



Český
modrý mák z.s.

19. MAKOVÝ OBČASNÍK

Mák v roce 2020



Únor 2020

Sborník referátů
ČZU v Praze

Občasník je vydán při příležitosti seminářů **MÁK v ROCE 2020** konaných:

10. 2. 2020, Libčany, okr. Hradec Králové

11. 2. 2020, Vsisko, okres Olomouc

12. 2. 2020, Větrný Jeníkov, okr. Jihlava

13. 2. 2020, Červený Újezd, okr. Praha – západ

pořádaných spolkem Český modrý mák z.s. a Českou zemědělskou univerzitou v Praze



Český modrý mák z.s.
Hájecká 215
273 51 Červený Újezd
<http://www.ceskymodrymak.cz>
info@ceskymodrymak.cz

Odborní garanti: Ing. Pavel Cihlář, Ph.D.
Ing. Vlastimil Mikšík, Ph.D.
Mgr. Stanislava Koprdoová, Ph.D.

Do tisku připravil: Ing. Vlastimil Mikšík, Ph.D.

© Česká zemědělská univerzita v Praze
Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů
www.af.czu.cz
165 00 Praha 6 - Suchdol
tel. 737 185 733
e-mail: MIKSIK@AF.CZU.CZ



ISBN 978-80-213-3004-7

MŮŽEME ODLIŠIT ČESKÝ MODRÝ MÁK?

Jaroslava OVESNÁ¹, Jakub VAŠEK², Pavel SVOBODA¹, Pavel VEJL²

¹Výzkumný ústav rostlinné výroby, ²Česká zemědělská univerzita v Praze

Shrnutí: Mák je polní plodina, která se dnes využívá v potravinářském a farmaceutickém průmyslu. Je zdrojem cenných látek pro farmacii tzv. opiátů. Pro potravinářské využití se pěstují odrůdy s nízkým obsahem takových látek. Semena farmaceutických odrůd se používají k falšování potravinářských produktů a nyní již máme nástroj jak je od sebe odlišit a to na základě DNA analýz, podobných jako např. při zjišťování paternity u člověka. Genetické analýzy indikují specifický genetický základ českých modrých máků.

Úvod

Mák je jednoletá bylina, která se dnes využívá v potravinářském a farmaceutickém průmyslu. Patří do čeledi *Papaveraceae* a má řadu příbuzných druhů. Je zdrojem řady cenných alkaloidů zjm. opiátů, které se využívají pro farmaceutickou výrobu. Ve středomoří a na blízkém východě se mák pěstuje po tisíciletí, kam se rozšířil ze své domoviny ve východní a střední Asii. Z těchto zemí se také rozšířilo jeho využití jako zdroje omamných psychotropních látek.

Struktura genetické informace máku – genomu byla popsána teprve nedávno. Guo a kol. (2018) uvedl, že velikost genomu opiového máku je 2,72 gigabázi sestavených do 11 chromozomů. Autor předpovídá, že obsahuje více než 50 000 genů, podle kterých si buňky vyrábějí potřebné proteiny se stavební funkcí i enzymy. Genom máku má poměrně složitou strukturu, která komplikuje analýzy, protože prošel během evoluce více částečnými nebo celogenomovými duplikacemi. Zajímavé je, že byl nalezen komplexní klastr, který zahrnuje geny kódující klíčové enzymy metabolické cesty syntézy opiových alkaloidů (Guo a kol. 2018).

Tyto alkaloidy se vyskytují zjm. v latexu. Z něho se získává opium, tj. zaschlá šťáva získaná z nezralých makovic. Pro získávání opiátů je třeba dobře sledovat zralost, jelikož latex z příliš mladých makovic obsahuje nízkou hladinu opiátu, u příliš zralých se morfin mění na kodein. Opium obsahuje mnoho přírodních alkaloidů, jako je narkotin, papaverin, kodein, tebain, morfin, přičemž jejich hladina a vzájemný poměr závisí na environmentálních podmínkách. Tyto opiáty (noskapin či morfin) slouží jako základ pro výrobu léčiv a patří mezi tzv. benzylizochinolinové alkaloidy (BIA).

Je známo, že chemická syntéza nebo přístupy syntetické biologie nejsou dosud dostatečně účinné a

Metody pro odlišení genotypu máku

Na trhu se uplatňují komodity, které pocházejí z porostů registrovaných odrůd – kultivarů. Pojem „odrůda“ vymezuje zákon č. 219/2003 Sb., o uvádění do oběhu osiva a sadby pěstovaných rostlin a o změně některých zákonů (zákon o oběhu osiva a sadby) § 2. Odrůda reprezentuje sou-

zatím se efektivně nevyužívají pro výrobu jakékoliv látky z podtřídy benzylizochinolinových alkaloidů (BIA). Z tohoto důvodu farmaceutické firmy stále pro jejich výrobu používají tzv. technický mák.

Mák je používán zejména pro výrobu farmak, ale také pro kulinářské účely a v tomto směru musí plnit určité normy co do obsahu opiátů. Labanca a kol. (2018) rozdělila odrůdy registrované v evropském katalogu. Registrované odrůdy máku v evropském seznamu vedeném Úřadem Společenství pro odrůdy rostlin (CPVO) se dělí podle jejich použití na:

- **průmyslové** („A1“, „Alfa“, „Botond“, „Evelin“, „Buddha“, „Csiki kek“, „Kek Gemon“, „Medea“, „Minoan“, „Monako“, „Nigra“ a „Tebona“ z Maďarska; „Extaz“ z Rumunska; „Lazur“ z Polska; „Riesenmohn“ z Německa),
- **kulinářské** („Aristo“, „Florian“, „Josef“, „Zeno“, „Zeno 2002“ a „Zeta“ z Rakouska; „Albakomp“, „Ametiszt“ a „Kozmosz“ z Maďarska; „Albin“ ze Slovenska); „Agát“, „Michalko“, „Mieszko“ a „Przemko“ z Polska),
- **duální** („Bergam“, „Gerlach“, „Major“, „Malsar“, „Maraton“ a „Opal“ ze Slovenska; „Edel-Weiss“ z Rakouska, „Kek Duna“ z Maďarska, „Marianne“ a „Rosemarie“ z Nizozemska, „Sokol“ z České republiky, „Parmo“ z Dánska a „Rub“ v Polsku). Další odrůdy mohou být uvedeny v národních katalozích.

Máky využívané průmyslově se často chemickou cestou zbavují nadbytečných alkaloidů. Chuťově je takový produkt nevalný, ale je podstatně levnější. Tyto máky se proto nelegálně přidávají do komodit a výrobků z máku a přinášejí vysoké zisky podnikům, které tuto praxi provozují. Proto je třeba trh a spotřebitele chránit a mít postupy, které takové máky odliší.

bor rostlin, vymezený projevem znaků vyplývajících z určitého genotypu nebo kombinace genotypů, odlišitelný od každého jiného souboru rostlin. K ověřování pravosti lze obecně využívat růstové charakteristiky, morfologické markéry a další zemědělsky významné znaky. Ty se zjišťují

během vegetace a při hodnocení sklizených semen. Používají se tedy zejména při hodnocení porostů, nicméně při prodeji komodity (semen a dalších produktů) jsou nepraktické a obtížně uplatnitelné.

Pro hodnocení máku jako komodity se často používají chemické analýzy (stanovení hladiny opiátů ve výrobku popřípadě dalších složek jako jsou antioxidanty či vitamíny). Odlišení opracovaných máků pomocí chemometrických metod vypracovala VŠCHT Praha a uspíšilo ho řešení projektu NAZV. Jednoznačně se uvádí, že nej přesnější postupy pro odlišení genotypů jsou ty, které využívají polymorfismus DNA. Lze uvést více typů analýz nukleových kyselin, nejčastěji se v současné době lze setkat s analýzou krátkých opakujících se motivů (vzorců) v řetězci DNA. Obvykle se počet opakování takovýchto motivů mezi genotypy rychle mění, což odráží jejich evoluci, ale i proces šlechtění a selekce. Sada takových motivů je schopna přesně identifikovat jednotlivé genotypy. Tyto motivy se využívají pro evoluční studie, identifikaci jedinců (např. pro stanovení paternity) a pokud jsou vázány k významné vlastnosti lze je využít i jako markéry. V oblasti identifikace odrůd je tento postup velmi rozšířen a pro některé druhy existují standardizované postupy. Tento postup se označuje jako analýza délkového polymorfismu krátkých opakujících se sekvencí tzv. mikrosatelitů (SSR) (Ovesná a kol. 2014). Příslušná metoda je velmi přesná a opakovatelná. Mezi novinkami, které by se mohly uplatnit v identifikaci odrůd, je sekvenování (stanovení pořadí „písmen“ v molekule

DNA), zejména pak sekvenování nové generace (tzv. Next Generation Sequencing – NGS). NGS, i přes svoji vypovídací schopnost, však zatím není použitelné jako akreditovaná metoda v odrůdovém zkušebnictví.

Výzkum máku setého ve světě je zaměřen zejména na studium biosyntetických drah pro produkci opiových alkaloidů. Pouze omezený počet studií nabízí SSR nebo obdobné markéry pro studium diversity a odlišení genotypů (Celik a kol. 2014, Micianová a kol. 2017, Lee a kol. 2011). Zjistili jsme však, že dosud publikované markéry mají nízkou vypovídací hodnotu, lokusy se vyskytují v několika kopiích v genomu a pro forenzní aplikace nejsou vhodné.

V rámci řešení projektu NAZV QK1720263 byl testován soubor potenciálních SSR lokusů z veřejných databází, ze kterých byly *in silico* analýzou eliminovány takové, které nesplňují požadavky kladené na dostatečně kvalitní markéry. Pro vybrané lokusy byly navrženy reakce, které umožní pomnožit odpovídající sekvence DNA tzv. polymerázovou řetězovou reakcí (Vašek a kol. 2020). Jedná se o enzymatickou reakci, během které se zmnožují vybrané úseky DNA, které je možné vizualizovat a porovnat jejich velikost. Na základě srovnání délkových rozdílů vybraných SSR lokusů mezi jednotlivými odrůdami je možné odrůdy od sebe jednoznačně odlišit. Soubor takových lokusů odlišných délek je možné považovat za SSR markéry. Tyto SSR markéry se obvykle vyhodnocují v laboratořích, které pracují s technikami molekulární biologie.

Postup pro odlišení odrůd máku pomocí SSR analýz

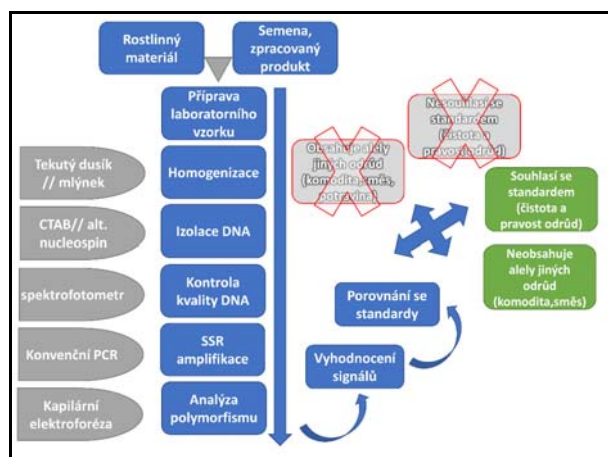
Pro analýzu mikrosatelitů se molekula DNA izoluje z rostlinného materiálu ať již listů, semen, nebo i zpracovaných výrobků. K výhodám SSR analýz patří schopnost množit úseky DNA i z vysoce poškozených (zpracovaných materiálů), protože systém, který se využívá, je schopen pracovat i s degradovanou DNA. Metod izolace je celá řada, některé jsou vhodné pro listy, jiné semena nebo procesované materiály a komplexní směsi (pekařské výrobky). Získaná DNA musí být dostatečně kvalitní a zbavená nečistot (sacharidů, buněčných proteinů nebo pigmentů). Pro množení specifických úseků jsou využívány speciální enzymy (tzv. *Taq* polymerázy) a k jejich detekci fluorescenční značky. Vzorky se pak hodnotí ve speciálním zařízení, které se označuje jako kapilární elektroforéza. Výsledek je generován jako tzv. elektroforetogram a přítomnost signálu je signalizována ve formě vrcholku – píku (obr. 1).

Je zřejmé, že poloha (tedy délka) signálu se u různých odrůd liší. Tento fakt umožňuje jejich vyhodnocení, ztotožnění s určitou odrůdou a vzájemné odlišení. Celkový postup je znázorněn na obr. 2.

Obr. 1: Příklad odlišných délek SSR lokusů u 2 odlišných odrůd (2 opakování každé)



Obr. 2 : Přehled postupu zpracování vzorků a jejich hodnocení po analýze.



Vhodný soubor SSR markerů může odrůdy odlišit a také ukázat na jejich vzájemné vztahy ve formě tzv. dendrogramu, který ukazuje genetické vzdálenosti mezi nimi. Takové porovnání může pomoci orientaci šlechtitelů v jejich dalším směřování.

Kdo může navržené postupy využívat

Byl připraven efektivní nástroj pro identifikaci odrůd a genotypů máku. Pro výzkumné účely mohou tento postup používat laboratoře vysokých škol, výzkumných ústavů i šlechtitelé ve svých laboratořích. Pro zkušební účely je třeba tyto postupy verifikovat, validovat a zavést je v podobě tzv. akreditované zkoušky v laboratořích, které jsou prověřeny českým institutem pro akreditaci podle ISO standardu. Taková laboratoř

– VÚRV v.v.i. Praha se účastnila i validační studie.

Je připraven vzorník délek SSR lokusů pro jednotlivé odrůdy, který bude dále rozšiřován a upřesňován. Bude validován postup ve formě multiplexu, který značně zlevní a urychlí celé stanovení.

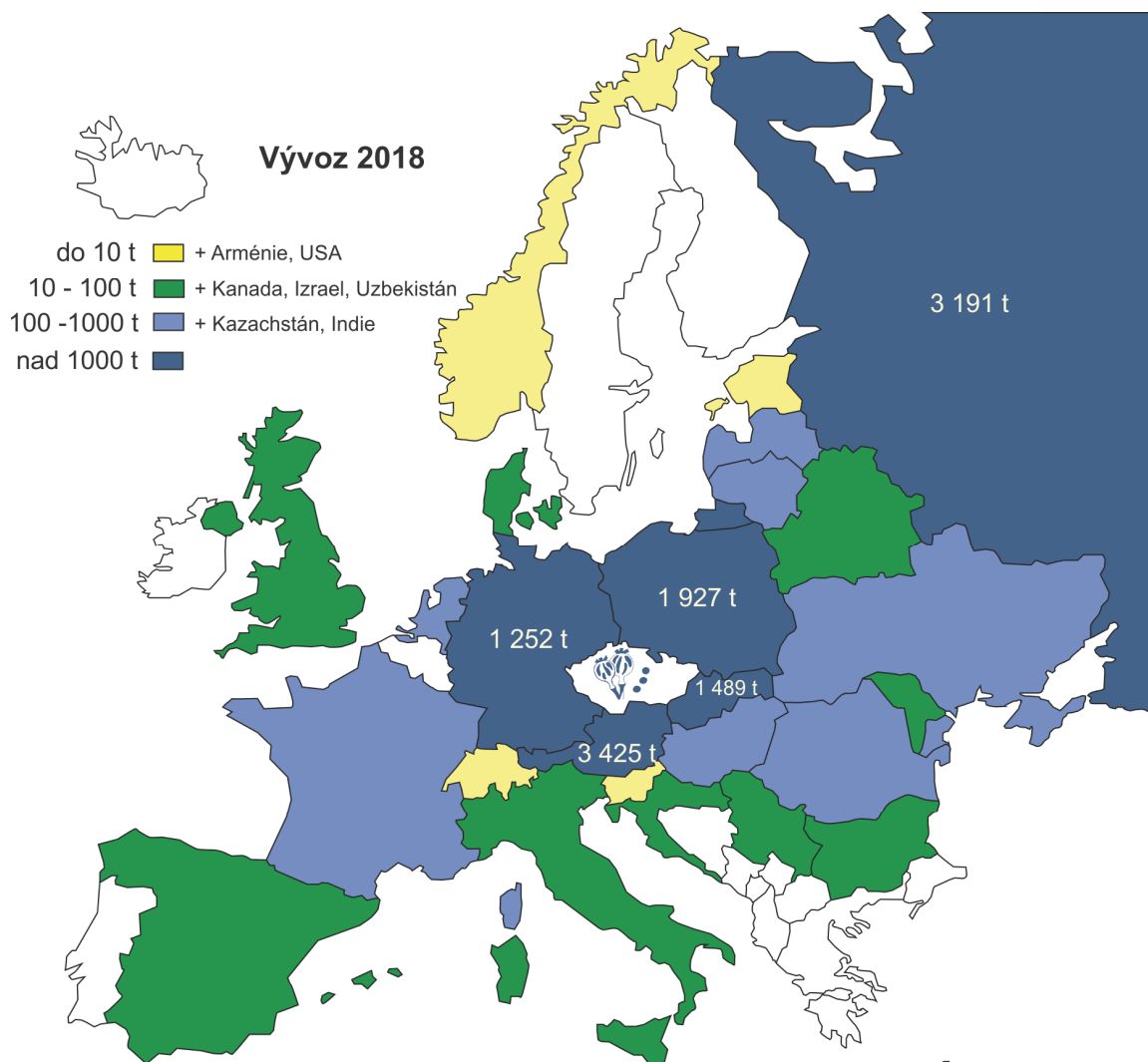
Použité zdroje

- Celik, I a kol. (2014): Development of genomic simple sequence repeat markers in opium poppy by next-generation sequencing. *Molecular Breeding*, 34: 323-334
- Guo L a kol (2018): The opium poppy genome and morphinan production. *Science*. 2018 Oct 19;362(6412):343-347. doi: 10.1126/science.aat4096. Epub 2018 Aug 30
- Labanca F a kol. 2018: *Papaver somniferum* L., taxonomy, uses and new insight into the biosynthetic pathways. *Phytochemistry reviews*. DOI:10.1007/s11101-018-9563-3
- Lee E.J. a kol. 2011: Exploiting Expressed Sequence Tag Databases for the Development and Characterization of Gene-Derived Simple Sequence Repeat Markers in the Opium Poppy (*Papaver somniferum* L.) for Forensic Applications. *J. Forensic Sciences*, 56: 1131-1135
- Micianova, V. a kol (2017): Forensic application of EST-derived STR markers in opium poppy, *Biologia*, 72: 587-594
- Ovesna, J. a kol. (2014): Microsatellite analysis indicates the specific genetic basis of Czech bolting garlic. *Czech J Genet Plant Breed*, 2014, 50(3), 226-34
- Vašek J. a kol. (2020): New EST-SSR Markers for Individual Genotyping of Opium Poppy Cultivars (*Papaver somniferum* L.). *Plants(Basel)*, 9(1), 10; <https://doi.org/10.3390/plants9010010>

Kontaktní adresa

Doc. RNDr. Jaroslava Ovesná, CSc., Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i. Drnovská 507, 161 06 Praha 6, ovesna@vurv.cz

Příspěvek vznikl v rámci uplatnění projektu NAZV QK1720263 a řešení RO0418



Vývoz máku ze sklizně 2018 (od září 2018 do srpna 2019). Dle ČSÚ a ČMM.

19. MAKOVÝ OBČASNÍK

Mák v roce 2020

Vydavatel: Česká zemědělská univerzita v Praze

Autor: kolektiv autorů

Druh publikace: Sborník referátů

Tisk: tiskárna TIGRAS, s.r.o., Hlavní 21, Klíčany, 250 69 Vodochody

Náklad: 420 ks

Počet stran: 120

Rok vydání: 2020

Určeno: účastníkům semináře

Tato publikace neprošla jazykovou úpravou

ISBN 978-80-213-3004-7