

Morfometrická a DNA analýza semien genofondu lipnice lúčnej**Morphology and DNA analysis of gene resources of Kentucky bluegrass****Ing. Bežo Martin****Katedra genetiky a šľachtenia rastlín, Fakulta agrobiológie a potravinových zdrojov,
Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre**

Abstract: Genetic resources of Kentucky bluegrass including, 30 genotypes, was evaluated on a base morphology characteristics of grains. In the laboratory conditions, five morphology characteristics (length, width, thickness of grains, length of brushes and width of creases) were evaluated using binocular magnifying glass with micrometer. Correlation analysis between length and width, length and thickness, width and thickness, length of grains and length of brushes, width of grains and width of creases, was used. Two different genotypes were distinguished using correlation analysis and average values of morphology characteristics (5/102, 1/22). Genotype 5/102 had the smallest average values of morphology characteristics and highest values of correlation coefficients. On the base of results the positive addition between length, width, thickness of grains, width of creases and negative addition between length of grains and length of brush was evident. The second genotype 1/22, had bigger average values and smaller correlation coefficients. The positive and highest addition between width of grains and width of creases was confirmed.

Random amplified polymorphic DNA (RAPD) will be use for characterization of Kentucky bluegrass genetic resources. The DNA isolation was optimized for Kentucky bluegrass according Rogers, Bendich (1994). DNA quality and quantity of isolated DNA was checked on 0,8 % agarose gel in comparison to a range of Human genomic DNA with known concentration. The amount of isolated DNA from Kentucky bluegrass was 12 ng DNA in 1 μ l⁻¹.

Key words: *Poa pratensis* (Kentucky bluegrass), gene resources, morphology analysis, DNA isolation

3. Riešiteľský kolektív

Ján Brindza, doc. Ing. CSc, Katedra genetiky a šľachtenia rastlín, FAPZ, SPU v Nitre

Štefan Hajdu, Ing., Katedra genetiky a šľachtenia rastlín, FAPZ, SPU v Nitre

Beata Marenčáková, Katedra genetiky a šľachtenia rastlín, FAPZ, SPU v Nitre

4. Ciele vecnej etapy

- 4.1 Analýza morfológických charakteristík zrna genofondu lipnice lúčnej (*Poa pratensis* L).
- 4.2 Analýza genetickej rozmanitosti a príbuznosti jednotlivých genotypov rodu lipnica (*Poa* L.) na základe hodnotenia polymorfizmu DNA metódou RAPD.
- 4.3 Spracovanie obrazovej dokumentácie morfológických charakteristík zrna genofondu lipnice lúčnej.
- 4.4 Spoznanie variability a biologických zákonitostí medzi morfológickými znakmi na úrovni zrna hodnoteného genofondu s využitím štatistických metód.

5. Dosiahnuté výsledky

V prvom roku riešenia vecnej etapy výsledky sa získali z nasledovných pokusov:

- 5.1 založenia poľných pokusov z genofondu lipnice lúčnej, kostravy červenej, kostravy lúčnej a hybridov metonohu a kostravy,

5.2 morfometrické merania zrna osiva lipnice lúčnej,

5.3 analýzy DNA.

Poľné pokusy

Na hodnotenie genofondu tráv bol založený poľný pokus s 90 genotypmi lipnice lúčnej. V lokalite areálu Botanickej záhrady SPU v Nitre boli v termíne 23. 4. 2002 vysiate v jednom opakovaní, v metrových pásoch, s náhodným usporiadaním členov vzorky 90 genotypov lipnice lúčnej. Výsevu predchádzala štandardná príprava a spracovanie pôdy, po zbere predplodiny (hlúboviny) nasledovala hlboká orba, kyprenie, bránenie, prihnojenie a chemické ošetrenie proti pýru plazivému. Po ručnom výseve do riadkov bola pôda upravená valcovaním. Pokus bol podľa potreby zavlažovaný postrekom. Napriek dodržaniu všetkých agronomických postupov osivo ani jedného z genotypov za 5 týždňov nevyklíčilo. Na základe uvedeného sa pokus zopakoval s novým osivom v zmenenej štruktúre pokusu, kde boli súčasne vysiate aj vzorky osiva kostravy červenej (*Festuca rubra* L.), kostravy lúčnej (*Festuca pratensis* L.) a hybridov metonohu a kostravy v termíne 31. 5. 2002. Ani pri opakovanom výseve v poľných podmienkach osivo genotypov lipnice lúčnej nevyklíčilo. Osivo iných druhov tráv (kostravy a hybridov) vyklíčilo. V laboratórnych podmienkach potvrdená dobrá 70-80 % klíčivosť väčšiny genotypov lipnice lúčnej (niektoré genotypy mali veľmi nízku klíčivosť pod 10 %), nás oprávňuje k domnienke, že na vybranom pozemku mohli byť negatívne účinky reziduí predchádzajúcich ošetrení chemickými prípravkami, na ktoré veľmi citlivo reagovali práve genotypy lipnice lúčnej. V laboratórnych podmienkach Katedry ochrany rastlín FAPZ SPU v Nitre bola dokázaná na povrchu osiva prítomnosť fytopatogénnych húb rodu *Fusarium*, čo mohla byť tiež príčina neklíčenia osiva v poľných podmienkach.

Morfometrické meranie zrna lipnice lúčnej

V laboratórnych podmienkach sa hodnotilo 5 morfológických charakteristík zrna: dĺžka, šírka, hrúbka zrna, dĺžka štetinky a šírka brázdy pomocou binokulárnej lupy s okulárovým mikrometrom. Na meranie sa použilo zrno 30 genotypov lipnice lúčnej a z každého genotypu bolo náhodne vybraných 30 zrn. Biologický materiál pochádza zo Šľachtiteľskej stanice Levočské lúky a.s. Levoča. Podkladové údaje sa spracovali v programe MS Excel.

V sledovanom súbore genotypov lipnice lúčnej boli zistené nasledovné priemerné hodnoty morfológických charakteristík zrna: dĺžka v rozpätí od 2,16 do 3,55 mm, šírka od 0,50 do 0,73 mm, hrúbka od 0,52 do 0,77 mm, dĺžka štetinky od 0,66 do 1,10 mm a šírka brázdy od 0,26 do 0,42 mm (obr. 1-5). Pri charakteristikách zrna ako je dĺžka, šírka a hrúbka, bol zistený nízky variačný koeficient do 15 % s výnimkou pri šírke zrna genotypu 11/108, kde bol variačný koeficient s hodnotou 22,8%. Šírka brázdy a dĺžka štetinky boli charakteristiky s výrazne vyšším variačným koeficientom až do 41% a to pri genotype 19/(99/1) znaku dĺžka štetinky.

Korelačná analýza sa robila medzi charakteristikami dĺžka a šírka zrna, dĺžka a hrúbka zrna, šírka a hrúbka zrna, dĺžka zrna a dĺžka štetinky, šírka zrna a šírka brázdy (tab. 1). V závislosti od genotypov boli hodnoty korelačných koeficientov pre charakteristiku dĺžka a šírka zrna veľmi rozdielne. Pri 93 % genotypov boli korelačné koeficienty nízke a kladné až na ojedinelé výnimky, kde boli korelačné koeficienty záporné a nízke. Vyskytovali sa od nízkych záporných hodnôt -0,01 až po 0,63 (5/102) a 0,74 (11/83). Pri týchto dvoch genotypoch s absolútnymi malými priemernými hodnotami dĺžky a šírky zrna bola relatívne vysoká závislosť medzi sledovanými dvoma charakteristikami, malým hodnotám dĺžky zodpovedali malé hodnoty šírky zrna. Korelácia medzi dĺžkou a šírkou mala hodnoty korelačných koeficientov nízke a stredné pri 86% genotypov. Vyskytovali sa od -0,25 až po 0,67 (11/108), 0,76 (5/102), 0,77 (22/(30/5)). Pri genotypoch 11/108 a 5/102 boli hodnoty dĺžky a hrúbky zrna malé, zatiaľ čo pri genotype 22/(30/5) dĺžka aj hrúbka patrili medzi najväčšie pri sledovaných genotypoch. Pri charakteristikách šírky a hrúbky zrna boli korelačné koeficienty kladné s 30% podielom vysokých korelačných koeficientov. Z toho sa dá usúdiť, že zrno jednej tretiny genotypov malo pri väčšej šírke aj väčšiu hrúbku. Korelácia medzi dĺžkou zrna a dĺžkou štetinky bola záporná s 82% podielom malých hodnôt korelačných koeficientov. Pri tomto jedinom porovnávaní sledovaných charakteristík bola výrazná záporná korelácia, čo znamená, že veľké zrná mali relatívne malé štetinky. Najväčšie hodnoty kladných korelačných koeficientov boli medzi šírkou zrna a šírkou brázdy. 73 % genotypov malo

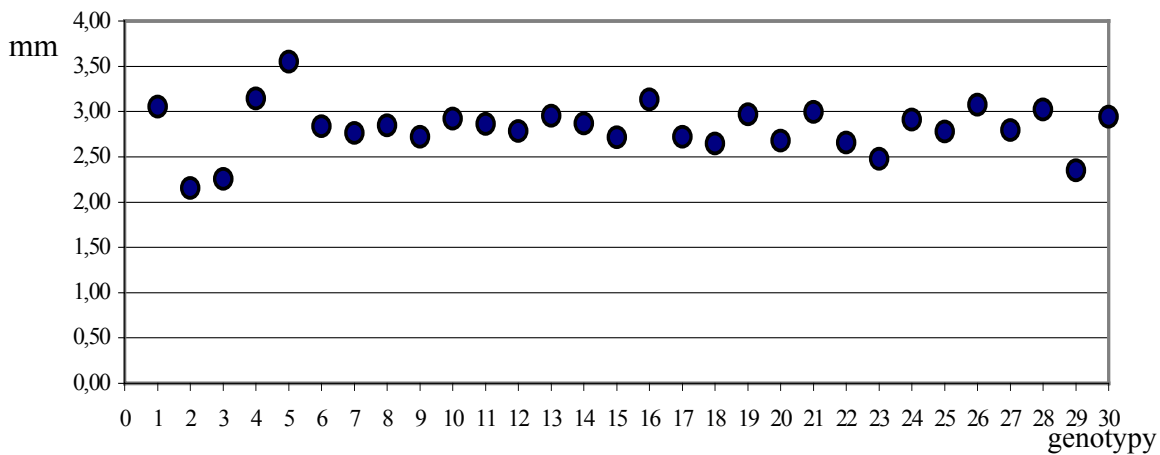
vysoké hodnoty korelačných koeficientov. Široké zrná mali široké brázdy. Na základe korelácií a nameraných morfológických charakteristík boli v sledovanom genofonde lipnice lúčnej dva zaujímavé genotypy. Pri genotype 5/102 boli namerané najmenšie priemerné morfológické charakteristiky, jedno z najmenších zrn zo sledovaných genotypov malo vysoké hodnoty korelačných koeficientov. Bola potvrdená kladná závislosť medzi dĺžkou, šírkou, hrúbkou zrna, šírkou brázdy a záporná závislosť medzi dĺžkou zrna a dĺžkou štetinky. Genotyp 1/22 jeden s najväčším zrnom v sledovanom súbore mal nízke korelačné koeficienty a jedine pri tomto genotype bola potvrdená kladná a vysoká závislosť medzi šírkou zrna a šírkou brázdy.

DNA markéry

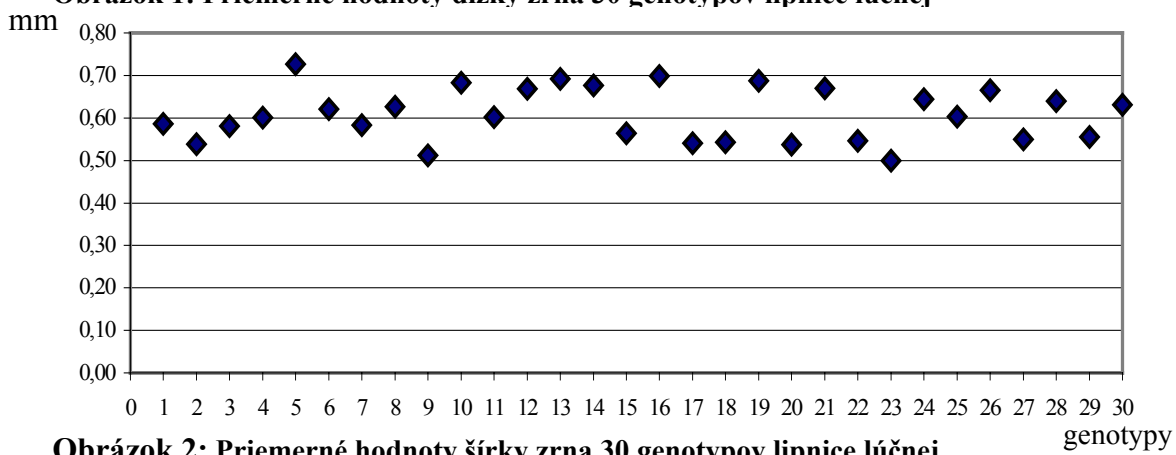
Na charakteristiku genofondu lipnice lúčnej sa použije technika polymorfizmu náhodne zmnoženej DNA (RAPD). Táto technika založená na báze polymerázovej reťazovej reakcie (PCR), vyžaduje optimalizáciu izolácie DNA a PCR. V prvej etape riešenia vecnej etapy sa naša pozornosť sústredila na výber vhodnej metódy izolácie DNA tráv. Izolácia DNA podľa Rogers, Bendich (1994), bola úspešná s výťažnosťou 12ng DNA v $1\mu\text{l}^{-1}$. Na izoláciu DNA z čerstvých listov tráv sa osvedčil postup: rozdrvenie materiálu v tekutom dusíku, prídanie 2x CTAB extrakčného roztoku a následná inkubácia pri 65 °C, prídanie chloroformu, centrifugácia, prenos supernatantu do novej skúmavky, prídanie zrážacieho roztoku, zrážanie pri -20 °C, centrifugácia, odstránenie supernatantu, prídanie koncentrovaného TE roztoku a zahriatie na 65 °C, prídanie etanolu, centrifugácia, odstránenie supernatantu, prídanie 80 % etanolu, centrifugácia, odstránenie supernatantu, vysušenie, prídanie TE roztoku a rehydratácia DNA v TE roztoku.

Tabuľka 1: Korelačné koeficienty medzi sledovanými charakteristikami zrna lipnice lúčnej

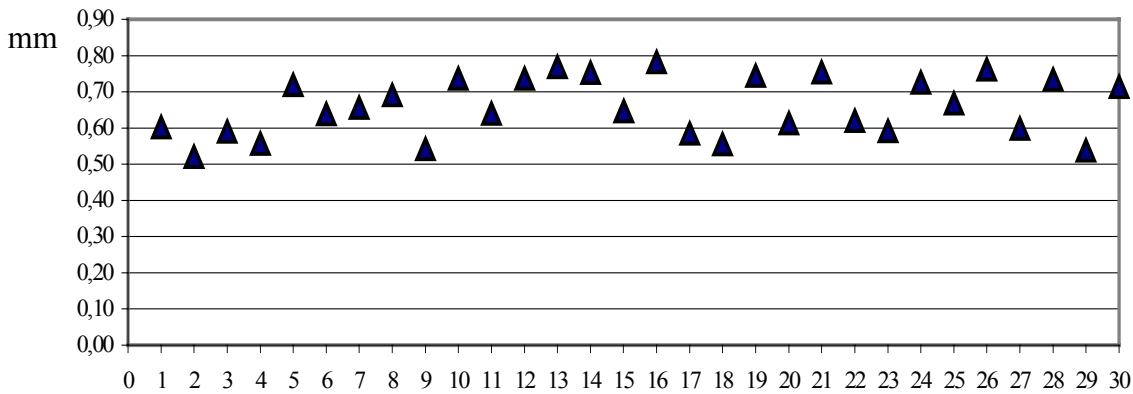
Genotyp	dĺžka/šírka zrna	dĺžka/hrúbka zrna	šírka/hrúbka zrna	dĺžka zrna /dĺžka štetinky	šírka zrna /šírka brázdy
4/57	-0,19	-0,25	0,42	0,10	0,39
5/102	0,63	0,76	0,79	-0,56	0,70
21/16	0,37	0,00	-0,14	-0,13	0,43
9/176	-0,02	0,15	0,46	-0,02	0,75
1/22	0,35	0,30	0,40	-0,19	0,81
5/069	0,27	0,46	0,26	-0,14	0,86
8/87	0,38	0,41	0,83	-0,32	0,77
1/82	0,41	0,60	0,56	-0,25	0,72
1/254	0,39	0,44	0,66	-0,50	0,65
17/(00/01)	0,08	0,36	0,39	-0,17	0,70
3/756	-0,01	0,26	0,76	-0,26	0,72
20/(4/14)	0,16	0,37	0,44	-0,25	0,58
18/(31/4)	0,13	0,56	0,60	-0,61	0,73
19/(99/1)	0,01	0,28	0,44	-0,03	0,62
8/36	0,35	0,50	0,58	-0,41	0,74
7/15	0,08	0,12	0,47	-0,17	0,50
10/285	0,38	0,46	0,76	-0,14	0,44
10/14	0,10	0,51	0,30	-0,22	0,81
10/64	0,45	0,45	0,58	-0,50	0,63
11/83	0,74	0,34	0,38	-0,13	0,74
16/9	0,36	0,39	0,42	-0,52	0,78
10/38	0,21	0,52	0,36	-0,50	0,82
11/108	0,26	0,67	0,34	-0,16	0,40
15/3	-0,03	0,27	0,56	-0,53	0,71
27/6	0,00	0,24	0,64	-0,22	0,66
22/(30/5)	0,24	0,77	0,36	-0,70	0,74
2/12	0,28	0,50	0,34	-0,21	0,50
29/4	0,44	0,57	0,62	-0,55	0,72
2/51	0,43	0,46	0,65	-0,78	0,53
28/5	0,12	0,51	0,33	-0,66	0,73



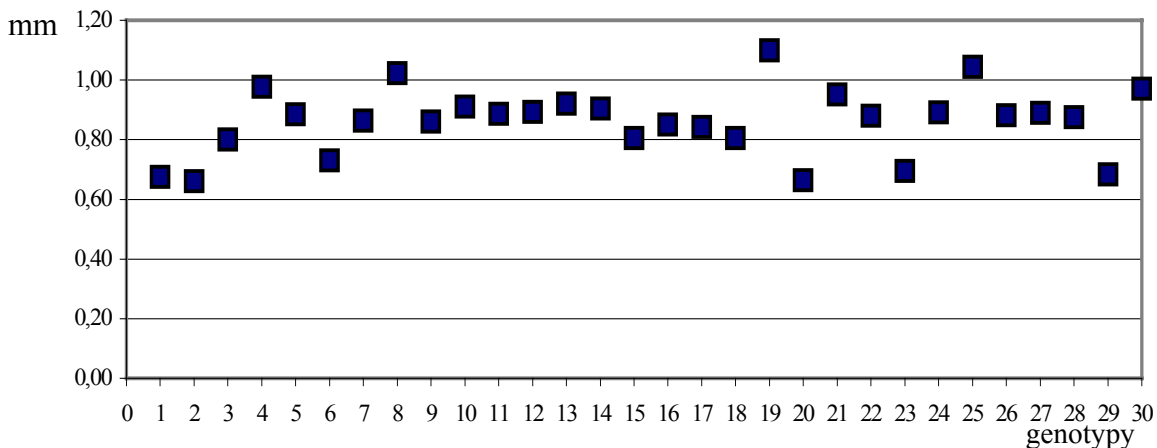
Obrázok 1: Priemerné hodnoty dĺžky zrna 30 genotypov lipnice lúčnej



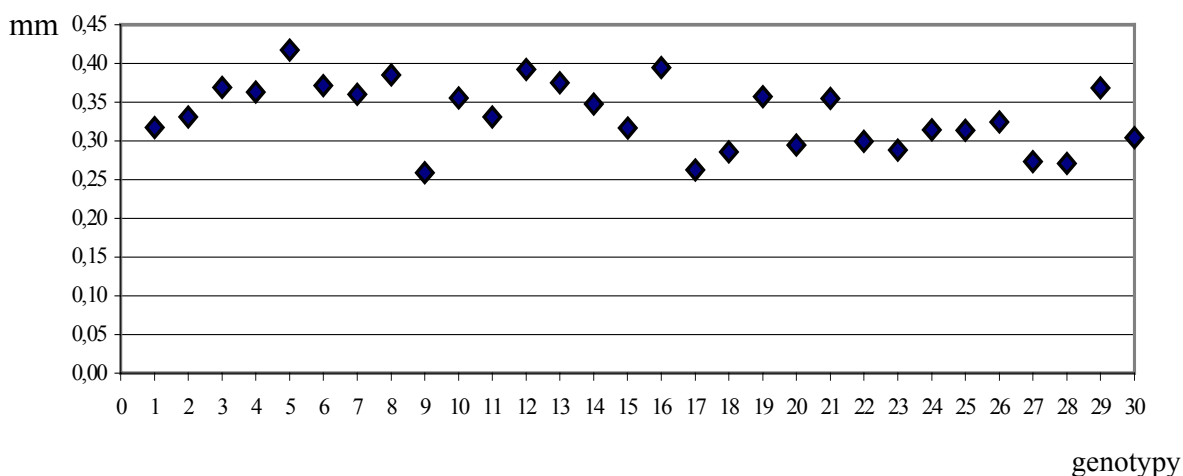
Obrázok 2: Priemerné hodnoty šírky zrna 30 genotypov lipnice lúčnej



Obrázok 3: Priemerné hodnoty hrúbky zrna 30 genotypov lipnice lúčnej



Obrázok 4: Priemerné hodnoty dĺžky štetinky zrna 30 genotypov lipnice lúčnej



Obrázok 5: Priemerné hodnoty šírky brázdy zrna lipnice lúčnej

Poradie genotypov

1-4/57, 2-5/102, 3-21/16, 4-9/176, 5-1/22, 6-5/069, 7-8/87, 8-1/82, 9-1/254,
10-17/(00/01), 11-3/756, 12-20/(4/14), 13-18/(31/4), 14-19/(99/1), 15-8/36,
16-7/15, 17-10/285, 18-10/14, 19-10/64, 20-11/83, 21-16/9, 22-10/38, 23-11/108,
24-15/3, 25-27/6, 26-22/(30/5), 27-2/12, 28-29/4, 29-2/51, 30-28/5.

6. Realizačné výstupy: -

7. Prezentácia výsledkov na vedeckých podujatiach, vo vedeckej a odbornej tlači

7.1 Bežo, M. – Kutišová, J. 2002: Rastlinné biotechnológie, In: Zborník referátov z medzinárodnej konferencie Biologické dni 2002. Nitra: Univerzita Konštantína Filozofa, 146 s., ISBN 80-8050-520-9

8. Zapojenie doktorandov na riešení problematiky

8.1 Téma: Morfometrická analýza a polymorfizmus DNA genofondu a osiva lipnice lúčnej (*Poa pratensis* L.), Ing. Martin Bežo, Katedra genetiky a šľachtenia rastlín, doc. Ing. Ján Brindza, CSc.

9. Zapojenie študentov na riešení problematiky formou diplomových prác: -

10. Zahraničná a domáca spolupráca

10.1 Šľachtiteľská stanica Levočské lúky a.s., 054 01 Levoča

Výskumný ústav rastlinnej výroby Piešťany, Bratislavská cesta 122, 921 68 Piešťany

11. Návrh na využitie dosiahnutých výsledkov a realizačné výstupy z riešenia problematiky

Výstupom práce bude obrazová dokumentácia, ktorej súčasťou budú údaje o morfológických vlastnostiach semena rastlín lipnice lúčnej (*Poa pratensis* L.). Realizačným výstupom RAPD analýzy budú DNA odtlačky jednotlivých genotypov z kolekcie genofondu lipnice lúčnej (*Poa pratensis* L.).

12. Súhrn

Genofond lipnice lúčnej (*Poa pratensis* L.) tvorený 30 genotypmi bol hodnotený na základe morfológických charakteristík zrna. V laboratórnych podmienkach sa hodnotilo 5 morfológických charakteristík zrna: dĺžka, šírka, hrúbka zrna, dĺžka štetinky a šírka brázdy pomocou binokulárnej lupy s okulárovým mikrometrom. Korelačná analýza sa robila medzi charakteristikami dĺžka a šírka zrna, dĺžka a hrúbka zrna, šírka a hrúbka zrna, dĺžka zrna a dĺžka štetinky, šírka zrna a šírka brázdy. Na

základe korelácií a nameraných morfológických charakteristík boli v sledovanom genofonde lipnice lúčnej dva zaujímavé genotypy (5/102, 1/22). Pri genotype 5/102 boli namerané najmenšie priemerné morfológické charakteristiky, jedno z najmenších zŕn zo sledovaných genotypov malo vysoké hodnoty korelačných koeficientov. Bola potvrdená kladná závislosť medzi dĺžkou, šírkou, hrúbkou zrna, šírkou brázdy a záporná závislosť medzi dĺžkou zrna a dĺžkou štetinky. Genotyp 1/22 je jeden s najväčším zrnom v sledovanom súbore mal nízke korelačné koeficienty a jedine bola potvrdená kladná a vysoká závislosť medzi šírkou zrna a šírkou brázdy.

Na charakteristiku genofondu lipnice lúčnej sa použije technika polymorfizmu náhodne zmnoženej DNA (RAPD). Optimalizovala sa izolácia DNA pre trávy. Úspešná bola izolácia DNA podľa Rogers, Bendich (1994) s výťažnosťou 12ng DNA v $1\mu\text{l}^{-1}$.

13. Kľúčové slová: lipnica lúčna (*Poa pratensis*), genofond, morfometrická analýza, DNA izolácia