

## TVORBA NOVÝCH GENOTYPŮ BRAMBORU S ČERVENOU DUŽNINOU S VYUŽITÍM MUTANTA Z UVC OZAŘOVÁNÍ PROTOPLASTŮ ODRŮDY HERBY

### CREATION OF NEW GENOTYPES OF RED-FLESHED POTATO USING A MUTANT FROM UVC IRRADIATION OF PROTOPLASTS OF THE HERBY VARIETY

Marie GREPLOVÁ, Renata ŠVECOVÁ, Romana HAMPEJSOVÁ, Jaroslava DOMKÁŘOVÁ

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

GREPLOVÁ, M – ŠVECOVÁ, R. – HAMPEJSOVÁ, R. – DOMKÁŘOVÁ, J.

#### TVORBA NOVÝCH GENOTYPŮ BRAMBORU S ČERVENOU DUŽNINOU S VYUŽITÍM MUTANTA Z UVC OZAŘOVÁNÍ PROTOPLASTŮ ODRŮDY HERBY

Vědecké práce – Výzkumný ústav bramborářský Havlíčkův Brod, 2024, 30: 43–52

Toto sdělení navazuje na článek z roku 2013 popisující vznik mutantů odrůdy Herby pomocí ozařování protoplastů ultrafialovým zářením (GREPLOVÁ *et al.*, 2013). Šlechtitelská práce pokračovala se dvěma mutanty: Herby 6/9 a Herby 6/29. Byla sledována fertilita pylu a oba genotypy byly zahrnuty do klasické hybridizace. Nasazení květů nebylo velké a záleželo i na ročníku. V průběhu sledovaného období se podařilo uskutečnit zpětné dosycovací křížení s odrůdou Herby – back cross generace (I. BCG) a následně bylo úspěšné opylení křížencem s barevnou dužninou za vzniku II. cross generace (II. CG). Získané hybridní potomstvo vykazovalo dostatečný počet jedinců s homogenně vybarvenou dužninou, ale naproti tomu se projevil snížený výnos i nedostatky chuti v testech stolní hodnoty. Získané poznatky poukazují na složitost hybridizace u tetraploidní plodiny, jakou je brambor (*Solanum tuberosum*).

mutageneze; hybridizace; barevná dužnina; stolní hodnota

## ÚVOD

Ultrafialové záření (UV) je součástí elektromagnetického spektra. UVC je tzv. krátkovlnné záření v rozsahu 280-100 nm. Toto UV záření již začíná být na své dolní hranici ionizující (wikipedie). Při dopadu dochází k ionizaci a excitaci, přičemž je absorbována energie (SÚJEB). UV záření může vést k poškození DNA, zejména přímou tvorbou pyrimidinových dimerů (CVETKOVIC *et al.*, 2023) a vznikem reaktivních forem kyslíku, které zapříčiňují oxidativní stres (HE *et al.*, 2008). Může způsobit změny v DNA jako mutace nebo chybné replikace DNA (HUO *et al.*, 2022), strukturální změny v chromozomech (BHOI *et al.*, 2022). Nicméně je také známo, že řídce ionizující záření může v oblasti velmi nízkých dávek stimulovat chromozómové reparace a vést k pozitivnímu účinku. Tento jev se nazývá *hormeze* (SÚJEB). UV záření jako technika fyzikálního působení k vyvolání mutagenese je využívána šlechtiteli (BHOI *et al.*, 2022). Přírodním zdrojem UVC je Slunce, ale může pocházet také ze speciálních lamp nebo laseru (NZIP) a takto kontrolovaně může být cíleně využito. Tento příspěvek informuje o úspěšnosti cílené hybridizace mutovaných genotypů Herby a představuje získané potomstvo.

## MATERIÁL A METODY

Do hybridizace byly zahrnuty dva mutované genotypy Herby: 6/9 a 6/29, které byly získány v předchozím řešení aplikací UVC ozařování protoplastů (GREPLOVÁ *et al.*, 2013) a byly uchovávány v *in vitro* podmínkách. Vybrány byly pro sytější barvu dužniny, ačkoli jejich výnos nedosahoval úrovně výchozí odrůdy Herby a stolní hodnota byla rovněž nižší (GREPLOVÁ *et al.*, 2013). *In vitro* rostliny byly kultivovány na MS médiu bez hormonů (MURASHIGE a SKOOG, 1962) v kultivační místnosti s fotoperiodou 16/8 h světlo/tma (světelné podmínky: zářivky, denní světlo,  $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) při 22 °C. Rostliny z *in vitro* podmínek byly aklimatizovány a převedeny do substrátu B (Rašelina Soběslav) a další kultivace probíhala v technickém izolátu. U mutantů byla sledována stabilita pozměněného morfologického projevu nejprve v technickém izolátu a následně i v polních podmínkách.

Rostliny byly hodnoceny podle Deskriptoru (HUAMAN *et al.*, 1977). V technickém izolátu byly vysazeny 3 rostliny a v dalším roce 3 hlízy, na poli bylo vysazeno 5 hlíz na genotyp. Fertilita pylu byla hodnocena podle FRČEK (1988), postup je popsán také v GREPLOVÁ *et al.* (2009). Cílené opylování bylo realizováno nanášením pylu na blizny vykastrovaných květů ve stádiu poupěte. Stolní hodnota byla stanovena podle ČSN 462211:1988 a varný typ podle ČERMÁK (2009).

## VÝSLEDKY

V morfologii barvy dužniny byla u mutantů zaznamenána stabilita jak při pěstování v technickém izolátu, tak v polním pěstování. Kvetení bylo problematické zejména u mutantu Herby 6/9, zatímco mutant Herby 6/29 kvetl téměř pravidelně. Fertilitu pylu a počty opylených květů v letech uvádí Tab. 1 a 2.

Tab. 1: Fertilita pylu u mutantních genotypů v průběhu pěti let v porovnání s fertilitou pylu výchozí odrůdy Herby

	Fertilita pylu (%)					
	2012	2014	2015	2016	2017	Ø
Herby 6/9	~	~	68	72	~	~
Herby 6/29	83	77	68	66	67	72
Herby	~	88	76	78	~	81

~ fertilita pylu nebyla stanovena

Tab. 2: Přehled počtu opylených květů ve dvou čtyřletých cyklech a zisk I. BC generace

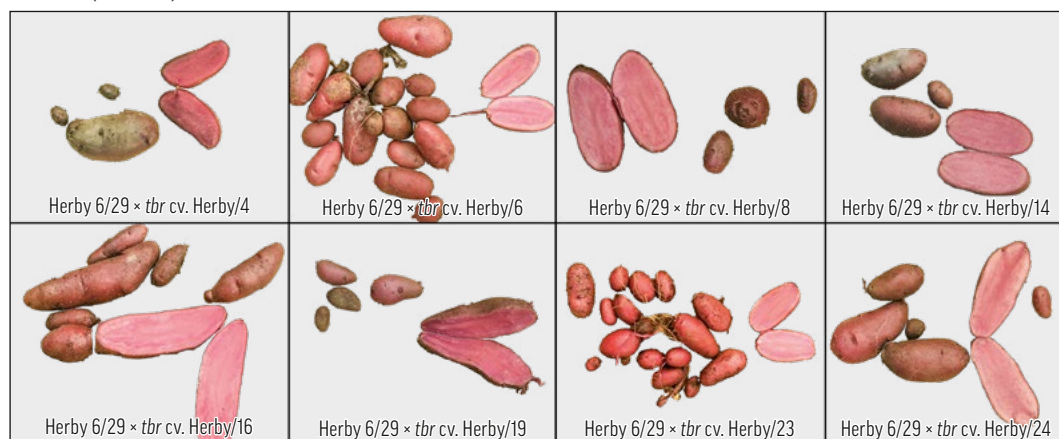
1. cyklus	Počet opylených květů						2. cyklus	Počet opylených květů					
	2014	2015	2016	2017	Σ	Ø		2021	2022	2023	2024	Σ	Ø
Herby 6/9	2	12	1*	28	43	11	Herby 6/9	—	—	—	—	—	—
Herby 6/29	14	12	35**	3	64	16	Herby 6/29	22	41	8	26	97	24

\* zjištěno chimérické pletivo a vyřazení ze sledování v dalším cyklu

\*\* 8 bobulí, 266 semen, v násled. roce 37 hlízotvorných regenerantů

V roce 2016 se zdařilo dosycovací křížení: Herby 6/29 × *tbr* cv. Herby. Celkem bylo získáno 8 bobulí s 266 semeny.

Obr. 1: Výběr z potomstva dosycovacího křížení mutantu Herby 6/29: Herby 6/29 × *tbr* cv. Herby (I. BCG)



Z výsevu těchto semen vzešlo 37 hlízotvorných genotypů, z nichž osm s červenou nebo růžovou dužninou bylo vyhodnoceno jako perspektivních k dalšímu využití. Tento výběr dokumentuje Obr. 1 a Tab. 3. V dalším cyklu (2021–2024) opylování mutanta Herby 6/29 nebyl zaznamenán úspěch.

Tab. 3: Přehled vybraných genotypů z I. BCG (2018), počet opylených květů a zisk II. CG (2019, 2020)

Rostlina v technickém izolátu			Hlízy					Počet opylených květů**		Bobulí/ semen
	Výška (cm)	Kvetení	Barva slupky	Barva dužniny	Tvar	Hmot. (g) na rostlinu	Počet hlíz na rostlinu	2019	2020	2020
Herby 6/29 × Herby /4	60	-	červená	světlé růžová	rohličkovitý	37	4	0	0	
Herby 6/29 × Herby /6	120	-/✓	červená	růžová, obvod krémová	oválný	187	17	0	10	
Herby 6/29 × Herby /8	90	-	červená	růžová	oválný	58	4	0	0	
Herby 6/29 × Herby /14	50	-	červená	sytlejší růžová	oválný	13	4	0	0	
Herby 6/29 × Herby /16	80	P/✓	červená	růžová mramorová	rohličkovitý	103	6	0	1	
Herby 6/29 × Herby /19	90	P/✓	červená	sytlejší růžová	rohličkovitý	64	5	0	6	1/63
Herby 6/29 × Herby /23	130	✓	červená	světlé růžová	oválný	189	17	0	12	2/177
Herby 6/29 × Herby /24	90	P	červená	růžová mramorová	oválný	75	6	26	2	

~ fertilita pylu nebyla stanovena; P – poupata

Kříženci I. BCG nekvety nebo shazovaly poupata. Přesto bylo v roce 2020 úspěšné opylování dvou genotypů se ziskem bobulí a semen: **Herby 6/29 × Herby/19 a Herby 6/29 × Herby/23** (Tab. 3). Úspěšným opylovačem byl v obou případech hybrid 10.9/1 s červenou slupkou i dužninou, který byl v roce 2022 registrován jako odrůda Val Red.

Z kombinace [Herby 6/29 × Herby/19] × 10.9/1 (pracovní označení **Rút**) bylo získáno 63 semen a vzešlo (v roce 2021) 16 semenáčů (12 hlízotvorných). Z kombinace [Herby 6/29 × Herby/23] × 10.9/1 (pracovní označení **Ráchel**) bylo získáno 177 semen a vzešlo (v roce 2022) 128 semenáčů (110 hlízotvorných). Po screeningu všech hlízotvorných kříženců byla provedena selekce podle kvality hlíz se zaměřením zejména na barevnou dužninu. Přehledy uvádí Tab. 4 a 5 a Obr. 2 a 3.

Tab. 4 Přehled vybraných genotypů Rút - [Herby 6/29 × Herby/19] × 10.9/1 ze skleníku (II. CG)

Rostlina v technickém izolátu			Pylová fertilita (%)	Hlízy					Stolony
Výška (cm)	Kvetení	Barva slupky		Barva dužniny	Tvar	Hmotnost (g) na rostlinu	Počet hlíz na rostlinu		
Rút = 20_21 [[Herby 6/29 × Herby/19] × 10.9/1]									
Rút 1	140	✓	39,2	červená	růžová	rohličkovitý	135	9	-
Rút 2	140	✓	64,4	fialová	tm.fialová	rohl./kulovitý	284	14	-
Rút 3	150	✓	49,4	červená	světlé růžová	rohličkovitý	239	15	-

Obr. 2: Výběr genotypů Rút z Tab. 4 (II. CG)

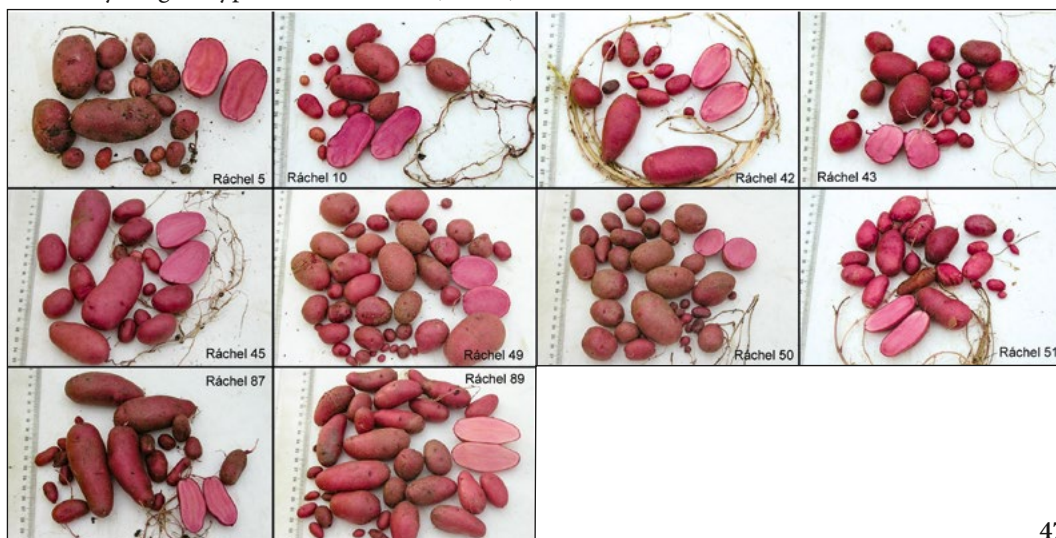


Tab. 5 Přehled vybraných genotypů Ráchel – [Herby 6/29 × Herby/23] × 10.9/1 ze skleníku (II.CG)

Rostlina v technickém izolátu	Pylová fertilita (%)			Hlíz					Stolony
	Výška (cm)	Kvetení		Barva slupky	Barva dužniny	Tvar	Hmotnost (g) na rostlinu	Počet hlíz na rostlinu	
Ráchel = 20_22 [[Herby 6/29 × Herby/23] × 10.9/1]									
Ráchel 5	190	✓	72,6	červená	sytě růžová	oválný	131	19	-
Ráchel 10	165	✓	67,6	červená	sytě růžová	oválný	83	17	✓
Ráchel 42	140	✓	83,0	červená	růžová - šedě mramorovaná	dlouze oválný	84	13	✓
Ráchel 43	135	✓	~	červená	růžová	oválný	166	26	✓
Ráchel 45	165	P	~	červená	sytě růžová	dlouze oválný	287	17	✓
Ráchel 49	160	✓	76,8	červená	sytě růžová	oválný	437	42	-
Ráchel 50	160	✓	78,5	červená	sytě růžová	kulatý až oválný	348	35	✓
Ráchel 51	145	✓	80,2	červená	sytě růžová	oválný	131	23	✓
Ráchel 87	170	✓	78,9	červená	sytě růžová až našedlá	dlouze oválný až rohličkovitý	242	20	✓
Ráchel 89	155	✓	82,9	červená	růžová - béžově mramorovaná.	rohličkovitý	360	33	-

~ fertilita pylu nebyla stanovena; P – poupata

Obr. 3: Výběr genotypů Ráchel z Tab. 5 (II. CG)



V roce 2023 byla v polních podmínkách ze skupiny Rút pěstována pouze Rút 2. Výnos na trs činil 0,93 kg s 21 hlízami. V testu stolní hodnoty **Rút 2** dosáhla celkový počet 67 bodů, což je úroveň 79 % kontrolní odrůdy Antonie (85 bodů). Ztráta bodů byla v chuti a v pevnosti dužniny, méně atraktivní byl rovněž varný typ CB. V roce 2024 bylo v polních podmínkách ze skupiny Ráchel pěstováno 5 genotypů (Ráchel 43, 45, 48, 49 a 50). Do testu stolní hodnoty (SH) byly vybrány **Ráchel 45 a 49**. Výnos byl u vybraných kříženců nižší, žádný nedosáhl 1 kg na trs. Celkový počet bodů stolní hodnoty dosáhl u nejvýnosnější Ráchel 49 až 75 bodů (téměř 95 % kontroly; Antonie 79 bodů) s varným typem BA, který je pro speciální použití velmi vhodný. Výnosy a výsledky zkoušek SH dokumentuje Tab. 6 a Obr. 4.

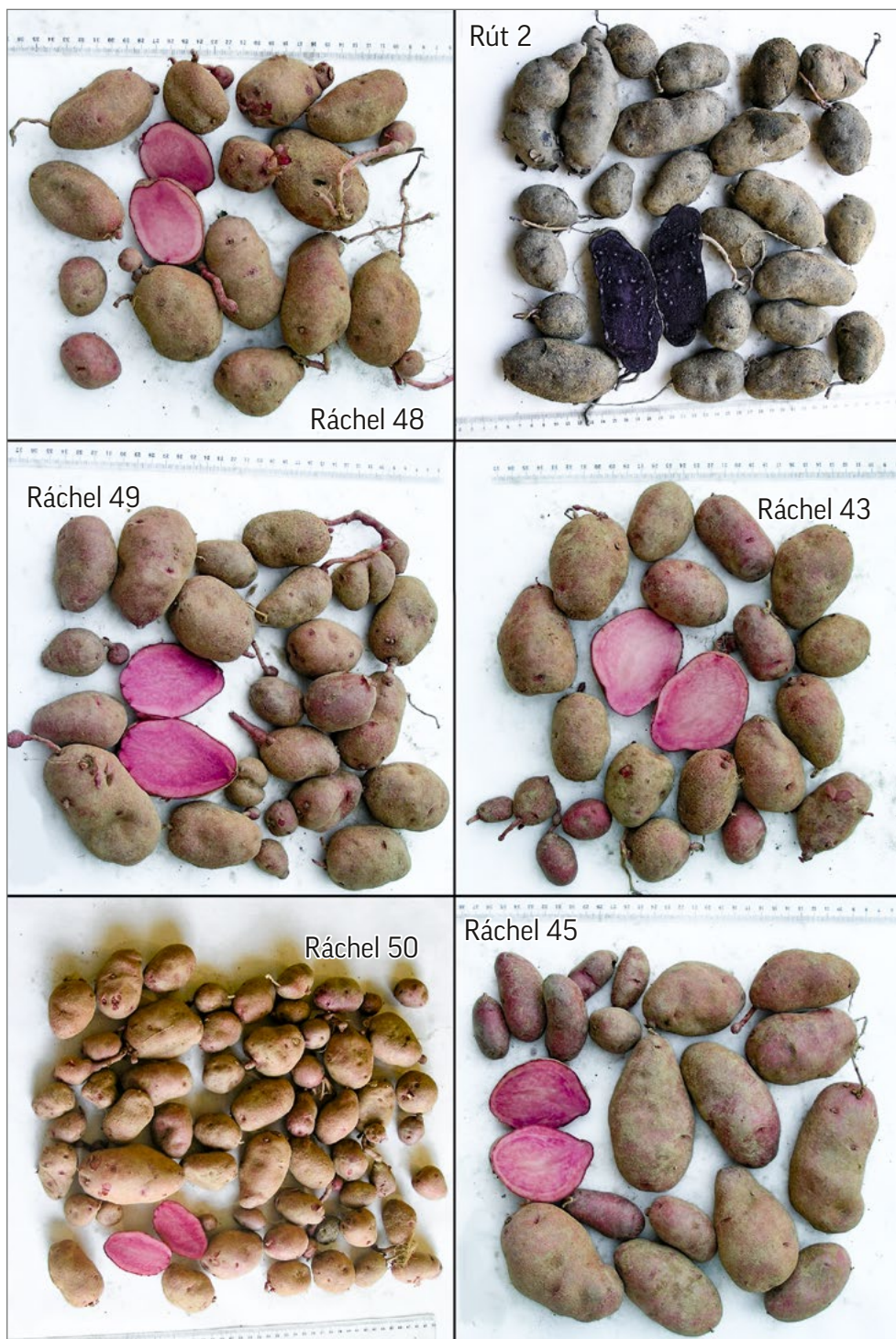
Tab. 6: Výběr kříženců II. CG z polního pěstování: Rút\* v roce 2023 a Ráchel v roce 2024

	výnos hlíz na trs		celkové body SH	varný typ
	kg	počet		
Rút 2*	0,93	21	67	CB
Ráchel 43	0,69	19	~	~
Ráchel 45	0,55	6	73	B
Ráchel 48	0,51	14	~	~
Ráchel 49	0,83	26	75	BA
Ráchel 50	0,76	24	~	~

~ stolní hodnota a varný typ nebyly stanoveny



Obr. 4: Výběr kříženců II. CG mutanta Herby 6/29 z polního pěstování roku 2023 (Rút) a roku 2024 (Ráchel)



## ZÁVĚR A DISKUSE

Aplikací UVC záření na protoplasty došlo u vybraných genotypů k posunu intenzity zbarvení dužniny. Současně se ale dostavilo snížení výnosu a částečně i zhoršení stolní hodnoty (GREPLOVÁ *et al.*, 2013). Přes zpětné křížení (I. BCG) a II. CG zůstal výnos na trs pod úrovní jednoho kilogramu, ale došlo ke zlepšení stolní hodnoty. Obsah glykoalkaloidů, který může ovlivnit chuťové vlastnosti, nebyl stanoven. Jejich koncentrace je spíše odrůdovou záležitostí než vazbou na množství antokyanů v hlízách, jak prokázal HAMOUZ *et al.* (2014): většina testovaných odrůd s barevnou dužninou vykazovala 1,53× vyšší hodnoty glykoalkaloidů a jedna odrůda absolutně nejnižší obsah ze všech 14 sledovaných kultivarů. Vliv genotypu a nikoli barva dužniny na koncentraci glykoalkaloidů potvrzuje i práce URBANA *et al.* (2018).

Šlechtění bramboru zaměřené na získání nových genotypů s vyšším obsahem antokyanů v dužnině má velký potenciál u spotřebitelů. Zdravotní benefity přírodních barviv se dostávají do širšího povědomí, zejména pro jejich antioxidační potenciál, a proto zájem o takové odrůdy postupně vzrůstá (WEGNER *et al.*, 2010). Blíže spotřebitelům je i čínská netransgenní odrůda Hongmei s červenou dužninou a se sníženým obsahem glykoalkaloidů na bezpečné úrovni pro konzum dužniny zasyrova, kdy je benefitem nejen vysoký obsah přírodních barviv, ale v plné míře je zachován i obsah kyseliny askorbové - vitamínu C (XU *et al.*, 2018).

## PODĚKOVÁNÍ

Práce byla realizována s podporou MZe SZIF - Tvorba genotypů bramboru s vysokou rezistencí k biotickým a abiotickým faktorům a diferencovanou kvalitou pomocí biotechnologických postupů a experimentální hybridizace s využitím různých úrovní ploidie a zdrojů rezistence, v rámci dotačního programu: 3.



## LITERATURA

- BHOI, A. – YADU, B. – CHANDRA, J. – KESHAVKANT, S. (2022): Mutagenesis: A coherent technique to develop biotic stress resistant plants. *Plant Stress*, 3: Article Number: 100053. DOI: 10.1016/j.stress.2021.100053.
- ČERMÁK, V. (2009): Metodika zkoušek užitné hodnoty brambor. ÚKZÚZ, Národní odrůdový úřad.
- CVETKOVIC, S. – VULETIC, S. – VUNDUK, J. – KLAUS, A. – MITIC–CULAFIC, D. – NIKOLIC, B. (2023): The role of *Gentiana lutea* extracts in reducing UV–induced DNA damage. *Mutagenesis*, 38(1): 71–80. DOI: 10.1093/mutage/geac006.
- FRČEK, J. (1988): Nepřímá metoda pro stanovení fertility pylu odrůd bramboru *Solanum tuberosum* L. *CJGPB*, 24: 85–86.
- GREPLOVÁ, M. – POLZEROVÁ, H. – DOMKÁŘOVÁ, J. (2013): Mutation Breeding of *Solanum tuberosum* using UVC irradiation. *Vědecké práce – Výzkumný ústav bramborařský Havlíčkův Brod*, 21: 59–74.
- GREPLOVÁ, M. – POLZEROVÁ, H. – DOMKÁŘOVÁ, J. (2009): Intra– and inter–specific crosses of *Solanum* materials after mitotic polyploidization *in vitro*. *Plant Breeding*, 128: 651–657.
- HAMOUZ, K. – PAZDERŮ, K. – LACHMAN, J. – ORSÁK, M. – PIVEC, V. – HEJTMÁNKOVÁ, K. – TOMÁŠEK, J. – ČÍŽEK, M. (2014): Effect of cultivar, flesh colour, location and year of cultivation on the glycoalkaloid content in potato tubers. *Plant Soil and Environment*, 60 (11): 512–517. DOI 10.17221/596/2014–PSE
- HE, R. – DRURY, G. E. – ROTARI, V. I. – GORDON, A. – WILLER, M. – FARZANEH, T. – WOLTERING, E. J. – GALLOIS, P. (2008): Metacaspase–8 modulates programmed cell death induced by ultraviolet light and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry*, 283(2): 774–783; DOI: 10.1074/jbc.M704185200
- HUAMAN, Z. – WILLIAMS, J. T. – SALHUANA, W. – VINCENT, L. (1977): Descriptors for the cultivated potato and for the maintenance and distribution of germplasm collections. International board for plant genetic resources, Rome, Italy.
- HUO, H. – HE, Y. – CHEN, W. – WU, L. – YI, X. – WANG, J. (2022): Simultaneously monitoring UVC–induced DNA damage and photoenzymatic repair of cyclobutane pyrimidine dimers by electrochemical impedance spectroscopy. *Talanta*, 239: 123081. DOI: 10.1016/j.talanta.2021.123081.
- MURASHIGE, T. – SKOOG, F. (1962): A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3): 473–497.
- URBAN, J. – HAMOUZ, K. – LACHMAN, J. – PULKRÁBEK, J. – PAZDERŮ, K. (2018): Effect of genotype, flesh colour and environment on the glyco–alkaloid content in potato tubers from integrated agriculture. *Plant Soil and Environment*, 64(4): 186–191. DOI: 10.17221/166/2018–PSE.
- WEGNER, K. – HERRMANN, M. E. – HILLEBRAND, S. – PAWELZIK, E. – ELLROTT, T. (2010): Current research on potatoes Part 2: Undesirable substances and contaminants; flesh–coloured potatoes. *Ernährungs Umschau*, 57(5): 232–237.
- XU, D. – LIU, H. – JIN, CH. – CAO, CH. – LI, W. – ZENG, F. – ZHAO, Y. – LIU, G. (2018): A new potato variety grown in China suitable for raw eating. *European Food Research and Technology*, 244(5): 851–860. DOI: 10.1007/s00217-017-3009-9.
- Národní zdravotnický informační portál: NZIP: <https://www.nzip.cz/rejstrikovy-pojem/3236>.
- SÚJEB: <https://sujb.gov.cz/radiacni-ochrana/oznameni-a-informace/strucny-prehled-biologicky-ucinku-zareni/>.
- Wikipedie:  
[https://cs.wikipedia.org/wiki/Ionizuj%C3%ADc%C3%AD\\_z%C3%A1%C5%99en%C3%AD](https://cs.wikipedia.org/wiki/Ionizuj%C3%ADc%C3%AD_z%C3%A1%C5%99en%C3%AD).  
[https://cs.wikipedia.org/wiki/Slune%C4%8Dn%C3%AD\\_energie](https://cs.wikipedia.org/wiki/Slune%C4%8Dn%C3%AD_energie).  
[https://cs.wikipedia.org/wiki/Ultrafialov%C3%A9\\_z%C3%A1%C5%99en%C3%AD](https://cs.wikipedia.org/wiki/Ultrafialov%C3%A9_z%C3%A1%C5%99en%C3%AD).  
<https://cs.wikipedia.org/wiki/Hormeze>.

GREPLOVÁ, M – ŠVEC OVÁ, R. – HAMPEJ SOVÁ, R. – DOMKÁŘOVÁ, J.

**CREATION OF NEW GENOTYPES OF RED-FLESHED POTATO USING A MUTANT FROM UVC IRRADIATION OF PROTOPLASTS OF THE HERBY VARIETY**

Vědecké práce – Výzkumný ústav bramborářský Havlíčkův Brod, 2024, 30: 43–52

This communication follows up on the 2013 article describing the emergence of mutants by UVC irradiation (GREPLOVÁ *et al.*, 2013). Breeding work continued with two mutants Herby 6/9 and Herby 6/29. Pollen fertility was monitored and both genotypes were included in classical hybridization. Flower setting was not high and also depended on the year. During the monitored period, a back-crossing with the Herby variety was successfully carried out - back cross generation (I. BCG) and subsequently pollination with a cross with colored pulp was successful and the II. cross generation (II. CG) was formed. The obtained hybrid offspring showed a sufficient number of individuals with homogeneously colored pulp, but on the other hand, a reduced yield and taste deficiencies were observed in table value tests. The obtained knowledge points to the complexity of hybridization in a tetraploid crop such as potato (*Solanum tuberosum*).

mutagenesis; hybridization; colored pulp; table value

*Kontakt:*

Ing. Marie GREPLOVÁ, Ph.D.

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

Dobrovského 2366

580 01 Havlíčkův Brod

Česká republika

tel.: +420 569 466 218

e-mail: greplova@vubhb.cz