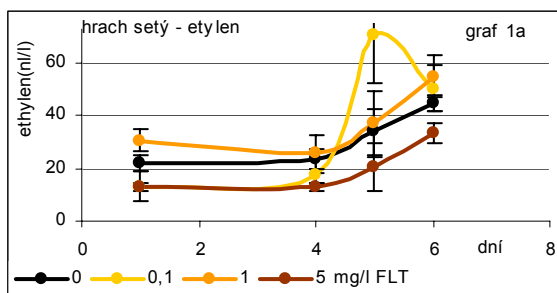
Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU, PAHs) jsou toxické látky znečišťující životní prostředí, které se dostávají do lidského organismu jak respiračním příjmem ze znečištěného ovzduší (PHILIPS, 2003), tak požitím kontaminovaných potravin (COCCO *et al.*, 2007) a vody. Fytotoxické účinky PAHs a jejich další transport v rostlině lze sledovat kořenovým příjmem rostlinou (WEISMAN *et al.*, 2010, KUMMEROVÁ *et al.*, 2010, ZHANG *et al.*, 2010), nebo příjmem plynných PAHs listy v atmosféricky kontrolovaných podmínkách (WILD *et al.*, 2006, DESALMEA *et al.*, 2011). Dopad kontaminace půd PAU na klíčivost a růst klíčnicích rostlin může být jedním z faktorů přirozené selekce a dokonce i rostlinné evoluce. Zvýšené zatížení PAU může být rozhodujícím faktorem pro budoucí rozmanitost rostlinných druhů v prostředí a může se i podílet na výši ekonomického výnosu plodin (KUMMEROVÁ, SLOVÁK, HOLOUBEK, 1997). Cílem naší práce bylo stanovit, jak PAU - fluoranten - ovlivňuje růst a vývoj rostlin hrachu setého a okurky seté z hlediska navozeného stresu a snížení výnosotvorných prvků, a jak se kumulují v plodech a semenech rostlin.

MATERIÁL A METODIKA

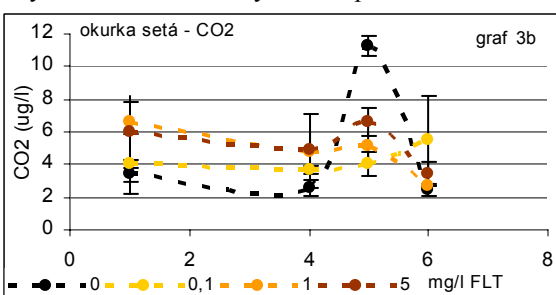
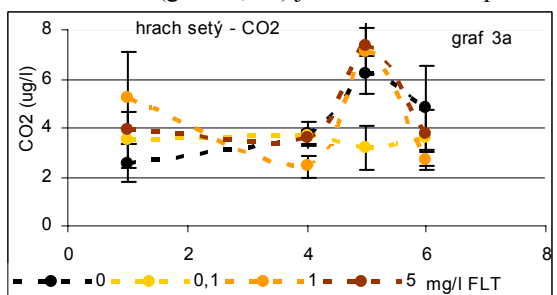
Semena hrachu odrůdy Zekon a okurek odrůdy Othello F1 byla umístěna do matrací z čedičové plsti (výrobce Bomat – Hradec Králové) vždy po 2 kusech semen v 5 opakováních na variantu. Po výsevu semen bylo do varianty matrace nalito 2,5 l roztoku Reid –York (1958) s 0, 0,1, 1 a 5 mg.l⁻¹ FLT. V období klíčení a růstu klíčnicích rostlin byla stanovena produkce etylenu a CO₂ – viz grafy 1a, 1b, 3a, 3b. Dále byl pravidelně u fotosynteticky aktivního listu měřen kvantový výtěžek elektronového transportu fotosystému PS II (grafy 4a, 4b), a výška rostliny (grafy 5a, 5b). K závěru pokusu byl vyhodnocen počet nasazených květů a počet vyvíjejících se plodů a semen (grafy 6a, 6b). V plodech a semenech byl stanoven obsah FLT (grafy 7a, 7b) a v apikálních listech rostlin byl stanoven obsah ABA (grafy 2a, 2b).

VÝSLEDKY A DISKUZE

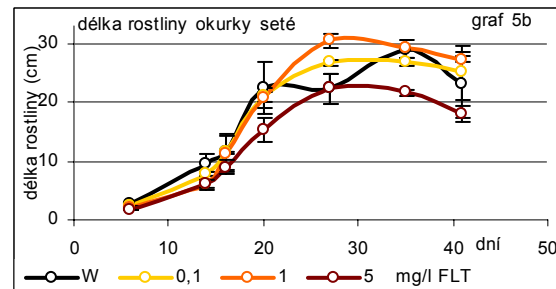
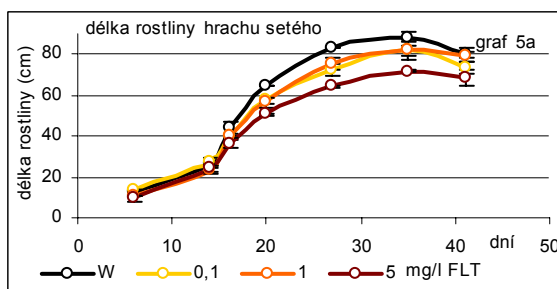
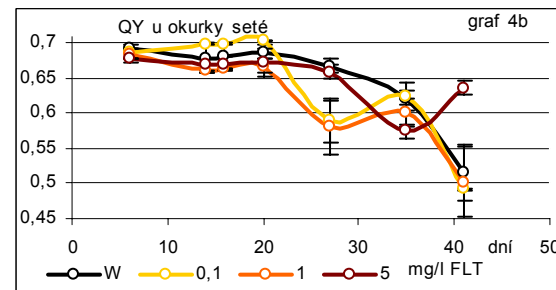
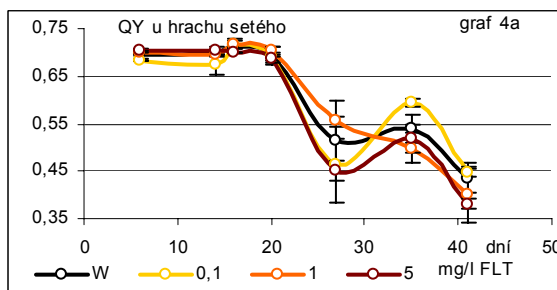
Nejvyšší koncentrace FLT snižuje produkci etylenu (graf 1a, 1b) jak u klíčicích semen hrachu a okurek a vyvíjejících se mladých rostlin. Rostliny hrachu se s přítomností FLT dříve vyrovnávají – vyšší produkce etylenu než u kontrolní varianty. Rozdíly jsou patrné i v obsahu ABA v apikálních listech rostlin v závěru pokusu (graf 2a, 2b), kdy u hrachu je obsah ABA vlivem FLT snižován a naopak u rostlin okurek statisticky průkazně zvyšován, což koresponduje s produkcí etylenu u mladých rostlin.



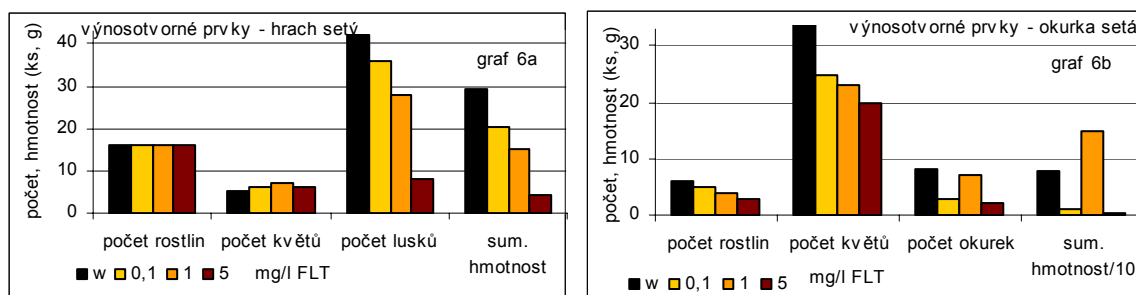
Produkce CO₂ (graf 3a, 3b) je fluorantem zpočátku zvyšována a v závěru týdne se oproti kontrole snižuje.



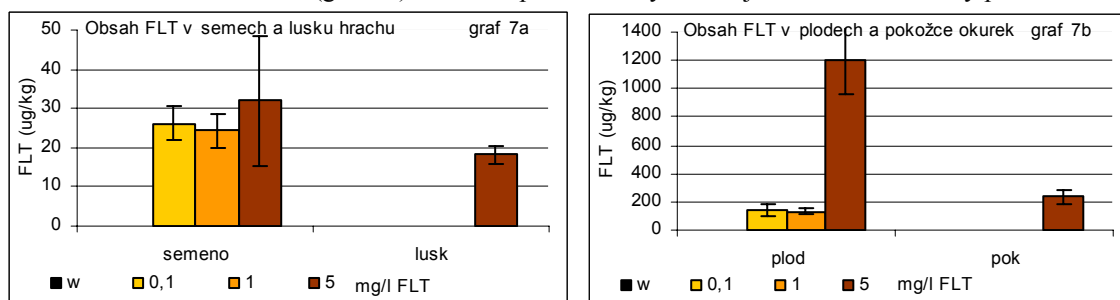
FLT snižuje kvantový výtěžek fotosyntézy a zkracuje statisticky průkazně délku rostlin (grafy 4a, 4b, 5a, 5b).



V grafech 6a, 6b jsou uvedeny výnosotvorné prvky u hrachu a okurky. FLT snižuje počet vyklíčených rostlin a počet květů u okurek, u hrachu počet nasazených lusků a jejich hmotnost.



Semena hrachu získaná z rostlin pěstovaných s přidavkem FLT obsahují do 30 $\mu\text{g/g}$ FLT, méně FLT je obsaženo v lusku rostlin (graf 7a), plody okurek získané z rostlin pěstovaných na přidavku FLT obsahují 10 x až 100 x více FLT než semena hrachu (graf 7b). Pokožka plodu okurky obsahuje méně FLT než celý plod.



ZÁVĚR

Rozdílné rostlinné druhy reagují na stresové zatížení s různou citlivostí. FLT negativně ovlivňuje výtvarnostvorné prvky a v plodech okurky se kumuluje až 100 x více této látky než v semenech hrachu.

Poděkování: Práce vznikla za podpory grantu GAČR - č. 522/09/0239 and Project: CzechGlobe – Centre for Global Climate Change Impacts Studies, Reg.No. CZ.1.05/1.1.00/02.0073.

LITERATURA

- COCCO, P. – MOORE, P.S. – ENNAS, M.G. – TOČCI, M.G. – IBBA, A. – MATTUZZI, S. – MELONI, M. – MONNE, M. – PIRAS, G. – COLLU, S. – SATTA, G. – ZUCCA, M. – SCARPA, A. – FLORE, C. 2007. Effect of urban traffic, individual habits, and genetic polymorphisms on background urinary 1-hydroxypyrene excretion, *Ann. Epidemiol.* 17 2007, pp. 1–8.
- DESALMEA, D. - BINETA, P. - BERNARDA, N. - GILBERTA, D. - TOUSSAINTA, M.L. - CHIAPUSIO, G. 2011. Atmospheric phenanthrene transfer and effects on two grassland species and their root symbionts: A microcosm study. *Environ. and Exp. Bot.*, 71, 2, 2011, 146-151.
- KUMMEROVÁ, M. – SLOVÁK, L. - HOLOUBEK, I. 1997. Growth response of spring barley to short- or long- period exposures to fluoranthene. *Rostlinná Výroba* 43, 1997, 209-215.
- KUMMEROVA, M. - VANOVA, L. - FISEROVA, H. - KLEMS, M – ZEZULKA, S. - KRULOVA, J. 2010. Understanding the effect of organic pollutant fluoranthene on pea in vitro using cytokinins, ethylene, ethane and carbon dioxide as indicators, *Plant Growth Regul.* 61, 2010, pp. 161–174.
- REID, P.H. – YORK, E.T. 1958. Effects of nutrient deficiencies on growth and fruiting characteristics of peanuts in sand culture. *Agron.J.*, 50(2), 1958, 63-67.
- WEISMAN, D. – ALKIO, M. - COLON-CARMONA, A. 2010. Transcriptional responses to polycyclic aromatic hydrocarbon-induced stress in *Arabidopsis thaliana* reveal the involvement of hormone and defense signaling pathways, *BMC Plant Biol.* 10, 2010, pp. 59–71.
- WILD, E. - DENT, J. – THOMAS, G.O. - JONES, K.C. 2006. Visualizing the air-to-leaf transfer and within-leaf movement and distribution of phenanthrene: further studies utilizing two-photon excitation microscopy, *Environ. Sci. Technol.* 40, 2006, pp. 907–916.
- ZHANG, Z.H - RENGEL, Z. - MENEY, K. 2010. Polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs) differentially influence growth of various emergent wetland species, *J. Hazard. Mater.* 182, 2010, pp. 689–695.

Adresy autorů: Dr. Ing. Helena Fišerová, RNDr. Ing. Marek Klemš, Ph.D., Prof. RNDr. Ladislav Havel, CSc. – Ústav biologie rostlin, Mendelova Univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno. RNDr. Štěpán Zezulka, Ph.D., Doc. RNDr. Marie Kummerová, CSc. - Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, Kotlářská 2, 602 00 Brno. Doc. Ing. Jan Triska, CSc., Ing. Rudolf Jílek - Laboratoř metaboliky a izotopových analýz, Centrum výzkumu globální změny AV ČR, v.v.i., Branišovská 31, 370 05 České Budějovice.

TECHNOLOGICKÁ KVALITA IZOGÉNNYCH LÍNIÍ PŠENICE

TECHNOLOGICAL QUALITY OF WHEAT ISOGENIC LINES

SOŇA GAVURNÍKOVÁ, SVETLANA ŠLIKOVÁ, EDITA GREGOVÁ

Centrum výskumu rastlinnej výroby Piešťany

We investigated the effect of the high-molecular-weight new glutenin allele on dough properties using near-isogenic lines (NILs) of three winter wheat cultivars (Torysa, Danubia and Hana). The differences were found between the NILs and the corresponding recurrent parents in the gluten index. The NILs with the new allele showed gluten index lower than recurrent parents.

Key words: Isogenic lines, new glutenin alleles, SDS-PAGE

ÚVOD

Pekársku kvalitu pšeničnej múky ovplyvňujú vysokomolekulové glutenínové podjednotky (HMW-GS) spolu s nízkomolekulovými glutenínovými podjednotkami a gliadínmi. Zistiť kladný alebo záporný vplyv jednotlivých HMW-GS je obtiažne, ale v súčasnosti je už známy vplyv často sa vyskytujúcich HMW-GS párov v odrodách na pekársku kvalitu pšeničnej múky. Na našom pracovisku sme v doterajších elektroforetických analýzach genotypov pšenice objavili nový, doteraz nepopísaný alelický pár kódovaný lokusom *Glu-1B*, ktorého vplyv na pekársku kvalitu nie je známy. Cieľom našej práce bolo zistiť technologickú kvalitu múky vytvorených izogénnych línií a rekurentných rodičov.

MATERÁL A METÓDY

Na izogénnych líniách, ktoré boli získané 6-násobným spätným krížením registrovaných odrôd Danubia, Torysa a Hana s genotypom Kotte a následnou selekciou na prítomnosť neznámej alely metódou SDS-PAGE bola stanovená ich technologická kvalita. Stanovenie bolo vykonané v dvoch opakovaniach pomocou týchto metód: obsah mokrého lepku a gluten index podľa ICC Standard No. 155, sedimentačný index, Zeleného test podľa STN ISO 5529, farinografické ukazovatele (vážnosť vody, vývin cesta, stabilita cesta, číslo kvality) podľa ICC Standard No. 115/1. 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

Základné kvalitatívne parametre NILs a rekurentných odrôd sú uvedené v Tabuľke 1. Podľa STN 46 1100-2 (2003): Zrno potravinárskej pšenice letnej zrno potravinárskej pšenice letnej zaradujeme do 4 tried kvality: E – elitná, A – štandardná, B – ustanovuje minimálne požiadavky na kvalitu pre intervenčný nákup pšenice, P – pečivárenská.

Všetky línie Hana x Kotte dosahovali vyššie hodnoty obsahu mokrého lepku voči kontrolnej odrode Hana, pričom prítomnosť glutenínových podjednotiek N+N spôsobila najvyšší nárast obsahu mokrého lepku, ale znížila sa jeho kvalita, čo sa prejavilo na nižšej hodnote gluten indexu (55) voči odrode Hana (89). Hodnota gluten indexu vyjadruje percento hmotnosti mokrého lepku, ktorý neprešiel sitkom po automatickom vypieraní a odšťavňovaní. Ak je hodnota gluten indexu v intervale od 60 do 90, poskytuje optimálnu pekársku kvalitu. Múky s hodnotami 95 a viac sú príliš silné a múky s hodnotami menej ako 60 sú príliš slabé pre výrobu chleba (Čurić et al. 2001). U všetkých línií kontrolných odrôd s Kotte N+N sme zaznamenali pokles hodnôt gluten indexu voči kontrolám, čo nám naznačuje, že prítomnosť glutenínových podjednotiek N+N zhoršuje kvalitu lepku. Línie Danubia x Kotte N+N a Danubia x Kotte 7+8 nedosiahli minimálnu hodnotu sedimentačného indexu pre pšenicu na pekárske využitie 22 ml. Z celkového hľadiska najlepšiu kvalitu dosiahla línia Hana x Kotte 7+8, ktorá zodpovedala triede kvality E a aj farinografické hodnotenie dosiahla najsilnejšie.

Najvýraznejšiu zmenu vo farinografickom hodnotení sme zaznamenali pri všetkých líniách Hana x Kotte, kedy sa oproti kontrole (Hana) výrazne zvýšila sila múky, zvýšili sa hodnoty vážnosti vody múkou, vývinu cesta i stability cesta, čo sa následne prejavilo vysokými hodnotami čísla kvality. Izogénne línie odrody Torysa boli podobné vo farinografickom hodnotení ku kontrole.

ZÁVER

Na základe celkového hodnotenia technologickej a pekárskej kvality analyzovaných izogénnych línií pšenice letnej sa ukázalo, že izogénna línia Hana x Kotte dosiahla najvyššiu kvalitu z testovaných línií. Všetky tieto línie dosiahli podľa STN triedu kvality E a podľa farinografického hodnotenia patria všetky k silným múkam. Avšak

prítomnosť glutenínových podjednotiek N+N zhoršila kvalitu lepku u všetkých línií, čo sa prejavilo znížením hodnôt gluten indexu oproti kontrolným vzorkám.

Tabuľka 1: Základné kvalitatívne parametre izogénnych línií pšenice

Vzorka	Kombinácia	<i>Glu-1B</i>	Obsah mokrého lepku v sušine [%]	Gluten index	Sedimentačný index podľa Zelenyho [ml]	Trieda kvality podľa STN 46 1100-2
Odroda	Hana	7+8	28,1	89	44	E
NIL	Hana x Kotte	N+N; 7+8	30,4	72	45	E
NIL	Hana x Kotte	N+N	32,5	55	46	E
NIL	Hana x Kotte	7+8	30,7	85	49	E
Odroda	Danubia	7+8	25,6	34	22	B
NIL	Danubia x Kotte	N+N; 7+8	24,1	29	22	B
NIL	Danubia x Kotte	N+N	24,1	12	18N	N
NIL	Danubia x Kotte	7+8	25,1	25	21N	N
Odroda	Torysa	7+8	26,1	62	30	A
NIL	Torysa x Kotte	N+N; 7+8	23,9	43	22	B
NIL	Torysa x Kotte	N+N	26,2	30	24	B
NIL	Torysa x Kotte	7+8	23,6	71	25	B

N-nevyhovuje žiadnej triede kvality pšenice

Tabuľka 2: Farinografické parametre izogénnych línií pšenice

Vzorka	Kombinácia	<i>Glu-1B</i>	Väznosť vody múkou pre 500 FU [%]	Vývin cesta [min]	Stabilita cesta [min]	Farinogr. číslo kvality	Sila múky
Odroda	Hana	7+8	58,1	2,0	2,0	34	stredná
NIL	Hana x Kotte	N+N; 7+8	59,4	2,2	5,2	76	silná
NIL	Hana x Kotte	N+N	59,4	3,5	9,8	141	silná
NIL	Hana x Kotte	7+8	59,3	2,2	18,7	200	silná
Odroda	Danubia	7+8	54,5	1,4	2,9	60	stredná
NIL	Danubia x Kotte	N+N; 7+8	53,9	1,2	1,1	21	slabá
NIL	Danubia x Kotte	N+N	53,0	1,2	1,0	21	slabá
NIL	Danubia x Kotte	7+8	53,4	2,0	5,1	91	stredná/silná
Odroda	Torysa	7+8	55,9	1,5	1,2	24	slabá
NIL	Torysa x Kotte	N+N; 7+8	54,0	1,2	0,7	17	slabá
NIL	Torysa x Kotte	N+N	54,6	1,4	1,5	24	slabá
NIL	Torysa x Kotte	7+8	54,1	1,4	1,0	21	slabá

Podakovanie: 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

STN 46 1100-2 Potravinárske obilniny: Časť 2: Zrno potravinárskej pšenice letnej. SÚTN, Bratislava, 2003, p.8
 Čurić, D. et al. 2001. Gluten as a Standard of Wheat Flour Quality. In *Food Technology and Biotechnology*, vol. 39, 2001, no. 4, pp. 353–361.

Adresa autorov:

Ing. Soňa Gavurníková, PhD., Ing. Svetlana Šliková, PhD., Ing. Edita Gregová, PhD., Centrum výskumu rastlinnej výroby Piešťany, Výskumný ústav rastlinnej výroby, Bratislavská cesta 122, 921 68 Piešťany
 e-mail: gavurnikova@vurv.sk, slikova@vurv.sk, gregova@vurv.sk.

DIVERSITY AND GENETIC STRUCTURE OF *APPLE CHLOROTIC LEAF SPOT VIRUS* ISOLATES INFECTING STONE FRUIT (*PRUNUS SPP.*) IN SLOVAKIA

VARIABILITA A GENETICKÁ ŠTRUKTÚRA IZOLÁTOV VÍRUSU CHLOROTICKEJ ŠKVRNITOSTI JABLONE NA KÔSTKOVINÁCH (*PRUNUS SPP.*) NA SLOVENSKU

MIROSLAV GLASA, LUKÁŠ PREDAJŇA, OTAKAR KÚDELA, ZDENO ŠUBR

Institute of Virology, Slovak Academy of Sciences, Dúbravská cesta 9, 84505 Bratislava, Slovakia

A *Trichovirus*, *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV) is one of the pathogens that spreads through infected planting material and can infect *Prunus* trees. In this work, the ACLSV variability was assessed by partial sequence analysis of 3 isolates recovered from plums and peach in Slovakia. Comparison of complete sequences of the capsid protein gene (579 bp) of Slovak ACLSV isolates showed that they shared similarities ranging from 76.4 to 84.6% and 71.0 – 91.2% at the nucleotide and the aminoacid levels, respectively. Moreover, a high intra-isolate variability within respective ACLSV isolates could be highlighted.

Key words: ACLSV, genetic diversity, RT-PCR

INTRODUCTION

Genetic variability is an essential feature of RNA viruses, which are characterized by high mutation rates resulting from the lack of proofreading activity of their RNA-dependent RNA polymerases. This process can lead to the emergence of new viral strains and variants better adapted to the ever-changing environmental conditions or with an increased fitness in their natural hosts. The fast mutation and large population size of RNA viruses produce populations of viral genomes known as quasispecies (Garcia-Arenal et al., 2001).

Apple chlorotic leaf spot virus (ACLSV) belonging to the genus *Trichovirus*, family *Betaflexiviridae*, is one of the most important viruses infecting *Prunus* trees. The infection is mostly symptomless, but the virus could also induce a highly diverse symptomatology, including false plum pox (causing erroneous visual detection of sharka disease) or severe graft incompatibilities in some *Prunus* combinations in nurseries. The severity of symptoms caused by ACLSV depends largely on the plant species and virus isolate (German et al., 1990; Al-Rawahin et al., 2004).

In this work, the ACLSV variability was assessed by partial sequence analysis of 3 isolates recovered from plums in Slovakia.

MATERIAL AND METHODS

Commercially available antibodies (Bioreba) were used for the detection of ACLSV by DAS-ELISA in leaf samples from *Prunus* trees. Two plum isolates (SK_BUD_plum and SK92_plum) originated from Bratislava and Dunajská Lužná, respectively. The SK196_peach was recovered from peach orchard in Dolné Plachtince. Random primer-synthesized cDNA was used for amplification of the complete ACLSV capsid protein (CP) gene and 3' terminal noncoding region (ca. 800 bp) using proofreading Takara Ex *Taq* polymerase (Takara) and primers 5'CAAGAGARTTTCAGTTTGCTCG3' (sense, designed for the purpose of this work) and 5'AAGTCTACAGGCTATTTATTATAAGTCTAA3' (antisense, Menzel et al. 2002). PCR amplification was performed under the following cycling conditions: initial denaturation at 94°C for 5 min; 35 cycles of 94°C for 45 s, 53°C for 45 s, and 72°C for 1 min; followed by a final extension step at 72°C for 10 min. PCR products were either directly sequenced or cloned into the pGEM-T Easy cloning vector (Promega) according to the manufacturer's instructions. Ten randomly chosen clones were sequenced for each PCR product to study the inra-isolate diversity. Sequence analyses were performed using the Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA v.4.1, Tamura et al. 2007) software. The sequences for comparison were retrieved from the Genbank database (www.ncbi.nlm.nih.gov).

RESULTS AND DISCUSSION

Better knowledge of the genetic diversity and characterization of virus populations provides a major contribution for understanding the complexity and epidemiology of the pathogen. In this work, we have determined the 3' terminal sequence of 3 ACLSV isolates recovered from plums, previously tested positive by DAS-ELISA.

Comparison of complete sequences of the capsid protein gene (579 bp) of Slovak ACLSV isolates showed that they shared similarities ranging from 76.4 to 84.6% and 71.0 – 91.2% at the nucleotide and the aminoacid levels, respectively (Table 1). The CP sequences of 3 Slovak ACLSV isolates were collinear and the deduced

capsid protein contained 193 aminoacids, with a calculated molecular mass of 21 524, 21 688 and 21 374 for SK_BUD_plum, SK92_plum and SK196_peach, respectively (Fig. 1).

Neighbour-joining tree generated from the complete CP sequences obtained in this work and retrieved from GenBank showed important variability within ACLSV. While SK_BUD_pl was phylogenetically related to common European ACLSV isolates, the isolates SK196_peach and SK92_plum have been found to be divergent and clustered slightly away from main ACLSV groups (data not shown). The presence of genetically divergent ACLSV isolates implies several introduction sources in Slovakia. Substantial heterogeneity of ACLSV populations could be a reason for the obvious absence of biological phylogenetic grouping of virus isolates based on host species and/or geographical origin (Nemchinov et al. 1995; Rana et al., 2010).

In order to characterize the complexity of the examined ACLSV isolates, the PCR products were cloned and the number of different variants within each isolate was sequenced. Multiple alignment of sequences has revealed two different situations. In case of the SK92_plum isolate, the inraisolate genetic distance reached 0.2% and was consistent with the quasi-species theory of RNA virus populations (presence of slightly divergent minor variants around a dominant sequence). For the isolates SK_BUD_plum and SK196_peach, the intra-isolate genetic distance reached 5.6% and 5.1%, respectively due to the presence of mixed infection of two different variants within isolate population.

The quasispecies nature of RNA viruses may imply a high adaptative potential, allowing for the rapid selection of biologically distinct variants with the highest fitness in new environments. It may result in dramatic changes in the biological properties of the virus, with major epidemiological consequences (Garcia-Arenal et al. 2001).

CONCLUSIONS

Only sporadic incidence of ACLSV was found in *Prunus* trees during surveys of stone-fruit trees in Slovakia. The complete CP sequence determined from 3 Slovak ACLSV isolates showed their genetic distinctness (nucleotide identities reaching 76.4 – 84.6%) although all originated from *Prunus* trees. Moreover, a high intra-isolate variability within respective ACLSV isolates could be highlighted.

Acknowledgements: This work was supported by the grant HUSK/0901/1.2.1/0126 of the Hungary-Slovakia Cross-border Co-operation Programme through the European Regional Development Fund.

REFERENCES

- AL-RAWAHNIH, M. - TURTURO, C. - MINAFRA, A. - SALDARELLI, P. - MYRTA, A. - PALLAS, V. - SAVINO, V. 2004. Molecular variability of Apple chlorotic leaf spot virus in different hosts and geographic regions. In *Journal of Plant Pathology*, vol. 86, 2004, pp. 117–122.
- GARCIA-ARENAL, F. - FRAILE, A. - MALPICA, J.M. 2001. Variability and genetic structure of plant virus populations. *Annual Reviews of Phytopathology*, vol. 39, 2001, pp. 157-186
- GERMAN, S. - CANDRESSE, T. - LANNEAU, M. - HUET, J.C. - PERNOLLET, J.C. - DUNEZ, J. 1990. Nucleotide sequence and genomic organization of Apple chlorotic leaf spot closterovirus. In *Virology*, vol. 179, 1990, pp. 104–112.
- MENZEL, W. – JELKMANN, W. – MAISS, E. 2002. Detection of four apple viruses by multiplex RT-PCR assays with coamplification of plant mRNA as internal control. In *Journal of Virological Methods*, vol. 99, 2002, pp. 81–92.
- NEMCHINOV, L. - HADIDI, A. - FOSTER, J.A. - CANDRESSE, T. - VERDEREVSKAYA, T. 1995. Sensitive detection of apple chlorotic leaf spot virus from infected apple or peach tissue using RT-PCR, IC-RT-PCR, or multiplex IC-RT-PCR. In *Acta Horticulturae*, vol. 386, 1995, pp. 51–62.
- RANA, T. – CHANDEL, V. – KUMAR, Y. – RAM, R. – HALLAN, V. – ZAIDI, A.A. 2010. Molecular variability analyses of Apple chlorotic leaf spot virus capsid protein. In *Journal of Biosciences*, vol. 35, 2010, pp. 605-615.
- TAMURA, K. - DUDLEY, J. - NIE, M. – KUMAR, S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. In *Molecular Biology and Evolution*, vol. 24, 2007, pp. 1596–1599.

Table 1: Pairwise comparison of complete nucleotide (below the diagonal) and amino acid sequences (above the diagonal) of the CP of three characterised Slovak ACLSV isolates. Identities are shown as percentages.

	SK_BUD_plum	SK92_plum	SK196_peach
SK_BUD_plum		91.2	68.4
SK92_plum	84.6		71.0
SK196_peach	76.4	77.2	

```

AJ243438      MAAVLNQLKVDADLKAFLGAEGRPLHGKTGVILEQILESIFANIAIQGTSEQTEFLGLTVEVKS
SK_BUD_plum  .....S.....A..N.....T..L.....D.V.....
SK92_plum    .....D.....K.D.....AT.....D.V.....
SK196_peach  .G.A.K..V..GG.....S.....Q....G...G.....DMV.....

AJ243438      MEDQKVIQSYNLREVVNLIKAFKITSSDQININMTFRQVCEAFAPPEARGLVVKLYKGVFTNLF
SK_BUD_plum  ....T.L....K.....T...P...S.....
SK92_plum    .....K.M.....L..T...P...S.....R.....Y.
SK196_peach  .....V.C..T.G..KM..D..G..FGL..CT..L..E...L...G.K....I..QRG.SHPY.

AJ243438      TMPEVGSKYPELMFDFNKGLNMFIMNKAQQKVITNMNRPLLQTEFAKSENEAKLSSVSTDLCI
SK_BUD_plum  .....R.....
SK92_plum    .....G.....H.....L.....R.....I.....
SK196_peach  PQ....G....I....H...YTLFL.T.P....N....RP..N.....H...T
    
```

Fig. 1: Multiple alignment of the deduced complete CP amino acid sequences of ACLSV isolates characterised in this study and their comparison with reference sequence AJ243438 (identical amino acids are indicated by dots).

Adresa autorov:

Ing. Miroslav Glasa, PhD., Mgr. Lukáš Predajňa, RNDr. Otakar Kúdela, CSc., RNDr. Zdeno Šubr, CSc., Virologický ústav, Slovenská akadémia vied, Dúbravská cesta 9, 84505 Bratislava, Miroslav.Glasa@savba.sk

MOLEKULÁRNA CHARAKTERIZÁCIA IZOLÁTOV VÍRUSU ZVINUTKY VINIČA-1 NA SLOVENSKU

MOLECULAR CHARACTERISATION OF GRAPEVINE LEAFROLL- ASSOCIATED VIRUS-1 ISOLATES IN SLOVAKIA

MIROSLAV GLASA, LUKÁŠ PREDAJŇA

Virologický ústav, Slovenská akadémia vied, Dúbravská cesta 9, 84505 Bratislava

Although Grapevine leafroll-associated virus-1 (GLRaV-1) is one of the most important agents of the grapevine leafroll disease, the data about its molecular variability are scarce. In order to obtain a picture of GLRaV-1 diversity in Slovakia, a genome region encoding the central part of the capsid protein gene was amplified by RT-PCR from 15 GLRaV-1 isolates and directly sequenced. Comparison of obtained sequences has shown the presence of 2 genetically different groups with the nucleotide identities between isolates ranging from 83 - 99.6%. These results provide first data about molecular variability of GLRaV-1 on the territory of Slovakia.

Key words: GLRaV-1, genetická diverzita, RT-PCR, fylogénéza

ÚVOD

Vírus zvinutky viniča-1 (*Grapevine leafroll-associated virus-1*, GLRaV-1) sa zaraďuje do rodu *Ampelovirus* (čel'ad' *Closteroviridae*) (Habibi et al., 2007). Vírus sa prenáša červcami z čel'ade *Cocciidae* (Sforza et al., 2003) a infikovaným rozmnožovateľským materiálom. Kry napadnuté zvinutkou majú slabší rast, typickými príznakmi sú nadol stočené listy, medzižilové sčervenanie alebo zožltnutie listov, strapce sú menšie a bobule obsahujú menej cukru (Rayapati et al., 2008). GLRaV-1 patrí medzi patogény, ktoré sa nesmú vyskytovať v množiteľskom materiáli viniča podľa Nariadenia vlády SR (č.49/2007), ktorým sa ustanovujú požiadavky na uvádzanie množiteľského materiálu viniča na trh.

Genóm GLRaV-1 tvorí jednovláknová RNA (19500 nukleotidov) a je organizovaný do 10 otvorených čítacích rámcov (ORF) (Fazeli & Rezaian, 2000; Little et al., 2001).

Výskum genetickej variability a pochopenie vzťahov medzi vírusovými kmeňmi a izolátmi je dôležitým aspektom pri kontrole viróz ako aj posudzovaní rizika spojeného s rozširovaním nových vírusov alebo ich variantov.

Hoci GLRaV-1 patrí k najrozšírenejším vírusovým patogénom viniča vo svete, poznatky o jeho molekulárnej variabilite sú značne obmedzené a z nášho územia takmer úplne chýbajú (Komínek et al., 2005). V tejto práci sme sa zamerali na detekciu GLRaV-1 na Slovensku a parciálnu genetickú charakterizáciu viacerých izolátov.

MATERIÁL A METÓDY

Na analýzu boli použité vzorky jednoročného dreva viniča zozbierané v mesiacoch január-február 2011 z rôznych vinohradov na Slovensku. Z jednoročného dreva bolo naškrabané lykové pletivo, ktoré bolo následne homogenizované v tekutom dusíku.

Vzorky boli najprv testované na prítomnosť GLRaV-1 imunochemicky metódou DAS-ELISA s použitím špecifických protilátok (Bioreba).

Totálna RNA z GLRaV-1-pozitívnych vzoriek bola vyizolovaná použitím NucleoSpin RNA Plant kitu (Macherey-Nagel). cDNA sa získala reverznou transkripciou pomocou AMV reverznej transkriptázy (Promega) použitím náhodných hexamérových primerov (pdN6) a následne bola použitá ako templát v štandardnej PCR reakcii. Na amplifikáciu bol použitý EmeraldAmp MAX PCR Master Mix (TaKaRa) za nasledovných podmienok: denaturácia 98°C 1 min, 35 cyklov (98°C 10 sek, 55°C 30 sek a 72°C 30 sek) a finálna elongácia 72°C 5 min). Použité primery LR1f (5' TGAAGGGRCCGGGAGGTTAT 3') a LR1rev (5'TTACCCATCACTTCAGCAC 3') boli zacielené na centrálnu časť génu kódujúceho obalový proteín vírusu (CP). Amplifikované fragmenty boli prečistené pomocou Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) a následne priamo sekvenované (Bitcet, PriFUK, Bratislava) Po odstránení sekvencií primerov sa na analýzu použil fragment dlhý 241 bp (nukleotidová pozícia 7139 – 7379 v AF195822). Sekvenčná a fylogenetická analýza bola realizovaná pomocou bioinformatického programu MEGA4 (Tamura et al., 2007).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Prvotný skrining pomocou DAS-ELISA dokázal vysoký výskyt GLRaV-1 v testovaných rastlinách viniča z rôznych lokalít Slovenska (približne 40% testovaných vzoriek bolo GLRaV-1 pozitívnych). Zo všetkých vzoriek pozitívnych v DAS -ELISA sme získali očakávaný fragment v PCR (280 bp).

Fylogenetická analýza získaných CP sekvencií ukázala, že slovenské GLRaV-1 izoláty tvoria 2 odlišné klastre (Obr. 1), čo potvrdzuje vysokú genetickú diverzitu vírusu na Slovensku.

Porovnanie sekvencií ukázalo, že nukleotidová zhoda slovenských GLRaV-1 izolátov na amplifikovanom úseku genómu dosahovala 83-99.6%.

Vysoká homológia medzi GLRaV-1 v klastru I bola zrejmá na základe odvodenej aminokyselinovej sekvencie, kde 10 z 13 GLRaV-1 izolátov vykázalo 100% identitu. Dva GLRaV-1 izoláty z klastra II sa odlišovali od ostatných slovenských GLRaV-1 izolátov 2 špecifickými aminokyselinovými zámienami na pozícií 1 (Thr/Ser) a 44 (Val/Ile) sekvenovaného úseku.

Detailná genetická charakterizácia GLRaV-1 izolátov cirkulujúcich na Slovensku je nevyhnutná na pochopenie geografickej dynamiky a genetického vývoja GLRaV-1 populácií, a poskytuje dôležité poznatky pre vypracovanie efektívnej kontroly ochorenia a prijatie účinných fytoosanitárnych opatrení, vrátane vývoja a optimalizácie špecifických a citlivých diagnostických procedúr.

ZÁVER

Na základe DAS-ELISA sme zistili častý výskyt vírusu zvinutky viniča-1 (GLRaV-1) v sledovaných vinohradoch na Slovensku. Analýza 15 získaných parciálnych CP sekvencií ukázala, že GLRaV-1 izoláty cirkulujúce na Slovensku môžeme zatriediť do dvoch geneticky odlišných kmeňov. Naše výsledky poskytujú prvé poznatky o genetickej variabilite GLRaV-1 na území Slovenska.

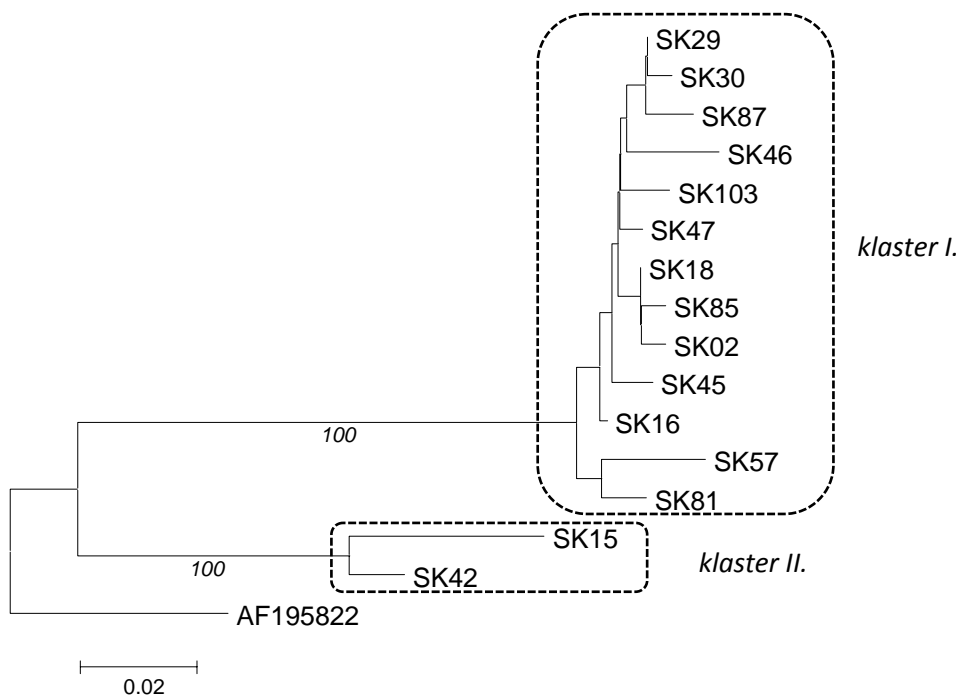
Podakovanie: Táto práca bola podporená grantom VEGA 02/0030/10.

LITERATÚRA

- FAZELI, C.F. - REZAIAN, M.A. 2000. Nucleotide sequence and organization of ten open 10 reading frames in the genome of Grapevine leafroll-associated virus 1 and identification of three subgenomic RNAs. In *Journal of General Virology*, vol. 81, 2000, pp. 605-615.
- HABILI, N., KOMÍNEK, P., AND LITTLE, A. 2007. Grapevine leafroll-associated virus 1 as a common grapevine pathogen. In *Plant Viruses*, vol. 1, 2007, pp. 63-68.
- KOMÍNEK, P. - GLASA, M. - BRYXIOVÁ, M. 2005. Analysis of the molecular variability of Grapevine leafroll-associated virus 1 reveals the presence of two distinct virus groups and their mixed occurrence in grapevines. In *Virus Genes*, vol. 31, 2005, pp. 247-255.
- LITTLE, A. - FAZELI, C.F. - REZAIAN, M.A. 2001. Hypervariable genes in Grapevine leafroll associated virus 1. In *Virus Research*, vol. 80, 2001, pp.109-116.
- RAYAPATI, A.N. - O'NEIL, S. - WALSH, D. 2008. Grapevine leafroll disease. In *WSU Extension Bulletin*. [<http://cru.cahe.wsu.edu/CEPublications/eb2027e/eb2027e.pdf>].
- SFORZA, R. - BOUDON-PADIEU, E. - GREIF, C. 2003. New mealybug species vectoring Grapevine leafroll-associated viruses-1 and -3 (GLRaV-1 and -3). In *European Journal of Plant Pathology*, vol. 109, 2003, 975-981.
- TAMURA, K. - DUDLEY, J. - NIE, M. - KUMAR, S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. In *Molecular Biology and Evolution*, vol. 24, 2007, pp. 1596-1599.

Tabuľka 1: Zoznam charakterizovaných izolátov GLRaV-1

Izolát	Lokalita	Odroda
SK02	Čachtice	Tramín červený
SK15	Pezinok	Veltlínske
SK16	Pezinok	Muller-Thurgau
SK18	Pezinok	Muller-Thurgau
SK29	Pezinok	Svätovavrinské
SK30	Pezinok	Veltlínske zelené
SK42	Pezinok	Chrupka biela
SK45	Pezinok	Chrupka biela
SK46	Pezinok	neznáma
SK47	Bratislava	Veltlínske červené skoré
SK57	Okoč	neznáma
SK81	Topolčianky	Svätovavrinské
SK85	Topolčianky	Panónia Kinose
SK87	Topolčianky	Chrupka ružová
SK103	Svätý Jur	neznáma



Obrázok 1: Fylogenetická analýza slovenských izolátov GLRaV-1 pomocou neighbour-joining metódy.

Adresa autora:

Ing. Miroslav Glasa, PhD., Mgr. Lukáš Predajňa, Virologický ústav, Slovenská akadémia vied, Dúbravská cesta 9, 84505 Bratislava, Miroslav.Glasa@savba.sk

KVALITATIVNÍ HODNOCENÍ ČIROKU PRO BIOMASU

QUALITY ASSESSMENT OF SORGHUM FOR BIOMASS PRODUCTION

JIŘÍ HERMUTH, DAGMAR JANOVSKÁ, ZDENĚK STEHNO, ANNA PROHASKOVÁ

Oddělení genové banky, Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.

Sorghum genetic resources from the Gene bank in the Crop Research Institute in Prague were tested in replicated field trials to evaluate production of biomass and its composition. Significant differences were detected among particular genotypes in the periods till emergency and heading. However, such differences were not confirmed in the time till grain ripeness. Similarly, no significant differences were found in plant high and dry matter production. High nitrogen content was identified in the cultivar 'GK Zsófia' and genotype '6 - bez taninu (cukrový)'. Check cultivar 'Latte' had the highest content of potassium but the lowest percentage of phosphorus.

The obtained results will be use for detail description of particular genetic resources and will serve for their possible practical use.

Key words: sorghum, genetic resources, biomass production, biomass composition

ÚVOD

V průběhu posledních dvou dekád se zvýšil zájem o obnovitelné zdroje energie. Jedním z nejstarších a nejslibnějších zdrojů energie je pěstování biomasy. Podle International Energy Agency (2011) se od roku 1980 zvyšuje využití biomasy jako zdroje energie každý rok o 1,4%, což představuje významný podíl na světové ekonomice.

Čirok je jednoletá C₄ rostlina s vysokou fotosyntetickou aktivitou. Jedná se o vysoce výnosnou plodinu bohatou na sacharidy. Ve výnosu nadzemní biomasy překonává např. více jak dvojnásobně sóju (Creamer & Baldwin, 1999). Jeho stébla obsahují hlavně sacharózu (až do 55% v suš.) a glukózu (do 3,2% v suš.). Dále obsahuje celulózu (12,4%) a hemicelulózu (10,2%) (Dalianis et al. 1996). Podle Mursec et al. (2009) má bioplyn velmi pozitivní efekt na prostředí, protože se při jeho spalování vytváří méně CO₂ než při fotosyntéze rostlin, ze kterých je vyroben.

Cílem této práce bylo zhodnotit vybrané perspektivní genetické zdroje čiroku s důrazem na produkci a složení biomasy.

MATERIÁL A METODY

V roce 2010 byly vysety vybrané materiály čiroku vybrané z kolekce čiroku v Genové bance VURV, v.v.i. Pokus byl vyset na parcelkách o celkové ploše 4,5m² ve třech opakováních. Seznam vysetých položek je uveden v tab. 1. Odrůdy čiroku byly vybrány na základě předběžného polního hodnocení v minulých letech. Jako kontrola byla použita komerční odrůda 'Latte' firmy Seed Service, což je hybrid *Sorghum saccharatum* x *Sorghum sudanense*, která se využívá pro biomasu. U jednotlivých položek byla 20. října 2010 odebrána nadzemní část a byla hodnocena hmotnost zelené biomasy. U odebraného materiálu byl hodnocen obsah vybraných základních živin jako N, P, K, Ca, Mg a Na a stopových prvků jako Al, B, Fe, Mn a S v sušině. Výsledky byly statisticky zpracovány faktorovou analýzou (ANOVA, Statistica 10.0) a Tuckey testem na hladině významnosti 0,05.

Tabulka 1: Seznam hodnocených odrůd čiroku

DRUH	ECN*	NÁZEV	STÁT	ZDROJ
<i>Sorghum bicolor</i>	01Z1500005	K - 81	DEU	Genová banka Praha
<i>Sorghum bicolor</i>	01Z1500029	Kecskemeti	HUN	Genová banka Praha
<i>Sorghum saccharatum</i>	01Z1600002	SO - 29	CSK	Genová banka Praha
<i>Sorghum</i> sp.	01Z1800011	GK 4 Zsófia	HUN	Genová banka Praha
<i>Sorghum</i> sp.	01Z1800012	6 - bez taninu (cukrový)	HUN	Genová banka Praha
<i>Sorghum</i> sp.	01Z1800014	21/00	HUN	Genová banka Praha
<i>Sorghum</i> sp.	01Z1800021	56/01	HUN	Genová banka Praha
<i>Sorghum</i> sp.	01Z1800027	GK 5 Zsófia	HUN	Genová banka Praha
<i>Sorghum saccharatum</i> x <i>Sorghum sudanense</i>	Kontrola	Latte	USA	Seed Service

*ECN národní evidenční číslo genové banky

VÝSLEDKY A DISKUSE

V tab.2 jsou uvedené výsledky morfologicko-fenologického hodnocení. Rychlost vzcházení je ovlivněna vedle genotypu též výrazně vnějšími podmínkami a to teplotou a dostatkem vláhy. Rozdílů v počtu dní do

vzcházení ukazují na rychlejší vzcházení genotypů patřících druhu *S. bicolor*. To však již neplatí pro délku vegetační doby do metání, kde odrůda ‚Kecskemeti‘ patřila spolu s kontrolní ‚Latte‘ k průkazně nejpozdějším. V počtu dní do plné zralosti se průkazně rozdíl již neprojevily, přesto však patřila odrůda ‚Kecskemeti‘ spolu s ‚SO - 29‘ (*S. saccharatum*) k velmi pozdním. Kontrolní odrůda ‚Latte‘ v pokusné lokalitě nedozrála. Délka vegetace se v hodnoceném souboru pohybovala v rozmezí od 159 do 170 dní. Nejnížší procento zapojení porostu bylo zjištěno u ‚SO - 29‘ a kontrolní ‚Latte‘. Mezi jednotlivými genotypy a odrůdami nebyl nalezen statisticky průkazný rozdíl ve výšce a ve výnosu sušiny z ha. Ve výnosu sušiny z jednotky plochy překonal kontrolní ‚Latte‘ pouze genotyp ‚21/00‘ a přibližně stejnou produkci sušiny měl ‚56/01‘.

Tabulka 2: Morfologicko-fenologické hodnocení vybraných odrůd čiroku

	Vzcházení (dny)	Metání (dny)	Plná zralost (dny)	Zapojení (%)	Výška (cm)	Výnos (t suš./ha)
K - 81	18,00±0,00a	80,00±0,00c	161,00±0,00a	100,00±0,00a	291,00±4,58a	26,08±1,97a
Kecskemeti	19,00±0,00ab	93,00±0,00d	169,00±0,00a	91,67±7,64a	314,67±4,51a	26,24±5,84a
SO - 29	21,33±0,58c	74,67±1,53b	170,00±0,00a	26,67±7,64b	302,33±7,02a	26,61±2,74a
GK 4 Zsofia	19,33±0,58ab	70,33±0,58a	163,00±0,00a	76,67±2,89a	308,67±7,57a	24,07±4,41a
6 - bez taninu (cukrový)	19,00±0,00ab	69,00±0,00a	160,00±0,00a	86,67±18,93a	304,00±19,70a	20,04±3,39a
21/00	19,33±0,58ab	69,00±1,00a	161,00±0,00a	91,67±7,64a	308,00±14,00a	29,51±7,21a
56/01	19,67±0,58abc	69,33±0,58a	159,00±0,00a	78,33±7,64a	317,00±7,00a	28,25±4,51a
GK 5 Zsofia	20,00±1,00bc	70,33±1,15a	159,00±0,00a	76,67±7,64a	294,67±12,66a	20,25±1,83a
Latte	20,00±1,00bc	95,00±0,00d	-	31,67±5,77b	312,67±9,07a	28,51±3,51a

Hodnoty označené shodným písmenem nebyly statisticky průkazně odlišné na $P \leq 0,05$

Tabulka 3: Obsah prvků v sušině sklizené biomasy

	N (%suš.)	P (%suš.)	K (%suš.)	Ca (%suš.)	Mg (%suš.)	Na (%suš.)
K - 81	1,00±0,04abc	0,15±0,01ab	1,03±0,06abc	0,47±0,01c	0,21±0,01a	0,0088±0,0002a
Kecskemeti	0,97±0,10bc	0,15±0,01ab	0,86±0,07b	0,45±0,02bc	0,22±0,02a	0,0089±0,0001a
SO - 29	1,16±0,10abc	0,19±0,02a	1,08±0,05a	0,36±0,02a	0,17±0,00a	0,0089±0,0007a
GK 4 Zsofia	1,22±0,09ab	0,18±0,02ab	0,89±0,03bc	0,43±0,02abc	0,20±0,02a	0,0086±0,0001a
6 - bez taninu (cukrový)	1,26±0,12a	0,18±0,04ab	1,09±0,07a	0,40±0,03abc	0,19±0,03a	0,0086±0,0002a
21/00	1,25±0,15ab	0,20±0,04a	0,89±0,12bc	0,39±0,04ab	0,19±0,03a	0,0085±0,0004a
56/01	1,17±0,08abc	0,17±0,01ab	1,04±0,15ac	0,43±0,05abc	0,18±0,03a	0,0086±0,0003a
GK 5 Zsofia	1,27±0,06a	0,18±0,01ab	1,10±0,08a	0,39±0,04ab	0,19±0,01a	0,0085±0,0003a
Latte	0,89±0,05c	0,12±0,00b	1,16±0,09a	0,37±0,02a	0,18±0,01a	0,0091±0,0002a

Tabulka 4: Obsah mikroprvků v sušině sklizené biomasy

	Al (mg/kg suš.)	B (mg/kg suš.)	Fe (mg/kg suš.)	Mn (mg/kg suš.)	S (mg/kg suš.)
K - 81	138,22±40,48a	4,17±0,08ab	141,83±4,65a	41,82±2,21b	764,30±75,93ab
Kecskemeti	98,89±31,84a	3,30±0,48a	154,49±32,74a	29,56±2,64a	704,53±35,97bc
SO - 29	88,04±42,83a	4,04±0,13ab	125,49±53,91a	28,33±2,46a	783,96±40,91ab
GK 4 Zsofia	143,21±46,67a	3,75±0,38ab	193,13±15,51a	33,63±3,72ab	846,98±72,64a
6 - bez taninu (cukrový)	147,62±54,60a	4,04±0,52ab	179,06±16,71a	29,93±6,42a	829,10±67,22a
21/00	97,07±26,58a	4,35±0,60b	128,93±34,68a	30,34±3,42a	831,56±56,66a
56/01	165,86±64,16a	3,60±0,29ab	223,29±99,61a	29,84±3,98a	767,24±37,68ab
GK 5 Zsofia	129,21±32,62a	3,88±0,32ab	141,54±13,73a	29,85±2,69a	833,67±53,47a
Latte	104,31±49,46a	3,60±0,30ab	119,77±56,42a	28,08±1,37a	615,08±22,68c

Nejvyšší obsah dusíku v sušině sklizené biomasy (tab. 3) byl zjištěn u odrůdy ‚GK Zsofia‘ a genotypu ‚6 – bez taninu (cukrový)‘ 1,27 resp. 1,26 %. Průkazně se od nich lišila ‚Latte‘ a ‚Kecskemeti‘ (0,89 resp. 0,97 %). Obsah N se významně projevuje zvláště v poměru C:N, významném pro mineralizaci biomasy v půdě. Ten je u čiroku obvykle široký a přesahuje hodnotu 50 (Creamer, Baldwin, 1999). Tento poměr lze využívat i pro určení vhodné doby sklizně čiroku pěstovaného jako mezplodina pro zelené hnojení (Silvia, et al. 2009).

Vysoký obsah fosforu, průkazně odlišný od kontrolní ‚Latte‘, byl zjištěn u genotypů ‚21/00‘ a ‚SO – 29‘. Nejvyšší obsah draslíku měla kontrolní odrůda ‚Latte‘ a průkazně se lišila od odrůdy ‚Kecskemeti‘. Vysoký obsah vápníku a hořčíku byl zaznamenán zvláště u ‚K – 81‘ a ‚Kecskemeti‘ patřícím druhu *S. bicolor*. V obsahu sodíku nebyly zjištěny průkazné rozdíly mezi hodnocenými genotypy.

Mezi hodnocenými genotypy byly zjištěny neprůkazné rozdíly v obsahu mikroprvků (tab. 4) v případě hliníku a železa. Vysoký obsah boru měl genotyp ,21/00'. Ve srovnání s ostatními genotypy měl velmi vysoký obsah manganu čírok ,K – 81'. Průkazně odlišný nejnižší obsah síry byl zjištěn u kontrolní odrůdy ,Latte'.

ZÁVĚR

Mezi hodnocenými 8 genetickými zdroji číroku z Genové banky ve VÚRV, v.v.i. Praha byly zjištěny průkazné rozdíly v době do vzejití a do metání, které se však již neprojeví jako statisticky průkazné v době do zralosti. Mezi jednotlivými genotypy a odrůdami nebyl nalezen statisticky průkazný rozdíl ve výšce a ve výnosu sušiny z ha. Nejvyšší obsah dusíku v sušině sklizené biomasy, významný pro poměr C:N, byl zjištěn u odrůdy ,GK Zsofia' a genotypu ,6 – bez taninu (cukrový)'. Průkazně se od nich lišila ,Latte' a ,Kecskemeti'. Vysoký obsah fosforu byl zjištěn u genotypů ,21/00' a ,SO – 29'. Kontrolní odrůda ,Latte' měla nejvyšší obsah draslíku, ale velmi nízký obsah fosforu. Neprůkazné rozdíly byly zjištěny v obsahu sodíku, hliníku a železa. Genetické zdroje představují určitý rezervoár kvality, která nemusí být obsažena v současných komerčních odrůdách. Důležité je zkoušet a nacházet nové potenciální materiály vhodné pro dané účely. Získané poznatky budou využity k detailnímu popisu shromážděných genetických zdrojů číroku a k jejich potenciálnímu praktickému využití v pěstování.

Poděkování: tato práce vznikla za podpory projektů MZe ČR Národní program konzervace a využívání genetických zdrojů rostlin a agro-biodiversity MZe č.j.: 20139/2006-13020 a MZE0002700604

LITERATURA

- CREAMER, N.G. - BALDWIN, K.R. 1999. Summer Cover Crops, *North Carolina Cooperative Extension Service*, <http://www.ces.ncsu.edu/depts/hort/hil/hil-37.html>
- DALIANIS, C. - PANOUTSOU, C. - DERCAS, N. 1996. Sweet and fiber sorghum, two promising biomass crops. In: *First European Seminar on Sorghum for Energy and Industry*, Toulouse, France, 1–3 April, pp. 173–176.
- MURSEC, B. – VINDIS, P. – JANZEKOVIC, M. – BRUS, M. – CUS, F. 2009. Analysis of different substrates for processing into biogas. *Journal of Achievements in Materials and Manufacturing Engineering*. 37(2):652-659
- SILVA, P.C.G. - FOLONI, J.S. S. - FABRIS, LUCIANA B. AND TIRITAN, C. S. 2009. Biomass and C/N ratio in intercrops of sorghum and maize with cover crops. *PESQ. AGROPEC. BRAS. [ONLINE]. 2009, VOL.44, N.11, PP. 1504-1512. ISSN 0100-204X. HTTP://DX.DOI.ORG/10.1590/S0100-204X2009001100019.*

Adresa autorov:

Ing. Jiří Hermuth, hermuth@vurv.cz

Ing. Dagmar Janovská, Ph.D., janovska@vurv.cz

Ing. Zdeněk Stehno, CSc., stehno@vurv.cz

Ing. Anna Prohasková, prohaskova@vurv.cz

DIAGNOSTIKA TOBAMOVÍRUSOV V PAPRIKE ROČNEJ A V RAJČIAKU JEDLOM POMOCOU DAS-ELISA METÓDY

DIAGNOSTICS OF TOBAMOVIRUSES IN PEPPER AND TOMATO BY DAS-ELISA METHOD

MARTINA HUDCOVICOVÁ, DANIEL MIHÁLIK, SVETLANA ŠLIKOVÁ, VALÉRIA ŠUDYOVÁ

Centrum výskumu rastlinnej výroby Piešťany

Tobamoviruses cause heavy yield losses for tomato and pepper worldwide. The detection of these viruses is becoming an important area in the plant pathology research. In our study we successfully used DAS-ELISA method for detection of TMV and ToMV in leaves of pepper and tomato. TMV was detected in 3 pepper samples and in 3 tomato samples inoculated in Zelseed and in all 4 pepper samples inoculated in CVRV. ToMV was detected in 14 tomato samples inoculated in Zelseed and in 3 tomato samples inoculated in CVRV. TMV and ToMV were not detected in non-inoculated tomato and pepper samples provided by Zelseed.

Key words: tobamoviruses, TMV, ToMV, pepper, tomato, ELISA

ÚVOD

Podiel pestovanej plodovej zeleniny na Slovensku tvorí 39% celkovej produkcie pestovanej zeleniny (Štatistický úrad SR, 2006). Paprika ročná (*Capsicum annum L.*) a rajčiak jedlý (*Solanum lycopersicum L.*) patria z hľadiska agrotechniky a hospodárskeho významu ku strategickým zeleninám na Slovensku aj inde vo svete. Prostredie, v ktorom rastliny žijú je charakterizované určitými vonkajšími podmienkami, ktoré sú pre ich rast, vývoj a rozmnožovanie priaznivé, alebo nepriaznivé. Nepriaznivý vplyv vonkajšieho prostredia môže spomaľovať životné funkcie rastlín, poškodzovať ich jednotlivé orgány, čo v krajnom prípade vedie k odumretiu rastliny. Jedným veľmi dôležitým faktorom ovplyvňujúcim životné pochody papriky a rajčiaka je napadnutie vírusmi rodu *Tobamovirus*.

Tobamovírusy patria medzi najrozšírenejšie vírusy na celom svete. Vyznačujú sa mimoriadne vysokou infekčnosťou a odolnosťou voči vonkajším vplyvom. Napadajú všetky druhy čeľade *Solanaceae*. Príznaky ochorenia sa začínajú prejavovať zosvetlením žil listov. Neskôr sa vytvárajú žlté škvrny na listovej čepeli, takže listy nadobúdajú žlté zafarbenie. Intenzita žltnutia listov varíruje od bledej až po citrónovú farbu. Typickými symptómami ochorenia sú mozaiky, u ktorých sa striedajú zelené, žlté a chlorotické oblasti, ktoré sa zafarbiajú dohnedá a nastáva nekróza. Napadnuté rastliny zaostávajú v raste, sú slabšie olistené, deformujú sa. Kvety vytvorené počas chlorotického štádia z väčšej časti opadávajú. Vytvorené plody sa vyvíjajú pomalšie, deformujú sa. Rastliny postupne odumierajú.

Ochorenia spôsobené tobamovírusmi zapríčiňujú závažné ekonomické straty v pestovaní papriky ročnej a rajčiaka jedlého najmä znížením ich úrody a kvality. Preto je veľmi dôležitá skorá, rýchla a presná diagnostika tohto ochorenia pomocou spoľahlivých metód. Cieľom našej práce je využitie sérologickej metódy DAS-ELISA (double antibody sandwich - enzyme-linked immunosorbent assay) a v ďalšej fáze práce využitie metódy RT-PCR (reverse transcription PCR) na spoľahlivú detekciu vírusov TMV (z angl. tobacco mosaic virus) a ToMV (z angl. tomato mosaic virus) v rastlinách papriky ročnej a rajčiaka jedlého.

MATERIÁL A METÓDY

Na DAS-ELISA analýzy sme použili súbor 40 genotypov papriky umelo infikovaných vírusom TMV (P1-P40) a súbor 40 genotypov rajčiaka umelo infikovaných vírusom ToMV (R1-R40). Oba súbory nám poskytla firma Zelseed, s.r.o., pričom 4 týždne po umelej infekcii boli z rastlín odobrané čerstvé listy. Listové vzorky boli odobrané aj zo súboru neinfikovaných 20 genotypov papriky (P41-P60) a 20 genotypov rajčiaka (R41-R60), taktiež poskytnuté firmou Zelseed, s.r.o.. Analyzovali sme aj listy 4 rastlín papriky a 4 rastlín rajčiaka z CVRV Piešťany (VÚRV Piešťany), a to 4 týždne po umelej infekcii vírusmi TMV resp. ToMV. Zo všetkých rastlín bolo odobrané po 0,1 g čerstvých listov a listy boli po odbere homogenizované pomocou tekutého dusíka. Homogenizovaný rastlinný materiál bol inkubovaný za občasného vortexovania v 2 ml extrakčného pufru po dobu 3 h na ľade, nasledovala centrifugácia 5 minút pri 10000 rpm a 4°C. Supernatant bol použitý na analýzy podľa pracovného postupu ELISA kitov firmy Bioreba na detekciu prítomnosti vírusov TMV a ToMV.

Špecifické rastlinné protilátky (IgG) sme 1000x zriedili v nanašacom pufru a pridali 200 µl do každej bunky ELISA platničky. Platničku sme tesne prekryli a vložili ju do vlhkého boxu. Nasledovala inkubácia pri 4°C cez noc, počas ktorej došlo k adsorpcii špecifických protilátok na povrch mikrotitračných buniek. Po vyprázdnení buniek sme bunky premyli 3-4 krát premývacím pufrom, odstránili sme všetku tekutinu vysušením platničky na obrúsky. Do buniek sme pridali po 200 µl z extraktu z každej vzorky – všetky vzorky boli nanašané v dvoch opakovaníach. Ako kontroly sme použili kontrolu pozitívnu a negatívnu dodané výrobcom. Pozitívnu kontrolu sme použili neriedenú a riedenú 1:10, 1:100 a 1:1000. Platničku sme tesne prekryli a vložili ju do vlhkého boxu. Nasledovala inkubácia pri 4°C cez noc, počas ktorej došlo k naviazaniu antigénu vírusu na rastlinné protilátky.

Platničku sme premyli postupom uvedeným vyššie. Enzýmový konjugát sme 1000x zriedili v kojugačnom pufrí a pridali po 200 μ l do bunky. Platničku sme tesne prekryli a vložili ju do vlhkého boxu. Nasledovala inkubácia pri 30°C 5 hodín, počas ktorej došlo k spájaniu - naviazaniu enzýmom označených protilátok. Platničku sme premyli postupom uvedeným vyššie. Substrát p-nitrofenyl fosfát sme rozpustili v substrátovom pufrí (1 mg/ml) a pridali po 200 μ l do bunky. Nasledovala inkubácia pri izbovej teplote (18-25°C) v tme. Po 30-120 minútach sme sledovali reakciu - farebná reakcia indikuje infikované vzorky. Vznik žltého sfarbenia sme hodnotili fotometricky pri 405 nm.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Sérologická metóda ELISA bola do rastlinnej virológie uvedená už v 70-tych rokoch (Clark a Adams, 1977) a stala sa široko využívanou metódou na detekciu a identifikáciu rastlinných vírusov vrátane tobamovírusov (Sevik a Kose-Tohumcu, 2011 a iní). Výhodou tejto metódy je jej jednoduchosť, nízke náklady, možnosť testovania veľkého počtu vzoriek a čiastočná automatizácia (Morrison, 1999). Nevýhodou metódy ELISA je možnosť krížovej reakcie medzi jednotlivými tobamovírusmi a ich antisérmi, ako aj nižšia citlivosť a presnosť. Preto sa nedávno na detekciu tobamovírusov začali používať aj moderné molekulárne metódy ako sú RT-PCR (Da Silva a kol., 2008), Multiplex RT-PCR (Kumar a kol., 2011), RT-LAMP (Yanhua a kol., 2010) a iné, ktorých výhodou je vysoká špecificita, presnosť a citlivosť, nevýhodou je často finančná náročnosť a komplikovanejší postup.

Tabuľka 1: Priemerné hodnoty absorbancie pri vzorkách: nc negatívna kontrola, s1 – s4 pozitívna kontrola (riedenia 1:1000, 1:100, 1:10 a neriedená), R1-R40 a P1-P40 infikovaný rajčiak a paprika (Zelseed, s.ro.), R41-R60 a P41-P60 neinfikovaný rajčiak a paprika (Zelseed, s.r.o.), R61-R64 a P61-P64 infikovaný rajčiak a paprika (CVRV).

	TMV	ToMV		TMV	ToMV		TMV	ToMV		TMV	ToMV
nc	0,0010	0,0030	R30	0,0010	0,0010	P24	0,0010	0,0015	R58	0,0010	0,0018
s1	0,0025	0,0095	R31	0,0010	0,0024	P25	0,0014	0,0010	R59	0,0010	0,0010
s2	0,0670	0,2230	R32	0,0010	0,0011	P26	0,0010	0,0010	R60	0,0018	0,0010
s3	0,3620	1,1865	R33	0,0018	0,0027	P27	0,0010	0,0014	P41	0,0010	0,0010
s4	0,4610	1,4280	R34	0,0010	0,0000	P28	0,0010	0,0010	P42	0,0010	0,0027
R1	0,0012	0,2730	R35	0,0010	0,0014	P29	0,0010	0,0021	P43	0,0010	0,0016
R2	0,0014	0,0470	R36	0,0010	0,0010	P30	0,0010	0,0010	P44	0,0012	0,0014
R3	0,0010	0,0010	R37	0,0012	0,0170	P31	0,0240	0,0010	P45	0,0010	0,0010
R4	0,0010	0,0023	R38	0,0010	0,0010	P32	0,0010	0,0010	P46	0,0010	0,0010
R5	0,0010	0,0010	R39	0,0010	0,0018	P33	0,0010	0,0010	P47	0,0013	0,0010
R6	0,0010	0,0010	R40	0,0010	0,0021	P34	0,0010	0,0027	P48	0,0010	0,0043
R7	0,0010	0,0012	P1	0,0010	0,0021	P35	0,0010	0,0016	P49	0,0010	0,0010
R8	0,0013	0,0380	P2	0,0010	0,0010	P36	0,0010	0,0010	P50	0,0010	0,0018
R9	0,0010	0,0010	P3	0,0010	0,0015	P37	0,0014	0,0010	P51	0,0014	0,0023
R10	0,0012	0,0580	P4	0,0010	0,0020	P38	0,0010	0,0018	P52	0,0014	0,0010
R11	0,0510	0,3250	P5	0,0640	0,0010	P39	0,0190	0,0010	P53	0,0010	0,0028
R12	0,0320	0,2140	P6	0,0010	0,0010	P40	0,0010	0,0010	P54	0,0015	0,0010
R13	0,0019	0,1440	P7	0,0010	0,0010	R41	0,0010	0,0023	P55	0,0012	0,0021
R14	0,0015	0,0800	P8	0,0010	0,0010	R42	0,0010	0,0010	P56	0,0010	0,0021
R15	0,0010	0,0010	P9	0,0010	0,0010	R43	0,0013	0,0010	P57	0,0013	0,0010
R16	0,0010	0,0010	P10	0,0010	0,0014	R44	0,0010	0,0010	P58	0,0015	0,0010
R17	0,0018	0,0043	P11	0,0010	0,0010	R45	0,0010	0,0010	P59	0,0010	0,0010
R18	0,0011	0,0010	P12	0,0010	0,0020	R46	0,0010	0,0014	P60	0,0010	0,0010
R19	0,0014	0,0320	P13	0,0013	0,0011	R47	0,0014	0,0010	R61		0,002
R20	0,0010	0,0010	P14	0,0015	0,0010	R48	0,0010	0,0021	R62		0,117
R21	0,0015	0,0920	P15	0,0010	0,0018	R49	0,0010	0,0010	R63		0,013
R22	0,0012	0,0010	P16	0,0010	0,0023	R50	0,0013	0,0010	R64		0,237
R23	0,0010	0,0010	P17	0,0011	0,0010	R51	0,0010	0,0021	P61	0,058	
R24	0,0010	0,0210	P18	0,0010	0,0028	R52	0,0018	0,0010	P62	0,014	
R25	0,0010	0,0470	P19	0,0010	0,0010	R53	0,0010	0,0010	P63	0,045	
R26	0,0010	0,0010	P20	0,0010	0,0010	R54	0,0010	0,0010	P64	0,006	
R27	0,0230	0,0080	P21	0,0010	0,0010	R55	0,0010	0,0014			
R28	0,0010	0,0010	P22	0,0010	0,0010	R56	0,0016	0,0010			
R29	0,0010	0,0010	P23	0,0011	0,0010	R57	0,0011	0,0020			

Výsledky našich analýz pomocou metódy DAS-ELISA (Tab. 1 – pozitívne vzorky sú zvýraznené) potvrdili prítomnosť vírusu TMV v troch vzorkách listov infikovanej papriky ročnej a v troch vzorkách infikovaného rajčiaka jedlého z firmy Zelseed, s.r.o. a vo všetkých štyroch vzorkách listov papriky ročnej infikovanej na

VÚRV Piešťany. Prítomnosť vírusu ToMV bola zistená v štrnástich vzorkách listov infikovaného rajčiaka z firmy Zelssed, s.r.o. a v troch vzorkách listov rajčiaka infikovaného na CVRV Piešťany (VÚRV Piešťany). Tri vzorky infikovaného rajčiaka (R11, R12 a R27) boli pozitívne na oba vírusy, bola teda zistená krížová reakcia, ktorej možnosť uvádza aj výrobca ELISA kitov. Krížovej reakcii možno predísť použitím monoklonálnej protilátky proti vírusu (Vinayarani a kol., 2011). V súbore 20 neinfikovaných papriek a 20 neinfikovaných rajčiakov nebola prítomnosť vírusov pomocou DAS-ELISA metódy zistená.

Neriedené pozitívne kontroly vykazovali priemernú absorbanciu 0,461 pri TMV a 1,428 pri ToMV, negatívne kontroly mali priemernú absorbanciu 0,001 pri TMV a 0,003 pri ToMV. Ako pozitívne boli hodnotené vzorky s priemernou absorbanciou vyššou ako 2-násobok priemernej absorbancie negatívnej kontroly (podľa Svoboda a kol., 2006) – pri TMV vyššou ako 0,002 a pri ToMV vyššou ako 0,006. Priemerná absorbancia vzoriek pozitívnych na TMV sa pohybovala v rozmedzí 0,006-0,064 a priemerná absorbancia vzoriek pozitívnych na ToMV sa pohybovala v rozmedzí 0,008-0,325, čo je porovnateľné s výsledkami iných autorov (napr. Vinayarani a kol., 2011; Sevik a Kose-Tohumcu, 2011). Bolo dokázané, že hodnoty absorbancie získané ELISou sú ovplyvňované rastovou fázou rastlín, počas ktorej sú vzorky odoberané (Cordoba-Selles a kol., 2007) a v ďalšom pokuse by sme chceli otestovať prítomnosť vírusov v rôznych časových intervaloch od umelej infekcie. V ďalšej fáze našej práce sa budeme snažiť o špecifickejšiu a citlivejšiu detekciu vírusov TMV a ToMV prostredníctvom genomickej analýzy, ktorá si vyžaduje identifikáciu vírusov na úrovni nukleových kyselín a to pomocou metódy RT-PCR.

ZÁVER

V práci sme dokázali vhodnosť DAS-ELISA metódy na diagnostiku vírusov TMV a ToMV v listoch papriky ročnej a rajčiaka jedlého. Stanovovanie vírusových ochorení pri zelenine je nevyhnutnosťou na určenie bezvírových materiálov v šľachtiteľskom procese. Podľa platných smerníc EÚ je nevyhnutná realizácia takýchto stanovení, zavedením týchto metodík sa zvyšuje konkurencieschopnosť slovenských šľachtiteľov aj v medzinárodnom meradle.

Podakovanie: Tato štúdia vznikla vďaka podpore v rámci Operačného programu Výskum a vývoj pre projekt: Prenos efektívnych postupov selekcie a identifikácie rastlín do šľachtenia (ITMS: 26220220142), spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

LITERATÚRA

- 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, 1977, s. 475-483.
- CODOBA-SELLES, M. C. - GARCIA-RANDEZ, A. - ALFARO-FERNANDEZ, A. 2007. Seed transmission of Pepino mosaic virus and efficacy of tomato seed disinfection treatments. *Plant Disease*, 91, 2007, s. 1250-1254.
- DA SILVA, R. M. - DE SOUTO, E. R. - PEDROSO, J. C. - ARAKAVA, R. - ALMEIDA, A. M. R. - BARBOZA, A. A. L. - VIDA, J. B. 2008. Detection and identification of TMV infecting tomato under protected cultivation in Paraná state. *Braz. Arch. Biol. technol.*, 51, 5, 2008, s. 903-909.
- KUMAR, S. - UDAYA SHANKAR, A. C. - NAYAKA, S. C. - LUND, O. S. - PRAKASH, H. S. 2011. Detection of Tobacco mosaic virus and Tomato mosaic virus in pepper and tomato by multiplex RT-PCR. *Letters in Applied Microbiology*, 53, 2011, s. 359-363.
- MORRISON, R. H. 1999. Sampling in seed health testing. *Phytopathology*, 89, 1999, s. 1084-1087.
- SEVIK, M. A. - KOSE-TOHUMCU, E. 2011. The ELISA analysis results in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seed health testing for Tobacco mosaic virus. *Žemdirbyste - Agriculture*, 98, 3, 2011, s. 301-306.
- SVOBODA, J. - ČERVENA, G. - RODOVA, J. 2006. First report of Pepper mild mottle virus in pepper seeds produced in the Czech Republic. *Plant Protection Science*, 42, 2006, s. 34-37.
- VINAYARANI, G. - MADHUSUDHAN, K. N. - DEEPAK, S. A. - NIRANJANA, S. R. - PRAKASH, H. S. 2011. Detection of mixed infection of Tobamoviruses in tomato and bell pepper by using RT-PCR and duplex RT-PCR. *Int. J. Plant Pathol.*, 2 (2), 2011, s. 89-95.
- YANHUA, L. - ZHIDE, W. - YUMEI, Q. - JIANMIN, M. - LILI, S. - FENGLONG, W. - JINGUANG, Y. 2010. Rapid detection of tobacco mosaic virus using the reverse transcription loop-mediated isothermal amplification method. *Arch. Virol.*, 155, 2010, s. 1681-1685.

STANOVENÍ ANTHOKYANŮ VE VZORCÍCH BAREVNÉ PŠENICE V PRŮBĚHU ZRÁNÍ ZRNA

ISOLATION OF ANTHOCYANINS IN PIGMENTED WHEAT DURING GRAIN DEVELOPMENT

JANA CHABINOVÁ, ONDŘEJ ZÍTKA, DALIBOR HÚSKA, BOŘIVOJ KLEJDUS, RENÉ KIZEK

Ústav chemie a biochemie, Agronomická fakulta, Mendelova univerzita v Brně

Extraction of anthocyanins from pigmented wheat grains and their analysis using HPLC/MS is described. Grain from six wheat lines differing in pigmentation was used in this study. Wheat grains were harvested every five days beginning 15th day post anthesis, ending once the grains reached physiologic maturity (40th day post anthesis), for a total six sampling dates. Anthocyanins were extracted with 10 ml acidified methanol (methanol and 1, 0 N HCl, 85:15 v/v) and shaking on Ika Ultra-Turrax® Tube Drive, for 2x29 min. The filtered extract were evaporated at 50 °C to dryness and redissolved in acidified methanol. Individual anthocyanins were separated and quantified by high-performance liquid chromatography (HPLC). Anthocyanin concentration increased rapidly during grain development and then decreased before maturity. Cyanidin-3-glucoside was the predominant anthocyanin in purple wheat. Delphinidin-3-glucoside is the principal one in blue wheat. Anthocyanins are considered to be physiologically active substances, whose importance in promoting health and reducing the risk of chronic disease has been documented. This means that the presence of wheat anthocyanins in pigmented wheat, can be a source of bioactive compounds for use in the food industry.

Key words: anthocyanins, blue wheat, purple wheat, extraction, HPLC, mass spectrometry

ÚVOD

Anthokyany jsou ve vodě rozpustné přírodní pigmenty, zodpovědné za červené, fialové až modré zabarvení květů, plodů a jiných částí rostlin. Aglykonová (necukerná) část anthokyanů se označuje jako anthokyanidin. Nejčastěji zastoupené sacharidy, které se vyskytují v anthokyanech jsou xylóza, arabinóza, rhamnóza, glukóza, galaktóza. Cukry mohou být acylovány organickými kyselinami. Nejběžnější acylační činidla jsou kyselina octová, malonová, p-kumarová, kávová, hydroxybenzoová. Mezi nejběžnější anthokyanidiny v rostlinných částech patří: pelargonidin, cyanidin, peonidin, delphinidin, petulidin a malvidin (Escribano-Bailón et al., 2004). Isolace anthokyanů z rostlinných matric je poměrně složitá díky jejich nestabilitě a zvýšené náchylnosti k degradaci (Giusti, Wrostad, 2003). Obecně platí, že anthokyany jsou stabilní při kyselém pH. Glykosilace a acylace sacharidů také zvyšuje stabilitu, proto jsou diglykosidy stabilnější než jejich odpovídající monoglykosidy. Při analýze je důležité kontrolovat teplotu, jelikož rychlost rozkladu anthokyanů stoupá se zvyšující se teplotou. Kromě toho také světelné záření urychluje odbourávání anthokyanů (Escribano-Bailón et al., 2004).

Funkce anthokyanů v rostlinách jsou shodné s obecnými vlastnostmi flavonoidů. Mezi jejich významné vlastnosti patří antioxidační aktivita, která hraje důležitou roli v prevenci kardiovaskulárních a nádorových onemocnění (Castaneda-Ovando et al., 2008). Byla prokázána jejich schopnost vázat těžké kovy, jako je železo, zinek a měď. Působí také jako induktory enzymů glutathion-S-transferázy (GST) a superoxid dismutázy (SOD) (Hosseinian et al., 2008).

Hlavními pigmenty v červené a žlutomouké pšenici jsou xantophyly, karotenoidy a flavony. Anthokyany jsou obsaženy v odrůdách pšenic s modrým aleuronem a purpurovým perikarpem. Cyanidin-3-glukosid byl nalezen jako hlavní anthokyan u pšenic s purpurovým perikarpem a jako druhý nejčastější u pšenic s modrým aleuronem. Delphinidin-3-glukosid je dominantní u pšenic s modrým aleuronem, kde zaujímá zhruba 41% z celkového obsahu anthokyanů. (Abdel-Aal, Hucl, 2003; Abdel-Aal et al., 2006; Hosseinian et al., 2008). Koncentrace anthokyanů prudce vzrůstá v průběhu zrání zrna, zatímco v době zralosti zrna poklesne (Knievel et al., 2009).

Anthokyany jsou polární molekuly, proto se pro extrakci obvykle používají vodné směsi ethanolu, methanolu a acetonu. Pro zvýšení jejich stability se do rozpouštědla přidává malé množství kyseliny (kys. trifluoroctvá, kys. chlorovodíková, kys. mravenčí, kys. octová) (Castaneda-Ovando et al., 2008; Chun Hu et al., 2007). Pro izolaci a identifikaci se v současné době nejčastěji používají metody vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) (Escribano-Bailón et al., 2004). V kombinaci s HPLC lze zvolit celou řadu detektorů. Giusti, Wrostad (2001, 2003) se ve svých publikacích zabývali UV-Vis metodami používanými pro charakterizaci a kvantifikaci anthokyanů. V současné době jsou však nejpoužívanějšími technikami pro jejich identifikaci tandemy HPLC-MS, HPLC-NMR (Castaneda-Ovando et al., 2008).

MATERIÁL A METODIKA

Chemikálie, standardy. Jako standard byly použity standardní roztoky antokyanů (cyanidin-3-glukosid, delphinidin-3-glukosid) od firmy Extrasynthese (Francie). Methanol a ostatní chemikálie byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich (St. Louis, MI, USA). Standardy byly připraveny navážením 1 mg sloučeniny do 100 ml methanolu a 1,0 M HCl, 85:15 v/v.

Reálné vzorky. Pro analýzy byly použity obilky barevných pšenic: UC66049 (modrý aleuron), Abissinskaja arrasajta (purpurový perikarp), Tchernaks Blaukörniger Sommerweizen /TBS/ (modrý aleuron), ANK - 28B (purpurový perikarp), Novosibirskaya 67 /N 67/ (červená obilka), Heroldo (bílá obilka). Vzorky byly získány z firmy Agrotest fyto, s.r.o. Kroměříž, které byly následně pěstovány v areálu Mendelovy univerzity v Brně. Byly odebrány vzorky obilek vždy 10., 15., 20., 25., 30., 35. a 40. den po objevení prašníků (*anthers*). Pro analýzu anthokyanů byly použity odběry 15. – 40. den. Obilky byly rozdrceny v třecí misce.

Extrakce. Pro extrakci byly vybrány dva homogenizační postupy: extrakce v laboratorní ultrazvukové lázni K-5LM (doba extrakce 60 min) a extrakce pomocí homogenizátoru Ika Ultra-Turrax® Tube Drive (2x29 min). Pro obě extrakce byly, jako rozpouštědla, použity vodné směsi methanolu (50: 50 v/v, 70:30 v/v, 90:10 v/v, methanol a 1,0 M HCl, 85:15 v/v). Objem solventu byl 10 ml. Pro optimalizaci metody byly použity vzorky zralých obilek i nezralých obilek. U všech vzorků u obou typů extrakce se zkoušely navážky 20 mg a 50 mg. Pro analýzu reálných vzorků byla vybrána extrakce pomocí homogenizátoru Ika Ultra-Turrax® Tube Drive (2x29 min.). Jako rozpouštědlo byl použit roztok methanolu a 1,0 M HCl, 85:15 v/v. Objem solventu 10 ml. Použité navážky obilek se pohybovaly v rozmezí od 0,05 - 0,14 g. Po extrakci byly vzorky přefiltrovány a odpařeny v proudu předehřátého (50 °C) dusíku za pomoci bezkontaktního systému. Odpařené vzorky byly až do provedení chromatografické analýzy skladovány ve tmě při teplotě 4 °C.

HPLC/MS. Pro izolaci a identifikaci anthokyanů bylo využito přístroje Agilent 1200 Series Rapid Resolution LC system (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). Přístroj je vybaven on-line odplynovačem, binární pumpou, autosamplermem a kolonovým termostatem. Detekce separovaných látek probíhala pomocí UV-Vis detektoru s fotodiodovým polem a MS detektoru Agilent Technologies MSD 1100 Single quad LC/MS. Pro separaci byla použita kolona Zorbax SB-C18 (30 x 2,0 mm; 1,8 µm velikost částic, Agilent Technologies, USA). Rychlost průtoku byla 0,7 l. min⁻¹. Separace probíhala při teplotě 40 °C. Gradientová eluce byla v čase 0 min 98 % vodné fáze, 0,5 min 95 % vodné fáze, 0,8 min 50 % vodné fáze, 1,8 min 98 % vodné fáze. Složení mobilní fáze bylo acetonitril/0,3 % kyselina mravenčí. Objem nástřiku byl 1-5 µl (ředění 1:100), 1 a 2µl (ředění 1:10) pro standardní roztok. Nástřik reálného vzorku byl v rozsahu 0,5-5µl. Pro identifikaci a kvantifikaci látek je MS detektor vybaven elektrosprejovou ionizací a specifické fragmenty jsou následně analyzovány pomocí kvadrupólového analyzátoru, přístroj pracoval v negativním modu. Parametry hmotnostního spektrometru byly: teplota plynu 350 °C, průtok plynu 13 l min⁻¹, tlak nebulizéru 50 psi, napětí na kapiláře 4000 V. Signál byl snímán v SIM modu při m/z → 463 pro delphinidin-3-glukosid a m/z → 447 pro cyanidin-3-glukosid.

VÝSLEDKY A DISKUZE

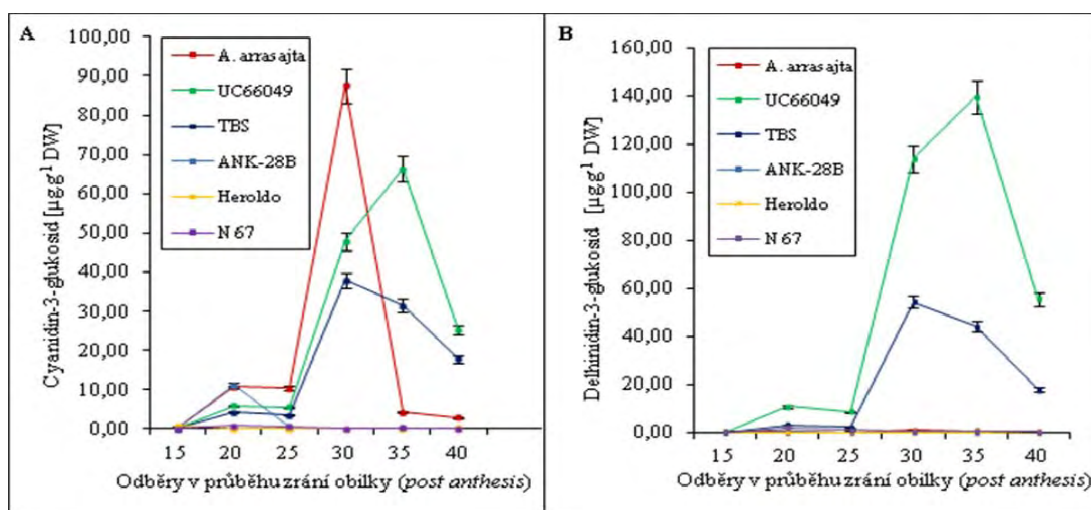
Optimalizace metody zpracování vzorku. Byla provedena optimalizace různých parametrů ovlivňujících extrakční proceduru, jako je složení rozpouštědla, extrakční čas, množství vzorku a metoda extrakce. Pro optimalizaci byly použity vzorky zralých obilek genotypů Heroldo, ANK-28B, UC66049 a nezralých obilek genotypu Abissinskaja arrasajta. Výsledné parametry optimalizace této metody jsou podrobně popsány v části M&M.

Optimalizace metody HPLC/MS. Pro optimalizaci chromatografické separace byly testovány různé koncentrace mravenčí kyseliny v rozmezí 0,1-0,6 % (v/v). Jako organická fáze byl testován metanol a acetonitril. Nejlepší separační účinnosti bylo dosaženo při použití 0,3 % (v/v) mravenčí kyseliny (solvent A) a acetonitrilu (solvent B). Pro hmotnostní detekci byly testovány různé teploty plynu v rozmezí 150 - 350 °C, průtoky plynu 3 - 13 l/min, tlaky 20 - 60 psi a napětí na kapiláře 100 - 5000 V. Optimalizované parametry chromatografické separace a hmotnostní detekce jsou uvedeny v kapitole M&M.

Změny obsahu anthokyanů v průběhu zrání obilky. U všech vzorků byl sledován obsah dvou anthokyanů (cyanidin-3-glukosid, delphinidin-3-glukosid). Při prvním odběru (15. den *post anthesis*) byly zjištěny nízké koncentrace anthokyanů u všech šesti genotypů pšenice. Ke změnám koncentrací docházelo v průběhu zrání. Odrůdy Heroldo (bílá obilka) a N 67 (červená obilka) obsahují nízké koncentrace obou sledovaných látek v průběhu celého zrání. Cyanidin-3-glukosid byl identifikován jako dominantní anthokyanin u pšenice s purpurovým perikarpem (Abissinskaja arrasajta, ANK-28) a jako druhý nejčastěji se vyskytující anthokyanin u pšenice s modrým aleuronem (UC66049, TBS), což odpovídá publikovaným výsledkům (Abdel-Aal, Hucl, 2003; Abdel-Aal et al., 2006; Hosseinian et al., 2008). Nejvíce zastoupeným antokyanem ve vzorcích modré pšenice je delphinidin-3-glukosid. UC66049 (modrý aleuron) dosahuje nejvyšších koncentrací obou sledovaných látek během 35. dne *post anthesis*, v době zralosti (40. den) však obsah anthokyanů prudce klesá. Trend poklesu je

podobný u genotypu TBS (modrý aleuron) s rozdílem, že zde je nejvyšší obsah anthokyanů zaznamenan během 30. dne *post anthesis*. Genotypy Abissinskaja arrasajta a ANK-28B (purpurový perikarp) obsahují nízké koncentrace delphinidin-3-glukosidu během celého zrání. Koncentrace cyanidin-3-glukosidu je u Abissinskaja arrasajta nejvyšší během 30. dne *post anthesis*, u ANK-28 během 25. dne. U vzorků pšenice s purpurovým perikarpem je rovněž patrný trend poklesu koncentrace cyanidin-3-glukosidu v době zralosti zrna.

Graf 1: Obsah cyanidin-3-glukosidu a delphinidin-3-glukosidu v analyzovaných vzorcích pšenice.



ZÁVĚR

Analýze přírodních biologicky aktivních látek v rostlinném materiálu by vždy měla předcházet komplexní optimalizace použitých extrakčních technik a separačních metod. Složitost přírodních matic a stopová množství analytů v nich obsažených vyžaduje aplikaci přesných a citlivých instrumentací. V neposlední řadě je nutná znalost maximálního množství informací o struktuře matrice a lokalizaci analyzovaných látek uvnitř matrice.

Anthokyaniny jsou považovány za fyziologicky aktivní látky, jejichž význam v podpoře zdraví a snížení rizika chronických onemocnění je vědecky doložen. Výskyt těchto látek v strategicky významné plodině pšenici by mohl významně přispět ke zlepšení zdraví konzumentů pokud by byly masově využívány v potravinářské výrobě.

Poděkování: Tato práce byla podpořena grantem IGA AF MENDELU č. TP 7/2011. Děkujeme firmě Agrotrest fyto, s.r.o. za poskytnutí vzorků osiva.

LITERATURA

- ABDEL-AAL EL S. M et al. 2006. Anthocyanin composition in black, blue, pink, purple, and red cereal grains. In *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 4696–4704.
- ABDEL-AAL EL S. M. - HUCL P. 2003. Composition and stability of anthocyanins in blue-grained wheat. In *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 2174–2180.
- CASTANEDA-OVANDO A. et al. 2008. Chemical studies of anthocyanins: A review. In *Food Chemistry*, vol. 113, 2008, no. 4, pp. 859-871
- ESCRIBANO-BAILÓN M. T. et al. 2004. Anthocyanins in cereals. In *Journal of Chromatography A*, vol. 1054, 2004, no. 1-2, pp. 129-141
- GIUSTI M. M. - WROSTAD R. E. 2001. Anthocyanins. Characterization and measurement of anthocyanins by UV – Visible spectroscopy. In *Current protocols in food analytical chemistry*, F1.2., pp. 1-13
- GIUSTI M. M. - WROSTAD R. E. 2003. Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems. In *Biochemical Engineering Journal*, vol. 14, 2003, no. 3, pp. 217–225
- HOSSEINIAN F. S et al. 2008. Measurement of anthocyanins and other phytochemicals in purple wheat. In *Food Chemistry*, vol. 109, 2008, no. 4, pp. 916-924
- CHUN HU et al. 2007. Anthocyanin characterization and bioactivity assessment of a dark blue grained wheat (*Triticum aestivum* L. cv. Hedong Wumai) extract. In *Food Chemistry*, vol. 104, 2007, no. 3, pp. 955-961
- KNIEVEL D. C. et al. 2009. Grain color development and the inheritance of high anthocyanin blue aleurone and purple pericarp in spring wheat (*Triticum aestivum* L.), In *Journal of Cereal Science*, vol. 50, 2009, no. 1, pp. 113-120

Kontaktní adresy:

Ing. Jana Chabinová, Mgr. Ondřej Zítka, Ing. Dalibor Hůska, prof. RNDr. Bořivoj Klejduš, Ph.D., doc. Ing. René Kizek, Ph.D., Ústav chemie a biochemie, Agronomická fakulta, Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika, Tel.: +420 545 133 275, e-mail: jana.chabinova@mendelu.cz, ondrej.zitka@mendelu.cz, dalibor.huska@mendelu.cz, borivoj.klejduš@mendelu.cz, rene.kizek@mendelu.cz

CHARAKTERIZÁCIA PROFILU MASTNÝCH KYSELÍN V RÔZNYCH ORGÁNOCH ZRELÝCH A NEZRELÝCH PŠENÍC

CHARACTERIZATION OF FATTY ACID PROFILE IN DIFFERENT PLANT BODIES OF MATURE AND IMMATURE WHEAT

TATIANA KLEMPOVÁ¹, DANIEL MIHÁLIK², KATARÍNA ONDREIČKOVÁ², MARCELA GUBIŠOVÁ²,
JÁN KRAIC², MILAN ČERTÍK¹

¹Fakulta chemickej a potravinárskej technológie STU, Bratislava

²Centrum výskumu rastlinnej výroby, Piešťany

Characterization of fatty acid profile in wheat during the growth and in separate plant bodies brings new information about metabolism of fatty acid with respect to physiological function of each plant body. Bodies such as leaf, footstalk and glume contain at least 48% of alpha-linolenic acid during the growth. On the other hand, mature leaf, footstalk and glume contain only 5-10% of these acid. The main fatty acid of grains is linoleic acid – approximately 55% during whole growing time. These information are very helpful in preparation of plants with modified lipid metabolism.

Key words: mastné kyseliny, lipidy, pšenica CY – 45, plynová chromatografia

ÚVOD

Pšenica je jednou z troch celosvetovo najvyužívanejších plodín spolu s kukuricou a ryžou (FAOSTAT). Mastné kyseliny sú majoritnou zložkou lipidických štruktúr každej bunky. Tieto štruktúry rozdeľujeme na dve základné skupiny – neutrálne (zásobné) a polárne (štruktúrne). Zásobné lipidické štruktúry sú triacylglyceroly, kde sa nachádzajú mastné kyseliny predovšetkým nasýtené a mononenasýtené. Hlavnou polárnou lipidickou štruktúrou sú fosfolipidy, ktoré sa nachádzajú v bunkových membránach. Fosfolipidy nachádzajúce sa v cytoplazmatickej membráne zložením mastných kyselín, ktoré sa v nich nachádzajú sú odpoveďou voči externému prostrediu, v ktorom sa bunka nachádza. Štúdium mastných kyselín nachádzajúcich sa v pšenici nám prináša komplexný pohľad, ako prebieha metabolizmus mastných kyselín v závislosti od rastového štádia ako aj od polohy rastového orgánu. Okrem toho je významným krokom pri príprave geneticky modifikovaných pšeníc pripravených za účelom získavania polynenasýtených tzv. ω -6 a ω -3 mastných kyselín.

MATERIÁLY A METÓDY

Všetky rastlinné materiály pšenice CY-45 boli získané zo zbierky Centra výskumu rastlinnej výroby Piešťany.

Príprava metylesterov mastných kyselín pre analýzu pomocou plynovej chromatografie

Do hrubostennej skúmavky so zábrusom sme navázili 20-100 mg rastlinného materiálu, ktorý sme v trecej miske zhomogenizovali s morským pieskom. Pridali sme 2 cm³ metanolickej HCl a 1 cm³ roztoku vnútorného štandardu kyseliny heptadekánovej v dichlórmetáne. Skúmavky sme vložili do termostatu vytemperovaného na 50°C na 3 hodiny. Po uplynutí času sme skúmavky vybrali z termostatu, ochladili a pridali 1 cm³ destilovanej vody a 4 cm³ hexánu. Skúmavky sme pretrepali a scentrifugovali (3000 ot., 5 minút). Hornú hexánovú vrstvu sme preniesli do odparovacej slzy a oddestilovali rozpúšťadlo na rotačnej vákuovej odparke. Získané metylestery mastných kyselín sme preniesli do 1 cm³ hexánu a analyzovali plynovou chromatografiou.

Analýza mastných kyselín pomocou plynovej chromatografie

Metylestery mastných kyselín boli merané plynovou chromatografiou prístrojom GC-6890 N (Agilent Technologies). Do kolóny DB-23 (50%-kyanopropyl-metylpolysiloxán, dĺžka 60 m, priemer 0,25 mm, hrúbka filmu 0,25 μ m) sa automaticky nastrekovalo 1 μ l vzorky metylesterov mastných kyselín, ktoré boli analyzované pri nasledovných podmienkach: nosný plyn – vodík, nástrek (teplota 230°C; prietok vodíka: 37 ml/min; split – 1:10), FID detektor (250 °C, prietok vodíka: 40 ml/min, prietok vzduchu: 450 ml/min), teplotný režim (150°C - 3 min; 150-175°C – 7,0°C/min; 175°C - 5 min; 175-195°C – 5,0°C/min; 195-225°C - 4,5°C/min; 225°C - 0,5 min; 225-215°C – 10°C/min; 215°C – 7 min; 215-240°C - 10°C/min; 240°C – 7 min). Záznamy boli vyhodnotené pomocou ChemStation

B0103 (Agilent Technologies) a kvantifikované na základe retenčných časov známych štandardov masných kyselín C4 – C24 (Sigma Aldrich, USA).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Jednotlivé rastliny boli rozdelené na šesť základných častí – koreň, stonka, list, zrno, pleva a ostne. Percentuálne zastúpenie najbežnejších masných kyselín v týchto orgánoch je uvedené v tabuľkách 1 a 2. V tabuľke č. 1 je uvedené porovnanie masných kyselín prítomných v zrelých pšeničných orgánoch. V tabuľke vidíme, že najbežnejšou masnou kyselinou vyskytujúcou sa v zrne je kyselina linolová (C 18:2, n-6) – 58%. Jej obsah sa počas dozrievania mení len veľmi málo, stúpa z hodnoty 54 na konečných 58%. Koreň je orgán, kde zastúpenie masných kyselín mení počas života rastliny najmenej výrazne, čo môžeme pripísať ako následok jeho funkcie, keďže slúži na dodávanie živín, pre rastlinu a odumiera ako posledný. Najvýraznejšie zmeny badáme v obsahu kyseliny alfa-linolénovej (C 18:3, n-3) a to v všetkých nadzemných častiach rastliny, ktoré sú v priamom styku s prostredím – stonka, list, ostne, pleva. Obsah tejto kyseliny až dramaticky klesá. Z priemernej hodnoty týchto orgánov 58% na priemernú hodnotu 7%. Tento poznatok je veľmi zaujímavý, z hľadiska ďalšieho fyziologického výskumu, aby sme mohli určiť akú funkciu zastáva práve táto masná kyselina pri ochrane rastliny pred vonkajším prostredím.

ZÁVER

Charakterizácia profilu masných kyselín počas rastu a v jednotlivých orgánoch pšenice môže priniesť množstvo nových poznatkov o fyziológii rastu a možnostiach rastliny ako sa brániť voči vplyvom životného prostredia. Je takisto prvým krokom pri príprave geneticky modifikovaných pšeníc s upraveným lipidickým profilom.

Podakovanie. 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.

Tabuľka 1: Percentuálne zastúpenie najbežnejších masných kyselín v zrelých orgánoch pšenice

Masné kyseliny	Orgány					
	zrno	stonka	list	koreň	pleva	ostne
C 16:0	21,37	31,34	45,98	26,97	30,25	27,94
C 18:0	1,73	11,26	7,71	10,49	11,66	12,03
C 18:1, n-9	11,66	21,09	10,54	16,64	14,47	11,87
C 18:1, n-7	2,19	0,97	0,87	3,48	1,26	1,31
C 18:2, n-6	57,99	25,22	16,37	30,62	31,71	34,88
C 18:3, n-3	3,84	5,64	10,14	3,42	5,13	6,28

Tabuľka 2: Percentuálne zastúpenie najbežnejších masných kyselín v nezrelých orgánoch pšenice

Masné kyseliny	Orgány					
	zrno	stonka	list	koreň	pleva	ostne
C 16:0	20,15	18,28	15,84	28,89	16,80	13,88
C 18:0	1,24	2,44	1,42	14,89	2,15	2,37
C 18:1, n-9	15,11	1,52	1,64	17,46	4,63	4,67
C 18:1, n-7	0,81	0,38	0,26	3,57	0,67	0,31
C 18:2, n-6	54,45	17,75	10,35	22,23	22,91	5,87
C 18:3, n-3	6,86	57,58	67,78	4,39	47,14	63,96

Zoznam autorov:

Ing. Tatiana Klempová – Oddelenie biochemickej technológie, Fakulta Chemickej a Potravinárskej Technológie STU, Radlinského 9, 812 37 Bratislava

Mgr. Daniel Mihálik, PhD – Centrum Výskum Rastlinnej Výroby, Bratislavská 122, 921 68 Piešťany

Mgr. Katarína Onreičková - Centrum Výskum Rastlinnej Výroby, Bratislavská 122, 921 68 Piešťany

Mgr. Marcela Gubišová - Centrum Výskum Rastlinnej Výroby, Bratislavská 122, 921 68 Piešťany

Doc. RNDr. Ján Kraic, PhD - Centrum Výskum Rastlinnej Výroby, Bratislavská 122, 921 68 Piešťany

Doc. Ing. Milan Čertík, PhD - Oddelenie biochemickej technológie, Fakulta Chemickej a Potravinárskej Technológie STU, Radlinského 9, 812 37 Bratislava

INFLUENCE OF FLUORANTHENE AND FLUROCHLORIDONE ON GROWTH AND PRODUCTION PROCESSES OF PEA

VLIV FLUORANTENU A FLUROCHLORIDONU NA RŮST A PRODUKČNÍ PROCESY HRACHU

MAREK KLEMŠ¹, JIŘÍ DOKOUPIL¹, KAMILA LÓNOVÁ¹, HELENA FIŠEROVÁ¹, MARIE KUMMEROVÁ², ZDENĚK ŠTĚPÁN¹, ALEŠ MACHÁLEK¹ a LADISLAV HAVEL¹

¹Department of Plant Biology, Faculty of Agronomy, Mendel University, Zemědělská 1, 613 00 Brno

²Institute of Experimental Biology, Faculty of Science, Masaryk University, Kotlářská 2, 611 37 Brno

The effects of fluoranthene (polycyclic aromatic hydrocarbon) and/or flurochloridone (inhibitor of carotenoid biosynthesis) in 0.5, 5 and 20 μM concentrations in the nutrient solution on the growth of pea plants (*Pisum sativum* L.), chlorophyll content and quantum yield of electron transport of PSII were studied. Both these xenobiotics decreased growth parameters at first in the roots and later in above ground parts of plants. Flurochloridone significantly decreased chlorophyll content and quantum yield of electron transport of PSII. In case of combined action of fluoranthene and flurochloridone in 5 μM concentrations were influenced the growth parameters, but were not significantly reduced parameters of photosynthesis of plants. Screening effects of fluoranthene and flurochloridone on pea plant growth and changes in the factors photoautotrophic disposition showed that xenobiotics affect plants in time sequence.

Key words: fluoranthene, flurochloridone, chlorophyll, pea

ÚVOD

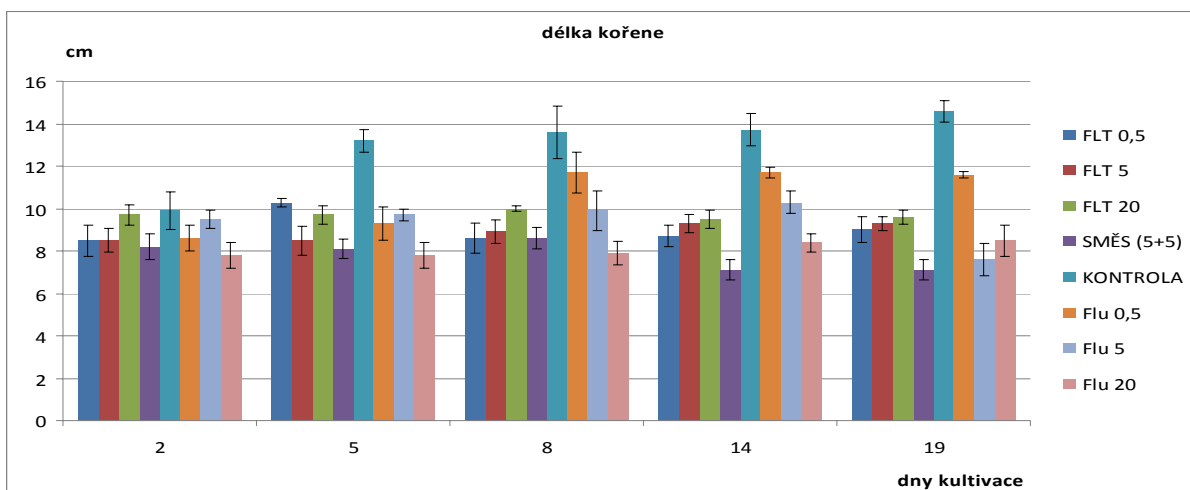
Cizorodé látky v prostředí ovlivňují růst a produkční schopnosti rostlin. Vyvolávají stres a s tím sekundárně spojené procesy inhibice růstu a při vysoké zátěži i nevratná poškození. Mezi xenobiotika interagující v energetických a růstových odezvách rostlin náleží fluoranthen (FLT, polycyklický aromatický uhlovodík, ovlivňuje fotosyntézu, KUMMEROVÁ et al. 2001) a flurochloridon (Flu, účinná látka některých herbicidů, inhibitor biosyntézy karotenoidů a ABA, KOWALCZYK-SHRÖDER a SANDMANN 1992). Tyto látky působí na rostliny i v relativně nízkých koncentracích poškozením jejich fyziologických funkcí. Cílem naší práce bylo studium ovlivnění růstu rostlin a procesů fotosyntézy pod vlivem působení herbicidů a organických polutantů na počátku vegetativního růstu. Experimenty byly zaměřeny na screening vlivu koncentrací xenobiotik nebo kombinace xenobiotik v živném roztoku na růstové parametry rostlin, obsah fotosynteticky aktivních pigmentů a kvantový výtěžek elektronového transportu PSII (Φ_{II}).

MATERIÁL A METODY

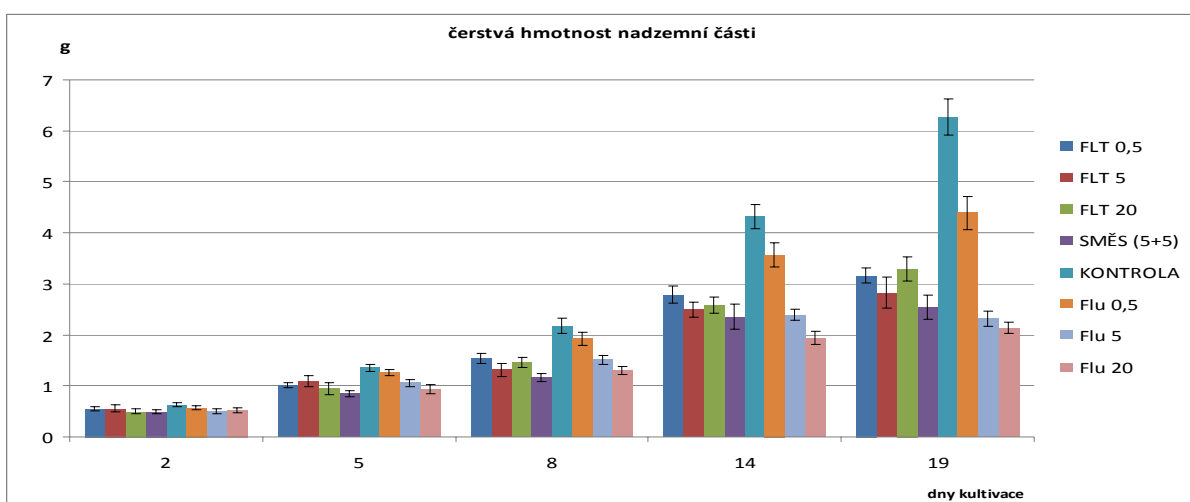
Rostliny hrachu odrůdy Oskar byly kultivovány v Richterově živném roztoku (RICHTER 1926) s fluoranthenem (0,5, 5 a 20 μM) nebo flurochloridonem (0,5, 5 a 20 μM) v řízených kultivačních podmínkách ve fytotronu (fotoperioda 16/8, teploty 24°C/16°C, relativní vzdušná vlhkost 65%). V termínech 2, 5, 8, 14 a 19 dní byly na rostlinách hodnoceny parametry – délka kořene, stonku, čerstvá hmotnost a sušina nadzemní části rostlin. Ve stejných termínech byly stanoveny obsahy chlorofylu „a“ a „b“ (na g čerstvé hmotnosti listu spektrofotometricky) a kvantový výtěžek elektronového transportu PSII (spektrofluorimetricky, LICHTENTHALER et al. 2005). Čtrnáctý a devatenáctý den kultivace byla provedena izolace intaktních chloroplastů (BRISKIN et al. 1987) pro stanovení obsahu chlorofylu a Φ_{II} .

VÝSLEDKY A DISKUZE

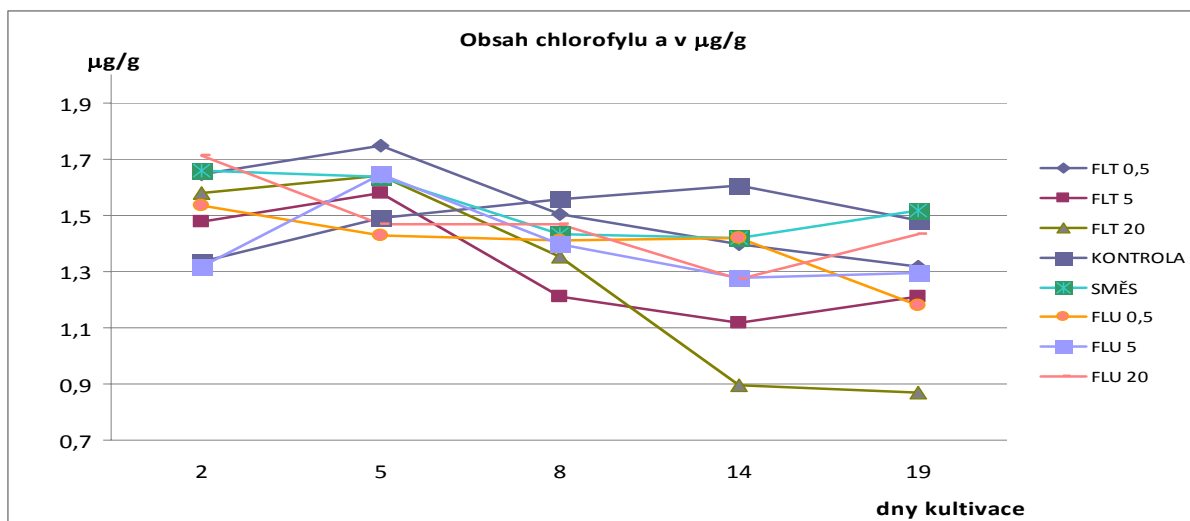
Z obsáhlého screeningu reakcí rostlin na výše uvedená xenobiotika bylo patrné, že ovlivňují růst jak kořenů tak nadzemní části rostlin. Inhibice růstu kořenů byla charakteristická pro všechny použité koncentrace i pro kombinaci v působení FLT a Flu na rostliny (graf č. 1). Statisticky průkazný rozdíl oproti kontrole byl potvrzen od pátého dne kultivace. Na nadzemní části rostlin byla tato statistická průkaznost potvrzena později od čtrnáctého dne kultivace a to jak pro délku stonku, sušinu nadzemní části nebo její čerstvou hmotnost (graf č. 2). S délkou kultivace se také významně snižoval obsah chlorofylu, charakteristické rozdíly od kontroly byly typické od osmého dne kultivace rostlin (graf č. 3) a s tím pozitivně korelovalo i snížení hodnoty Φ_{II} (graf č. 4). To bylo ještě výraznější po působení Flu. Obdobné analýzy fotoautotrofní dispozice na subcelulární úrovni tuto tendenci potvrdily. Kombinované působení FLT a Flu však snížení obsahu chlorofylu a kvantový výtěžek elektronového transportu PSII nezpůsobilo.



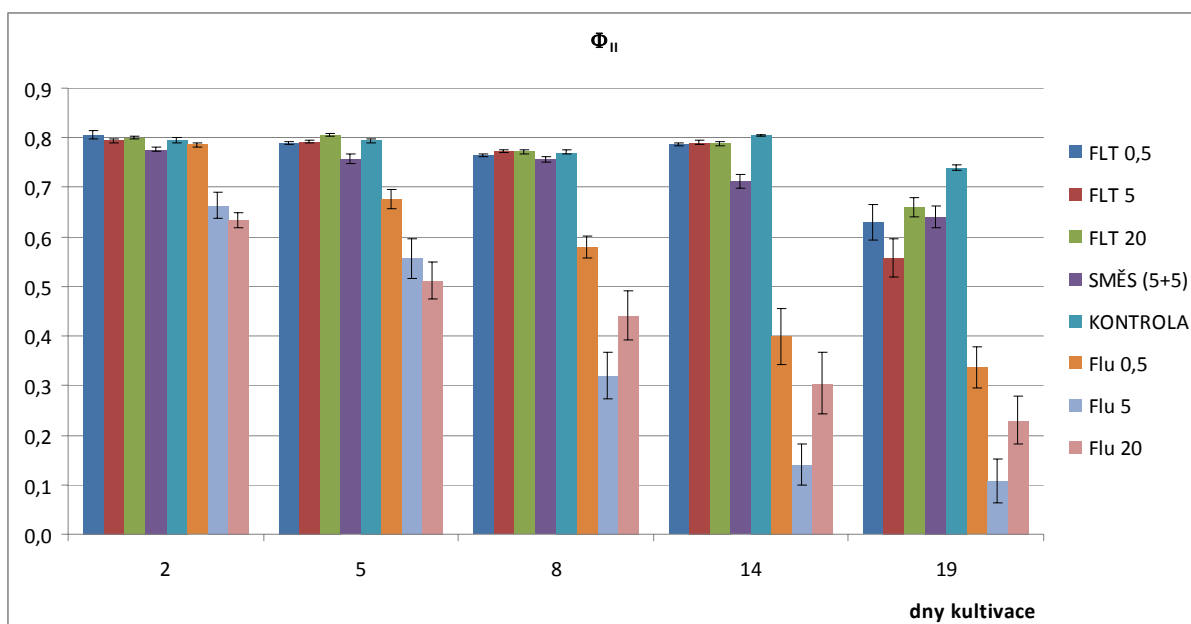
Graf 1: Délka kořene (cm) rostlin hrachu po kultivaci v přítomnosti FLT, Flu



Graf 2: Čerstvá hmotnost nadzemní části (g) rostlin po kultivaci v přítomnosti FLT, Flu



Graf 3: Obsah chlorofylu a v µg/g čerstvé hmotnosti po kultivaci v přítomnosti FLT, Flu



Graf 4: Kvantový výtěžek Φ_{II} rostlin po kultivaci v přítomnosti FLT, Flu

ZÁVĚR

Z výsledků je zřejmé, že xenobiotika přijatá rostlinami z živného roztoku ovlivnila nejprve růst kořenů a později růst nadzemní části rostlin a její bioenergetickou funkci. To je důsledkem translokace xenobiotik xylémem a tudíž opožděné distribuce těchto látek do listů. Charakteristické inhibice růstu prostřednictvím FLT byly již publikovány (KUMMEROVÁ and KMENTOVÁ 2004) a podporují naše výsledky. Rovněž ovlivnění obsahu pigmentů a snížení fotosyntetických aktivit odpovídá již dříve publikovaným pracím (KUMMEROVÁ et al. 2006).

Poděkování: Experimenty byly realizovány za finanční podpory grantu GAČR 522/09/0239.

LITERATURA

- BRISKIN D. P., LEONARD R. T., HODGES T. K. (1987): Isolation of the plasmamembrane – membrane makers and general-principles. *Methods Enzymol.* 148: 542 -558.
- KOWALCZYK-SHRÖDER S., SANDMANN G. (1992): Interaction of fluridone with phytoene desaturation of *Aphanocapsa*. *Pest. Biochem. Physio.*, 42: 7-12.
- KUMMEROVÁ, M. and KMENTOVÁ, E., (2004): Photoinduced toxicity of fluoroanthene on germination and early development of plant seedling. *Chemosphere* 26: 387-393.
- KUMMEROVÁ, M., KRULOVÁ, J., ZEZULKA, Š. and TRÍSKA, J. (2006): Evaluation of fluoroanthene phytotoxicity in pea plants by Hill reaction and chlorophyll fluorescence. *Chemosphere* 65 (3): 489-496.
- KUMMEROVÁ, M., KMENTOVÁ, E. and KOPTÍKOVÁ, J. (2001): Effect of fluoroanthene on growth and primary processes of photosynthesis in faba bean and sunflower. *Plant Production* 47 (5): 344-351.
- LICHTENTHALER H. K., BUSCHMANN C., KNAPP M. (2005): How to correctly determine the different chlorophyll fluorescence parameters and the chlorophyll fluorescence decrease ratio Rfd of leaves with the PAM fluorometer. *Photosynthetica*. 43: 379 - 393.
- RICHTER O. (1926): Beiträge zur Ernährungsphysiologie der Kulturgräser. I. Über das grosse Eisenbedürfnis der Reisepflanze (*Oryza sativa* L.) Sitz.- Ber. Akad. Wiss. 203-242.

SKRÍNING GENOTYPOV CÍCERA BARANIEHO (*CICER ARIETINUM* L.) POČAS VODNÉHO STRESU

SCREENING CHICKPEA (*CICER ARIETINUM* L.) GENOTYPES IN THE WATER STRESS

ELEONÓRA KRIVOSUDSKÁ¹, JANA FERENCOVÁ¹, MICHAELA BENKOVÁ²

¹ Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, Katedra fyziológie rastlín, Tr. A. Hlinku 2, 949 01 Nitra

² CVRV – VÚRV Piešťany, Génová banka SR, Bratislavská 122, 921 68 Piešťany

In year 2011 were performed vegetation pot trials experiments with four genotypes of chickpea (*Cicer arietinum* L.). The origin of cultivars was of Slovakia: genotyp „Alfa“, „Beta“ and „Slovak“. The cultivar „Irenka“ originated in the Czech Republic. The influence of water stress was tested on some physiological parameters (stomatal closure, relative water content in leaf, osmotic potential, free proline content and osmotic adjustment). Among tested genotypes, cultivars „Alfa“ (0,20 MPa) and „Irenka“ (0,19 MPa) showed the higher capacity for osmotic adjustment in the water stress.

Key words: water stress, free proline, osmotic adjustment, chickpea

Najdôležitejším abiotickým faktorom, ovplyvňujúcim rast a produkciu rastlín je voda. Jej zásoby v rastline kolíšu a sú dopĺňané nepravidelnými zrážkami, pričom sa často prejavuje ich nedostatok. V období sucha sa s ním rastliny musia vyrovnávať. Nedostatok vody sa preto môže prejavovať ako vážna príčina porúch v zložitých fyziologických a biochemických procesoch, prebiehajúcich vo vnútri rastlinného organizmu [8].

Jednou z najvýznamnejších a najvhodnejších strukovín a možno aj poľných plodín vôbec, pre teplé a suché až polosuché oblasti je cícer baraní. V takýchto oblastiach ostatné strukoviny trpia nedostatkom vody a sú viac napádané škodcami, ich úrodnosť a stabilita úrod silno klesá [3]. Keďže adaptácie rastlín na suchu predstavujú komplexnú vlastnosť celého organizmu, charakterizovanú súborom menšieho alebo väčšieho počtu znakov, podmienených viacerými génmi, ich realizácia bude závisieť aj od ontogenetického stavu rastlín, preto môže byť významné hľadať také interakcie stresového faktora a reakcií rastlín, ktoré umožnia expeditívne testovať odrody už v skorých rastových fázach [7].

MATERIÁL A METÓDY

Pri riešení stanovených úloh boli založené v roku 2011 vegetačné nádobové pokusy. Do nádob s objemom 10 ltr boli vysiate štyri genetické zdroje intermediálneho typu : Alfa, Beta, Slovák (SR), Irenka (ČR). Odroda „Alfa“ (1998) je skorá odroda, nízka so slabou intenzitou vetvenia. Lístok na liste je malý až stredný, listy sú blede - zelenej farby. V struku sú prevažne dve semená guľatého tvaru, po dozretí svetlo béžovej farby. Ďalšou odrodou je „Beta“ (1998) - stredne skorá odroda, nízka až stredne vysoká, so strednou intenzitou vetvenia. Lístok je veľký, listy sú zelenej farby. V struku sú prevažne dve semená, guľatého tvaru, po dozretí svetlo béžovej farby. Odroda „Slovák“ (1998) patrí k stredne skorým, stredne vysokým až vysokým odrodám so silnou intenzitou vetvenia. Lístok je malý, listy sú zelenej farby. V struku sú prevažne dve semená guľatého tvaru, po dozretí svetlo béžovej farby. „Irenka“ (1998) bola vyšľachtená z planého druhu, struk s 1–2 semenami, sfarbenými dohnedá, farba kvetu červeno-ružová.

Pri nástupe kvitnutia bol u polovice rastlín z každého genotypu simulovaný vodný stres pozastavením zálievky a zamedzením prístupu zrážok. Zvyšok rastlín slúžil ako kontrolné varianty, ktoré boli zalievané počas celého obdobia trvania vodného stresu.

Pomocou porometra Delta-T-Devices (Cambridge, England) sa realizovali v dopoludňajších hodinách merania difúznej vodivosti (g_c) listov.

Na dehydratovaných aj kontrolných rastlinách boli tiež sledované parametre ako je relatívny obsah vody v listoch (RWC), obsah voľného prolínu v listoch a osmotický potenciál (Ψ_s). Relatívny obsah vody v % bol stanovený gravimetricky na základe čerstvej hmotnosti sušiny listu, hmotnosti listu po štvorhodinovej saturácii a následnej hmotnosti sušiny listu [4].

Obsah voľného prolínu v listoch bol stanovený refraktometricky [2] a spektrofotometricky ninhydrínovou metódou. Osmotický potenciál (Ψ_s) vzorky listov bol stanovený psychrometrickým meraním použitím PsyPro analyzára (Wescor, USA).

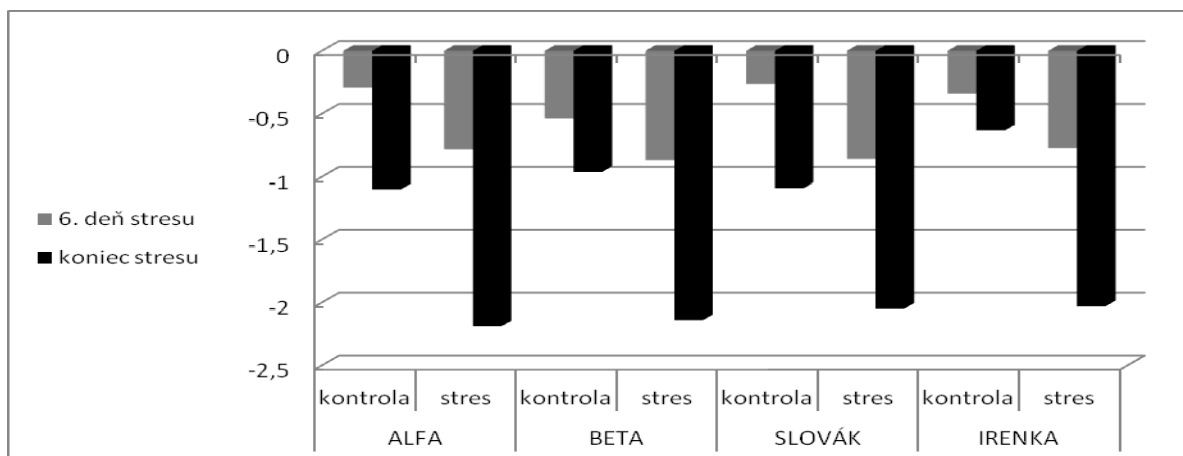
Na základe osmotického potenciálu listov kontrolných i dehydratovaných rastlín, prepočítaného na plne hydratovaný stav sme určili hodnotu osmotickej adjustácie [10]. Pre výpočet boli tiež potrebné údaje pre relatívny obsah vody v listoch (RWC) a korekciu ($B=18\%$) pre apoplastickú vodu [1].

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Okrem dvoch hlavných typov cícera baranieho „desi“ a „kabuli“, možno vyčleniť tretí typ cícera tzv. intermediálny s guľatými semenami podobnými hrachu, ktorý je menej rozšírený a vyskytuje sa hlavne

v strednej Európe. Sem patria aj všetky slovenské genotypy cícera [5], ktorým sme pri našich meraniach venovali pozornosť.

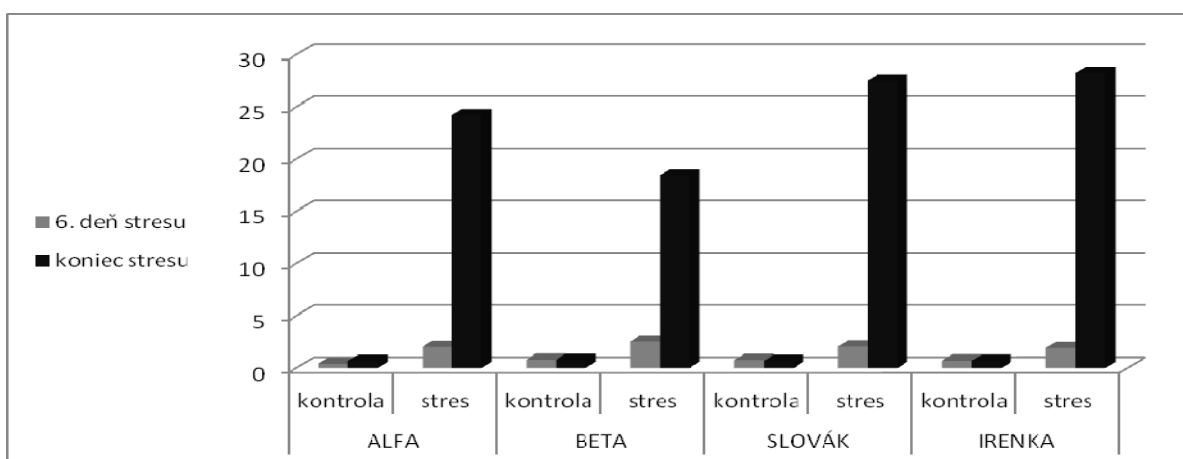
V rámci sledovania vodného režimu rastlín je jedným z najvhodnejších ukazovateľov relatívny obsah vody v rastline (RWC) a obsah vodného, či osmotického potenciálu. Pri hodnotení testovaných genotypov sme mohli v prvých dňoch dehydratácie sledovať nezmenenú reakciu na obsah vody. Po prvých piatich dňoch začal obsah RWC klesať a výraznejší pokles (pod 50%) bol zaznamenaný na 16. deň dehydratácie. Najvyšší obsah vody v listoch si zachoval genotyp Irenka (52,87%). Naopak najvýraznejšie za dané obdobie pokleslo RWC pri genotype Beta (45,35%). V súvislosti s poklesom RWC sa menili hodnoty osmotického potenciálu v rozpätí od -2,03 do -2,19 MPa (Obr.1).



Obrázok 1: Zmeny osmotického potenciálu v listoch cícera (MPa)

Aj reakcie prieduchov na vodný stres predstavujú jeden z dôležitých mechanizmov na ochranu rastlín. V závislosti od zmien vlhkosti vzduchu priebeh difúznej vodivosti listov kolísala. Úplné zatvorenie prieduchov nastalo na 10. deň vodného stresu.

Takmer univerzálnou reakciou rastlín na vodný deficit je akumulácia voľného prolínu [6]. Pri sledovaní metabolických zmien indukovaných vodným stresom sme jednoznačne zaznamenali nárast obsahu voľného prolínu (Obr. 2) v pletivách listov cícera. Vyššiu akumuláciu uvedeného ukazovateľa sme mohli sledovať pri genotype Irenka (28,25 $\mu\text{mol.g}^{-1}\text{ČH}$ v prepočte na 100 % RWC) a Slovák (27,49 $\mu\text{mol.g}^{-1}\text{ČH}$). O niečo nižší obsah daného osmoprotektanta bol pri odrode Alfa (24,22 $\mu\text{mol.g}^{-1}\text{ČH}$). Najnižšiu akumuláciu obsahu voľného prolínu sme zaznamenali pri odrode Beta, t. j. 18,47 $\mu\text{mol.g}^{-1}\text{ČH}$ v prepočte na 100 % RWC.



Obrázok 2: Obsah voľného prolínu v listoch cícera ($\mu\text{mol.g}^{-1}\text{ČH}$ v prepočte na 100 % RWC)

Jedným z významných mechanizmov tolerance plodín na sucho je osmotické prispôsobenie. Naše údaje možno porovnať so zisteniami Leporta [9], ktorý testoval rôzne genotypy cícera. Pri hodnotení osmotickej adjustácie dosiahol hodnoty od 0 do 1,30 MPa. V rámci našich meraní bola schopnosť osmotickej adjustácie v rozpätí 0,02 – 0,20 MPa. Najnižšia schopnosť prispôsobenia sa prejavila pri odrode Beta (0,02 MPa). Pri genotype Alfa (0,20 MPa) a Irenka (0,19) sme zistili takmer zhodnú schopnosť osmotického prispôsobenia. Využitie vhodných genotypov, so schopnosťou tolerovať sucho, patrí nielen k riešeniam, ktoré môžu priniesť významný ekonomický efekt, a tým i stabilitu úrod, ale aj ekologickú stabilitu prostredia.

ZÁVER

V pokusnom období roku 2011 boli uskutočnené nádobové vegetačné experimenty so štyrmi genotypmi cícera baranieho (*Cicer arietinum* L.). Pôvod testovaných genotypov bol zo Slovenska „Alfa“, „Beta“ a „Slovák“. Štvrtý genotyp „Irenka“ má pôvod z ČR. V rámci uvedených genotypov bol sledovaný účinok vodného stresu na vybrané fyziologické parametre (zatváranie prieduchov, relatívny obsah vody v listoch, osmotický potenciál, obsah voľného prolínu a následne aj osmotické prispôsobenie). Vyššiu schopnosť osmotickej adjustácie mali genotypy „Alfa“ a „Irenka“. V rámci sledovaných fyziologických meraní najlepšie parametre v tolerancii na sucho dosiahol genotyp „Irenka“ (ČR), ktorý môže poslúžiť pri výbere genotypov vhodných pre podmienky sucha.

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. ISSN: 0011-183X
- BATES, L. S. – WALDREN, R. P. – TEARE, J. D., 1973. Rapid determination of proline for water stress studies. In *Plant and Soil*, roč. 39, 1973, s. 205 – 207.
- BELUSKÝ, J. 2004. Pestovanie malotonážnych strukovín. In *Naše pole*, roč. 41, 2004, č. 3, s. 44. ISSN 1336-2666
- BOYER, J. S. 1968. Measurements of the water status of plants. *Annual Review of Plant Physiology*, 1968, 9: p. 351 – 363.
- GÁBORČÍK, N. - PASTUCHA, E. 1996. Hodnotenie svetového sortimentu cícera baranieho na Slovensku. In *Cícer baraní na Slovensku – stav a perspektívy*. Banská Bystrica: Výskumný ústav trávnych porastov a horského poľnohospodárstva, 1996, s. 42 – 44.
- HARE, P.D. 1999. Proline synthesis and degradation: a model system for elucidating stress-related signal transduction. In *Journal of Experimental Botany*, 1999, 50, 413-434. ISSN 0022-0957
- KOSTREJ, A. et al. 2000. Funkčné parametre produkčného procesu obilnín v meniacich sa podmienkach prostredia. Nitra : SPU, 2000. 110 s. ISBN 81-9974-41.
- KINCL, M. - KRPEŠ, V. 2000. Základy fyziologie rostlin, Praha: Montanex, 220 s. ISBN 9788023983753.
- LEPORT, L. - TURNER, N.C.- FRENCH, R.J.- BARR, M.D. - DUDA,R.- DAVIES, S.L.- TENNANT, D. SIDDIQUE, K.H.M. 1999. Physiological responses of chickpea genotypes to terminal drought in a Mediterranean- type environment. In *European Journal of Agronomy*, 1999, 11, 279-291. ISSN 1161-0301
- 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., Ing. Jana Ferencová, Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, Katedra fyziológie rastlín, Tr. A. Hlinku 2, 949 01 Nitra, e-mail: eleonora.krivosudska@uniag.sk
Ing. Michaela Benková, PhD. CVRV Piešťany, Génová banka SR, Bratislavská 122, 921 68 Piešťany, e-mail: benkova@vuvr.sk

SROVNÁNÍ VÝSLEDKŮ TESTOVÁNÍ *IN VITRO* ROSTLIN ČESNEKU KUCHYŇSKÉHO NA PŘÍTOMNOST VIRŮ ODLIŠNÝMI METODAMI

COMPARING THE RESULTS OF *IN VITRO* TESTING PLANTS OF GARLIC FOR PRESENCE VIRUSES BY DIFFERENT METHODS

MARTINA KUDĚLKOVÁ, JANA ČECHOVÁ, HANA SASKOVÁ

Mendelova univerzita v Brně, Zahradnická fakulta v Lednici, Mendeleum – ústav genetiky

The experiment was focused on present *Potyvirus* by garlic (*Allium sativum* L.). 100 plants of garlic were tested of present Onion yellow dwarf virus (OYDV) and Leek yellow stripe virus (LYSV). DAS-ELISA and RT-PCR were used for detection. The young leaves of garlic cultivated *in vitro* were used for testing. The results have proved a higher sensitivity of RT-PCR method. OYDV was present in 20% by ELISA and 36% by RT-PCR. LYSV was present in 39% by ELISA and 66% by RT-PCR.

Key words: garlic, Leek yellow stripe virus (LYSV), Onion yellow dwarf virus (OYDV), ELISA, RT-PCR

ÚVOD

Virové choroby česneku jsou rozšířené po celém světě, způsobují vážné ztráty na výnosu plodin a zhoršení jejich kvality (Bai a kol., 2010; Klukáčková a kol., 2004). Česnek bývá infikován komplexem dvou a více virů, často se jedná o zástupce rodů *Potyvirus* a *Carlavirus* (Barg a kol., 1994). K zjištění přítomnosti virů v česneku může být použita sérologická metoda DAS-ELISA (Double antipody sandwich - Enzyme - linked immunosorbent assai) (Leisova-Svobodova a Karlova-Smekalova, 2011) či molekulárně genetická metoda RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction) (Dovas a kol., 2001; Klukáčková a kol., 2004).

MATERIÁL A METODIKA

Pokus byl realizován na Zahradnické fakultě v Lednici, na Mendeleu – ústavu genetiky. Bylo testováno 100 rostlin česneku kultivovaných *in vitro*. Výchozí materiál pro založení *in vitro* pocházel z oddělení Genové Banky VÚRV v Olomouci a sloužil pro práci na projektu NAZV QH71228: Ozdravení domácích genotypů česneku za účelem jejich uchování metodou kryokonzervace. Práce sledovala přítomnost virů Leek yellow stripe virus (LYSV) a Onion yellow dwarf virus (OYDV). Rostliny byly kultivovány na médiu Murashige, Skoog s přidavkem rostlinných regulátorů (benzyladenin - 0,5 mg.l⁻¹; α-naftyloctová kyselina - 0,1 mg.l⁻¹; kyselina gibberelová - 0,5 mg.l⁻¹). Jako metody testování byly zvoleny DAS-ELISA a RT-PCR. Testovací materiál byly v obou případech mladé listy rostlin kultivovaných *in vitro*.

Testování ELISA

Testování bylo provedeno podle metodiky firmy Bioreba. Vzorky listových čepelí byly homogenizovány poloautomatickým homogenizérem a k testování byly použity sady testovacích sér (IgG + konjugát) pro jednotlivé viry a lyofilizované pozitivní a negativní kontrolní vzorky od firmy Bioreba. Absorbance vzorků byla měřena při 405 nm. Podrobný popis testování metodou ELISA lze najít v publikaci Smekalová a kol., 2010.

Testování RT-PCR

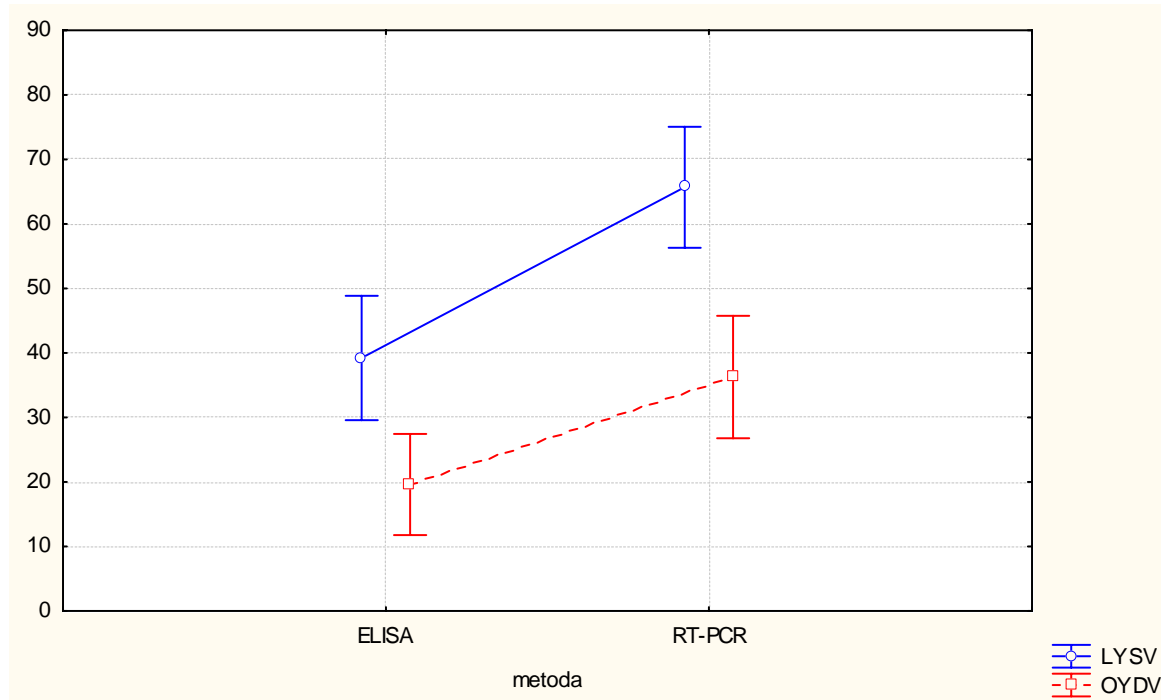
Pro izolaci rostlinné RNA byl použit izolační kit - Spectrum™ Plant Total RNA Kit (Sigma) dle přiloženého protokolu od výrobce. Koncentrace vyizolované RNA byla měřena přístrojem Modulus™ Single Tube Fluorometer 9200-000 (TURNER BIOSYSTEMS), pro měření bylo použito barvivo RiboGreen (Invitrogen). Pro izolaci RNA následovala reverzní transkripce (RT). Při RT byly vzorky přepsány na cDNA (complementary DNA) za užití enzymu reverzní transkriptázy M-MLV RT (RevertAid™ Reverse Transcriptase, Fermentas). Prvním krokem RT byla denaturace (5 min 95 °C), vzorek byl tvořen 12 μl HPLC vody, 2 μl celková RNA a 0,5 μl random primer p(dN)₆ (Roche). Následovala syntéza cDNA (10 min 25 °C a 1 hod. 42 °C) před kterou bylo do vzorků přidáno 10 μl reakční směsi obsahující 5 μl RT pufru (5x, dodávaný s reverzní transkriptázou, Fermentas); 1,25 μl (10mM) dNTPs (deoxynucleotide triphosphates) (Invitek); 0,5 μl reverzní transkriptázy (200 U/μl, Fermentas), zbytek do 10 μl tvořila HPLC voda. 2 μl získané cDNA byly použity do polymerázové řetězové reakce (PCR). Celkový objem reakční směsi činil 25 μl a obsahoval: HPLC vodu, 0,5 μl (10mM) dNTPs (Invitek); 0,75 μl (10 μM) každého primeru; 2,5 μl pufru (10x; dodávaný s polymerázou); 0,25 μl polymerázy (2 U/ μl; DyNAzyme™ II DNA Polymerase - Finnzymes). Sekvence primerů dle Leisova-Svobodova a Karlova-Smekalova (2011) jsou uvedeny v tabulce 1. Teplotní režim PCR reakce byl následující: 94 °C 5 min.; následovalo 40 cyklů 94 °C 30 sek., 47 °C 30 sek., 72 °C 45 sek.; po cyklování následovalo 72 °C 7 minut. Po PCR byly vzorky elektroforeticky separovány na 2% agarózovém gelu. Pro obarvení vzorků bylo použito barvivo GelRed (Biotium), které bylo přidáno přímo do gelu při rozvařování v dávce 5 μl na 100 ml gelu.

Tabulka :1 Sekvence primerů

Onion yellow dwarf virus	OYDV81F: 5'-TTTAGCACGTTACGCATTCGA-3'
Onion yellow dwarf virus	OYDV81R: 5'-TTACCATCCAGGCCAAACAA-3'
Leek yellow stripe virus	LYSV81-410F: 5'-AAGAACACCAGTTAGAGCGCG-3'
Leek yellow stripe virus	LYSV81-535R: 5'-TGCCTCTCCGTGTCCTCATC-3'

VÝSLEDKY A DISKUSE

Bylo testováno 100 rostlin česneku kuchyňského kultivovaného *in vitro* na přítomnost dvou potyvírů OYDV a LYSV. K detekci virů byla zvolena sérologická metoda DAS-ELISA a molekulárně-genetická metoda RT-PCR. Pro zpracování výsledků byl použit statistický program Statistica 9 (StatSoft), LSD test ($p=0,05$). Výsledky testování metodou ELISA ukazují, že vir OYDV byl přítomen téměř ve 20% testovaných vzorků, kdežto výsledky metody RT-PCR detekovaly až 36% pozitivních rostlin (graf č. 1). Vir LYSV byl přítomen dle metody ELISA ve 39% vzorků, metodou RT-PCR bylo však zjištěno 66% pozitivních rostlin (graf č. 1). U obou těchto virů byl mezi metodami statisticky průkazný rozdíl. Z výsledků tedy vyplývá, že metoda RT-PCR byla schopna odhalit vyšší procento infekcí v testovaném souboru. Molekulárně-genetická metoda je dle experimentu citlivější, než sérologická. Výsledky podporují i další práce na danou problematiku. Leisova-Svobodova a Karlova-Smekalova (2011) testovaly 50 genotypů česneku, přičemž vzorky byly odebírány z rostlin brzy na jaře. Jejich výsledky ukazují přítomnost OYDV v 54% testovaných rostlin detekční metodou ELISA, metodou SYBR Green real-time RT-PCR bylo pozitivních 100%. U viru LYSV bylo ELISA metodou zjištěno 42% pozitivních rostlin, metodou real-time RT-PCR 62% pozitivních rostlin. Dovas a kol. (2001) testovali mladé listy česneku na přítomnost OYDV a LYSV. Metodou ELISA byly tyto viry detekovány v koncentraci 10^{-1} a 10^{-2} , metodou RT-PCR byly zjištěny již v koncentraci 10^{-6} . Práce od Klukáčková a kol. (2004) prokazuje i rozdílnost výsledků při užití různých primerů. V práci testovali rostliny česneku na přítomnost OYDV. Materiál pocházel z Genové banky, supermarketu a od českých pěstitelů. Dle ELISA testu byl vir přítomen v 92%, 100% a 53%. Pro RT-PCR byly použity různé primery - OYD-UP/OYD-DW- zde byl vir detekován v 88%, 100% a 53% a primery OL2/OR1 – zde byla přítomnost viru 0,2%, 0% a 0%. V tomto případě byla metodou ELISA detekována vyšší přítomnost OYDV. Může to být způsobeno tím, že RT-PCR je sice citlivější metoda, ale nemusí být schopna rozeznat různé kmeny jednoho viru. Dalším důvodem mohou být špatně navržené primery.



Graf 1: Výsledky testování česneku na přítomnost OYDV a LYSV metodami ELISA a RT-PCR

ZÁVĚR

V experimentu bylo testováno 100 rostlin česneku kuchyňského (*Allium sativum* L.) kultivovaného *in vitro*. Byla testována přítomnost virů Onion yellow dwarf virus a Leek yellow stripe virus. Jako detekční metoda byla

zvolena DAS-ELISA, jako zástupce sérologických metod, a RT-PCR, jakožto molekulárně-genetická metoda. Dle výsledků se RT-PCR projevila jako citlivější metoda, jelikož odhalila více virových infekcí. U viru OYDV detekovala 36% pozitivních jedinců, u viru LYSV se jednalo o 66% pozitivních jedinců. Metoda ELISA odhalila přítomnost OYDV pouze u 20% jedinců a přítomnost LYSV u 39% jedinců. Metodu RT-PCR lze doporučit pro další testování virů OYDV a LYSV v česneku.

Poděkování: Práce byla uskutečněna za finanční podpory interního grantového projektu č. 14/2011/591 Interní grantové agentury ZF MENDELU v Brně a projektu NAZV QH71228: Ozdravení domácích genotypů česneku za účelem jejich uchování metodou kryokonzervace.

LITERATURA

- BAI Y., ZHANG W., LI X., SHEN Y., GAO Y., FAN G., GENG H., MENG X. (2010): *Advances in Research of Garlic Virus Diseases*, Journal of Northeast Agricultural University (English Edition) Vol. 17 No. 2 85-92.
- BARG E., LESEMANN D. E., VETTREN H. J., GREEN SK (1994): *Identification, partial characterization, and distribution of viruses infecting Allium crops in south and southeast Asia*, Acta Horticult 358: 251–258.
- DOVAS C. I., HATZILOUKAS E., SALOMON R., BARG E., SHIBOLETH Y., KATIS N. I. (2001): *Comparison of Methods for Virus Detection in Alliums pp.*, Journal of Phytopathology 149, 1-7, ISSN0931-1785.
- KLUKÁČKOVÁ J., NAVRÁTIL M., VESELÁ M., HAVRÁNEK P., ŠAFÁŘOVÁ D. (2004): *Occurrence of Garlic Viruses in The Czech Republic*, Acta fytotechnica et zootechnica, Vol. 7, 2004, Special Number, Proceedings of the XVI. Slovak and Czech Plant Protection Conference organised at Slovak Agricultural University in Nitra, Slovakia.
- SMÉKALOVÁ K., STAVĚLÍKOVÁ H., DUŠEK K. (2010): *Distribution of viruses in the garlic germplasm collection of the Czech Republic*, Journal of Plant Pathology 92 (1), 273-274.
- LEISOVA-SVOBODOVA L., KARLOVA-SMEKALOVA K. (2011): *Detection of Garlic Viruses Using SYBR Green Real-time Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction*, Journal of Phytopathology 159:429-434

Adresa autorov:

Ing. Martina Kudělková, Ing. Jana Čechová, Ing. Hana Sasková, Valtická 337, 691 44 Lednice, Česká republika;
martina.kudelkova@mendelu.cz

GENETICKÁ TRANSFORMÁCIA *RUBUS FRUTICOSUS* L. A *VACCINIUM CORYMBOSUM* L. POMOCOU *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS*

AGROBACTERIUM TUMEFACIENS-MEDIATED GENETIC TRANSFORMATION OF *RUBUS FRUTICOSUS* L. AND *VACCINIUM CORYMBOSUM* L.

MIROSLAVA LATEČKOVÁ, GABRIELA LIBIAKOVÁ, JANA MORAVČÍKOVÁ, ALENA GAJDOŠOVÁ

Ústav genetiky a biotechnológií rastlín SAV, Nitra

Increasing demand for berry fruits on the world market evokes necessity to create new genotypes with improved attributes which are determined by their use as fruit crops, medicinal or landscape ornamental ground cover plants. Classical breeding is in fruit trees limited by their long reproductive cycle. Genetic engineering could ensure relatively quick acquiring of desired traits together with keeping of positive attributes of cultivar, what is in classical breeding of highly, heterozygous trees very time-consuming. Incorporation of exogenous DNA into crops by use of *Agrobacterium tumefaciens* is promising transformation technique which is, however, dependent on successful plant regeneration from transformed cell. In *Vaccinium* and *Rubus* spp. is genetic transformation and regeneration of transgenic plants considerably limited till now what is mostly caused by high sensitivity of their cells and tissues to selection antibiotics commonly used in genetic transformation.

Key words: *in vitro*, berry fruits, plant transformation

ÚVOD

Za posledné desaťročie boli dosiahnuté zásadné pokroky pri *in vitro* regenerácii mnohých ekonomicky významných rastlín. Vytvorili sa tým predpoklady na začlenenie explantátových kultúr do šľachtiteľskej a poľnohospodárskej praxe. Rastlinné pletivové kultúry v kombinácii s metódami genetického inžinierstva sú schopné prekonať niektoré nedostatky klasického šľachtienia rastlín. Môžu tak poskytnúť nové možnosti pre špecifické vylepšenie a produkciu nových kombinácií žiadaných genetických vlastností. Základnou podmienkou pre úspešnú aplikáciu genetického inžinierstva pri drobnom ovocí je účinná adventívna regenerácia *in vitro*.

Vypracovanie systému účinnej genetickej transformácie pre genetické zlepšenie drobného ovocia by mohlo v budúcnosti umožniť prenos génov pre zvýšenie rastlinnej rezistencie k hubovým ochoreniam, chladovej tolerancie, vývin partenokarpických plodov, atď. Predmetom záujmu je najmä prenos a expresia antifungálnych génov vzhľadom na ich potenciál nahradiť aplikáciu fungicídov v produkčnom systéme bobuľového ovocia. Získané transgénne rastliny môžu byť ďalej rozmnožované konvenčnými propagačnými metódami, čo umožní získať veľké množstvo transgénnych rastlín v relatívne krátkom čase.

Pri ovocných drevinách je genetická transformácia a následná regenerácia transgénnych rastlín zatiaľ limitovaná len na niekoľko druhov alebo genotypov. Napriek značnému pokroku v rastlinnom genetickom inžinierstve pri iných plodinách, sú informácie o genetickej transformácii drobného ovocia zriedkavé a dostupné transformačné postupy pri druhoch rodu *Rubus* a *Vaccinium* neúčinné a nespoľahlivé. Dostupných je len niekoľko prác týkajúcich sa genetických transformácií *Rubus* sp. a *Vaccinium* sp. (Kokko a Karenlampi, 1998; Zeldin., 2002; Mezzetti a i., 2004; Song a Sink, 2004, Hancock a i., 2008).

Cieľom práce je vypracovanie účinného systému pre transformáciu a regeneráciu *Rubus* sp. a *Vaccinium* sp. pomocou *Agrobacterium tumefaciens*.

MATERIÁL A METÓDY

Rastliny *Rubus fruticosus* L. a *Vaccinium corymbosum* L. dopestované v *in vitro* podmienkach boli použité ako zdroj explantátov (Gajdošová a i., 2007) pre transformačné experimenty. Na transformáciu listových diskov a listových stopiek z *in vitro* rastlín boli použité kmene *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404, C58 a AGL0 obsahujúce binárny vektor pTS2 a pCAMBIA 1304. Bakteriálne kmene boli kultivované v tekutom LB médiu s antibiotikami (25 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ rifampicín, 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ kanamycín, 25 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ streptomycín) cez noc pri teplote 27 °C. Do pripravenej bakteriálnej suspenzie, ktorá bola riedená v pomere 1:20 (LBA4404), 1:40 (C58) bolo pridaných 100 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ acetosyringonu pre lepšiu priľnavosť baktérii k rastlinným pletivám. Listy a listové stopky boli inkubované v bakteriálnej suspenzii 10 minút (listy) a 60 minút (listové stopky). Následne boli explantáty 2 dni ko-kultivované v tme. Potom boli explantáty štyrikrát premyté, osušené na sterilnom filtračnom papieri a prenesené na regeneračné médium. Pre regeneráciu *Rubus fruticosus* L. bolo použité kultivačné médium MS s obsahom 1 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ TDZ a 0,05 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ IBA. Ako selekčné antibiotiká boli použité kanamycín v koncentrácii 5 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$, geneticín (G-418) v koncentrácii 2-5 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ alebo hygromycín v koncentrácii 2 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Pre elimináciu *A. tumefaciens* z kultúry bol použitý cefotaxim a karbenicilín obe v koncentrácii 250 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Po dvoch týždňoch kultivácie bola koncentrácia selekčných antibiotík zvýšená na dvojnásobné množstvo. Pri transformácii *Vaccinium corymbosum* L. boli transformované pletivá kultivované na kultivačnom médiu WPM s obsahom 2 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ TDZ a 0,2 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ IAA s pridaním antibiotík 2 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ geneticínu (G-418) a 300 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ cefotaximu. Na podporu regenerácie výhonkov bolo do média pridaných 250 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ spermidínu. Ku každému pokusu bola založená pozitívna (kultivačné médium bez pridaní antibiotík) a negatívna kontrola (rovnaké kultivačné

médium ako pre transformované pletivá). Histochemická detekcia GUS aktivity bola u oboch odrôd uskutočnená podľa Jeffersona a kol. (1987).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Genetická transformácia *Rubus fruticosus* bola dosiahnutá použitím všetkých testovaných kmeňov *A. tumefaciens*. Na regeneračnom médiu s 2 mg.l⁻¹ hygromycínu (pCambia1304), resp. 3 mg.l⁻¹ G 418 (pTS2) sme dosiahli tvorbu kalusu, pričom 51.5% kalusov bolo GUS-pozitívnych. Regenerácia výhonkov nebola dosiahnutá. Počas regenerácie potenciálne transgénnych výhonkov *Rubus fruticosus* L. odroda 'Čačanska bestrna' boli pri kultivácii explantátov viaceré problémy. Prvým problémom bola vysoká produkcia fenolických látok explantátmi, ich difúzia do kultivačného média a nekróza pletív. Podobný jav popísali Rout a i. (1999), ktorí predokladali, že môže byť spôsobený oxidáciou polyfenolov z povrchu explantátov. Odporúčali pridať do kultivačného média PVP (polyvinyl pyrrolidon) alebo kyselinu citrónovú, prípadne častejšiu subkultiváciu na čerstvé médium. V našich experimentoch prídanie kyseliny citrónovej (50 mg.l⁻¹) a kultivácia explantátov vo väčších nádobách eliminovali produkciu fenolov. Transformované pletivá ale často nekrotizovali, alebo na rozdiel od pozitívnej kontroly, indukovali veľké kalusy, bez následnej regenerácie výhonkov. Prídanie dusičnanu strieborného a sodium tiosulfátu (v pomere 1:4) znížilo nekrozu pletív, ale nemalo pozitívny vplyv na regeneráciu výhonkov z kalusov. Testovaním vplyvu cytokinínov (TDZ a BAP) na regeneračný potenciál transformovaných pletív bolo konštatované, že typ a koncentrácia cytokinínu pravdepodobne nie sú príčinou obmedzenej regenerácie výhonkov. Lopez-Noguera a i. (2009) dosiahli prídanim spermidínu (250 mg.l⁻¹) v kombinácii so sodium tiosulfátom (60 μmol.l⁻¹) významné zlepšenie regenerácie výhonkov po transformácii listov marhule.

Na genetickú transformáciu *Vaccinium corymbosum* L., odroda 'Berkeley' boli použité tri rôzne kmene *A. tumefaciens* – LBA 4404, C58, AGL0, v kombinácii s plazmidom pTS2. Z dosiahnutých výsledkov vyplynulo, že explantáty sú schopné regenerovať výhonky v prípade všetkých troch kmeňov na WPM médiu doplnenom o rastové látky a selekčné antibiotiká geneticín (2 mg.l⁻¹) a cefotaxim (300 mg.l⁻¹). Najlepšie výsledky boli dosiahnuté transformáciou pletív kmeňom *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404, kedy rovnako ako u iných autorov (Kokko a Kärenlampi, 1998; Song a Sink, 2004) bola pozorovaná regenerácia transgénnych výhonkov, avšak účinnosť transformácie bola veľmi nízka. Pri transformácii pomocou zvyšných dvoch kmeňov dochádza k postupnej nekrotizácii pletív a tvorba výhonkov zatiaľ nebola pozorovaná.

ZÁVER

Na základe dosiahnutých výsledkov sme dospeli k záveru, že najvhodnejšie médium pre adventívnu organogézu odrody *Rubus fruticosus* L. 'Čačanska bestrna' je MS médium s koncentráciou 1 mg.l⁻¹ TDZ a 0,05 mg.l⁻¹ IBA. Na tomto médiu bolo dosiahnuté vyššie percento regenerovaných výhonkov na listových stopkách (46 %), v porovnaní s listami (22 %). Transformované pletivá na selekčných médiách indukovali kalusy, na ktorých bola detekovaná GUS histochemická aktivita na 51,5 % kalusov. Na žiadnom kaluse nebola zaznamenaná regenerácia transgénnych výhonkov. Najlepšie výsledky pri transformácii *Vaccinium corymbosum* L. odroda 'Berkeley' boli dosiahnuté pomocou kmeňa *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404. Použitím tohoto kmeňa boli indukované transgénne výhonky, ale ich indukcia bola veľmi nízka. V experimentoch je potrebné naďalej pokračovať, aby sa zaistila vyššia efektívnosť transformácie.

Podakovanie: Práca bola vypracovaná s podporou Grantovej agentúry VEGA projekt č. 2/0040/11.

LITERATÚRA

- GAJDOŠOVÁ, A. – OSTROLUCKÁ, M.G. – LIBIAKOVÁ, G. – ONDRUŠKOVÁ, E. 2007. Protocol for micropropagation of *Vaccinium vitis-idaea* L. *Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits*. In Jain, S. M. and Häggman H. (eds.), Springer, Dordrecht, The Netherlands, 2007. ISBN 978-1-4020-6351-0, pp. 447 - 464.
- HANCOCK, J.F. (Ed.). 2008. *Temperate fruit crop breeding, Germplasm to genomic*. Hardcover: Springer, 2008. ISBN 978-1-4020-6906-2, 460 p.
- JEFFERSON, R.A. – KAVANAUGH, T.A. – BEVAN, M.W. 1987. GUS fusions: β-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. In *EMBO Journal*, vol. 6, 1987, pp. 3901 – 3907.
- KOKKO, H.I. – KÄRENLAMPI, S.O. 1998. Transformation of arctic bramble (*Rubus arcticus* L.) by *Agrobacterium tumefaciens*. In *Plant Cell Reports*, vol. 17, 1998, pp. 822 – 826.
- LOPEZ-NOGUERA, S. – PETRI, C. – BURGOS, L. 2009. Combining a regeneration-promoting ipt gene and site-specific recombination allows a more efficient apricot transformation and the elimination of marker genes In *Plant Cell Reports*, vol. 28, no. 12, 2009, pp. 1781 - 1790.
- MEZETTI, B. - LANDI, L. - PANDOLFINI, T. – SPENA, A. 2004. The *DefH9-iaaM* auxin-synthesizing gene increases plant fecundity and fruit production in strawberry and raspberry. In *BMC Biotechnik*, 2004, vol. 4, pp.1 - 10.

- ROUT, G.R. – MOHAPATRA, A. – JAIN MOHAN, S. 2006. Tissue culture of ornamental pot plant: A critical review on present scenario and future prospects. In *Biotechnology Advances*, vol. 24, 2006, pp. 531-560.
- SERRES, R.A. – ZELDIN, E.L. – McCOWN, B.H. 1997. Applying biotechnological approaches to *Vaccinium* improvement. In *Acta Horticulturae*, vol. 446, 1997, pp. 221 – 226.
- SONG, G-Q. – SINK, K.C. 2004. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.). In *Plant Cell Rep*, vol. 23, 2004, pp. 475 – 484.
- ZELDIN, E.L. 2002. Tolerance to the herbicide glufosinate in transgenic cranberry (*Vaccinium macrocarpon* Ait.) and enhancement of tolerance in progeny. In *Soc Hortic. Sci.*, vol. 127, 2002, pp. 502 – 507.

Adresa autorov:

Ing. Miroslava Latečková; RNDr. Gabriela Libiaková, CSc.; Ing. Jana Moravčíková, PhD.; RNDr. Alena Gajdošová, CSc. – Ústav genetiky a biotechnológií rastlín SAV, Akademická 2, P.O.Box 39A, 950 07 Nitra, e-mail: miroslava.lateckova@savba.sk

DIAGNOSTIKA *RAMULARIA COLLO-CYGNI* V SEMENÁCH JAČMEŇA POMOCOU REAL-TIME PCR

DIAGNOSTICS OF *RAMULARIA COLLO-CYGNI* IN BARLEY SEED USING REAL-TIME-PCR

PAVEL MATUŠINSKY¹, LEONA LEIŠOVÁ-SVOBODOVÁ², JOZEF GUBIŠ³, MARTINA HUDCOVICOVÁ³, LENKA KLČOVÁ³, MARCELA GUBIŠOVÁ³, PAVEL MAŘÍK⁴, LUDVÍK TVARŮŽEK¹, VĚRA MINAŘIKOVÁ¹

¹Agrotest fyto, s.r.o. Havlíčkova 2787, 767 01 Kroměříž, Česká republika

² Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i. Drnovská 507, 161 06 Praha 6 – Ruzyně, Česká republika

³Centrum výskumu rastlinnej výroby Piešťany, Bratislavská cesta 122, 921 68 Piešťany, Slovenská republika

⁴Výzkumné centrum SELTON, s.r.o., Stupice 24, 250 84 Sibiřina, Česká republika

Ramularia collo-cygni (RCC) is a pathogen of spring and winter barley which causes disease Ramularia leaf spot (RLS). The aim of this study was to identify the location of RCC in the grain using quantitative methods for detection of pathogen based on real time PCR. PCR primers and a TaqMan probe were designed to target RCC-specific DNA sequence. After washing, kernels were dissected into lemma, pericarp, testa, endosperm and embryo which were individually tested by real time PCR. *Ramularia* DNA was detected in the highest amount in lemma, and occurred in lower amounts in the pericarp, embryo and in the water used for washing the kernels also. The results showed that RCC does not penetrate through the testa into the endosperm. It was also confirmed that the level of seed contamination is not the main factor influencing symptom expression. Key words: Ramularia leaf spot, molecular diagnosis, real-time PCR, seed-borne diseases

ÚVOD

Ramularia collo-cygni (Sutton et Waller) (RCC) je hubový patogén napádajúci jarný a ozimný jačmeň (*Hordeum vulgare*), ktorý spôsobuje ochorenie známe ako ramulariová listová škvrnitosť (RLS) s charakteristickými nekrotickými škvrnami na listoch. Príznaky sa zvyčajne objavujú počas neskorej fázy rastu hostiteľskej rastliny. Pri vysokom napadnutí, RLS postupuje veľmi rýchlo a znižuje množstvo a kvalitu zrna (Newton a kol., 2010).

Kým Frei a kol. (2007) preukázali, že ozimný jačmeň je dôležitým zdrojom inokula pre jarný jačmeň a že patogén sa môže šíriť z ozimného na jarný jačmeň, existuje celý rad aj iných možných zdrojov inokula, vrátane ďalších trávnatých hostiteľov, ako sú ovos, pšenica, raž a pýr (Hus, 2004). RCC sa môže prenášať aj semenom (Havis a kol., 2006; Frei, 2007, 2009), čo sa potvrdilo aj použitím PCR metódy. Havis a kol. (2006) predpokladá, že semenom prenosná RCC má vážny dopad na pestovanie jačmeňa. Predchádzajúce štúdie ukázali, že RCC infikuje rastliny cez semeno a môže byť prítomná v semene, aj keď na infikovanej rastline nie sú žiadne viditeľné príznaky (Nyman a kol., 2009).

Infekcia osiva je spôsob, ktorým sa choroba rozširuje v priebehu sezóny a potenciálne do nových oblastí. Niektoré semenom prenosné patogény jačmeňa môžu prežiť iba v rastúcich rastlinách alebo zozbieraných semenách (napr. *Ustilago nuda* alebo *Pyrenophora graminea*) (Black a kol., 2006). Vo všeobecnosti platí, že podľa spôsobu prenosu môžeme prenos chorôb semenom rozdeliť do dvoch kategórií. Bola popísaná prítomnosť spór patogéna *Tilletia tritici* v obalových vrstvách pšenice, *P. graminea* a *Pyrenophora teres* v oplodí jačmeňa (Babadoost, 1997) ale tiež napr. *Ustilago nuda* v embryu, kedy je kontrola semien náročnejšia. Presná lokalizácia patogéna RCC v semene doposiaľ nebola identifikovaná.

Cieľom tejto štúdie bolo identifikovať lokalizáciu RCC v zrne pomocou kvantitatívnej detekcie patogéna metódou real-time PCR.

MATERIÁL A METÓDY

Odber biologického materiálu (semien jačmeňa jarného) bol vykonaný na dvoch miestach Českej republiky (Kroměříž a Lužany), v rokoch 2009 a 2010 (ďalej označené ako KM09, KM10 a LU09, LU10). Rozbor semien bol uskutočnený pri 10 semenách každej z piatich odrôd (tabuľka 2) namočením do sterilnej destilovanej vody po dobu 24 hodín pri izbovej teplote. Semená boli rozobrané na jednotlivé časti: plevica, oplodie, osemenie, endosperm a embryo, ktoré boli individuálne zvážené a umiestnené samostatne do mikroskúmavky. Prítomnosť RCC na povrchu semena bola zisťovaná z 30 semien jednotlivých testovaných odrôd miešaním v 2 ml vody počas 5 min., vzorka bola následne odstredená pre získanie peletu v mikroskúmavke. Až do izolácie DNA, boli vzorky skladované pri - 30 °C.

Extrakcia DNA z mycélia RCC a ostatných testovaných hubových patogénov (nezobrazené) zoškriabaných z Petriho misiek bola uskutočnená homogenizáciou v kvapalnom dusíku, a následne bola celková genomická DNA extrahovaná pomocou DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Nemecko). DNA zo semien jačmeňa (100 mg na vzorku) a ich jednotlivých častí bola extrahovaná obdobným spôsobom.

Real-time PCR reakcie boli prebiehali v 25 µl reakčnom objeme zloženom z: 1x PCR pufor, 4 mm MgCl₂, 100 µM každého dNTP, 1,25 U AmpliTag Gold polymerázu (Life Technology, USA), 0,3 µM každého priméru,

0,2 μM TaqMan MGB sondy pre patogény a hostiteľské rastliny a 250 ng templátovej DNA v 5 μl . Real-time PCR bola vykonaná v ABI PRISM 7000 termocykléri za nasledovných reakčných podmienok: 10 min na 95 °C, potom 40 cyklov pri 95 °C po dobu 15 sekúnd a 60 °C po dobu 1 min.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

V práci sme zisťovali prítomnosť RCC v semenách a ich častiach jačmeňa siateho f. jarná odobratých z poľných podmienok na lokalitách Kroměříž a Lužany počas v rokoch 2009 a 2010. Po následnej separácii jednotlivých častí semena a vykonaní real-time PCR sme zistili, že najvyššia koncentrácia RCC DNA sa vyskytovala v plevici (0,000342 pg 100 ng⁻¹ z celkovej DNA). Hladina koncentrácie ramulárovej DNA boli nižšie v oplodí, embryu a vo výluhu z povrchu semien a zanedbateľné v osemení a endosperme (tabuľka 1). V analyzovaných vzorkách na prítomnosť RCC sme pomocou kvalitatívnej PCR zistili v obalových vrstvách zrna (plevica a oplodie) prítomnosť iných semenom prenosných druhov patogénov, ako je *P. teres*, *Cochliobolus sativus*, *Microdochium nivale* var. *majus* a *M. nivale* var. *nivale*. *C. sativus* a v jednom prípade bola tiež zistená prítomnosť *M. nivale* var. *nivale* v embryu. Pri ostatných sledovaných patogénoch (*Fusarium graminearum*, *F. culmorum* a *F. avenaceum*) nebola zistená ich prítomnosť v žiadnej izolovanej časti zrna, resp. slabý výskyt bol zaznamenaný pri *F. poe* v oplodí a plevici a *P. graminea* v plevici (výsledky neuvedené v práci).

Táto práca sa zaoberala dôležitosťou prenosu RCC semenom počas infekcie RLS v poľných podmienkach. Naše zistenia sú v zhode s výsledkami predchádzajúcich štúdií (Havis a Oxley 2006, Frei 2009, Nyman a kol. 2009) a naznačujú, že RCC DNA sa vyskytuje v klíčiacich listoch rastlín vysiatych z infikovaných semien (výsledky neuvedené). To potvrdzuje, že RCC môže byť semenom prenosná. DNA hubových patogénov je možné detegovať pomocou molekulárnych metód, aj keď nie sú viditeľné príznaky ochorenia, pričom ani obsah v listoch nemusí práve zodpovedať intenzite napadnutia a symptómom choroby na rastline RLS.

Podľa našich pozorovaní, keď boli v roku 2009 vysiate semená s priemernou kontamináciou semien 0,000055 pg 100 ng⁻¹ z celkovej DNA na oboch lokalitách, príznaky RLS boli veľmi silné. Naopak, o rok neskôr v Kroměříži (KM10) neboli pri jačmeni viditeľné príznaky RLS, aj keď bol výsev semien s mierne vyššou RCC kontamináciou než v predchádzajúcom roku (tabuľka 1). Toto môže byť brané ako indikácia, že v roku 2010 patogén bol prítomný v Kroměříži (KM10) v jeho endofytickej fáze, pričom neprišlo ku prechodu do nekrotrofickej fázy prejavujúcej sa charakteristickými symptómami na rastline. Toto zistenie súhlasí s tvrdením Nyman a kol. (2009), že RCC sa môže prenášať semenom z generácie na generáciu bez toho, aby sa dali vizuálne detegovať symptómy choroby na rastline

ZÁVER

V práci bolo potvrdené, že patogén *Ramularia collo-cygni* spôsobujúci ramulárovú škvrnitosť na jačmeni je semenom prenosný. V rastline môže pretrvávajúť v latentnej forme a prenášať sa do nasledujúcej generácie bez toho, aby boli na rastlinách pozorované vizuálne symptómy. Tento fakt sťažuje ochranu a výber zdravého osiva. Práve tu môžu zohrávať molekulárne metódy detekcie na úrovni DNA významnú úlohu. Pri zisťovaní lokalizácie patogéna RCC v infikovaných semenách porovnaním rôznych častí semena (plevica, oplodie, osemenie, endosperm a embryo) bolo pomocou real-time PCR detegované najvyššie množstvo patogénnej DNA v plevici. Tiež bolo preukázané, že úroveň infekcie osiva nie je hlavným faktorom ovplyvňujúcim symptómy ochorenia na rastline.

Podakovanie: Táto práca bola podporovaná Ministerstvom poľnohospodárstva Českej republiky, projekty č. QH91054 a QH71242 a Agentúrou na podporu výskumu a vývoja na základe zmluvy č. VMSP-P-0047-09.

LITERATÚRA

- BABADOOST M., 1997. Barley stripe. In: Marthe D.E. (ed.). Compendium of Barley Diseases, pp. 124-125. APS Press, St. Paul, Mn, USA.
- BLACK M., BEWLEY J.D., HALMER, P., 2006. The Encyclopedia of Seeds. Science, Technology and Uses. CAB International, Wallingford, UK.
- FREI P., GINDRO K., RICHTER H., SCHÜRCH S., 2007. Direct-PCR detection and epidemiology of *Ramularia collo-cygni* associated with barley necrotic leaf spots. *Journal of Phytopathology* 155: 281-288.
- FREI P., 2009. *Ramularia collo-cygni* on barley: a seed-borne diseases. In: Oxley S., Brown J., Foster V., Havis N. (eds.). The 2nd European Ramularia Workshop - A new disease and challenge in barley production. *Aspects of Applied Biology* 92: 109-110.
- HAVIS N.D., OXLEY S.J.P., PIPER S.R., LANGRELL S.R.H., 2006. Rapid nested PCR-based detection of *Ramularia collo-cygni* direct from barley. *FEMS Microbiology Letters* 256: 217-223.
- HAVIS N.D., OXLEY S.J.P., 2006. Investigating the life cycle of *Ramularia collo-cygni* using a PCR based diagnostic. In: Koopman B., Oxley S., Schützendübel A., von Tiedemann A. (eds.). *Ramularia collo-cygni: a new disease and challenge in barley production. Proceedings of First European Ramularia Workshop, Göttingen, Germany*: 39-44.

- HUSS H., 2004. The biology of *Ramularia collo-cygni*. In: Yahyaoui A.H., Brader L., Tekauz A., Wallwork H., Steffenson B. (eds.). Proceedings of the Second International Workshop on Barley Leaf Blights, April 2002, Aleppo, Syria pp. 321-328, ICARDA, Aleppo, Syria.
- NYMAN M., HAVIS N.D., OXLE, S.J.P., 2009. Importance of seed-borne infection of *Ramularia collo-cygni*. In: Oxley S., Brown J., Foster V., Havis N. (eds.). The 2nd European Ramularia Workshop - A new disease and challenge in barley production. *Aspects of Applied Biology* **92**: 91-96.

Tabuľka 1: Kvantifikácia DNA *Ramularia collo-cygni* v oddelených častiach semien jačmeňa (plevica, oplodie, osemenie, endosperm, embryo a výluh z povrchu semien).

Časť zrna	Lokalita a rok	Odroda	RCC kvantita fg 100ng ⁻¹	RCC lokalita a rok fg 100ng ⁻¹ (priemer)	RCC Časť zrna fg 100ng ⁻¹ (priemer)	Časť zrna	Lokalita a rok	Odroda	RCC kvantita fg 100ng ⁻¹	RCC lokalita a rok fg 100ng ⁻¹ (priemer)	RCC Časť zrna fg 100ng ⁻¹ (priemer)	
lemma-plevica	LU09	Diplom	1,139	0,683	0,342	endosperm	LU09	Diplom	0,037	0,044	0,031	
		Jersey	0,118					Jersey	0,040			
		Malz	0,608					Malz	0,026			
		Prestige	0,000					Prestige	0,031			
		Scarlet	1,551					Scarlet	0,089			
	KM10	Diplom	0,000	0,000			0,018	KM10	Diplom	0,025		0,018
		Jersey	0,000						Jersey	0,016		
		Malz	0,000						Malz	0,018		
		Prestige	0,000						Prestige	0,029		
		Scarlet	0,000						Scarlet	0,000		
pericarp-oplodie	LU09	Diplom	0,235	0,171	0,129	embryo	LU09	Diplom	0,149	0,194	0,100	
		Jersey	0,237					Jersey	0,273			
		Malz	0,077					Malz	0,481			
		Prestige	0,059					Prestige	0,065			
		Scarlet	0,245					Scarlet	0,000			
	KM10	Diplom	0,039	0,087			0,006	KM10	Diplom	0,000		0,006
		Jersey	0,000						Jersey	0,029		
		Malz	0,237						Malz	0,000		
		Prestige	0,128						Prestige	0,000		
		Scarlet	0,029						Scarlet	0,000		
testa-osemenie	LU09	Diplom	0,000	0,001	0,001	výluh z povrchu semien	LU09	Diplom	0,185	0,190	0,107	
		Jersey	0,005					Jersey	0,122			
		Malz	0,000					Malz	0,367			
		Prestige	0,000					Prestige	0,150			
		Scarlet	0,000					Scarlet	0,126			
	KM10	Diplom	0,000	0,002			0,024	KM10	Diplom	0,000		0,024
		Jersey	0,000						Jersey	0,000		
		Malz	0,000						Malz	0,119		
		Prestige	0,000						Prestige	0,000		
		Scarlet	0,009						Scarlet	0,000		

Adresa autorov: Ing. Jozef Gubiš, PhD.; Mgr. Martina Hudcovicová, PhD.; Mgr. Lenka Klčová; Mgr. Marcela Gubišová – Centrum výskumu rastlinnej výroby Piešťany, Bratislavská cesta 122, 921 68 Piešťany, Slovenská republika, e-mail: gubis@vurv.sk, hudcovicova@vurv.sk, l.klcova@vurv.sk, gubisova@vurv.sk

Mgr. Leona Leišová-Svobodová, PhD. – Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i. Drnovská 507, 161 06 Praha 6 – Ruzyně, Česká republika, e-mail: leisova@vurv.cz

Mgr. Pavel Matušinsky, PhD.; Dr. Ing. Ludvík Tvarůžek; Ing. Mgr. Věra Minaříková – Agrotrest fyto, s.r.o. Havlíčkova 2787, 767 01 Kroměříž, Česká republika, e-mail: matusinsky.pavel@vukrom.cz

Ing. Pavel Mařík - Výzkumné centrum SELTON, s.r.o., Stupice 24, 250 84 Sibřina, Česká republika, e-mail: marik@selgen.cz

VÝVOJOVÉ TRENDY ŠĽACHTENIA PŠENICE OZIMNEJ NA VŠS VÍGĽAŠ - PSTRUŠA

DEVELOPMENT TRENDS OF BREEDING WINTER WHEAT FOR VŠS VÍGĽAŠ - PSTRUŠA

KATARINA MATÚŠKOVÁ¹, ANDREA HANKOVÁ¹, DANIELA VALČUHOVÁ¹,
LUBOMÍR RÜCKSCHLOSS¹

¹CVRV Piešťany, Výskumno-šľachtiteľská stanica Vígľaš-Pstruša, 962 12 Detva

The aim of the research task was to describe wheat breeding evolution for breeding station Vígľaš-Pstruša its actual development and breeding trends. In research task we used one old landrace grown in fortieth years of 20th century, 12 lines bred in research – breeding station Vígľaš – Pstruša in 1968 – 1996 and also 3 varieties released after 2000 year. This used material was divided into four blocks according to year of arising advance, the oldest lines were placed to the first group and lines and varieties advanced after 1990 were placed to the fourth block. Material was sowed in stationary trial in 12 different fertilization variants in two replications.

Key words: breeding, wheat, yield components, fertilization

ÚVOD

Triticum aestivum L., forma ozimná, reprezentuje v našej pestovateľskej praxi prioritné zastúpenie v rámci hustosiatych obilnín. Na Slovensku a v celom svete patrí k najvýznamnejším zdrojom ľudskej výživy. Pšenicu šľachtíme už vyše 100 rokov, kedy sa menili šľachtiteľské ciele, smery a metódy. Postupne sa šľachtienie sústredilo na intenzívne typy pšenice, pri ktorých sa zvyšuje produkčná schopnosť, stabilita úrod a kvalita.

Výživa a hnojenie je jeden z najvýznamnejších a súčasne najnákladnejších faktorov pestovania obilnín. Vhodne volenou a správne usmernenou minerálnou výživou možno v komplexe s ostatnými činiteľmi prostredia pôsobiť na priebeh fyziologicko-biochemických procesov v rastlinách a ovplyvniť ich v žiadanom smere. Vplyv hnojenia základnými živinami na kvalitu pšenice ozimnej sledovali viacerí autori (Kandera, 1982; Law et al. 1984; Prugar et al. 1986; Černý et al., 2005). Z doterajších poznatkov vyplýva, že aplikovaná výživa nie je každoročne optimálne využívaná na tvorbu hlavného produktu. Cieľom šľachtienia pšenice je vývoj genotypov s vysokým využitím príjmu živín (Rajaram 2000).

Hlavne v 90. rokoch minulého storočia, ale i v súčasnom období, boli publikované mnohé práce, ktoré hodnotili šľachtiteľský pokrok pri obilninách (Užík a Žofajová, 1990, 2003, 2009; Bareš, 1995) a identifikovali tiež morfológické a fyziologické znaky spojené so zvýšením úrody zrna (Slafer a Andrade, 1991; Brancourt-Hulmel et al. 2003).

MATERIÁL A METÓDY

V práci bolo použitých 16 materiálov pšenice letnej formy ozimnej (Tab.1) vyšľachtených na Výskumno-šľachtiteľskej stanici Vígľaš-Pstruša od 40-tich rokov 20. storočia až po súčasnosť. Bolo tu zaradených 13 línií, ktoré mali veľmi dobré výsledky a dostali sa do firemných prípadne až štátnych odrodových skúšok, no pre horšie výsledky neprešli odrodovými skúškami. Najstaršou z nich je odroda Vígľašská červená. Je to stará krajová odroda pestovaná v 40-tich rokoch. Kontrolnou odrodou bola odroda Viginta.

Poľné pokusy boli realizované na Výskumno-šľachtiteľskej stanici Vígľaš-Pstruša. Materiál bol vysiaty na stacionárnom pokuse, ktorý bol na VŠS Vígľaš-Pstruša založený doc. Baierom v roku 1957 ako experimentálny základ pre štúdium princípov minerálnej výživy rastlín a vplyvu hnojív a činiteľov prostredia na rastliny. Varianty hnojenia na stacionárnom pokuse sa od založenia pokusu nemenili. Pokus bol založený v štyroch blokoch, ktoré boli rozdelené podľa roku vzniku daného materiálu (Tab. 1). V každom bloku sú zaradené štyri materiály + kontrolná odroda. Pokus bol založený v dvoch opakovaníach.

V pokuse bolo dodržaných 12 variantov výživy podľa Tab. 2. Základné N hnojenie sa aplikuje na jeseň spolu s fosforom a draslíkom u všetkých variantov okrem variantov 011, 012 a 021. Regeneračné N hnojenie sa aplikuje na jar vo fáze BBCH 21-25 a to vo variantoch hnojenia 014, 015, 016, 023, 024, 025 a 026. Produkčné N hnojenie sa aplikuje vo fáze BBCH 39-45 u variantov 015, 016 a 024 a kvalitatívne N hnojenie vo fáze BBCH 69 u variante 016. Nehnojenými variantmi sú varianty 011 a 021. Zároveň je každé štyri roky zapracúvané organické hnojivo v podobe maštalného hnoja v dávke 40 t.ha⁻¹. Maštalný hnoj sa aplikuje v každom variante hnojenia, okrem variantu 021.

Tabuľka 1: Rozdelenie do blokov podľa roku vzniku

Číslo bloku	Označenie materiálu	Pôvod	Rok vzniku	Rok povolenia odrody
1	Viginta			1984
	Vígl. červená	stará krajová odroda	40. r. 20. st.	
	PS - 2	Vir 43822 x Mironovská 808	1968	
	PS - 4	Fakír x Kaukaz	1971	
	PS - 5	Florian x Kaukaz	1971	
2	Viginta			1984
	PS - 102	Cap. Wilm.xKaukaz	1971	
	PS - 8	(Solo x Kaukaz) x SO-892	1979	
	PS - 9	BU - 17 x S-281	1979	
	PS - 13	Taw 4523/74 x SK-3879	1978	
3	Viginta			1984
	PS - 15	Regina x Viginta	1983	
	PS - 17	Agra x Taw-28886/77	1981	
	PS - 18	PS-6 x STH-60	1985	
	PS - 19/94	Torysa x Taw 603282	1988	
4	Viginta			1984
	PS - 11	Astella x Estica	1996	
	Vanda	Zdar x Hana		2001
	Veldava	Sana x Hadmerslebener 94/11		2005
	Pavčina	Torysa x RA 1 x Nova		2005

Tabuľka 2: Varianty hnojenia stacionárneho pokusu na VŠS

Variant	Dávky živín		
	N	P ₂ O ₅	K ₂ O
11	0	0	0
12	0	60	60
13	40	60	60
14	80	60	60
15	120	60	60
16	150	60	60
21	0	0	0
22	40	0	0
23	80	0	0
24	120	0	0
25	80	60	0
26	80	0	60

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Vývoj šľachtienia je možné hodnotiť na základe porovnaní rozdielov medzi súbormi starých a nových odrôd. Rozdiely sú zvlášť zaujímavé, pokiaľ sú tieto odrody vysievané vedľa seba v parcelách na tom istom pozemku, teda v porovnateľnom prostredí. V práci bola sledovaná výška úrod, úrodovitých a kvalitatívnych prvkov. Výsledky boli štatisticky spracované pomocou programu Statgraphic + (Tab. 3).

V pokuse bol zaznamenaný nárast úrody zrna vo štvrtom bloku v porovnaní s prvým blokom o 0,88 t/ha (Tab. 4). Na zvýšení úrod sa viac podieľala hmotnosť zrna v klase než počet zŕn v klase a počet klasov na m². Takisto bol zaznamenaný nárast zberového indexu, ktorý sa podieľa na zvyšovaní úrody zrna (Austin Et al., 1980). Zatiaľ čo úroda zrna sa zvyšovala, opačný efekt nastal pri obsahu bielkovín a obsahu mokrého lepku. Môžeme to zhodnotiť tým, že nové odrody majú slabší záporný vzťah medzi úrodou zrna a obsahom bielkovín (Ortis-Monasterio, 1997; Užik, Žofajová, 2006).

V rámci variantov hnojenia sa výška úrod so stúpajúcimi dávkami N zvyšovala. Pri variantoch bez N hnojenia modernejšie odrody a línie zo štvrtého bloku reagovali na nedostatok výživy znížením výšky úrody voči najstarším líniam z prvého bloku, ktoré si aj pri nedostatočnej výžive dokázali udržať vyššiu úrodu.

Tabuľka 3: Viacfaktorová analýza rozptylu

Zdroj premenlivosti		Ukazovateľ								
		Úroda zrna (t.ha ⁻¹)	HTZ	Zberový index	Hmotnosť zrna jedného klasu (g)	Počet zŕn jedného klasu	Počet klasov na m ²	Obsah bielkovín NIRS [%]	Mokrý lepok v sušine [%]	Sedimentačný index (Zeleny) [ml]
variant hnojenia	F-ratio	21,37	3,57	1,53	3,5	9,85	10,18	51,94	23,62	7,45
	P-value	++	++	-	++	++	++	++	++	++
Blok	F-ratio	36,67	38,7	29,31	37,08	48,09	5,67	9,46	28,09	11,56
	P-value	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Rok	F-ratio	327,37	179	47,95	237,42	169,29	346,48	70,09	195,97	49,05
	P-value	++	++	++	++	++	++	++	++	++

+P<0,05 ++P<0,01

Tabuľka 4: Priemerné hodnoty znakov v rámci súborov

Blok	Úrodovorné prvky						Kvalitatívne znaky		
	Úroda t/ha	HTZ	Zberový index	Hmotnosť zrna v klase	Počet zŕn z klasu	Počet klasov na m ²	Obsah bielkovín NIRS [%]	Mokrý lepok v sušine [%]	SDT (Zeleny) [ml]
1	5,58	41,7	0,434	1,213	29,0	780	12,31	25,86	41,30
2	5,89	40,6	0,446	1,315	32,3	743	11,93	23,58	41,58
3	6,05	40,2	0,456	1,352	33,4	809	11,75	21,41	39,80
4	6,46	43,2	0,481	1,427	32,9	790	11,72	20,79	47,16

ZÁVER

Môžeme zhodnotiť, že v pokuse bol zachytený pokrok v šľachtení pšenice. Úroda zrna, HTZ, zberový index a hmotnosť zrna v klase v rámci blokov narastali. Pokrok vo zvýšení úrody zrna je kompenzovaný znížením parametrov kvality. Nízka kvalita zrna u modernejších odrôd a línií bola spôsobená práve zvyšovaním úrody zrna. V pokuse sme zachytili zaujímavý jav kedy staršie línie, šľachtené v období kedy intenzita hnojenia nebola na takej úrovni ako v súčasnosti dokážu aj pri nedostatočnej výžive dosahovať vyššie úrody oproti modernejším odrodám a líniám. Zároveň tvoria vyšší objem biomasy, ktorú môže rastlina pri nedostatočnej výžive redistribuovať do tvorby zrna.

LITERATÚRA

- AUSTIN, R. B.; BINGHAM, R.D.; BLACKWELL, R.D.; EVANS, L.T.; FORD, M.A.; MORGAN, C.L.; TAYLOR, M.: Genetic improvements in wheat yields since 1900 and associated physiological changes. *J. Agric. Sci.* 94, 1980, 675-689.
- BAREŠ, I.; DOTLAČIL, L.; STEHNO, Z.; FABEROVÁ, I.; VLASÁK, M.: Puvodní a povolené odrudy pšenice v Československu v letech 1918-1992. In: *Sbírka VÚRV – Genetické zdroje* č. 65, 1995, p. 79-81.
- Brancourt-Hulmel, M.–Doussinault, G.–Lecomte, C.–Bérard, P.–Le Buanec, B.–Trottet, M. (2003): Genetic improvement of agronomic traits of winter wheat cultivars released in France from 1946 to 1992. In: *Crop Sci.*, vol. 43, 2003, N. 1, pp. 37-45.
- ČERNÝ, I., KARABÍNOVÁ, M., UPOHLAV, T., 2005. Grain yield and quality of winter durum wheat depending on a level of nitrogen fertilization and fertilizer form applied. In: *Acta fytotechnica et zootechnica*, 8, 2005, 2, strana.
- KANDERA, J., 1982. Vplyv hnojenia dusíkom na úrody a kvalitu úrod ozimnej pšenice. *Pol'nohospodárstvo*, 28, 1982, č. 1, s. 13-24.
- LAW, C.N. et al., 1984. Studies of genetical variation affecting grain protein type and amount in wheat. In: *Cereal grain protein improvement*. IAEA, Vienna 1984, pp. 279-300.
- ORTIZ-MONASTERIO, R.; PEÑA, R.J.; SAYRE, K.D.; RAJARAM, S. (1997): CIMMYT's genetic progress in wheat grain quality under four nitrogen rates. *Crop Sci.* 37, 892-898.
- PRUGAR, J., HRAŠKA, Š., 1986. *Kvalita pšenice*. Príroda, Bratislava, 1986, 220 s.
- RAJARAM, S. (2000): Prospects and promise of wheat breeding in the 21st century. In: Abstracts of oral and posters presentations: 6th International wheat conference. 5–9 June 2000, Budapest. Marton-vásár: ARIHAS, 2000, p. 24.

- SLAFER, G.A.; ANDRADE, H.: Changes in physiological attributes of the drz matter economy of bread wheat (*Triticum aestivum*) through genetic improvement of grain yield potential at defferent regions of the world. In: *Euphytica*, vol. 58, 1991, p. 37-49.
- UŽÍK, M.; ŽOFAJOVÁ, A.; HANKOVÁ, A.: Breeding progress in grain yield and quality of winter wheat cultivars. *Agriculture (Poľnohospodárstvo)*, vol. 55, 2009, N. 1, pp. 26-32.
- UŽÍK, M.; ŽOFAJOVÁ, A.: Pokrok v agronomických znakoch pri Česko-slovenských odrodách pšenice letnej f. oyimnej povolených v rokoch 1923-1995. In *Acta fytotechnika et zootechnika*, Nitra, Slovaca Universitas Agriculturae Nitriae, 4, 2003, s. 93-100.
- UŽÍK, M., ŽOFAJOVÁ, A. 1990. Selection progress of newly-bred varieties of winter wheat in the Slovak Republic as expected and performed. In: *Proceedings of international symposium: Wheat breeding. Prospects and future approaches*. June 4-8, 1990, Albena, p. 362-368.
- UŽÍK, M., ŽOFAJOVÁ, A.: Využitie technologického a metodologického pokroku pri šľachtení pšenice. Nové poznatky z genetiky a šľachtenia poľnohospodárskych rastlín. Zborník z 13. vedeckej konferencie, Piešťany: VÚRV, 2006, str. 8-11.

FAKTORY OVPLYVŇUJÚCE ZVÝŠENIE EFEKTIVITY PRI GENETICKEJ TRANSFORMÁCII VYBRANÝCH DRUHOV OBILNÍN

FACTORS AFFECTING THE INCREASE OF EFFICIENCY IN GENETIC TRANSFORMATION OF SELECTED TYPES OF CEREALS

DANIEL MIHÁLIK^{1*}, MARCELA GUBIŠOVÁ^{1,3}, KATARÍNA ONDREIČKOVÁ¹, ĽUBICA NOGOVÁ^{1,3},
TATIANA KLEMPOVÁ², MILAN ČERTÍK², JÁN KRAIC^{1,3}

¹ Centrum výskumu rastlinnej výroby Piešťany

² Oddelenie biochemickej technológie, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, STU, Bratislava

³ Katedra botaniky a genetiky, Fakulta prírodných vied, UKF v Nitre

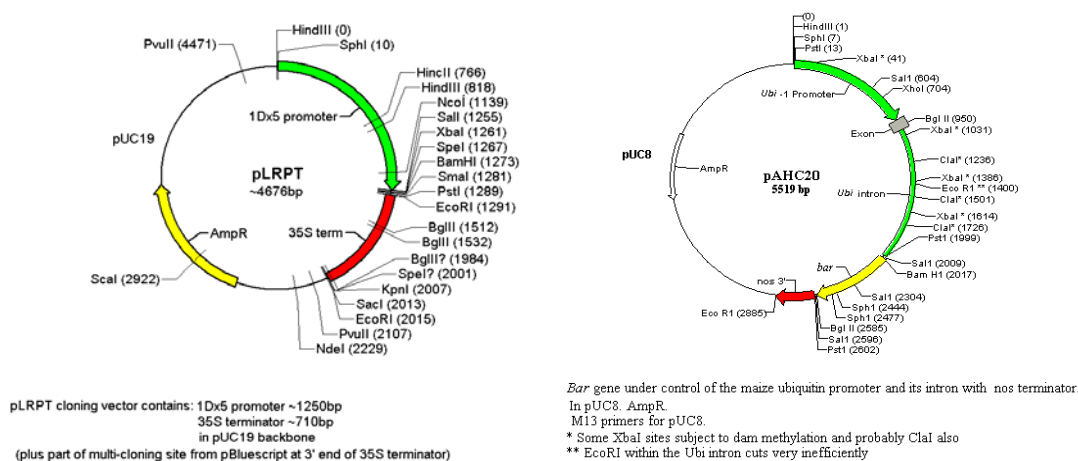
Biotechnological approaches to plant breeding including development of genetically modified plants are believed to be able to improve more quickly the quality and quantity of plant production and also the adaptability to changing environmental conditions. This work is aimed to the selection of a suitable construct for transformation of cereals and selection of cereal (barley and wheat) genotypes with appropriate regeneration capacity in explant culture. For the process of genetic transformation of selected plant species it is necessary to achieve partial results such as selection and preparation of a suitable vector, selection of regenerable genotypes and optimization of the transformation process. For transformation of wheat and barley with gene coding for enzyme delta-6-desaturase, pLRPT plasmid that contains endosperm specific promoter from the high molecular glutenin subunit Dx5 was chosen. Based on regeneration efficiency, Slovak spring barley cultivars Levan, Pribina and cultivar of naked barley Rastik were selected. For wheat, genotype CY-45 regenerated comparable to the control variety Bobwhite, but both Slovak cultivars of winter wheat, Veldava and Pavlína, showed a weaker regeneration capacity.

Key words: genetic transformation, plasmid, regeneration, delta-6-desaturase, pLRPT, wheat, barley

ÚVOD

Ročná produkcia pšenice dosahuje celosvetovo takmer 700 miliónov ton (FAOSTAT). Spolu s ryžou a kukuricou predstavujú trojicu najdôležitejších obilnín. Predpokladá sa, že v roku 2020 bude vzhľadom na celosvetovo rastúci dopyt po potravinách treba zvýšiť výnosy o 40-50%. Metódami klasického šľachtienia sa dá však dosiahnuť ročné zvýšenie produkcie iba o 0,9% a práve tu existuje veľký priestor pre zaplnenie tohto rozdielu metódami genetických transformácií. Nekonenčnými metódami šľachtienia, prípravou geneticky modifikovaných rastlín dokážeme rýchlejšie reagovať na biotické a abiotické stresové faktory, zlepšovať kvalitu a kvantitu produkcie a tiež urýchliť adaptabilitu na zmenené podmienky prostredia. Prostredníctvom genetických transformácií dokážeme obohatiť genóm hostiteľského organizmu o gény často aj veľmi druhovo vzdialených organizmov, čo je pri konvenčnom spôsobe šľachtienia takmer nemožné. Dôležitými faktormi ovplyvňujúcimi účinnosť transformácie je výber vhodného vektora na prenos transgénu do organizmu recipienta, úprava, zosúladenie genetického kódu transgénu s genetickým kódom hostiteľa a napokon výber vhodného genotypu recipienta (Castillo a kol., 1998; Jones, 2005) v našom prípade pšenice a jačmeňa s prijateľnou mierou regeneračnej schopnosti v *in vitro* kultúre.

Na transformáciu obilnín sú využívané vektory nesúce popri génu záujmu selekčné markery, ktorými sú zvyčajne gény rezistencie voči antibiotikám, resp. herbicidom. Pre optimálnu expresiu génu je dôležitá voľba promotora, z ktorého bude riadená expresia génu záujmu. Možné je využitie konštitutívneho promotora, kedy bude dochádzať k expresii bez rozdielu pletivovej špecificity, resp. použitím pletivovo špecifického promotora dochádza k riadenej, pletivovo špecifickej expresii transgénu (Dahleen a Manoharan, 2007). V prípade, že dochádza k prenosu génu z druhovo vzdialenejšieho organizmu býva často veľký rozdiel vo využití degenerovaných tripletov genetického kódu, vtedy je vhodnejšia úprava, prispôbenie genetického kódu génu záujmu z donora na recipienta. V tejto práci budeme využívať vektor nesúci endosperm špecifický promotor pochádzajúci z vysokomolekulárnej glutenínovej podjednotky Dx5. Pre maximálnu utilizáciu génu záujmu je potom nevyhnutná inzercia signálnej sekvencie pred gén záujmu za súčasného zachovania jeho čítacieho rámca. Vektor pLRPT (obr. 1), ktorý bude využitý pri transformácii obilnín kóduje selekčný marker: gén *amp^r* – gén rezistencie voči ampicilínu a kotransformačný vektor pAHC20 (obr. 2) nesie selekčný marker: gén *-bar* – gén rezistencie voči antibiotiku fosfotricín. Gén záujmu bude použitý gén kódujúci enzým delta 6-desaturázu, ktorý je zahrnutý v metabolizme mastných kyselín.



Obr. 1 - Vektor pLRPT

Obr. 2 - Vektor pAHC20

MATERIÁL A METÓDY

Izolácia plazmidovej DNA

Na izoláciu a skríning pozitívnych klonov obsahujúcich plazmidovú DNA sa použil QIAprep Spin Miniprep kit(250)(QIAGEN, SRN), pričom na izoláciu plazmidovej DNA vo väčšom množstve a kvalite požadovanej na sekvenčnú analýzu sa použil QIAGEN Plasmid Maxi kit(25),(QIAGEN, SRN).

Kontrola kvality a koncentrácie plazmidovej DNA

Kvalita plazmidovej DNA bola kontrolovaná elektroforézou v agarózovom géli a jej koncentrácia bola meraná spektrofotometricky pri vlnovej dĺžke 260 nm na spektrofotometri GENOVA LIFE SCIENCE (JENWAY).

Selekcia regenerabilných genotypov jačmeňa a pšenice

Pri výbere genotypov jačmeňa a pšenice pre genetickú transformáciu bola otestovaná ich efektivita regenerácie v *in vitro* kultúre. Otestovaných bolo 9 slovenských odrôd jarného jačmeňa *Hordeum vulgare* L.(Donaris, Ezer, Levan, Ludan, Nitran, Pribina, Sladar, Orbit, Pax) a Golden Promise – ako kontrolná odroda a 5 odrôd / genotypov nahého jačmeňa *Hordeum vulgare* subsp. *nudum* (Rastik, AF Lucius a 3 šľachtiteľské línie zo Sládkovičova – SK 7043-4-10, SK 7043-5-10, SK 7043-6-10). Pri pšenici letnej (*Triticum aestivum* L.) boli dosiaľ otestované 4 odrody – 2 slovenské odrody ozimnej formy (Veldava a Pavlína) a 2 odrody jarnej formy pšenice (CY-45 a Bobwhite ako kontrolná odroda). Regenerácia rastlín jačmeňa i pšenice bola indukovaná z nezrelých štítkov 12 - 18 dní po antéze. Na indukciu kalogenézy v tme boli použité živné médiá obsahujúce 2,5 mg l⁻¹ Dicamba (pri jačmeni), resp. 2,4-D (pri pšenici). Kalusy boli preložené na regeneračné médiá so zvýšeným obsahom CuSO₄ a prídavkom 2,5 mg l⁻¹ 2,4-D a 0,1 mg l⁻¹ BAP (v prípade jačmeňa) alebo bez prídavku rastových regulátorov a kultivované pri fotoperióde 16 / 8 h. Presná metodika regeneračných experimentov je popísaná v práci Gubišová a kol. (2011). Pri hodnotení efektivity regenerácie jednotlivých odrôd / genotypov bola sledovaná frekvencia regenerabilných explantátov a počet regenerantov.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Nekonvenčnými metódami šľachtenia, prípravou geneticky modifikovaných rastlín dokážeme rýchlejšie reagovať na biotické a abiotické stresové faktory, kvalitu a kvantitu produkcie a tiež urýchliť adaptabilitu na zmenené podmienky prostredia. Krokmi nevyhnutnými k príprave takýchto rastlín je príprava konštruktu a výber vhodného genotypu obilniny a napokon optimalizácia transformačného procesu. Obilniny neprodujú esenciálne masné kyseliny, ale produkujú metabolické prekursorov nevyhnutné pre ich produkciu, vnesením vhodných génov schopných utilizovať tieto prekursorov, dokážeme modifikovať pšenicu a jačmeň tak, že dochádza k tvorbe esenciálnych masných kyselín. Pre realizáciu tohto zámeru je nevyhnutné mať vhodný vektor na transformáciu hostiteľského organizmu. Bol vybratý plazmid pLRPT (obr. 1), ktorý obsahuje pletivo špecifický promotór z podjednotky kódujúcej vysokomolekulárny glutenín Dx5, ktorý je endosperm špecifický. Ďalšou výhodou tohto promotora je to, že pripojením signálnej sekvencie pred gén záujmu, v našom prípade gén

kódujúci delta–6–desaturázu, získame fúzny proteín, ktorý je destinovaný do endoplazmatického retikula, kde dochádza k biosyntéze mastných kyselín.

Na základe selekcie genotypov jačmeňa a pšenice s ohľadom na regeneračnú schopnosť boli pri jačmeni jarnom vybrané slovenské odrody Levan a Pribina, z nahých jačmeňov najlepšie regenerovala odroda Rastik. Pri pšenici bola regeneračná schopnosť genotypu CY-45 porovnateľná s kontrolnou odrodou Bobwhite. Obe slovenské odrody ozimnej pšenice vykazovali slabšiu regeneráciu a výber vhodného genotypu vyžaduje testovanie ďalších odrôd.

ZÁVER

Bola zvolená stratégia prípravy transgénnej obilniny, pre jej realizáciu je nevyhnutné dosiahnutie čiastkových výsledkov akými sú výber a príprava vhodného vektora, výber vhodného genotypu obilnín a optimalizácia transformačného procesu. V predkladanej práci bol vybratý vhodný pletivovo špecifický vektor a genotypy pšenice a jačmeňa, ktoré sú objektom transformačného procesu.

Podakovanie. 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. Ďakujeme Ing. Kláre Križanovej, PhD. z Hordeum, s.r.o., Sládkovičovo za poskytnutie semien použitých genotypov jačmeňa.

LITERATÚRA

- CASTILLO, A. M. - EGANA, B. - SANZ, J. M. - CISTUÉ, L. 1998. Somatic embryogenesis and plant regeneration from barley cultivars grown in Spain. *Plant Cell Reports*, 17, 1998, s. 902-906.
- DAHLEEN, S. L. - MANOHARAN, M. 2007. Recent advances in barley transformation. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*, 43, 2007, 6, s. 493-506.
- GUBIŠOVÁ, M. - MIHÁLIK, D. - KONÔPKOVÁ, E. 2011. Regeneration efficiency of Slovak spring barley cultivars and winter wheat cultivars. *Agriculture*, 57, 2011, 2, s. 76-83.
- JONES, H. D. 2005. Wheat transformation: current technology and applications to grain development and composition. *Journal of Cereal Science*, 41, 2005, s. 137-147.

Autori: Mgr. Daniel Mihálik, PhD.^{1*}, Mgr. Marcela Gubišová^{1,3}, Mgr. Katarína Ondreičková¹, Mgr. Ľubica Nogová^{1,3}, Ing. Tatiana Klempová², doc. Ing. Milan Čertík, PhD²., doc. RNDr. Ján Kraic, PhD.^{1,3}

¹Výskumný ústav rastlinnej výroby Piešťany, Centrum výskumu rastlinnej výroby Piešťany, Bratislavská cesta 122, 921 68 Piešťany, SR

²Oddelenie biochemickej technológie, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, STU, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, SR

³Katedra botaniky a genetiky, Fakulta prírodných vied, Univerzita Konštantína Filozofa v Nitre, Trieda A. Hlinku 1, 949 74 Nitra, SR

*Corresponding author: Tel.: +421-33-7722311; fax: +421-33-7726306; E-mail: mihalik@vurv.sk

VLIV STŘÍBRA NA PROCES REGENERACE PROTOPLASTŮ

THE INFLUENCE OF SILVER ON PROTOPLAST REGENERATION

PAVLA MORICOVÁ, LENKA LUHOVÁ, MAREK PETŘIVALSKÝ, VLADAN ONDŘEJ,
BOŽENA NAVRÁTILOVÁ

Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci
Faculty of Sciences, Palacký University in Olomouc

The aim of this work was to study the influence of silver ions and silver nanoparticles on protoplast regeneration. Nanoparticles are currently very used material and get into the environment and effect all components of ecosystem. Influence of silver nanoparticles on the process of protoplast regeneration is dependent on the dose and the genotype of the plant. It was detected a higher toxicity of silver ions compared with silver nanoparticles. Protoplast cultures of *Brassica oleracea* showed a higher sensitivity to the tested substances than protoplast cultures of *Cucumis sativus*.

Keywords: *Brassica oleracea*, *Cucumis sativus*, protoplast regeneration, silver ions; silver nanoparticles

ÚVOD

Protoplast je označení pro buňku zbavenou buněčné stěny. Jejich důležitou vlastností je schopnost dediferenciace a skutečnost, že se jedná o totipotentní buňky, které jsou schopné při správných podmínkách obnovovat novou buněčnou stěnu, zahájit buněčný cyklus, dělit se a regenerovat do různých orgánů, případně vytvořit novou rostlinu (Davey et al. 2005). K rekonstrukci buněčné stěny je důležitá kontrolovaná produkce reaktivních forem kyslíku (ROS) a pro regenerující protoplasty je typická zvýšená aktivita katalasy a peroxidasy (POX), které hrají důležitou roli v procesu polymerizačních reakcí při stavbě buněčné stěny (Siminis et al. 1994). Regenerační potenciál protoplastů závisí především na druhu a genotypu rostliny.

Nanočástice stříbra (Ag-nč) představují v současné době významnou skupinu bioaktivních látek. Díky širokospektrým antimikrobiálním vlastnostem jsou používány pro biomedicínské účely a s rychlým rozvojem nanotechnologií byly aplikace rozšířeny do mnoha spotřebitelských produktů. Široké použití Ag-nč v praxi má za následek zvýšený výskyt Ag-nč v ekosystému a jejich působení na člověka a je potřeba tyto důsledky zkoumat v rané fázi rozvoje nanotechnologií (Lambert 2005; Navarro et al. 2008).

MATERIÁL A METODY

Rostlinný materiál, izolace a kultivace protoplastů

Zdrojem mezofylových protoplastů byly *in vitro* pěstované rostliny *Cucumis sativus* cv. MARKETER (CZ09H3900121) a *Brassica oleracea*, var. botrytis cv. SIRIA, homozygotní dihaploidní linie DH01 odvozená od Siria F1. Kultivace probíhala u rostlin *C. sativus* 4 týdny, u *B. oleracea* 8 týdnů v kultivační místnosti s teplotou 22 ± 2 °C, světelným režimem 16 h den a 8 h noc a s osvětlením 32 - 36 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$. Pro izolaci byl použit enzymatický roztok obsahující 1% celulasu Onozuka R-10 a 0,25% macerozym R-10 v promývacím roztoku (PGly u *C. sativus*, W5 u *B. oleracea*), pH 5,8 (tma, 27 °C, 18 h) (Navrátilová et al. 2008; Pelletier et al. 1983). Pro izolaci protoplastů byla použita centrifugace v hustotním gradientu sacharosy, protoplasty byly naředěny kultivačním médiem na výslednou hustotu $1,5 \times 10^5$ protoplastů na 1 ml média (LCM1 u *C. sativus*, B médium u *B. oleracea*). Ihned po izolaci protoplastů bylo k buněčné suspenzi přidáno stříbro ve formě stříbrných iontů Ag^+ (koncentrace: 0,05; 0,5; 5 mg/l) nebo nanočástic stříbra Ag-nč (koncentrace: 0,05; 0,5; 5 mg/l).

Stanovení životnosti fluorescenční sondou fluoresceindiacetátem (FDA)

Stanovení bylo prováděno v mikrodestičkovém uspořádání s využitím spektrofotometru/fluorimetru Reader Synergy HT. Ke 100 μl protoplastové suspenze bylo přidáno 5 μl sondy FDA o koncentraci 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Fluorescenční signál (excitace 485 nm, emise 515 nm) byl měřen ihned po přidávku detekční sondy k buněčné suspenzi a po 10min inkubaci ve tmě při 27 °C.

Stanovení produkce oxidu dusnatého (NO) a produkce reaktivních forem dusíku (RNS) a kyslíku (ROS)

Intracelulární produkce NO byla stanovena s využitím detekční sondy 4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein diacetát (DAF-FM DA), ke stanovení produkce RNS a ROS byla použita fluorescenční sonda 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetát ($\text{H}_2\text{DCF DA}$). Ke 100 μl buněčné suspenze bylo přidáno 5 μl 0,2 mmol/l detekční sondy. Byl měřen fluorescenční signál (excitace 485 nm, emise 515 nm) okamžitě po přidávku sondy a po 1h inkubaci ve tmě při 27 °C.

Stanovení aktivity peroxidasy (POX)

Aktivita POX byla stanovena spektrofotometricky modifikovanou metodou s guajakolem (1-hydroxy-2-methoxybenzen) (Angelini et al. 1990). Po oxidaci guajakolu vzniká žlutohnědý tetraguajakolchinon, jehož molární absorpční koeficient je $\epsilon = 4\,500 \text{ l}/(\text{mol} \cdot \text{cm})$ a byl měřen nárůst absorbance při 436 nm po 1 min při 30

°C. Reakční směs obsahovala 150 µl 0,1 mol/l fosfátového pufru, pH 6, 40 µl 50 mmol/l guajakolu, 50 µl homogenizované protoplastové suspenze a 50 µl 10 mmol/l peroxidu vodíku, jehož přidávkem byla reakce startována.

VÝSLEDKY A DISKUZE

U buněčné suspenze byl po aplikaci stříbra detekován toxičtější vliv Ag^+ než u Ag-nč. Testované koncentrace Ag-nč 0,05 a 0,5 mg/l životnost buněk *C. sativus* neovlivnily, Ag^+ v koncentraci 0,5 mg/l působily toxicky a v průběhu 72 h po izolaci protoplastů byl detekován pokles životnosti o 70 % oproti kontrole (protoplasty kultivované bez přidavku Ag). Na buňky *B. oleracea* působila přítomnost Ag citlivěji. Toxicky se projevila již koncentrace 0,05 mg/l u Ag^+ , vyšší koncentrace (0,5 mg/l) působila na životnost negativně u obou forem Ag (obr. 1).

Pro regenerující protoplasty je typická zvýšená aktivita POX (Siminis et al. 1994), která byla v experimentech detekována u kontrolních buněk. Vlivem Ag byla krátce po izolaci protoplastů (čas 0 h) detekována vyšší aktivita POX u obou genotypů oproti kontrole. Negativní vliv byl detekován od 24 h po izolaci protoplastů působením Ag^+ v koncentraci 0,5 mg/l u obou genotypů, u buněk *B. oleracea* byla nižší aktivita POX oproti kontrole detekována i vlivem Ag-nč v koncentraci 0,5 mg/l.

Působením Ag^+ i Ag-nč v koncentraci 0,05 mg/l na produkci ROS u buněk *C. sativus* byl detekován mírný negativní vliv krátce po izolaci protoplastů, v čase 72 h byla působením Ag-nč stanovena vyšší produkce ROS než u kontrolních buněk v obou testovaných koncentracích. Na produkci ROS u buněk *B. oleracea* působilo Ag negativně.

V průběhu života rostlin plní NO důležitou funkci. Podílí se na stimulaci buněčného dělení u protoplastů (Otvos et al. 2005) a molekuly NO bývají zahrnuty do obranných mechanismů vyvolaných působením mnoha abiotických stresových faktorů (Wendehenne et al. 2005). Vyšší produkce NO oproti kontrole byla detekována vlivem Ag^+ , zejména u buněk *C. sativus* v obou testovaných koncentracích, u buněk *B. oleracea* nemělo Ag výrazný vliv na produkci NO.

ZÁVĚR

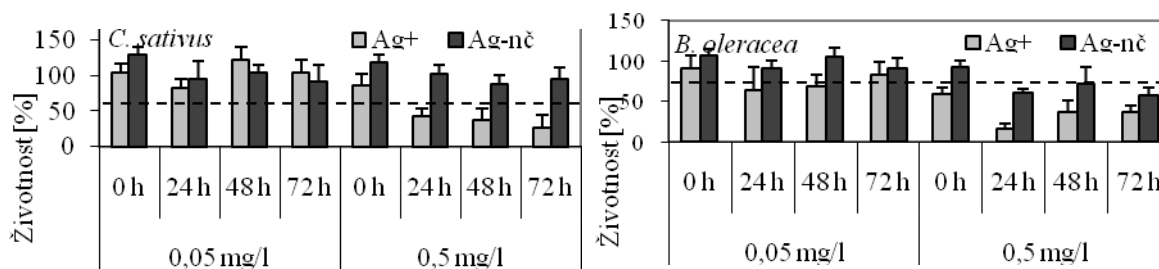
Ag^+ vykazují toxický vliv projevující se poklesem životnosti buněk v koncentraci o řád vyšší v porovnání s Ag-nč. Protoplastové kultury *B. oleracea* vykazovaly vyšší citlivost na přítomnost Ag než protoplastové kultury *C. sativus*. Nižší detekovaná životnost protoplastů koresponduje se sníženou stanovenou aktivitou POX a produkcí RNS a ROS. Koncentrace 5 mg/l Ag^+ i Ag-nč byla letální pro protoplastové kultury *B. oleracea* i *C. sativus*.

Poděkování: Práce byla podporována projektem Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR (MSM 6198959215).

LITERATURA

- ANGELINI, R. - MANES, F. - FEDERICO, R. (1990): Spatial and functional correlation between diamine-oxidase and peroxidase activities and their dependence upon de-etiolation and wounding in chick-pea stems. In: *Planta* 182: 89-96.
- DAVEY, M.R. - ANTHONY, P. - POWER, J.B. - LOWE, K.C. (2005): Plant protoplasts: status and biotechnological perspectives. In: *Biotechnical Advances* 23: 131-171.
- LAMBERT, P.A. (2005): Bacterial resistance to antibiotics: Modified target sites. In: *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57 (10): 1471-1485.
- NAVARRO, E. - BAUN, A. - BEHRA, R., HARTMANN, N.B. - FILSER, J. - MIAO, A.J. - QUIGG, A. - SANTSCHI, P.H. - SIGG, L. (2008): Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi. In: *Ecotoxicology* 17: 372-386.
- NAVRÁTILOVÁ, B. - LUHOVÁ, L. - PETŘIVALSKÝ, M. (2008): Effect of UV-C irradiation on mesophyll protoplasts of *Cucumis sativus*. In: *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 94: 313-318.
- OTVOS, K. - PASTERNAK, T.P. - MISKOLCZI, P. - DOMOKI, M. - DORJGOTOV, D. - SZUCS, A. - BOTTKA, S. - DUDITS, D. - FEHÉR, A. (2005): Nitric oxide is required for, and promotes auxin-mediated activation of, cell division and embryogenic cell formation but does not influence cell cycle progression in alfalfa cell cultures. In: *The Plant Journal* 43: 849-860.
- PELLETIER, G. - PRIMARD, C. - VEDEL, F. - CHERIT, P. - REMY, R. - ROUSSELLE, P. - RENARD, M. (1983): Intergeneric cytoplasmic hybridization in Cruciferae by protoplast fusion. In: *Molecular General Genetics* 191:244-250.
- SIMINIS, C.I. - KANELIS, A.K. - ROUBELAKIS-ANGELAKIS, K.A. (1994): Catalase is differentially expressed in dividing and nondividing protoplasts. In: *Plant Physiology* 105: 1375-1383.

WENDEHENNE, D. - GOULD, K. - LAMOTTE, O. - DURNER, J. - VANDELLE, E. - LECOURIEUX, D. - COURTOIS, C. - BARNAVON, L. - BENTÉJAC, M. - PUGIN, A. (2005): NO signaling functions in the biotic and abiotic stress response. In: BMC Plant Biology 5: 35-36.



Obr. 1: Vliv Ag⁺ a Ag-nč na životnost protoplastů (stanovenou fluorescenční sondou FDA) *C. sativus* (vlevo) a *B. oleracea* (vpravo) v průběhu 72 h po izolaci protoplastů (100 % je označena hodnota stanovená u protoplastové suspenze kultivované bez obsahu Ag).

Adresy autorů:

Mgr. Pavla Moricová, moricovapavla@seznam.cz

Doc. RNDr. Lenka Luhová, Ph.D., lenka.luhova@upol.cz

Mgr. Marek Petřivalský, Dr., Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc, marek.petrivalsky@upol.cz

Doc. RNDr. Vladan Ondřej, Ph.D., vladan.ondrej@upol.cz

RNDr. Božena Navrátilová, Ph.D., Katedra botaniky, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc, bozena.navratilova@upol.cz

ANALÝZA POLYMORFIZMU ENZÝMOV EKONOMICKY VÝZNAMNÝCH DRUHOV LÁSKAVCA (*AMARANTHUS SP.*)

ANALYSIS OF ENZYMES POLYMORPHISM IN ECONOMICALLY IMPORTANT SPECIES OF AMARANTH (*AMARANTHUS SP.*)

PAVOL MÚDRY¹, MICHAELA CHALÁNYOVÁ¹, IVETA ČIČOVÁ², ANDREA HRICOVÁ³

¹Trnavská univerzita, Katedra biológie, Trnava

²Centrum výskumu rastlinnej výroby, Piešťany

³Ústav genetiky a biotechnológií rastlín, Slovenská akadémia vied, Nitra

Increasing demand for the proteomic study, breeding and practical utilization of amaranths led us to investigate a collection of twelve economically important genotypes - Burgundy, K283, Olpír, Fícha, Golden Giant, 1008, Plaisman, Koniz, Ames 21670 (PI 641042), RRC 682 (PI606281), K433 and cv. Rawa. For enzyme multiplicity of ACP, ADH, CAT, DIA, GLU, GOT, IDH, MDH, PGD, PGI and PGM methodology of horizontal starch gel analysis we have used. Our investigation confirmed the enzyme polymorphism uniformity for all genotypes besides genotype RRC 682 (PI606281) - *A. blitum* subsp. *oleraceus* L. This genotype differs from the others in multiplicity of ADH and IDH. Our research more supports the idea of lower enzyme polymorphism diversity of amaranths previously published in several scientific works.

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

ÚVOD

Multiplicita enzýmov alebo polymorfizmus enzýmov je vyjadrením existencie mnohorakých foriem enzýmov v živých organizmoch, ktoré majú rovnakú substrátovú a reakčnú špecifickosť. Nie všetky formy polymorfizmu enzýmov sú v živých systémoch rovnako významné. Z existenčného a praktického hľadiska sú významné polymorfizmy enzýmov, ktoré sú geneticky podmienené. 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, šľachtienia a semenárstva. Z globálneho hľadiska je však problematické nájsť biologickú disciplínu, ktorej by sa polymorfizmus enzýmov priamo alebo nepriamo nedotýkal.

Pre praktické využívanie polymorfizmu enzýmov poľnohospodárskych plodín sa javí rozhodujúcim rozsah diverzity zárodočnej plazmy daných plodín a jej distribúcia v analyzovaných vzorkách. Polymorfizmus enzýmov našiel praktické využitie v testovacích laboratóriách mnohých krajín po celom svete. Využíva sa hlavne pri určovaní identity genotypu, jeho homogenity a čistoty. Z poľnohospodárskych plodín sa v praxi využíva pri kukurici siatej, sóji fazuľovej, slnečnici ročnej, hrachu siatom, niektorých druhoch tráv, d'atelin a obilovín.

Napriek narastajúcemu ekonomickému významu mnohých druhov láskavca ich poznanie polymorfizmu enzýmov, oproti spomenutým plodinám, nie je adekvátne. Príčiny, ktoré vedú k nedoceneniu štúdia polymorfizmu enzýmov láskavca môžu byť viaceré ale najvýznamnejšie sú slabé tradície pestovania a využívania láskavcov v poľnohospodársky vyspelých krajinách a skutočnosť, že ešte v roku 1980 sa konštatuje v práci autorov Jain et al. (1980) úzka variabilita polymorfizmu enzýmov v analyzovaných genotypoch láskavca. V priebehu nasledovných troch desaťročí pri riešení výskumných cieľov boli sporadicky publikované práce s dostatočnou aj nedostatočnou variabilitou polymorfizmu v analyzovaných vzorkách.

Hlavným cieľom našej experimentálnej práce bolo zrealizovať analýzy polymorfizmu enzýmov dvanástich ekonomicky, fenotypovo a po stránke praktického využitia odlišných genotypov láskavca. Súčasne vyhodnotiť rozsah diverzity polymorfizmu jedenástich druhov enzýmov pre účely jeho praktického využitia. Na základe dosiahnutých výsledkov rozhodnúť stratégiu ďalšieho štúdia polymorfizmu enzýmov láskavcov, ktorá by viedla ku genetickej interpretácii izozymogramov.

MATERIÁL A METÓDY

Experimentálnu prácu sme zrealizovali v roku 2011. Do analýz polymorfizmu enzýmov sme zaradili dvanásť genotypov láskavca, na ktoré sa sústreďuje niekoľkoročná intenzívna výskumná aktivita troch pracovísk - Centrum výskumu rastlinnej výroby, Piešťany, Ústav genetiky a biotechnológií rastlín SAV, Nitra a Katedra biológie, Trnavská univerzita, Trnava. Do experimentu sme zaradili nasledovné genotypy: druh láskavec metlinatý (*Amaranthus cruentus* L.) bol zastúpený genotypmi Burgundy, K283, Olpír a Fícha, *A. hypochondriacus* L. genotypmi Golden Giant, 1008, Plaisman a Koniz, *A. cannabinus* L. genotypom Ames 21670 (PI 641042), *A. blitum* subsp. *oleraceus* L. genotypom RRC 682 (PI606281), *A. hypochondriacus* x *A. hybridus* L. hybridom K433 a *Amaranthus* sp. L. odrodou cv. Rawa. Vzorky semien poskytla Génová banka, Centra výskumu rastlinnej výroby, Piešťany. Ako kontroly v experimente boli zaradené dva genotypy, ktorých analýzy boli realizované a prezentované v predošlých rokoch - *A. cruentus* L. genotyp Fícha - pôvodná vzorka bola získaná z Génovej banky Výskumného ústavu rastlinnej výroby Praha-Ruzyň, Česká republika a hybrid

K-433 produkt medzidruhového kríženia (*A. hypochondriacus* L. x *A. hybridus* L.), ktorý je pôvodom z Rodalo Research Center v Pensilvánii, USA.

Analýzy polymorfizmu enzýmov sme uskutočnili na trojdňových klíčencoch laskavcov. 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 bol uniformný v tomto experimente - 11 x 1,5 mm. Pre porovnanie mobility zón enzymatickej aktivity laskavcov s mobilitou zón aktivity enzýmov časti koleoptily bol použitý extrakt z päťdňovej koleoptily dvojlíniového hybridu kukurice (Sc 3098 x 3150, Sempol Holding, Trnava, Slovenská republika) pestovanej za tých istých kultivačných podmienok.

Pre štúdium polymorfizmu enzýmov sme použili nami mierne modifikovanú a experimentálne overenú metódu horizontálnej elektroforézy na škrobovom géle (Múdry a 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), β -glukozidáza (GLU, E.C. 3.2.1.21), glutamát-oxaloacetáttransaminázy (GOT, E.C. 2.6.1.1), izocitrátdehydrogenázy (IDH, E.C. 1.1.1.42), malátdehydrogenázy (MDH, E.C. 1.1.1.37), 6-fosfoglukonátdehydrogenázy (PGD, E.C. 1.1.1.44), fosfoglucoizomerázy (PGI, E.C. 5.3.1.9) a fosfoglukomutázy (PGM, E.C. 2.7.5.1). Všetky vzorky klíčiacych rastlín boli homogenizované a extrahované ručne sklenou tyčinkou v zariadení na homogenizáciu umiestnenom v ľade. Zloženie extrakčného činidla bolo: 5 ml vody; 0,84 g sacharózy a 0,42 g askorbátu sodného. Extrakčné činidlo sme aplikovali nasledovne: 20 μ l/časť koleoptily kukurice jedenásť mm dlhej. Pomer objemu extrakčného činidla k hmotnosti vzorky bol 100 μ l /200 mg. Škrobové gély mali zloženie: 77,31 g hydrolyzovaného škrobu zo zemiakov pre elektroforézu (Starch Art Corporation, Smithville, USA), 15 g sacharózy a 600 ml gélového tlmivého roztoku. Extrakt vzoriek boli vložené do škrobového gélu prostredníctvom papierových knôtov (Whatman 2) s rozmermi 11 x 1,5 mm. Elektroforetická separácia prebiehala v chladničke pri teplote 4 °C. Zloženie tlmivých roztokov na prípravu škrobových gélov, farbivých roztokov a parametre režimu konštantného výkonu boli podľa hore uvedených metodík.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

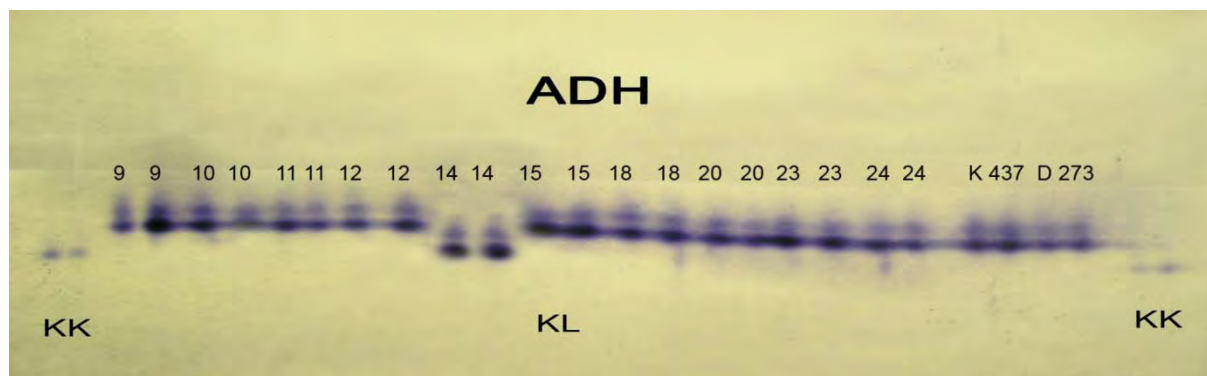
V roku 2011 sme uskutočnili analýzy polymorfizmu enzýmov dvanástich ekonomicky významných genotypov laskavca. Dosiahli sme nasledovné výsledky.

ACP – polymorfizmus kyslej fosfatázy bol pre všetky vzorky monomorfný so siedmimi až ôsmimi izoformami.

Podobné výsledky sú publikované aj v práci Sawhney et al. (1981).

ADH – polymorfizmus alkoholdehydrogenázy potvrdzuje úzku variabilitu s dvoma alelami rýchlou a pomalou. Všetky genotypy okrem RRC 682 (PI606281) majú rýchlu alelu, kým uvedený genotyp pomalú (Obr. 1).

Obrázok 1: Izozymogramy alkoholdehydrogenázy (ADH) ekonomicky významných druhov laskavca



CAT – izozymogramy katalázy boli monomorfné s jednou izoformou, ktorej fingerprint je pretiahleho tvaru.

DIA – polymorfizmus diaforázy všetkých genotypov bol monomorfný s piatimi izoformami.

GLU – aktivitu β -glukozidázy sme nezaznamenali (okrem kontroly) v žiadnej vzorke laskavca.

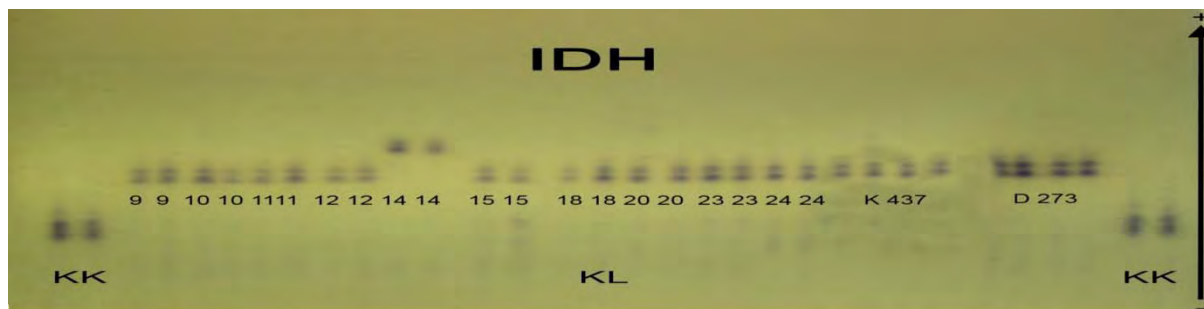
GOT – polymorfizmus všetkých vzoriek laskavca bol monomorfný s dvoma izoformami.

IDH – izozymogramy IDH boli monomorfné pre všetky genotypy laskavca okrem RRC 682 (PI606281). Sú reprezentované dvoma škvŕnami s pomalou mobilitou, kým uvedený genotyp má dvojicu škvŕn s rýchlou mobilitou (Obr. 2).

MDH – všetky genotypy boli monomorfné s piatimi izoformami..

PGD – izozymogramy 6-fosfoglukonátdehydrogenázy boli monomorfné s jednou izoformou.

Obrázok 2: Izozymogramy izocitrátdehydrogenázy (IDH) ekonomicky významných druhov láskavca



Vysvetlivky: K – koleoptila kukurice, 9 – trojdnové klíčence genotypov Golden Giant, 10 – Burgundy, 11 - cv. Rawa, 12 - K283, 14 - RRC 682 (PI606281), 15 - Ames 21670 (PI 641042), 18 – 1008, 20 – Plaisman, 23 – Olpír, 24 – Koniz.

PGI – analýzy potvrdili monomorfnosť všetkých vzoriek láskavca. Fingerpriny boli reprezentované štyrmi izoformami.

PGM – aj posledný analyzovaný enzým bol monomorfný so štyrmi izoformami. Výsledky korešponujú s našimi analýzami a citáciami publikovanými v práci Múdry et al. (2011), kde sú uvedené aj diadramy izozymogramov jednotlivých enzýmov.

Z výsledkov vyplynula výrazná uniformita analyzovaných genotypov až na genotyp RRC 682 (PI606281) - *A. blitum* subsp. *oleraceus* L.

ZÁVER

Na základe analýz polymorfizmu enzýmov ekonomicky významných genotypov láskavca, ktoré sme uskutočnili v roku 2011 sme zistili, že všetky genotypy sú monomorfné, až na genotyp RRC 682 (PI606281) - *A. blitum* subsp. *oleraceus* L., ktorý sa odlišuje od ostatných genotypov polymorfizmom ADH a IDH. I keď naše analýzy celkom nepotvrdzujú úzku, resp. širokú variabilitu zárodočnej plazmy láskavcov, skôr potvrdzujú výsledky prác s úzkou variabilitou sledovaných enzýmov. Pre detailné poznanie situácie a genetickú interpretáciu polymorfizmu láskavcov bude nevyhnutne potrebné uskutočniť analýzy podstatne väčšieho súboru genotypov, prípadne celého genofond.

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

LITERATÚRA

- JAIN, S.K. - WU, L. - VAIDYA, K.R. 1980. Levels of morphological and allozyme variation in Indian amaranths: a striking contrast. In *The Journal of Heredity*, vol. 71, 1980, no. 4, pp. 283-285.
- MÚDRY, P. – HRICOVÁ, A. – LIBIAKOVÁ, G. - GAJDOŠOVÁ, A. 2011. Methodological approaches to simple enzyme polymorphism analyses of amaranth species (*Amaranthus* sp.). In *Agriculture (Poľnohospodárstvo)*, vol. 57, 2011, no. 1, pp. 1-11. DOI: 10.2478/v10207-011-0001-4.
- MÚDRY, P. - GAJDOŠOVÁ, A. 2009. Metodológia analýzy polymorfizmu enzýmov druhov rodu láskavec (*Amaranthus* sp. L.) pre účely genetiky, šľachtenia a semenárstva. In *Zb. zo 16. vedeckej konferencie, Centrum výskumu rastlinnej výroby, Piešťany, 2009*, pp. 27-30, ISBN 978-80-89417-04-09.
- SAWHNEY, S. – BASRA, A.S. – KOHLI, R.K. 1981. Enzyme activity and electrophoretic pattern of isoenzymes of peroxidase, esterase and alkaline and acid phosphatase in relation to flowering in *Amaranthus viridis* L. – a quantitative SD plant. In *Biologia Plantarum*, vol. 23, 1981, no. 5, pp. 335-341.
- 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.). In *Technical Bulletin*, 1988, North Carolina Agric. Res. Service, North Carolina State University, Raleigh, no. 286, pp. 1-87.

Adresa pracoviska: RNDr. Pavol Múdry, CSc., Michaela Chalányová, Trnavská univerzita, Pedagogická fakulta, Katedra biológie, Priemyselná 4, P.O. Box č. 9, 918 43 Trnava, E-mail: pmudry@truni.sk, Ing. Iveta Čičová, PhD., Centrum výskumu rastlinnej výroby, Bratislavská 122, 921 68 Piešťany, E-mail: cicova@vurv.sk, Ing. Andrea Hricová, PhD., Ústav genetiky a biotechnológií rastlín, Slovenská akadémia vied, Akademická 2, P.O. Box 39A, 950 07 Nitra, e-mail: andrea.hricova@savba.sk

EVALUATION OF WILD HOPS (*HUMULUS LUPULUS* L.) HODNOCENÍ PLANÝCH CHMELŮ (*HUMULUS LUPULUS* L.)

VLADIMÍR NESVADBA, KAREL KROFTA, ARKADIJ MARZOEV, ANNA MARZOEVA, IVANA PŠENÁKOVÁ, JURAJ FARAGÓ, MIRDIN MURSALIEV, KASHID KYRDALIEV, ZDĚNKA POLONČÍKOVÁ, ALENA HENYCHOVÁ

In the period of 2006-2010 we evaluated 136 wild hops from our field collection. The average content of alpha acids was 2.16% and beta acids 3.12%. Alpha bitter acids content showed high level of variability (59.4%). In 2010 we analyzed 18 samples of wild hops taking from the original habitat. Hop plant sampled near the village of Mozdog (North-Osetia) had the highest content of alpha acids within this group. (8.87 %). Good for the breeding work seems to be a wild hop sampled near the river Vah with good content of alpha acids (3.55 %) and very low percentage (15,40 % rel.) of cohumulone. These hops seem to be valuable genetic material.

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

INTRODUCTION

Wild hops are very important within breeding programs. They are typical of wide genetic variability and thus they enrich the collection of hop genetic resources. Many wild hops have been selected by natural selection and in this way they have obtained some important characteristics. These features are utilized in breeding aimed at tolerance and resistance to diseases, pests and drought (Patzak et al., 2010). A great deal of contemporary breeding material is over-bred and depression is obvious. Wild hops used in breeding programs help to split progenies showing high vitality.

Wild hops show genetic (Patzak et al., 2007), chemical (Pšenáková et al., 2010) and phenotype variability. It is necessary to transfer wild hops into field conditions to confirm that needed characteristics are based genetically and not influenced by environment. It is very difficult to assess tolerance and resistance, as the infection pressure in hop-yards is much higher than in natural habitats of wild hops (Nesvadba et al., 2009). Hop Research Institute in Zatec takes wild hops collection trips every year (Nesvadba et al., 2010). Its gene fond contains wild hops from Europe: Czech Republic, Austria, Belgium, France, Spain, Switzerland, etc. A great number of these plants have their origin in Caucasus as well as in North America (US, Canada). In 2008 we managed to get wild hops from Kirghizia in Asia.

METHODS

Plant material

Monitoring of wild hops occurrence is carried out every year. In spring new localities are searched for and leaves sampled to do DNA analyses. Later since August to October these wild hops are evaluated (descriptions, occurrence of pests and diseases). Hop cones are sampled in perspective wild hops to carry out chemical analyses. After the assessment is finished perspective wild hops are selected and planted in a special hop-yard. Descriptions as well as chemical analyses are made in this stage as well. The aim is to confirm the characteristics, which were the plants sampled for in their natural biotopes. This assessment process was performed in the period 2005 - 2010. Totally 136 wild hops were researched.

Chemical analyses

Dry cones of the tested wild hops were used for chemical analyses aimed at hop resins and essential oils determination during four years. Hop resins were determined according to EBC 7.7. (Analitica, 1997) method by liquid chromatography (HPLC) on the column Nucleosil RP C₁₈ (Macherey-Nagel, Germany, 5 µm, 250 x 4 mm) using chromatograph SHIMADZU LC 20A (Shimadzu, Japan) with diode array detectors (DAD) according to Novak *et al.* (2006) and Krofta (2003). Hop essential oils were estimated from vacuum concentrated, water distilled samples by gas chromatography (GC) on capillary column DB 5 (Chromservis, CR, 30 m x 0.25 mm x 0.25 µm film thickness) using gas chromatograph Varian 3400 in the connection with mass detector Finnigan ITD 800 according to Krofta (2003). Compound identification was based on the comparison of GC retention indices and mass spectra with those of authentic compounds. Semi-quantitative evaluation of hop oils composition was performed on the basis of peak areas of individual components and expressed relatively to the total integrated area of all substances involved.

RESULTS

Wild hops are very natural important source for hop breeding. Their importance has increased recently because of the utilization within crossing aimed at tolerance and resistance to biotic and abiotic factors. The main objective of this work was to obtain new genotypes showing resistance to fungal diseases, drought, hot weather conditions, etc. Therefore, just the hop plants, which did not show any symptoms of downy and powdery mildew in their natural habitats were chosen. To be sampled they had to show good growing

characteristics, productivity, aroma, optimal chemical structures in hop cones, etc. Assessment of those hops has been carried out since 2006. The collection of 103 wild hops was selected in 2010 to extend evaluation of variability. These plants have been planted altogether in a hop garden. Contents and structure of hop resins are reviewed in Table 1.

Table 1: Variability in the contents and structure of hop resins (2006 – 2010)

Parameter	Alpha acids (% w/w)	Beta acids (% w/w)	Ratio alpha/beta	Cohumulone (% rel.)	Colupulone (% rel.)
Minimum	0.10	0.14	0.09	13.6	29.8
Maximum	8.87	8.23	2.07	64.6	82.9
Mean	2.16	3.12	0.74	32.6	49.8
Coef. variability (%)	59.4	41.8	50.1	46.2	36.3

In 2010 we analyzed 18 samples of wild hops taking from the original habitat. One sample was brought from Kyrgyz. It showed alpha acid content 2.21 %, but beta acid content was higher (4.14 %). Four samples were obtained within the international cooperation with University of SS. Cyril and Methodius, Faculty of Natural Sciences in Slovakia. They have their origin from the vicinity of Pezinok and Piešťany. Good for the breeding work seems to be a wild hop sampled near the river Váh with good content of alpha acids (3.55 %) and very low percentage (15,40 % rel.) of cohumulone. Czech hops have their origin in North Bohemia. The highest content of alpha acids (4.45%) was found out in a hop plant sampled near the village of Trebusin (Ustek hop region). Six wild hops were obtained within the expedition aimed at the collection of wild hops in North-Osetia. Hop plant sampled near the village of Mozdog had the highest content of alpha acids within this group. (8.87 %). Wild hop from Achsarisar showed also high alpha content (6.67 %). These hops seem to be valuable genetic material.

Table 2: Contents and structure of hop resins in wild hops harvested at the original habitat in 2010

Locality		Alpha acids (% w/w)	Beta acids (% w/w)	Cohumulone (% rel.)	Colupulone (% rel.)
CR	Suletice 3	2.02	4.09	20.8	41.7
CR	Třebušín 1	4.45	3.37	21.4	51.8
CR	Třebušín 2	2.01	3.20	25.2	41.4
CR	Česká Lípa	2.29	4.77	24.6	43.4
CR	Libochovice	2.31	3.56	26.3	42.3
Slovakia	Piešťany 1	2.87	2.44	22.0	52.7
Slovakia	Piešťany 2	3.55	2.40	15.4	49.5
Slovakia	Piešťany 3	2.22	2.75	18.1	52.2
Slovakia	Pezinok	2.25	2.79	23.1	46.4
Caucasus	Alagir	3.22	2.57	25.9	47.7
Caucasus	Vladikavkaz 1	4.51	2.00	22.3	42.6
Caucasus	Elchotova	3.59	1.90	18.6	40.1
Caucasus	Vladikavkaz Tareg	3.59	1.62	19.7	38.7
Caucasus	Achsarisar	6.67	2.26	17.1	34.9
Caucasus	Mozdog	8.87	2.45	17.4	38.1
Kyrgyz	Bishkek	2.21	4.14	23.6	45.6

SUMMARY

Numerous original wild hops are used also for brew tests at North-Osetia State University in Vladikavkaz. Department of Biotechnologies at the Faculty of Natural Sciences in University of SS. Cyril and Methodius in Trnava also utilizes this original wild material for research work. University of Agriculture in Bishkek has started recognition of wild hops at the territory of Kyrgyz Republic. The activities of the above-mentioned subjects are the reason why Hop Research Institute in Žatec has begun to cooperate with them on the base of mutual agreements.

Wild hops are very important for genetic resources and hop breeding. Genotypes with wide genetic variability are valuable material for the collection of genetic resources. Many important characteristics of these hops are utilized within breeding programs. Since 2007 wild hops have been used for breeding in Hop Research Institute in Žatec as well. The obtained results show at the variability of wild hops not only among the localities

but also within them. Mainly this variability is the base for hop research within the above-mentioned subjects. It is necessary to realize that these are only results from one year's research. Nevertheless, it is historically the first comparison of the original wild hops within four countries.

Acknowledgements: This work was supported by the Ministry of Education, Youth and Sports of CR in project ME832: "The search of wild hop populations in North Osetia region". National Program of Conservation and Utilization of Genetic Resources in Plants and Biodiversity" (Mze 33083/03-300 6.2.1) issued by Czech Ministry of Agriculture

REFERENCES

- Analytica EBC, Metod 7.7, 1997: European Brewery Convention, Getränke Fachverlang,
- KROFTA, K.: Comparison of quality parameters of Czech and foreign hop varieties. - Plant Soil Environ. 49: 261-268, 2003.
- NESVADBA V., PATZAK J., KROFTA K.: Variability of wild hops. Proceedings of Scientific Commission of IHGC, León, Spain, June 21-25, 13-16, 2009.
- NESVADBA V., POLONČÍKOVÁ Z., HENYCHOVÁ A.: Hop Genetic Resources in the Czech Republic. Sborník 6. vedeckej konferencie „Hodnotenie genetických zdrojov rastlín pre výživu a poľnohospodárstvo“, 26.-27. mája 2010 Piešťany, Slovensko.
- NOVÁK, P., KROFTA, K., MATOUŠEK, J.: Chalcone synthase homologues from *Humulus lupulus*: some enzymatic properties and expression. - Biol. Plant. 50: 48-54, 2006.
- PATZAK, J., VRBA, L., MATOUŠEK, J.: New STS molecular markers for assessment of genetic diversity and DNA fingerprinting in hop (*Humulus lupulus* L.). Genome 50: 15-25, 2007.
- PATZAK J., NESVADBA V., KROFTA K., HENYCHOVÁ, A., MARZOEV, A.I., RICHARDS, K.: Evaluation of genetic variability of wild hops (*Humulus lupulus* L.) in Canada and the Caucasus region by chemical and molecular methods. Genome 53: 545-557, 2010.
- PŠENÁKOVÁ, I., HETEŠOVÁ, L., NEMEČEK, P., FARAGÓ, J., KRAIC, J.: Genotype and seasonal variation in antioxidant activity of hop extracts. Agriculture (Poľnohospodárstvo), 56: 106-113., 2010.

Vladimír NESVADBA, Karel KROFTA, Zdenka POLONČÍKOVÁ, Alena HENYCHOVÁ: Hop Research Institute, Zatec, Czech Republic
Arkadij MARZOEV, Anna MARZOEVA: North-Osetia State University, Vladikavkaz, Russia
Ivana PŠENÁKOVÁ^{1,2}, Juraj FARAGÓ¹: ¹Department of Biotechnologies, Faculty of Natural Sciences, University of SS. Cyril and Methodius in Trnava, Slovak Republic; ² Department of Botany and Genetics, Faculty of Natural Science, Constantine the Philosopher University in Nitra, Slovak Republic
Mirdin MURSALIEV, Kashid KYRDALIEV: University of Agriculture, Bishkek, Kyrgyz Republic.

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

COMPARISON OF SOME TETRAPLOID WHEAT SPECIES ACCORDING TO THEIR PHOTOSYNTHETIC PERFORMANCE AND SELECTED PHYSIOLOGICAL CRITERIA

POROVNANIE NIEKTORÝCH DRUHOV TETRAPLOIDNÝCH PŠENÍC Z HĽADISKA ICH FOTOSYNTETICKEJ VÝKONNOSTI A VYBRANÝCH FYZIOLOGICKÝCH KRITÉRIÍ

OLŠOVSKÁ KATARÍNA¹, HUNKOVÁ ELENA¹, ŽIVČÁK MAREK¹, ŠVEC MIROSLAV²

¹Department of Plant Physiology, Faculty of Agrobiolgy and Food Resources, Slovak Agricultural University in Nitra, A. Hlinku 2, 94976 Nitra, ²Department of Genetics, Faculty of Natural Sciences, Comenius University in Bratislava, Mlynská dolina B1, 84215 Bratislava

The experiment with parental lines of tetraploid wheat species of various provenance cultivated in pots was performed in growth chamber. Plants were evaluated for selected growth parameters, photosynthetic pigments content and their ratio as well as fluorescence parameter performance index, chosen as the most suitable criterion for photosynthetic performance evaluation. The lowest values of total chlorophyll were measured in genotype ARM 7 (*T. timopheevii* subsp. *armeniicum*), then in DCS 9 (*T. turgidum* subsp. *dicoccoides*) and in CAR 1 (*T. turgidum* subsp. *carthlicum*), the highest values achieved ISP 6 (*T. ispahanicum*), then TRI 6158 (*T. turgidum* subsp. *dicoccon*) and TRG 7 (*T. turgidum* subsp. *turgidum*). Content of carotenoids were lowest in CAR 1, then in TIM 1 (*T. timopheevii* subsp. *timopheevii*) and ARM 7. Highest values of carotenoids were detected in TRG 7, then in ISP 6 and TRI 6158. Performance index (PI) was lowest in TIM 1, then in ARM 7, highest values achieved genotype PLN 8 (*T. turgidum* subsp. *polonicum*), then TRN 8 (*T. turgidum* subsp. *turanicum*) and CAR 1. Plant dry mass weight and leaf area per plant were lowest in ARM 7, the highest dry mass weight reached PLN 8 and CAR 1. The greatest leaf area was discovered in TRN 8, then in TRI 6158. Based on evaluated criteria and PI values mainly we can state that genotypes PLN 8, TRN 8, CAR 1, DSC 9 and ISP 6 used their photosynthetic performance above 100% of mean value compared to the rest of studied genotypes. We presuppose that parental lines with higher photosynthetic performance would bring more productive progeny compared to low-producing parents.

Key words: *Triticum* sp., tetraploid wheat, photosynthetic pigments, plant dry mass, leaf area, performance index

INTRODUCTION

Genetic sources are unique and irredeemable supplies of genes and gene complexes for constant improving of biological and production potential of organisms. Modern growing species and hybrids were developed by breeders for growing in various regions and for intensive agriculture as plant growing programs or genetics programs products [5]. Diploid and tetraploid wheats with their intraspecific variability become gradually the gene resources for wheat breeding. Some of them contain genes, which are absent in hexaploid wheat genotypes; they can be valuable in resistance increase against biotic and abiotic factors. In studium of genetic sources using options is not always given sufficient attention to physiological processes [1]. The goal of this work was to evaluate some tetraploid wheat species for selected physiological criteria and their photosynthetic performance.

MATERIAL AND METHODS

Seeds of tetraploid wheat species with various provenance (table 1) were exposed to vernalization (0-2°C) for 6 weeks in cooling box. Thereafter they were planted into plastic pots and grown in growth chamber in photoperiod 16/8 h (day/night), with temperature 21/18°C and light intensity at the leaf level 250 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. After 6 weeks plants were evaluated for selected growth parameters (plant height, number of tillers per plant, leaf area per plant, plant dry mass weight), photosynthetic pigments content, their ratio; moreover the rapid chlorophyll *a* fluorescence kinetics was measured. Intact youngest fully developed leaves of wheat plants were adapted to darkness for 30 min using light-withholding clips. Chlorophyll *a* fluorescence was measured by portable non-modulated fluorimeter Handy PEA (Plant Efficiency Analyser, Hansatech Instruments, Kings Lynn, UK). After the adaptation of leaves to darkness a single strong 1 s light pulse (3500 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) was applied on them with the help of three light-emitting diodes (650 nm). The fast fluorescence kinetics (F_0 to F_M) was recorded during 10 μs to 1 s. The measured data were analysed by the JIP test [3, 4]. Status of photosynthetic apparatus was characterised by performance index PI_{abs} , chosen as the most suitable criterion for photosynthetic performance evaluation [6]. It was calculated according formula [4]:

$\text{PI}_{\text{abs}} = [1 - (F_0/F_M)/(M_0/V_J)] * [(F_M - F_0)/F_0] * [(1 - V_J)/V_J]$ where: F_0 means fluorescence intensity at 50 μs , F_J is fluorescence intensity at 2 ms, F_M is maximal fluorescence intensity, V_J is relative variable fluorescence at 2 ms calculated as $V_J = (F_J - F_0)/(F_M - F_0)$, M_0 represents initial slope of fluorescence kinetics, which can be derived from the equation: $M_0 = 4 * (F_{300\mu\text{s}} - F_0)/(F_M - F_0)$. Photosynthetic pigments content was detected by JENWAY 6405UV/Vis. spectrophotometer and calculated according to [2]. Leaf area was measured after scanning leaves using image analyses by program ImageJ 1.38 (Wayne Rasband, NIH, USA), plant mass was dried with 60°C in drying chamber and thereafter weighted. Statistical analysis was performed by one way analysis of variance, the weighted means and standard errors were plotted in graphs.

Table 1: Identification and provenance of studied tetraploid wheat species (USDA, ARS, National Genetic Resources Program, Germplasm Resources Information Network (GRIN) [7]. * = Georgia

Name	Wheat species	Title	Origin	Donor
ARM 7	<i>Triticum timopheevii</i> subsp. <i>armeniacum</i>	PI 352265	AZE	GRIN, Beltsville, USA
TIM 1	<i>Triticum timopheevii</i> subsp. <i>timopheevii</i>	PI 119442	TUR	GRIN, Beltsville, USA
DCS 9	<i>Triticum turgidum</i> subsp. <i>dicoccoides</i>	PI 487262	SYR	GRIN, Beltsville, USA
Roncal	<i>Triticum turgidum</i> subsp. <i>dicoccon</i>	TRI 17700	ESP	IPK Gatersleben
TRI 6158	<i>Triticum turgidum</i> subsp. <i>dicoccon</i>	TRI 6158	IRN	IPK Gatersleben
TRG 7	<i>Triticum turgidum</i> subsp. <i>turgidum</i>	PI 384230	ETH	GRIN, Beltsville, USA
CAR 1	<i>Triticum turgidum</i> subsp. <i>carthlicum</i>	PI 61102	GEO *	GRIN, Beltsville, USA
PLN 8	<i>Triticum turgidum</i> subsp. <i>polonicum</i>	PI 254215	IRQ	GRIN, Beltsville, USA
TRN 8	<i>Triticum turgidum</i> subsp. <i>turanicum</i>	PI 624892	IRN	GRIN, Beltsville, USA
ISP 6	<i>Triticum ispahanicum</i>	PI 330548	IRN	GRIN, Beltsville, USA

RESULTS AND DISCUSSION

Contrasts between genotypes were statistically significant on probability level 95% (One Way ANOVA). The lowest values of total chlorophyll were measured in ARM 7 (*T. timopheevii* subsp. *armeniacum*), then in DCS 9 (*T. turgidum* subsp. *dicoccoides*) and in CAR 1 (*T. turgidum* subsp. *carthlicum*); the highest values achieved ISP 6 (*T. ispahanicum*), then TRI 6158 (*T. turgidum* subsp. *dicoccon*) and TRG 7 (*T. turgidum* subsp. *turgidum*). Content of carotenoids was lowest in CAR 1, then in TIM 1 (*T. timopheevii* subsp. *timopheevii*) and ARM 7. Highest values of carotenoids were detected in TRG 7, then in ISP 6 and TRI 6158. Performance index (PI) was lowest in TIM 1, then in ARM 7, highest values achieved PLN 8 (*T. turgidum* subsp. *polonicum*), then TRN 8 (*T. turgidum* subsp. *turanicum*) and CAR 1. Plant dry mass weight and leaf area per plant were lowest in ARM 7, the highest dry mass weight reached PLN 8 and CAR 1. The greatest leaf area was discovered in TRN 8, then in TRI 6158. PI values and dry mass weight showed mutual correlation. It supports the results of [4] showing performance index as a parameter indicating vitality of photosynthetic apparatus. Based on evaluated criteria and PI values mainly (fig.1, fig. 2) we can state that genotypes PLN 8, TRN 8, CAR 1, DSC 9 and ISP 6 used their photosynthetic performance above 100% of mean value compared to the rest of studied genotypes collection.

Figure 1: The content of pigments (chlorophyll *a* - fig. 1a, chlorophyll *b* - fig. 1b, carotenoids - fig. 1c) and chlorophyll *a* to *b* ratio (fig. 1d), total chlorophyll to carotenoids ratio (fig. 1e), performance index (fig. 1f) in relative units (r. u.) in wheat tetraploid genotypes.

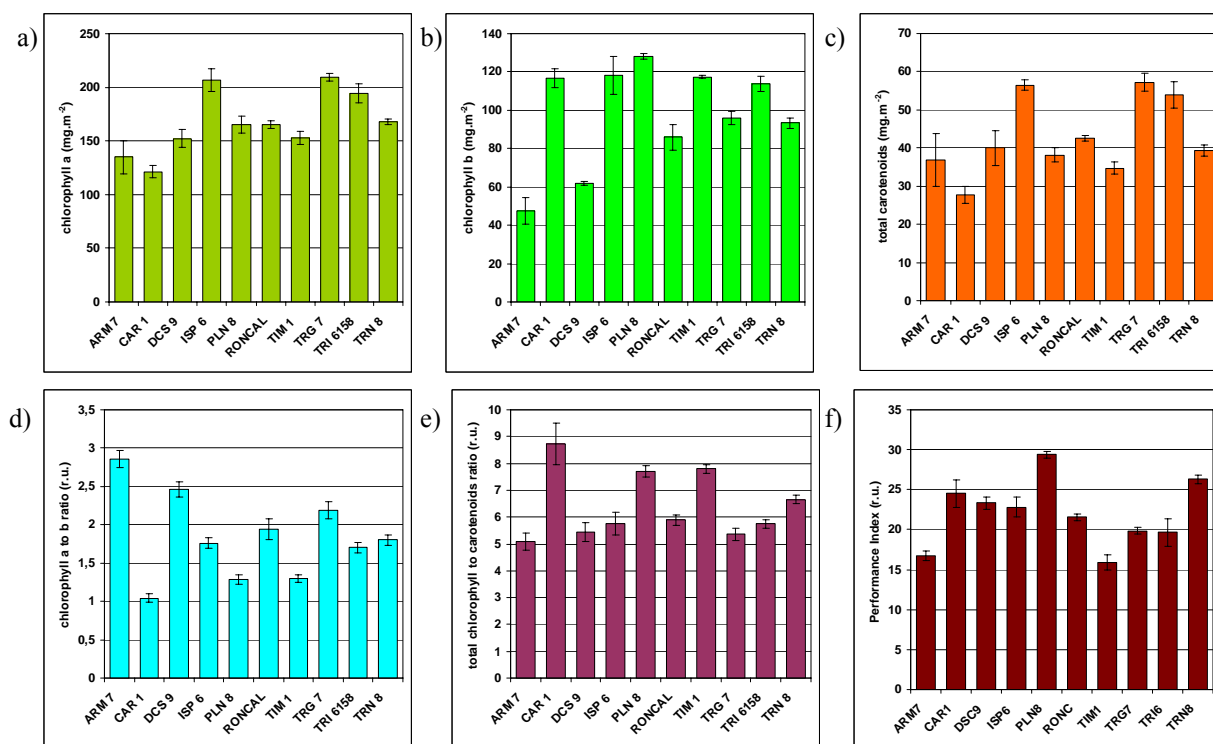
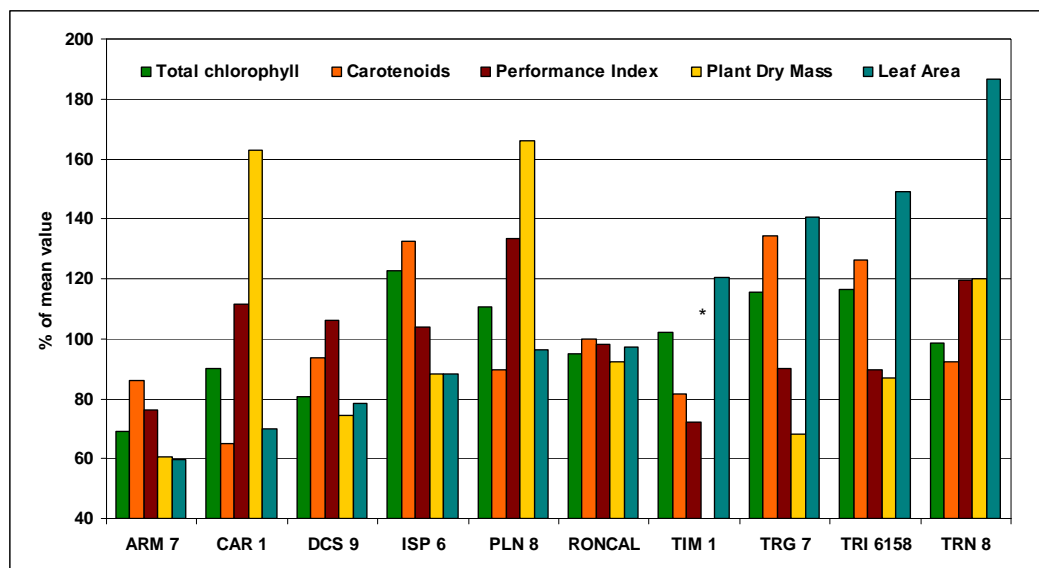


Figure 2: Relative values (%) of selected physiological parameters in relation to some growth indicators (* mean that indicator was not valuable regarding to insufficient number of plants).



CONCLUSION

Evaluation of measured main photosynthetic pigment contents and their mutual ratios enabled to identify genotypes with more favourable physiological properties and presumption of better resistance of photosynthetic apparatus. We presuppose that parental lines with higher photosynthetic performance would bring more productive progeny compared to low-producing parents.

Acknowledgement: This work was supported by project APVV – 0661 – 10.

REFERENCES

- HAUPTVOGEL, P. – ŠVEC, M. – BRESTIČ, M. – MENDEL, L. – HAUPTVOGEL, R. – BIELIKOVÁ, M. – ZIRKELBACHOVÁ, K. – GREGOVÁ, E. – OLŠOVSKÁ, K. – REPKOVÁ, J. – GAVURNÍKOVÁ, S. – BOJNANSKÁ, K. 2010. Genewheat – characterisation and evaluation diversity of wheat and their wild relatives and their utilising in breeding. In *Evaluation of plant genetic resources for nutrition and agriculture : proceeding from 6th scientific conference (Hodnotenie genetických zdrojov rastlín pre výživu a poľnohospodárstvo : zborník zo 6. vedeckej konferencie)*. Piešťany : CVRV, 2010. ISBN 978-80-89417-13-1, pp. 43-46.
- LICHTENTHALER, H. K. 1987. Chlorophylls and Carotenoids: Pigments of Photosynthetic Biomembranes. In *Methods in Enzymology*, vol. 148, 1987, pp. 350-382, DOI 10.1016/0076-6879(87)48036-1
- STRASSER, R. J. – SRIVASTAVA, A. – GOVINDJEE. 1995. Polyphasic chlorophyll *a* fluorescence transients in plants and cyanobacteria. In *Photochemistry and Photobiology*, vol. 61, 1995, no.1, pp. 32-42, DOI 10.1111/j.1751-1097.1995.tb09240.x
- STRASSER, R. J. – SRIVASTAVA, A. – TSIMILI-MICHAEL, M. 2000. The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples. In YUNUS, M. – PATHRE, U. – MOHANTY, P. (Eds.): *Probing Photosynthesis: Mechanisms, Regulation and Adaptation*. London, New York : Taylor and Francis, 2000, pp. 445-483.
- ŠVEC, M. - HAUPTVOGEL, P. – BRESTIČ, M. – MIKULOVÁ, K. 2010. *Vyhľadávanie a identifikácia genetických zdrojov pšenice (Triticum spp. L.) (Investigation and identification of wheat genetic sources (Triticum spp. L.)*. Brno : Tribun EU, 2010. 139 pp. ISBN 978-80-7399-966-7.
- ŽIVČÁK, M. – BRESTIČ, M. – OLŠOVSKÁ, K. – SLAMKA, P. 2008. Performance index as a sensitive indicator of water stress in *Triticum aestivum* L. In *Plant Soil and Environment*, vol. 54, 2008, no. 4, pp. 133-139
- <http://www.ars-grin.gov> Germplasm Resources Information Network (GRIN) [online database]

EVALUATION OF PHOTOSYNTHETIC APPARATUS TOLERANCE OF SELECTED TETRAPLOID WHEAT SPECIES TO HEAT STRESS

HODNOTENIE TOLERANCIE FOTOSYNTETICKÉHO APARÁTU VYBRANÝCH DRUHOV TETRAPLOIDNÝCH PŠENÍC NA STRES Z VYSOKEJ TEPLoty

OLŠOVSKÁ KATARÍNA, ŽIVČÁK MAREK, HUNKOVÁ ELENA, BRESTIČ MARIÁN

Department of Plant Physiology, Faculty of Agrobiolgy and Food Resources, Slovak Agricultural University in Nitra, A. Hlinku 2, 94976 Nitra

10 genotypes of tetraploid wheat species (parental lines) of different origin grown in growth chamber in pots were tested for heat susceptibility by exposure of whole plants to air temperature of 42°C for the 6 hours in light. Fluorescence measurements and photosynthetic pigments analyses were performed on plant leaves before and after heat stress. Majority of tested genotypes showed decrease of total chlorophyll content under heat stress - in TIM 1, CAR 1, RONCAL and TRN 8, mainly. Chlorophyll *a* to chlorophyll *b* ratio was generally almost unaffected, with exception of TRN 8, RONCAL and CAR 1, where significant increase was observed. The ratio of total chlorophylls to carotenoids decreased in all genotypes. According to results of rapid chlorophyll *a* kinetics measurements, genotypes CAR 1, TIM 1, ARM 7 and TRI 6158 were found as the most susceptible to heat stress at the level of photosynthetic apparatus; on the other hand, the best tolerance was observed in RONCAL, DCS 9 and TRG 7. Genotypes ISP 6, PLN 8 and TRN 8 offered medium or lower tolerance in high temperature conditions.

Key words: *Triticum* sp., tetraploid wheat genotypes, heat stress, chlorophyll fluorescence, photosynthetic pigments

INTRODUCTION

Heat stress is one of the main environmental factors that could easily constrain both crop growth and productivity. Even the dark reactions of photosynthesis, especially activation of Rubisco, were found the most sensitive to high temperature over 35°C [1], the real heat injury usually occurs at the thylakoid level. The photosystem II complex (PSII) is particularly sensitive to heat and even a short period of exposure to high temperatures irreversibly inactivates the oxygen-evolving complex of PSII [5]. Authors [2] investigated thermostability of wheat cell membranes and recorded big variability between observed genotypes. The goal of this work was find out genotypes of tetraploid wheat species with more tolerant photosynthetic apparatus against heat stress.

MATERIAL AND METHODS

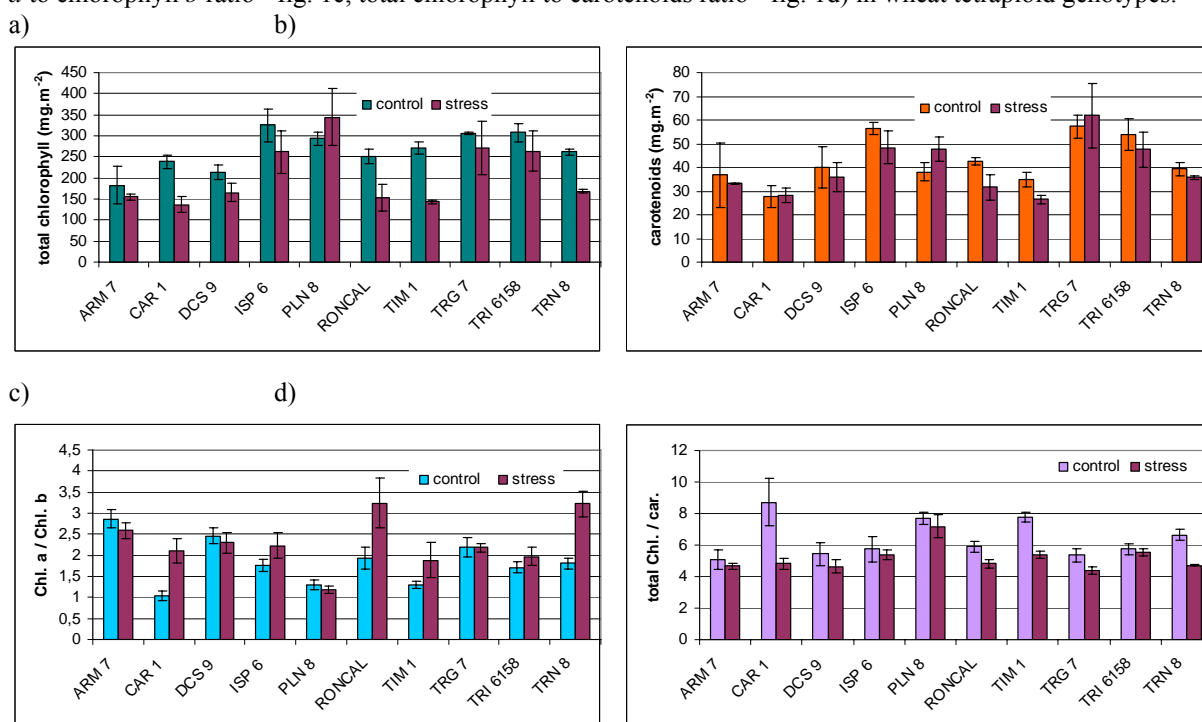
Genotypes of tetraploid wheat species used in experiment had different identification and origin, as follows: RONCAL (*Triticum turgidum* subsp. *dicoccon*, TRI 17700, Spain); TRI 6158 (*Triticum turgidum* subsp. *dicoccon*, Iran) – donor of those two genotypes was IPK Gatersleben; ARM 7 (*Triticum timopheevii* subsp. *armenicum*, PI 352265, Azerbaijan); CAR 1 (*Triticum turgidum* subsp. *carthlicum*, PI 61102, Georgia); DCS 9 (*Triticum turgidum* subsp. *dicoccoides*, PI 487262, Syria); ISP 6 (*Triticum ispahanicum*, PI 330548, Iran); PLN 8 (*Triticum turgidum* subsp. *polonicum*, PI 254215, Iraq); TIM 1 (*Triticum timopheevii* subsp. *timopheevii*, PI 119442, Turkey); TRG 7 (*Triticum turgidum* subsp. *turgidum*, PI 384230, Ethiopia); TRN 8 (*Triticum turgidum* subsp. *turanicum*, PI 624892, Iran) – donor of those eight genotypes was GRIN, Beltsville, USA (USDA, ARS, National Genetic Resources Program. Germplasm Resources Information Network - GRIN, Online database [7]). Kernels of these genotypes were vernalized under 0-2°C for 6 weeks in cooling box. Subsequently they were planted into plastic pots, transferred into growth chamber and grown under photoperiod 16/8 h (day/night), temperature 21/18°C and light intensity 250 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ at the leaf level. After 6 weeks plants were treated by 42°C temperature (heat stress) for 6 hours in fully watered conditions (without drought stress) and immediately measured with fluorescence technique – rapid chlorophyll *a* fluorescence kinetics according to [4]. Portable non-modulated fluorimeter Handy PEA (Plant Efficiency Analyser, Hansatech Instruments, Kings Lynn, UK) was used. Intact fully developed youngest leaves were adapted to darkness for 30 min using light-withholding clips and then measured. The measured data were analysed by the JIP test [4, 5]. The fluorescence parameters were appreciated and calculated as follows: Photochemical quantum yield: $\Phi_{\text{P}_0} = [1 - (F_0/F_M)]$; quantum yield of non-photochemical dissipation: $\Phi_{\text{D}_0} = F_0/F_M$; quantum yield of electron transport $\Phi_{\text{E}_0} = [1 - (F_0/F_M)] \cdot (1 - V_J)$; probability that dissipated electron moves to electron transport chain $\psi_0 = 1 - V_J$; $V_J = (F_{2\text{ms}} - F_0)/(F_M - F_0)$. $F_{2\text{ms}}$ = fluorescence at 2 ms; F_0 = minimal fluorescence, when all reactive centres are open; F_M = maximal fluorescence, when all reactive centres are closed.

A part of wheat leaves under heat stress were separated for photosynthetic pigments analysis. Pigments content was detected by colorimetric method using JENWAY 6405UV/Vis. spectrophotometer and calculated according to [3]. Statistical analyses were performed by one way analysis of variance, the weighted means and standard errors were plotted in graphs.

RESULTS AND DISCUSSION

The majority of tested genotypes showed decrease of total chlorophyll content under heat stress, in TIM 1, CAR 1, RONCAL and TRN 8, mainly (fig. 1a). On the contrary, decrease in PLN 8, TRG 7 and TRI 6158 was not present or was not significant. Chlorophyll *a* to chlorophyll *b* ratio was gently lower or balanced in majority of genotypes, with exception TRN 8, RONCAL and CAR 1, where significant increase was observed (fig. 1c). This increase detects structural change of light harvesting antennas and reactive centres of photosystems. Content of carotenoids was less affected than total chlorophyll content (fig. 1b); hence ratio of total chlorophylls to carotenoids decreased in all genotypes (fig. 1d). This fact suggests on increase of carotenoids contribution in pigment-protein complexes of light harvesting antennae; carotenoids are considered as important photoprotective compounds in plant cells especially on environmental stress conditions.

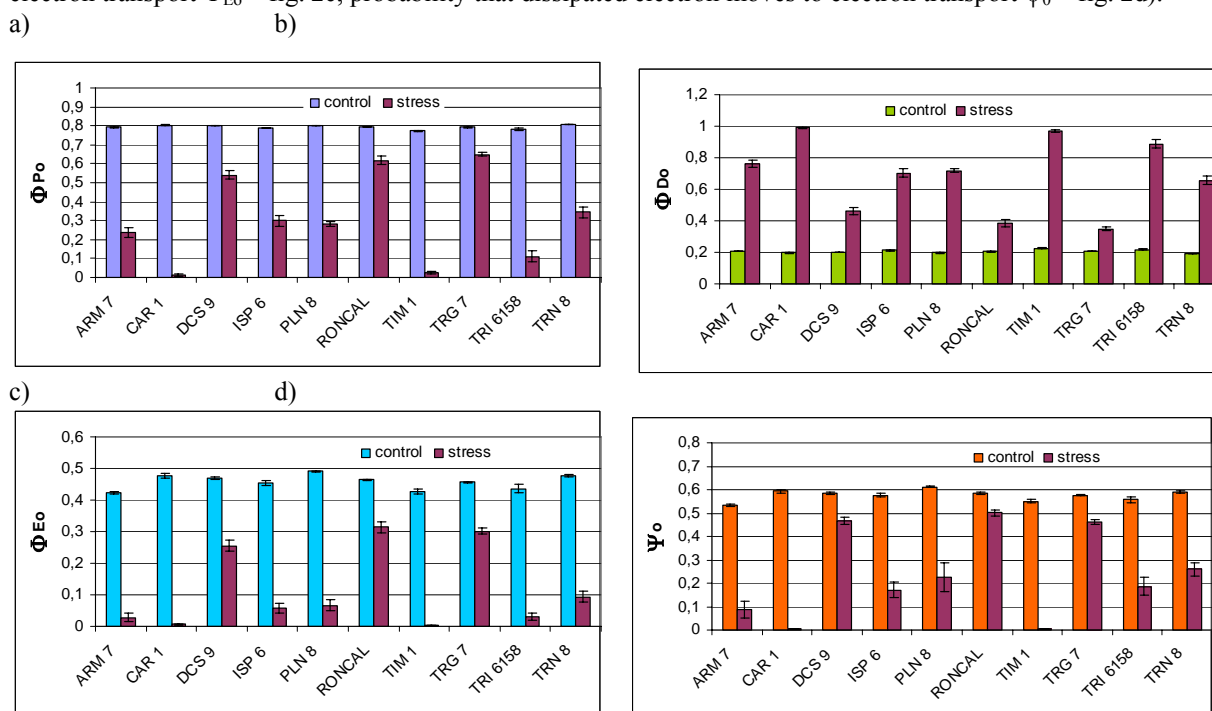
Fig. 1: The content of assimilation pigments (total chlorophyll - fig. 1a, total carotenoids – fig. 1b, chlorophyll *a* to chlorophyll *b* ratio - fig. 1c, total chlorophyll to carotenoids ratio - fig. 1d) in wheat tetraploid genotypes.



Photochemical quantum yield Φ_{P_0} presents ratio of photon number (light energy) used for reactive centre excitation to total photons number (light energy) captured by light harvesting complex [5]. The decrease of quantum effectivity caused by high temperature ranged from moderate to the total decline. In CAR 1 and TIM 1 we observed total photosynthesis inhibition (fig. 2a). Quantum yield of non-photochemical dissipation Φ_{D_0} states share of harvested energy dissipated as unproductive heat (where 1 means 100% of energy dissipated as heat) – we noticed increase of this parameter in all genotypes, in CAR 1 and TIM 1 nearly 1 (fig. 2b). Quantum yield for electron transport Φ_{E_0} expresses share of accumulated light energy which can be changed on electron transport and thus used in other photosynthetic processes. The smallest decline of this parameter under heat stress showed TRG 7, RONCAL and DCS 9 (fig. 2c). Parameter ψ_0 i.e. probability that dissipated electron moves to electron transport chain specifically quantifies the impairment of PSII acceptor side [5]. Decrease compared to control indicates reduction of available electron carriers. Genotypes RONCAL, DCS 9 and TRG 7 proved only small decrease indicating almost unaffected plastoquinone pool (fig. 2d).

Based on these results we can advise that genotypes CAR 1, TIM 1, ARM 7 and TRI 6158 showed the lowest tolerance of their photosynthetic apparatus to heat stress. On the contrary, the best tolerance achieved RONCAL, DCS 9 and TRG 7. Genotypes ISP 6, PLN 8 and TRN 8 offered medium or even lower tolerance to high temperature conditions. The fast chlorophyll *a* fluorescence kinetics measurements seemed as suitable technique for detection heat stress effects on the photosynthesis [6] and thus the differences in the photosynthetic apparatus thermostability among studied wheat genotypes.

Fig. 2: Quantum yields derived from rapid chlorophyll *a* fluorescence kinetics using the JIP-test (photochemical quantum yield Φ_{Po} – fig. 2a, quantum yield of non-photochemical dissipation Φ_{Do} – fig. 2b, quantum yield for electron transport Φ_{Eo} – fig. 2c, probability that dissipated electron moves to electron transport Ψ_0 – fig. 2d).



CONCLUSION

Evaluation of measured main photosynthetic pigment contents and ratios as well as measurements of fast chlorophyll *a* fluorescence kinetics enabled to identify different level of resistance of the photosynthetic apparatus to high temperature. We presuppose that parental lines of tetraploid wheat genotypes with higher heat resistance could be donors of improved high temperature tolerance for its progeny and hence, the most tolerant species identified in the experiment represents very valuable genetic resources.

Acknowledgement: This work was supported by the project APVV – 0661 – 10.

REFERENCES

- CRAFTS-BRANDNER, S. J. – LAW, R. D. 2000. Effects of heat stress on the inhibition and recovery of the ribulose-1,5 biphosphate carboxylase/oxygenase activation state. In *Planta*, vol. 212, 2000, no. pp. 67-74, DOI 10.1007/s004250000364
- IBRAHIM, A. M. H. – QUICK, J. S. 2001. Genetic Control of High Temperature tolerance in Wheat as Measured by Membrane Thermal Stability. In *Crop Science*, vol. 41, 2001, no. 5, pp. 1405-1407.
- LICHTENTHALER, H. K. 1987. Chlorophylls and Carotenoids: Pigments of Photosynthetic Biomembranes. In *Methods in Enzymology*, vol. 148, 1987, pp. 350-382, DOI 10.1016/0076-6879(87)48036-1
- STRASSER, R. J. – SRIVASTAVA, A. – GOVINDJEE. 1995. Polyphasic chlorophyll *a* fluorescence transients in plants and cyanobacteria. In *Photochemistry and Photobiology*, vol. 61, 1995, no.1, pp. 32-42, DOI 10.1111/j.1751-1097.1995.tb09240.x
- STRASSER, R. J. – SRIVASTAVA, A. – TSIMILI-MICHAEL, M. 2000. The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples. In YUNUS, M. – PATHRE, U. – MOHANTY, P. (Eds.): *Probing Photosynthesis: Mechanisms, Regulation and Adaptation*. London, New York : Taylor and Francis, 2000, pp. 445-483.
- ŽIVČÁK, M. – BRESTIČ, M. – OLŠOVSKÁ, K. 2008. Application of Photosynthetic Parameters in the Screening of Wheat (*Triticum aestivum* L.) Genotypes for Improved Drought and High Temperature Tolerance. In ALLEN, J. F. – GANTT, E. – GOLBECK, J. H. – OSMOND, B. (Eds.): *Photosynthesis. Energy from the Sun : 14th International Congress on Photosynthesis*. Dordrecht, The Netherlands : Springer, 2008. ISBN 978-1-4020-6707-5, pp. 1253-1256.
- <http://www.ars-grin.gov> Germplasm Resources Information Network (GRIN) [online database]

VYUŽITIE EST-SSR MARKEROV PRI CHARAKTERIZÁCII SLOVENSKÝCH ODRÔD PŠENICE (*TRITICUM AESTIVUM* L.)

CHARACTERIZATION OF SLOVAK WHEAT VARIETES (*TRITICUM AESTIVUM* L.) USING EST – SSR MARKERS

KATARÍNA ONDREIČKOVÁ, MARTINA HUDCOVICOVÁ, PAVOL HAUPTVOGEL

Centrum výskumu rastlinnej výroby Piešťany

Hexaploid bread wheat (*T. aestivum* L.) is one of the world's most important crop plants and displays a very low level of intraspecific polymorphism. Microsatellites, also termed simple sequence repeats (SSRs), have been proposed as one of the most suitable markers for the assessment of genetic variation and diversity among wheat varieties/lines, because they are multiallelic, chromosome specific and evenly distributed along chromosomes. Large number of SSRs are located in transcribed regions of genomes, including protein-coding genes and expressed sequence tags (ESTs), although in general, repeat numbers and total lengths of SSRs in these regions are relatively small. A set of 5 wheat microsatellite markers was used for the assessment of genetic diversity in 46 genotypes of hexaploid bread wheat. The total number of alleles in locus CV 782422 are 16, in locus CV 782549 are 8, in locus CV 782428 are 22, in locus AY 857761 are 11 and in locus TDI 389708 are 11.

Key words: microsatellites, EST-SSR, polymorphism, wheat

ÚVOD

Genetický polymorfizmus je definovaný ako znak s dvoma alebo viacerými geneticky determinovanými diskontinuítnymi variantmi v jednej populácii, pričom početnosť zriedkavého variantu má frekvenciu aspoň 1%. Genetický polymorfizmus vylučuje negenetické znaky, kontinuálnu variabilitu, polytypizmy a zriedkavé znaky. Polymorfizmus môže byť: morfológický, funkčný, sérologický, biochemický a DNA polymorfizmus.

V súčasnosti medzi často používané DNA markery zaraďujeme mikrosatelity, čo sú úseky DNA, ktoré obsahujú opakujúce sa nukleotidové motívy, pričom dĺžka základnej tandemovej repetície je 1 – 6 nukleotidov (Tautz, 1989). Sú často označované ako SSR (Simple Sequence Repeats) alebo STR (Short Tandem Repeats, Simple Tandem Repeats). Mikrosatelity sa vyskytujú vo vysokom počte kópií vo všetkých doteraz analyzovaných eukaryotických a aj prokaryotických genómoch (*Neisseria* sp., *Haemophilus influenzae*, *H. parainfluenzae*, *Moraxella catarrhalis*) a sú rozptýlené po celom genóme (Li a kol., 2004). Vyskytujú sa ako v nekódujúcich tak aj v kódujúcich oblastiach. Polymorfizmus mikrosatelitov sa prejavuje ako variabilný počet kópií tandemových opakovaní. Môže byť detegovaný rôznymi prístupmi využívajúcimi buď hybridizáciu, alebo amplifikáciu v polymerázovej reťazovej reakcii.

Pre mikrosatelity nachádzajúce sa v kódujúcich oblastiach je zaužívaná skratka EST – SSR (Expressed Sequence Tags - Simple Sequence Repeats). Rozdiel oproti mikrosatelitom nachádzajúcich sa v nekódujúcich sekvenciách (SSR) a EST – SSR je, že EST – SSR vykazujú len asi polovičnú úroveň polymorfizmu, je to však nahradené ich podstatne vyššou informatívnou hodnotou. EST – SSR markery majú potenciál stať sa markermi odhaľujúcimi tzv. funkčnú diverzitu, pričom počet potrebných analýz by mal byť nižší a diverzita by sa dala odhaľovať v konkrétnych znakoch, vlastnostiach či súvislostiach. Mikrosatelity nachádzajúce sa vo vnútri génov sú kritickým faktorom pre normálnu génovú aktivitu, pretože expanzia alebo skrátenie SSR v kódujúcich sekvenciách má priamy účinok na zodpovedajúci gén a na vznik fenotypového prejavu (Li a kol., 2004). EST – SSR markery majú niekoľko výhod oproti DNA markerom nachádzajúcim sa v nekódujúcich sekvenciách: udávajú variabilitu v kódujúcich sekvenciách a vytvárajú tzv. „dokonalé markery“ na označenie génov; vytvorenie EST databázy je po finančnej stránke menej nákladné ako databáza vytvorená z genomického SSR a môže byť použitá na určenie vzdialenejšej genetickej príbuznosti, keďže stupeň variability v kódujúcich sekvenciách je nižší (Gupta a kol., 2003).

Cieľom práce bolo určenie genetickej variability v kódujúcich sekvenciách 46 odrôd pšenice (*Triticum aestivum* L.) pomocou EST - SSR s použitím navrhnutých primerov a zhodnotenie alelickej variability v jednotlivých lokusoch.

MATERIÁL A METÓDY

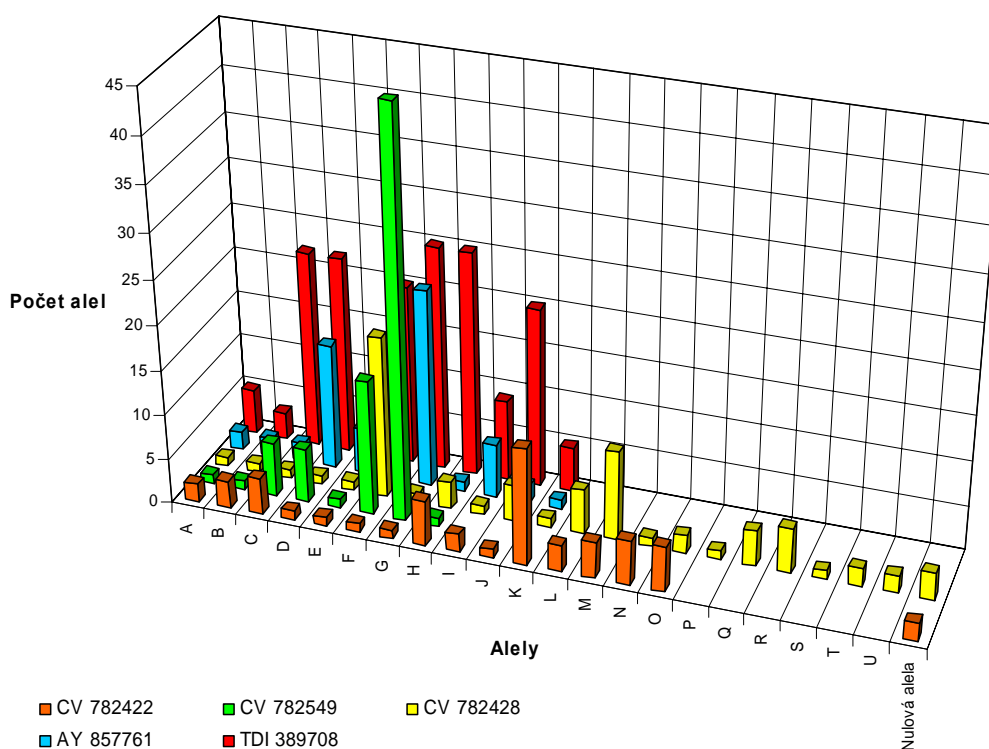
Pre analýzy mikrosatelitného polymorfizmu DNA sme použili súbor 46 slovenských odrôd hexaploidnej pšenice *Triticum aestivum* L., ktoré sme získali z kolekcie genetických zdrojov pšenice Génovej banky semenných druhov Slovenskej republiky Výskumného ústavu rastlinnej výroby v Piešťanoch. Celkovú rastlinnú DNA sme izolovali z mladých listov pšenice pomocou kitu Qiagen Plant Maxi Kit (Qiagen). V GenBank databáze nukleotidových sekvencií sme vyhľadali mikrosatelitné sekvencie nachádzajúce sa v kódujúcich oblastiach pšenice. Pre 5 z nich sme navrhli primery on – line programom Primer3 (Rozen a Skaletsky, 2000). Tieto primery sme použili na amplifikáciu DNA zo 46 odrôd pšenice, ktoré sme následne elektroforeticky separovali na polyakrylamidových géloch a farbili striebrom. V DNA profiloch sme hodnotili prítomnosť reprodukovateľných polymorfných markerov.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Vo vybraných genotypoch pšenice *T. aestivum* L. sme analyzovali polymorfizmus amplifikovaných mikrosatelitných úsekov DNA nachádzajúcich sa v kódujúcich oblastiach. Testovali sme 5 párov mikrosatelitných primerov u 46 odrôd hexaploidnej pšenice *T. aestivum* L. Celkový počet alel v lokuse CV 782422 je 16 vrátane nulovej alely, v lokuse CV 782549 je 8, v lokuse CV 782428 je 22 vrátane nulovej alely, v lokuse AY 857761 je 11 a v lokuse TDI 389708 je tiež 11. Frekvenciu výskytu jednotlivých alel v lokusoch udáva Obr. 1. a v Tab. 1 je vyjadrený počet alel v jednotlivých lokusoch pri konkrétnych odrodách.

Tabuľka 1: Tabuľka vyjadrujúca počet alel v jednotlivých lokusoch pri 46 odrodách *Triticum aestivum* L. Pod poradovými číslami sú tieto odrody: 1. Diosecka 85-6, 2. Diosecka NR, 3. Diosecka 1013, 4. Balada, 5. Radosinska, 6. Lontovska, 7. Bucianska, 8. Slovenska skora, 9. Samorinska, 10. Rada, 11. Blava, 12. Butin, 13. Danubia, 14. Ilona, 15. Kosutka, 16. Viginta, 17. Regia, 18. Solida, 19. Livia, 20. Torysa, 21. Sana, 22. Agra, 23. Roxana, 24. Iris, 25. Istra, 26. Solaris, 27. Barbara, 28. Kondor (SO-8527), 29. Bucianska červenoklasa, 30. Bucianska v. t. 16, 31. Bucianska 16/438, 32. Bucianska 106, 33. Bucianska 202, 34. Bucianska 316, 35. Bucianska 316/515, 36. Calovska, 37. Kosutka, 38. Novy zivot, 39. Radosinska dorada, 40. Radosinska karola, 41. Radosinska norma, 42. Radosinska polorana 562, 43. Radosinska rana 594, 44. Slovenska B, 45. Slovenska intenzivna, 46. Slovenska 2

P.č. odrody	Názov lokusu v GenBank					Por.č. odrody	Názov lokusu v GenBank				
	(typ EST-SSR)						(typ EST-SSR)				
	CV 782422	CV 782549	CV 782428	AY 857761	TDI 389708		CV 782422	CV 782549	CV 782428	AY 857761	TDI 389708
	(GCCA)n	(CTT)n	(CCAT)n	(CG)n	(AAC)n		(GCCA)n	(CTT)n	(CCAT)n	(CG)n	(AAC)n
1.	-	2	1	2	-	24.	1	1	-	2	-
2.	2	2	4	2	5	25.	-	2	3	-	-
3.	1	1	2	3	3	26.	2	1	2	1	2
4.	-	3	1	2	-	27.	2	1	1	-	3
5.	-	2	4	2	4	28.	-	2	2	-	3
6.	-	2	2	-	6	29.	1	1	2	-	3
7.	2	2	NULOVÁ	2	6	30.	3	1	2	1	3
8.	-	2	4	4	-	31.	-	1	1	1	3
9.	2	2	4	1	6	32.	2	2	-	-	4
10.	-	2	NULOVÁ	-	4	33.	-	1	2	-	4
11.	2	2	4	3	5	34.	1	1	1	3	4
12.	-	2	2	1	3	35.	3	1	3	-	4
13.	1	2	2	1	4	36.	2	2	2	3	6
14.	1	3	1	-	5	37.	1	2	2	-	6
15.	-	3	1	-	5	38.	2	2	2	-	3
16.	2	1	-	2	4	39.	1	-	-	3	5
17.	3	2	-	1	4	40.	1	1	-	2	5
18.	1	1	-	2	4	41.	2	2	-	3	4
19.	-	2	-	-	1	42.	3	1	-	3	4
20.	2	2	1	-	4	43.	NULOVÁ	1	-	3	3
21.	2	1	-	-	3	44.	1	1	2	2	2
22.	-	3	2	-	3	45.	1	1	2	2	3
23.	2	2	2	2	1	46.	NULOVÁ	2	NULOVÁ	2	3



Obrázok 1: Graf znázorňujúci početnosť jednotlivých alel v lokusoch CV 782422, CV 782549, CV 782428, AY 857761 a TDI 389708.

Z uvedených výsledkov vyplýva, že najpolymorfnejší je lokus CV 782428 s celkovým počtom alel 22 (vrátane nulovej alely) a najviac alel na odrode je v lokuse TDI 389708. Okrem prítomnosti jednotlivých alel sa v lokusoch pri niektorých odrodách vyskytovali aj nulové alely čo znamená, že sa v danej dráhe po elektroforéze opakovane neobjaví amplifikovaný PCR produkt. Môže to byť napr. spôsobené zmenou sekvencie potrebnou na nadviazanie primerov pri PCR reakcii (Cordeiro a kol., 2001).

ZÁVER

V práci sme dokázali vyšší stupeň mikrosatelitného polymorfizmu nachádzajúci sa v kódujúcich oblastiach. Plánujeme prácu doplniť o výsledky polymorfizmu v nekódujúcich oblastiach a porovnať získané výsledky, pričom súbor doplníme o ďalšie slovenské odrody.

Podakovanie: Tato 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

- CORDEIRO, G. M. - CASU, R. - MCINTYRE, C. L. - MANNERS, J. M. - HENRY, R. J. 2001. Microsatellite markers from sugarcane (*Saccharum* spp.) ESTs cross transferable to *Erianthus* and sorghum. *Plant Sci*, 160, 2001, s. 1115-1123.
- GUPTA, P. K. - RUSTGI, S. - SHARMA, S. - SINGH, R. - KUMAR, N. - BALYAN, H. S. 2003. Transferable EST – SSR markers for the study of polymorphism and genetic diversity in bread wheat. *Mol Gen Genomics*, 270, 2003, s. 315-323.
- LI, Y. CH. - KOROL, A. B. - FAHIMA, T. - NEVO, E. 2004. Microsatellites within genes: structure, function and evolution. *Mol Biol and Evol*, 21, 2004, 6, s. 991-1007.
- ROZEN, S. - SKALETSKY, H. 2000. Primer3 on the www for general users and for biologist programmers. *Methods in Molecular Biology*, 132, 2000, s. 365-386.
- TAUTZ, D. 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acid Res*, 17, 1989, s. 6463-6470.

Autori: Mgr. Katarína Ondreičková, Mgr. Martina Hudcovicová, PhD.*, Ing Pavol Hauptvogel, PhD.
 Výskumný ústav rastlinnej výroby Piešťany, Centrum výskumu rastlinnej výroby Piešťany, Bratislavská cesta
 122, 921 68 Piešťany, SR,
 *Corresponding author: Tel.: +421-33-7722311; fax: +421-33-7726306; E-mail: hudcovicova@vurv.sk

HODNOCENÍ ODOLNOSTI CHMELE K PADLÍ CHMELOVÉMU (*PODOSPHAERA MACULARIS SSP. HUMULI*)

ASSESSMENT OF HOP RESISTANCE TO DOWNY MILDEW (*PODOSPHAERA MACULARIS SSP. HUMULI*)

ZDĚNKA POLONČÍKOVÁ, ALENA HENYCHOVÁ, VLADIMÍR NESVADBA, TOMÁŠ KUDRNA

Hop Research Institute, Co., Ltd., Kadanska 2525, Zatec, Czech Republic

*In 2010 we tested 2777 specimens from eight progenies to find out their possible resistance to powdery mildew (*Podosphaera macularis ssp. humuli*). The progeny descending from Saazer showed the biggest number of the sensitive genotypes (83%). On the contrary, the biggest ratio of the resistant genotypes was found out in the progeny of an English dwarf male plant. Within Czech hop varieties the highest resistance was determined in the progeny having its origin in Sládek (22%).*

*Key words: hops, *Humulus lupulus L.*, hop breeding, resistance, powdery mildew, *Podosphaera macularis ssp. humuli**

ÚVOD

Šlechtění chmele je vysoce komplikovaný proces, trvající v průměru deset až patnáct let. V různých fázích šlechtitelského programu je selektován rozsáhlý rozpracovaný šlechtitelský materiál. Značný důraz je kladen na vysoký stupeň odolnosti vůči rozhodujícím patogenům. V posledních letech byla činnost výzkumného záměru zaměřena na tvorbu metodik na odolnost chmele k peronospoře chmelové a k padlí chmelovému. V roce 2008 byla ukončena metodika pro hodnocení odolnosti chmele k peronospoře chmelové, která se roku 2009 využívá v šlechtitelském procesu při tvorbě nových genotypů odolných k této chorobě. Náročnější byla tvorba postupu testace chmele na odolnost chmele k padlí chmelovému. První testace byly prováděny výhradně v letech, kdy byl silný výskyt této choroby (rok zahájení 1998). Bylo nutné vybrané porosty neošetřovat a až míra poškození jednotlivých genotypů či odrůd chmele stanovila náchylnost či odolnost k této chorobě. Tyto testované porosty byly téměř zničeny. Z tohoto důvodu bylo nutno získat postup pro stanovení odolnosti k padlí chmelovému. Výzkumný záměr byl zahájen v roce 2004. V prvních letech se jednalo o ověření metodického postupu. Získaný šlechtitelský materiál se touto metodou testuje od roku 2008. Součástí této práce je i testace rodičovských komponentů, jak přenáší odolnost k padlí chmelovému na svá potomstva. Na základě těchto znalostí je možné vybrat vhodné rodičovské komponenty, u kterých lze předpokládat obecnou nebo i specifickou kombinační schopnost požadovaných znaků. V roce 2010 se pokračovalo v tvorbě a optimalizaci umělých infekcí k padlí chmelovému ve skleníkových podmínkách. Jak bylo uvedeno na počátku řešení výzkumného záměru, dosud nebyly genotypy chmele na odolnost k padlí chmelovému testovány. Pro tento cíl byla vybavena skleníková kóje, která slouží pro uchování přirozených podmínek padlí chmelového a následně možnosti infekce testovaného rostlinného materiálu. Na základě dosažených výsledků a optimalizace jednotlivých postupů se v roce 2010 podařilo ukončit postup, kterým lze stanovit odolnost chmele k padlí chmelovému.

METODIKA

Optimální termín pro realizaci testování chmele na odolnost k padlí chmelovému je od počátku února do poloviny května. A to z důvodu vytvoření optimálních podmínek ve skleníkové kóji. V pozdějším termínu se vlivem zvyšování teplot a intenzity slunečního záření výrazně zvyšuje teplota ve skleníku. Následkem toho dochází k zastavení nárůstu infekce padlí chmelového. Napadená pletiva dřívě zasychají a je omezena další tvorba konidií, které se šíří vzduchem. Skleníková kóje musí být vybavena automatickou klimatizací, která udržuje stabilní teplotu od 14 do 25°C. Při nižší teplotě nedochází k uvolňování ascospor z kleistotecií. Při vyšší teplotě se ascospory uvolňují, ale dochází k zastavení klíčení oidia a tím je zamezena infekce. Aby se docílilo relativní vzdušné vlhkosti nad 90 % (simulace rosy) musí být dále skleníková kóje vybavena automatickým rosením. Rosení se neprovádí přímo na rostliny, zařízení je upevněno pod úroveň rostlin. Za těchto stabilizovaných podmínek se do kóje vnesou citlivé (náchylné) chmelové rostliny v květináčích, na které se následně rozprostře zmrazený infikovaný materiál, který byl odebrán v době hromadného výskytu v předešlém roce. Za 3 až 4 týdny se na rostlinách začíná projevovat infekce padlí chmelového, která se dostává z výtrusů průduchy do listů, zvláště citlivé jsou mladé vyvíjející se orgány (citlivé tkáně). Tyto rostliny označujeme jako infikční. Rostliny s měkkými, mladými listy se infikují opakovaně. Tímto propojením infekce se udržuje infekce po několik měsíců, kdy je neustále na rostliny vynakládán infikční tlak.

VÝSLEDKY A DISKUSE

V roce 2010 se celkem testovalo 2777 nových genotypů chmele, které byly získány v rámci 7 křížení. Všechna křížení byla provedena ve šlechtitelské školce, kde matečné rostliny byly opyleny přirozeným způsobem samčími genotypy Sm08. Nejvyšší procento náchylných jedinců vykazují potomstva českých odrůd. Zatecký poloraný červeňák (ŽPČ) a Vital, a to 83 % resp. 77 %. Z dosažených výsledků je zcela zřejmé, že tyto

české odrůdy nejsou vhodné pro šlechtění na odolnost k padlí chmelovému. Potomstva odrůd Sládek (ČR) a Columbus (USA) vykazují téměř shodně citlivost k padlí chmelovému, protože vykazují 52 % resp. 54 % senzitivních jedinců. Současně potomstva vykazují 22 % resp. 21 % odolných genotypů, což je pro šlechtění velmi důležité. Novošlechtění 5166 je velmi perspektivní pro vysoký obsah alfa hořkých kyselin, proto byla i jeho potomstva testována na odolnost k padlí chmelovému. Z tabulky 1 je patrné, že pouze 36 % jedinců je senzitivních, ostatní jedinci jsou tolerantní, nebo vykazují odolnost (64 %). Tento poznatek je velmi důležitý, protože tento nadějný genotyp lze využívat v rámci šlechtitelského programu na šlechtění pro vysoký obsah alfa kyselin a současně budou tato potomstva vykazovat i odolnost k padlí chmelovému. Potomstvo Sm08 H6 bylo získáno v rámci výzkumného záměru, z křížení na odolnost k padlí chmelovému. Semena těchto dvou potomstev byla získána z nadějných samičích rostlin, která vykazovala při výběru dobré šlechtitelské znaky. Z výsledků je zřejmé, že potomstva vykazují pouze 19 % resp. 27 % senzitivních jedinců, což je nejméně v rámci testovaného souboru matečných rostlin. Tyto matečné rostliny se stanou základním výchozím materiálem pro šlechtění chmele na odolnost k padlí chmelovému. V rámci šlechtění chmele na nízké konstrukce bylo testováno potomstvo křížení po německé odrůdě Taurus a anglickém samci, který je zakrslého typu (genotyp pro nízké konstrukce). Je patrné, že toto potomstvo vykazuje nevyšší podíl odolných genotypů (49 %). Odolnost je pravděpodobně dána anglickou samčí rostlinou, protože v Anglii se šlechtí na odolnost k padlí chmelovému již desítky let.

Tabulka 1: Hodnocení potomstev na odolnost k padlí chmelovému

Křížení	Senzitivní	Tolerantní	Odolné
ŽPČ x OP	83 %	16 %	1 %
Vital x OP	77 %	18 %	5 %
Sládek x OP	52 %	26 %	22 %
Columbus x OP	54 %	25 %	21 %
Nš.5166 x OP	36 %	51 %	13 %
Sm 08 H6 15/139 x OP	19 %	45 %	36 %
Sm 08 H6 15/227 x OP	27 %	50 %	23 %
Taurus x Anglie (NK)	24 %	27 %	49 %

ZÁVĚR

Dosažené výsledky poukazují, že se podařilo získat postup hodnocení chmele na odolnost k padlí chmelovému. Je to první metodika, která bude využívána v České republice pro testování nových i případně zahraničních odrůd na odolnost k padlí chmelovému. Výsledky poukazují, že nejméně vhodné odrůdy pro šlechtění na odolnost k padlí chmelovému jsou Žatecký poloraný červeňák a Vital.

Poděkování: Tento příspěvek byl zpracován v rámci výzkumného záměru MSM 1486434701 „Výzkum a regulace stresových faktorů chmele“ a projektu 3.d „Tvorba genotypů chmele s rezistencí k biotickým a abiotickým faktorům s požadovanou kvalitou znaků“, který podporuje MZe.

KVALITA SLADOVNICKÉHO JEČMENE VE SLOVENSKEJ REPUBLICE 1960 - 2009

MALTING BARLEY QUALITY IN THE SLOVAK REPUBLIC 1960 - 2009

VRATISLAV PSOTA¹, LENKA SACHAMBULA¹, JIŘÍ HARTMANN², VERONIKA ZAJACOVÁ³

Výzkumný ústav pivovarský a sladařský¹, Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský², Veterinární a farmaceutická univerzita v Brně²

Grain yield of varieties tested in the 1960s varied on average around 4.5 t/ha. Today the yield moves at the level of 6 t/ha. Sieving fractions over 2.5 mm have also increased. Decline in the accumulation of nitrogenous substances in grain and increase in extract content by approximately 2 % were detected. By the end of the 1970s, most varieties had diastatic power higher than 300 °WK. In the 1980s, decline in this trait was observed. Today the values of this trait exceed 350 °WK. The values of Kolbach index moved initially under 40 %, in current varieties, the level of proteolytic modification is above 45 %. Values of relative extract at 45 °C gradually increased from 36 % to current 42 %. Apparent final attenuation rose from 80 % to current 82 - 84 %. Degradation of cell walls improved.

Keywords: barley; breeding progress, malting quality;

ÚVOD

Informace o počátcích šlechtění jarního ječmene na Slovensku jsou jen kusé. Dvě světové války a politické změny, ke kterým na Slovensku v průběhu především první poloviny 20. století došlo, způsobily v některých případech i ztrátu původních informací. V literárních zdrojích lze nalézt u některých konkrétních odrůd různé roky povolení. U některých odrůd docházelo i ke změnám jejich názvu.

První informace o šlechtění jarního ječmene na Slovensku pochází z roku 1899 (Grabner 1913). Všechny šlechtitelské pokusy zahájené před rokem 1912 po krátkém čase zanikly (Jamárik 1970). Od roku 1912 a hlavně po první světové válce a vzniku Československa se na Slovensku šlechtil jarní ječmen na pracovištích Velké Šurany, Sládkovičovo, Radošina, Bučany, Kovárce, Lontov, Nána a Budmerice. V letech 1920-1948 bylo na Slovensku vyšlechtěno 27 odrůd jarního ječmene. Bohužel o hospodářských vlastnostech většiny těchto odrůd se nedochovaly pravděpodobně žádné významnější informace (Grabner 1913, Jamárik 1970, Lekeš 1997).

Povinné zkoušení odrůd bylo na Slovensku zahájeno 17.3.1921. Odrůdové zkoušky do roku 1951 vykonával Ústav pro kontrolu semen. K 1. 1. 1951 byl zřízen Ústřední kontrolní a zkušební ústav polnohospodářský (dále jen ÚKSÚP), který se zabývá registrací nových odrůd ječmene, ale i dalších plodin dodnes. Pokusná místa ÚKSÚP jsou rozmístěna po celém území Slovenské republiky. Odrůdy jsou ve všech lokalitách pěstovány podle stejné metodiky. Následně jsou výsledky (výnos, HTZ, odolnost vůči chorobám atd.) shromažďovány a vyhodnocovány.

Od roku 1955 spolupracuje ÚKSÚP s Výzkumným ústavem pivovarským a sladařským (dále jen VÚPS), což přispělo k výrazné objektivizaci hodnocení sladovnických odrůd ječmene. Počínající rokem 1962 byly ve VÚPS zpracovávány vzorky z pokusných stanovišť umístěných na Slovensku. Každoročně jsou vzorky odrůd sladovnického ječmene odebrané z několika pokusných míst ÚKSÚP podrobeny ve VÚPS mikroskladovací zkoušce.

MATERIÁL A METÓDY

Odrůdy

Zpracovaná data byla čerpána z výzkumných zpráv Výzkumného ústavu pivovarského a sladařského v Brně (Trkan 1956-1958; Svědřihová et al. 1959-1975; Hlavinková et al. 1976 - 1992; Psota 1993 - 2009).

V letech 1962 - 1990 byly v závěrečných zprávách VÚPS v Brně uváděny výsledky rozborů vzorků ze všech zkušebních stanic bez ohledu na obsah dusíkatých látek v nesladovaném zrně ječmene. Od roku 1991 se do závěrečných zpráv Výzkumného ústavu pivovarského a sladařského v Brně zařazují pouze čtyři vybrané zkušební stanice, ve kterých byl průměrný obsah dusíkatých látek v zrně kontrolních odrůd sladovnického ječmene na optimální úrovni (10,7 – 11,2 %) nebo se těmito hodnotám v daném roce nejvíce přiblížil. Ve snaze dosáhnout objektivního porovnání dat za celé sledované období, byly tedy v letech 1955 - 1990 z dalšího zpracování vyloučeny zkušební stanice, u nichž byl průměrný obsah dusíkatých látek (bílkovin) v zrně ječmene nejdále od optimálních hodnot.

Do sledování byly zařazeny pouze registrované odrůdy. Každý rok byl tedy sortiment sledovaných odrůd trochu jiný. Překonané odrůdy nebo odrůdy, které se nerozšířily, byly z tohoto souboru vyřazeny a v následujícím roce byly nahrazeny novými odrůdami.

Mikrosladování a rozbor ječmene a sladu

V průběhu 50 let byla sledována řada technologických parametrů. Jen několik z nich bylo sledováno po celé období. Pro tuto studii byly vybrány jen znaky sledované několik desítek let. Ve výzkumných zprávách VÚPS byly uváděny i údaje o výnosu, HTZ a podílu zrna nad 2,5 mm. Tyto informace byly získány od ÚKSÚP.

Za sledované období došlo k mnoha změnám, které mohly dosažené výsledky určitým způsobem ovlivnit. Vyrobený slad byl analyzován podle metodik MEBAK a EBC platných v dané době (EBC 1953, 1975, 1987, 1998; MEBAK 1979, 1984, 1997). V oblasti metodické došlo k standardizaci a automatizaci postupů stanovení jednotlivých sledovaných znaků. Rozsah analýz se v průběhu sledovaného období měnil podle požadavků ze strany sladovnického průmyslu. Původní humnové sladování bylo zaměněno v roce 1975 za sladování v pneumatické mikrosladovně. Od tohoto roku se používá systém sladování, který je v podstatě totožný se systémem popsáným v metodice MEBAK (1997).

Statistické zpracování výsledků

Základní parametry zrna jarního ječmene a sladu, analyzovaných ve sladařském ústavu VÚPS Brno v letech 1962 až 2009 zahrnovaly informace o 114 odrůdách. Pro jednotlivé parametry byly zprvu stanoveny metodou residuální maximální věrohodnosti efekty roků, míst a odrůd v lineárním modelu trojného třídění bez interakce, který je popsán v publikaci Psota et al. 2009. Adjustované průměry hodnocených znaků jsou zobrazeny v grafech.

Vzhledem k tomu, že na ose x jsou uvedeny roky, ve kterých byly sledované odrůdy ve VÚPS poprvé analyzovány.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Výnos

V průběhu celého sledovaného období se výnos zrna ječmene postupně zvyšoval. V 60. letech minulého století se výnos pohyboval kolem 4 t/ha, v polovině 70. let přesáhl hodnotu 5 t/ha. Po roce 2000 se pohybuje již kolem 6,0 – 6,5 t/ha. Odrůdy testované na začátku sledování dosahovaly necelých 64 % výnosu dnešních odrůd.

Obsah dusíkatých látek v zrně ječmene

V souvislé časové řadě je možno vysledovat jistou tendenci k postupnému snižování akumulace dusíkatých látek v zrně u novějších odrůd. Obsah dusíkatých látek v zrně odrůd se pohyboval v 60. letech minulého století na úrovni 12 %, ale na konci sledovaného období byl o jedno procento nižší.

Modifikace škrobu

Obsah extraktu vypovídá o úrovni modifikace škrobu v průběhu sladování. U tohoto významného technologického a ekonomického znaku sledovaného po celé období je vidět výrazný výsledek šlechtitelského úsilí. Posun u extraktu přinesly postupně odrůdy Slovenský 802, Slovenský dunajský trh, Diamant, Xanadu a Levan. Zatím co ve 2. polovině 60. let byly naprosto normální hodnoty kolem 80 % extraktu na konci sledovaného období se obsah extraktu v sušině sladu pohyboval na úrovni 82 %. Genetický zisk v tomto znaku byl ovlivněn snížením akumulace dusíkatých látek v zrně a zvýšením aktivity enzymatického aparátu obilky v průběhu sladování u moderních odrůd. Odrůdy z počátku 21. století vykazovaly, o 2–3 % vyšší obsah extraktu než odrůdy pěstované v 60. letech minulého století.

Amylolytické rozluštění

Dalším technologickým znakem sledovaným po celé období, je diastatická mohutnost. Vývoj šlechtitelského pokroku u diastatické mohutnosti, tj. aktivity amylolytických enzymů (především β -amyláz) je velice zajímavý. Zdá se, že zatímco do konce 70. let minulého století dosahovala většina odrůd hodnot diastatické mohutnosti vyšších než 320 °WK. V 70. až 80. letech klesla diastatická mohutnost až pod 300 °WK. V 2. polovině 90. let minulého století a na začátku tohoto století došlo u části moderních odrůd k výraznému zvýšení aktivity amylolytických enzymů a hodnoty diastatické mohutnosti se běžně pohybovaly opět nad 320 °WK.

Proteolytické rozluštění

Proteolytické rozluštění vyjádřené hodnotou Kolbachova čísla bylo ve vzorcích ze slovenských pokusných stanovišť sledováno od roku 1962. I u této vlastnosti došlo k významnému šlechtitelskému pokroku, tj. k postupnému zlepšování modifikace dusíkatých látek. V polovině 70. let bylo proteolytické rozluštění na úrovni 40 %. V průběhu 90. let dochází k výraznému nárůstu hodnot u tohoto znaku a na konci sledovaného období se průměrné hodnoty pohybovaly kolem 45 %. Některé analyzované vzorky byly v tomto znaku přelouštěné.

Relativní extrakt při 45 °C

Relativní extrakt při 45 °C byl ve VÚPS u testovaných odrůd sledován od roku 1963. Tento znak vyjadřuje aktivitu proteolytických enzymů a α -amylázy. Koreluje do určité míry s hodnotou Kolbachova čísla. Aktivita

enzymů ovlivňujících hodnotu relativního extraktu při 45 °C se postupně zvyšovala. Hodnota relativního extraktu při 45 °C byla ovlivněna jednak odrudovou skladbou a jednak průběhem počasí v daném roce.

Odrůdy registrované v letech 1962 až do konce 80. let měly relativní extrakt při 45 °C úrovní do 40 %. Obdobně jako u znaku Kolbachovo číslo dochází koncem sledovaného období k výraznému zvýšení aktivity enzymů ovlivňujících hodnotu relativního extraktu při 45 °C. U odrůd registrovaných na konci sledovaného období (2005 až 2009) se hodnota tohoto znaku pohybovala kolem 43 %.

Kvalita složení sladiny

Od roku 1968 je získávána informace o předpokládaném průběhu kvašení v provozních podmínkách metodou založenou na prokvašení laboratorně připravené sladiny. Z počátku nebylo na zlepšování kvality sladiny cíleně šlechtěno a zlepšení bylo spojeno se zlepšováním ostatních technologických znaků. Teprve po zavedení sledování tohoto znaku se začalo s výběrem a šlechtěním na kvalitu sladiny. Od 70. let minulého století se hodnota tohoto znaku postupně zvyšuje. Od roku 2005 se dosažitelný stupeň prokvašení pohybuje v průměru nad 82 %.

Cytolytické rozluštění

Friabilita a obsah beta-glukanů ve sladině, jako znaky charakterizující cytotolytické rozluštění začaly být sledovány až od sklizně 1992. U tohoto znaku nastala z počátku obdobná situace, jako u dosažitelného stupně rozluštění. Na úroveň cytotolytického rozluštění se nešlechtilo a tak byly zpočátku hodnoty obsahu beta-glukanů na úrovni 200 – 250 mg/l. Jednou z prvních odrůd, které měly nízký obsah beta-glukanů ve sladině byla slovenská odrůda Kompakt (Psota, Kosař 1996, Psota et al. 2002). Koncem sledovaného období již s obsahem beta-glukanů ve sladině problém nebyl a odrůdy dosahovaly běžně hodnot pod 200 mg/l.

ZÁVER

Z předložené práce je zřejmé, že se šlechtitelům podařilo výrazným způsobem změnit rostlinu ječmene, zvýšit výnos a především sladovnickou kvalitu. Přínos výsledků šlechtění pro pěstitele a sladaře je značný, neboť odrůda je nejlevnějším intenzifikačním faktorem. Srovnání vlastností starých a moderních odrůd může pomoci identifikovat indikátory šlechtitelské kvality u genetických zdrojů ječmene používaných ve šlechtění nových odrůd. Šlechtění na odolnost vůči chorobám, poléhání a suchu, stejně jako na výnos má také dopad na odrudové vlastnosti charakterizující sladovnickou kvalitu.

Podakovanie: Prezentované výsledky byly dosaženy za podpory Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky v rámci řešení projektu „Výzkum sladovnického a pivovarského suroviny a technologie“ (identifikační kód MSM6019369701).

LITERATÚRA

- EBC: Analytica–EBC, Verlag Hans Carl Getränke–Fachverlag, Nürnberg 1998
- Jamárík, J.: Vývoj šlechtění rostlin od roku 1870 do roku 1948. In: 100 rokov šlechtění rastlín na Slovensku. Priroda, Bratislava 1970.
- Grabner, E.: Die Entwicklung und der heutige Stand der Pflanzenzüchtung in Ungarn. Zeitschrift für Pflanzenzüchtung. 1, 2:187-222, 1913.
- Lekeš, J. Šlechtění obilovin na území Československa. Brázda, Praha 1997
- MEBAK: Brautechnische Analysenmethoden, Band I, Freising – Weihenstephan 1997
- Psota, V., Hartmann, J., Sejkorová, Š., Loučková, T., Vejražka, K.: 50 years of progress in quality of malting barley grown in the Czech Republic. J. Inst. Brew.116(4), 2009.
- Psota, V., Kosař, K.: Auswertung der Sommergerstensorten in der Tchechischen Republik. Monatsschrift für Brauwissenschaft 49, 5/6: 178-182, 1996.
- Psota, V., Ehrenbergerová, J., Havlová, P., Hartmann, J.: Beta-glucan content in caryopses, malt and wort of the selected spring barley varieties. Monatsschrift für Brauwissenschaft. 55, 10-14, 2002.

Adresy autorů:

Ing. Vratislav Psota, CSc., Dr. Ing. Lenka Sachambula, VÚPS, Mostecká 7, 614 00 Brno, Česká republika, e-mail: psota@beerresearch.cz; sachambula@beerresearch.cz; Ing. Jiří Hartmann, CSc., ÚKZÚZ, Hroznová 2, 656 06 Brno, Česká republika; Veronika Zajacová, VFU v Brně. Palackého 1/3, 612 42 Brno, Česká republika

AKUMULÁCIA ANTOKYANÍNOV V ZRNE PŠENICE LETNEJ ACCUMULATION OF ANTHOCYANINS IN WHEAT GRAIN

^{1,2}IVANA PŠENÁKOVÁ, ³ALŽBETA ŽOFAJOVÁ, ³MICHAELA HAVRLETOVÁ,
³LUBOMÍR RÜCKSCHLOSS, ¹MICHAELA PILIAROVÁ

¹Univerzita sv. Cyrila a Metoda v Trnave

²Univerzita Konštantína Filozofa v Nitre

³Centrum výskumu rastlinnej výroby Piešťany

In the recent years, for specific goals of utilization, winter wheat breeding has been aimed on increasing content of anthocyanins in winter wheat grains considering their high antioxidant activity. The aim of research was to evaluate grain colour development in three wheat genotypes (ANK 28A and 62/0 with purple pericarp and Ilona with red pericarp) during grain filling period. Grain samples from two replications of field experiment established in the vegetation 2010/11 were taken six times at winter form (62/0, Ilona) and five times at spring form (ANK 28A). Total anthocyanins content was determined by spectrophotometer. Genotypes with purple pericarp reached the highest anthocyanins content on the twenty-second day after anthesis with gradual increasing and decreasing before and after this term, respectively. At maturity the highest anthocyanins content had ANK 28A (37.80 mg kg⁻¹) and newly bred genotype 62/0 had similar content (34.50 mg kg⁻¹). At maturity registered cultivar Ilona was about 93.7% lower in anthocyanins content compared to ANK 28A. Significant variability in anthocyanins content has indicated that breeding for their increasing is real. Confirmation of this fact is newly bred winter wheat genotype 62/0 originated from the Research and Breeding Station at Vígľaš-Pstruša.

Key words: wheat, grain colour, anthocyanins, breeding

ÚVOD

Z dôvodov vysokých nákladov je klasické šľachtenie pšenice len zriedkavo zamerané na tvorbu odrôd pre určitú oblasť a pre špecifické ciele využitia. V súčasnosti sú však vyhľadávané a využívajú sa aj odrody a druhy s neobvyklými znakmi a vlastnosťami. Jedným z nich je netradičná farba zrna pšenice. Väčšina u nás pestovaných odrôd pšenice má červenú farbu zrna, ktorá je spájaná aj s vyššou odolnosťou voči porastavosti (Basso & Flintham 2005).

Za červenú, purpurovú, modrú, oranžovú a bielu farbu zrna pšenice a iných obilnín sú zodpovedné antokyaníny (Abdel-Aal et al. 2006). Patria medzi flavonoidy a tie medzi fenolické látky, ktoré sumárne predstavujú fytochemikálie (Liu 2004). Antokyaníny predstavujú veľkú skupinu vo vode rozpustných prírodných farbív a v rastline sa nachádzajú v glykozylovanej forme, všeobecne vo väzbe s glukózou, galaktózou, arabinózou, ramnózou, xylózou a fruktózou (Hosseinian et al. 2008). Najčastejším je kyanidín (zodpovedný za červenú farbu), potom delfinidín (modrá farba), peonidín (modrá farba), pelargonidín (oranžová a červená farba), petunidín (purpurová farba) a malvidín (purpurová farba) (Oomah & Mazza 1999). Zdraviu prospešná úloha antokyanínov vyplýva z ich vysokej antioxidantnej aktivity. V rastlinnom organizme zohrávajú úlohu v ochrane rastliny pred biotickými a abiotickými faktormi prostredia.

Cieľom výskumu bolo zhodnotiť vývoj farby zrna v priebehu jeho nalievania pri vybraných genotypoch pšenice letnej s rôznou farbou zrna.

MATERIÁL A METÓDY

Vybrané genotypy pšenice letnej f. ozimnej a f. jarnej sme sledovali v poľnom pokuse založenom metódou znáhodnených blokov vo vegetácii 2010/11 v záhrade CVRV Piešťany. Súbor tvorili: ANK 28A, jarná forma s purpurovým perikarpom, novošľachtený genotyp 62/0, ozimná forma s purpurovým perikarpom, ktorý pochádza z programu šľachtienia farebných pšeníc z VŠS Vígľaš-Pstruša a kontrolná odroda pšenice letnej f. ozimnej Ilona so štandardnou farbou zrna. Od mliečnej do fyziologickej zrelosti postupom, ktorý uviedli Knievel et al. (2009) (v intervale od 4 do 10 dní) sme z každého opakovania zozbierali po 8 klasov a zrná ručne vydrolili. Vzorky zrn boli vysušené pri teplote 40°C.

Extrakcia antokyanínov z otrúb farebných pšeníc bola podľa metódy opísanej Hosseinian et al. (2008). Vzorky sme extrahovali extrakčným činidlom (metanol:1M HCl, 85:15, v/v) v pomere 1:8 (w/v) počas 45 min. pri 300 ot./min a laboratórnej teplote. Vzorky otrúb sme opakovane extrahovali za rovnakých podmienok a supernatany boli spojené. Po extrakcii sa vzorka centrifugovala (15 min. a pri 9050 ot./min). Supernatant sa zliatil a odparil na rotačnej vákuovej odparke. Odparok sa následne rozpustil v 15 ml metanolu (p.a). Takto pripravené vzorky extraktov sme použili na stanovenie obsahu antokyanínov. Extrakty boli uchovávané pri teplote 4°C.

Spektrofotometrické stanovenie antokyanínov

Celkový obsah antokyanínov bol stanovený metódou opísanou podľa Fuleki & Francis (1968). Pred meraním absorbancie sa vzorky upravili pomocou tlmivých roztokov na pH 1,0 a pH 4,5. V prípade zákalu bolo vzorky potrebné centrifugovať (15 min. a pri 12 000 ot./min.). Absorbancia sa merala do 20-50 min. pri vlnovej dĺžke 520 nm a 700 nm. Ako blank sa použila destilovaná voda.

Koncentrácia (mg.l^{-1}) antokyanínov bola prepočítaná podľa nasledujúceho vzorca na ekvivalent kyanidín-3-glukozidu:

$$C_{\text{ant}} = (A \times MW \times DF \times 10^3) / (\epsilon \times l)$$

kde: A je absorbancia = $(A_{520\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH } 1,0} - (A_{520\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH } 4,5}$; MW je molekulová hmotnosť = 449,2 g.mol^{-1} pre kyanidín-3-glukozid; DF je dilučný faktor = 10; l = hrúbka kvety v cm ; ϵ je molárny extinkčný koeficient = 26 900 ($\text{L} \times \text{cm}^{-1} \times \text{mol}^{-1}$) pre kyanidín-3-glukozid; 10^3 = faktor na prepočítanie z g na mg (Lee et al. 2005; Hosseinian et al. 2008).

Obsah antokyanínov bol prepočítaný na mg.kg^{-1} .

Údaje sme spracovali programom Statgrafics plus for Windows.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

ANK 28A je izogénnou líniou odrody Novosibirskaya 67 a je v programe šľachtienia farebných pšeníc vo VŠS Vigľaš-Pstruša využívaná ako donor pre purpurovú farbu osemenia. Línia je jedným z rodičovských odrôd genotypu 62/0, ktorý bol vo vegetácii 2010/11 skúšaný prvým rokom v štátnych odrodových pokusoch na Slovensku. Do hodnoteného súboru sme tiež zaradili odrodu Ilona, ktorá je kontrolou pre kvalitu so štandardnou farbou zrna. Genotyp 62/0 bol v porovnaní s odrodou Ilona neskorší v začiatku klasenia a tiež kvitnutia o 8 dní, avšak mliečnu zrelosť sme zaznamenali o 1 deň skôr od kvitnutia (tab. 1). Jarná línia ANK 28A kvitla 12.6.2011 a mliečnu zrelosť dosiahla už o 8 dní. Pri ozimnej forme, genotypy dosiahli fyziologickú zrelosť za rovnaký počet dní (42), počas ktorých sme 6 krát odoberali klasy pre stanovenie dynamiky obsahu antokyanínov v zrne a pri jarnej forme to bolo o 10 dní skôr (32), počas ktorých sme odoberali klasy v 5 termínoch. V dôsledku privalových dažďov začiatkom júla sme nemohli zabezpečiť najmä pri jarnej línii ANK 28A odbery v pravidelných intervaloch, v dôsledku čoho medzi 2. a 3. termínom odberu bolo až 10 dní.

Podľa očakávania najvyšší obsah antokyanínov v zrelosti mala línia ANK 28A ($37,80 \text{ mg.kg}^{-1}$) (tab. 2). Šľachtením sa podarilo pri genotype 62/0 dosiahnuť obsah antokyanínov ($34,50 \text{ mg.kg}^{-1}$) porovnateľný s rodičovskou líniou ANK 28A. Nie menej významnými sú pri novošľachtenom genotype ďalšie znaky a vlastnosti (ozimná forma, výška, produktivita klasu, vyrovnanosť ai.), ktoré zodpovedajú súčasným odrodám, ktoré sú registrované a pestované u nás. Odroda Ilona mala v zrelosti o 93,7 % nižší obsah antokyanínov v porovnaní s ANK 28A. Významná variabilita v obsahu antokyanínov naznačuje, že šľachtenie na zvýšenie jeho obsahu je možné, čo potvrdili v širšom súbore farebných pšeníc aj Knievel et al. (2009).

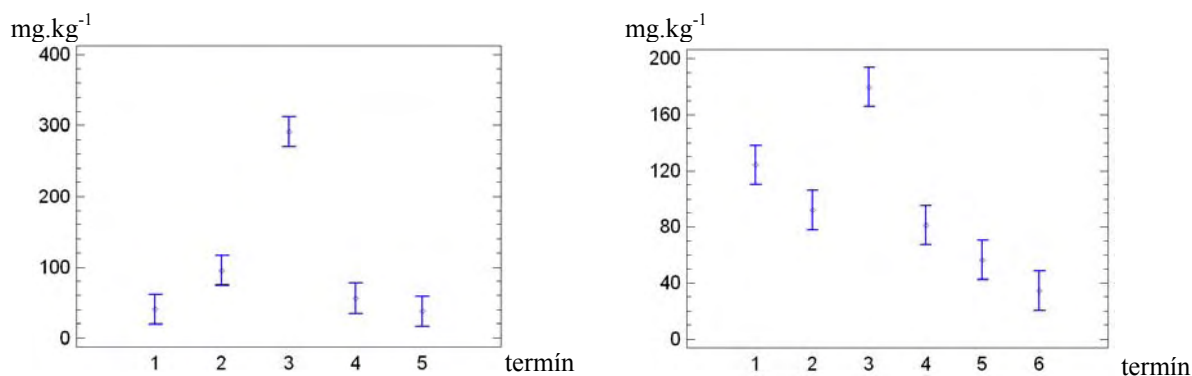
Oba genotypy s purpurovým zrnom mali najvyšší obsah antokyanínov na 22. deň po kvitnutí, s postupným nárastom a poklesom pred a po tomto termíne (obr. 1), čo sme pozorovali najmä pri línii ANK 28A. Pri genotype 62/0 neočakávane už na 13. deň po kvitnutí sme zistili druhý najvyšší obsah antokyanínov počas obdobia nalievania zrna ($124,09 \text{ mg.kg}^{-1}$) (tab. 2), čo mohlo byť spôsobené aj odberom vzoriek. Farebné genotypy mali približne rovnaký obsah antokyanínov v 2. termíne hodnotenia, avšak odlišovali sa vo vývoji zrna (12 verus 17 dní po kvitnutí). Aj keď rozdiel v obsahu antokyanínov medzi ANK 28A a 62/0 v 3. termíne predstavoval $111,54 \text{ mg.kg}^{-1}$ v neprospech v poradi druhého genotypu, v zrelosti bol minimalizovaný a bol len $3,3 \text{ mg.kg}^{-1}$. Pri oboch genotypoch najvyššia redukcia v obsahu antokyanínov bola v 4. termíne (26. a 27. deň po kvitnutí) v porovnaní s 3. termínom a to o 80,8 % pri ANK 28A a 54,9 % pri 62/0. Knievel et al. (2009) uviedli, že zníženie obsahu antokyanínov môže byť výsledkom toho, že sušina je akumulovaná v endosperme oveľa rýchlejšie ako sú ukladané antokyány v perikarpe a v aleuróne. V ďalších našich experimentoch bude potrebné venovať pozornosť aj interakcii genotypu s prostredím, ktorá môže ovplyvniť kvantitu a kvalitu antokyanínov.

Tabuľka 1: Termíny odberu klasov odrôd pšenice letnej f. ozimná a jarná* vyjadrené počtom dní po kvitnutí

Genotyp	Dátum začiatku		Termín odberu klasov					
	klasenia	kvitnutia	1	2	3	4	5	6
ANK 28A*	5.6.2011	12.6.2011	8	12	22	26	32	–
62/0	24.5.2011	31.5.2011	13	17	22	27	34	42
Ilona	16.5.2011	23.5.2011	14	18	25	30	35	42

Tabuľka 2: Priemerné hodnoty obsahu antokyanínov [mg.kg^{-1}] podľa odrôd pšenice letnej f. ozimná a jarná* a termínov odberu

Odroda	Termín						\bar{x}	LSD _(0,05) (termín)
	1	2	3	4	5	6		
ANK 28A*	40,47	95,33	291,07	55,75	37,80	–	104,08	42,14
62/0	124,09	91,83	179,53	81,00	56,32	34,50	94,54	28,19
Ilona	8,74	13,36	6,28	6,73	3,10	2,37	6,76	1,90



Obr. 1 Priebeh akumulácie antokyanínov od mliečnej po fyziologickú zrelosť línie ANK 28A (vľavo) a genotypu 62/0 (vpravo) pšenice letnej f. jarnej a ozimnej, jednotlivu

ZÁVER

Genotypy pšenice letnej s purpurovým osemením (ANK 28A a 62/0) mali najvyšší obsah antokyanínov na 22. deň po kvitnutí. Významná variabilita v obsahu antokyanínov v zrne naznačila, že šľachtenie na jeho zvýšenie je možné, čoho dôkazom je aj novovyšľachtený genotyp pšenice letnej f. ozimnej z VŠS Vígľaš-Pstruša, ktorý je skúšaný v štátnych odrodových pokusoch.

LITERATÚRA

- ABDEL-AAL ESM – YOUNG JC – RABALSKI I.: Anthocyanin composition in black, blue, pink, purple, and red cereal grains. In *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 54, 2006, pp. 4696–4704.
- BASSOI, M.C. – FLINTHAM, J.: Relationship between braun colour and preharvest sprouting-resistance in wheat. In *Pesq. Agropec. Bras.*, vol. 40, 2005, 981–988.
- FULEKI, T. – FRANCIS, F. J.: Determination of total anthocyanin and degradation index for cranberry juice. In *Food Science*, vol. 33, 1968, pp. 78–83
- HOSSEINIAN, F.S. – LI, W. – BETA, T.: Measurement of anthocyanins and other phytochemicals in purple wheat. In *Food Chemistry*, vol. 109, 2008, pp. 916–924.
- KNIEVEL, D.C. – ABDEL-AAL, E.-S.M. – RABALSKI, I. – NAKAMURA, T. – HUCL, P.: Grain color development and the inheritance of high anthocyanin blue aleurone and purple pericarp in spring wheat (*Triticum aestivum* L.). In *Journal of Cereal Science*, vol. 50, 2009, pp. 113–120.
- LEE, J. – DURST, R. W. – WROLSTAD, R. E.: Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: Collaborative study. In *Journal Association of Official Analytical Chemists International*, vol. 88, 2005, no. 5, pp. 1269–1278.
- LIU, R. H.: Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. In *Journal of Nutrition*, vol. 134, 2004, pp. 3479S–3485S.
- OOMAH, B. D. – MAZZA, G.: Health benefits of phytochemicals from selected Canadian crops. In *Trends in Food Science and Technology*, vol. 10, 1999, pp. 193–198.

Podakovanie: Práca bola realizovaná za finančnej podpory MP SR v rámci úlohy „Biologická a funkčná diverzita genofondu rastlín pre zvýšenie pridanej hodnoty poľnohospodárskej produkcie“.

Adresy:

Ing. Ivana Pšenáková, Katedra biotechnológií, Fakulta prírodných vied, Univerzita sv. Cyrila a Metoda v Trnave, Námestie J. Herdu 2, Trnava, 917 01, SK; Katedra botaniky a genetiky, Fakulta prírodných vied, Univerzita Konštantína Filozofa v Nitre, Trieda A. Hlinku 1, 949 74 Nitra, SK

Michaela Pillarová, Katedra biotechnológií, Fakulta prírodných vied, Univerzita sv. Cyrila a Metoda v Trnave, Námestie J. Herdu 2, Trnava, 917 01, SK

Ing. Alžbeta Žofajová, PhD., RNDr. Michaela Havrlentová, PhD., Ing. Ľubomír Rückschloss, Centrum výskumu rastlinnej výroby Piešťany, Bratislavská cesta 122, 921 68 Piešťany

PŘÍPRAVA A TESTOVÁNÍ KONSTRUKTŮ PRO INDUKCI REZISTENCE VŮČI VIRŮM A POŽEROVÉMU HMYZU U HRACHU

PREPARATION AND TESTING OF CONSTRUCTS TO INDUCE RESISTANCE TO VIRAL AND INSECTS IN PEA

MICHAL ROHRER, PAVEL HANÁČEK, VILÉM REINÖHL, STANISLAV PROCHÁZKA, HELENA BŘUSKOVÁ

Mendelova univerzita v Brně, Agronomická fakulta, Ústav biologie rostlin

The most common viruses that attack peas grown in the Czech Republic are – pea enation mosaic virus (PEMV) and Pea seed-borne mosaic virus (PSbMV). In this work we are exploiting genetic modification to achieve the induction of resistance to viral diseases (PSbMV and PEMV) and insect pests in pea plants. CP cDNA fragment of both viruses (PEMV and PSbMV) and cDNA fragment of Cell to Cell movement protein (PEMV) were inserted in sense/antisense orientation between the 35S promoter and CAMV terminator in the plasmid pHannibal and cloned into tDNA region of the vector system pGreen (Hellens et al., 2000) that. Sense/antisense orientation should be transcribed to hairpin RNA (hpRNA) which leads to post-transcriptional gene silencing inducing resistance to both viruses (PEMV and PSbMV). The same cassette was inserted also into pWELL11B, that incorporates besides the reporter (*uidA*) and selection (*bar*) genes also between the triple 35S promoter and OCS terminator the inhibitor of insect serine proteases (*SPI2*) gene fused to the green fluorescent protein (*GFP*) gene. The ability of the construct to transform plants will be tested by transformation of tobacco leaf discs. The final construct pWELL14B should induce resistance against both viruses and also against insect pests.

Key words: pea, transformation, *Agrobacterium tumefaciens*, post-transcriptional gene silencing, resistance

ÚVOD

Vlivem rostoucí populace se musí neustále zvyšovat objem a kvalita zemědělské produkce. Toho lze dosáhnout například zavedením nových pěstebních technologií, účinnější ochranou před různými patogeny a škůdci a nebo šlechtěním výnosnějších a odolnějších plodin.

Hrách setý (*Pisum sativum* L.) je pro své cenné agronomické vlastnosti jednou z nejvíce pěstovaných luskovin u nás. Na jeho produkci mají vliv různé abiotické a biotické faktory. Mezi nejzávažnější hmyzí škůdce patří kyjatka hrachová (*Acyrtosiphon pisum* Harris), která kromě škod způsobených sáním, zpřičňuje další ztráty na výnose jako jeden z hlavních přenašečů viróz. Mezi nejčastější virové patogeny napadající hrách setý v České republice patří výrůstková mozaika hrachu (PEMV), která je přenášena právě kyjatkou hrachovou a dále virus semenem přenosné mozaiky hrachu (PSbMV). Kombinace těchto virů může způsobit snížení výnosu semen až o 80% (Seidenglanz 2011).

Chemická ochrana rostlin proti škůdcům a patogenům je značně nákladná a má negativní vliv na životní prostředí. Vhodnější je pěstování rezistentních odrůd zemědělských plodin. V dnešní době stoupá ve šlechtění využití metod molekulární biologie, zvláště pak genového inženýrství.

Jednou z metod genového inženýrství pro šlechtění odrůd rezistentních vůči virům je využívání posttranskripčního utišení genů invertovanými sekvencemi (PTGS), které ve své práci popsal Berstein et al., (2001). Při vnesení fragmentů virových genů do genomu rostlin v sense/antisense orientaci dochází k vytvoření vláskové hairpinRNA (hpRNA). Dvouvláknová hpRNA je dále štěpena dsRNásou na 21-23 nukleotidové mikro RNA (siRNA small interfering RNA). SiRNA je poté začleněna do nukleázového komplexu RISC (RNA-induced silencing complex) a tento komplex podle siRNA sekvence degraduje ssRNA se stejnou sekvencí. Na základě toho by cizorodá virová RNA měla být degradována a rostlina by se tak měla stát rezistentní.

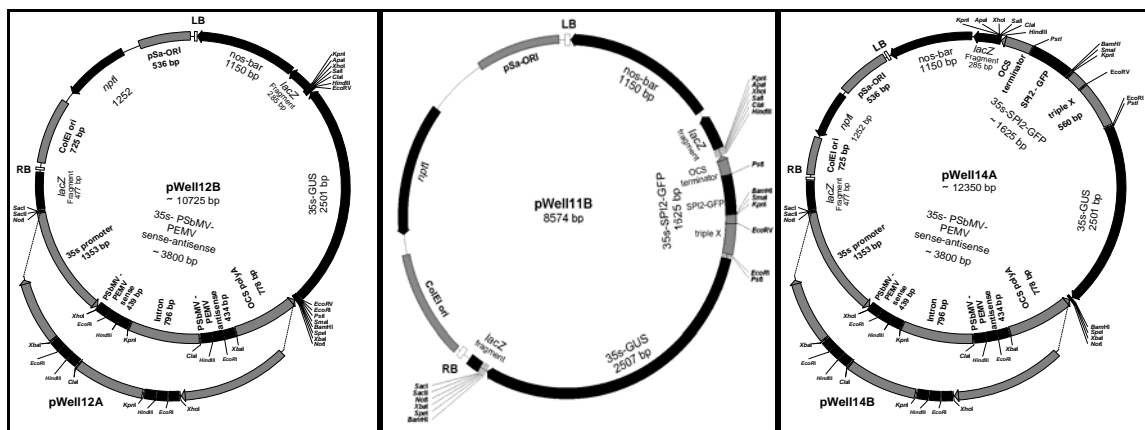
Při tvorbě rostliny rezistentní vůči požerovému hmyzu lze využít proteolytické enzymy. Ty katalyzují štěpení molekul bílkovin na menší řetězce a posléze až na jednotlivé aminokyseliny. Serinové proteázy byly nalezeny v zaživacím traktu mnohých zástupců hmyzu, zejména řádu motýlů *Lepidoptera*, který zahrnuje celou řadu významných škůdců rostlin. Inhibitory proteas inhibují proteasovou aktivitu těchto trávicích enzymů, což má za následek vyčerpání rezerv sirných aminokyselin. Výsledkem těchto pochodů je oslabení hmyzu, jeho omezený vývoj a často i smrt. Inhibitory serinových proteas mají optimální pH prostředí 9-11, což koresponduje s obvyklým pH střevního traktu řady zástupců *Lepidoptera* (Hraška 2006).

V této práci využíváme jak PTGS, tak i inhibitory proteas k vytvoření rostliny hrachu, která bude rezistentní vůči virům PSbMV a PEMV a také vůči hmyzím škůdcům.

MATERIÁL A METODY

Pro tvorbu konstruktu pWELL14B byly využity již dříve zhotovené konstrukty a to pWELL11B, který nese gen pro inhibitor serinových proteas *SPI2* fúzaný s reporterovým genem *GFP* a pWELL12A (obr. 1, 2 a 3). Oba tyto plazmidy byly vytvořeny na základě vektorového systému pGREENII 0229. Plazmidy pWELL11B a pWELL12A byly izolovány z namnožených bakterií *E. coli* kmen Top 10, dlouhodobě uchovaných v glycerolu při teplotě -72°C, pomocí kitu GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Fermentas).

Z rekombinantního plazmidu pWELL12A byla pomocí restriční endonukleázy NotI vyštěpena kazeta 35S::cpPSbMV:mpPEMV:cpPEMV a pomocí fosfatázy byla tato kazeta defosforylována. Restričním enzymem NotI byl naštěpen také plazmid pWELL11B. Naštěpené plazmidy byly poté rozdělěny pomocí 1% agarózové elektroforézy. Naštěpený pWELL11B a kazeta 35S::cpPSbMV:mpPEMV:cpPEMV byli poté izolováni a přečištěni z gelu pomocí kitu Invisorb Fragment Clean Up (Invitex). Koncentrace byla změněna spektrofotometrem Picodrop. Poté byl pomocí T4 DNA-ligázy naštěpený plazmid pWELL11B a kazeta 35S::cpPSbMV:mpPEMV:cpPEMV spojeny.



Obr. 1: pWELL12A, B

Obr. 2: pWELL11B

Obr. 3: pWELL14A, B

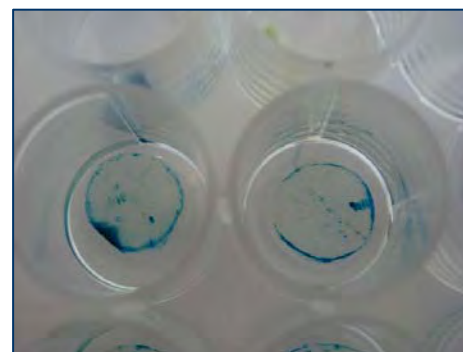
Vytvořeným konstruktem pWELL14 byly po purifikaci pomocí kitu Invisorb Fragment Clean Up (Invitex) transformovány elektrokompetentní buňky *E. coli* Top 10 elektroprátorem (Easyject, Equibio). Po namnožení na LB mediu s kanamicinem byly vybrané kolonie *E. coli* přeneseny do roztoku Tris/MgCl₂ (50mM MgCl₂, 50 mM Tris Cl pH 7), kde byly krátkodobě uchovány v chladničce a zároveň posloužily jako templát pro kontrolní PCR. Vybrané kolonie byly namnoženy v tekutém LB mediu a pomocí kitu (GeneJET Plasmid Miniprep Kit od firmy Fermentas) z nich byla izolována plazmidová DNA, která byla testována pomocí PCR a restriční analýzy a poté sekvenována. Na základě směru čtení vložené kazety byly podle restriční analýzy vybrány dvě varianty konstruktu a to pWELL14A a pWELL14B.

Elektroporací byly konstruktem pWELL14B spolu s pomocným plazmidem pSoup transformovány kompetentní buňky *Agrobacterium tumefaciens* kmen EHA 105. Pro ověření funkčnosti byl konstruktem pWELL14B transformován tabák virginský (*Nicotina tabacum*) kmen SR-1, jako modelová rostlina pro transformace pomocí *A. tumefaciens*. Tabák byl transformován metodou transformace listových disků. Korkovrtem byly vyřezány disky z listů tabáku a ty byly máčeny jednu minutu v suspenzi kultury *A. tumefaciens*. Po osušení byly listové disky dány na kultivační medium MS 0,1/1. Po třech dnech kultivace byly explantáty převedeny na medium MS 0,1/1 s augmentinem a několik málo disků bylo použito na histochemický GUS test podle Fütterera et al. (1995). Tři až čtyři týdny staré regeneranty byly přeneseny na selekčním medium MS 0,1/1 s augmentinem a fosfinitricinem.

VÝSLEDKY A DISKUZE

V této práci se podařilo vytvořit konstrukt pWELL14. Konstrukt nese počátky replikace funkční v *A. tumefaciens* a *E. coli* (ColEI-ori a pSa-ORI), dále gen pro bakteriální rezistenci k antibiotiku kanamicin (*nptI*), selekční gen *nos-bar* navozující rezistenci transgenní rostliny k herbicidům s účinnou látkou fosfinitricin (*nos-bar*), *lacZ* gen kódující β-galaktosidázu pro modrobílou selekci bakterií, dále obsahuje mnohonásobné klonovací místo (polylinker), reportérový gen *uidA* vhodný pro rychlé testování transformovaných rostlin (například pomocí histochemického GUS testu), dále kazetu, která nese fragmenty cDNA genů pro CP virů PEMV a PSbMV a rovněž fragment cDNA genu *cell to cell movement* proteine PEMV v sense/antisense orientaci oddělené intronem. Součástí kazety jsou regulační sekvence 35S promotor a OCS terminátor. Konstrukt dále obsahuje gen pro inhibitor serinových proteas *SPI2* fúzovaný s reportérovým genem *GFP*. Tyto dva geny byly regulovány trojnásobným promotorem 35S (triple X) a terminátorem OCS.

Na základě restriční analýzy byly rozlišeny dvě varianty konstruktu a to pWELL14A a pWELL14B.



Obr. 4: Pozitivní GUS test

Tyto plazmidy se liší směrem čtení kazety 35S::cpPSbMV:mpPEMV:cpPEMV. Umístění promotoru v této kazetě by mohlo ovlivnit expresi.

Konstruktem pWELL14 byl poté metodou transformace listových disků podle Dombrowského et al. (1994) transformován tabák jakožto modelová rostlina pro transformace *Agrobacterium tumefaciens*. Úspěšnost transformace byla prokázána pomocí pozitivního GUS testu listových disků tabáku (obr. 4).

Konstruktem pWell14 se bude dále transformovat hrách setý pomocí metody transformace hrachových semen *in vitro* podle Švábová et al., (2005). U transformovaných rostlin by měl vyvolat rezistenci vůči hmyzím škůdcům spojenou s rezistencí vůči virům PSbMV a PEMV způsobenou vlivem posttranskripčního utišení genů PTGS. O využívání PTGS při ochraně rostlin proti virózám pojednává Kyrychenko et. al., (2007).

ZÁVĚR

Podarilo se připravit konstrukt pWELL14, který nese fragmenty cDNA genů pro cp virů PEMV a PSbMV a fragment cDNA genu mp PEMV v sense/antisense orientaci mezi 35S promotorem a OCS terminátorem, dále obsahuje gen pro inhibitor serinových proteas *SPI2* a reportérový gen pro GFP pod regulací trojnásobného 35S promotoru a OCS terminátoru. Tento konstrukt by měl spojit navození rezistence vůči hmyzím škůdcům a virózám, které by měl indukovat v transformovaných rostlinách hrachu. Vzhledem k obtížnosti transformace hrachu je to významný krok k usnadnění přípravy transgenních linií rezistentních vůči uvedeným chorobám a škůdcům.

Poděkování: Tato práce byla řešena za podpory NAZV projektu QI91A229 a projektu IGA AF MENDELU TP 7/2011.

LITERATURA

- BERNSTEIN, E. - CAUDY, A. - HAMMOND, S. - HANNON, G. 2001. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. In *Nature*, 18: 363-6.
- DOMBROWSKI, J.E. - GOMEZ, L. - CHRISPEELS, J. - RAIKHEL, N.V. 1994. Targeting of proteins to the vacuole. In: Gelvin, S.B., Schilperoort, R.A. 1995. In *Plant molecular biology manual*, Kluwer academic publishers, Dordrecht.
- FÜTTERER, J. - GISEL, A. - IGLESIAS, V. - KLÖTI, A. - KOST, B. - MITTELSTEN, S. O. - NEUHAUS, G. - NEUHAUS-Url, G. - SCHROTT, M. - SHILLITO, R. - SPANGENBERG, G. - WANG, Z.Y. 1995. Standard Molecular Techniques for the Analysis of Transgenic Plants. In: Potrykus, I., Spangenberg, G. 1995. *Gene transfer to plants*. In Springer-Verlag, Berlin.
- HELLENS, R. P. - EDWARDS, E. A. - LEYLAND, N. R. - BEAN, S. - MULLINEAUX, P. M. 2000. pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. In *Plant Mol. Bio.*, 42: 819-832.
- HRAŠKA, M. - RAKOUSKÝ, S. - ČURN, V. 2006. Inhibitory proteas, mechanism účinku a perspektivy jejich využití v transgenozí rostlin. In *Chem. listy*, 100: 501 – 507.
- KYRCHENKO, A. M. - TELEGEYEVA, T. A. - KOVALENKO, O. G. 2007. Molecular and Genetic Mechanisms of Resistance of Plants to Viruses. In *Tsitologiya i Genetika*, 41: 67-79.
- SEIDENGLANZ, M. - HUŇADY, I. - POSLUŠNÁ, J. - LOES, A. 2011. Influence of Intercropping whit Spring Cereals on the Occurrence of Pea Aphids (*Acyrtosiphon pisum* Harris, 1776) and their Natural Enemies in Field Pea (*Pisum sativum* L.). In *Plant Protect. Sci.*, 47: 25-36.
- ŠVÁBOVÁ, L. - SMÝKAL, P. - GRIGA, M. - ONDŘEJ, V. 2005. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Pisum sativum* in vitro and in vivo. In *Biol. Plant*, 49: 361-370.

Kontaktní adresa:

Ing. Michal Rohrer, (m.rohrer@seznam.cz); Ing. Pavel Hanáček, Ph.D. (pavel.hanacek@mendelu.cz); Mgr. Vilém Reinöhl, CSc. (vilem.reinohl@mendelu.cz); prof. Ing. Stanislav Procházka, DrSc. (stanislav.prochazka@mendelu.cz); Ing. Helena Břusková (xbruskov@node.mendelu.cz); - Ústav biologie rostlin, Agronomická fakulta, MENDELU, Brno, Zemědělská 1, 61300

VLIV INTOXIKACE KADMIEM NA FYZIOLOGICKÉ CHARAKTERISTIKY SUSPENZE BUNĚK TABÁKU BY-2

INFLUENCE OF CADMIUM INTOXICATION ON PHYSIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF TOBACCO CELL SUSPENSION BY-2

¹ZDENĚK ŠTĚPÁN, ¹MAREK KLEMŠ, ²ONDŘEJ ZÍTKA, ¹LADISLAV HAVEL

¹Ústav biologie rostlin Mendelovy univerzity Brno
²Ústav chemie a biochemie Mendelovy univerzity Brno

Our intention was to clarify the influence of addition of toxic metal cadmium to the behaviour of tobacco BY-2 cells. From results of this work ensue, that the cadmium deeply influences physiological characteristics of tobacco cell suspension BY-2, namely especially while using lower pH of medium, that the receipt of toxic metal supports. The addition of cadmium to this suspension makes viability and number of cells in suspension decrease in comparison to variant without cadmium; in later stages of growth of suspension the average percentage of dry matter decreases when cadmium plus lowered pH were applied, and content of reduced glutathione in cellular part of suspension and ability to change pH of medium grown when these conditions were used (among fifth and eighth day of cultivation grown as well the contents of oxidized form of glutathione). Knowledge about influence of cadmium on vegetable matter can virtually be used by many ecological disciplines.

Key words: tobacco cell suspension, BY-2, cadmium, physiological characteristics,

ÚVOD

V botanice má dlouhou tradici studium intaktního rostlinného materiálu, avšak v několika posledních desítkách let začaly být ve výzkumu aspektů života rostlin využívány v poměrně širokém měřítku rostlinné suspenze. Jejich využití značně zlepšuje šance na hlubší poznání fyziologických zákonitostí růstu rostlin, rostlinného metabolismu a reakcí na vnější vlivy. Poměrně jednoduchá kultivace, rychlý růst a dobře patrný vliv různých ošetření u suspenzí rostlinných buněk vědeckým pracovníkům značně ulehčují jejich experimentální činnost. V současné době jsou tyto suspenze intenzivně využívány v oblasti výzkumu fytoxicity různých polutantů, a to včetně těžkých kovů. Do této oblasti je směřována rovněž naše práce. Negativních vlivů těžkých kovů na rostlinný materiál a zejména rostlinnou buňku je mnoho, například narušení membránových přenosů, fotosyntézy, činnosti ATPázy, dělení buněk, jejich morfologie a viability. Tyto vlivy jsou dány do značné míry především oxidativním stresem (ŽRÓBEK-SOKOLNIK et al., 2009).

MATERIÁL A METODY

Při provedení pokusu byly použity celkem čtyři varianty – kontrolní varianta s pH 5,5, kontrolní varianta s pH 3,5, varianta s přidavkem kadmia pH 5,5 a varianta s přidavkem kadmia pH 3,5. Důvodem použití dvou různých hodnot pH byl poznatek, že sloučenina, pomocí níž bylo kadmium dodáno ($\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$) se lépe rozpouští a disociuje při nižším pH, při němž je tedy i lépe přijímána. Termíny odběrů vzorků a pozorování byly celkem čtyři - 0 dní, 2 dny, 5 dní a 8 dní. Kultivace proběhla na médiu Linsmayer a Skoog (1964), které bylo mírně modifikováno. Součástí všech médií byl $1\mu\text{M}$ 2,4-D a do variant, které měly obsahovat kadmium, bylo přidáno $25\mu\text{M}$ $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$. Počet buněk byl stanoven pozorováním na Fuchs-Rosenthalově hematocytometru, viabilita pomocí fluorescence na mikroskopu Olympus IX 70, sušina vážením po lyofilizaci, pH na pH metru a glutathion spektrofotometricky.

VÝSLEDKY A DISKUZE

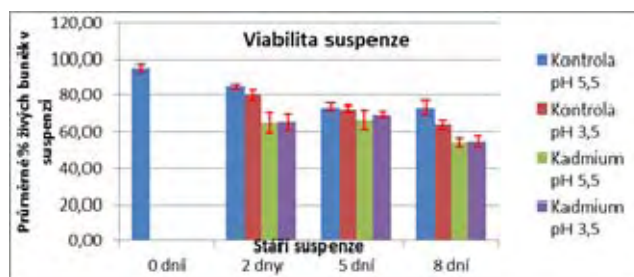
U všech dílčích pokusných záměrů se prokázal toxický vliv kadmia. U variant s přidáním kadmia došlo ke snížení viability (viz graf 1). Nejvyšší počet buněk byl pozorován u varianty kontrola s pH 5,5, nejnižší pak u varianty s přidáním kadmia a pH 3,5 (viz graf 2). K obdobným výsledkům došli napr. KUTHANOVÁ et al. (2004), v jejich případě však byla použita dvakrát vyšší koncentrace kadmia ($50\mu\text{M}$). To naznačuje velmi vysokou toxicitu kadmia, která se projevuje i při nízkých koncentracích. Došlo k výraznému zhoršení morfologie u varianty s přidavkem kadmia na pH 3,5 oproti kontrolní variantě s pH 5,5 (viz obr. 1 a obr. 2). Buňky byly u variant s obsahem kadmia výrazně protáhlejší (podobně, jako to pozorovali KUTHANOVÁ et al. (2004)), u těchto variant se ovšem hojně vyskytovaly i clustery kulovitých buněk; u obou kontrolních variant bylo těchto clusterů pouze velice málo.



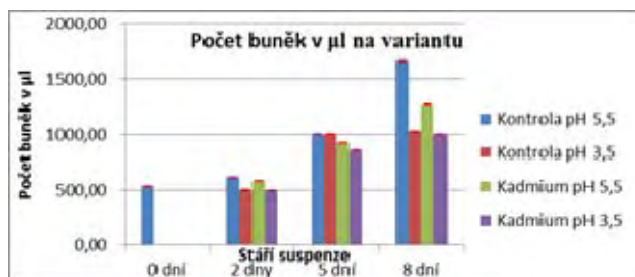
Obrázek 1: Vvarianta s obsahem kadmia pH 3,5 8. den (zvětšeno 100X)



Obrázek 2: Kontrola pH 5,5 5. den (zvětšeno 100X)

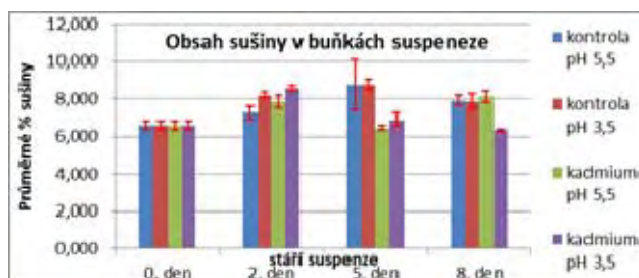


Graf 1: Viabilita suspenze

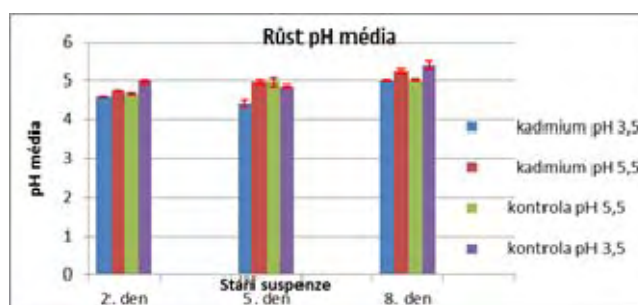


Graf 2: Počet buněk na µl suspenze

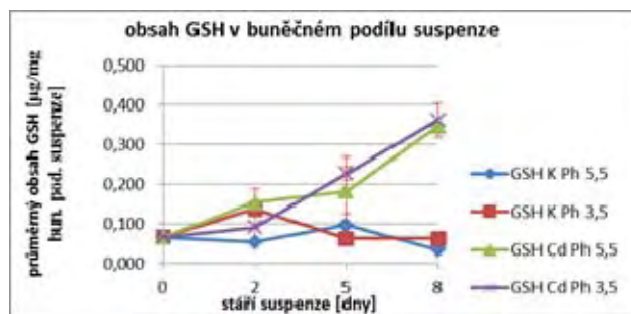
Sušina buněk se v 5. a 8. dni růstu suspenze při kultivaci v médiu s přidavkem kadmia a pH 3,5 snížila (viz graf 3). Také se zvýšilo pH média z 3,5 na 5,5 (viz graf 4). V suspenzích s přidavkem kadmia rostl obsah redukovaného glutathionu po celou dobu kultivace, oxidovaný od 5. do 8. dne kultivace (viz grafy 5 a 6).



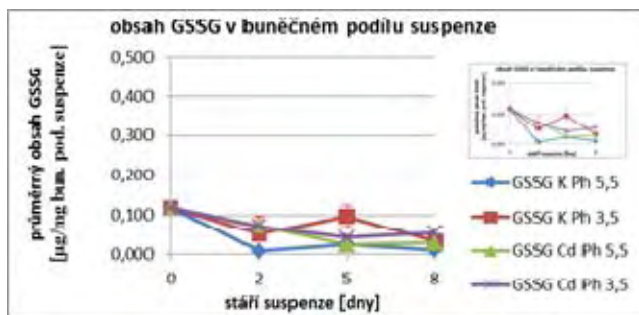
Graf 3: sušina suspenze



Graf 4: Vliv na změnu pH



Graf 5: Obsah redukované formy glutathionu



Graf 6: Obsah oxidované formy glutathionu

ZÁVĚR

Kadmium představuje významný polutant, který silně ovlivňuje fyziologické charakteristiky suspenzí rostlinných buněk. Zhoršuje výrazně všechny fyziologické parametry růstu suspenze. Zvyšuje obsah redukovaného a částečně i oxidovaného glutathionu, sloužícího k jeho detoxikaci.

Poděkování. Experimenty byly hrazeny z grantu TP IGA 7/2011

LITERATURA

- ŽRÓBEK-SOKOLNIK, A.- ASARD, H.- GÓRSKA-KOPLIŇSKA, K.- GÓRECKI, R.J. 2009. Cadmium and zinc-mediated oxidative burst in tobacco BY-2 cell suspension cultures. In *Acta Physiologiae Plantarum*, vol. 31, 2009, no. 1, pp. 43-49, DOI: 10.1007/s11738-008-0197-8
- KUTHANOVÁ, A.- GEMPERLOVÁ, L.- ZELENKOVÁ, S.- EDER, J.- MACHÁČKOVÁ, I.- OPATRŇY, Z.- CVIKROVÁ, M. (2004): Cytological changes and alterations in polyamine contents induced by cadmium in tobacco BY-2 cells. *Plant Physiology and Biochemistry* vol. 42, 2004, pp. 149–156
- RNDr. Marek Klemš, Ph.D., Ing. Zdeněk Štěpán, Prof. RNDr. Ladislav Havel: Ústav biologie rostlin Mendelovy univerzity, Zemědělská 1, 61300 Brno Česká republika - Budova C, Mgr. Ondřej Zítka: Ústav chemie a Biochemie Mendelovy univerzity, Zemědělská 1, 61300 Brno Česká republika - Budova D
mail: Zdenek279@gmail.com

Označení grantu: IGA TP 7/2011

VÝSKYT BRANIČNATKY PŠENIČNÉ U ODRŮD PŠENICE JARNÍ A VYBRANÝCH GENETICKÝCH ZDROJŮ

OCCURRENCE OF *SEPTORIA TRITICI* LEAF BLOTCH IN SPRING WHEAT CULTIVARS AND SELECTED GENETIC RESOURCES

ILONA SVOBODOVÁ¹, PETR MARTINEK¹, LUBOMÍR VĚCHET²

¹Agrotest fyto, s.r.o., Kroměříž,

²Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Praha

In the period 2008-2011, field tests were conducted on a set of spring cereal crops consisting of 20 cultivars of spring wheat (*Triticum aestivum* L.), 10 lines of tritordeum (\times *Tritordeum* Ascherson et Graebner), a line of haynaldoticum (\times *Haynaldoticum sardoum* Meletti et Onnis) named Denti de Cani C.P. and selected synthetic wheat CIGM93.266. Nine different isolates of *Septoria tritici* leaf blotch (*Mycosphaerella graminicola* /Fuckel/ J. Schröt.) were used for artificial infection. Responses of genotypes to three isolates were tested each year. The isolates used in 2009 and 2010 were identical. A variant without artificial infection was a check. The aim was to select potential resistance donors. The infection level was measured as a percentage of the disease on four upper leaves of 15 stems per genotype. The infection was largely affected by weather conditions over the season and virulence of the isolate used. Average disease severity in spring wheat cultivars was 4.45 % (check 0.64 %), tritordeum 0.16 % (check 0.09 %), synthetic wheat CIGM93.266 0.29 % (check 0 %) and Denti de cani C.P. 0.46 % (check 0.25 %). The results confirmed a higher level of resistance in tritordeum, haynaldoticum and synthetic wheat.

Key words: septoria tritici blotch, spring wheat, tritordeum, synthetic wheat, haynaldoticum, resistance

ÚVOD

Rod *Septoria* je velmi rozsáhlý co do počtu druhů na různých druzích rostlin, z nichž na obilovinách a travách parazituje asi 100 druhů. Pšenici napadá braničnatka plevová (*Septoria nodorum* Berk, sexuální stádium *Leptosphaeria nodorum* Miller) a braničnatka pšeničná (*Septoria tritici* Rob. ex Desm., sexuální stádium *Mycosphaerella graminicola* /Fuckel/ Schrotter). Braničnatka pšeničná patří k nejrozšířenějším škodlivým organismům u pšenice. K jejímu rozšíření přispívá vlhké a spíše chladnější počasí. Braničnatka pšeničná působí výnosové ztráty hlavně vyvoláním předčasného stárnutí tkáně listů a tím redukcí fotosyntetické aktivity.

U pšenice existují donory odolnosti nesoucí jednotlivé *Stb* geny rezistence s rozdílnou mírou účinnosti, specifickou pro jednotlivé izoláty. V současnosti je uváděno 15 genů *Stb* (Wheat Genetic Resources Databáze Komugi). Zásadní význam má vyhledávání nových zdrojů rezistence s výraznější mírou odolnosti, jejichž výskyt lze spíše očekávat u planých forem.

Cílem práce bylo otestovat míru odolnosti současných odrůd jarní pšenice k odlišným izolátům *M. graminicola* v polních podmínkách a pokusit se najít nové zdroje odolnosti. K tomuto účelu byly vybrány hlavně běžné odrůdy pšenice a allopolyploidní formy s výskytem pšeničných genomů, které mohou být využitelné pro hybridizaci s běžnou pšenicí setou.

MATERIÁL A METODY

V letech 2008 až 2011 bylo testováno 18 registrovaných odrůd jarní pšenice (*Triticum aestivum* L.), dva významné donory odolnosti k fuzáriu klasu Sumai 3 a Nobeoka Bozu, 10 linií jarního hexaploidního tritordea (\times *Tritordeum* Ascherson et Graebner), jedna linie jarní hexaploidní syntetické pšenice CIGM93.266 a jedna hexaploidní linie z jižní Itálie označovaná jako Denti de cani C.P (psí zub), která byla vyselektována z místní krajové odrůdy (Meletti et al., 1996) a byla pokládána za nový druh haynaldoticum (\times *Haynaldoticum sardoum*).

Tritordeum (\times *Tritordeum* Ascherson et Graebner, obrázek 2) je uměle vytvořený obilný druh, odvozený z křížení planého ječmene *Hordeum chilense* Roemer et Schultes ($2n = 2x = 14$; $H^{ch}H^{ch}$) s hexaploidní nebo tetraploidní pšenicí (Martín et al., 1999).

Syntetická pšenice ($2n = 6x = 42$, BBAAD¹D¹, vznikla křížením *Triticum durum* Desf. ($2n = 4x = 28$, BBAA) s *Aegilops squarrosa* L. /syn. *Aegilops tauschii* (Coss.) Schmalh./ ($2n = 2x = 14$, D¹D¹). Od pšenice seté se syntetická pšenice odlišuje především genomem D¹, který může nést geny nových významných vlastností (Arraiano et al., 2001).

Použité formy tritordea, haynaldotikum a syntetické pšenice jsou hexaploidy. Seznam použitých materiálů je zřejmý z tabulky 2.

Každý z vybraných genotypů byl v letech 2008 – 2011 vyset do čtyř záhonů. Jednotlivé záhony byly následně obsety hořčicí setou jako izolační plodinou pro zabránění šíření infekce mezi záhony. Bylo prováděno testování odolnosti celkem k devíti rozdílným izolátům braničnatky pšeničné (tabulka 1). V období plného odnožování byl každý ze tří záhonů naočkován (pomocí ručního rozprašovače) jedním z izolátů, čtvrtý záhon byl ponechán nenaočkovaný a byl pokládán za kontrolní variantu. Izoláty byly připraveny ve VÚRV, v.v.i. Praha. Čtyři dny po inokulaci bylo zahájeno pravidelné rosení, které probíhalo přibližně do poloviny července.

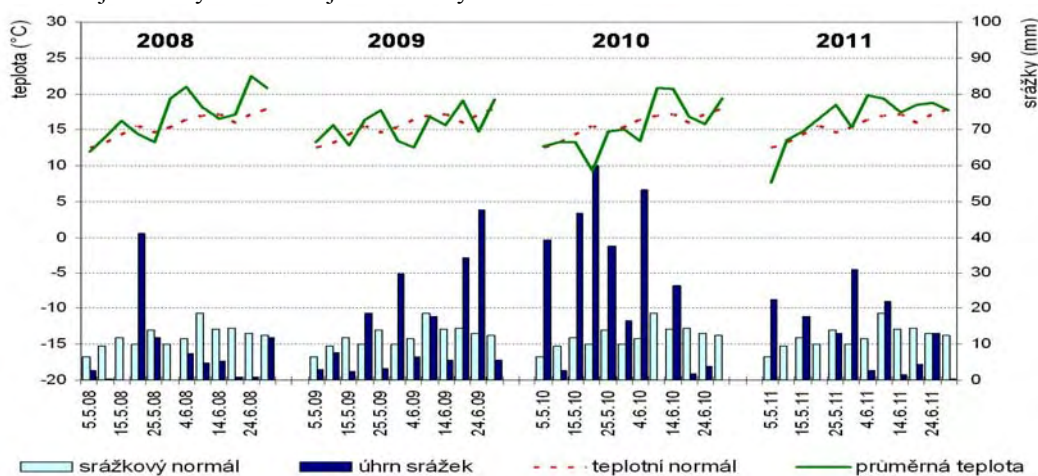
Procento napadení rostlin bylo hodnoceno jako součet procent listové plochy s bráničnatkou čtyř horních listů u 15 náhodně vybraných produktivních stébel. Hodnocení probíhalo ve dvou termínech (kvetení, mléčná zralost).

Tabulka 1: Přehled použitých izolátů a datum inokulace v letech 2008 - 2011

(S – číslo skvrny, CRI – číslo izolátu ve sbírce VÚRV)

1	Alibaba, Hadačka u Kralovic, Plzeň, 1. list, S1, CRI 0361	22.5.2008
2	Kanzler, VURV Praha, 1. list, S1, CRI 0016	22.5.2008
3	Kanzler, VURV Praha, 2. list, S1, CRI 0108	22.5.2008
4	Meritto, Jehnědí, Ústí n. Orlicí, 3. list, S2, CRI 0324	12.5.2009, 10.5.2010
5	Bardotka, Kuřim, Čejkovice, Pastviska, 1.list, S2, CRI 0323	12.5.2009, 10.5.2010
6	Chul, VURV Praha, 1.list, S1, CRI 0271	12.5.2009, 10.5.2010
7	Michigan Amber 2005, VÚRV, 2. list, CRI 0044	29.4.2011
8	Meritto, Jehnědí Ústí nad Orlicí, 3. list, S2, CRI 0360	29.4.2011
9	BR-05-082, VÚRV Praha, 4. list, S1, CRI 0282	29.4.2011

Na rozvoj patogena měl významný vliv vývoj počasí v jednotlivých letech. Srážky a teploty v nejkritičtějších obdobích jednotlivých ročníků jsou uvedeny na obrázku 1.



Obrázek 1: Průběh srážek a teplot během května a června v letech 2008–2011 v Kroměříži

VÝSLEDKY A DISKUSE

Ve všech čtyřech hodnocených letech bylo u uměle infikovaných odrůd jarní pšenice průměrné napadení 4,45 % (kontrola 0,64 %), tritordeum 0,16 % (kontrola 0,09 %), Denti de cani C.P. 0,46 % (kontrola 0,25 %) a syntetická pšenice CIGM93.266 0,29 % (kontrola 0 %). Výsledky potvrdily vyšší průměrnou odolnost u tritordea, haynaldotikum Denti de cani C.P. a také u syntetické pšenice CIGM93.266. Může se tedy jednat o potenciální donory rezistence využitelné ve šlechtění. V testovaném souboru jarní pšenice bylo nižší napadení zaznamenáno u Nobeoka Bozu (0,39 % v průměru 3 let), Trappe (1,86 %), Brawura (2,82 %), Leguan (2,89 %), Vánek (3,04 %), vyšší napadení bylo u odrůd SW Kronjett (8,43 %), Corso (6,3 %) a Sandra (6,01 %).

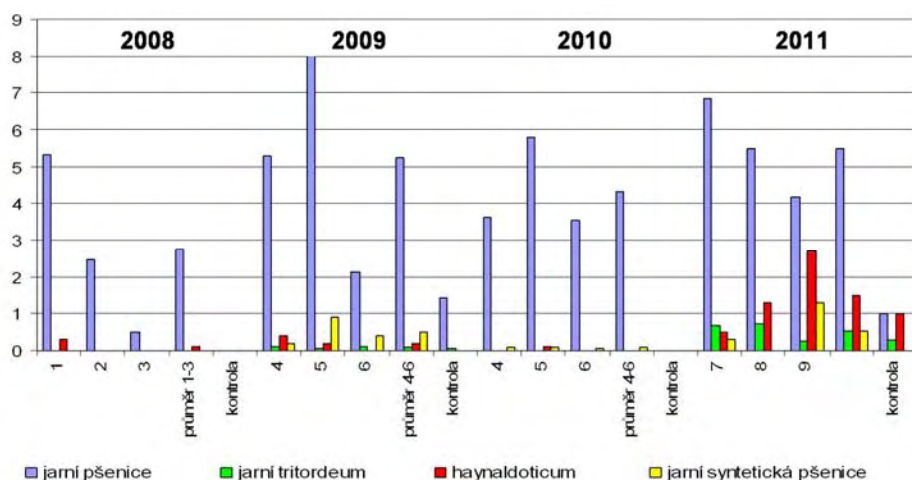
Zajímavé bylo, že u vybrané syntetické pšenice CIGM93.266, haynaldotikum a u všech deseti linií tritordea byly rostliny zdravé nebo jen s malým napadením bráničnatkou.

Ze srovnání napadení jednotlivých druhů na obrázku 2 je zřejmé, že v roce 2011 došlo oproti předešlým letům k vyššímu výskytu projevů choroby u některých zástupců tritordea, haynaldotikum a i syntetické pšenice.

Bráničnatka patří ke skupině hemibiotrofních patogenů, které pro svůj život potřebují zpočátku živé pletivo a následně způsobí odumírání rostlinných pletiv. Její genetická specializace na daný substrát je méně vyhraněná než u jiných patogenů (padlí, rzi), kteří jsou vázáni více na živá pletiva svých hostitelů. Z toho vyplývá složitost vztahu mezi hostitelem a patogenem. Slibná by proto mohla být nehostitelská forma rezistence typická pro *Hordeum chilense* (Rubiales set al., 2000), které je jedním z rodičů tritordea. Přítomnost pšeničných genomů u tritordea může tuto rezistenci potlačovat. Poněkud vyšší výskyt infekce u tritordea, haynaldotikum a syntetické pšenice v roce 2011 oproti předcházejícím letům mohou být způsobeny odlišnostmi ve virulenci jednotlivých izolátů, případně změnou přirozeného infekčního tlaku patogena z okolního prostředí.

Tabuľka 2: Procento napadení listovej plochy testovaných genotypů jarních obilovín izoláty bráničnatky pšeničné

genotyp	rok registrace v ČR	2008				2009				2010				2011				
		izolát č.			kontrola	izolát č.			kontrola	izolát č.			kontrola	izolát č.			kontrola	
		1	2	3		4	5	6		4	5	6		7	8	9		
pšenice																		
1	Amaretto	2006	5,5	4	1,5	0	1,7	5,8	2	2,4	1	6,7	22	0	7,3	2,6	4,4	0
2	Aranka	1998	8,8	2	0,5	0	1,4	3,2	3,1	1,4	0,1	6	20	0	5,2	9,3	6,8	0
3	Brawura	2007	6,2	1,5	1	0	2,3	3,3	3,7	1,9	0,1	2,4	0,7	0	4,7	3,8	4,1	4,1
4	Corso	2001	4,5	2,5	0,2	0	11	21,5	3,3	8,2	0,9	0,7	0	0	10,4	8,5	12,9	5,3
5	Granny	2004	7	1,3	0,2	0	10	13,2	0,5	0,4	11,1	7,7	0	0	5,5	2,9	1,4	0,1
6	Leguan	1998	3,3	3,3	1,2	0	8,7	3,6	0,4	1,5	0,7	5,3	0	0	2,1	5,4	0,7	0
7	Munk	1995	5,5	2,8	0	0	4,8	4,4	1,5	0,5	1,1	9,7	0	0	5,8	4,2	6,8	0
8	Sandra	1984	4,5	4	0	0	3,4	5,4	3	2,7	3,8	28,1	1,3	0	11,4	5,8	1,4	0,1
9	Saxana	1990	3,8	0,8	0,1	0	6,9	2,7	0,7	1	0	3,8	20	0	4,5	4,7	0,3	1,0
10	Septima	2008	2,9	2,8	2,7	0	2,3	1,8	0,3	0	2,5	26,3	0,3	0	8,6	9,2	8,2	0,8
11	Sirael	2005	5,2	1,7	0	0	1,3	18,8	2,7	0,7	5,9	9	0	0	3,7	2,1	0,7	1,5
12	SW Kadrijl	2006	6,7	3	0,4	0	1,2	15,1	2,5	0,5	13,2	6,5	0	0	6,9	11,4	0,6	0
13	SW Kronjet	2005	3,8	2,1	0,5	0	10	5,4	4,7	1	28	3,4	0,3	0,1	19,4	8,4	15,2	0,6
14	Trappe	2007	3,5	1	0	0	0,2	2,5	1,2	0,2	0	0,3	5	0	1,8	3,6	3,2	3,2
15	Triso	2002	3,8	5	0,3	0	9,3	11,2	5,4	0,7	2,3	0,1	0,3	0	7,9	13,4	4,1	0,6
16	Vánek	2004	8,2	3,5	0,1	0,2	7,1	4,8	1,1	0,5	0,1	0	0	0	5,6	2,2	3,8	0
17	Vinjet	2001	8,2	2,7	0	0	11	19,1	1	0,5	0,4	0	1	0	8,4	6,4	2,9	1,5
18	Zuzana	2003	4,5	0,2	0,2	0	3,4	23,1	1,4	0,5	1,3	0	0	0	2,5	1,8	0,5	0
19	Nobeoka Bozu						0	1,1	0	0	0	0	0	0	1,9	0,3	0,2	0,5
20	Sumai 3						10,2	0,8	3,9	4,2	0	0	0	0	13,5	4,1	5,1	0,7
<i>průměr</i>			5,3	2,5	0,5	0,0	5,3	8,3	2,1	1,4	3,6	5,8	3,5	0,0	6,9	5,5	4,2	1,0
<i>průměr 3 izolátů</i>			2,76				5,26			4,32				5,51				
tritordeum																		
21	HTC 1323DH		0	0	0	0	0,2	0	0	0	0	0	0	0	2,1	0	0	0
22	HTC 1331aDH		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,3	0	0
23	HTC 1331bDH		0	0	0	0	0,2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,5
24	HTC 1331cDH		0	0	0	0	0	0	0,2	0	0	0	0	0	1,7	4,7	0,7	1,7
25	HT 135aDH		0	0	0	0	0,2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
26	HT 135bDH		0	0	0	0	0	0	0	0,5	0	0	0	0	0	0,5	0	0
27	HTC 2060		0	0	0	0	0	0,3	0	0	0	0	0	0	2	0	1,2	0
28	HTC 2071		0	0	0	0	0	0	0,7	0	0	0	0	0	0	1,7	0	0
29	HTC 2083		0	0	0	0	0,3	0	0,2	0	0,1	0	0	0	1	0	0	0
30	HTC 2084		0	0	0	0	0,2	0,2	0	0	0	0	0	0	0	0	0,5	0,7
<i>průměr</i>			0	0	0	0	0,1	0,1	0,1	0,1	0	0	0	0	0,7	0,7	0,2	0,3
<i>průměr 3 izolátů</i>			0,00				0,09			0,00				0,55				
haynaldotikum																		
31	Denti de cani C.P.		0,3	0	0	0	0,4	0,2	0	0	0	0,1	0	0	0,5	1,3	2,7	1
<i>průměr 3 izolátů</i>			0,10				0,20			0,03				1,50				
syntetická pšenice																		
32	CIGM93.266		0	0	0	0	0,2	0,9	0,4	0	0,4	0	0	0	0,3	0	1,3	0
<i>průměr 3 izolátů</i>			0,00				0,50			0,13				0,53				



Obrázek 2: Srovnání průměrného napadení listové plochy u jednotlivých druhů obilovin ve čtyřech letech

ZÁVĚR

- Nejvirulentnější izoláty použité pro umělou infekci byly izoláty č. 1, 5 a 7.
- K odrůdám, které se objevovaly po celou dobu testování mezi nejméně napadenými bez ohledu na ročník a izolát, patřily Nobeoka Bozu (0,39 % v průměru 3 let), Trappe (1,86 %), Brawura (2,82 %), Leguan (2,89 %) a Vánek (3,04 %).
- Vysoká rezistence k braničnatce byla nalezena u tritordea, syntetické pšenice CIGM93.266 a haynaldotikum Denti de cani C. P. Může se jednat o potenciální donory rezistence využitelné ve šlechtění.
- Byla potvrzena specifická reakce odrůd na jednotlivé izoláty braničnatky.

Poděkování. Práce byla podpořena projektem NAZV QH81284 Ministerstva Zemědělství České republiky a projektem Kontakt Mobilita MEB0810001 Ministerstva školství mládeže a tělovýchovy České republiky.

LITERATURA

- ARRAIANO, L.S., WORLAND, A.J., ELLERBROOK, C., BROWN, J.K.M.: Chromosomal location of a gene for resistance to Septoria tritici blotch (*Mycosphaerella graminicola*) in the hexaploid wheat 'Synthetic 6x'. *Theor., Appl., Genet.*, 103, 2001: 758–764.
- MARTÍN, A., ALVAREZ, J.B., MARTIN, L.M., BARRO, F., BALLESTEROS, J.: The development of tritordeum: a novel cereal for food processing. *Journal of Cereal Science*, 30(2), 1999: 85–95.
- MELETTI, P., SBRANA, V., QUATTRUCCI E., GALLI V., CAPRONI, E., CORAZZA, L., BALMAS, V., STEFANI, A., BOZZINI, A.: Denti de cani (= X *Haynaldoticum sardoum*) spontaneous hexaploid wheat. Agronomic and technological characterization [Sardinia – Tuscany – Calabria – Sicily]. *Sementi Elette (Italy)* 42(6), 1996: 33–41.
- RUBIALES, D., READER, R.M., MARTÍN, A.: Chromosomal location of resistance to Septoria tritici in *Hordeum chilense* determined by the study of chromosomal addition and substitution lines in 'Chinese Spring' wheat. *Euphytica*, 115, 2000: 221–224.

Adresa autorov:

RNDr. Ilona Svobodová, Agrotest fyto, s.r.o., Havlíčkova 2787, 767 01 Kroměříž, tel.: +420 573 317 154,

e-mail: svobodova.ilona@vukrom.cz

Ing. Petr Martinek, CSc., Agrotest fyto, s.r.o., Havlíčkova 2787, 767 01 Kroměříž, tel.: +420 573 317 152,

e-mail: martinek.petr@vukrom.cz

Ing. Lubomír Věchet, CSc., Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Drnovská 507/1 Praha 6 - Ruzyně, tel.: +420 233 022 361, e-mail: vechet@vurv.cz

PRIRODZENÁ INOKULÁCIA PŠENICE FUZÁRIAMI A OBSAH DEOXYNIVALENOLU

FUSARIUM AND DEOXYNIVALENOL CONTENT FOLLOWING NATURAL INOCULATION OF WHEAT

VALÉRIA ŠUDYOVÁ, SVETLANA ŠLIKOVÁ

Centrum výskumu rastlinnej výroby Piešťany

The occurrence of the *Fusarium* spp. and the mycotoxin deoxynivalenol (DON) in grain of wheat grown for food purposes in different locations of the Slovak Republic were studied during 2006–2008. Samples of naturally cultivated winter wheat from three localities in Slovak Republic were evaluated for occurrence of *Fusarium* species and DON content. Wheat samples from different localities showed different contamination of grain with DON and relative density of *Fusarium* spp. The highest relative density for 2006-2008 was found in the locality Turčiansky Ďur. The highest DON content was found in the locality Turčiansky Ďur and the lowest in Abrahám.

Key words: *Fusarium*, relative density, deoxynivalenol,

ÚVOD

Mykotoxín deoxynivalenol produkujú huby *Fusarium* spp., ktoré napadajú pšenicu počas rastu i uskladnenia, ak zrno nie je dostatočne vysušené (Stenglein 2009). *F. culmorum* a *F. graminearum* sú druhy, ktoré sa vyskytujú najčastejšie na napadnutých zrnách pšenice v Európe. Frekvencia výskytu a druhové spektrum *Fusarium* spp. nie je stabilné, kolíše v závislosti od ročníka, odrodovej skladby a vývoja počasia v čase infekcie a líši sa aj v jednotlivých krajinách. Niekoľkoročné analýzy zrna pšenice často odhalili zmenu v druhej skladbe a prevalencii druhov *Fusarium* spp. (Lõiveke 2003). Vzorky zrna zozbierané z rôznych lokalít Slovenska ukázali, že boli kolonizované viacerými druhmi fuzárií, pričom najvyššie zastúpenie zo zistených izolátov malo v roku 2006 *F. graminearum*, v roku 2007 a 2008 to bolo *F. poae*. Najčastejšie sa v zrnách napadnutých fuzáriami vyskytuje mykotoxín DON pôsobiaci toxicky na človeka, zvieratá a rastliny. 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 výrobnjej oblasti, 5 % z repárskej výrobnjej oblasti a 14,3 % zo zemiakarskej výrobnjej oblasti prekročilo povolený limit obsahu DON stanovený EÚ počas troch sledovaných rokov (Šliková a kol. 2008). Cieľom práce bolo poskytnúť obraz o prirodzenom výskyte mykotoxínu DON na pšenici pestovanej v rozdielnych produkčných oblastiach na Slovensku v rokoch 2006, 2007 a 2008 a denzite toxínogénnych druhov fuzárií.

MATERIÁL A METÓDY

Materiál

V rokoch 2006 až 2008 boli získané zrnové vzorky pšenice ozimnej v množstve 1 kg od pestovateľov z lokalít Abrahám, Veľké Ripňany a Turčiansky Ďur, resp. z troch produkčných oblastí -kukuričnej, repárskej a zemiakarskej.

Izolácia a identifikácia húb rodu Fusarium spp.

Zrná pšeničných vzoriek boli povrchovo sterilizované v 1% roztoku NaOCl po dobu 2 minúty. Následne boli 3 -krát prepláchnuté v re-destilovanej vode a kultivované v Petriho miskách (Ø 8 cm) na zemiakovo-dextrózovom agare (PDA) v biologickom termostate pri teplote 23°C po dobu 5-7 dní. Na každú vzorku bolo testovaných 100 náhodne vybraných zrn. Z rozvinutých kolónií bolo reisolované mycélium a opätovne kultivované v Petriho miskách na syntetickom živnom médiu (SNA) pod UV-svetlom, fotoperiódou 12 hod deň/12 hod noc, teplote 24 °C. Na determináciu jednotlivých druhov bola použitá klasická identifikácia na základe mikroskopických znakov podľa laboratórných manuálov Gerlach a Nirenberg (1982) a Leslie a Summerell (2006). Relatívna denzita bola stanovená nasledovne:

$$(RD \%) = (n_i / N_i) \cdot 100$$

n_i = počet izolátov rodu alebo druhu

N_i = celkový počet detegovaných izolátov

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

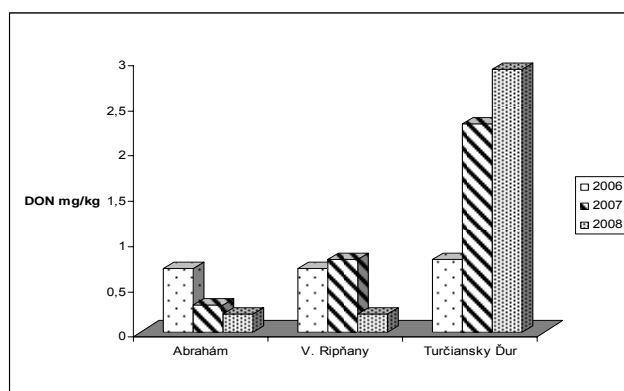
Z analyzovaných vzoriek pšenice bol determinovaný najväčší počet druhov rodu *Fusarium* sp. v lokalite Turčiansky Ďur v roku 2007 (12 druhov). V tejto lokalite bol zistený v roku 2007 aj 2008 najvyšší obsah DON (zhodne $2,3 \text{ mg.kg}^{-1}$) a najvyššia RD *F. graminearum* a *F. culmorum* ako hlavných producentov sledovaného mykotoxínu. V roku 2007 bola RD pre *F. graminearum* 9,0%, pre *F. culmorum* 3,6% (Tab. 1), v roku 2008 bola 3-násobne vyššia RD pri *F. graminearum* a 4-násobne vyššia pre *F. culmorum* v porovnaní s predchádzajúcim rokom. V rokoch 2007 a 2008 dochádza k zmene v prevalencii druhov, keď najvyššia RD bola zistená pri *F. poae*, nasledovalo *F. graminearum* a *F. sporotrichioides*. Prevalencia *F. poae* bola na našom území zaznamenaná v prácach Roháčik a Hudec (2005) a Mašková a kol. (2009). Klimatické zmeny zaznamenané v ostatných rokoch zmenili aj geografické a výškové areály rozšírenia jednotlivých druhov fuzárií (Hudec, 2006; Stepien 2008).

Priemerný obsah DON v analyzovaných vzorkách pšenice získaných z troch lokalít bol $1,01 \text{ mg.kg}^{-1}$. V lokalite Turčiansky Ďur bol zistený priemerný obsah DON za sledované obdobie $1,9 \text{ mg.kg}^{-1}$ (2,08), čo je až 4,7 krát viac ako v lokalite Abrahám a 3,8 krát ako v lokalite Veľké Ripňany. V tejto lokalite bol zaznamenaný najvyšší obsah DON aj v jednotlivých rokoch (Graf č. 1). Medzi lokalitami Abrahám a Veľké Ripňany sa zistil 20% rozdiel v priemernom obsahu DON za roky 2006 až 2008. V roku 2006 priemerný obsah DON vo vzorkách z lokality Turčiansky Ďur bol vyšší o 21% ako v lokalite Veľké Ripňany a o 11% ako v lokalite Abrahám. V rokoch 2008 bol tento rozdiel vyšší o 65 % pri lokalite Veľké Ripňany a 84% pri lokalite Abrahám, v roku 2008 v oboch lokalitách porovnaní s lokalitou Turčiansky Ďur bol tento rozdiel až 93%. Silný regionálny efekt na obsah DON bol pozorovaný vo vzorkách ozimnej pšenice, ktoré boli pozbierané z polí v Holandsku za účelom vypracovania prediktívnych modelov pre obsah DON v tejto plodine (Franz a kol. 2009). Podľa Schaafsma a Hookera (2007) poveternostné podmienky ovplyvňujú výskyt mykotoxínu DON v zrnách pšenice na 48%, pestovaná odroda 27% a pestovateľské podmienky okolo 14%-28%, pričom 4 až 7 dní pred kvitnutím a 3-10 dní po kvitnutí sú obdobia, ktoré najvýznamnejšie súvisia s kontamináciou vzoriek mykotoxínom DON.

Tabuľka 1: Relatívna denzita (%) *Fusarium* sp. v rokoch 2007-2008 v troch lokalitách Slovenska

Lokalita	Roky											
	Druh fuzária											
	2006				2007				2008			
	<i>F. gram</i>	<i>F. culm</i>	<i>F. poae</i>	<i>F. sporo</i>	<i>F. gram</i>	<i>F. culm</i>	<i>F. poae</i>	<i>F. sporo</i>	<i>F. gram</i>	<i>F. culm</i>	<i>F. poae</i>	<i>F. sporo</i>
Abrahám	14,8	0	0	8,8	7,5	0	2,5	2,5	14,3	0	42,4	29,3
Veľké Ripňany	5,6	0	0	5,6	8,5	2,8	2,8	0	20,0	0	6,6	13,3
Turčiansky Ďur	7,6	0	5,5	2,5	9,0	3,6	25,4	21,8	29,2	9,2	12,3	15,4
Priemer	9,3	0	1,8	5,6	8,3	2,1	10,2	8,1	21,2	3,1	20,4	19,3

F. gram – *Fusarium graminearum*; *F. culm* – *Fusarium culmorum*; *F. sporo* – *Fusarium sporotrichioides*



Graf 1: Porovnanie priemerného obsahu DON v zrnových vzorkách pšenice získaných v troch lokalitách v rokoch 2006 až 2008

ZÁVER

Výsledky z analýz obsahu DON zo vzoriek získaných zo zemiakarskej produkčnej oblasti, ktorá bola zastúpená lokalitou Turčiansky Ďur ukázali na vysokú kumuláciu DON a najvyššiu relatívnu denzitu *F. graminearum* a *F. culmorum*, hlavných producentov daného mykotoxínu počas sledovaných rokov 2006-2008.

Priemerná kumulácia DON vo vzorkách pochádzajúcich z kukuričnej a repárskej oblasti v sledovaných rokoch nebola vyššia ako povolený EÚ limit pre obsah DON v nespracovanej pšenici.

Acknowledgements: This work was supported by OP Research and Development: Development of new types of genetically modified plants with farm traits (ITMS 26220220027) from the European Regional Development Fund.

LITERATÚRA

- European Commission, 2006a. Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 amending Regulation (EC) setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. Official Journal of the European Union, L 364/5.
- FRANZ E. et al. 2009. Prediction of Deoxynivalenol Content in Dutch Winter Wheat. In *Journal of food protection*, vol. 72, 2009, no. 10, pp. 2170-2177.
- GERLACH, W. – NIRENBERG, H. I. 1982. The Genus *Fusarium* – a Pictorial Atlas. Berlin: Paul Parey, 1982. 406 pp.
- HUDEC, K. 2006. Vplyv lokality a ročníka na výskyt húb z rodu *Fusarium* pri fuzarióze klasu a bázy stebľa pšenice [Influence of locality and year on *Fusarium* species occurrence in *Fusarium* head blight and stalk rot of winter wheat]. In *Agriculture (Poľnohospodárstvo)*, vol. 52, 2006, no. 2, pp. 69–76.
- LÕIVEKE, H. et al. 2003. *Fusarium* fungi as potential toxicants on cereals and grain feed grown in Estonia during 1973–2001. In *Agronomy Research*, vol. 1, 2003, no. 2, pp. 185–196.
- LESLIE, J.F. – SUMMERELL, B.A. 2006. *The Fusarium Laboratory Manual*. Australia: Blackwell Publishing, 2006, 338 p. ISBN 978-0-8-8138-1919-8.
- MAŠKOVÁ, Z. et al. 2009. Spektrum druhov rodu *Fusarium* izolovaných zo pšenice slovenského pôvodu a toxigenita vybraných kmeňov. In *Mykologické listy*, 2009, suppl., pp.82–83. ISBN 978-80-254-6038-2.
- ROHÁČIK, T. – HUDEC, K. 2005. Influence of agro-environmental factors on *Fusarium* infestation and population structure in wheat kernels. In *Annals of agricultural and environmental medicine*, vol. 12, 2005, pp. 39–45.
- SCHAAFSMA, A.W. – HOOKER, D.C. 2007. Climatic models to predict occurrence of *Fusarium* toxins in wheat and maize. In *International Journal of Food Microbiology*, vol. 119, 2007, no. 1-2, 2007, pp. 116-125.
- STENGLEIN, S. A. 2009. *Fusarium poae*: A pathogen that needs more attention. In *Journal of Plant Pathology*, vol. 91, 2009, no. 1, pp. 25–36.
- STEPIEŇ, L. et al. 2008. Wheat-infecting *Fusarium* species in Poland – their chemotypes and frequencies revealed by PCR assay. In *Journal of Applied Genetics*, vol. 49, 2008, no. 4, pp. 433–441.
- ŠLIKOVÁ, S. et al. 2008. Deoxynivalenol in wheat from the growing areas of Slovakia. In *Cereal Research Communications*, 36, 2008, pp. 279-287.

Adresa autorov:

Valéria ŠUDYOVÁ, Svetlana ŠLIKOVÁ: Centrum výskumu rastlinnej výroby Piešťany, Bratislavská cesta 122, 921 68 Piešťany; email: sudyova@vurv.sk

DETEKCE GENŮ PRO CHALKON SYNTÁZU U PŠENICE (*TRITICUM AESTIVUM* L.)

CHALCONE SYNTHASE GENE DETECTION IN WHEAT (*TRITICUM AESTIVUM* L.)

VÁCLAV TROJAN¹, MILENA MUSILOVÁ¹, TOMÁŠ VYHNÁNEK^{1,2}, LADISLAV HAVEL¹

¹Ústav biologie rostlin, ²CEITEC MENDELU, Agronomická fakulta, Mendelova univerzita v Brně

Anthocyanins, flavonoid substances in nature, are responsible for the different pigmented caryopsis of common wheat (*Triticum aestivum* L.). Anthocyanin biosynthesis path is realized in plants by many enzymes. One of the key enzymes in this pathway is chalcone synthase (CHS). Pigments forming this biosynthetic pathway in grain are stored in different layers. Purple pigments simultaneously accumulate in the pericarp, blue pigments are stored in the aleurone layer caryopsis.

The field experiment Agricultural Research Institute Kroměříž, Ltd. derived samples ripened caryopsis of wheat selected genotypes with different pigment caryopsis, which from total RNA was isolated using a commercial kit Total RNA was reverse transcribed into cDNA transcription. House keeping *GAPDH* gene (the gene for glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) was chosen as a control for PCR to verify the successful transcription of cDNA. Proven cDNA was subsequently used as a template for gradient PCR to test the optimum temperature annealing for designed primer combinations. Using a degenerate primer for the CHS no PCR products have been observed, thereby directly identified gene sequences were, specifically parts the *CHS* gene in the NCBI database (National Center for Biotechnology Information). Application BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) we searched other sequences with a high level of similarity, which served for a combination of primer design in the program Primer3. Gradient PCR allowed the detection of specific PCR products at two of the three primer pairs. After optimization PCR obtained primer combination products for CHS from *Hordeum vulgare* L. and *Triticum aestivum* L. 'Chinese Spring' were subjected to cloning and sequencing analysis.

Key words: Anthocyanins, Chalcone synthase, wheat

ÚVOD

Anthokyany, látky flavonoidní povahy, jsou odpovědné za různé zbarvení obilek pšenice seté (*Triticum aestivum* L.). Biosyntetická dráha anthokyanů je v rostlinách upravována mnoha enzymy, jeden z klíčových enzymů této dráhy je chalkon syntáza (CHS). Geny kódující enzymy biosyntetické dráhy se dělí na dvě skupiny, geny rané biosyntézy (EBGs - early biosynthesis genes) a geny pozdní biosyntézy (LBGs - late biosynthesis genes) (Nesi et al., 2001). CHS se řadí do skupiny genů rané biosyntézy. Barviva tvořící se touto biosyntetickou dráhou se v obilce ukládají v různých vrstvách. Purpurová barviva se současně s červenými hromadí v perikarpu, modrá barviva jsou ukládána v aleuronové vrstvě obilky. Vzhledem k tomu, že úloha anthokyanů je ze zdravotního hlediska obecně prospěšná (Lila, 2004) mohou být uváděné nestandardně zbarvené pšenice zdrojem nových vhodných látek. Přírodní barviva se obvykle vyznačují antioxidační aktivitou. Strava bohatá na antioxidanty typu antokyanů, flavonoidů a karotenoidů působí preventivně mimo jiné na výskyt aterosklerózy, ischemické choroby srdeční, zánětlivých procesů, zlepšuje funkci zraku a pozitivně ovlivňuje ochranné procesy v organismu (Lachman et al., 2003). Cílem práce bylo pomocí molekulárně biologických metod detekovat geny zodpovědné za různé zbarvení obilek pšenice seté.

MATERIÁL A METODY

Z polního pokusu Zemědělského výzkumného ústavu Kroměříž, s.r.o. pocházely vzorky zrajících obilek genotypů pšenice seté s různým zbarvením obilky, ze kterých byla izolována celková RNA. Pomocí komerčního kitu (Sigma-Aldrich, USA) byla celková RNA reverzní transkripcí přepsána do cDNA. Provozní gen *GAPDH* (gen pro glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenázu) byl vybrán dle Wang et al. (2003) jako vhodný kontrolní gen pro PCR k ověření úspěšnosti přepisu do cDNA. Ověřená cDNA byla následně použita jako templát pro gradientové PCR k testování optimální teploty anealingu navržených primerových kombinací pro CHS.

VÝSLEDKY A DISKUSE

Použitím degenerovaného primeru pro CHS dle sekvenční dat, které uvádějí Gao et al. (2001) nebyly opakovaně zaznamenány žádné PCR produkty, proto se přímo zjišťovaly sekvence genu, resp. části genu pro CHS v databázi NCBI (*National Centre for Biotechnology Information*). Využitím aplikace BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) jsme dohledali další sekvence s vysokým stupněm podobnosti, které posloužily pro návrhy kombinací primerů. Pro návržení primerových kombinací je možno využít mnoho z dostupných programů na design primerů př. NetPrimer (Koressaar a Remm, 2007), Primo Pro (Abd-Elsalam, 2003), Primer3 (Rozen a Skaletsky, 2000). V našem případě byl využit Primer3. Gradientová PCR umožnila návrh optimálních teplot nasedání primerů (Tab. 1), specifické PCR produkty byly zaznamenány u dvou (HvCHS, TaCHS_es) ze tří primerových dvojic.

Tabulka 1: Primerové kombinácie s optimálnou teplotou nasedání

	Velikost PCR produktu (bp)	Optimální teplota nasedání primeru (°C)
HvCHS		
<i>Hordeum vulgare</i> L. CHS	196	57
TaCHS		
<i>Triticum aestivum</i> L. CHS	221	58
TaCHS_cs		
<i>Triticum aestivum</i> L. 'Chinese spring' CHS	180	58

ZÁVĚR

Postup detekce genu pro CHS se v našem případě pomocí degenerovaného primeru neosvědčil. Navrzení specifických primerových kombinací přímo na *in silico* nalezené sekvence genu pro CHS umožnilo jeho detekci. Po optimalizaci PCR byly získané produkty primerových kombinací pro CHS z *Hordeum vulgare* L. a *Triticum aestivum* L. 'Chinese spring' podrobeny klonování a sekvenční analýze. Díky získaným výsledkům budou navrženy protokoly pro Real-time PCR, pomocí nichž by měla být realizována studie genové exprese.

Poděkování: Práce vznikla za finanční podpory projektu IGA AF MENDELU TP 7/2011 a GAČR 204/09/H002.

LITERATURA

- ABD-ELSALAM K.A. 2003. Bioinformatic tools and guideline for PCR primer design. In *Afr. J. Biotechnol.* 2003, vol. 2 (5), p. 91-95. ISSN 1684-5315.
- KORESSAAR T., REMM M. 2007. Enhancements and modifications of primer design program Primer3. In *Bioinformatics.* 2007, vol. 23 (10), p. 1289-1291. ISSN 1460-2059.
- LACHMAN J., DUDJAK J., ORSÁK M., PIVEC V. 2003. Effect of accelerated ageing on the content and composition of polyphenolic complex of wheat (*Triticum aestivum* L.) grains. In *Plant Soil Environ.*, 2003, vol. 49 (1), p. 1-7. ISSN 1214-1178.
- LILA A.M. 2004. Anthocyanins and human health. In *An in vitro investigative approach.* In *J. Biomed. Biotech.*, 2004, vol. 2004(5), p. 306-313. ISSN 1110-7251.
- NESI N., JOND C., DEBEAUJO I., CABOCHE M., LEPINEIC L. 2001. The Arabidopsis *TT2* gene encodes an R2R3 MYB domain protein that acts as a key determinant for proanthocyanidin accumulation in developing seed. In *Biologia Plant.*, 2001, vol. 53(2), p. 223 - 228. ISSN 0006-3134.
- WANG A., XIA Q., XIE W., DATLA R., SELVARAJ G. 2003. The classical Ubisch bodies carry a sporophytically produced structural protein (RAFTIN) that is essential for pollen development. In *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003, vol. 100(24), p. 14487-14492. ISSN 0027-8424.
- GAO J, LIU J., LI B., LI, Z. 2001. Isolation and Purification of Functional Total RNA from Blue-grained Wheat Endosperm Tissues Containing High Levels of Starches and Flavonoids. In *Plant Mol. Biol. Rep.*, 2001, vol. 19(2), p. 185a-185i. ISSN 0167-4412.
- ROZEN S., SKALETSKY H. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In *Methods Mol. Biol.* 2000, vol. 132 (3), p. 368-386. ISSN 1064-3745.

Kontaktní adresa:

MVDr. Ing. Václav Trojan¹, Ing. Milena Musilová¹, Ing. Tomáš Vyhnánek, Ph.D.^{1,2}, prof. RNDr. Ladislav Havel, CSc.¹, ¹Ústav biologie rostlin, ²CEITEC MENDELU, Agronomická fakulta, Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika, Tel.: +420 545 133 389,
e-mail: vaclav.trojan@mendelu.cz, milena.musilova@mendelu.cz, vyhnanek@mendelu.cz, lhavel@mendelu.cz

VÝSKYT SNĚTÍ (*TILLETIA CARIES* A *TILLETIA CONTROVERSA*) NA OZIMÉ PŠENICI V ČR A ODRŮDOVÁ NÁCHYLNOST

SUSCEPTIBILITY OF WINTER WHEAT CULTIVARS TO BUNT (*TILLETIA CARIES* AND *TILLETIA CONTROVERSA*) AND SURVEY OF INCIDENCE IN THE CZECH REPUBLIC

MARIE VÁŇOVÁ, DAGMAR SPITZEROVÁ, ZUZANA KLEMOVÁ

Agrotest fyto, Kroměříž, s.r.o., Havlíčkova 2787, 767 01 Kroměříž, Czech Republic

Bunts (*Tilletia caries* (DC.) Tul. and *Tilletia controversa* Kuhn) belong to very important diseases of winter wheat because contaminated commodities (seeds, foods and feeds) affect the competitiveness of the crop on both domestic and export markets. The incidence of the bunts in the Czech Republic (CR) was very low till 1990. *T. caries* was relatively easily controlled by chemical seed treatments and *T. controversa* by strict regulations concerning seed production. Both the consumption of seed dressing fungicides and use of certified seed have declined over the last 20 years. Consequently, the incidence of the two bunts has markedly increased and a number of farmers have been facing relevant problems.

Microscopic assessments of grain samples collected from all regions of the CR in 2001-2010 documented considerably increased incidence of both bunts out of which *T. controversa* dominated. The highest percentage of samples contaminated by *T. controversa* was found in 2006. This was due to long-term accumulation of this bunt spores in soil and favourable conditions during the 2005 autumn and 2006 winter. The work gives results of ten-year monitoring of bunt incidence in grain samples that were not cleaned and sorted after harvest. A total of 3.400 samples collected from various locations in the CR were examined. They were analysed for the presence of bunt spores and diagnosed using a microscope. The investigation demonstrated rather wide spread of bunts across the CR. The incidence of bunts negatively influences marketability of winter wheat. This state has necessitated a recovery of chemical seed treatment as well as the interest in cultivars with higher resistance to bunts has increased. Such an interest is also associated with wider use of organic farming practices. The employment of wheat cultivars partially or fully resistant to bunts could greatly contribute to ease the bunt problem. The reaction of Czech and foreign winter wheat cultivars registered in the CR was evaluated in field tests. Seeds of winter wheat were inoculated with teliospores of *T. caries*. The resistance to *T. controversa* was studied under heavy natural infestation from the soil. The heaviest infestation was found in plots with *T. caries* in cvs. Cubus, Federer and Eurofyt. Very low incidence was detected in cvs. Alibaba, Bill, Baroko and Nela.

On average, *T. controversa* incidence was lower than that of *T. caries* but differences among the cultivars were not so expressive.

Keywords: bunts, *Tilletia caries*, *Tilletia controversa*, cultivars, winter wheat, incidence of bunts, Czech Republic

ÚVOD

Sněti rodu *Tilletia* se v ČR na ozimé pšenici až do roku 1999 vyskytovaly jen ojediněle, což svědčilo o dobré účinnosti mořidel a efektivním způsobu moření. V roce 1999 byly zaznamenány první rozsáhlejší výskyty sněti mazlavé. Předcházející nízký výskyt svádí k myšlence omezit použití mořidel, což je možné tehdy, pokud je zabezpečena kontrola zdravotního stavu porostů i osiva, která vyloučí následné nebezpečí výskytu choroby. V rámci úkolu NAZV Mze se zabýváme výskytem sněti z rodu *Tilletia* na ozimé pšenici v následujících etapách.

1. Sledujeme citlivost odrůd ozimé pšenice (v průměru u 30ti odrůd) jak k *Tilletia caries*, tak k *Tilletia controversa* od roku 2007.
2. Vyhodnocujeme vzorky zrna odebrané od kombajnu a v nich zjišťujeme přítomnost spor obou snětí. Ročně zpracujeme kolem 300 vzorků z celé ČR.
3. Zabýváme se spolu s ČZU Praha metodami na stanovení přítomnosti mycelia houby ve vegetačních vrcholech ozimé pšenice a metodami na stanovení přítomnosti spor *Tilletia controversa* v půdě.

V předložené práci jsou uvedeny výsledky monitoringu výskytu obou snětí v ČR v letech 2001-2010.

Dále jsou uvedeny výsledky z roku 2011, v nichž byla vyhodnocena náchylnost 40 vybraných odrůd ozimé pšenice k *Tilletia caries* a *Tilletia controversa*.

MATERIÁL A METODY

Náchylnost odrůd ozimé pšenice byla sledována v polních pokusech. Pokusy s *Tilletia caries* byly založeny v Kroměříži (220 m nadmořská výška, průměrná teplota 8,7°C). Osivo bylo infikováno chlamydosporami ze sběrů snětivých klasů v předcházejícím roce. Bylo použito suspenze 1 g spor ve 20 ml vody na 1 kg osiva. Náchylnost odrůd k *Tilletia controversa* byla sledována v pokusech založených na okr. Vsetín (450 m nadmořská výška, průměrná teplota 6,7°C). Pokusy byly založeny na pozemku s vysokým výskytem spor *Tilletia controversa* v půdě.

Výsev byl proveden v období mezi 5.-10. říjnem. Koncem vegetačního období (GS 85-80) bylo provedeno hodnocení výskytu snětivých klasů na parcele. Hodnocení bylo provedeno vizuálním zjištěním a chlamydospory byly diagnostikovány mikroskopicky.

Podle % napadených klasů byly sledované odrůdy rozděleny do skupin. Pro obě sněti bylo použito následující hodnotící schéma.

rezistentní	0 - 0,01 %	středně citlivé	8 - 20 %
velmi málo citlivé	0,01 - 2 %	silně citlivé	20 - 40 %
málo citlivé	< 8 %	velmi silně citlivé	> 40 %

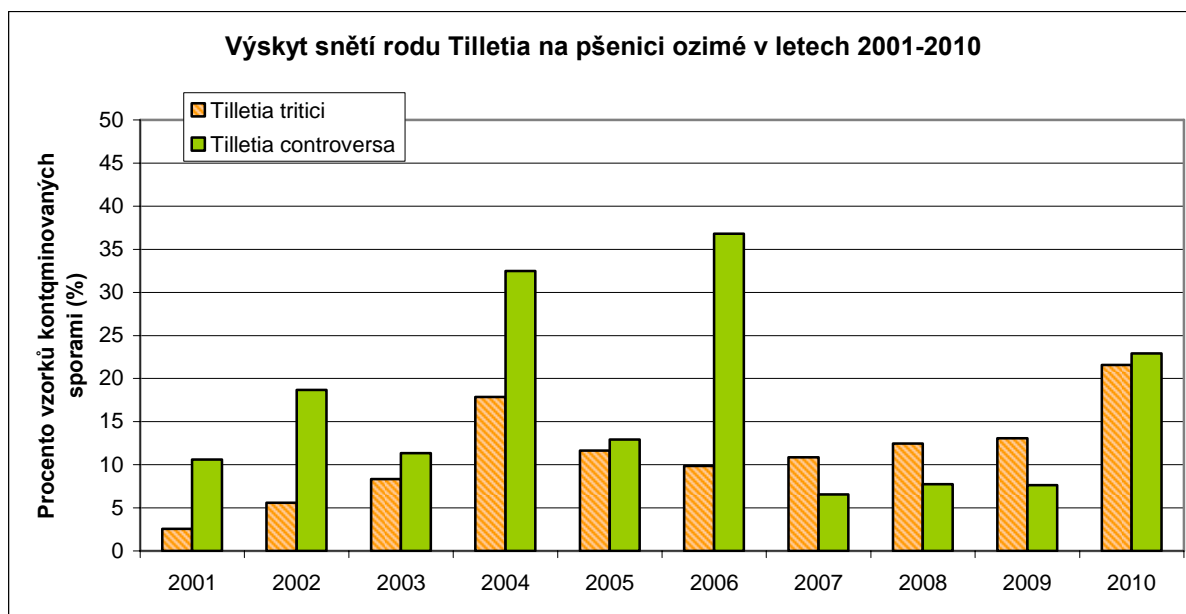
Monitoring výskytu sněti byl prováděn na vzorcích ozimé pšenice z kombajnové sklizně bez předchozího čištění. Ročně bylo zpracováno 300 - 340 vzorků ze všech krajů ČR. Tyto vzorky byly analyzovány na přítomnost spor obou snětí a jejich přítomnost byla diagnostikována mikroskopicky.

VÝSLEDKY A DISKUZE

Desetileté sledování výskytu sněti v České republice (graf 1) ukazuje na neustálou přítomnost spor obou snětí ve vyšetřovaných vzorcích zrna. Kolísající úroveň výskytu sněti mazlavé (*Tilletia caries*), stejně jako sněti zakrslé (*Tilletia controversa*) je výsledkem toho, jak vážně je vnímáno jejich nebezpečí.

Z tohoto hlediska je velmi závažné to, že v roce 2010 byla zjištěna přítomnost spor sněti mazlavé v 65 vzorcích (ze tří set), což je 21,6 %. Je to nejvyšší výskyt této sněti v rámci deseti sledovaných let. Vzhledem k dostupnosti účinných mořidel a jejich vysoké účinnosti, je otázkou, zda se % mořeného osiva výrazně snížilo nebo zda se zhoršila úroveň moření.

Výskyt sněti zakrslé v roce 2010 byl v rámci desetiletého sledování třetí nejvyšší. Dosáhl v průměru hodnoty 16,76 %. Tento průměr je ovlivněn nulovými hodnotami v kraji libereckém a ústeckém. Ve zbývajících krajích bylo % vzorků kontaminovaných snětí zakrslou v rozmezí 42,4 - 12,5 %. Je to překvapivě vysoký výskyt.



Graf 1: Výskyt snětí ve vzorcích zrna z monitoringu v ČR (nečištěný vzorek od sklizecí mlátičky). Průměrný roční počet zpracovaných vzorků byl 220-300.

Stejně důležité jsou i informace o odrůdách vysoce náchylných, které jsou rizikové pro organický způsob hospodaření (Wächter et al. 2007) a u konvenčního hospodaření vyžadují pečlivé vyšetření osiva před mořením a pečlivé moření. Vysoké procento velmi citlivých odrůd ke snětem může být i jednou z příčin, proč se u nás ve sklizeném zrna ozimé pšenice vyskytuje v průměru kolem 10% vzorků, v nichž byly zjištěny teliospory sněti. V roce 2011 bylo napadení ozimé pšenice při umělé infekci vysoké (až 69 % napadených klasů u odrůdy Citrus) a tak bylo možné velmi dobře vyhodnotit i reakci jednotlivých odrůd (tab. 1).

Sněť zakrslá je větším problémem neboť více uniká pozornosti pěstitelů. A tak se čas od času vyskytne za příznivých okolností v širším rozsahu i proto, že běžná mořidla na ni neúčinkují a speciální se používají v omezeném rozsahu. Pokud běžný pěstitel zjistí na pozemku výskyt sněti zakrslé, je třeba následně používat k moření speciální mořidla (Dividend, Celest). Podniky produkující osivo by měly zamořené hony vyloučit z produkce osiv. Kromě toho je třeba si uvědomit, že hostitelem této sněti je i řada trav.

Tabulka 1: Citlivost vybraných odrůd ozimé pšenice v ČR k *Tilletia caries* r. 2011.

rezistentní	0 - 0,01 %			
Alibaba	0,00			
velmi málo citlivé	0,01 - 2 %	silně citlivé	20 - 40 %	
Baroko, Bill, Nella		Iridium	Bardotka	Bohemia
málo citlivé	< 8 %	Anduril	Etela	
Brilliant	Chevalier	Darwin	velmi silně citlivé	> 40 %
Drifter	Globus	Karolinum	Baryton	Biscay
Mulan	Sogood		Cubus	Ebi
středně citlivé	8 - 20 %	Federer	Magister	Merito
Alana	Akteur	Bakfís	Pitbull	Raduza
Boncap	Herman	Nikol	Ebi	Rheia

Tabulka 2: Citlivost vybraných odrůd ozimé pšenice v ČR k *Tilletia controversa* v r. 2011.

rezistentní	0 - 0,01 %	středně citlivé	8 - 20 %	silně citlivé	20 - 40 %
nic	0,00	Alibaba	Bardotka	Baryton	Anduril
velmi málo citlivé	0,01 - 2 %	Bill	Biscay	Bohemia	Boncap
nic		Chevalier	Cubus	Eurofit	Sulamit
málo citlivé	< 8 %	Federer	Karolinum	Ludwig	Illias
Alana	Brillant	Citrus	Magister	Merito	velmi silně citlivé
Darwin	Globus	Herman	Nikol	Nella	> 40 %
Iridium	Pitbull	Raduza	Simila		nic
Sogood					

ZÁVĚR

Kvalitní osiva jsou základním pilířem úspěchu rostlinné výroby. Ke kvalitě osiva patří i ochrana proti chorobám, které jsou osivem přenášeny. Výzkumy týkající se sněti mají velmi důležité praktické uplatnění, přestože by se zdálo, že použití mořidel problém sněti definitivně řeší. Segmentace různých technologií pěstování požaduje informace o možnosti využití odolnosti odrůd a o celkovém lokálním výskytu těchto chorob. Důležité jsou i nové diagnostické metody a studium odlišnosti obou druhů sněti.

Jednou z příčin, proč se u nás ve sklizeném zrně ozimé pšenice vyskytuje v průměru kolem 10% vzorků, u nichž byly zjištěny teliospory sněti, může být vysoké procento velmi citlivých odrůd ke sněti mazlavé.

Poděkování. Práce byla provedena díky finanční podpoře Mze -NAZV projekt QH71105.

LITERATURA

- GOATES, B.J. 1996. Common bunt and dwarf bunt. In R.D. Wilcoxson, and E.E. Saari (ed.): *Bunt and smut diseases of wheat: Concepts and methods of disease management*. CIMMYT. Mexico, D.F., 1996. ISBN 968-6923-37-3. pp. 12–25. Available at: <http://libcatalog.cimmyt.org/download/cim/61965.pdf>
- VÁŇOVÁ, M. – MATUŠINSKY, P. – BENADA, J. 2006. Survey of incidence of bunts. In *Plant Protection Science*, vol. 42, 2006, no. 1, ISSN 1212-2580, pp. 21-25. Available at: <http://www.cazv.cz/default.asp?ch=54&typ=1&val=45452&ids=2980>
- WÄCHTER, R. – WALDOW, F. – MÜLLER, K.-J. – SPIEB, H. – HEYDEN, B. – FURTH, U. – WENG W. – MIEDANER, T. – STEPHAN, D. – KOCH, E. 2007: Charakterisierung der Resistenz von Winterweizensorten und zuchtlinien gegenüber Steinbrand (*Tilletia tritici*) und Zwergsteinbrand (*T. controversa*). In *Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutz*, vol. 59, 2007, no. 2, ISSN 0027-7479, pp. 30-39.
- ZOUHAR, M. – MAZÁKOVÁ, J. – PROKINOVÁ, E. – VÁŇOVÁ, M. – RYŠÁNEK, P. 2010. Quantification of *Tilletia caries* and *Tilletia controversa* mycelium in wheat apical meristem by real-time PCR. In *Plant Protection Science*, vol. 46, 2010, no. 3, ISSN 1212-2580, pp. 107–115. Available at: <http://www.agriculturejournals.cz/publicFiles/25530.pdf>

Adresa autorov:

Ing. Marie Váňová, CSc., Agrotest Fyto s.r.o., Havlíčkova 2787, 767 01 Kroměříž, vanova.marie@vukrom.cz

Ing. Dagmar Spitzerová, Agrotest Fyto s.r.o., Havlíčkova 2787, 767 01 Kroměříž, spitzerova.dagmar@vukrom.cz

Ing. Zuzana Klemová, Agrotest Fyto s.r.o., Havlíčkova 2787, 767 01 Kroměříž, klemova.zuzana@vukrom.cz

REGENERATION OF LEAF EXPLANTS IN GRAPEVINE ROOTSTOCKS REGENERACE LISTOVÝCH EXPLANTÁTŮ U PODNOŽÍ RÉVY VINNÉ

VEJSADOVÁ HANA

Silva Tarouca Research Institute for Landscape and Ornamental Gardening, Publ. Res. Inst. Průhonice

Objective of this work was to find the regeneration way of *in vitro* explants in two grapevine rootstocks 'SO-4' and 'Craciunel 2'. The petiole segments and leaf blades of *in vitro* cultures were used as initial explants. After 10 weeks of explant incubation on modified MS medium, combination of thidiazuron (TDZ) and benzyladenine (BA) significantly stimulated organogenesis initiation. The blades regenerated in greater rate at 1 mg.l⁻¹ TDZ and 4 mg.l⁻¹ BA compared to petiole segments in both vine rootstocks. Somatic embryogenesis induction was significantly influenced by type and growth regulator combination. Auxin β-naphthoxyacetic acid (NOA) with cytokinin TDZ showed as key factors of embryogenic structure formation in all tested explants of both grapevine rootstocks. Significantly positive effect of cytokinin BA on somatic embryo initiation was not found.

Key words: grapevine, rootstocks, 'SO-4', 'Craciunel 2', organogenesis, somatic embryogenesis

INTRODUCTION

Shoot organogenesis and *in vitro* somatic embryogenesis have been achieved from various explants of different *Vitis* species and cultivars (Bouquet and Torregrosa, 2003). The somatic embryogenesis was induced in anthers (Stamp and Meredith, 1988) or ovules (Gray and Mortensen, 1987) but rarely from leaf segments (Robacker, 1993, Cutanda et al., 2008). Somatic embryogenesis was also observed in callus initiated from tendrils of greenhouse grown grapevine cultivars (Salunkhe et al., 1997).

The leaves and petioles as explant sources are often harvested from *in vivo* cultivated plants, a surface sterilization is required and the explants are often threatened with bacteria contamination. Torregrosa and Bouquet (1996) found high level of regeneration in the youngest leaves excised from axillary shoots in proliferating nodal cultures of several *Vitis x Muscadinia* hybrids. Robacker (1993) demonstrated a greater somatic embryogenesis incidence in immature petioles than in leaf laminae of cultivars 'Regale' and 'Fry' muscadine grapes (*Vitis rotundifolia* Michx.).

In this report, shoot regeneration of leaf explants was studied in *in vitro* grown leaves of grapevine rootstocks 'SO-4' and 'Craciunel 2'.

MATERIAL AND METHODS

In grapevine rootstocks 'SO-4' (SO4) and 'Craciunel 2' (Cr2), the leaves were excised from axillary shoots produced by one subculture on WPM (Lloyd and McCown, 1980) medium without growth regulators. Medium was supplemented with 2.5 g.l⁻¹ activated charcoal, 25 g.l⁻¹ sucrose, vitamins B5 and 8 g.l⁻¹ agar (Phytoagar, Duchefa). The explants – dark green leaves were obtained from top and central part of *in vitro* cultures. Modified MS (Murashige and Skoog, 1962) medium with a full concentration of salts was used as regeneration medium. This medium contained a mix of vitamins, 40 g.l⁻¹ sucrose, 7 g.l⁻¹ agar (Microagar, Duchefa) and combination of auxin β-naphthoxyacetic acid (NOA) with cytokinins thidiazuron (TDZ) and benzyladenine (BA), Table 1. The blades were cut through using scissors and cultured (abaxial side down) on regeneration medium. The petioles were dissected into segments cca 5 mm long and placed horizontally on the medium. The explants were cultivated in Petri dishes in the thermostat (23±2°C) at darkness.

The cultures were assessed after 10 weeks. For each treatment, 30 explants were used. The experiment was repeated two-times. Data were statistically evaluated by analysis of variance (ANOVA) and means by Duncan's test (P=0.05).

De novo formed shoots were cultivated in the Erlenmeyer flasks (100 ml) with tinfoil covers in a growth room maintained at a temperature of 23/19°C (day/night) with 16 h photoperiod and a photon fluence rate of 55 μmol.m⁻².s⁻¹ provided by cool white fluorescent tubes. Maintenance WPM medium (Duchefa) contained 2.5 g.l⁻¹ activated charcoal, 25 g.l⁻¹ sucrose, 8 g.l⁻¹ agar (Phytoagar, Duchefa) and 1.5 mg.l⁻¹ BA with indolylic acid (IAA) in concentration of 0.1 mg.l⁻¹

RESULTS AND DISCUSSION

The ability of explant morphogenesis induction is highly depended on the particular genotype of various *Vitis* species, cultivars or hybrids and on certain culture conditions (Bouquet and Torregrosa, 2003). In this work, two grapevine rootstocks 'SO-4' (SO4) and 'Craciunel 2' (Cr2) were used in the presented culture conditions. After 10 weeks, combination of TDZ and BA without auxin stimulated shoot organogenesis in leaf explants – the blades regenerated in greater rate at 1 mg.l⁻¹ TDZ + 4 mg.l⁻¹ BA compared to petiole segments in both grapevine rootstocks (Table 1).

Table 1: Effect of NOA, TDZ and BA treatments on organogenesis and somatic embryogenesis induction in leaf explants after 10 weeks

NOA	TDZ	BA	Explants with shoot bud regeneration (%)				Explants with embryogenic structure formation (%)			
			'SO4'		'Cr2'		'SO4'		'Cr2'	
mg.l ⁻¹			BL	PE	BL	PE	BL	PE	BL	PE
–	0.5	2	11.3 ^d	8.5 ^d	20.8 ^b	15.6 ^c	–	–	–	–
–	1	4	16.3 ^c	10.2 ^d	27.3 ^a	20.9 ^b	–	–	–	–
4	0.5	–	–	–	–	–	60.2 ^c	72.4 ^b	32.5 ^e	47.2 ^d
4	1	–	–	–	–	–	70.5 ^b	80.1 ^a	30.6 ^e	50.7 ^d
4	0.5	2	–	–	–	–	58.7 ^c	73.5 ^b	34.7 ^e	48.6 ^d
4	1	4	–	–	–	–	69.3 ^b	86.8 ^a	29.9 ^e	45.5 ^d

BL – blade explant; PE – petiole explant (30 explants/treatment). The values represent the means of two repeated experiments. Numbers followed by the same letter within one column do not differ significantly at P=0.05 (Duncan's test).

Induction of embryogenic structures was exclusively enhanced by auxin NOA. In 'SO4', the percentage of blade and petiole explants forming embryogenic structures increased significantly to 70–87% with addition of 1 mg.l⁻¹ TDZ and 4 mg.l⁻¹ BA. In 'Cr2' explants, embryogenic tissues appeared in reduced rate – on average 30% in blades and 48% in petioles.

The process of somatic embryogenesis usually requires the involvement of auxin in the induction media with or without subsequent removal of explant from auxin media while cytokinins generally induce shoot formation on casus and support growth in tissue and organ cultures (Fellman et al., 1987). Robacker (1993) used auxin 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and cytokinin BA for embryogenic mass induction in immature leaf laminae and petioles of 'Regale' and 'Fry' muscadine grapes (*Vitis rotundifolia*). In *Vitis rupestris*, Stamp and Meredith (1988) found the embryogenic tissue initiation directly from the explant rather from the callus. Likewise, in the present experiments, the white somatic embryos were observed on the blade disrupted (dissected) surface and on the petiolar stub without callus formation. Whereas, in *V. vinifera*, somatic embryogenesis was induced by 5 µM 2,4-D and 1 µM BA (Cutanda et al., 2008), in rootstocks 'SO-4' and 'Craciunel 2', key factors of somatic embryogenesis induction of leaf explants were auxin NOA and cytokinins TDZ with or without BA.

CONCLUSION

After 10 weeks of explant incubation on modified MS medium, combination of thidiazuron (TDZ) and benzyladenine (BA) significantly stimulated organogenesis initiation. The blades regenerated in greater rate at 1 mg.l⁻¹ TDZ and 4 mg.l⁻¹ BA compared to petiole segments in both vine rootstocks. Somatic embryogenesis induction was significantly influenced by type and growth regulator combination. Auxin β-naphthoxyacetic acid (NOA) with cytokinin thidiazuron (TDZ) showed as key factors of embryogenic structure formation in both grapevine rootstocks.

Acknowledgment: This work was financial supported by the Ministry of Agriculture of the Czech Republic (Project No. QH91214).

REFERENCES

- BOUQUET, A., TORREGROSA, L. (2003): Micropropagation of the grapevine (*Vitis* spp.). In: Micropropagation of Woody Trees and Fruits, Jain S.M. and Ishii K. (eds.), 319–352 pp. Kluwer Academic Publishers, the Netherlands.
- Cutanda, m.c., bouquet, a., chatelet, p., lopez, g., botella, o., montero, f.j., torregrosa, L. (2008): Somatic embryogenesis and plant regeneration of *Vitis vinifera* cultivars 'Macabeo' and 'Tempranillo'. *Vitis*, 47:159-162
- FELLMAN, C. D., READ, P. E., HOSIER, M. A. (1987): Effects of thidiazuron and CPPU on meristem formation and shoot proliferation. *HortScience*, 22: 1197–1201.
- GRAY, D.J., MORTENSEN, J.A. (1987): Initiation and maintenance of long term somatic embryogenesis from anthers and ovaries of *Vitis longii* 'Microsperma'. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 9: 73–80.
- LLOYD, G., MCCOWN, B. (1980): Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. *International Plant Propagators' Society Proceedings*, 30: 421–427.
- MURASHIGE, T., SKOOG, F. (1962): A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15: 473–497.

- ROBACKER, C. (1993): Somatic embryogenesis and plant regeneration from muscadine grape leaf explants. HortSci., 28:53–55.
- SALUNKHE, C.K., RAO, P.S., MHATRE, M. (1997): Induction of somatic embryogenesis and plantlets in tendrils of *Vitis vinifera* L. Plant Cell Rep., 17: 65–67.
- STAMP, J.A., MEREDITH, C.P. (1988): Somatic embryogenesis from leaves and anthers of grapevine. Sci. Hortic., 35:235–250.
- TORREGROSA, L., BOUQUET, A. (1996): Adventitious bud formation and shoot development from *in vitro* leaves of *Vitis x Muscadinia* hybrids. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 45: 245–252.

Adresa autora:

RNDr. Hana Vejsadová, CSc., Výzkumný ústav Silva Taroucy pro krajinu a okrasné zahradníctví, v.v.i., CZ-25243 Průhonice, Czech Republic, vejsadova@vukoz.cz

VPLYV ROČNÍKA A FOLIÁRNYCH PRÍPRAVKOV NA PRODUKČNÉ PARAMETRE ÚRODY SLNEČNICE ROČNEJ

THE INFLUENCE OF YEAR AND FOLIAR PREPARATIONS ON YIELD PRODUCTION PARAMETERS OF SUNFLOWER

ALEXANDRA VEVERKOVÁ, IVAN ČERNÝ, VLADIMÍR PAČUTA, RASTISLAV BUŠO

Katedra rastlinnej výroby, Fakulta agrobiológie a potravinových zdrojov, SPU Nitra

The aim of experiment was detect the influence of weather conditions of experimental year and foliar preparations Route and Sunagreen on production parameters of sunflower yield. In the trial were used three hybrids of sunflower NK Dolbi, NK Kondi, Tristan and foliar applied fertilizer Route and growth stimulator Sunagreen. The impact of weather conditions influenced the yield and fat content in achenes of sunflower negatively. In the evaluation of biological material was found NK Kondi as the most productive, was achieved higher yield and higher fat content in comparison with other hybrids. In comparison between each variant with application of Route, was found the highest yield on variant with hybrid NK Kondi and the highest fat content on variant with hybrid NK Dolbi. In the range of treated variants with growth stimulator Sunagreen was achieved the highest yield on variant with hybrid NK Dolbi and the highest fat content on variant with NK Kondi.

Key words: weather conditions, sunflower hybrids, foliar preparations, yield, quality

ÚVOD

Slnečnica ročná je ponímaná v celosvetovom meradle v súčasnosti medzi päť najvýznamnejších olejní sveta (Málek, 2004). Obsah oleja v semenách olejní je rôzny a pohybuje sa v intervale 25 - 48 %. Olejnatosť a zloženie oleja sú do značnej miery ovplyvnené genotypom. Genotyp a teplota počas dozrievania nažiek predstavujú hlavný faktor ovplyvňujúci pomer olejovej a linolénovej kyseliny v oleji. (Černý, Töröková, 2008; Steer, Seiler, 1990).

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). Černý, Pačuta, Veverková, Bacsová (2010) zdôrazňujú, že porasty slnečnice ročnej spolu s klimatickými a pôdnymi faktormi predstavujú zložitú dynamickú sústavu, v rámci ktorej je vytyčená plodina považovaná za menej adaptívny prvok.

Negatívny vplyv na počiatočný vývoj slnečnice ročnej majú nízke teploty alebo aplikácia preemergentných herbicidov. Preto sa ponúka priestor rastlinným stimulátorom, ktoré môžu stresujúce účinky do istej miery potlačiť (Peza, 2008).

Dôležitú úlohu v systéme pestovania slnečnice ročnej majú biostimulátory, sú to biologicky aktívne látky obsahujúce hormóny, enzýmy, proteíny, aminokyseliny, mikroelementy a iné komponenty, ktoré aktivujú metabolizmus, zameraný hlavne na zlepšenie rastu a vývinu rastlín. Hlavná úloha spočíva v regulácii životných procesov na úrovni bunky, jednotlivých orgánov a organizmu ako celku (Jankowski a Dubis 2008).

MATERIÁL A METÓDY

Cieľom experimentu bolo zistiť vplyv poveternostných podmienok pestovateľského ročníka a foliárnych prípravkov Route a Sunagreen na produkčné parametre úrody slnečnice ročnej.

Poľný polyfaktorový pokus bol realizovaný v roku 2010 na experimentálnej báze Strediska biológie a ekológie rastlín FAPZ SPU v Nitre Dolná Malanta. Sledovaná lokalita sa nachádza v kukuričnej výrobní oblasti charakterizovanej ako teplá a mierne suchá, s miernou zimou a dlhým slnečným svetom. Pokusy boli realizované na hnedozemi kultizemnej.

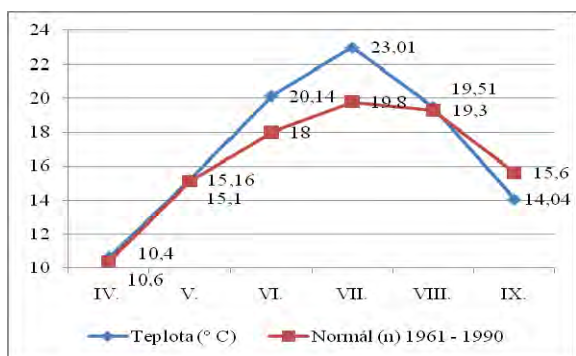
Predplodinou slnečnice ročnej (*Helianthus annuus* L.), v rámci 7 honového oševného postupu, bola pšenica letná forma ozimná (*Triticum aestivum* L.). Základné hnojenie bolo uskutočnené bilančnou metódou, na základe agrochemického rozboru pôdy na predpokladanú výšku úrody 3 t.ha⁻¹. Obrábanie pôdy (podmietka, hlboká jesenná orba) a spôsob založenia porastu (medziriadková vzdialenosť 0,70 m, vzdialenosť v riadku 0,22 m) boli uskutočňované v súlade so zásadami konvenčnej technológie pestovania slnečnice ročnej. Pokus bol založený metódou kolmo delených blokov s náhodným usporiadaním v troch opakovaníach.

V rámci biologického materiálu boli použité hybridy: NK Dolbi, NK Kondi a Tristan.

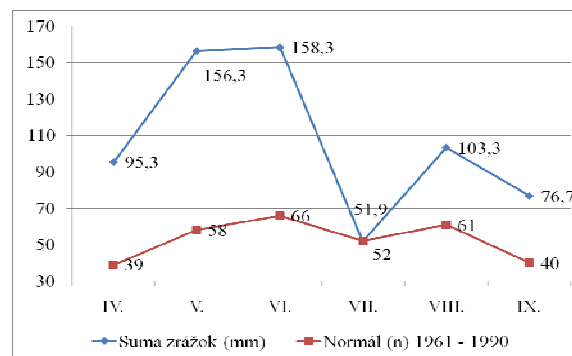
Úrovně aplikácie prípravkov:

Podporné hnojivo Route bolo aplikované vo fáze BBCH 14 – 16 (4 – 6 pravých listov), aplikačná dávka 0,8 l.ha⁻¹. Aplikácia rastového stimulátora Sunagreen bola realizovaná v dvoch fázach BBCH 15 – 25 (vyvinutých 5 – 8 pravých listov) a vo fáze BBCH 53 – 61 (priemer kvetného puku s priemerom od 50 mm do začiatku kvetu). Aplikačná dávka bola v množstve 0,5 l.ha⁻¹.

Poveternostné charakteristiky experimentálneho územia boli získané z Agrometeorologickej stanice FZKI SPU v Nitre (Obrázok 1,2).



Obrázok 1: Priemerné hodnoty teplôt za rok 2010



Obrázok 2: Priemerné hodnoty zrážok za rok 2010

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Šrojtová (2006) uvádza, že priebeh poveternostných podmienok je významným faktorom ovplyvňujúcim produkčný proces slnečnice ročnej. Tento názor potvrdzujú aj nami dosiahnuté výsledky, kde vplyv ročníka sa prejavil štatisticky vysoko preukazne. Vysoký a vegetačne neproporcionálne prerozdelený úhrn zrážok sa negatívne prejavil na sledovaných produkčných parametroch porastu (Obr. 1,2).

Tabuľka 1: Vplyv biologického materiálu a foliárnych prípravkov na úrodu nažiek ($t \cdot ha^{-1}$)

	Biologický materiál	Route	Sunagreen
NK Dolbi	2,65	2,10	3,10
NK Kondi	2,89	3,21	2,59
Tristan	2,58	2,58	2,42
priemer	2,70	2,63	2,70

Priemerná úroda nažiek v rámci celého experimentu bola $2,68 t \cdot ha^{-1}$. Z hodnotenia biologického materiálu vyplýva, že ako najproduktívnejší sa prejavil hybrid NK Kondi $2,89 t \cdot ha^{-1}$ a najmenej produktívny hybrid Tristan $2,58 t \cdot ha^{-1}$. Biologický materiál ovplyvnil sledované parametre produkcie štatisticky vysoko preukazne. Foliárnou aplikáciou podporného hnojiva Route bola získaná najvyššia úroda $3,21 t \cdot ha^{-1}$ pri hybride NK Kondi a najnižšia pri hybride NK Dolbi $2,10 t \cdot ha^{-1}$. Rastový stimulátor Sunagreen pozitívne ovplyvnil úrodu nažiek hybridu NK Dolbi, kde bola dosiahnutá najvyššia úroda $3,10 t \cdot ha^{-1}$, v porovnaní s ostatnými hybridmi (Tab. 1). Oba prípravky ovplyvnili úrodu nažiek štatisticky preukazne. Pri porovnaní aplikácie jednotlivých prípravkov a ich vplyvu na dosiahnutú úrodu nažiek, priemerne vyššia úroda bola zistená pri aplikácii rastového stimulátora Sunagreen (Tab.1).

Tabuľka 2: Vplyv biologického materiálu a foliárnych prípravkov na obsah tuku v nažkách (%)

	Biologický materiál	Route	Sunagreen
NK Dolbi	40,75	41,63	38,49
NK Kondi	42,22	40,51	42,20
Tristan	41,95	40,82	41,24
priemer	41,64	40,99	40,64

Priemerná hodnota obsahu tuku v nažkách bola 41,09 %. Nami dosiahnuté výsledky korešponujú s názorom Karabu (2005), ktorý tvrdí, že správny výber hybridu je dôležitý z hľadiska dosiahnutej kvality produkcie. Najvyšší obsah tuku bol zaznamenaný na hybride NK Kondi 42,22 % a najnižší pri hybride NK Dolbi 40,75 %. Pri porovnaní jednotlivých hybridov s aplikáciou podporného hnojiva Route, najvyšší obsah tuku bol získaný pri hybride NK Dolbi 41,63 % a najnižší na hybride NK Kondi 40,51 %. Aplikáciou stimulátora Sunagreen bol zaznamenaný najvyšší obsah tuku pri hybride NK Kondi 42,20 % a najnižší na hybride NK Dolbi 38,49 % a jeho vplyv sa prejavil štatisticky vysoko preukazne (Tab.2). Z hodnotenia vplyvu foliárnych prípravkov na obsah tuku v nažkách vyplýva, že priemerne vyšší obsah tukov bol získaný na variantoch s aplikáciou podporného hnojiva Route (Tab.2).

ZÁVER

V poľnom polyfaktorovom pokuse realizovanom v roku 2010 na pozemkoch EXBA Dolná Malanta, bol sledovaný vplyv ročníka a foliárnych prípravkov na produkčné parametre úrody slnečnice ročnej. Z realizovaného experimentu vyplývajú nasledovné závery:

- vplyv poveternostných podmienok ročníka pre pestovanie slnečnice ročnej hodnotíme ako nepriaznivý. Neadekvátne prerozdelenie zrážok počas vegetačného obdobia negatívne ovplyvnilo dosiahnutú úrodu a obsah tuku v nažkách štatisticky vysoko preukazne.
- V rámci hodnotenia biologického materiálu bol produkčne najstabilnejším hybrid NK Kondi, kde bola zaznamenaná najvyššia úroda nažiek i najvyšší obsah tukov.
- Pri porovnaní jednotlivých variantov s aplikáciou hnojiva Route, bola zistená najvyššia úroda na variante s hybridom NK Kondi a najvyšší obsah tukov na variante s hybridom NK Dolbi.
- V rámci variantov ošetrovaných rastovým stimulátorom Sunagreen bola získaná najvyššia úroda na variante s hybridom NK Dolbi a najvyšší obsah tuku na variante s hybridom NK Kondi.

Pod'akovanie: 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., PAČUTA, V., VEVEKOVÁ, A., BACSOVÁ, Z., 2010. Zhodnotenie kvalitatívnych a kvantitatívnych parametrov slnečnice ročnej (*Helianthus annuus L.*) vplyvom vybraných faktorov jej pestovania. In *Prosperujúci olejniny (sborník s konferencie)*. Praha: ČZU Praha, 2010, s. 101 - 104, ISBN 978 - 80 - 213 - 2128 - 1.
- ČERNÝ, I., TÖRÖKOVÁ, M. 2008. Aktuálne zhodnotenie úrodového potenciálu slnečnice ročnej. In *Agromanuál*, 2, 2008, s. 78 – 79.
- 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 annuus L.*) v podmienkach Slovenska. Autoreferát dizertačnej práce Nitra: SPU. 2005, s.7.
- MÁLEK, B. 2004. Pěstování slnečnice v celosvětovém měřítku a v podmínkách České republiky. In *Vyhodnocovací seminář Systém výroby řepky a slnečnice (Sborník)*, Hluk, 311 - 325 s. ISBN 80-903464-2-1.
- PEZA, Z. 2008. Stimulace a listová výživa slnečnice - výsledky poloprovozního sledování. In *Prosperující olejniny 2008 (sborník konference s mezinárodní účastí)*, Praha: Česká zemědělská univerzita, 2008, s. 150-152, ISBN 978 – 80 -213 – 1860 - 1.
- STEER, B. T. – SEILER, G. J., 1990: Changes in fatty acid composition of sunflower (*Helianthus annuus L.*) seeds in response to time of nitrogen application, supply rates and defoliation. In *Journal Science Food Agriculture*, Vol. 51, pp. 11 – 26.
- ŠROJTOVÁ, G. 2006. Závislosť úrod slnečnice od poveternostných podmienok. In *Bioklimatológia a voda v krajine: Medzinárodná vedecká konferencia Bioklimatické pracovné dni*. Nitra : SPU, 2006, ISBN 80-89186-12-2.

Kontaktná adresa:

Ing. Alexandra Veverková., Katedra rastlinnej výroby FAPZ SPU Nitra, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, e-mail: alexandra.veverkova@uniag.sk; doc. Ing. Ivan Černý, PhD., Katedra rastlinnej výroby FAPZ SPU Nitra, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, e-mail: ivan.cerny@uniag.sk; prof. Ing. Vladimír Pačuta, PhD., Katedra rastlinnej výroby FAPZ SPU Nitra, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, e-mail: vladimir.pacuta@uniag.sk; Ing. Rastislav Bušo, PhD., Centrum výskumu rastlinnej výroby Piešťany, e-mail: buso@vurv.sk

TVORBA DIHAPLOIDOV PŠENICE LETNEJ F. OZIMNÁ DOUBLE HAPLOIDS PRODUCTION OF WINTER WHEAT

ALŽBETA ŽOFAJOVÁ, JOZEF GUBIŠ, MARCELA GUBIŠOVÁ, KATARÍNA BOJNANSKÁ, MICHAELA HAVRENTOVÁ

Centrum výskumu rastlinnej výroby Piešťany

Double haploid (DH) plants are useful in plant breeding programs. Androgenic response of 28 winter wheat populations originated from three different breeding programs was evaluated. In 21 populations androgenic process was induced, but only in 5 populations green plants were obtained. Low efficiency was caused by genotypic differences in responsibility to anther culture techniques and also lower quality of donor plants due to unfavorable weather conditions. More efficient method of DH plant production can be through wide crosses with maize. By this method regenerated green plants were obtained also in populations, which appeared as recalcitrant in androgenic culture.

Key words: double haploid, androgenesis, wheat x maize hybridization

ÚVOD

V klasickom šľachtení musí byť pestovaných a sledovaných niekoľko segregujúcich generácií, aby sa dosiahla určitá úroveň homozygotnosti, čo následne umožní selekciu na požadované znaky. Z tohto dôvodu je produkcia dihaploidných (DH) rastlín významná, nakoľko umožňuje šľachtiteľom získať homozygotné rastliny priamo z hybridných jedincov. Pri pšenici sú DH rastliny tvorené buď pomocou medzirodovej hybridizácie s kukuricou alebo indukciou androgenézy cez peľnicové alebo mikrospórové kultúry. Technika vzdialenej hybridizácie je rozpracovávaná ostatných 30 rokov a v súčasnosti je považovaná za doplnok ku konvenčným šľachtiteľským programom (Inagaki 2003). Androgenézou sa môže potenciálne produkovať veľké množstvo DH rastlín nakoľko v peľniciach je veľké množstvo mikrospór. Stále je nevyhnutné rozpracovávať túto techniku, keďže mnohé agronomicky významné odrody pšenice majú nízku alebo žiadnu odozvu na androgénnu indukciu (Soriano et al. 2008). Aktuálnosť výskumu dokumentujeme na prácach z ostatného obdobia. Redha a Suleman (2011) sledovali vplyv exogénnych polyamínov na peľnicové kultúry vybraných genotypov pšenice. Zistili, že aplikácia zvýšila produkciu embryu podobných štruktúr (ELS) a zelených rastlín, ale vplyvy putrescínu, spermidínu a sperminu boli závislé na genotype a na trvaní predošetrenia peľnic polyamínmi. Vplyv samotnej dehydratácie alebo v kombinácii s kolchicínom alebo prolínom na peľnicové alebo mikrospórové kultúry jarnej pšenice sledovali Redha a Islam (2010). V snahe zvýšiť regeneráciu zelených rastlín pri 3 genotypoch hexaploidnej pšenice, ktoré mali vysoký výskyt albinických rastlín v peľnicovej kultúre, Redha a Talaat (2008) hodnotili vplyv médií s prídavkom ficolu, kolchicínu alebo maltózy, jednotlivo alebo v kombináciách. Zistili, že použitím maltózy produkcia zelených rastlín bola vyššia pri všetkých genotypoch v porovnaní so sacharózou. Menej ELS bolo na 100 kultivovaných peľnic na všetkých médiách, ktoré obsahovali kolchicin, ale zistili vyššiu frekvenciu zelených rastlín. Podobne ako iní autori (Inagaki 2003, Žofajová et al. 2005 ai.) pozorovali genotypické diferencie v rezpozibilitate na techniku peľnicových kultúr, čo je všeobecne považované za jej nedostatok.

Cieľom výskumu bolo vytvoriť dihaploidy pšenice letnej f. ozimnej využijúc techniku peľnicových kultúr a medzirodovej hybridizácie s kukuricou.

MATERIÁL A METÓDY

Donorové rastliny sme pestovali vo vegetácii 2009/10 v poli a čiastočne v skleníku. Pri technike peľnicových kultúr sme využili postup podľa Pauk et al. (2003). Klasy (v priemere 15 na populáciu) sme zberali v strednom až neskorom jednojadrovom štádiu vývinu mikrospóry a predošetrili v chlade pri 4°C 7 až 14 dní. Ako indukčné médium sme použili modifikované P4, kultivácia peľnic bola pri 32°C 3 dni a následne 6-8 týždňov pri 28°C. Regenerácia bola na modifikovanom médiu 190-2, za svetla pri 25°C. Androgénnu rezpozibilitu sme vyjadrili počtom kalusov a embryoidov, počtom albinických a zelených rastlín, pričom všetky znaky sme prepočítali na 1 klas. Pri medzirodovom krížení pšenice s kukuricou vo vegetácii 2010/11 sme postupovali podľa Inagaki (2003). Po 2 až 3 dňoch po emaskulácii sme klasy opelili čerstvým peľom kukurice odrody Sundance. Pre zvýšenie tvorby semena sme 1 až 2 dni po opelení aplikovali roztok kyseliny giberelínovej (75 mg.l⁻¹, Tween 20). Po 14 dňoch sme embryá extirpovali a kultivovali na médiu B5, za tmy pri 22 ± 2°C dovtedy, kým koleoptyla dosiahla asi 1 cm. Následne sme rastliny pestovali za svetla (16 hodín) a neskôr po ukončení adaptácie na *in vivo* podmienky sme ich presadili do pôdy.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Pre tvorbu dihaploidných línií sme z troch šľachtiteľských programov (Malý Šariš, Viglaš-Pstruša, Solary) získali spolu 28 populácií pšenice letnej f. ozimná v rôznych generáciách (F2 až F4). Technikou peľnicových kultúr sa podarilo pri 21 populáciách indukovať proces androgenézy, pričom najnižšiu rezpozibilitu mali

populácie zo Solár (60 %), nasledovali populácie z Vígľaš-Pstruša (75 %) a najvyššiu rezpozibilitu mali populácie z Malého Šariša (85,7 %) (Tabuľka 1). V priemere na populáciu a 1 klas bolo vytvorených 0,77 kalusov a embryoidov, pričom variačné rozpätie bolo od 0,08 (PS 112) po 3,00 (MŠ 22). Z posledne uvedenej populácie sme získali aj najvyšší počet zelených rastlín na 1 klas a to 0,83. V priemere najvyšší počet kalusov a embryoidov na 1 klas mali populácie pochádzajúce z malého Šariša (1,47) a najnižší zo Solár (0,22). Viac ako pri polovici populácií (57,1 %) regenerovali kalusy a embryoidy do albinických rastlín. Iba pri piatich populáciách sme získali zelené rastliny. Pri populácii SO 24 z kalusov a embryoidov regenerovali len zelené rastliny, čo je pri procese androgenézy jav všeobecne žiaduci. Pomerne nízku efektivitu tvorby dihaploidov vo vegetácii 2009/10 pripisujeme okrem genotypickej diferencii v rezpozibilitate na techniku peľnicových kultúr tiež poveternostným podmienkam, podobne ako Pauk et al. (2003), a to konkrétne privalovým dažďom v čase zberu donorových rastlín, ktoré negatívne ovplyvnili ich kvalitu.

Okrem zistenia a spresnenia podmienok, ktoré riadia, kontrolujú a ovplyvňujú proces androgenézy, zvažujú sa tiež aj iné možnosti ako zvýšiť efektívnosť tejto metódy. Perspektívnym sa javí identifikácia rezpozívnych genotypov pomocou molekulárnych markerov a prípadne pomocou klasických šľachtiteľských metód introdukovať gény ovplyvňujúce rezpozibilitu (Redha & Talaat 2008).

Tabuľka 1: Indukcia a regenerácia rastlín z peľnicových kultúr populácií pšenice letnej f. ozimnej (2009/10)

Poradové číslo	Označenie populácií	Počet kalusov a embryoidov/1 klas	Počet albinických rastlín/1 klas	Počet zelených rastlín/1 klas
1	MŠ 17	1,25	0,33	–
2	MŠ 18	1,58	–	–
3	MŠ 22	3,00	0,25	0,83
4	MŠ 26	1,42	0,50	0,42
5	MŠ 32	0,75	0,33	–
6	MŠ 35	0,83	0,08	0,50
7	PS 5	0,17	0,16	–
8	PS 6	0,33	–	–
9	PS 18	1,42	–	–
10	PS 21	0,91	–	–
11	PS 48	0,25	0,08	–
12	PS 50	0,25	0,16	–
13	PS 52	0,66	–	–
14	PS 76	0,17	0,08	–
15	PS 111	0,42	0,16	0,08
16	PS 112	0,08	–	–
17	PS 159	1,00	–	–
18	PS 8	1,00	0,25	–
19	SO 24	0,25	–	0,58
20	SO 27	0,25	–	–
21	SO 28	0,17	0,16	–
\bar{x}		0,77	0,21	0,48

Vo vegetácii 2010/11 sme v 3 populáciách (Tabuľka 2), z ktorých 2 (SO 25, SO 26) sa v predchádzajúcej vegetácii javili ako nerepozibilné na techniku peľnicových kultúr, overovali možnosť tvorby dihaploidných línií pomocou medziodového kríženia pšenice s kukuricou. Aj keď medzi populáciami boli rozdiely v počte regenerovaných rastlín (od 1 do 16 rastlín), pozitívnym bol fakt eliminácie genotypických diferencii pri tejto metóde tvorby dihaploidov. To znamená, že z každej populácie sme získali zelené rastliny. Pri populácii SO 24 sme získali viacej zelených rastlín (9) pri vzdialenej hybridizácii v porovnaní s technikou peľnicových kultúr (2) (Tabuľka 1). V zhode s Inagaki (2003) môžeme uviesť, že dihaploidy vytvorené z hybridných populácií metódou medziodového kríženia môžu byť využité ako rekombinované inbredné línie s priaznivou uniformitou v šľachtiteľských výberoch.

Tabuľka 2: Efektívnosť tvorby haploidov pri krížení pšenice s kukuricou (2010/11)

Označenie populácií	Počet opelených klasov	Počet získaných embryí	Počet regenerovaných rastlín
SO 24	15	24	9
SO 25	20	20	16
SO 26	10	3	1
\bar{x}	15	15,7	8,7

Metóda vzdialenej hybridizácie si však vyžaduje, aby v čase kríženia bol dostupný živý peľ, to znamená, že kvitnutie pšenice a donora peľu (pšenice, prosa ai.) musí byť synchronizované. Využitie metódy je obmedzené na vegetačné obdobie a na miesta, kde rastú obe rastliny. Navyše bolo zistené, že podmienky prostredia, v ktorých rastú rastliny pšenice po opelení sú rozhodujúcimi pre tvorbu haploidov. Adekvátne metódy pre dlhodobé uchovanie peľu a pre pestovanie rastlín pšenice v kontrolovaných podmienkach bez potreby synchronizácie kvitnutia oboch rodičovských komponentov uviedli Inagaki et al. (1997).

ZÁVER

Medzirodová hybridizácia pšenice s kukuricou môže predstavovať efektívnejšiu metódu tvorby DH rastlín najmä pri odrodách (hybridných populáciách) pšenice, ktoré sú rekalcitrantné v androgénnej kultúre.

Podakovanie: 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“.

LITERATÚRA

- INAGAKI, M. N. – NAGAMINE, T. – MUJEEB-KAZI, A. 1997. Use of pollen storage and detached-tiller culture in wheat polyhaploid production through wide crosses. In *Cereal Research Communications*, vol. 25, 1997, no. 1, pp.448-459.
- INAGAKI, M. N. 2003. Double haploid production in wheat through wide hybridization. In *Double haploid production in crop plants*. Maluszynski et al.(Ed.) Kluwer academic publishers, Dordrecht, 2003, pp. 53-58 ISBN 1-4020-1544-5
- PAUK, J. – MIHÁLI, R. – PUOLIMATKA, H. 2003. Protocol of wheat (*Triticum aestivum* L.) anther culture. In *Double haploid production in crop plants*. Maluszynski et al.(Ed.) Kluwer academic publishers, Dordrecht, 2003, pp. 59-64 ISBN 1-4020-1544-5
- REDHA, A. – ISLAM, S. 2010. Effect of selected stress factors on androgenesis of wheat (*Triticum aestivum* L.). In *Kuwait Journal of Science and Engineering*, vol. 37, 2010, no. 1A, pp. 127–138.
- REDHA, A. – SULEMAN, P. 2011. Effects of exogenous application of polyamines on wheat anther cultures. In *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, vol. 105, 2011, pp. 345–353.
- REDHA, A. – TALAAT, A. 2008. Improvement of green plant regeneration by manipulation of anther culture induction medium of hexaploid wheat. In *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, vol. 92, 2008, pp. 141–146. DOI 10.1007/s11240-007-9315-3
- SORIANO, M. – CASTILLO, A. M. – CISTUÉ, L. 2008. Enhanced induction of microspore embryogenesis after n-butanol treatment in wheat (*Triticum aestivum* L.) anther culture. In *Plant Cell Reports*, vol. 27, 2008, pp. 805–811. DOI 10.1007/s00299-007-0500-y
- ŽOFAJOVÁ, A. – MASÁR, Š. – UŽÍK, M. 2005. Anther culture derived progeny of winter wheat with rye translocation. In *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, vol. 41, Special Issue, 2005, p. 218.

Adresa autorov:

Ing. Alžbeta Žofajová, Ing. Jozef Gubiš, PhD., Mgr. Marcela Gubišová, Ing. Katarína Bojnanská, RNDr. Michaela Havrlentová, PhD., Centrum výskumu rastlinnej výroby Piešťany, Bratislavská cesta 122, 921 68 Piešťany, E-mail: zofajova@vurv.sk

INDEX

Benediková, D.	63	Kizek, R.	119
Benková, M.	63, 65, 127	Klčová, L.	136
Bláha, L.	69	Klejduš, B.	119
Bojnanská, K.	72, 197	Klemová, Z.	188
Brázda, P.	46	Klempová, T.	122, 143
Brestič, M.	42, 158	Klemš, M.	175
Břusková, H.	172	Klíma, M.	69
Bušo, R.	75, 194	Kolenová, K.	63
		Kováčik, P.	19
Civáň, P.	52	Kraic, J.	122, 143
Čechová, J.	130	Krivosudská, E.	127
Černý, I.	75, 194	Křižanová, K.	72
Čertík, M.	122, 143	Krofta, K.	33, 152
Čičová, I.	63, 78, 82, 149	Kúdela, O.	25, 107
		Kudělková, M.	130
Dobroviczka, T.	85	Kudrna, T.	164
Dobrovolskaya, O.B.	56	Kyrdaliev, K.	152
Dubas, E.	88		
Dvončová, D.	19	Latečková, M.	133
		Leišová-Svobodová, L.	136
Faragó, J.	33, 90, 93, 152	Libantová, J.	8, 88
Faragová, N.	90, 93	Libiaková, G.	133
Ferencová, J.	99, 127	Luhová, L.	146
Filová, A.	99		
		Maksymowicz, A.	88
Gajdošová, A.	133	Martinek, P.	13, 56, 179
Gavurníková, S.	105	Marzoev, A.	152
Glasa, M.	107, 110	Marzoeva, A.	152
Golovatiuk, Y.	8	Mařík, P.	136
Gregová, E.	22, 105	Matušíková, I.	8, 85, 88
Griga, M.	49	Matušinský, P.	136
Gubiš, J.	72, 136, 197	Matúšková, K.	39, 139
Gubišová, M.	122, 136, 143, 197	Mendel, L.	63, 65, 78
		Mészáros, P.	8
Hanáček, P.	49, 172	Mihalčík, P.	93
Hanková, A.	39, 139	Mihálik, D.	116, 122, 143
Hartmann, J.	166	Michalcová, M.	27
Hauptvogel, P.	27, 52, 65, 161	Minaříková, V.	136
Hauptvogel, R.	63	Mistříková, V.	8
Havel, L.	13, 175, 186	Moravčíková, J.	8, 88, 133
Havrlentová, M.	169, 197	Moricová, P.	146
Henychová, A.	30, 152, 164	Múdry, P.	149
Hermuth, J.	113	Mursaliev, M.	152
Horáček, J.	49	Musilová, M.	13, 186
Hozlár, P.	19	Navrátil, M.	46, 49
Hricová, A.	149	Navrátilová, B.	146
Hudcovicová, M.	116, 136, 161	Nesvadba, V.	30, 33, 152, 164
Hudecová, V.	99	Nogová, L.	143
Hunková, E.	155, 158		
Húska, D.	119	Olšovská, K.	155, 158
		Ondreičková, K.	122, 143, 161
Chabinová, J.	119	Ondřej, V.	146
Chalányová, M.	149		
		Pačuta, V.	75, 194
Ivaničová, Z.	52	Pastirčák, M.	72, 82
		Petřivalský, M.	146
Janovská, D.	113	Piliarová, M.	169
		Piršelová, B.	8, 85

Pokorný, R.	49
Pokorova, P.	56
Polončíková, Z.	30, 152, 164
Predajňa, L.	107, 110
Prohasková, A.	113
Procházka, S.	172
Psota, V.	166
Pšenáková, I.	33, 90, 152, 169
Reinöhl, V.	49, 172
Roháčik, T.	72
Rohrer, M.	172
Rückschloss, E.	39, 139, 169
Sachambula, L.	166
Sasková, H.	130
Smýkal, P.	49
Spieß, A.	8
Spitzerová, D.	188
Stehno, Z.	113
Svobodová, I.	179
Sytar, O.	42, 99
Šafařová, D.	46, 49
Šliková, S.	22, 105, 116, 183
Štěpán, Z.	175
Šubr, Z.	107
Šudyová, V.	116, 183
Švábová, L.	49
Švec, M.	27, 52, 155
Taran, N.	8
Trojan, V.	13, 186
Tvarůžek, L.	136
Ůrgeová, E.	90
Vajciková, V.	25
Valčuhová, D.	39, 139
Vaňová, M.	56, 188
Věchet, L.	179
Vejsadová, H.	191
Veverková, A.	75, 194
Vyhnánek, T.	13, 186
Vyvadilová, M.	69
Zajacová, V.	166
Zítka, O.	119, 175
Zmeškalová, J.	90
Žur, I.	88
Živčák, M.	155, 158
Žofajová, A.	72, 169, 197

Názov: **Nové poznatky z genetiky a šľachtenia poľnohospodárskych rastlín.
Zborník z 18. medzinárodnej vedeckej konferencie.**

Editor: Valéria Šudyová

Recenzenti/typografia/technická úprava: prof. RNDr. Zdenka Gálová, CSc., SPU Nitra
Jarmila Poništová

Vydanie: prvé

Vydavateľ: Centrum výskumu rastlinnej výroby Piešťany
Bratislavská cesta 122, 921 68 Piešťany

Rok vydania: 2011

Počet strán: 199 strán

Tlač: CVRV Piešťany

Formát: A4

Náklad: 25 ks

Nepredajné/Určené pre vlastnú potrebu.

ISBN 978-80-89417-29-2