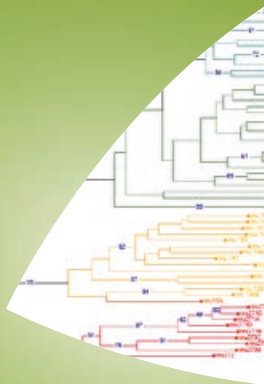
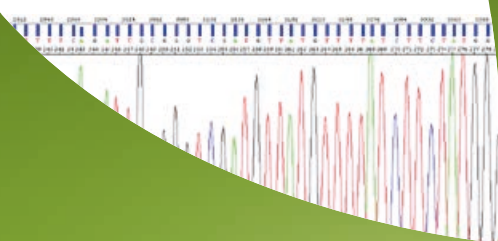




MINISTERSTVO ZEMĚDĚLSTVÍ



# GENETICKÉ ZDROJE ROSTLIN

MODERNÍ TECHNOLOGIE KONZERVACE  
A HODNOCENÍ



MINISTERSTVO ZEMĚDĚLSTVÍ

Editoři  
KŘÍŽKOVÁ Iva  
HOLUBEC Vojtěch  
ZEDEK Vlastimil

Vydalo  
**Ministerstvo zemědělství**  
Těšnov 17, 110 00 Praha 1  
[www.eagri.cz](http://www.eagri.cz)  
email: [info@mze.cz](mailto:info@mze.cz)

Autorská práva vyhrazena. Citace bez uvedení zdroje, komerční rozmnožování, nebo jiné využití jakékoliv části této publikace bez souhlasu vydavatele bude chápáno jako neoprávněný zásah do vydavatelských a autorských práv.

Publikace neprošla jazykovou úpravou

© Ministerstvo zemědělství, Praha, Česká republika, 2018

**ISBN 978-80-7434-483-1**

# Obsah

Technologie pro zajištění dlouhodobé životaschopnosti semen v Genové bance v Praze.....	2
Využití tkáňových kultur k uchování kolekce genetických zdrojů bramboru a k eradikaci virové infekce.....	9
Technologie kryoprezervace: Patnáct let provozu kryobanky vegetativně množených rostlin - zkušenosti a perspektivy.....	16
Metody molekulární charakterizace genetických zdrojů a jejich význam.....	24
Moderní postupy hodnocení jakosti genetických zdrojů obilnin.....	32
Produkce zelené hmoty ozimého tritikale a hodnocení výtěžnosti bioplynu a metanu u vybraných genetických zdrojů.....	42
Moderní technologie hodnocení kvalitativních parametrů oleje a jejich využití.....	49
Hodnocení odolnosti plodin vůči abiotickým stresům.....	56
Predikce kvality píče genetických zdrojů trav s využitím FT-NIR spektrometru.....	62
Hodnocení obsahu a složení silic u léčivých, aromatických a kořeninových rostlin.....	69
Srovnání obsahu vybraných pomologických znaků a nutričních látek u evropských a asijských odrůd meruněk.....	75
Hodnocení genových zdrojů révy vinné s využitím laboratorních metod.....	86
Biologicky aktivní látky rodu lékořice (Glycyrrhiza L.).....	90
Hodnocení kolekce chmele a přínos planých forem.....	95

# Technologie pro zajištění dlouhodobé životaschopnosti semen v Genové bance v Praze

**Holubec V., Papoušková L., Hlásná Čepková P., Matějovič M.**

**Genová banka, VÚRV v.v.i., Praha**

holubec@vurv.cz, papouskova@vurv.cz

## Genetické zdroje rostlin a genové banky

Pěstováním a šlechtěním vznikla u zemědělsky využívaných druhů významná vnitrodruhová genetická diverzita, reprezentovaná šlechtěnými a krajovými odrůdami a jiným genetickým materiálem, které jsou spolu s planými příbuznými druhy označovány jako genetické zdroje rostlin (GZR). Konzervace GZR pro jejich současné i budoucí využití je základní činnost, která je uplatňována i v mezinárodním měřítku. Většina GZR je uchovávána v národních genových bankách (83 %) a v Mezinárodních centrech pro zemědělský výzkum (CGIAR), kde je uloženo cca 11 % světových genofondů. Odhaduje se, že ve světě je nyní v kolekcích genových bank shromážděno asi 7,5 mil. položek GZR, z toho třetina je v Evropě. Cílem genových bank je vytvoření optimálních podmínek pro dlouhodobé uložení semen kulturních i planých druhů rostlin k zachování jejich životnosti v dlouhodobém horizontu bez nutnosti přesevu.

V České republice se shromažďování genetických zdrojů rostlin, jako výchozích šlechtitelských materiálů, datuje již od počátku minulého století, kdy jsou k dispozici první zprávy o shromažďování a studiu odrůd ječmene (1899) a pšenice (1903). Konzervace semen množných GZR byla zajišťována v neklimatizovaných skladech a podle stavu

klíčivosti byla nutná častá regenerace, podle typu plodiny každých 3-5 let. Důležitým milníkem byl rok 1988, kdy byl ve Výzkumném ústavu rostlinné výroby (VÚRV) Praha zahájen rutinní provoz genové banky.

Veškeré aktivity, které se týkají GZR, jsou v souladu s podmínkami zákona č. 148/2003 Sb., o genetických zdrojích rostlin a mikroorganismů a jsou také zahrnuty v Národním programu pro genetické zdroje rostlin (NP GZR), který byl zahájen Ministerstvem zemědělství ČR v roce 1993 a kterého se účastní 12 privátních i státních institucí. Koordinací NP GZR je pověřeno pracoviště Genové banky VÚRV. V současné době je v NP GZR zařazeno přes 55 tisíc GZR, z toho 81 % jsou generativně množené GZR a zbytek tvoří vegetativně množené GZR, kdy za každou plodinovou kolekci odpovídá kurátor kolekce.

## Genová banka Praha - Ruzyně

Zabezpečení konzervace GZR by mělo probíhat co nejefektivněji, s maximálním ohledem na biologické zvláštnosti jednotlivých druhů rostlin i kategorií GZR (plané druhy, krajové odrůdy, šlechtěné odrůdy), ale i s ohledem na nezbytné a racionální náklady pro zabezpečení dlouhodobé životnosti semen. Strategie a metody konzervace GZR by

měly garantovat optimalizaci všech kroků od zasetí přes sklizeň, výmlat, sušení, manipulace a podmínky uložení semen při zachování optimálních biologických a fyzikálních parametrů semen. Při regeneraci osiv je třeba dbát na minimalizaci patogenních mikroorganismů na semenech. Následná manipulace s osivem musí být prováděna biologicky šetrnými postupy pro minimalizaci mikropoškození a zamezení expozice vysokými teplotami. Nutnou podmínkou je i zachování genetické kvality materiálu - čistoty linie nebo diverzity populace, s čímž souvisí minimální množství semen ve vzorku, vyloučení genetického driftu nebo genetické selekce vlivem nepříznivých podmínek regenerace.

Dlouhodobé uchování semenných vzorků zajišťuje pro všechna pracoviště v rámci NP GZR Genová banka ve VÚRV, Praha-Ruzyně. V současné době je v genové bance uchovááno 44 500 generativně množených genetických zdrojů rostlin z různých plodinových kolekcí NP GZR. Vzorky semen jsou na uložení do skladu předávány z plodinových kolekcí pracovišť NP GZR zodpovědných za jednotlivé plodiny. Pro uložení do genové banky musí vzorek GZR splňovat standardy, uvedené v Metodice NP GZR ([http://genbank.vurv.cz/genetic/nar\\_prog\\_rostlin/index.php#](http://genbank.vurv.cz/genetic/nar_prog_rostlin/index.php#)).

Všechny GZR jsou označeny Národním evidenčním číslem, musí mít odpovídající homogenitu i zdravotní stav. Obsah vody při příjmu vzorku by se měl pohybovat pod dvanácti procenty. Minimální klíčivost předávaného vzorku by měla dosahovat 95 %, ale existují určité výjimky pro méně klíčivé rostlinné druhy (například pro plané druhy, některé druhy trav či aromatické a léčivé rostliny, řepu). Před uložení do skladu genové banky se semena vysuší pomocí šetrného dlouhodobého sušení při teplotě 15 – 20 °C na

obsah vody doporučený pro jednotlivé druhy (4 - 8 % obsahu vody).

Vzorky jsou v chladových komorách uloženy v označených skleněných lahvích, do kterých je vložena i příslušná jmenovka a malý sáček se silikagelem s indikátorem vlhkosti. Silikagel absorbuje zbytkovou vlhkost vzduchu a při manipulaci se vzorkem je silikagel nahrazen čerstvým. Pro označení je používán čárový kód skladu určující přesnou identifikaci vzorku, včetně umístění ve skladu.

V roce 2010 byla ukončena v Genové bance rekonstrukce skladu, při níž došlo ke zvýšení kapacity skladovacích prostor z původních 5 na nyníšších 10 chladových komor (Obr. 1). Všechny komory jsou chlazeny na -18 °C, což odpovídá mezinárodním standardům (FAO 2014) pro dlouhodobé skladování GZR.



Obr. 1: Chladové komory genové banky

Při sušení na doporučené hodnoty vlhkosti 6-8% (FAO 2014) je třeba zajistit teplotu skladování -18 až -20 °C, což je standardní teplota používaná kvalitními genovými bankami Evropy a světa. Zvýšení teploty na -10 až -15 °C již vede ke ztrátě plné délky potenciální životnosti (BÖRNER *et al.* 2018).

## Metody sušení a teplota skladování

Dlouhodobé uchování semen lze zajistit zejména kombinací tří faktorů: vysoké kvality vstupních vzorků semen, jejich vysušením na nízkou hladinu vlhkosti a skladovací teplotou. Kombinace těchto faktorů zajistí sníženou úroveň metabolismu nutnou pro dlouhověkost. Kvalita je dána biologicky šetrnou výrobou osiva a proměnné jsou vlhkost a teplota. Při vysušení semen na biologickou hranici vlhkosti nemusí být požadována teplota skladování záporná, ale postačí nadnulová (PEREZ-GARCÍA *et al.* 2007). U semen obilnin je predikovaná potenciální životnost přesahující 100 let (TREUREN *et al.* 2018), v praxi ale v genové bance IPK byl zaznamenán pokles křivky životnosti většiny semen okolo 35 roku (BÖRNER *et al.* 2018).

Pro zvýšení životnosti semen byla zkoušena metoda ultrasuchých semen (PEREZ-GARCÍA *et al.* 2007). Jedná se o sušení k biologické hranici životnosti semen, na úroveň 0,3-3% vlhkosti, přičemž je třeba zajistit dlouhodobé sušení (obr. 2) při teplotě do 20°C (doporučuje se do 17°C). Dvacet pět semenných položek čeledi *Brassicaceae* bylo vysušeno pod 3% vlhkosti a jedna sada vzorků byla uložena v genové bance při -5 a -10 °C v hermeticky uzavřených obalech, druhá sada byla umístěna při pokojové teplotě. Po 34-40 letech byla hodnocena jejich vitalita. V případě uskladnění za nízké teploty v genové bance vykazovalo deset položek z dvanácti vysokou počáteční klíčivost (s nízkou dormancí) a tato klíčivost nebyla snížena ani po ukončení pokusu (91-100%). Ve dvou případech se projevila sekundární dormance, což se podařilo úspěšně překonat skarifikací.

Další sada 13 semenných vzorků vykazovala klíčivost mezi 0-20%, tedy byla s vysokou počáteční dormancí. V jednom případě do-



Obr. 2: Sušení osiva před uložením

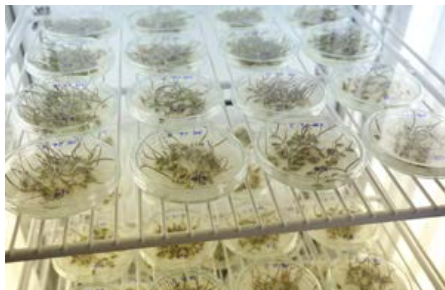
šlo k přerušení dormance a tím ke snížení následné klíčivosti na 92%, v 9 případech byla klíčivost výrazně zvýšena dodáním GA3 nebo skarifikací. Dormance se může během skladování osiva přerušit (nejčastější případ), ale také může dojít k jejímu prodloužení nebo nástupu další fáze, nebo se vůbec neměnit. Sada vzorků umístěná při pokojové teplotě vykazovala v klíčivosti podobné hodnoty jako u vzorků, uložených při -5 až -10 °C. Tento výsledek naznačuje, že teplota uskladnění nemusí být tak důležitá, přinejmenším pro střednědobé uskladnění, pokud jsou semena extrémně vysušena. Příprava ultrasuchých semen však vyžaduje velkou kapacitu sušáren a následné dosušení silikagelem a naráží na kapacitní možnosti genových bank a na specifika jednotlivých rostlinných druhů.

Univerzálním řešením je kryokonzervace (semen, částí rostlin, tkáňových kultur), kde doba skladování v podstatě není limitujícím faktorem. Rutinní provoz kryokonzervace semen je například v USA (National Laboratory for Genetic Resources Preservation, Fort Collins, CO) již od konce 70 let minulého století. V rámci NP GZR v České republice slouží kryokonzervace jako bezpečnostní duplikace pouze pro vybrané druhy vegetativně množených GZR.

## Metody testování klíčivosti a ošetření osiva

Hlavními parametry kvality osiva jsou procento klíčivosti a vitalita (PAZDERŮ 2009). Před uložením do skladu se testuje klíčivost osiva dle standardní metodiky ISTA (ISTA 2011) (Obr. 3). Během skladování probíhá pravidelná inventarizace osiv s kontrolou klíčivosti. Pokud dojde k významnému poklesu klíčivosti, je potřeba vzorek za přesně specifikovaných podmínek regenerovat (regeneraci provádějí kurátoři kolekcí) a po regeneraci uložit nová semena. Interval kontrol je nastaven podle typu uložených plodin na 10-20 let.

Na základě záznamů o klíčivosti semen, které jsou v genové bance k dispozici od zahájení provozu, bylo zjištěno, že například u klíčivosti 60 nejstarších položek pšenice došlo za posledních 23-28 let k poklesu pouze o 2 %. Změny klíčivosti u dalších plodin jsou zaznamenány v Tabulce 1. U ječmene byl nejvyšší pokles způsoben pravděpodobně horší počáteční klíčivostí. V případě nárůstu klíčivosti se jedná o dormanci při testování vstupní klíčivosti.



Obr. 3: Testování klíčivosti

Klíčivost, energie klíčení a vzházení jsou parametry osiva, určující vývoj a kvalitu porostu a tím předurčují do značné míry i budoucí výnos. Energie klíčení je definována jako procento semen vyklíčených za daný čas od jejich zbobtnání (HOSNEDL 2003) a je jednoduchým testem vitality (PAZDERŮ 2009). Energie klíčovosti je také vhodným parametrem pro vyjádření možnosti skladovacího potenciálu osiva s ohledem na rychlost a vyrovnanost klíčení (DON 2009). Vitalita (vnitřní kvalita semen) osiva je složitá fyziologická charakteristika, jež je nezbytná k zajištění rychlého a jednotného vývoje rostlin v polních podmínkách (VENTURA *et al.* 2012) a výrazně ovlivňuje i skladovatelnost semen.

**Tabulka 1: Změny klíčivosti semen u vybraných plodin za určité období**

Plodina	počet sledovaných vzorků	počáteční klíčivost (%)	rozdíl klíčivosti (%)	sledované období (roky)
<i>Triticum L.</i>	60	95,3	-2	23-28
<i>xTriticosecale WITTM. (winter)</i>	26	89,2	0	20
<i>Hordeum L. (spring)</i>	44	89,8	-11,9	20
<i>Phaseolus L.</i>	365	92,1	-1,2	19
<i>Pisum sativum L. convar. sativum</i>	212	74,1	-14,6	19
<i>Brassica napus L. var. napus</i>	48	78,9	-0,1	20
<i>Brassica rapa L. f. biennis THELL.</i>	16	79,5	0	20
<i>Sinapis alba L.</i>	6	72,6	0	20

V rámci nového výzkumu semen v GB bude zkoušena metoda nízkoteplotního plazmatu pro prodloužení skladovatelnosti osiva a zlepšení jeho zdravotního stavu (Obr. 4). Při využití plazmy pro ošetřování semen a potravin se využívá efektu elektrického výboje, při kterém vzniká v závislosti na použitém nosném plynu řada ROS (reaktivní formy kyslíku)/NOS (reaktivní formy dusíku). Někteří autoři potvrzují pozitivní vliv technologie nízkoteplotního plazmatu na klíčivost semen (FILATOVA *et al.* 2011), potlačení vlivu fytopatogenních organismů (Obr. 4, 5) (ZIMMERMANN 2007) a také na zlepšení kvality zrn díky snížení obsahu toxinů a nitrátů (FILATOVA *et al.* 2014, LING *et al.* 2015). Ošetření nízkoteplotním plazmatem zvyšuje vitalitu osiva (AMBRICO *et al.* 2017) a procento klíčivosti, může snížit vliv působení stresu suchem na klíčení i růst klíčících rostlin. Potenciál klíčivosti a další růst semenáčků se např. v pokusu Guo *et al.* (2017) zvýšil po ošetření DBD (dielectric barrier discharge plasma) o 27,2 %. Aplikace elektrického výboje též navýšila hladinu rozpustných cukrů a prolinu (Guo *et al.* 2017). Metody studené plazmy (cold plasma, CP) byly vyvinuty původně pro vylepšení adhezních vlastností polymerů, zvyšující povrchové napětí materiálů a pro použití v různých oblastech elektroniky (EKEZIE *et al.* 2017). V současnosti je spektrum využití nízkoteplotních technologií široké, zahrnuje mimo jiné sterilizace nástrojů ve zdravotnictví (ČURN *et al.* 2018), úpravu potravinářských produktů proti mikrobiálním patogenům (ČURN *et al.* 2018, EKEZIE *et al.* 2017). Ošetřením semen bazalky (*Ocimum basilicum* L.) došlo ke statisticky významnému snížení mikrobiální zátěže osiva bez vlivu na životnost semen, když zjištěné konidie fytopatogenních hub, zejména v oblasti mikropyle, byly po ošetření plazmou destruovány (AMBRICO *et al.* 2017), růst vyklíčených semenáčků byl urychlen a došlo k celkovému navý-

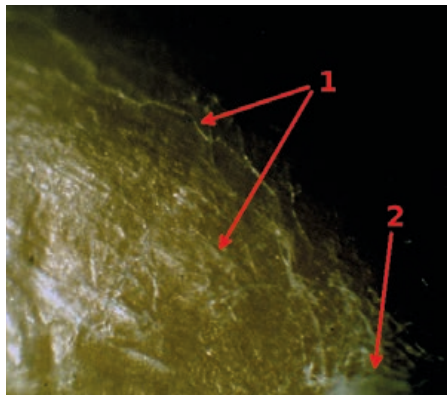


Obr. 4: Záběr na elektrický výboj generátoru plazmy typu Gliding-Arc. Výboj je proudem nosného plynu (kyslík, dusík, atd.) hnán do Petriho misky (ve spodní části snímku), ve které je umístěno ošetřované osivo.

šení parametrů růstu mladých rostlin jako je celková délka/výška, hmotnost sušiny a prodloužování listů (AMBRICO *et al.* 2017). U rostlin řepky byly hodnoty délky kořene vyšší než u kontrolních vzorků a stejně tak se zvýšila odolnost semenáčků řepky vůči stresu suchem (ČURN *et al.* 2018). SEM (skenovací elektronová mikroskopie), provedená na rostlinách prokázala, že po ošetření nízkoteplotní plazmou nedošlo k významnému porušení obalů semene ani embrya (AMBRICO *et al.* 2017).

Celkový efekt ošetření semen plazmovými technologiemi a při výboji vznikajícími re-





Obr. 5: Fotografie obilky pšenice seté (*Triticum aestivum* L.) kolonizované hyfami (1) houby rodu *Mucor* s rozvíjejícím se myceliem (2). Snímek pořízen binolupou Bresser Biolux ICD, kamerou Bresser MikroCam 5.0M a SW MikroCamLab v6.1.4.0 for Windows, při zvětšení 20x. (Foto: Matějovič).

aktivními formami kyslíku a dusíku s následnými změnami ve struktuře povrchu semen a změnami mikrobiálního zatížení, může významně zvýšit životnost (vigor) osiva (AMBRI-*co et al.* 2017).

Dosud byly vyzkoušeny v laboratorních a poloprovozních pokusech následující metody fyzikálního ošetření semen: Ar-O<sub>2</sub> plasma (kyslíko-argonová plazma), kdy je nosným plynem, ve kterém dochází k elektrickému výboji, kyslík a argon, DBD plasma (dielectric barrier discharge plasma), při které dochází k elektrickému výboji v kyslíkové atmosféře a Gliding-Arc plasma (Obr. 4), kde je hnacím plynem dusík nebo kyslík a ošetření probíhá za atmosférického tlaku. Proud N-O<sub>2</sub> plynu prochází mezi elektrodami, mezi kterými dochází ke vzniku vysokonapěťového elektrického výboje a proudem procházejícího plynu je výboj vytlačován vně elektrod a dochází tak ke vzniku elektrického oblouku (gliding-arc). Doba expozice se u jednotlivých metod pohybuje od několika sekund (MATRA



Obr. 6: Fotografie obilky pšenice seté (*Triticum aestivum* L.) (1) s již vytvořenými radikulami (3), kolonizovanými hyfami (2) rodu *Mucor*. Snímek pořízen binolupou Bresser Biolux ICD, kamerou Bresser MikroCam 5.0M a SW MikroCamLab v6.1.4.0 for Windows, při zvětšení 20x.

2018) až po 13 min (Li *et al.* 2017). V případě, kdy se užívá jako nosné médium směs několika plynů, lze využít i jejich různé poměry (MATRA 2018).

Tyto metody ale nejsou doposud zavedené a ověřené v zemědělské praxi a neexistuje jejich srovnání s metodami dnes běžně používanými. Z toho je zřejmé, že tato problematika hledání alternativních postupů k chemickému ošetření, které by byly uplatnitelné i u semen dlouhodobě uchovávaných v genové bance, je vysoce aktuální. Všechny získané poznatky pak budou použity při konzervaci semen v genové bance.

## Seznam použité literatury

- AMBRICO P.F., ŠIMEK M., MORANO M., DE ANGELINI R.M.M., MINAFRA A.A., TROTTI P., AMBRICO M., PRUKNER V., FARETRA F. (2017): Reduction of microbial contamination and improvement of germination of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) seeds via surface dielectric barrier discharge. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 50 (30). DOI: 10.1088/1361-6463/aa77c8.
- BÖRNER A., NAGEL M., REHMAN ARIF M.A., AGACKA-MOLDOCH M., MOHLER V., BÖRNER M., LOHWASSER U., RIEWE D., WIEBACH J., ALTMANN T. (2018): Seed conservation of germplasm in crop genebanks. Meeting of WG Seed Science and Certification, 10-12 Apr. 2018, IPK Gatersleben. Book of abstracts p.6.
- ČURN V., BOHATÁ A., OLŠAN P., HAVELKA Z., STREJČKOVÁ M., KŘÍŽ P., BARTŠ P., ŠPATENKA P., BERAN J. (2018): Nechemické metody ošetření osiva: Využití nízkoteplotního plazmatu a biologického ošetření osiva u řepky ozimé. *Agromanuál*, 6: 30-32.
- DON, R. (2009): *ISTA Handbook on Seedling Evaluation*. 3ed ISTA, Bassersdorf, 131 pp.
- EKEZE F-G.C., SUN Da-W., CHENG J-H. (2017): A review on recent advances in cold plasma technology for the food industry: Current applications and future trends. *Trends in Food Science & Technology*, 69: 46-58.
- FILATOVA I.I., AZHARONOK V.V., GONCHARIK S.V., LUSHKEVICH V.A., ZHUKOVSKY A.G., GADZHEVA G.I. (2014): Effect of RF Plasma treatment on the germination and phytosanitary state of seeds. *Journal of Applied Spectroscopy*, 81(2): 250-256.
- FILATOVA I.I., TRUKHACHEV F.M.; CHUBRIK N.I. (2011): Study of the process of dust grain discharging in the afterglow of an RF discharge. *Plasma Physics Reports*, 37 (12): 1042-1045.
- FAO (2014): *Genebank Standards for Plant Genetic Resources for Food and Agriculture*. Rev. ed. Rome. <http://www.fao.org/3/a-i3704e.pdf>.
- GUO Q., WANG Y., ZHANG H., QU G., WANG T., SUN Q., LIANG D. (2017): Alleviation of adverse effects of drought stress on wheat seed germination using atmospheric dielectric barrier discharge plasma treatment. *Scientific reports*, 7: article No 16680: 1-14. doi.org/10.1038/s41598-017-16944-8.
- HOSNEDL V. (2003): Klíčivost a vzházivost osiva. Dostupné online: <http://www.agris.cz/clanek/125695>.
- ISTA (2011): *International Rules for Seed Testing*. The International Seed Testing Association (ISTA). ISBN-13978-3-906549-63-7. Edition 2011/1.
- LI Y., WANG T., MENG Y., QU G., QIUHONG S., LIANG D. HU S. (2017): Air atmospheric dielectric barrier discharge plasma induced germination and growth enhancement of wheat seeds. *Plasma Chemistry and Plasma Processing*, 37: 1621-1634.
- LING L., JIANGANG L., MINCHONG S., CHUNLEI Z., YUANHUA D. (2015): Cold plasma treatment enhances oilseed rape seed germination under drought stress. *Scientific Reports*, 5: 13033.
- MATRA K. (2018): Atmospheric non-thermal argon-oxygen plasma for sunflower seedling growth improvement. *Japanese Journal of Applied Physics*, 57: 01AG03. doi.org/10.7567/JJAP.57.01AG03.
- PAZDERŮ K. (2009): Význam energie klíčení pro hodnocení kvality osiva. In: *Osivo a sadba - IX. odborný a vědecký seminář*. 56-60.
- PEREZ-GARCÍA F., GONZÁLEZ-BENITO M.E., GÓMEZ-CAMPO C. (2007): High viability recorded in ultra-dry seeds of 37 species of Brassicaceae after almost 40 years of storage. *Seed Science and Technology*, 35: 143-153.
- TREUREN, van R., BAS N., KIK C. (2018): Seed stability of *ex situ* conserved wheat and barely is poorly maintained at 4°C storage. Seed conservation of germplasm in crop genebanks. Meeting of WG Seed Science and Certification, 10-12 Apr. 2018, IPK Gatersleben. Book of abstracts p.7.
- VENTURA L., DONA M., MACOVEI A., CARBONERA D., BUTTAFAVA A., MONDONI A., ROSSI G., BALESTRAZZI A. (2012): Understanding the molecular pathways associated with seed vigor. *Plant Physiol. Biochem.*, 60: 196-206.
- ZIMMERMANN G. (2007): Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Biocontrol Science and Technology*, 17: 879-920.

# Využití tkáňových kultur k uchování kolekce genetických zdrojů bramboru a k eradikaci virové infekce

**Horáčková V., Domkářová J.**

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

horackova@vubhb.cz, domkarova@vubhb.cz

Rostoucí význam genetických zdrojů bramboru ve šlechtění a geneticko - šlechtitelském výzkumu vedl již v roce 1952 ve VÚB Havlíčkův Brod k založení kolekce dostupných genotypů bramboru a jejich udržování. Byla tak zahájena dlouholetá tradice práce s genofondy bramboru, která probíhá v této instituci bez přerušení dosud. V současné době je VÚB jedním z pověřených pracovišť, která zabezpečují činnosti spojené s konzervací a využíváním ge-

netických zdrojů kulturních rostlin pod koordinací genové banky kulturních rostlin, která je součástí VÚRV Praha – Ruzyně a tuto činnost vykonává z pověření Ministerstva zemědělství ČR (DOMKÁŘOVÁ a HORÁČKOVÁ 2014) (Obr. 1).

Rod *Solanum* zahrnuje přes 2 000 druhů, z nichž jen asi 100 druhů tvoří hlízy. Je to jednoletá bylina, která se teoreticky může rozmnožovat dvěma způsoby; a to generativně nebo vegetativně. Praktické množení bramboru má svá specifika, která vyplývají z tetrasomické dědičnosti kulturních genotypů bramboru, která se projevuje značnou proměnlivostí znaků a vlastností potomstev ze samoopylení a záměrného křížení. Proto jsou tetraploidní kulturní druhy *Solanum tuberosum* rozmnožovány pouze vegetativně hlízami a rovněž vegetativní cestou mohou být udržovány. Uchovávání vzorků ve formě semen je využíváno pouze u omezeného souboru fertálních planých a kulturních druhů rodu *Solanum*.

Generativní způsob množení je však nezbytný v novošlechtění bramboru, neboť v semeně populaci se projeví kombinace vlastností rodičovských partnerů a po podchycení žádoucích klonů probíhá další rozmnožování vegetativním způsobem, který projev vysoké heterozygotnosti eliminuje a zachovává vlastnosti F1 generace.



Obr. 1: Část genové banky bramboru *in vitro*

Značným problémem při uchování kolekcí genetických zdrojů bramboru byly virové choroby, které se v našich klimatických, geografických a půdních podmínkách velmi snadno rozšiřují a jsou pro brambory mimořádně škodlivé. Proto při polním vedení a každoročním vegetativním přesazování byla shromážděná kolekce vystavena přirozenému infekčnímu tlaku virových chorob, které vedlo ke zhoršování zdravotního stavu a často ke ztrátám materiálu.

Velký přelom v činnosti genové banky bramboru nastal s rozvojem rostlinných explantátových technik. Zejména těch postupů, které lze využít k uchovávání kolekcí vegetativně množených plodin a které při manipulaci na úrovni *in vitro* zachovávají genetickou identitu materiálu. Jednou z prvních vegetativně množených plodin u nás, u které se začala konzervace genových zdrojů *in vitro* využívat, byly brambory. Tento postup lze použít nejen pro záchranu materiálu plně zamořeného virovými chorobami bramboru, ale vytvořily se i podmínky pro aktivní eradikaci virů, včetně rozpracování postupu detekce přítomnosti virové infekce na úrovni *in vitro* kultury.

Techniky tkáňové kultury podstatně rozšířily možnosti využívání genetických zdrojů bramboru, neboť dovolují časově prakticky neomezené udržování širokého spektra genotypů v definovaných podmínkách, bez nebezpečí reinfekce viry. Kultury vyžadují minimální nároky na skladovací prostory, umožňují snadnou detekci a ozdravení od virových chorob a v případě potřeby, kdykoliv během roku přípravu požadovaných genotypů. Kultivace *in vitro* přispěla výrazně i k rozvoji mezinárodní výměny genových zdrojů, neboť celosvětová síť genových bank bramboru pracuje již výhradně na principu *in vitro* konzervace a představuje

dostupnou základnu s dostatečně širokým spektrem genetických materiálů.

Postupy používané ke konzervaci bramboru *in vitro* se liší mezi jednotlivými světovými kolekcemi v dílčích detailech, přičemž společně všem jsou následující aspekty:

- jednoduchost zakládání kultury a možnost jejího využití pro široké spektrum genotypů bramboru,
- schopnost dlouhodobého udržování organogenetické schopnosti v kultuře *in vitro* a dlouhá subkultivační perioda,
- možnost zachování genetické homogenity a identity udržovaného materiálu s materiálem výchozím.

### **Dlouhodobá konzervace genetických zdrojů bramboru v kultuře *in vitro***

Ve VÚB Havlíčkův Brod byla provedena celá série pokusů zaměřených na techniky dlouhodobého udržování bramboru v kultuře *in vitro*. Především byl sledován vliv složení kultivačních médií a podmínek kultivace na zpomalení růstu kultur a vyvolání tuberizace *in vitro*, na způsoby zakládání kultur a potlačení kontaminací při převodu do sterilního prostředí a rovněž na postupy aktivní eradikace virové infekce v kultuře *in vitro* (DOMKÁŘOVÁ a HORÁČKOVÁ 2013, HORÁČKOVÁ a DOMKÁŘOVÁ 1998, HORÁČKOVÁ a DOMKÁŘOVÁ 1999, HORÁČKOVÁ a kol. 2004, HORÁČKOVÁ a DOMKÁŘOVÁ 2005, HORÁČKOVÁ a DOMKÁŘOVÁ 2018 v tisku).

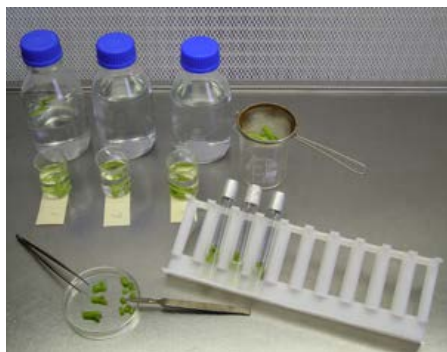
Na základě těchto pokusů byl vypracován metodický postup dlouhodobé kultivace *in vitro*. Je založen na úpravě základních podmínek, které zpomalují růst a vývoj rostlin (teplota, světelný režim, složení kultivačních médií) a stimulují tuberizaci *in vitro* (Obr. 2). Celý cyklus uchovávání je rozdělen do několika kroků (HORÁČKOVÁ a DĚDIČ 2009, HORÁČKOVÁ a DOMKÁŘOVÁ 2012).



Obr. 2: Tuberizace při dlouhodobém uchování *in vitro*

### Převod a založení aseptické kultury *in vitro*

K převodu do *in vitro* se používají stonkové segmenty odebírané především ze skleníkových rostlin, nebo klíčky hlíz (Obr. 3). Provést lze i přímý výsev semen na agar, používaný především u planých druhů. Převodové segmenty vyžadují před přenesením do aseptického prostředí kultury *in vitro* důkladnou, ale šetrnou povrchovou sterilizaci a navazující vícenásobnou, krátkodobou kultivaci na základních médiích obohacených o selektivní antibakteriální prostředky k odstranění nežádoucích kontaminací, které ve většině případů



Obr. 3: Převod stonkových segmentů do *in vitro* kultury

nepocházejí z povrchu segmentu, ale vyskytují se uvnitř pletiv. Čistá kultura je obvykle získána po třech až čtyřech měsících od převodu.

### Kultivační média a podmínky pro dlouhodobé uchování

K indukci tuberizace během kultivace, tedy tvorby mikrohlízek v prostředí *in vitro*, dochází současným působením několika faktorů stresové povahy. Jedním ze základních je úprava složení živného média, kdy se v základním médiu MS 62 (MURASHIGE a SKOOG 1962) zvyšuje obsah sacharózy a přidává se retardant růstu Alar 85. Každý k udržování připravený genotyp je pasážován na tři živná média různého složení. Na zpomalení rychlosti růstu rostlin *in vitro* působí rovněž změny ve fyzikálních podmínkách během kultivačního procesu, a to snížená, ale vitální kultivační teplota (10 °C), zkrácená fotoperioda (10 h světlo, 14 h tma) a nižší intenzita osvětlení (40 μmol/m<sup>2</sup>/s). Po 4 - 6 měsících začnou rostliny *in vitro* tvořit mikrohlízky, proběhne dormance a mikrohlízky začnou rašit. Celková délka kultivačního cyklu je obvykle 12 - 18 měsíců a po té následuje regenerační pasáž.

### Regenerační pasáž na nová média

Subkultivace na nová média se provádí pomocí rašících mikrohlízek po periodě dormance, nebo přežívajících segmentů stonku, případně zelených zbytků původních rostlin. V závislosti na udržovaném materiálu se může projevit jistá variabilita růstové reakce, proto je nutná průběžná kontrola a v případě patrných rozdílů v růstu i dřívější regenerační pasáž. Regenerace vzorků začíná přenesením životaschopných segmentů na základní množící živné médium. Jednou až dvěma subkultivacemi se namnoží počet rostlin potřebných k opětovnému založení kultury v podmínkách dlouhodobé kultivace *in vitro*. Do chladového

režimu genové banky jsou přenášeny již vyvíjející se rostliny. V případě požadavku se u vybrané položky mohou kdykoliv v průběhu roku použít živé části uchovávané kultury k pasážování na množící médium MS a připraví se materiál k dalšímu využití.

### **Eradikace virové infekce *in vitro* v kolekci genové banky bramboru**

Postupně bylo do dlouhodobého uchování převedeno cca 1.600 položek z polního vedení. V kolekci výrazně převyšovaly genotypy napadené jedním i více viry bramboru. Náhoda klasického způsobu za udržování v kultuře *in vitro* probíhala postupně, počínaje nejvíce zamořenými položkami. Byla tak před nenahraditelnou ztrátou zachráněna řada genotypů. Nedobrý zdravotní stav kolekce však výrazně snižoval její hodnotu a využitelnost. Pro zlepšení tohoto stavu byla zahájena rozsáhlá aktivní eradikace virové infekce.

K ozdravování od virových chorob v kultuře *in vitro* je využíváno několika postupů (HORÁČKOVÁ a kol. 2007, HORÁČKOVÁ a DĚDIČ 2009, HORÁČKOVÁ a kol. 2010, HORÁČKOVÁ a DOMKÁŘOVÁ 2012).

V prvé fázi je uplatňována klasická metoda, spočívající v kombinaci termoterapie s následným odběrem vrcholových meristémů. Metoda vychází ze skutečnosti, že virus není v rostlině bramboru rovnoměrně rozložen, jeho koncentrace klesá, jak směrem k vegetačnímu vrcholu, tak směrem ke kořenové špičce. Eliminovatelnost jednotlivých virů je rozdílná a závisí na tom, do jaké vzdálenosti od terminálních buněk vystupují. Nejnížší hladinu má virus A bramboru (PVA), o něco vyšší je u virů Y (PVY) a svinutky (PLRV). Virus X (PVX) a virus M (PVM) vystupují ve vegetačním vrcholu vysoko a zóna bez virů je velmi malá. Nejvýše vystupuje virus S (PVS),

který se často dostává přímo do buněk meristematického vrcholu. Součástí postupu je použití termoterapie, která ovlivňuje multiplikaci a translokaci virů a vede ke zvětšení viruprosté zóny ve vrcholových pletivech.

Rostliny *in vitro* jsou ovlivňovány teplotou 37 °C po dobu 6 týdnů a následně pak odbírány vrcholové části pupenů do velikosti 1 mm, tvořené obvykle apikálním vrcholem se dvěma až třemi listovými základy a zbytky krycích šupin. Apikální vrcholy se odebírají jak z vrcholu stonků, tak zejména z úžlabních pupenů listů. Preparace probíhá pod stereomikroskopem při 16ti až 24ti násobném zvětšení a odřezky se kultivují ve zkumavkách na šikmém agaru, na médiu B5 pro izolaci meristémů. Regenerace rostlinek schopných dalšího pasážování (výška cca 4 cm) trvá, v závislosti na ozdravovaném genotypu, tři až čtyři měsíce od odběru vrcholů. Tento způsob ozdravování je vhodný zejména pro viry A (PVA), Y (PVY) a virus svinutky bramboru (PLRV). Pokud nedojde k odstranění viru po proběhnutí celého eliminačního procesu, musí se termoterapie a odběr meristému někdy i vícekrát opakovat.

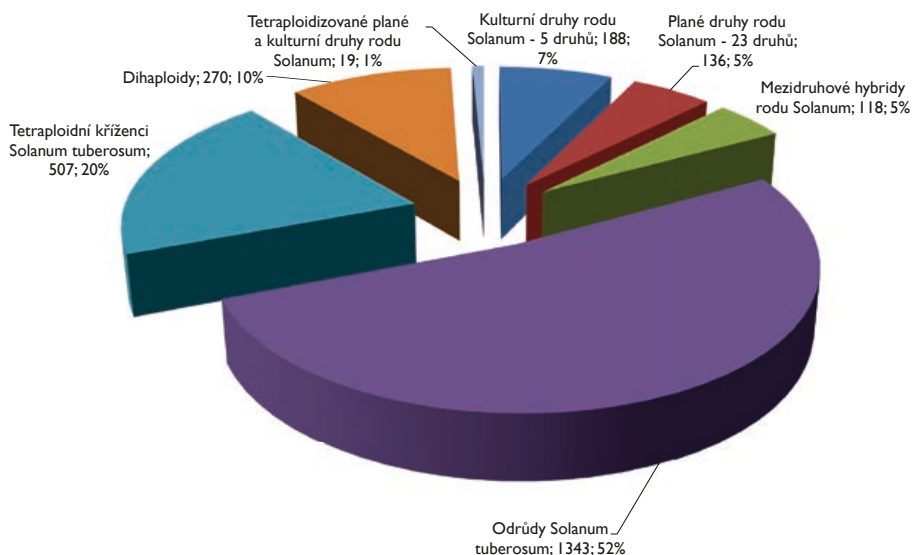
Vážný problém v genové bance představoval virus S (PVS), který byl u nás, na rozdíl od zahraničí, dlouhodobě tolerován a nepatřil mezi viry povinně kontrolované při certifikaci sadby. To bylo u nás zavedeno vyhláškou až od roku 2006. V kolekci genové banky byl virus S nejčastěji přítomným virem. Vzhledem k tomu, že tento virus vystupuje vysoko do vegetačního vrcholu, je možnost jeho odstranění klasickým postupem minimální. Z tohoto důvodu byl ve VÚB rozpracován postup eliminace viru S pomocí chemoterapie *in vitro*, která je založena na aplikaci preparátu s virostatickým účinkem (HORÁČKOVÁ 1998, HORÁČKOVÁ a DĚDIČ 2009, HORÁČKOVÁ a DOMKÁŘOVÁ 2012).

Nejlépe se osvědčil přípravek Ribavirin, syntetický ribosid, který inhibuje replikaci viru a výrazně zpomaluje jeho systémové šíření v rostlině. Metodický postup chemoterapie je založen na opakovaném pasážování rostlin na základní agarové živné médium s Ribavirinem. Vrcholové řízký se vkládají po deseti do plastových kultivačních nádob a celý cyklus se v rozmezí čtyř týdnů třikrát opakuje. Vzorek se po třetí pasáži rozklonuje podle jednotlivých ovlivňovaných rostlin a připraví k otestování. Při ozdravování od viru S je při použití chemoterapie dosahováno velmi pozitivního efektu, viry A (PVA), Y (PVY) a svinutka bramboru (PLRV) na tuto terapii pozitivně nereagují.

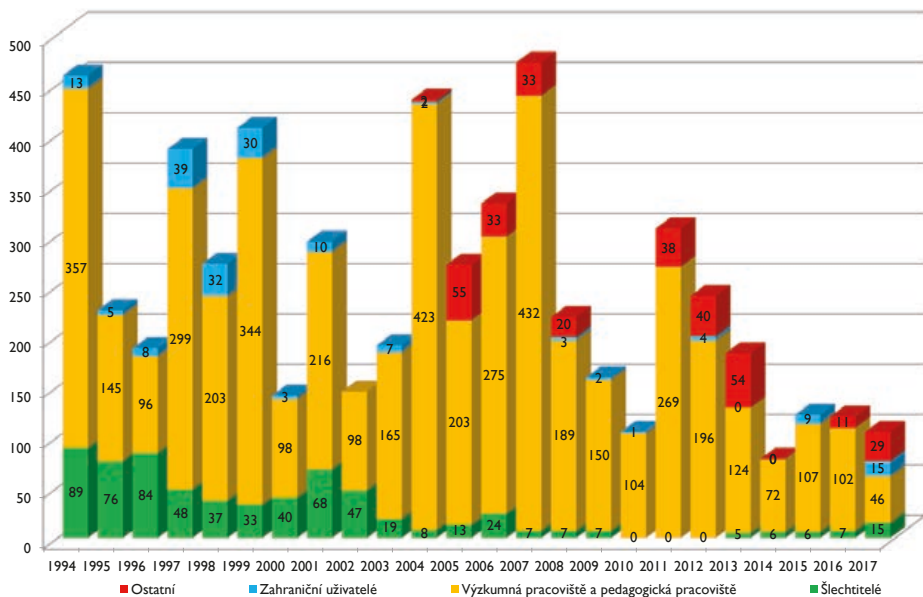
Po ukončení každé fáze aktivního ozdravování se u všech postupů využívá k otestování zdravotního stavu imunoenzymatická metoda ELISA, nejprve přímo z rostlin *in vitro* a u detekovaných zdravých klonů následuje

otestování z rostlin *in vivo* vysazených ve skleníku. Hodnotí se přítomnost všech běžných virů bramboru (PVS, PVM, PVX, PVA, PVY a PLRV). Klony s potvrzeným bezvirovým zdravotním stavem se rozmnoží a využijí k založení kultury pro dlouhodobou kultivaci. Časový interval od převodu do kultury *in vitro* po dosažení ozdravených klonů se, v závislosti na odstraňovaných virech, pohybuje obvykle mezi 10 až 14 měsíci, při smíšené infekci i déle.

V kolekci genetických zdrojů rodu *Solanum* udržované ve VÚB bylo do konce roku 2017 shromážděno 2.581 položek. Systematickým odstraňováním virové infekce bylo dosaženo stavu, kdy je 99,88 % kolekce udržováno v bezvirovém stavu a sbírka se rozšiřuje pouze o materiály získané jako bezvirové, případně aktivně ozdravené vzorky. Složení genové banky a početní rozsah jednotlivých dílčích kolekcí je vyjádřen graficky (Graf 1).



Graf 1: Podíl jednotlivých kategorií materiálu v genové bance



Graf 2: Přehled poskytování genetických zdrojů bramboru

Genová banka *in vitro* ve VÚB Havl. Brod má parametry srovnatelné s předními světovými bankami a představuje zdroj řady donorů významných hospodářských vlastností, rezistencí proti chorobám a škůdcům, biotickým a abiotickým stresům. Velká pozornost je v Genové bance věnována zachování genetické rozmanitosti genotypů bramboru vytvořených na území našeho státu, ty tvoří cca 34 % ko-

lekce. Shromážděné vzorky jsou dostupné pro výzkum, šlechtění a vzdělávání a poskytují se především praktickým šlechtitelům, výzkumným pracovištím, univerzitám, muzeím, botanickým zahradám v celé ČR a rovněž řadě zahraničních uživatelů. Informaci o využívání banky dokládá přiložený graf poskytování genetických zdrojů bramboru v letech 1994 – 2017 (Graf 2).



## Seznam použité literatury

- DOMKÁŘOVÁ J., HORÁČKOVÁ V. (2013): Česká banka genetických zdrojů bramboru a její využití ve výzkumu a šlechtění. *Vědecké práce - VÚB Havlíčkův Brod* 21: 47 – 58.
- DOMKÁŘOVÁ J., HORÁČKOVÁ V. (2014): Genetické zdroje bramboru ve VÚB Havlíčkův Brod. In: *Genetické zdroje rostlin v ČR po 20 letech existence Národního programu*. Praha: Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., 2014. *Genetické zdroje*, 102: 1 – 9.
- HORÁČKOVÁ V. (1998): Eliminace viru S bramboru chemoterapií *in vitro* za použití ribavirinu. *Rostlinná výroba*, 44: 539 – 544.
- HORÁČKOVÁ V., DOMKÁŘOVÁ J. (1998): Konzervace *in vitro*, její uplatnění u kolekce bramboru. In: *Metody konzervace genofondu rostlin a možnosti jejich využití v ČR*. Sborník referátů ze semináře konaného 19. listopadu 1998 ve VÚRV Praha – Ruzyně. Praha: VÚRV, 1998. 60 – 66.
- HORÁČKOVÁ V., DOMKÁŘOVÁ J. (1999): Vývoj a charakteristika genové banky bramboru *in vitro* ve VÚB Havlíčkův Brod. *Vědecké práce - VÚB Havlíčkův Brod*, 13: 58 - 68.
- HORÁČKOVÁ V., DĚDIČ P., PTAČEK J., DOMKÁŘOVÁ J. (2004): Program revitalizace a valorizace genové banky bramboru *in vitro*. *Úroda*, 12: 31 – 33.
- HORÁČKOVÁ V., DOMKÁŘOVÁ J. (2005): The Czech bank of potato genetic resources. *Czech J. Plant Breed.*, 41(3): 117 – 119.
- HORÁČKOVÁ V., DĚDIČ P., DOMKÁŘOVÁ J. (2007): Ozdravování bramboru od virové infekce technikami *in vitro*. *Úroda*, 55: 54-57.
- HORÁČKOVÁ V., DĚDIČ P. (2009): Metodika přípravy bezvirových materiálů bramboru v novošlechtění a udržovacím šlechtění s využitím biotechnologických a virologických postupů. *Certifikovaná metodika. Praktické informace* 27, Výzkumný ústav bramborářský Havlíčkův Brod, s.r.o., 28 pp.
- HORÁČKOVÁ V., DĚDIČ P., FALTUS M. (2010): Využití tkáňových kultur pro eliminaci virové infekce bramboru. *Vědecké práce - VÚB Havlíčkův Brod*, 18: 85 – 96.
- HORÁČKOVÁ V., DOMKÁŘOVÁ J. (2012): Metodika produkce bramboru s barevnou dužninou s využitím biotechnologických a virologických postupů. *Certifikovaná metodika. Praktické informace* 39, Výzkumný ústav bramborářský Havlíčkův Brod, s.r.o., 28 pp.
- HORÁČKOVÁ V., DOMKÁŘOVÁ J. (2018): Kolekce bramboru uchovávaná v genové bance *in vitro* a její genetický potenciál. *Vědecké práce - VÚB Havlíčkův Brod*, 18 [in press].
- MURASHIGE T., SKOOG F. (1962): A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15: 473 – 497.

# Technologie kryoprezervace: Patnáct let provozu kryobanky vegetativně množených rostlin - zkušenosti a perspektivy

**Zámečník J., Faltus M., Bilavčík A.**

**Výzkumný ústav rostlinné výroby, v. v. i., Drnovská 507, 16106 Praha 6 Ruzyně**  
zamecnik@vurv.cz, faltus@vurv.cz

---

Kryobanky jsou budovány pro dlouhodobé skladování vegetativně rozmnožovaných rostlin při ultra nízkých teplotách. Navíc některé kryobanky skladují také rekalcitrantní semena, která netolerují hluboké vysušení. Uchování genofundu rostlin v přirozených podmínkách s každoročním založením porostů (např. česnek) nebo ve víceleté kultuře (ovocné dřeviny, chmel) se nepovažuje za bezpečné. Životnost takto uchovávaných druhů může být nespolehlivá, mohou být ohroženy abiotickými environmentálními faktory, zvláště při měnících se klimatických podmínkách (nedostatek vody, nízká teplota a další) i biotickými faktory (škůdci a nemoci). Jako alternativní metoda uchování genofundu rostlin byla zavedena jejich kryokonzervace, uložení v kapalném dusíku v teplotách  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Kryokonzervace je založena na snížení a následném zastavení metabolických funkcí biologického materiálu uloženého při ultra nízké teplotě kapalného dusíku ( $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Kryoprezervace uchovávaných rostlin je využívána jako „safe duplicate“ k metodám uchování genofundu rostlin v polních podmínkách, která slouží jako bezpečná záloha oproti jiným odlišným postupům, co do místa a způsobu uchování.

## Krátký nástin vývoje kryoprezervace ve světě

Již v roce 1984 popsal poprvé Fahy a jeho spolupracovníci vitrifikaci buněk (FAHY *et al.* 1984), která je základním krokem k přežití explantátu bez tvorby letálních krystalků ledu během ultra-rychlého zmrazení. V průběhu času byly popsány četné postupy vitrifikace a přímého ponoření do kapalného dusíku také pro rostliny (NIINO *et al.* 1992, GROSPIETSCH *et al.* 1999, Keller 2002, TANAKA *et al.* 2004). Všechny postupy byly založeny na kryokonzervaci prostých nebo enkapsulovaných vzrostných vrcholů (FABRE a DEREUDDRE 1990). Rychlým ohřevem rostlinných částí, tzn. jejich ponořením do teplé vody ( $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), se zabrání tvorbě ledu. Případná rekrystalizace při pomalém tání by byla letální pro buňky meristému.

## Historie kryoprezervace ve VÚRV

Počátky kryoprezervace rostlin v České republice lze datovat do poloviny sedmdesátých let. Zakladatelem kryokonzervace ve VÚRV je Ing. Vladimír Skládal, CSc. (Obr. 1). Ing. Skládal získal nejen nejmodernější vybavení kryolaboratoře, ale také pozval světové experty v oblasti kryoprezervace na své pracoviště. Jeho mezinárodní ohlas vyústil v organizová-

ní světové konference v Mariánských lázních v roce 1990, na kterou přijeli z celého světa odborníci nejen v kryoprezervaci rostlin, ale také v kryoprezervaci používané v humánní medicíně.



Obr. 1: Ing. Vladimír Skládal, CSc. budující kryolaboratoř ve Výzkumném ústavu rostlinné výroby v roce 1988.

Významným oceněním pracoviště Fyziologie a kryobiologie rostlin jako vedoucího pracoviště v termální analýze bylo uspořádání Školy termické analýzy (TA School) v roce 2007 pro účastníky z EU. Pro svůj velký úspěch byla TA School zorganizována opakovaně ještě ve dvou následujících letech. Během těchto tří ročníků absolvovalo TA School celkem 18 PhD studentů z celé EU, specializujících se na kryoprezervaci. Následující roky byli na dlouhodobé stáži na našem pracovišti PhD studenti z Argentiny, Brazílie, Slovenska, Polska, Finska a Norska.

V roce 2003 byly schváleny Radou genetikých zdrojů rostlin Národního programu konzervace a využívání genetikých zdrojů

rostlin, zvířat a mikroorganismů významných pro výživu a zemědělství kryopostupy a byla založena Kryobanka vegetativně množených rostlin ve VÚRV v Praze Ruzyni, uchovávající položky rostlin, které jsou součástí Národního programu.

Výběr položek pro kryoprezervaci je v kompetenci kurátorů jednotlivých plodin, kteří rozhodují, které geneticky zajímavé položky genofondu kolekce budou uchovány metodami kryoprezervace. Až na některé výjimky jako je brambor, který je uchováván v *in vitro* kultuře v VÚB v Havlíčkově Brodě, je nutné většinu vegetativně množených plodin předem převést do *in vitro* podmínek. I přes relativně bezpečné uchovávání genofondu bramboru v *in vitro* podmínkách je potřeba i k této kolekci vytvořit bezpečnostní duplikaci v ultranízkých teplotách. Převody do *in vitro* podmínek jsou u některých druhů rostlin problematické z důvodu výskytu endofytických mikroorganismů. Odvirování meristému rostlin je žádoucí před jejich uskladněním v ultra nízkých teplotách (FALTUS *et al.* 2016). Viruprostý genofond uchováván v ultranízkých teplotách v Dewarových nádobách může sloužit jako technický izolát bránící reinfekci uskladněných položek.

### Progres metod kryoprezervace

Koncem osmdesátých let byla nejčastěji používanou metodou kryoprezervace tzv. dvoustupňové mrznutí. Dvoustupňové mrznutí spočívalo v relativně pomalém ochlazení vzorků do  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$  a poté jejich velmi rychlé vhození přímo do kapalného dusíku. Během prvního stupně mrznutí byla často vyvolávána nukleace, aby docházelo k mimobuněčnému mrznutí v intercelulárních prostorách (ZÁMEČNÍK 1990). Extracelulární mrznutí zaručovalo dostatečnou dehydrataci buněk a tím se zabránilo letální tvorbě ledu uvnitř buněk. Postupem času se začaly uplatňovat kryopro-

tektivní látky nebo jejich směsi, a to Plant Vitrification Solution No. 2 (SAKAI *et al.*, 1990) a Plant Vitrification Solution No. 3 (NISHIZAWA *et al.* 1993). Tyto dvě směsi látek doznaly řady různých modifikací podle toho, jak byly optimalizované pro různé druhy rostlin. Před jejich použitím se uplatňovalo postupně stále více otužování, a to roztoky sacharózy po dobu jednoho a více dní. Rovněž u chladu odolných druhů se před aplikací vitrifikačních roztoků uplatňovalo otužování nízkou teplotou po dobu 24 hodin až několika dní. Otužení v přirozených podmínkách se používá s výhodou u kryoprezervace dormantních pupenů. U těchto pupenů bylo zjištěno, že nezáleží na stádiu jejich endodormance (BILAVČÍK *et al.* 2015). Do dnešního dne se používá toto tzv. dvoustupňové, nejprve pomalé a následně rychlé chlazení rostlinných meristémů, právě u dormantních pupenů dřevin.

### **Moderní metody kryoprezervace**

V posledních letech byl zaznamenán výrazný skok v metodách kryoprezervace rostlin, a to za použití hliníkového nosiče rostlinných vzorků, tzv. V-plate a D-plate (YAMAMOTO *et al.* 2012). Princip nosiče spočívá v tom, že se do hliníkového plechu ve stejných vzdálenostech vytlačí důlky různé velikosti a tvaru podle velikosti a tvaru rostlinných částí. V-plate je určen pro vitrifikační roztoky, kdy se vzrostné vrcholy ponoří do kapky vitrifikačního roztoku, která odpovídá velikosti prohlubně vytlačené do hliníkového plechu. Pak se celý hliníkový plíšek s takto připravenými vzorky ponoří do kapalného dusíku, aby došlo k velmi rychlému ochlazení. Na jedné straně se pomocí V-plate dá unifikovat tvar kapky kryoprotektivního roztoku, na druhé straně jsou proti takto připravované sestavě s rostlinnými meristémy v kapce vitrifikačního roztoku námitky, že hliníkový nosič tvoří bariéru pro rychlé ochlazení vzorků. Oproti tomu D-plate je

určen pro dehydrataci vzorků. Na tento nosič se umístí vzorky s vitrifikačním roztokem nebo bez něj a nechají se dehydratovat po určitou, předem vyzkoušenou dobu, nad silikagelem. Po dehydrataci se rostlinné meristémy ponoří do kapalného dusíku, aby došlo k jejich rychlému zchlazení. Následný postup ohřevu je standardní jako u předchozí metody.

Poslední dobou se používá diferenční skenující kalorimetr (DSC) pro definování nových směsí kryoprotektivních roztoků na základě termické analýzy (TEIXEIRA *et al.* 2014). Pomocí termické analýzy je možné stanovit kritický objev vody v rostlinných vzorcích po jejich osmotické, mrazové, či prosté dehydrataci nad vysoušecím médiem. Na základě měření objemu krystalické vody lze stanovit objem zmrzlé, nezmrzlé a nezmrznutelné vody. Nezmrznutelná voda je definovaná jako voda, která zůstává v pletivu rostlin při nulovém objemu krystalické vody (ZÁMEČNÍK *et al.* 2018). Lze tak stanovit hraniční objem vody, při kterém úroveň dehydratace už poškozuje rostlinné buňky. Přitom cílem kryoprezervace rostlinných vzorků je, aby po všech způsobech otužování vykazovaly vzrostné vrcholy rostlin co nejvyšší úroveň regenerace před jejich ponořením do kapalného dusíku. Tímto požadavkem je docíleno nejvyšší regenerační schopnosti vzrostných vrcholů po odtátí z kapalného dusíku. Podrobným experimentálním výzkumem je možné optimalizovat kryoprotokol i pro citlivé genotypy bramboru (FALTUS *et al.* 2016).

### **Druhy vegetativně množených plodin a počty položek kryoprezervovaných v kryobance**

V České republice bylo v posledních patnácti letech vynaloženo velké úsilí na kryokonzervací nejdůležitějších vegetativně množených plodin. Za posledních pět let se v laboratoři

**Tab. 1: Počty úspěšně kryoprezervovaných položek v rámci jednotlivých druhů plodin.**

Plodina	v Kryobance
<i>Solanum tuberosum</i> L.	84
<i>Humulus lupulus</i> L.	54
<i>Allium sativum</i> L.	147
<i>Malus domestica</i> BORKH.	17
<i>Pyrus communis</i> L.	24
<i>Cerasus avium</i> (L.) MOENCH	3
<i>Cerasus vulgaris</i> P. MILLER	10
<i>Cerasus x effusa</i> HOST	3
<i>Fragaria x ananassa</i> DUCH.	34
<i>Armeniaca vulgaris</i> LAM.	6
* <i>Vitis vinifera</i> L.	3
* <i>Lonicera caerulea</i> L. var. <i>edulis</i> Turcz. ex Herder	20
* <i>Malus baccata</i> (L.) Borkh.	1
* <i>Malus coronaria</i> (L.) Mill.	2
* <i>Malus sargentii</i>	1
* <i>Malus toringo</i> (Siebold) de Vriese	1
* <i>Malus</i> „Professor Sprenger“	1
<b>Celkem</b>	<b>411</b>
* nově uložené druhy za posledních 5 let, na základě nových kryoprotokolů	

kryoprezervace vyvinuly a aplikovaly kryoprototypy použitelné pro další čtyři druhy rostlin (viz Tab. 1).

### Postavení Kryobanky ve srovnání se světem

V polovině roku 2017 vznikla studie „Feasibility study a safety back-up cryopreservation facility“ (ACKER et al. 2017), mapující stav kryoprezervace rostlin ve světě. Informace publi-

kovaných i z nepublikovaných zdrojů a údajů z Bioversity International a CIP (International Potato Centre) byly sestaveny tak, aby porovnávaly praktickou, spolehlivou a nákladovou účinnost kryokonzervace s terénními a *in vitro* metodami pro udržení životaschopnosti a genetické integrity kolekcí genetických zdrojů rostlin v dlouhodobém horizontu (> 50 let). Byl rovněž zhodnocen stav vývoje protokolů kryokonzervace a problematika kryoprezervace sbírek vegetativně rozmnožovaných plodin a plodin s rekalcitrantními semeny.

Dvaceti šesti institucím byl zaslán dotazník, jehož cílem bylo zjistit jejich současné počty skladovaných položek v kryobance a pravděpodobnost nárůstu v příštích pěti letech. Dotazník se zabýval také duplikací kryokonzervovaných sbírek a zájmem o bezpečnostní záložní kryoprezervaci. Dotazované instituce byly známy tím, že mají kryokonzervované sbírky nebo se předpokládá jejich pravděpodobné zapojení do kryoprezervace dalších položek v blízké budoucnosti. Zahrnovaly pět mezinárodních genetických bank s vegetativně množnými rostlinami CGIAR (Consultative Group of International Agriculture Research), CIAT (International Centre for Tropical Agriculture), CIP, IITA (International Institute for Tropical Agriculture), ICRAF (World Agroforestry Centre) a národní kryobanky.

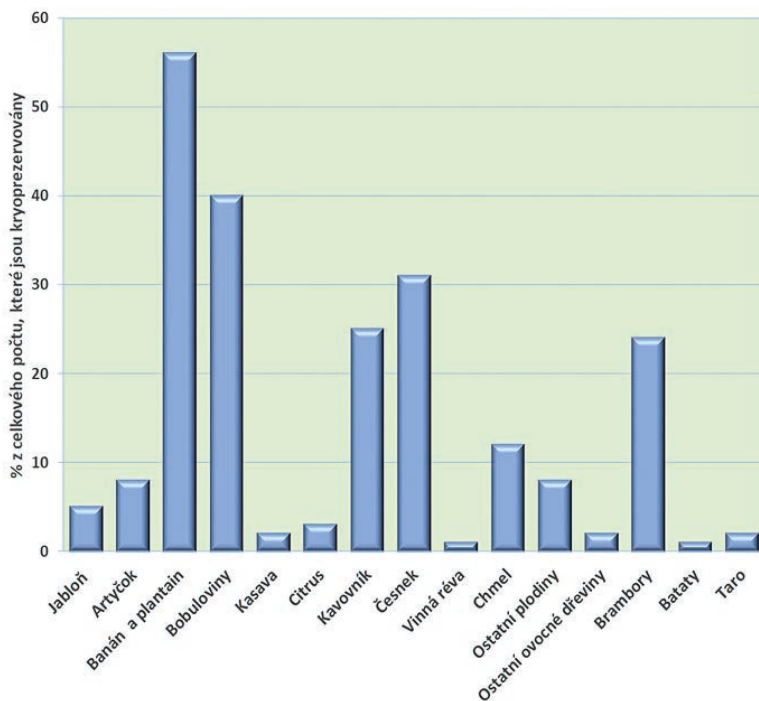
Dále bylo provedeno posouzení sbírek vegetativně rozmnožovaných a rekalcitrantních semenných plodin, které jsou v terénu a v *in vitro* v genobankách po celém světě, a dosud nebyly předmětem kryoprezervace. To poskytuje údaj o potenciálním budoucím použití „safe duplicate“ kryoprezervace, pokud by tyto sbírky byly případně uloženy v kryobance. Hodnocení bylo založeno na informacích Světové zprávy o rostlinných genetických zdrojích pro výživu a zemědělství, Světového informačního systému a systému

včasného varování FAO (WIEWS), genetického online informačního portálu Genesys (z Organizace pro výživu a zemědělství OSN (FAO)), na dokumentaci projektu Crop Trust a globální strategii ochrany plodin, a na informacích z internetových stránek jednotlivých institucí uchovávaných rostlinné genetické zdroje. Studie byla zaměřena na sbírky vegetativně množených plodin a plodiny s rekalcitrantními semeny zařazené v příloze 1 a článku 15 ITPGRFA (The International Treaty on Plant Genetic Resources for Food and Agriculture).

Z analýzy vyplynuly stručné závěry. Byly konstatovány výhody kryokonzervace, kterými jsou nízké náklady, větší životnost a vysoká míra

genetické stability při dlouhodobém uchovávání sbírek v ultra nízkých teplotách, ve srovnání s jinými metodami uchování. Nevýhody kryokonzervace jsou prvotní náklady na zavedení rostlinných sbírek do ultra nízkých teplot. Poté jsou náklady po dobu skladování v kapalném dusíku nízké ve srovnání s každoročními náklady v tradičním uchování rostlin *in situ*.

Rozsah plodin zastoupených v kryokonzervovaných sbírkách je omezený. Celosvětově byly hodnoceny kryoprezervované kolekce plodin, které mají více jak 100 položek v kapalném dusíku. Jsou to brambory, moruše, jahody, banány, česnek, kasava, kávovník a máta. Z těchto plodin jsou uloženy v naší kryobance brambory, jahody a *Allium*, přičemž u *Allium* je uloženo



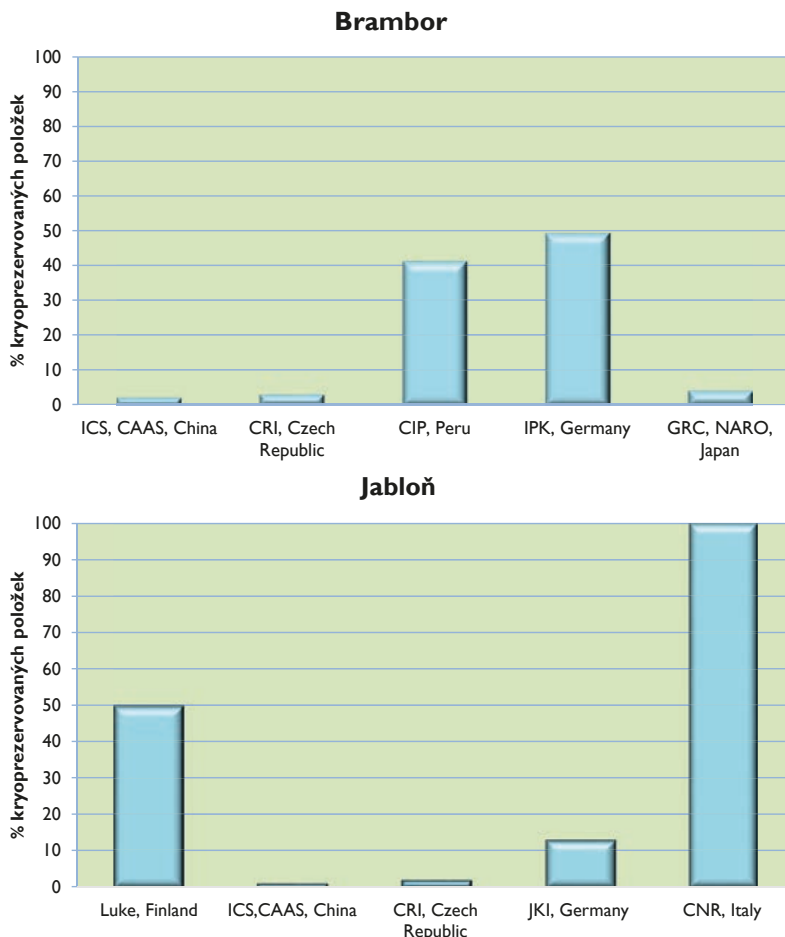
Graf 1: Podíl kryoprezervovaných položek z celkového počtu položek, které vlastní společně 15 ústavů (včetně VÚRV, v.i.) (Acker et al. 2017).

137 položek. Pro těchto osm plodin existují dobře fungující, odzkoušené kryoprotokoly, které byly úspěšně implementovány u celé řady genotypů v rámci rostlinného druhu. Ne všechny laboratoře však dosahují stejného úspěchu při aplikaci stejného kryoprotokolu.


jsou např. jabloně a brambory, je stále ještě velmi malé procento genofondových položek uchováno bezpečnou duplikací v kryobankách. Je to odrazem složitosti biotechnologického postupu a času nutného pro kryokonzervaci velkých objemů genofondových položek.

Z grafu 1 je patrné, že dokonce i u plodin, u kterých jsou plně funkční kryoprotokoly, jako

Rozsah kryokonzervace se významně liší u 15 institucí. Tento rozdíl je ilustrován v grafu 2



Graf 2: Počet kryoprezervovaných položek v kryobance v poměru k celkovému počtu položek jabloní a brambor ve sledovaných institucích. Čísla v závorkách udávají celkový počet položek ve sbírce (Acker et al. 2017).



u jabloní a bramboru jako příklad. V institucích s malými kolekcemi (Itálie) může být již 100% sbírky kryokonzervováno. V rozsáhlých kolekcích je procento kryokonzervovaných položek z celé kolekce méně než 50%, v některých případech dosahuje podíl jenom řádu procent.

### **Závěr a doporučení**

V současné době je známo, že pouze šest z 13 plodin, uvedených v genofondových sbírkách podle Přílohy I a článku 15 Plant Treaty, které jsou vegetativně rozmnožovány nebo mají rekalcitrantní semena, jsou uloženy ve světových kryobankách. V této době je tedy nejnaléhavější potřeba iniciativy k urychlení vývoje a zavádění kryokonzervace vegetativně rozmnožovaných plodin a plodin s rekalcitrantními semeny.

V České republice je několik pracovišť, které se zabývají výzkumem i praktickým využitím kryoprezervace k dlouhodobému uchování vegetativně množených GZR. Tyto aktivity jsou soustředěny zejména ve VÚRV, v. v. i. v Praze Ruzyni. Z hlediska vývoje a ověřování kryoprotokolů je na tom toto pracoviště po odborné stránce velmi dobře. Problémem je nicméně nedostatek finančních prostředků, který brzdí aplikaci stávajících kryoprotokolů a tím podstatně zvýšení počtu kryoprezervovaných genotypových položek za účelem jejich bezpečné duplikace v kryobance.

### **Poděkování**

Tato práce vznikla za částečné podpory projektů MZe 51834/2017-MZE-17253/6.2.16, QJ1610020 a RO0418.



## Seznam použité literatury

- ACKER J.P., ADKINS S., ALVES A., HORNA D., TOLL J. (2017): Feasibility study a safety back-up cryopreservation facility independent expert report: July 2017. Rome (Italy): Biodiversity International. 100 pp. ISBN: 978-92-9255-073-8. [[https://www.biodiversityinternational.org/fileadmin/user\\_upload/Feasibility\\_Acker\\_2017pdf.pdf](https://www.biodiversityinternational.org/fileadmin/user_upload/Feasibility_Acker_2017pdf.pdf)].
- BILAVČÍK A., ZÁMEČNÍK J., FALTUS M. (2015): Cryotolerance of apple tree bud is independent of endodormancy. *Front. Plant Sci.*, 6: 695. doi:10.3389/fpls.2015.00695.
- FABRE J., DEREUDDRE J. (1990): Encapsulation-dehydration: a new approach to cryopreservation of *Solanum* shoot tips. *CryoLetters*, 11: 413-426.
- FAHY G.M., McFARLANE 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. (2016): Metodika kryokonzervace citlivých genotypů bramboru. Praha, Certifikovaná metodika. Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., 18 pp.
- GROSPIETSCH M., STODŮLKOVÁ E., ZÁMEČNÍK J. (1999): Effect of osmotic stress on the dehydration tolerance and cryo preservation of *Solanum tuberosum* shoot tips. *CryoLetters*, 20: 339-346.
- KELLER E.R.J. (2002): Cryopreservation of *Allium sativum* L. (Garlic). In: Bajaj Y.P.S., and L.E. Tovill (eds.) Cryopreservation of plant germplasm II. Berlin (Germany): Springer-Verlag, pp. 37-46.
- 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: 261-266.
- 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 Sci.*, 91: 67-73.
- SAKAI A., KOBAYASHI S., OIYAMA I., (1990): Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. *Plant Cell Rep.*, 9: 30-33.
- TANAKA D., NINNO T., ISUZUGAWA K., HIKAGE T., UEMURA A M. (2004): Cryopreservation of shoot apices of *in-vitro* grown gentian plants: comparison of vitrification and encapsulation-vitrification protocols. *CryoLetters*, 25: 167-176.
- TEIXEIRA A.S., FALTUS, M., ZÁMEČNÍK, J., GONZÁLEZ-BENITO, M., MOLINA-GARCIA A. (2014): Glass transition and heat capacity behaviors of plant vitrification solutions. *Thermochimica Acta*, 593: 43-49.
- YAMAMOTO S, RAFIQUE T, FUKUI K, SEKIZAWA K, NIINO T. (2012): V-cryo-plate procedure as an effective protocol for cryobanks: case study of mint cryopreservation. *CryoLetters*, 33(1):12-23.
- ZAMEČNÍK J., FALTUS M., BILAVČÍK A (2018): Frozen and unfreezable water detected by DSC: their role in plant cryopreservation. *Cryoletters* (in press)
- ZÁMEČNÍK J. (1990): Způsob kryoprezervace biologických, zejména rostlinných materiálů. Patent č. 279735.

# Metody molekulární charakterizace genetických zdrojů a jejich význam

**Leišová-Svobodová L.**

**Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.**

leisova@vurv.cz

## Úvod

V osmdesátých letech minulého století došlo k velkému rozvoji molekulární biologie a genetiky. To s sebou neslo vývoj nových metod a možností, jak odpovědět na mnohé otázky i v návazných oborech, jako je třeba zemědělství. Nové metody se týkaly zejména detekce polymorfismu, tedy rozdílů v sekvenci informační molekuly DNA mezi vzorky či individui. Umožnily tak analýzu genetické diverzity, konstrukci map genomu vybraných druhů zemědělských plodin a pochopení rozdílů mezi odrůdami. Genetické mapy vedly k sestavení DNA knihoven a ty se staly základem pro nalezení individuálních genů hospodářsky významných znaků u mnoha plodin. Následné sekvence a bioinformační analýzy nalezených genů a dalších oblastí genomu se staly základem pro vývoj molekulárních markerů, které se v oblasti zemědělství využívají zejména pro charakterizaci odrůd a ve šlechtění nových odrůd (MAS - Marker Assisted Selection). V posledních letech bylo vyvinuto několik metod pro tzv. sekvenace nové generace (NGS - Next Generation Sequencing). Tyto metody zrychlí cestu k nalezení genů odpovědných za mnohé fenotypové projevy žádané u nových odrůd zemědělských plodin a rovněž umožní komplexněji pojmout diverzitu genetických zdrojů zemědělských plodin a jejich planých příbuzných druhů.

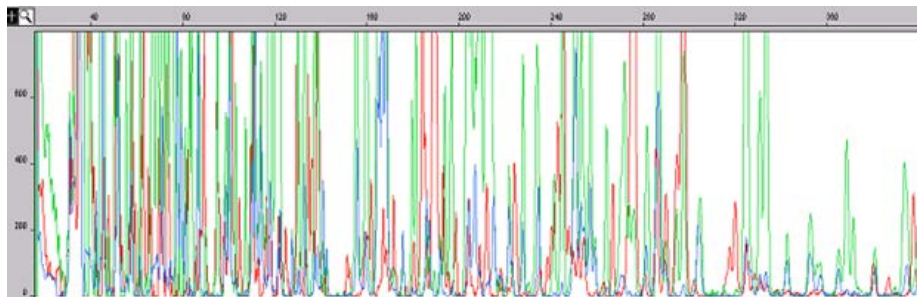
Tento článek si klade za cíl seznámit čtenáře se základními metodami molekulární biologie,

kteří jsou využívány nebo mohou být využity při práci s genetickými zdroji rostlin.

## RFLP – AFLP

*(Restriction Fragment Length Polymorphism - Amplification Fragment Length Polymorphism)*

Tyto metody patří mezi restriční analýzy a jsou založeny na rozpoznání určité konkrétní sekvence vybranými restričními endonukleázami, které rozpoznávají určité konkrétní sekvence a v tom místě molekulu DNA přeruší. Následnou metodou gelové elektroforézy jsou detekovány fragmenty DNA různých velikostí, které jsou specifické pro danou odrůdu či jedince. Metoda AFLP je navíc kombinovaná s polymerázovou řetězovou reakcí (PCR - Polymerase Chain Reaction), kdy dojde k namnožení DNA fragmentů vybraných pomocí kombinace primerů. Tím je výrazně usnadněna jejich detekce. Obě metody mají výhodu v tom, že není třeba předem znát žádnou sekvenci studovaného genotypu. Proto se využívají u druhů, u kterých je toho dosud jen velmi málo známo a zejména u druhů s menším genomem, např. u genetických zdrojů virových, bakteriálních a houbových patogenů. Nevýhodou je jejich pracnost, což platí zejména pro vyhodnocování výsledků (Obr. 1). Proto se u vyšších rostlin používají jen tam, kde nejsou k dispozici žádné specifickéjší markery, např. u druhu *Lonicera caerulea* (HOLUBEC *et al.* 2018). Dříve se tyto metody užívaly i u obilnin (SIEDLER *et al.* 1994).

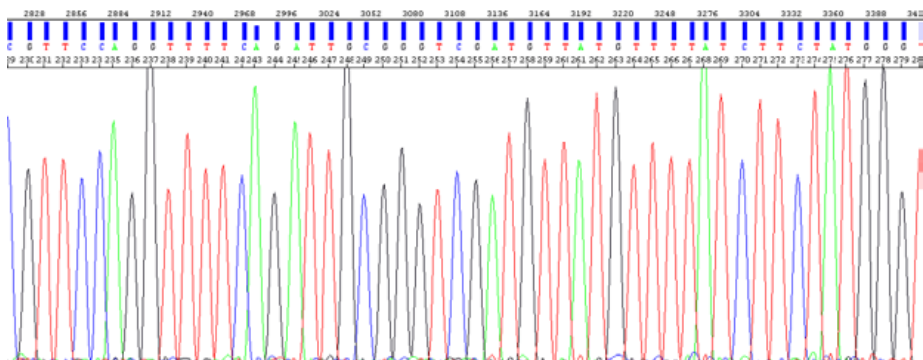


Obr. 1: Elektroforetogram analýzy AFLP - multiplexové uspořádání 3 reakcí značených modře, zeleně a červeně u odrůdy ječmene Diamant

### Sekvenování - DNA barcoding

Metoda sekvenování je zjišťování sekvence, tedy pořadí nukleotidů DNA u studovaného vzorku, dosud nejběžněji podle Fredericka Sangera, kdy je daný úsek vkládán samostatně do reakce a amplifikován pomocí primeru a fluorescenčně značených nukleotidů. Následná elektroforéza probíhá ve speciálních přístrojích - sekvenátorech, protože musí být zaručena vysoká rozlišovací schopnost na úrovni 1 bp (pár bazí) (Obr. 2). Touto metodou je možno získat sekvenci v délce do 1000 bp u 1 vzorku na 1 reakci. Vyznačuje se velmi nízkým výskytem chyb, v závislosti na sekvenci. Moderní metody NGS jsou za-

loženy zjednodušeně řečeno na fragmentaci DNA, navázání vzniklých fragmentů na nějaký pevný nosič, např. na skleněnou destičku nebo kuličku, podle výběru metody. Sekvenování pak probíhá syntézou všech fragmentů najednou a mnohokrát za sebou zároveň se čtením sekvencí. Počet čtení daného fragmentu je pak ukazatelem věrohodnosti získaných sekvencí. Obě metody, jak klasické sekvenování, tak i NGS jsou přesné, ale mají nezastupitelnou úlohu v identifikaci genů. NGS je výhodná pro získání velkého množství dat z jednoho experimentu, ale zároveň je to metoda dosud značně drahá. Nicméně i pro studium biodiverzity bude mít čím dál větší význam.



Obr. 2: Elektroforetogram sekvenační analýzy úseku DNA „2seg“ u odrůdy ječmene Aksamit

Metoda, která ze sekvenační analýzy vychází, je metoda tzv. DNA barcodingu. Je to metoda využívaná zejména systematickými zoology, kteří používají sekvence mitochondriální DNA pro nomenklaturní zařazování živočišných druhů. Mykologové a bakteriologové používají sekvence oblastí DNA nacházející se mezi geny pro ribozomální podjednotky, tzv. ITS (Internal Transcribed Spacer) pro systematické zařazování hub a bakterií. U rostlin je situace složitější. Dosud neexistuje ustálený výběr oblastí DNA, jejíž sekvence by spolehlivě rozlišovala rody a druhy rostlin. Proto se používá těchto oblastí více, a systematická botanika se o tyto výsledky opírá jen částečně. Nejčastěji se používají oblasti ITS a dále vybrané části mitochondriální a chloroplastové DNA – např. v práci SCHULTHEIS a DONOGHUE (2004).

## SNP

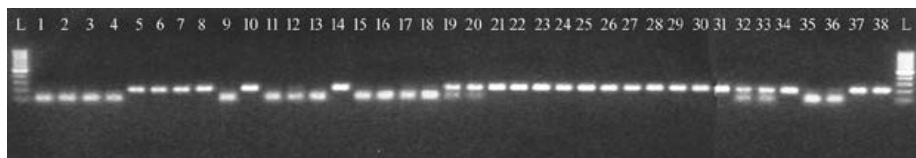
(*Single Nucleotide Polymorphism*)

Tato metoda je založena na faktu, že se mohou odrůdy či jedinci mezi sebou lišit v dané pozici genu pouze v jediném nukleotidu, který může mít dopad na některý hospodářsky důležitý znak, např. na lepší termostabilitu  $\beta$ -amylázy u ječmene (CLARK *et al.* 2003). Tato jednobodová mutace může být detekována mnoha metodami – nejlevnější metodou je prostá amplifikace cílové oblasti s tím, že primery se váží tak, aby došlo k amplifikaci pouze jedné z variant. Dražší metodou je opět amplifikace cílového úseku DNA a následná aplikace restrikční endonukleázy, která přeruší vlákno

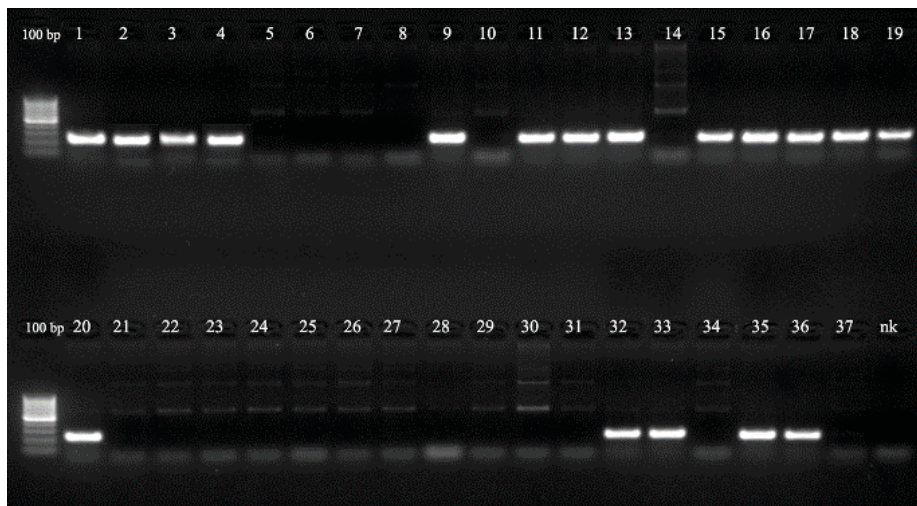
DNA ve specifickém místě přesně podle přítomnosti či nepřítomnosti daného nukleotidu. Na následném elektroforetogramu jsou pak vidět buď kratší produkty štěpení, nebo 1 původní nerozštěpený úsek DNA (Obr. 3). Dalšími metodami jsou různé modifikace amplifikace nebo hybridizace, které vycházejí z faktu, že k alele obsahující v daném místě nukleotid „A“ se dokonale hybridizuje pouze alela obsahující nukleotid „T“. Míra hybridizace je detekována několika metodami. Dražší metody vyžadují obvykle speciální zařízení, např. zařízení pro NGS, DNA čipy, pyrosekvenátor, apod. Nicméně přes svou finanční nákladnost má tato metoda pro studium biodiverzity a popis genetických zdrojů zemědělských plodin význam a její význam ještě vzroste po nalezení většího množství jednobodových mutací markerujících důležité hospodářské znaky (Guo *et al.* 2014).

## Specifické markery

Specifické markery jsou velmi ceněny šlechtiteli. Jejich vývoj je nejsnazší tam, kde je daný znak podmíněn pouze jedním genem. A protože takových znaků mnoho není, není dosud k dispozici ani mnoho specifických markerů. Ačkoli je jejich vývoj obvykle složitý a dlouhotrvající, jejich používání je jednoduché. Je založeno na PCR reakci s primery, které zaručují specifitu, přesnost a spolehlivost analýzy. Následnou elektroforézou jsou detekovány výsledné produkty PCR (Obr. 4). V ideálním případě může mít šlechtitel výsledky testování přítomnosti genu rezistence



Obr. 3: Elektroforetogram produktů restrikční analýzy enzymem *NcoI* produktů amplifikace úseku DNA odpovědného za sladovnickou kvalitu ječmene pro CHZO České pivo



Obr. 4: Elektroforetogram produktů amplifikace markeru sladovnické kvality ječmene *Mks3*

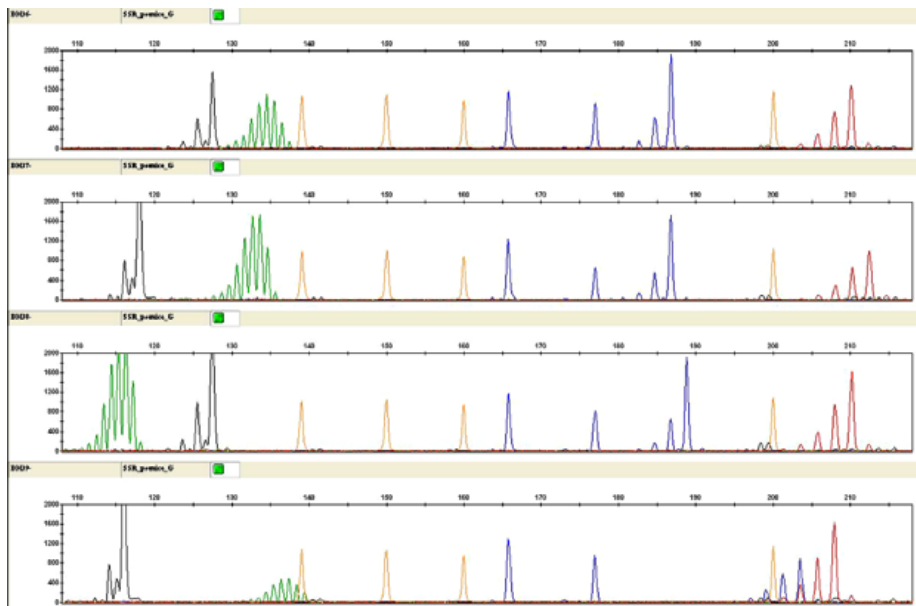
k padlí travnímu a několik dalších genů rezistence či kvality na stole do 2 dnů od odebrání vzorků mladých rostlin. Tento fakt výrazně urychluje a zlevňuje proces šlechtění. Z hlediska práce s genetickými zdroji jsou zatím specifické markery uplatňovány jen omezeně, zejména protože jich ani není mnoho k dispozici. Většina důležitých hospodářských znaků je totiž založena polygenně a proto mnohé publikované markery mají vypovídací hodnotu jen v rámci mapovacích populací, ve kterých byly vyvinuty.

Nicméně těmto markerům, spolu s SNP, patří budoucnost v práci s genetickými zdroji rostlin. Dá se předpokládat, že zavedením širšího využití NGS technologií sekvenování dojde k nalezení a popisu funkce mnoha genů a jejich alelických variant. To se odrazí v intenzivnějším vývoji molekulárních markerů. Jejich aplikace už ale asi nebude prováděna formou individuálních PCR a následné elektroforezy, ale pomocí některé z čipových technologií.

### **Analýza mikrosatelitů**

Analýza mikrosatelitů (SSR - Simple Sequence Repeat) je založena na detekci alelických variant úseků DNA, které obsahují repetitivní sekvence, např. „TCTCTCTC...“, které snáze podléhají mutacím v důsledku chyb transkripce. Proto se vyznačují vysokou mírou variability i v rámci druhu a jsou specifické pro danou odrůdu či individuum. Proto se využívají ve forenzních aplikacích: určování paternit zvířat i lidí, v kriminalistice, apod. U rostlin jsou využívány ke studiu biodiverzity a k charakterizaci odrůd a jejich identifikaci a ochranu. Další výhodou analýzy mikrosatelitů je jejich kodominantní charakter, kdy lze detekovat jak homozygotní, tak i heterozygotní sestavu alel. Analýza je vysoce reprodukcibilní a spolehlivá. Proto se při práci s genetickými zdroji využívá dosud zdaleka nejčastěji pro studium biodiverzity a pro různé mapovací a populační studie.

Analýza mikrosatelitů probíhá jako individuální PCR reakce s primery buď specifickými



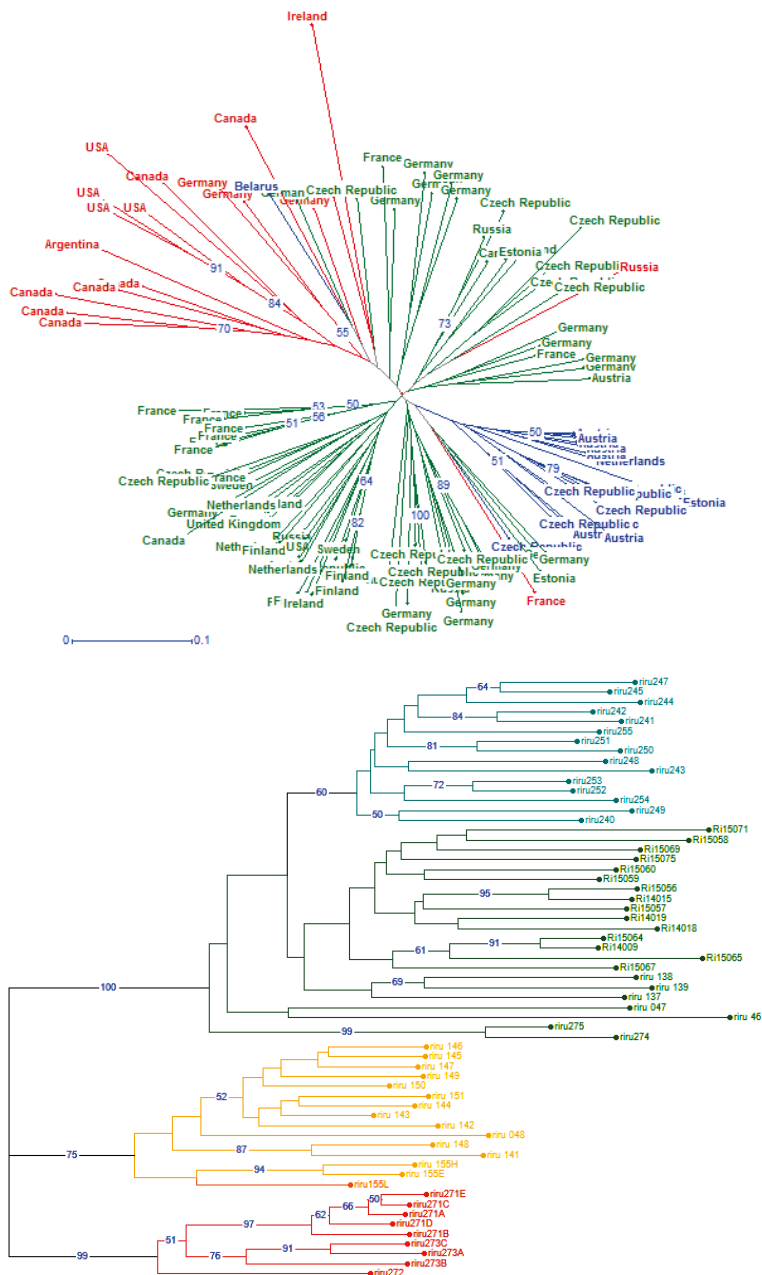
Obr. 5: Elektroforetogram analýzy 4 mikrosatelitů (modře, zeleně, černě a červeně) spolu s interním velikostním standardem (oranžově) u 4 odrůd pšenice (*Triticum aestivum*)

pro úsek před a za mikrosatelitní oblasti, pak je detekován délkový polymorfismus daného mikrosatelitu. Druhou možností je užití primerů přímo opakujícího se mikrosatelitu, kdy je detekován délkový polymorfismus oblasti mezi mikrosatelity. Pro následnou gelovou elektroforézu se obvykle využívají sekvenátory, protože mají lepší rozlišovací schopnost a je možno analyzovat multiplexově obvykle 4 reakce v jednom vzorku (Obrázek 5). Význam analýzy mikrosatelitů do budoucna pravděpodobně neporoste, ale zůstane spolehlivou metodou základní charakterizace genetických zdrojů rostlin (ROUSSEL *et al.* 2005; LEISOVA-SVOBODOVA *et al.* 2014, 2018).

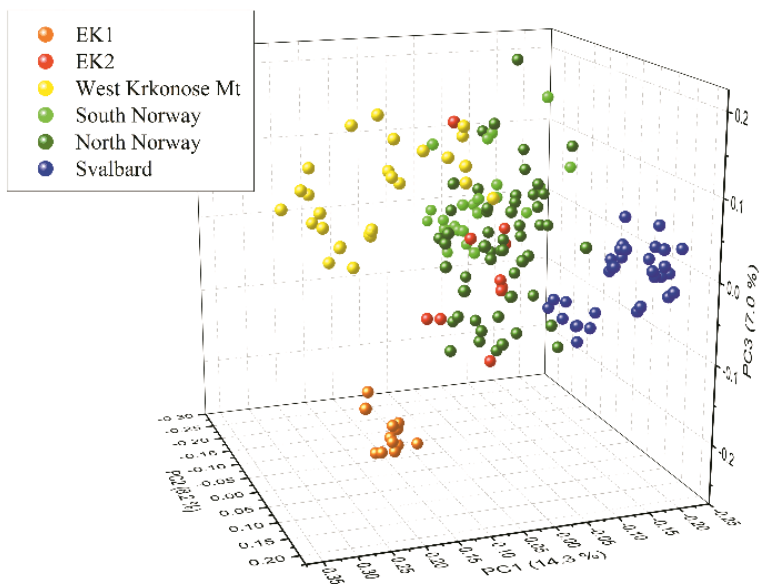
## Analýza dat

Analýza dat je velmi důležitou součástí molekulárně-biologických analýz pro pochopení genetické diverzity druhů, odrůd či popula-

cí. Kromě výpočtů různých indexů diverzity, z nichž jsou nejčastěji užívány dva:  $\hat{h}$  index podle Neiho (NEI 1978) a Shannonův informační index  $I'$  (SHANNON a WEAVER 1949), se jedná hlavně o aplikaci vybraných metod více-rozměrné analýzy dat. První, běžně užívanou, je shluková analýza (CLU – Cluster analysis). Zabývá se vyšetřováním podobnosti vícerozměrných objektů a jejich klasifikací do tříd neboli shluků. Nejprve jsou z dat vypočteny koeficienty podobnosti nebo nepodobnosti mezi objekty a sestavena matice těchto hodnot. Poté je provedeno shlukování podle vybraného algoritmu. Grafickým výstupem je tzv. dendrogram, který může mít více podob (Obrázek 6). Věrohodnost výsledků je dána např. hodnotami tzv. bootstrapů, tj. procentuálním zastoupením téhož shluku v dendrogramu po  $x$  (obvykle 1000) opakováních provedení výpočtů se znáhodněným pořadím vzorků.



Obř. 6: Dvě grafické verze dendrogramu, vlevo u genetických zdrojů ovsa (*Avena sativa*) a vpravo u planých příbuzných druhů rybizu (*Ribes spp.*); hodnoty bootstrapů větší než 50 jsou uvedeny modře na větvích dendrogramu.



Obr. 7: Elektroforetogram analýzy 4 mikrosatelitů (modře, zeleně, černě a červeně) spolu s interním velikostním standardem (oranžově) u 4 odrůd pšenice (*Triticum aestivum*)

Další metodou je multidimenzionální škálování (MDS – Multidimensional Scaling), což je technika vytvoření mapy relativního umístění objektů ve dvou nebo třírozměrném grafu (Obr. 7) na základě matice Euklidovských vzdáleností mezi objekty. Vypočtené latentní proměnné - jednotlivé osy v grafu - pak reprezentují podíl vysvětlené variability analyzovaného souboru vzorků.

Poté jsou data zpracovávána dalšími metodami populační analýzy, zejména tzv. F-statistikou, která umožňuje testovat hypotézy o identitě skupiny genotypů, odrůd či populací a odhadnout míru toku genů mezi nimi. Pro data molekulárně-biologických analýz existuje rovněž varianta analýzy variance ANOVA: AMOVA

(Analysis of Molecular Variance), kdy lze sledovat vliv více faktorů na diverzitu studovaného souboru genotypů. Uvedené postupy byly využity např. v práci LEISOVA-SVOBODOVA *et al.* (2018).

## Závěr

Závěrem je možno shrnout, že výše uvedené molekulárně-biologické analýzy jsou čím dál více používány pro studium biodiverzity a pro charakterizaci genetických zdrojů rostlin. V současné době pracujeme na tom, aby bylo možno výsledky těchto analýz vkládat do databáze genetických zdrojů rostlin, aby s nimi mohli pracovat kurátoři sbírek i uživatelé jako s jinými běžnými deskriptory.



## Seznam použité literatury

- CLARK S.E., HAYES P.M., HENSON C.A. (2003): Effects of single nucleotide polymorphisms in  $\beta$ -amylases I alleles from barley on functional properties of the enzymes. *Plant Physiology and Biochemistry*, 41: 798-804.
- GUO G., DONDUP D., ZHANG L., HU S., YUAN X., ZHANG J. (2014): Identification of SNPs in barely (*Hordeum vulgare* L.) by deep sequencing of six reduced representation libraries. *Crop Journal*, 2(6): 419-425.
- HOLUBEC V., SMEKALOVA T., LEISOVA-SVOBODOVA L. (2018): Morphological and molecular evaluation of the Far East fruit genetic Resources of *Lonicera caerulea* L. – vegetation, ethnobotany, use and conservation. *Genetic Resources and Crop Evolution* (<https://doi.org/10.1007/s10722-018-0701-y>).
- LEIŠOVÁ-SVOBODOVÁ L., PHILLIPS J., MARTINUSSEN I., HOLUBEC V. (2018): Genetic differentiation of *Rubus chamaemorus* populations in the Czech Republic and Norway after the last glacial period. *Ecology and Evolution*, 2018: 1-11; DOI: 10.1002/ece3.4101.
- LEIŠOVÁ-SVOBODOVÁ L., TOMKOVÁ L., SEDLÁČEK T., PSOTA V., KUČERA L. (2014): The application of microsatellite analysis in barley malting quality breeding programmes. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, 50(4): 268-277.
- NEI M. (1978): Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89(3): 583-590.
- ROUSSEL V., LEISOVA L., EXBRAYAT F., STEHNO Z., BALFOURIER F. (2005): SSR allelic diversity changes in 480 European bread wheat varieties released from 1840 to 2000. *Theoretical and Applied Genetics*, 111: 162-170.
- SCHULTHEIS L.M., DONOGHUE M.J. (2004): Molecular Phylogeny and Biogeography of *Ribes* (*Grossulariaceae*), with an emphasis on Gooseberries (subg. *Grossularia*). *Systematic Botany*, 29: 77-96.
- SHANNON C.E., WEAVER W. (1949): *The mathematical theory of communication*. Univ Illinois Press., 117 pp.
- SIEDLER H., MESSMER M.M., SCHACHERMAYR G.M., WINZELER H., WINZELER M., KELLER B. (1994): Genetic diversity in European wheat and spelt breeding material based on RFLP data. *Theoretical and Applied Genetics*, 88: 994-1003.

# Moderní postupy hodnocení jakosti genetických zdrojů obilnin

**Dvořáček V., Dvořáková Z., Doležalová J., Jágr M.**  
*Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Praha – Ruzyně*  
dvoracek@vurv.cz

## I. Úvod

Vzhledem k dominantnímu postavení obilnin v rostlinné výrobě a závislosti jejich oceňování při výkupu na chemicko-technologické jakosti zrna, je hodnocení kvality dlouhodobě jedním z nejvíce propracovaných postupů. Chemicko-technologické vlastnosti obilnin jsou tak i v rámci portfolia hodnocení genetických zdrojů Genové Banky Praha, majoritně zahrnující především pšenice, ozimě ječmeny a tritikále, klíčovými parametry jejich hodnocení. Na rozdíl od hodnocení při výkupu je strategie hodnocení genetických zdrojů, podobně jako při šlechtění, cíleně směřována k víceletému komplexnímu popisu kvality dané odrůdy či genotypu. Výběr parametrů je tak zohledňován z hlediska jejich průkazné vazby na genotyp a s ohledem k potenciální aplikační šíři dané obilniny. V případě pšenice je snahou sledovat parametry ovlivňující především její pečárenské využití.

V souvislosti s nástupy moderních analytických metod a definicí řady zdravotních rizik souvisejících s výživou (obezita, diabetes, potravinové alergie, karcinomy aj.) roste u obilnin význam hodnocení jejich hygienické i nutriční kvality. Zatímco z obecnějšího pohledu kvality produkce se jeví hygienická kvalita daná přítomností resp. absencí široké škály kontaminantů jako zcela klíčová, z pohledu hodnocení kvality genetických zdrojů není tak zásadní. Určitou výjimkou je sledová-

ní výskytu některých biokontaminantů (např. mykotoxinů) související s potenciální rezistencí materiálů. Důvodem je opět výše uvedená strategie hodnocení genofondu založená na průkazné genetické závislosti sledovaného znaku či parametru při maximálním možném odfiltrování vlivu externích podmínek. Ty jsou ovšem hlavní příčinou detekce kontaminantů v obilninách. Naproti tomu nutriční skladba obilného zrna, daná nejen základní chemicko-technologickou skladbou zrna (např. obsahem dusíkatých látek či škrobu), ale i celou škálou tzv. bioaktivních látek (např. polyfenoly, vitamíny, dietní vláknina, karotenoidy, minerální látky aj.) je z významné části geneticky podmíněna, a je tak naší snahou i tyto parametry postupně do hodnocení genetických zdrojů zařazovat.

## 2. Strategie hodnocení chemicko-technologické kvality zrna u genetických zdrojů obilnin

Význam sledování těchto znaků logicky souvisí s jejich klíčovým dopadem především na potravinařský průmysl. Ve srovnání s řadou definovaných chemických analýz či polních hodnocení je technologická kvalita zrna velmi flexibilním parametrem, jejíž parametry se mohou měnit dle individuálních požadavků výrobce resp. senzorických požadavků konzumentů. Z tohoto důvodu jsou při hodnocení genofondů upřednostňovány především primární technologické parametry zrna, jako

je např. u pšenice obsah dusíkatých látek, či obsah a kvalita mokrého lepku a Zeleného sedimentace. Hodnocení složitějších a časově náročnějších procedur, např. reologických analýz se tak doposud děje jen okrajově např. u materiálů se specifickým složením škrobu (DVOŘÁČEK *et al.* 2014).

Při snaze o zařazení nových technologických parametrů také musíme dlouhodobě počítat s jejich nevyváženým mapováním v rámci celkové databáze dané obilné kolekce. Důvodem je primární hodnocení nově získaných materiálů a ze starších položek většinou pouze těch, které při kontrole vykazují nedostatečné množství semen a nižší klíčivost. Určité řešení nabízejí v tomto směru metody blízké infračervené spektrometrie (NIR), umožňující archivaci získaných NIR spekter, které se dají využít v kombinaci s predikčním modelem pro nově vytvořený parametr a pro zpětné mapování v minulosti hodnocených materiálů (WILLIAMS a NORRIS 2001). Velkou efektivitu lze v těchto případech v budoucnu předpokládat při zpětném mapování již dříve zhodnocených položek z jejich uchovávané genetické informace (DNA), a to pomocí komplexního molekulárního screeningu.

### 3. Strategie hodnocení nutriční kvality zrna u genetických zdrojů obilnin

Strategie v oblasti hodnocení nutriční kvality obilnin vyplývá z ekonomických možností Národního programu. Na finální nutriční hodnotě se podílí velký počet analytů, a to jak z řad základní chemické skladby zrna (bílkoviny, škroby, tuky, vláknina, minerální látky), tak především z řad celé škály tzv. bioaktivních látek (vitamíny, polyfenoly, neškrobové polysacharidy, endogenní enzymy aj). Takové komplexní analýzy by zahrnovaly jistě přes stovku údajů na jeden vzorek, což je doposud časově a především finančně neúnosné. Navíc,

jen u zhruba poloviny z těchto parametrů víme detailněji něco o jejich nutričním působení (FARDET 2010).

Racionálnější přístup hodnocení tak doposud vychází ze současných šlechtitelských programů zaměřených jen na určité dílčí nutriční aspekty (změny) ve skladbě zrna. Vhodným příkladem ze současnosti je vývoj nových odrůd tzv. barevných pšenic s vyšším obsahem polyfenolů, které mají průkazně vyšší antioxidační aktivitu nebo vývoj nových odrůd ječmene s vyšším obsahem tzv. beta glukanů s celou škálou vysoce pozitivních účinků na organismus. Zcela samostatnou šlechtitelskou kapitolou je v důsledku požadavků na vyšší nutriční kvalitu obilnin i širší implementace tzv. pluchatých pšenic (špaldy, jednozrnky a dvouzrnky). Jejich nutriční přínos v současnosti však především souvisí s jejich výhradně celozrnným zpracováním a prokazatelně vyšším obsahem minerálních látek (především Fe a Zn) v potravinářských produktech (TROJAN *et al.* 2010, DICKIN *et al.* 2011).

Neméně významný aspekt racionální strategie sledování nutriční kvality zrna by měl zahrnovat i kvalitu krmnou. Přestože je v ČR více jak 50 % pšenice zkrmováno, definice klíčových parametrů krmné kvality zrna je doposud velmi vágní. Důvody této skutečnosti jsou obecně známé a souvisí s druhovou, plemennou i věkovou variabilitou hospodářských zvířat a komplexností přípravy krmných směsí (PRUGAR 2008).

V případě GB Praha vedly výše uvedené faktory doposud k výběru jen poměrně malého spektra sledovaných nutričních parametrů se zaměřením na naši největší plodinou kolekci, jíž je pšenice. V současnosti jsou tak sledovány obsahy vodorozpustných i nerozpustných arabinoxylanů, dietární vlákniny a obsahu majoritního karotenoidu luteinu (viz Tab. 1).

#### 4. Perspektivní metody predikce kvality zrna u genofondu obilnin

Z hlediska strategie hodnocení genofondů obilnin lze současně využívané metody popisující kvalitu zrna rozčlenit do tří základních kategorií zahrnující genetické metody, laboratorní (referenční) analýzy a predikční metody na bázi spektrální analýzy.

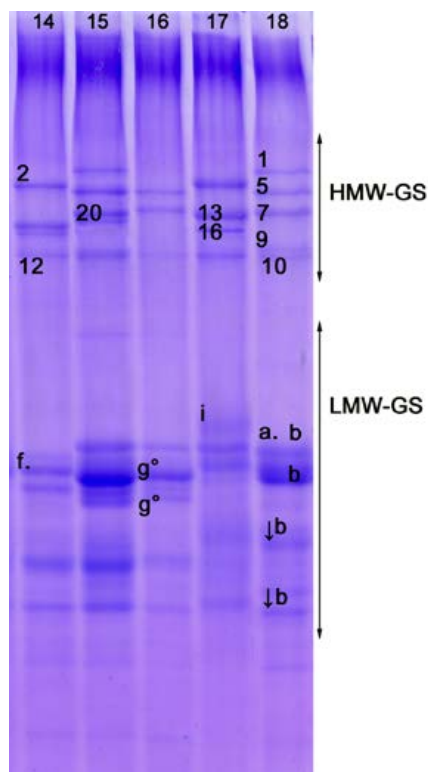
##### 4.1 Genetické metody

Genetické metody jsou principiálně založeny na přímém vztahu mezi danou vlastností zrna a specifickou genetickou skladbou. Mezi tyto metody lze zařadit v současnosti ve šlechtění široce aplikované molekulární postupy např. v podobě markery asistované selekce (Marker Assisted Selection), popřípadě v poslední době poněkud ustupující metody biochemické analýzy založené na studiu polymorfismu zásobních bílkovin zrna. Pro hodnocení genetických zdrojů poskytují hned několik výhod. První z nich je jednoznačná identifikace materiálu, což je zcela zásadní např. pro vyloučení duplicit, či chybných zařazení v uložených kolekcích. Další výhodou je i přímé hodnocení dědičných vlastností materiálu pro sledovaný znak bez dalšího působení vnějších faktorů. Současně lze genetickou informaci v podobě extrahované DNA či semenných proteinů dlouhodobě i prostorově nenáročně skladovat, což dává možnost dodatečného mapování kolekce s využitím v budoucnu vytvořených nových markerovacích systémů. Poslední velkou výhodou jsou minimální požadavky na množství vzorku a možnost vysoké míry automatizace těchto postupů, což umožňuje zhodnotit stovky materiálů v krátkém časovém úseku.

V případě řady technologických parametrů obilného (pšeničného) zrna s komplikovaným genetickým založením však zatím molekulární metody nehrají tak zásadní roli, jako je tomu

např. v případě detekcí rozličných rezistencí. V tomto směru jsou tak u pšeníc či ječmene vcelku stále preferované postupy elektroforézy zásobních bílkovin či isoenzymů (KOEUBNER a SUMMERS 2003).

Na pracovišti ve VÚRV Praha se tyto bílkovinné markery dlouhodobě využívají pro identifikaci odrůd pšenice a ozimého ječmene včetně odhadu pekařské kvality pšeničných materiálů. Kombinuje se zde především predikční schopnost tří odlišných typů zásobních bílkovin – gliadinů, vysokomolekulárních a nízkomolekulárních gluteninů (Obr. 1)



Obr. 1: Elektroforetické spektrum vysokomolekulárních (HMW-GSs) a nízkomolekulárních gluteninů (LMW-GSs) pšenice (SDS-PAGE) (zdroj: V. Dvořáček)

(BRADOVÁ 2006). Vzhledem k rozšiřování kolekcí do oblasti dalších pšeničných druhů a rostoucí kolekci ozimého i jarního tritikále, jsou v současnosti bílkovinné markery využívány i u těchto plodin. V těchto případech zatím primárně umožňují jednoznačnou identifikaci, nicméně aktuálně jsou zpracovávány postupy, jež by měly umožnit markerově odlišit materiály s rozdílnými parametry pekařské jakosti u pšenice špaldy resp. pšenice dvouzrnky.

#### 4.2 Laboratorní (referenční) analýzy

Široké spektrum laboratorních analýz doposud zůstává zcela zásadní pro komplexní mapování kvality obilného zrna. V těchto výsledcích se ovšem odráží nejen genetický potenciál odrůdy, ale rovněž i vliv prostředí, agrotechniky či jejich vzájemných interakcí. Tato skutečnost má svou výhodu, ale přináší i určité problémy. Pozitivem je možnost vyhodnotit sledovanou vlastnost v kontextu s podmínkami prostředí. Současně však variabilita povětrnostních podmínek stěžuje objektivní porovnání rozdílů sledovaných parametrů genetických zdrojů obilnin pěstovaných v odlišných ročních.

Víceletá hodnocení kolekcí genofondů řeší tento problém jen částečně a případné další statistické přístupy zohledňující specifickou proměnlivost povětrnostních podmínek nejsou doposud uspokojivě dořešeny.

#### Základní chemicko-technologické analýzy

Typickým příkladem těchto analýz je Kjeldahlova metoda, která se používá pro stanovení hrubých bílkovin, představená dánským chemikem Johanem Kjeldahlem, již v roce 1883. Princip je založen na rozkladu dusíkatých látek za přítomnosti kyseliny sírové za vzniku síranu amonného. Jeho amonná složka se poté uvolní a stanoví titračně. Současné moderní systémy na tomto principu prakticky nic nezměnily, jsou však vybaveny automatickým řízením procesu mineralizace a i následné destilace, titrace, kalkulace výsledků včetně jejich automatického ukládání (Obr. 2). Tytéž



Obr. 2: Aparatura pro Kjeldahlovu analýzu f. FOSS (zdroj: V. Dvořáček): A) mineralizační a B) destilační jednotka

principy je možno vidět i v případě stanovení dalších makrokomponent zrna (škrobu, tuku či vlákniny). V posledních dvou dekádách se rozšířily systémy stanovení N-látek tzv. přímým spalováním dle Dumasovy metody. Metoda je rychlejší, nepoužívá zdraví škodlivé chemikálie a má i lepší možnost automatizace (WILES et al. 1998).

Naopak velmi rigidní zůstává stále například hodnocení obsahu lepku, které se dlouhou dobu provádělo ručním vypíráním a následným měřením tažnosti a bobtnavosti. V roce 1971 pak byl představen dnes nejrozšířenější mechanický systém vypírání lepku, tzv. Glutomatic, který je s drobnými vylepšeními na trhu dodnes (PERTEN 2016). V poslední dekádě se pak na trhu objevil systém GlutoPeak, založený na principu rotačního viskozimetru, který je již řízen přes počítač a umožňuje graficky zachytit reologický záznam měření mouky a z těchto parametrů je i odvozováno množství lepku. Na podobném principu měření pomocí rotačního viskozimetru jsou v poslední době nabízeny např. i přístroje pro hodnocení kvality škrobu (Obr. 3).



Obr. 3: Jednotka RVA 4500 f. Perlen pro stanovení vlastností škrobu (zdroj: <https://www.perten.com>)

Posledním z mnoha dalších příkladů miniaturizace a automatizace, které zde uvedu, jsou reologické přístroje. Potřeby šlechtění spolu s vývojem výpočetní techniky docílily i u těchto principiálně stále stejně založených systémů výraznější miniaturizace a jednoduššího vyhodnocování reologických záznamů (Obr. 4). Limitace pro jejich zařazení do plošného hodnocení genetických zdrojů pšenice je však vedle relativně vysoké pořizovací ceny především v nízké měřicí produktivitě.



Obr. 4: Mikroreologický systém Microdough f. Perlen s potřebou cca 4g vzorku (zdroj: <https://www.perten.com>)

Závěrem lze zmínit jednu z novějších metod, tzv. centrifugační vaznost mouky - SRC test (solvent retention capacity test) založený na principu měření specifické vaznosti mouky v různých rozpouštědlech a postihující řadu vlastností zrna (vaznost mouky, kvalitu zásobních bílkovin, poškození škrobu a vlastnosti pentozanů) (GUZMÁN et al. 2015). Tato přes 20 let známá metoda prošla v poslední době významnou instrumentální modernizací a automatizací. Výsledkem je plně automatizované zařízení SRC-CHOPIN (Obr. 5), kde obsluha v podstatě jen navažuje vzorky a připravuje roztoky rozpouštědel.



Obr. 5. Plně automatizovaná jednotka SRC-Chopin f. CHOPIN pro hodnocení SRC-testu (zdroj: <https://chopin.fr/en/home.html>)

### Laboratorní metody v oblasti nutriční kvality

Ve srovnání s přístupy v oblasti predikce technologické jakosti zaznamenaly biochemické analýzy v posledních 30 letech bouřlivý rozvoj. Tyto analýzy byly založeny především na chromatografických principech v kombinaci s nově vyvinutými citlivými UV-VIS nebo fluorescen-



Obr. 6: Vysokorozlišovací tandemový hmotnostní spektrometr Q Exactive s UHPLC chromatografem od f. Thermo-Fisher Scientific (zdroj: V. Dvořáček)

čními detektory a dostatečně výkonnou výpočetní technikou. Dalším významným milníkem byl dynamický vývoj o několik řádů citlivějších analytických metod na principu hmotnostní spektrometrie (Obr. 6). Na základě těchto metod se v 90. letech začaly rozvíjet i celé vědecké disciplíny jako například proteomika či metabolomika.

Z pohledu mapování genetických zdrojů vnímáme v současné době jako nutričně významné složky obilného zrna vlákninu a některé její významné komponenty (např. beta glukany či arabinoxylany), řadu látek s antioxidační aktivitou (polyfenoly, karotenoidy) a výskyt některých významných minerálních látek (např. Zn či Fe). Jako velmi perspektivní se jeví studium potenciálních alergických reakcí obilovin resp. složek jejich bílkovin, jako je např. celiakie či řada neceliakálních alergicit (mlynářské astma, kopřivky, zažívací potíže apod.) (FARDET 2010).

Pro detekci řady těchto látek sehrála významnou roli vysokotlaká kapalinová chromatografie, jež se od 80. let minulého století postupně rozšiřovala do většiny biochemických laboratoří společně s rozvojem výpočetní techniky. Na tyto analytické metody pak na konci devadesátých let navázala výše uvedená hmotnostní spektrometrie s řadou modelových systémů odlišujících se způsobem ionizace separovaných látek a dále typem hmotnostního analyzátoru.

Přestože výše uvedené systémy jsou vysoce výkonné, pořizovací cena, provozní náklady i nároky na kvalifikaci obsluhy jsou v případě hmotnostní spektrometrie doposud mimo běžný rámec rutinního nasazení pro monitoring genetických zdrojů v GB Praha.

Určitou alternativou pro možné plošnější mapování některých látek s vyšším obsahem

(např. obsah dietární vlákniny, arabinoxylanů, beta glukanu či amylosy) jsou v současnosti komerčně dostupné enzymatické kity s možností UV-VIS spektrometrické detekce.

### 4.3 Predikční metody na bázi spektrální analýzy

Metody spektrální analýzy jsou obecně založeny na interakci hmoty a energie elektromagnetického záření. Z celé řady metod využívaných k charakteristice složení semen obilnin, kam patří například emisní spektrometrie, nukleární magnetická rezonance či výše zmíněná hmotnostní spektrometrie, se na konci 90. let stala naprosto klíčovou infračervená spektrometrie patřící do skupiny tzv. molekulové spektroskopie. Velmi zjednodušeně lze princip metody popsat jako specifickou interakci (absorpci) infračerveného záření (o vlnočtech  $4000\text{ cm}^{-1} - 0,5\text{ mm}^{-1}$ ) s jednotlivými komponentami studované vzorku umožňující jak jeho kvalitativní, tak kvantitativní rozbor. V zemědělské praxi (výkupy, šlechtění, mapování genofondů) se uplatnily výhradně systémy v rozsahu v tzv. blízké infračervené oblasti (NIR,  $4000\text{ cm}^{-1} - 12000\text{ cm}^{-1}$ ) umožňující snadnou kvantifikaci sledovaných látek. Naopak systémy využívající střední infračervenou oblast (MIR,  $200 - 4000\text{ cm}^{-1}$ ) jsou více využívány ke specifickým strukturním (kvalitativním) analýzám. Jejich aplikace v rámci hodnocení složení obilnin resp. mapování kolekcí genetických zdrojů je však zatím zcela zanedbatelná.

Nesporná výhoda NIR spektrometrie především souvisí s jednoduchostí a vysokou rychlostí měření, minimálními nároky na přípravu vzorku, vysokou mezilaboratorní spolehlivostí i naprostou eliminací jakýchkoliv chemikálií, které jsou běžně s laboratorními analýzami spojeny. Na druhé straně, zcela klíčový je pro přesnost této metody vývoj a kvalita kalibrač-

ních modelů založených na precizním měření desítek či lépe stovek kalibračních vzorků pomocí referenčních laboratorních metod. První zemědělská aplikace systému NIRS byla představena již na konci 60. let minulého století. Od té doby našly NIR spektrometry široké uplatnění např. ve farmaceutickém či potravinářském průmyslu, především jako základní kontrolní jednotky kvality výroby (Obr. 7). U obilnin jsou jimi především měřeny obsahy organických makrokomponent (např. vlhkost, dusíkaté látky, škrob, tuk, vláknina). Možnost predikce komponentů s nízkou koncentrací pod jedno procento, či dokonce detekce látek



Obr. 7: Dispersní NIR spektrometr NIRS 6500 f. FOSS (zdroj: V. Dvořáček)



**Tabulka I: Charakteristiky vyvinutých NIR predikčních modelů pro zrno pšenice**

Parametry	Počet vzorků	Predikční rozsah	R	SEC	R <sub>cv</sub>	SEC <sub>V</sub>
Sušina (%)	282	81,4 – 93,2	0,953	0,673	0,948	0,708
Hrubé bílkoviny (%)	343	7,1 – 21,5	0,993	0,385	0,988	0,507
Škrob (%)	721	59,0 – 70,1	0,938	0,606	0,840	0,953
Dietní vláknina (%)	92	7,4 – 15,5	0,965	0,416	0,759	1,040
Mokřý lepek (%)	472	15,1 – 49,4	0,969	1,810	0,953	2,210
Tvrdost zrna (%)	195	2,3 – 22,6	0,992	0,486	0,944	1,250
Celkové arabinoxylany (%)	108	2,3 – 5,5	0,973	0,163	0,847	0,378
Lutein (ppm)	119	0,9 – 11,3	0,938	0,589	0,890	0,776

**R:** korelační koeficient kalibrace, **R<sub>cv</sub>:** korelační koeficient křížové validace, **SEC:** standardní chyba kalibrace, **SEC<sub>V</sub>:** standardní chyba křížové validace

s mikrogramovým množstvím je zatím možná jen ve specifických případech. V nich však nedetekujeme přímo danou komponentu, ale efekt, který její vyšší či nižší koncentrace může doprovázet (např. specifická změna či poškození makrosložek, odlišné zbarvení zrna apod.) (WILLIAMS a NORRIS 2001). Přehled vyvinutých kalibračních modelů na našem pracovišti pak udává Tabulka I.

Pro významné zvýšení detekčních limitů IR spektrometrie byly v poslední době vyvinuty zcela nové techniky založené na tzv. povrchově zesílené Ramanově spektroskopii (Surface-Enhanced Raman Spectroscopy – SERS). Velmi zjednodušeně jde o citlivou techniku, která využívá řádové zvýšení Ramanova rozptylu (studovaného spektrometrického signálu) molekuly v IČ spektrální oblasti adsorbované na zdrsněném povrchu nanosených částic vzácných kovů, nejčastěji stříbra či zlata (Obr. 8). V důsledku tohoto zesílení, které dosud není zcela jednoznačně vysvětleno, je možné docílit nesmírně vysoké rozlišovací



Obr. 8: Speciálně upravené vzorkové terčiky s nanovrstvou vzácných kovů pro analýzu SERS pomocí Ramanovy spektrometrie od f. ThermoFisher Scientific (zdroj: <http://www.nicoletcz.cz/slers>)

schopnosti. V případě některých molekul obsahujících uhlík lze identifikovat řádově i jednotlivé molekuly. Využití povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie lze tak nalézt v lékařství a farmakologii např. k identifikaci léčiv a drog, k určení jejich kontaminace a interakce s jinými látkami. Obdobné sledování lze využít v rozličných aplikacích v rámci studia znečištění životního prostředí a kvality potravin (CIALLA *et al.* 2012). Metoda se tak do budoucna může stát výrazně levnější alternativou citlivých referenčních metod na bázi hmotnostní spektrometrie.

V oblasti elementárního prvkového složení se na trhu objevily tzv. emisní rentgenové spektrometry. Jsou založeny na principu rentgenem vyvolávané fluorescence, jež je prvkově jednoznačně specifická. Metoda nevyžaduje žádnou nebo jen velice malou přípravu vzorků, je vhodná pro pevné, kapalné a sypké typy vzorků a je schopná měřit široký rozsah prvků s citlivostí o několika ppm (BECKHOFF *et al.* 2007). Jedná se tak o velmi zajímavou alter-

nativu k laboratornímu systému hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS).

## 5. Závěr

Vzhledem k permanentnímu rozvoji výzkumu v oblasti technologické a nutriční kvality obilnin lze předpokládat, že porostou nároky i na komplexní hodnocení jejich genetikých zdrojů. Pro úspěšné dosažení těchto požadavků tak bude nutné počítat s celkovým nárůstem nákladů na analýzy i s dalšími jednorázovějšími investicemi v oblasti přístrojové techniky a oblasti získání nového, či proškolení stávajícího personálu. Návratnost těchto investic nebude jistě okamžitá. Komplexní mapování kvality obilnin by však mělo v kontextu s ostatními sledovanými vlastnostmi umožnit přesněji detekovat jedinečné materiály resp. jejich geny využitelné v dalším šlechtění a vývoji nových odrůd reagující např. na měnící se agroklimatické podmínky i na požadavky spotřebitelů.

## Seznam použité literatury

BECKHOFF B. et al. (ed.) (2007): Handbook of practical X-ray fluorescence analysis. Springer Science & Business Media, 863 pp. ISBN 13-978-3-540-28603-5.

BRADOVÁ J. (2006): Optimalizovaná metodika SDS-PAGE pro analýzu LMW-podjednotek gluteninů pšenice. Výzkumný ústav rostlinné výroby.

CIALLA D., MÄRZ A., BÖHME R., THEIL F., WEBER K., SCHMITT M., POPP J. (2012): Surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS): progress and trends. Analytical and bioanalytical chemistry, 403(1): 27-54.

DICKIN E., STEELE K., FROST G., EDWARDS-JONES G., WRIGHT D. (2011): Effect of genotype, environment and agronomic management on  $\beta$ -glucan concentration of naked barley grain intended for health food use. Journal of Cereal Science, 54(1): 44-52.

DVOŘÁČEK V., BRADOVÁ J., PROHASKOVÁ A., ŠTOČKOVÁ L., PAPOUŠKOVÁ L. (2014): Perspektivní metody pro hodnocení kvality genetických zdrojů pšenice seté v Genové bance Praha. In: Papoušková L. (Ed.). Genetické zdroje rostlin v ČR po 20 letech existence Národního programu, VÚRV, v.v.i. Praha. 20 – 29.

FARDET A. (2010): New hypotheses for the health-protective mechanisms of whole-grain cereals: what is beyond fibre?. Nutrition research reviews, 23(1): 65-134.

GUZMÁN C., POSADAS-ROMANO G., HERNÁNDEZ-ESPINOSA N., MORALES-DORANTES A., PEÑA R.J. (2015): A new standard water absorption criteria based on solvent retention capacity (SRC) to determine dough mixing properties, viscoelasticity, and bread-making quality. Journal of Cereal Science, 66: 59-65.

KOEBNER R.M., SUMMERS R.W. (2003): 21st century wheat breeding: plot selection or plate detection? TRENDS in Biotechnology, 21(2): 59-63.

PERTEN (2016): [www.perten.com/Global/Brochures/61110.pdf](http://www.perten.com/Global/Brochures/61110.pdf). [staženo 10. 10. 2018]

PRUGAR J. (2008): Kvalita rostlinných produktů na prahu 3. tisíciletí. I. vyd. Praha: Výzkumný ústav pivo-  
varský a sladařský, 327 pp. ISBN 978-808-6576-282.

TROJAN V., MUSILOVÁ M., VYHNÁNEK T., HAVEL L. (2010): The genetic variability of coloured grain wheat collection. In: MendelNet Proceedings of International PhD Students Conference. 845-851.

WILES P. G., GRAY I. K., KISSLING R. C. (1998): Routine analysis of proteins by Kjeldahl and Dumas methods: Review and interlaboratory study using dairy products. Journal of AOAC International, 81(3): 620-632.

WILLIAMS P., NORRIS K. (eds.) (2001): Near-infrared technology in the agricultural and food industries. 2. Vydání. American Association of Cereal Chemists, Inc. 296 pp. ISBN 1-891127-24-1.

# Produkce zelené hmoty ozimého tritikale a hodnocení výtěžnosti bioplynu a metanu u vybraných genetických zdrojů

Nesvadba<sup>1</sup> Z., Ust'ak<sup>2</sup> S., Hermuth<sup>1</sup> J.

<sup>1</sup>Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Genová banka, Praha – Ruzyně

<sup>2</sup>Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., pracoviště Chomutov

nesvadba@vurv.cz

V současné době existuje v oblasti energetiky celé Evropy a také České republiky zřetelný odklon od tradičních fosilních paliv a naopak prosazování energie vyrobené z obnovitelných zdrojů. Důvodem jsou mimo jiné klesající zásoby fosilních paliv, snaha o energetickou soběstačnost jednotlivých zemí, zvyšování energetické efektivity a snižování emisí znečišťujících látek. Členské státy Evropské unie se zavázaly k zajištění celkové spotřeby energie z obnovitelných zdrojů ve výši 20 % v roce 2020 a 32 % v roce 2030. K naplnění těchto cílů je třeba hledat dosud nevyužité zdroje, které jsou snadno dostupné a stabilní. V současné době se jedná především o energie z biomasy. Jednou z možností energetického využití biomasy je anaerobní fermentace s cílem výroby bioplynu a biometanu. Z hlediska ekonomiky provozu je cíleně pěstovaná biomasa nejvýhodnější varianta, protože pro tyto stanice je garantována nejvyšší výkupní cena elektrické energie a zároveň se díky kvalitě vstupních materiálů jedná o nejméně problémový provoz (GERŠL *et al.* 2015). Řada zemí světa v současné době rozšiřuje sektor energie získávané z obnovitelných zdrojů, což vede ke zvyšování pěstebních ploch plodin využívaných na produkci biomasy (LOSERT *et al.* 2016).

V roce 2016 bylo v České republice v provozu celkem 404 bioplynových stanic, 108 komu-

nálních a průmyslových čistíren odpadních vod s produkcí kalového plynu a 68 výroben s produkcí skládkového plynu. Celkový instalovaný výkon těchto výroben dosáhl v roce 2016 úrovně 368,6 MW, přičemž bioplynové stanice tvořily 87 % tohoto výkonu, což odpovídá 320,1 MW. V roce 2016 bylo z bioplynu vyrobeno celkem 2 589,0 GWh elektrické energie a 4 894,4 TJ tepelné energie. Využití bioplynu při výrobě elektřiny a tepla také významně přispívá k podílu OZE na hrubé konečné spotřebě. V roce 2016 odpovídal příspěvek bioplynových stanic k celkovému podílu na hodnotě 0,80 % v příspěvku v sektoru elektroenergetiky a 0,68 % v případě sektoru vytápění a chlazení, celkem se tedy jednalo o příspěvek na úrovni 1,48 % (Anonymous 2018).

Podpora bioplynu jako OZE je upravena zákonem č. 165/2012 Sb. o podporovaných zdrojích energie a o změně některých zákonů, v platném znění. Ze strategických dokumentů se k bioplynovým stanicím (BPS) vztahují Národní akční plán pro obnovitelné zdroje, Akční plán pro biomasu v ČR na období 2012-2020, Strategická výzkumná agenda a Akční implementační plán (MATĚJKA *et al.* 2018).

Bioplyn v bioplynových stanicích je vyráběn prostřednictvím tzv. anaerobní fermentace, která zahrnuje komplex biochemických pro-

**Tabulka 1: Počet bioplynových stanic a čistíren odpadních vod v letech 2010-2016**

	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016
Komunální ČOV	97	98	94	97	88	88	94
Průmyslové ČOV	12	14	14	14	15	15	15
Bioplynové stanice	115	186	317	388	404	403	404
Skládkový plyn	63	62	61	65	67	68	68
<b>Celkem</b>	<b>287</b>	<b>360</b>	<b>486</b>	<b>564</b>	<b>574</b>	<b>574</b>	<b>581</b>

cesů, při kterých dochází k rozkladu organické hmoty bez přítomnosti vzdušného kyslíku. V průběhu 4 základních fází – hydrolyzy, acidogeneze, acetogeneze a metanogeneze mikroorganismy přítomné v tomto procesu vytváří rozkladem organické hmoty meziprodukty, které jsou pak spotřebovávány jinými mikroorganismy. Absence mikroorganismů tvořících meziprodukty pro průběh následující fáze může mít negativní dopad na celý průběh anaerobní fermentace. V průběhu hydrolyzy dochází především k hydrolytickému štěpení polysacharidů, proteinů a tuků. Produktem této fáze jsou především aminokyseliny, mastné kyseliny a cukry. Během fáze acidogeneze vzniká majoritně kyselina máselná, propionová, mléčná a kyselina octová. Dále vzniká etanol, oxid uhličitý a vodík. V průběhu acetogeneze jsou organické kyseliny a etanol přeměňovány na kyselinu octovou, oxid uhličitý a vodík. Kyselina octová je základem pro poslední fázi metanogeneze, ve které je přeměněna na oxid uhličitý, dusík, vodík, sirovodík a především metan. V této fázi jsou dominantní archea bakterie. Produktem anaerobní fermentace je bioplyn, který obsahuje především metan (50-75 % obj.), oxid uhličitý (25-45 % obj.). Dalšími produkty jsou fermentační zbytek, kyslík (< 2 % obj.), dusík (< 2 % obj.), vodík (< 1 % obj.), sirovodík (20-20000 ppm), vodní pára (2-7 % obj.) a další. Spalitelnou složkou je především metan. Jeho koncentrace je podstatná pro energetické využití a měla by se pohybovat od 50 % objemových (GERŠL *et al.* 2015).

Biomasa získaná ze zemědělských plodin představuje významný zdroj obnovitelné energie. V zemích, kde se hojně pěstují plodiny na produkci bioplynu, je dominantní plodinou silážní kukuřice (WANASSEK *et al.* 2017). LOSERT *et al.* (2016) uvádějí, že tritikale produkuje mnohem více biomasy než pšenice, ječmen nebo žito, na druhou stranu mnohem méně než kukuřice a čirok. V produkčních systémech založených na využití kukuřice nebo čiroku může pěstování ozimého tritikale přinést výhodu v časovém rozložení pracovních špiček (setí a sklizeň), využití zimní a časné jarní vláhy a umožní diverzifikovat osevni postup. Siláž z tritikale je navíc k dispozici o přibližně dva měsíce dříve než kukuřičná siláž (GOWDA *et al.* 2011). CANTALE *et al.* (2016) uvádějí, že podle IEA (International Energy Agency) se výnos bioplynu u tritikale pohybuje v rozpětí 337 – 555 m<sup>3</sup>/tunu.

V mezidobí 2006 – 2016 došlo v Evropě ke zvýšení sklizňových ploch tritikale o 30 %, z 2.856 tisíc ha na 3.714 tisíc hektarů, což jasně hovoří o důležitosti této plodiny. Naproti tomu v České republice docházelo ve stejném období k dalšímu poklesu ploch o téměř 4 %, z původních 41 tisíc ha na 39 tisíc ha. Největší sklizňové plochy byly v roce 2016 zaznamenány v Polsku (1.404 tis. ha), v Bělorusku (500 tis. ha) a v Německu (396 tis. ha) (FAOSTAT 2018). A právě ve využití tritikale na biomasu je možno spatřovat potenciál této plodiny a možnost opětovného navýšení pěstebních ploch v ČR v budoucích letech.

Výhodou tritikale je, že dosahuje velmi dobrých výnosů v méně příznivých půdních a klimatických podmínkách, kde se obvykle pěstuje. Jeho hospodářský význam narůstá díky výrazným šlechtitelským úspěchům, které vedly k vyšlechtění odrůd s podstatně kratším stébem a větším podílem zrna na nadzemní biomase. Významné jsou některé pěstitelsky výhodné vlastnosti pocházející od rodičů, především však nižší náročnost tritikale na pěstební podmínky a v průměru lepší zdravotní stav oproti pšenici, zděděná do určité míry po ozimém žitu. V úrodnějších a klimaticky příznivějších oblastech lze tritikale zařazovat i po obilnině. Je však důležité zohlednit případné riziko výskytu plísně sněžné. Tritikale se obvykle dokáže lépe vyrovnávat s některými biotickými a abiotickými stresey než pšenice. Jeho schopnost poskytovat dobré výnosy na písčitých půdách s častým výskytem hliníkových iontů, vyplavovaných kyselými dešti, vyvolala jeho velkou oblibu u pěstitelů v severních oblastech Polska, kde dosahuje lepších výsledků než pšenice. Významná je schopnost některých odrůd odolávat suchu. Tritikale má mohutný kořenový systém a proto dokáže využít živiny i z větších hloubek a z méně přístupných forem. K negativním vlastnostem patří vyšší riziko porůstání a v některých případech i vyšší náchylnost k poléhání. Výhodnou vlastností tritikale je jeho dobrá krmná hodnota, daná příznivějším složením esenciálních aminokyselin v zrna než u pšenice. Tritikale lze využít do krmných směsí pro výkrm prasat, drůbeže, mladého skotu, případně i jako zelené krmení (MARTINEK 2017).

V minulosti bylo cílem šlechtění tritikale především zkrátit délku stébla a zlepšit odolnost poléhání. V současné době je prioritní výnos zrna a výnos zelené hmoty. Většina současných odrůd, které mají vysoký výnos zrna, má tendenci k nízké produkci biomasy a vysoce výnosné odrůdy na zelenou hmotu mají zase nízký

výnos zrna. Současným trendem ve šlechtění tritikale je proto vytvořit odrůdy s vysokým výnosem zrna a současně vysokým výnosem zelené hmoty tak, aby se zvýšila komerční potřeba po této plodině (GOWDA *et al.* 2011).

V rámci studie bylo hodnoceno 20 genotypů ozimého tritikale, které byly získány z kolekce National Small Grains Collection (NSGC, USDA-ARS, Aberdeen, Idaho, USA). Jak uvádějí Mergoum *et al.* (2009), tritikale bylo v USA, odkud většina zkoušených genotypů pochází, pěstováno na ploše 405 tisíc ha a většina produkce byla použita ke krmným účelům, buď jako jadrné krmivo nebo na zeleno. Jako kontrolní odrůda byla použita odrůda Balu PZO, která je v Německu využívána na produkci biomasy a kromě toho je mimo jiné také kontrolní odrůdou ve státních odrůdových zkouškách ozimého tritikale na zelenou hmotu v Německu (Bundessortenamt). Jako standardní odrůda zrnového typu byla použita německá odrůda Agrano. Studovaný soubor byl pěstován v letech 2015-2017 v polních podmínkách lokality Praha – Ruzyně na parcelách o velikosti 4,5 m<sup>2</sup> v jednom opakování standardními pěstebními postupy v režimu s nízkým uplatněním intenzifikačních zásahů, po předplodině hrachu polního. Výsevek byl 3,5 milionu klíčivých semen na hektar. Pokusná lokalita je zařazena do výrobní oblasti řepařské, subtypu řepařsko-pšeničného, s půdním typem degradovaná černozem. Oblast Praha – Ruzyně (340 m n. m.) má průměrný roční úhrn srážek 526 mm. Dlouhodobá průměrná roční teplota vzduchu je 7,9 °C.

V průběhu vegetace byla prováděna hodnocení morfologických, biologických a hospodářských znaků podle platného Klasifikátoru pro genus *xTriticale* Müntzing (RYCHTÁŘIK *et al.* 1991). Pro potřeby laboratorní biozplynovací zkoušky byla v době mléčné-voskové zralosti provedena sklizeň nadzemní hmoty



Obr. 1: Kolekce genotypů ozimého tritikale z National Small Grains Collection, USDA-ARS, Aberdeen, Idaho (USA) vyšetřené ve VÚRV Praha – Ruzyně

akumulátorovými zahradními nůžkami (minimálně 300g mokré hmoty), aby bylo zajištěno dostačující množství pro provedení testu. Zelená hmota byla následně sešrotována na stacionární řezačce, vložena do PET uzavíratelných sáčků a zamražena v chladicím boxu při  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Vzhledem k malému rozsahu plochy pokusných parcel nebyl zjišťován výnos zelené hmoty z jednotky plochy. Vzorky zmrazené biomasy byly následně předány na pracoviště VÚRV, v.v.i. v Chomutově, kde byla provedena laboratorní bioplynovací zkouška.

Laboratorní experimenty bioplynování byly provedeny na sestavě se 48 třílitrovými skleněnými anaerobními fermentory (reaktory), zahřátými na mezofilní teplotu  $37\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ , míchanými po dobu 15 minut každé dvě hodiny. Testování potenciální produkce bioplynu a metanu bylo provedeno v souladu s metodikou VDI 4630 (ANONYMOUS 2006). Poměr vstupu organické sušiny vzorku k očkovací látce byl cca 3:10. Očkovací látkou byl digestát z provozní bioplynové stanice, která zpracovává zvěřecí exkrementy, kukuřičnou siláž a senáž píce v poměru zhruba 40:40:20. Údaje z měření experimentální produkce bioplynu byly zaznamenávány většinou jednou denně, v době nejvyšší intenzity produkce bioplynu i několikrát denně. Kvalitativní analýza bioplynu byla provedena na specializovaném bioplynovém analyzátoru Biogas Check Analyser renomované-

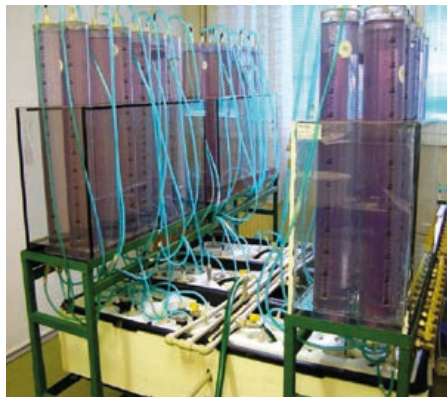
ho výrobce Geotechnical Instruments (GBR), přesnost měření byla kontrolována pomocí plynového chromatografu s detektorem TCD. Celková doba experimentální fermentace byla jednotně stanovena na 49 dnů (7 týdnů). To je dostatečný čas pro zajištění intenzivní fáze produkce bioplynu u všech testovaných substrátů. V mnoha případech se výroba bioplynu zcela nezastavila ani po uplynutí stanovené doby, což je spojeno s postupnou fermentací obtížně odbouratelných složek biomasy, jako jsou celulózy a hemicelulózy. Intenzivní etapa výroby bioplynu trvala obvykle 2 - 4 týdny po uplynutí fáze prodlevy (lag-fáze), která obvykle probíhala 1 až 5 dnů.

Průměrné výsledky bioplynovací zkoušky z dvouletých experimentů uvádí Tabulka 2. Procentický obsah sušiny se ve studovaném souboru pohyboval od hodnoty 31,47% (M86-6089) až do 38,61% (NE422GT). Průměrná koncentrace metanu u testovaných vzorků činila 52,9%. Nejvyšší výtěžnost bioplynu byla zaznamenána u linie M86-6051 a to 670 l/kg sušiny. Linie NE426GT se jevila z hlediska celkové výtěžnosti bioplynu jako nejméně produktivní (445 l/kg suš.). Nejvýznamnější parametr bioplynovací zkoušky – celková výtěžnost metanu, byla nejvyšší u odrůdy Pika (368 l/kg sušiny) a naopak nejnižší hodnota byla naměřena u linie NE426GT (236 l/kg sušiny).

Tabulka 2: Výsledky bioplynovacích zkoušky na pracovišti VÚRV, v.v.i. Chomutov (2016-2017)

Odrůda / linie	ECN	Stát pův.	Sušina vzorku (%)		Celk. výtěž. bioplynu (l/kg suš.)		Celk. výtěž. CH <sub>4</sub> (l/kg suš.)		Prům. konc. CH <sub>4</sub> (%)	
			Průměr ± s <sub>x</sub>	V <sub>k</sub> (%)	Průměr ± s <sub>x</sub>	V <sub>k</sub> (%)	Průměr ± s <sub>x</sub>	V <sub>k</sub> (%)		Průměr ± s <sub>x</sub>
OAC Wintri	01C0900115	CAN	35,53±0,27	0,8	544±26	4,8	288±12	4,3	52,9±0,1	0,1
M86-6027	01C0930282	USA	34,04±0,11	0,3	509±30	6,0	269±15	5,7	52,4±0,6	1,1
M86-6037	01C0930286	USA	32,77±1,57	4,8	517±34	6,6	271±18	6,5	52,5±0,1	0,2
Agrano (kontrola)	01C0930149	DEU	36,62±1,94	5,3	589±79	13,5	307±38	12,4	52,7±0,1	0,2
M86-6051	01C0930290	USA	35,02±0,56	1,6	670±24	3,6	352±18	5,0	52,6±0,6	1,2
M86-6052	01C0930291	USA	35,73±1,58	4,4	630±95	15,1	339±56	16,6	53,5±1,0	1,9
M86-6054	01C0930292	USA	33,80±1,83	5,4	629±54	8,6	338±31	9,1	53,4±0,5	0,9
M86-6064	01C0930295	USA	36,90±0,54	1,5	466±14	3,1	247±13	5,4	53,5±0,7	1,4
M86-6081	01C0930301	USA	37,58±2,00	5,3	453±43	9,5	239±18	7,3	53,0±1,1	2,1
M86-6089	01C0930302	USA	31,47±2,54	8,1	537±24	4,4	284±9	3,3	52,8±0,6	1,2
M86-6116	01C0930304	USA	34,75±0,57	1,6	505±92	18,2	265±44	16,8	52,6±0,7	1,3
M86-6171	01C0930306	USA	33,98±1,55	4,5	513±82	16,0	268±44	16,4	52,2±0,2	0,4
M86-6174	01C0930307	USA	35,23±2,60	7,4	549±59	10,8	288±31	10,9	52,4±0,1	0,3
M86-150	01C0930279	USA	32,84±0,59	1,8	528±38	7,2	284±21	7,3	53,2±0,5	1,0
Pilka	01C0930310	CAN	34,33±1,61	4,7	610±125	20,5	368±31	8,3	53,3±0,9	1,8
Breaker	01C0930270	USA	33,13±0,73	2,2	523±47	9,1	277±23	8,5	52,9±0,2	0,4
UCRTCL3-2001	01C0930312	USA	36,58±0,00	0,0	566±47	8,3	301±23	7,6	53,2±0,4	0,8
NE422T	01C0930308	USA	38,61±3,25	8,4	504±48	9,5	270±24	8,7	53,4±0,7	1,3
NE426GT	01C0930309	USA	35,81±1,13	3,2	445±88	19,8	236±45	19,1	52,9±0,6	1,1
KT941256h003	01C0930273	USA	34,34±0,12	0,3	633±17	2,7	329±11	3,4	52,2±0,3	0,5
KT941312SA018	01C0930276	USA	33,63±3,94	11,7	609±14	2,4	327±10	3,0	53,3±0,7	1,3
Balu PZO (kontrola)	01C0930260	DEU	33,47±2,60	7,8	543±114	21,0	341±12	3,4	53,0±0,6	1,1
Všechny položky			34,82±1,34	4,1	549±10	10,0	295±25	8,6	52,9±0,5	1,0





Obr. 2: Laboratorní 48-hnízdní zařízení pro sledování vývoje bioplynu s automatickým časovaným promícháváním

Hodnocení položek kolekce genetických zdrojů ozimého tritikale v rámci Národního programu konzervace a využívání genetických zdrojů rostlin a agrobiodiverzity umožňuje identifikovat významné vlastnosti u jednotlivých genotypů. Ty pak mohou být na základě zjištěných vlastností využity v rámci šlechtitelských programů pro tvorbu nových odrůd nebo v dalším výzkumu.

Na základě tříletých výsledků polního hodnocení, dvouletých výsledků bioplynovací zkoušky a jednoletých výsledků mezistaničních předzkoušek na 3 lokalitách s hodnocením výnosu zelené hmoty byly vyselektovány 2 šlechtitelské linie. Po namnožení dostatečného množství osiva bude u perspektivnějšího materiálu podána žádost o registraci odrůdy ozimého tritikale na biomasu v rámci státních odrůdových zkoušek ÚKZÚZ. Potenciál využití těchto genotypů je pro ekologické země-



Obr. 3: Měřicí souprava pro analýzu bioplynu

dělství a také v rámci systému „dry farming“ pro udržitelné hospodaření bez závlah v oblastech s častým výskytem sucha. Předběžný zájem o tento materiál již projevila firma SEED SERVICE, s.r.o., která se zabývá smluvním množením certifikovaného osiva trav, jetelevin a jiných kulturních plodin a většinu své produkce exportuje do zahraničí.

#### Dedikace:

Príspevek vznikl v rámci řešení projektu "Národní program konzervace a využívání genetických zdrojů rostlin a agrobiodiverzity" č. 51834/2017-MZE-17253/6.2.14 a institucionálního projektu MZe RO0418.

## Seznam použité literatury

- ANONYMOUS (2018): Scénáře rozvoje podporovaných zdrojů energie do roku 2030. Ministerstvo průmyslu a obchodu. [nepublikováno].
- ANONYMOUS (2006): Metodika VDI 4630.
- CANTALE C., PETRAZZUOLO F., CORRENTI A., FARNETI A., FELICI F., LATINI A., GALEFFI P. (2016): Triticale for bioenergy production. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, 8: 609-616.
- FAOSTAT database (2018): <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>.
- GERŠL M., MAREČEK J., ŠOTNAR M., KOUTNÝ T., KUDĚLKA J., ŠOFROVÁ J. (2015): Možnosti využití rostlin z fyto-sanitačních postupů pro produkci bioplynu v bioplynových stanicích. Mendelova univerzita, Brno: 34 s.
- GOWDA M., HAHN V., REIF J.C., LONGIN F.H., ALHEIT K., MAURER H.P. (2011): Potential for simultaneous improvement of grain and biomass yield in Central European winter triticale germplasm. *Fiedl Crop Research*, 121:153-157.
- LOSERT D., MAURER H.P., WEISMANN S., WÜRSCHUM T. (2016): Hybrid breeding for biomass yield in winter triticale: I. Hybrid performance, trait correlations and heterosis. *Plant Breeding*, 135: 560-566.
- MARTINEK P. (2017): Vznik tritikale, jeho význam a hybridizace pšenice s jinými rody. *Obilnářské listy*, XXV. Ročník, 2: 44-48.
- MATĚJKA J., NOBILIS L., PACEK L. (2018): Má bioplyn v budoucnu šanci? *Úroda* 2: 27-30.
- MERGOU M., SINGH P.K., PEÑA R.J., LOZANO-DEL RIO A.J., COOPER K.V., SALMON D.F., GOMEZ MACPHERSON H. (2009): Triticale: a „new“ crop with old challenges, in „cereals“. In: CARENA M.J. (Ed.) Springer: 267-287.
- RYCHTÁRIK J., MOGILEVA V.I., BENEŠ F., SEHNALOVÁ J., BAREŠ I. (1991): Klasifikátor genus *xTriticale* Müntzing. *Genové zdroje* č. 52, Výzkumný ústav rostlinné výroby Praha – Ruzyně, 33 s.
- WANASSEK L., ORTNER M., AMON B., AMON T. (2017): Sorghum, a sustainable feedstock for biogas production? Impact of climate, variety and harvesting time on maturity and biomass yield. *Biomass and Bioenergy*, 106: 137-145.

# Moderní technologie hodnocení kvalitativních parametrů oleje a jejich využití

Rychlá A., Endlová L.,

OSEVA PRO s.r.o., odštěpný závod Výzkumný ústav olejnin Opava

rychla@oseva.cz

Rostlinná semena obsahují ve svých strukturách zásoby oleje, které slouží jako pohotový energetický zdroj v důležitém období klíčení a vzházení. Celkové množství oleje v semeni je ale druhově specifické. V průběhu historie si člověk vyčlenil skupinu zemědělských plodin, které mají toto množství významněji, lze je ze semen snáze a efektivněji získat a především se dají využít pro přímou lidskou výživu nebo pro jiné účely. Kolekce olejních plodin Národního programu (NP) uchovává a hodnotí genové zdroje (GZ) majoritních i minoritních olejních plodin. Nejvýznamnější, s ohledem na využití oleje pro lidskou výživu, je kolekce brukve řepky olejky a to ve formě ozimé a jarní. Pro přímou lidskou výživu je dále využíván mák setý, hořčice bílá a v menší míře i hořčice sareptská. Mezi minoritní kolekce jsou zařazeny GZ řepice ozimé a jarní, hořčice černé, lničky seté, ředkve olejné, katránů habešského a rockety seté. Tyto olejny jsou využívány ve světě pro produkci oleje spíše okrajově a jedná se o olej se specifickými vlastnostmi s využitím např. pro technické účely.



Obr. 1: Hořčice bílá



Obr. 2: Lnička setá



Obr. 3: Řepka ozimá

Pro potencionálního uživatele je velmi důležité znát nejen celkový obsah oleje v semenech, ale především jeho kvalitativní parametry. Rostlinné oleje patří mezi glyceridy, což jsou estery mastných kyselin s trojsovitým alkoholem glycerolem (triacylglyceroly). Na glycerol jsou navázány různé mastné kyseliny (MK). Liší se nejen délkou řetězce, ale i přítomností či absencí dvojných vazeb, které rozhodující měrou určují vlastnosti konkrétního oleje. Například čím více dvojných vazeb struktura MK obsahuje, tím je olej tekutější, snáze však podléhá degradaci. Z pohledu významu jsou sledovány obsahy šesti nejvýznamnějších MK a to kyseliny olejové, linolové, linolenové, erukové, palmitové a stearové.

Kyselina palmitová a stearová jsou nasycené MK, jejichž struktury neobsahují dvojnou vazbu. Jsou tedy stabilní, z pohledu lidské výživy ale spíše nežádoucí. Nasycené MK jsou převládající složkou živočišných tuků (maslo, sádlo). Nenasycené MK olejová, linolová a linolenová mají oproti nasyceným MK příznivé účinky na lidský organismus. Nenasycené MK jsou tím nestálejší, čím více dvojných vazeb v molekule obsahují. Kyselina olejová je mononenasyčená mastná kyselina s jednou dvojnou vazbou, která tedy dobře snáší tepelné zatížení např. při smažení. Kyseliny linolová a linolenová jsou nenasycené MK se dvěma a třemi dvojnými vazbami. Kyselina linolenová je podstatně choulostivější než olejová nebo linolová při tepelném zatížení a náchylnější k oxidaci. Obě tyto MK patří mezi esenciální MK, které si lidské tělo neumí syntetizovat a musí je proto přijímat potravou. Kyselina linolenová patří mezi MK označované jako „omega-3“ a kyselina linolová mezi „omega-6“. Pro konzumenta je důležitý poměr omega-3 a omega-6 MK v oleji. Omega-3 MK jsou jediné, všeobecně odborníky doporučované MK, u kterých je zapotřebí navýšit jejich denní příjem. Běžná strava obyvatel České republiky

obsahuje nadbytek omega-6 kyseliny linolové, je proto odborníky všeobecně doporučováno snížit její podíl. Ideální poměr těchto omega-3/omega-6 MK by se měl pohybovat mezi hodnotami 1:1 až 1:5, dnes se tyto hodnoty pohybují v rozmezí 1:15-30. Další sledovanou MK je kyselina eruková, která patří do skupiny mononenasyčených MK, je zdraví škodlivá a potravinářský olej ji může obsahovat pouze stopová množství.

Do oleje mohou při zpracování přecházet i jiné látky v semeni obsažené. Nejvýznamnější jsou glukosinoláty (GSL), které způsobují palčivost a hořkost oleje a jsou antinutriční. Současně zůstávají v pokrutinách, stejně jako látky dusíkaté látky, a tím limitují jejich použití pro krmivářské účely.

Šlechtitelé i ostatní uživatelé GZ z kolekce olejnin NP oceňují přístup k informacím o chemickém složení oleje. Analýzy obsahu oleje a skladby MK jsou součástí standardního hodnocení, jsou realizovány opakovaně ve víceletých cyklech a exaktní data jsou za pomoci kontrolních kultivarů převedena na hodnotu deskriptoru, který je v konečné fázi zveřejněn na kartě položky - v IS GRIN Czech. Spolu s pokrokem v oblasti vývoje nových analytických metod jsou na řešitelském pracovišti postupně zaváděny modernější, levnější a rychlejší metody hodnocení oproti klasickým metodám, jako je např. plynová chromatografie (GC), extrakce, kapalinová chromatografie (HPLC), gravimetrie, aj.

### **Metody hodnocení celkové olejnatosti a složení mastných kyselin**

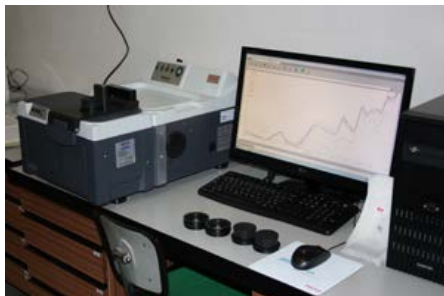
V organizaci OSEVA PRO s.r.o., Výzkumný ústav olejnin Opava (VÚO) v akreditované Zkušební laboratoři OSEVA se stanovuje obsah oleje podle ČSN EN ISO 659 a zastoupení mastných kyselin na základě norem

ČSN EN ISO 12966-1 a ČSN EN ISO 12966-2 [1, 2, 3]. Stanovení obsahu oleje je založeno na extrakci oleje např. petroletherem nebo hexanem, resp. všech látek vyextrahovaných za podmínek popsanych v normě ČSN EN ISO 659 a vyjádřených v hmotnostních procentech z produktu tak, jak byl obdržen, nebo z vyčištěných semen. V izolovaném oleji se následně stanovuje skladba MK, které se převedou na methylestery MK zmýdlením methanolickým roztokem NaOH za vzniku alkalické soli a esterifikací zahříváním suchou HCl v methanolu při 80 °C. Následně se methylestery MK stanoví metodou plynové chromatografie za použití plamenově-ioničacího detektoru [1, 2, 3].



Obr. 4: Plynový chromatograf firmy Dani Instrument S.p.A., typ MASTER GC s FID detektorem

Sledování profilu kvalitativních složek kolekce olejnin pomocí klasických metod je velmi časově i finančně náročné, proto byla na pracovišti zavedena spektroskopie v blízké infračervené oblasti s Fourierovou transformací (FT-NIR). Metoda FT-NIR patří obecně mezi metody molekulové spektroskopie a je v současné době běžně používanou metodou v celé řadě výzkumných i kontrolních laboratoří. FT-NIR spektroskopie je nedestruktivní, rychlá metoda, umožňující simultánní stanovení několika parametrů najednou a z hlediska nepoužívání chemikálií je bezpečná pro životní prostředí.



Obr. 5: FT-NIR spektrometr firmy Thermo Scientific, typ ANTARIS II

FT-NIR technika má také své nevýhody. Je to metoda sekundární a pořizovací cena přístroje je relativně vysoká [4].

Během let 2012 - 2018 byly ve VÚO vytvořeny kalibrační modely pro stanovení obsahu oleje a hlavních MK (kyseliny palmitové, stearové, olejové, linolové a linolenové, eruková, eikosenové) z kolekce olejnin. Měření vzorků pro tvorbu kalibračních modelů a vlastní měření se provádí na spektrometru FT-NIR Antaris II (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) na integrační sféře v režimu reflektance ve spektrálním rozsahu 10 000 – 4 000  $\text{cm}^{-1}$  pomocí softwaru Omnic for Antaris. Vzorky semen jsou proměřovány v rotačních kruhových květáčích o průměru 30 a 50 mm a výšce 15 a 25 mm, které jsou opatřeny křemenným dnem propustným pro NIR záření. Kalibrační modely pro kvantitativní analýzu příslušných analytů byly vyvinuty pomocí chemometrického programu Thermo Scientific TQ Analyst (Thermo Fisher Scientific Inc., USA). Na základě získané závislosti mezi spektrální informací a složením vzorku byly vytvořeny pro každou kvantitativní analýzu zvlášť kalibrační modely pomocí algoritmu Partial Least Squares. K vývoji kalibračních modelů pro jednotlivé analyty byly využity rozdílné spektrální intervaly. Byla vyjádřena standardní chyba kalibrace (RMSEC) a korelační koeficient kalibrace (R).

Pro ověření spolehlivosti, robustnosti a přesnosti kalibračních modelů byla použita úplná křížová a externí validace. Při křížové validaci se vycházelo ze stejné sady vzorků jako při kalibraci, byla vyjádřena chyba křížové validace (RMSECV) a hodnota korelačního koeficientu křížové validace ( $R_{CV}$ ). Externí validace byly provedeny softwarově, automatickým výběrem validačních standardů z kalibračního souboru. Při výpočtu chyby predikce byly validační standardy z kalibračního souboru vyloučeny. Jejich počet byl vždy roven přibližně 10 procentům z celkového počtu standardů zadaných a rovnoměrně pokrývaly kalibrační intervaly

[4]. Byla vyjádřena chyba predikce (RMSEP) a hodnota korelačního koeficientu predikce ( $R_p$ ). V tab. 1 jsou uvedeny výsledky kalibrace vybraných jakostních znaků a charakteristiky modelů řepky ozimé a jarní. Metoda FT-NIR je pro svoji časovou nenáročnost, dostatečnou přesnost, nedestruktivnost a nižší náklady na analýzu jednoho vzorku nejpoužívanější metodou stanovení obsahu MK pro GZ kolekce olejnin. Materiály jsou hodnoceny opakovaně ve víceletých cyklech hodnocení a výsledky jsou porovnávány k platnému kontrolnímu kultivaru. V tab. 2 je uveden přehled počtu analyzovaných vzorků kolekcí z let 2015-2017.

**Tab. 1 Parametry kalibračních modelů vybraných jakostních znaků řepky ozimé a jarní**

Složka	n <sup>a</sup>	n ign.	Počet faktorů	Derivace	RMSEC	R	RMSECV	$R_{CV}$	RMSEP	$R_p$
Olej (%)	727	20	15	bez derivace	0,49	0,99	0,58	0,99	0,53	0,99
C16:0 <sup>b</sup> (%)	323	5	7	bez derivace	0,23	0,70	0,26	0,62	0,27	0,65
C18:0 <sup>c</sup> (%)	312	11	13	bez derivace	0,13	0,81	0,16	0,72	0,22	0,65
C18:1 <sup>d</sup> (%)	1195	48	12	bez derivace	1,72	0,90	1,96	0,86	1,94	0,89
C18:2 <sup>e</sup> (%)	1189	14	14	bez derivace	1,01	0,94	1,32	0,90	1,53	0,90
C18:3 <sup>f</sup> (%)	1316	20	15	bez derivace	0,54	0,92	0,66	0,88	0,63	0,89
C22:1 <sup>g</sup> (< 11 %)	1051	10	15	první	0,56	0,90	0,72	0,83	1,33	0,77
C22:1 (> 11 %)	67	4	11	s bez derivace	1,93	0,99	2,99	0,97	2,99	0,97

<sup>a</sup> Počet vzorků, <sup>b</sup> kyselina palmitová, <sup>c</sup> kyselina stearová, <sup>d</sup> kyselina olejová, <sup>e</sup> kyselina linolová, <sup>f</sup> kyselina linolenová, <sup>g</sup> kyselina eruková

**Tab. 2 Počty vzorků analyzovaných metodou FT-NIR v letech 2015-2017**

	2015	2016	2017
řepka ozimá	634	647	656
řepka jarní	0	222	212
řepice ozimá	0	35	30
řepice jarní	0	45	61
hořčice bílá	35	136	149
hořčice černá	26	27	29
hořčice sarepská	90	94	101
mák setý	220	234	236
makovina	220	236	236
lnička setá	91	91	86
ředkev olejná	9	9	13
katrán habešský	12	13	15
roketa setá	14	15	16
<b>CELKEM</b>	<b>1351</b>	<b>1804</b>	<b>1840</b>

HPLC stanovení GSL v řepce a řepici vychází z normy ČSN EN ISO 9167-1, která definuje stanovení GSL ve formě desulfoglukosinolatů. GSL se opakovaně extrahují bezprostředně po pomletí vzorku 70 % methanolem na termostatické lázni při 80 °C. Po té následuje čištění a enzymatická desulfatace extraktu (suspenze iontoměničové pryskyřice DEAE Sephadex A-25). K enzymatické desulfaci se používá 0,2 % roztok sulfatázy typ H-I. HPLC separace desulfoglukosinolatů se provádí na koloně s reverzní fází za použití gradientové eluce a detekce v UV oblasti. Pro sledování celkového obsahu GSL a dusíkatých látek v semeni řepky je ve VÚO využívána metoda FT-NIR. Metoda HPLC je využívána v omezené míře (pro její náročnost) a to i pro stanovení obsahu GSL v zelené hmotě řepky [5].

### Metody hodnocení obsahu GSL a dusíkatých látek

V současné době jsou ve VÚO k hodnocení obsahu a skladby glukosinolatů (GSL) používány metody spektroskopie FT-NIR a HPLC.



Obr. 6: Vysokoučinný kapalinový chromatograf firmy Thermo Scientific, typ Dionex UltiMate 3000 s DAD detektorem

### Analýzy kvalitativních parametrů GZ máku setého

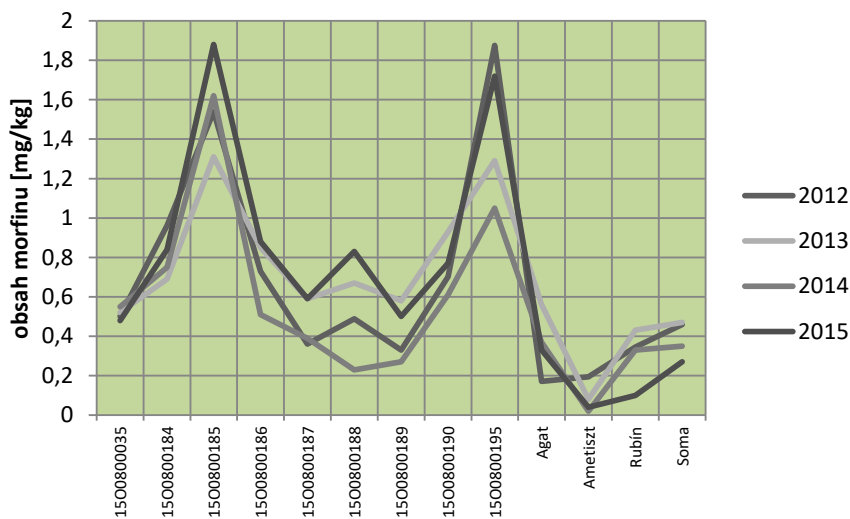
Specifikem v pěstování olejných plodin je produkce makového semene pro přímý konzum. Jeho využití je typické pro slovanské národy, velké využití má ale i bílý mák např. v Indii. V ostatních státech světa je mák pěstován k produkci alkaloidů pro farmaceutické účely. Jde o diametrální rozdíl ve využití s nutností dopadu do použité odrůdové skladby. Máky proto dělíme do skupiny potravinářských a technických máků. Zatímco potravinářské máky se šlechtí především na výnos semene, technické na výnos makoviny a co nejvyšší obsah alkaloidů v ní. Semeno máku alkaloidy neobsahuje. Ty se tvoří v mléčnicích v tobolce. Při kombajnové sklizni, kdy se makovice drtí, ale dochází k uvolňování prachu z makoviny, který alkaloidy obsahuje a k jeho usazování na povrchu semen. Kvalita semenné produkce

klesá a konzument často hodnotí takový mák jako nahořklý. S ohledem na bezpečnost pro lidské zdraví je množství alkaloidů na semeni monitorováno a k pěstování pro potravinářské účely jsou povolovány pouze odrůdy s nižším obsahem morfinu v tobolce. Z tohoto důvodu je velmi přínosné pro uživatele znát obsahy alkaloidů v tobolkách GZ máku. Jedná se především o obsah morfinu, důležitý je ale také thebain a kodein.

### Metody hodnocení obsahu alkaloidů v makovině

Kromě primárního produktu - makového semene, kde je metodou FT-NIR stanovena olejnatost a skladba MK v semeni, se ve VÚO hodnotí také obsahy vybraných alkaloidů v makovině (morfin, kodein, thebain, papaverin a noskapin). K hodnocení obsahu alkaloidů v makovině jsou používány meto-

dy spektroskopie FT-NIR a HPLC. Pracovní postup hodnocení obsahu alkaloidů pomocí HPLC vychází z extrakce alkaloidů buď pomocí roztoku 5 % kyseliny octové s následným přečištěním extraktu na pevné fázi nebo směsí amoniaku, methanolu a chloroformu. Po odstranění elučního činidla, případně extrakčního činidla se alkaloidy rozpustí v methanolu a stanoví se metodou HPLC na koloně s reverzní fází za použití gradientové eluce a detekce v UV oblasti. Metoda FT-NIR je vhodná rovněž ke stanovení alkaloidů v makovině, ale pouze obsahu morfinu a kodeinu. Měření probíhá v pevném vzorku, který se před měřením upraví mletím a důkladnou homogenizací. Při dodržení standardizovaného pracovního postupu získáme data s uspokojivou vypovídající schopností, v případě alkaloidů však musíme počítat se silným ročníkovým vlivem (průběh počasí) a stanovení realizovat ve víceletých cyklech [6].



Graf 1. Obsahy morfinu v makovině vybraných GZ dle FT-NIR z let 2012-2015





Obr. 7: Mák setý

### Využití výsledků laboratorních analýz

Laboratorní analýzy kvalitativních parametrů oleje GZ jsou nedílnou součástí hodnocení materiálů. Z hlediska uživatelů jde o jedny z nejdůležitějších dat. Využívají je jak šlechtitelé pro výběr potencionálních rodičovských komponent do křížení, tak výzkumní pracovníci pro řešení specifických úkolů. Přínosem pro kolekce je získávání a zařazování GZ s diverzním obsahem MK a specifickou skladbou. Z tohoto pohledu je vhodné uchování registrovaných odrůd i ustálených šlechtitelských materiálů, jako donorů cenných vlastností. Každoročně je na pracovišti zhodnoceno velké množství vzorků, proto je více než žádoucí zavádění nových, moderních, nedestruktivních a především ekonomicky dostupnějších metod stanovení. Jedině tak lze dosáhnout plynulého získávání dat pro GZ nejen řádné kolekce, ale především pro nově získané materiály z kolekcí pracovních, a tím umožnit řešitelům zodpovědné rozhodnutí, zda vzorek splňuje požadavky pro přeřazení do kolekci řádných.

### Seznam použité literatury

- [1] ČSN EN ISO 659. Olejnatá semena – Stanovení obsahu oleje (Referenční metoda). Praha: Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, 2011, [účinnost od 1. 2. 2011].
- [2] ČSN EN ISO 12966-1. Živočišné a rostlinné tuky a oleje - Plynová chromatografie methylesterů mastných kyselin - Část 1: Směrnice pro moderní plynovou chromatografii methylesterů mastných kyselin. Praha: Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, 2015, [účinnost od 1. 8. 2015].
- [3] ČSN EN ISO 12966-2. Živočišné a rostlinné tuky a oleje - Plynová chromatografie methylesterů mastných kyselin - Část 2: Příprava methylesterů mastných kyselin. Praha: Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, 2017, [účinnost od 1. 12. 2017].
- [4] ENDLOVÁ L., VRBOVSKÝ V., NAVRÁTILOVÁ Z., TENKL L. (2017): Využití spektroskopie v blízké infračervené oblasti ve šlechtění řepky olejky. Chemické listy, 111: 524-530. ISSN 1213-7103.
- [5] ČSN EN ISO 9167-1. Semeno řepky - Stanovení obsahu glukosinolatů - Část 1: Metoda vysokovýkonné kapalinové chromatografie. Praha: Český normalizační institut, 1998 [účinnost od 1. 1. 1999].
- [6] LARYŠOVÁ A., ENDLOVÁ L., VRBOVSKÝ V., NAVRÁTILOVÁ Z. (2015): Analýza alkaloidů v makovině metodou vysokoúčinné chromatografie. Chemické listy, 109(3): 229 - 234. ISSN 0009-2770.

# Hodnocení odolnosti plodin vůči abiotickým stresům

Vítámvas P., Kosová K., Prášil I. T.

*Tým Biologie stresu a biotechnologie ve šlechtění, Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.*  
vitamvas@vurv.cz

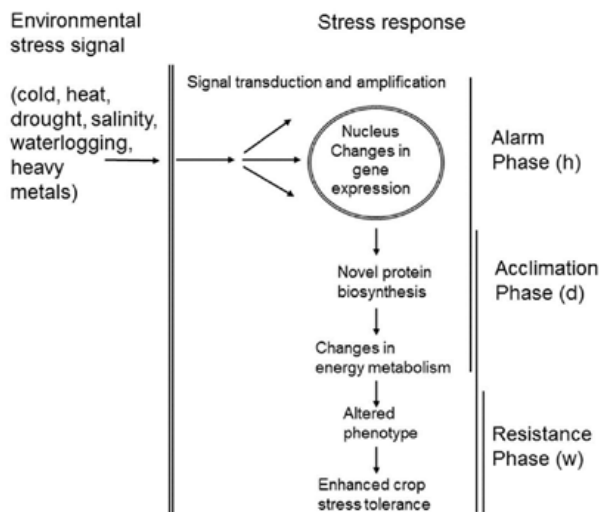
Abiotické stresy (např. sucho, nízká či vysoká teplota, zasolení) významně ovlivňují rozšíření, růst a výnos plodin. V rámci klimatických změn dochází k častějším výkyvům počasí do extrémů. Například v letošní zimě 2017/18 byly na území ČR naměřeny podprůměrné srážky. V kombinaci s nadprůměrnými lednovými teplotami a příchodem mrazů v únoru došlo k mrazovému poškození některých citlivějších ozimých plodin. Nedostatek srážek ve vegetačním období, jako tomu bylo v letošním roce (2018) toto poškození umocnil a sucho pak způsobilo výrazné propady výnosu nejen obilnin. Extrémy počasí jsou pozorovány na celém světě a s tím přichází tlak odborné veřejnosti na rychlé a co nejpřesnější odlišení odrůd s různou odolností vůči abiotickým stresům.

Pravidelné hodnocení odolnosti k abiotickým stresům u nových nebo již využívaných odrůd a hledání genetických zdrojů jako nositelů vhodné odolnosti pro šlechtění patří k zásadním krokům v boji proti negativnímu působení abiotických stresů na pěstované plodiny. Za účelem popisu a selekce genetických zdrojů nesoucích znaky odolnosti se intenzivně vyvíjí metody charakterizace založené na vhodných markrech. Ukazuje se, že studium změn složení rostlinného proteomu představuje významný a důležitý nástroj pro pochopení klíčových prvků odezvy rostlin vůči stresu.

Dvě hlavní strategie rostlin, kterými mohou reagovat na stres, jsou evoluční adaptace

umožňující rostlině vyhnout se stresu, nebo vývoj tolerance vůči stresu (Kosová *et al.* 2018). Největší škody u polních plodin jsou způsobeny nedostatečnou úrovní tolerance genotypů plodin vůči stresům.

Odolnosti rostlin vůči abiotickým stresům jsou založené polygenně. Rostliny po vystavení abiotickým stresům spouštějí řadu obranných mechanismů umožňujících opravovat poškození způsobená stresem a přizpůsobit se změněným podmínkám (Obr. 1). Během vystavení stresu dochází k výrazným změnám v rostlinách, které se projevují na úrovni mRNA (transkripční úroveň), proteinů a metabolitů. Tyto obranné mechanismy mohou být jak nespecifické (např. tvorba antioxidantních enzymů, zvýšená produkce proteinů opravujících chybně sbalené proteiny, tzv. chaperonů, nebo degradujících poškozené proteiny), tak specifické (např. tvorba protimrazových proteinů za mrazu, proteinů tepelného šoku HSP – tj. heat shock proteinů – nebo fitochelatinů při nadbytku těžkých kovů v půdě). Nalezené změny v hladině proteinů v rostlinách vystavených účinkům stresu mohou být v úzkém vztahu s výslednou úrovní tolerance rostlin na daný stres. Proteomické studie mohou proto vést k identifikaci potenciálních proteinových indikátorů (markerů), jejichž změny v abundanci mohou být úzce spojené s kvantitativními změnami fyziologických parametrů (Kosová *et al.* 2018). Některé specifické odpovědi rostlin se mohou překrývat u stresů majících



Obr. 1: Schéma dynamiky stresové odpovědi rostlin na buněčné úrovni. Převzato z Kosová et al. 2015.

na rostliny obdobný účinek. Například po vystavení rostlin mrazu či zasolení dochází i k dehydrataci (snížení obsahu vody) buněk a osmotickému stresu. Proto při chladovém otužení sledujeme v rostlinách nárůst osmoticky aktivních látek a některých ochranných proteinů vyskytujících se i během vystavení rostlin suchu či zasolení (VITÁMVÁS et al. 2012, VITÁMVÁS et al. 2015, MARŠALOVÁ et al. 2016).

Významná skupina ochranných proteinů jsou proteiny COR/LEA (cold regulated/late embryogenesis abundant). Mezi tyto proteiny patří také tzv. dehydriny. Jde o hydrofilní proteiny, které jsou rozpustné po varu a obsahují aspoň jednu 15-ti aminokyselinovou sekvenci EKKGIMDKIKEKLPG bohatou na aminokyselinu lysin (tzv. K-segment). Dehydriny byly nalezeny v cytoplasmě, jádře, mitochondriích i plastidech. Konkrétní role dehydrinů není dosud úplně jasná, v buňce pravděpodobně hrají úlohu jako osmotika, v některých studiích byl popsán jejich pozitivní vliv při stabilizaci membrán (Kosová et al. 2007).

Ve Výzkumném ústavu rostlinné výroby, v. v. i. hodnotíme odolnosti rostlin polními (např. míru poškození rostlin během zimy), polně-laboratorními (rostliny odebrané z polních pokusů se analyzují v laboratoři, např. mrazovými testy či zjišťováním obsahu různých látek jako prolinu či dehydrinů) a laboratorními testy (rostliny pěstované v regulovaných podmínkách se testují na obsah různých RNA, proteinových či metabolických indikátorů). Polní testy jsou časově náročné, je nutné disponovat dostatečnou polní lokalitou a zemědělskou technikou, ale nejsou náročné na přístrojové vybavení. Polní testy jsou ovšem závislé na počasí během probíhajícího experimentu, v nestresujících podmínkách nemusí být různě odolné genotypy rozlišeny. Laboratorní testy jsou přístrojově i energeticky náročné, ale rychleji proveditelné, reprodukovatelnější a lze je provádět i mimo vegetační sezónu (nezávisle na aktuálním počasí). Ovšem vždy je nutné ověřit laboratorní výsledky i na poli, kde dochází k interakci různých biotických i abiotických faktorů.

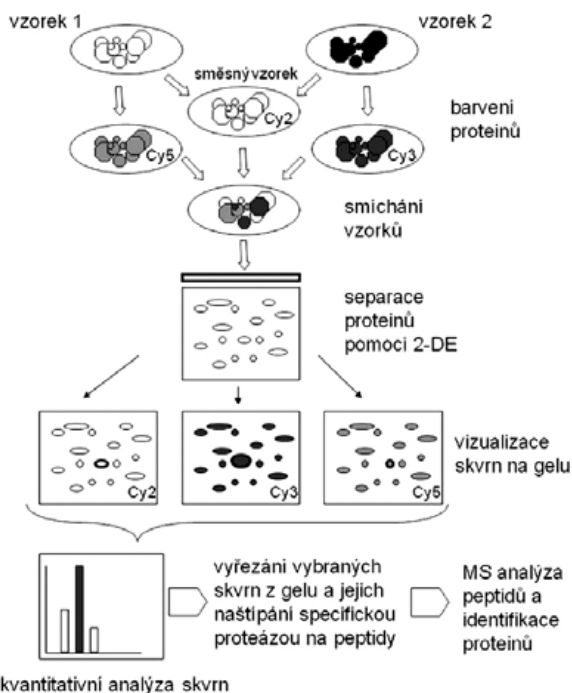
V posledních letech se v laboratoři „Biologie stresu a biotechnologie ve šlechtění“ zaměřujeme na hledání laboratorních indikátorů odolnosti genetických zdrojů plodin vůči abiotickým stresům (chlad, sucho, zasolení), a to pomocí proteomické gelové metody 2D-DIGE (two dimensional difference gel electrophoresis, přehled např. Vítámvás et al. 2010b). Díky použití fluorescenčních CyDye barviv lze na jednom dvourozměrném polyakrylamidovém gelu separovat tři různé vzorky (jeden je obvykle směsný vzorek, který slouží jako interní standard pro kvantifikaci proteinových skvrn na různých gelech (Obr. 2).

Touto metodou se nám podařilo stanovit možné proteinové markery odolnosti plodin vůči abiotickým stresům, a to u pšenice a ječ-

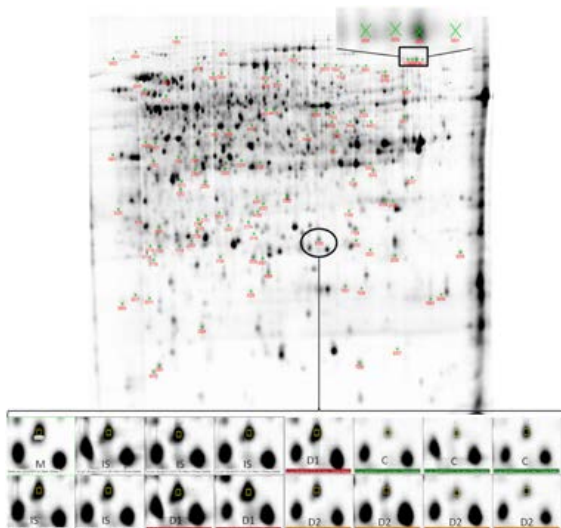
menů vystavených chladu (Vítámvás et al. 2012, HLAVÁČKOVÁ et al. 2013, KOSOVÁ et al. 2013a), suchu (Vítámvás et al. 2015) (Obr. 3) či zasolení (MARŠÁLOVÁ et al. 2016) nebo u řepky vystavených suchu (URBAN et al. 2017).

Tyto markery patří mezi antioxidantní enzymy (např. superoxid dismutáza), chaperony (např. HSP70), ribozomální proteiny, proteázy, stresové proteiny (např. PR-like proteiny, COR/LEA proteiny, proteiny s ABA\_WDS doménou), enzymy sacharidového metabolismu, chloroplastové proteiny, atp. (Obr. 4).

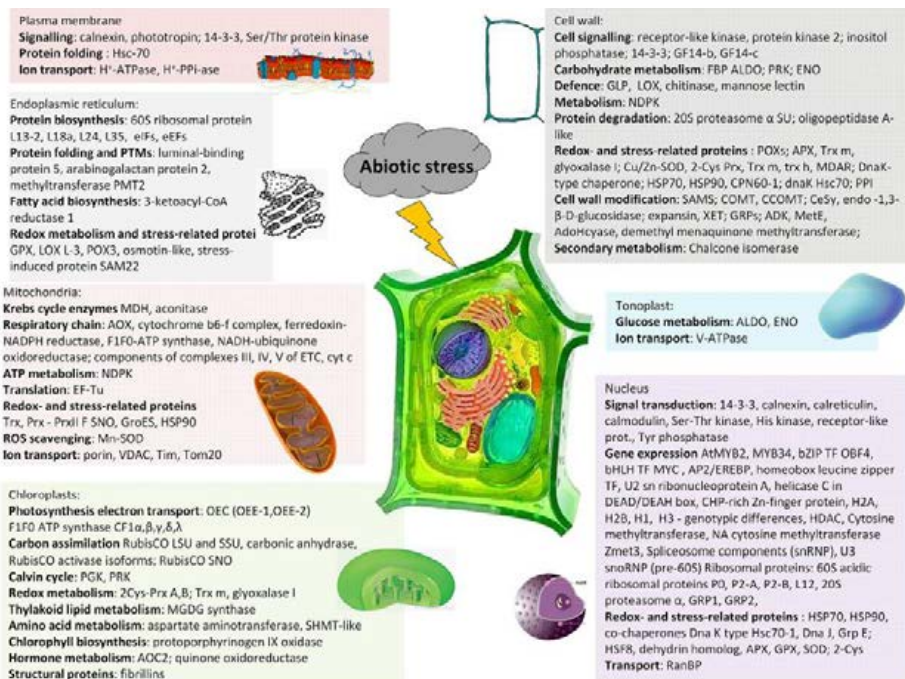
Jako slibný proteinový indikátor odolnosti rostlin (plodin) k abiotickým stresovým faktorům (nízká teplota, sucho, zasolení) se jeví akumulace dehydrinů v listech či odno-



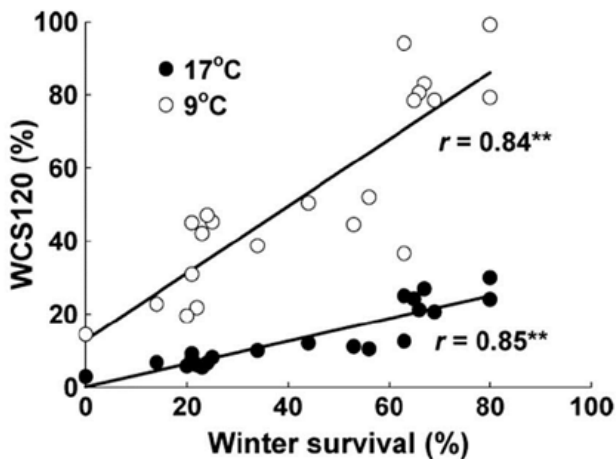
Obr. 2: Schéma metody 2D-DIGE. Převzato z Vítámvás et al. 2010b.



Obr. 3: Výsledek analýzy 2D-DIGE gelu, na kterém jsou vyznačeny proteinové skvrny, jejichž densita se signifikantně liší (2x) mezi kontrolními a suchem stresovanými vzorky ječmene Amuletu. Převzato z Vitámvás et al. 2015.



Obr. 4: Zjednodušený přehled nejvýznamnějších proteinů v jednotlivých organelách, jejichž akumulace se mění během stresu. Převzato z Kosová et al. 2018.



Obr. 5: Relativní akumulace dehydrinu WCS120 u pšeníc pěstovaných za různých teplot a jejich korelace se zimovzdorností (winter survival) daných genotypů. Převzato z Vitámvás et al. 2010a.

žovacích uzlech plodin. Dehydriny detekujeme hybridizací anti-dehydrin protilátek s proteiny navázaných na membránu (tzv. immunoblotting či western blot). Zvýšená schopnost akumulovat dehydriny byla pozorována u odolnějších genotypů obilnin a řepky pěstovaných v chladu (např. VITÁMVÁS et al. 2010a, KLÍMA et al. 2012), suchu (VITÁMVÁS et al. 2015, URBAN et al. 2017), při zasolení (KOSOVÁ et al. 2015) a v případech mrazuvzdornosti i za vyšších teplot (VITÁMVÁS et al. 2010a, KOSOVÁ et al. 2013b; Obr. 5).

Z našich experimentů vyplývá, že pomocí akumulace dehydrinů je možno odlišit genotypy

rostlin s různou úrovní odolnosti vůči stresům již v raných stádiích vývoje. Ovšem u některých druhů plodin (např. vodní meloun, hrách) byly dehydriny téměř nedetekovatelné a jako indikátory odolnosti se tedy nehodí. Je proto nutné hledat další možné ukazatele odolnosti rostlin pro zpřesnění stupně odolnosti genotypů různých plodin. Studium změn složení rostlinného proteomu proto představuje významný a důležitý nástroj pro pochopení klíčových prvků odezvy rostlin na abiotický stres a získání dalších markerů odolnosti, které umožní rychle a přesně odlišit a popsat různé odolné genotypy v kolekci genetických zdrojů plodin.

## Seznam použité literatury

- HLAVÁČKOVÁ I., VITÁMVÁS P., ŠANTRŮČEK J., KOSOVÁ K., ZELENKOVÁ S., PRÁŠIL I.T., OVESNÁ J., HÝNEK R., KODÍČEK M. (2013): Proteins Involved in Distinct Phases of Cold Hardening Process in Frost Resistant Winter Barley (*Hordeum Vulgare* L.) cv Luxor. *International Journal of Molecular Sciences*, 14 (4): 8000-8024.
- KLÍMA M., VITÁMVÁS P., ZELENKOVÁ S., VYVAĐILOVÁ M., PRÁŠIL I.T. (2012): Dehydrin and proline content in *Brassica napus* and *B. carinata* under cold stress at two irradiances. *Biologia Plantarum*, 56 (1): 157-161.
- KOSOVÁ K., VITÁMVÁS P., HLAVÁČKOVÁ I., URBAN M.O., VLASÁKOVÁ E., PRÁŠIL I.T. (2015). Responses of two barley cultivars differing in their salt tolerance to moderate and high salinities and subsequent recovery. *Biologia Plantarum*, 59 (1): 106-114. DOI: 10.1007/s10535-014-0465-y.
- KOSOVÁ K., VITÁMVÁS P., PLANCHON S., RENAUT J., VAŇKOVÁ R., PRÁŠIL I.T. (2013a): Proteome Analysis of Cold Response in Spring and Winter Wheat (*Triticum aestivum*) Crowns Reveals Similarities in Stress Adaptation and Differences in Regulatory Processes between the Growth Habits. *Journal of Proteome Research*, 12: 4830-4845.
- KOSOVÁ K., VITÁMVÁS P., PRÁŠIL I.T. (2007): The role of dehydrins in plant response to cold. *Biologia Plantarum*, 51 (4): 601 - 617.
- KOSOVÁ K., VITÁMVÁS P., PRAŠILOVÁ P., PRÁŠIL I.T. (2013b): Accumulation of WCS120 and DHN5 proteins in differently frost-tolerant wheat and barley cultivars grown under a broad temperature scale. *Biologia Plantarum*, 57 (1): 105-112.
- KOSOVÁ K., VITÁMVÁS P., URBAN M.O., KLÍMA M., RAY A., PRÁŠIL I.T. (2015): Biological Networks Underlying Abiotic Stress Tolerance in Temperate Crops-A Proteomic Perspective. *International Journal of Molecular Sciences*, 16 (9): 20913-20942. DOI: 10.3390/ijms160920913.
- KOSOVÁ K., VITÁMVÁS P., URBAN M.O., PRÁŠIL I.T., RENAUT J. (2018): Plant Abiotic Stress Proteomics: The Major Factors Determining Alterations in Cellular Proteome. *Frontiers in Plant Science* 9: 122. Doi: 10.3389/fpls.2018.00122.
- MARŠÁLOVÁ L., VITÁMVÁS P., HÝNEK R., PRÁŠIL I.T., KOSOVÁ K. (2016): Proteomic response of *Hordeum vulgare* cv Tadmor and *Hordeum marinum* to salinity stress: similarities and differences between a glycophyte and a halophyte. *Frontiers in Plant Science*, 7 (1154). DOI: 10.3389/fpls.2016.01154.
- URBAN M.O., VAŠEK J., KLÍMA M., KRŤKOVÁ J., KOSOVÁ K., PRÁŠIL I.T., VITÁMVÁS P. (2017): Proteomic and physiological approach reveals drought-induced changes in rapeseed: Water-saver and water-spender strategy. *Journal of Proteomics*, 152, 188-205. DOI: 10.1016/j.jprot.2016.11.004.
- VITÁMVÁS P., KOSOVÁ K., PRAŠILOVÁ P., PRÁŠIL I.T. (2010a): Accumulation of WCS120 protein in wheat cultivars grown at 9 °C or 17 °C in relation to their winter survival. *Plant Breeding*, 129:611-616.
- VITÁMVÁS P., KOSOVÁ K., ŠKODÁČEK Z., PRÁŠIL I.T. (2010b): Metoda dvourozměrné diferenční gelové elektroforézy (2D-DIGE) a její využití v proteomice. *Chemické Listy*, 104:671-676.
- VITÁMVÁS P., PRÁŠIL I.T., KOSOVÁ K., PLANCHON S., RENAUT J. (2012): Analysis of proteome and frost tolerance in chromosome 5A and 5B reciprocal substitution lines between two winter wheats during long-term cold acclimation. *Proteomics*, 12: 68-85.
- VITÁMVÁS P., URBAN M.O., ŠKODÁČEK Z., KOSOVÁ K., PÍTELKOVÁ I., VITÁMVÁS J., RENAUT J., PRÁŠIL I.T. (2015): Quantitative analysis of proteome extracted from barley crowns grown under different drought conditions. *Frontiers in Plant Science*, 6: 479. DOI: 10.3389/fpls.2015.00479.

# Predikce kvality píce genetických zdrojů trav s využitím FT-NIR spektrometru

Lošák<sup>1</sup> M., Endlová<sup>2</sup> L.

<sup>1</sup> OSEVA PRO s.r.o., o. z. Výzkumná stanice travinářská Rožnov – Zubří

<sup>2</sup> OSEVA vývoj a výzkum s.r.o., pracoviště Opava

losak@oseva.cz, endlova@oseva.cz

Travní porosty na Zemi představují po lesních kulturách plošně nejrozšířenější vegetační pokryv. Podle evidence katastru nemovitostí zaujímaly trvalé travní porosty v rámci výměry půdy v ČR k 31. 12. 2017 celkem 1 007 tis. ha, což představuje 23,9 % z výměry zemědělské půdy. Za posledních 50 let se tak plocha trvalých travních porostů na našem území zvýšila o více než 56 tis. ha (ČÚZK 2018). Význam travních porostů je vícestranný. Kromě celospolečensky významných mimoprodukčních funkcí (krajinotvorný význam, ochrana půdy proti erozi, vodohospodářská funkce, zachování biodiverzity aj.) je velice významná produkční funkce, která má význam nejen pro konzumenty a člověka, ale také pro celkovou kvalitu životního prostředí. Produkční funkce travních porostů představuje vytváření píce z porostů pěstovaných na orné půdě nebo z trvalých travních porostů pro výživu zvířat na přímé zkrmování (pastva, stájové krmení) a na konzervaci pro mimoprodukční období (seno, senáž, siláž). Zelené rostliny přítomné v travních porostech jsou jediným článkem v travním ekosystému, který je schopen vázat primární sluneční energii, kterou dále transportuje a ukládá (HRABĚ a BUCHGRABER 2004, MIKA *et al.* 1997, NOVÁK 2008).

Z produkčního hlediska jsou základní složkou travních porostů především druhy z čeledi lipnicovité (*Poaceae*). Tyto druhy by měly být v travních porostech zastoupeny nejvyšším



Obr. 1: Genetické zdroje trav pro pícní využití ve VST Zubří (květen 2017)

podílem, avšak mezi jednotlivými travními druhy existují rozdíly v kvalitě jejich píce. Některé druhy se vyznačují vysokým obsahem živin, vysokou produkcí píce a zároveň jsou chuťově atraktivní pro hospodářská zvířata. Zpravidla jsou charakteristické vysokým obsahem energie a dusíkatých látek (N-látek), vysokou stravitelností organické hmoty a nízkým obsahem vlákniny. Mezi travní druhy s největší krmnou hodnotou řadíme jilek vtrvalý, kostřavu luční, bojínek luční a lipnici luční. Tvorbou mezidruhových (jilek hybridní) a mezirodových hybridů (*festulium*) došlo k významnému zlepšení krmné hodnoty píce travních porostů. Na druhé straně se v porostech mohou vyskytovat také méně hodnotné travní druhy s malou produkcí píce, která se vyznačuje nízkou kvalitou. K takovým dru-



hům řadíme metlici trsnatou, smilku tuhou, třtinu křovištní aj. (NOVÁK 2008, SKLÁDANKA *et al.* 2014).

Znalost krmné hodnoty čerstvé či konzervované píce z travních porostů je důležitá pro zajištění racionální výživy přežvýkavců. Pojem kvalita píce označuje souhrn charakteristik udávajících schopnost krmiva uspokojit přesně vymezené potřeby zvířete a určujících vhodnost krmiva pro příjem zvířetem. Výživná hodnota travní píce závisí na úrodnosti půdy, hloubce podzemní vody, počasí, hnojení, vegetační fázi, ve které se píce sklízí, botanickém složení porostu, způsobu sklizně a způsobu skladování. U píce z travních porostů je kromě požadavku na vysoký obsah živin a jejich stravitelnost kladen důraz také na její dietetickou hodnotu, která je dána sníženým obsahem antinutričních látek ovlivňujících chuť a přijímatelnost píce zvířaty. Neméně významná je také hygienická čistota píce, kterou nejvíce ovlivňuje znečištění píce při sklizni (HRABĚ *et al.* 2004, MIKA *et al.* 1997).

Z hlediska vlivů na výživnou hodnotu píce je často diskutován optimální termín sklizně travních porostů. Za optimální senokosnou zralost travního porostu je považována fenologická fáze na počátku kvetení dominantního travního druhu a optimální pastevní zralost je dosahována nejpозději na počátku metání dominantního travního druhu při výšce porostu přibližně 15-20 cm. V pozdějších fázích vývoje dochází sice ke zvyšování produkce píce, ale současně se v píci zvyšuje obsah sušiny, vlákniny a snižuje se obsah N-látek, tuku a mírně se snižuje obsah popelovin v sušině. Ve vícedruhovém travním společenstvu může rozdílná doba pícní zralosti jednotlivých druhů a odrůd zapříčinit snížení kvality píce. V případě hodnocení kvality píce jednotlivých odrůd je proto zcela nezbytné provádět hodnocení ve srovnatelné růstové fázi a podle předpo-

kládaného budoucího využití (luční/pastevní). Podle ranosti nebo pozdnosti odrůd mohou být vnější podmínky před dosažením konkrétní růstové fáze rozdílné, což má za následek, že ve stejné růstové fázi mají ranější odrůdy většinou lepší kvalitu než odrůdy pozdní, protože ji dosahují v období pomalejší lignifikace rostlinných pletiv (Hrabě a BUCHGRABER 2004, MIKA *et al.* 1997, NOVÁK 2008). Výživná hodnota je ovlivňována také stoupající četností využití travních porostů. Při větším počtu sečí nebo pastevních cyklů stoupá obsah N-látek a snižuje se obsah vlákniny; je podporováno bohaté olistění, které je nositelem kvality píce. Naproti tomu při menším využití bývá stravitelnost i obsah energie v píci zřetelně menší, protože se zvyšuje podíl lignifikujících stébel (KAŠPAROVÁ a ŠRÁMEK 2005, KOMÁREK *et al.* 2005).

OSEVA PRO s.r.o., Výzkumná stanice travinářská v Zubří je řešitelským pracovištěm genofondové kolekce travin. V rámci subkolekce genetických zdrojů trav určených pro pícní využití provádí víceleté hodnocení materiálů v polních podmínkách podle Klasifikátoru pro trávy (ŠEVČIKOVÁ *et al.* 2002). Hodnoceny jsou znaky morfologické, fenologické, biologické a hospodářské. V rámci hospodářských znaků je hodnocena pícninářská výkonnost jednotlivých materiálů při třísečném (lučním) a pěti-sečném využití (simulovaná pastva). Termíny sečí a dávky hnojení jsou určeny Metodikou práce s kolekcemi genetických zdrojů travin (LOŠÁK 2015). Kvalita píce je hodnocena u materiálů v luční variantě, kde jsou pro objektivní stanovení požadovaných parametrů prováděny sklizně a odběry vzorků v rámci první seče podle růstové fáze jeden týden po začátku metání. Pícninářské pokusy s genetickými zdroji jsou sklizeny zpravidla motorovým žacíím strojem MF-70 a takto sklizená hmota je neprodleně zvážena, jsou odebrány reprezentativní vzorky zelené hmoty, které

**Tab. 1: Stupnice pro přepočet zhodnocených ukazatelů kvality píce na bodové vyjádření podle klasifikátoru pro trávy**

Znak	Bodová stupnice	Hodnoty znaku
Stravitelnost organické hmoty	1 velmi nízká	< 60 [%]
	3 nízká	60-65 [%]
	5 střední	66-70 [%]
	7 vysoká	71-75 [%]
	9 velmi vysoká	> 75 [%]
Obsah dusíkatých látek v sušině	1 velmi nízký	< 6,0 [%]
	2 velmi nízký až nízký	6,0-7,5 [%]
	3 nízký	7,6-9,0 [%]
	4 nízký až střední	9,1-10,5 [%]
	5 střední	10,6-12,0 [%]
	6 střední až vysoký	12,1-13,5 [%]
	7 vysoký	13,6-15,0 [%]
	8 vysoký až velmi vysoký	15,1-16,5 [%]
	9 velmi vysoký	> 16,5 [%]

jsou zváženy, následně sušeny v komorové sušárně a poté opět zváženy v suchém stavu pro stanovení výnosu suché hmoty výpočtem. Tyto vzorky slouží k následné analýze kvality píce. Na základě klasifikátoru pro trávy jsou hodnoceny znaky: stravitelnost organické hmoty a obsah dusíkatých látek v sušině. Přepočet zjištěných výsledků kvality píce na bodové vyjádření je prováděn podle stupnice v klasifikátoru (Tab. 1) a bodové hodnoty jsou následně předávány do informačního systému genetických zdrojů GRIN Czech, kde jsou k dispozici uživatelům genetických zdrojů.

**Stravitelnost organické hmoty (OMD – Organic Matter Digestibility)** je uznávána jako velmi dobrá a jednoduchá charakteristika kvality píce. Podobně jako u jiných živin v píci je silně ovlivněna růstovou fází rostliny v době sečení (spásání) a po růstové fázi kvetení nastává rychlý pokles stravitelnosti. V praxi se OMD u píce z travních porostů pohybuje zpravidla v rozmezí 65-70 %. Avšak např. píce z jednosečných přestárlých „květnatých luk“ může mít OMD

pouze 45 %. U pozdních odrůd je průměrný denní pokles OMD menší než u raných odrůd trav. Obecně stravitelnější jsou listy než stébla. Používané metody stanovení stravitelnosti jsou přímé *in vivo* (bilanční pokusy na zvířatech) a nepřímé – *in vitro* nebo fyzikálně chemické metody (FT-NIRS – spektroskopie v blízké infračervené oblasti s Fourierovou instrumentací). V kolekci genetických zdrojů trav je OMD v současnosti zhodnocena celkem u 428 položek. Výsledky hodnocení pícninářsky nejvýznamnějších travních druhů přináší tabulka 2.

**Dusíkaté látky** jsou nezbytné pro život organismu a v krmivech poskytují zvířatům nezastupitelný zdroj živin pro jejich fyziologické potřeby. Obsah dusíkatých látek v sušině se v praxi pohybuje zpravidla v rozmezí 10-14 %. U přestárlých porostů se obsah N-látek snižuje na 70 g.kg<sup>-1</sup> sušiny píce. Aplikace dusíkatých hnojiv významně ovlivňuje obsah N-látek v sušině píce. Pro stanovení celkových N-látek je nejrozšířenější alkalimetrická Kjejdahlova metoda, která je časově a pracovně nároč-

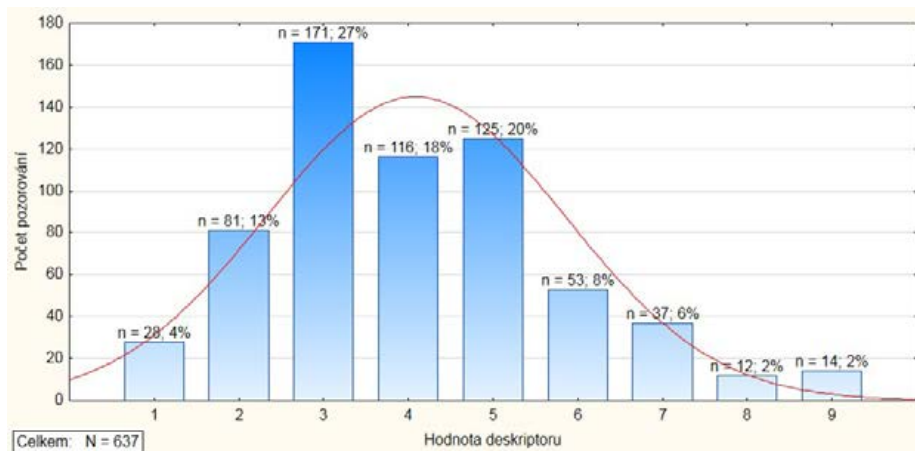
**Tab. 2: Stravitelnost organické hmoty u pícninářsky významných druhů genetických zdrojů trav**

Druh	Počet zhodnocených položek	Stravitelnost OH (body)				
		Průměr	Medián	Min.	Max.	$v_x$ (%)
Bojínek luční	63	6,37	7	1	9	50
<i>Festulolium</i>	9	8,33	9	7	9	12
Jílek hybridní	15	6,73	7	3	9	33
Jílek mnohokvětý	39	5,46	5	3	9	38
Jílek vytrvalý	77	7,29	9	3	9	29
Kostřava červená	19	4,89	5	1	7	40
Kostřava luční	32	6,63	7	3	9	31
Kostřava rákosovitá	23	7,52	7	5	9	22
Lipnice luční	17	7,00	7	5	9	14
Ovsík vyvýšený	22	5,73	5	3	9	30
Psárka luční	8	8,75	9	7	9	8
Srha laločnatá	71	7,11	7	3	9	25

Pozn.:  $v_x$  = variační koeficient vyjadřující míru variability

ná. Z hlediska rychlosti, dostačující přesnosti a zejména jednoduchosti se stále více prosazuje použití spektroskopické metody FT-NIRS (HRABÉ a BUCHGRABER 2004, MÍKA et al. 1997, NOVÁK 2008, SKLÁDANKA et al. 2014). Obsah

N-látek v sušině píce je v současnosti zhodnocen celkem u souboru 637 genetických zdrojů trav. Rozložení četností bodového vyjádření obsahu N-látek u všech zhodnocených položek je zobrazeno v grafu 1.



Graf 1: Rozložení četností bodového vyjádření obsahu N-látek v kolekci genetických zdrojů

Hodnocení kvality píce genetických zdrojů trav je v současné době prováděno metodou spektroskopie v blízké infračervené oblasti. Tato metoda vyniká rychlostí, nedestruktivností, pracovní nenáročností, umožňuje simultánní stanovení několika parametrů najednou a v případě měření rozsáhlých sérií vzorků stejného charakteru také ekonomickou výhodností. Podstatným pozitivem použití této metody je také fakt, že mnohem méně zatěžuje životní prostředí než běžné metody „mokrých chemií“ (úspora chemikálií, energií, laboratorních pomůcek). FT-NIR technika má také své nevýhody. Je to metoda sekundární a též pořizovací cena přístroje bývá relativně vysoká. Přestože metoda FT-NIRS neposkytuje stejnou přesnost jako běžně používané referenční metody hodnocení kvality píce, je pro naše účely její přesnost dostačující. V běžném provozu je přesnost metody FT-NIRS závislá na kvalitě kalibračních modelů a kvalitě vlastního spektrofotometru. Pro využití této metody je velmi důležité vyvinutí robustních,

přesných a spolehlivých modelů. Dále pak správná validace kalibračních modelů, což představuje určité omezení, neboť vývoj těchto kalibrací je finančně náročný a předpokládá se, že soubory vzorků určených pro kalibraci jsou dostatečně široké, homogenní, přesně determinované a typické (BIEN a HRBÁČKOVÁ 2017, JENDRIŠÁKOVÁ 2005, NERUŠIL *et al.* 2005, RESCH 2007).

Měření vzorků pro tvorbu kalibračních modelů a vlastní FT-NIR měření probíhá v OSEVA PRO s.r.o. na spektrometru FT-NIR Antaris II (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) na integrační sféře v režimu reflektance ve spektrálním rozsahu 10 000 – 4 000 cm<sup>-1</sup> pomocí softwaru Omnic for Antaris. Vzorky pomletých a homogenizovaných trav, které byly přesety přes síto, jsou proměřovány v rotačních, kompresních, kruhových kyvetách o průměru 30 mm a výšce 15 mm, které jsou opatřeny křemenným dnem propustným pro NIR záření. Výsledné spektrum každého vzor-

**Tab. 3: Parametry kalibračních modelů vybraných jakostních znaků píce**

	Parametr			
	Vlhkost (%)	Stravitelnost organické hmoty (%)	Popel v sušině (g)	N-látky v sušině (g)
<b>Rozsah</b>	6,18-7,84	46,20-84,80	53,90-82,90	51,40-175,90
<b>n<sup>a</sup></b>	67	66	63	64
<b>n ign.</b>	1	2	5	4
<b>Počet faktorů</b>	9	7	12	9
<b>Derivace</b>	Spectrum	Spectrum	Spectrum	Spectrum
<b>RMSEC<sup>b</sup></b>	0,160	4,740	2,050	2,850
<b>R<sup>c</sup></b>	0,916	0,890	0,941	0,991
<b>RMSECV<sup>d</sup></b>	0,215	5,970	2,920	4,740
<b>R<sub>cv</sub><sup>e</sup></b>	0,845	0,823	0,880	0,975
<b>RMSEP<sup>f</sup></b>	0,179	7,530	2,120	5,890
<b>R<sub>p</sub><sup>g</sup></b>	0,899	0,746	0,964	0,974

<sup>a</sup> Počet vzorků, <sup>b</sup> chyba kalibrace, <sup>c</sup> korelační koeficient kalibrace, <sup>d</sup> chyba křížové validace, <sup>e</sup> korelační koeficient křížové validace, <sup>f</sup> chyba predikce, <sup>g</sup> korelační koeficient predikce.



Obr. 2: Analýza vzorků píce na FT-NIR spektrometru Antaris II

ku se získává zprůměrováním ze 128 scanů s rozlišením  $2 \text{ cm}^{-1}$ . Kalibrační modely pro kvantitativní analýzu příslušných jakostních znaků byly vyvinuty pomocí chemometrického programu Thermo Scientific TQ Analyst (Thermo Fisher Scientific Inc., USA). Na základě získané závislosti mezi spektrální informací a složením vzorku byly vytvořeny pro každou kvantitativní analýzu zvlášť kalibrační modely pomocí algoritmu Partial Least Squares. V tabulce 3 jsou uvedeny výsledky kalibrace vybraných jakostních znaků a charakteristiky modelů píce. Modely budou zpřesňovány průběžným zařazením méně početně zastoupených nebo nerovnoměrně rozložených znaků, dále průběžnou aktualizací modelů, která je nutná k zajištění dostatečné robustnosti modelů při změně matrice vzorků vlivem ročníku.

V národní kolekci genetických zdrojů trav jsou zastoupeny genotypy uplatnitelné ve šlechtění nových pícních odrůd, které reprezentují jak české a zahraniční odrůdy, tak plané populace

travních druhů využitelných pro pícní účely, které byly získány sběrovou činností z volně přírody na přirozených nebo polopřirozených stanovištích. Hlavním selekčním kritériem ve šlechtitelském procesu v našich podmínkách je výnos (tj. produkce píce), ale ještě důležitější je výnosová adaptabilita na mnoha lokalitách a ve více ročnících (CHLOUPEK 2008). Pro šlechtění je významné, že stravitelnost organické hmoty má heritabilitu (dědivost) přibližně 45 %. S ohledem na fakt, že kvalita píce z trav je do značné míry ovlivněna různou raností odrůd, bude pro využití genetických zdrojů ve šlechtění pícních odrůd nezbytná znalost fenologických ukazatelů všech materiálů dostupných v kolekcích. Na kvalitu píce a obsah antinutričních látek se bude při šlechtění nových pícních odrůd zaměřovat stále větší pozornost. Z těchto důvodů je do budoucna FT-NIR analýza perspektivní metodou hodnocení genetických zdrojů trav a lze očekávat rozšiřování jejího využití o hodnocení dalších významných znaků kvality píce.

## Seznam použité literatury

- BIEN R., HRBAČKOVÁ B. (2017): NIR analýza – spolehlivá kontrola jakostních parametrů v krmivářském průmyslu a dalších odvětvích. *Krmivářství* 21 (2): 27–28. ISSN 1212-9992.
- ČÚZK (2018): Souhrnné přehledy o půdním fondu z údajů katastru nemovitostí ČR: stav ke dni 31. prosince 2017. Praha: Český úřad zeměměřický a katastrální, 76 pp. ISSN 1804-2422.
- HRABĚ F. et al. (2004): Trávy a jetelovino trávy v zemědělské praxi. Olomouc: Vydavatelství Ing. Petr Baštan, 121 pp. ISBN 80-903275-1-6.
- HRABĚ F., BUCHGRABER K. (2004): Pícninářství – travní porosty. Brno: MZLU v Brně, 149 pp. ISBN 80-7157-816-9.
- CHLOUPEK O. (2008): Genetická diverzita, šlechtění a semenářství. 3. vyd. Praha: Academia, 312 pp. ISBN 978-80-200-1566-2.
- JENDRIŠÁKOVÁ J. (2005): Stanovení výživnej hodnoty objemových krmiv metodou NIRS. In: Kohoutek, A., Pozdíšek J. (Eds.). *Kvalita píce z travních porostů*. Praha: VÚRV, 2005. 80–84. ISBN 80-86555-75-5.
- KAŠPAROVÁ J., ŠRÁMEK P. (2005): Výnosy a kvalita píce z travních porostů v aluvii Rožnovské Bečvy. In: Kohoutek, A., Pozdíšek J. (Eds.). *Kvalita píce z travních porostů*. Praha: VÚRV, 2005. 117–122. ISBN 80-86555-75-5.
- KOMÁREK P. et al. (2005): Produkce a kvalita píce travních porostů v závislosti na zatížení skotem a frekvenci sečení. In: Kohoutek, A., Pozdíšek J. (Eds.). *Kvalita píce z travních porostů*. Praha: VÚRV, 2005. 175–182. ISBN 80-86555-75-5.
- LOŠÁK M. (2015): Metodika práce s kolekce genetikých zdrojů travin. In: Holubec, V. et al. (eds.). *Rámcová metodika Národního programu konzervace a využívání genetikých zdrojů rostlin a agrobiodiverzity*. Praha: VÚRV, 2015. 280–295.
- MIKA V. et al. (1997): *Kvalita píce*. Praha: ÚZEI, 227 s. ISBN 80-96153-59-2.
- NERUŠIL P. et al. (2005) Vývoj kalibrace NIR platné pro dva různé soubory vzorků trav. In: Kohoutek, A., Pozdíšek J. (Eds.) *Kvalita píce z travních porostů*. Praha: VÚRV, 2005. 71–79. ISBN 80-86555-75-5.
- NOVÁK J. (2008): *Pasienky, lúky a trávniky*. I. vyd. Prievidza: Patria, 708 pp. ISBN 978-80-85674-23-1.
- RESCH R. (2007): Nasazení diodových spektrometrů na maloparcelní sklizeče k operativnímu vyhodnocování luční píce. In: Multifunkční obhospodařování a využívání travních porostů v LFA. Rapotín: VÚCHS, 51–59. ISBN 978-80-87144-00-8.
- SKLÁDANKA J. et al. (2014): *Pastva skotu*. I. vyd. Brno: Mendelova univerzita v Brně, 244 pp. ISBN 978-80-7509-145-1.
- ŠEVČÍKOVÁ M., ŠRÁMEK P., FABEROVÁ I. (2002): *Klasifikátor Trávy (Poaceae)*. Praha: VÚRV a OSEVA PRO s.r.o., VST Zubří, 36 pp.

# Hodnocení obsahu a složení silic u léčivých, aromatických a kořeninových rostlin

**Smékalová K., Kaffková K.**

*Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.*

**Oddělení genetických zdrojů zelenin, léčivých rostlin a speciálních plodin,**

smekalova@genobanka.cz

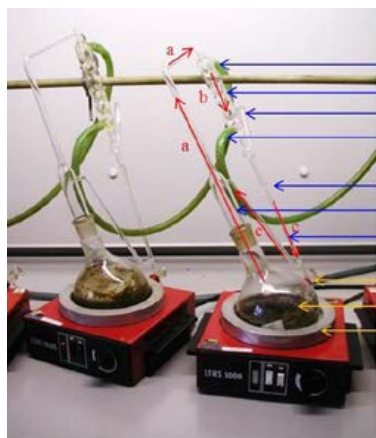
kaffkova@genobanka.cz

Léčivé, aromatické a kořeninové rostliny (LAKR) jsou člověkem využívány především kvůli obsahu svých účinných látek (HOSSEINZADEH a kol. 2015). Jako účinné látky označujeme celou řadu strukturně různorodých sloučenin, které se vyznačují nějakou biologickou aktivitou, tedy působením na jiné organismy nebo rostlinné či živočišné buňky (RUBIÓ a kol. 2013). Mezi účinné látky tak patří například sloučeniny, které podle jejich podobného chemického složení či biologických účinků řadíme do skupin jako alkaloidy, flavonoidy, glykosidy, hořčiny, kumariny, pryskyřice, saponiny, třísloviny apod. (CRAGG a NEWMAN 2001). Jednou z významných skupin biologicky účinných látek jsou také silice (dříve nazývány jako éterické nebo aromatické oleje) (PROPEZRI a kol. 2012).

Silice lze popsat jako olejovité směsi těkavých látek (DHIFI a kol. 2016). Některé druhy rostlin je vytváří jako svoji ochranu před býložravci, hmyzími škůdci a chorobami, na druhé straně se ale často jedná o vonné látky, které lákají hmyzí opylovače a jejich vytvářením rostliny zvyšují svoji šanci na opylení květů a tvorbu většího množství kvalitních semen. Produkci silic jsou typické rostliny z čeledi borovicovité, hluchavkovité, kakostovité, miříkovité, myrtoité, růžovité, vavřínovité a další (REMAN a ASIF HANIF 2016). Silice mají často antibakteriální, fungicidní a jiné dezinfekční účinky a své využití našly při výrobě humánních i veterinárních lé-

čiv, v potravinářském a kosmetickém průmyslu (NIETO 2017), i při výrobě tzv. botanických pesticidů (ISMAN a MACHIAL 2006). Jako nejčastější účinky různých druhů silic a možné použití siličnatých drog se uvádí expektorans (rozpuští hlen – kozlík, mateřídouška, anýz), korigens chuti a vůně (máta, lékořice, puškovec), dezinficiens (šalvěj, heřmánek), karminativum (proti nadýmání – máta, fenykl), diuretikum (močopudné – chmel, tymián), antiseptikum močové a urogenitální (křen), anthelmintikum (proti střevním parazitům – pelyněk, česnek), nervinum (uklidňuje – meduňka, levandule, dobromysl, třezalka, kozlík, chmel) atd. (PAULIA a SCHILCHERB 2004).

V současnosti je známo asi 3 000 různých druhů silic a obvykle se jedná o složité směsi látek. Nejčastěji jsou tvořeny terpeny a jejich deriváty, ale i uhlovodíky, alkoholy, aldehydy, ketony, karboxylovými kyselinami a dalšími látkami – postupně bylo detekováno více než 1 000 různých komponent (DHIFI a kol. 2016). Barva, vůně a účinky různých silic závisí na jejich přesném složení, tedy přítomnosti a vzájemném poměru jednotlivých komponent, a může se lišit jak u různých druhů rostlin, tak u různých rostlin stejného druhu (OLAJUYIGBE a ASHAFA 2014). Množství silice, kterou rostlina obsahuje, stejně jako její složení, se dále liší v různých částech rostliny, při různém stáří, vývojové fázi a zdravotním stavu rostliny, ovlivňují je



přívod chladicí kapaliny (voda z vodovodního řádu)  
 chladič  
 trubice pro čištění aparatury  
 odvod chladicí vody z chladiče (zde napojený na další destilační aparatury v sérii)  
 hladina vody, na které se kumuluje silice  
 trubice, kterou stoupá plynná směs vodní páry a silice k chladiči  
 cejchovaná trubice, která umožňuje odečíst objemu silice a vrací kondenzovanou vodu zpět do banky  
 kohout s výpustí silice po ukončení destilace  
 banka s rostlinným materiálem a destilovanou vodou; probíhá tu var  
 topné hnízdo – zdroj tepla

Cirkulace vody (červené šipky): a – vodní pára stoupá a unáší sebou silici; b – v chladiči vodní pára i silice kondenzují (změna skupenství z plynného na kapalné) a v kapkách stékají po stěnách trubice až k hladině, kde se lehčí silice kumuluje v plovoucí vrstvě; c – chladná voda se přepadem (princip spojených nádob) vrací zpět do banky.

Obr. 1: Destilace silice s vodní parou v laboratorních podmínkách

i půdní a klimatické podmínky prostředí, ve kterém rostlina roste a kolísají i v průběhu dne (LEE a DING 2016). Nejvýznamnější vliv na obsah i složení silice má ale samozřejmě genetika, a proto je obsah a složení silice důležitým znakem charakterizujícím jednotlivé druhy, odrůdy a další genetické materiály siličnatých rostlin (IQBAL a kol. 2003). Studium těchto látek umožňuje významné zhodnocení genetických zdrojů LAKR a jejich efektivního využití při dalším šlechtění či průmyslovém využití (COOPER a kol. 2014).

Obsah silice se v rostlinách pohybuje od 0,05 % (růže) (KOVATCHEVA a kol. 2011) až po 17 % (hřebíček) (GAYLOR a kol. 2013) a rostliny mohou silice vytvářet a kumulovat ve všech svých částech (kořeny, stonky, listy, květy, plody apod.) (JELEN 2012). Vyměšovací pletiva mohou mít charakter kanálků (chmel otáčivý), žláznatých chlupů či nádržek (rostliny z čeledi hluchavkovité), papil (heřmáněk pravý) apod. (LEE a DING 2016). Izolace silice se při průmyslovém zpracování aromatických rostlin nejčastěji provádí destilací vodní parou, lze ale využít i možnost extrakce organickými rozpouštědly

(methanol, etanol, aceton apod.), mechanické lisování (používá se u flaveda pomeranče – tzv. pomerančové kůry) nebo metodu *enfleurage* – studenou extrakci silice do hovězího loje a pak následnou extrakci alkoholem (RASSEM a kol. 2016). Tato metoda je však velmi nákladná a používá se pouze pro získávání velmi cenných a choulostivých silic (př. jasmínové) a jejich použití v parfumerii (SAGARIN a kol. 2013).

Při hodnocení obsahu silic LAKR se v laboratorních podmínkách používá metoda destilace s vodní parou (obr. 1). Princip metody spočívá v unášení těkavé silice horkou vodní parou do chladiče, kde obě látky kondenzují a silice, která se s vodou nemísí, pak díky své olejovité konzistenci zůstává většinou oddělena na vodní hladině. Při destilaci běžných LAKR (máta, mateřídouška, levandule, fenykl, kmín apod.) se z 30 g sušeného rostlinného materiálu získá průměrně 0,5 – 9 ml silice (MINISTERSTVO ZDRAVOTNICTVÍ ČR 2009).

Složení různých druhů silice se analyzuje metodou plynové chromatografie. Plynová chromatografie (anglicky *Gas chromatogra-*



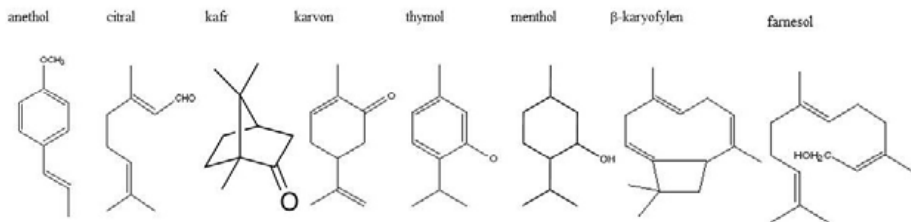
phy, zkratka GC) je separační metoda, která umožňuje oddělovat od sebe jednotlivé složky vzorků převedených do plynné fáze, aniž by došlo k jejich rozkladu. V případě analýzy složení silice se vzorek silice dávkuje do proudu nosného plynu, který jej dále unáší kolonou. V koloně se složky separují na základě různé schopnosti poutat se na stacionární fázi, tedy vrstvičku kapaliny nebo polymeru, kterou je potažen vnitřní povrch kolony. Různé složky silice jsou při průtoku kolonou zadržovány její stacionární fází různou silou a na konec kolony se tedy dříve dostanou látky méně zadržované. Složky opouštějící kolonu indikuje detektor. Vyhodnocovací zařízení zpracovává signál z detektoru, zakresluje chromatografickou křivku (chromatogram) a provádí její vyhodnocení – z časového průběhu intenzity signálu se určí druh a kvantitativní zastoupení jednotlivých složek. Kvalitativní vyhodnocení je založeno na stanovení retenčního času a retenčního objemu. Retenční čas je doba, která uplyne od nástřiku vzorku po dosažení maxima křivky (píku) a retenční objem je objem látky, která kolonou za tuto dobu protékla. Retenční čas a retenční objem jsou pro každou látku separovanou v daném systému charakteristické. Pro identifikaci jednotlivých složek se provádí porovnávání retenčních dat standardu a identifikované látky. Kvantitativní analýza, tedy stanovení množství konkrétních komponent silice a jejich vzájemný poměr se vyhodnocuje podle plochy jednotlivých píků.

Přesnější kvantitativní analýza silice vychází z kalibračních křivek, které se v daném systému zpracovávají na základě známých koncentrací čistých komponent pro každou látku zvlášť.

Plynová chromatografie může být dále doplněna hmotnostní spektrometrií (anglicky *Mass spectrometry*, zkratka MS). Toto spojení je označováno jako GC-MS nebo GC/MS a při analýze silic je výhodné k přesnější identifikaci různých derivátů terpenů a objasnění chemické struktury jejich molekul (KROFTA 2001).

Majoritními složkami silice aromatických druhů běžně rostoucích či pěstovaných v ČR jsou obvykle látky ze skupiny monoterpenů či seskviterpenů (DE SOUSA 2015). Mezi monoterpeny řadíme například anethol, citral, thujon, karvon, karvacrol, thymol, menthol, kafr a další, příkladem seskviterpenů je  $\beta$ -karyofylen, farnesol aj. (BAYALA a kol. 2014). Chemickou strukturu vybraných terpenoidů znázorňuje obrázek 2.

Množství silice, kterou aromatické rostliny obsahují, stejně jako její složení, se u jednotlivých druhů rostlin liší. Stručný příklad celkového obsahu silice a obsahu majoritních látek u některých známých druhů aromatických rostlin, které jsou uchovávány v kolekci genetických zdrojů LAKR na olomouckém pracovišti ÚRUV, v.v.i., uvádí tabulka 1. Jedná se však



Obr. 2: Strukturální vzorce vybraných terpenoidů

**Tab. 1: Příklady celkového obsahu a složení silice u vybraných druhů LAKR**

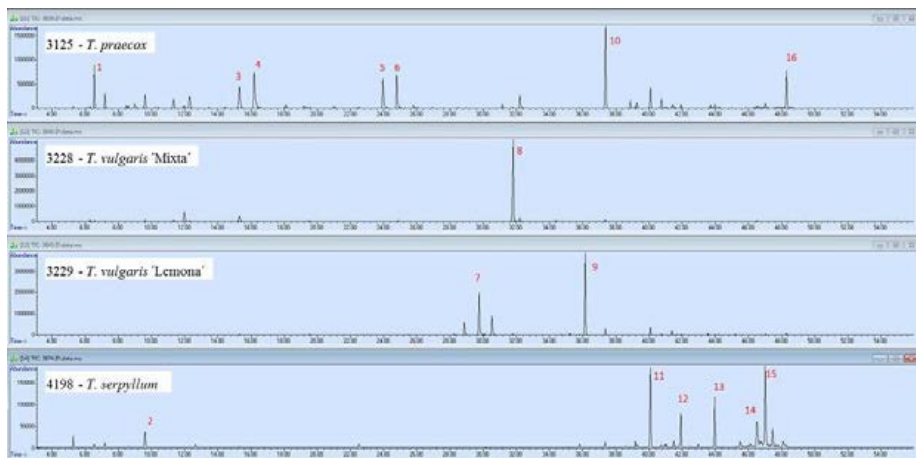
Druh	Obsah silice (%)	Majoritní látky a jejich podíl v silici
bazalka	0,5 - 1,5	linalool (30 - 80 %), estragol (0 - 45 %), eukalyptol (3 - 35 %), eugenol (0 - 35 %), bergamoten (0 - 11 %)
dobromysl	0,4 - 0,8	$\beta$ -karyofylen (5 - 25 %), sabinen (3 - 21 %), $\beta$ -kubeben (8 - 20 %), $\beta$ -ocimen (3 - 15 %), cis-sabinenhydrát (0 - 20 %), terpinen-4-ol (0 - 20 %), $\gamma$ -terpinen (0 - 17 %), eukalyptol (0 - 8 %)
levandule	1,0 - 9,0	linalool (13 - 70 %), linalyl acetát (7 - 40 %), lavandulyl acetát (1 - 19 %), $\alpha$ -terpineol (1 - 17 %), terpinen-4-ol (2 - 11 %), lavandulool (0,1 - 4 %)
máta	0,7 - 3,5	piperitenon oxid (0 - 65%), mentol (0 - 60%), karvon (0 - 50%), pulegon (0 - 50%), linalool (0 - 30%), linalyl acetát (0 - 30%)
mateřídouška	0,1 - 4,0	linalool (0 - 93 %), thymol (0 - 78 %), karvakrol (0 - 56 %), cymen (0 - 55 %), $\gamma$ -terpinen (0 - 30 %)
meduňka	0,1 - 0,2	citral (10 - 45 %), $\beta$ -karyofylen (10 - 30 %), $\beta$ - kubeben (10 - 20 %), $\alpha$ - kadinol (3 - 10 %), geraniol (0 - 10 %), citronelal (0 - 5 %), citronelol (0 - 4 %)
fenykl	0,1 - 10,0	fenchon (0 - 27 %), $\alpha$ -felandren (0 - 30 %), estragol (0 - 40 %), anethol (0 - 86 %), limonen (0 - 60 %)
kmín	2,0 - 7,0	karvon (45 - 80 %), limonen (40 - 50 %)
kopr	0,5 - 5,5	karvon (30 - 60 %), limonen (30 - 40 %), felandren (0 - 20 %)

opravdu jen o velmi obecný přehled, zatímco podrobné analýzy prokazují významné rozdíly v obsahu i složení silice i mezi různými druhy uvedených rodů, stejně jako mezi různými genotypy (rostlinami z planých populací, odrůdami apod.) a dokonce i mezi různými jedinci v rámci jednoho genotypu. Tyto rozdíly dobře znázorňují chromatogramy různých mateřídoušek – mateřídouška časná (*Thymus praecox*), tymián obecný (*Thymus vulgaris*, odrůdy 'Mixta' a 'Lemona') a mateřídouška úzkolistá (*Thymus serpyllum*) na Obr. 3.

Složení silice různých druhů aromatických rostlin a vzájemný poměr jednotlivých komponent má vliv jak na její chemické a fyzikální vlastnosti (např. barvu – obr. 4 a 5), tak na její biologickou účinnost. Platí však, že výsledný účinek té které silice se nerovná přímému součtu účinků jednotlivých jejích složek,

protože tyto látky se vzájemně ovlivňují (synergický či antagonický účinek) a působení majoritních složek může být v konečném výsledku zcela převáženo účinkem některé z minoritních látek (PAVELA 2015).

Hodnocení obsahu a složení silic u LAKR je nutnou podmínkou jejich následného využívání pro různé účely i šlechtění na vyšší obsah účinných látek. Znalost principů tvorby, a akumulace silice v různých částech a vývojových fázích rostlin, stejně jako znalost správného skladování rostlinných drog, metody destilace silice vodní parou a následného skladování získané silice jsou nutnými předpoklady pro úspěšné a efektivní pěstování, zpracovávání a využívání různých druhů aromatických rostlin a ve sbírkách genetických zdrojů LAKR hraje hodnocení obsahu a složení silice významnou roli.



Obr. 3: Ukázka chromatogramů, které dokumentují různorodost složení silice některých genotypů rodu *Thymus* ve sbírce genetických zdrojů LAKR olomouckého oddělení VÚRV, v.v.i. Očíslované píky vyjadřují obsah jednotlivých složek silice: 1 -  $\alpha$ -pinen, 2 -  $\beta$ -myrcen, 3 -  $\gamma$ -terpinen, 4 - thujanol-4, 5 - borneol, 6 - terpinen-4-ol, 7 - geraniol, 8 - thymol, 9 - nerol, 10 -  $\beta$ -karyofylen, 11 - kubenol, 12 -  $\beta$ -trans-nerolidol, 13 -  $\beta$ -karyofylen oxid, 14 -  $\alpha$ -kadinol, 15 -  $\gamma$ -murolen, 16 - 4-epi-kubedol.



Obr. 4: Barva mateřídouškové silice získané destilací se pohybuje od světle žluté až po světle hnědou.



Obr. 5: Barva silice řebříčku chlumního (*Achillea collina*) má barvu modrou. Intenzita modré barvy stoupá s obsahem chamazulenu v silici.

## Seznam použité literatury

- BAYALA B., BASSOLÉ I.H.N., SCIFO R., GNOULA C. (2014): Anticancer activity of essential oils and their chemical components: A review. *American Journal of Cancer Research*, 4(6): 591-607. ISSN 2156-6976.
- COOPER M., MESSINA C.D., PODLICH D., TOTIR L.R., BAUMGARTEN A., HAUSMANN N.J., WRIGHT D., GRAHAM G. (2014): Predicting the future of plant breeding: complementing empirical evaluation with genetic prediction. *Crop and Pasture Science*, 65(4): 311-336. DOI: 10.1071/CPI4007. ISSN 1836-0947.
- CRAGG G.M., NEWMAN D.J. (2001): Medicinals for the Millennia: The Historical Record. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 953a(1): 3-25. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2001.tb11356.x. ISSN 0077-8923.

De SOUSA D.P. (ed) (2015): *Bioactive Essential Oils and Cancer*. I. Switzerland: Springer, Cham., ISBN 978-3-319-19143-0.

DHIFI W., BELLILI S., JAZI S., BAHLOUL N., MNIF W. (2016): Essential Oils' Chemical Characterization and Investigation of Some Biological Activities: A Critical Review. *Medicines*, 3(4). DOI: 10.3390/medicines3040025. ISSN 2305-6320.

GAYLOR R., MICHEL J., PANJA R., FANJA F., PASCAL D. (2013): Effects of phenological stages on yield and composition of essential oil of *Syzygium aromaticum* buds from Madagascar. *International Journal of Basic and Applied Sciences*, 2(4): 312-318. DOI: 10.14419/ijbas.v2i4.1100. ISSN 2227-5053.

HOSSEINZADEH S., JARARIKUKHDAN A., HOSSEINI A., ARMAND R. (2015): The Application of Medicinal Plants in Traditional and Modern Medicine. *International Journal of Clinical Medicine*, 6(9): 635-642. DOI: 10.4236/ijcm.2015.69084. ISSN 2158-284X.

ISMAN M. B., MACHIAL C. M. (2006): Pesticides based on plant essential oils: from traditional practice to commercialization. *Advances in Phytomedicine*, 3(1): 29-44. DOI: 10.1016/S1572-557X(06)03002-9. ISBN 9780444522412.

IQBAL Z., HUSSAIN I., HUSSAIN A., YASIN ASHRAF M. (2003): Genetic variability to essential oil contents and composition in five species of *Eucalyptus*. *Pakistan Journal of Botany*, 35(5): 843-852.

JELÉN H. (ed.) (2012): *Food flavors: chemical, sensory and technological properties*. Boca Raton, Fla. CRC Press, 492 pp. ISBN 978-143-9814-918.

KOVATCHEVA N., ZHELJAZKOV V. D., ASTATKIE T. (2011): Productivity, Oil Content, Composition, and Bioactivity of Oil-bearing Rose Accessions. *HortScience*, 46(5): 710-714. ISSN 0018-5345.

KROFTA J. (2001): *Návody pro laboratorní cvičení z analytické chemie II*. 6. přepr. vyd. VŠCHT Praha, 165 pp. ISBN 80-708-0451-3.

LEE Y. L., DING P. (2016): Production of Essential Oil in Plants: Ontogeny, Secretory Structures and Seasonal Variations. *Pertanika Journal of Scholarly Research Reviews*, 2(1): 1-10.

MINISTERSTVO ZDRAVOTNICTVÍ ČR (2009): *Český lékopis 2009 (čl. 2009)*. Evropská část III. 3. díl. I. vyd. Praha: Grada Publishing, 2009. 2396 pp. ISBN 80-247-0464-1.

NIETO G. (2017): Biological Activities of Three Essential Oils of the Lamiaceae Family. *Medicines*, 4(3): 63. DOI: 10.3390/medicines4030063. ISSN 2305-6320.

OLAJUYIGBE O., ASHAF A. (2014): Chemical Composition and Antibacterial Activity of Essential Oil of *Cosmos bipinnatus* Cav. Leaves from South Africa. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 13(4): 1417 - 1423.

PAULIA A., SCHILCHERB H. (2004): Specific Selection of Essential Oil Compounds for Treatment of Children's Infection Diseases. *Pharmaceuticals (Basel)*, 1(1): 1-30. DOI: 10.3390/ph1010001. ISSN 1424-8247.

PAVELA R. (2015): Acute toxicity and synergistic and antagonistic effects of the aromatic compounds of some essential oils against *Culex quinquefasciatus* Say larvae. *Parasitology Research*, 114(10): 3835-3853. DOI: 10.1007/s00436-015-4614-9.

PROPERZI A., ANGELINI P., BERTUZZI G. VENANZONI R. (2012): Some Biological Activities of Essential Oils. *Medicinal & Aromatic Plants*, 2(5): 136. DOI: 10.4172/2167-0412.1000136. ISSN 21670412.

RASSEM H.H.A., NOUR A.H., YUNUS R.M. (2016): Techniques For Extraction of Essential Oils From Plants: A Review. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 10(16): 117 - 127.

REHMAN R., ASIF HANIF M. (2016): Biosynthetic Factories of Essential Oils: The Aromatic Plants. *Natural Products Chemistry & Research*, 4(4): 227. DOI: 10.4172/2329-6836.1000227. ISSN 23296836.

RUBIÓ L., MOTILVA M.J., ROMERO M.P. (2013): Recent Advances in Biologically Active Compounds in Herbs and Spices: A Review of the Most Effective Antioxidant and Anti-Inflammatory Active Principles. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53(9): 943-953. DOI: 10.1080/10408398.2011.574802. ISSN 1040-8398.

SAGARIN E., REDGROVE H.S., VERRILL H. (2013): *A Guide to Perfume Production: A Selection of Vintage Articles on the Methods and Ingredients of Perfumery*. I. USA: Read Books, ISBN 9781473390775.

# Srovnání obsahu vybraných pomologických znaků a nutričních látek u evropských a asijských odrůd meruněk

Nečas T., Göttingerová M., Wolf J., Kiss T., Ondrášek I.

Mendlova univerzita v Brně

Zahradnická fakulta

tomas.necas@mendelu.cz

Na Zahradnické fakultě v Lednici se meruňky v genofundové kolekci uchovávají a využívají již od 60. let minulého století zásluhou výzkumné činnosti pracovníků tehdejší Katedry ovocnictví a vinohradnictví při Vysoké škole zemědělské v Brně (později MZLU a dnešní Mendelově univerzitě v Brně). U zrodu kolekce meruněk byli významní ovocnáři ústavu a to především prof. Miloslav Vávra, Ing. František Hladík a zejména prof. Zdeněk Vachůn. V kolekci jsou zastoupeny odrůdy všech ekologicko-geografických skupin meruněk, významné klony odrůdy Velkopavlovická a také velká skupina genotypů, představující donory významných vlastností, využívaných pro šlechtění nových odrůd. Celkový stav kolekce čítá 377 položek zapsaných v databázi GRIN Czech 1.9.1 (za rok 2017).

Z historického hlediska je meruňka novodobým ovocným druhem. Meruňka obecná (*Prunus armeniaca* L.) se do střední Evropy dostala až v 1. století n. l. (což dokládají archeologické nálezy v okolí města Linz v Rakousku). Slované meruňku v raném středověku nepěstovali, i když se spekuluje, že se na našem území pěstovala od 9. století v klášterních a šlechtických zahradách. V Maďarsku se pěstování eviduje od 10. století, na našem území až od 15. – 16. století. První písemné zmínky o výskytu meruněk na území ČR pochází



Obr. 1: Čínská odrůda s hladkými plody Juan-Sin

z 15. století z roku 1427 (autor Jan Pittekart z Hradiště u Tuchlovic). Další písemná zmínka pochází z roku 1563 od Mathiolliho v publikaci „Herbář aneb Bylinář“. Pěstování meruněk na území dnešní ČR bylo objektivně potvrzeno až v 17. století. V 18. století jsou již známy některé odrůdy meruněk jako např. Bohutická. První kolekce meruněk sloužící k poznávání vlastností a zejména jako zdroj k rozmnožování byla založena již v 18. století v Brně-Lužánkách (NĚMEC 1595, JANSON 1996, VACHŮN a kol. 2001, BERANOVÁ 2012).

Po obsahové stránce jsou meruňky bohatým zdrojem provitamínu A, jehož obsah je ve srovnání s ostatními druhy ovoce až 10x

vyšší a dále jsou zdrojem vitamínů ze skupiny B. Naopak obsah vitamínu C je poměrně nízký. Z minerálních a stopových prvků obsahují zejména draslík, železo, vápník, hořčík, mangan, flór, kobalt, bór a měď. Výhodou je nízký obsah sodíku a vysoký obsah draslíku, který pozitivně působí při chorobách krevního tlaku a ledvin. Hlavní podíl z pohledu zastoupení kyselin v plodech tvoří kyselina citrónová a jablečná. Významnou složku tvoří celá řada bioaktivních látek společně vytvářejících vysokou antioxidační kapacitu. Sušené plody meruněk jsou tradičním a významným zdrojem energie, čerstvé plody některých odrůd pro sušení mají až 25 % sacharidů. Sušené jsou významným zdrojem proteinů (až od 5%) a železa (KOPEC 1998).



Obr. 2: Čínská odrůda *Mai-Che-Sin*

Z hlediska zdravotního významu jsou díky nízkému obsahu kalorií (cca 48-50 kcal/100 g) vynikající potravinou při odtučňovací dietě. Nejdůležitější složkou čerstvých i sušených meruněk je provitamin A. Díky tomu mají vysokou terapeutickou hodnotu především při diagnózách nemocí očí. Jejich konzumace se doporučuje v případech suchých spojivek, při jejich chronickém podráždění nebo svědění, ztrátě ostrosti vidění a šerosleposti. Působí proti anémii (způsobené nedostatkem žele-

za) – obsah železa v čerstvých plodech není významný, ale v sušených ano. Využívají se při léčení kožních onemocnění a onemocnění sliznice, díky provitaminu A zvyšují odolnost vůči infekcím a působí jako antiseptikum. Doporučují se při chronickém zánětu sliznice hltanu, zánětu přínosných dutin a při ekzémech.

Předmětem konzumace jsou i sladká jádra (JANICK a PAULL 2008). V semeni meruněk se vyskytují kromě kyanogenního glykosidu amygdalinu (2%), u kterého se poukazuje na protinádorové účinky (vitamín B17 – laetryl), také jiné steroidní sloučeniny a olej s převahou kyseliny olejové (73,4 %), linolenové (20 %), palmitové (3,5 %), stearové (2 %) a myristové (1,1 %). Z aminokyselin je zastoupena mimo jiné především kyselina asparťamová, glutamová, treonin, serin, prolin, alanin aj. Z léčivých účinků jader meruněk lze pro příklad uvést potlačení kašle a zmírňování astmatu, působí také proti zácpě. Jádra mají antibakteriální, analgetické a antiparazitické účinky (VALÍČEK 2009).

Přestože pěstování meruněk na území ČR v posledních letech provází značné problémy, jsou meruňky stále vysoce žádané ovoce zejména pro pozitivní zastoupení nutričních látek. Sortiment pěstovaných odrůd dnes čítá tisíce odrůd z různých eko-geografických skupin pěstovaných v různých částech světa. Pomologická variabilita plodů stejně jako požadavky na podmínky pěstování jsou často velmi rozdílné. Cílem hodnocení genofondu bylo nastínit rozdíly v obsahu vybraných látek v plodech meruněk mezi odrůdami evropského a asijského typu. Obě skupiny jsou často pomologicky výrazně odlišné a doposud nebyly publikovány údaje, které by charakterizovaly kvalitativní i kvantitativní rozdíly u obsahových látek obou skupin. Poznání v této oblasti pomůže při hledání a výběru vhodných donorů požadovaných znaků s ohledem na obsahové látky.

## Metody hodnocení sortimentu meruněk

Plody pro hodnocení a analýzu byly sklizeny z genofondové kolekce meruněk na Zahrádnické fakultě v Lednici (ZF). Jedná se o výsadbu založenou v roce 1998-1999, ve sponu 5x3 m. Výsadba je každoročně doplňována o regenerované stromy evidovaných položek a o nové položky (genotypy). Pěstitelským tvarem je volně rostoucí zákrsek bez terminálu na podnoži meruňkový semenáč. Z každé odrůdy je vysazeno vždy 5 stromů. Kolekce je aktuálně bez závlahy, od roku 2019 bude kompletně pod závlahou. Meziřadí je zatravněné, pravidelně mulčované. Ošetřování výsadby je standardní: provádí se jarní prosvětlovací řez, ochrana proti přezimujícím škůdcům, monitoring úžehu, gnomonii, mšicím a merám. Stromy jsou pravidelně vizuálně sledovány na přítomnost šarky švestky (PPV) a evropské žloutenky peckovin (ESFY).

Kolekce meruněk se nachází na pozemcích ZF MENDELU v obci Lednice v Jihomoravském Kraji, v nadmořské výšce 164 m n. m. Jedná se o jednu z nejteplejších lokalit v ČR, kde průměrné roční teploty dosahují 9,1 °C a průměrný úhrn srážek je 422 mm (1960-1991), průměrná teplota v letech 2010 - 2017 dosahovala již 10,7°C a 396,2 mm srážek. Ve-



Obr. 4: Čínská odrůda *Moi-Chua-Sin* s nesoouměrnými plody podobná odrůdě *Hargrand*



Obr. 3: Čínská odrůda *In-Bei-Sin* s barevně velmi atraktivními plody

getační doba pro danou oblast trvá od 19. 4. do 19. 10., což představuje 178 dní.

Odrůdy meruněk byly rozděleny podle pomologického charakteru **na odrůdy evropského typu** (bez vlivu geografického původu): Goldrich, Hacıhaliloğlu, Kioto, Koliza rife, Lasgerdii Mashad, Leskora, Marlen (klon odrůdy Velkopavlovická), Murgab, Pinkcot, Samurai, Strepet, Šalah a **odrůdy pomologicky asijského charakteru**: Achrori, Gvardějskij, Chuan-Sin, In-Bei-Sin, Jin-Na-Li, Juan-Sin, Liaoning, Mai-Huang, Mai-Che-Sin, Moi-Chua-Sin, Sai-Mai-Ti, Wan-Xing.

**Vybrané pomologické znaky** se hodnotily podle Klasifikátoru pro meruňku *P. armeniaca* Mill., který byl vytvořen pro evidenci víceletých výsledků studia genetických zdrojů kulturních rostlin (NITRANSKÝ 1992). Pomologické znaky (hmotnost, refrakce, podíl pecky na plodu a chuť dužniny) byly vždy hodnoceny u 10 plodů. Chuť plodu byla hodnocena bodově podle klasifikátoru, kdy 1 znamená nejhorší a 9 nejlepší. Hmotnost plodů byla standardně vážena laboratorními váhami na dvě desetinná místa gramu.

Procentický podíl pecky na hmotnosti plodu byl vypočten ze vztahu:

$$\frac{\text{(hmotnost pecky (g))}}{\text{(hmotnost plodu (g))}} \times 100 = \%$$

Refraktometrické stanovení rozpustné sušiny probíhalo s využitím Abbého refraktometru. Měření bylo tzv. přímým obsah refraktometrické sušiny (hmotnostní procenta rozpuštěného cukru).

Stanovení veškerých titrovatelných kyselin probíhalo potenciometrickou titrací, která je založena na sledování změn elektromotorického napětí článku, jenž vzniká během titrace (VORLOVÁ 2014). Do kádinky je naváženo 30 g homogenizovaného vzorku, přidá se 10 ml destilované vody a ponoří se kombinovaná elektroda. Za stálého míchání, které zajišťuje elektromagnetická míchačka, se titruje roztokem 0,1 M NaOH do pH 8,1 (GOLIÁŠ a NĚMCOVÁ 2009).

### **Stanovení antioxidační kapacity a obsahu fenolických látek**

Stanovení antioxidační kapacity i množství fenolických látek bylo provedeno z metanolového výluhu rostlinného pletiva. Bylo zhomogenizováno 5 g dužniny a přidáno 20 ml 75 % metanolu. Takto připravený extrakt byl uchován při pokojové teplotě po dobu 24 hodin. Následně byl extrakt filtrován přes filtrační papír a doplněn na objem 50 ml 75 % metanolem (ZBÍRAL 2005).

Pro stanovení celkového obsahu fenolických látek se do 50 ml odměrné baňky napipetuje 9 ml destilované vody, 1 ml metanolového výluhu a 1 ml Follin-Ciocalteuova činidla. Po 10 minutách bylo přidáno 10 ml 7 % uhličitanu sodného ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) a baňka se za stálého míchání doplnila po rysku destilovanou vodou. Absorbance byla měřena po 90 minutách při



Obr. 5: Šalah odrůda s krémovou dužninou, s vysokým obsahem cukru vhodná na sušení a zpracování

vlnové délce 765 nm. Odečet byl proveden proti standardu kyseliny gallové (NEUGEBAUEROVÁ a VÁBKOVÁ 2011).

Stanovení celkové antioxidační kapacity je založeno na schopnosti stabilních volných radikálů 1,1-difenyl-2-pikrylhydrazylu (DPPH) reagovat s donory vodíku. Bylo použito 200  $\mu\text{l}$  vhodně zředěného vzorku (20  $\mu\text{l}$  výluhu + 180  $\mu\text{l}$  75 % metanolu) a 3,8 ml reakčního roztoku DPPH. Absorbance se měřila po 30 minutách od začátku reakce při vlnové délce 515 nm. Jako standard byl použit Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina, TAC), proto je celková antioxidační kapacita vyjádřena v mg ekvivalentu Troloxu na 1 kg čerstvé hmoty ( $\text{mgTAC} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) (NEUGEBAUEROVÁ a VÁBKOVÁ 2011). Zjištěná data byla analyzována Statistickým softwarem Statistika 12 s použitím analýzy rozptylu a Tukeyova HSD testu.

### **Hodnocení pomologických znaků**

*Hmotnost plodu a procentický podíl pecky na hmotnosti plodu*

Ze zjištěných výsledků vyplývá, že v klimatických podmínkách roku 2018 v nezavla-



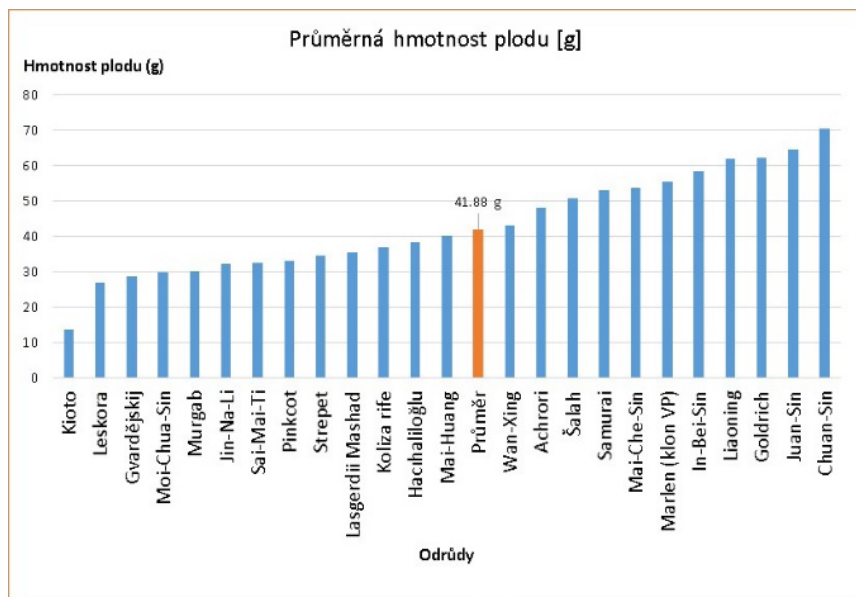
žované výsadbě dosáhly největší hmotnosti plodů z prvních pěti hned 4 čínské odrůdy (asijského typu). Nejvyšší hmotnosti plodů bylo dosaženo u odrůd Juan-Sin (průměrně 64,71 g) a Chuan-Sin (70,62 g). Třetí odrůda (první evropského typu) byla odrůda Goldrich (původ USA) s hmotností 62,4 g (Graf 1). Statisticky zjištěné rozdíly mezi odrůdami jsou vysoce průkazné. Odrůdy byly zařazeny do 5 homogenních podskupin. Rozdíl v průměrné hmotnosti mezi evropskou pomologickou skupinou a asijskou je 7,79 g ve prospěch asijských odrůd (47,05 g / 39,26 g).



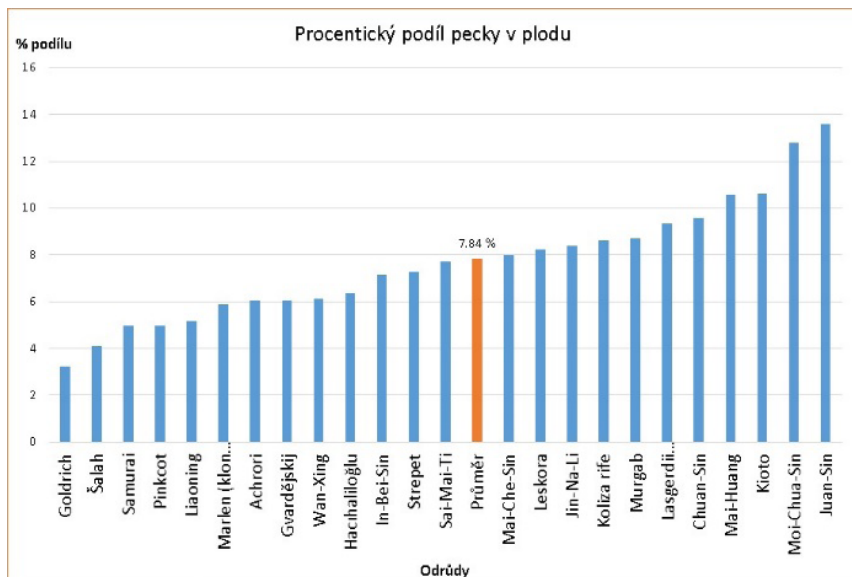
Obr. 6: Achrori velmi raná odrůda původem ze země Sovětského svazu

Procentický podíl pecky na hmotnosti plodu charakterizuje využitelný podíl dužniny. Výsledky ukazují, že podíl pecky je u plodů evropského typu průměrně 6,86 %, což je o 1,57 % méně než u odrůd asijského typu (8,43 %). Průměrný podíl pecky dosahoval 7,84 %. Zjištěné rozdíly jsou statisticky vysoce průkazné,

odrůdy byly zařazeny do šesti homogenních podskupin. Z pěti odrůd s největším podílem pecky byly 4 odrůdy asijského typu a odrůda Kioto (10,6 %). Naopak z pěti odrůd s nejnižším podílem byly 4 evropského typu a jedna asijského typu (Liaoning 5,19 %) (Graf 2).



Graf 1: Hodnoty průměrné hmotnosti plodů po sklizni (g)



Graf 2: Podíl pecky na hmotnosti plodu (%)

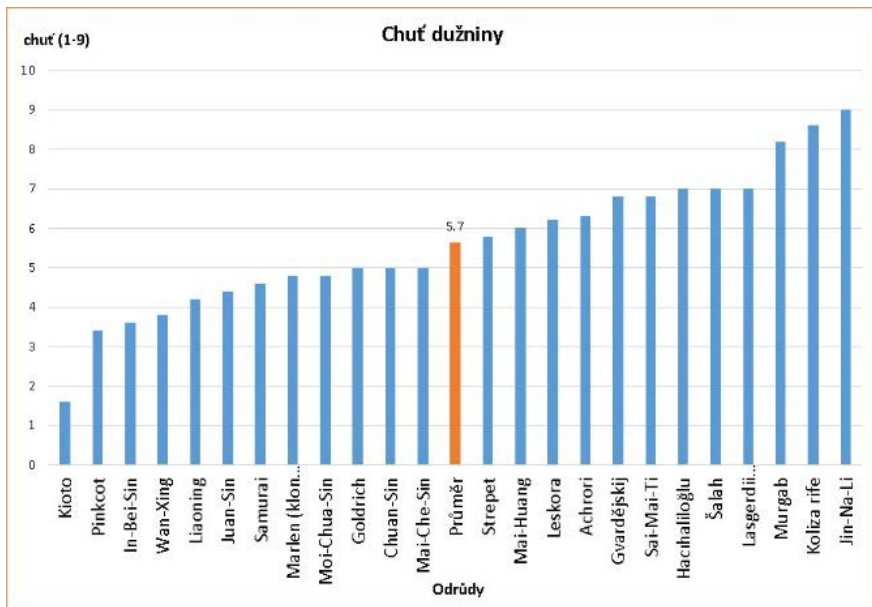
## Chut' dužniny a refraktometrická sušina

Pro využití zahraničních odrůd, zejména těch asijských, je důležité znát jejich chuťové a kvalitativní parametry. Je to zejména proto, že chuťové návyky jsou v asijských zemích významně odlišné od těch evropských. Je zajímavé, jak subjektivní hodnocení chuti koresponduje s hodnotami sladkosti, respektive refraktometrické sušiny.

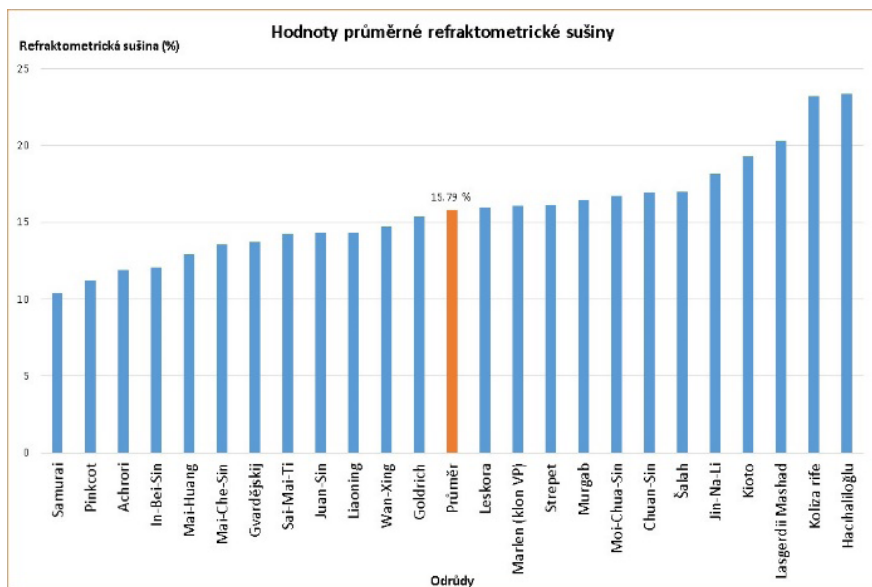
Bylo zjištěno, že jako nejlépe chuťově hodnocené odrůdy byly odrůdy s vyšším obsahem cukru, většinou primárně určené pro zpracování – sušení (Hachililoğlu, Šalah, Koliza rife, Murgab, Lasgerdii Mashad). Jako nejlepší byla ale vyhodnocena čínská odrůda Jin-Na-Li. Poměrně zajímavé a současně korespondující se současným stavem šlechtění je také umístění dvou nejhůře hodnocených odrůd patřících k nejvýznamnějším komerčním odrůdám v Ev-

ropě (Kioto a Pinkcot). Mezi deset nejhůře hodnocených odrůd patří také významné komerční odrůdy Samurai a Goldrich (Graf 3). Chut' (dužniny) je subjektivní znak, který každý hodnotitel vnímá individuálně a závisí na mnoha vnějších faktorech (stáří, pohlaví, individuálním rozpoložení, zdravotním stavu apod.). Výsledky v rámci realizovaných studií nelze zcela objektivně srovnávat.

Při hodnocení refraktometrické sušiny se ukázalo, že odrůdy s nejvyššími hodnotami refrakce přibližně korespondují s odrůdami, které byly hodnoceny jako nejlepší po chuťové stránce. Výjimkou je pouze odrůda Kioto, která byla po chuťové stránce hodnocena jako nejhorší, přestože má nadprůměrné hodnoty refrakce (19,3 %). Průměrné hodnoty refraktometrické sušiny dosahují 15,79 %. Rozdíl mezi odrůdou s nejnižší a nejvyšší refrakcí dosahuje téměř 13,4 %. Průměrně je skupina



Graf 3: Rozdělení odrůd podle chuti



Graf 4: Zjištění průměrné hodnoty refraktometrické sušiny v plodech

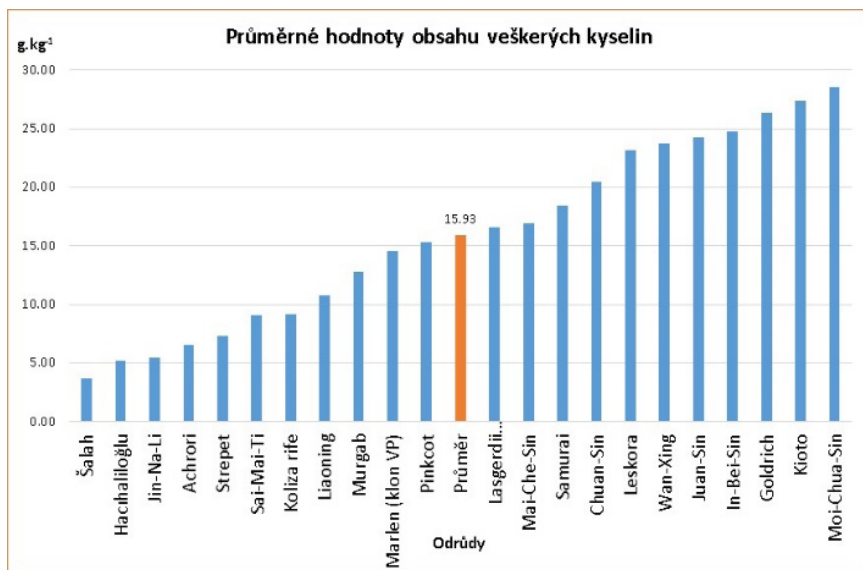
odrůd evropského typu sladší o 2,63 % (evropské dosáhli průměrné refrakce 17,07 %, asijské pak 14,48 %) (Graf 4). Rozdíly v získaných hodnotách jsou statisticky vysoce průkazné, odrůdy byly rozděleny do pěti homogenních podskupin.

Při hodnocení rozpustné sušiny, tedy subjektivního vjemu sladkosti ovoce, má velký vliv také vzájemný poměr rozpustné sušiny a obsahu veškerých kyselin. Vzájemný poměr „sladkokyselosti“ je významným parametrem hodnocení kvality plodů. VANGDAL (1980) uvádí jako prahovou hodnotu refrakce 11,3 % pro hrušky, 12,5 % pro švestky a 14,2 % pro třešně. V práci CALISKANA et al. (2012) byly publikovány výrazně nižší hodnoty refraktometrické sušiny u plodů meruněk, které se pohybovaly od 9,6 % – 14,6 %, přestože se jedná o pěstitelsky teplou oblast. Tyto hodnoty jsou u nás dosahovány u standardních odrůd v nepříliš klimaticky příznivých letech.

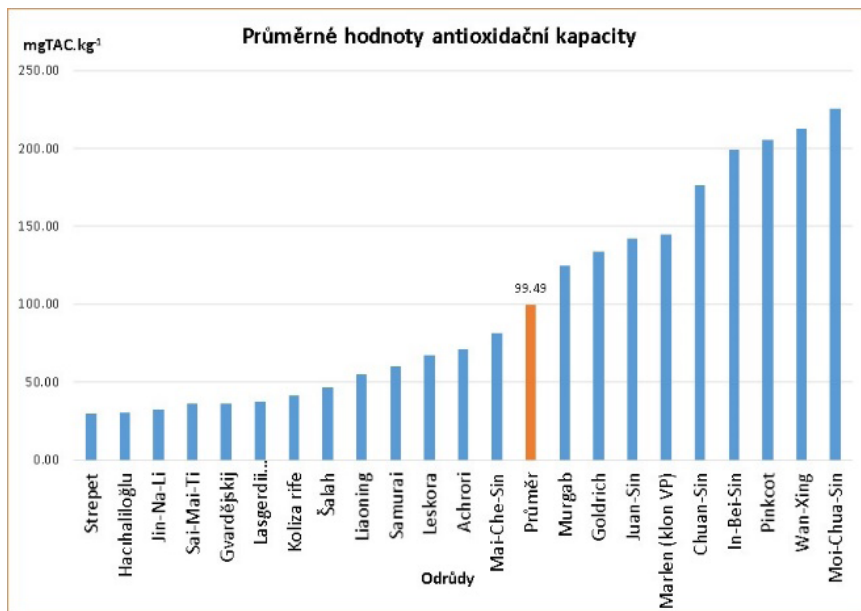
## Stanovení celkových titrovatelných kyselin

Jak již bylo uvedeno, celkový dojem z chuti je tvořen vzájemným poměrem sladkosti a kyselosti (poměrem sacharidů a kyselin). Nicméně podle VANGDALA (1980) je například obsah kyselin v hruškách nízký a nemá vliv na vnímání chuti.

Opět poměrně zajímavé zjištění je to, že odrůdy, které byly hodnoceny po chuťové stránce velmi dobře, mají poměrně nízký obsah kyselin. Nejnížší obsah kyselin byl zaznamenán u odrůdy Šalah (3,69 g.kg<sup>-1</sup>) a dále u odrůd Hachihaliloglu a Jin-Na-Li (5,16 respektive 5,48 g.kg<sup>-1</sup>). Průměrná hodnota testovaného souboru dosahuje 15,93 g.kg<sup>-1</sup>. Rozdíl v kyselosti asijských odrůd je zanedbatelně vyšší než u evropských odrůd (15,99 g.kg<sup>-1</sup> u asijských a 15,88 g.kg<sup>-1</sup> u evropských odrůd). Rozdíly ve zjištěných hodnotách jsou statisticky vysoce průkazné, variabilita



Graf 5: Průměrné hodnoty obsahu celkových titrovatelných kyselin



Graf 6: Průměrné hodnoty celkové antioxidační kapacity

zjištěných dat je poměrně široká, odrůdy byly rozděleny do 12 homogenních podskupin.

### Stanovení antioxidační kapacity a hodnot fenolických látek

Nejvyšší hodnoty antioxidační kapacity v čerstvých plodech byly zaznamenány u plodů odrůdy Moi-Chua-Sin (225,46 mgTAC.kg<sup>-1</sup>), odrůdy Wan-Xing (212,65 mgTAC.kg<sup>-1</sup>) a odrůdy Pinkcot (205,72 mgTAC.kg<sup>-1</sup>). Nejnižší celková antioxidační kapacita byla naměřena u plodů odrůd Strepet a Hachaliloglů (29,76 a 30,13 mgTAC.kg<sup>-1</sup>). Při srovnání obou skupin se ukázalo, že vyšší celkovou antioxidační kapacitu mají asijské odrůdy (průměrně 115,20 mgTAC.kg<sup>-1</sup>), kdežto evropské odrůdy mají hodnotu průměru nižší (83,78 mgTAC.kg<sup>-1</sup>). Rozdíly mezi odrůdami byly potvrzeny jako statisticky vysoce průkazné a seřazeny do jedné homogenní podskupiny. Průměrná hodnota celkové an-

tioxidační kapacity testovaného souboru meruněk dosahovala 99,49 mgTAC.kg<sup>-1</sup> (Graf 6). Oproti jinému ovoci jsou tyto hodnoty velmi nízké. Například hodnoty antioxidační kapacity v čerstvých plodech zimolezu a hlohu se pohybují na úrovni 12 392,36 mgTAC.kg<sup>-1</sup> respektive 12 199,21 mgTAC.kg<sup>-1</sup> (GÖTTINGEROVÁ 2018).

Hodnoty fenolických látek byly měřeny ve třech rozdílných vzorcích, a to v dužnině, slupce a ve směsném vzorku. Z výsledků pak vyplývá, že největší průměrné zastoupení fenolických látek je ve slupce (průměrně 1461,94 mg ekvivalentu GAE.100 g<sup>-1</sup>) a naopak nejméně pak v dužnině plodu (průměrně 715,53 mg ekvivalentu GAE.100 g<sup>-1</sup>). Při posouzení obsahu fenolických látek mezi oběma skupinami meruněk se ukázalo, že vyšší zastoupení těchto látek ve slupce je u asijské skupiny meruněk (průměrně 1509,79 mg ekvivalentu GAE.100 g<sup>-1</sup>), u evropské skupiny se hodnota dosáhla prů-

měru 1414,08 mg ekvivalentu GAE.100 g<sup>-1</sup>. Rozdíl obsahu v dužnině byl významnější; a to 926,13 mg ekvivalentu GAE.100 g<sup>-1</sup> u asijských k 504,94 mg ekvivalentu GAE.100 g<sup>-1</sup> u evropských odrůd. Zajímavou studií zaměřenou i na antioxidační kapacitu se zabýval WANI et al. (2017), který zkoumal hodnoty fenolických látek u sušených meruněk a hodnoty se pohybovali v rozmezí od 8,77 do 12,11 mg GAE.g<sup>-1</sup>.

Nejvyšší hodnoty fenolických látek ve směsném vzorku vykazovaly čínské odrůdy Moi-Chua-Sin, In-Bei-Sin a Wan-Xing s hodnotami 2093,08; 2208,66; 2739,18 mg ekvivalentu GAE.100 g<sup>-1</sup>. Naopak nejmenší hodnoty obsahu fenolických látek vykazovaly odrůdy „k sušení“ Hacıhaliloğlu a Koliza rife (174,27 a 191,36 mg ekvivalentu GAE.100 g<sup>-1</sup>). Průměrné hodnoty ve směsném vzorku se pohybovaly na úrovni 874,21 mg ekvivalentu GAE.100 g<sup>-1</sup>. Rozdíly mezi zjištěným hodnotami jsou opět vysoce statisticky průkazné.

## Závěr

Při hledání vhodných odrůd zemědělských plodin pro pěstitelské podmínky ČR zejména v období probíhajících klimatických změn, je vhodné využívat genofondové kolekce daných druhů. Obecně jsou meruňky v asijských podmínkách vystaveny větším výkyvům počásí a změnám z našeho pohledu často až extrémním. Proto jsou z pěstitelského hlediska vhodné genetické zdroje skýtající potenciál zlepšení pěstování meruněk v probíhajících změnách klimatu na našem území, právě v Asii. Z tohoto důvodu bylo započato s jejich užším testováním zaměřeným na zjišťování vlastností tak, aby mohli být využity přímo pro produkční pěstování nebo pro šlechtění.

Ze zjištěných výsledků vyplývá, že prozatím dostupný poměrně omezený sortiment přibližně 20 genotypů (ne všechny jsou zahrnuty v této studii) skýtá významný potenciál v ob-

lasti kvalitativních i kvantitativních vlastností plodů meruněk.

Jak je z výsledků patrné, nejlépe hodnocenou odrůdou testovaného souboru po chuťové stránce je čínská odrůda Jin-Na-Li. Nadprůměrně bylo hodnoceno celkem 5 asijských odrůd. Naopak propadly moderní komerční odrůdy, jako je Pinkcot a Kioto.

Nejvyšší hmotnost plodů byla dosažena v suchých podmínkách Lednice opět u čínské odrůdy Chuan-Sin, přičemž 7 odrůd z 11 nadprůměrně hodnocených bylo opět asijských. Nejhůře opět dopadly evropské standardní odrůdy, jako je Kioto a Leskora (u Leskory je malý plod standardním znakem). Hodnoty refraktometrické sušiny jsou do jisté míry ovlivněny primárním uplatněním odrůdy, proto nejvyšších hodnot dosáhly meruňky určené k sušení, jako je Hacıhaliloğlu nebo Koliza rife. Nicméně ve skupině nadprůměrně hodnocených jsou opět zastoupeny tři asijské odrůdy. A opět některé evropské standardní odrůdy zcela propadly (Samurai a Pinkcot). Obsah kyselin jako faktorů také ovlivňujícího chuť byl nejvyšší u čínské odrůdy Moi-Chua-Sin. Celkem 50 % asijských odrůd dosáhlo nadprůměrných hodnot. Naopak nejnižší obsah kyselin měly odrůdy pro sušení Šalah a Hacıhaliloğlu.

Podíl pecky na hmotnosti dužniny vyjadřuje využitelnost plodu. Plody s velkou peckou jsou v případě průmyslového zpracování nebo sušení méně ekonomicky využitelné (velký odpad z váhy ovoce). V tomto znaku jsou asijské odrůdy prokazatelně horší, kdy šest odrůd z celkem dvanácti asijských testovaných mělo nadprůměrně velkou pecku. Nejlépe naopak dopadly komerční odrůdy Goldrich, Samurai, Pinkcot.

Obecně výsledky pomologického hodnocení i celkové antioxidační kapacity a fenolických látek vyzněly ve prospěch asijských odrůd. Nejvyšších hodnot antioxidační kapacity do-

sáhly čínské odrůdy Wan-Xing a Moi Chua-Sin. Naopak nejnižší hodnoty byly zaznamenány u odrůd pro zpracování, jako jsou Strepet a Hachhaliloğlu. Fenolických látek obsahovaly taktéž více asijské odrůdy, kdy ve směsi dužniny a slupky bylo naměřeno u pěti asijských odrůd nadprůměrných hodnot.

Z uvedených výsledků je celkem zřejmé, že asijské odrůdy skýtají jistý potenciál, který by měl být využit jak ve šlechtění, tak v dalším výzkumu. Vzhledem k probíhajícím klimatickým

změnám je totiž docela možné, že genetické zdroje z oblastí původního vzniku druhů či stanovišť s extrémními podmínkami ve srovnání s ČR, budou jedinou perspektivou zachování komerční produkce na našem území.

**Poděkování:** Výsledky v tomto příspěvku vznikly za podpory Národního programu genetických zdrojů rostlin, kap. 6.2.10 Teplo milné a méně známé ovoce, réva vinná, vytrvalé zeleniny, vybrané druhy květin a léčivých rostlin ZF MENDELU Lednice 51834/2017-MZE-17253/6.2.10.

## Seznam použité literatury

- BERANOVÁ M. (2012): Jídlo a pití v pravěku a středověku. Praha: Academia, 511 pp. ISBN 978-80-200-1991-2.
- CALISKAN O., BAYAZIT S., SUMBUL A. (2012): Fruit Quality and Phytochemical Attributes of Some Apricot (*Prunus armeniaca* L.) Cultivars as Affected by Genotypes and Seasons. Not. Bot. Horti. Agrobo., 40(2): 284-294. ISSN 0255-965X.
- GÖTTINGEROVÁ M. (2018): Zpracování plodů netradičních ovocných druhů mírného pásma. Diplomová práce. Zahradnická fakulta v Lednici, Mendelova univerzita v Brně.
- GOLIAŠ J., NĚMCOVÁ A. (2009): Skladování a zpracování ovoce a zeleniny: (návod do cvičení). Vyd. I. Brno: Mendelova univerzita, 97 pp. ISBN 978-80-7375-331-3.
- JANICK J., PAULL R. E. (2008): The encyclopedia of fruit & nuts. Wallingford: CABI, 954 pp. ISBN 978-0-85199-638-7.
- JANSON H. F. (1996): Pomona's harvest. An Illustrated Chronicle of Antiquarian Fruit Literature. Portland, Oregon: Timber Press, 433 pp. ISBN 0-88192-336-2.
- KOPEC K. (1998): Tabulky nutričních hodnot ovoce a zeleniny. Praha: Ústav zemědělských a potravinářských informací, 72 pp. 80-86153-64-9.
- NĚMEC B. (1955): Dějiny Ovocnictví. Praha: Nakladatelství československé akademie věd, 280 pp.
- NEUGEBAUEROVÁ J. a VÁBKOVÁ J. (2011): Antioxidační aktivita a látky fenolické povahy v rodu máta (*Mentha* L.). In: Salaš P. (ed): Rostliny v podmínkách měnícího se klimatu. Lednice 20.- 21. 10. 2011, Úroda, vědecká příloha, 395 – 401. ISSN 0139-6013.
- NITRANSKÝ Š. (1992): Klasifikátor pro genus *P. armeniaca* Mill. Praha: VÚRV.
- VACHŮN Z., KRŠKA B., OUKROPEC I. (2001): Historie a současný stav práce s genofondy meruněk a broskvoní na MZLU Brno, Zahradnické fakultě v Lednici. Sborník referátů ze semináře „Historie a současný stav práce s genofondy“, s. 87. ISBN 80-86555-14-3.
- VANGDAL E. (1980): Threshold values of soluble solids in fruit determined for the fresh fruit market. Acta Agr. Scandinavica, 30: 445–448.
- VALIČEK P. (2009): Léčivé rostliny Číny a Vietnamu: (a–i) I. díl. I. vyd. Benešov: Start, 338 pp. ISBN 978-80-86231-48-81.
- VORLOVÁ L. a kol. (2014): Chemie potravin a chemické laboratorní metody: obecné kapitoly. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno. ISBN 978-80-7305-686-5.
- WANI S. M., JAN N., WANI T. A., AHMAD M., MASOODI F. A., GANI A. (2017): Optimization of antioxidant activity and total polyphenols of dried apricot fruit extracts (*Prunus armeniaca* L.) using response surface methodology. Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences, 16: 119–126. ISSN 1658-077X.
- ZBÍRAL J. (2005): Analýza rostlinného materiálu: jednotné pracovní postupy. Vyd. 2., rozš. a přeprac. Brno: Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, 192 pp. ISBN 80-86548-73-2.

# Hodnocení genových zdrojů révy vinné s využitím laboratorních metod

Stralková<sup>2</sup> R., Mýlová<sup>2</sup> P., Leišová-Svobodová<sup>1</sup> L., Matějová<sup>2</sup> E.

<sup>1</sup> Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Praha – Ruzyně

<sup>2</sup> Výzkumná stanice vinařská Karlštejn

stralkova@vurv.cz

V roce 2014 si připomenul Národní program konzervace a využívání genetických zdrojů rostlin a agrobiodiverzity 20 let svého trvání. Za tu dobu se v práci s genetickými zdroji mnohé změnilo, stejně jako se změnilы metody používané při jejich hodnocení. V hodnocení révy vinné se doposud využívalo hlavně ampelografické hodnocení (PAVLOUŠEK 2008) jednotlivých genotypů založené na hodnocení vybraných fenotypových znaků z deskriptoru (klasifikátoru) pro révu vinnou (HUBÁČKOVÁ a FÁBEROVÁ 1999). Dnes se pozornost soustřeďuje stále více na popis genotypových znaků. Genotypem je označován souhrn všech genů a dalších oblastí uložených v sekvenci DNA, z nichž některé se projevují fenotypovými znaky a jiné jednoznačně charakterizují daný druh, odrůdu, jedince.

Výzkumná stanice vinařská v Karlštejně oslaví v roce 2019 své 100. výročí založení. Materiály, které nyní v Karlštejně rostou, jsou výběrem těch českých a světových odrůd, kterým se v drsných podmínkách karlštejnských vinic daří dobře. V letech 2013 - 2016 došlo u všech položek Národního genofondu révy vinné v Karlštejně k hodnocení. Jedná se o polní kolekci, vysazenou v letech 1990 - 1995. K analýze byly použity listy odebrané v měsíci červnu ve fázi plně vyvinutého devátého listu. Z celé řady různých DNA analýz byla vybrána metoda analýzy mikrosatelitů, což jsou krátké opakující se sekvence.

DNA byla extrahována z mladých listů pomocí komerční soupravy DNAeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Germany) podle protokolu výrobce. Kvalita a koncentrace extrahované DNA byla ověřena elektroforeticky v agarózovém gelu porovnáním s velikostním standardem  $\lambda$ HindIII a spektrofotometricky.

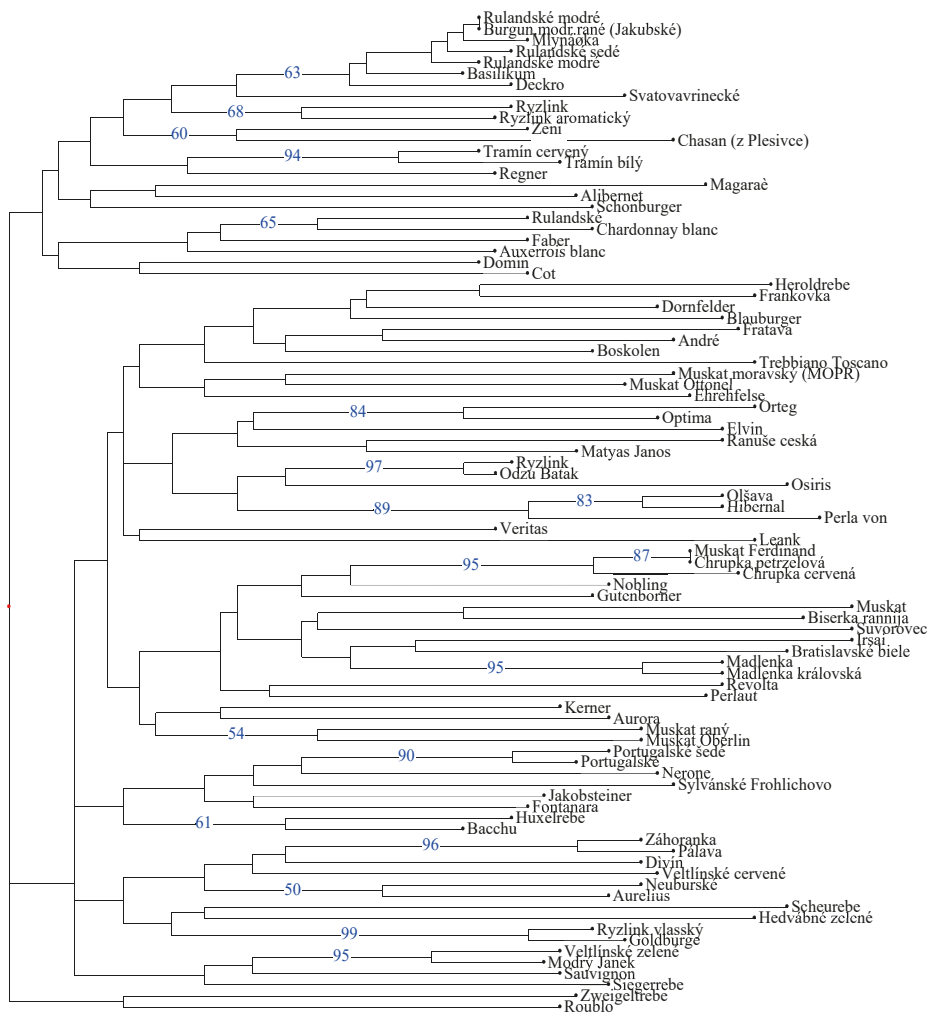
Pro analýzu mikrosatelitů bylo zvoleno 10 lokusů. Markery byly testovány a jejich použití ověřováno v rámci několika EU projektů spolu s výběrem vhodných standardů alel. PCR reakce byly prováděny podle optimalizovaných protokolů a výsledné amplikony byly separovány pomocí kapilární elektroforézy v přístroji ABI PRISM 310 (Perkin-Elmer). Elektroforeogramy byly analyzovány pomocí programů GeneScan a Genotyper. Výsledná sestava alel je uchovávána v programu MS Excel.

Matrice genetických vzdáleností mezi analyzovanými vzorky byly počítány pomocí Simple matching koeficientu nepodobnosti v programu DARwin (<http://darwin.cirad.fr/darwin>; Perrier and Jacquemoud-Collet 2006). Shluková analýza byla prováděna neváženou metodou nejbližšího souseda. Věrohodnost dendrogramu byla ověřována metodou bootstrappingu se dvěma tisíci opakováními výpočtu se znáhodněným pořadím vzorků. Dále bylo využito vícerozměrné škálování, které bylo prováděno v programu Statistica a korespondenční analýza v programu NCSS.



Statistickým zpracováním získaných výsledků byl vytvořen dendrogram, který ukazuje, které odrůdy jsou si geneticky bližší či vzdálenější (Obr. 1, Obr. 2). Touto metodou lze např. ověřit pravost odrůdy a popsat vzájemné

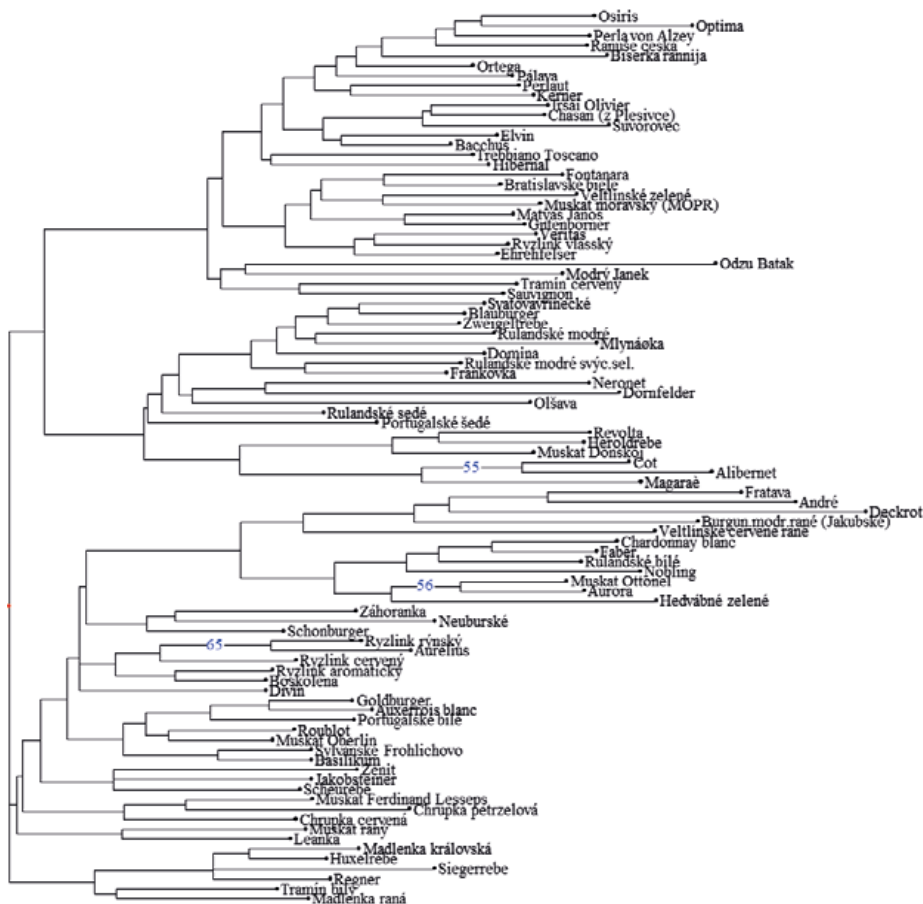
vztahy jednotlivých odrůd. Dalším grafickým výsledkem zpracování získaných dat je např. dvojrozměrný škálový diagram (Obr. 3), shlukující k sobě materiály blízké podle vybraných kritérií.



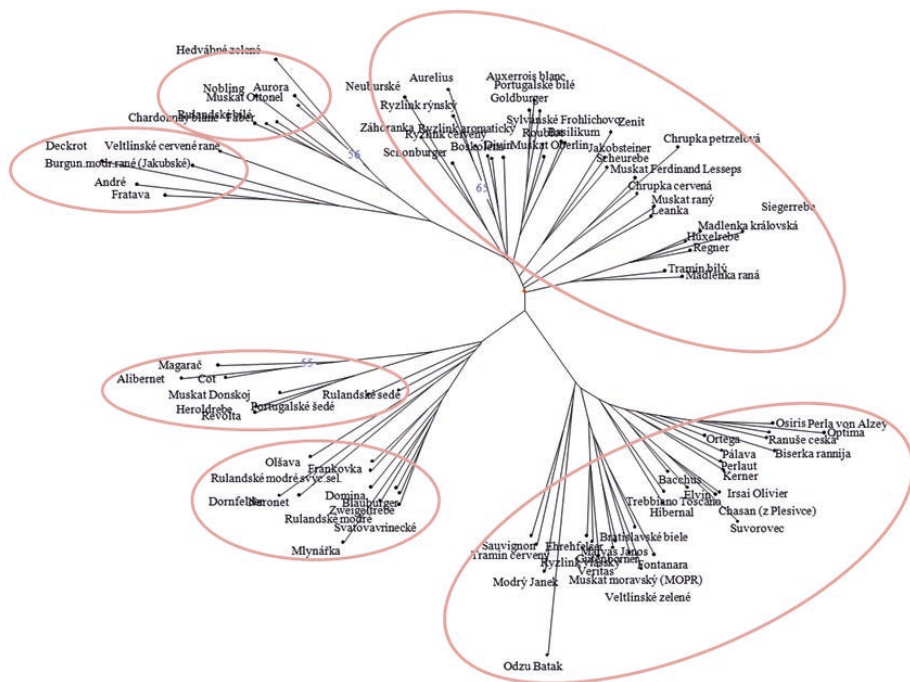
Obr. 1: Dendrogram na základě genotypových dat

Byli bychom velmi rádi, kdyby tyto informace o uvedených neznámých a v České republice nepěstovaných odrůdách posloužily jak odborné, tak i laické veřejnosti. Vinaři, pěstitelé i šlechtitelé si rozšíří přehled o možnostech

využívání genových zdrojů révy vinné ať už ke šlechtění, výzkumu, výuce nebo při budování naučných stezek. Zahrádkáři a milovníci révy vinné se mohou přijet k nám podívat, odrůdy si prohlédnout a vidět něco výjimečného.



Obr. 2: Dendrogram na základě fenotypových dat



Obr. 3: Dvojměrný škálový diagram

## Seznam použité literatury

- HUBÁČKOVÁ M., FÁBEROVÁ I. (1999): Klasifikátor - Descriptor List Genus *Vitis* L. VÚRV Praha, 1999, 59 pp.
- PAVLOUŠEK P. (2008): Encyklopedie révy vinné. Computer press a.s., Vydání druhé, 316 pp. ISBN 978-80-251-2263-1.

# Biologicky aktivní látky rodu lékořice (*Glycyrrhiza* L.)

Neugebauerová J.

Mendlova univerzita v Brně

Zahradnická fakulta

jarmila.neugebauerova@mendelu.cz

Lékořice je jednou z nejstarších kulturních rostlin s léčivými účinky. Jméno *Glycyrrhiza* pochází z řečtiny (glykys, glykeros = sladký, rhiza = kořen). Lékořice (*Glycyrrhiza*) je vytrvalá rostlina čeledi bobovitých (*Fabaceae*), rod zahrnuje vytrvalé byliny s dlouhými kořeny a oddenky. Lékořice mají lichozpeřené listy s celokrajnými nebo jemně pilovitými lístky. Květy jsou v úžlabních, dlouze stopkatých hroznech. Koruna je bílá, bílofialová, fialová nebo modrá. Kalich je krátce zvonkovitý, slabě dvoupyský. Plodem jsou nepukavé lusky, hlad-



Obr. 1: *Glycyrrhiza glabra* květenství



Obr. 2: *G. glabra* plodenství, oddenek

ké nebo ostnitě. Lusky mohou být dlouhé až 4 cm, rovné nebo pokroucené. Semena jsou kulatá nebo čočkovitá, po dozrání hnědá nebo hnědočerná. Lékořice je entomogamická.

Lékořice se vyskytuje převážně v jižní Evropě a Asii, méně v Austrálii, v Severní a Jižní Americe. V České republice nalezneme jen lékořici lysou, je místy zplanělá i zdomácnělá jako pozůstatek dřívějších kultur. Od 16. století byla hojně pěstována na jižní Moravě až do druhé poloviny 19. století v okolí Hustopečí (Pouzdrňany, Popice, Starovice), Mikulova (Dolní Věstonice, Strachotín) a Bzence. Na jižní Moravě se doposud místy vyskytuje, zvláště v okolí Hustopečí a Pouzdrňan. V Čechách, kde byla pěstována vzácně, roste v okolí Pardubic, na jižním Slovensku na sever až po Nitru a na východ po Plešivec (VYMYSLICKÝ a NEUGEBAUEROVÁ 2009).



Obr. 3: *Glycyrrhiza uralensis* květenství

Lékořice je odedávna používána jako léčivá rostlina v lidové i oficiální medicíně, je významnou surovinou pro farmaceutický, potravinářský a kosmetický průmysl nejenom v Evropě, ale především v Asii.

Z celkového počtu 21 druhů (The Plant List 2013) jsou nejvýznamnější lékořice lysá (*Glycyrrhiza glabra* L. obr. 1, 2) a lékořice uralská (*Glycyrrhiza uralensis* L., obr. 3, 4). Oba druhy jsou uchovány *ex situ* v polní kolekci genofondu léčivých rostlin na pracovišti Zahradnické fakulty MENDELU v Brně se sídlem v Lednici. Nejpočetnější skupinou jsou sběrové položky druhu *Glycyrrhiza glabra* původem z okolí Lednice, ze Starovic, Pouzdřan a jedna položka ze Simferopolu (Ukrajina). Dalšími druhy zařazenými v polní kolekci (aktuálně k datu 30. 6. 2018) jsou *Glycyrrhiza echinata* L., *Glycyrrhiza pallidiflora* Maxim, *Glycyrrhiza macedo-*



Obr. 4: *G. uralensis* kořen

*nica* Bois. Et Orph. a *Glycyrrhiza foetida* Desf. V aktivní kolekci je konzervováno 19 položek, v pracovní kolekci dalších 6.

### Oblast využití lékořice – medicína a farmacie

Pro farmaceutický průmysl je nejdůležitější surovinou lékořicový kořen – *Liquiritiae radix*. Je to usušený neloupaný nebo loupáný, celý nebo řezaný kořen a výběžky druhu *Glycyrrhiza glabra* L. a/nebo *Glycyrrhiza inflata* Bat. a/nebo *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. Hlavní účinnou látkou v kořenech a výběžcích je saponin glycyrrhizin (kyselina glycyrrhizová) ve formě vápenaté nebo draselné soli.

Podle Českého lékopisu z roku 2017 (MINISTERSTVO ZDRAVOTNICTVÍ 2017) je požadované minimální množství kyseliny glycyrrhizové (glycyrrhizinu) 4,0 %. K lékopisným drogám patří i lékořicový extrakt tekutý etanolický standardizovaný (*Liquiritiae extractum fluidum ethanolicum normatum*) obsahující 3,0-5,0 % kyseliny glycyrrhizové a lékořicový extrakt suchý pro aromata (*Liquiritiae extractum siccum ad saporandum*), který má obsahovat 5,0-7,0 % kyseliny 18 $\beta$ -glycyrrhizové, počítáno na vysušený extrakt.

Zahuštěná lékořicová šťáva (*Succus liquiritiae*) a lékořicový kořen se používá pro ulehčení odkašlávání (expektorans), jako prostředek močopudný (diuretikum), mírně projímavý (laxans), zlepšující chuť (korigens) a také ochraňuje jaterní buňky (hepatoprotektivum). Expektorační účinky má především glycyrrhizin a glycyrrhetin. Izolovaný glycyrrhizin má také účinky antiflogistické (protizánětlivé) a antibioidní, snižuje sekreci žaludečních šťáv. Při léčbě žaludečních vředů se používá derivát glycyrrhizinu – karbonexol.

Lékořicový kořen není toxický, ale měl by se užívat v přiměřených dávkách, tj. denně

3,0-12,0 g usušeného a pomletého kořene ve formě odvaru nebo nálevu. Pokud se používá vodný extrakt, pak v množství 2,0-6,0 ml denně v poměru 1:1. Vysoké dávkování tj. denně 20,0-60,0 g extraktu rozpuštěného ve vodě, který se doporučuje při léčbě žaludečních vředů, je možné užívat jen po dobu 4-6 týdnů. Maximální denní dávka glycyrrhizinu je 100,0 mg, pokud je obsažen v cukrovinkách. Nad toto množství může glycyrrhizin zvyšovat krevní tlak, nebo způsobit svalovou slabost, chronickou únavu, bolesti hlavy, otoky a snižovat hladinu testosteronu u mužů (TUMOVÁ 2011).

Kromě glycyrrhizinu, kyseliny glabrinové a jejich glykosidů obsahuje lékořičový kořen také glykosidy kyseliny 11-desoxyglycyrrhetinové a liquiritové, dále izoflavonové glykosidy, kumariny (umbeliferon a herniarin), látky typu steroidních hormonů, hořčinu glycyramarin a z flavonoidů především liquiritin, isoliquiritigenin a glabridin. Flavonoidy jsou nejvýznamnějšími látkami fenolické povahy kořene lékořice. Fenoly jsou přítomny ve všech třech farmaceuticky významných druzích (*Glycyrrhiza glabra*, *Glycyrrhiza uralensis* a *Glycyrrhiza inflata*) (CHEEL *et al.* 2013).

V současné medicíně je zkoumán především antioxidační účinek fenolických látek a jejich schopnost vázat volné radikály. Tato vlastnost snižuje riziko kardiovaskulárních onemocnění, diabetu, astmatu a dalších onemocnění spojených především s vyšším věkem.

### **Oblast využití lékořice – potravinářství a kosmetika**

Glycyrrhizin je 50x sladší než sacharóza a proto je používán jako přírodní sladidlo v potravinářském průmyslu. V Hustopečích, kde byla lékořice zpracovávána až do padesátých let XX. století pro výrobu cukrovinek, se jako základ používala štáva ze sladkého dřeva (*Succisa liquiritiae*), tedy lékořičový extrakt. Lékořičo-

vý extrakt je uveden také ve složení limonády Kofola. Izolovaný flavonoid glabridin se využívá rovněž v kosmetickém průmyslu pro jeho bělící, antisenzibilizující a protizánětlivé vlastnosti.

### **Hodnocení lékořice podle klasifikátoru**

Klasifikátor rodu lékořice, platný od roku 2012, obsahuje 54 popisných znaků. Jsou to znaky a) morfologické: habitus, délka stonku, průměr stonku, odění stonku, základní barva stonku, skvrnitost stonku, doplňková barva stonku, průřez stonku, počet internodií, délka středního internodia, počet bočních větví, délka složeného listu, počet jařem listu, tvar terminálního lístku, okraj terminálního lístku, vrchol terminálního lístku, délka terminálního lístku, šířka terminálního lístku, barva lístku, lesk lístku, lepkavost terminálního lístku, přítomnost palistů, tvar palistů, barva palistů, délka květenství, počet květenství na výhonu, hustota květenství, počet květů v květenství, délka květu s kalichem, barva křídel květů, počet plodenství na stonku, typ plodenství, tvar plodenství, délka plodenství se stopkou, délka plodenství bez stopky, šířka plodenství, tvar plodů, délka plodů, šířka plodů, povrch plodů, počet semen v lusku, tvar semen, barva semen, barva na povrchu kořene, barva na průřezu kořene; b) biologické: celkový zdravotní stav - napadení škůdci a chorobami (výskyt *Uromyces glycyrrhizae* Magnus, *Phyllosticta glycyrrhizae* Brun., *Rhizoctonia violacea* Tull., *Sitona lineatus* L., *Ptinus fur* L., *Lasioderma serricorne* F.); c) biochemické: obsah glycyrrhizinu a aroma (VYMYSLICKÝ *et al.* 2012).

Stanovení glycyrrhizinu má zásadní význam pro hodnocení a identifikaci položek lékořice, protože je jedním z určujících znaků. Druhy lékořice jsou rozděleny do dvou skupin; první tvoří takzvané pravé lékořice (*Euglycyrrhiza* Bois.) a druhou nepravé lékořice (*Pseudoglycyrrhiza* Regel. Krug.) Skupina *Euglycyrrhiza*, kam patří druhy *G. glabra*, *G. uralensis*, *G. inflata*, *G. korshinskyi*, *G. aspera* obsahuje jako majo-

ritní saponinovou složku glycyrrhizin. Další druhy – *G. echinata*, *G. macedonica*, *G. lepidota* a *G. pallidiflora* skupiny *Pseudoglycyrrhiza* obsahují makedonosid C jako majoritní saponin.

### Metoda stanovení glycyrrhizinu

Pro stanovení obsahu glycyrrhizinu se používá metoda vysoce účinné kapalinové chromatografie (HPLC), uvedená v platném lékopisu (Ministerstvo zdravotnictví 2017). Kapalinová chromatografie je separační metoda založená na rozdílu v distribuci látek mezi dvě nemísitelné fáze. Mobilní fází je kapalina, která postupuje stacionární fází (silikagelem). Kvalitativní stanovení se provádí z retenčních dat a kvantitativní stanovení z ploch (výšek) píků vzorku a standardu. Pro hodnocení na pracovišti ZF MENDELU se používá kapalinový chromatograf ECOM (CZ).

Pro analýzu se odebírá 1,00 g práškové drogy (lékořičový kořen – *Liquiritiae radix*). Všechna hodnocení obsahu se provádí ve třech opakováních, průměrná hodnota je počítána na vysušenou drogu (konstantní hmotnost vzorku).

Zjištěné hodnoty obsahu glycyrrhizinu, sledované průběžně od roku 1995, se pohybovaly v rozmezí 0,05 % (42A4400008 *Glycyrrhiza echinata*) až 13,38 % (42A4400011 *Glycyrrhiza glabra*). Hodnoty obsahu glycyrrhizinu jsou závislé především na druhu, ale také na stáří rostliny, morfologii podzemních orgánů a termínu sklizně.

Stupnice prezentovaná v systému GRIN nabývá hodnot 3 (pro nízké množství do 0,5 %), 5 (střední množství 0,5-2,5 %) nebo 7 (vysoké nad 2,5 %). Tato stupnice bude revidována a upravena vzhledem k lékopisným požadavkům a také k mnohaletým zkušenostem s hodnocením tohoto biochemického znaku.

Kromě obsahu glycyrrhizinu je z hlediska využití lékořice ve všech oblastech významná

její antioxidační aktivita a obsah fenolických látek. První hodnocení 26 položek genofondu lékořice bylo provedeno v roce 2017.

### Metoda stanovení celkové antioxidační kapacity (TAC)

Celková antioxidační kapacita byla na pracovišti ZF MENDELU stanovena spektrofotometrickou metodou s použitím DPPH radikálu (2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl) (ZLOCH *et al.* 2004). Metoda spočívá v reakci testované látky se stabilním radikálem DPPH. Při reakci dochází k redukci barevného stabilního radikálu DPPH na bezbarvý. Rychlost a rozsah odbarvení (pokles absorbance) jsou úměrné antioxidační (antiradikálové) účinnosti analyzovaného extraktu.

Rostlinný materiál (2,00 g práškové drogy) je extrahováno v 75 % metanolu po dobu 24 hodin. Macerát je filtrován přes filtrační papír do 50 ml baňky a doplněn po rysku 75% metanolem (SHAN *et al.* 2005). Takto připravený extrakt vzorku je také používán pro stanovení celkového obsahu fenolických látek (TPC). Pro stanovení antioxidační kapacity je použit jako indikátor 4mM roztok DPPH v metanolu. Ke 2,5 ml reakčního roztoku DPPH je napipetováno 200  $\mu$ l analyzovaného extraktu. Po 30 minutách se měří absorbance na spektrofotometru SPECORD 50 PLUS při vlnové délce 515 nm. Jako standard se používá Trolox. Analýza každého vzorku se děje ve třech opakováních, průměrná hodnota je vztažena na konstantní hmotnost vzorku. Výsledky jsou přepočítány na mg Troloxu v 100 g vzorku (mg TE. 100 g<sup>-1</sup>).

Nejvyšší celková antioxidační kapacita byla naměřena u položky *Glycyrrhiza uralensis* s pracovním číslem 37 (2,00 mg TE. 100 g<sup>-1</sup>), nejnižší hodnoty byly naměřeny u položky *Glycyrrhiza uralensis* s pracovním číslem 77 (0,32 mg TE. 100 g<sup>-1</sup>). V případě položek *Glycyrrhiza glabra* se hodnoty TAC pohybovaly v rozmezí 0,47-1,17 mg TE. 100 g<sup>-1</sup>.

## Metoda stanovení celkového obsahu fenolů (TPC)

Metoda stanovení celkového obsahu fenolů (TPC) je založena na oxidačně redukční reakci, při které v alkalickém prostředí fenolové sloučeniny oxidují.

Stanovuje se spektrofotometricky pomocí Folin-Ciocalteuova činidla (ZLOCH *et al.* 2004). Ze zásobního extraktu je napipetováno 50  $\mu$ l do 50 ml odměrné baňky s 9,0 ml destilované vody, a poté je přidán 1,0 ml Folin-Ciocalteuova činidla. Po 5 minutách pak 1,0 ml 7%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  a je doplněno po rysku destilovanou vodou. Takto připravený vzorek je ponechán 15 minut při laboratorní teplotě. Absorbance vzorků je měřena při vlnové délce 750 nm na přístroji SPECORD PLUS 50. Každý vzorek se stanovuje třikrát. Průměrné hodnoty jsou přepočteny na 100 g sušené hmoty a vyjádřeny v mg ekvivalentu kyseliny gallové (mg GAE. 100  $\text{g}^{-1}$ ).

Nejvyšší celkový obsah fenolických látek byl naměřen u položky *Glycyrrhiza uralensis* s pracovním číslem 37 (7,52 mg GAE. 100  $\text{g}^{-1}$ ) a nejnižší hodnoty byly naměřeny u položky *Glycyrrhiza uralensis* s pracovním číslem 71 (2,21 mg GAE. 100  $\text{g}^{-1}$ ). Hodnoty TPC se v případě položek genofundu *Glycyrrhiza glabra* pohybovaly v rozmezí 3,40-6,92 mg GAE. 100  $\text{g}^{-1}$ .

Z hlediska dalšího využití lékořice je třeba se zaměřit na popis chemotaxonomických znaků. Kromě stanovení glycyrrhizinu, celkové antioxidační aktivity a celkového obsahu fenolických látek to bude hodnocení nejvýznamnějších flavonoidů (liquiritin, glabridin) a jejich celkového obsahu. Výsledky hodnocení látek s antioxidačními účinky mají v případě lékořice prvořadý význam pro identifikaci položek genofundu. Vzhledem k počtu zastoupených druhů v kolekci je možné touto cestou poskytnout uživatelům další přesnější charakteristiky a podpořit tak zájem o šlechtitelské a výzkumné aktivity v České republice i zahraničí.

## Seznam použité literatury

CHEEL J., TŮMOVÁ L., ARECHE C., VAN ANTVERPEN P., NÉVE J., ZOUAOU-BOUDJELTIA K., SAN MARTIN A., VOKŘÁL I., WSÖL V., NEUGEBAUEROVÁ J. (2013): Variations in the chemical profile and biological activities of licorice (*Glycyrrhiza glabra* L.), as influenced by harvest times. *Acta Physiologiae Plantarum*, 35 (4): 1337-1349.

The Plant List (2013). Version 1.1. <http://www.theplantlist.org/> [accessed 2018-08].

MINISTERSTVO ZDRAVOTNICTVÍ ČR (2017): Český lékopis 2017. Grada Publishing, a. s., Praha, 4904pp. ISBN 978-4-04-924045-0.

SHAN B., CAI Y. Z., SUN M., CORKE H. (2005): Antioxidant Capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. *J. Agric. Food Chem.*, 53: 7749 - 7759.

TŮMOVÁ L. (2011): Lékořice – terapeutické účinky a možné interakce. *Praktické lékárenství*, 7(6): 286-287.

VYMYSLICKÝ T., NEUGEBAUEROVÁ J., FÁBEROVÁ I. (2012): Klasifikátor: Descriptor List Genus *Glycyrrhiza* L. [online] URL: <http://genbank.vurv.cz/genetic/resources/documents/Glycyrrhiza.pdf>.

VYMYSLICKÝ T., NEUGEBAUEROVÁ J. (2009): Metodika pěstování lékořice lysé (*Glycyrrhiza glabra* L.) v České republice. Uplatněná certifikovaná metodika 8/09 VÚPT, ZV Troubsko. ISBN 978-80-86908-17-5.

ZLOCH Z., ČELAKOVSKÝ J., AUJEZDSKÁ A. (2004): Stanovení obsahů polyfenolů a celkové antioxidační kapacity v potravinách rostlinného původu. Závěrečná zpráva o plnění projektu podpořeného finančně Nadačním fondem Institutu Danone, Plzeň, [https://www.researchgate.net/profile/Zdenk\\_Zloch/publications](https://www.researchgate.net/profile/Zdenk_Zloch/publications) [accessed 2018-08].



# Hodnocení kolekce chmele a přínos planých forem

**Nesvadba V., Charvátová J., Štefanová L.**  
**Chmelařský institut s.r.o. Žatec**  
 nesvadba@chizatec.cz

Genetické zdroje chmele jsou uchovány v polní kolekci *ex situ* tzn., že všechny položky zařazené do kolekce jsou hodnoceny na stanovišti polní kolekce. Genetické zdroje chmele zařazené do unikátní kolekce jsou děleny dle charakteru materiálu do těchto skupin:

1. krajové a primitivní formy,
2. pěstované a restringované odrůdy,
3. ostatní biologický materiál (nová šlechtění, význačné komponenty hybridů atd.), plané chmele.

Založení polní kolekce se řídí metodikou výsadby chmelnic (Fric a Beránek 1997); a to ve sponu 300 cm meziřadí (dle mechanizační techniky), mezi rostlinami je vzdálenost minimálně 80 cm a maximálně 120 cm. V polní kolekci jsou všechny položky množeny klonováním pro zachování genetické identity. Na stanovišti je každý genotyp po výsadbě udržován 15 až 20 let. Po této době je regenerován opět klonováním. Tento způsob uchování kolekce je nutný jak z důvodu hodnocení položek, tak z hlediska nižší frekvence genetických změn (mutací). Nové položky jsou získávány od šlechtitelských firem nebo z pracovní kolekce, kde jsou hodnoceny plané chmele z expedic v tuzemsku a v zahraničí. Při zařazování nových položek do kolekce GZ chmele je nutné dodržovat tyto základní body:

- a) Kompletace informací o nové položce,
- b) zaevidování pasportních dat do IS GRIN Czech,

- c) rozmnožení získaného materiálu na min. počet 10 rostlin (Obr. 1),
- d) hodnocení zdravotního stavu,
- e) výsadba do izolované chmelnice,
- f) předběžný popis základních znaků,
- g) příprava sadby pro zařazení do aktivní kolekce.



Obr. 1: Množení vybraných položek chmele

Nejdůležitější část hodnocení kolekce chmele probíhá v aktivní kolekci (Obr. 2). V této části je nutné dodržet tyto základní postupy:

- a) Výsadbu provést dle metodiky výsadby chmele.
- b) Výsadba aktivní kolekce se provádí ve 3 opakovaných po 8 rostlinách. Současně je třeba zajistit zapojení porostu a chybějící rostliny průběžně doplňovat.
- c) V prvním roce pěstování se jednotlivé položky nehodnotí (nedosahují plné výkonnosti).

- d) Hodnocení se provádí od druhého roku pěstování a to po dobu minimálně 5 let. Pokud jsou v průběhu některého roku nepříznivé povětrnostní podmínky, které ovlivnily růst či vývoj rostlin chmele, je nutné hodnocení opakovat v následujícím roce.
- e) Hodnocení se provádí na základě Klasifikátoru chmele (*Humulus lupulus* L.), který je platný od roku 2000, ve kterém je definováno 73 deskriptorů (znaky morfologické, biologické, hospodářské a dodatkové).



Obr. 2: Polní kolekce genetických zdrojů chmele

Po hodnocení aktivní kolekce jsou položky přesazeny do depozitní části polní kolekce (min. 4 rostliny). Všechny položky jsou vždy v polní kolekci GZ chmele a to z těchto důvodů:

- a) Je možné každoročně z každé položky poskytnout uživatelům vzorky ve formě chmelových hlávek a listů, popřípadě chmelové sádky.
- b) Je možné každoročně využívat všechny položky pro šlechtění chmele.
- c) Při extrémních podmínkách lze hodnotit důležité znaky (odolnost k mrazu, suchu či zamokření, odolnost vylamování pazochů při vichřici atd.).
- d) Je možné odstranit zjištěné mutace, na stanovišti se projevují všechny znaky genotypu.

V současné době je v kolekci GZ chmele zařazen vysoký počet planých chmelů, proto se této části musí věnovat zvýšená pozornost při hodnocení znaků. Hlavní důvod hodnocení je ověření požadovaných znaků, neboť řada znaků je ovlivněna prostředím. Z historie je patrné, že se chmel pěstoval téměř na celém území České republiky (BERÁNEK a FRIC 1994). Proto je nutné postupně v těchto lokalitách nalézt tyto původní rostliny, sledovat je a popřípadě zařadit do GZ chmele. Součástí tvorby kolekce planých chmelů je i sběr v zahraničí, kde se vyskytují odlišné genotypy než v ČR a dle informací byly nalezeny plané chmele s vysokou odolností jak ke škůdcům a chorobám, tak i k vnějším podmínkám (sucho, vysoká hladina spodní vody atd.). Současně byly nalezeny genotypy s odlišným složením chmelových pryskyřic i silic. Tyto poznatky jsou uvedeny v řadě odborných publikací (HAMPTON *et al.* 2002, NESVADBA *et al.* 2009).

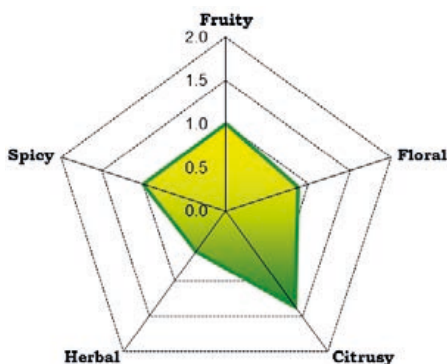
Při hodnocení planých chmelů na stanovišti se zaměřujeme na 10 hlavních deskriptorů, charakterizujících morfologii rostlin, na chemické analýzy chmelových hlávek a popis stanoviště. Po 2 až 3 letech hodnocení jsou vybrány genotypy jak typické pro danou oblast, tak geneticky zajímavé (odolnost, znaky které nejsou v GZ chmele). Vybrané genotypy jsou namnoženy na minimálně 8 rostlin pro výsadbu do pracovní kolekce. V pracovní kolekci probíhá minimálně 3leté hodnocení základních deskriptorů shodných jako na stanovišti, neboť řada znaků je polygenně založena a je ovlivněna prostředím, proto je nutné znaky stanovené na stanovišti ověřit i v polních podmínkách. Pomocí analýzy DNA se identifikuje genetická rozmanitost. Na základě výsledků hodnocení GZ na stanovišti a v pracovní kolekci jsou nové odlišné genotypy zařazeny do polní kolekce GZ chmele. O předání planých chmelů do polní kolekce GZ chmele je proveden protokolární zápis.

V rámci hodnocení planých chmelů se v současné době používá analýza obsahu a složení chmelových silic. Chmelové hlávky jsou sklizeny v technologické zralosti, po sklizni usušeny při teplotě 55 – 60 °C. Těsně před analýzou se suché chmelové hlávky rozdrtí (mletí). Chmelové silice jsou izolovány destilační metodou, obsah silic stanoven jako hmotnostní podíl vytěkaný v průběhu devadesátiminutového varu ze 100 g chmele. Složení silic je určeno plynovou chromatografií na chromatografu Varian 3400 ve spojení s hmotnostním detektorem Finnigan ITD 800 a kapilární koloně DB5 30m x 0,25 mm x 0,25 μm s teplotním programem v intervalu 60-250 °C. Nosným

plynem je hélium o průtoku 1 ml/min, nástřík dělený v poměru 1:50. Složky chmelových silic jsou identifikovány na základě porovnání elučních časů hmotnostních spekter složek se standardy a pomocí knihovny hmotnostních spekter. Semikvantitativní hodnocení složení silic formou relativního zastoupení obsahů složek vychází z ploch elučních pásů jednotlivých látek, vztažených na celkovou integrovanou plochu všech složek. Složky jednotlivých silic mají významný podíl na charakteru vůně (tabulka 1), takže charakter vůně lze na základě znalosti složení silic identifikovat. Následně jsou vytvořeny grafy charakterizující jednotlivé vůně (Graf 1).

**Tabulka 1: Senzorický charakter vůně podle složení chmelových silic**

Fruity	Floral	Citrusy	Herbal	Spicy
isobutylisobutyrate	linalool	limonene	beta pinene	myrcene
2+3 methylbutylisobutyrate	geraniol		beta phelandrene	alfa kopaene
2-nonanone	farnesol		beta selinene	karyophylene
S-methylthiohexanoate	2-dekanone		alfa selinene	farnesene
methylnonanoate			gama kadinene	humulene
2-undekanone			delta kadinene	karyofylenepoxide
methyldekadienoate			humulenepoxide I	
			humulenepoxide II	



Graf 1: Charakter chmelového aroma

Přínos planých forem chmelů je velmi významný. Prošlechtováním odrůd chmele na agrotechnické a pivovarské vlastnosti se výrazně snižuje genetická variabilita. Z tohoto důvodu jsou od roku 1997 prováděny sběry planých chmelů. V současné době se zařazují do šlechtění chmele v České republice.

V tabulce 2 je uvedeno využití planých chmelů pro šlechtění chmele. Plané chmele jsou do šlechtění zařazeny od roku 2005. Jak je patrné, tak se podařilo získat pouze dva nadějně genotypy z původních semen z planých chmelů (Kavkaz a Alta). Úspěšnější je použití samčích

planých chmelů s odrůdou Kazbek pro specifické vůně. Nejzajímavější je využití planých samců z Kanady a USA. Z jejich potomstev se podařilo získat celkem 38 nadějných genotypů, které jsou zařazeny do šlechtitelských školek. Především planý samec z Kanady (180 – Antler River Valley, získaný z expedice v roce 2003) s Kazbekem vykazuje 6,34 % šlechtitelkou úspěšnost.

Plané chmele jsou charakterizovány v rámci dotace MZe pro „Národní program konzervace a využívání genetických zdrojů rostlin a agrobiodiversity“ (51834/2017-MZE-17253/6.2.1). Dále se podařilo získat

dva mezinárodní projekty. V rámci projektu ME832 „Průzkum výskytu planých chmelů v oblasti Severní Osetie, stanovení jejich genetické hodnoty s cílem jejich uplatnění jako donorů cílených vlastností v šlechtitelském procesu českého chmele a stanovení vhodnosti místních podmínek pro pěstování chmele“, který byl řešen v letech 2006 až 2010, byly prováděny každoročně expedice zaměřené na sběry planých chmelů. V letech 2012 a 2013 byl proveden podrobný průzkum výskytu planých chmelů na území Slovenska v rámci projektu MOBILITY 7AMB12SK184 „Nové aspekty využití chmele pro zemědělské, agroekologické a fytomedicinské

**Tabulka 2: Využití planých chmelů ve šlechtění v České republice od roku 2005**

Rok	Šlechtitelský materiál	Počet vysetých semen	Počet vysázených semenáčových rostlin	Výběry pro další šlechtění
2005	Semena z Kavkazu	200	60	1
2006	Semena z Kavkazu	1400	250	0
	Semena z Belgie	200	0	0
2008	Semena z Kirgizie	443	210	0
2009	Sládek x planý chmel (Francie 35)	400	120	0
	Semena z Kirgizie	600	40	0
2012	Kazbek x planý chmel (Kanada 180)	650	410	26
	Kazbek x planý chmel (Kanada 189)	140	90	1
	Sm12H11 x planý z Ruska (Čuvaš)	168	40	0
	semena z Kavkazu	2400	460	0
2013	Sm13 x pyl z Altaje	0	0	0
2014	Semena z Altaje	1600	508	1
2015	Kazbek x planý chmel (USA 139)	235	166	4
	Kazbek x planý chmel (Kanada 187)	256	170	3
	Kazbek x planý chmel (USA 57)	1219	560	4
	Kazbek x planý chmel (USA 50)	65	20	0
2017	Kazbek x planý chmel (Kanada 180)	1555	1250	
	5164 x planý chmel (USA 72)	3	0	



Obr. 3: Planý chmel v Jeseníkách (obec Uhelná)

aplikace“. V současné době se provádí průzkum výskytu planých chmelů v Jeseníkách (Obr. 3).

Kolekce chmele v České republice patří mezi největší genetické zdroje chmele na světě a je využívána pro šlechtění, vědecké účely, stu-

dijní potřeby. Každá položka je přístupná pro české i zahraniční pracoviště a to ve všech formách vzorků (rostliny, suché hlávky, listy nebo DNA). V posledních letech mají zájem o vzorky chmelů i malé české pivovary pro testování a selekci odrůd chmele vhodných pro vznik nových značek pív.

## Seznam použité literatury

- BERÁNEK F., FRIC V. (1994): Nezbytnost šlechtění vlastních odrůd chmele. *Chmelařství*, 7: 81 - 83.
- FRIC V., BERÁNEK F. (1997): Šlechtění chmele s obsahem nad 12 % alfa hořkých kyselin v roce 1996. *Výroční zpráva Chmelařského institutu Žatec*.
- HAMPTON R., NICKERSON G., WHITNEY P., HAUNOLD A. (2002): Comparative chemical attributes of native North American hop, *Humulus lupulus* var. *Lupuloides* E. Small. *Phytochemistry*, 61: 855 – 862.
- KROFTA K. (2008): Hodnocení kvality chmele 4/08, *Metodika pro praxi 4/2008*. Chmelařský institut Žatec.
- NESVADBA V., PATZAK J., KROFTA K. (2009): Variability of wild hops. *Proceedings of the Scientific Commission I. H. G. C.*, 21 – 24 July 2009 Leon, Poland: 7 – 12.
- NESVADBA V., CHARVÁTOVÁ J., ŠTEFANOVÁ L. (2017): Využití genetických zdrojů chmele (*Humulus lupulus* L.) pro specifické šlechtitelské cíle. *Úroda*, 12: 27 – 34.







MINISTERSTVO ZEMĚDĚLSTVÍ

Vydalo  
Ministerstvo zemědělství  
Těšnov 17, 110 00 Praha I  
[www.eagri.cz](http://www.eagri.cz)

Praha 2018

ISBN 978-80-7434-483-1