



Európska únia  
Európsky fond regionálneho rozvoja



Podporujeme výskumné aktivity na Slovensku/Projekt spolufinancovaný zo zdrojov ES  
Vybudovanie výskumného centra „AgroBioTech“

## Vybudovanie výskumného centra "AgroBioTech" ITMS 26220220180

<b>Partner</b>	<b>Ústav genetiky a biotechnológií rastlín SAV v Nitre (Partner 2)</b>
<b>Aktivita</b>	<b>3.1 Aplikovaný výskum v rastlinných biotechnológiách</b>
<b>Zodpovedná osoba</b>	RNDr. Alena Gajdošová, CSc.
<b>Cieľ</b>	B. Realizácia aplikovaného výskumu v oblasti rastlinných biotechnológií
<b>Výstup 2</b>	Efektívne množenie ekonomicky významných plodín využitím <i>in vitro</i> kultúr a začlenenie do poľnohospodárskej produkcie, čo bude príspevkom pre trvalo udržateľné poľnohospodárstvo, udržanie biologickej diverzity a potravinovú bezpečnosť.
<b>Autori</b>	RNDr. Alena Gajdošová, CSc. RNDr. Gabriela Libiaková, CSc. RNDr. Radoslava Matúšová, PhD. Doc. RNDr. Ján Salaj, DrSc. Mgr. Martin Hajduch, PhD. Mgr. Katarína Klubíková, PhD. Mgr. Ľubica Uvačková, PhD. Mgr. Daša Gábrišová, PhD. Ing. Dagmara Kullačová

V Nitre, dňa:

**RNDr. Alena Gajdošová, CSc.**  
zodpovedná osoba odbornej aktivity 3.1

**prof. Ing. Marián Brestič, PhD.**  
predseda vedeckého výboru a vedecký  
garant



Podporujeme výskumné aktivity na Slovensku/Projekt spolufinancovaný zo zdrojov ES  
Vybudovanie výskumného centra „AgroBioTech“

**a) Efektívne množenie vybraných druhov drobného ovocia využitím *in vitro* kultúr a začlenenie do poľnohospodárskej produkcie**

**Autori: A. Gajdošová, Gabriela Libiaková**

**1. Stav riešenia problematiky v zahraničí a na Slovensku**

Drobné ovocie patrí medzi hodnotné druhy ovocia s pozitívnym dopadom na ľudské zdravie. V súčasnosti sa stáva čoraz populárnejšie najmä z dôvodu vysokého obsahu zdraviu prospešných látok, čím sa zvyšuje dopyt po tomto ovocí. V 90-tych rokoch minulého storočia bol na Slovensku zaznamenaný prudký pokles v produkcii drobného ovocia napriek faktu, že Slovensko s jeho klímou, poľnými podmienkami, ako aj mnohými pôvodnými odrodami drobného ovocia ponúka početné možnosti pre jeho intenzívne pestovanie. V súčasnosti sa situácia mení a je badateľný vzrastajúci záujem o pestovanie a produkciu rôznych typov bobuľovín nielen u záhradkárov, ale aj u drobných farmárov. Drobné ovocie je všeobecne jedným z najbohatších zdrojov antioxidantov spomedzi čerstvého ovocia a preto je často považované za funkčnú potravu (Szajdek a Borowska, 2008).

*Rubus idaeus* L. (ostružina malinová) a *Rubus fruticosus* L. (ostružina černicová) patria medzi hodnotné druhy ovocia. Plody malín sú významnou surovinou pre spracovateľský priemysel, obsahujú priaznivé zastúpenie vitamínu C, E, P, B1, B2, B6 a provitamínu A i celého radu minerálnych látok, z čoho je významný vyšší obsah vápnika, železa, draslíka a kyseliny fosforečnej.

Ako alternatívne nekonvenčné ovocné dreviny sú pre pestovanie v podmienkach Slovenska vhodné niektoré introdukované odrody *Vaccinium corymbosum* L. (čučoriedka chocholíkatá) a *Vaccinium vitis-idaea* L. (brusnica pravá). Záujem o tieto atraktívne druhy drobného ovocia sa zvyšuje. Predpokladá sa jeho široké uplatnenie na trhoch EU vzhľadom na nutričnú a dietetickú hodnotu plodov. Sú významnou surovinou pre potravinársky a farmaceutický priemysel. Záujem o tieto druhy ovocia u nás vedie k nešetrnému zberu našich pôvodných druhov *Vaccinium myrtillus* L. (brusnica čučoriedková) a *Vaccinium vitis-idaea* L. (brusnica obyčajná), ktoré predstavujú významné komponenty lesných ekosystémov v horských a podhorských oblastiach a ktoré sa nachádzajú prevažne už len v ťažko prístupných lokalitách, v národných parkoch a chránených územiach. Nešetrný zber má za následok devastáciu pôvodne rozsiahlych porastov prirodzených druhov. Prirodzené porasty je potrebné revitalizovať, zvlášť v nadmorských výškach, kde vykazujú protierózný efekt, majú ekologický význam, prispievajú k enviromentálne prijateľnému využitiu veľmi kyslých a málo úrodných pôd a taktiež k zachovaniu biodiverzity. V súčasnosti existuje veľa vyšľachtených, produktívnych odrôd druhov rodu *Vaccinium*, ktoré rozšírením ich pestovania a zavedením do veľkovýrobnej praxe umožňujú riešiť dopyt po ovocí na trhu, v spracovateľskom priemysle, ako aj u agropodnikateľov azáhradkárov. Najvyužívanejším druhom pre veľkoplošné pestovanie je *V. corymbosum* L. (brusnica chocholíkatá). Odrody druhu *V. corymbosum* L. sú selektované a pestované v odlišných agroklimatických podmienkach. Je potrebné overiť ich nároky na pestovanie a uplatnenie na Slovensku. Výskum odrôd, uskutočňovaný na pokusných plochách Výskumnej stanice v Krivej na Orave, poukazuje na úspešnosť introdukcie tohto druhu v našich podmienkach. Tento druh sa javí ako vhodný alternatívny druh brusnice čučoriedkovej s uplatnením nielen v horských a podhorských oblastiach.



Podporujeme výskumné aktivity na Slovensku/Projekt spolufinancovaný zo zdrojov ES  
Vybudovanie výskumného centra „AgroBioTech“

Značná pozornosť je venovaná aj pestovaniu vyšľachtených odrôd *Vaccinium vitis-idaea* L. na Slovensku (Šimala et al., 2007).

Ďalším atraktívnym nekonvenčným druhom drobného ovocia je muchovník (*Amelanchier spp.*). Muchovník zahŕňa asi 25 druhov krov a malých opadavých stromov z čeľade *Rosaceae* (ružovité). Pôvodne pochádza zo Severnej Ameriky, ale aj na našom území sú vhodné podmienky pre jeho pestovanie. Niektoré druhy muchovníka, ako *A. ovalis* (muchovník vajcovitý), sa prirodzene vyskytujú v strednej i južnej Európe (Ochmian et al., 2013). Plody muchovníka sú vzhľadom aj chuťovo podobné čučoriedkam, hoci ide o malvice. Dajú sa konzumovať bez úpravy alebo spracovať pre výrobu džemov, sirupov a vín. Muchovník je mimoriadne mrazuvzdorná rastlina, v prípade *A. alnifolia* bola zaznamenaná odolnosť až do  $-45^{\circ}\text{C}$  (Junttila et al., 1983). Tieto rastliny sú zaujímavé z výživového hľadiska, pretože ich plody obsahujú veľký podiel fenolov (antokyánov a flavonolov), množstvo flavonoidov (quercetín) a antioxidantov (vitamín C). Okrem značného množstva ďalších vitamínov obsahujú aj vysoký podiel železa, draslíka a horčíka (Ochmian et al., 2013; Rop et al., 2013; Mazza a Cottrell, 2008). Napriek všetkým týmto benefitom je komerčné pestovanie muchovníka úzko obmedzené iba na niektoré oblasti USA a Kanady (Remphrey a Pearn, 2006). Muchovník ako netypická plodina je na Slovensku veľmi málo známy a jeho pestovanie nie je rozšírené. Jedným z dôvodov je aj nedostatok sadbového materiálu širšieho sortimentu odrôd.

Nedostatok kvalitného biologického materiálu je hlavným limitujúcim faktorom rozšírenia produktívnych odrôd a realizácie ich plantážnického spôsobu pestovania na Slovensku. Využitie techník pletivových kultúr umožňuje dosiahnuť efektívnu masovú produkciu nových výkonných odrôd, produkciu zdravého biologického materiálu, ale taktiež je predpokladom pre aplikáciu genetického inžinierstva. Mikropropagácia je významnou súčasťou komerčného množenia mnohých druhov rastlín (Pierik, 1997). Vyvinuté boli početné techniky množenia rastlín *in vitro*, ktoré zahŕňajú indukciu axilárnych výhonkov z dormantných púčikov a nodálnych segmentov, regeneráciu adventívnych výhonkov, kultiváciu izolovaných meristémov a regeneráciu rastlín somatickou embryogenézou (Razdan, 2003). Medzi hlavné výhody využitia explantátových kultúr patria: nezávislosť od ročného obdobia a vývinovej fázy rastliny, možnosť prekonať nekrížiteľnosť systematicky vzdialených rastlinných druhov a umožniť tak vznik nových genotypov poľnohospodárskych a záhradníckych plodín s významnými hospodárskymi znakmi a vlastnosťami, možnosť dlhodobého udržiavania genetických zdrojov rastlín v *in vitro* kultúre, možnosť využitia selekcie v kultúrach *in vitro* a tým urýchlenie a skvalitnenie šľachtiteľskej práce, možnosť „konštrukcie“ nových genotypov kultúrnych rastlín metódami genetického inžinierstva či možnosť využiť biochemický potenciál *in vitro* kultúr na produkciu farmaceuticky významných látok (Salaj a Blehová, 2006).

## 2. Ciele výskumu

Ciele výskumu boli nasledovné:

- nadviazanie kontaktu so záhradníckou praxou za účelom spolupráce pri získavaní východiskového rastlinného materiálu pre zakladanie *in vitro* kultúr
- založenie *in vitro* kultúr vybraných odrôd drobného ovocia
- následná mikropropagácia vybraných odrôd *Rubus*, *Vaccinium* a *Amelanchier*



Podporujeme výskumné aktivity na Slovensku/Projekt spolufinancovaný zo zdrojov ES  
Vybudovanie výskumného centra „AgroBioTech“

- 
- odovzdanie získaného rastlinného materiálu pre ďalšie testovanie *in vitro* vypestovaných rastlín v podmienkach *in vivo*

### 3. Objekty experimentálneho štúdia

Vybrané odrody druhov:

*Rubus fruticosus* L. – ostružina černicová

*Rubus idaeus* L. – ostružina malinová

*Vaccinium corymbosum* L. – čučoriedka chocholíkatá

*Vaccinium vitis-idaea* L. – brusnica pravá

*Amelanchier alnifolia* var. *Cusickii* – muchovník jelšolistý

### 4. Použitá laboratórna technika

Pre riešenie úloh výskumu bola použitá existujúca laboratórna technika, ako aj niektoré prístroje objednané, dodané a už inštalované v rámci projektu AgroBioTech.

- autokláv STURDY SA-260 MA
- autokláv horizontálny (Laboklav 25-M) – zakúpený z projektu ABT
- analytické váhy (Sartorius)
- analytické váhy Kern – zakúpené z projektu ABT
- predvažovačky Unitwist (UniEquip)
- pH meter Consort (Scientific Instruments)
- laminárny box s HEPA filtrom UniFlow UVU700
- laminárny box Labcare clean air
- laminárny box Biohazard (BioII Advance 6) – zakúpený z projektu ABT
- lupy Binocular SMZ – 2T (Nikon); EZ4D (Leica); Stemi Dv4 (Zeiss)
- svetelný mikroskop NU2 Carl Zeiss
- fluorescenčný mikroskop Axioplan 2 (Zeiss)
- invertovaný mikroskop EC3 (Leica); TMS (Nikon)
- sušičky G100/250 (KBC), HS62A
- laboratórna sušička (Memmert) – zakúpená z projektu ABT
- zariadenie na demineralizovanú vodu AQUAL 29 (Merci)
- prístroj pre výrobu ultračistej vody (Simplicity UV) – zakúpený z projektu ABT
- chladničky, mrazničky -20°C
- kultivačné miestnosti s regulovanou teplotou a svetelným režimom

### 5. Pracovné postupy

Výskum bol rozdelený na viaceré vzájomne sa prekrývajúce etapy:

- Zber rastlinného materiálu z dospelých jedincov (z rastlín poskytnutých spoločnosťou Wellberry s.r.o. alebo zakúpených rastlín). Odber materiálu, výhonkov s dormantnými axilárnymi a apikálnymi púčikmi, bol realizovaný v mesiacoch január –február 2014, 2015.
- Sterilizácia rastlinného materiálu (nodálnych segmentov nesúcich 1 púčik) v 70 % etanole - 2 min., 0,1% HgCl<sub>2</sub> - 6 min., následné premývanie v sterilnej destilovanej vode 3 x15 min.



Podporujeme výskumné aktivity na Slovensku/Projekt spolufinancovaný zo zdrojov ES  
Vybudovanie výskumného centra „AgroBioTech“

- Vysadenie vysterilizovaných explantátov na kultivačné médium. Zloženie kultivačného média bolo stanovené podľa rastlinného druhu: MS - Murashige a Skoog (1962) médium pre druhy rodu *Rubus* a *Amelanchier* a WPM - Woody Plant Medium (Lloyd a McCown, 1980) pre druhy rodu *Vaccinium*;
- Kultivácia *in vitro* kultúr vybraných odrôd *Rubus* spp. a *Vaccinium* spp. na kultivačných médiách s rôznymi kombináciami a koncentraciami rastových látok a opakovaná subkultivácia na čerstvé kultivačné médium.
- Experimentálne testovanie rôznych faktorov ovplyvňujúcich účinnosť mikropropagácie, ako sú:
  - typ a koncentrácia rastových látok pre iniciáciu rastu výhonkov
  - typ a koncentrácia rastových látok pre multiplikáciu výhonkov
  - typ a koncentrácia rastových látok pre dlhodobú opakovanú subkultiváciu výhonkových kultúr (tzv. udržiavacie médium)
  - testovanie rôzneho zdroja a koncentrácie železa v kultivačnom médiuPre posúdenie vhodnosti kultivačných podmienok bol hodnotený počet a vitalita výhonkov na explantát.
- Testovanie zakoreňovania výhonkov získaných *in vitro* na médiách s auxínom;
- Všetky spomínané experimenty smerovali k vypracovaniu a optimalizácii protokolov pre mikropropagáciu vybraných odrôd.

## 6. Výsledky a očakávané prínosy

ÚGBR SAV má od roku 2011 uzatvorenú bilaterálnu zmluvnú spoluprácu so spoločnosťou WELLBERRY, s.r.o. (Príloha č. 5) zameranú na *in vitro* množenie vybraných druhov a odrôd drobného ovocia a testovania ich adaptability v podmienkach Slovenska. Účelom spolupráce je zefektívnenie riešenia výskumných vedeckých úloh s využitím výsledkov výskumu v praxi na báze vzájomnej výhodnosti a reciprocity. V rámci tejto zmluvnej spolupráce zmluvné strany intenzívne spolupracujú pri poskytovaní biologického materiálu spoločnosťou Wellberry s.r.o. pre výskumné účely (množenie a genetické vylepšenie druhov drobného ovocia aplikáciou biotechnologických postupov), pri dodávaní rastlinného materiálu vyprodukovaného na ÚGBR SAV v *in vitro* podmienkach spoločnosti Wellberry, s.r.o. pre účely testovania jeho rastu v podmienkach *in vivo*. Intenzívna dlhoročná spolupráca existuje tiež s Ing. Danielom Šimalom, popredným odborníkom pre pestovanie *V. corymbosum* a *V. vitis-idaea* na Slovensku.

Na ÚGBR SAV bol v roku 2014 a 2015 založený široký sortiment odrôd *Vaccinium corymbosum* L.- čučoriedka chocholíkatá (Chandler, Hannah's Choice, Berkeley, Liberty, Aurora, Nelson, KazPliszka, Bluecrop, atď.), *Rubus idaeus* L.-ostružina malinová (Lesničanka), *Rubus fruticosus* L.-ostružina černicová (Black Satin, Čačanska Bestrna), *Amelanchier alnifolia* L. var. Cusickii-muchovník v kultúrach *in vitro* s cieľom optimalizácie ich mikropropagácie. Rastlinný materiál *Vaccinium corymbosum* (približne 200 rastlín) získaný z *in vitro* experimentov bol v štádiu niekoľko mesačných zakorenených rastlín v plastových sadbovačoch v roku 2015 poskytnutý spoločnosti Wellberry s.r.o. Tieto rastliny budú priebežne hodnotené na plochách spoločnosti Wellberry s.r.o. (porovnanie rastlinného materiálu produkovaného konvenčnými postupmi a materiálu získaného z *in vitro* experimentov).



Podporujeme výskumné aktivity na Slovensku/Projekt spolufinancovaný zo zdrojov ES  
Vybudovanie výskumného centra „AgroBioTech“

Vypracované boli mikropropagačné protokoly pre druhy drobného ovocia (*Vaccinium corymbosum*, *Vaccinium vitis-idaea*, *Rubus idaeus*, *Rubus fruticosus*, *Amelanchier alnifolia*), ktoré umožňujú dosiahnuť efektívnu mikropropagáciu širokého sortimentu odrôd produktívnych v našich klimatických a ekologických podmienkach, s cieľom začleniť ich do produkčného systému. Taktiež druhy prirodzene rozšírené na Slovensku - *Vaccinium myrtillus* L. a *Vaccinium vitis-idaea* L., ktoré predstavujú významné komponenty lesných ekosystémov v horských a podhorských oblastiach, môžu byť množené týmto spôsobom s cieľom zachovania ich biodiverzity, revitalizácie prirodzených porastov a to zvlášť v nadmorských výškach, kde vykazujú protierózný efekt a majú značný ekologický význam. Vypracované protokoly ako aj odborné poradenstvo sú k dispozícii ostatným pestovateľom a množiteľom u dr. Gajdošovej. Efektívne množenie vybraných odrôd drobného ovocia využitím *in vitro* kultúr a začlenenie do poľnohospodárskej produkcie bude príspevkom pre trvalo udržateľné poľnohospodárstvo, udržanie biologickej diverzity, potravinovú bezpečnosť a v neposlednej miere prispieva k ochrane prirodzených porastov divo rastúcich druhov bobuľovín (brusnice čučoriedkovej, brusnice pravej), ktoré sú ohrozené nešetrným zberom.

V júni 2014 bola dr. Gajdošovou v spolupráci s Wellberry s.r.o. vypracovaná štúdia pre pestovanie drobného ovocia pre potreby praxe (k dispozícii na ÚGBR SAV – interný materiál pre potreby spoločnosti Wellberry s.r.o.).

#### **Merateľné ukazovatele výsledkov:**

LIBIAKOVÁ, Gabriela - SÚKENÍKOVÁ, Miroslava - MATÚŠOVÁ, Radoslava - GAJDOŠOVÁ, Alena. Adventitious shoot regeneration *in vitro* *Rubus fruticosus* L. In Applied Natural Sciences 2013: The 4<sup>th</sup> International Scientific Conference, Nový Smokovec, 2-4 October 2013. Trnava, University of SS. Cyril and Methodius, 2013, p. 108. ISBN 978-80-8105-501-0.

Termín kedy bola publikácia vydaná: október 2014

Podiel ABT – 33%

SÚKENÍKOVÁ, Miroslava – LIBIAKOVÁ, Gabriela – MORAVČÍKOVÁ, Jana – HRICOVÁ, Andrea - GAJDOŠOVÁ, Alena. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of blackberry (*Rubus fruticosus* L.). In *Plant Cell Tiss Organ Cult.*, 2015, 120, 351-354.

Termín kedy bola publikácia vydaná: 2014

podiel ABT– 25 %

#### **7. Zoznam použitej literatúry**

- JUNTILLA, O. - ŠTUSHNOFF, C. - GUSTA, L.V. (1983). *Can. J. Botany*. 61(1), p. 164.  
LLOYD, G. – McCOWN, B. (1980). In: *Proc Int Plant Prop Soc*, 30, p. 421–427.  
MAZZA, G. - COTTRELL, T. (2008). *J. Food. Compos. Anal.* 21(3), p. 249.  
MURASHIGE, T. – SKOOG, F. (1962). *Physiologia Plantarum*, 15, p. 473 – 497.  
OCHMIAN, I. - KUBUS, M. - DOBROWOLSKA, A. (2013). *Dendrobiology* 70, p. 59.



Podporujeme výskumné aktivity na Slovensku/Projekt spolufinancovaný zo zdrojov ES  
Vybudovanie výskumného centra „AgroBioTech“

- PIERIK, R.L.M. (1997). *In vitro culture of higher plants*. 4<sup>th</sup> ed. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- RAZDAN, M.K. (2003). *Introduction to plant tissue culture*. Science Publishers Inc., Enfield, NH, USA.
- REMPHREY, W.R. - PEARN, L.P. (2006). *Can. J. Plant. Sci.* 86(2), p. 499.
- ROP, O. - MLCEK, J. - JURIKOVA, T., et al. (2013). *Fruits* 68(5), p. 435.
- SALAJ, T. - BLEHOVÁ, A. (2006). *In vitro kultúry vyšších rastlín*. Bratislava, Univerzita Komenského Bratislava, 2006. 158 p. ISBN 80-223-2061-7.
- SZAJDEK, A. – BOROWSKA, E.J. (2008). *Plant Foods Hum Nutr* 63, 147-156.
- ŠIMALA, D. - OSTROLUCKÁ, M.G. - GAJDOŠOVÁ, A. (2007). *Acta horticulturae et regioteecturae*, ročník 10, mimoriadne číslo, p. 33-36.

## **b) Udržanie potravinovej bezpečnosti ochranou poľnohospodárskej produkcie významných plodín pred parazitickými rastlinami**

**Autori: Radoslava Matúšová, Dagmara Kullačová**

### ***1. Stav riešenia problematiky v zahraničí a na Slovensku***

Parazitické rastliny rodov *Phelipanche*, *Orobanche* a *Striga* sú holoparazitické a hemiparazitické rastliny, ktoré pre svoj rast a ukončenie životného cyklu získavajú vodu a všetky živiny z koreňov hostiteľských rastlín. Následkom sú znížené výnosy a kvalita poľnohospodárskych významných rastlín a pri vysokom zamorení pôdy dochádza až k znehodnoteniu celého porastu. V celosvetovom meradle tieto druhy ovplyvňujú výnosy poľnohospodárskych plodín na ploche viac ako milión hektárov poľnohospodárskej pôdy (Cardoso et al. 2011; Fernández-Aparicio et al. 2011; Gomez-Roldan et al. 2008). Na Slovensku je zaznamenaný výskyt zárazovca konáristého (*Phelipanche ramosa* L. Pomel.) v poľnohospodárskych oblastiach juhozápadného Slovenska, kde sú najviac postihnuté porasty rajčiakov.

Parazitické buriny čerpajú živiny cez korene hostiteľských rastlín a tak mechanické odstraňovanie rastlín z pôdy poškodí aj korene hostiteľských rastlín. Taktiež nie sú známe účinné selektívne herbicídy. Pri riešení daného problému zlyhávajú všetky známe postupy odstraňovania daných burín z pôdy. Komplikáciou je aj fakt, že parazitické rastliny klíčia iba v prítomnosti a v tesnej blízkosti koreňov hostiteľských rastlín. Korene hostiteľských rastlín vylučujú do rizosféry chemické látky (strigolaktóny), ktoré indukujú klíčenie parazitických rastlín a tie následne napádajú hostiteľské rastliny (Bouwmeester et al. 2003; Matúšová et al., 2005; Matúšová et al. 2004). Preto sa v súčasnosti pozornosť vedcov zameriava na štúdium mechanizmov rozpoznania strigolaktónov semenami parazitických rastlín a spojenia koreňov hostiteľských rastlín s haustóriami parazitických rastlín. Pre skúmanie funkcií génov podieľajúcich sa na vytvorení funkčného spojenia je nevyhnutné vypracovanie protokolov pre genetické transformácie parazitických rastlín. V súčasnosti nie je publikovaný žiadny protokol pre genetické transformácie *P. ramosa*.



Podporujeme výskumné aktivity na Slovensku/Projekt spolufinancovaný zo zdrojov ES  
Vybudovanie výskumného centra „AgroBioTech“

## 2. Ciele výskumu

Známe a konvenčne využívané metódy v ochrane proti parazitickým rastlinám rodu *Orobancha* sú v poľnohospodárskej praxi do značnej miery neúčinné. Je veľmi ťažké kontrolovať a odstraňovať tieto koreňové parazitické rastliny z pôdy, rovnako šľachtenie rezistentných a tolerantných odrôd poľnohospodárskych plodín prináša iba krátkodobé efekty, rýchlo dochádza k selekcii a rozšíreniu odolných burín. Cieľom práce je študovať podmienky rastu *P. ramosa* ako modelovej rastliny v *in vitro* podmienkach pre možnosť následnej genetickej transformácie *P. ramosa* za účelom jej eliminácie.

## 3. Objekty experimentálneho štúdia

Objektom experimentálneho štúdia je zárazovec konáristý, jediný zástupca burinných druhov koreňových parazitov rodov *Phelipanche* a *Orobancha* na Slovensku. Do výskumu sme zaradili *P. ramosa* pochádzajúce z rôznych lokalít rozšírenia *P. ramosa* v rámci Európy.

## 4. Použitá laboratórna technika

Používame kombinácie laboratórnych techník pre prácu s rastlinami v podmienkach *in vitro* (techniky pletivových kultúr) a techník pre prácu so semenami parazitických rastlín.

- autokláv STURDY SA-260 MA
- autokláv horizontálny (Laboklav 25-M) – zakúpený z projektu ABT
- analytické váhy (Sartorius)
- analytické váhy Kern – zakúpené z projektu ABT
- predvažovačky Unitwist (UniEquip)
- pH meter Consort (Scientific Instruments)
- laminárny box s HEPA filtrom UniFlow UVU700
- laminárny box Labcare clean air
- laminárny box Biohazard (BioII Advance 6) – zakúpený z projektu ABT
- lupy Binocular SMZ – 2T (Nikon); EZ4D (Leica); Stemi Dv4 (Zeiss)
- svetelný mikroskop NU2 Carl Zeiss
- fluorescenčný mikroskop Axioplan 2 (Zeiss)
- invertovaný mikroskop EC3 (Leica); TMS (Nikon)
- sušičky G100/250 (KBC), HS62A
- laboratórna sušička (Memmert) – zakúpená z projektu ABT
- zariadenie na demineralizovanú vodu AQUAL 29 (Merci)
- prístroj pre výrobu ultračistej vody (Simplicity UV) – zakúpený z projektu ABT
- chladničky, mrazničky -20°C
- kultivačné miestnosti s regulovanou teplotou a svetelným režimom
- elektroforetické aparátúry – zakúpené z projektu ABT
- Termocyklér – zakúpený z projektu ABT
- centrifúga chladená – zakúpená z projektu ABT
- Inkubátor – zakúpený z projektu ABT





Podporujeme výskumné aktivity na Slovensku/Projekt spolufinancovaný zo zdrojov ES  
Vybudovanie výskumného centra „AgroBioTech“

### 5. Pracovné postupy

Pre štúdium molekulárnych mechanizmov podieľajúcich sa na interakciách hostiteľských rastlín a parazitických rastlín je nevyhnutné mať vypracované postupy pre *in vitro* kultúry skúmaných druhov a postupy regenerácie pre ukončenie ich životného cyklu (získanie semenného materiálu). Nakoľko *P. ramosa* ako holoparazitický druh nesyntetizuje chlorofyl a pre rast výhonkov je nevyhnutná prítomnosť hostiteľskej rastliny, na ktoré musia napojiť svoj koreňový systém v priebehu niekoľkých dní od vyklíčenia, pracovné postupy zahŕňajú zavedenie pletivových kultúr *P. ramosa* – detekcia vhodných štádií klíčenia a vývinu pre indukovanie pletivových kultúr, testovanie vhodných kultivačných médií pre ich rast a možnosti regenerácie pletív, skúmanie možnosti napojenia *in vitro* rastúcich pletív na korene hostiteľských rastlín. Práca s *in vitro* rastúcimi pletivami zahŕňa aj výber vhodných selekčných markerov pre selekciu transgénnych pletív.

### 6. Výsledky a očakávané prínosy

Mnohé parazitické rastliny, patriace do čeľade *Orobanchaceae* (zárazovité) sa zaraďujú k celosvetovo významným rastlinným škodcom hospodársky dôležitých plodín. Majú vysoko negatívny dopad na produkciu tak významných plodín, ako sú napr. rajčiaky, repka olejka, tabak, mrkva, zemiaky, strukoviny, slnečnica, kukurica a cirok (Afrika), čím ohrozujú **potravinovú bezpečnosť**. Štúdium mechanizmu rastu a množenia parazitickej rastliny *Phelipanche ramosa* v *in vitro* podmienkach nám umožnilo získať informácie, ktoré napomôžu eliminácii tejto parazitickej rastliny z poľných kultúr.

V práci sme sa zamerali na skúmanie optimálnych podmienok pre klíčenie *P. ramosa*, výber vhodných štádií rastu *P. ramosa* na indukciu pletivových kultúr a zloženie kultivačných médií pre rast *P. ramosa in vitro*. Dosiahnuté výsledky sme prezentovali vo forme prednáškových a posterových prezentácií na medzinárodných konferenciách a formou článku. Očakávanými prínosmi sú poznatky z biológie parazitických rastlín rodu *Phelipanche*, ich možnosti rastu v *in vitro* podmienkach s cieľom využitia poznatkov pri štúdiu interakcií parazitických rastlín a hostiteľských rastlín a pri objasňovaní funkcií génov. Získané poznatky môžu byť v poľnohospodárskej praxi v budúcnosti využité pri vytváraní komplexného návrhu na elimináciu týchto parazitov.

### Merateľné ukazovatele výsledkov

KULLAČOVÁ, Dagmara – MATÚŠOVÁ, Radoslava. Establishment of *Phelipanche ramosa* tissue culture and effect of kanamycin on culture growth. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 2015, sp. issue 2, p. 63-65. ISSN 1338-5178.

MATÚŠOVÁ, Radoslava. Strigolactones and parasitic weeds. In *Advances in Plant Breeding & Biotechnology Techniques*. 27-29 April, 2014. Pannonian Plant Biotechnology Association, 2014, p. 66-67. ISBN 978-963-89129-5-4.

KULLAČOVÁ, Dagmara – MATÚŠOVÁ, Radoslava. Biotechnological approach to control parasitic weeds. In *Advances in Plant Breeding & Biotechnology Techniques*. 27-29 April, 2014. Pannonian Plant Biotechnology Association, 2014, p. 87-88. ISBN 978-963-89129-5-4.



Podporujeme výskumné aktivity na Slovensku/Projekt spolufinancovaný zo zdrojov ES  
Vybudovanie výskumného centra „AgroBioTech“

## 7. Zoznam použitej literatúry

- BOUWMEESTER, H.J. - MATUSOVA, R. - ZHONGKUI, S. - BEALE, M.H. (2003). *Current Opinion in Plant Biology*, 6(4), 358-364.
- CARDOSO, C. - RUYTER-SPIRA, C. - BOUWMEESTER, H.J. (2011). *Plant Science*, 180(3), 414-420.
- FERNÁNDEZ-APARICIO, M. - RUBIALES, D. - BANDARANAYAKE, P. - YODER, J. - WESTWOOD, J. (2011). *Plant methods*, 7(36), 1-10.
- GOMEZ-ROLDAN, V. - FERMAS, S. - BREWER, P.B. - PUECH-PAGES, V. - DUN, E.A. - PILLOT, J.-P. - LETISSE, F. - MATUSOVA, R. - DANOUN, S. - PORTAIS, J.-C. - BOUWMEESTER, H. - GUILLAUME, B. - BEVERIDGE, CH.A. - RAMEAU, C. - ROCHANGE, S.F. (2008). *Nature*, 455, 189–194.
- MATUSOVA, R. - RANI, K. - VERSTAPPEN, F.W.A. - FRANSSEN, M.C.R. - BEALE, M.H. - BOUWMEESTER, H.J. (2005). *Plant Physiology*, 139(2), 920-934.
- MATUSOVA, R. - van MOURIK, T. - BOUWMEESTER, H.J. (2004). *Seed Science Research*, 14(4), 335-344.

### c) Optimalizácia procesu mikropropagácie pomocou somatickej embryogenézy pri hospodársky významných plodinách a drevinách

**Autori: Terézia Salaj, Radoslava Matúšová, Ján Salaj**

#### 1. Stav riešenia problematiky v zahraničí a na Slovensku

Z ekonomického hľadiska je najvýhodnejšie množiť väčšinu rastlín (a špeciálne ihličnaté druhy) iba semenami. Avšak, zlepšovanie ich produkčných či iných vlastností iba klasickým krížením a množením prostredníctvom semien je časovo náročný proces, keďže niektoré plodiny – a najmä dreviny - majú dlhý reprodukčný cyklus. Riešením tohto problému môže byť používanie technológie tzv. „umelých semien“, ktorá je založená na produkcii dobre vyvinutých somatických embryí, ktoré sú „zaliaté“ v nejakom ochrannom médiu (zvyčajné algináty).

Somatická embryogenéza je najúčinnjším systémom *in vitro* regenerácie a mikropropagácie väčšiny rastlinných druhov a je aj ideálnym experimentálnym systémom na štúdium fyziologických (Hazubská et al., 2013), štruktúrnych (Salajová a Salaj, 2001), biochemických (von Arnold et al., 2005) a molekulárnych (Steiner et al., 2012) charakteristík skorých vývinových štádií rastlinného organizmu. Proces somatickej embryogenézy sa indukuje v *in vitro* podmienkach a primárnymi explantátmi sú juvenilné pletivá ako nezrelé a zrelé zygotické embryá (Montalbán et al., 2012) alebo segmenty kľúčnych rastlín (Salajová a Salaj, 2001) a ojedinele explantáty odobraté z dospelých stromov (Klimaszewska et al., 2011).

Napriek tomu, že indukcia bola zaznamenaná pri viacerých rastlinných druhoch, problémy stále pretrvávajú. Problémom sú najmä nízke frekvencie indukcie, (ktoré sú výrazné najmä pri druhoch rodu *Pinus*) a tiež reštrikcia indukcie na juvenilné pletivá, (ktoré sú geneticky neznáme pôvodu). Tieto aspekty vyžadujú ďalšie štúdium.



Podporujeme výskumné aktivity na Slovensku/Projekt spolufinancovaný zo zdrojov ES  
Vybudovanie výskumného centra „AgroBioTech“

Embryogénne pletivá sa indukujú a udržiavajú na médiách s obsahom exogénnych rastových regulátorov, ktoré sa dodávajú do médií empiricky na základe predchádzajúcich skúseností alebo literárnych údajov. Pomerne málo informácií je k dispozícii o interakcii exogénnych rastových regulátorov a endogénnych rastových hormónov (Jimenez a Bangerth, 2001; Jimenez a Thomas, 2006) a o vplyve týchto interakcií na rast a vývin somatických embryí. Je to téma na hlbšie štúdium obsahu endogénnych hormónov, ktorých množstvá (obsah) v explantátoch sú neznáme.

Je všeobecne známym javom, že embryogénne pletivá po určitom čase kultivácie strácajú regeneračnú schopnosť a tým aj schopnosť produkcie rastlín. Na tento nežiaduci jav zatiaľ nebolo predložené relevantné vysvetlenie. Predpokladá sa, že strata regeneračnej schopnosti môže byť dôsledok genetických zmien počas kultivácie (von Aderkas et al., 2003), alebo tento jav je vyvolaný zmenou obsahu endogénnych rastových hormónov (Jimenez a Bangerth, 2001).

S cieľom optimalizácie procesu somatickej embryogenézy v poslednom období sa viaceré štúdiá sústredili na identifikáciu molekulárnych markerov. Tieto práce odhalili prítomnosť niekoľkých proteínov, ktoré môžu zohrávať významnú úlohu ako molekulárne markery embryogénnej kapacity. Doterajšie štúdiá sa zameriavali najmä na krytosemenné rastliny ako je *Medicago* (Imin et al., 2005), *Vitis vinifera* (Marsoni et al., 2008), *Coffea arabica* (Tonietto et al., 2012), *Theobroma cacao* (Noah et al., 2013), zatiaľ čo práce zaoberajúce sa s ihličnatými drevinami sú ojedinelé (Lippert et al., 2005).

## 2. Ciele výskumu

Konečným cieľom výskumu bola optimalizácia procesu somatickej embryogenézy a vypracovanie postupu na praktické využitie vo vegetatívnom množení ťažko množiteľných druhov, či veľmi vzácných hybridov.

Všeobecným cieľom výskumu bola charakteristika jednotlivých štádií somatickej embryogenézy (SE) sledovaných druhov z fyziologického, biochemického a molekulárneho hľadiska na indukovaných a vyselektovaných embryogénnych líniiach.

Konkrétnym cieľom je študovať úlohu vybraných rastových látok v jednotlivých štádiách tvorby a vývinu somatických embryí, ako aj zloženie bielkovinového spektra počas týchto štádií a jeho podiel pri regulácii procesu somatickej embryogenézy.

## 3. Objekty experimentálneho štúdia

Experimentálnymi rastlinami sú hospodársky významné druhy - borovica čierna (*Pinus nigra* Arn.) a jedľa biela (*Abies alba* a jej hybridy), ktoré sú významnými komponentami našich lesov.

## 4. Použitá laboratórna technika

Pre riešenie úloh výskumu bola použitá existujúca laboratórna technika, ako aj niektoré prístroje objednané, dodané a už inštalované v rámci projektu AgroBioTech.

- fluorescenčný mikroskop Axioplan 2 (Zeiss)
- fluorescenčný stereomikroskop Leica MZ F10, vybavený CCD kamerami
- invertovaný mikroskop EC3 (Leica); TMS (Nikon)
- stereomikroskop BinStemi Dv4 (Zeiss)
- svetelný mikroskop NU2 Carl Zeiss



Podporujeme výskumné aktivity na Slovensku/Projekt spolufinancovaný zo zdrojov ES  
Vybudovanie výskumného centra „AgroBioTech“

- mikrotóm Microtech Cut 4079
- autokláv horizontálny (Laboklav 25-M) - zakúpený z projektu ABT
- analytické váhy (Sartorius)
- analytické váhy Kern – zakúpené z projektu ABT
- predvažovačky Unitwist (UniEquip)
- pH meter Consort (Scientific Instruments)
- laminárny box s HEPA filtrom UniFlow UVU700
- laminárny box Biohazard (BioII Advance 6) – zakúpený z projektu ABT
- sušičky G100/250 (KBC), HS62A
- laboratórna sušička (Memmert) – zakúpená z projektu ABT
- prístroj pre výrobu ultračistej vody (Simplicity UV) – zakúpený z projektu ABT
- zariadenie na demineralizovanú vodu AQUAL 29 (Merci)
- chladničky, mrazničky (-20°C)
- kultivačné miestnosti s regulovanou teplotou a svetelným režimom

### 5. Pracovné postupy

Na indukciu somatickej embryogenézy u druhov *Pinus nigra* a *Abies alba* (a jej hybridov) a udržiavanie embryogénnych a neembryogénnych pletív sa používajú *in vitro* metódy kultivácie rastlinných explantátov (príprava živných médií, pravidelné pasážovanie kultúr). Okrem rastových regulátorov sa testuje aj vplyv iných zložiek médií (polyamíny), ktoré nie sú bežnou súčasťou živných médií, ale môžu prispievať k optimalizácii indukcie a vývinu somatických embryí.

S cieľom dlhodobého uchovávanía kultúr sa testujeme metódy pomalého zmrazovania (slow-freezing method) na kryokonzerváciu pletív.

Na cytologickú (farbenie acetokarmínom a orceínom) a histologickú (parafínové rezy) charakterizáciu embryogénnych kultúr a somatických embryí sa používajú metódy svetelnej a fluorescenčnej mikroskopie (FDA metóda).

### 6. Výsledky a očakávané prínosy

Optimalizovali sme proces mikropropagácie pomocou somatickej embryogenézy pri borovici z nezrelých zygotických embryí (ktorá je relatívne nízka v porovnaní s inými druhmi) z pletív, ktoré pochádzajú zo stromov známeho genotypu (Príloha č. 6).

Analýza obsahu endogénnych rastových hormónov v pletivách s rôznou štruktúrnou organizáciou umožnila vzťahovať endogénny obsah rastových látok na morfogénnu, resp. embryogénnu kapacitu pletív.

Proteomické analýzy poskytujú údaje o prítomnosti proteínov, ktoré zohrávajú úlohu pri vývinových procesoch počas *in vitro* kultivácie a špeciálne v somatickej embryogenéze ihličnatých drevín.

Údaje získané či už na úrovni analýz rastových hormónov alebo proteomiky môžu významne prispieť k objasneniu príčin straty embryogénnej kapacity pletív. Získané embryogénne línie môžu byť uchovávané kryokonzerváciou a môžu byť kedykoľvek k dispozícii pre množenie týchto druhov.



Podporujeme výskumné aktivity na Slovensku/Projekt spolufinancovaný zo zdrojov ES  
Vybudovanie výskumného centra „AgroBioTech“

---

### *Merateľné ukazovatele výsledkov*

SALAJ, Terézia - MATÚŠOVÁ, Radoslava – SALAJ, Ján. Conifer somatic embryogenesis – an efficient plant regeneration system for theoretical studies and mass propagation. *Dendrobiology* 2015, 74 (prijaté do tlače).

### *7. Zoznam použitej literatúry*

- HAZUBSKA-PRZYBYL, T. – RATAJCZAK, E. – KALEMBA, E.M. – BOJARCZUK, K. (2013). *Dendrobiology* 69, 77-86.
- IMIN, N. – NIZAMIDIN, M. – DANIHER, A. - NOLAN, K.E. – ROSE, R.J. – ROLFE, B.G. (2005). *Plant Physiol.* 137, 1250-1260.
- JIMENEZ, V.M. – BANGERTH, F. (2001). *Plant Sci.* 160, 247-257.
- JIMENEZ, V.M. – THOMAS, C. (2006). *Somatic Embryogenesis*, Eds. Mujib A, Šamaj J, Springer, pp.357.
- KLIMASZEWSKA, K. – OVERTON, C. – STEWART, D. – RUTLEGE, R. (2011). *Planta* 233, 635-647.
- LIPPERT, D. – ZHUANG, J. – RALPH, S. – ELLIS, D. – GILBERT, M. – OLAFSON, R. – RITLAND, K. – ELLIS, B. – DOUGLAS, C.J. – BOHLMAN, J. (2005). *Proteomics* 5, 461-473.
- MARSONI, M. - BRACALEM, R. – ESPEN, L. – PRINSI, B. – NEGRI, A.S. – VANNINI, C. (2008). *Plant Cell Rep.* 27, 347-356.
- MONTALBAN, I.A. - De Diego, N. – MONCALEAN, P. (2012). *Acta Physiol. Plant.* 34, 451-460.
- NOAH, A.M. – NIEMENAK, A. – SUNDERHAUS, S. – HAASE, C. – OMOKOLO, D.N. – WINKELMANN, T. – BRAUN, H-P. J. (2013). *Proteomics* 78, 123-133.
- SALAJOVA, T. – SALAJ, J. (2001). *J. Plant Physiol.* 158, 747-755.
- STEINER, N. - SANTA-CATARINA, C. – GUERRA, P. – CUTRI, L. – DORNELAS, M.C. – FLOH, E.I.S. (2012). *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 109, 41-50.
- TONIETTO, A. – SATO, J.H. – TEIXEIRA, J.B. - de SOUZA, E.M. – PEDROSA, F.O. – FRANCO, O.L. (2012). *Plant Mol. Biol. Rep.* 30, 1393-1399.
- von ADERKAS, P. – PATTANAVIBOOL, R. – HRISTOFOROGLU, K. (2003). *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 75, 27-34.
- von ARNOLD, S. – BOZKHOV, P. – CLAPHAM, D. – DYACHOK, J. – FILONOVA, L. – HOGBERG, A. – INGOUFF, M. – WIEWEGER, M. (2005). *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 81, 323-329.



Podporujeme výskumné aktivity na Slovensku/Projekt spolufinancovaný zo zdrojov ES  
Vybudovanie výskumného centra „AgroBioTech“

## d) Využitie genetických zdrojov a biologickej diverzity pre medicínske účely

**Autori: Martin Hajduch, Ľubica Uváčková**

### 1. Stav riešenia problematiky v zahraničí a na Slovensku

Strom Ginko dvojlaločné je medzi rastlinami nazývané aj „živá fosília“ a je jediný žijúci reprezentant rodu „*Ginkgoaceae*“ (Chen a kol., 2001; Mc Kenna a kol., 2001; Tremouillaux Guiller a kol., 2002). Ginko je dôležitý medicínsky a okrasný strom, ktorý je do značnej miery odolný voči rôznym patogénom a hmyzu (Major, 1967) a taktiež má schopnosť obývať rôzne prírodné prostredia. Listy ginka sa už po tisícročia používajú v čínskej medicíne (DeFeudis a kol., 2000; Glisson a kol., 1999). Extrakt z listov ginka obsahuje rôzne sekundárne metabolity s pozitívnym vplyvom na zdravie (Smith a Luo, 2004; Mazza a kol. 2006; Ude a kol., 2013) vrátane protirakovinotvorných účinkov (Sparreboom a kol., 2004; Sagar a kol., 2006).

Proteomické analýzy stromov sú limitované kompletnosťou databáz proteínových sekvencií. Aj napriek týmto obmedzeniam, proteomické analýzy boli vykonané na viacerých stromoch (Abril a kol., 2011; Quiala a kol., 2012; Valledor a kol., 2012), vrátane ginka dvojlaločného, kde výsledky poskytli nový pohľad na ploiditu a celkový metabolizmus (Yang a kol., 2013; Wei a kol., 2013).

### 2. Ciele výskumu

Cieľom výskumu bolo uskutočniť systematickú charakterizáciu proteínov obsiahnutých v listoch ginka.

### 3. Objekty experimentálneho štúdia

Objektom výskumu boli listy zozbierané zo samčieho stromu *Ginkgo biloba*, ktorý sa nachádza v Nitrianskom mestskom parku.

### 4. Použitá laboratórna technika

Pri výskume sa používali váhy, aparátúra na proteínovú dvojrozmernú elektroforézu (2-DE), softvér určený na vyhodnotenie proteínových gélov, vákuová odparka a hmotnostná spektrometria (MS/MS) pre identifikáciu proteínov.

### 5. Pracovné postupy

Pracovné postupy zahrňovali protokoly pre extrakciu proteínov, 2-DE, MS/MS, a bioinformatické spracovanie výsledkov.

### 6. Výsledky a očakávané prínosy

*Ginkgo biloba* je druh s významným medicínskym využitím. Proteomickými analýzami tohto druhu sa v listoch ginka kvantifikovalo a identifikovalo 158 proteínov, z ktorých najviac bolo asociovaných s energetickými reakciami bunky. Ďalšie proteíny môžu nájsť uplatnenie a potenciálne využitie v medicíne. Tieto proteíny boli použité na zostrojenie referenčnej mapy proteínov nachádzajúcich sa v listoch stromu ginko.



Podporujeme výskumné aktivity na Slovensku/Projekt spolufinancovaný zo zdrojov ES  
Vybudovanie výskumného centra „AgroBioTech“

### *Merateľné ukazovatele výsledkov*

UVAČKOVÁ, Ľubica – ONDRUŠKOVÁ, Emília – DANCHENKO, Maksim - ŠKULTÉTY, Ľudovít – MIERNYK, Jan,A. – HRUBÍK, Pavel – HAJDUCH, Martin (2014). Establishing a leaf proteome reference map for *Ginkgo biloba* provides insight into potential ethnobotanical uses. J Agric Food Chem. 62, 11547-11556.

### *7. Zoznam použitej literatúry*

- CHEN, L.Q. - LI, C.S. - CHALONER, W.G. - BEERLING, D.J. - SUN, Q.G. - COLLINSON, M.E. - MITCHELL, P.L. (2001). American Journal of Botany, 88, 1309-1315.
- MCKENNA, D.J. - JONES, K. - HUGHES, K. (2001). Alternative Therapies in Health and Medicine, 7, 70.
- TREMOUILLAUX-GUILLER, J. - ROHR, T. - ROHR, R. - HUSS, V.A.R. (2002). American Journal of Botany, 89, 727-733.
- MAJOR, R.T. (1967). Science, 157, 1270-3.
- DEFEUDIS, F.V. - DRIEU, K. (2000). Current Drug Targets, 1, 25-58.
- GLISSON, J. - CRAWFORD, R. - STREET, S. (1999). The Nurse practitioner, 24, 35-36.
- SMITH, J.V. - LUO, Y. (2004). Applied Microbiology and Biotechnology, 64, 465-472.
- MAZZA, M. - CAPUANO, A. - BRIA, P. - MAZZA, S. (2006). European Journal of Neurology, 13, 981-985.
- UDE, C. - SCHUBERT-ZSILAVECZ, M. - WURGLICS, M. (2013). Clinical Pharmacokinetics, 52, 727-749.
- SPARREBOOM, A. - COX, M.C. - ACHARYA, M.R. - FIGG, W.D. (2004). Journal of Clinical Oncology, 22, 2489-2503.
- SAGAR, S.M. - YANCE, D. - WONG, R.K. (2006). Current oncology, 13, 99-107.
- ABRIL, N. - GION, J.-M. - KERNER, R. - MUELLER-STARCK, G. – NAVARRO CERRILLO, R.M. - PLOMION, C. - RENAUT, J. - VALLEDOR, L. - JORRIN-NOVO, J.V. (2011). Phytochemistry, 72, 1219-1242.
- QUIALA, E. - JESUS CANAL, M. - RODRIGUEZ, R. - YAGUEE, N. - CHAVEZ, M. - BARBON, R. -VALLEDOR, L. (2012). Proteomics, 12, 1039-1044.
- VALLEDOR, L. - CASTILLEJO, M.A. - LENZ, C. - RODRIGUEZ, R. - CANAL, M.J. - JORRIN, J. (2008). Journal of Proteome Research, 7, 2616-2631.
- YANG, N. - SUN, Y. - WANG, Y. - LONG, C. - LI, Y. - LI, Y. (2013). Plos One, 8.
- WEI, X.-D. - SHI, D.-W. - CHEN, G.-X. (2013). Plant Growth Regulation, 69, 191-201.



Podporujeme výskumné aktivity na Slovensku/Projekt spolufinancovaný zo zdrojov ES  
Vybudovanie výskumného centra „AgroBioTech“

## e) Mikropropagácia pomocou somatickej embryogenézy kukurice - využitie proteomických metód pre charakterizáciu procesu

**Autori: Martin Hajduch, Ľubica Uvačková**

### 1. *Stav riešenia problematiky v zahraničí a na Slovensku*

Vývin vyšších rastlín začína fúziou peľovej a vajíčkovej bunky do zygoty. Totipotencia je biologický fenomén, pri ktorej sa zo somatickej bunky vyvinie kompletná rastlina bez vytvorenia zygoty prostredníctvom procesu somatickej embryogenézy (SE) (Buss, 1987; Kaplan a Cooke, 1997). Počas procesu SE sa nová rastlina vyvinie *de novo* priamo z pletivovej bunky, čo bolo prvýkrát demonštrované na mrkve koncom päťdesiatych rokov minulého storočia (Steward, 1958; Reiner, 1959). Vývin embrya cez SE vykazuje podobné morfológické charakteristiky ako počas normálnej, zygotickéj, embryogenézy (Zimmerman, 1993; Golberg a kol., 1994). Aj napriek dlhoročným výskumom, proces SE je stále zahalený tajomstvom.

V súčasnosti sa proteomika úspešne používa na porozumenie procesu SE. Napríklad, pri modelovej strukovine, *Medicago truncatula*, rozdielne abundantné proteíny boli detegované medzi embryogénnymi a ne-embryogénnymi bunkami (Almeida a kol., 2012) ktoré sa líšili v SE potenciáli (Imin a kol., 2005). Vo všeobecnosti, proteomické výskumy prispeli k charakterizácii procesu SE prostredníctvom identifikácie proteínov, ktoré by mohli byť potenciálne zapojené do procesu SE.

### 2. *Ciele výskumu*

Cieľom tohto výskumu bolo prispieť k pochopeniu procesu SE identifikáciou nových proteínov potenciálne zapojených do tohto procesu a tak dospieť k optimalizácii procesu somatickej embryogenézy.

### 3. *Objekty experimentálneho štúdia*

Ako rastlinný materiál sa použila kukurica línie A19, z ktorej sa pomocou *in vitro* metód vygenerovali embryogénne (EC) a ne-embryogénne (NEC) bunky.

### 4. *Použitá laboratórna technika*

Pri výskume sa používali váhy, aparátúra na proteínovú dvojrozmernú elektroforézu (2-DE), softvér určený na vyhodnotenie proteínových gélov, vákuová odparka a hmotnostná spektrometria (MS/MS) pre identifikáciu proteínov.

### 5. *Pracovné postupy*

Pracovné postupy zahrňovali protokoly indukciu EC a NEC kalusov *in vitro*, protokoly pre extrakciu proteínov, 2-DE, MS/MS, a bioinformatické spracovanie výsledkov.

### 6. *Výsledky a očakávané prínosy*

Celkovo sa identifikovalo 361 2-DE škvŕn v EC a NEC, ktorých 44 bolo rozdielne abundantných. Pomocou MS/MS sa v 44 diferénčne abundantných 2-DE spotoch identifikovalo 33 proteínov. Z identifikovaných proteínov, 39% bolo asociovaných s metabolizmom a energickými reakciami. Na základe identity identifikovaných proteínov, bol





Podporujeme výskumné aktivity na Slovensku/Projekt spolufinancovaný zo zdrojov ES  
Vybudovanie výskumného centra „AgroBioTech“

navrhnutý pracovný model pre rastlinnú totipotenciu. Tento model poukazuje na to, že reprogramovanie somatickej bunky k EC je spojené s uvoľnením glukózy, biosyntézy pyruvátu a detoxifikáciou peroxidu vodíka.

### **Merateľné ukazovatele výsledkov**

VARHANÍKOVÁ, Miroslava – UVAČKOVÁ, Ľubica – ŠKULTÉTY, Ľudovít – PREŤOVÁ, Anna – OBERT, Bohuš – HAJDUCH, Martin (2014). Comparative quantitative proteomic analysis of embryogenic and non-embryogenic calli in maize suggests the role of oxylipins in plant totipotency. *J Proteomics* 104:57-65( IF 3.9).

### **7. Zoznam použitej literatúry**

- BUSS, L.W. (1987). *The Evolution of Individuality*. Princeton, Princeton University Press.
- KAPLAN, D.R. – COOKE, T.J. (1997). *Plant Cell*, 9, 1903-19.
- STEWART, F.C. (1958). *Am J Bot*, 45, 709-711.
- REINERT, J. (1959). *Planta*, 53, 318-33.
- ZIMMERMAN, J.L. (1993). *Plant Cell*, 5, 1411-23.
- GOLDBERG, R.B. - de PAIVA, G. – YADEGARI, R. (1994). *Science*, 266, 605-614.
- ALMEIDA, A.M. – PARREIRA, J.R. – SANTOS, R. – DUQUE, A.S. – FRANCISCO, R. – TOMÉ, D.F. *et al.* (2012). *Physiol. Plant*, 146, 236-49.
- IMIN, N. – NIZAMIDIN, M. – DANIHER, D. – NOLAN, K.E. – ROSE, R.J. – ROLFE, B.G. (2005). *Plant Physiol.*, 137, 1250-60.

### **f) Štúdium adaptácie rastlín v prostredí kontaminovanom rádioaktivitou – príspevok k udržaniu biodiverzity a trvalo udržateľnej poľnohospodárskej produkcií**

**Autori: Martin Hajduch, Katarína Klubicová, Daša Gáabrišová**

#### **1. Stav riešenia problematiky v zahraničí a na Slovensku**

Prežívanie rastlín v prostredí kontaminovanom rádioaktivitou je spojené so zvýšenou úrovňou DNA mutácií (Moller a Mousseau, 2015). Nakoľko bolo ukázané, že korelácia medzi úrovňami expresie transkriptov a proteínov je malá (Hornshoj a kol., 2009; Hajduch a kol., 2010) je pre komplexné pochopenie fenoménu rastlín rastúcich v rádioaktívite dôležité obohatiť dáta z genomických analýz analýzami na proteomickej úrovni. Predchádzajúce analýzy proteómu rastlín rastúcich v rádioaktívnej Černobyľskej oblasti ukázali limitovaný efekt rádioaktívneho prostredia na proteóm semien prvej generácie sóje a ľanu (Danchenko a kol., 2009; Klubicova a kol., 2010). Pri druhej generácii sóje, proteomické analýzy zistili zvýšenú akumuláciu zásobných proteínov počas vývinu semena v rádioaktívnej oblasti (Klubicova a kol., 2012). Okrem toho sa zistila v druhej generácii ľanových semien zvýšená abundancia proteínov spojených s biosyntézou pyruvátu, dehydrogenáciou isocitrátu alebo oxidáciou etanolu (Klubicova a kol., 2013).



Podporujeme výskumné aktivity na Slovensku/Projekt spolufinancovaný zo zdrojov ES  
Vybudovanie výskumného centra „AgroBioTech“

## 2. Ciele výskumu

Cieľom výskumu bolo pokračovať v týchto výskumoch a charakterizovať tretiu generáciu ľanu rastúceho v rádioaktívnej Černobyľskej oblasti.

## 3. Objekty experimentálneho štúdia

Objektom štúdia boli ľanové semená zozbierané z tretej generácie ľanu rastúceho v rádioaktívnej Černobyľskej oblasti.

## 4. Použitá laboratórna technika

Pri výskume sa používali váhy, aparátúra na proteínovú dvojrozmernú elektroforézu (2-DE), softvér určený na vyhodnotenie proteínových gélov, vákuová odparka a hmotnostná spektrometria (MS/MS) pre identifikáciu proteínov.

## 5. Pracovné postupy

Pracovné postupy zahrňovali protokoly pre extrakciu proteínov, 2-DE, MS/MS a bioinformatické spracovanie výsledkov.

## 6. Výsledky a očakávané prínosy

Celkovo boli vytvorené expresné profily pre 130 2-DE škvŕn počas vývinu ľanového semena v nerádioaktívnej a rádioaktívnej Černobyľskej oblasti, z ktorých 46 vykazovalo rozdiely medzi oboma oblasťami. Z nich sa pomocou MS/MS identifikovalo 21 proteínov, z ktorých najväčšiu skupinu tvorili proteíny zo skupiny cupin. Na základe výsledkov sa poukázalo na pravdepodobnú účasť týchto proteínov v prežívaní rastlín v rádioaktívnom prostredí.

## Merateľné ukazovatele výsledkov

GABRIŠOVÁ, Daša – DANCHENKO, Maksym – KLUBICOVÁ, Katarína – BEREZHNA, V.Valentina – ŠKULTÉTY, Ľudovít – RASHYDOV, Namik,M. – HAJDUCH, Martin. Proteomics analysis of developing flax seeds suggest the role for seed allergens cupins in plant survival in radio-contaminated Chernobyl environment. *Frontiers in Plant Sciences* (IF 3,6, in review)

## 7. Zoznam použitej literatúry

- DANCHENKO, M. – SKULTÉTY, L. – RASHYDOV, N.M. et al. (2009). *Journal of Proteome Research* 8, 2915-22.
- HAJDUCH, M. – HEARNE, L.B. – MIERNYK, J.A. et al. (2010). *Plant Physiology* 152, 2078-87.
- HORNSHOJ, H. – BENDIXEN, E. – CONLEY, L.N. et al. (2009). *Bmc Genomics* 10.
- KLUBICOVA, K. – DANCHENKO, M. – SKULTÉTY, L. et al. (2010). *Environmental Science & Technology* 44, 6940-6.
- KLUBICOVA, K. – DANCHENKO, M. – SKULTÉTY, L. – BEREZHNA, V.V. – RASHYDOV, N.M. – HAJDUCH, M. (2013). *Journal of Proteome Research* 12, 4799-806.
- KLUBICOVA, K. – DANCHENKO, M. – SKULTÉTY, L. et al. (2012). *PlosOne* 7.
- MOLLER, A.P. – MOUSSEAU, T.A. (2015). *Scientific reports* 5, 8363.



Podporujeme výskumné aktivity na Slovensku/Projekt spolufinancovaný zo zdrojov ES  
Vybudovanie výskumného centra „AgroBioTech“

---

\_\_\_\_\_ podpis \_\_\_\_\_  
RNDr. Alena Gajdošová, CSc.

\_\_\_\_\_ podpis \_\_\_\_\_  
RNDr. Gabriela Libiaková, CSc.

\_\_\_\_\_ podpis \_\_\_\_\_  
RNDr. Radoslava Matúšová, PhD.

\_\_\_\_\_ podpis \_\_\_\_\_  
Doc. RNDr. Ján Salaj, DrSc.

\_\_\_\_\_ podpis \_\_\_\_\_  
Mgr. Martin Hajduch, PhD.

\_\_\_\_\_ podpis \_\_\_\_\_  
Mgr. Katarína Klubicová, PhD.

\_\_\_\_\_ podpis \_\_\_\_\_  
Mgr. Ľubica Uvačková, PhD.

\_\_\_\_\_ podpis \_\_\_\_\_  
Mgr. Daša Gábrisová, PhD.

\_\_\_\_\_ podpis \_\_\_\_\_  
Ing. Dagmara Kullačová



Podporujeme výskumné aktivity na Slovensku/Projekt spolufinancovaný zo zdrojov ES  
Vybudovanie výskumného centra „AgroBioTech“

---

**Príloha č. 5:** Zmluva o spolupráci medzi ÚGBR SAV a Wellberry s.r.o.

**Príloha č. 6:** Mikrorozmnožovanie rastlín (ihličnatých drevín) metódou somatickej embryogenézy

Práca bola riešená v rámci projektu Európskeho spoločenstva: Vybudovanie výskumného centra „AgroBioTech“, projekt číslo 26220220180.