

OPTIMALIZACE PODMÍNEK MUTAGENEZE K ZÍSKÁNÍ NOVÉ VARIABILITY MÁKU (*PAPAVER SOMNIFERUM* L.)

*Optimization of mutagenesis conditions to obtain new variability in poppy (*Papaver somniferum* L.)*

Magdalena WALKOWIAK, Maria OGRODOWCZYK

IHAR – PIB, Oddział w Poznaniu, Polska

Summary: The experiment was conducted to achieve new variability in alkaloid composition in poppy heads by mutagenesis. The seeds were treated with ethyl methanesulphonate (EMS) and ultrasounds (UD). The plant material was consisted of cultivar Lazur with high morphine content and lines derived from recombinants of high morphine forms from the collection at Plant Breeding and Acclimatization Institute. Ten methods inducing mutagenesis by different concentration of mutation agent EMS and UD, and different time of exposure and washing of seeds under running water were evaluated. In some combination new variability in alkaloid content has been obtained.

Key word: poppy seed, mutagenesis, alkaloid

Souhrn: Cílem realizovaného výzkumu byla optimalizace mutagenese k získání nové variability ve složení alkaloidů v makovině. Za účelem získání genetické variability byla vystavena semena máku etylmetansulfonátu (EMS) a ultrazvuku (UD). Zkoumaným materiálem byla vysokomorfinová odrůda Lazur a vyšlechtěné linie pocházející z rekombinace různých forem vysokomorfinového máku z kolekce IHAR-PIB. V pokusných letech bylo použito deset způsobů mutagenese používajících různou koncentraci mutageního prvku EMS a UD, času expozice a máčení semen v tekoucí vodě. Některými kombinacemi byla získána nová variabilita obsahu alkaloidů.

Klíčová slova: mák setý, mutagenese, alkaloidy

Úvod

Hlavními produkty získávanými z máku jsou semena, makový olej (Bernáth i in. 2003) a makovina - zdroj alkaloidů, které nacházejí využití ve farmaceutickém průmyslu (Rumińska 1973, Németh i in. 2002, Shukla S. i in. 2010). Morfin představuje až 75 % celkového obsahu veškerých alkaloidů vyskytujících se v makovině. Současné šlechtění máku ve světě je zaměřené na tvorbu nových odrůd bohatých na morfin nebo papaverin, tebain a kodein. Jednou z metod získání nových zdrojů variability ve šlechtění je mutagenese.

V rámci víceletého programu „Zdokonalení rostlin pro udržitelné AgroEkoSystémy, vysoce kvalitní potraviny a rostlinnou produkci bez potravinářského využití“ jsou Ústavem genetiky a šlechtění olejnin IHAR-PIB v Poznani realizované práce s chemickou a fyzikální mutagenézí zaměřenou na zvýšení variability obsahu alkaloidů v makovině.

Cílem práce byla optimalizace podmínek mutagenese způsobená etylmethansulfonátem (EMS) a ultrazvukem (UD) pro získání nových linií u máku.

Materiál a metody

V první etapě pokusu s chemicky realizovanou mutagenézí v roce 2011 byla použita semena vysokomorfinových vyšlechtěných linií a odrůdy Lazur. Semena byla na počátku namočená v destilované vodě o teplotě 20°C po dobu 12 hodin. Po odsušení na filtračním papíru byla jedna část zalita 0,6 % roztokem a druhá 0,8 % roztokem EMS. Roztok EMS byl připraven ve fosfátovém pufru o pH=7. Semena byla ponechána v roztoku mutagenu 3 nebo 4 hodiny. Po dekantaci roztoku byla semena promývána přes 2 hodiny pod tekoucí vodou a odsušena na filtračním papíru (tabulka 1). Semena vystavená mutagenézi a kontrolní linie byly vysety v selekčních školkách. Makovina rostlin M1 generace jednotlivě sklizená a následně nadrcená byla analyzována na obsah alkaloidů. Na základě bioche-

mických analýz byla provedena selekce a vybrána semena pro opětovnou mutagenézi v roce 2012. Rovněž byla provedena zkouška vyvolání mutačních změn obsahu alkaloidů použitím ultrazvuku (čas expozice semen vystavených ultrazvuku činil 25 minut) s měnicími se koncentracemi roztoků EMS (tabulka 1).

Semena vystavená mutagenézi a semena kontrolní linie se nechala naklíčit a následně byla procenticky vyjádřena mortalita. Do selekčních školek byla použita jen ta kombinace, u které se podíl přeživších vyklíčených semen blížil 50 %. Změny obsahu alkaloidů v makovině po mutagenézi v porovnání s kontrolním materiálem je uveden v tabulách 2 - 5.

Tabulka 1. Podmínky realizace mutagenese

Rok	Způsob účinku	Počáteční máčeni semen v destilované vodě [teplota/čas]	Koncentrace mutagenu [%]	Expozice [teplota/čas]	Čas vymývání mutagenu pod tekoucí vodou	
		kontrola	Namáčení semen v destilované vodě			
2011	I	20°C/12 h	0,6	4 h	2 h	
	II		0,8	3 h	4 h	
	III		0,6	25 min UD/4 h	2 h	
	IV		0,8	25 min UD/3 h	2 h	
2012	V				5 min UD/4 h	2 h
	VI			0,8 po I způsobu působení v 2011	4 h	2 h
	VII			0,8 po I způsobu působení v 2011	4 h	1 h
	VIII			1,0 po I způsobu působení v 2011	4 h	1 h
	IX			1,2 po I způsobu působení v 2011	4 h	1 h
	X			1,0 po II způsobu působení v 2011	4 h	1 h

Tabulka 2. Změny obsahu morfinu v makovině po mutagenesi oproti kontrole

Faktor	Lazur		Linie 102/4i//09		Linie 130/2i//09		Linie 138/2i//10		Lazur UD + EMS	
	2011	2012	2011	2012	2011	2012	2011	2012	2011	2012
Morfin										
Kontrola	0,625	0,743	0,786	0,739	0,736	0,736	0,531	0,679	0,943	0,679
I	0,759		0,858		0,795		0,39			
II	0,908		1,165		0,55		0,584		0,767	
III									0,442	
IV										0,677
V										
VI		0,625								
VII		0,704		0,779		0,792		0,528		0,693
VIII		0,681								
IX		0,825								
X		0,693		0,842		0,714		0,300		0,945
Průměr po mutagenesi	0,834	0,706	1,012	0,811	0,673	0,753	0,487	0,414	0,605	0,772
Variační koef.	12,64	10,39	21,46	5,58	25,76	7,32	28,17	38,94	38,02	19,48
F - test	3,93*	1,44	3,95*	0,58	2,29	0,82	0,35	7,76*	4,24*	4,4*

Tabulka 3. Změny obsahu kodeinu v makovině po mutagenesi oproti kontrole

Faktor	Lazur		Linie 102/4i//09		Linie 130/2i//09		Linie 138/2i//10		Lazur UD + EMS	
	2011	2012	2011	2012	2011	2012	2011	2012	2011	2012
Kodein										
Kontrola	0,040	0,047	0,122	0,013	0,033	0,007	0,045	0	0,029	0,002
I	0,006		0,221		0,121		0,052			
II	0,003		0,137		0,016		0,048		0,007	
III									0	
IV										0
V										
VI		0,015								
VII		0,016		0,027		0,007		0,003		0,066
VIII		0,023								
IX		0,019								
X		0,017		0,009		0,009		0,008		0,088
Průměr po mutagenesi	0,005	0,018	0,179	0,018	0,069	0,008	0,05	0,006	0,018	0,077
Variační koef.	47,13	17,57	33,18	70,71	108,39	17,68	5,66	64,28	86,42	20,2
F - test	7,98*	0,43	1,58	2,87	0,9	0,09	0,02	0,58	0,87	2,86

Tabulka 4. Změny obsahu tebainu v makovině po mutagenizi oproti kontrole

Faktor	Lazur		Linie 102/4i//09		Linie 130/2i//09		Linie 138/2i/10		Lazur UD + EMS	
	2011	2012	2011	2012	2011	2012	2011	2012	2011	2012
Tebain										
Kontrola	0,023	0,024	0,008	0,017	0,062	0,028	0,007	0	0,043	0,011
I	0,054		0,021		0,034		0,003			
II	0,033		0,108		0,032		0,025			
III									0,051	
IV									0,027	
V		0,024								0,016
VI		0,007		0,029		0,011		0,003		0,075
VIII		0,010								
IX		0,008								
X		0,009		0,027		0,023		0,010		0,050
Průměr po mutagenizi	0,044	0,012	0,065	0,028	0,033	0,017	0,014	0,007	0,039	0,047
Variační koef.	34,14	60,53	95,38	5,05	4,28	49,91	111,11	76,15	43,51	63,01
F - test	13,39**	3,44**	5,16*	0,02	1,69	9,03**	4,76*	2,68	0,77	0,77

Tabulka 5. Změny obsahu papaverinu v makovině po mutagenizi oproti kontrole

Faktor	Lazur		Linie 102/4i//09		Linie 130/2i//09		Linie 138/2i/10		Lazur UD + EMS	
	2011	2012	2011	2012	2011	2012	2011	2012	2011	2012
Papaverin										
Kontrola	0,052	0,034	0,073	0,057	0,118	0,042	0,082	0,045	0,073	0,053
I	0,024		0,069		0,089		0,104			
II	0,012		0,075		0,123		0,109			
III									0,084	
IV									0,131	
V										0,079
VI		0,036								
VII		0,028		0,058		0,039		0,074		0,084
VIII		0,05								
IX		0,049								
X		0,046		0,055		0,035		0,077		0,092
Průměr po mutagenizi	0,018	0,042	0,072	0,057	0,106	0,037	0,107	0,076	0,108	0,085
Variační koef.	47,17	22,72	5,89	3,75	22,68	7,64	3,32	2,81	30,92	7,71
F - test	24,85**	5,08**	0,05	0,02	4,10*	0,36	2,17	0,33	7,49	0,19

Výsledky

Obsah morfinu byl významně závislý na koncentraci a způsobu působení mutagenní látky v daném roce pokusu a pohyboval se na úrovni charakteristické pro vysokomorfinový typ máku. Průměrná koncentrace kodeinu v makovině se v roce 2012 výrazně snížila při použití silnější dávky mutagenu, zejména v makovině linie 138/2i/10 a odrůdy Lazur, kde byla použita integrovaná mutagenize. Procentický obsah tebainu byl významně

závislý na dávce mutagenu. Statistická analýza prokázala, že množství papaverinu obsaženého v makovině závisí na koncentraci mutagenní látky. Použití silnějších dávek EMS ve spojení s ultrazvukem v roce 2012 mělo za následek více změn v obsahu alkaloidů v makovině. Získání nové variability ve složení alkaloidů máku cestou indukované mutagenize je možné, což potvrzují realizované pokusy.

Literatura

- Bernáth J., Németh É., Petheő F. 2003. Alkaloid accumulation in capsules of the selfed and cross-pollinated poppy. *Plant Breeding* 122: 263-267.
- Rumińska A. 1973. *Leksykon roślin leczniczych*. PWN, Warszawa, 93-101.
- Németh É., Bernáth J., Sztefanov A., Petheő F. 2002. New results of poppy (*Papaver somniferum* L.) breeding for low alkaloid content in Hungary. *Acta Hort.* (576): 151-158.
- Shukla S., Yadav H.K., Rastogi A., Mishra B.K., Sindh S.P. 2010. Alkaloid diversity in relation to breeding for specific alkaloids in opium poppy (*Papaver somniferum* L.). *Czech J. Genet. Plant Breed.*, 46 (4): 164-169.

Kontaktní adresa

Mgr Inž. Magdalena Walkowiak, Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin - Państwowy Instytut Badawczy, Oddział w Poznaniu ul. Strzeszyńska 36; e-mail: magda@nico.i.har.poznan.pl

Z polštiny přeložil Ing. Petr Pšenička, Ph.D. a jazykově doladila Ing. Lucie Bečková, Ph.D.