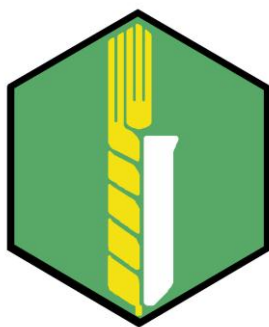


Rada genetických zdrojů rostlin

Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i. Praha - Ruzyně



Genetické zdroje rostlin v ČR po 20 letech existence Národního programu



VÚRV, v.v.i. Praha, 2014

Vydal: Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i. Praha 6 - Ruzyně

Druh publikace: Sborník referátů

Autor: Kolektiv autorů

Editor: Ludmila Papoušková

Tisk: Power Print, Praha 6

Náklad: 200 kusů

Publikace neprošla jazykovou úpravou

Publikace vznikla za podpory Národního programu MZe č.j. 206553/2011-MZe-17253 a
Výzkumného záměru MZe ČR 0002700604

ISBN 978-80-7427-152-6

Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i. Praha – Ruzyně
Rada genetických zdrojů rostlin



Sborník referátů ze semináře

Genetické zdroje rostlin v ČR po 20 letech existence Národního programu

pořádaného

4. prosince 2013
Šlechtitelskou stanicí vinařskou Znojmo a.s.
ve Znojmě

AMPELOS

© Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i. Praha - Ruzyně
„Genetické zdroje č.102“, VÚRV, v.v.i. Praha 2014
Editor: Ludmila Papoušková

ISBN 978-80-7427-152-6

Obsah:

Domkářová J., Horáčková V.: Genetické zdroje bramboru ve VÚB Havlíčkův Brod.....	1
Dotlačil L., Holubec V., Papoušková L.: Genetické zdroje rostlin v ČR – historie a současnost.....	10
Dvořáček V., Bradová J., Prohasková A., Štočková L., Papoušková L.: Perspektivní metody pro hodnocení kvality genetických zdrojů pšenice seté v Genové bance Praha.....	20
Hermuth J., Janovská D., Ust'ak S.: Genofond široku obecného <i>Sorghum bicolor</i> (L.) Moench a možnosti jeho využití v podmínkách ČR.....	30
Holubec V., Smekalova T.: Výsledky expedice na Kamčatku 2013: výzkum genetických zdrojů zimolezu <i>Lonicera kamtschatica</i> Turcz.....	37
Holubec V., Vymyslický T., Poverene M., Cantamutto M.: Výsledky expedice do Argentiny 2013: výzkum planých genetických zdrojů a introgrese z kulturních druhů.....	45
Pavelek M.: Genofondová kolekce lnu (<i>Linum usitatissimum</i> L.) – cesta od klasických deskriptorů k molekulárním markerům a moderním metodám hodnocení.....	50
Pelikán J., Knotová D., Semanová I., Vymyslický T.: Šedesát let studia genetických zdrojů v Troubsku.....	64
Tomášek J.: Problematika genofondů révy vinné	72
Zámečník J., Faltus M., Bilavčík A.: Deset let provozu kryobanky vegetativně množených rostlin – zkušenosti a perspektivy	75

GENETICKÉ ZDROJE BRAMBORU VE VÚB HAVLÍČKŮV BROD

Potato genetic resources in PRI Havlíčkův Brod

Domkářová J., Horáčková V.

Výzkumný ústav bramborářský Havlíčkův Brod, s.r.o.

Abstrakt

Činností spojenou s konzervací a využíváním genetických zdrojů bramboru v ČR byl v rámci Národního programu pověřen VÚB Havlíčkův Brod. Práce s genofondy bramboru má ve VÚB dlouholetou tradici probíhá bez přerušení od roku 1952. Postupně došlo k přechodu od polního vedení kolekcí k udržování a množení v laboratorních podmínkách pomocí tkáňové kultury *in vitro*. V kolekci bylo do roku 2013 shromážděno 2 454 genetických zdrojů. Jsou dostupné pro výzkum, šlechtění a vzdělávání a poskytují se především praktickým šlechtitelům, výzkumným pracovištím, univerzitám, muzeím, botanickým zahradám v celé ČR. Vzorky jsou poskytovány i řadě zahraničních uživatelů. V letech 1994 až 2013 bylo uživatelům poskytnuto celkem 5432 vzorků. Informace o genetických zdrojích bramboru jsou součástí databáze genetických zdrojů udržovaných v ČR.

Klíčová slova: genetické zdroje, brambor, *in vitro*, *Solanum* spp.

Abstract

In the framework of the National Program PRI Havlíčkův Brod was authorized for the activity associated with potato genetic resource conservation and use in the Czech Republic. Working with potato gene pools has had a long-year tradition in PRI; it has been done without interruption since 1952. Gradually, there was a shift from management of field collections to conservation and propagation under laboratory conditions using *in vitro* tissue cultures. By 2013, the collection comprised 2 454 genetic resources. They are accessible to research, breeding and education and are especially supplied to practical breeders, research institutions, universities, museums and botanical gardens across the Czech Republic. The accessions are also provided to foreign users. Between 1994 and 2013 in total 5432 accessions were supplied to the users. Data about potato genetic resources are involved in the database of genetic resources maintained in the Czech Republic.

Key words: genetic resources, potato, *in vitro*, *Solanum* spp.

Úvod

Genetické zdroje bramboru jsou unikátním a nenahraditelným zdrojem genů a genových komplexů pro další genetické zlepšování biologického a hospodářského potenciálu nových odrůd bramboru.

Sbírka kulturních druhů bramboru a primitivních odrůd je soustředěna v Mezinárodním centru pro brambory (CIP) v Limě v Peru (Huaman et al., 2000). Vzorky představují širokou morfologickou diverzitu a maximální geografické zastoupení a jsou cenné pro budoucí šlechtění v Jižní Americe i ve světě. Tato kolekce je uchovávána klonovým množením na poli a v kultuře *in vitro*.

Cílem řady expedic byl sběr planých hlízotvorných druhů rodu *Solanum*, které jsou rozšířené od jihozápadu USA po střední Argentinu a sousední Chile (Hawkes, 1990). Jsou obrovským zdrojem pro šlechtění bramboru, vzhledem k širokému zeměpisnému rozšíření a velkému rozpětí ekologické adaptace. Vzorky fertilních planých druhů jsou udržovány formou pravých semenných populací.

Sběrové expedice vedly k založení řady kolekcí genetických zdrojů ve světě. Nejrozsáhlejší světová sbírka bramboru je uchovávána v CIP v Limě (Peru). Další hlavní

kolekce genetických zdrojů jsou Kolekce bramboru Spojeného království (CPC, Dundee, Skotsko), Holandsko-německá kolekce bramboru (CGN, Wageningen, Nizozemí), Kolekce bramboru Gross Lüsewitz (GLKS, IPK, Gross Lüsewitz, Německo), Kolekce bramboru Institutu Vavilova (VIR, St. Petersburg, Rusko), Genová banka bramboru USA (NRSP-6, Sturgeon Bay, USA) a kolekce bramboru v Argentině, Bolívii, Chile, Kolumbii a Peru. Uvedené kolekce tvoří spolu Asociaci pro spolupráci genových bank bramboru, která založila Databázi intergenové banky bramboru (IPD), kde je možné získat údaje z hodnocení planých druhů v 55 znacích, jako např. sušina, škrob, redukující cukry a glykoalkaloidy a rezistence vůči houbám, bakteriím, virům, viroidům, hmyzu a environmentálním stresům, např. mrazu, horku a suchu.

Veškerou činností spojenou s konzervací a využíváním genetických zdrojů bramboru v ČR byl v rámci Národního programu pověřen VÚB. Pracoviště zabezpečuje shromažďování, základní hodnocení, dokumentaci, poskytování, regeneraci a dlouhodobé udržování kolekcí bramboru. Práce s genofondy bramboru má na tomto pracovišti dlouholetou tradici, neboť probíhá bez přerušení od roku 1952.

Při uchovávání kolekce bramboru v polní genové bance docházelo v důsledku přirozeného infekčního tlaku virových chorob k výraznému zhoršování zdravotního stavu a vysokému riziku úplné ztráty vzorků. Velký přelom v činnosti genové banky bramboru nastal s rozvojem rostlinných explantátových technik, které umožnily přejít od polního vedení kolekcí k udržování a množení v laboratorních podmínkách pomocí tkáňové kultury *in vitro*. Po roce 1985 byly veškeré shromážděné vzorky postupně převáděny do sterilního prostředí a polní vedení kolekcí bylo plně nahrazeno udržováním a množením v laboratorních podmínkách pomocí tkáňové kultury (Horácková a Domkářová, 2003).

Kultura *in vitro* významně rozšířila možnosti využívání genetických zdrojů, vytvořily se podmínky pro aktivní ozdravování od virové infekce, včetně detekce virů a podstatně se usnadnila mezinárodní výměna vzorků.

Materiál a metody

Konzervace genetických zdrojů bramboru založená na dlouhodobé kultivaci *in vitro* (Tab. 1) umožňuje časově prakticky neomezené skladování širokého spektra vzorků s minimálními nároky na skladovací prostory a s možností namnožení identických jedinců kdykoliv během roku. Postup dlouhodobé kultivace je založen na ovlivnění základních růstových a vývojových podmínek působením faktorů stresové povahy, které vedou ke zpomalení růstu a stimulují tuberizaci *in vitro*. Účinným impulzem tuberizace je úprava složení živného média, použitím zvýšené dávky sacharózy a retardantu růstu Alaru 85. Na zpomalení růstu působí změny ve fyzikálních podmínkách během kultivačního procesu, a to nižší teplota, zkrácená fotoperioda a snížená intenzita osvětlení.

Využíváno je živné médium MS (Murashige and Skoog, 1962) s agarem, bez růstových regulátorů, ve třech modifikacích. V prvním případě je základní MS médium doplněno zvýšenou dávkou sacharózy (6 %), která působí jako osmotikum a energetický zdroj, který pozitivně ovlivňuje tuberizaci *in vitro*. Ve druhém případě je zvýšený obsah sacharózy kombinován s růstovým retardantem Alar 85 (dimetylhydrazid kyseliny jantarové) v dávce 5 mg/l, působícím na prodloužení periody růstu před nasazením mikrohlízek a na stimulaci jejich tvorby. Ve třetím médiu je základní obsah sacharózy (3 %) doplněn zvýšenou dávkou Alaru 85 (30 mg/l).

Do Genové banky jsou ukládány vyvíjející se rostliny a jejich další kultivace probíhá v chladových podmínkách při snížené, ale vitální teplotě (10° C), při krátké délce světelného dne (10 h) a při nižší intenzitě osvětlení (40 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), což pozitivně ovlivňuje diferenciaci rostlinných orgánů.

Tab. 1 Schéma dlouhodobé kultivace *in vitro*

Kultivační fáze	Kultivační režim	Stav kultury	Délka kultivační fáze
1.	20 °C fotoperioda 16 hod. světlo, 8 hod. tma	regenerující řízky	2 týdny
2.	10 °C fotoperioda 10 hod. světlo, 14 hod. tma	rostliny nasazující mikrohlízky	4 - 6 měsíců
3.	10 °C fotoperioda 10 hod. světlo, 14 hod. tma	zasychající stonek dormantní mikrohlízky	4 - 5 měsíců
4.	10 °C fotoperioda 10 hod. světlo, 14 hod. tma	rašící mikrohlízky, mikrohlízky s výhonem, zbytky stonků schopným řízkováním	6 - 7 měsíců
Celková délka cyklu:			14 - 18 měsíců

Regenerační pasáž na nová média je prováděna po 14 – 18 měsících pomocí rašících mikrohlízek po periodě dormance, nebo přežívajících segmentů stonku, případně zelených zbytků původních rostlin. Prvním krokem regenerace vzorků je jedna až dvě subkultivace na základním médiu, pak opětovná pasáž na média pro dlouhodobou kultivaci *in vitro* a cyklus se opakuje (Horáčková a Domkářová, 2004). V závislosti na udržovaném materiálu se může projevit jistá variabilita růstové reakce, a to jak kladná, tak záporná. Proto je nutná průběžná kontrola a v případě potřeby i dřívější regenerační pasáž.

U vzorků s prokázaným výskytem běžných virů bramboru je uplatněna aktivní eliminace virové infekce v kultuře *in vitro*. Využívány jsou dva postupy, a to kombinovaná metoda odběru vrcholových explantátů po termoterapii *in vitro*, nebo technika založená na aplikaci chemických látek, které potlačují množení a transport virů v rostlině. V případě prvního postupu jsou rostliny *in vitro* ovlivňovány vyšší teplotou (37° C po dobu 6 týdnů) a následně odebírány primární meristémy. Postup je vhodný zejména v případě eliminace viru A bramboru (PVA), viru Y (PVY) a viru svinutky bramboru (PLRV). Chemoterapie *in vitro* za využití virostatického preparátu Ribavirin (syntetický ribosid na bázi purinu) se nejlépe osvědčila při odstraňování viru X bramboru (PVX), viru M bramboru (PVM) a především viru S bramboru (PVS) (Horáčková, 1998; Horáčková et al., 2010).

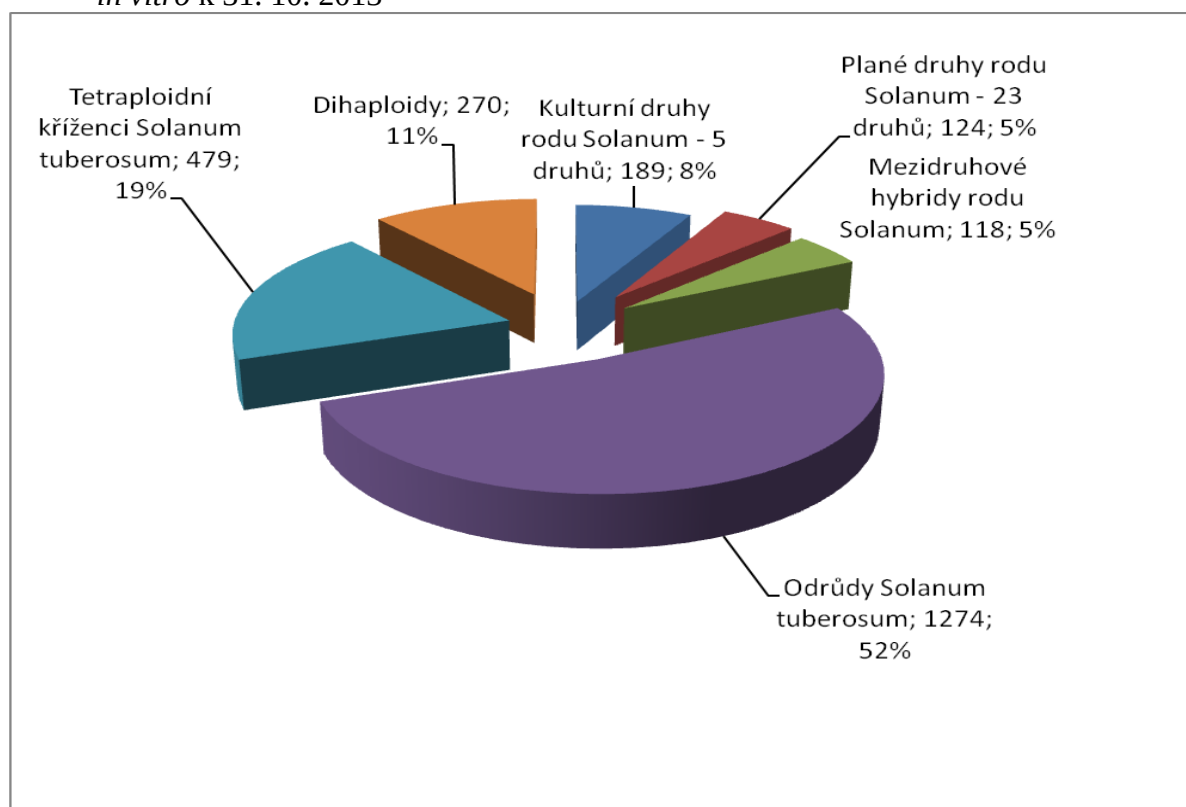
Úspěšnost eliminace virové infekce se, jak při sériové diagnóze z rostlin, tak v experimentální práci, hodnotí pomocí sérologické imunoenzymatické metody ELISA a to základního postupu ELISA označovaného DAS (dvojitý protilátkový sendvič). Postup vychází z původní obecné metody vypracované Clarkem a Adamsem (1976). Jejím využitím pro testování virů bramboru u nás rozpracoval do podoby sériové diagnózy Dědič (1985; 1987), včetně vlastních modifikací (Dědič, 1988; Dědič, 1989; Dědič et al., 1999). Používány jsou komerčně dostupné, polyklonální protilátky (diagnostické soupravy). Zásadním požadavkem je jejich širokospektrální reaktivita s co nejrozsáhlejším izolátovým spektrem příslušného viru. Testování ELISA v tkáňové kultuře a v celém procesu eliminace virové infekce vyžaduje specifický přístup a erudici hodnotitele.

Při vkládání genetického zdroje do Genové banky bramboru je povinně vyplněna karta s pasportními údaji a novému zdroji je přiděleno evidenční číslo národní v databázi EVIGEZ. Další informace o genetickém zdroji obsahuje popisná část, ve které jsou zpracovány údaje získané při hodnocení genetického zdroje vysazeného v polní studijní kolekci. Jedná se o víceleté hodnocení komplexu hospodářsky a šlechtitelsky důležitých znaků a vlastností, které jsou popisovány během vegetace a při mechanických a kvalitativních rozborech hlíz. Jsou prováděny pomocí „Klasifikátoru pro genus *Solanum* L.“ (Vidner et al., 1987) a podle schválených metodik. S využitím devítibodové bonitační stupnice je hodnoceno 44 morfologických a 12 hospodářských znaků a vlastností a popsána je úroveň odolnosti proti 12 chorobám a škůdcům.

Výsledky a diskuze

V kolekci rodu *Solanum* udržované ve VÚB bylo do roku 2013 shromážděno 2 454 genetických zdrojů bramboru (Graf 1). V současné době je 97,6 % kolekce udržováno v bezvirovém stavu a dále se rozšiřuje pouze o zdravé, případně ozdravené vzorky. Velká pozornost je v Genové bance věnována zachování genetické rozmanitosti genotypů bramboru vytvořených na území našeho státu, ty tvoří cca 30 % kolekce.

Graf 1 Podíl jednotlivých dlouhodobě udržovaných kategorií v Genové bance bramboru *in vitro* k 31. 10. 2013



Kolekce je rozdělena podle charakteru udržovaného materiálu na šest dílčích kolekcí.

a) **Odrůdy *Solanum tuberosum*** – kolekce 1 274 odrůd, vyšlechtěných ve 35 státech světa. Součástí je sbírka 141 originálních odrůd domácího šlechtění, což je téměř 90 % ze všech dosud u nás vyšlechtěných a povolených odrůd. Ze zaregistrovaných odrůd v rozmezí let 1927 až 1945 je v genové bance 15 odrůd, navazující šlechtění od roku 1946 až do

současné doby je, až na 5 odrůd, kompletní. Celá kolekce odrůd domácího šlechtění prošla rozsáhlým ozdravováním od virové infekce a je plně viruprostá.

b) **Tetraploidní kříženci** - soubor 479 genotypů jak zahraničního původu (CIP, Peru), tak genotypů získaných zejména při výzkumném řešení problematiky rezistentního šlechtění ve VÚB a rovněž materiály z praktického novošlechtění.

c) **Dihaploidy** - sbírka 270 indukovaných primárních a sekundárních dihaploidů, mezidruhových hybridů a regenerantů z pylových embryí. Tyto materiály byly z velké části vyprodukovány v geneticko - šlechtitelském výzkumu VÚB, nebo byly získány vzájemnou výměnou s výzkumnými pracovišti v Německu a Polsku.

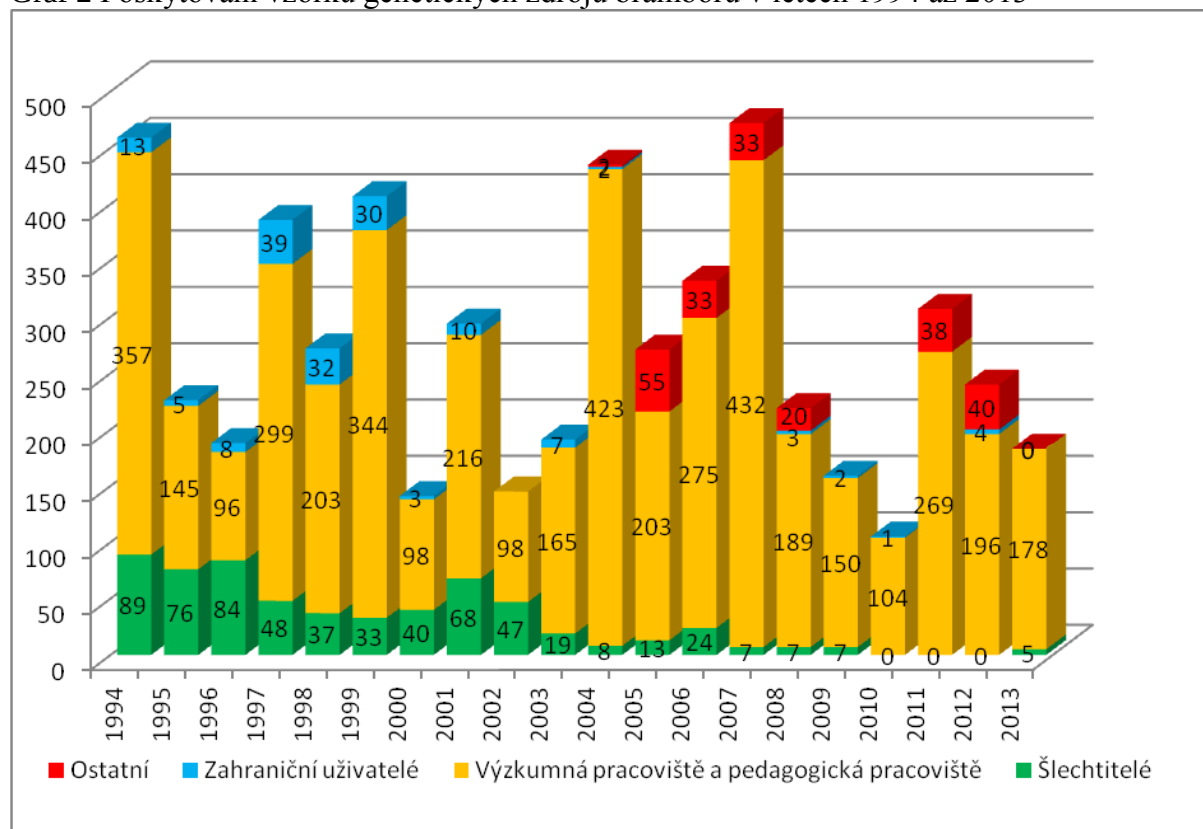
d) **Kulturní druhy rodu *Solanum*** – soubor populací 5 hlízotvorných, primitivních kulturních druhů bramboru s různou úrovní ploidie. Udržované kulturní druhy byly získány ze zahraničních genových bank ve formě *in vitro* rostlin nebo jako semenné populace.

e) **Plané druhy rodu *Solanum*** - soubor populací 23 planých druhů bramboru. Materiály byly získány ze světových kolekcí genetických zdrojů bramboru ve formě semenných vzorků. Plané druhy jako zdroj široké genetické diverzity jsou poskytovány jako experimentální materiály pro řešení výzkumných projektů na řadě pracovišť.

f) **Mezidruhové hybridy** - shromážděný materiál (118 položek) tvoří zejména hybridy s geny horizontální rezistence proti plísni bramboru získaného z CIP Peru ve formě semenných populací.

V letech 1994 až 2013 bylo uživatelům poskytnuto celkem 5432 vzorků (Graf 2). Nejvíce Genovou banku využívají výzkumná a univerzitní pracoviště - 4440 vzorků a dále praktičtí šlechtitelé bramboru – 612 vzorků. Vzorky jsou rovněž předávány na tematicky zaměřené výstavy a do muzejních expozic - 221 vzorků. Zájemci ze zahraničí si vyžádali – 159 vzorků.

Graf 2 Poskytování vzorků genetických zdrojů bramboru v letech 1994 až 2013



V posledních letech dochází k intenzivnějšímu využívání planých druhů bramboru uchovávaných v Genové bance *in vitro* a to jak v rámci účelového, tak i institucionálního financování rozvoje VÚB. Požadavky na zvýšení rezistencí, na změny technologických vlastností či zlepšení odolnosti při skladování vedou šlechtitele k hledání nových genetických zdrojů zmíněných vlastností. Vzhledem k poměrně jednostranné prošlechtěnosti kulturního druhu bramboru *Solanum tuberosum* bylo třeba obrátit pozornost k příbuzným, zpravidla planým druhům bramboru, kde lze předpokládat nalezení zdrojů požadovaných vlastností. Dosud byl využíván ve šlechtění moderních odrůd relativně malý okruh planých druhů, jednalo se především o druhy *S. demissum* (zdroj rezistence vůči plísni bramboru a vůči viru PLRV), *S. acaule* (PVX, PLRV, PSTV, rakovina brambor, háďátka bramborové, mrazuvzdornost), *S. chacoense* (PVA, PVY, plíseň bramboru, mandelinka), *S. spegazzinii* (fuzáriová hniloba, rakovina bramboru, háďátka bramborové), *S. stoloniferum* (PVA, PVY) a *S. vernei* (háďátka bramborové). Příležitostně byly využity i druhy *S. microdontum*, *S. sparsipilum*, *S. verrucosum*, *S. phureja*, *S. tuberosum* subsp. *andigena*, *S. commersonii* a *S. maglia*.

Plané druhy byly využity v projektech NAZV QF 4108 „Využití techniky fúze protoplastů ve šlechtění hospodářsky významných plodin rodu *Brassica*, *Cucumis* a *Solanum*“ a QF 4107 „Tvorba výchozích šlechtitelských materiálů s geny horizontální rezistence k plísni bramborové“, oba projekty byly koordinovány VÚB. Při řešení se uplatnily především plané druhy *S. verrucosum*, *S. pinnatisectum* a *S. bulbocastanum*. Materiály získané jak pomocí fúze protoplastů, tak mezidruhovou hybridizací byly předány do genové banky k uchování a v současné době jsou využívány k řešení výzkumných náplní financovaných z institucionálních prostředků na rozvoj VÚB. Vybrané materiály jsou hodnoceny a připravovány pro řešení návazných projektů.

Mezidruhová hybridizace je náročný postup, který je ovlivňován řadou faktorů, jako jsou ročník, intenzita kvetení, fertilita pylu, tvorba neredukovaných gamet, vzájemná nekřížitelnost (inkompabilita) a další. Zvýšení účinnosti tvorby mezidruhových hybridů klasickými postupy je velmi obtížné a proto každý touto cestou získaný mezidruhový hybrid s prověřenými vlastnostmi je možno považovat za velmi cenný genetický zdroj využitelný v dalším šlechtění. Stejně tak jako materiály vzniklé fúzí protoplastů. Certifikované metodické postupy vzniklé v rámci těchto projektů „Metodika mitotické polyplidizace *in vitro* (u rodu *Solanum*)“ a „Metodika fúze protoplastů elektrickým polem (u rodu *Solanum*)“ jsou uživatelům dostupné na www.vubhb.cz.

Genová banka je zdrojem pokusného materiálu pro aktuálně probíhající řešení projektu NAZV (koordinátor JÚ České Budějovice) pod názvem „Hodnocení potenciálu proteinů planých genotypů brambor pro využití ve šlechtění bramboru (*Solanum tuberosum* L.) a v biotechnologiích“. Cílem řešení je zmapování genotypové variability hlízových proteinů genových zdrojů planých druhů (Solanaceae), které jsou v genové bance k dispozici, jako rozhodujícího faktoru pro následné využití těchto genových zdrojů při šlechtění a tvorbě genotypů se zvýšeným obsahem hlízových proteinů se specifickými vlastnostmi. Charakteristika obsahu, struktury a vlastností vybraných proteinů v hlízách planých genotypů brambor dává předpoklad nalezení nových hlízových proteinů či specifických vlastností, které nebyly u kulturního druhu popsány a které jsou využitelné v řadě biotechnologických aplikací a šlechtitelských programech. Ve VÚB je zajišťováno namnožení rostlin *in vitro* vybraných položek z genové banky, a to 23 planých druhů, 5 kulturních druhů a jejich klonů a 5 kontrolních odrůd. Proveden je převod do podmínek *in vivo* a dopěstování ve skleníku, ve vegetačních nádobách do rostlin poskytujících dostatečné množství hlíz pro následné analýzy. Výzkum vlastností proteinů představuje nový trend ve využití rostlinné produkce a řešení

projektu zajišťuje konkurenceschopnost s ostatními státy EU, kde výzkum v této oblasti probíhá a částečně jsou již připraveny šlechtitelské programy na zvýšení obsahu proteinů v hlízách kulturního bramboru.

Vybrané genotypy náležející k 16 diploidním a tetraploidním druhům rodu *Solanum* byly z Genové banky bramboru poskytnuty pro řešení probíhající v rámci výzkumného záměru MSM 6046070901 „Setrvalé zemědělství, kvalita zemědělské produkce, krajinné a přírodní zdroje“ (koordinátor ČZU Praha). Pokusné materiály byly použity ke studiu vnitrodruhové a mezidruhové variability nekódujících oblastí mitochondriální DNA.

Kolekce *Solanum tuberosum* byla zdrojem odrůd s rozdílnou hladinou rezistence k obecné strupovitosti, které byly využity při řešení projektu MŠMT 2B 06188 „Zvýšení kvality konzumních brambor a jejich konkurenceschopnosti redukcí výskytu fytopatogenních bakterií rodu *Streptomyces*“ (koordinátor VÚRV, v.v.i., Praha). Rostliny z Genové banky namnožené v tkáňové kultuře byly použity k rozpracování metodického postupu stanovení agresivity izolátů fytopatogenních streptomyces umělou infekcí rostlin *in vitro* suspenzí testovaných izolátů. Test agresivity je součástí uplatněné certifikované metodiky (Pánková et al., 2011).

Za účelem ověřování možností dalšího rozšíření odrůd pro speciální užití, které se vyznačují specifickými kulinárními vlastnostmi, nebo zdraví prospěšnými účinky byl z Genové banky bramboru poskytnut soubor vybraných genotypů pro řešení dvou projektů NAZV. Vytvořena byla pracovní kolekce odrůd, která slouží jako výchozí materiál k pasážování *in vitro*, za účelem každoroční produkce bezvirové egalizované sadby pro založení polních pokusů na více lokalitách. Hodnoceny jsou obsahové látky v hlízách z konvenčních, tak ekologicky vedených pokusů, s cílem zjistit vliv genotypu a způsobu pěstování. Pracovní kolekce slouží rovněž k přípravě materiálu pro laboratorní provokační testy odolnosti k plísni bramboru na rostlinách v kultuře *in vitro*. Na polních neošetřených parcelách je hodnocena odolnost plísni v podmínkách přirozeného infekčního tlaku. Řešení probíhá v rámci projektů NAZV QH 92110 „Využití brambor s barevnou dužninou jako alternativní plodiny se specifickou potravinářskou kvalitou“ (koordinátor ČZU Praha) a NAZV QI 101A184 „Technologie pěstování brambor – nové postupy šetrné k životnímu prostředí (koordinátor VÚB, s.r.o. Havlíčkův Brod).

V Genové bance je uložena řada genotypů se známou úrovní odolnosti k plísni bramboru (*Phytophthora infestans* Mont. de Bary). Tyto zdroje byly použity jako pokusný materiál při rozpracování biologického testu *in vitro* pro účely selekce náchylných materiálů vůči plísni bramboru. Řešení probíhalo v rámci projektu NAZV QF4107 - Vývoj metod identifikace a charakterizace donorů rezistence plísně bramborové v genofondu bramboru pomocí DNA markerů a biologického testu v *in vitro* podmínkách. Metodický postup selekce je založen na umělé infekci rostlin *in vitro* sporovou suspenzí původce plísně bramboru (*Phytophthora infestans* Mont. de Bary) a byl zpracován formou recenzované metodiky v řadě "Praktické informace" Výzkumného ústavu bramborářského. Na spoluřešitelském pracovišti z ČZU byla v rámci tohoto projektu zpracována „Metodika postupu charakterizace genetických zdrojů pro účely markery asistované selekce v procesu šlechtění bramboru“.

V rámci výzkumného záměru VÚB MSM6010980701 „Molekulární a technologické základy produkce kvalitních brambor“ byla vytvořena certifikována Metodika detekce genů rezistence vůči *Globodera rostochiensis* a *Synchytrium endobioticum* v procesu šlechtění bramboru *Solanum tuberosum* pomocí DNA markerů. Pro experimenty byly vybrány z genové banky početné velké soubory, především z kolekce odrůd bramboru, na základě uváděných popisů fenotypových projevů obou chorob.

Součástí Genové banky je rovněž kolekce 141 odrůd vyšlechtěných v České republice v letech 1932 – 2013. Vzhledem k tomu, že se jedná o velmi cenný materiál, je jeho bezpečné zachování jištěno uložením v kryobance bramboru, která byla vytvořena ve VÚRV Praha –

Ruzyně v rámci projektu NAZV QD 3039 „Založení kryobanky pro konzervaci vegetativních vrcholů bramboru a chmele“. Nejstarší české odrůdy jsou rovněž duplicitně uloženy v podmínkách *in vitro* ve VŠÚZ Velká Lomnice SK, jako reciproční spolupráce obou genových bank.

Závěr

Materiály v Genové bance představují zdroj řady donorů významných hospodářských vlastností, rezistencí proti chorobám a škůdcům a biotickým a abiotickým stresům. Jsou dostupné pro výzkum, šlechtění a vzdělávání a poskytují se především praktickým šlechtitelům, výzkumným pracovištím, univerzitám, muzeím, botanickým zahradám v celé ČR. Vzorky jsou poskytovány i řadě zahraničních uživatelů. Informace o genetických zdrojích bramboru jsou součástí databáze genetických zdrojů udržovaných v ČR.

Dedikace

Článek byl zpracován s podporou Národního programu konzervace a využívání genetických zdrojů rostlin, zvířat a mikroorganismů významných pro výživu a zemědělství Č.j. 206553/2011-MZE-17253 Podprogram 1: Národní program konzervace a využívání genetických zdrojů rostlin a agro-biodiversity. Kolekce: Brambor

Použitá literatura

- Clark, MF., Adams, AN., 1977: Characteristic of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. J. Gen. Virol., 34, 475-483.
- Dědič, P., 1985: Využití testu ELISA při sériové diagnóze virů ve šlechtění brambor. Sbor. Moderní metody imunoanal. CSVTS Praha, 27 – 41.
- Dědič, P., 1987: Racionalizace sériové ELISA diagnózy virů bramboru. Sbor.VŠÚB ČSVTS Havlíčkův Brod, 34 – 49.
- Dědič, P., 1988a: Diagnóza viru M bramboru [PVM] přímým a nepřímým postupem ELISA. Rostl.Výroba, 34, 1051 - 1060.
- Dědič, P., 1989: Detection of potato viruses X, M, S, A, Y and Leafroll by ELISA with artificial polyvalent antibodies. Plant Virol., Proc. X. conf. Cz.plant virol.Praha, 61 - 62.
- Dědič, P., Ptáček, J., Filigarová, M., Čerovská, M., 1999: Současná imunologická diagnóza viru S bramboru (PVS). Vědecké práce VÚB, 13, 17 – 25.
- Hawkes, J. G., 1990: The Potato, Evolution, Biodiversity and Genetic Resources. Belhaven Press, London.
- Horáčková, V., 1998: Eliminace viru S bramboru chemoterapií *in vitro* za použití ribavirinu. Rostlinná výroba, 44, (12): 539 – 544.
- Horáčková, V., Domkářová, J., 2003: Biologický potenciál genofondu bramboru udržovaného v genové bance *in vitro*. Vědecké práce - Výzkumný ústav bramborářský Havlíčkův Brod, 14, 87-101.
- Horáčková, V., Domkářová, J., 2004: Konzervace a využití genetických zdrojů bramboru. Úroda, 8, 26 – 28.
- Horáčková, V., Dědič, P., Faltus, M., 2010: Využití tkáňových kultur pro eliminaci virové infekce bramboru. Vědecké práce – Výzkumný ústav bramborářský Havlíčkův Brod, 18, 85-96.
- Huaman, Z., Hoekstra, R., Bamberk, J.B., 2000: The inter-genebank potato database and the dimension of available wild potato germplasm. Am. J. Potato Res. 77, 353 – 362.

- Murashige, T., Skoog, F., 1962: A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15, 473 – 497.
- Pánková, I., Hausvater, E., Krejzar, V., Doležal, P., 2011: Metodika stanovení rezistence odrůd bramboru k původcům aktinomycetové obecné strupovitosti a agresivity izolátů fytopatogenních streptomycet. Výzkumný ústav bramborářský Havlíčkův Brod, s.r.o. Praktické informace č. 36.
- Vidner, J., Dobiáš, K., Konrád, J. et al., 1987: Klasifikátor – genus *Solanum* L. VŠÚB Havlíčkův Brod, VÚRV Praha – Ruzyně.

GENETICKÉ ZDROJE ROSTLIN V ČR - HISTORIE A SOUČASNOST**Plant genetic resources in the Czech Republic - past and present****Dotlačil L., Holubec V., Papoušková L.***Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Praha-Ruzyně***Abstrakt**

Český Národní program (NP) pro genetické zdroje rostlin (GZ) navázal na dlouhou tradici práce s GZ v ČR. Jeho účastníky je dvanáct institucí, koordinaci a služby v rámci NP uživatelů GZ (informační systém EVIGEZ, Genová banka semen, kryobanka) zajišťuje VÚRV Praha. GZ vegetativně množených druhů uchovávají pracoviště odpovědné za kolekce těchto druhů a které rovněž zajišťují služby uživatelům. V kolekcích je shromážděno 53 232 GZ patřících k 1173 druhům, semeny množené kolekce představují 81,2 % a vegetativně množené druhy 18,8 %. Rozšiřování kolekcí se orientuje na GZ domácího původu a GZ cenné pro uživatele, u všech kolekcí je zajištěna evidence, popisná data z hodnocení GZ jsou k dispozici u 71 % položek. Konzervaci všech semenných druhů (pro 96 % všech položek) zajišťuje genová banka, vegetativně množené druhy jsou uchovány v polních genových bankách (76,1 %), *in vitro* kulturách (brambory, vybrané květiny), rozvíjí se provoz kryobanky. Vzorky GZ jsou poskytovány uživatelům na základě SMTA (cca 3-6 tis. GZ ročně). Významnou činností se stává mezinárodní spolupráce v rámci ECPGR; 8 účastníků je přidruženým členem AEGIS. V rámci NP se podařilo zajistit péči o GZ na mezinárodně srovnatelné úrovni; slabým místem NP zůstává však nestabilní financování, nedostatečný technologický rozvoj a výzkumná podpora NP.

Klíčová slova: genetické zdroje rostlin, Národní program, SWOT analýza

Abstract

Czech National Programme (NP) for Plant Genetic Resources (PGR) follows a long tradition on PGR conservation and use in the Czech Republic. Twelve institutions cooperate in the NP where Crop Research Institute in Prague provides project coordination as well as services for the participants and PGR users (information system EVIGEZ, seed gene bank, cryo bank). In vegetatively reproduced species, institutes holding PGR collections provide conservation as well as services to users. Currently there are 53 232 PGR accessions belonging to 1173 species gathered in the Czech collections, among them seed - propagated species account for 81,2 % and vegetatively reproduced 18,8 % respectively. Collections are enlarged preferably by PGR of a local origin and those important for users. All collections guarantee documentation and evaluation, evaluation data are available in 71 % PGR. The gene bank conserves currently 96 % of all seed - propagated PGR, most of vegetatively reproduced PGR we conserve in field gene banks (76,1 %) and *in vitro* banks; also cryo - conservation is under development. PGR samples are available to users according to the SMTA rules (about 3-6 000 distributed samples yearly). International collaboration in the ECPGR is important; 8 Czech institutions became associated members of AEGIS project. The Czech NP meets international standards in the care on PGR, however, the unstable funding, inadequate progress in application of new technologies and lack of a research support remain weak points of the NP.

Key words: plant genetic resources, National Programme, SWOT analysis

Úvod

Jako genetický zdroj (GZ) je obecně označován genetický materiál, který obsahuje funkční jednotky dědičnosti a který má aktuální nebo potenciální hodnotu (FAO, 2001). V případě GZ rostlin se jedná o krajové a šlechtěné odrůdy zemědělských plodin, šlechtitelské

a experimentální linie s cennými znaky a plané druhy příbuzné zemědělským plodinám. Tyto GZ jsou nenahraditelným zdrojem nové genetické diversity pro šlechtění rostlin a biotechnologie. Poznání významu GZ rostlin a počátky jejich shromažďování a využívání sahají v Čechách a na Moravě do počátku dvacátého století, kdy v souvislosti se znovuoobjevením Mendelových zákonů začíná rozvoj vědecky podloženého šlechtění. Bývalé Československo patří ke státům, kde v této době šlechtitelské a výzkumné stanice začaly shromažďovat a hodnotit krajové a šlechtěné odrůdy a využívat je ve šlechtění.

Systematická péče o genofondy rostlin začala v padesátých letech minulého století a je spojena se vznikem výzkumných zemědělských ústavů; v té době bylo v českých kolekcích shromážděno cca 6 tisíc položek. Koncem osmdesátých let se na péči o genofondy podílelo cca 25 institucí v bývalém Československu a v kolekcích bylo shromážděno celkem 42 tisíc položek GZ. Od sedmdesátých let začal mezinárodní spolupráce, nejprve v rámci bývalého RVHP a od osmdesátých let začala rovněž spolupráce s významnými institucemi v západní Evropě (EUCARPIA, IBPGR, FAO, genové banky). V této době začalo také budování národního informačního systému GZ rostlin (EVIGEZ) a byly prováděny experimenty se skladováním semen - to vše s cílem podpořit a připravit provoz národní genové banky ve VÚRV Praha - Ruzyně; ta byla uvedena do provozu v roce 1988 a sloužila všem pracovištím udržujícím kolekce semenných druhů v tehdejší Československu (Bareš a Dotlačil, 1998).

Změny po roce 1989 se odrazily i v systému práce s genetickými zdroji v Československu a později v České republice. V důsledku organizačních změn, privatizace některých ústavů a úsporných opatření nebylo možné zachovat národní kolekce v dosavadní struktuře; po vzniku samostatné ČR a Slovenska zůstalo v českých kolekcích 37,9 tis. položek GZ (Dotlačil et al., 2008).

Ohrožení genofondů zemědělských plodin (v důsledku rušení či privatizace některých ústavů a nedostatek prostředků) vyřešilo MZe ČR v roce 1993 zahájením Národního programu konzervace a využití genetických zdrojů rostlin (dále NP). Tento projekt, podobný národním programům ve většině evropských zemí, zajistil efektivní koordinaci, financování a metodické vedení všech subjektů v ČR, které se do NP zapojily (Stehno et al., 1997). Významným krokem bylo přijetí národní legislativy (Zákon o genetických zdrojích rostlin a mikroorganismů č. 148/2003 Sb. a prováděcí vyhláška č. 458/2003). Oba dokumenty jsou plně v souladu s platnou mezinárodními dohodami, zejména Mezinárodní dohodou o genetických zdrojích rostlin (Dotlačil et al., 2008). Na základě této legislativy byl Národní program postupně rozvíjen do současné podoby.

Materiál a metody

Práce přináší stručný přehled o konzervaci a využívání genetických zdrojů rostlin (GZ) v ČR a o současném stavu genofondů rostlin; vychází z analýzy dostupných dat a relevantních informací k následujícím aktivitám:

(a) shromažďování GZ a rozšiřování kolekcí; (b) dokumentace GZ, informační systém EVIGEZ; (c) charakterizace a hodnocení GZ, (d) konzervace GZR, dostupnost GZR a služby uživatelům a (e) mezinárodní spolupráce.

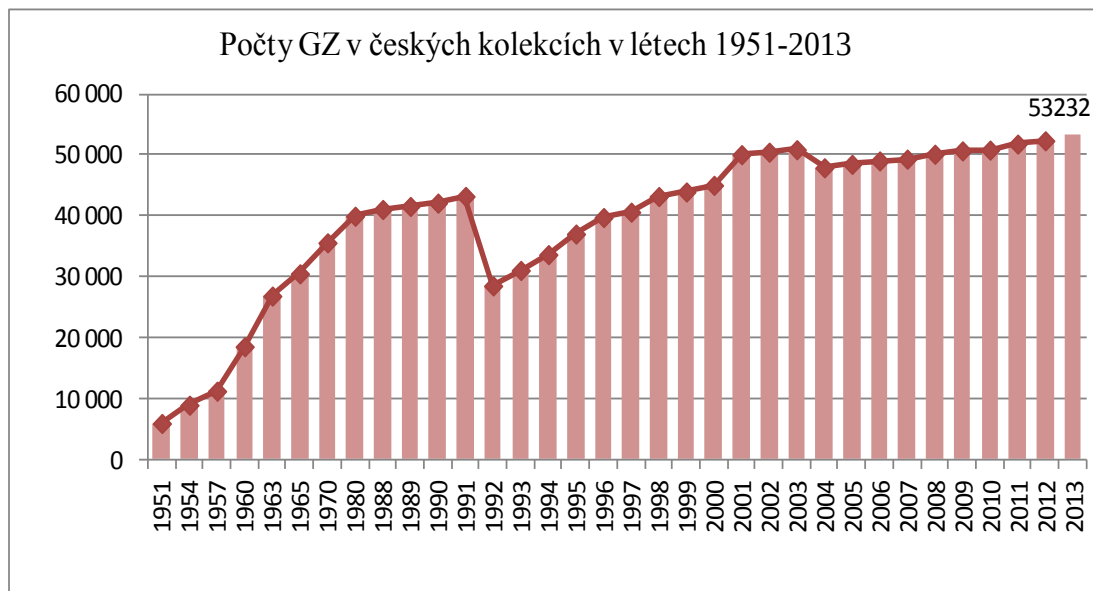
Východí data pro analýzy a zhodnocení vývoje NP poskytla pracoviště účastníků NP prostřednictvím Výročních zpráv a Souhrnných zpráv za NP, které každoročně předkládá koordinační pracoviště Genové banky ve VÚRV Praha.

Výsledky a diskuse

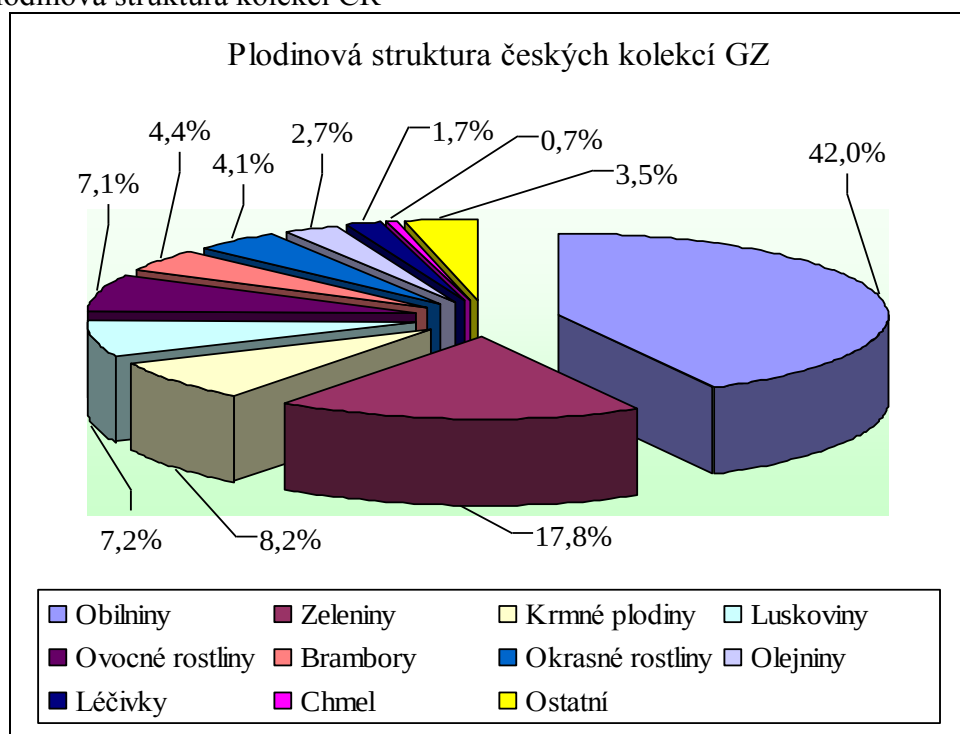
Jak již bylo zmíněno, NP vychází z české legislativy a z platných mezinárodních dohod: Mezinárodní dohoda o GZ rostlin-ITPGRFA (FAO, 2001), Standardní dohoda o poskytování GZ rostlin - SMTA (FAO, 2004) a Globálního akčního plánu – GPA (FAO, 1996). V rámci NP spolupracuje šestnáct pracovišť patřících dvanácti právním subjektům ze sféry veřejných výzkumných institucí (VÚRV Praha, VÚKOZ Průhonice, BÚ ČAV Průhonice), universit (MENDELU, ZF v Lednici) a soukromých výzkumných ústavů (ZVÚ Kroměříž, AGRITEC Šumperk, VÚB Havlíčkův Brod, CHI Žatec, VŠÚO Holovousy, VÚP Troubsko, OSEVA PRO - VST Zubří a VÚO Opava a AMPELOS, Znojmo - Vrbovec). Koordinaci a servisní činnosti (národní informační systém EVIGEZ, provoz národní genové banky semen a provoz kryobanky) zajišťuje pro všechny účastníky NP VÚRV Praha. Genetické zdroje vegetativně rozmnožovaných druhů jsou uchovávány na pracovištích odpovědných za kolekce těchto druhů; tato pracoviště poskytují rovněž vzorky GZ a informací uživatelům.

Počet GZ v českých kolekcích rostl zejména od počátku padesátých let do roku 1980, což bylo spojeno s mimořádným zájmem domácího šlechtění i pěstelské praxe (mj. o introdukci nových zahraničních odrůd do praxe). V osmdesátých letech se introdukce GZ snížily a začalo se více prosazovat české šlechtění. Následující redukce rozsahu kolekcí je důsledkem rozdělení bývalého Československa a dalším období se již realizuje cílené rozšiřování kolekcí, koordinované v rámci NP, s provedenou revizí kolekcí v roce 2004 (vyloučení duplicit a nevhodných položek), (Obr. 1). K počátku roku 2014 je v českých kolekcích shromážděno 53 232 GZ, s převládajícím podílem obilnin, zelenin, píceňin, luskovin a ovocných rostlin (Obr. 2). Z toho semeny množené druhy představují 81,2 % a vegetativně množené druhy 18,8 %. Druhovou diversitu českých kolekcí charakterizuje 1173 kulturních i planých druhů.

Obr.1 Počet GZ v kolekcích NP od roku 1951

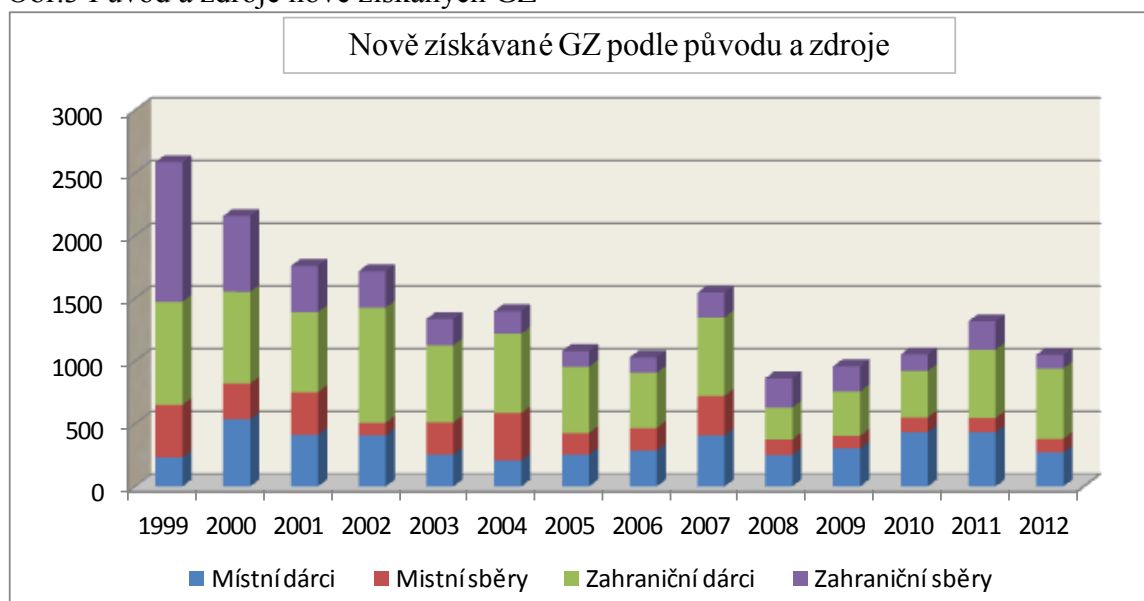


Obr. 2 Plodinová struktura kolekcí ČR



Strategie **rozšiřování kolekcí** o nové genetické zdroje (GZ) se zaměřuje zejména na GZ domácího původu a na nárůst kolekcí o zdroje nové genetické diversity, požadované uživateli. V roce 2013 bylo nově získáno 1186 GZ od domácích a zahraničních dárců a ze sběrových expedic. Z přiloženého obrázku vyplývá (Obr. 3), že dlouhodobě jsou hlavním zdrojem pro rozšiřování kolekcí GZ zahraniční dárci (genové banky, výzkumná pracoviště, šlechtitelské firmy), následují domácí dárci a sběry doma i v zahraničí.

Obr.3 Původ a zdroje nově získaných GZ



V českém **informačním systému GZ** (EVIGEZ) jsou u všech GZ v národních kolekcích evidována pasportní data, popisná data jsou v různém rozsahu k dispozici u 37,3 tis. GZ (tj. 70,7 % položek). Tímto podílem se ČR řadí ke státům s relativně vysokým stupněm zhodnocení národních kolekcí. Rozdíly mezi kolekcemi jednotlivých účastníků NP jsou však značné - od 45 % do 100 % popsanych GZ (Tab. 1).

Uživatelé GZ mohou nalézt dostupné informace na URL:

<http://www.genbank.vurv.cz/genetic/resources/>.

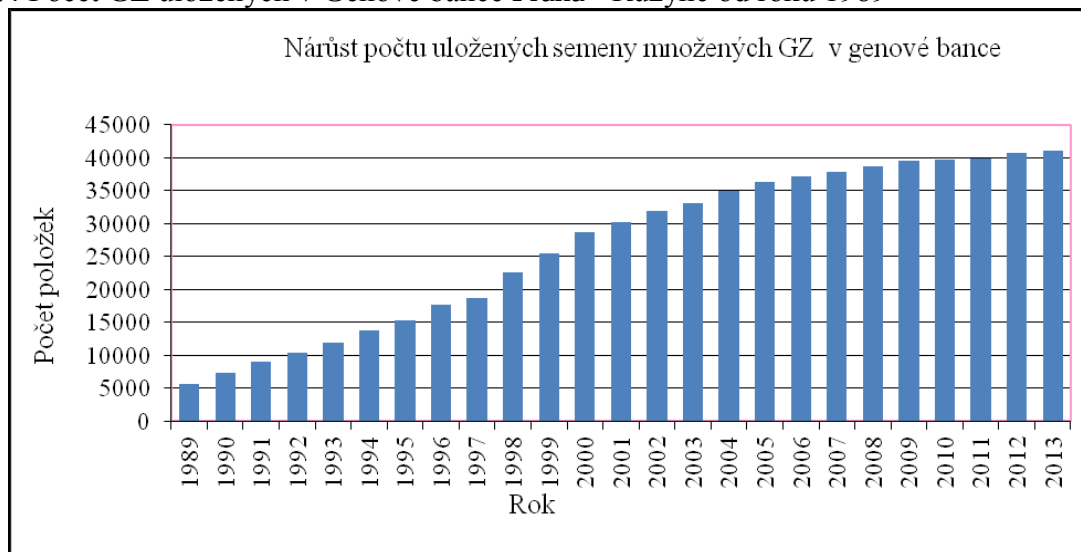
Tab. 1 Stav dokumentace GZ v rámci kolekcí jednotlivých účastníků NP k 1. 1. 2014

Účastník NP	Pasportní data - počty dostupných GZ	Popisná data - počty GZ	Podíl GZ s popisnými daty (%)
VÚRV Praha-Ruzyně	16380	11415	69,7
ZVÚ Kroměříž	5667	5431	95,8
AGRITEC Šumperk	5037	4027	79,9
VÚB Havlíčkův Brod	2454	2289	93,3
CHI Žatec	343	343	100,0
VÚRV Olomouc	10180	4963	48,8
VŠÚO Holovousy	2324	1397	60,1
VÚKOZ Průhonice	1821	1288	70,7
VÚP Troubsko	2299	1606	69,9
OSEVA VST Zubří	2398	1975	82,4
OSEVA VÚO Opava	1403	1173	83,6
VÚRV VSV Karlštejn	274	151	55,1
MZLU Lednice	1430	645	45,1
BU AV Průhonice	423	410	96,9
AMPELOS Znojmo	286	136	47,6
Celkem	52 719	37 276	70,7 %

Popisná data jsou výsledkem **hodnocení GZ** (polní pokusy, laboratorní testy) a jsou doplňována dalšími genetickými charakteristikami (identifikované geny, genetické markéry), které jejich užitnou hodnotu dále zvyšují. Rozsah hodnocených znaků se liší u jednotlivých druhů - v průměru se u všech kolekcí hodnotí cca 30 znaků.

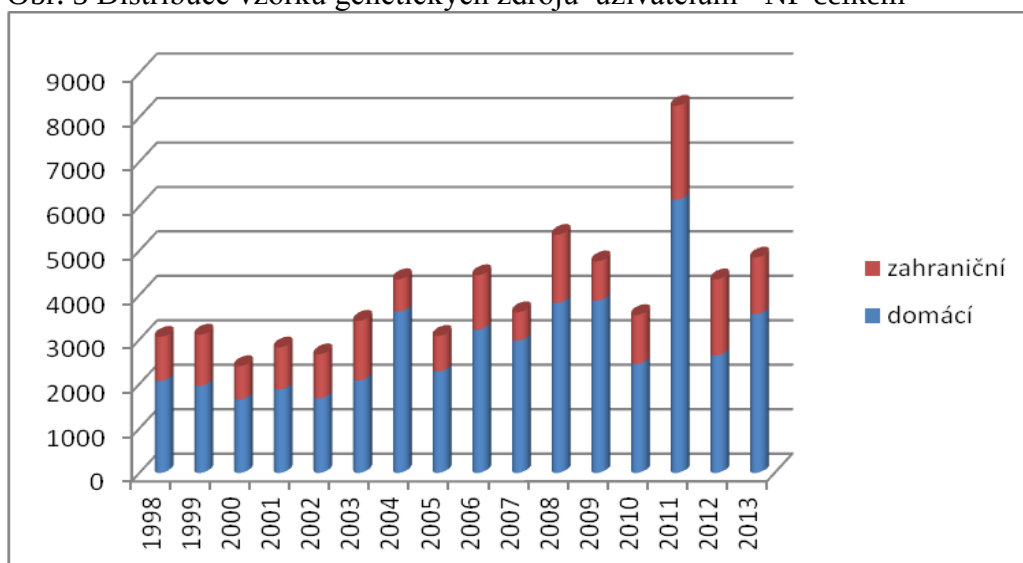
Konzervace GZ je základním posláním NP. Úspěšně uchovat lze ovšem pouze zdravé a vitální GZ; pokud GZ takové podmínky nesplňují, je nezbytná jejich předchozí regenerace. Zachování životnosti **semenných vzorků** v Genové bance VÚRV Praha je dosahováno šetrným vysoušením semen (při teplotě do 20°C) a jejich dlouhodobým uložením při teplotě -18°C. Z celkového počtu 42,8 tis. generativně množených GZ je nyní v genové bance evidováno 40 936 GZ (tj. 95,7 %). V genové bance jsou rovněž uchovány vzorky a standardy DNA (2245 položek). Převod vzorků GZ do genové banky probíhal od roku 1989, se zvýšenou intenzitou pak zejména v letech 1998 - 2004, po konsolidaci NP (Obr. 4). Dnešní naplnění GB se již blíží setrvalému stavu (rutinně budou i nadále probíhat regenerace a každoročně jsou doplňovány nové přírůstky). ***Vegetativně množené druhy jsou uchovávány*** v polních genových bankách (76,1 %) v *in vitro* kulturách (brambory, okrasné rostliny) a u vybraných druhů se začíná uplatňovat metoda kryokonzervace ve VÚRV Praha. Problémem polních genových bank je riziko poškození GZ (vlivy počasí, patogenů apod.) a vysoké náklady - proto je vhodná bezpečnostní duplikace (např. v *in vitro* - a kryo - bankách). Polní kolekce je však nenahraditelná pro hodnocení GZ.

Obr.4 Počet GZ uložených v Genové bance Praha - Ruzyně od roku 1989



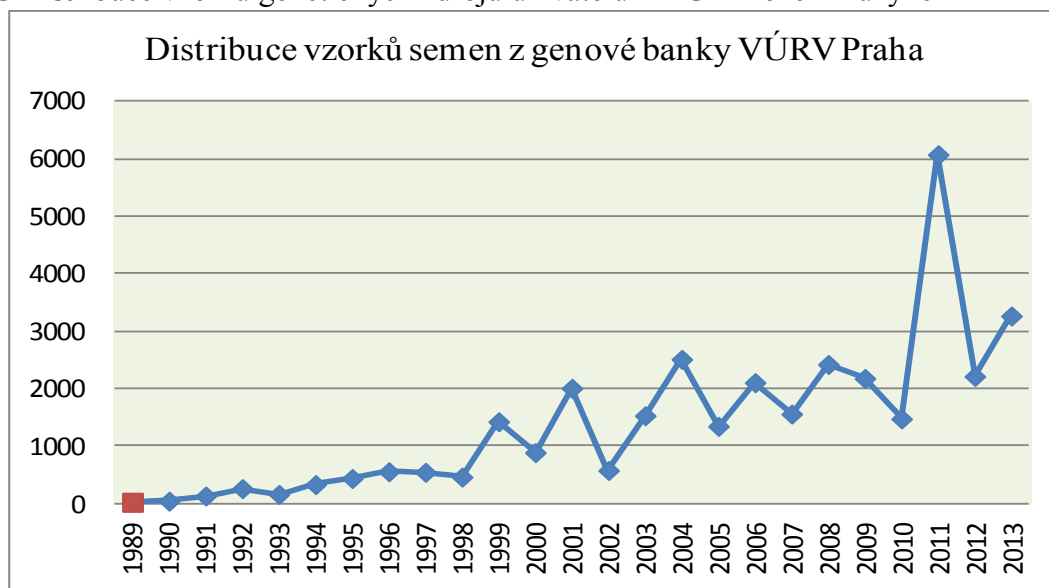
Vzorky genetických zdrojů a relevantní informace jsou dostupné uživatelům - pro potřeby šlechtění, vědy, výzkumu a vzdělávání, nikoliv však pro přímé komerční využití. Tato služba se řídí zákonem 148/2003 Sb. a mezinárodními dohodami, jimiž je ČR vázána (IT/PGRFA-Mezinárodní dohoda o GZ, SMTA- standardní dohoda o poskytování GZ). V roce 2013 bylo uživatelům předáno 4846 vzorků GZ, z toho 67 % prostřednictvím genové banky semen. Nejčastějším uživatelem GZ se stává výzkum, za ním následuje šlechtění. Zájem uživatelů o vzorky GZ má dlouhodobě vzrůstající trend (Obr. 5), mění se však poměr rozesílaných položek podle typu příjemce (stoupá zejména zájem o genetické zdroje ze strany výzkumu); poměr domácích a zahraničních uživatelů je relativně stabilní a cca 2/3 poskytnutých GZ představuje domácí distribuce. Opačný poměr při získávání GZ z domácích a zahraničních zdrojů dokládá výhodnost mezinárodní spolupráce při výměně GZ pro ČR.

Obr. 5 Distribuce vzorků genetických zdrojů uživatelům - NP celkem



Služby uživatelům u semen množných GZ se postupně přesouvají z jednotlivých pracovišť (od kurátorů kolekcí) na genovou banku - v souladu s jejím naplňováním (Obr. 6); to se projevuje zejména u distribuce vzorků GZ do zahraničí. Je však žádoucí, aby kurátoři kolekcí i nadále přímo poskytovali vzorky GZ a informace uživatelům (včetně generativně množných druhů). Zejména v případě domácích uživatelů jsou kontakty mezi kurátorem kolekce a šlechtitelem zárukou efektivního využívání GZ a přispívají rovněž k racionalizaci práce s kolekcemi.

Obr. 5 Distribuce vzorků genetických zdrojů uživatelům z GB Praha - Ruzyně



Významnou činností NP se postupně stala **mezinárodní spolupráce**. Vedle řady jiných aktivit a projektů je nejvýznamnější „Evropský program spolupráce pro genetické zdroje rostlin (ECPGR), do kterého je zapojeno 44 evropských států, včetně všech zemí EU. V současnosti se společné aktivity posouvají od spolupráce k efektivní dělbě práce a integraci kapacit v evropském regionu, při zajištění standardů kvality a dostupnosti GZ (projekt AEGIS). Pro Národní programy v Evropě je AEGIS výzvou a příležitostí aktivně se podílet na bezpečnější konzervaci, dostupnosti a efektivnějším využívání GZ. Zásadní význam má účast českých specialistů v plodinových pracovních skupinách (kterých pracuje 18) a smluvní zapojení osmi účastníků NP jako přidružených členů AEGIS. Účast na mezinárodních aktivitách usnadňuje novela zákona 148/2003 Sb. (Sb. 232/2013, částka 91/2013, z 2.8. 2013), která umožňuje využít část poskytovaných prostředků pro NP i zajištění mezinárodní spolupráce a plnění našich mezinárodních závazků.

Aktuální problémy a perspektivy NP stručně definuje níže provedená analýza silných a slabých stránek NP, existujících rizik a příležitostí (SWOT analýza):

Silné stránky	Slabé stránky
Silný a funkční NP, navazující na tradici a splňující všechna mezinárodní kritéria	Nestabilní a nedostatečné financování NP (formou dotací, bez valorizace)
Vzájemná spolupráce účastníků NP se šlechtěním, výzkumem a praxí	Nedostatečný (obtížný) přístup k moderním technologiím (investice, kapacity)
Centralizace koordinace a služeb, decentralizace a plodinová specializace kolekcí	Nedostatečná podpora práce s GZ ze strany výzkumu
Kvalifikace řešitelů, zvládání generační výměny	Nedostatečná provázanost mezi zeměd. výzkumem a envi-programy (biodiv.)
Dobrá pozice v mezinárodní spolupráci	Propagace GZ (public awareness)
Na 4 pracovištích zavedena kontrola kvality	Nekompatibilita se současným způsobem hodnocení V a V
Dobrá komunikace se státní správou (MZe, MŽP) a uživateli	
Příležitosti	Rizika
Další rozvoj spolupráce s uživateli GZ pro zvýšení užitné hodnoty kolekcí	Nepodaří se racionalizovat způsob financování NP
Efektivní zapojení přidružených členů AEGIS (8 institucí) do tohoto projektu	Bude pokračovat oslabování rezortního výzkumu a jeho vazeb na práci s GZ
Společné projekty účastníků NP se šlechtiteli a dalšími uživateli	Zajištění dostupnosti GZ (získávání GZ od donorů, ABS)
Uplatnění genetických a fyziologických metod při hodnocení a konzervaci GZ	Rozvoj NP nestačí technologickému pokroku ve vyspělých zemích
GZ pro adaptaci ke změně klimatu	Nedostatečná propagace GZ
Využití GZ na podporu agrobiodiversity a nevýrobních funkcí zemědělství	Nebude dostatečně respektován specifický charakter a potřeby práce s genofondy na úrovni účastníků a koordinačního pracoviště NP
Získání nové genetické diversity do kolekcí (sběry, výměna, donátoři)	
Prohloubení spolupráce s NGO	

Lze konstatovat, že realizací NP MZe ČR se podařilo navázat na domácí tradici práce s genofondy a zajistit další efektivní rozvoj této problematiky v ČR, při dodržování mezinárodních standardů (FAO, 1996; FAO, 2001) a širokém zapojení do mezinárodní spolupráce. Koordinací aktivit účastníků NP byly v prvních letech jeho existence vyloučeny dřívější duplicity a bylo možné rozšířit a prohloubit péči o GZ. Přitom se podařilo udržet efektivní spolupráci s domácími uživateli GZ ve šlechtění a výzkumu, ve které spatřujeme i významnou příležitost pro další rozvoj NP. Decentralizace kolekcí v plodinových ústavech není při koordinované spolupráci v rámci NP nevýhodou, naopak může být výhodná. Kolekce GZ jsou zpravidla lokalizovány v pro ně vhodných půdně - klimatických podmínkách, což zvyšuje jejich bezpečnost a validitu získávaných dat při hodnocení GZ. Výzvou a příležitostí je zejména zapojení účastníků NP do mezinárodní spolupráce v rámci ECPGR a do projektu AEGIS, stejně jako široké uplatnění nových technologií a využití genofondů na podporu a využívání agrobiodiversity.

Dlouhodobým závažným problémem je nestabilní a nevhodná forma financování NP formou dotací, bez valorizace podle inflace. S tím souvisí u většiny účastníků NP i obtížný přístup k novým technologiím a nezbytným investicím. Narůstajícím deficitem NP je také absence výzkumných priorit a projektů, orientovaných na metodickou pomoc pro NP a na výběr a podrobné zhodnocení GZ pro konkrétní potřeby uživatelů. Jde o aktivity významně zhodnocující celou práci s genofondy a její výsledky, pro které však nejsou v rámci NP prostředky ani kapacity (tak jak je tomu v zahraničí) a proto by měly být předmětem spolupráce s výzkumem.

Závěr

Hodnocení dvaceti let existence NP pro genetické zdroje rostlin potvrzuje, že tento model péče o GZ se v ČR plně osvědčil a umožnil dosáhnout v této oblasti úrovně srovnatelné s nejvyspělejšími státy. Má-li si NP tuto pozici a svoji plnou funkčnost udržet a dále rozvíjet, bude nezbytné v relativně krátké době 3 - 4 let stabilizovat financování NP, umožnit jeho technologický rozvoj, umožnit aplikovaný výzkum pro potřeby NP a nalézt odpovídající zařazení NP ve struktuře programů MZe - v oblasti mezi výzkumem a mandatorními aktivitami resortu zemědělství, které vyplývají z domácí legislativy a mezinárodních dohod.

Dedikace

V příspěvku je využito výsledků získaných v průběhu řešení „*Národního programu konzervace a využití genofondů rostlin a agrobiodiversity*“, č.j. MZe ČR 206553/2011-17253

Použitá literatura

- Bareš, I., Dotlačil, L., 1998: History of Genetic Resources Studies in the Czech Republic. In: Dotlačil, L., Štolc, K.J.: National Programme on Plant Genetic Resources Conservation and Utilization in the Czech Republic. Praha, 4 – 8.
- Dotlačil, L., Faberová, I., Stehno, Z., 2008: Plant genetic resources in the Czech Republic, Czech J. Genet. Plant Breed. 44(4): 129-139.
- FAO, 1996: Global Plan of Action for the Conservation and Sustainable Utilization of Plant Genetic Resources for Food and Agriculture. FAO, Rome, 1996, 63.
- FAO, 2001: International Treaty on Plant Genetic Resources for Food and Agriculture (ITPGRFA). FAO, Rome, 25.
- FAO, 2004: Standard Material Transfer Agreement. FAO, Rome, 12.

Stehno, Z., Dotlačil, L., Hermuth, J., 1997: Plant genetic resources conservation and utilisation in the Czech Republic. Proceedings of the Latvian Academy of Sciences Vol. 51, no.1/2: 39 – 44.

Kontaktní adresa: Ing. Vojtěch Holubec, CSc., Genová banka, Výzkumný ústav rostlinné výroby v.v.i., 16106 Praha 6- Ruzyně, Drnovská 507; e-mail:holubec@vurv.cz

PERSPEKTIVNÍ METODY PRO HODNOCENÍ KVALITY GENETICKÝCH ZDROJŮ PŠENICE SETÉ V GENOVÉ BANCE PRAHA

*Perspective methods for genetic resource evaluation of common wheat in Gene bank of
Prague*

Dvořáček V., Bradová J., Prohasková A., Štočková L., Papoušková L.

Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Praha-Ruzyně

Abstrakt

Příspěvek pojednává o zavádění a optimalizaci vybraných perspektivních metod hodnocení kvality zrna genetických zdrojů pšenice v laboratoři kvality rostlinných produktů. Popisované metody zahrnují elektroforetickou identifikaci tzv. „waxy“ bílkovinných alel s těsným vztahem ke složení škrobu pšeničného zrna. Dále jsou zde popisovány metody kvantifikace bílkovinných frakcí zrna a stanovení relativní viskozity vodného výluhu mouky s vazbou k nutriční i technologické jakosti mouky. V neposlední řadě je rovněž zmíněna i metoda retenční kapacity mouky (SRC - test) a její potenciál pro predikci pekařské kvality mouky.

Klíčová slova: *Triticum aestivum* L., kvalita zrna, waxy alely, frakcionace bílkovin, relativní viskozita, retenční kapacita mouky

Abstract

The paper discusses an application and optimizing of selected perspective methods of grain quality evaluation in wheat genetic resources in the laboratory of the plant product quality. These described methods include electrophoretic identification so-called “waxy” protein alleles with a close relation to starch composition of the wheat grain. There are evaluated methods of grain protein fractionation and assessment of relative viscosity of the aqueous extract of wheat flour as well which showed a significant relation to nutritional and technological quality of wheat flour. Finally, there is also mentioned the method of retention capacity of flour (so - call SRC test) and its efficiency for prediction of bread-making quality of flour.

Keywords: *Triticum aestivum* L., grain quality, waxy alleles, protein fractionation, relative viscosity, retention capacity of flour

Úvod

Oddělení genové banky se vedle celonárodní koordinace, dokumentace a uchování generativně množených genetických zdrojů rostlin, věnuje též hodnocení vlastností a znaků významných obilnin a minoritních plodin, za které má ruzyňské pracoviště garanci v rámci Národního programu konzervace a využití genetických zdrojů rostlin a agrobiodiverzity. Ze skupiny významných obilnin jsou zde hodnoceny kolekce pšenice seté (*T. aestivum* L.) tritikale (*Triticosecale*) a ozimého ječmene (*H. vulgare* L.). Garance u minoritních plodin zahrnuje kolekce pšenice špaldy (*T. spelta* L.), pšenice jednozrnky (*T. monococcum* L.) a dvouzrnky (*T. dicoccum* SCHUEBL), pohanky seté (*Fagopyrum esculentum* MOENCH.), pohanky tatarské (*Fagopyrum tataricum* L.), prosa setého (*Panicum miliaceum* L.), čiroku (*Sorghum* sp.), amarantu (*Amaranthus* sp), bérů (*Setaria italica* L.) a řady dalších kulturních i planých předků obilnin.

U významných obilnin je v poslední době zaznamenáván nejen trvalý pokrok v oblasti rezistentního šlechtění a celkového výkonu odrůdy, ale vzhledem k požadavkům trhu je stále větší tlak i na jednoznačně diferencovanou kvalitu produkce. V případě pšenice seté je to oblast pečivářská či průmyslová požadující např. nízké vaznosti mouky, tažný až roztékavý

lepek či specifickou kvalitu škrobů (Békés, 2012). Doposud na úrovni výzkumných prací ovšem s předpokládaným rychlým transferem především do šlechtitelské praxe jsou u pšenice studovány možnosti nutričních změn a to jak z pohledu krmné jakosti především u monogastrů, tak výživové kvality zahrnující např. zvýšení obsahu přirozených antioxidantů pšeničného zrna, snížení glykemického indexu a zátěže či snížení alergizujícího efektu lepkových bílkovin (Balyan et al., 2013).

Tyto skutečnosti tak vedou i naše laboratorní pracoviště v Genové bance k nutnosti rozšiřovat portfolio sledovaných znaků u genetických zdrojů pšenice včetně jejich optimalizace a adaptace z hlediska požadavků na minimální spotřebu testovaného materiálu. Za posledních 6 let tak byly na souborech genetických zdrojů pšenice seté aplikovány dva postupy stanovení bílkovinných frakcí pšeničného zrna, sledování viskozity vodného výluhu šrotu případně mouky s vazbou k obsahu arabinoxylanů, detekce tzv. „waxy“ alel odpovědných za poměr amylosy a amylopektinu s využitím elektroforézy (SDS-PAGE) či charakterizace centrifugační vaznosti mouky tzv. SRC - testu (Solvent Retention Capacity Test) s vazbou k pekařské a pečivářské jakosti zrna.

Příklady vybraných optimalizovaných metod

Detekce waxy bílkovinných alel

Obsah amylosy je u hexaploidních pšenic regulován 3 waxy alelami Wx-A1(a/b), Wx-B1(a/b) a Wx-D1(a/b), které jsou přítomné na chromozomech 7A, 7D a 4A (Van Hung, 2008). Absence (b) nebo mutace jedné či více alel pak způsobuje snížení aktivity enzymu GBSS1 zodpovědného za syntézu amylosy, čímž je její obsah v zrně snížen (až pod 1%). Pro detekci těchto alel byly zvoleny čtyři pšeničné waxy materiály *T. aestivum* L. (Kanto 107x, WQL6K107-BH WX2-2a, WQL6K107-BH WX14-7, Waxy-Pen) s deklarovanou skladbou dvou resp. tří waxy (nulových) alel a kontrolní odrůda Chinese Spring s aktivními alelami na všech třech lokusech.

Purifikace a izolace GBSS proteinů byla provedena dle autorů Zhao a Sharp (1996) a k jejich detekci byla použita SDS-PAGE 12,5 %, velikost gelu 80 × 55 × 0,75 mm, vizualizace proteinů Coomassie Brilliant Blue R250 (Bradová et al., 2011).

Kvantifikace albumino-globulinové a gliadinové frakce

Příklad kvantifikace albumino-globulinové a gliadinové frakce je uveden na souboru 24 geneticky heterogenních pšeničných materiálů evropského původu a dvou čínských genotypů. Princip metody je založen na odlišné rozpustnosti jednotlivých bílkovinných složek zrna v roztoku 0,5M NaCl při 4°C (albumino-globulinová frakce) a 60% ethanolu při 20°C (gliadiny) (Dvořáček et al., 2001). Obě bílkovinné frakce byly extrahovány ve třech opakováních. Detekce extrahovaných bílkovin byla provedena pomocí dvou metod: 1) Kjeldahlovy mineralizační metody (ISO 5983-1) 2) vysokotlaké chromatografie RP-HPLC (Naeem et al., 2007).

Relativní viskozita vodného výluhu mouky

Příklad stanovení hodnoty relativní viskozity mouky ve vodném výluhu je popsán u 35 kontrastních genotypů pšenice pěstovaných v roce 2010 na 3 lokalitách. Soubor tvořily v ČR registrované odrůdy, vybraní zástupci světové kolekce pšenic a skupina HMW-Glu linií pšenic pocházejících z evropských krajových odrůd. Princip metody je založen na měření viskozity odstředěného a varem enzymaticky inaktivovaného roztoku kapilárním kuličkovým mikroviskozimetrem (Saulnier et al., 1995).

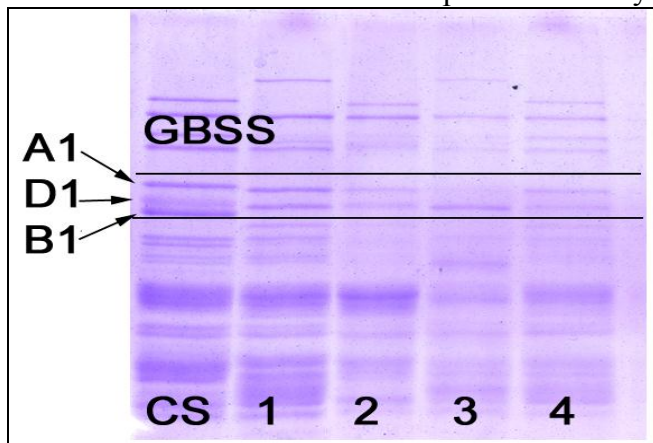
SRC - test

V roce 2009 byla na našem pracovišti zavedena metoda Solvent Retention Capacity testu (SRC - test), která je oficiálně uznávanou metodou AACCC 56-11 a slouží pro predikci finálních pekařských parametrů pšenice. Test je založen na hodnocení centrifugační vaznosti (retence) mouky pomocí čtyř roztoků (destilovaná voda, 5% roztok uhličitanu sodného, 50% roztok sacharosu a 5% roztok kyseliny mléčné). Úroveň vaznosti 5% roztoku uhličitanu sodného je dle metody asociována k poškození škrobu, vaznost roztoku sacharosu je ovlivňována obsahem pentosanů, vaznost roztoku kyseliny mléčné kvalitou přítomné gluteninové frakce a celková vaznost vody je pak ovlivněna všemi výše uvedenými komponenty pšeničné mouky. Výhody tohoto ukazatele jsou dokumentovány na víceletém hodnocení (2009 - 2011) souboru genotypů pšenice seté (viz „*Relativní viskozita vodného výluhu mouky*“).

Dosažené výsledky a diskuse**Detekce waxy bílkovinných alel**

Metoda SDS-PAGE umožňuje separaci proteinů GBSS1 vázaných na granule škrobu přítomných v pšenici jako tři elektroforetických pruhů na gelu, které korespondují s výskytem aktivních alel Wx-A1a, Wx-B1a a Wx-D1a. Výsledky separace a vizualizace těchto alel za použití klasické SDS-PAGE elektroforézy u sledovaných waxy materiálů jsou znázorněny na obrázku 1. Vizualizace SDS-PAGE potvrdila u kontrolní odrůdy Chinese Spring tři typické elektroforetické pruhy, které odpovídají příslušným aktivním Wx proteinům, jak uvádí Zhao a Sharp (1996). Nejpomalejší pruh odpovídá Wx-A1a proteinu a dva další pruhy s velmi blízkou pohyblivostí odpovídají Wx-D1a a Wx-B1a proteinům. Zjištěné výsledky testovaných waxy materiálů se ovšem s deklarovanými charakteristikami shodují pouze částečně (Obr.1). V případě odrůdy Kanto 107x byl detekován kromě deklarovaného proteinu Wx-D1a i Wx-A1a protein. U ostatních materiálů, které by podle deklarace měly být zcela bez výskytu příslušných proteinů, byl zjištěn jeden (Wx-D1a u WQL6K107-BH WX2-2a) či dva (Wx-D1a, Wx-A1a u WQL6K107-BH WX14-7 a Waxy Pen) slabé pruhy. Je tak zřejmé, že testované waxy odrůdy se vyznačovaly neuspokojivou odrůdovou čistotou, což dokládají i hodnoty obsahu amylosy zjištěnými u těchto materiálů (Tab.1), kdy žádná z deklarovaných plně waxy pšenic nepotvrdila pouhé stopy obsahu amylosy (pod 1%).

Obr. 1 Elektroforetické stanovení proteinů vázaných na granule škrobu (GBSS1) v pšenici



1- Kanto 107x; 2- Waxy Pen; 3- WQL6K107-BH WX2-2a; 4- WQL6K107-BH WX14-7; CS- Chinese Spring);

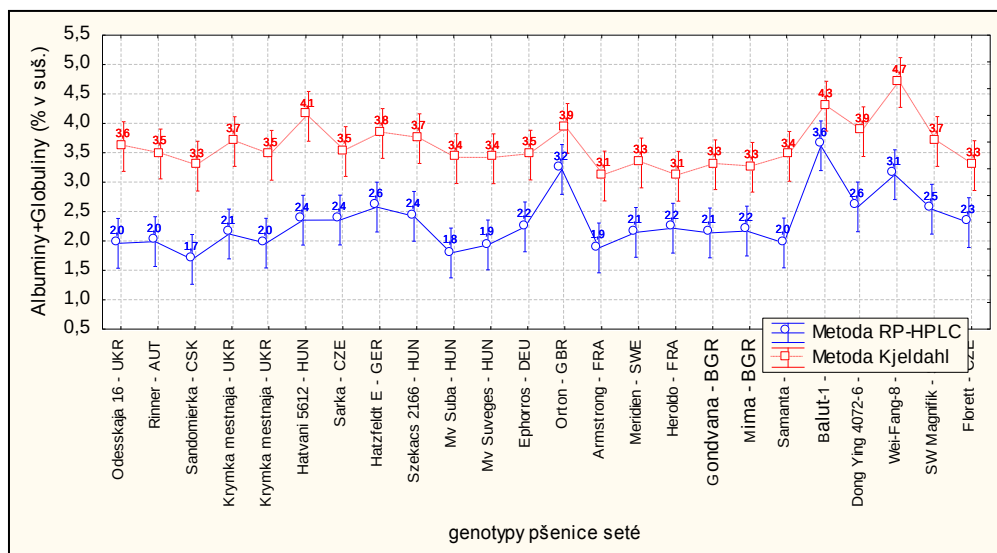
Tab. 1 Průměrný obsah amylosy u hodnocených materiálů

Odrůda	Amylosa (%)
KW 107x	3,4
Waxy Pen	4,7
WQL6K107-BH WX 2-2a	6,2
WQL6K107-BH WX 14-7	6,7
Chinese Spring	25,0

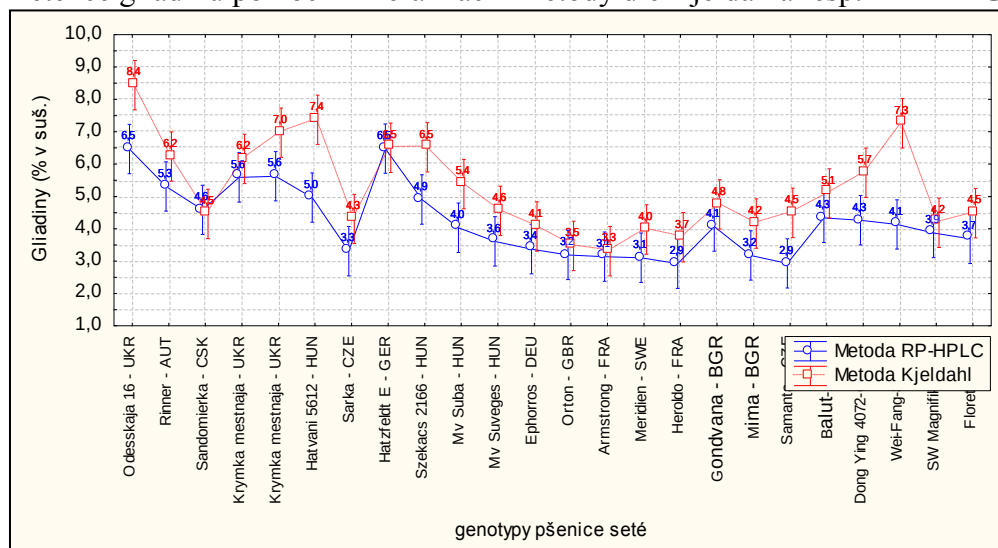
Kvantifikace albumino-globulinové a gliadinové frakce

U studovaného souboru starších a současných odrůd pšenice seté se potvrdily statisticky průkazné rozdíly mezi oběma sledovanými frakcemi (Obr. 2 a 3). Vyšší genotypové difference byly zaznamenány u starších odrůd s vyšším obsahem gliadinové frakce (Odeskaja 16, Hatvani 5612 apod.) ve srovnání s moderními evropskými odrůdami (Dvořáček et al., 2001; Dotlačil et al., 2008).

Obr. 2 Detekce albumino-globulinové frakce pomocí mineralizační metody dle Kjeldahla resp. RP-HPLC



Obr. 3 Detekce gliadinů pomocí mineralizační metody dle Kjeldahla resp. RP-HPLC



Zřejmý je i významný rozdíl v hodnotách u identických vzorků v závislosti na použité metodě stanovení, přičemž hodnoty obou frakcí stanovené mineralizační metodou vykazovaly obecně významně vyšší hodnoty ve srovnání s metodou RP-HPLC. V případě albumino-globulinové frakce je to při mineralizačním stanovení pravděpodobně způsobeno zahrnutím i nebílkovinných složek zrna. Rozdíly obou metod při stanovení gliadinové frakce byly nižší s průkazně vyšší úrovní vzájemné korelace ($r = 0,68$ vs. $0,53$). Tento fakt je pravděpodobně dán i volbou vhodného proteinového standardu pro tuto frakci, jímž byl přímo pšeničný gliadin. V případě analýzy albumino-globulinových frakcí byl pro RP-HPLC použit jako bílkovinný standard sérový hovězí albumin s výrazně odlišným chromatografickým spektrem od získané směsi pšeničných albuminů a globulinů. Přesto i v případě gliadinové frakce byly hodnoty získané mineralizační metodou vyšší a pro absolutní srovnatelnost obou metod by tak měl být obecně přijímaný bílkovinný koeficient pro pšenici (5,7) snížen.

Velmi zajímavé jsou poznatky týkající se korelačních závislostí stanovených bílkovinných frakcí oběma metodami k vybraným nepřímým parametrům pekařské jakosti (obsah hrubých bílkovin – NL, mokrého lepku – ML, gluten indexu - GI a Zeleného sedimentace - ZS). Vyšší či dokonce významně vyšší korelační vztahy pro parametry NL, ML a GI byly získány při stanovení obou frakcí mineralizační metodou (Tab. 2). Naopak obsahy obou bílkovinných frakcí stanovené pomocí RP-HPLC lépe korelovaly s hodnotou ZS. Je tak zřejmé, že stanovení tzv. „čistého“ proteinu u obou bílkovinných frakcí hraje významnou úlohu v úrovni tohoto parametru.

Tab. 2 Korelační vztahy mezi obsahem bílkovinných frakcí a vybranými ukazateli kvality pšeničného zrna

Parametry	Obsah hrubých bílkovin	Obsah mokrého lepku	Gluten index	Zeleného sedimentace
Alb+Glo (HPLC)	-0.01	0.08	-0.15	-0.39
Alb+Glo (Kjeldahl)	0.43*	0.54*	-0.51*	-0.18
Gli (HPLC)	0.88*	0.84*	-0.64*	0.47*
Gli (Kjeldahl)	0.93*	0.92*	-0.74*	0.35

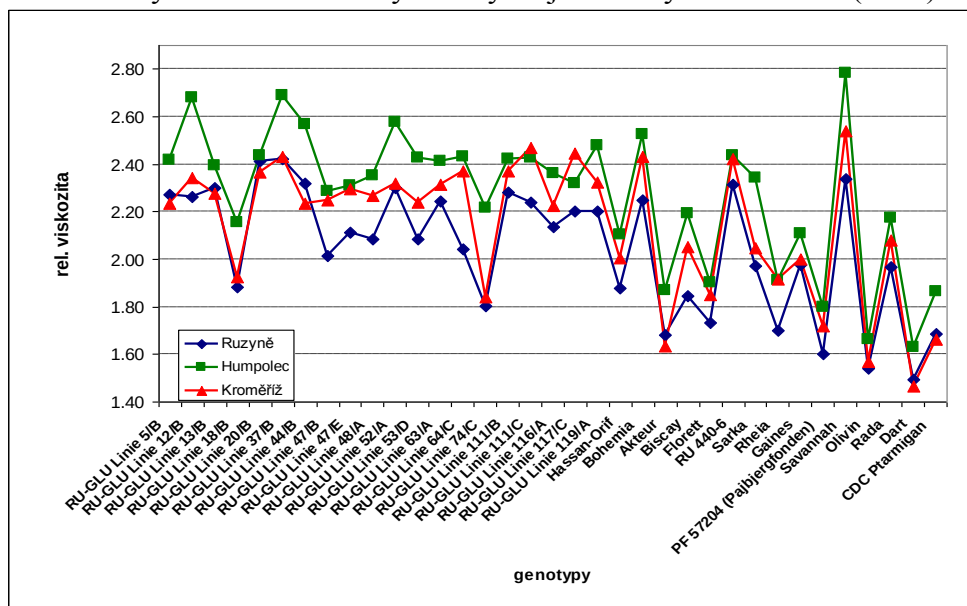
*statisticky signifikantní pro $p \leq 0.05$

Relativní viskozita vodného výluhu mouky

Zjištěné rozdíly v hodnotách relativní viskozity mouky ($R_{vis(m)}$) potvrdily vysokou genotypovou závislost (85,3 %) ve shodě se Saulnierem et al. (2007). Je tak zřejmé, že tuto vlastnost $R_{vis(m)}$ ($vk = 13$ %) lze považovat šlechtitelsky za velmi příznivou (Obr. 4).

Pro možnosti využití parametru $R_{vis(m)}$ bude rovněž důležitá její vazba k dalším technologickým ukazatelům resp. parametrům přímého pekařského testu. Při srovnání s tradičním parametrem predikujícím pekařskou jakost zrna (Zeleného sedimentační test) jsou dosažené korelační úrovně získané relativní viskozity mouky velmi srovnatelné, přičemž vyšší korelační hodnoty dosahovala $R_{vis(m)}$ s objemem pečiva a šířkou bochníku. Naopak výška bochníku a tvarový index (poměr výšky a šířky bochníku) více koreloval s hodnotou Zeleného sedimentace (Tab. 3).

Obr. 4 Hodnoty relativní viskozity mouky na jednotlivých lokalitách (2010)



Tab. 3 Korelační vztahy relativní viskozity a Zelenyho sedimentačního testu k finálním pekařským parametrům

Parametr	Objem bochníku	Výška bochníku	Šířka bochníku	Poměr výšky a šířky bochníku
Rel. viskozita	0,54**	0,30**	0,46**	0,10
Zelenyho test	0,46**	0,46**	0,26**	0,35**

SRC - test

Získané tříleté výsledky hodnocení retenční kapacity mouky u vzorků pšenice je uveden v Tab. 4. Nejvyšší variabilita byla zjištěna u retenční kapacity mouky v 5% kyselině mléčné ($V_k = 18\%$). Variabilita retenční kapacity pro ostatní roztoky byla v průběhu ročníků a lokalit stabilnější a nepřekročila 10% hranici. Metoda je zatím výhradně využívána k predikci pečivářských pšeníc (sušenky, kreky apod.), pro něž jsou deklarovány hodnoty sledovaných parametrů mouky dle normy AACC 56-11. Z našich výsledků vyplývá možnost efektivního využití metody i pro účely predikce pekařské jakosti, jak např. naznačuje porovnání výsledků u elitní odrůdy Akteur (pekařská jakost E) s dosaženým celkovým průměrem retencí u celého hodnoceného souboru. Odrůda Akteur vykazovala vysokou retenční hodnotu především v roztoku v kyselině mléčné. Naopak poměrně nižší (např. ve srovnání s odrůdou Bohemia - pekařská jakost A) byla u této odrůdy retence v roztoku sacharosy a uhličitanu sodného, svědčící o nižším podílu neškrobových polysacharidů a nižším poškození škrobu.

Rozdíly v retenci kyseliny mléčné a uhličitanu sodného nebyly mezi gluteninovými krajovými liniemi a šlechtěnými materiály statisticky významné. Na vyšší hodnot retenčních parametrů s roztokem sacharosy a uhličitanu se pak částečně projevil i vliv pěstební lokality.

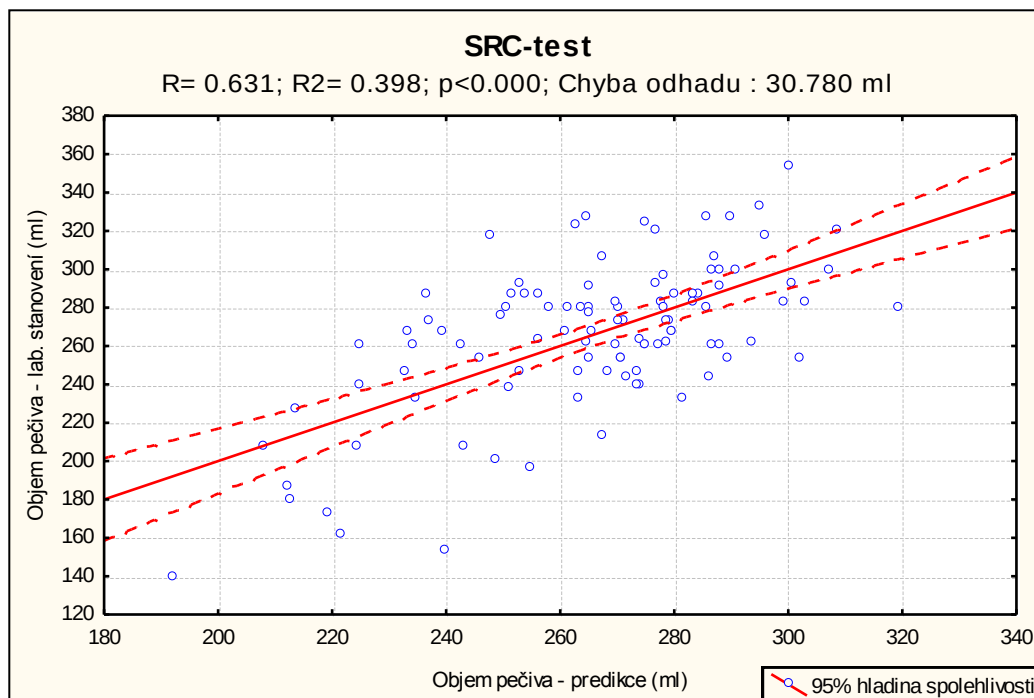
Tab. 4 Charakteristika retenčních parametrů mouky - SRC test (2009 – 2011)

Parametr	Voda (%)	Kys. mléčná (%)	Sacharosa (%)	Uhličitan sodný (%)
RU-GLU linie	65,99 ^b	138,14 ^a	114,65 ^a	82,18 ^a
Šlechtěné odrůdy	62,69 ^a	136,64 ^a	107,10 ^b	80,71 ^a
Odrůda Akteur	62,63	156,74	105,18	77,30
Ruzyně	64,92 ^a	129,70 ^a	107,90 ^a	80,24 ^a
Kromčříž	65,14 ^a	127,02 ^a	111,03 ^b	83,18 ^b
Humpolec	63,60 ^a	149,79 ^b	117,82 ^c	81,98 ^{ab}

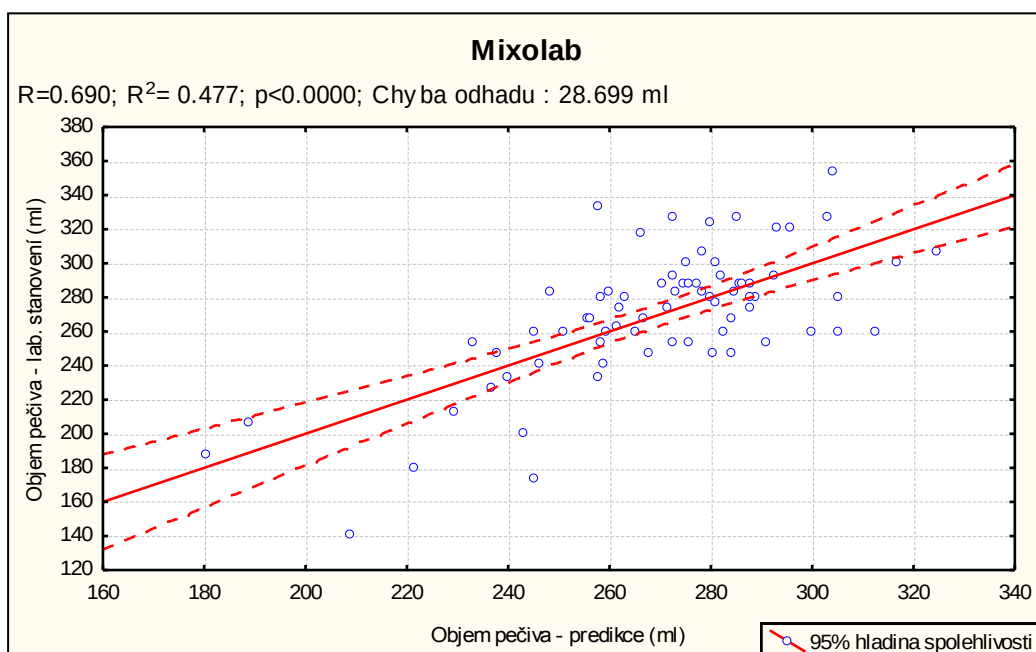
Hodnoty s odlišnou indexací jsou signifikantní pro $p \leq 0,05$

Efektivitu SRC - testu vzhledem k predikci objemu pečiva lze velmi dobře dokumentovat vícenásobnou regresní analýzou na základě vzájemného srovnání s predikčními schopnostmi současných reologických systémů (Mixolab, Farinograf, Alveograf). Porovnáme-li jednotlivé regresní vztahy (Obr. 5 - 8), nejvyšší predikční schopnost se potvrdila pro odhad objemu pečiva pomocí alveografu ($R = 0,80$). Nicméně i další hodnocené reologické metody dosáhly naprosto srovnatelné regresní korelace R i chyby odhadu. Vzhledem k minimálním vstupním nákladům metody SRC - testu vyžadující pouze vhodný rotátor a standardní centrifugu i relativně nízkou spotřebu vzorku lze tak považovat její aplikaci např. pro šlechtitelské účely či hodnocení genetických zdrojů za vysoce perspektivní.

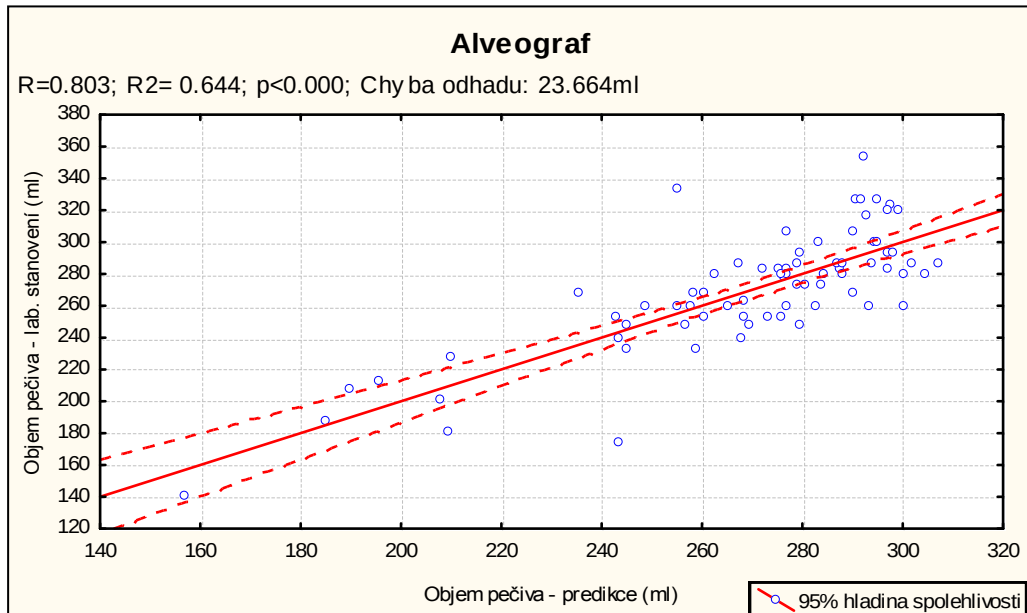
Obr. 5 Predikce objemu pečiva pomocí metody SRC - test (2009-2011, Ruzyně)



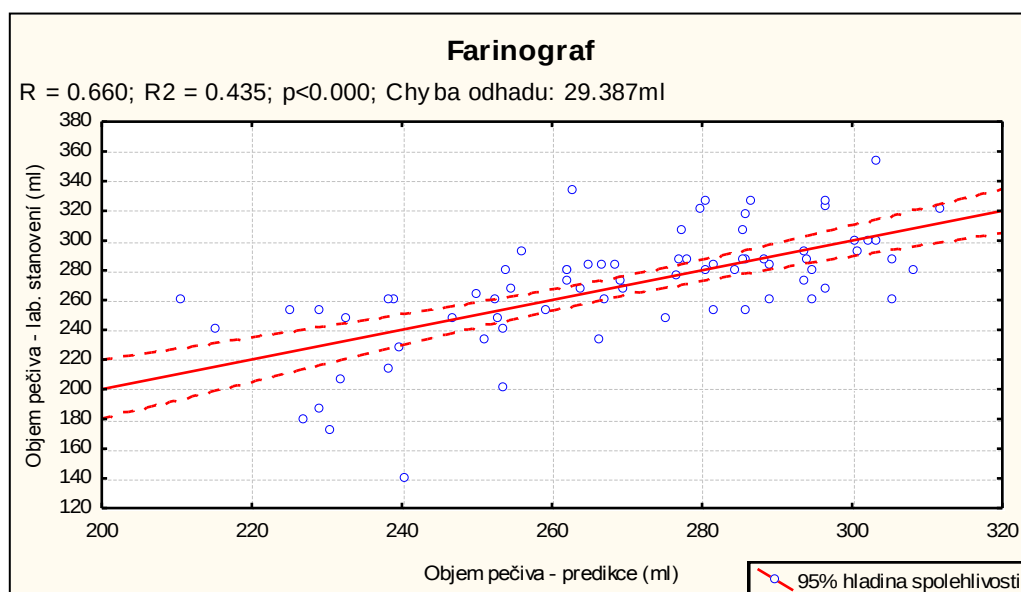
Obr. 6 Predikce objemu pečiva pomocí metody Mixolab, 2009-2011, Ruzyně)



Obr. 7 Predikce objemu pečiva pomocí metody Alveograf (2010-2011)



Obr. 8 Predikce objemu pečiva pomocí metody Farinograf (2009-2011)



Závěr

Uvedené příklady hodnocení perspektivních metod potvrzují jejich široké uplatnění pro posuzování kvality zrna pšenice seté. Svým charakterem jsou především určeny jako screeningové metody vhodné pro hodnocení rozsáhlých kolekcí genetických zdrojů či šlechtitelských materiálů a pro hledání a vývoj genotypů (nových odrůd) vhodných pro specifické koncové využití (chleba, sušenky oplatky, krmné odrůdy, průmyslové aplikace aj.). Ve srovnání s tradičními metodami pak v řadě případů nabízejí komplexnější pohled na celkovou jakost zrna (např. SRC - test), nebo tradiční jakostní parametry významně rozšiřují o hodnocení dalších ukazatelů, jež technologickou resp. nutriční kvalitu rovněž významně ovlivňuje (frakcionace proteinu, relativní viskozita). I z tohoto důvodu tak lze očekávat jejich možné uplatnění v některých výrobních provozech při prvotním nákupu komodit nebo vlastním zpracování a využívání pšeničné mouky.

Dedikace

Tato práce vznikla za podpory MZe ČR „Národní program konzervace a využívání genetických zdrojů kulturních rostlin a agro-biodiversity“, č.j. MZe ČR 206553/2011-17253 a Výzkumného záměru MZe ČR 0002700604

Použitá literatura

- Balyan, H.S., Gupta, P.K., Kumar, S., Dhariwal, R., Jaiswal, V., Tyagi, S., Agarwal, P., Gahlaut, V., Kumari, S., 2013: Genetic improvement of grain protein content and other health-related constituents of wheat grain (review). *Plant Breeding*, 132, 446–457.
- Békés, F., 2012: New Aspects in Quality Related Wheat Research: I. New Methodologies for Better Quality Wheat Cereal Research Communications 40(3), 307–333.
- Bradová, J., Dvořáček, V., Štočková, L., 2011: Využití gelové a čipové elektroforézy pro identifikaci podjednotek gluteninů s vysokou a nízkou molekulovou hmotností u pšenice. Certifikovaná metodika. Osvědčení pod č.j. 1/10967-2011, VÚRV, v.v.i., Praha, 25.

- Dotlačil, L., Fáberová, I., Stehno, Z., 2008: Plant Genetic Resources in the Czech Republic Czech J. of Gen. and Plant Breed. 44:129-139.
- Dvořáček, V., Moudrý, J., Čurn, V., 2001: Studies of Protein Fraction in Grain of Spelt Wheat (*Triticum spelta* L.) and Common Wheat (*Triticum aestivum* L.). Sci. Agric. Bohemica, 32, 287–305.
- Naeem, H.A., Sapirstein, H. D., 2007: Ultra-fast separation of wheat glutenin subunits by reversed-phase HPLC using a superficially porous silica-based column. J. Cereal Sci. 46,157-168.
- Saulnier, L., Sado, P. E., Branlard, G., Charmet, G., Guillon, F., 2007: Wheat arabinoxylans: Exploiting variation in amount and composition to develop enhanced varieties. Journal of Cereal Science 46, 261–281.
- Saulnier, L., Peneau, N., Thibault, J. F., 1995: Variability in grain extract viscosity and water-soluble arabinoxylan content in wheat. Journal of Cereal Science 22, 259–264.
- Van Hung, P., Yasui, T., Maeda, T., Morita, N., 2008: Physicochemical characteristics of starches of two sets of near-isogenic wheat lines with different amylose content. Starch/Stärke 60, 34–40.
- Zhao, X.C., Sharp, P.J., 1996: An improved 1-D SDS-PAGE method for the identification of three bread wheat waxy proteins. Journal of Cereal Science, 23: 191-193.

Kontaktní adresa: Ing. Václav Dvořáček, Ph.D., Genová banka, Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., 161 06 Praha 6 – Ruzyně, Drnovská 507; e-mail: dvoracek@vurv.cz

GENOFOND ČIROKU OBECNÉHO *SORGHUM BICOLOR* (L.) MOENCH A MOŽNOSTI JEHO VYUŽITÍ V PODMÍNKÁCH ČR

Utilization of *Sorghum bicolor* gene pool and its usage in the conditions of the Czech Republic

Hermuth J.¹, Janovská D.¹, Ust'ak S.²

¹ Oddělení genové banky, Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Praha

² Oddělení ekotoxikologie, Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., pracoviště Chomutov

Abstrakt

Čirok je jednou z nejdéle pěstovaných plodin. V současné době je jeho zrnová forma pátou nejpěstovanější obilovinou světa. Možnosti využití všech forem čiroku jsou velmi široké. V potravinářském průmyslu je využíván čirok cukrový pro výrobu sirupů, cukrovinek, lihu, lihových nápojů a piva, protože snadno a rychle zkvašuje. Velmi rozšířená je příprava kaší z mouky a krup. V průmyslu je využívána čiroková mouka pro výrobu lepidel, olejů a škrobu. V poslední době zaznamenává razantní nárůst v produkci bioplynu a etanolu. Čirok je dále vhodný jako kvalitní krmná plodina pro vysoký obsah cukrů, velmi dobrou stravitelnost a vysoký výnos zelené silážní hmoty. Varieta technického čiroku je surovinou pro výrobu kartáčů a košťat.

Klíčová slova: čirok, genetické zdroje, biomasa, potravinářství, novošlechtění

Abstract

Sorghum is one of the oldest grown crops. At present, it is one of the five most cultivated cereals in the world for human nutrition. Possibilities of their usage of all forms are very wide. In food industry is exploited Sorghum sugar for production syrups, confectionaries, spirit, spirituous drinks and beer, because easily and quickly ferment. Wide - spread is preparation pulp from flour and croup. Industrial usage sorghum flour is for production glues, oils and starch. Recently records penetrative growth in performance alcohol like firing from biomass. Sorghum is further fit like high - quality feeding product for high content sugars, very good digestibility and high decree green silage masses. Variety technical sorghum is raw material for production brushes and brooms.

Key words: sorghum, genetic resources, biomass production, food industry, new variety

Úvod

Možnosti využití všech forem čiroků jsou velmi široké. V potravinářském průmyslu je využíván čirok cukrový pro výrobu sirupů, cukrovinek, lihu, lihových nápojů a piva, protože snadno a rychle zkvašuje. Velmi rozšířená je příprava kaší z mouky a krup. Průmyslové využití čirokové mouky je pro výrobu lepidel, olejů a škrobu (Martin and MacMasters, 1952). V poslední době zaznamenává razantní nárůst v produkci etanolu jako paliva z biomasy (Martin et al., 2006). Čirok je dále vhodný jako kvalitní krmná plodina pro vysoký obsah cukrů, velmi dobrou stravitelnost a vysoký výnos zelené silážní hmoty. Varieta technického čiroku je surovinou pro výrobu kartáčů a košťat. Pěstování čiroku je významné především v teplých, sušších oblastech, kde je pěstován zejména zrnový čirok, a kde je nejdůležitější složkou potravy obyvatel. Tradičně velký význam má pěstování čiroku v Africe, stejně tak v sušších oblastech Indie, Japonska, Středního východu. S intenzivními kulturami čiroku se setkáváme v jižní, střední a teplejší části Severní Ameriky, v Austrálii, jižní Evropě. Obilky čiroku zbavené pluch se připravují buď v celku, nebo se z nich častěji mele mouka, která je vhodná především pro přípravu kaší. Z obilky čiroku se také připravuje čirokové pivo, které je

oblíbené nejen pro svou opojnost, ale i jako zdroj vitamínů skupiny B, kterých je v některých oblastech pěstování čiroku nedostatek. Podobně jako z jiných obilnin i z obilek čiroku je možné vyrábět líh. V oblastech jeho pěstování jsou obilky čiroku i významným krmivem pro drůbež i výkrm prasat. Hlavními světovými producenty zrnového čiroku jsou Spojené státy, Nigerie, Indie, Mexiko, Súdán (Holec et al., 2011).

V posledních letech je patrný posun pěstování čiroku i do severnějších oblastí (Francie, Maďarsko), kde existují programy šlechtění hybridů čiroků. Šlechtí se zejména na chladuvzdornost, ranost a snížení obsahu antinutričních látek v obilkách (Rajki-Siklósi, 1993). Tak se nabízí větší možnost jeho využití v Evropě k potravinářským účelům, což se dosud dělo jen v omezené míře. Lysin v běžných genotypech čiroku představuje v rozvojových zemích téměř 40 % doporučené dávky této esenciální aminokyseliny pro děti pro správný růst a vývin organismu. Vysokolysinové genotypy mají zastoupení lysinu vyšší a i celkové složení aminokyselin nutričně příznivější (Serna-Saldivar and Rooney, 1995). Obsahy jednotlivých látek mohou být značně rozdílné podle místa pěstování a pěstitelské praxe. Například obsah bílkovin silně ovlivňuje hnojení dusíkem. Zvyšuje zejména podíl prolaminové frakce, která se u čiroků nazývá kafirin. Tato frakce je chudá na lysin, arginin, histidin a tryptofan, naopak obsahuje hodně prolinu a glutaminu. Rajki-Siklósi (1993) uvádí obsah bílkovin v znu zrnového čiroku v podmínkách Maďarska 10,0 – 10,7 %. Jako negativní vlastnost se uvádí obsah taninu (proanthokyanidinu) a některých dalších antinutričních látek, které mohou nepříznivě ovlivňovat stravitelnost. Trísloviny totiž reagují s bílkovinami potravy, trávicími enzymy i bílkovinami střevní sliznice. Zrno těchto odrůd by se nemělo používat pro krmení mladé drůbeže, u které může způsobovat zpomalení růstu. Obsah škrobu je podobný jako u kukuřice okolo 70 %, obsah bílkovin 8 – 16 %, tuku 3,3 %, popelovin 1,9 % a hrubé vlákniny 1,9 % (Jambunathan and Subramanian, 1988). Zájem o pěstování čiroku ve střední Evropě roste s ohledem na oteplování klimatu, možnosti využití ke krmným účelům a v lidské výživě pro možnost jeho uplatnění v bezlepkové dietě. Z tohoto pohledu je významné zastoupení jednotlivých frakcí bílkovin zrna čiroku, protože celiakálně toxické sekvence aminokyselin jsou přítomné v prolaminové frakci. Existují genotypové rozdíly, kdy odrůdy čiroku zrnového vykazují ve srovnání s čirokem cukrovým příznivější složení bílkovinných frakcí, vyšší zastoupení nutričně hodnotných albuminů a globulinů a nižší zastoupení prolaminů. Výsledky imunologického hodnocení množství prolaminů (ELISA) u sledovaných odrůd čiroků prokázaly, že byly hluboko pod limitem pro bezlepkovou dietu (max. 10 mg gliadinů – prolaminů) na 100 g vzorku (Petr et al., 2003). Klinickým testováním se potvrdila možnost bezproblémového využití čiroku pro dietu při celiakii.

V současné době se v ČR, po vzoru Německa a Rakouska, využívá nejvíce pro výrobu bioplynu kukuřice. S ohledem na potřebu zvýšení biodiverzity pěstovaných zemědělských plodin a zamezení negativních vlivů této plodiny na životní prostředí, zejména při opakovaném pěstování na stejném místě, jsou zemědělským výzkumem a následně i praxí vyhledávány vhodné alternativy. Velmi vhodnou alternativou pro výrobu bioplynu se jeví čirok. Podobně jako kukuřice, čirok poskytuje vysoké výnosy nadzemní biomasy, vhodné pro silážování a následnou produkci bioplynu. Na rozdíl od kukuřice je čirok odolnější k suchu, a proto je vhodnější pro pěstování na lehčích půdách a do suchých oblastí. S ohledem na klimatické změny bude pěstování čiroku v ČR nabývat na významu (Podrábský, 2008).

Materiál a metody

V roce 2009 a 2010 pracovníci Genové banky ve VÚRV, v.v.i., uskutečnili polní experimenty s vybranými materiály čiroku. Pokus byl vyšetřován na parcelách o ploše 4,5m² ve třech opakováních. Hodnocené odrůdy čiroku jsou komerční materiály a byly vybrány na základě doporučení firmy Seed Service, která se zabývá introdukcí čiroků do ČR. Další materiály byly dodány osivářskými firmami Saatbau Linz a Syngenta. Některé genotypy čiroků byly získány z genové banky - kolekce genetických zdrojů čiroků.

Výsledky a diskuze

Získané informace jsou zahrnuty v následujících tabulkách 1- 4 a textu.

Tab.1 Hodnocené parametry biomasy u čiroku; průměrná data z let 2009-2010

	Výška (cm)	Biomasa (kg/m ²)	Obsah základních živin v % sušiny				
			N	P	K	Ca	Mg
Goliath	228,67±22,27	10,10±0,93	1,82±0,40	0,25±0,08	3,41±1,24	0,70±0,09	0,25±0,02
Sucrosorgo 506	209,50±24,34	8,62±2,16	1,87±0,29	0,26±0,07	3,40±0,97	0,69±0,12	0,24±0,03
Nutri Honey	199,33±20,85	7,18±1,37	1,75±0,37	0,23±0,05	2,58±0,71	0,65±0,11	0,23±0,03
Latte	197,67±25,01	7,96±3,60	1,70±0,55	0,25±0,06	2,92±1,09	0,63±0,09	0,22±0,04
Honey Graze BMR	194,83±14,80	5,60±1,46	1,83±0,53	0,23±0,08	3,52±1,79	0,76±0,05	0,24±0,04
Big Kahuna BMR	173,17±30,04	6,71±2,25	2,17±0,37	0,29±0,08	3,66±0,73	0,82±0,06	0,28±0,02

Goliath – raný hybrid, vhodný pro bioplynové stanice

Sucrosorgo 506 – hybrid, dává vysoké výnosy zelené hmoty i na stanovištích nevhodných pro silážní kukuřici

Nutri Honey – hybrid čiroku a súdánské trávy, vhodný pro píce i ke spásání

Latte – krmná odrůda, vysoká odolnost k suchu

Honey Graze BMR – hybrid vhodný pro výrobu senáže, sena, zeleného krmení či pastvy; nižší obsah ligninu

Big Kahuna BMR – hybrid vhodný pro siláž, fotoperiodicky citlivý ke krátkému dni

Při využití zelené hmoty je v případě sečení v období do začátku metání obsah bílkovin v píce velmi vysoký, srovnatelný s obsahem v mladých travách nebo horší vojtěšce. V uvedené růstové fázi mají rostliny vysoký obsah rozpustné vlákniny, které se stárnutím rostlin postupně ubývá a ředí se i obsah bílkovin. K výrazné lignifikaci dochází v době odkvétání rostlin.

Tab.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 $P \leq 0,05$

Dle údajů ze sousedního Německa dosahovaly výnosy suché hmoty při sklizni na siláž u různých odrůd a hybridů čiroků hodnot 9 - 22 t z 1 ha, přičemž nejvyšších výnosů obvykle dosahoval hybrid čiroku zrnového a súdánské trávy. Výhodou kříženců čiroku zrnového a súdánské trávy je obvykle vyšší produkce jakostní zelené hmoty, která v pozdějších růstových fázích nedřevnatí, a proto je vhodnější pro silážování a následnou produkci bioplynu.

Naše vlastní experimentální hodnocení chemického složení a fermentačních schopností rozsáhlé kolekce genotypů čiroků svědčí o vysoké variabilitě jak chemického složení, tak i produkce bioplynu mezi jednotlivými odrůdami a hybridy. Tento fakt zdůrazňuje potřebu pečlivého výběru vhodných odrůd na základě testování rozsáhlých kolekcí, který v současné době provádí VÚRV, v.v.i. Na základě souhrnného hodnocení vlastních a literárních výsledků byla sestavena následující tabulka variability obsahu základních složek biomasy čiroků ovlivňujících kvalitu silážování a následnou produkci bioplynu, a to ve srovnání s kukuřicí. Z tabulky je vidět, že čiroky obvykle obsahují více popela (cca o 50 %), vlákniny (o cca 60 %), ligninu (o cca 30 %) a méně proteinů (o cca 8 %) a tuků (o cca 30 %). Toto je důvodem nižších výtěžků metanu a bioplynu z čiroků (především hybridů) ve srovnání s kukuřicí (o cca 6-16 %). Bez ohledu na nižší výtěžnost bioplynu ve srovnání s kukuřicí lze z 1 ha čiroku získat stejné množství nebo i více bioplynu, zejména metanu jako hlavní energetické složky, a to díky vyšším průměrným výnosům sušiny biomasy. Pro dosažení vyšších výnosů však potřebujeme pečlivě vybrat vhodné odrůdy a dodržet veškeré požadavky agrotechniky. V podmínkách ČR jsou důležité především rané odrůdy čiroku.

Průběh silážování a fermentace u kukuřice a čiroků je rovněž odlišný – proces má delší náběh a je pomalejší. Důvodem je vyšší obsah polyfenolických látek u čiroků (zejména taninu), což má za následek inhibiční činnosti mikroorganismů a zpomalení fermentačních procesů, v některých případech až zastavení fermentačních procesů. Jelikož anaerobní fermentace obvykle docela účinně odstraňuje polyfenolické látky přirozeného původu, tak po ukončení bioplynování je docílen jejich rozklad, metanogenní mikroorganismy však vyžadují adaptaci na siláž z čiroků. Tohoto lze docílit postupným přidáváním čiroků ve směsi s kukuřicí nebo je třeba počítat s iniciační podporou adaptačních procesů přidáním kvalitnějších surovin při náběhu zpracování siláží čiroku (např. přidáním kukuřičného jádra, CCM nebo GPS obilovin). Po nastartování normálního průběhu bioplynové fermentace další

dávky siláže čiroků nevyžadují podporu. Dalším východiskem je cílený výběr odrůd a hybridů čiroku s nižším obsahem inhibičních látek.

Tab. 3 Průměrné hodnoty složení biomasy čiroků, výtěžků bioplynu a hektarových výnosů sušiny biomasy a bioplynu ve srovnání s kukuřicí.

Parametr	Čirok	Kukuřice
Popel, % suš.	6 - 12	4 – 8
Hrubý protein, % suš.	5 - 9	6 – 9
Cukry celkové, %	8 - 18	8 – 18
Hrubý tuk, % suš.	1 - 3	2 - 4
Hrubá vláknina, % suš.	32 - 44	20 - 28
Neutrálně detergenční vláknina (NDF), % suš.	48 - 62	32 - 44
Hemicelulóza, % suš.	12 - 18	12 - 16
Lignin, % suš.	3 - 6	2 - 5
Ztráty sušiny při silážování, %	2 - 8	2 - 6
Výtěžnost bioplynu, Nm ³ .t ⁻¹ suš.	420 - 620	400 - 710
Koncentrace metanu, %	52 - 55	52 - 55
Výtěžnost metanu, Nm ³ .t ⁻¹ suš.	220 - 340	210 - 390
Výtěžnost metanu, Nm ³ .t ⁻¹ org.suš.	240 - 380	230 – 440
Průměrné výnosy sušiny biomasy, t.ha ⁻¹	9 – 22	8 – 18
Výnos metanu, Nm ³ .ha ⁻¹	2000 – 7500	1700 – 7000

Problematika šlechtění čiroků v podmínkách mírného pásma je zaměřena na odolnost proti nízkým teplotám. V posledních letech je patrný posun pěstování čiroku i do severnějších oblastí (Francie, Maďarsko), kde existují programy šlechtění hybridů čiroků. Šlechtí se zejména na chladuvzdornost, ranost a snížení obsahu antinutričních látek v obilkách. Nabízí se větší možnost jeho využití v Evropě k potravinářským účelům, což se dosud dělo jen v omezené míře. Šlechtění je pro jednotlivé druhy čiroků rozdílné a provádí se podle užitkového směru jednotlivých druhů. Je nutné v úvodu předeslat, že v současné době šlechtění čiroků v České republice neprobíhá, máme zde pouze introdukce materiálů ze zemí, kde jsou šlechtitelské programy čiroku podporovány. Zrnové čiroky mají pro naše poměry dlouhé vegetační období. Při výběru odrůd (sort) zrnového čiroku volíme ty s nejkratším vegetačním obdobím. Jeden z nejdůležitějších cílů šlechtění je co nejvíce zkrátit vegetační období. Kromě toho velmi důležitou vlastností je chemické složení zrna, které má co nejvíce vyhovovat pěstitelskému směru. Při použití zrna pro potravinářské účely je důležitý tvar zrna a jeho velikost. Zrno pro potravinářské a krmivářské účely může znehodnocovat a snižovat také vysoký obsah taninu. Proto jeden z důležitých cílů v rámci šlechtění zrnových čiroků je získání materiálů prostých těchto antinutričních látek. Velmi důležitou úlohu při šlechtění hraje i výška, kdy nižší porosty usnadňují proces mechanizované sklizně.

Jak již bylo v úvodu zmíněno, zrnové čiroky – hybridy jsou k nám v současné době dováženy a nabízeny prostřednictvím osivářských firem, např. SEED SERVICE. Pracoviště Genové banky ve Výzkumném ústavu rostlinné výroby, v.v.i., se také zabývá hodnocením a introdukci potencionálních genotypů čiroků, které by byly vhodné do pěstitelských podmínek ČR. Tyto materiály jsou získávány z genových bank a univerzitních pracovišť z Evropy,

USA, Austrálie, Asie atd. Jsou to nehybridní materiály, které jsou každý rok odzkoušeny v polních pokusech na lokalitě Praha – Ruzyně. Výsledkem těchto pozorování je každoroční získání nových originálních dat s důležitou vypovídající schopností pro uplatnění nových introdukovaných genotypů do našich zeměpisných a pěstitelských podmínek. Tyto nově odzkoušené a popsané genetické zdroje čiroků, jsou uloženy v genové bance za definovaných podmínek a stávají se zdrojem genetického materiálu pro potencionální šlechtitelské programy v této oblasti.

Tab. 4 Přehled odzkoušených zrnových genotypů čiroků ve VÚRV Praha – Ruzyně

Dopěstované nové genotypy čiroků	Nevzešlé genotypy čiroků	Nevymetané genotypy čiroků	Nedozrálé genotypy čiroků	Celkem vyšetých položek
²⁰¹⁰ 59 (34,8 %)	38 (22,3 %)	7 (4,1 %)	66 (38,8 %)	170 (100 %)
²⁰¹¹ 58 (38,4 %)	7 (4,6 %)	8 (5,3 %)	78 (51,7 %)	151 (100 %)

Z přehledu je patrné, že propad materiálu je značný. Každý rok se podařilo sklidit zralé obilky u cca 30 – 40%, ale jsou to genotypy, které prokázaly životaschopnost v pěstitelských podmínkách dané lokality. Tyto materiály je dále potřeba zkoušet, rajonizovat a propracovávat jejich agrotechniku.

Závěr

Prvním slibným výsledkem je podání žádosti o registraci odrůdy a žádosti o udělení ochranných práv. Odrůda byla na pracovišti genové banky vyšlechtěna na základě řady pozitivních a negativních výběrů z populace, která je vedena pod označením ECN 01Z1800017 (449 Holubec). Tato odrůda je druhým rokem hodnocena ve zkouškách DUS, které organizuje ÚKZÚZ Brno. Na základě zkoušek užitné hodnoty ze sklizně 2012, které provádí ÚKZÚZ – Národní odrůdový úřad se jeví tento materiál jako perspektivní. Odrůda po prvním roce zkoušení byla bez připomínek, vyhověla požadavkům na odlišnost a uniformitu.

Dedikace

Tato práce vznikla za podpory MZe ČR „Národní program konzervace a využívání genetických zdrojů kulturních rostlin a agro-biodiversity“, č.j. MZe ČR 206553/2011-17253 a Výzkumného záměru MZe ČR 0002700604

Použitá literatura

- Holec, J., Hamouz, P., Jursík, M., Brant, V., 2011: Čirok – charakteristika, hospodářský význam a příbuzné druhy. Agromanuál, 6, 50 – 52.
- Jambunathan, R., Subramanian, V., 1988: Grain quality and utilisation of sorghum and pearl millet. In: Biotechnology workshop, Pantacheru, India, Pantacheru ICRISAT, 12-15 January 1988, 133-139.
- Martin, J. H., MacMasters, M. M., 1952: Industrial uses for grain sorghum. USDA Yearbook 1950 – 51, 349 – 352.

- Martin, J. H., Waldren, R. P., Stamp, D. L., 2006: Principles of Field Crop Production. Upper Saddle River, New Jersey Columbus, Ohio, 954.
- Petr, J., Michalík, I., Tlaskalová, H., Capouchová, I., Faměra, O., Urminská, D., Tučková, L., Knoblochová, H., 2003: Extension of the Spectra of Plant Products for the Diet in Coeliac Disease. Czech J. Food Sci. 21 (2), 8-15.
- Podrábský, M., 2008: Nový hybrid široku se súdánskou trávou. Agromanuál, 3, 36 – 37.
- Rajki-Siklósi, E., 1993: Grain sorghum and silage sorghum breeding objectives. XVI. Maize and Sorghum. Eucarpia Conf. Bergamo, 173-188.
- Serna-Saldivar, S., Rooney, L. W., 1995: Structure and chemistry of sorghum and millets. In: Dendy, D.A.V. (ed.): Sorghum and Millets. Chemistry and Technology. Am. Assoc. Of Cereal Chemists. St. Paul, Minnesota, 69 – 124.

Kontaktní adresa: Ing. Jiří Hermuth, Genová banka, Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., 161 06 Praha 6 – Ruzyně, Drnovská 507; e-mail: hermuth@vurv.cz

VÝSLEDKY EXPEDICE NA KAMČATKU 2013: VÝZKUM GENETICKÝCH ZDROJŮ ZIMOLEZU *LONICERA KAMTSCHATICA* TURCZ.

Results of expedition to Kamchatka: honeysuckle (*Lonicera kamtschatica* Turcz.)
germplasm research

Holubec V.¹, Smekalova T.²

¹Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Praha

²VIR Sankt Peterburg, Rusko

Abstrakt

Zimolez, *Lonicera kamtschatica* z agregátu *L. caerulea* L. s.l. je velmi perspektivní ovoce a jeho sladkoplodé odrůdy i plané genetické zdroje jsou významné pro šlechtění. V rámci česko-ruského bilaterálního projektu byla v roce 2013 podniknuta výzkumná expedice do severní části areálu výskytu sladkoplodých zimolezů, na poloostrov Kamčatka. Nalezené lokality byly charakterizovány z ekologicky a vegetačně, byly zapsány fytoocenologické snímky a posouzeny faktory ohrožení nezbytné pro plánování *in situ* konzervace. V rámci populací byla provedena selekce perspektivních materiálů pro ovocné využití, byly provedeny odběry generativního i vegetativního materiálu pro další výzkum a šlechtění.

Klíčová slova: zimolez, genetické zdroje, ovoce, konzervace, *in situ*, ohrožení

Abstract

Honeysuckle, *Lonicera kamtschatica* from the aggregate *L. caerulea* L. s.l. is very promising fruit and its sweet-fruit cultivars and wild genetic resources are important for breeding. Based on the Czech–Russian bilateral project a research expedition was undertaken to the northern area of distribution of the sweet-fruited honeysuckles to Kamchatka in 2013. Found localities were characterised ecologically and from the point of vegetation, phytosociological relevés were noted and threat factors were assessed as prerequisite for *in situ* conservation planning. Selection of the most promising materials for fruits was done within populations and generative and vegetative material was sampled for further use in taxonomic research and breeding.

Key words: honeysuckle, genetic resources, fruits, conservation, *in situ*, threat

Úvod

Kamčatka na Dálném východě představuje významný reservoir řady druhů drobného ovoce, z nichž dva druhy jsou ekonomicky velmi významné, jsou běžně sbírány domorodci a prodávány na trhu. Největší podíl má zimolez (*Lonicera kamtschatica*) a dále brusnice klapovka (*Vaccinium praestans*). Modroplodý zimolez (*Lonicera kamtschatica*) je chuťově blízký borůvkám a v našich podmínkách představuje neranější ovoce zrající před jahodami. Nutričně patří mezi nejvyšší ovoce, které je užívané rovněž v léčitelství.

Modrý zimolez už popsal v předlinneovském období Clusius (1583). Linné uvedl popis *Lonicera caerulea* v Species Plantarum (1753). Monograf rodu *Lonicera* - Rehder (1903) ustanovil podsekcí *Caeruleae* Rehd. a zmínil, že zahrnuje možná jen jediný, ale polymorfní druh *Lonicera caerulea* L. s množstvím subspecií. Pojarkova ve Floře SSSR (1958) uvádí 4 známé druhy (*L. caerulea*, *L. altaica*, *L. pallasii*, *L. edulis*) a popisuje z území Svazu 6 dalších druhů subsekcí *Caerulea* (*L. stenantha*, *L. bushiorum*, *L. baltica*, *L. turczaninowii*, *L. kamtschatica* a *L. iliensis*). Skvorcov a Kuklina (2002) konstatují, že lze vyčlenit jen 2 druhy v subsekcí *Caerulea* a to *L. caerulea* a *L. iliensis* a ostatní lze považovat za variabilitu v rámci polymorfního druhu, nebo uvažovat je jen na úrovni subspecifické. V rámci druhu *L. caerulea* lze nalézt sladkoplodé mutace, které byly již využity jako ovocné kultivary především v

Rusku. Výhradně sladkoplodé druhy se nacházejí jen na Dálném Východě na poloostrově Kamčatka, na Sachalinu a Kurilských ostrovech (Položij, 1996; Vorobiev et al., 1974; Charkevič a Čerepanov, 1981) a jsou to druhy *L. edulis* a *L. kamschatica*. Vzhledem k tomu, že zimolez je významné perspektivní ovoce s velkým šlechtitelským potenciálem, je žádoucí provádět výzkum genetických zdrojů, z hlediska morfologie, obsahového složení, kvality plodů a v neposlední řadě i konzervace genofondu *in situ*. Je nutné zajistit spolehlivé rozlišení druhů v rámci agregátu *Lonicera caerulea*, neboť řada kvalitativních znaků je vázána právě na tyto druhy. Projekt zahraniční spolupráce Kontakt „Taxonomické, evoluční a fytochemické otázky komplexu *Lonicera kamschatica/caerulea* jako genetického zdroje nového ovoce a potřeby jeho *in situ* konzervace“ řeší tuto problematiku s cílem přijmout nebo vyvrátit hypotézu o právoplatnosti malých druhů. V prvním roce řešení byla podniknuta výzkumná expedice do jižní části areálu výskytu sladkoplodých zimolezů, na ostrov Sachalin.

Materiál a metody

Z herbářových (VIR a LE) a literárních údajů byly získány informace o výskytu *Lonicera kamschatica*. Dále byly získány informace o výskytu populací zimolezu od místních sběračů. Trasa expedice byla naplánována s cílem pokrýt velký areál výskytu a prozkoumat nejsilnější populace, které nebyly v minulosti autorským kolektivem navštíveny. Expedice proběhla v jižní a střední části poloostrova v termínu 14-23.7.2013. Během pobytu bylo navštíveno 13 lokalit, přičemž položky vhodné ke sběru byly nalezeny na 7 lokalitách. Načasování bylo stanoveno podle informací zralosti plodů ve středních a nižších polohách na Kamčatce. Východiskem bylo hlavní město ostrova Petropavlovsk Kamčatskij. Trasa zahrnovala očekávané lokality a místa doporučená místními obyvateli. Jednotlivé lokality s výskytem zimolezu byly zaměřeny přístrojem GPS. Každá lokalita byla charakterizována z hlediska přírodních podmínek a vegetace. Na vybrané reprezentativní ploše 4x4 m byly zapsány fytoecologické snímky při užití Braun-Blanquetovy kombinované stupnice abundance/dominance (Prach, 1994). Dále byla zaznamenána velikost a hustota populace zimolezu, ohroženost a faktory možného ohrožení.

Z každé lokality/populace bylo vybráno 2-8 keřů podle kvality přítomných plodů. Od každé vybrané rostliny byly odebrány větvičky s plody do herbáře pro VÚRV i VIR (Obr.1).



Obr. 1. Sběr řízků, roubů a herbářových položek *Lonicera kamschatica* na poloostrově Kamčatka.

Řízky a výhony byly uloženy odděleně ve svazcích od každého vybraného keře do mikrotenových sáčků a každý vzorek představoval 5-8 větvíček. U těchto rostlin byla zaznamenána biometrická data (morfologické znaky: tvar trsu, tvar velikost listů, odění výhonů, tvar a velikost plodů, organoleptické znaky: kyselost, sladkost a hořkost). Biometrické a organoleptické znaky byly stanoveny na místě z 20 odebraných plodů na keři.

Výsledky a diskuze

Lokality zimolezu (*Lonicera kamtschatica*) na Kamčatce a ekologická charakteristika

lokalita č. 1 Avačinskaja suchaja rečka, rajon Elizovo. JV Kamčatka

Habitat: údolí suchého potoka na úbočí sopky Avača nad osadou Mutnoj,

Ekologie: křovinaté světliny březového lesa. Geologie: Šedá půda a vulkanický písek na vulkanických sedimentech. Inklinace: 10° JZ

Lat. N53°13'41,2", Lon. E158°32'18,5", Alt. 148 m, Datum: 15.07.2013

Hojnost výskytu zimolezu: hojný výskyt keřů na volných plochách a na okraji lesa.

Charakteristika rostlin: vzpřímené až poléhavé keře 70-120 cm výšky, listy velké oválné sytě zelené, plody ve stádiu konce plodnosti (Obr. 2). Zdravotní stav: dobrý.

Sběrové číslo zimolezu: 1-5



Obr. 3 Extremní tvary plodů *Lonicera kamtschatica* z lokality Avačinskaja Suchaja rečka, JV Kamčatka (hranolovitý).

lokalita č. 2 Sot Družba, 3 km od Teploe ozero, rajon Elizovo. JV Kamčatka

Habitat: březový les u chatové osady, ovlivněn lidskou činností.

Ekologie: řídký les *Betula ermannii* s křovinatým podrostem.

Geologie: Vulkanické horniny překryté organickým opadem. Inklinace: 30°

Lat. N53°16'59,7", Lon. E158°27'08,0", Alt. 159 m. Datum: 15.07.2013

Hojnost výskytu zimolezu: velká populace zimolezů v řídkém lese s podrostem křovin *Pinus pumila* a *Lonicera chamissoi*.

Charakteristika rostlin: Keře velké, vzpřímené až vystoupavé 100-150 cm vysoké, po hlavní plodnosti. Zdravotní stav: silné napadení červci na větvíčkách.

Sběrové číslo zimolezu: 6-10

lokalita č. 3 Apača, J Kamčatka.

Habitat: okraj lesa a údolní louka podél řeky jižně od osady Apača.

Ekologie: smíšený les s olšemi, místně, podmáčený, vysokostébelná orchidejová louka

Geologie: kamenitá podzolovaná půda na štěrkových náplavech. Inklinace: 0° široké ploché údolí

Lat. N52°54'25,8", Lon. E157°01'43,73", Alt. 100 m. Datum: 16.07.2013

Hojnost výskytu zimolezu: roztroušené slabší keře na okraji lesa a v louce spolu s červenoplodým druhem *Lonicera chamissoi*. Charakteristika rostlin: vzpřímené keře 70-100 cm, bez plodů. Rostliny nebyly vhodné pro hodnocení a selekci.

Sběrové číslo zimolezu: 0

lokalita č. 4 Dolinovka, C. Kamčatka.

Habitat: lokalita východně od obce Dolinovka, střední Kamčatka.

Ekologie: křoviny podél silnice *Lonicera chamissoi* a *L. kamtschatica*

Geologie: organická lesní půda na pemzových sopečných sedimentech. Inklinace: 0° široké ploché údolí

Lat. N55°07'47,7", Lon. E158°56'06,2", Alt. 147 m. Datum: 17.07.2013

Hojnost výskytu zimolezu: dominující výskyt červenoplodého zimolezu a slabší keře *L. kamtschatica*.

Charakteristika rostlin: polovzpřímené keře 50-80 cm, bez plodů,

Odběr semen a roubů pouze *L. chamissoi*.

lokalita č. 5 Dolinovka, C. Kamčatka.

Habitat: lokalita JV od obce Dolinovka, střední Kamčatka.

Ekologie: křoviny v prostoru vykáceného modřínového lesa *Larix gmelinii*.

Geologie: organická lesní půda na pemzových sopečných sedimentech. Inklinace: 0° široká plošina.

Lat. N55°06'49,0", Lon. E159°02'55,3", Alt. 157 m. Datum: 17.07.2013

Hojnost výskytu zimolezu: velmi silná populace *L. kamtschatica*, dominující výskyt v keřové vegetaci.

Charakteristika rostlin: polovzpřímené keře 70-100 cm, po hlavní plodnosti. Velká diversita morfologických a plodových znaků. Odběr semen a roubů.

Sběrové číslo zimolezu: 11-18

lokalita č. 7 Pinočevo, rajon Elizovo, JV Kamčatka.

Habitat: 15 km od silnice podél suché říčky v areálu sopky Avača, světliny v lese

Ekologie: otevřený les *Betula ermannii* a lesní světliny s bohatým keřovitým a bylinným podrostem.

Geologie: organická lesní půda na vulkanických horninách. Inklinace: 10° JZ, Lat. N53°22'01,1", Lon. E158°23'59,4", Alt. 227 m. Datum: 18.07.2013

Hojnost výskytu zimolezu: hojný výskyt zejména na světlinách. Charakteristika rostlin: vzpřímené keře 80-120 cm, po hlavní plodnosti, přetrvávají jednotlivé plody.

Sběrové číslo zimolezu: 19

lokalita č. 8 Pinočevo, rajon Elizovo, JV Kamčatka.

Habitat: les u silnice při ústí potoka do suché řeky, světliny v lese

Ekologie: otevřený les *Betula ermannii* a lesní světliny s bohatým keřovitým a bylinným podrostem. Geologie: organická lesní půda na vulkanických horninách. Inklinace: 10° JZ, Lat. N53°20'57,7", Lon. E158°22'40,4", Alt. 146 m. Datum: 18.07.2013

Hojnost výskytu zimolezu: hojný výskyt zejména na světlinách. Charakteristika rostlin: vzpřímené keře 100-130 cm, po hlavní plodnosti, přetrvávají jednotlivé plody.

Sběrové číslo zimolezu: 20

lokalita č. 12 Bambeška, 5 km V od Petropavlovsk-Kamčatskij, rajon P-Kamčatskij, JV Kamčatka.

Habitat: v keřovitém porostu olše kamčatské na okraji březového lesa v blízkosti Tichého oceánu

Ekologie: parkové křoviny *Alnus kamtschatica* (*A. fruticosa*) s vysokostébelnou luční vegetací.

Geologie: náplavy vulkanických hornin na terase nad Tichým oceánem. Inklinace: 0° , Lat. N53°06'07,7", Lon. E158°44'49,9", Alt. 189 m. Datum: 21.07.2013

Hojnost výskytu zimolezu: hojný výskyt velkých keřů. Charakteristika rostlin: vzpřímené až vystoupavé keře 80-120 cm, v plné plodnosti, velká diversita morfologických a plodových znaků (Obr. 3).

Sběrové číslo zimolezu: 21-25



Obr. 3 Extremní tvary plodů *Lonicera kamtschatica* z lokality Bambeška, JV Kamčatka (dlouze vřetenovitý).

lokalita č. 13 Pobřeží Tichého oceánu, 10 km V od Petropavlovsk-Kamčatskij, rajon P-Kamčatskij, JV Kamčatka.

Habitat: stare duny na pobřeží

Ekologie: duny zarostlé keřovou a bylinnou vegetací, převažující *Rosa rugosa*, *Lonicera caerulea*.

Geologie: černý vulkanický písek. Inklinace: 0° , Lat. N53°00'24,5", Lon. E158°52'21,7", Alt. 9 m. Datum: 22.07.2013

Hojnost výskytu zimolezu: roztroušený výskyt v prohlubních mezi dunami. Charakteristika rostlin: pouze plazivé malé keře 20-50 cm, v plné plodnosti a zelené zralosti.

Sběrové číslo zimolezu: 26

Fytocenologické snímky

V navštívené oblasti Kamčatky byl prověřován výskyt zimolezů na 13 lokalitách. Z toho na 7 lokalitách byly rostliny dobře zapložené a bylo možno provádět hodnocení. Bylo zapsáno 9 fytocenologických snímků.

Na lokalitách rajonu Elizovo (Suchaja rečka, Sot Družba, Pinočevo) byla podobná vegetace. Lokality se nacházejí ve vzdálenosti do 30 km od sebe. Geologickým podkladem jsou šterkové uloženiny vulkanického popela místy s pemzou, překryté organickým opadem. Lokality vegetačně představují boreální les kamenné břízy *Betula ermannii* s bohatým podrostem keřů a bylin. Les je na řadě míst vykácen a tyto paseky okupuje vysokostébelná křovinatá louka. V keřovém patře je dominantní *Rosa* sp. *Lonicera* spp a *Spiraea beauverdiana* Rod *Lonicera* zde zahrnuje dva druhy *Lonicera kamtschatica* z komplexu *L. coerulea* a červenoplodý *L. chamissoi*. Výskyt zimolezu je zde poměrně hojný, keře jsou zpravidla vzpřímené až vystoupavé s přikořeňujícími dolními větvemi. U velmi starých jedinců vzniká polykormon, který posléze dává vznik dceřiným rostlinám.

Lokality v oblasti Dolinovka ve střední Kamčatce představovaly širokou plošinu mezi Středokamčatským hřbetem a pásmem vulkánů za východním pobřežím poloostrova. Geologicky se jednalo o náplavy řeky Kamčatky složené převážně z vulkanických hornin. Lokality vegetačně představují boreální les modřínu (*Larix gmelinii* a *L. sibirica*) a kamenné břízy (*Betula ermannii*) s bohatým podrostem keřů a bylin. Les je na řadě míst vykácen a tyto paseky okupuje vysokostébelná křovinatá louka. Objevují se zde prvky vysoké bylinné vegetace (vysokotravje) s *Filipendula kamtschatica* a *Senecio cannabifolius*. Rod *Lonicera* zde opět zahrnuje dva druhy *Lonicera kamtschatica* z komplexu *L. coerulea* a červenoplodý *L. chamissoi*. Výskyt zimolezu je zde velmi hojný, keře jsou zpravidla vystoupavé a poléhavé s přikořeňujícími dolními větvemi.

Výskyt zimolezu byl zaznamenán i na pobřeží Tichého oceánu ve starých dunách tvořených černým vulkanickým pískem. Rostliny zimolezu byly poléhavé, často tvořeny polykormony. Tyto rostliny byly v zelené zralosti.

Sběr materiálu

Během expedice byly sbírány zralé plody jako semenné položky, vegetativní části pro využití jako herbářové doklady, na rouby, řízky, *in vitro* množení a listy na molekulární analýzy. Bylo sebráno 26 vzorků zimolezu *Lonicera kamtschatica*, 2 vzorky *Lonicera chamissoi* a z dalších ovocných druhů 1 vzorek *Vaccinium praestans*, celkem 27 ovocných druhů.

Hodnocení rostlin v terénu

Na lokalitách v terénu byly vybírány rostliny pro odběr vegetativního vzorku na základě kvality a velikosti přítomných plodů a morfologických znaků plodů a keřů a pro zajištění různorodosti ve znacích. U těchto rostlin byly zapsány hodnoty morfologických a organoleptických znaků v terénu a následně při zakládání do herbáře. Délka a šířka listů byla měřena z odebraných větvíček pro herbář na 6-10 listech po odběru. Délka a šířka plodů byla měřena na 20 plodech, dále byla měřena hmotnost 20 plodů.

Velikost rostliny a tvar trsu závisel na půdně - geologickém podkladu, zástinu a na dostupnosti vody. Keře v řídkém lesním porostu byly řídké s několika větvemi a středně vysoké. Keře na písčích a organických půdách byly shodně poléhavé až plazivé, většinou nízké. Největší keře byly na lokalitě Bambeška. Největší variabilita materiálu ve všech znacích byla ve velkých populacích na lokalitách Dolinovka a Bambeška. Rostliny s největšími plody byly nalezeny na lokalitě Sot Družba (27 mm délky). Na lokalitě Bambeška převažovaly keře s plody širšími a oválnými.

Z hlediska organoleptických znaků byla zjištěna velká variabilita na všech lokalitách. Většina testovaných plodů byla sladkokyselá, jen zřídka s mírně nahořklou chutí. Nebyly zjištěny plody jenom hořké, jako je tomu u *L. coerulea* v kontinentální Asii. Přítomnost nahořklých plodů na Kamčatce je spíše vzácná, na rozdíl od často nahořklých na ostrově Sachalin.

Posouzení ohroženosti

Přímé ohrožení lidskou činností, nehrozí, populace jsou v terénu, obvykle v lese, na kraji lesa, na pasekách. V době plodnosti jsou lokality navštěvovány nájedzy sběračů plodů pro prodej na trhu. Keře jsou poškozovány lámáním větví, zajižděním terénními auty. Další významné poškození je způsobováno medvědy, pro které plody jsou významnou sezónní potravní složkou.

Důvodem ohroženosti jsou pouze malé populace a jejich fragmentace – roztroušené populace v lesním porostu a na holinách.

Doporučení pro konzervaci

Lonicera je velmi perspektivní ovoce a jeho odrůdy i plané genetické zdroje významné pro šlechtění je třeba zahrnout do agrobiodiversity. Konzervace agrobiodiversity je však celosvětově v počátcích, přestože *in situ* konzervace byla již zahrnuta do CBD a ITPGRFA (Maxted et al., 2012). Účastníci expedice měli k dispozici lokality z herbářových sběrů v herbářích VIR Sankt Petěrburg a Botanického ústavu Komarova (LE) a získali informace od místních obyvatel a sběračů plodů. Výskyt zimolezu na Kamčatce je poměrně hojný na rozdíl od Sachalinu. Výskyt druhu *L. kamtschtica* je soustředěn vždy do vhodných podmínek keřo-stromové tajgy a je tak lokalizován do populací. Rozšíření populací je roztroušené po celé Kamčatce. Vyskytují se i malé populace, které jsou ohroženy fragmentací a genetickým driftem a ty by měly být adekvátním způsobem chráněny. V první fázi by ochrana měla mít charakter zvyšování povědomí (*public awareness*) o významu těchto genetických zdrojů a zabránění poškozování lokalit jakoukoliv lidskou destruktivní činností. Výhledově by bylo třeba uvažovat vhodné formě *in situ* konzervace.

Dedikace

Tato práce vznikla při řešení projektu MŠMT č. LH11134.

Použitá literatura

- Charkevič, S.S., Čerepanov, S.K., 1981: Opredelitel rastenij Kamčatskoj oblasti. Moskva, Nauka, 411.
- Maxted, N., Dulloo, M.E., Ford-Lloyd, B.V., Freese, L., Iriondo, J., Carvalho, M.A.A.P., 2012: Agrobiodiversity Conservation, CABI UK, 365.

- Pojarkova, A.I., 1958: Žimolost' – Lonicera L.//Flora SSSR, Moskva/Leningrad, vol. 23, 453–625.
- Položij, A.V., et al., 1996: Flora Sibiri 12: 128-133.
- Prach, K., 1994: Monitorování změn vegetace, metody a principy. Český ústav ochrany přírody, Praha, 69.
- Rehder, A., 1903: Synopsis of the genus Lonicera. Ann. Rep. Missouri Bot. Gard. 14:27-232.
- Skvorcov, A. K., Kuklina, A.G., 2002: Golubye žimolosti. Nauka, Moskva, 160.
- Vorobiev, D.P., Vorošilov, V.N., Gurzenkov, N.N., Doronina, J.A, Egorova, E.M. Nečaeva, T.I., Probatova, N.S., Tolmačev, A.I., Černjaeva, A.M., 1974: Opredelitel vyšších rastenij Sachalina i Kurilskich ostrovov. Nauka, Leningrad, 373.

Kontaktní adresa: ing. Vojtěch Holubec, CSc., Genová banka, Výzkumný ústav rostlinné výroby v.v.i., 161 06 Praha 6 Ruzyně 507; e-mail: holubec@vurv.cz

VÝSLEDKY EXPEDICE DO ARGENTINY 2013: VÝZKUM PLANÝCH GENETICKÝCH ZDROJŮ A INTROGRESE Z KULTURNÍCH DRUHŮ

Results of expedition to Argentina 2013: research of crop wild relatives and introgression from cultivated crops

Holubec V.¹, Vymyslický T.², Poverene M.³, Cantamutto M.³

¹Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Praha

²Zemědělský výzkum, spol. s r. o., Troubsko

³Universidad Nacional del Sur, Bahia Blanca, Argentina

Abstrakt

Česko-Argentinský projekt na výzkum populací genetických zdrojů - planých příbuzných druhů, zplanělých druhů a hybridů s kulturními druhy na území obou států, byl navržen s cílem shromáždit informace o rozšíření spontánních hybridů a sebrat semenné vzorky. Hybridní rostliny byly nalezeny na 7 lokalitách. Nalezené lokality byly charakterizovány ekologicky i vegetačně a byly posouzeny faktory ohrožení nezbytné pro plánování *in situ* konzervace. V roce 2013 byly sebrány semenné vzorky a vzorky do herbáře na celkem 35 lokalitách.

Klíčová slova: slunečnice, čirok, genetické zdroje, hybridy, introgrese, konzervace, *in situ*, ohrožení

Abstract

Czech-Argentinian project on genetic resources population investigation of crop wild relatives, escapes from cultivation and spontaneous hybrids with cultivated species was proposed with an aim to gather information on their distribution and to collect seed samples for further research. Hybrid plants were found on 7 localities. Found localities were characterised ecologically and from the point of vegetation, and threat factors were assessed as prerequisite for *in situ* conservation planning. Seeds samples and herbarium specimens were collected on 35 localities in 2013.

Key words: sunflower, sorghum, genetic resources, hybrids, introgression, conservation, *in situ*, threat

Úvod

Spontánní hybridizace je častý přírodní jev a může k ní dojít při styku kulturních plodin, plevelů a planých druhů. Dojde-li ke spontánní hybridizaci, potomstvo je často sterilní, tvořící abortované plody. Je-li tato bariéra přerušena, hybridizace může být následována generací křížitelného potomstva, které se rekurentně může křížit s rodiči. V takových případech se některé nové geny mohou postupně stabilizovat v rámci rodičovského genomu procesem zvaným genetická introgrese. Hlavním účinkem toku genů je snížení rozlišení mezi populacemi doprovázené současně zvýšením rozdílností mezi jednotlivci v populaci. Plevelné formy některých plodin se zdá, že vznikly hybridizací planých a kulturních druhů a mohou se šířit na a pole a ruderalní pozemky v mnoha zemích, podobně jako je tomu u slunečnice v Argentině, v ČR, v Evropě a v jiných částech světa (Holec et al., 2005; Muller et al., 2009, 2010; Poverene and Cantamutto, 2010; Mayrose et al., 2011). Slunečnice a řepka jsou významné olejninové plodiny v obou zemích a jsou velmi náchylné na hybridizaci a genovou introgresi do planě rostoucích příbuzných druhů.

Pěstování geneticky modifikovaných plodin v poslední době iniciovaly mnoho otázek týkajících se možného úniku introdukovaných genů z plodin do planě rostoucích rostlin. Hybridizace a introgrese představují most mezi plodinami a planými nebo plevelnými druhy pro únik geneticky modifikovaných znaků nebo nových mutací (např. toleranci vůči herbicidům), které mohou způsobit vznik nových škodlivých plevelů. Přítomnost planých populací rodu *Helianthus* v Argentině vyloučilo povolení transgenní slunečnice (Cantamutto and Poverene, 2009).

Po dohodě s argentinskou stranou byl navržen projekt na výzkum populací genetických zdrojů - planých příbuzných druhů, zplanělých druhů a hybridů s kulturními druhy na území obou států, s cílem shromáždit informace o rozšíření a sebrat semenné vzorky.

Materiál a metody

V rámci řešeného projektu byla pozornost zaměřena na rody vyskytující se v obou zemích, jejichž druhy jsou využívány v zemědělství, vyskytují se jako plané druhy a u nichž jsou známi hybridy planých a kulturních druhů. Z herbářových a literárních údajů byly získány informace o výskytu planých příbuzných druhů plodinám, zplanělých forem a segetálních druhů, zejména slunečnice (*Helianthus*), čiroku (*Sorghum*) a komplexu příbuzných rodů *Brassica*. Pokrytí vybraných lokalit bylo naplánováno na dvě expedice v letech 2013 a 2014. Cílem expedic bylo prozkoumat velký areál výskytu jak početných populací, tak slabých a ohrožených populací, které nebyly v minulosti argentinským kolektivem navštíveny. Cesta do Argentiny byla načasována na dobu květu a plodnosti populací slunečnice.

Jednotlivé lokality s výskytem cílových druhů byly zaměřeny přístrojem GPS. Každá lokalita byla charakterizována z hlediska přírodních podmínek a vegetace. Dále byla zaznamenána velikost a hustota populace, ohroženost a faktory možného ohrožení. Na lokalitách proběhla fotodokumentace, sběr semen a herbářových položek. Z každé lokality/populace bylo náhodně sebráno 5-20 úborů z různých rostlin ve stádiu plné nebo voskové zralosti. Z typických rostlin populace a z hybridních rostlin byly odebrány části do herbáře. Sebrané osivo bylo rozděleno mezi hostitelskou a návštěvnické organizace. Osivo slunečnice bylo použito na pokusy v Zemědělském výzkumu, spol. s r. o. Troubsko. Druhy *Triticeae* a zrnový čirok byly zařazeny do kolekcí genové banky ve VÚRV v.v.i. Praha.

Výsledky a diskuze

Sběr a hodnocení na lokalitách v terénu

V rámci návštěvy v Argentině byla pozornost věnována zejména studiu dvou rodů, u kterých probíhá introgrese, a sice *Helianthus* a *Sorghum*. U rodu *Helianthus* se jedná o hybridizaci taxonů *H. annuus* var. *macrocarpus* (kulturní slunečnice), *H. annuus* var. *annuus* (planý předek kulturní slunečnice), *H. petiolaris* (zavlečený planý druh ze Severní Ameriky). U rodu *Sorghum* se pak jedná o *S. halepense* (invazní druh) a *S. bicolor* (zrnový čirok). Dále byly zkoumány zplanělé populace brukvovitých rostlin – *Brassica rapa*, *B. oleracea*, *Raphanus sativus*, *R. raphanistrum* a dalších.

Populace plané slunečnice se nacházejí převážně na druhotných stanovištích s vyšší mírou narušování (disturbance). *Helianthus petiolaris* se vyskytuje převážně podél silnic a vozových cest v krajině, na mezích polí a na úhorech. Často se populace nacházejí na písčitých půdách v aridních lokalitách, ne zřídka s vysráženou vápencovou vrstvou v podloží, která ještě zvyšuje ariditu (Relmo, Cuoro de Zoro). Plané populace *Helianthus annuus* často sledují *H. petiolaris*, ale lze je nalézt i v humidnějších podmínkách, zejména na úhorech a

zanedbaných polích a v příkopech podél silnic (Obr.1 - 2). Na mnoha místech jsou populace vázány na zavlažované oblasti se zvýšenou salinitou. Výskyt hybridů byl zaznamenán v populacích nebo v dosahu rodičovských druhů. Rostliny jsou charakterizovány přítomností znaků obou rodičů a v případě hybridů s *H. petiolaris* nízkým nasazením plodů v úboru a výskytem sterilních květů. V centru úboru se roztroušeně vyskytují bílé chlupy (plevkaté lůžko úboru). Jde o znak přenesený z druhu *H. petiolaris*. Hybridy *H. annuus* s kulturní plodinou bývají dobře plodné, vyskytuje se ztlustění stonku a najít lze i fasciace a změny tvaru listu – nejčastěji na kosníkovitý.



Obr. 1 *Helianthus petiolaris*, lokalita Padre Buodo, Argentina



Obr. 2 Hybrid *Helianthus petiolaris* x *H. annuus*, lokalita Colonia Baron, Argentina

Sorghum bicolor a *S. halepense* se liší ekologicky, planý druh vyhledává humidnější podmínky podél vodních toků a v příkopech, často se stojatou vodou. Hybridy v rodu *Sorghum* byly téměř výhradě nalezeny na širokových polích, než v rámci porostů *Sorghum halepense*. V kulturách čiroku jsou u některých hybridů poměrně časté segreganty s vysokou výškou a rozvolněnou latou. Hybridy s druhem *Sorghum halepense* se liší od segregantů kořenovým systémem, absencí vzdušných kořenů a výběžkatostí. Jde o hybridy jednoletého kulturního čiroku a vytrvalého planého druhu, vyznačující se heterozním efektem – výška výrazně převyšuje oba rodiče.

V rámci příbuzných rodů čeledi *Brassicaceae* - *Brassica*, *Raphanus* a *Diplotaxis* nebyly nalezeny zřetelné hybridy.

Byly dále studovány populace druhů, které jsou v Argentině invazní – např. *Chondrilla juncea*, *Diplotaxis tenuifolia*, *Lactuca serriola*, *Melilotus albus*, *Ambrosia artemisiifolia*, *Carduus nutans* a další. Druh *Diplotaxis tenuifolia* je obecně rozšířený ve střední Argentině a stal se dominantním druhem na plochách s vysokou disturbancí, invaduje i do pastvin, vyskytuje se podél cest a nevadí mu ani velmi aridní klima. Je schopen růst i v oblastech s ročními úhrny srážek kolem 200 mm.

Během cesty v Argentině v roce 2013 bylo navštíveno celkem 9 lokalit s výskytem zdomácnělých planých druhů a byly nalezeny hybridy s intermediálními znaky mezi planým druhem, plodinou a zplanělou naturalizovanou formou na 7 lokalitách (Tab.1).

Během pobytu argentinských kolegů v České republice byly hledány a nalezeny případy introgrese planých a kulturních druhů, např. *Papaver rhoeas* a *P. somniferum*, *Beta maritima* a *B. vulgaris*, *Elytrigia repens* and *Triticum aestivum*, *Helianthus annuus* a *H. tuberosus*.

Tab. 1 Výskyt druhů *Helianthus*, *Sorghum*, *Brassica*, *Raphanus* a jejich hybridů na navštívených lokalitách v Argentině 2013

Lokalita	Druhy a hybridy	Datum sběru	Zem. Šířka	Zem. Délka	Výška n.m.
Sierra de la Ventana	<i>Brassica rapa</i>	27.3.2013	S 37°46'00,6''	W 61°58'05,1''	338
Padre Buodo	<i>H. petiolaris</i>	28.3.2013	S 37°17'42,8''	W 64°23'43,6''	203
Colonia Baron	<i>H. annuus x petiolaris</i> , <i>H. annuus x crop</i>	28.3.2013	S 36°10'59,9''	W 63°52'32,4''	152
Santa Agustina	<i>H. annuus x petiolaris</i>	28.3.2013	S 36°07'47,5''	W 63°46'36,7''	134
General Pico	<i>S. bicolor x halepense</i>	29.3.2013	S 35°31'26,5''	W 63°36'19,7''	124
Trenque Lauquen	<i>B. rapa</i> , <i>R. sativus</i>	29.3.2013	S 35°56'51,9''	W 62°48'01,2''	95
De Bary	<i>H. annuus x crop</i>	29.3.2013	S 36°18'16,8''	W 63°20'31,5''	124
Relmo	<i>H. annuus x petiolaris</i> , <i>H. annuus x crop</i>	29.3.2013	S 36°16'10,8''	W 63°23'06,8''	124
Cuero de Zorro	<i>H. annuus x petiolaris</i> <i>H. annuus x crop</i>	29.3.2013	S 35°49'45,3''	W 62°49'43,5''	100

Posouzení ohroženosti a doporučení pro konzervaci

Přímé ohrožení lidskou činností nehrozí, populace se vyskytují podél cest a silnic a na úhorech. Malé populace nejsou stabilní. Setrvalý výskyt druhů závisí na zachování disturbance a nižší kompetice bylinné a keřovité vegetace. Některé lokality nalezené dříve (Poverene and Cantamutto, 2010) zanikly pravděpodobně vlivem vytlačení bylinnou vegetací v humidnějších podmínkách během sukcese. Místně se vyskytují i malé populace, které jsou ohroženy fragmentací a genetickým driftem. Tyto populace by měly být geneticky sledovány a při zjištění významné genetické variability by měly být adekvátním způsobem chráněny. Výhledově by bylo třeba uvažovat vhodné formě *in situ* konzervace. Konzervace agrobiodiversity je však celosvětově v počátcích, přestože *in situ* konzervace byla již zahrnuta do CBD a ITPGRFA (Maxted et al., 2012).

Dedikace

Tato práce vznikla při řešení projektu Mobility MŠMT „Spontánní hybridizace kulturních a planých taxonů - genová introgrese jako zemědělská hodnota nebo ohrožení?“ č. 7AMB13AR002.

Použitá literatura

- Cantamutto, M., Poverene, M., 2009: Transgenic sunflower. Chapter 9 in Genetics, Genomics and Breeding of Sunflower. Hu J, Seiler G, Kole Ch (eds). Science Publishers - CRC Press, New York, EEUU: 279–312.
- Holec, J., Soukup, J., Cerovska, M., Novakova, K., 2005: Common sunflower (*Helianthus annuus* var. *annuus*) – potential threat to coexistence of sunflower crops in Central Europe. In: Proceedings 2nd International Conference on co-existence between GM and non-GM based agricultural supply chains, Montpellier, France, 14-15 Nov 2005, 271–272.
- Maxted, N., Dulloo, M.E., Ford-Lloyd, B.V., Freese, L., Iriondo, J., Carvalho, M.A.A.P., 2012: Agrobiodiversity Conservation, CABI UK, 365.
- Mayrose, M., Kane, N.C., Mayrose, I., Dlugosch, K.M., Rieseberg, L.H., 2011: Increased growth in sunflower correlates with reduced defences and altered gene expression in response to biotic and abiotic stress. *Molecular Ecology* 20, 4683–4694.
- Muller, M.H., Delieux, F., Fernandez-Martinez, J.M. et al., 2009: Occurrence, distribution and distinctive morphological traits of weedy *Helianthus annuus* L. populations in Spain and France. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 56, 869–877.
- Muller, M.H., Latreille, M., Tollon, C., 2010: The origin and evolution of a recent agricultural weed: population genetic diversity of weedy populations of sunflower (*Helianthus annuus* L.) in Spain and France. *Evolutionary Applications*, 4(3), 499–514.
- Poverene, M., Cantamutto, M., 2010: A comparative study of invasive *Helianthus annuus* populations in their natural habitats of Argentina and Spain. *Helia*, 33, 63–74.

Kontaktní adresa: ing. Vojtěch Holubec, CSc., Genová banka, Výzkumný ústav rostlinné výroby v.v.i., Drnovská 507, 161 06 Praha 6-Ruzyně; e-mail: holubec@vurv.cz

GENOFONDOVÁ KOLEKCE LNU (*LINUM USITATISSIMUM* L.) – CESTA OD KLASICKÝCH DESKRIPTORŮ K MOLEKULÁRNÍM MARKERŮM A MODERNÍM METODÁM HODNOCENÍ

Linum usitatissimum L. collection – the path from traditional descriptors to molecular markers and modern methods of evaluation

Pavelek M.

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

Abstrakt

Metodické přístupy pro hodnocení kolekcí patří k základním prvkům práce s kolekcemi s cílem shromáždit co nejvíce dostupných údajů o genetické diversitě kolekcí a tyto údaje poskytnout pro šlechtitelské aplikace a zvyšování všestrannosti využití dané plodiny. V příspěvku jsou popsány různé evaluační metody hodnocení kolekce lnu (*Linum usitatissimum* L.) počínaje tradičními metodami hodnocení morfologických, biologických a výnosových charakteristik pomocí popisných deskriptorů a dále s využitím modernějších metod, např. obrazovou analýzou a pomocí biochemických a molekulárních markerů.

Klíčová slova: len setý (*Linum usitatissimum* L.), metody, hodnocení, obrazová analýza, biochemické, molekulární markery

Abstract

Methodological approaches for collections evaluation are the base for work with collections to gather as much available data concerning genetic diversity as possible and to provide them with the breeding applications and to increase versatility of their utilization. Different methods of *Linum usitatissimum* L. collection evaluation are described in this contribution starting with traditional methods of morphological, biological and yielding characters evaluation via describing descriptors and further using advanced techniques such as image analysis or biochemical and molecular markers as well.

Key words: flax (*Linum usitatissimum* L.), methods, evaluation, image analysis, biochemical, molecular markers

Úvod

Komplexní hodnocení kolekcí všemi dostupnými metodami je považováno za základ zvyšování jejich užitné hodnoty (Brindza et al., 1998; Chapman, 1989; Debré, 1998; Nožková et al., 2006) a je současně jednou z priorit Národního programu konzervace a využívání genetických zdrojů rostlin a agro – biodiverzity (Dotlačil et al., 2009). Základní informaci a jednoznačnou identifikaci genetického zdroje umožňují pasportní data, jejichž základním standardem je dokument Multi – Crop Passport Descriptors (MCPD) (Dotlačil et al., 2009) obsahující 28 pasportních deskriptorů. Další součástí jsou charakterizační data, která kromě dalších informací o identifikaci genetického zdroje umožňují např. i hodnocení genetické rozdílnosti v rámci souborů, popř. i využití jako markerů významných znaků. Vedle morfologických znaků jsou pro tento účel stále více využívány bílkovinné nebo molekulární DNA markery.

V souvislosti se změnami šlechtitelských cílů u lnu, utlumením a ukončením šlechtění přadného lnu a zvýšeným zájmem o šlechtění odrůd olejného lnu (Pavelek et al., 2014) vyvstala potřeba prozkoumat kolekci lnu zejména z hlediska obsahových látek v semeni lnu pro diverzifikaci využití olejného lnu.

Materiál a metody

Pasportní a popisné deskriptory

V příspěvku je popsán vývoj pasportního klasifikačního systému u lnu, který byl na základě spolupráce mezi společnostmi AGRITEC s.r.o. Šumperk a Poľnohospodárskou univerzitou v Nitre vyvinut kolektivem pracovníků pod vedením Doc. Ing. J. Brindzy (Nožková et al., 2011). Východiskem pro jeho vývoj byly klasifikační systémy: 1) UPOV (1995), 2) Mezinárodní deskriptor VIR (Rykova et al., 1989), 3) Národní klasifikátor lnu (Pavelek a Faberová, 2000, nepublikováno), 4) Národní klasifikátor lnu (Rosenberg et al., 1978) a 5) International Flax Data Base (IFDB) (Pavelek, 1995, 1997, 1998a, 1998b). Cílem byla unifikace dosavadních klasifikačních systémů a vytvoření mezinárodně uznávaného klasifikačního systému pro len.

Současná kolekce lnu (*Linum usitatissimum* L.) uchovává 2 185 položek. Na základě analýzy pasportního deskriptoru „ORIGCTY“ byla stanovena geografická struktura kolekce, dle deskriptoru „ORIGIN“ struktura původu získání GZ a dle popisného deskriptoru „TYPE of USE“ struktura dle hospodářského typu.

Obrazová analýza

Obrazovou analýzou byla vyhodnocena morfologie květu a semen (uvést výsledky VZ) u části kolekce reprezentované současnými, moderními, komerčními odrůdami a získané výsledky byly využity jako podklad pro racionalizaci kolekce z hlediska počtu redundantních položek a tvorbu prototypové core kolekce (Vinklárková et al., 2009; Smýkalová et al., 2013).

Biochemické markery

V rámci analýz izoenzymových spekter byla hodnocená část kolekce reprezentovaná komerčními odrůdami přadného i olejného lnu a bylo analyzováno 18 izoenzymových systémů AAP, AAT, ACO, ACP, ADH, AMY, DIA, GDH, GOT, EST, IDH, LAP, LPX, MDH, PER, SDH, SOD, URE. Tyto izoenzymy byly aplikovány ve fázi suchých semen, klíčících semen, prýtlů s odstraněnými dělohami, zelených děloh a prvního páru pravých listů. Elektroforeogramy byly vyhodnoceny na polyakrylamidovém gelu

Molekulární DNA markery

DNA analýzy byly provedeny u všech položek kolekce reprezentujících současné, moderní, komerční odrůdy. Pro analýzy DNA byly odebírány směsné vzorky, jeden vzorek zahrnoval 10 rostlin. Pro hodnocení podobnosti, respektive odlišnosti odrůd byly použity níže uvedené molekulární markery: RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA), ISSR (Inter – Simple Sequence Repeats), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), SSR (Simple Sequence Repeats) mikrosatelity a retrotranspozony IRAP (Inter Retrotransposone Amplified Polymorphism), RBIP (Retrotransposone Based Insertion Polymorphism).

Výsledky a diskuse

Pasportní a popisné deskriptory

Nejednotnost dosavadních výchozích klasifikačních systémů je uvedena v tabulce 1 na příkladu hmotnosti 1000 semen. U klasifikačního systému UPOV a IFDB není uvedeno rozpětí znaku, uvádí se jen standardní odrůdy a jejich hospodářské užití (P-přadný, O-olejný).

Tab. 1 Expresa znaku HTS v různých klasifikačních systémech

Expresa znaku (1-9) /klasifikační systém	1	2	3	4	5
1. velmi malá	OPALINE (P)	3,6 – 5,2	< 2	< 3,6	OPALINE (P)
3. malá		5,3 – 6,0	2,1 – 5,0	3,6 – 5,5	
5. střední	AMAZON (0)	6,1 – 8,0	5,1 – 8,0	5,6 – 8,9	AMAZON (0)
7. velká		8,1 – 11,0	8,1 – 11,0	9,0 – 11,5	
9. velmi velká	OCEAN (O)	> 11	> 11	> 11,5	OCEAN (O)

Proto je nutno při unifikaci jednotlivých klasifikačních systémů zachovávat princip jednoznačnosti, komplexnosti a polaritu slovní charakteristiky exprese znaků (Nožková et al., 2011). Princip jednoznačnosti je dán naprosto přesným rozdělením hodnot exprese jednotlivých znaků s návazností v jednotlivých kategoriích umožňující jednoznačné vyjádření exprese znaku bez možnosti spekulování, do které kategorie vlastně patří. Tuto první zásadu podporuje princip komplexnosti, která je uveden v tabulce 2.

Tab. 2 Princip komplexnosti na příkladu znaku: koruna – průměr otevřené koruny (mm)

Expresa znaku	Rozpětí znaku	Interval (charakterizace)
1. velmi malá	< 10	() otevřený
3. malá	10,0 – 15,9	[] uzavřený
5. střední	16,0 – 21,9	[] uzavřený
7. velká	22,0 – 27,9	[] uzavřený
9. velmi velká	> 27,9	() otevřený

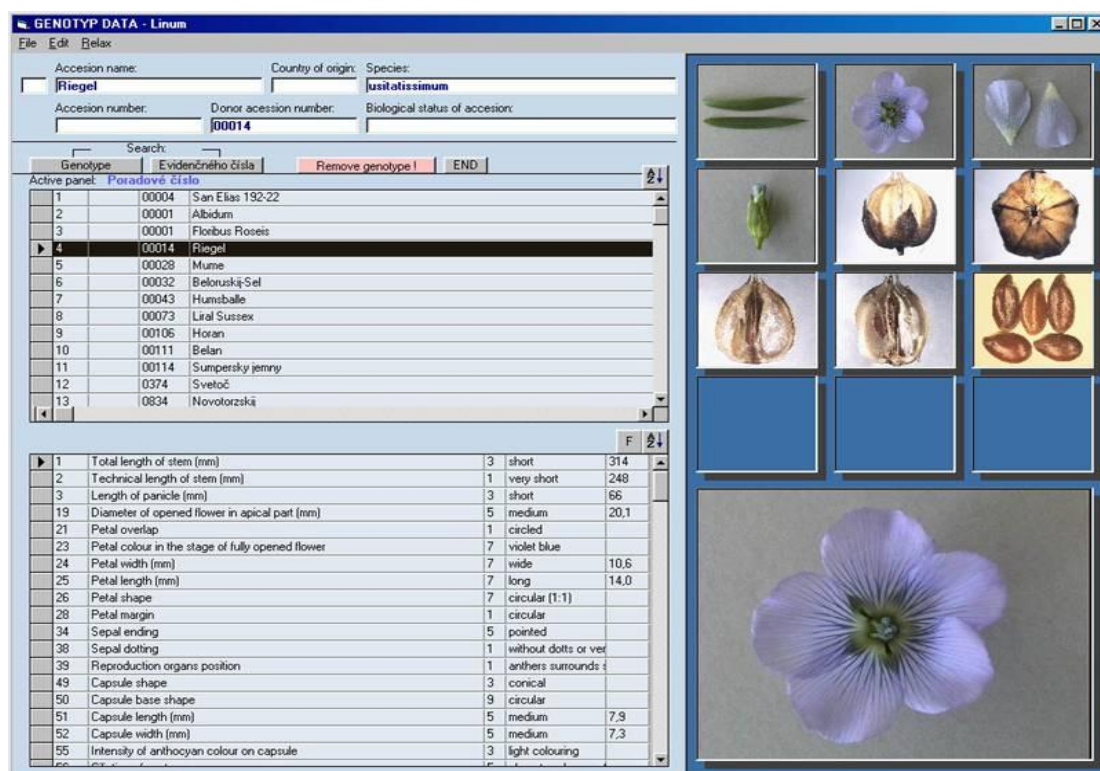
Princip komplexnosti dále specifikuje princip jednoznačnosti v tom smyslu, že polarita slovní charakteristiky je dána otevřeným intervalem, kdežto hodnoty mezi těmito krajními mezemi rozpětí intervalu jsou dány uzavřeným intervalem. Při stanovení těchto intervalů je nutná znalost širší variability jednotlivých kvantitativních znaků, je nutno stanovit přesnost číselného vyjádření na desetinná místa a použít vhodnou metodu stanovení rozpětí intervalů (Nožková et al., 2011; Stehlíková et al., 2003). Na základě těchto zásad byl vypracován nový klasifikační systém pro hodnocení lnu (*Linum usitatissimum* L.) (Nožková et al., 2011). Výchozí data, která byla použita pro vypracování výše uvedeného klasifikátoru, se stala základem pro tvorbu slovenského počítačového informačního systému GENOTYPDATA pro dokumentaci a hodnocení genetických zdrojů (Brindza et al., 1998). Tento systém obsahuje 9 vzájemně propojených a komunikujících databází, jejichž přehled a podstata jsou uvedeny v tabulce 3.

Systém umožňuje cílený výběr GZ dle zadaných kritérií znaků, vzájemné srovnávání genotypů na základě obrazové dokumentace, matematicko – statistické analýzy znaků a skýtá řadu dalších možností vyhodnocování a uchování dat (Obr. 1).

Tab. 3 Struktura slovenského databázového systému GENOTYPDATA pro dokumentaci a hodnocení GZ

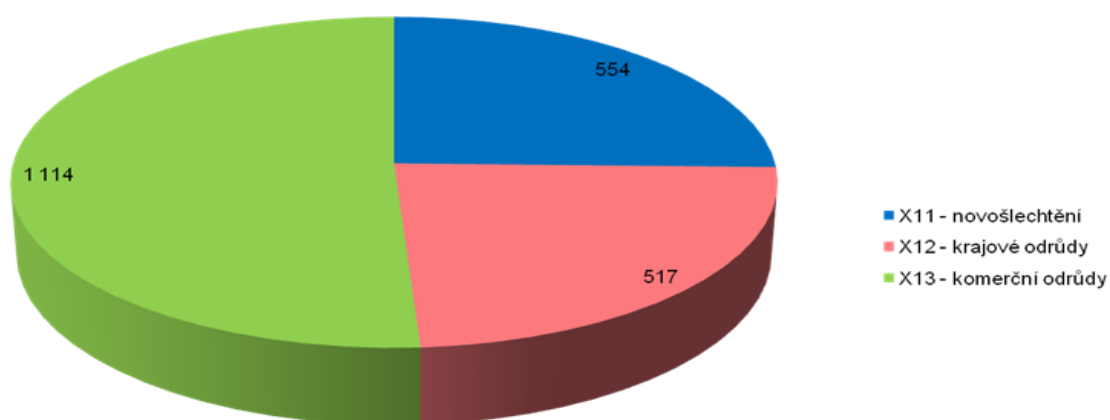
Databáze	Popis databáze
Databáze 1	Biologie druhu <i>Linum usitatissimum</i> L. Text a obrazová dokumentace týkající se biologie a vývoje
Databáze 2	Popisný systém pro hodnocení genetické variability
Databáze 3	Katalogové zpracování dokumentace jednotlivých genotypů s propojením na obrazovou analýzu morfologických znaků
Databáze 4	Matematicko – statistické zpracování souborů získaných dat
Databáze 5	Anglicko – slovenský, Slovensko – anglický slovník základní a odborné terminologie
Databáze 6	Genetická variabilita znaků a genotypů, srovnávací studie obrazové analýzy
Databáze 7	Vývoj katalogu genotypů
Databáze 8	Vývoj „on line“ informačního systému
Databáze 9	Katalog DNA elektroforeogramů

Obr. 1 Ukázka software slovenského databázového systému GENOTYPDATA (odrůda Riegel – propojení na morfologické znaky a obrazovou analýzu)

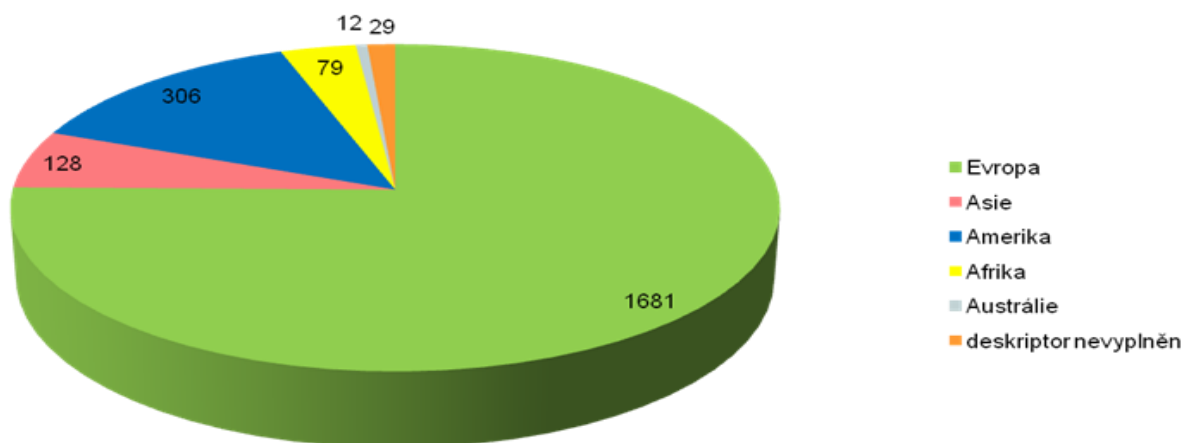


Na základě příslušných pasportních a popisných deskriptorů jsme analyzovali strukturu národní kolekce lnu z hlediska původu vzniku materiálů, geografického původu a hospodářského typu. Výsledky jsou uvedeny v grafech 1 – 3.

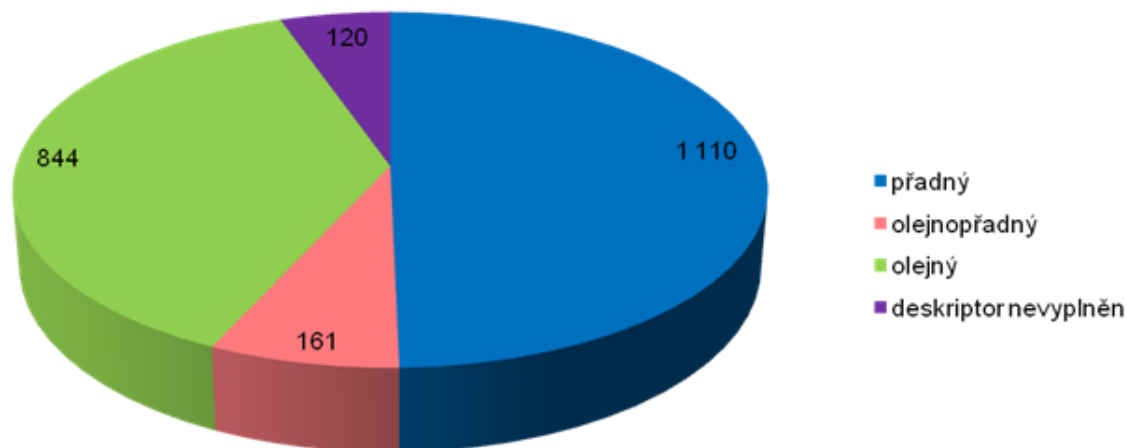
Graf 1 Struktura národní kolekce lnu dle původu GZ



Graf 2 Struktura národní kolekce lnu dle geografického původu



Graf 3 Struktura národní kolekce lnu dle hospodářského typu

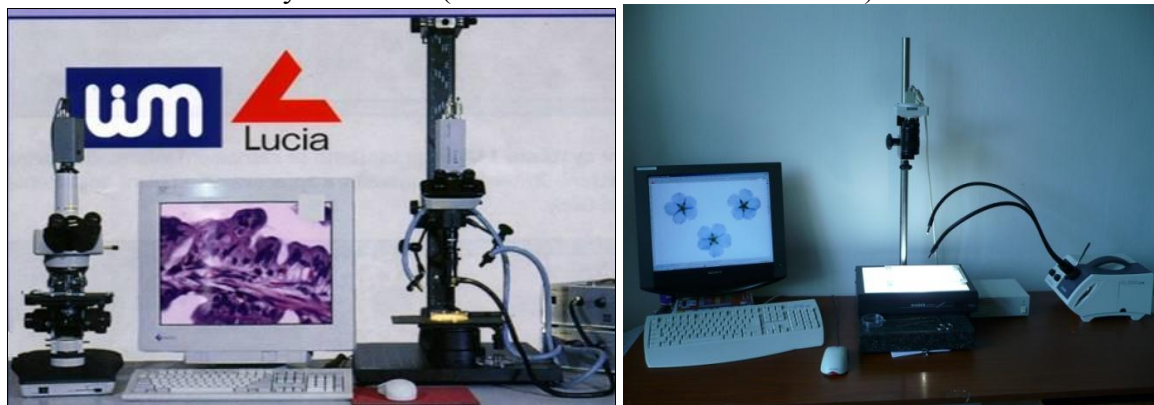


V kolekci je přes 50 % komerčních odrůd, zbytek tvoří téměř rovnoměrným dílem novošlechtění a krajové odrůdy. Téměř $\frac{3}{4}$ kolekce tvoří materiály pocházející z Evropy a dále následují GZ pocházející z USA. Menší podíl je pak tvořen GZ původem z Asie, Afriky. Zanedbatelný počet genotypů je australského původu. Z hlediska hospodářského typu je prakticky polovina kolekce tvořena přadnými lny a dále následují olejný lny. Pouze 161 genotypů z celkového počtu 2 185 položek tvoří přechodný, olejnopřadný typ.

Obrazová analýza

Obrazovou analýzou jsme u komerčních odrůd zdokumentovali morfologii květu (Vinklárková et al., 2009) a naměřené parametry porovnávali softwarem Lucia (Obr. 2)

Obr. 2 Obrazová analýza LUCIA (software NIS Elements AR 2.30)



Pro analýzu jsme použili 2 parametry (MaxFeret a Area) (Obr. 3), kterými jsme v kolekci statisticky posoudili morfologii květu a v kombinaci s pasportním deskriptorem „ACCENAME“ (Obr. 4) detekovali přítomnost potenciálních duplikací, triplikací a kvadruplikací v kolekci.

Obr. 3 Stanovení parametrů obrazové analýzy MaxFeret a Area pro odlišení odrůd z hlediska morfologie květu



MaxFeret

Area – celá, fialová plocha květu

Obr. 4 Ukázka detekce přítomnosti duplikace v kolekci lnu (*Linum usitatissimum* L.) analýzou morfologie květu a pasportního deskriptoru „ACCENAME“ u olejného lnu Buck 114

ACCENUMB	ACCENAME	ORIGCTY	USETYPE
05X1300170	BUCK 114	ARG	3
05X1300094	BUCK 114	ARG	3



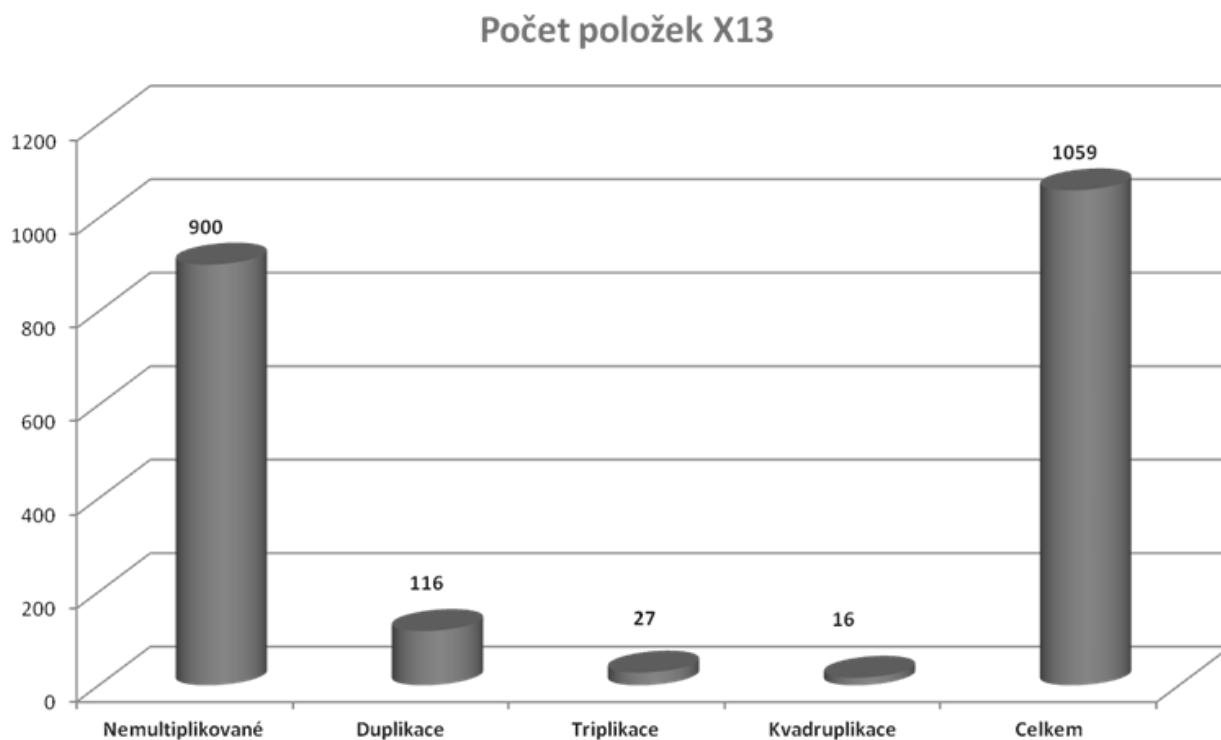
05X1300170



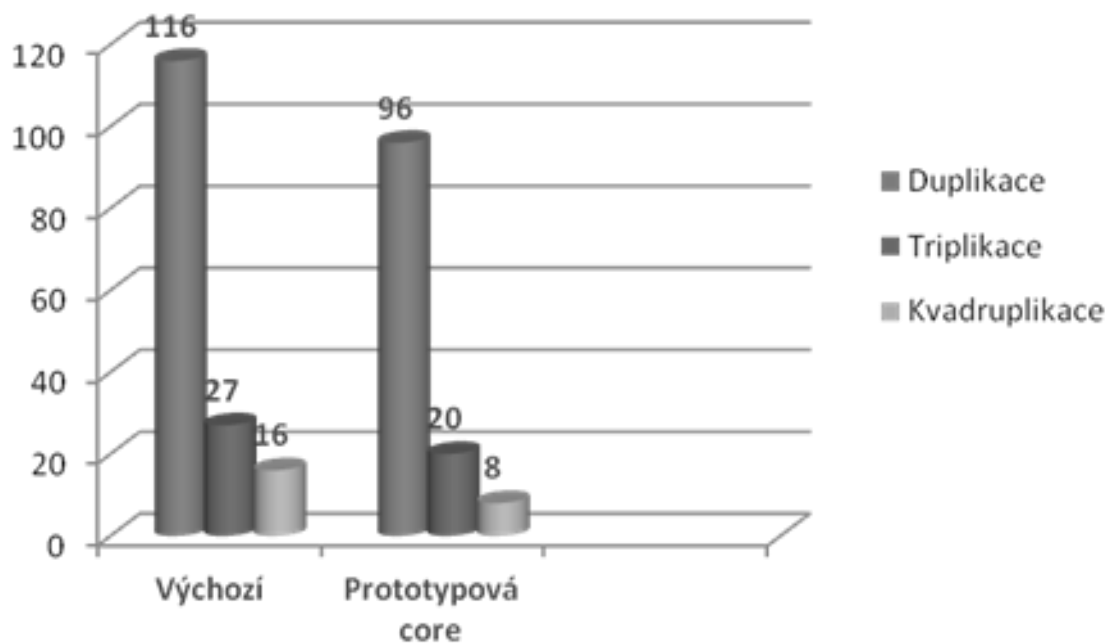
05X1300094

Tímto způsobem jsme u 1059 komerčních odrůd v kolekci detekovali 116 potenciálních duplikací, 27 triplikací a 16 kvadruplikací (Graf 4). Na základě analýzy dosažených výsledků jsme byli schopni redukovat počet duplikací na 96, triplikací na 20 a kvadruplikací na 8 (Graf 5) a celkově tak snížit počet komerčních odrůd v kolekci z původního počtu 1059 ve výchozí kolekci na 152 v prototypové kolekci (Graf 6).

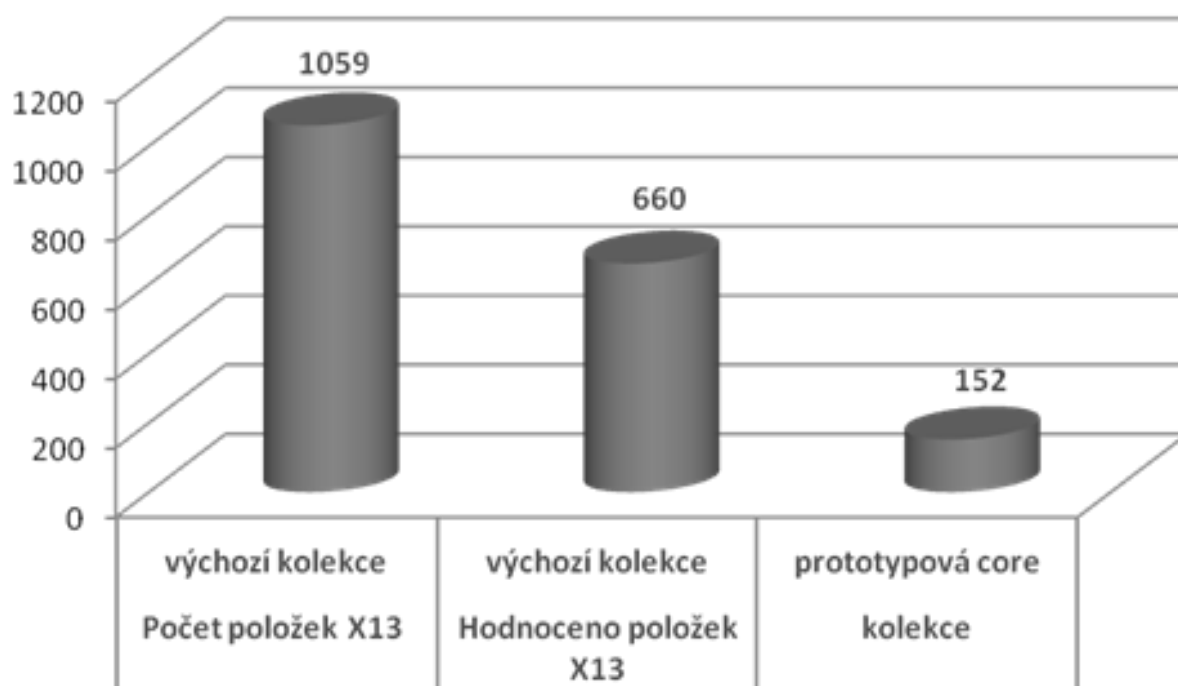
Graf 4 Počet potenciálních duplikací, triplikací, kvadruplikací v kolekci lnu (*Linum usitatissimum* L. u komerčních odrůd (X13)



Graf 5 Redukce počtu duplikací, triplikací a kvadruplikací v kolekci lnu (*Linum usitatissimum* L.) u komerčních odrůd (X13)



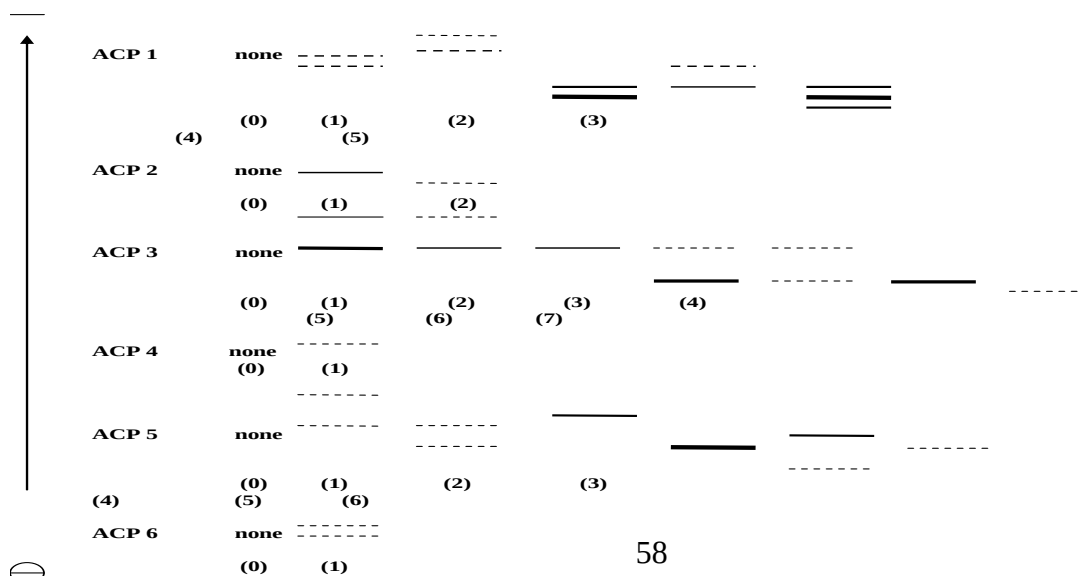
Graf 6 Počet komerčních odrůd (X13) ve výchozí a prototypové kolekci lnu (*Linum usitatissimum* L.)



Biochemické markery

Pomocí 18 isoenzymových systémů jsme analyzovali 12 odrůd přadného a 16 odrůd olejného lnu (Krulíčková et al., 2002). Získali jsme 145 bandů, z nichž 66 (46 %) prokázalo polymorfismus. Na nich se nejvíce podílely isoenzymy ACP (Obr. 5) a EST. Největší počet jedinečných isoenzymových spekter byl zjištěn ve fázi zelených prýtů s odstraněnými dělohami. Pomocí těchto dvou isoenzymových systémů bylo odlišeno 20 odrůd (71 %) z analyzovaného souboru genotypů (Obr. 6).

Obr. 5 Ukázka diagramu isoenzymového komplexu ACP



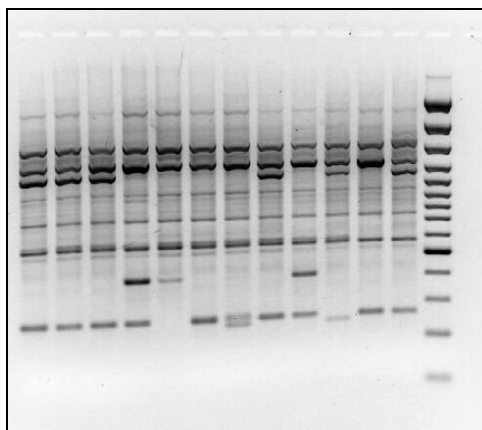
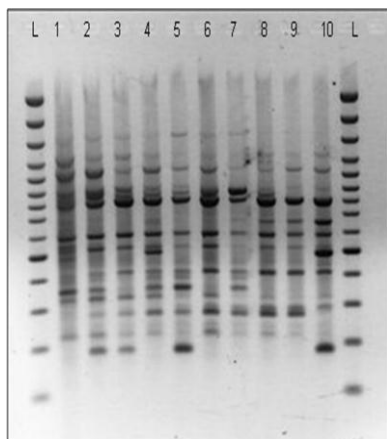
Obr. 6 Isoenzymová spektra ACP pro jednotlivé odrůdy, z toho 20 jedinečných spekter

ACP (ACP1, ACP2, ACP3, ACP4, ACP5, ACP6)						
No.	CULTIVAR	DS	IS	SWRC	GC	FTL
1.	1288/12	NONE	0,2,2,0,1,0*	3,0,3,1,3,0	1,0,0,0,3,0	1,0,6,0,4,1
6.	C 1/7	0,2,1,0,1,1	0,2,1,0,1,0	4,0,3,1,0,0*	2,0,3,1,3,0*	1,0,6,1,0,0*
9.	ED 30	0,2,1,0,2,1*	0,2,3,0,2,0*	5,0,3,1,4,1*	1,0,0,0,3,0	1,0,6,0,4,0
12.	JORDAN	NONE	0,2,5,0,1,0*	3,0,3,1,3,0	1,0,0,0,0,0	1,0,7,1,0,0*
13.	JUPITER	0,1,1,0,1,1*	0,1,1,0,1,0	3,0,3,1,3,1	1,0,0,0,3,0	1,0,6,0,4,0
14.	LIFLORA	NONE	0,2,4,0,1,0	3,0,6,1,0,0	1,0,0,0,0,0	1,0,7,0,0,0*
15.	MIKAEL	NONE	0,2,4,0,1,0	3,0,6,1,3,1*	1,0,0,0,3,0	1,0,7,1,4,1
17.	NLN 245-OR	0,2,1,1,1,1*	0,2,1,0,1,0	3,0,3,1,3,1	NONE	1,0,6,0,4,0
19.	OCEAN	NONE	0 2,1,0,1,0	3,0,3,1,5,1*	1,0,3,0,3,0	1,0,6,1,4,1
20.	OLIVER	0,2,1,0,1,1	0,2,1,0,1,0	3,0,3,1,3,1	1,0,0,0,0,0	1,0,6,1,0,1*
24.	TEXA	0,1,1,0,2,1*	0,1,1,0,1,0	3,0,3,1,3,1	1,0,0,0,3,0	1,0,6,0,4,0
25.	V-12/446	NONE	0,2,4,0,1,0	3,0,6,1,3,0*	1,0,0,0,3,0	1,0,7,1,4,1
26.	VERA	NONE	0,2,1,0,1,0	3,0,3,1,0,0*	1,0,0,0,0,0	1,0,6,1,6,0
27.	VIKING	0,2,1,0,1,1	0,1,1,0,1,0	3,0,3,1,4,0	1,0,3,1,3,0*	1,0,6,1,6,1

Molekulární DNA markery

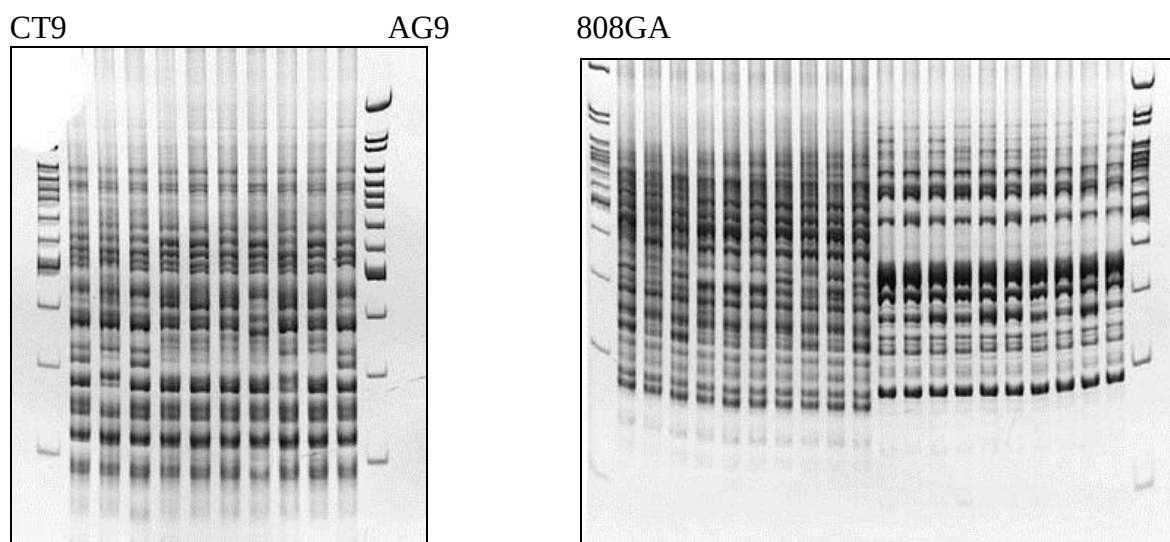
50 RAPD primerů (Operon, UBC) bylo testováno na souboru 12 kontrastních genotypů lnu. Bylo detekováno 6 primerů s vysokou úrovní polymorfismu, které byly využity pro odlišení registrovaných odrůd lnu (Obr. 7)

Obr. 7 RAPD spektra 10 registrovaných odrůd lnu



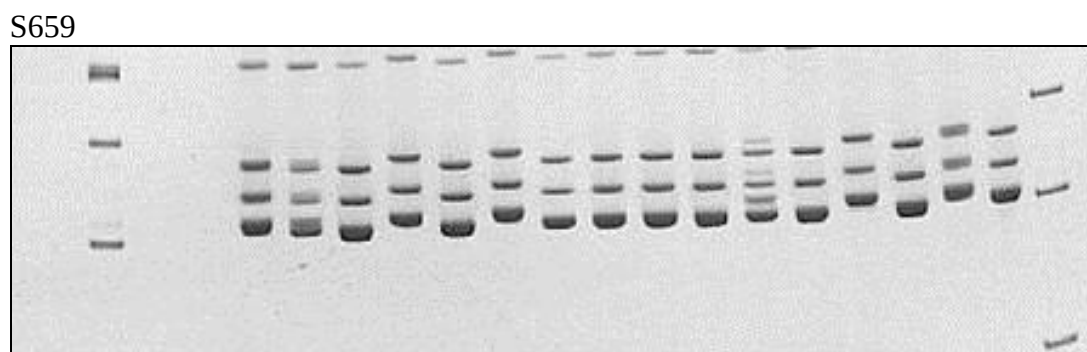
Dále bylo testováno 12 ISSR primerů, které prokázaly nízkou hladinu polymorfismu. Ukázka ISSR elektroforeogramů je na obrázku 8. Výhodou RAPD a ISSR analýz je jednoduchost jejich provedení, není nutno znát sekvenci, nevýhodou je poměrně nízká úroveň polymorfismu a z tohoto důvodu nízká rozlišovací schopnost, nízká informovanost a nízká reprodukcibilita.

Obr. 8 Elektroforeogramy odrůd lnu testovaných 3 primery s největším polymorfismem – CT9, AG9, 808GA

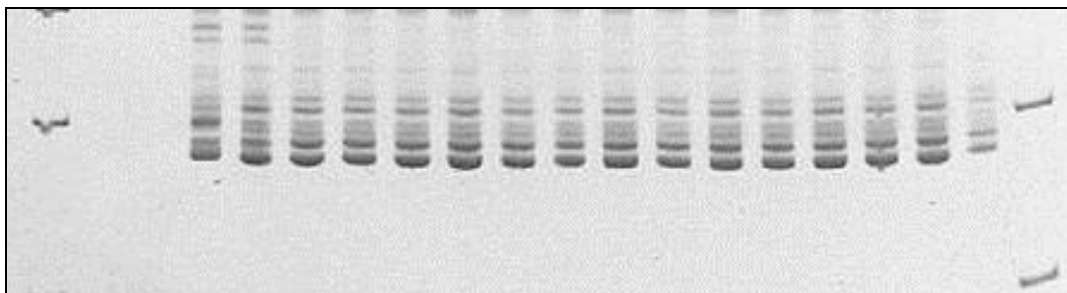


Daleko přesnější metodou je použití mikrosatelitních a retrotransposonových markerů. Na souboru kontrastních odrůd lnu jsme testovali polymorfismus 20 mikrosatelitních repetič, z nichž 5 prokázalo vyšší úroveň polymorfismu. Tři z nich jsou uvedeny na obrázku 9. Výhodou je jednoduchost aplikace metodou IRAP, pokrytí celého genomu a vyšší úroveň polymorfismu.

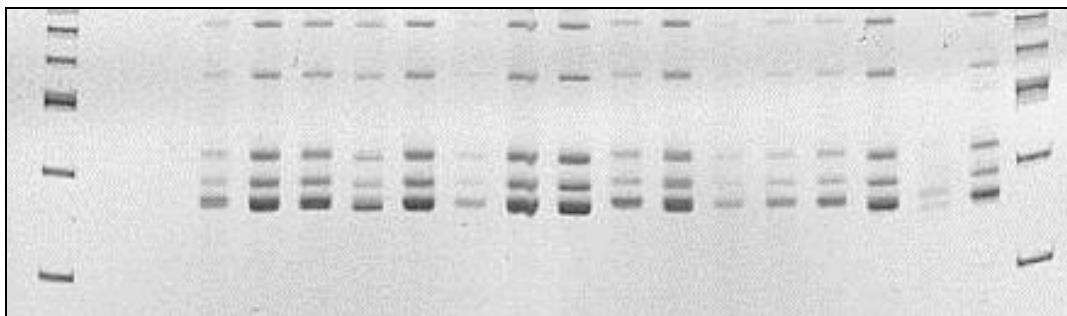
Obr. 9 Elektroforeogramy souboru odrůd lnu testovaných 3 SSR markery S659, LU12, LU17



LU12



LU17

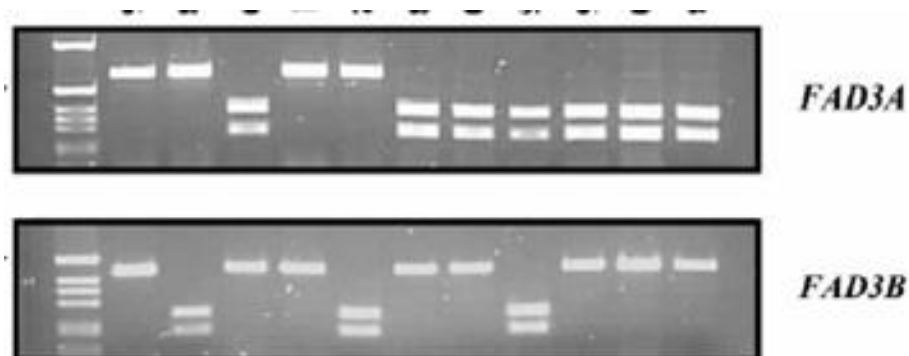


Závěry práce s molekulárními markéry u lnu byly shrnuty a publikovány v práci (Smýkal et al., 2011) s následujícími závěry: byly charakterizovány retrotransposonové segmenty a byly vyvinuty IRAP markéry pro hodnocení rodu *Linum*. Bylo klonováno více než 75 IRAP segmentů. Celkem bylo testováno 708 položek kolekce lnu, z toho 178 šlechtitelských linií, 143 krajových odrůd a 387 komerčních odrůd. Z nich bylo 357 přadných, 87 olejných a 271 olejnopřadných lnů z 36 zemí světa. Kromě těchto položek bylo navíc testováno dalších 10 divokých druhů rodu *Linum*. Soubor 10 nejvíce polymorfních primerů poskytl 141 reprodukovatelných informačních dat na jednu položku s 52 % polymorfismem a Shanonovým indexem diversity 0,34. Maximální genetická diversita byla detekována mezi divokými druhy (IRAP polymorfismus 100 %, Jackardův index podobnosti 0,57), zatímco diversita u druhu *Linum usitatissimum* L. klesala v linii divoké druhy (58 %, 0,63) – šlechtitelské materiály (48 %, 0,85) – komerční odrůdy (50 %, 0,81). Bayesiánská analýza poskytla 20 robustních shluků, které se vytvořily v souvislosti s původem a hospodářským typem. To indikovalo překrytí genetické diverzity bez ohledu na „rušivý“ vliv cílené selekce přadné versus olejné typy. Bez ohledu na tuto skutečnost 8 shluků zahrnovalo velkou část komerčních odrůd (70 – 100 %), zatímco ve dvou shlucích (60 %) převažovaly primitivní odrůdy. Tyto závěry se staly základem pro lepší management kolekce, pro vytvoření základů prototypové core kolekce, pro výzkum diverzity ve šlechtění a objasnění úlohy retrotransposonů v dynamice vývoje genomu lnu.

Praktickým příkladem aplikace DNA markerů je např. detekce mutantních alel A, B FAD 3 desaturázy pomocí metod PCR a následné restrikce při šlechtění nízkolinolenových linií lnu. Geny kódují enzymy odpovědné za přeměnu k. linolové na k. linoleovou. Nositelé mutantní alely se projevují nízkým obsahem k. linolenové. Enzymy rozpoznávají původní sekvenci a štěpí ji, kdežto mutantní forma zůstává neštěpená, což se projeví získáním dvou nebo jen jednoho fragmentu při elektroforetické separaci produktů (Obr. 10).

Obr. 10 Detekce mutantních alel A, B FAD 3 desaturázy blokujících přeměnu k. linolové na linolenovou

PCS – CAPS marker



α -linolenová kyselina (C18:3) 2 %

Závěr

Výše uvedený přehled evaluačních metod kolekce lnu poukázal na možnost skloubení tradičních metod hodnocení kolekcí pomocí pasportních a popisných deskriptorů s moderními metodami hodnocení založenými na obrazové analýze, biochemických a molekulárních markérech. Použití tohoto přístupu umožnilo racionalizaci práce s kolekcí lnu, komplexní hodnocení genotypů, cílený výběr genotypů pro potřeby šlechtitelů, výzkumných pracovníků a v neposlední řadě informace pro mezinárodní databázi lnu a management kolekcí na vnitrostátní i mezinárodní úrovni. Cca 50 % kolekce reprezentované komerčními odrůdami, zhodnocenými tímto komplexním přístupem představuje bohatý zdroj informací pro další práci s kolekcí. V tomto trendu bychom rádi pokračovali i u druhé části kolekce reprezentované primitivními odrůdami a šlechtitelským materiálem.

Dedikace

Příspěvek vznikl na základě řešení „Národního programu konzervace a využití genetických zdrojů kulturních rostlin a agro-biodiversity“ financovaného MZe ČR, č.j. MZe ČR 206553/2011-17253 a Výzkumného záměru MSM 2678424601 financovaného MŠMT

Použitá literatura

- Brindza, J., Balogh, Z., Zimmerová, J., Gažo, J., 1998: GENOTYPDATA – computerized information system for documentation and evaluation of genetic resources. In: Characterization and documentation of genetic resources utilizing multimedia databases. Neapol workshop: IPGRI, 22 – 27, ISBN 92-9043-388-4.
- Dotlačil, L., Stehno, Z., Faberová, I., Holubec, V., 2009: Rámcová metodika Národního programu konzervace a využívání genetických rostlin a agro – biodiverzity. RGZ, VÚRV v.v.i., Praha Ruzyně, 296.
- Chapman, C., 1989: Principles of germplasm evaluation. In: Stalker, H.T., Chapman, C. Scientific management of germplasm characterization, evaluation and enhancement. IBPGR training courses: lecture series. 2. Rome, 55 – 63.
- Debré, F., 1998: Genetické zdroje l'anu. Závěrečná správa. Piešťany: VÚRV, 35.

- Kruličková, K., Pošvec, Z., Griga, M., 2002: Identification of flax and linseed cultivars by isozyme markers. *Biologia Plantarum* 45 (3), 327 – 336.
- Nožková, J., Pavelek, M., Bjelková, M., Brutch, N., Tejklová, E., Porokhovinova, Brindza, J., 2011: Descriptor list for flax (*Linum usitatissimum* L.). Pol'nohospodarska univerzita, Nitra, Slovenská republika, 102.
- Pavelek, M., 1995: Further development of International Flax Data Base and special descriptors for more detail evaluation of agronomic and processing characters, 1 – 13. Breeding for fibre and oil quality in flax: Proceedings of the third meeting of the International Flax Breeding Group, 7 – 8 November, ST. Valery en Caux, France, Centre technique pour l' étude et l' amélioration du lin (CETEL), Paris, France.
- Pavelek, M., 1997: Discussion for IFDB standard varieties. Euroflax Newsletter 1 (7), 17-20, Information Bulletin of the FAO European Cooperative Research Network on Flax and Other Bast Plants, Institute of Natural Fibres - Coordination Centre of the FAO Network on Flax and Other Bast Plants, Poznan, Poland.
- Pavelek, M., 1998a: International Flax Data Base – poster. ECP/GR Steering Committee Meeting, Symposium on implementation of the GPA in Europe, Braunschweig, Germany, June 29 – July 5, 370 – 371.
- Pavelek, M., 1998b: Analysis of current state of International Flax Data Base – lecture. Proceedings of the Best Fibrous Plants Today and Tomorrow, Breeding, Molecular Biology and Biotechnology Beyond 21st Century, St. Petersburg, Russia, September 28 – 30, 36 – 44.
- Pavelek, M., Faberová, I., 2000: Národní klasifikátor lnu *Linum usitatissimum* L., AGRITEC s.r.o., VÚRV Ruzyně v.v.i., Praha Ruzyně, nepublikováno.
- Pavelek, M., Bjelková, M., Tejklová, E., 2014 (v tisku): Směry šlechtění olejného lnu v ČR a nové odrůdy. Ve sb.: Olejný len v České republice (únor 2014), LS, APR, Šumperk.
- Rosenberg, L., Trnka, M., Procházka, F., 1978: Klasifikátor *Linum usitatissimum* L., závěrečná zpráva, Výzkumný a šlechtitelský ústav technických plodin a luskovin, Šumperk – Temenice, 1978.
- Rykova, R., Kutuzova, S., Korneichuk, V., Rosenberg, L., 1989: Meždunarodnyj klasifikátor CEV – vida *Linum usitatissimum* L, Petrohrad, 40.
- Smýkal, P., Bačová – Kerteszová, N., Kalendar, R., Corander, J., Schulmann, A. H., Pavelek, M., 2011: Genetic diversity of cultivated flax (*Linum usitatissimum* L.) germplasm assessed by retrotransposon-based markers. *Theor Appl Genet* 122, 1385–1397.
- Smýkalová, I., Grillo, O., Bjelková, M., Pavelek, M., Venora, G., 2013: Phenotypic evaluation of flax seeds by image analysis. *Industrial Crops and Products* 47, 232 – 238.
- Stehlikova B, Gazo J, Miko M, Brindza, J., 2003: Fuzzy zonal analysis -a tool for evaluation of yield characters and identification of valuable plants. *Biologia* 58, 59–63.
- UPOV, 1995: Flax (*Linum usitatissimum* L.) – Guidelines for the conduct of tests for distinctness, uniformity and stability. UPOV, Geneve.
- Vinklárková, P., Smýkalová, I., Pavelek, M., 2009: Obrazová analýza při hodnocení genetických zdrojů lnu setého. *Úroda*, 1, 50 – 52.

Kontaktní adresa: Ing. Martin Pavelek, CSc., AGRITEC, výzkum, šlechtění a služby s.r.o., 787 01, Šumperk, Zemědělská 2520/16; e-mail: pavelek@agritec.cz

ŠEDESÁT LET STUDIA GENETICKÝCH ZDROJŮ V TROUBSKU

Sixty years of genetic resources studies in Troubsko
Pelikán J.¹, Knotová D.¹, Semanová I.², Vymyslický T.²

¹Výzkumný ústav pícninářský, spol. s r. o. Troubsko

²Zemědělský výzkum, spol. s r. o. Troubsko

Abstrakt

Genofondy pícnin jsou řešeny v Troubsku od roku 1953 a hlavní pozornost je věnována druhům čeledi *Fabaceae*. Kromě toho se pracoviště zabývá i některými druhy jiných čeledí. Práce s genofondy zahrnuje tři základní okruhy: shromažďování (darem, výměnou a sběry ve volné přírodě), zkoušení a popis v laboratorních a polních podmínkách. Semenné vzorky jsou dlouhodobě uchovávány v české národní genové bance a postupně regenerovány. Příspěvek přináší přehledy položek shromážděných, přezkoušených, popsanych a konzervovaných za celou dobu práce s genofondy a za dvacet let trvání Národního programu.

Klíčová slova: pícniny a další druhy, kolekce genetických zdrojů, shromažďování, zkoušení, popis a uchování

Abstract

Genetic resources of forage crops have been studied in Troubsko since 1953. The main attention is paid to the species of the family *Fabaceae*. In addition, the workplace deals with certain species of other families. Studying the genetic resources includes three basic areas: gathering (donation, exchange of seed samples or collection in the nature), evaluation and description both in the field conditions and in the laboratory. The seed samples are long-term stored in the Czech national gene bank and are subsequently regenerated. The paper presents the survey of collected, tested, described and conserved items that have been processed both during the whole period of work with genetic resources in Troubsko and also during twenty years of the National programme duration.

Key words: forages and other species, collections of genetic resources, gathering, testing, descriptions and preservation

Úvod

Od roku 1953 se datuje pícninářský výzkum v Troubsku. Po celou dobu existence pícninářského výzkumu v Troubsku byla pozornost věnována problematice genofondů pícnin a je spojena s řešiteli kolekcí, jako např. RNDr. Vladimír Vacek, CSc., RNDr. Věra Mrázková, CSc., Ing. Anna Tomašovičová, CSc., RNDr. Ivanka Zapletalová, CSc. a dalšími. V letech 1953 – 1959 byly genofondy řešeny pracovníky tehdejšího Výzkumného ústavu krmivářského v Brně a pokusy byly realizovány na pozemcích v Troubsku. V roce 1959 je zřízena Výzkumná stanice jetelovin a travin v Troubsku, později s názvem Výzkumná stanice vytrvalých pícnin. Od roku 1969 nese pracoviště název Výzkumná stanice pícninářská v Troubsku. Od roku 1977 dochází ke sloučení tohoto pracoviště s Výzkumnou stanicí travinářskou v Rožnově pod Radhoštěm a k pracovišti je přičleněno 8 šlechtitelských stanic. Pracoviště nese název Výzkumný a šlechtitelský ústav pícninářský v Troubsku a je podřízen VHJ – generálnímu ředitelství Oseva v Praze. V roce 1990 je pracoviště rozděleno na dva samostatné ústavy: Šlechtitelský ústav Troubsko a Výzkumný ústav pícninářský Troubsko, jehož součástí byla i Výzkumná stanice travinářská v Zubří. K poslední změně došlo v roce 1994 vznikem samostatného Výzkumného ústavu pícninářského, spol. s r. o. Troubsko. Od roku 1993 je pracoviště zapojeno do řešení „Národního programu konzervace a využití genofondu rostlin a agro-biodiversity“. Vedle hlavních pícních druhů čeledi *Fabaceae* (vojtěška, jetel luční, jetel plazivý) je pozornost zaměřena na tzv. maloobjemové druhy (jetel

hybridní, jetel alexandrijský, jetel perský, vičenec, štirovník), perspektivní druhy pro zvyšování diverzity jetelotravních společenstev z čeledi *Fabaceae* a dalších čeledí (tzv. komponenty květnatých luk). Dále je vedena kolekce světlice barvířské a v kolekci pracoviště jsou zastoupeny také některé plané druhy rodů *Vicia* a *Lathyrus*.

Materiál a Metody

Za dobu řešení Národního programu je pozornost při shromažďování, zkoušení a popisování věnována pícním druhům čeledi *Fabaceae* a pícním druhům jiných čeledí, perspektivních z pohledu tvorby tzv. květnatých luk. Kolekce také obsahuje položky světlice barvířské (*Carthamus tinctorius*). Do 70. let minulého století byly na pracovišti řešeny také kolekce některých druhů čeledi *Poaceae*, krmné lupiny a v 80. letech sortiment krmných brukvovitých. Pokusy jsou zakládány metodou znáhodněných bloků ve třech opakováních na píci a třech opakováních na semeno. V těchto pokusech jsou hodnoceny výnosové charakteristiky, hospodářské znaky, některé morfologické charakteristiky a odebírány vzorky pro stanovení kvality píce. Dále jsou prováděny individuální výsadby pro popis morfologických a výnosových charakteristik na rostlinách (Pelikán et al., 2005). Při nedostatku osiva jsou zakládány řádkové kultury pro získání základních popisných charakteristik. Do pokusů jsou zařazovány české a zahraniční odrůdy získané darem od majitelů, případně výměnou a dále plané formy, získané sběry ve volné přírodě. Popisy jsou prováděny pomocí klasifikátorů pro příslušný druh, případně rod. Výsledky jsou průběžně publikovány v odborném tisku.

Výsledky a diskuze

V tabulce 1 jsou uvedeny počty položek přezkoušených na pracovišti v Troubsku za dobu práce s genofondy po desetiletích a samostatně za 20 let řešení Národního programu. Celkově bylo pracovištěm přezkoušeno 3143 položek pícních druhů čeledí *Fabaceae*, *Poaceae* a dalších pícních druhů jiných čeledí. Nejvíce položek patří k hlavním pícním druhům, což jsou vojtěška, jetel luční, jetel plazivý a jednoleté pícní druhy, zařazené do skupiny ostatní jeteloviny. Za dobu řešení Národního programu bylo přezkoušeno 791 pícních druhů čeledi *Fabaceae*, rodu *Phacelia* a některých dalších pícních druhů.

Tab. 1 Počty genetických zdrojů přezkoušených na pracovišti v Troubsku

Skupina	1953 -1962	1963 -1972	1973 -1982	1983 -1992	1993 -2002	2003 -2013	Celkem	Celkem za NP
Vojtěška		35	81	83	122	149	470	271
Jetel luční		33	101	69	27	136	366	163
Jetel plazivý		85	55	72	54	41	307	95
Štirovník			36		4	38	78	42
Ostatní jeteloviny	8	19	16	8	40	145	236	185
Lupina		25					25	
Svazenka					5	30	35	35
Bruckvovité				30			30	
Kulturní <i>Poaceae</i>		195	51				246	
Plané <i>Fabaceae</i>	954		234	12			1200	
Plané <i>Poaceae</i>			150				150	
Celkem	962	392	724	274	252	539	3143	791

Vedle domácích a zahraničních odrůd pícíků druhů jsou nedílnou součástí genofondů také plané položky těchto druhů a jim příbuzných druhů získaných sběry ve volné přírodě.

Tab. 2 Položky získané individuálními sběry a v rámci sběrových expedic v průběhu řešení Národního programu

Rok	Sběrové expedice						Individuální sběry			
	Tuzem- ské	Zahra- niční	Získané položky	Předané			Získané položky	Předané		
				GB	Jiné ústavy	Prac. kol.		GB	Jiné ústavy	Prac. kol.
1993	1		153	50			37	19		
1994	1		165	82			224	117		
1995	1		115	20		3	389	195		2
1996	1		103	10	2		222	100		2
1997	1		104	27		1	104	54		
1998	1		171	20		3	178	103	1	1
1999	1	1	194	20	16	16	85	31	2	3
2000	1	2	146	29		24	48	31	1	
2001	2	2	288	56	5	25	153	83	2	12
2002		2	110	18	17	41	77	22	9	13
2003	1		69	17	29	17	45	7	2	12
2004	1	1	124	61	7	25	22	7	3	6
2005	1	2	86	20	19	42	14	5	2	6
2006	1	1	69	3	42	6	9	4		4
2007	1	2	135	5	82	46	7	5		1
2008	1	1	67	19	8	37	12	2		8
2009	2	2	151	16	97	37	10	3	5	
2010	2	2	140	13	73	54	1			1
2011	1	1	57	4		53	4			4
2012	2	2	67	35		32				
2013	1	2	100			100	5			5
Celkem	24	23	2614	525	397	562	1646	788	27	80

Přehled o těchto položkách získaných v rámci řešení Národního programu je uveden v tabulce 2 za jednotlivé roky řešení jak v rámci individuálních sběrů, tak i sběrových expedic v tuzemsku i v zahraničí. Podrobně je problematika sběrů popsána Vymyslickým et al. (2005). Celkově se za dobu řešení Národního programu uskutečnilo 24 tuzemských a 23 zahraničních sběrových expedic. V zahraničí byly sběry realizovány na Slovensku, v Polsku, Rakousku, Maďarsku, Slovinsku, Srbsku a Chorvatsku. V prvních letech řešení Národního programu převažovaly individuální sběry, v posledních 10 letech je větší

pozornost věnována získávání materiálů v rámci sběrových expedic. Je však nutno připomenout, že vzorky získané individuálními sběry jsou mnohdy kvalitnější, především z hlediska klíčivosti, protože individuální sběry lze načasovat na nejoptimálnější dobu zralosti semen.

Celkově bylo shromážděno sběrovými expedicemi 2614 položek, z tohoto počtu je 525 položkám přiděleno ECN a jsou uloženy v Genové bance, 397 položek bylo předáno na jiná řešitelská pracoviště Národního programu a 562 položek je v pracovní kolekci pracoviště a je nutno je regenerovat. U zbývajících položek nedošlo k jejich vyklíčení při regeneracích, případně získané osivo bylo nepoužitelné pro jeho poškození živočišnými škůdci. Celkem 1646 položek bylo získáno individuálními sběry a z tohoto počtu je 788 položkám přiděleno ECN a jsou uloženy v Genové bance, 27 položek bylo předáno na jiná řešitelská pracoviště Národního programu a 80 položek je v pracovní kolekci pracoviště a je nutno je regenerovat. Regenerace druhů čeledi *Fabaceae* jsou náročné pro jejich cizosprašnost, víceletost a hmyzosnubnost a podrobně se problematikou regenerací u této čeledi zabývají Pelikán et al. (2012).

V poslední době pracoviště rozšířilo při práci s genetickými zdroji činnost o charakterizaci s použitím DNA markerů. Tato činnost je zabezpečována dodavatelsky při použití metody AFLP a SSR. V současné době je tímto způsobem zhodnocena prakticky celá kolekce *Medicago sativa* a *Medicago x varia*.

Pro rozsáhlost vybraných významných pícních druhů: rod vojtěška (*Medicago sativa*, *Medicago x varia* a *Medicago falcata*), jetel luční (*Trifolium pratense*), jetel plazivý (*Trifolium repens*), jetel hybridní (*Trifolium hybridum*) a rod *Lotus* bylo provedeno zhodnocení všech původů v individuálních výsadbách, porovnání jejich podobností pomocí metody shlukové analýzy a na základě dosažených výsledků vybrání zástupci do „core collection“. Celkově bylo zhodnoceno 457 původů rodu *Medicago* a do „core collection“ bylo vybráno 99 původů (z toho se jedná o 96 původů *Medicago sativa*, 5 původů *Medicago x varia* a 1 původ *Medicago falcata*). Z 214 zhodnocených původů jetele lučního bylo vybráno 76 původů (50 diploidních a 26 tetraploidních), ze 162 původů jetele plazivého bylo vybráno 41 původů, z 25 původů jetele hybridního bylo vybráno do „core collection“ 11 původů a z 34 původů rodu *Lotus* bylo vybráno 25 původů. Přehled je uveden v tabulce 3. Současně byly v kolekcích zjišťovány duplicity. Zkušenosti získané při této činnosti vedly k vydání uplatněné certifikované metodiky pro motýlokvěte pícniny (Pelikán et al., 2009).

Tab. 3 Počty hodnocených původů a počty původů zařazených do „core collection“

	Počet hodnocených původů	Počet původů zařazených do „core“
<i>Medicago sativa, varia, falcata</i>	457	99
<i>Trifolium pratense</i>	214	76
<i>Trifolium repens</i>	162	41
<i>Trifolium hybridum</i>	25	11
<i>Lotus corniculatus</i>	34	25

Tab. 4 Přehled zpracovaných klasifikátorů

1	Užík M., Vacek V., Tomašovičová A., Bareš I., Sehnalová J., Blahout J.	Klasifikátor genus <i>Trifolium</i> L.	1985
2	Vacek V., Mrázková V., Sestrienka A., Sehnalová J., Bareš I., Hájek D.	Klasifikátor genus <i>Medicago</i> L.	1985
3	Hýbl M., Smolíková M., Faberová I.	Klasifikátor <i>Cicer arietinum</i> L.	1998
4	Hofbauer J., Uher J., Faberová I.	Klasifikátor <i>Carthamus tinctorius</i> L.	2001
5	Hutyrová H., Minjaríková P., Pelikán J., Knotová D.	Klasifikátor rod svazenka (<i>Phacelia</i> Juss.)	2010
6	Vymyslický T., Neugebauerová J., Faberová I.	Klasifikátor genus <i>Glycyrrhiza</i> L.	2010
7	Knotová D., Pelikán J., Minjaríková P., Hutyrová H.	Klasifikátor genus <i>Lotus</i> L.	2013

Nedílnou součástí práce s genetickými zdroji je zpracování klasifikátorů pro hodnocení zkoušených materiálů. Návrh prvního klasifikátoru zpracovali Vacek et al. (1971) pro popisy odrůd víceletých kulturních druhů rodu *Medicago* L. a tento se stal později základem pro vypracování Klasifikátoru genus *Medicago* L. a následně také klasifikátoru genus *Trifolium*. Celkově se pracoviště podílelo na vypracování 7 klasifikátorů, jejichž přehled je uveden v tabulce 4.

V tabulce 5 jsou uvedeny počty předaných pasportních a popisných dat do centrální evidence EVIGEZ a počty vzorků předaných do GB celkově a za dobu řešení Národního programu. Celkově bylo předáno 3135 pasportních záznamů, z toho za dobu řešení Národního programu 2094 záznamů, což je 66,8 %. Všechna popisná data byla předána za dobu řešení Národního programu a jednalo se o popisy u 1606 položek. K dlouhodobému uskladnění v Genové bance ve VÚRV, v.v.i. v Praze-Ruzyni bylo předáno 2529 semenných vzorků, z toho 2289 za dobu řešení Národního programu, což je 90,5 %.

Kolektiv řešící problematiku genetických zdrojů se aktivně podílí na šlechtitelském programu pracoviště a členové jsou autory 11 odrůd zapsaných ve Státní odrůdové knize, případně odrůd jimž byla udělena právní ochrana. Dále jsou členy šlechtitelských kolektivů u řady dalších registrovaných odrůd. V současné době jsou přihlášena k právní ochraně další tři novošlechtění.

Významnou činností kolektivu je dlouhodobá spolupráce se Správou NP Podyjí a CHKO Moravský kras a dále s Bankou semen ohrožených druhů v Olomouci.

Od počátku devadesátých let probíhaly především individuální sběry planých forem a vybraných ohrožených druhů v NP Podyjí Dr. Zapletalovou. Do této oblasti byly soustředěny i dvě sběrové expedice, a sice v letech 1997 a 2000. Po roce 2000 poklesl počet sbíraných semenných vzorků v NP Podyjí, a pracoviště se na základě požadavků a konzultací s botanikem Správy NP Podyjí zaměřilo na ohrožené druhy. Tyto druhy byly a jsou ukládány jak v genové bance v Praze-Ruzyni, tak i v Bance semen ohrožených druhů v Olomouci. Od roku 2007 započal intenzivní výzkum úhorových společenstev na území NP Podyjí a v současnosti se do popředí zájmu v rámci dlouholeté spolupráce dostává tvorba regionálních směsí pro zatravnění zemědělské půdy v NP Podyjí a okolí.

Tab. 5 Počty předaných pasportních a popisných dat do centrální evidence EVIGEZ a počty vzorků předaných do GB celkově a za dobu řešení Národního programu

		Pasport*		Popis	GB*	
		Celkem	1993-2013		Celkem	1993-2013
A,D,F		155	155		122	122
H,L,M		383	341	2	331	330
O		21	21	15	21	21
T01	<i>Medicago sativa</i> L.	586	357	549	540	445
T02	<i>Trifolium pratense</i> L.	619	222	508	360	265
T03	<i>Trifolium repens</i> L.	346	194	256	277	249
T04	<i>Trifolium hybridum</i> L.	69	43	39	57	57
T05	<i>Trifolium</i> sp. (other sp.)	270	226	77	241	241
T06	<i>Anthyllis</i> L.	35	32	1	33	33
T08	<i>Astragalus</i> L.	92	87	3	79	79
T09	<i>Coronilla</i> L.	43	40	2	42	42
T10	<i>Chamaecytissus</i> LINK.	9	9		7	7
T11	<i>Dorycnium</i> MILLER	10	10		8	8
T12	<i>Galega</i> L.	5	4	3	4	9
T13	<i>Genista</i> L.	27	27		27	27
T14	<i>Lotus</i> L.	101	67	49	73	73
T15	<i>Medicago lupulina</i> L.	44	42	4	41	41
T16	<i>Medicago</i> x <i>varia</i> MARTYN	43	19	38	35	29
T17	<i>Medicago</i> L. (other sp.)	48	30	4	41	25
T18	<i>Melilotus</i> MILLER	102	64	16	76	74
T20	<i>Ononis</i> L.	2	1		2	1
T21	<i>Onobrychis</i> MILLER	32	30	9	30	29
T22	<i>Ornithopus</i> L.	9	6	1	7	7
T23	<i>Tetragonolobus</i> SCOP.	11	9		10	10
T25	<i>Trigonella</i> L.	10	4	1	6	6
T27	<i>Malva</i> L.	8	4		6	6
T30	<i>Lavatera</i> L.	3	3		3	3
T31	<i>Leuzea</i> DC.	1	1		1	1
T34	<i>Silphium</i> L.	1			1	1
T36	<i>Scorpiurus</i> L.	4	2		2	2
T38	<i>Stylosanthes</i>	1			1	1
T39	<i>Phacelia</i> JUSS.	31	30	29	31	31
T40	<i>Spergula</i> L.	1	1		1	1
T41	<i>Hedysarum</i> L.	2	2		2	2
W77	<i>Sarothamnus</i> WIMMER	11	11		11	11
Celkem		3135	2094	1606	2529	2289

*všechny položky včetně nedostupných, chráněných a pracovní kolekce

Spolupráce s CHKO Moravský kras probíhá na úrovni botanického monitoringu závrtů a změn v jejich vegetaci, byla zde organizována expedice v roce 2001 a dále byly společně s ČSOP Ponikva prezentovány vybrané materiály starých a krajových odrůd na políčkách. Na tuto činnost navázalo několik přednáškových bloků pro odbornou veřejnost, z nich poslední blok proběhl v květnu 2013.

Banka semen ohrožených druhů při Vlastivědném muzeu v Olomouci uchovává mnoho semenných vzorků ohrožených druhů rostlin, zejména z oblasti Moravy. Nejvíce sběrů je právě z oblasti NP Podyjí (115 vzorků, 68 druhů), většina z nich byla sbírána pracovníky ústavu. Některé položky jsou použity ve venkovní expozici ohrožených druhů a jiné jsou prezentovány při výstavách.

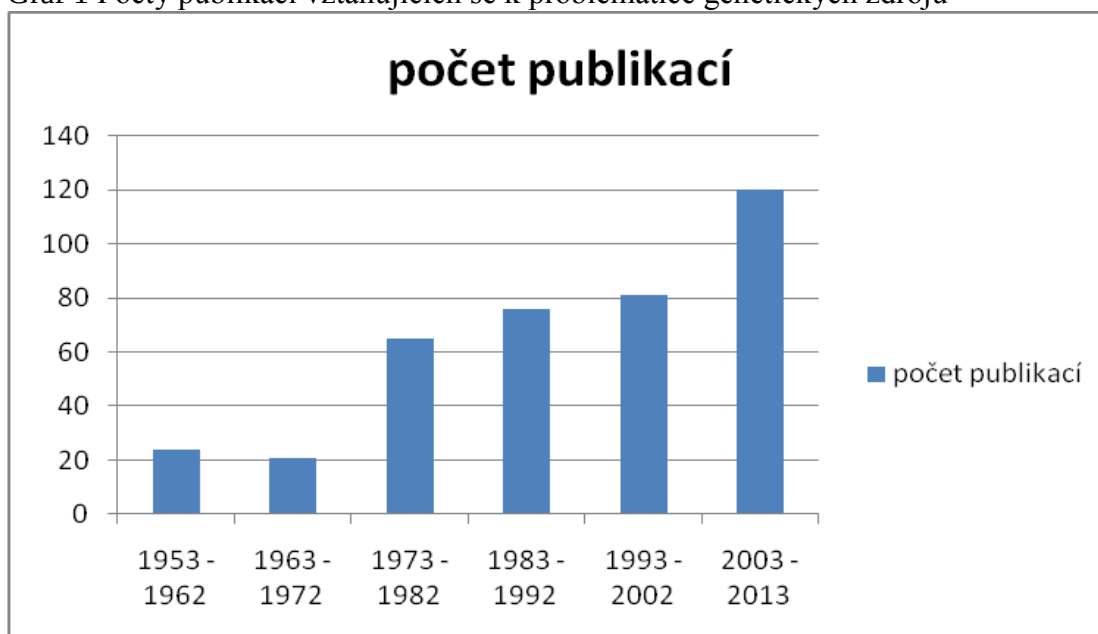
Kolektiv řešitelů dále velice úzce spolupracuje se šlechtitelskými firmami v ČR (DLF Trifolium Hladké Životice; Agrogen, spol. s r.o. Troubsko; Tagro, spol. s r.o. Červený Dvůr; Oseva UNI, a. s. Choceň a Oseva PRO, s. r. o., Výzkumná stanice travinářská Zubří).

Významná je také spolupráce se zahraničními partnery. Jedná se především o VÚRV Piešťany, Slovensko; Výskumný ústav trávnych porastov a horského poľnohospodárstva, Banská Bystrica, Slovensko; Institute for Forage Crops, Ltd., Kruševac, Srbsko; Research institute of mountain stockbreeding and agriculture, Troyan, Bulgaria a Universidad Nacional del Sur, Departamento de Agronomía, Bahía Blanca, Argentina.

Součástí práce s genetickými zdroji je prezentace dosažených výsledků na domácích a zahraničních konferencích formou přednášek a posterů, příspěvků v odborném a vědeckém tisku a na seminářích pro odbornou i laickou veřejnost. V průběhu řešení Národního programu bylo kolektivem zpracováno a vydáno 5 uplatněných certifikovaných metodik, 2 knižní publikace, 3 kapitoly v odborných knihách a 2 učební texty.

V grafu 1 jsou uvedeny počty publikací, vztahující se k problematice genetických zdrojů. Celkově bylo publikováno 387 prací, v období 1973 – 2002 jsou započítány také práce řešitelů kolekcí VST Zubří, protože v této době byla stanice součástí troubského pracoviště. Za dobu řešení Národního programu bylo publikováno 201 prací, vztahujících se ke genetickým zdrojům.

Graf 1 Počty publikací vztahujících se k problematice genetických zdrojů



Závěr

V příspěvku jsou shrnuty výsledky studia genetických zdrojů, nejen za 60 roků existence pícninářského výzkumu v Troubsku (1953-2013), ale i za dobu řešení „Národního programu konzervace a využití genetických zdrojů kulturních rostlin a agro-biodiversity“ (1993-2013). Zpracované přehledy ukazují vývoj v oblasti shromažďování genetických zdrojů, jejich zkoušení, popis a skladování. Dále je uveden vývoj publikační činnosti kolektivu, podíl na šlechtění a jsou zmíněny dlouhodobé spolupráce s domácími a zahraničními pracovišti.

Dedikace

Výsledky byly získány za částečné institucionální podpory na dlouhodobý koncepční rozvoj výzkumné organizace a částečně z prostředků „Národního programu konzervace a využití genetických zdrojů kulturních rostlin a agro-biodiversity“, financovaného MZe ČR, č.j. MZe ČR 206553/2011-17253

Použitá literatura

- Pelikán, J., Vymyslický, T., Gottwaldová, P., 2005: Hodnocení genetických zdrojů motýlokvetých a příbuzných druhů pícnin v České republice. In: Hodnotenie genetických zdrojov rastlín. VÚRV Piešťany, 73 – 76.
- Pelikán, J., Vymyslický, T., Hutyrová, H., Knotová, D., Minjaríková, P., Cholastová, T., Nedělník, J., 2009: Metodika tvorby „core collection“ u motýlokvetých pícnin. Uplatněná certifikovaná metodika 9/09. VÚP Troubsko, ZV Troubsko, 34. ISBN: 978-80-86908-18-2
- Pelikán, J., Vymyslický, T., Knotová, D., Hutyrová, H., Raab, S., 2012: Problematika regenerace a uchování semen planých forem čeledi *Fabaceae*. In: Aktuální otázky v práci s genetickými zdroji rostlin a zhodnocení výsledků Národního programu. Sborník referátů, Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i. Praha 6 – Ruzyně, 60-64, ISBN 978-80-7427-094-9.
- Vacek, V., Schmied, M., Hájek, D., Kristek, J., 1971: Klasifikátor pro popisy odrůd víceletých kulturních druhů rodu *Medicago* L. Záv. zpráva VSP Troubsko, 118, 11.
- Vymyslický, T., Pelikán, J., Gottwaldová, P., Nedělník, J., 2005: Sběrové expedice – cílené sběry za účelem uchování biodiverzity krajových forem kulturních rostlin a příbuzných planých druhů. In: Sbor. ref. ze semináře Dostupnost a využívání genetických zdrojů rostlin a podpora biodiverzity. VÚRV Praha – Ruzyně, 108 – 111.

Kontaktní adresa: Ing. Jan Pelikán, CSc., Výzkumný ústav pícninářský, spol. s r. o., Zahradní 1, 664 41 Troubsko; e-mail: pelikan@vupt.cz

PROBLEMATIKA GENOFONDŮ RÉVY VINNÉ

Issue of grapevine germplasm

Tomášek J.

Šlechtitelská stanice vinařská, Ampelos Znojmo a.s., Vrbovec

Abstrakt

Ampelos Šlechtitelská stanice vinařská od svého založení roku 1895 se zabývá šlechtěním vinné révy a kolekcemi odrůd révy vinné. Kolekce odrůd byly vysazovány jako výchozí materiál ke kombinačnímu křížení. Díky těmto kolekcím se ve Znojenské vinařské oblasti rozšiřovaly první odrůdy, které se následně šířily do ostatních vinařských oblastí. Jednalo se například o Müller Thurgau, Bouvierův hrozen, Malinger a další.

Klíčová slova: šlechtění, vinná réva, vinařský region

Abstract

Ampelos Viticulture Breeding Station is interested in breeding vines and collections vine varieties since its establishment in 1895. Collection varieties were planted as a base material to the crossing. Regarding these collections in the viticultural region in Znojmo, first varieties expanded and subsequently spread to other regions. These included Müller Thurgau, Bouvierův grape, Malinger etc.

Key words: breeding, grape - vine, viticultural region

Původ odrůd révy vinné

Za geografický původ ušlechtilých odrůd je považovaná oblast kolem Středozemního moře. Odtud se réva šířila spontánně ve formě *Vitis vinifera* a *Vitis Silvestris*. I na našem území kde se nachází zbytky těchto rév. Mnohem větší význam pro naše Vinařství mělo vědomé šíření ušlechtilých rév. Pro vinařství na Jižní Moravě měly vliv Římské legie v období Říše Římské. Legie u svých sídel zakládaly vinice. Řešily tím zaměstnání vojáků a produkci vína nutného pro další tažení.

Z odrůd, které pochází z tohoto období, jsou všechny typy chrupek. Vyobrazení chrupek je ve výzdobě pyramid. Další odrůdy vznikaly z volného opylení mezi starými římskými odrůdami a planě rostoucí révou. V oblasti Rýna tak vznikla odrůda Ryzlink rýnský.

Středověk s rozšířením křesťanství a vznikem klášterů se šířilo pěstování révy a byly importovány další odrůdy. Za panování Karla IV. se rozšířily burgundské odrůdy Pinot blanc (Rulandské bílé), Pinot gris (Rulandské šedé), Pinot noir (Rulandské modré), Chardonnay. Výrazný pokrok za Karla IV. spočíval v nastolení příznivých podmínek ekonomických a změna pěstitelských technologií.

U dalších odrůd se v ampelografiích píše odrůda neznámého původu. Jsou to velmi staré odrůdy dodnes pěstované.

U nejstarších odrůd je charakteristické, že jsou oblíbené u konzumentů vína. Aby se odrůdy udržely v dobrém zdravotním stavu s dostatečným výnosem, ve vysoké kvalitě a zabránilo se postupné degeneraci, je nutná selekce. Pro révu vinnou je příznačné, že selekce se praktikují velmi dlouho a u většiny odrůd jsou vyselektovány klony, které jsou již velmi odlišné. Proto jsou zařazeny i v našem genofondu. V současné době pro množitelské účely je kladen důraz na zdravotní stav a materiály se ozdravují.

V důsledku invaze mšičky révokaza, který na konci 19. století lavinovitě ničil evropské vinice, se hledalo východisko v kombinačním křížení a štěpování na americké révy. Začíná cílevědomé novošlechtění. Původního cíle odolné révy proti révokazu s kvalitními

hrozný ušlechtilých evropských rév nebylo v tomto období dosaženo vzhledem k složitosti genotypů vinné révy a polygenní struktuře důležitých znaků a vlastností. Z tohoto období pochází odrůdy z Německa, Francie, Maďarska, Ruska a dalších zemí. Tyto odrůdy tvoří další část genofondu.

Problémy genofondu vinné révy

Réva se v podmínkách České republiky pěstuje v nejteplejších oblastech, ve kterých se vyhledávají vhodná stanoviště. V průběhu deseti let musíme počítat minimálně se dvěma roky, kdy je réva poškozená zimními nebo pozdními jarními mrazy. U importovaných odrůd z jižních oblastí je poškození mrazy ještě výraznější, musí se obnovovat celý keř a mnoho keřů odumírá. Problémem je i odlišný charakter zimy. Například *Vitis Amurensis* ve své domovině na dálném východě bez problémů snáší teploty -40°C . V našich podmínkách zmrzá při mnohem nižších teplotách. Dochází zde ke snižování, kdy při oteplení se rychleji připravuje na rašení.

Dalším problémem proti jiným plodinám je jejich obtížnější vegetativní rozmnožování. Štěpuje se v předjarním období, štěpy se stratifikují, aby se vytvořilo závalové pletivo způsobující srůst roubu a podnože, a teprve potom se může vysázet do révové školky.

Réva, která je dlouholetá plodina, vyžaduje stavbu opěrné konstrukce, množství ruční práce při řezu, úpravou listové plochy a intenzivní ochranu proti chorobám a škůdcům.

Aktuální situace

Deskriptory

V současné době ve sledováních popisujeme odrůdu pomocí morfologických, fenologických, hospodářských a analytických znaků a vlastností. Je vytvořen klasifikátor se 72 deskriptory, kde každý deskriptor má svoji číselnou škálu. Ke každému číslu přísluší slovní popis nebo i schématický náčrt. Deskriptory jsou výběrem z mnohem podrobnějšího mezinárodního klasifikátoru OIV. Růstové fáze se popisují stupnicí BBCH, která rozlišuje 99 kódů, analytické rozbory moštů a vín sledují 13 parametrů. Pro charakteristiku stolních hroznů (10 parametrů), používáme klasifikátor ÚKZUZ. I přes snahu maximálně přesně popsat odrůdu v odlišných klimatických podmínkách, dávají stejné metodiky odlišné výsledky. Nadále zůstává úkol hledání nových jednoznačných charakteristik pro odrůdy révy vinné. Zde vkládáme naději do nových genetických postupů charakterizováním odrůd pomocí genetických markerů.

Sortimenty

Do roku 1989 byly sortimenty odrůd ve všech vinařských stanicích. Poslední sortiment na původních stanicích byl likvidován ve Velkých Pavlovicích roku 2013. Pracovníkům stanice vděčíme za upozornění o likvidaci. Za vegetace jsme označily 207 odrůd a během prosince odebrali rostliny révy na množení. Spolu s mizením sortimentů vlastně mizí i genové zdroje. Genofondy nabývají na důležitosti i zkracováním věku odrůd. Kupodivu ztráta odrůd nehrozí u nejstarších odrůd, které mají stálé místo jak v pěstování, tak i u konzumentů vín. Nejohroženější skupinou jsou odrůdy z raných období šlechtění, které jsou překonávány nejnovějšími odrůdami.

Udržování odrůd

K výše uvedeným skutečnostem je po technické stránce důležité udržovat genofond po stránce agrotechnické i fyto-sanitární. Praktická životnost Genofondu je mnohem kratší, než je

životnost produkční vinice. Na udržení genofondu je třeba včas začít s obnovou, aby se zachovala kontinuita pozorování. Na množení používat keře vybrané metodou udržovacího šlechtění.

Dedikace

Tato práce vznikla za podpory MZe ČR „Národní program konzervace a využívání genetických zdrojů kulturních rostlin a biodiversity“, č.j. MZe ČR 206553/2011-17253

Kontaktní adresa: Ing. Jaroslav Tomášek, Šlechtitelská stanice vinařská, Ampelos Znojmo a.s., 671 24 Vrbovec 274; e-mail: jaroslav.tomasek@gmail.com

**DESET LET PROVOZU KRYOBANKY VEGETATIVNĚ
MNOŽENÝCH ROSTLIN – ZKUŠENOSTI A PERSPEKTIVY**
**Ten years anniversary of cryobank operation of vegetatively propagated plants –
experience and perspectives**
Zámečník J., Faltus M., Bilavčík A.

Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Praha - Ruzyně

Abstrakt

Vzhledem k desetiletému výročí provozu kryobanky je v příspěvku zhodnocen vývoj kryoprezervace ve Výzkumném ústavu rostlinné výroby, v.v.i. Krátce je zmíněna historie a hlavní milníky vývoje kryoprezervačních metod. Jsou uvedeny příklady kryobank a počty kryoprezervovaných vzorků v ČR, EU a ve světě. V metodice jsou uvedeny kryoprezervační postupy se zaměřením na metody vyvolávající tvorbu biologického skla za účelem uchování genofundu bez nežádoucích krystalů ledu. Kriticky je zhodnoceno, proč se nepoužívá v kryobance mutagenní kryoprotektant dimethyl sulfoxid, ačkoliv zajišťuje vysokou regenerační schopnost. V kryobance je uloženo 368 genotypů od deseti druhů plodin v 3731 kryozkumavkách v kapalném dusíku. Je diskutována metoda kryoterapie vzhledem k ostatním metodám odvirování a provedení fyzické revize kryobanky. V závěru je shrnut pohled na rozvoj kryobanky do budoucnosti.

Klíčová slova: kryoprezervace, kryokonzervace, kryoterapie, kryoprotektant, vitifikace

Abstract

The paper reviews the development of cryopreservation at the Crop Research Institute on the occasion of the ten-year anniversary of the Cryobank. The history and main milestones of the development of cryopreservation methods are mentioned. Examples of most famous cryobanks with a number of accessions in the Czech Republic, the EU and the world are given. The cryopreservation procedures focusing on methods inducing biological glass in order to preserve germplasm without dangerous ice crystal formation are listed in the methods. It is critically evaluated why the Cryobank does not use mutagenic cryoprotectant dimethyl sulfoxide, although it is widely used. The 368 genotypes of 10 plant species in 3731 cryoampules are stored in liquid nitrogen in the Cryobank. Cryotherapy method for virus elimination is discussed in relation to other methods of virus removal. In conclusion the view of cryobank development in the future is summarized.

Key words: cryopreservation, cryoconservation, cryotherapy, cryoprotectant, vitrification

Úvod

Kryobanky se budují za účelem dlouhodobého uchování hlavně vegetativně množených druhů rostlin, dále pak druhů, které tvoří tzv. rekalcitrantní semena, tj. semena která nesnesou hlubokou dehydrataci a druhů, které jsou citlivé k nízkým teplotám. Je to bezpečný a levný způsob uchování genofundu rostlin po dlouhou dobu, počítá se s desítkami let (30–100 let). Je nezávislý na vnějších klimatických podmínkách a také je do určité míry málo závislý na dodávkách elektrické energie. Kryokonzervace vegetativně množených rostlin je upravena v zákoně č. 148/2003 Sb. a prováděcí vyhlášce 458/2003 k tomuto zákonu, kterými se upravují podmínky a zásady péče o genofondy a jejich využívání. Uchování vzorků v kryobance je z hlediska dlouhodobého uchování bezpečné, proto se doporučuje kryoprezervace jako bezpečnostní duplikace k ostatním způsobům uložení genofundu rostlin (FAO, 2013; Reed, 2001; Reed, 2010).

Historie kryobiologie ve Výzkumném ústavu rostlinné výroby

Počátky kryoprezervačních technik zavedl ve Výzkumném ústavu rostlinné výroby Ing. Vladimír Skládal, CSc. počátkem sedmdesátých let. V roce 1988 na mezinárodním semináři, za účasti předního světového odborníka profesora Y. P. S. Bajaj z Punjab Agricultural University, Indie, zhodnotil první výsledky s kryoprezervací bramboru (Skládal a Klimešová, 1988). Po dalším dlouholetém výzkumu optimalizace kryoprotokolů a na základě slibných výsledků byla dne 26. 11. 2003 na zasedání Rady genetických zdrojů v Žatci založena kryobanka vegetativně množených rostlin (Zámečník et al., 2005).

Řada výzkumných projektů (3 GAČR, 4 NAZV, 3 COST, 2 GENRES, 2 Kontakt) se v průběhu let zabývala vylepšením kryoprotokolů a prohloubením znalostí rostlinné kryobiologie. V roce 2006 získal „Poloprovoz kryobanky vegetativně množených rostlin“ uznání ministra zemědělství a předsedy ČAZV jako nejlepší aplikovaný výsledek. V roce 2006 byl uspořádán pracovní seminář o kryoprezervaci s ukázkou kryoprezervačních technik pro české držitele kolekcí. Následovaly tři školy termické analýzy (TA School) v letech 2007-2009 pro 18 doktorandů z deseti států EU, potenciální uživatele termické analýzy v kryobiologii. V roce 2013 kryobanka získala certifikaci managementu kvality ISO 9001. V roce 2013 byli seznámeni účastníci tří denního kurzu na univerzitě Cuyo v Argentině s naším know-how s kryoprezervací vegetativně množených rostlin, s cílem založit argentinskou kryobanku česneků. V letošním roce slaví Kryobanka vegetativně množených rostlin ve VÚRV, v.v.i. desáté výročí od jejího založení, což je zároveň v roce dvacátého výročí založení Národního programu konzervace a využití genofondu rostlin.

Kryobanky v České republice

Vedle Kryobanky vegetativně množených rostlin provozované ve Výzkumném ústavu rostlinné výroby, v.v.i., v Praze Ruzyni se nižší rostliny např. řasy uchovávají v Kryobance v Třeboni. Ke konzervaci genetického materiálu živočichů slouží Kryobanka v Hradištku ČMSCH založená v roce 1995 a Kryobanka myších hybridů v Ústavu molekulární genetiky, AV ČR 2007. Kryobanky jsou stavěny i ve specializovaných zdravotnických zařízeních nebo přímo v nemocnicích např.: Tkáňová banka, FN Brno 1992; Kryobanka FN Motol, 2002; FN Hradec Králové, 2003; Ústav hematologie a krevní transfuze Praha; lidské embryonální kmenové buňky, Brno 2007; FN Královské Vinohrady, Praha 2011 a další.

Kryobanky v Evropské unii

Podle databáze EURISCO je podle pořadí Česká republika na prvním místě v počtu uchovávaných vegetativně množených rostlin v *in vitro* podmínkách s 2515 položkami, Německo má 2434 a Polsko 1613 uchovávaných položek genotypů v *in vitro* metodou pomalého růstu. Je zajímavé, že ty státy, které mají nejvíce rostlin uchovávaných v *in vitro*, mají zároveň také velké množství uchovávaných položek v kryobance, což nepřímo svědčí o nezbytnosti zvládnutí techniky pěstování rostlin v *in vitro*, než se přistoupí ke kryoprezervaci. V databázi EURISCO jsou uváděny jen čtyři kryobanky s rostlinami uchovávaných v ultranízke teplotě. Počty kryoprezervovaných položek podle pořadí: v Německu 1156, ČR 293, Polsko 191 a Estonsko jednu jablň. Vedle kryobank uvedených v databázi EURISCO jsou ještě další kryobanky, například Laboratory of Tropical Crop Improvement, K.U.Leuven (Leuven, Belgie) s více než 440 položkami banánovníků, AFOCEL (Association Forêt Cellulose of France) s více než 100 položkami jilmů a IRD (Montpellier, France), s více než 80 položkami palem.

Kryobanky ve světě

Nejnámější, největší a asi i nejstarší je kryobanka v National Seed Storage Laboratory (NSSL) (Fort Collins, Colorado, USA) s více než 2 100 položkami jabloní, dále

National Clonal Germplasm Repository (NCGR) of Corvallis (USA) s více než 104 položkami hrušní; International Potato Centre (CIP, Lima, Peru) s více než 345 položkami brambor; Tissue Culture BC Research Inc. (Vancouver, BC, Canada) přibližně s 5000 položkami 14 druhů konifer; National Institute of Agrobiological Resources (NIAR Japan), s více než 50 položkami morušovníků. Velká kryobanka RDA vegetativně množených rostlin plně automatická a odolná k zemětřesení se nachází v Suwonu v Jižní Koreji a skladuje stovky položek bramboru, 1158 položek česneku a položky ženšenu korejského původu.

Metody kryoprezervace

Metody kryoprezervace rostlin založené na tvorbě skla

Cílem kryoprezervačních metod je navodit takovou dehydrataci pletiv, při které již není volná voda a netvoří se krystalky ledu (Zámečník et al., 2011). V případě, že odebrané množství vody rostlině navozuje odumírání již před samotným ponořením do kapalného dusíku, pak se musí rostliny chránit pomocí kryoprotektivních roztoků, nejčastěji směsí sacharózy a glycerolu. Dalším nástrojem je rychlé až ultrarychlé zchlazení (řádově stovky až tisíce °C za minutu) v malých (1–2 mm) vzrostných vrcholech. Pro dosažení těchto rychlostí se vzrostné vrcholy umístí na hliníkový plíšek a ten se pak rychle ponoří do kapalného dusíku. Při takto rychlém zamrazení se nestačí tvořit krystaly ledu anebo se tvoří malé a ty pak nejsou škodlivé. V návaznosti na rychlé chlazení je nutné provést i rychlý ohřev vzorků. Rychlý ohřev vzorků se zabezpečuje jejich ponořením do 40°C teplé vody. Kryoprotokol pro příslušný rostlinný druh je založen na metodách vyvolávajících vitrifikační stav, který je výhodný pro dlouhodobé uchování genetické informace.

Vitrifikační metoda

Kryoprezervace vegetativně množených rostlin, nebo jejich částí je metoda pro uchování v nízkých nebo ultranízkých teplotách za účelem uchování biodiversity (Zámečník et al., 2007a). Podstatou této metody je ve většině případů navození vitrifikačního stavu, při kterém se při ochlazování netvoří krystaly ledu, které mají jinak za následek nevratné poškození rostlinných buněk (Fahy et al., 1984). Většina nových metod kryoprezervace rostlin je založena na vitrifikaci. Vitrifikační metoda vede k navození amorfního stavu buněčného obsahu tzv. biologického skla i při ultranízkých teplotách. V literatuře se uvádí mnoho modifikací metody vitrifikace. S určitými úpravami používáme v naší laboratoři tuto metodu (Grospietsch et al., 1999; Zámečník et al., 2007a). Vitrifikační metoda, zesklenní buněčného obsahu je založena na: a) dehydrataci, proceduře odvodnění (Fabre and Dereuddre, 1990; Faltus et al., 2007); b) osmotické dehydrataci pomocí kryoprotektivních roztoků nebo směsí kryoprotektantu (Faltus et al., 2006b); c) enkapsulačně-dehydratační metodě, podle které se nejdříve vzrostné vrcholy enkapsulují v alginátu sodném a pak se teprve dehydratují (Gonzalez-Arno and Engelmann, 2006).

Metoda dvoustupňového mrznutí

Vedle vitrifikačních metod pro *in vitro* narostlé dřeviny (Niino et al., 1992) se používá také metoda dvoustupňového mrznutí, která je založena na mrazové dehydrataci buněk při pomalém mrznutí zpravidla do -30 až -50 °C. Metoda dvoustupňového zamrazování se používá hlavně pro uchování dormantních pupenů ovocných dřevin. Dvoustupňová metoda je užívaná především pro kryoprezervaci takových rostlin, které jsou schopné otužení a přežití podnulových teplot. Především se používá pro kryoprezervaci dormantních pupenů (Stushnoff, 1987). Princip této metody spočívá v pomalém snižování teploty do úrovně teploty -30 až -40 °C v prvním stupni, kdy dochází při rychlostech přibližně 2 °C za hodinu

k promrzání pletiv a k jejich mrazové dehydrataci. Poté následuje vyrovnání po dobu 4 – 24 hodin na dosažené teplotě a následuje přímé ponoření vzorků do kapalného dusíku. Odtátí vzorků probíhá jejich vložením do teploty 5 °C (ve vzduchu), kdy dojde k exponenciálnímu ohřevu vzorků (s počáteční rychlostí desítky stupňů Celsia za minutu). Po odtátí jsou vzorky, dormantní pupeny, regenerovány buďto očkovaním na podnože (Seufferheld et al., 1991) anebo převodem do *in vitro* podmínek.

Kryoprotektanty – problematické používání dimethyl sulfoxidu

Jedna z nelepších kryoprotektivních látek je dimethyl sulfoxide (DMSO). Je základem velmi rozšířené kryoprotektivní směsi (PVS2) Plant Vitricification Solution No.2 (Sakai et al., 1990). Na základě cytogenetické analýzy je tato látka podle Safety Data Sheet Sigma-Aldrich genotoxická, karcinogenní, mutagenní a toxická při reprodukci. Z těchto důvodů, v naší kryobance nepoužíváme DMSO a tím se řadíme ke kryobankám s označením DMSO Free Cryobank. Vzhledem k vysoké úrovni regenerace při použití DMSO, je jeho nepoužívání velká nevýhoda. Tato nevýhoda je kompenzována tím, že dlouhodobě uchovaný genetický materiál rostlin nebude v přítomnosti s touto mutagenní látkou. Náhradou se používá vitrifikační roztok PVS3 (Nishizawa et al., 1993). V kryoprotektivních roztocích bez DMSO jsou hlavní složkou polysacharidy. Použití specifických polysacharidů závisí na rostlinném druhu, většinou se používá sacharóza. Sacharóza je přidávána již do předkultivačních médií. Rostliny z média přijímají sacharózu do pletiva a tím dochází k osmotické dehydrataci buněk. Sacharóza je také sklotvornou látkou a napomáhá tvorbě skla v rostlinách (Sikora et al., 2007). Druhou nejčastěji používanou kryoprotektivní látkou je glycerol.

Výsledky a diskuse

Termická analýza

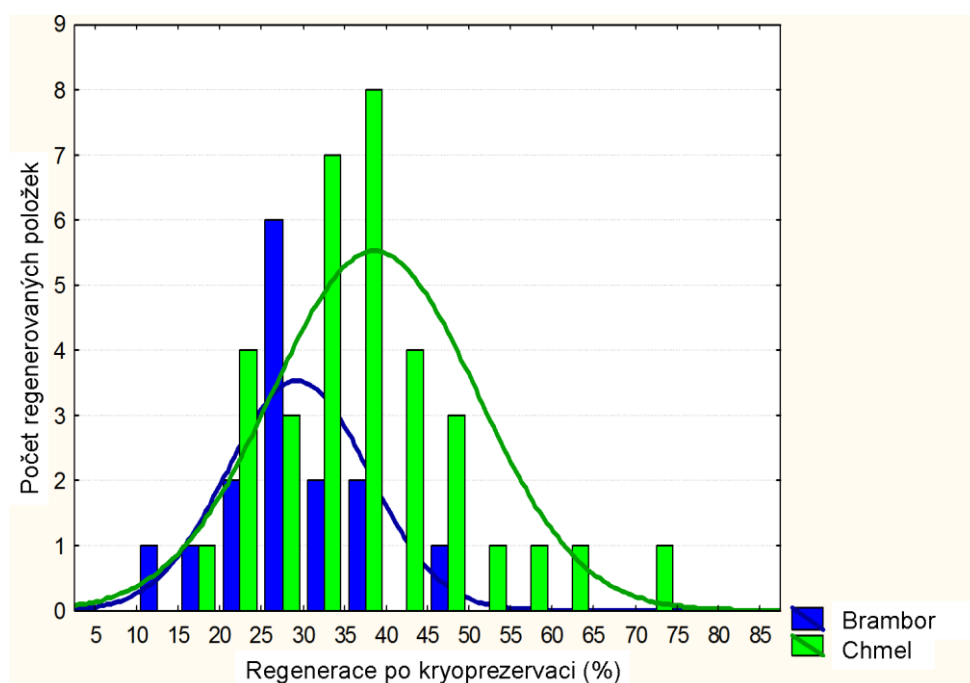
Diferenční skenovací kalorimetrie (DSC), patří k termickým metodám, které mohou být použity pro měření a stanovení fázových přechodů a teploty skelné transformace pro kryokonzervaci. V zásadě DSC měří teplotu a tepelný tok spojený s přechodem v rostlinném materiálu jako funkce času a teploty. Poskytuje informace o endotermické nebo exotermické změně, nebo změně v tepelné kapacitě. Získané údaje mohou být použity pro stanovení teploty skelného přechodu, teploty ledové nukleace, tání, varu, doby krystalizace a kinetické reakce – nejdůležitější vlastnosti pro kryokonzervaci rostlin (Zámečník et al., 2007b; Zámečník et al., 2006). Nebezpečí nukleace a následné intracelulární krystalizace ledu vede k poškození mrazem během chlazení a ohřevu vzorků a je považováno za kritický bod pro přežití rostlin v ultranízkých teplotách. Termická analýza se používá při zlepšování kryoprotokolů, postupů dehydratace a určení bezpečnostního limitu nízké teploty.

Účinnost kryoprezervačních metod – porovnání bramboru a chmele

V rámci výzkumných projektů byly optimalizovány podmínky kryoprezervace bramboru a chmele tak, aby byla dosažena vyšší průměrná regenerace rostlin u testovaných genotypů (Faltus et al., 2011a,b). Postupně byly modifikovány podmínky předkultivace explantátů, míra dehydratace a složení regeneračních médií (Faltus et al., 2006a). U bramboru i chmele se osvědčil růst nodálních segmentů na modifikovaném MS médiu se sníženým obsahem dusíku. Zatímco u bramboru byla úspěšná předkultivace explantátů na mediu s přísadkou 2M sacharosy, u chmele byla vhodnější kombinace působení roztoku 0,7M sacharosy a nízké teploty v jarovizační komoře. Průběh dehydratace závisel u obou plodin primárně na velikosti explantátů. Ta byla nižší u vzrostných vrcholů chmele než u bramboru. Z toho se odvíjel i čas dehydratace explantátů těchto plodin. Zatímco u chmele se doba

dehydratace pohybovala mezi 1:30 do 1:45 h., u bramboru to bylo mezi 1:40, až 2:00 h. Velký význam pro dosažení uspokojivé regenerace rostlin měl i způsob kultivace rostlin při regeneraci vzrostných vrcholů z tekutého dusíku. Regenerující rostliny musí být přistíněny, jinak může docházet k jejich poškození. U chmele bylo optimalizováno fytohormonové složení regeneračního media, které omezilo tvorbu kalusu a zvýšilo regeneraci explantátů chmele po kryoprezervaci. Pomocí těchto modifikací došlo ke zvýšení regenerační schopnosti bramboru po kryoprezervaci o 4,4 a u chmele o 7,9 %. Díky tomu bylo dosaženo průměrné regenerace explantátů u bramboru 29 % a u chmele 38 % (Obr. 1). Nejvyšší frekvence regenerace rostlin po kryoprezervaci byly u obou plodin přibližně v průměru jejich regenerační schopnosti.

Obr. 1 Histogram frekvence regenerační schopnosti explantátů po kryoprezervaci genotypů bramboru a chmele po kryoprezervaci na základě metody předkultivace – dehydratace testovaných. Průměrná hodnota regenerační schopnosti každého genotypu byla stanovena na základě regenerace minimálně 20 rostlin. (Faltus et al., 2008)



V tabulce (Tab. 1) jsou uvedeny počty kryoprezervovaných položek jednotlivých druhů vegetativně množených rostlin. Některé genotypy byly kryoprezervovány odvirované, za pozornost stojí 16 genotypů česneků odvirovaných pomocí kryoterapie (blíže vysvětleno níže), uložených v kryobance. Tyto položky byly zamrazeny v jednotlivých letech od doby založení kryobanky. Výsledky jsou v převážné většině výsledkem jednotlivých výzkumných úkolů.

V rámci řešení mezinárodního projektu EURALLIVEG (Keller et al., 2012) byla vytvořena core kolekce s cílem zahrnout do ní reprezentativní a zároveň odlišné genotypy česneků. Na obrázku 2 je genetickou analýzou hodnocená vnitrodruhová příbuznost ve shlucích podle oblastí původu. Většina položek je kryoprezervovaná (hvězdička u čísla položky), zbývá ještě kryoprezervovat nevybíhající česneky.

Čistota kultur v *in vitro* podmínkách, eliminace kontaminací

Tkáňové kultury rostlin představují užitečný nástroj pro pěstování a produkci celých rostlin, nebo rostlinných částí či orgánů v umělých médiích. Pro kryoprezervaci rostlin jsou proto využívány rostliny předpěstované v *in vitro* podmínkách. Během kultivace rostlin v *in vitro* podmínkách jsou rostliny snadno zbaveny hub a bakterií použitím nekontaminovaných částí rostlin, desinfekčními postupy nebo vyřazením zamořených rostlin z kultury *in vitro*.

Tab. 1 Počty úspěšně kryoprezervovaných položek v rámci jednotlivých druhů plodin, celkem, z nich v rámci Národního programu a procento odvírovaných z celkového počtu skladovaných v kryogenní teplotě.

Plodina (skupina plodin)	Počet kryoprezervovaných genotypů		
	celkem	z toho	
		v národním programu	odvírovaných %
<i>Solanum tuberosum</i> L.	58	58	100
<i>Humulus lupulus</i> L.	40	40	0
<i>Allium sativum</i> L.	125	105	16*
<i>Malus domestica</i> BORKH.	59	17	14
<i>Pyrus communis</i> L.	35	24	34**
<i>Cerasus avium</i> (L.) MOENCH	3	3	0
<i>Cerasus vulgaris</i> P.MILLER	10	10	0
<i>Cerasus x effusa</i> HOST	3	3	0
<i>Fragaria x ananassa</i> DUCH.	34	34	0
<i>Armeniaca vulgaris</i> LAM.	1	1	0
Celkem	368	295	

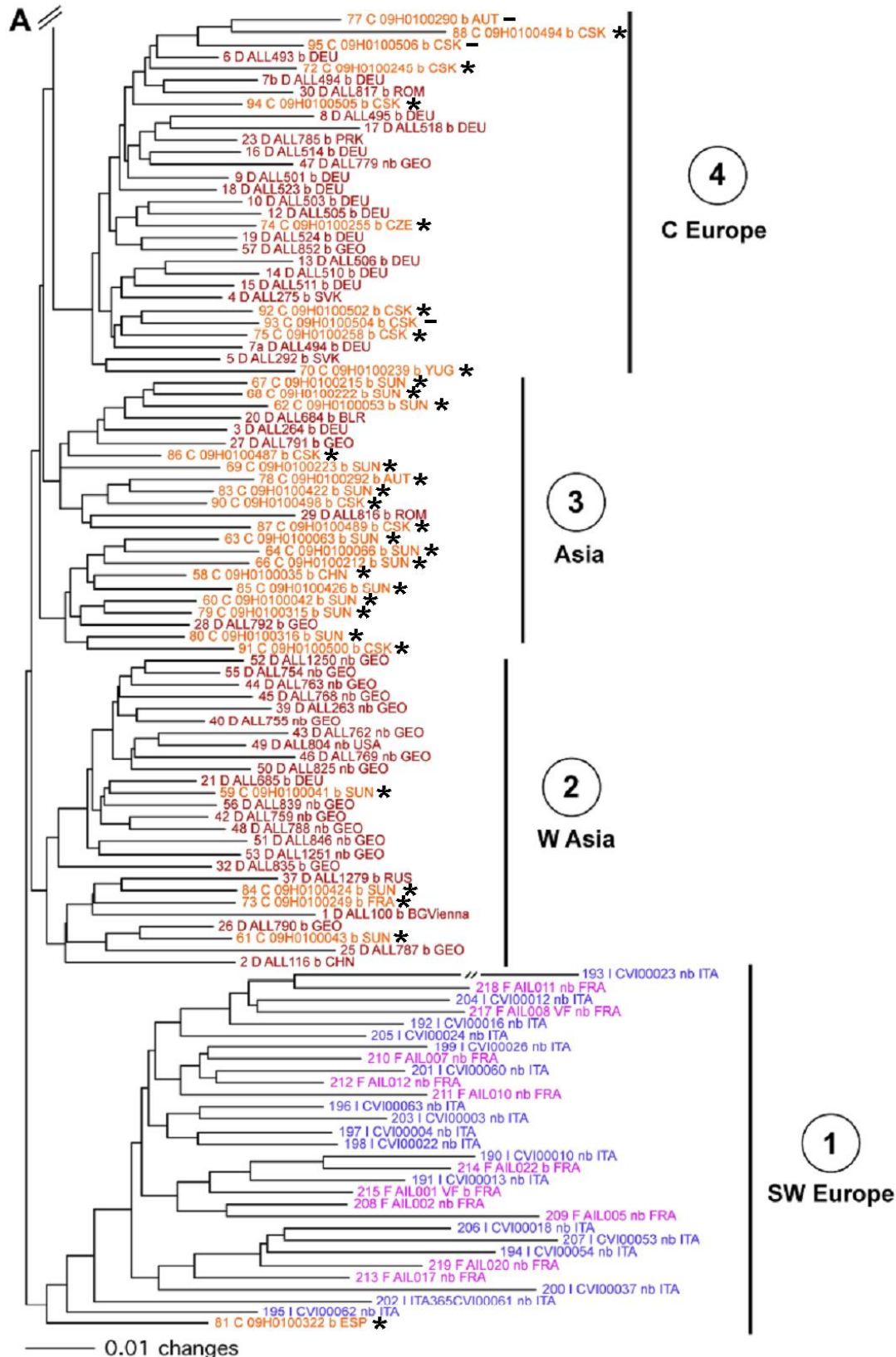
Poznámka: * odvírovány pomocí kryoterapie; ** testováno na viry (VT)

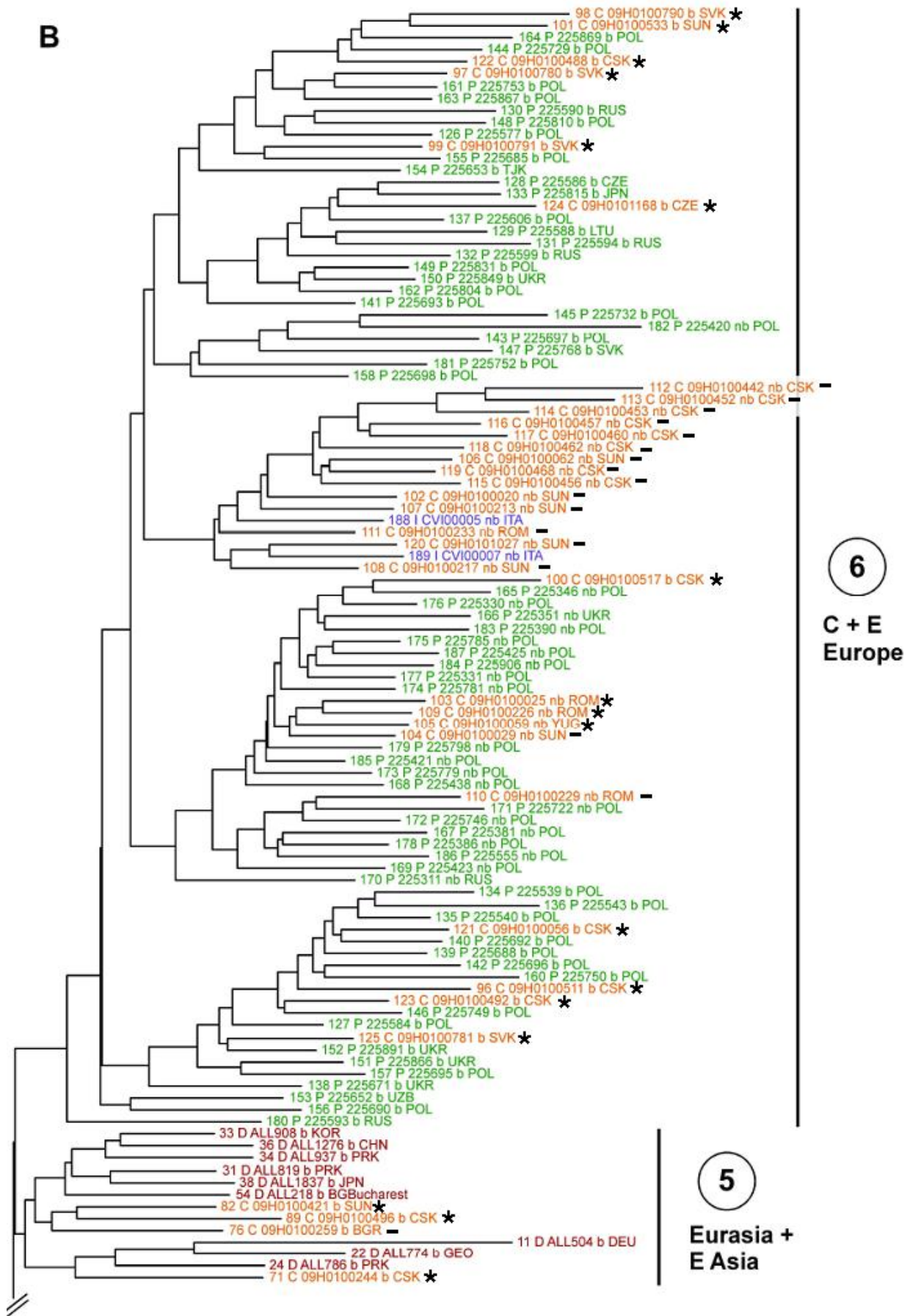
Rostlinný materiál zavedený čerstvě do kultury z *ex vitro* podmínek může obsahovat skryté endofyty (většinou bakterie). Endofyty se začínou množit často až po několika pasážích (subkultivacích) např. u česneků. Růst bakterií začne většinou v průběhu regenerace po kryoprezervaci. V jednotlivých případech záleží na posouzení experimentátora a jeho rozhodnutí, jak naložit s kontaminovaným rostlinným materiálem. U vzácného materiálu se doporučuje použití antibiotik. Je-li to možné, doporučuje se ozdravené rostliny v *in vitro* kultuře kontrolovat při opakovaném pasážování. V případě neúspěchu je nutné zavést do *in vitro* podmínek nové rostliny.

Kryoterapie – porovnání s ostatními metodami

Pro eliminaci viroidů před uložením rostlin do kryobanky, vedle běžně používaných technik na odvírování rostlin termoterapie a chemoterapie, může být použita také nová technika kryoterapie tzv. kryonůž (Helliot et al., 2001). Tato technika je založená na zničení starších buněk s viry v tunice v důsledku jejich poškození ultranízkou teplotou. Následná regenerace rostliny z mladších buněk nacházejících se v meristematickém dómu, zpravidla neobsahuje viroidy (Faltus et al., 2012a,b). Metodika kryoterapie představuje novou a velice účinnou metodu eliminace některých rostlinných virových patogenů pomocí působení kryogenních teplot. Metoda kryoterapie se skládá z postupu přípravy rostlinného materiálu, vystavení kryogenním teplotám, odtátí a regenerace. Následné hodnocení zdravotního stavu explantátů určí účinnost kryoterapie. Metoda kryoterapie se ukázala jako vysoce účinná pro odvírování bramboru a česneku.

Obr. 2 A, B: Vnitrodruhová příbuznost česneků v Core kolekci EU z projektu vytvořená pomocí AFLP fingerprintingu (Zanke et al., 2011). Uspořádání čísel: první číslo, sonda číslo; země odběru, dárce (C - Česká republika); sběr země, číslo ECN; země původu; dárcovská země; vybíhání (b), nevybíhání (nb) do květenství. Geografické původy jsou zobrazeny na pravé straně. Hvězdička u čísla značí úspěšné uchování v kryobance, pomlčka znamená nutnost kryokonzervace v blízké budoucnosti.





Účinnost eliminace viroidů

Při odvirování genotypů bramboru od tří virů byla metoda kryoterapie účinná u dvou virů (PLRV a PVY) (Tab.2). U těchto virů dokonce kryoterapie dvojnásobně převyšovala úspěšnost dalších dvou použitých metod, termoterapii a chemoterapii. U jednoho viru (PVS) nebyla účinná ani termoterapie ani kryoterapie. U genotypů chmele se prováděla kryoterapie dvou virů u 12 genotypů s 10-25% úspěšností. Kolekce českého česneku byla hodnocena na přítomnost čtyř virových chorob (OYDV, GCLV, LYSV a SLV) metodou ELISA. Výsledky ukázaly 65-83% promoření kolekce v závislosti na jednotlivých genotypech. Na základě těchto výsledků byly provedeny pokusy s ozdravením materiálů českých genotypů česneku, a to kombinací metod izolace meristémů v podmínkách *in vitro* a chemoterapie. Po kryoterapii byla u jednotlivých genotypů česneků zjištěna pomocí RFLP 60% úspěšnost eliminace čtyř virů (OYDV, GCLV, LYSV a SLV) u 20 genotypů česneků, což je srovnatelné s ostatními metodami eliminace virů (Zámečník a Svobodová, nepublikováno).

Tab. 2 Porovnání úspěšnosti odvirování rostlin pomocí kryoterapie s ostatními metodami u bramboru (spolupráce s P. Dědičem VÚB HB)

Metoda	Eliminace virů bramboru (%)		
	PLRV	PVY	PVS
Termoterapie	28	24	0
Chemoterapie	0	22	80
Kryoterapie	67	64	0

Zkušenosti s provozem kryobanky

Byl vypracován pracovní postup pro uchování vzorků genetických zdrojů rostlin (GZR) v kryobance. Výchozí materiál pro uchování GZR v kryobance jsou rostliny napěstované v podmínkách *in vitro*. Vypreparované vzrostné vrcholy s meristematickými buňkami jsou použity jako zdroj rostlinné části pro kryoprezervaci. Pro dlouhodobé skladování kryoprezervovaných rostlinných vzorků je použit systém skladování v kapalném dusíku, tedy v teplotě -196 °C. Rostlinné vzorky jsou uchovány v kryozkumavkách, umístěné v krabičkách a následně v nosičích krabiček. Metody kryoprezervace jsou postupně optimalizovány pro jednotlivé druhy rostlin. Pro určení počtu živých rostlin uložených v kapalném dusíku se používá pravděpodobnostní model (Dussert et al., 2003).

Dokumentace vzorků GZR uložených v kryobance

Informační systém EVIGEZ vypracovaný pro genobanku je základem pro dokumentaci GZR v kryobance. K databázi EVIGEZ je přidána databáze kryoprotokolů. Kryoprotokol obsahuje údaje o původu vzorku, o datu jeho převzetí do kryobanky, o předkultivaci (době, času, teplotě), o složení kultivačního média (hlavně o hormonálním složení média), o datu a podmínkách kryoprezervace. Kryoprotokol dále obsahuje podmínky pro odtátí, které byly použity pro stanovení regenerace kontrolního vzorku. Údaje o procentu regenerace a teplotě pro bezpečné skladování jsou uchovávány v kryoprotokolu. Kryoprotokol obsahuje i důležitou poznámku experimentátora, který navrhne metodu odtátí (teplotu, rychlost, rehydrataci). Manipulace při skladování položek a komunikace se skladovou databází v PC se realizuje pomocí terminálu čárového kódu. Každá kryozkumavka je označena jedinečným alfanumerickým kódem. Kód obsahuje pořadové číslo uchovaného

vzorku, jeho pozici v Dewarově nádobě a datum zamrazení. Ukládání a vyskladňování vzorků z/do kryobanky je monitorováno (vzorek, číslo kontejneru, číslo stojanu, číslo pozice ve stojanu a číslo pozice v kryoboxu). O uložení je veden duplicitní elektronický a písemný záznam.

Technická opatření k zajištění bezpečnosti a monitoring uchovávaných GZR

Nebezpečí případné technické havárie je nepřetržitě monitorováno. Je měřena teplota ve dvou úrovních v každé Dewarově nádobě, tím pokles hladiny, otevření/zavření kontejneru. Bezpečnost práce v kryobance je hlídána kyslíkovým čidlem spojeným s výstražnou sirénou. Zabezpečení kryobanky proti vniknutí nepovolané osoby je zajištěno propojením 3 okruhů zabezpečovacího systému na pult centrální ochrany.

Revize kryobanky po deseti letech provozu

Inventarizace skladovaných vzorků v kryobance probíhá každým rokem tzv. virtuálně podle elektronické databáze. Jednou za 10 let je podle statutu kryobanky naplánovaná fyzická inventarizace. Tato fyzická inventarizace připadla na letošní rok. Vzorky byly identifikovány podle čárového kódu, v kapalném dusíku nebo v jeho parách. To znamená, že byly fyzicky zkontrolovány všechny vzorky, které jsou uloženy v kryobance. Jednalo se o 3 731 kryozkumavek devíti druhů plodin. Každý genotyp je uložen průměrně v 10 kryozkumavkách. Při revizi byla stanovená lidská chyba na 4 % a technická chyba na 0,55 %. Díky způsobu značení, pozice skladování a datu uložení bylo možné špatné označení vzorků zrekonstruovat a opravit. Kontrolní položky byly odtáty a položky s nevyhovující úrovní regenerace byly navrženy na regeneraci a opětovné zamrazení.

Závěr a perspektivy do budoucna

Výhodou kryoprezervace je především relativně vysoká jistota bezpečnosti uchování, malá náročnost na prostor a údržbu během uchovávání a nízké udržovací náklady kolekce (Keller et al., 2013), oproti uchování rostlin v polních podmínkách.

Podle počtu úspěšně kryoprezervovaných plodin (Sakai and Engelmann, 2007) je možné shrnout, že cryobanking u vegetativně množených rostlin dosáhl v poslední dekádě velkého rozvoje. Nárůst počtu publikací jejich citací je exponenciální. Rozvoj kryoprezervace je podmíněn rozsáhlou řadou nově získaných poznatků z molekulární biofyziky, teorie tvorby biologických skel (Zámečník a Šesták, 2011). Kryoprezervace se zefektivnila na základě použití molekulárně genetických popisů při výběru core kolekcí. Na jedné straně se pro pochopení a vyladění kryoprotokolu používají poměrně drahé přístroje, například diferenční skenovací kalorimetr pro termickou analýzu, na druhé straně samotný vitrificační kryoprotokol nepotřebuje zvláštní zařízení a může být prováděn i v primitivně zařízené laboratoři. Jiné kryoprotokoly tzv. dvoustupňové, používané u dormatních pupenů dřevin, používají mrazicí zařízení s přesnou regulací poklesu teploty až do -50 °C (výše citované). V neposlední řadě k rozvoji kryoprezervace vegetativně množených rostlin přispívají nově získané poznatky z fyziologie rostlin za nízké teploty (Bilavčík et al., 2012; Bruňáková et al., 2011), nebo ovlivňování rostlin stresovými hormony (Bruňáková et al., 2011) Tyto získané poznatky se ukázaly v mnohých případech jako nezbytné pro další rozvoj kryoprezervace.

Závěrem lze konstatovat, že další rozvoj bude silně závislý na získání nových poznatků nejen v kryobiologii rostlin, ale také v navazujících vědních oborech. Na základě technického pokroku lze očekávat nahrazení zastaralého značení kryozkumavek čárovým kódem čipy ve spojení s elektronickými snímači zaznamenávajícími každý pohyb vzorku. Rozvíjí se spolupráce na mezinárodní úrovni v rámci pracovní skupiny pro konzervaci GZ révy vinné COST. V rámci mezinárodní spolupráce je udržován provoz tripartitní (česko-polsko-německé) kryobanky *Allium*.

Poděkování

Autoři děkují držitelům kolekcí vegetativně množených plodin za jejich spolupráci při poskytování genofondu rostlin pro uložení v kryobance. Konkrétně by chtěli poděkovat Jaroslavě Domkářové (VÚB, Havlíčkův Brod), Borisi Krškovi (ZF, Lednice), Františkovi Papršteinovi (VÚO, Holovousy), Ondřejovi Skalovi (VÚRV,v.v.i. - VSV, Karlštejn), Vladimírovi Nesvadbovi a Petru Svobodovi (CHI, Žatec) a v neposlední řadě Heleně Stavělikové (VÚRV,v.v.i., Olomouc).

Dedikace

Tato práce vznikla za podpory MZe ČR „Národní program konzervace a využívání genetických zdrojů kulturních rostlin a agro-biodiversity“, č.j. MZe ČR 206553/2011-17253

Použitá literatura

- Bilavčík, A., Zámečník, J., Grospietsch, M., Faltus, M. & Jadrná, P., 2012: Dormancy development during cold hardening of in vitro cultured *Malus domestica* Borkh. plants in relation to their frost resistance and cryotolerance. *Trees structure and function*, 26, 4, 1181-1192.
- Bruňáková, K., Zámečník, J., Urbanová, M., Čellárová E., 2011: Dehydration status of ABA-treated and cold-acclimated *Hypericum perforatum* L. shoot tips subjected to cryopreservation. *Thermochimica Acta*, 525, 1-2, 62-70.
- Dussert, S., Engelmann, F., Noirot, M., 2003: Development of probabilistic tools to assist in the establishment and management of cryopreserved plant germplasm collections. *CryoLetters* 24, 339-350.
- Fabre, J., Dereuddre, J., 1990: Encapsulation-dehydration: a new approach to cryopreservation of *Solanum* shoot tips. *Cryoletters*, 11, 413-426.
- Fahy, G.M., Macfarlane, D.R., Angell, C.A., Meryman, H.T., 1984: Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology*, 21, 407-426.
- Faltus, M., Bilavčík, A., Zámečník, J., 2006a: Effect of different pretreatment on hop cryopreservation, In: Plenary papers of the Conference "Biotechnology 2006", 15th-16th February 2006, University of South Bohemia, České Budějovice, 558-560.
- Faltus, M., Zámečník, J., Bilavčík, A., 2006b: Osmotic stress pretreatment and cryopreservation of potato. *Cryobiology*, 53, 3, 421-422.
- Faltus, M., Bilavčík, A., Zámečník, J., Svoboda, P., Domkářová, J. 2008: Establishment of cryobank of potato and hop apices in the Czech Republic In: Cryopreservation of crop species in Europe MTT Agrifood Research Finland, 44-45.
- Faltus, M., Zámečník, J., Bilavčík, A., 2007: Odolnost „in vitro“ rostlin chmele k desikaci ve vztahu k jejich kryoprezervaci, ISBN 978-80-87011-00-3, In: Vliv abiotických a biotických stresů na vlastnosti rostlin 2007, Praha 21.3.2007, 558-562.
- Faltus, M., Zámečník, J., Dědič, P., Horáčková, V., 2012b: Využití metody kryoterapie pro ozdravení bramboru od virových patogenů. Uplatněná certifikovaná metodika. ISBN: 978-80-7427-108-3.
- Faltus, M., Zámečník, J., Domkářová, J., Kreuz, L., Horáčková, V., 2011a.: Conservation of Potato Germplasm in the Czech Republic. *Acta Horticulturae*, 908, 405-412.
- Faltus, M., Zámečník, J., Svoboda, P., 2012a: Využití metody kryoterapie pro ozdravení chmele od virových patogenů. Uplatněná certifikovaná metodika. ISBN: 978-80-7427-109-0.
- Faltus, M., Zámečník, J., Svoboda, P., Patzak, J., Nesvadba, V., 2011b: Progress in the Czech Hop Germplasm Cryoconservation. *Acta Horticulturae* 908, 453-460.

- FAO, 2013: Genebank Standards for Plant Genetic Resources for Food and Agriculture. Rome.
- Gonzalez-Arnao, M.T., Engelmann, F. 2006: Cryopreservation of plant germplasm using the encapsulation-dehydration technique: Review and case study on sugarcane. *Cryoletters* 27, 3, 155-168.
- Grospietsch, M., Stodůlková, E., Zámečník, J., 1999: Effect of osmotic stress on the dehydration tolerance and cryopreservation of *Solanum tuberosum* shoot tips. *Cryo-Letters*, 20, 339–346.
- Helliot, B., Panis, B., Locicero, A., Reyniers, K., Muylle, H., Vandewalle, M., Michel, C., Swennen, R., Lepoivre P., 2001: Development of in vitro techniques for elimination of virus diseases from Musa. - *Acta Hort. (ISHS)* 560, 535-538.
- Keller, E. J., Zanke, C. D., Senula, A., Breuing, A., Hardeweg, B., Winkelmann, T., 2013: Comparing costs for different conservation strategies of garlic (*Allium sativum* L.) germplasm in genebanks. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 1-14.
- Keller, E. R. J., Zanke, C. D., Blattner, F. R., Kik, C., Stavěliková, H., Zámečník, J., Esnault, F., Kotlinska, T., Solberg, S., Miccolis, V., 2012: EURALLIVEG: Establishment of a European Core Collection by Cryopreservation and Virus Elimination in Garlic. *Acta Horticulturae*, 969, 319-327.
- Niino, T., Sakai, A., Yakuwa, H., Nojiri, K., 1992: Cryopreservation of in vitro-grown shoot tips of apple and pear by vitrification, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 28, 261.
- Nishizawa, S., Sakai, A., Amano, Y., Matsuzawa, T., 1993: Cryopreservation of asparagus (*Asparagus officinalis* L.) embryogenic suspension cells and subsequent plant regeneration by vitrification, *Plant Science*, 91, 67-73.
- Reed, B.M., 2001: Implementing cryogenic storage of clonally propagated plants, *CryoLetters* 22, 97-104.
- Reed, B.M., 2010: Plant cryopreservation. A practical guide. Springer, New York, USA.
- Sakai, A., Engelmann, F., 2007: Vitrification, encapsulation-vitrification and droplet-vitrification: a review. *CryoLetters*, 28, 3, 151-172.
- Sakai, A., Kobayashi, S., Oiyama, I., 1990: Cryopreservation of nuclear cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis*) by vitrification. *Plant Cell Reports*, 9, 30-33.
- Seufferheld, M.J., Fitzpatrick, J., Walsh, T., Stushnoff, C., 1991: Cryopreservation of dormant buds from cold tender taxa using a modified vitrification procedure. *Cryobiology*, 28, 576.
- Sikora, A., Dupanov, O., Kratochvíl, J., Zámečník, J., 2007: Transitions in Aqueous Solutions of Sucrose at Subzero Temperatures. *Journal of Macromolecular Science, Part B: Physics*, 46, 71–85.
- Sikora, A., Dupanov, V., Kratochvíl, J., Zámečník, J., 2007: Transitions in Aqueous Solutions of Sucrose at Subzero Temperatures. *Journal of Macromolecular Science*, 46: 71-85.
- Skládal, V., Klimešová, M., 1988: Kryoprezervace brambor s cílem uchování genových zdrojů. Kryoprezervace v živočišné a rostlinné výrobě. ČSVTS, Most. 106-119.
- Stushnoff, C., 1987: Cryopreservation of apple genetic resources. *Canadian Journal of Plant Science*, 67, 4, 1151-1154.
- Zámečník, J., Bilavčík, A., Faltus M., 2007b: Importance, involvement and detection of glassy state in plant meristematic tissue for cryopreservation, *Cryobiology* 55, 3, 357.
- Zámečník, J., Bilavčík, A., Faltus, M., Sikora, A., 2006: Evaluation of glass transition and frozen water in plant tissues by temperature modulated differential scanning calorimetry. *Cryobiology* 53, 3, 443-444.
- Zámečník, J., Bilavčík, A., Faltus, M., Skládal, V., 2005: Provoz kryobanky. In: Faberová, I. (ed.) Konzervace a regenerace genetických zdrojů vegetativně množených druhů rostlin, VÚRV, Praha, 41-45.

- Zámečník, J., Faltus, M., Bilavčík, A., 2007a: Cryoprotocols used for cryopreservation of vegetatively propagated plants in the Czech cryobank, ISSN 0394-6169, Advances in Horticultural Science, 21, 4, 247-250.
- Zámečník, J., Faltus, M., Kotková, R., Hejnák, V., 2011: Fundamental Aspects of Cryopreservation and Cryoprotection-Glass Glass Transition Determination in *Allium* Shoot Tips after Dehydration Acta Horticulturae (ISHS) 908, 33-38.
- Zámečník, J., Šesták, J., 2011: Constrained States Occurring in Plants Cryo-Processing and the Role of Biological Glasses. In Glassy, Amorphous and Nano-Crystalline Materiale, 291-310. Springer Netherlands.
- Zanke, C., Zámečník, J., Kotlinska, T., Olas, M., Keller, E., 2011: Cryopreservation of Garlic for the Establishment of a European Core Collection. Acta Horticulturae, 908, 431-438.

Kontaktní adresa: Ing. Jiří Zámečník, CSc., Ing. Miloš Faltus, Ph.D., RNDr. Alois Bilavčík, Ph.D., Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i. Laboratoř fyziologie rostlin a kryobiologie, Drnovská 507, 161 06 Praha 6 – Ruzyně, e-mail: zamecnik@vurv.cz; faltus@vurv.cz; bilavcik@vurv.cz