

## IDENTIFICATION, DIFFERENTIATION AND CHARACTERIZATION OF BARLEY GENOTYPES USING SSR MARKERS.

Martin Vivodík, Zdenka Gálová, Želmíra Balážová

### ABSTRACT

Eleven primer pairs for study of genetic diversity of 30 barley genotypes were used, that amplified altogether 58 different polymorphic alleles with an average number of 5,3 alleles per locus. The number of alleles ranged from two (*HVCMA*) to eleven (*HVRCABG*). All eleven microsatellite markers were polymorphic and produced reproducible data. The diversity index of the tested SSR markers ranged from 0,124 (*HVCMA*) to 0,866 (*HVRCABG*) with an average of 0,584. The polymorphic information content ranged from 0,116 (*HVCMA*) to 0,866 (*HVRCABG*) with an average of 0,555. Six (54 %) of 11 microsatellite loci obtain values of index diversity higher than 0,6, which is generally considered sufficient for this purpose. Dendrogram based on hierarchical cluster analysis using UPGMA algorithm grouped genotypes into two main clusters. Two genotypes, SK 5407 and SK 5451 was not possible to distinguish from one another. Results showed the utility of microsatellite markers for estimation of genetic diversity of wheat cultivars and barley genotypes leading to genotype identification.

**Keywords:** barley, microsatellites, genetic diversity, PCR, DNA markers

### ÚVOD

DNA markery sa využívajú pri mapovaní genómu, v štúdiu genetickej diverzity, pri selekcii genotypov s hospodársky významným génom tesne viazaným k určitému molekulárnemu markeru atď. DNA markery, ktoré sa využívajú pri selekcii požadovaných genotypov, nie sú ovplyvnené agroekologickými podmienkami pestovania a nezávisia od štádia vývoja rastliny, v ktorom sú analyzované. Je ich vhodné použiť vtedy, keď je ťažké a časovo náročné použiť bežné šľachtiteľské metódy. Molekulárne markery založené na metóde PCR sa využívajú napríklad aj pri príprave geneticky modifikovaných rastlín, ale tiež pri detekcii vnesených génov do vybraných genotypov, čím je možné odlišiť modifikované genotypy od nemodifikovaných. Zlepšenie vlastností rastlín, či už prírodnou selekciou alebo cieľovým šľachtením, bolo založené na vytvorení, hodnotení a selekcii správnych kombinácií alel. Použitím molekulárnych markerov je možné sledovať významné alely v štiepiacej populácii a ich následné

mapovanie. Spomedzi DNA techník dopĺňajúcich proteínové analýzy, ktoré sa v súčasnosti používajú, najväčší polymorfizmus vykazujú mikrosatelitné markery. Mikrosatelitné markery ako efektívne markerovacie systémy sa môžu využiť pri identifikácii a diferenciacii genotypov pšenice a jačmeňa, čo je možné následne využiť pri výbere genetických zdrojov pre šľachtenie, pri hodnotení ich genetickej rozmanitosti využiteľnej v šľachtení, určovaní novosti, odlišnosti, vyrovnanosti a stálosti registrovaných odrôd, ale aj pri najrôznejších štúdiách v systematike a genetike.

Mikrosatelity alebo tiež krátke tandemové repetície (STR-Short Tandem Repeats), jednoduché opakovania sekvencií (SSR-Simple Sequence Repeat), dĺžkový polymorfizmus jednoduchých sekvencií (SSLP-Simple Sequence Length Polymorphism) sa rozdeľujú na dokonalé (perfect),

nedokonalé (imperfect) a zložené (compound) mikrosatelity (Weber, 1990). Dokonalé mikrosatelity sú tvorené jedným súvislým repetitívnym motívom napr. (AT)<sub>14</sub>. V nedokonalých mikrosatelitoch je základný motív prerušený poradím niekoľkých nukleotidov napr. (AC)<sub>16</sub>GT(AC)<sub>4</sub>. Zložené mikrosatelity predstavujú niekoľko sekvenčných motívov napr. (AT)<sub>15</sub>(AC)<sub>20</sub>. V dôsledku nových informácií o rôznych sekvenčných motívoch vo vnútri mikrosatelitov, Chambers a MacAvoy (2000) rozšírili uvedené rozdelenie na šesť tried, pričom termín „perfect“ nahradili termínom „pure“ pre označenie dokonalých mikrosatelitov a termín „imperfect“ nahradili termínom „interrupted pure“ pre označenie nedokonalých mikrosatelitov (Tabuľka 1).

Tabuľka 1 Šesť tried mikrosatelitov (Chambers a MacAvoy, 2000)

Trieda	Class	Sekvencia
Dokonalý	Pure	-(AT) <sub>16</sub> -
Prerušovaný dokonalý	Interrupted pure	-(TA)-(CA) <sub>4</sub> - TA-(CA) <sub>6</sub> -
Zložený	Compound	-(AT) <sub>12</sub> -(AC) <sub>8</sub> -
Prerušovaný zložený	Interrupted compound	-(AC) <sub>14</sub> -AG- AA-(AG) <sub>12</sub> -
Komplexný	Complex	(TTTC) <sub>3-4</sub> -(T) <sub>6</sub> - (CT) <sub>0-1</sub> - (CYKY) <sub>n</sub> - CTCC- (TTCC) <sub>2-4</sub>
Prerušovaný komplexný	Interrupted complex	Alela s prerušením vo vnútri repetitívnej jednotky

Mikrosatelity sa vyskytujú často, náhodne a vo veľkom množstve vo všetkých preskúmaných eukaryotických jadrových DNA (Tautz & Renz, 1984, Gupta et al., 1996). Frekvencia výskytu

mikrosatelitov sa líši významne medzi rôznymi organizmami (Morgante a Olivieri, 1993, Gupta et al., 1996). Odhaduje sa, že ľudský genóm obsahuje v priemere o 10x viac mikrosatelitov ako rastlinný genóm. V rastlinných druhoch sa najčastejšie vyskytujú dinukleotidové repetície (AC)<sub>n</sub> a (GA)<sub>n</sub>, pričom pšenica obsahuje viac dinukleotidových repetícií ako ryža či kukurica (Gupta a Varshney, 2000).

Veľkosť repetitívnej sekvencie u mikrosatelitov je predmetom diskusie rôznych autorov. Tautz (1993) navrhuje dĺžku repetitívnej jednotky od 1 do 10 bp, ďalší navrhujú 1-6 bp (Goldstein & Pollock, 1997) prípadne 1-5 bp (Schlotterer, 1998). Chambers a MacAvoy (2000) navrhujú pri mikrosatelitoch minimálnu dĺžku konečného zoskupenia 8 nukleotidov a dĺžku repetitívnej jednotky 2-6 nukleotidov. Mononukleotidové repetície navrhujú vyčleniť samostatne a nezaraďujú ich medzi mikrosatelity ani 7-10 nukleotidové repetície kvôli nedostatku informácií o mutačných procesoch v rámci nich.

Cieľom práce bolo pomocou mikrosatelitných markerov identifikovať, diferencovať a charakterizovať genotypy jačmeňa siateho (*Hordeum vulgare* L.). Získané výsledky bude možné následne využiť pri výbere genetických zdrojov pre šľachtenie, pri hodnotení ich genetickej rozmanitosti, určovaní novosti, odlišnosti, vyrovnanosti a stálosti registrovaných odrôd, ako aj pri najrôznejších štúdiách v systematike a genetike.

## MATERIÁL A METODIKA

Na mikrosatelitné analýzy sme použili súbor 30 genotypov jačmeňa siateho (*Hordeum vulgare* L.) (Tabuľka 2). Jednotlivé vzorky boli získané z UKSÚP Bratislava, AGRO BSS s.r.o. Sládkovičovo a Génovej banky semenných druhov SR VÚRV v Piešťanoch. Anorganické a organické chemikálie, enzýmy a ďalšie špeciálne chemikálie, ktoré sme používali pri analýzach boli zakúpené od firiem: Sigma, Merck, Fermentas, Sklochem.

Tabuľka 2 Zoznam genotypov jačmeňa siateho použitého na analýzy

	Genotyp	Rok povolenia a krajina pôvodu
1.	Adan	
2.	Amos	1995 SR
3.	Diosecky Kneifl	1938 SR
4.	Expres	1999 SR
5.	Garant	1994 SR
6.	Jubilant	1991 SR
7.	Kompakt	1995 SR
8.	Kosan	1994 SR
9.	Malc	

10.	Nitran	2003 SR
11.	Orbit	1986 SR
12.	Progres	1998 SR
13.	Reni	2001 NEM
14.	Slovensky jemny	1946 SR
15.	Slovensky kvalitny	1946 SR
16.	Stabil	1993 SR
17.	Terrasol Pivovarsky	1944 CZE
18.	Tiffany	1995NEM
19.	Vladan	1996 SR
20.	Zlatan	1994 SR
21.	KM 96	SR
22.	KM 98	SR
23.	SK 5104	SR
24.	SK 5184	SR
25.	SK 5374	SR
26.	SK 5397	SR
27.	SK 5407	SR
28.	SK 5451	SR
29.	SK 5526	SR
30.	SK 5976	SR

Celkovú rastlinnú DNA sme izolovali z mladých 7-10 dňových listov jačmeňa. Rastlinný materiál sme homogenizovali v trecej miske v tekutom dusíku. Pre samotnú izoláciu DNA jačmeňa sme použili postup vytvorený kombináciou dvoch izolačných postupov – podľa Dellaportu et al. (1983) a Granera et al. (1990). Mikrosatelitné analýzy sme uskutočňovali v objeme 20 µl. Na analýzy jačmeňa sme použili 11 mikrosatelitných párov primerov, ktoré popisali Becker a Heun (1995) a Macaulay et al. (2001) (Tabuľka 3).

Tabuľka 3 Zoznam použitých SSR markerov jačmeňa, ich charakteristika, motív repetície mikrosatelitu a sekvencie párov primerov k nim navrhnutých (Becker a Heun, 1995, Macaulay et al., 2001)

SSR marker	Sekvencie primerov (5' - 3')
Bmac0040	AGCCCGATCAGATTTACG TTCTCCCTTTGGTCCTTG
Bmac0067	AACGTACGAGCTCTTTTTCTA ATGCCAACTGCTTGTTTAG
Bmag0013	AAGGGGAATCAAATGGGAG TCGAATAGGTCTCCGAAGAAA
Bmag0135	ACGAAAGAGTTACAACGGATA GTTTACCACAGATCTACAGGTG
Bmag0173	CATTTTTGTTGGTGACGG ATAATGGCGGGAGAGACA
Bmag0211	ATTCATCGATCTTGATTAGTCC ACATCATGTTCGATCAAAGC
Bmag0222	ATGCTACTCTGGAGTGGAGTA GACCTTCACTTTGCCTTATA

<b>Bmag0225</b>	AACACACCAAAAATATTACATCA CGAGTAGTTCATGTGAC
<b>HVCMA</b>	GCCTCGGTTTGGACATATAAAG GTAAAGCAAATGTTGAGCAACG
<b>HVGNIRE</b>	GAGTTGCAACAACAACAGGGTA GTCATGCACATCATCGAGATCT
<b>HVRCABG</b>	ACACCTTCCCAGGACAATCC CAGAGCACCGAAAAAGTCTGTA

Amlifikované alely sme separovali v 6 % polyakrylamidových géloch (35 cm x 45 cm x 0,4 mm) denaturovaných močovinou. DNA profily sme hodnotili kvalitatívne z hľadiska prítomnosti DNA fragmentov. Zároveň sme určovali aj veľkosť amplifikovaných fragmentov pomocou DNA štandardov. Výsledné PCR produkty v polyakrylamidových géloch sme skenovali pomocou CCD kamery UVP a načítané polyakrylamidové gély sme vyhodnocovali pomocou dokumentačných a vyhodnocovacích programov systému Grab-It 1D pre Windows.

Na hodnotenie polymorfizmu medzi genotypmi jačmeňa a využiteľnosť mikrosatelitných markerov pri ich diferenciácii sme použili index diverzity (DI) (Weir, 1990), pravdepodobnosť identity (PI) (Paetkau et al., 1995) a polymorfický informačný obsah (PIC) (Weber, 1990).

V DNA profiloch sme hodnotili polymorfické reprodukovateľné markery ako prítomné (1) alebo neprítomné (0). Vytvorili sme tabuľku a získané údaje sme použili na výpočet Jaccardovho koeficientu genetickej podobnosti pre všetky párové kombinácie, ktoré sme robili modulom SPSS Professional Statistics 16,0, štatistického balíka programov SPSS for Windows (SPSS inc., Chicago, Ill., USA). Takto získanú maticu genetickej podobnosti sme použili na konštrukciu dendrogramu.

Výsledný dendrogram sme skonštruovali hierarchickou klastrovou analýzou metódou UPGMA (Unweighted Pair Group Method using arithmetic Averages). Geneticnú diverzitu v grafických vyjadreniach dendrogramov sme vyjadrovali v relatívnych hodnotách v rozmedzí od 0-25.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Na identifikáciu 30 genotypov jačmeňa siateho sme použili 11 mikrosatelitných markerov, ktoré publikovali Becker a Heun (1995) a Macaulay et al. (2001). Osem mikrosatelitov bolo dokonalých, jeden nedokonalý a dva boli zložené. Celkovo sme na 11 lokusoch detegovali 58 alel na chromozómoch 1H, 3H, 4H, 5H, 6H, 7H. Počet alel na lokus sa pohyboval od 2 do 11 s priemerným počtom 5,3 alely na lokus. Najvyšší počet alel (11) sme pozorovali v lokuse HVRCABG a najnižší počet alel (2) bol detegovaný v lokuse HVCMA. Priemerný počet

alel na lokus (5,3) získaný našimi analýzami je porovnateľný s priemernými alel na lokus, ktoré publikovali viacerí autori (Li et al., 2003, Kraic et al., 2005, Feng et al., 2006, Pandey et al., 2006, Malysheva-Otto et al., 2007, Backes et al., 2009). Úroveň polymorfizmu medzi analyzovanými genotypmi jačmeňa sme charakterizovali pomocou indexu diverzity (DI), polymorfického informačného obsahu (PIC) a pravdepodobnosti identity (PI). Všetky hodnoty (Tabuľka 4) boli vypočítané na základe frekvencie alel každého markera.

**Tabuľka 4** Prehľad počtu získaných mikrosatelitných alel, vypočítané hodnoty DI, PIC, PI

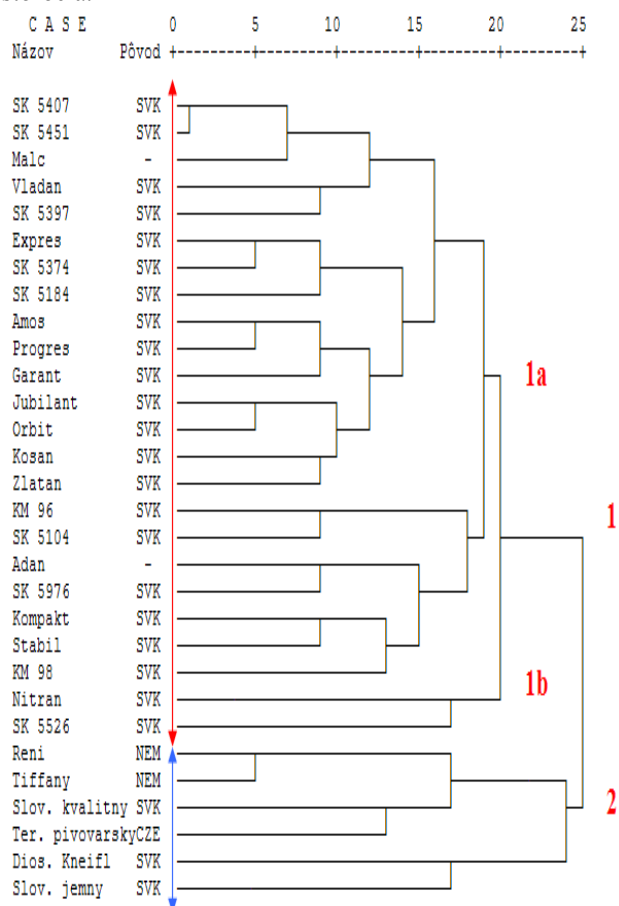
SSR marker	Počet alel	Lokus na chromozóme	DI	PIC	PI
<b>Bmac0040</b>	10	6H	0,849	0,846	0,010
<b>Bmac0067</b>	6	3H	0,691	0,652	0,123
<b>Bmag0013</b>	4	3H	0,340	0,316	0,458
<b>Bmag0135</b>	3	7H	0,527	0,419	0,331
<b>Bmag0173</b>	4	6H	0,593	0,546	0,203
<b>Bmag0211</b>	4	1H	0,624	0,567	0,188
<b>Bmag0222</b>	3	5H	0,371	0,370	0,350
<b>Bmag0225</b>	5	3H	0,727	0,716	0,051
<b>HVCMA</b>	2	7H	0,124	0,116	0,744
<b>HVGNIRE</b>	6	3H	0,711	0,694	0,074
<b>HVRCAG</b>	11	4H	0,866	0,866	0,010
<b>Priemer</b>	<b>5,3</b>		<b>0,584</b>	<b>0,555</b>	<b>0,231</b>

Na základe veľkostí mikrosatelitných alel pre každý z 11 lokusov získaných v analýzach bolo možné využitím UPGMA algoritmu vytvoriť dendrogram (Obrázok 1), ktorý naznačuje genetické vzťahy medzi genotypmi jačmeňa siateho. Genotypy bolo možné rozdeliť do dvoch hlavných klastrov, pričom prvý klastor zahŕňa 24 genotypov jačmeňa a druhý klastor obsahuje 6 genotypov jačmeňa.

V prvom klastri sa zoskupilo 24 genotypov jačmeňa siateho a tieto genotypy sú rozdelené do dvoch skupín. Skupinu 1a tvorí 22 genotypov, z ktorých 11 genotypov (50%) bolo vyšľachtených v Slovenskej republike a ďalších 11 genotypov jačmeňa (50%) sú novošľachtence. V 1b skupine sú vyčlenené dva slovenské genotypy Nitran a novošľachtenc SK 5526. Všetky analyzované novošľachtence sú obsiahnuté v prvom klastri.

V druhom klastri je obsiahnutých 6 genotypov jačmeňa, ktoré sú zoskupené do troch dvojíc. Prvú dvojicu tvoria nemecké genotypy Reni a Tiffany, druhú dvojicu tvoria slovenský genotyp Slovenský kvalitný a český genotyp Terrasol pivovarský. Tretiu dvojicu tvoria slovenské genotypy Diosecky Kneifl a Slovenský jemný. Druhá a tretia dvojica sú

genotypy staré, teda vyšľachtené v 1. polovici 20. storočia.



**Obrázok 1 Dendrogram 30 genotypov jačmeňa siateho s využitím 11 SSR markerov.**

Použitím 11 mikrosatelitných markerov sa nám podarilo odlíšiť 28 z 30 genotypov jačmeňa siateho. Nepodarilo sa nám od seba odlíšiť novošľachtence SK 5407 a SK 5451, pretože majú pravdepodobne rovnaký genetický základ a rovnaké miesto vyšľachtenia.

## ZÁVER

V 11 jačmenných mikrosatelitných lokusoch sme detegovali 58 alel s rôznou veľkosťou. Najvyšší počet alel (11) sme pozorovali v lokuse *HVRCABG* a najnižší počet alel (2) sme detegovali v lokuse *HVCMA* s priemernou hodnotou 5,3 alely na lokus. Vysoký stupeň polymorfizmu v sledovaných 11 lokusoch jačmeňa potvrdzujú aj vysoké hodnoty indexu diverzity (DI) a polymorfického informačného obsahu (PIC). Z 11 použitých mikrosatelitných markerov jačmeňa, u 72 % lokusov sme detegovali hodnoty DI väčšie ako 0,5 a u 63 % lokusov hodnoty PIC väčšie ako 0,5, čo poukazuje na vysokú diferenciačnú schopnosť použitých mikrosatelitných markerov a vysokú úroveň polymorfizmu genotypov jačmeňa siateho. Využitím UPGMA algoritmu bol zostrojený dendrogram na základe veľkostí mikrosatelitných

alel pre každý z 11 lokusov. Použitím 11 mikrosatelitných markerov sa nám podarilo odlíšiť 28 z 30 genotypov jačmeňa siateho, pričom sa nepodarilo od seba odlíšiť novošľachtence SK 5407 a SK 5451. Na základe získaných výsledkov z STMS analýz, je možné konštatovať, že aplikované mikrosatelitné markery vykazujú vysoký polymorfizmus medzi sledovanými genotypmi jačmeňa siateho. Uvedená technika je vhodná na identifikáciu a diferenciaciu odrôd jačmeňa pričom na základe mikrosatelitov je možné vytvoriť fylogenetický strom a genotypy rozdeliť do skupín.

DNA markery majú veľký význam pri identifikácii a diferenciacii genotypov obilnín využiteľné pre následné MAS šľachtenie pre tvorbu homozygotného materiálu s požadovanými génmi, pri kontrole čistoty, pravosti a stability genotypu v záujme zachovania znakov, ktoré nesie. Do popredia sa postupne dostávajú DNA markery nachádzajúce sa v kódujúcich sekvenciách DNA (EST markery), ktoré odrážajú genetickú diverzitu a zároveň prejav exprimujúcich sa génov.

## LITERATÚRA

BACKES, G., ORABI, J., WOLDAY, A., YAHYAOU, A., JAHOR, A. 2009. High genetic diversity revealed in barley (*Hordeum vulgare*) collected from small-scale farmer's fields in Eritrea. In : *Genet Resour Crop Evol*, vol. 56, 2009, p. 85-97

BECKER, J., HEUN, M. 1995. Barley microsatellites: allele variation and mapping. In *Plant molecular biology*, vol. 27, 1995, p. 835-845

DELLAPORTA, S. L., WOOD, J., HICKS, J. B. 1983. Plant DNA minipreparation: version II. In *Plant Mol Biol Rep*, vol. 1, 1983, p. 19-21

FENG, Z.Y., ZHANG, L.L., ZHANG, Y.Z., LING, H.Q. 2006. Genetic diversity and geographical differentiation of cultivated six-rowed naked barley landraces from the Qinghai-Tibet plateau of China detected by SSR analysis. In *Genetics and Molecular Biology*, vol. 29, 2006, p. 563-570

GOLDSTEIN, D. B., POLLOCK, D. D. 1997. Launching microsatellites: a review of mutation processes and methods of phylogenetic inference. In *J. Hered.*, vol. 88, 1997, p. 335-342

GRANER, A., SIEDLER, H., JAHOR, A. et al. 1990. Assessment of the degree and the type of restriction fragment length polymorphism in barley (*Hordeum vulgare*). In *Theoretic and Applied Genetics*, 80, 1990, s.826-832

GUPTA, P.K., VARSHNEY, R.K. 2000. The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat. In *Euphytica*, vol. 113, 2000, p. 163-185

- GUPTA, P.K., BALYAN, H.S., SHARMA, S. et al. 1996. Microsatellites in plants: a new class of molecular markers. In *Curr Sci.*, vol. 70, 1996, p. 45-54
- CHAMBERS, G.K., MACAVOY, E.S. 2000. Microsatellites: consensus and controversy. In *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, vol. 126, 2000, p. 455-476
- KRAIC, J. 2005. Relevancy of genomic and gene-based variation in distinguishing of elite barleys. In *Biologia*, vol. 60, 2005, no. 6, p. 675-680
- LI, J.Z., SJAKSTE, T.G., RODER, M.S., GANAL, M.W. 2003. Development and genetic mapping of 127 new microsatellite markers in barley. In *Theoretic and Applied Genetics*, vol. 107, 2003, p. 1021-1027
- MACAULAY, M., RAMSAY, L., POWELL, W., WAUGH, R. 2001. A representative, highly informative genotyping set of barley SSRs. In *Theoretic and Applied Genetics*, vol. 102, 2001, no. 4, p. 801-809
- MALYSHEVA-OTTO, L., GANAL, M.W., LAW, J.R., REEVES, J.C., RÖDER, M.S. 2007. Temporal trends of genetic diversity in European barley cultivars (*Hordeum vulgare* L.). In *Mol Breeding*, vol. 20, 2007, p. 309-322
- MORGANTE, M., OLIVIERI, A. M. 1993. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. In *Plant. J.*, vol. 3, 1993, p. 175-182
- PAETKAU, D., CALVERT, W., STIRLING, I., STROBECK, C. 1995. Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. In *Mol. Ecol.*, vol. 4, 1995, p. 347-354
- PANDEY, M., WAGNER, C., FRIEDT, W., ORDON, F. 2006. Genetic relatedness and population differentiation of Himalayan hulless barley (*Hordeum vulgare* L.) landraces inferred with SSRs. In *Theoretic and Applied Genetics*, vol. 113, 2006, no. 4, p. 715-729
- SCHLÖTTERER, C., RITTER, R., HARR, B. et al. 1998. High mutation rates of a long microsatellite allele in *Drosophila melanogaster* provides evidence for allele-specific mutation rates. In *Mol. Biol. Evol.*, vol. 15, 1998, p. 1269-1274
- TAUTZ, D. 1993. Notes of the definition and nomenclature of tandemly repetitive DNA sequences. In Pena, S.D.J.-Chakraborty, R.-Epplen, J.Z.-Jeffreys, A.J.(eds.) *DNA fingerprinting : State of science*. Birkhäuser, Basel, 1993. p. 21-28
- TAUTZ, D., RENZ, M. 1984. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. In *Nucl Acid Res.*, vol. 12, 1984, p. 4127-4138
- WEBER, J. L. 1990. Informativeness of human (dC-dA)<sub>n</sub> x (dG-dT)<sub>n</sub> polymorphism. In *Genomics*, vol. 7, 1990, p. 524-530
- WEIR, B.S. 1990. Genetic data analysis. Sinauer Associated, Sunderland, Mass.

### Kontaktná adresa:

Martin Vivodík, Department of Biochemistry and Biotechnology, Faculty of Biotechnology and Food Science, Slovak University of Agriculture, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra Slovakia, E-mail: [vivodik@afnet.uniag.sk](mailto:vivodik@afnet.uniag.sk)

Zdenka Gálová, Department of Biochemistry and Biotechnology, Faculty of Biotechnology and Food Science, Slovak University of Agriculture, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra Slovakia, E-mail: [galova@afnet.uniag.sk](mailto:galova@afnet.uniag.sk)

Želmíra Balážová, Department of Biochemistry and Biotechnology, Faculty of Biotechnology and Food Science, Slovak University of Agriculture, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra Slovakia, E-mail: [balazova@afnet.uniag.sk](mailto:balazova@afnet.uniag.sk)