

ÚSTAV ZEMĚDĚLSKÝCH A POTRAVINÁŘSKÝCH
INFORMACÍ

GENETIKA A ŠLECHTĚNÍ

GENETICS AND PLANT BREEDING

4

ROČNÍK 33 (LXX)
PRAHA 1997
CS ISSN 0862-8629

ČESKÁ AKADEMIE ZEMĚDĚLSKÝCH VĚD

Abstracts from the journal are comprised in the databases: Agrindex, Biol. Abstr., Bibl. Agri., Chem. Abstr., Field Crop Abstr., Helminthol. Abstr., Herb. Abstr., Landwirt. Zentralbl., Plant Breed. Abstr.

Editorial board – Redakční rada

Chairman – Předseda

Ing. Václav Šíp, CSc.

Members of the Editorial Board – Členové redakční rady

Ing. Bohumír Cagaš, CSc., prof. Ing. Jiří Černý, DrSc., Ing. Antonín Fojtík, CSc.,
Ing. Alena Hanišová, prof. Ing. Oldřich Chloupek, DrSc., Ing. Josef Konrád, CSc.,
prof. Ing. Antonín Kováčik, DrSc., Ing. Josef Pešek, DrSc., prof. dr. Ing. Jan Rod, DrSc.,
RNDr. Erich Schwarzbach, dr. agr. habil., Ing. Jaroslav Špunar, CSc.,
Ing. Jaroslav Tupý, DrSc.

Foreign Members of the Editorial Board – Zahraniční členové redakční rady

Dr. I. Bos (The Netherlands), Prof. Dr. V. A. Dragavcev (Russia),
PD. Dr. A. Jahoor (Germany), Prof. Dr. A. Mesterházy (Hungary),
O. Univ. Prof. Dipl.-Ing. Dr. P. Ruckebauer (Austria),
Prof. Dr. Z. Staszewski (Poland), RNDr. D. Šubová (Slovak Republic),
Ing. M. Užík, DrSc. (Slovak Republic)

Editors – Redaktorky

RNDr. Marcela Braunová, Ing. Hedvika Malíková

Aim and scope: The journal publishes original scientific papers, short communications, and reviews, that means papers based on the study of technical literature and reviewing knowledge in the given field. Published papers are in Czech, Slovak or English.

Subscription information: Subscription orders can be entered only by calendar year and should be sent to the contact address.

Subscription price for 1997 is 204 Kč, 51 USD (Europe) and 53 USD (overseas)

Periodicity: The journal is published four times a year.

Contact address: Slezská 7, 120 56 Praha, Czech Republic

tel.: 00 420 2 251 098; fax: 00 420 2 242 539 38; e-mail: fof@uzpi.cz

WHEAT CULTIVAR TJELVAR AS A SOURCE OF BUNT (*Tilletia* spp.) RESISTANCE*

Veronika BLAŽKOVÁ, Pavel BARTOŠ, Miroslav ŠKORPÍK, Renata HANUŠOVÁ

Research Institute of Crop Production – Division of Genetics and Plant Breeding,
Prague, Czech Republic

Abstract: The Swedish winter wheat cultivar Tjelvar, resistant to common bunt [*Tilletia laevis* Kühn and *T. tritici* (Bjerk.) Wint.] and dwarf bunt (*T. controversa* Kühn), was crossed with the Czech cvs. Hana and Regina; F₁, F₂ and F₃ progenies were developed from randomly selected plants. Twenty six F₃ lines of the cross Tjelvar x Hana and 50 F₃ lines of the cross Tjelvar x Regina were inoculated with a mixture of teliospores of *Tilletia tritici* (race T-1) and *T. laevis* (race L-5). Bunt reaction was evaluated in the field as percentage of infected ears of the total number of ears. Differences in the disease level of F₃ lines were not defined enough to enable postulation of the number of resistance genes. Selected progenies of the crosses were tested also in F₄ and F₅. Homozygous resistant lines were selected that are earlier than cv. Tjelvar, with shorter straw and without translocation 1BL.1RS that adversely affects baking quality. This material could be used to develop common bunt resistant cultivars, which is consistent with the aim for environment-friendly agriculture.

common bunt; dwarf bunt; resistance breeding; winter wheat; cv. Tjelvar

The best approach to manage dwarf bunt of wheat is to use resistant cultivars. Because of the likely decrease in use of chemical seed treatments, resistance to common bunt may also gain in importance. For these reasons we studied bunt resistance of wheat cultivars registered in the Czech Republic (Blažková, Bartoš, 1995), as well as of foreign cultivars described as bunt resistant (Blažková, Bartoš, 1997). Of the tested cultivars the Swedish cv. Tjelvar showed very good bunt resistance and relatively good agronomic traits. In Sweden it has been described also as resistant to dwarf bunt. Therefore, we used it as donor of bunt resistance in crosses with two of our cultivars. The objective was to find out how the resistance is transferred

* This work was supported by the Grant Agency of the Czech Republic, grant No. 513/94/1414.

into the progenies, and to develop lines with the bunt resistance of Tjelvar and better agronomic characters.

MATERIAL AND METHODS

The winter wheat cultivar Tjelvar was a registered and recommended cultivar in Sweden (1984–1995). It possesses the translocation 1BL.1RS, i.e. genes for resistance to rusts and powdery mildew that are now mostly ineffective in central Europe. It is also resistant to *Stagonospora (Septoria) nodorum* in Sweden. It is late and has a lower baking quality. The winter wheat cv. Hana was registered in the Czech Republic in 1985 and remains one of the most widespread cultivars because of very good baking quality. The cv. Regina was registered in 1982 as a high yielding and adaptable cultivar and is still widely grown.

Cv. Tjelvar was crossed as the female parent with cvs. Hana and Regina, and F_1 , F_2 and F_3 progenies were developed from randomly selected plants. In 1995, twenty-six F_3 lines of the cross Tjelvar x Hana, and one year later 50 F_3 lines of the cross Tjelvar x Regina were inoculated with bunt by shaking 10 g of seed with 10 mg of teliospores in a flask for 1 min. A mixture 1 : 1 of *T. tritici* (race T-1) and *T. laevis* (race L-5) was used as inoculum. Inoculated seed was sown in October in the field at Ruzyně in two 1 m rows 0,2 m apart. Infection level was expressed as percentage of bunted ears of the total number of ears. Inoculated parental cultivars were included as controls.

Of the cross Tjelvar x Hana, five plants from each of the most resistant F_3 lines were selected and tested again for bunt reaction as F_4 generation in the following year. Plants of each of the three most resistant lines were harvested as bulks and tested in F_5 . Of the cross Tjelvar x Regina, five plants from each of 13 resistant F_3 lines were tested in F_4 .

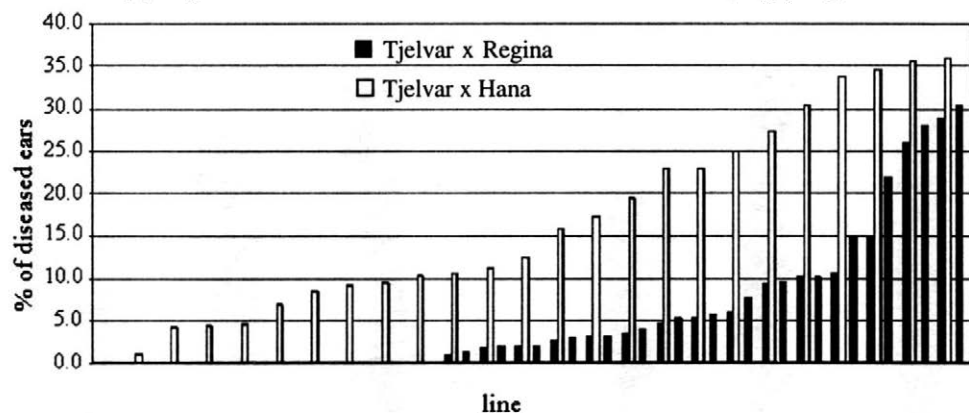
To make a preliminary evaluation of some agronomic traits we planted 53 single plant progenies selected from resistant F_4 lines of the cross Tjelvar x Hana, and 22 single plant progenies from resistant F_3 lines of the cross Tjelvar x Regina. Agronomic characteristics had been considered at the selection of these plants. Seed for this field trial was not inoculated with bunt. The trial was sown at Ruzyně in October 1996 by Seedmatic on single field plots of 2 m². Overwintering, heading time, height of plants and yield were

determined. Fifteen seedlings of the same progenies were tested in the greenhouse with race 61 isolate 1887 of wheat leaf rust that is avirulent to resistance gene *Lr26* located on T1BL.1RS. From the resistant or susceptible reaction of each line we could determine which of them possess the translocation 1BL.1RS.

RESULTS

The infection levels of 25 F_3 lines of the cross Tjelvar x Hana and 50 F_3 lines of the cross Tjelvar x Regina are summarized in Fig. 1. One line of the cross Tjelvar x Hana with an infection of 76,1% is not included, because the high infection does not fit in with the range of the other lines for reasons unknown to us. Both populations showed a similar trend in the infection level. The average infection level was lower in 1996 when the progeny of the cross Tjelvar x Regina was tested than in 1995 when that of Tjelvar x Hana was examined. This can explain the larger number of lines without infection in the progeny of the cross Tjelvar x Regina in 1996.

Percentage of bunt infection in the progenies of selected resistant lines from the cross Tjelvar x Hana is given in Table I. Lines 21, 12 and 11 with low infection levels in F_3 (0.0%, 1.0% and 4.6%, respectively) yielded the most resistant progenies in F_4 . Bunt infection was nil or very low also in bulked F_5 progenies from these lines. On the other hand, F_4 progenies from



I. Percentage of bunt in randomly selected F_3 lines from the crosses Tjelvar x Hana (25 lines) and Tjelvar x Regina (50 lines) – one line of the first cross and twenty lines of the second cross were bunt free

I. Percentage of bunt infected ears in F₃–F₅ progenies of the cross Tjelvar x Hana

Lines	F ₃ (1995)	F ₄ plant progenies (1996)					F ₅ bulk of F ₄ plant progenies (1997)				
		/1	/2	/3	/4	/5	/1	/2	/3	/4	/5
21	0.0	3.1	0.0	1.7	0.7	0.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
12	1.0	0.0	0.0	1.3	0.0	0.0	0.7	2.2	0.0	0.0	0.0
13	4.3	4.3	1.5	15.5	5.8	8.0	–	–	–	–	–
7	4.3	9.7	24.7	7.5	43.8	1.1	–	–	–	–	–
11	4.6	0.5	9.4	1.9	2.6	3.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Tjelvar	0.8	0.0					0.0				
Hana	55.2	not tested					23.5				

the lines 13 and 7 with also a relatively low infection level (4.3% in both) obviously segregated for bunt reaction. This is particularly evident in line 7 and indicates heterozygosity of this F₃ line for bunt reaction. Segregation for bunt resistance appeared also among the F₄ progeny of the resistant F₃ lines of the cross Tjelvar x Regina (Table IV), most clearly in the progeny of lines 26, 34 and 35.

The 1997 field trial for agronomic traits of the resistant lines (Tables II and III) gave mostly intermediate values or values closer to cv. Tjelvar than to the other parent. Of the three parents, Tjelvar had the lowest wintersurvival and some of the lines had even lower survival. However, this may have been



2. Ear type: Hana (left), Regina (right)

II. Percentage of bunt infected ears in F₃ and F₄ progenies of the cross Tjelvar x Regina

Line	F ₃ (1996)	F ₄ plant progenies (1991)				
		/1	/2	/3	/4	/5
3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	—
5	0.0	1.9	3.8	0.0	3.5	0.0
7	0.0	0.9	1.4	4.5	1.6	3.5
9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
11	1.3	0.0	0.0	7.1	0.0	0.0
15	0.9	3.1	0.0	0.0	0.0	0.0
20	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
22	0.0	1.4	1.0	11.8	0.0	4.1
26	1.9	25.6	4.9	5.8	16.7	9.9
29	1.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
34	0.0	3.2	0.0	0.0	25.0	0.0
35	1.9	0.0	0.0	3.2	38.9	0.0
38	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Tjelvar	0.0	0.0				
Regina	35.2	28.3				

influenced by different quality of the seed. While the seed of the parental cultivars was of good quality, that of the single plants lines was not sifted because of the small amount of harvested kernels. The selection for earliness was only partially successful. Tjelvar was the latest parent; most of the lines were as late as Tjelvar, some were later, and only a few lines were earlier up

to three days. Even these earliest lines, measured by heading time, were three days later than cv. Hana, and two days later than cv. Regina. To select for lower height seems to be easier than the selection for earliness. Some lines had the same height as cvs. Hana or Regina, or had even shorter straw.



3. Ear type: Tjelvar

III. Field trial characteristics of selected F₅ progenies of the cross Tjelvar x Hana (1997)

Line (designa- tion in F ₄)	Number of F ₅ plant progenies	Bunt in F ₄ [%]	Ovewin- tering 1-9 (9 - best)	Heading date	Height [cm]	Presence of T1BL/1RS	Average yield [g/m ²]
11/1	4	0.5	6-7	11.-12. 6.	80-85	+	926.0
11/2	3	9.4	6-7	11.-12. 6.	75-95	+	831.3
11/3	3	1.9	5-6	11.-12. 6.	75-115	+	842.0
11/4	1	2.6	8	10. 6.	80	+	(1088.0)
11/5	4	3.4	5-8	10.-12. 6.	75-85	+	865.0
21/1	4	3.1	6-7	8.-12. 6.	100-105	-	950.7
21/3	4	1.7	7-8	8.-10. 6.	95-100	-	933.2
21/4	6	0.7	6-8	10.-11. 6.	105-110	-	885.0
21/5	4	0.6	6-7	10. 6.	95-105	-	937.2
21/2	5	0.0	5-7	9.-11. 6.	85-100	-	840.2
12/1	1	0.0	5	13. 6.	70-105	+	(694.0)
12/2	5	0.0	6-7	10. 6.	70-100	+ -	895.4
12/3	2	1.3	6-7	9. 6.	70-75	+ -	897.0
12/4	4	0.0	6-8	9.-11. 6.	75-85	- (+)	858.2
12/5	3	0.0	7	11. 6.	85-90	+ -	840.3
Hana	-	23.5	9	5. 6.	80.0	-	(921.0)
Tjelvar	-	0.0	8	11. 6.	100.0	+	(871.0)
* greenhouse tests							Ø 886.8

Yield results from the single 2m² plots offer only an approximate assessment of the yield potential. Of the parents, cv. Regina yielded more than cv. Hana, while Tjelvar had the lowest yield. On average, the progenies of the cross Tjelvar x Hana yielded less than those of the cross Tjelvar x Regina. The average yield of the progenies of the cross Tjelvar x Hana was lower than the yield of Hana and only slightly higher than of Tjelvar; average yields were higher than of Hana in five lines, and higher than of Tjelvar in eight of 15 lines. The average yield of the progenies of the cross Tjelvar x Regina was lower than of Regina but they, with the exception of one line, yielded more than Tjelvar. Line progenies possessing T1BL.1RS gave a slightly higher average yield than line progenies without that translocation.

4. Ear type: Tjelvar x Hana
(line 21, 1997)



Another undesirable trait of cv. Tjelvar is a low baking quality due to the translocation 1BL/1RS. The tests for the presence of T1BL/1RS in the lines indicate that the bunt resistance is not linked with the translocation. Of the cross Tjelvar x Hana, line 11 was homozygous for the presence of

IV. Field trial characteristics of selected F₄ progenies of the cross Tjelvar x Regina (1997)

Line (designation in F ₃)	Number of F ₄ plant progenies	Bunt in F ₃ (%)	Ovewinte- ring 1–9 (9 – best)	Heading date	Height [cm]	Presence of T1BL/1RS*	Average yield [g/m ²]
5	3	0.0	4–6	12.–13. 6	85–100	–	997.3
7	1	0.0	7	11. 6.	80–105	+	(758.0)
9	2	0.0	6–7	10.–11. 6	95–100	+–	884.0
11	1	1.3	7	10. 6	95	–	(980.0)
15	1	0.9	7	10. 6.	90	–	(924.0)
22	4	0.0	6	9.–11. 6.	80–90	–	918.0
26	1	1.9	6	10. 6	100	+–	(965.0)
29	1	1.7	7	10. 6.	95	–	(928.0)
34	2	0.0	6	11.–12. 6.	80–105	+–	955.0
35	3	1.9	6–7	10.–11. 6.	85–95	+–	921.3
38	3	0.0	6–7	10.–12. 6.	75–110	+–	925.7
Regina	–	35.2	9	7. 6.	80	–	(1025.0)
Tjelvar	–	0.0	8.0	11. 6	100.0	+	(871.0)
* greenhouse tests							Ø 927.1

5. Ear type: Tjelvar x Regina (line 26, 1997)



T1BL/1RS, line 21 was homozygous for its absence, and line 12 segregated for this character. It is very likely that lines with a better quality than of cv. Tjelvar can be derived from the progenies of line 21, namely 12/4, 12/2, 12/3 and 12/5. In the cross Tjelvar x Regina, progenies of lines 5, 11, 15, 22 and 29 lacked T1BL/1RS, only line 7 possessed it. The remaining lines segregated for the presence of T1BL/1RS.

DISCUSSION

Wheat breeding for bunt resistance has been carried out in several European countries, e.g. in Sweden (Jönsson, Svensson, 1990), Russia (Babayants, Dubinina, 1990), Near East (Mamluk, Nachit, 1994), as well as in the USA (Hoffmann, 1982) and Canada (Gaudet et al., 1993). In the USA, cultivars resistant to *Tilletia* spp. have successfully controlled dwarf and common bunt in some areas. In southern Idaho and northern Utah dwarf bunt has been reduced to trace levels that are insignificant to production and quality (Goates, 1996). The principle source of dwarf bunt and common bunt resistance currently in use in the USA is the line PI 178383. It originated in Turkey and has resistance genes *Bt-8*, *Bt-9*, *Bt-10*, plus an unidentified factor. Cultivar Tjelvar also has PI 178383 in the pedigree so that all or at least some of the above mentioned genes can be expected in Tjelvar. Unfortunately, differences in the disease level of the F_3 lines we have analysed cannot be delimited sharply enough to enable postulation of the number of resistance genes involved. Since genes *Bt-8*, *Bt-9* and *Bt-10*

have been described as dominant (cit. after Wilcoxson, Saari, 1996), most lines should be resistant, presuming the same high effect of all three *Bt* genes in the analysed crosses. High effect (100%) of *Bt-8*, *Bt-9* and *Bt-10* in the lines derived from the cross of Elgin with PI 178383 was proved in our previous trials (Blažková, Bartoš, 1997). Hence presence of all three resistance genes in the cv. Tjelvar does not seem probable because of a lower number of highly resistant lines than expected for three dominant genes. However, effects of different genetic backgrounds on the expression of *Bt* genes cannot be excluded.

Dwarf bunt resistance of the lines resistant to common bunt developed in our trials has not been tested till now. Nevertheless, dwarf bunt resistance of cv. Tjelvar was demonstrated in a small field experiment on plots highly infested with dwarf bunt carried out by Ing. Z. Trčálek (personal communication). In his trial in 1995 the average number of diseased plants on 1 m² in cv. Regina and Tjelvar was 5 and 0.25, respectively, at Ratiboř, and 4 and 0.1 at Horní Lideč. In 1996 the number of diseased plants on 4 m² in cv. Regina and Tjelvar was 8 and 1, respectively, at Janová.

Results summarized in this paper show the possibility to breed for bunt resistance using cv. Tjelvar as a source of resistance. Lines earlier and shorter than cv. Tjelvar and possessing a better baking quality (lacking T1BL.1RS) could be used to develop a commercial bunt resistant winter wheat cultivar for environment-friendly agriculture.

Acknowledgements

We thank Ing. Z. Trčálek for his interest in our work and for testing the cultivar Tjelvar for dwarf bunt resistance. We are indebted to Dr. J. Nielsen, Canada, for critical reading of our manuscript.

References

- BABAYANTS, L. T., DUBININA, L. A. (1990): A novel donor of wheat resistance to bunt (*Tilletia caries* (DC.) Tul., *Tilletia laevis* Kühn) and its genetical background. Genetika, 26: 2186–2190 (in Russian).
- BLAŽKOVÁ, V., BARTOŠ, P. (1995): Odolnost českých a slovenských odrůd pšenice ozimé k sněti mazlavé a sněti hladké. Genet. a Šlecht., 31: 267–276.

BLAŽKOVÁ, V., BARTOŠ, P.: Reaction of winter wheat cultivars registered in the Czech Republic to common bunt (*Tilletia tritici* (Bjerk.) Wint. and *T. laevis* Kühn) and sources of resistance. Cereal Res. Commun. (in print).

GAUDET, D. A., PUCHALSKI, B. L., KOZUB, G. C. (1995): Reaction of CIMMYT and Canadian red spring wheat cultivars to common bunt (*Tilletia tritici* and *T. laevis*). Cereal Res. Commun., 23: 141-146.

GOATES, B. J. (1996): Common bunt and dwarf bunt. In: WILCOXSON, R. D., SAARI, E. E. (Eds.): Bunt and Smut Diseases of Wheat: Concepts and Methods of Disease Management. Mexico, D.F., CIMMYT.

HOFFMANN, J. A. (1982): Bunt of wheat. Plant Dis., 66: 979-986.

JÖNSSON, J. Ö., SVENSSON, G. (1990): Tjelvar-ny höstvetesort med resistens mot dvärgstinksot. Weibulls Arsbok: 14-16 (cit. JOHNSON, L.: Common bunt in wheat - factors influencing the disease. Växskyddrapporter Avhandlingar. Uppsala, Sweden, 21, 1991).

MAMLUK, O. F., NACHIT, M. M. (1994): Sources of resistance to common bunt (*Tilletia foetida* and *T. caries*) in durum wheat. J. Phytopath., 142: 122-130.

Received September 18, 1997

Odrůda pšenice Tjelvar jako zdroj rezistence k snětím *Tilletia* spp.

Pro křížení s odrůdami Hana a Regina jsme použili švédskou odrůdu Tjelvar, která je odolná k sněti mazlavé pšeničné, sněti mazlavé hladké i k sněti zakrslé. Z populace F₂ generace jsme náhodným výběrem rostlin získali 26 F₃ linií z křížení Tjelvar x Hana a 53 linií z křížení Tjelvar x Regina. Osivo jsme inokulovali směsí teliospor *Tilletia tritici* (rasa T-1) a *T. laevis* (rasa L-5) a po vymetání jsme zjišťovali procento klasů napadených snětí. Rozdíly v napadení F₃ linií nebyly dostatečně výrazně rozčleněné, aby bylo možné činit závěry o genetickém založení rezistence odrůdy Tjelvar. Vybraná odolná potomstva křížení jsme testovali i v F₄ a částečně také F₅ na reakci k sněti. Vybrali jsme odolné homozygotní linie, které jsou ranější než odrůda Tjelvar, mají kratší stéblo a na rozdíl od odrůdy Tjelvar neobsahují translokaci 1BL.1RS, která podmiňuje nižší pekařskou kvalitu. Získané linie by mohly být využity pro vyšlechtění odrůdy rezistentní k sněti mazlavé pšeničné a sněti mazlavé hladké.

sněť mazlavá; sněť zakrslá; odolnost; šlechtění; pšenice ozimá; odrůda Tjelvar

Contact address:

Veronika Blažková, Výzkumný ústav rostlinné výroby, 161 06 Praha 6-Ruzyně, Česká republika

Phone: + 00 420 2 360 851, fax: + 00 420 2 365 229, e-mail: blazkovav@hb.vurv.cz

**EVALUATION OF WHEAT (*Triticum aestivum* L.) CULTIVARS
WITH STANDARD *Gli/Glu* ALLELES USING PCR AND LEAF TISSUE
AS A DIRECT TEMPLATE***

Renata MARTYNKOVÁ, Jaroslava OVESNÁ, Ladislav KUČERA

*Research Institute of Crop Production – Division of Genetics and Plant Breeding,
Prague, Czech Republic*

Abstract: Preliminary studies were performed to prove, whether sequence-based primers could be used for gliadin/glutenin loci identification instead of polyacrylamide or starch gel electrophoresis, which are the standard methods for the prolamins analysis. The possibility of evaluation of DNA-based markers using direct template was studied showing that a segment of tissue is usable for PCR reaction also in wheat tissue. Different sets of primers specific for gliadin/ LMW glutenin loci were used to verify the reliability of the reaction. Segment of leaf tissue is suitable, unexpensive template, whereas coleoptile did not work for this purposes. Two sets of primers derived from γ -gliadin pseudogene were used to analyze a set of wheat cultivars with standard gliadin alleles (*Gli-B1* locus). Using $F_1 \times R$ and $F_2 \times R$ primer combinations, 13 different bands were recorded, which made differentiation of 12 groups possible. Such reaction could be therefore a simple and alternative method for their verification.

Triticum aestivum L.; PCR; glutenins; gliadins; direct template

The patterns of gliadins and glutenins (the main wheat storage proteins) in gel electrophoresis are used as markers for dough quality in breeding programmes. Many studies have also been performed on DNA level (Campenhout et al., 1995; Bartels et al., 1986). The results, obtained on limited spectra of cultivars allowed to design primers for gliadin and glutenin loci identification (Devos et al., 1995; Campenhout et al., 1995) using PCR.

The polymerase chain reaction (PCR) is an *in vitro* method for amplification of selected nucleic acids sequences. The method consists of repetitive cycles of DNA denaturation, primer annealing, and extension by DNA

* This work was supported by the grant 521/97/0222, Grant Agency of the Czech Republic.

polymerase. The original template DNA can be used in a pure form and as a discrete molecule or it can be a very small part of a complex mixture of biological substances. The amplification of a specific DNA fragments from complex genomic samples is one of the most common applications of this technique.

The aim of this study was to verify, whether:

- (1) published primers (Devos et al., 1995; Campenhout et al., 1995) allow to differ among known alleles of gliadin *Gli-B1* locus and LMW glutenin *Glu-A3*- and *Glu-D3*-loci,
- (2) segments of wheat leaf tissue could be a reliable template for PCR reaction.

MATERIALS AND METHODS

Plant material

Wheat cultivars – Chinese Spring, nulli-tetrasomic lines CS N1A T1B, and CS N1D T1B, Bezostaya 1, Siette Cerros 66, Falchetto, Maris Freeman, Galahad, Insignia, Levent, Kremena, Ljutescens 62, Akmolinka 1, Dukát, Fiocco, Krasnodarka, Gabo, Chinook, Spada, Rezistente, Skala, Saratovskaya 36, Forlani, Rannaya 73, Marquis, Sadovo 1 and Mironovskaya 808

The plants were cultivated in the greenhouse, and second leaves from about 10 days old plants were harvested.

Polymerase chain reaction

Frozen (liquid nitrogen, -80°C) or fresh leaf tissue were used as a template for PCR.

Template preparation: about 10 mm^2 ($3 \times 3.5\text{ mm}$) tissue was excised by razor blade and denaturated in $40\text{ }\mu\text{l}$ 0.25M NaOH cca in $40\text{ }\mu\text{l}$ 0.25M NaOH for a 25 s at 100°C , quickly iced, neutralized with $40\text{ }\mu\text{l}$ 0.25M HCl, $20\text{ }\mu\text{l}$ 0.5M TRIS-Cl pH 8 a $2\text{ }\mu\text{l}$ 0.5% TRITON X-100 (Sigma), denaturated 2 min at 100°C , quickly iced. The tissue was given into the Eppendorf tube with the reaction mixture, which was overlaid with parafin oil.

PCR amplification

Polymerase chain reaction was carried out in a DNA Thermal Cycler (MJ Research, PTC-100) in $50\text{ }\mu\text{l}$ reaction mixture – $10\times$ reaction buffer (500mM KCl, 100mM TRIS-Cl, pH 9.0, 1% TRITON X-100), 25mM MgCl_2 , 10mM dNTP, 2 U Taq DNA-polymerase in the storage buffer A (50mM TRIS-Cl,

pH 8.0, 100mM NaCl, 0.1mM EDTA, 5mM DTT, 50% glycerol, 1.0% TRITON X-100, Promega), 4nM primer (LAMBDA BIO-MED). The samples were subjected to 30 cycles of 1 min denaturation at 92 °C, 1.5 min annealing at 60 °C (F₁xR, F₂xR) or 55 °C (16E0 x 08I5, 16D9 x 08I6, 08I0 x 08I1), and 2 min extension at 72 °C, then the final extension step for 10 min at 72 °C. Amplification products were visualised under UV light after with ethidium bromide staining of on 2 or 3% agarose gels (Agarose Appligene Oncor) in TAE buffer. The STEP LADDER, 50 bp, S7025 (Sigma) was used as a size standard.

The sequences of primers:

LOCUS *Gli - B1* locus:

08I2(F ₁)	5'-GCA GAC CTG TGT CAT TGG TC-3'
08I3(F ₂)	5'-GAT CTG GCC ACA AAG CGC-3'
REVERS	5'-GAT ATG TGG CAG CAG GAT ACG -3'

LOCUS *Glu - A3* locus:

08I0(O11A5)	5'-CGC CGT TGT GGC GAC AAG TA-3'
08I1(O11A3)	5'-GTT CTT GTA GGA TGA TGG AGT AGG-3'

LOCUS *Glu - D3* locus:

08I5(O11D3)	5'-ATG GTA TTT GTT GTT GCG GA-3'
08I6(C13)	5'-ACT GCA CAT CGT TGG CAG GA-3'
16D9(C15A)	5'-CAG ATG GAG ACT AGA TGC ATC C-3'
16E0(O11BD5A)	5'-CCA CAT CCC TAG CTT GGA GAA-3'

RESULTS AND DISCUSSION

Routine analysis of gliadin loci is usually based on electrophoresis of total protein extract from a half of wheat kernel. (Černý, Šašek, 1996; Metakovsky, 1991). Another approach using PCR analysis is now available (D'Ovidio et al., 1995; Lafiandra et al., 1997; Campenhout et al., 1995).

Usually pure DNA is required for analysis on nucleic acid level. This step can be laborious and expensive. A simple technique to prepare the template has been tested for several species, e.g. insects (Greveling et al., 1996) or plant tissue – tomato (Klimyuk et al., 1993) or barley (Clancy et al.,

1996) and even segment of tissue can be suitable. Template preparation is fast and requires alkali treatment, neutralization and heat-denaturation.

Several parameters were optimized: tissue type, liquid nitrogen treatment and duration of alkali treatment (5, 10, 20, 30, 60 s) (Table I).

I. Factors influencing effectivity of PCR amplification using wheat (*T. aestivum* L.) tissue as a direct template

Tissue	Liquid nitrogen treatment	Alkali treatment	PCR reaction
Coleoptile	fresh	5s	no products
		20s	poor, non repeatable
		30s	poor, non repeatable
		60s	no products
	LN ₂ treated	20s	poor, non repeatable
Leaf	fresh	5s	poor, non repeatable
		20s	good yield, good reproducibility
		30s	good yield, good reproducibility
		60s	poor, non repeatable
	LN ₂ treated	5s	no products
		20s	good yield, good reproducibility
		30s	good yield, good reproducibility

Tissue from fresh and frozen coleoptiles and leaves were tested. Coleoptile tissues were not reliable templates, whereas leaf tissue was suitable for the procedure. Liquid nitrogen treatment as well as long-term storage of the tissue at low temperature (-80°C) did not affect the results.

Indispensable for template preparation was a pre-treatment in hot alkali solution; 20–30 s was optimal for the reaction.

The size of the sample of tissue was another critical parameter. Larger ($14\text{ mm}^2 - 3.5 \times 4\text{ mm}$ and more) or smaller segments of tissue than ($6\text{ mm}^2 - 3 \times 2\text{ mm}$ and less) inhibited the reaction. Second leaf of 10 days old plants was used as a standard. The upper tip (1.5 cm), middle rib and the base

(1.5 cm) of the leaf were excluded. Total 50 μ l of reaction mixture was used for amplification. 20 μ l out of it was enough for agarose gel analyses. Usually adequate amount of products were in 20 μ l of mixture, which were loaded on the 2 or 3% gel.

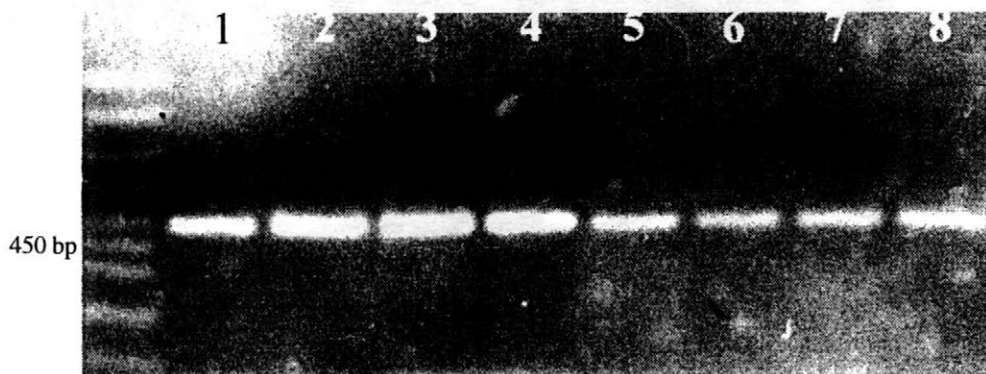
Optimal protocol requires: excision of 10 mm² of green leaf tissue, short freezing in liquid nitrogen (optional), 20–30 s long denaturation in hot alkali, neutralization and two minutes template denaturation. The liquid nitrogen pre-treatment was necessary before long-term storage at –80 °C

The possibility to use a segment of wheat leaf as a direct template (source of DNA) make the application of the PCR reaction suitable for breeders, because it is inexpensive and fast. The only disadvantage as compared with purified DNA as a template is the necessity to use as twice higher amount of Taq-polymerase for the reaction.

The PCR reaction using direct template – segment of leaf – was confirmed as a reliable method, because the results are comparable with those using purified DNA.

To test the reliability of the PCR reaction several primer pairs were used within 25 cultivars. DNA isolated from cvs. Chinese Spring and Bezostaya 1 (Negru *et al.*, 1992) were used as a control template.

Primers derived from the LMW-glutenin-genes on the chromosomes 1D (011BD5Ax011D3, C15AxC13) and 1A (011A5x011A3) (Campenhout *et al.*, 1995) repeatedly provided the products of the same, expected length (Fig. 1), proving high reproducibility of the reaction with direct template.

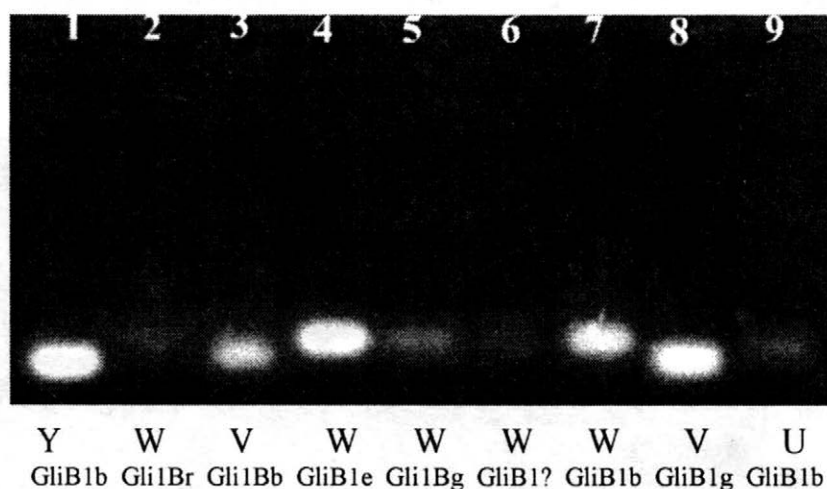


1. PCR profile generated by primers combination 011BD5Ax011D2 (1 – Kремена, 2 – Скала, 3 – Саратовская 36, 4 – Форлани, 5 – Рання 73, 6 – Маргуйс, 7 – Садово 1, 8 – Мировновская 808, with fragments of 479 bp)

II, Standard alleles – locus *Gli-B1* in cultivars of wheat

Allele – locus Gli-B1	Cultivar of wheat	Allele – locus Gli-B1	Cultivar of wheat
a	Chinese Spring	i	Insignia
b	Bezostaya 1, Gabo, Skala	k	Kremena
	Marquis, Mironovskaya808	l	Dukát
c	Siette Cerros 66	m	Akmolinka 1
d	Falchetto	a*	Spada
e	Ljutescens 62, Saratovskaya 36	o	Levent
f	Maris Freeman	r	Chinook
g	Galahad, Forlani, Sadovo 1	s	Rezistente

To analyse gliadin loci on chromosome *1B*, primers derived from the γ -gliadin pseudogene (De vos et al., 1995) were used on 25 standard cultivars with different composition of gliadin alleles (Table II). The primer pair, which should distinguish among genes, differ in the length of the internal repetitive sequence ($F_1 \times R$) (Fig. 2 and 3) produced 6 different bands, no product was detected in the cultivars with rye translocation – Dukát and Fiocco. When the primer pair based on the sequence polymorphism were

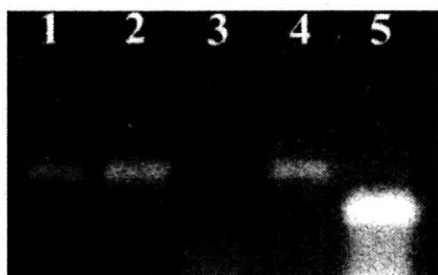


2. PCR bands generated by primer combination $F_1 \times R$ (1 – Gabo, 2 – Chinook, 3 – Skala, 4 – Saratovskaya 36, 5 – Forlani, 6 – Rannaja 73, 7 – Marguis, 8 – Sadovo 1, 9 – Mironovskaya 808 for fragments sizes see Table III; /1 – pattern category; /2 – standard alleles)

III. Size of different categories of the bands amplified in the γ -gliadin loci (chromosome 1B)

Band F ₂ ×R category	Fragment size	Band F ₁ ×R category	Fragment size
A	240 bp	Z	215 bp
B	185 bp	Y	230 bp
C	175 bp	X	245 bp
D	230 bp	W	250 bp
E	200 bp	V	220 bp
F	180 bp	U	240 bp
G	620 bp	—	—
0	no amplification		

used, seven different bands were identified within the cultivars (Fig. 4) (Table III and IV). Combination of the both pairs of primers made identification of 12 different gliadin genotypes on 1B chromosome possible. Nulli-tetrasomic lines were used as a control material. No products were detected in nulli-1B Chinese Spring as expected (Fig. 3). Even, when at present protein analysis of wheat storage protein is more comprehensive, PCR with combination of more suitable primers could bring other information about loci organization and could be used for breeding material analysis as well.



3. PCR bands generated by primer combination F₁ × R proving the chromosome specificity of the PCR products using nulli-tetrasomic lines of Chinese Spring (1 – Chinese Spring, 2 – N1AT1B, 3 – N1BT1A, 4 – N1DT1B, 5 – Bezostaya 1, for band size see Table III)

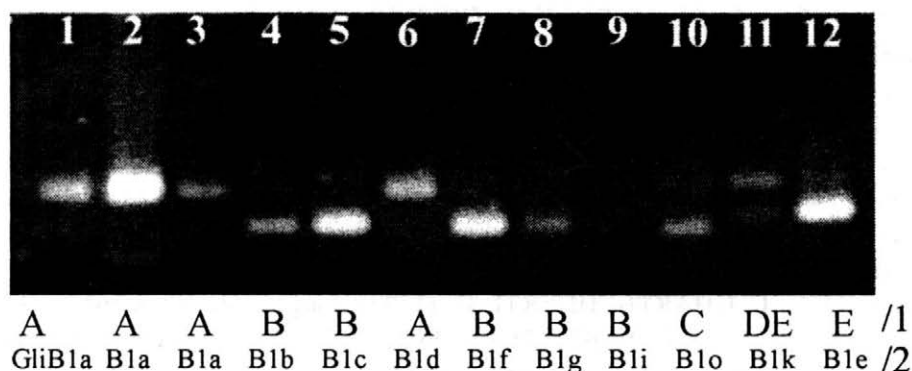
In this study, we have shown the possibility to use the set of gliadin loci specific primers to verify allelic polymorphism in wheat. Primers based on the γ -gliadin-pseudogene (1BS chromosome) can differentiate between several standard cultivars. However, using proposed primers sequences derived from the LMW glutenin-genes on chromosomes 1A and 1D no variability among the cultivars was detected and other studies will be necessary to design appropriate primers.

VI. Comparison of PCR bands pattern generated using γ -gliadine sequence derived primers ($F_1 \times R$ and $F_2 \times R$) in different wheat cultivars described with standard protein (Gli-B1) alleles

Wheat cultivar	Allel	Band patterns
Chinese Spring	a	A Z
Bezostaya	b	B Y
Gabo	b	B X
Skala	b	B V
Marquis	b	E W
Mironovskaya 808	b	B U
Siette Cerros	c	B X
Falchetto	d	A Y
Ljutescens 62	e	E W
Saratovskaya	e	E W
Maris Freeman	f	B W
Galahard	g	B X
Forlani	g	B W
Sadovo 1	g	B V
Insignia	i	B W
Kremena	k	D E W
Dukat, Fiocco	rye translocation	no product
Akmolinka 1	m	E W
Spada	n*	F E V
Levent	o	C V
Chinook	r	E W
Rezistente	s	G W

References

BARTELS, D., ALTOSAAR, I., HARBERD, N. P., BARKER, R. F., THOMPSON, R. D. (1986): Molecular analysis of γ -gliadin gene families at the complex *Gli-1* locus of bread wheat (*Triticum aestivum* L.). Theor. Appl. Genet., 72: 845-853.



4. PCR bands generated by primer F_{2x} R (1 – Chinese Spring, 2 – NIAT1B, 3 – NIDT1B, 4 – Bezostayja 1, 5 – Siete Cerros 66, 6 – Falchetto, 7 – Maris Freeman, 8 – Gala had, 9 – Insignia, 10 – Levent, 11 – Kremena, 12 – Ljutescens 62) 50 bp ladder (SIGMA) was used as the size standard (/1 – pattern category; /2 – standard alleles)

BEJ, A. K., MAHBUBANI, M. H., ATLAS, R. M. (1991): Amplification of nucleic acids by Polymerase Chain Reaction (PCR) and other methods and their applications. *Critical Rev. Biochem. Molec. Biol.*, 26: 301–334.

CAMPENHOUT, S. van, VANDER STAPPEN, J., SAGI, L., VOLCKAERT, G. (1995): Locus-specific primers for LMW glutenin genes on each of the group 1 chromosome of hexaploid wheat. *Theor. Appl. Genet.*, 91: 313–319.

CLANCY, J. A., JITKOV, V. A., HAN, F., ULLRICH, S. E. (1996): Barley tissue as direct template for PCR: a practical breeding tool. *Molecular Breed.*, 2: 181–183.

ČERNÝ, J., ŠAŠEK, A. (1996): Bílkovinné signální geny pšenice obecné. Praha, ÚZPI: 1–61.

D'OVIDIO, R. D., MASCI, S., PORCEDDU, E. (1995): Development of set of oligonucleotide primers specific for genes at the *Glu-1* complex loci of wheat. *Theor. Appl. Genet.*, 91: 189–194.

DACHKEVITCH, T., REDAELLI, R., BIANCARDI, A., METAKOVSKY, E. V., POGNA, N. E. (1993): Genetics of gliadins coded by the 1 group chromosome in the high-quality bread wheat cultivar Neepawa. *Theor. Appl. Genet.*, 86: 389–399.

DEVOS, K. M., BRYAN, G. J., COLLINS, A. J., STEPHENSON, P., GALE, M. D. (1995): Application of two microsatellite sequences in wheat storage proteins as molecular markers. *Theor. Appl. Genet.*, 90: 247–252.

GREVELDING, C. G., KAMPKOETTER, A., HOLLMANN, M., SCHAEFER, U., KUNZ, W. (1996): Direct PCR on fruitflies and blood flukes without prior DNA isolation. *Nucleic Acid Res.*, 24: 4100–4101.

- KLIMYUK, V. I., BERNARD, J. C., COLWYN, M. T., JONES, J. D. G. (1993): Alkali treatment for rapid preparation of plant material for reliable PCR analysis. *Plant J.*, 3: 493-494.
- LAFIANDRA, D., TUCCI, G. F., PAVONI, A., TURCHETTA, T., MARGIOTTA, B. (1997): PCR analysis of x- and y-type genes present at the complex *Glu-A1* locus in durum and bread wheat. *Theor. Appl. Genet.*, 94: 235-240.
- METAKOVSKY, E. V. (1991): Gliadin allele identification in common wheat. II. Catalogue of gliadin alleles in common wheat. *J. Genet. Breed.*, 45: 325-344.
- NEGRUTIU, I., GHARTI-CHHERTI, G. (1992): Large-scale extraction of *Arabidopsis* genomic DNA. In: SALUZ, H. P., BECKER, M. M. (Eds.): A laboratory guide for cellular and molecular plant biology. *BioMethods - Birkhauser*: 135-139.
- NIETO-TALADRIZ, M. T., PERRETANT, M. R., ROUSSET, M. (1994): Effects of gliadins and HMW and LMW subunits of glutenin on dough properties in the F₆ recombinant inbred lines from a bread wheat cross. *Theor. Appl. Genet.*, 88: 81-88.

Received July 22, 1997

Hodnocení odrůd pšenice se standárními *Gli/Glu* alelami metodou PCR s použitím listového pletiva jako přímého templátu

Cílem práce bylo ověřit, zda PCR primery odvozené ze sekvenčních dat mohou být použity pro identifikaci gliadinových a gluteninových alel u pšenice místo polyakrylamidové nebo škrobové elektroforézy zásobních proteinů jako standardních metod analýzy prolaminů. Byla studována možnost použití segmentů listového pletiva jako přímého templátu a optimalizovány parametry pro práci s pšenicí. Pro verifikaci byla použita sada primerů specifických pro gliadinové a gluteninové alely. Listový segment se jeví jako vhodný a levný templát, zatímco koleoptile klíčnicích rostlin nedávaly standardní výsledky. Dvě primerové sady specifické pro γ -gliadinový pseudogen byly použity pro odlišení se standardní sestavou alel na chromozomu 1B (*Gli-1B* lokus). V souboru 25 odrůd bylo amplifikováno 13 produktů odlišné délky a ty rozlišovaly uvnitř souboru 12 skupin. PCR reakce tak může být jednoduchou alternativní metodou pro jejich verifikaci.

Triticum aestivum L.; PCR; gluteniny; gliadiny; přímý templát

Contact address:

RNDr. Jaroslava Ovesná, Výzkumný ústav rostlinné výroby
161 06 Praha 6-Ruzyně, Česká republika
Phone: + 420 2 360 851, fax: + 420 2 365 228

**GENETICKÁ DIVERZITA A DĚDIČNOST REZISTENCE
K VIRU ŽLUTÉ ZAKRSLOSTI JEČMENE U JEČMENE JARNÍHO***

**Genetic Diversity and Mode of Inheritance of Resistance
to Barley Yellow Dwarf Virus in Spring Barley**

Václav ŠÍP, Josef VÁCKE, Jana CHRPOVÁ, Miroslav ŠKORPÍK

*Research Institute of Crop Production – Division of Genetics and Plant Breeding,
Prague, Czech Republic,*

Abstract: Response to infection with barley yellow dwarf virus (BYDV) was studied in the 1994–1997 trials with Czech spring barley cultivars and foreign sources of resistance from the “BYDV nurseries” of CIMMYT and ICARDA. In order to obtain information about the mode of inheritance of BYDV resistance the following varieties, that differ in VSS (visual symptom score), were selected for hybridization: Atlas 68 (gene *Yd2*, average VSS: 4.1) and Brea’S’Ben (3.3) as resistant varieties; modern Czech varieties Malvaz (5.1) and Atribut (5.2) as moderately resistant varieties and Akcent (7.9) and Jaspis (8.3) as susceptible varieties. Parental varieties and F_1 – F_3 hybrids were in the field artificially infected with PAV strain of BYDV at an early growth stage using *Rhopalosiphum padi* L. aphids originating from greenhouse rearings. Symptomatic reactions to the virus infection were recorded in infected plants during the vegetation period till the stage of full flowering (final assessment in Tables I, II and IV and Fig. 1 and 5) using the 0–9 scale developed by Shaller and Qualset (1980). F_3 lines of the cross Brea’S’Ben/Atlas 68 did not segregate in the response to BYDV infection. A single major gene *Yd2* was responsible for the resistance to BYDV in Brea’S’Ben (Table II, Fig. 1). According to the evaluation of agronomically important characters (Table III), the variety Brea’S’Ben (Fig. 2) may be a more suitable donor of *Yd2* gene for barley breeding than the very early variety Atlas 68. The incompletely dominant resistance gene *Yd2* had high effect on resistance level measured by VSS and segregation for this gene in crosses Atlas 68/Akcent, Atlas 68/Jaspis and Brea’S’Ben/Akcent caused a high genetic diversity in resistance to BYDV (Table II, Fig. 1, 3 and 4). Segregation analyses of the response to BYDV infection in F_3 lines of the crosses between moderately resistant Czech variety Malvaz and susceptible varieties Akcent and Jaspis, supplemented in the cross Malvaz/Akcent by quantitative ELISA assay of BYDV in leaf extracts,

* Práce byla uskutečněna za finanční podpory GA ČR v rámci projektu reg. č. 521/97/0749.

showed that at least two genes of minor effect are responsible for the resistance to BYDV in the variety Malvaz. Relative BYDV content from ELISA was significantly higher in the susceptible variety Akcent than in Malvaz and in the three nonsegregating susceptible F_3 lines of the cross Malvaz/Akcent (selected of 60 F_3 lines) in comparison with the three resistant lines (Table IV). The presence of BYDV was detected by ELISA in all the 157 examined plants (100% reliability of infection test). The intercrossing of moderately resistant Czech varieties Malvaz and Atribut did not result in the increase of resistance level (absence of evident transgression) and the average VSS in F_3 of this cross (5.8) was similar as in the cross between Malvaz and the susceptible Jaspis. Combining major (*Yd2*) and minor genes appears to be the most prospective way to reach success in breeding barley for BYDV resistance. A large genetic variability in VSS was obtained in the cross Malvaz/Atlas 68, in which 35% of F_3 lines had even higher resistance level (VSS: 2.0–3.5) than the resistant variety Atlas 68 (Table II, Fig. 5).

spring barley; barley yellow dwarf virus; symptomatical response; virus content; hybridological analyses; resistance genes; breeding for resistance

Abstrakt: V období 1994–1997 byla posuzována reakce na infekci virem žluté zakrslosti ječmene (BYDV) u odrůd ječmene jarního českého původu a též zahraničních odrůd získaných z kolekce CIMMYT Mexiko a ICARDA Sýrie. Na základě tohoto hodnocení byly vybrány pro hybridizaci za účelem genetických analýz odrůdy Atlas 68 (gen *Yd2* – průměrné symptomatické hodnocení 4,1) a Brea'S'Ben (3,3) jako odolné, české odrůdy Malvaz (5,1) a Atribut (5,2) jako mírně odolné a odrůdy Akcent (7,9) a Jaspis (8,3) jako náchylné. Rodičovské odrůdy a hybridy v generacích F_1 – F_3 byly infikovány virem v rané růstové fázi pomocí mšic *Rhopalosiphum padi* L. ze skleníkových chovů. Genetickou analýzou v generaci F_3 po hybridizaci s odrůdou Atlas 68 bylo zjištěno, že odrůda Brea'S'Ben je nositelem genu *Yd2*. Po křížení této odrůdy s náchylnou odrůdou Akcent bylo prokázáno monogenní založení, podobně jako u odrůdy Atlas 68 (Atlas 68/ Akcent, Atlas 68/Jaspis). Neúplně dominantní gen *Yd2* působil výrazné zvýšení rezistence k BYDV. Analýzy segregace v reakci na infekci BYDV po křížení odrůdy Malvaz s náchylnými odrůdami Akcent a Jaspis, doplněné u křížence Malvaz/Akcent též stanovením koncentrace viru metodou ELISA ukázaly, že rezistence u odrůdy Malvaz je založena nejméně dvěma geny s menším účinkem, odlišnými od genu *Yd2* (Malvaz/Atlas 68). Vzájemné křížení dvou českých mírně odolných odrůd Malvaz a Atribut nepřineslo zvýšení úrovně rezistence (evidentní transgrese nebylo možno prokázat). Průměrný symptomatický projev v generaci F_3 (5,8) byl stejný jako u křížence mezi odrů-

dou Malvaz a náchylnou odrůdou Jaspis. Perspektivní cestou k dosažení požadované úrovně rezistence v českém šlechtění ječmene jarního zřejmě je kombinace major genu *Yd2* s minor geny přítomnými v mírně odolných moderních odrůdách (Malvaz, Atribut). Křížení odrůdy Malvaz s odrůdou Atlas 68 umožnilo rozšířit genetickou variabilitu ve stupni rezistence (s^2 u Malvaz/Atlas 68 = 1,84, zatímco u Malvaz/Atribut = 0,43) a 35 % linií vykazovalo dokonce vyšší stupeň rezistence (2–3,5) než rezistentní odrůda Atlas 68. Na základě hodnocení komplexu znaků a vlastností bylo zjištěno, že odrůda Brea'S'Ben je vhodnějším donorem genu *Yd2* pro naše šlechtění než odrůda Atlas 68.

ječmen jarní; virus žluté zakrslosti ječmene; symptomatická reakce; obsah viru; hybridologické analýzy; geny rezistence; šlechtění na rezistenci

Virus žluté zakrslosti ječmene (barley yellow dwarf virus – BYDV) patří mezi hospodářsky závažné patogeny na obilninách. U ječmene vyvolává intenzivní symptomatickou reakci a ztráty na výnosu. Jejich výše závisí na patogenitě kmenu viru, době infekce a odolnosti odrůdy. Problematikou škodlivosti viru se v zahraničí zabývala řada autorů. Pike (1990) v přehledu výsledků jejich prací uvádí, že nejčasnější infekce BYDV vyvolávají u ječmene redukci výnosu zrna v rozmezí 14,8–93,2 %. Při infekci pozdější, tj. ve fázi odnožování až sloupkování, se tyto ztráty pohybují od 10 do 43,3 %. Časná infekce působí u náchylných odrůd silnou zakrslost rostlin spojenou se žloutnutím listů, inhibici vývoje kořenového systému rostlin, redukci počtu odnoží, oddálení doby metání rostlin a silnou redukci počtu i hmotnosti zrn. Na počátku šedesátých let byl výskyt tohoto viru zjištěn také v bývalé Československé republice (Vacke, 1964) a v mnohých oblastech byl od té doby zaznamenán silný až epidemický výskyt (Vacke, 1991).

Od objevení tohoto viru (1951) až do současné doby je rozšířen názor, že velice účinným a spolehlivým způsobem ochrany proti tomuto patogenu je dosažení vysoké rezistence odrůd, i když existují i možnosti omezení výskytu choroby některými pěstebními zásahy, např. zpožděním doby výsevu tak, aby rostliny byly chráněny před napadením vironosnými mšicemi (Qualset et al., 1990). Otázky odolnosti ječmene jarního k BYDV řešila ve světě řada autorů, např. Suneson (1955), Schaller et al. (1963), Catherrall a Hayes (1966), Gill et al. (1969), Comeau a St-Pierre (1982), Qualset (1983) a Qualset et al. (1990). Již Suneson (1955) identifikoval recesivní gen v odrůdě Rojo, který byl později označen *yd1* (Ras-

mussona Schaller (1959). Tento gen nenašel širší uplatnění ve šlechtění ječmene na rezistenci k BYDV z důvodu nízkého efektu na rezistenci, na rozdíl od genu *Yd2*, který detekovali Schaller et al. (1963) ve velmi raných odrůdách ječmene etiopského původu. Na základě genetických studií jde o neúplně dominantní gen (či aditivní gen) lokalizovaný na chromozomu 3, ve vazbě s genem pro hustý klas (15,9 cM), genem determinujícím barvu klasu (xantha) (14,5 cM) a odolnost k *Rhynchosporium secalis* (27,6 cM) (Qualset et al., 1990). V poslední době byl lokus genu *Yd2* identifikován pomocí RFLP markerů (Collins et al., 1996). Nositeli genu *Yd2* jsou odrůdy ječmene Atlas 68, Abate a CI 2376 (Schaller, 1983); dále též Coracle, CM 67, CM 72, Franklin, Nomin, Prato, Shannon, Shyri, Sutter, UC 337, UC 476, UC 566, UC 603, Venus, Vixen a Wysor (Burnett et al., 1995). Vysoký efekt genu *Yd2* na rezistenci k BYDV byl prokázán i našimi testy u kříženců s odrůdou Atlas 68 (Šíp et al., 1996).

České odrůdy jarního ječmene byly většinou k viru BYDV silně náchylné (se symptomatickým hodnocením v rozmezí 6,9–9,0), pouze odrůdy Malvaz, Atribut a novošlechtění ST 180, ST 181 a ST 183 bylo možné považovat za mírně odolné (Vacke et al., 1997). Prověřovala se též účinnost deklarovaných zdrojů rezistence získaných ze CIMMYT Mexiko a ICARDA Sýrie. Jako velice slibné se v příslušných testech ukázaly odrůdy ječmene jarního Atlas 68, Sutter (gen *Yd2*), Corris, Brea'S'Ben a UC762552/NK71 (Šíp et al., 1996). Cílem předložené práce bylo na základě hodnocení reakce na infekci virem u kříženců mezi detekovanými zdroji rezistence, nositelem genu *Yd2* (Atlas 68) a náchylnými odrůdami jarního ječmene posoudit diverzitu materiálu v rezistenci, shodnost či odlišnost genetického založení rezistence a doporučit vhodnou strategii ve šlechtění na rezistenci k BYDV u ječmene jarního.

MATERIÁL A METODY

Reakce na infekci virem žluté zakrslosti ječmene byla zjišťována u rodičovských odrůd a hybridů v generacích F_1 – F_3 v tříletém období (1995 až 1997). Jako rodiče s vysokou rezistencí byly použity odrůdy Atlas 68 (gen *Yd2*) a Brea'S'Ben, jako mírně odolné odrůdy Malvaz a Atribut (ST 167) a jako náchylné odrůdy Akcent a Jaspis. Přehled symptomatického hodnocení

I. Průměry a variabilita (s^2 – 1997) v symptomatickém hodnocení (0–9, 0 – bez příznaků) rodičovských odrůd po infekci BYDV v letech 1995–1997 – Means and variability (s^2 – 1997) of symptom scores (0–9, 0 – without symptoms) in parental varieties after BYDV infection in the years 1995–1997

	1995	1996	1997	s^2 – 1997
Akcent	8,4	7,7	7,6	0,091
Jaspis	8,8	8,5	7,7	0,292
Malvaz	5,2	5,4	4,8	0,051
Atribut	5,3	4,9	5,4	0,032
Atlas 68	3,5	4,1	3,2	0,095
Brea'S'Ben	4,0	2,0	2,4	0,255

reakce rodičovských odrůd v jednotlivých letech zkoušení je uveden v tab. I. Schéma křížení: Atlas 68/Akcent, Atlas 68/Jaspis, Brea'S'Ben/Akcent, Brea'S'Ben/Atlas 68, Malvaz/Akcent, Malvaz/Jaspis, Malvaz/Atribut a Malvaz/Atlas 68. Linie generace F_3 byly získány z náhodně vybraných rostlin generace F_2 . Jejich počet se pohyboval od 45 do 74 (tab. II) podle

II. Reakce na infekci BYDV v generaci F_1 a F_3 v porovnání s průměrem rodičů – MP (symptomatické hodnocení: 0–9, 0–bez příznaků) a distribuce F_3 linií u osmi kříženců v letech 1995–1997 – Response of F_1 's and F_3 lines to the infection with BYDV in comparison with means of parents – MP (symptom scoring on 0–9 scale: 0 – without symptoms) and distribution of F_3 lines in eight crosses during 1995–1997

Kříženec ¹	F_1	MP	Počet F_3 linií ²			F_3	$s^2 - F_3$	MP
			neštěpící odolné ³	štěpí- cí ⁴	neštěpící náchylné ⁵			
Atlas 68/Akcent	4,0*	5,9*	15	35	10	5,12*	2,830*	5,90*
Atlas 68/Jaspis			16	34	17	4,97	2,739	5,45
Brea'S'Ben/Akcent			11	25	11	4,26	2,471	5,00
Brea'S'Ben/Atlas 68			64			2,58	0,376	2,80
Malvaz/Akcent	6,0*	6,6*	2 (3 ⁺)	55	3 (3 ⁺)	6,25*	0,442*	6,60*
Malvaz/Jaspis			(3)	46	(4)	5,84	0,497	6,25
Malvaz/Atribut	4,5**	5,2**		70		5,85	0,432	5,10
Malvaz/Atlas 68	3,0*	4,7*	(4)	16		4,07*	1,837*	4,75*

* 1996, **1995, + ELISA test

¹cross; ²number of F_3 lines; ³nonsegregating resistant; ⁴segregating; ⁵nonsegregating susceptible

dostupnosti rostlin generace F_2 . Nízký byl počet linií generace F_3 u křížence Malvaz/Atlas 68 (20) v důsledku nižší vzcházivosti semen při stejném objemu generace F_2 jako u ostatních kříženců. Linie generace F_3 byly vysévány na dvouřádkové parcely 1,20 m dlouhé, se sponem rostlin 20 x 8 cm. Stejný byl spon rostlin u rodičovských odrůd a potomstev generace F_1 či F_2 .

Testované genotypy byly ve fázi 2–3 listů infikovány vysoce patogenním, nespecifickým PAV kmenem BYDV, který je na našem území převážně rozšířen (Vacke, 1988). K přenosu viru sloužily mšice *Rhopalosiphum padi* L. ze skleníkových chovů, jejichž reprodukce a infekce probíhaly podle metodiky modifikované ve VÚRV (Vacke et al., 1996). Po uplynutí pěti až sedmidenního inokulačního sání byli přenašeči usmrceni aphicidním přípravkem. Během vegetační doby se pokusné parcely i okolní dělíci a ochranné pásy udržovaly pod insekticidní clonou. Reakce rostlin se posuzovala od začátku objevení příznaků (zohledněna délka inkubační doby jako určitý indikátor rezistence) nejméně ve třech dalších termínech až do fáze kvetení. Průběžné sledování projevu infekce (s variabilitou příznaků během vegetace) bylo nutné pro vydělení linií generace F_3 generace štěpících a neštěpících v reakci na infekci BYDV. Vedle symptomatického hodnocení sloužilo u linií křížence Malvaz/Akcent vybraných v roce 1996 a u rodičovských odrůd k prokázání rozdílů v reakci na infekci virem též zjišťování relativní koncentrace viru dvojitou „sendvičovou“ metodou ELISA (Clark, Adams, 1977) v roce následujícím. Odběry rostlinného materiálu (listy z 15–18 rostlin příslušné linie či rodičovské odrůdy) pro stanovení koncentrace viru byly prováděny ve fázi kvetení. Výsledné symptomatické hodnocení (údaje v tabulkách a na obrázcích) bylo prováděno ve fázi kvetení podle stupnice 0–9, kterou vyvinuli Schaller a Qualset (1980).

VÝSLEDKY A DISKUSE

Reakce odrůd na infekci BYDV

V tab. I jsou uvedeny průměry symptomatického hodnocení (SH) rodičovských odrůd v jednotlivých ročnících testování. Odrůdy Akcent, Jaspis, Malvaz a Atribut byly hodnoceny každoročně počínaje rokem 1993. Průměrné hodnoty výnosových znaků těchto odrůd v infekční variantě, jejich procentní redukce vlivem infekce a SH za období 1993–1995 uvádějí

Vacke et al. (1997). U mírně odolných odrůd Malvaz a Atribut byla zjištěna v porovnání s náchylnými odrůdami Akcent a Jaspis nižší redukce ve výnosu zrna (38 a 51 % proti 82 a 85% redukci u náchylných odrůd). Průměrné SH zmíněných odrůd v této práci (1993–1995) nejvíce odpovídá podmínkám roku 1995.

Z kolekcí zdrojů rezistence k BYDV ze CIMMYT Mexiko a ICARDA Sýrie vykázaly na základě SH ve čtyřletém období hodnocení (1993–1997) nejvyšší stupeň rezistence odrůdy Corris = CI 03906-1/Abed Deba (2,4), Sutter (3,0), UC 76252/NK71 (3,1) a Brea'S'Ben (3,3); odrůda Atlas 68 (4,1). Redukce výnosu zrna vlivem infekce u těchto materiálů sice kolísaly v průběhu testování, avšak nepřevýšily 10 %. Se všemi zmíněnými odrůdami probíhá hybridizace za účelem zjištění genetického základu rezistence a pro posouzení možností šlechtitelského využití. V první etapě (do této studie) byly vybrány jako rodičovské odrůdy Atlas 68 (jako známý nositel genu *Yd2*) a odrůda Brea'S'Ben (lépe vyhovující v ostatních vlastnostech – tab. III).

III. Charakteristika odrůd ječmene jarního využitelných ve šlechtění na rezistenci k BYDV (1995–1996) – Characteristics of spring barley varieties that can be used in breeding for resistance to BYDV (1995–1996)

Odrůda ¹	HZP	HZK	DEM	VYR	Klas ²	Padlí ³
Atlas 68	182,5	1,011	11.6.	71	6řadý ⁴	4,0
Brea'S'Ben	352,5	0,836	18.6.	89	2řadý ⁵	6,5
UC 76252/NK 71	253,5	0,889	22.6.	70	6řadý	7,0
Corris	322,0	0,764	6.7.	94	2řadý	6,0
Sutter	333,0	1,067	25.6.	95	6řadý	5,5
Malvaz	392,9	0,929	29.6.	79	2řadý	5,5
Atribut	414,6	0,874	29.6.	80	2řadý	8,5

HZP = hmotnost zrna na plochu [g/m²] – grain yield [g/m²]

HZK = hmotnost zrna na klas [g] – grain weight per spike [g]

DEM = den metání – heading date

VYR = výška rostliny [cm] – plant height [cm]

Padlí = rezistence k padlí travnímu (0–9, 9 – bez příznaků) – resistance to powdery mildew (0–9, 9 – without symptoms)

¹variety; ²spike; ³powdery; ⁴6row; ⁵2row

SH podle Schallera a Qualseta (Schaller, Qualset, 1980), které bylo použito, bere v úvahu nejen diskolorace listů, ale též zkrácení rostlin v důsledku infekce a redukci velikosti klasu. Evidentní byly rozdíly v symptomatické reakci jednotlivých odrůd, ale též jejich interakce s podmínkami jednotlivých ročníků (tab. I). Poněkud slabší byl projev infekce v roce 1997 (5,18) proti roku 1995 se silnějším projevem u většiny odrůd (5,87). Určitá variabilita (vyšší u odrůd Jaspis a Brea'S'Ben) byla zjištěna také mezi parcelami na pokusném pozemku. Qualset et al. (1990) ukázali, že exprese symptomů po infekci BYDV je silně ovlivněna podmínkami prostředí, což znesnadňuje genetickou interpretaci segregace v rezistenci.

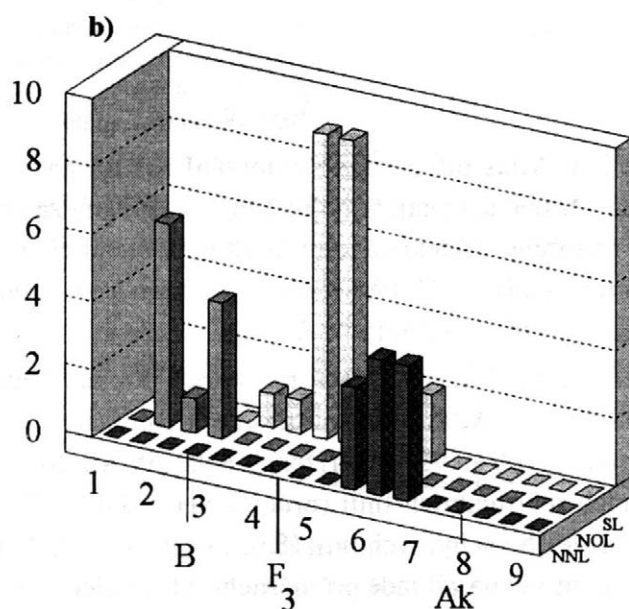
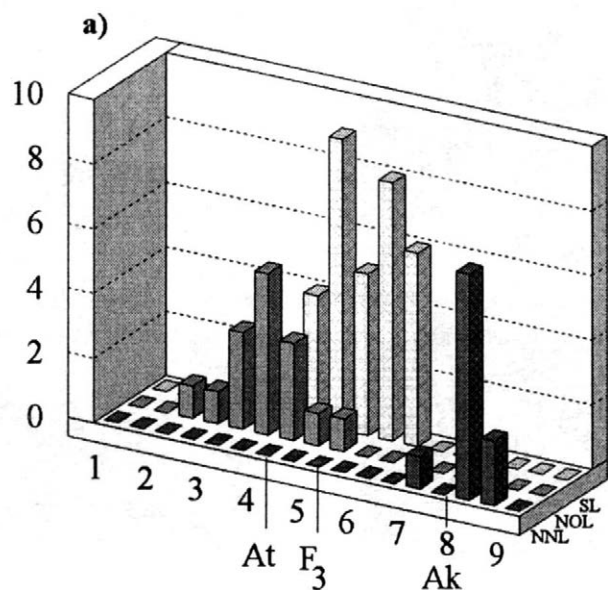
Genetické založení rezistence k BYDV u odrůdy Brea'S'Ben

U linií generace F_3 křížence Brea'S'Ben/Atlas 68 byl po infekci BYDV zjištěn pouze výskyt neštěpících, rezistentních linií, přičemž průměr SH v generaci F_3 (2,58) byl blízký průměru rodičovských odrůd (2,80). Také variance linií generace F_3 v SH byla ze všech hodnocených kříženců nejnižší (tab. II). Po křížení odrůdy Brea'S'Ben s náchylnou odrůdou Akcent bylo zjištěno 11 neštěpících rezistentních linií (průměr SH = 1,91), 25 štěpících linií (4,50) a 11 neštěpících náchylných linií (6,06), což odpovídá poměru 1 : 2 : 1 ($\chi^2 = 0,192 < \chi^2_{0,95} = 5,99$) pro monogenní založení (obr. 1b). Genetickými analýzami byla tedy prokázána přítomnost genu *Yd2* u odrůdy Brea'S'Ben.

Rezistentní odrůda Brea'S'Ben (obr. 2) s dvouřadým klasem byla výnosnější než odrůda Atlas 68, pozdnější v metání a vykazovala vyšší odolnost k padlí travnímu (tab. III), což lépe odpovídá šlechtitelským požadavkům na naše odrůdy jarního ječmene. Jako potenciální donor genu *Yd2* přichází v úvahu i odrůda Sutter s produktivním, avšak šestiřadým klasem. Vhodnost zahraničních zdrojů vysoké rezistence z tab. III pro naše šlechtění však bude třeba posoudit po hybridizaci s moderními českými odrůdami ječmene jarního.

Studium genetické diverzity materiálu segregujícího v genu *Yd2*

V roce 1995 byla analyzována segregace ve stupni rezistence u křížence Atlas 68/Akcent v generaci F_2 . Reakce rostlin na infekci BYDV byla značně rozdílná, což dokládá obr. 3. Separaci rostlin v této generaci bylo možno provádět na základě stupně produktivního odnožení. Plné metání rostlin odpoví-



1. Rozdělení četností v symptomatickém hodnocení infekce BYDV (0–9; 0 – bez symptomů) u F_3 linií kříženců: a) Atlas 68 (At)/Akcent (Ak) a b) Brea'S'Ben (B)/Akcent – Frequency distribution for BYDV scores (0–9, 0 – without symptoms) from F_3 lines of crosses: a) Atlas 68 (At)/Akcent (Ak) and b) Brea'S'Ben (B)/Akcent



2. Rezistentní odrůda Brea'S'Ben (474) s genem *Yd2* – Resistant variety Brea'S'Ben (474) which carries *Yd2* gene



3. Segregace v rezistenci rostlin k infekci BYDV v F_2 generaci u křížence Atlas 68 (gen *Yd2*)/Akcent (náchylná odrůda) – Segregation in BYDV resistance in F_2 generation of the cross Atlas 68 (gene *Yd2*)/Akcent (susceptible variety)

dalo reakci rodiče Atlas 68, zatímco nemetání rostlin náchylnému rodiči Akcent. Rostliny částečně metající mohly být považovány za pravděpodobné heterozygotní genotypy. Detekováno bylo 18 plně metajících rostlin, 33 částečně metajících rostlin a 17 nemetajících rostlin, což odpovídá poměru 1 : 2 : 1 pro monogenní založení ($\chi^2 = 0,88$).

Vysoký účinek genu *Yd2* na stupeň rezistence dokládají analýzy tří kříženců (Atlas 68/Akcent, Atlas 68/Jaspis a Brea'S'Ben/Akcent) v generaci F_3 prováděné v letech 1996 a 1997. U křížence Atlas 68/Akcent bylo detekováno 15 neštěpících rezistentních linií (průměr SH = 3,47), 35 štěpících linií (5,02) a 10 neštěpících náchylných linií (8,00) – $\chi^2_{1:2:1} = 2,50$. Proti kříženci Brea'S'Ben/Akcent byl na základě průměrného SH evidentní nižší stupeň rezistence u skupiny neštěpících rezistentních linií a také vyšší variabilita v rámci této skupiny (Atlas 68/Akcent = 0,568; Brea'S'Ben/Akcent = 0,241 – obr. 1a, b). Nižší stupeň rezistence je vysvětlitelný nižším stupněm u rodičovské odrůdy Atlas 68, zvláště v roce 1996 (4,1), proti odrůdě Brea'S'Ben (2,0 – 1996;

2,4 – 1997). Variabilitu v rezistenci uvnitř neštěpících rezistentních linií mohly ovlivnit podmínky ročníku, avšak pravděpodobnější je vliv genetického pozadí. Odrůda Atlas 68 je bezesporu morfogeneticky odlišnější od odrůdy Akcent (rozdíl v době metání je více než 14 dnů) než odrůda Brea'S'Ben, a tak interakce mezi rezistencí a morfotypem se mohly výrazněji uplatnit. Také u křížence Atlas 68/Jaspis s prokázaným štěpením v poměru 1 : 2 : 1 v generaci F_3 (tab. II – $\chi^2 = 0,045$) byla zjištěna u skupiny neštěpících rezistentních rostlin vysoká variabilita v SH (dokonce 0,844, i když průměr SH této skupiny 2,86 nepřevyšoval průměr odrůdy Atlas 68 3,2). Genetické pozadí zřejmě má na expresi genu *Yd2* výrazný vliv. Ve Velké Británii Catherall a Hayes (1966) zjistili nižší efektivitu tohoto genu u pozdních odrůd s pomalejším vývojem. Také Jones a Catherall (1970) přisoudili nižší efektivitu genu *Yd2* u ozimých genotypů pomalému růstovému rytmu. Comeau a Jedlinski (1990) upozornili na vázanost efektu tohoto genu na větší délku rostliny a zhoršené parametry jakosti zrna. Nejnovější výsledky šlechtění na rezistenci u ječmene ozimého však dokázaly (Delogu et al., 1995), že vysokou rezistenci s využitím genu *Yd2* lze kombinovat s příznivými agronomickými vlastnostmi. Šlechtitelský úspěch závisí nemalou měrou i na výběru vhodného donora genu *Yd2*.

Předložené výsledky (i obr. 3 a 4) dokládají, že diverzita v rezistenci materiálu segregujícího v genu *Yd2* je vysoká, a tudíž lze tento gen považovat za gen s velkým účinkem na rezistenci k PAV izolátu (nejrozšířenějšímu v našich podmínkách) BYDV. U všech tří kříženců analyzovaných v generaci F_3 a též v generaci F_1 u křížence Atlas 68/Akcent byly průměry hybridní populace v SH nižší než průměry odpovídajících rodičů v daném roce, což potvrzuje zjištění z literatury (Quallset et al., 1990), že jde o neúplně dominantní gen.

Založení rezistence u českých mírně odolných odrůd Malvaz a Atribut

Odrůda Malvaz, s detekovanou mírnou rezistencí k BYDV (Vacke et al., 1997), byla křížena s náchylnými odrůdami Akcent a Jaspis. Jak je patrné z obr. 5a, b a z údajů v tab. II, variabilita v SH F_3 linií těchto kříženců byla výrazně nižší (0,442 a 0,497) než u kříženců segregujících v genu *Yd2* (2,471–2,830). Průměrné SH generace F_3 obou kříženců i v generaci F_1 křížence Malvaz/Akcent byl však (podobně jako po segregaci v genu *Yd2*) vždy



4. Variabilita v rezistenci linií generace F_3 k infekci BYDV u křížence Atlas 68 (gen *Yd2*)/Jaspis (547 – rezistentní neštěpící linie; 546 – náchylná neštěpící linie; 544, 545 – štěpící linie) – Variability in BYDV resistance of F_3 lines of the cross Atlas 68 (gene *Yd2*)/Jaspis (547 – resistant nonsegregating line; 546 – susceptible nonsegregating line; 544, 545 – segregating lines)

nižší než průměr rodičovských odrůd, což indikuje mírnou (neúplnou) dominanci pro vyšší rezistenci.

S cílem poznat genetické založení rezistence k BYDV u odrůdy Malvaz jsme se pokusili na základě srovnání s reakcí rodičovských odrůd v letech 1996 a 1997 detekovat u kříženců této odrůdy s náchylnými odrůdami Akcent a Jaspis a s nositelem genu *Yd2* Atlas 68 linie odolné či náchylné neštěpící a linie štěpící v reakci na infekci BYDV (tab. II). Na základě štěpení v reakci u F_3 linií křížence Malvaz/Atlas 68 byla prokázána odlišnost v genetickém založení rezistence u odrůd Malvaz a Atlas 68. V roce 1996 (generace F_3) bylo předběžně u křížence Malvaz/Akcent vybráno ze 60 linií sedm neštěpících linií, z nichž tři byly označeny jako náchylné (29, 56, 70) a čtyři jako odolné (15, 22, 45, 55 – tab. IV). Tyto linie spolu s rodičovskými odrůdami byly pro ověření jejich reakce přesety v roce následujícím (generace F_4) na čtyřřádkové parcely, infikovány BYDV a opět sledovány vizuálně a s využitím metody ELISA pro stanovení relativní koncentrace viru ve šťávě extrahované z listů infikovaných rostlin. Jak ukazuje tab. IV, vizuálně podle průměrného SH a homogenity v reakci rostlin na infekci BYDV byly vybrány tři linie s označením neštěpící náchylné a dvě linie s označením neštěpící odolné. Tato zjištění vyhovují dvougenovému modelu, se štěpným poměrem 1 : 14 : 1 ($\chi^2 = 1,086$). Shoda s tímto poměrem byla nalezena i u křížence Malvaz/Jaspis ($\chi^2 = 0,051$) (předběžné výsledky roku 1997 – tab. II).

S použitím metody ELISA (tab. IV) byly prokázány významné rozdíly v absorbanci (relativní ukazatel koncentrace viru) mezi rodičovskými odrůdami Malvaz a Akcent ($t = 5,030 > t_{0,975} = 1,70$), jakož i mezi skupinou

IV. Hodnocení F₃ a F₄ linií křížence Malvaz/Akcent vybraných v roce 1996 jako neštěpící náchylné (29, 56, 70) a neštěpící odolné (15, 22, 45, 55) – Evaluation of F₃ and F₄ lines of the cross Malvaz/Akcent selected in 1996 as nonsegregating susceptible (29, 56, 70) and nonsegregating resistant (15, 22, 45, 55)

Rodič/linie ¹	SH ² – F ₃ 1996	ELISA test absorbance – A _{405nm}	SH – F ₄ 1997	VV ³
Akcent	7,7	0,763 ± 0,0255	7,6	
Malvaz	5,4	0,278 ± 0,0128	4,8	
29	7,5	1,028 ± 0,0757	7,5	+
56	7,0	1,082 ± 0,0385	7,5	+
70	7,8	1,258 ± 0,0412	7,8	+
15	5,8	0,667 ± 0,0293	5,5	
22	5,0	0,763 ± 0,0453	5,5	+
45	5,7	0,639 ± 0,0467	5,5	
55	5,0	0,966 ± 0,0312	5,0	+

VV = vizuální výběr linií podle průměrného SH a homogenity rostlin v reakci na infekci BYDV v roce 1997 – visual selection of lines according to average symptom score and homogeneity of plant reaction to BYDV infection in 1997

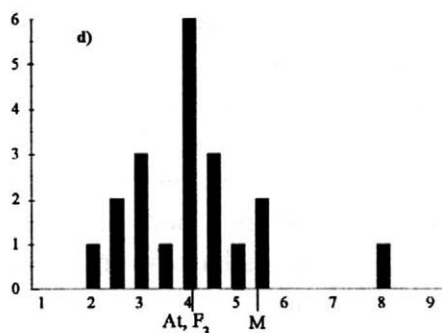
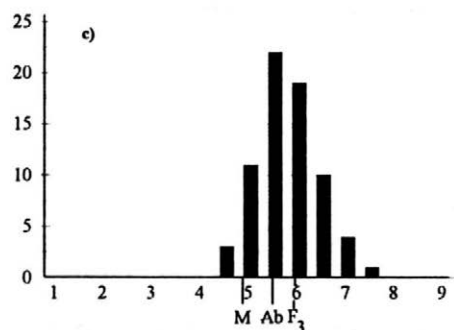
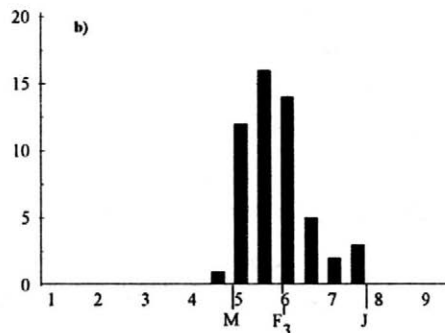
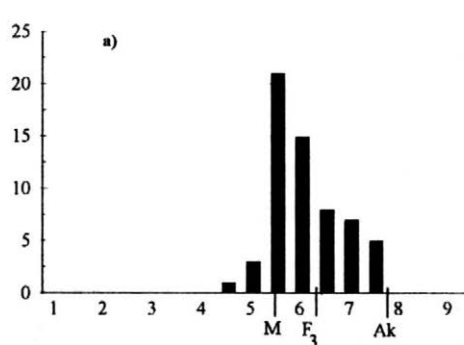
¹parent/line, ²symptom scoring (0–9, 0 – without symptoms)

podle koncentrace viru odolných (15, 22, 45) a skupinou náchylných (29, 56, 70) linií ($t = 4,69 > 1,66$). Na základě hodnocení rozdílů v rozptylech F -testem byl rozptyl v hodnotách absorbance významně nižší u rodičů než u linií a také relativně nižší pro skupinu odolných linií než pro skupinu linií náchylných. Shodnost rozptylu s rozptylem rodičovských odrůd bylo možné statisticky prokázat pouze u linie 15. Celkově byly jak průměrné hodnoty absorbance, tak jejich rozptyl vyšší u hybridního materiálu než u příslušných rodičovských odrůd, i když symptomatické hodnocení tří náchylných linií odpovídalo odrůdě Akcent a čtyř odolnějších linií odrůdě Malvaz. Linie 55 byla vybrána podle SH i homogenity v reakci rostlin jednoznačně jako odolná. Její průměrná absorbance však byla významně vyšší než absorbance skupiny linií 15, 22 a 45 ($t = 5,17 > 1,67$) a nemohla být tudíž na základě ELISA testu zařazena do této skupiny.

ELISA testem byla detekována přítomnost BYDV 100% u všech analyzovaných rostlin všech odrůd a linií, což dokládá vysokou spolehlivost

infekčních testů; kvantitativní stanovení „koncentrace“ viru touto metodou je však třeba považovat za aproximativní. Prokázaly se relace mezi průměrnou absorbancí a symptomatickým hodnocením, a tedy spojitost nižší „koncentrace“ viru s vyšší odolností zjištěnou na základě symptomatického projevu nákazy. U hybridního materiálu však byly průměry i rozptyly v absorbanci obvykle významně vyšší než u rodiče s přibližně stejným SH. Vyšší rozptyly naznačují, že i přes homogenitu v symptomatickém projevu koncentrace viru v populacích rostlin štěpících v komplexu znaků a vlastností (neštěpících pouze ve vizuálním projevu nákazy) více kolísá než u homozygotního rodičovského materiálu a výsledkem může být i vyšší průměrná hodnota. Zjištění závislosti stupně rezistence na genetickém pozadí a v interakci s prostředím je literárně podloženo (Qualset et al., 1990) a zvláště je-li výsledný efekt genů nižší (mírná odolnost odrůdy Malvaz), dochází často k tomu, že tolerance může být u téže odrůdy (jako např. pšenice jarní Anza) indikována jako kvantitativní (Tola, Kronstad, 1984) či jako kvalitativní (gen *Bdv1* s částečnou efektivitou – Singh et al., 1993). U odrůdy Malvaz můžeme na základě vizuálního hodnocení reakce na infekci BYDV u hybridního materiálu hovořit o oligogenním založení rezistence nejméně dvěma geny, avšak evidentní interakce genů s faktory prostředí i vliv genetického pozadí ztěžují interpretaci segregace i přípravu vhodného materiálu nutného pro detekci markerů zúčastněných genů. Pro odvození genetických markerů rezistence odrůdy Malvaz bude zřejmě z těchto důvodů nutné uplatnit přístup běžný pro kvantitativní znaky (QTL).

Pro detekci shodnosti či odlišnosti genetického založení dvou mírně odolných českých odrůd Malvaz a Atribut byly tyto odrůdy vzájemně kříženy a v generaci F_3 byla posuzována reakce na infekci BYDV (tab. II, obr. 5c). Vizuální hodnocení příznaků infekce prokázalo segregaci jak v reakci rostlin uvnitř linie, tak mezi jednotlivými liniemi generace F_3 (stejný rozptyl u křížence Malvaz/Atribut jako u kříženců odrůdy Malvaz s náchylnými odrůdami Akcent a Jaspis – tab. II), což svědčí o odlišnosti genetického založení rezistence těchto odrůd. Přihlédne-li se k možnému kolísání SH pozorovanému u rodičovských odrůd (tab. I), transgrese evidentně nelze prokázat. Rezistence linií generace F_3 posuzovaná na základě SH byla výrazně nižší (5,85) než v průměru rezistence rodičů (5,10). Průměrné SH v generaci F_3 bylo stejné jako u křížence odrůdy Malvaz s náchylnou odrů-



5. Rozdělení četností v symptomatickém hodnocení infekce BYDV (0–9; 0 – bez příznaků) u F_3 linií kříženců: a) Malvaz (M)/Akcent (Ak), b) Malvaz/Jaspis (J), c) Malvaz/Atribut (Ab) a d) Malvaz/Atlas 68 (At) – Frequency distribution for BYDV scores (0–9; 0 – without symptoms) from F_3 lines of crosses: a) Malvaz (M)/Akcent (Ak), b) Malvaz/Jaspis (J), c) Malvaz/Atribut (Ab) and d) Malvaz/Atlas 68 (At)

dou Jaspis, což ukazuje, že vzájemné křížení mírně odolných odrůd Malvaz a Atribut zřejmě není perspektivní cestou pro zvýšení rezistence.

Strategie ve šlechtění na rezistenci k BYDV

Vhodnou strategii naznačují výsledky dosažené u křížence Malvaz/Atlas 68 (tab. II, obr. 5d). Křížení donora genu *Yd2* (Atlas 68) s mírně odolnou českou odrůdou Malvaz vedlo k výraznému rozšíření genetické variability ve stupni rezistence (s^2 u Malvaz/Atlas 68 = 1,84, zatímco u Malvaz/Atribut = 0,43) a 35 % linií vykazovalo dokonce vyšší stupeň rezistence (2–3,5) než rezistentní odrůda Atlas 68.

Nezbytnost kombinování major a minor genů rezistence je odůvodněna jednak zjištěním částečné efektivity genu *Yd2* v některých genetických pozadích (Quail et, 1983) a dále tím, že pro dosažení trvalejší (durable) rezistence k chorobám je obecně požadováno založení rezistence více geny. Ze šlechtitelského hlediska je rozhodující předložení rychlého a zároveň efektivního postupu dosažení požadovaného stupně rezistence.

V současné době je efektivní gen *Yd2* přítomen v odrůdách či liniích, které jsou morfogeneticky značně odchylné od současných českých povolených odrůd ječmene jarního. Důležitým krokem je zhodnocení komplexu agronomicky významných znaků u donorů tohoto genu a výběr nejvhodnějšího donora pro hybridizaci s mírně odolnými moderními odrůdami. Monogenní založení rezistence genem s velkým účinkem umožňuje efektivní výběr na přítomnost genu *Yd2* podle testace v polních podmínkách, nebo po odvození molekulárních diagnostických markerů též nedestruktivně a se zkrácením cyklu. Nutná je rekurentní selekce s opakovaným zpětným křížením s mírně odolným rodičem – moderní povolenou odrůdou jarního ječmene. Podobně jak bylo popsáno v pokusech s přenosem rezistence k BaYMV (Foroughi - Wehr, Wenzel, 1990), je výhodnou cestou k urychlení šlechtitelského procesu využití rekurentní selekce s haploidními kroky. Vytvořený dihaploidní materiál (regenerovaný z F_2 mikrospór) segreguje v rezistenci založené jedním genem v poměru 1 : 1, což usnadňuje výběry v provokačních testech. Materiál je homozygotní a tak lépe zhodnotitelný i v ostatních znacích již v generaci A_2 . Na zřeteli je však třeba mít, že čím jsou rodiče v morfofyzilogických znacích vzdálenější, tím větší rozsah populace dihaploidních linií je žádoucí.

Udávaná spojitost vyššího účinku genu *Yd2* s větší délkou rostliny a rychlejším růstovým rytmem (viz Studium genetické diversity materiálu segregujícího v genu *Yd2*), která by mohla být překážkou šlechtitelského pokroku ve studovaných podmínkách, nebyla v našich testech prokázána. Naopak ve zkoušených podmínkách byla zjištěna z korelační analýzy mezi SH a dobou metání u skupiny odolných, neštěpících linií generace F_3 křížence Atlas 68/Akcent významná negativní korelace ($r = -0,622^{++}$), což ukazuje, že vyšší stupeň rezistence lze očekávat při pozdějším metání (blízkém odrůdě Akcent). Také porovnání stupně rezistence u odrůd, které jsou nositeli tohoto genu ukazuje, že vyšší stupeň rezistence byl zjištěn u později metajících odrůd Sutter (3,0) a Brea'S'Ben (3,3) než u extrémně rané odrůdy

Atlas 68 (4,1) (též údaje z tab. III). Korelace mezi SH a výškou rostliny byla statisticky nevýznamná ($r = 0,037$), a tak vysoký stupeň rezistence lze očekávat při rozdílné výšce rostliny. Vzhledem ke složitému genetickému založení jakosti zrna je také málo pravděpodobná spojitost vysoké rezistence podmíněné genem *Yd2* se zhoršenými parametry kvality, jak uvádějí Comeau a Jedlinski (1990). Naopak příznivá pro šlechtění je vazba genu *Yd2* s genem determinujícím rezistenci k *Rhynchosporium secalis* (Qualset et al., 1990). Uvedená zjištění jsou nepochybně povzbuzením pro naše šlechtění, ale na závěr je třeba připomenout, že vzhledem k prokázanému ovlivnění stupně rezistence genetickým pozadím i podmínkami prostředí mohou garantovat úspěch šlechtění jen širší rozsahy testovaného materiálu a víceleté údaje o jeho reakci na infekci BYDV.

L i t e r a t u r a

- BURNETT, P. A., COMEAU, A., QAULSET, C. O. (1995): Host plant tolerance or resistance for control of barley yellow dwarf virus. In: D'ARCY, C. J., BURNETT, P. A. (Eds.): Barley Yellow Dwarf – 40 Years of Progress. APS Press, St. Paul, Minnesota, Canada: 321–343.
- CATHERALL, P. L., HAYES, J. D. (1966): Assessment of varietal reaction and breeding for resistance to yellow dwarf virus in barley. *Euphytica*, 15: 39–51.
- CLARK, M. F., ADAMS, A. N. (1977): Characteristics of the microplate methods of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.*, 34: 475–483.
- COLLINS, N. C., PALTRIDGE, N. G., FORD, C. M., SYMONS, R. H. (1996): The *Yd2* gene for barley yellow dwarf virus resistance maps close to the centromere on the long arm of barley chromosome 3. *Theor. Appl. Genet.*, 92: 858–864.
- COMEAU, A., ST-PIERRE, C. A. (1982): Trials on the resistance of cereals to barley yellow dwarf virus (BYDV). Report no 4. Res. Stat. Agric. Canada, Sainte-Foy, Quebec, Canada: 132s.
- COMEAU, A., JEDLINSKI, H. (1990): Successful breeding for barley yellow dwarf resistance or tolerance: a systematic approach related to other agronomic characteristics. In: BURNETT, P. A. (Ed.): World Perspectives on Barley Yellow Dwarf. Mexico, CIMMYT: 441–451.
- DELOGU, G., CATTIVELLI, L., SNIDARO, M., STANCA, A. M. (1995): The *Yd2* gene and enhanced resistance to barley yellow dwarf virus (BYDV) in winter barley. *Plant Breeding*, 114: 417–420.

FUROUGHI-WEHR, B., WENZEL, G. (1990): Recurrent selection alternating with haploid steps – a rapid breeding procedure for combining agronomic traits in inbreeders. *Theor. Appl. Genet.*, 80: 564–568.

GILL, C.C., BUCHANON, K. W., WESTDAL, P. H. (1969): Susceptibility to the yellow dwarf virus of barley varieties grown in Manitoba, and assessment of African varieties for tolerance. *Can. J. Plant Sci.*, 49: 287–292.

JONES, A. T., CATHERALL, P. L. (1970): The relationship between growth rate and the expression of tolerance to barley yellow dwarf virus in barley. *Annals Appl. Biol.*, 65:137–145.

PIKE, K. S. (1990): A review of barley yellow dwarf virus grain yield losses. In: BURNETT P. A. (Ed.): *World Perspectives on Barley Yellow Dwarf*. Mexico, CIMMYT: 368–382.

QUALSET, C. O. (1983): Evaluation and breeding methods for barley yellow dwarf resistance. *Barley Yellow Dwarf*. In : *Proc. Workshop*. Mexico, CIMMYT: 72–80.

QUALSET, C. O., LORENS, G. F., ULLMAN, D. E., McGUIRE, P. E. (1990): Genetics of host plant resistance to barley yellow dwarf virus. In: BURNETT, P. A. (Ed.): *World Perspectives on Barley Yellow Dwarf*. Mexico, CIMMYT: 368–382.

RASMUSSEN, D. C., SCHALLER, C. W. (1959): The inheritance of resistance in barley to the yellow-dwarf virus. *Agron. J.*, 51: 661–664.

SCHALLER, C. W., RASMUSSEN, D. C., QUALSET, C. O. (1963): Sources of resistance to the barley yellow dwarf virus in barley. *Crop Sci.*, 3: 342–344.

SCHALLER, C. W., QUALSET, C. O. (1980): Breeding for resistance to barley yellow dwarf virus. In: *Proc. Third Int. Wheat Conf.*, Madrid, Spain University of Nebraska Agric. Exper. Stat. Public. MP, 41: 528–541.

SINGH, R. P., BURNETT, P. A., ALBARRÁN, M., RAJARAM, S. (1993): Bdv 1: A gene for tolerance to barley yellow dwarf virus in bread wheats. *Crop Sci.*, 33: 231–234.

SUNESON, C. A. (1955): Breeding for resistance to barley yellow dwarf virus in barley. *Agron. J.*, 47: 283.

ŠÍP, V., VACKE, J., ŠKORPÍK, M. (1996): Increasing resistance to barley yellow dwarf virus (BYDV) in spring barley and wheat. *Annual Report 1996, RICP, Prague*: 29.

TOLA, J. E., KRONSTAD, W. E. (1984): The genetics of resistance to barley yellow dwarf in wheat. In *Barley Yellow Dwarf*. Mexico, CIMMYT: 83–91.

VACKE, J. (1964): Žlutá zakrslost ječmene v ČSSR. *Rost. Výr.*, 10: 859–869.

VACKE, J. (1988): Výskyt viru žluté zakrslosti ječmene na ozimých obilovinách. In: *Sbor. Ref. XI. Konf. Ochr. Rostl.*, Nitra: 203–204.

VACKE, J. (1991): Výskyt virů na obilovinách a jejich škodlivost. In: *Sbor. Refer. Aktuální problémy ochrany polních plodin*. Praha: 100–109.

VACKE, J., ŠÍP, V., ŠKORPÍK, M. (1996): Reakce vybraných odrůd pšenice jarní na infekci virem žluté zakrslosti ječmene. Genet. a Šlecht., 32: 95–106.

VACKE, J., ŠÍP, V., ŠKORPÍK, M. (1997): Reakce vybraných odrůd a novošlechtění ječmene jarního na infekci virem žluté zakrslosti ječmene. Genet. a Šlecht., 33: 33–44.

Došlo 27. 10. 1997

Kontaktní adresa:

Ing. Václav Šíp, CSc., Výzkumný ústav rostlinné výroby, 161 06 Praha 6-Ruzyně,
Česká republika

tel.: + 420 2 360 851, fax: + 420 2 365 229

Z VĚDECKÉHO ŽIVOTA

XVIII. Mezinárodní travinářský kongres

se koná ve čtyřletých intervalech. Letos, v době od 8. do 19. června, byla hostitelskou zemí této vrcholné travinářské, či spíše pícninářské události Kanada, resp. Winnipeg (Manitoba) a Saskatoon (Saskatchewan). Pořadatelé pravděpodobně s ohledem na velký počet příspěvků zvolili systém úvodních, šířeji koncipovaných přednášek, které iniciovaly každou ze tří sekcí. Jednalo se o sekci „rostlinnou“, která zahrnovala tematické okruhy počínající tvorbou odrůd a introdukcí nových druhů až po pastevní techniku a semenářství, dále sekci „živočišnou“, která se zabývala kvalitativními aspekty pícnin jakožto podstatných komponent výživy zvířat, a dále „travinářskou“, zahrnující otázky alternativního využití pícnin, biodiverzity, anebo sociálními a ekonomickými aspekty travních porostů. Po úvodních referátech následovala diskuse u posterů, kterých byl opravdu úctyhodný počet – plných 1032.

Kanadští pořadatelé demonstrovali vysokou úroveň domácího travinářství i na exkurzích – jednak na hlavní, mezikongresové, která zároveň spojovala přesun účastníků z Manitoby do Saskatchewanu, jednak na dvou půldenních výjezdech. Pro většinu účastníků konference, kteří byli v Kanadě poprvé, bylo jistě překvapujícím a inspiřujícím dojmem, jak kanadští farmáři dovedou v relativně velmi obtížných podmínkách, které jsou ohraničeny pouze pětíměsíční vegetační dobou, dosáhnout pozoruhodných výsledků ve výrobě pícnin – ať už semen, nebo píce. Na druhé straně řada z nás záviděla upřímně přízeň, kterou vláda věnuje zemědělství – bylo to patrné nejenom z rozhovorů s farmáři, ale i z vybavení obou zemědělských univerzit jak ve Winnipegu, tak v Saskatoonu.

Vhodným se ukázalo také spojení výstavy zemědělských podnikatelských subjektů s kongresem, kde se navazovaly přímé obchodní kontakty i probíhala čilá výměna informací.

Pro všímavého účastníka konference bylo velkým požitekem také setkání s travami, které jako všudypřítomná zeleň hrají v Kanadě nezastupitelnou roli. Jsou integračním prvkem městské výstavby, nepostradatelné na dálničních mezípařkách, golfových a kriketových hřiřtích i jednotlivých prvkem univerzitních kampusů. Po tom všem, co travinářský kongres nastínil, se skoro zdálo, že kanadským národním znakem by neměl být červený javorový list, ale zelený čtyřúhelník travnaté plochy, tolik typický při pohledu z letadla na provincie západní Kanady.

Ing. Bohumír Čagaš, CSc., Ing. V. Pavlů

PŘEHLEDY

VYUŽITÍ BIOCHEMICKÝCH MARKERŮ VE ŠLECHTĚNÍ ŘEPKY A DALŠÍCH BRUKVOVITÝCH PLODIN*

Vladislav ČURN, Lenka SÁKOVÁ

Jihočeská univerzita, zemědělská fakulta, České Budějovice, Česká republika

Olejniny jsou významnými zemědělskými plodinami, které zabezpečují výživu lidí a jsou také důležitou surovinou pro průmyslové zpracování, případně pro chemický průmysl. Jsou rovněž cenným bílkovinným zdrojem pro výrobu krmiv a perspektivně i pro lidskou výživu. V ekologických podmínkách naší republiky je nosnou olejinou ozimá řepka.

Řepka olejná (*Brassica napus* L. var. *napus*) je amfiallotetraploid s 38 chromozomy. Její původní výskyt je vázán na středomořské genetické centrum, kde jsou také oblasti výskytu jejich původních rodičovských komponent – *Brassica oleracea* L. (brukev zelná) a *Brassica campestris* L. (řepice olejná). Spontánní hybridizací těchto dvou druhů s diploidním počtem chromozomů a následnou amfidiploidizací vznikla řepka olejná se svojí poměrně složitou genetickou strukturou.

Historie pěstování řepky a dalších brukvovitých plodin je již dávno spojena s kulturou člověka – původní uplatnění druhů z širokého a variabilního rodu *Brassica* jako zeleniny či pochutiny. Zeleninové typy brukvovitých rostlin byly široce využívány již v neolitu, staré indické písemné prameny uvádějí, že „Siddhartha“ (*B. campestris*) byla pěstována již 2000–1500 let př. n. l. Na evropském kontinentě bylo významné uplatnění těchto plodin již v dobách antického Řecka a Říma (Fussell, 1966; Labana, Gupta, 1993; Murphy, 1994) a v Anglii a v Nizozemsku již v 16.–17. století přerostlo v širší uplatnění olejnatých semen řepky a řepice, zprvu na technické účely (svícení, mydlářství), později i na potravinářské využití (Fussell, 1966; Seeborn, 1976). Na našem území dochází k většímu rozmachu v pěstování řepky počátkem minulého století (Fábry et al., 1992; Vašák, Fábry, 1994). Od 50. let dvacátého století se stala řepka velmi významnou potravinářskou plodinou, nově nabývá na významu i využití řepky pro technické účely i jako obnovitelného zdroje energie (Scarlsbrick et al., 1989).

* Zpracováno na základě výsledků výzkumných projektů z let 1991–1995, řešeno za podpory grantů EC-TEMPUS-JEP-2216 (EC Brussel), GA 56/93/0998 (Grantová agentura ČR), 04/93 a 05/94 (JU-ZF).

U řepky, stejně jako je tomu u ostatních pěstovaných rostlin, je odrůda nositelem znaků a kvalitativních vlastností jak z hlediska nutričního a technologického, tak i z hlediska hygienické jakosti, a spektrem svých znaků a vlastností se odlišuje od ostatních pěstovaných odrůd. Proto mají pro hodnocení kvality zemědělských produktů a potravin takový význam metody, kterými je možné charakterizovat identitu, původnost a čistotu odrůdy. Mnohé zemědělské plodiny mají velký počet odrůd a pro povolení nové odrůdy k pěstování a prodeji platí ve většině zemí přísná pravidla. Základem těchto pravidel bývá striktní charakteristika, která dovoluje novou odrůdu (resp. novošlechtění) odlišit od jiných již pěstovaných odrůd. K tomuto účelu jsou většinou používány popisné morfologické znaky, které však jsou u mnohých komerčně významných skupin plodin obtížněji použitelné.

Aplikace metod molekulární biologie v této oblasti umožňuje využití různých bílkovinných a enzymových systémů jako biochemických genetických markerů pro popis a identifikaci genotypů/odrůd. U některých plodin je s úspěchem využívána i možnost rozlišení genotypů na úrovni DNA, na základě polymorfismu DNA. Tyto metody začínají být nejen šířeji uplatňované ve šlechtitelské a semenářské práci (popis, zkoušení a právní ochrana odrůd, zkoušení a certifikace osiv), ale „biochemické a molekulárně biologické certifikáty“ mohou být v řadě států vyžadovány i při mezinárodním obchodu s osivy, sadbou i zemědělskými produkty (Sýkorová, 1992; Horváth, 1993; Juráček, Múdry, 1994).

Rovněž izoenzymy i zásobní proteiny jsou již po relativně dlouhé období využívány jako biochemické markery ve šlechtitelské a semenářské praxi. U brukvovitých rostlin metoda analýzy izoenzymů a proteinů pomocí elektroforézy na gelovém nosiči (agaru, škrobu nebo polyakrylamidu) našla své uplatnění v taxonomických a fylogenetických studiích (Vaughan, Waite, 1967; Truco, Arús, 1987), v identifikaci mezirodových hybridů po somatické hybridizaci – fúzi protoplastů (Sundberg, Glimelius, 1986, 1991) a v charakterizování adičních linií (Chevre et al., 1991). Pravděpodobně nejvýznamnější aplikaci lze spatřovat v kontrole čistoty osiva F_1 hybridů (Nijenhuis, 1971; Woods, Thurman, 1976; Wills et al., 1979; Wills, Wiseman, 1980; Suurs, 1986) a v identifikaci a charakterizování odrůd zemědělských plodin (Arús, 1985; Mündges, 1990).

Zejména tyto dvě poslední aplikace nabývají v současné době stále více na významu, mnohé šlechtitelské a semenářské firmy využívají biochemické a molekulární markery ve svých šlechtitelských programech, ke kontrole čistoty osiva (F_1 hybridů a klasických odrůd) a k identifikaci odrůd (Hackeman, pers. com.). Z hlediska předpisů UPOV jsou pro právní ochranu odrůdy vyžadovány tzv. DUS testy a používání mnohdy pouze morfologických znaků pro charakterizování a odlišení odrůd již u některých rostlin nepostačuje. Biochemické genetické markery mohou být

vhodným doplňkem klasických popisných metod a mohou napomoci k identifikaci a odlišení u některých skupin plodin (Nielsen, 1985; Horváth, Horváth, 1994).

Genetické bílkovinné markery

Genetický marker (signální gen) se používá pro označení jasně fenotypově se projevujícího znaku s jednoduchou dědičností. Označení marker pak předpokládá spojení tohoto znaku genovou vazbou s jinými kvantitativními či kvalitativními znaky (Sozinov, 1985). Genetické biochemické markery se musí vyznačovat dostatečnou genetickou a jí odpovídající fenotypovou variabilitou, vysokou expresivitou a penetrancí a rovněž vysokou heritabilitou, tj. nezávislostí na podmínkách prostředí (Šašek et al., 1983).

Bílkoviny mohou velmi dobře splňovat kritéria pro genetické markery, neboť se vyznačují vysokým stupněm geneticky fixovaného polymorfismu, kodominantní dědičností, rozlišitelností alel v individuích, jistou mírou nezávislosti na vnějších podmínkách. Takovými systémy mohou být zásobní bílkoviny nebo izoenzymy (molekulární formy enzymů). V principu všechny bílkoviny vykazující genetický polymorfismus mohou být využity jako diferenční markery u odrůd, a to s větším efektem než klasické morfologické markery (Sýkrová, Hadačová, 1992).

Morfologické znaky mají několik nevýhod, pokud jsou používány jako markery v rostlinné genetice a šlechtitelských postupech. Recesivní alely genů kódujících morfologický projev (znak) se v homozygotním stavu nemusí projevit, nebo mohou být ztrátové. Také epistatický nebo pleiotropický efekt takových genů může limitovat počet markerů použitelných v jednom souboru. Naproti tomu alely (alozymy) většiny izoenzymových lokusů jsou kodominantní a mohou se pak projevit i v případě recesivity nebo pleiotropie. Tato kodominance také umožňuje rozlišit heterozygoty od homozygotů. Izoenzymy jen zřídka vykazují epistatický projev, což pak umožňuje použít u daného materiálu značně rozsáhlejší počet markerů. Molekulární markery jsou proti morfologickým i více nezávislé na vnějších podmínkách prostředí (Moore, Collins, 1983).

V roli biochemických markerů se kromě izoenzymů používají i neenzymatické bílkoviny (např. zásobní proteiny), markery na úrovni DNA (RFLP markery mající kodominantní charakter, RAPD markery charakterizované dominantním charakterem a řada dalších technik, např. AP-PCR, DAF, MAAF, metody izotopového i neradioaktivního fingerprintingu), je možné použít i jiných metabolitů, např. mastných kyselin, u nižších rostlin i sekundárních metabolitů a pigmentů (Song et al., 1988; Tanksley et al., 1989; Hu, Quiros, 1991; Parent, Pagé, 1992; Waugh, Powell, 1992; Davik, 1993; Horváth, 1993). I tyto biologické makromolekuly, markerovací systémy, v různé míře splňují požadavky biochemických markerů, tj.

nezávislost na podmínkách prostředí, genetický polymorfismus, přítomnost vhodné separační a detekční techniky.

Další výhodou biochemických markerů bývá možnost rychlého testování rozsáhlého materiálu; tento proces je nedestruktivní, tj. pro analýzu se používá jen malá část rostlinné tkáně. Použití molekulárních markerů má proti morfologickým klasickým znakům výhody i v možnosti sledování většího počtu žádaných znaků. Navíc velmi často je možné testovat rostliny v klíčním stavu a dále si ponechat jen rostliny vhodného genotypu. Tento fakt je příznivý zejména pro aplikace ve šlechtění (Moore, Collins, 1983).

Mnoho ekonomicky významných rostlinných druhů zahrnuje velký počet odrůd, z nichž mnohé jsou blízké příbuzné. V případě agronomicky ceněných druhů může mít značný ekonomický význam možnost rozlišení odrůd. V mnoha zemích platí v různé úpravě šlechtitelská práva a omezení pro povolení nové odrůdy na trhu. Jedno z těchto omezení je jasná charakteristika, která může odlišit odrůdu od všech ostatních povolených odrůd. U mnohých významných druhů (obilniny, řepa, píce a další) existuje značné množství odrůd a mnohé nové odrůdy (novošlechtění) často nejsou akceptovány vzhledem k nemožnosti odlišení ve znacích používaných pro rozlišení a charakteristiku odrůd, resp. genotypů (Nielsen, 1985). Z tohoto důvodu vyvstává potřeba nových kvalitativně odlišných znaků pro charakterizování odrůd, genotypů, a mnohé morfologické znaky používané v současnosti pak budou nahrazeny novými charakteristikami. V současné době probíhají diskuse mezi šlechtiteli a správním aparátem, jaké biochemické markery a v jakém rozsahu budou používány pro potřeby identifikace odrůd (Horváth, 1993).

Izoenzymy se používají jako markery v genetickém výzkumu mnoha druhů a jsou vhodné i jako biochemické markery pro identifikaci odrůd. Některé proteiny bez detekovatelné enzymatické aktivity (např. zásobní proteiny) jsou rovněž vysoce polymorfní a jsou vhodné jako biochemické markery pro tyto účely. V principu všechny enzymy nebo proteiny, které vykazují genetickou variabilitu, mohou být použity jako markery k označení odrůd.

Volba vhodného biochemického markerovacího systému (na úrovni DNA, proteinu nebo enzymu) je založena na těchto požadavcích:

- dostatečná frekvence genetických variant u daného druhu,
- exprese nezávislá na podmínkách prostředí,
- vhodná elektroforetická a detekční technika (Nielsen, 1985).

Již řada dřívějších studií při použití elektroforetických metod ukázala na výskyt geneticky kontrolovaných enzymových variant (izoenzymů) u celé řady rostlinných druhů (Shannon, 1968; Scandalios, 1969, 1974; Gottlieb, 1981). Mnozí autoři poukazovali na jejich možné aplikace v taxonomických, populačně genetických i šlechtit-

telských aplikacích. Izoenzymy a proteiny byly testovány u celé řady druhů rostlin i z hlediska možného charakterizování a identifikace odrůd (Nielsen, 1985).

Přehledné údaje o využití isoenzymů, proteinů (a případně i DNA markerů) v genetických (systematických, evolučních, populačně biologických, biotechnologických) studiích a šlechtění rostlin poskytují Brewer a Sing (1970), Ferguson (1980), Jensen a Fairbrothers (1983), Tanksley a Orton (1983a, b), Pasteur et al. (1988), Weeden (1989), Hillis a Moritz (1990), Soltis a Soltis (1990), Hoelzel (1992), Linskens a Jackson (1992), Zimmer et al. (1993).

Významný je také způsob vyhodnocování získaných elektroforetických dat a způsob jejich interpretace. Výsledné spektrum proužků proteinů nebo enzymů na gelu je nazýváno elektroforetický fenotyp. Tento fenotyp je značně proměnlivý ve své komplexitě, závisí na řadě faktorů, např. druhu organismu, tkáni, analyzovaného enzymu nebo proteinu. V některých případech je tvořen pouze jedním nebo několika nevariabilními proužky, totožnými ve všech vzorcích. Naopak některé enzymy mohou být kódovány více geny a zobrazují se pak jako komplexní fenotyp s 15–20 i více proužky u jedince. Následující faktory se považují za primární determinanty počtu pozorovaných proužků: počet kódujících genů, jejich alelický stav (homozygotní nebo heterozygotní), kvaterní struktura bílkovinné molekuly, a její subcelulární kompartmentace (Weeden, Wendel, 1990; Wendel, Weeden, 1990). Příklady genetické interpretace isoenzymové elektroforézy, charakter spektra monomerních a polymerních bílkovinných molekul uvádí řada autorů (např. Harris, Hopkinson, 1976; Pasteur et al., 1988; Wendel, Weeden, 1990; Acquaah, 1992; May, 1992).

Aplikace biochemických markerů u brukvovitých plodin

Rod *Brassica* zahrnuje diploidní a amfiploidní druhy (používané jako zelenina, olejnin, krmivo), které jsou samosprašné i cizosprašné. U brukvovitých zelenin (zelí, kapusta, květák, růžičková kapusta, brukev, brokolice) se v posledních letech velmi rozšířilo pěstování hybridních F_1 odrůd, jejichž čistotu z hlediska příměsí nehybridních rostlin je možné velmi efektivně kontrolovat pomocí různých enzymových markerů, což je rychlejší a levnější než biologické testy u klíčících rostlin (Arús, 1983; Arús, Shields, 1983).

V následujícím přehledu jsou uvedeny nejvýznamnější aplikace použití izoenzymů a proteinů separovaných elektroforetickými technikami jako biochemických genetických markerů u brukvovitých plodin:

- taxonomické a populačně genetické studie
- genetická analýza somatických a vzdálených hybridů
- markerování morfologických a fyziologických znaků, konstrukce genových map
- využití izoenzymů a proteinů ve šlechtění a semenářství a pro účely identifikace odrůd

Taxonomické a populačně genetické studie

Elektroforetická spektra proteinů semene a enzymů u zástupců rodu *Brassica* a blízkce příbuzných hořčic (*Sinapis* sp.) byla zprvu používána pro studium fylogenetických vztahů a pro taxonomické studie u brukvovitých rostlin. První studie se týkaly zásobních proteinů u zástupců rodu *Brassica* a hořčic (Vaughan et al., 1966; Vaughan, Waite 1967; Vaughan, Denford, 1968). Semenné bílkoviny separované pomocí elektroforézy byly u řepky používány jako markery při taxonomických studiích pro charakterizování a odlišení genotypů a skupin genotypů řepky, resp. jednotlivých druhů rodu *Brassica* (Vaughan, Gordon, 1973; Šašek et al., 1978; Yada va et al., 1979; Gupta, Röbbelen, 1986; Sánchez-Yélamo et al., 1992). Problémem je poměrně vysoký počet zón získaný po elektroforéze, špatné rozlišení některých zón a poměrně blízká spektra.

V taxonomických studiích byly využívány i izoenzymové markery, jejich použití je nyní pravděpodobně častější (Denford, Vaughan, 1977; Truco, Arús 1987; Arús et al., 1991, 1992). Denford a Vaughan (1977) např. využívali řady enzymových systémů (ACP, ALP, CAT, EST, GDH, LAP, PER) k srovnávacím studiím izoenzymů semen v rámci rodu *Brassica*, Truco a Arús (1987) studovali charakter spektra izoenzymů PGM, PGI, GOT, LAP, ADH u *B. napus* ve vztahu k rodičovským druhům a usuzovali na možný fylogenetický původ jednotlivých izoenzymů. Delourme a Foisset (1991) studovali devět enzymových systémů u genotypů *B. napus* odlišného geografického původu. Polymorfismus izoenzymů je uvažován i jako efektivní nástroj ke studiu genetiky a evoluce populací (Arús, Orton, 1983).

Kromě elektroforetických technik bývají pro taxonomické účely využívány i další chemotaxonomické metody (Dass, Nybom, 1967; Vaughan, Gordon, 1973; Tsukamoto et al., 1993).

Izoenzymové markery (a v některých případech i proteinové markery – albuminy) se používají i ke zjišťování charakteru uměle resyntetizovaných amfidiploidů *B. napus* (Vaughan et al., 1970; Schenck, Wolf, 1986; Sundberg, Glimelius, 1986; Thorpe, Duke, 1993) a při porovnání charakteru amfidiploidních rostlin s původními rodičovskými druhy (Mündges et al., 1989). V případě nově resyntetizované řepky nebo somatických hybridů jsou někdy zmiňovány i různé interakce mezi genomy na úrovni exprese nebo represe některých izoenzymů, formování hybridních enzymů ve srovnání s rodičovskými typy (Chen, Heneen, 1989; Sjödin, Glimelius, 1989). Enzymová elektroforéza je používána i k porovnání nově resyntetizovaných *B. napus* z rodičovských diploidních druhů *B. campestris* a *B. alboglabra* a k porovnání s kulturní *B. napus* (Chen et al., 1989).

Genetická analýza somatických a vzdálených hybridů

Metoda izoenzymové analýzy je využívána i pro potvrzení somatických hybridů jako důkaz hybridnosti rostlin vzniklých po fúzi protoplastů. Jako markerů pro účely

testování hybridnosti regenerovaných rostlin byla používána řada enzymových systémů. Pomocí izoenzymů LAP a IDH byla prováděna verifikace hybridního charakteru regenerantů, fertálních somatických hybridů *B. napus* a *Arabidopsis thaliana* (Forsberg et al., 1994). Izoenzymy LAP, SDH, G-6-PDH, PGM a PGI byly využity k testování *B. naponigra*, somatického hybridu rezistentního k *Phoma lingam* (Sjödín, Glimelius, 1989). Izoenzymový systém LAP sloužil k charakterizování hybridů *B. napus* a *B. oleracea* (Sundberg, Glimelius, 1991), 6-PGDH a PGM pro *B. napus* a *Raphanus sativus* (Sundberg, Glimelius, 1991). Kato a Tokumasu (1979) porovnávali prostřednictvím isoenzymů EST a PER *Brassicoraphanus* s jeho rodičovskými druhy (*B. japonica* a *Raphanus sativus*).

Markerování morfologických a fyziologických znaků, konstrukce genových map

Izoenzymy společně s mastnými kyselinami a RFLP markery sloužily pro charakterizování disomických adičních linií *B. napus* ($\times$ *B. nigra*), u nichž jeden pár homologních chromozomů z hořčice černé byl přidán do genomu řepky (Chevre et al., 1991). Série izoenzymů, RFLP a RAPD markerů byly používány i pro charakterizování a identifikaci monosomických adičních linií *B. napus* (AACC + 1B, $2n = 39$), různé studie se týkají zjišťování vztahu a místa izoenzymových markerů v genetických (RFLP) mapách (Chevre et al., 1991; Struss et al., 1992). ACO a GPI izoenzymy mohou být využity jako markery při křížení *B. napus* $\times$ *Sinapis alba* potvrzující přenos genů mezi těmito druhy (Ripley et al., 1992). Enzymové markery nacházejí své uplatnění i na *in vitro* úrovni, např. pro porovnání intaktních a regenerovaných rostlin (Maršálek et al., 1989).

Využití izoenzymů a proteinů ve šlechtění a semenářství a pro účely identifikace odrůd

Jedna z prvních aplikací izoenzymové elektroforézy ve šlechtění a semenářství rostlin a první studie směřující do oblasti intraspecifické variability u *B. oleracea* se týkala izoenzymů ACP u různých F_1 hybridních odrůd růžičkové kapusty (Nijenhuis, 1971).

Tato aplikace, tj. kontrola hybridnosti a čistoty osiva, má zejména u brukvovitých zelenin asi největší možnosti využití (Woods, Thurman, 1976; Wills et al., 1979; Wills, Wiseman, 1980; Arús et al., 1982; Gasanova, 1990). Luhový a Reňáková (1989) používali izoenzymy ACP a PGM pro kontrolu hybridnosti F_1 hybridů růžičkové kapusty a testování homozygotnosti, resp. čistoty šlechtitelských linií. Izoenzymy kyselé fosfatázy umožňovaly i detekci přikřížení ředkve ohnice do genomu ředkvičky. Pomocí těchto enzymových systémů byly testovány populace kapusty pro výběr homozygotních linií pro tvorbu hybridů. Izoenzymy je možné také používat jako markery pro screening šlechtitelského materiálu, pro hodnocení čistoty

androgenetických linií řepky a novošlechtění kapusty (Thorpe, Duke, 1993; Čurn et al., 1994; Čurn, 1995).

Izoenzymové markery našly své uplatnění i při hodnocení míry cizosprášení u řepky. Řepka se považuje za převážně samosprašnou plodinu s jistou mírou cizosprášení. Podíl cizího sprášení je ovlivňován podmínkami prostředí a během množení odrůdy se pak mohou objevovat změny v hladině heterozygotnosti. Pomocí izoenzymové analýzy byla u odrůdy Topas na různých lokalitách v Evropě zjištěna úroveň cizosprášení 12–47 % (Becker et al., 1992).

V posledních několika letech se izoenzymy a v některých případech i zásobní proteiny a markery na úrovni DNA začínají využívat i ve šlechtitelských programech u řepky a pro účely charakterizování a identifikace odrůd (Hackenberg, pers. com.; Hartman, pers. com.; Hauska, pers. com.; Arús et al., 1985; Mündges et al., 1990). Přehled zjištěné variability u jednotlivých izoenzymových systémů a využití izoenzymových markerů ve šlechtění řepky a dalších brukvovitých plodin uvádějí Thorpe a Duke (1993). Projevuje se výraznější snaha o začlenění problematiky izoenzymů jako genetických markerů do šlechtitelských programů – jako markerů tolerance vůči suchu, CMS, triazinové rezistence a případně i kvantitativních znaků (Thorpe, Duke, 1993).

Na našem pracovišti (Laborať aplikované molekulární biologie Zemědělské fakulty Jihočeské univerzity) se problematikou biochemických genetických markerů v genetice a šlechtění brukvovitých plodin zabýváme již řadu let. Metodiky eklektroforetické analýzy byly zpracovávány ve spolupráci s De Montfort University, Leicester, U. K.

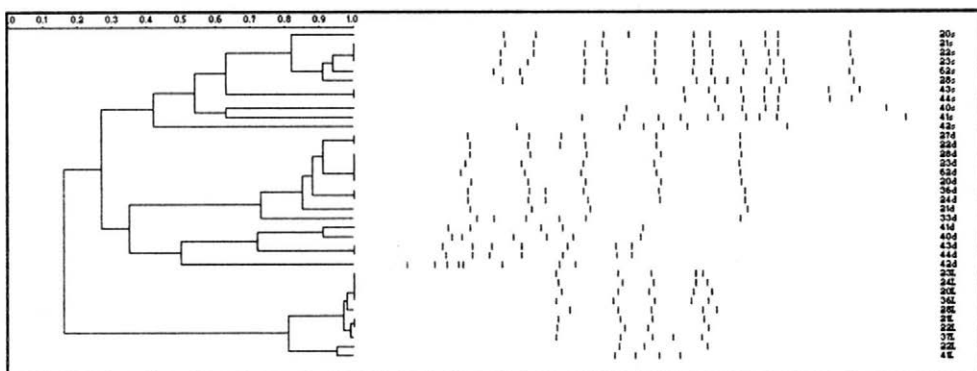
Během řešení experimentální části práce byly modifikovány a optimalizovány metodiky extrakce enzymů a proteinů z různých částí rostlinného těla u brukvovitých plodin, modifikovány metody elektroforetické separace izoenzymů a proteinů (převážně využívající diskontinuální systém elektroforézy na polyakrylamidovém gelu), ověřovány metody vyhodnocování elektroforeogramů a vypracována metodika digitální obrazové analýzy gelů při využití specializovaného software (Čurn, 1992, 1995a; Čurn et al., 1995).

Ontogenetická variabilita biochemických markerů

Vzhledem k variabilitě spektra izoenzymů i proteinů v různých částech rostliny a v různých ontogenetických fázích je nezbytné analýzy provádět ze stejné části rostliny, kultivované za standardních kontrolovatelných a definovaných podmínek.

Na obr. 1 je demonstrována ontogenetická variabilita izoenzymů esteráz analyzovaných v různém materiálu – v semeni, děložních listcích a mladých pravých listech. Výsledky analýzy ukazují, že tyto tři systémy jsou zcela nekompatibilní a nelze

porovnávat spektra izoenzymových markerů získaných z různého typu materiálu. Míra variability mezi odrůdami (genotypy) se pohybuje na úrovni 1–20 % (listy) až 5–50 % (semena a děložní lístky), ale je stále menší než míra ontogenetické variability. Odlišnost spekter EST z různých typů biologického materiálu je na úrovni 60–90 %.

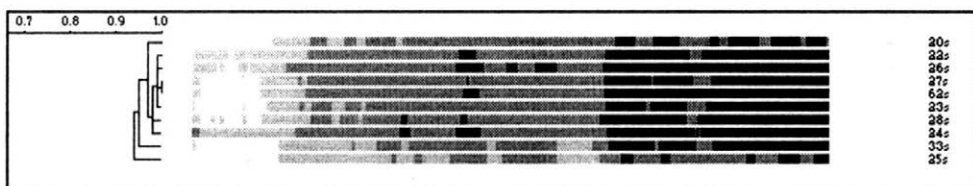


1. Spektrum izoenzymů esteráz (s – semena, d – děložní lístky, L – pravé listy)

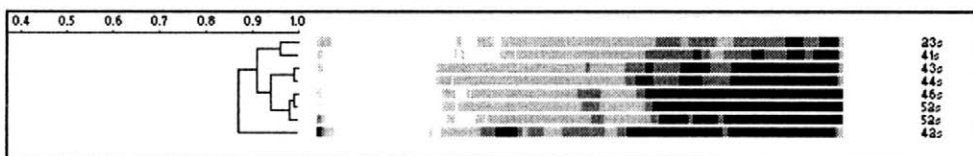
SDS-proteinové markery

Na obr. 2 a 3 jsou prezentovány výsledky analýz celkového proteinu semen a děložních lístků separovaného technikou SDS-PAGE. Dendrogramy získané na základě korelačních matic zobrazují míru podobnosti charakteristických spekter vybraných odrůd řepky a hořčice.

a) odrůdy řepky

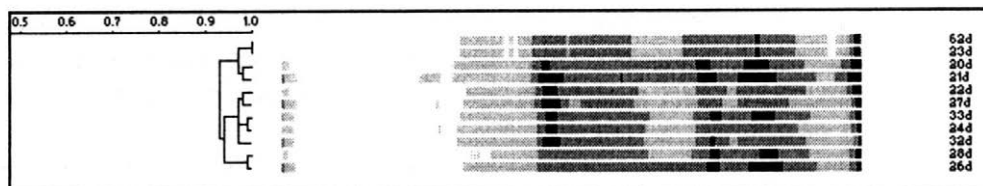


b) hořčice

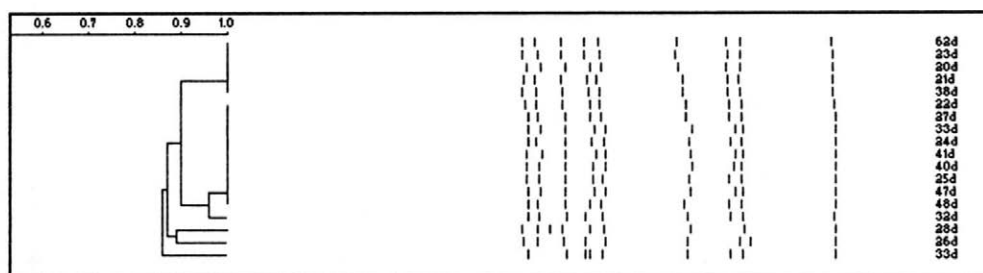


2. Dendrogramy – analýza výsledků SDS-PAGE proteinů ze semen odrůd řepky a dalších brukvovitých plodin

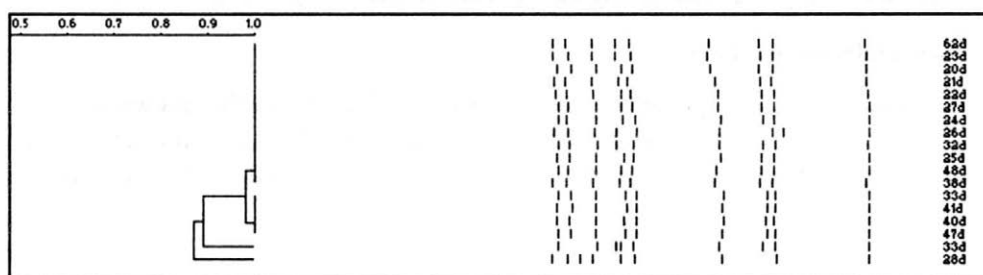
a) odrůdy řepky



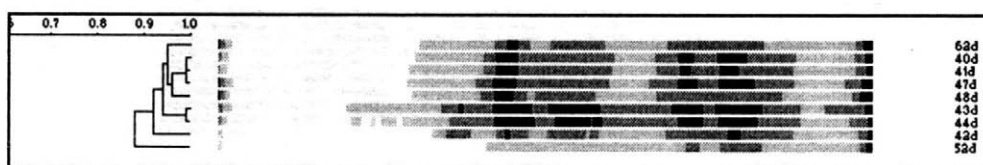
b) odrůdy řepky, dendrogram – podobnostní matice, citlivost 5 dpi



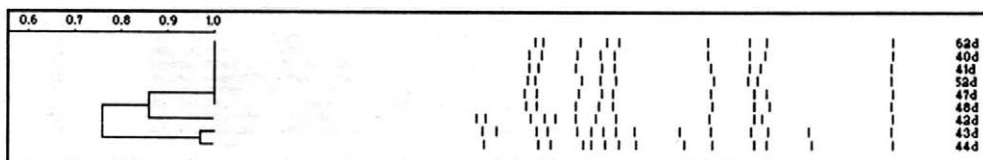
c) odrůdy řepky, dendrogram – podobnostní matice, citlivost 10 dpi



d) hořčice, dendrogram – korelační matice



e) hořčice, dendrogram – podobnostní matice, citlivost 5 dpi



3. Dendrogramy – analýza výsledků SDS-PAGE proteinů z děložních lístků odrůd řepky a dalších brukvovitých plodin

Odrůdy ozimých a jarních řepok se ve spektru zásobních proteinů semene příliš neliší, variabilita mezi odrůdami se pohybuje na úrovni 3–5 %. V mnohých případech jsou rozdíly mezi jednotlivými vzorky v rámci jedné odrůdy na stejné úrovni jako rozdíly meziodrůdové. Mírně vyšší míru odlišnosti mají ve spektru analyzovaných materiálů odrůdy Jet Neuf (25) a Mar (33).

Při porovnání odrůd řepok a dalších brukvovitých plodin se ukazují rozdíly na poněkud vyšší úrovni. Analyzované vzorky se po clusterové analýze seskupily do skupin řepka/řepice (v tomto případě Ceres, Rex, Jumbuck), barevné hořčice (43, 44), krmná kapusta a květák (52, 46), hořčice bílá (42). Odchytky, resp. míra odlišnosti mezi těmito skupinami byla na úrovni 5–10 %, nejvíce se odlišuje spektrum proteinů hořčice odrůdy Zlata.

Výsledky jsou obdobného charakteru jako u analýz proteinů ze semen. Charakter spektra proteinů u odrůd ozimých a jarních řepok je až na výjimky (Lirajet – 28, Mar – 33) téměř shodný. Dendrogram kalkulovaný s citlivostí 10 dpi (0,85 mm) lépe odráží vizuální charakter spektra, při vyšší citlivosti mohou být zdůrazněny i některé kvantitativní rozdíly, resp. přirozená variabilita biologického materiálu.

Při porovnání řepok s ostatními brukvovitými plodinami se ukazuje velmi výrazná odlišnost v charakteru proteinového spektra barevných hořčic a hořčice bílé. Míra odlišnosti (nepodobnosti) je daleko vyšší než v předchozím případě.

Pro hodnocení proteinových spekter je možné použít dva metodické postupy clusterové analýzy. První postup spočívá ve výpočtu korelačních matic (zohlednění-korelace všeobecného charakteru spektra, resp. absorbančního profilu elektroforetického spektra) a druhý využívá konstrukce podobnostní matice (hodnocení pozice píků na absorbančním profilu, tj. pozice proužků na elektroforetickém spektru). Dendrogram vytvořený na základě korelační matice v tomto případě dává nižší rozlišovací schopnost, míra podobnosti je velmi vysoká a jednotlivé genotypy prakticky nelze rozlišit. Tento postup je ale v případě komplexních spekter velmi rychlý. Vyšší rozlišovací schopnost je získána v případě porovnávání pozic jednotlivých proužků na gelu – u proteinových spekter je možné hodnotit celé spektrum, nebo jen majoritní proužky.

Proteiny (neenzymatické bílkoviny) lze u brukvovitých plodin použít spíše k charakterizování a rozlišení materiálů na vyšší taxonomické úrovni, na mezidruhové a meziorodové úrovni. Výraznější rozdíly byly patrné mezi skupinou odrůd řepok (*Brassica napus*), řepic (*Brassica rapa* [*B. campestris*]), barevných hořčic (*Brassica juncea* a *B. nigra*) a hořčice bílé (*Leucosinapis alba* [*B. hirta*, *B. alba*]).

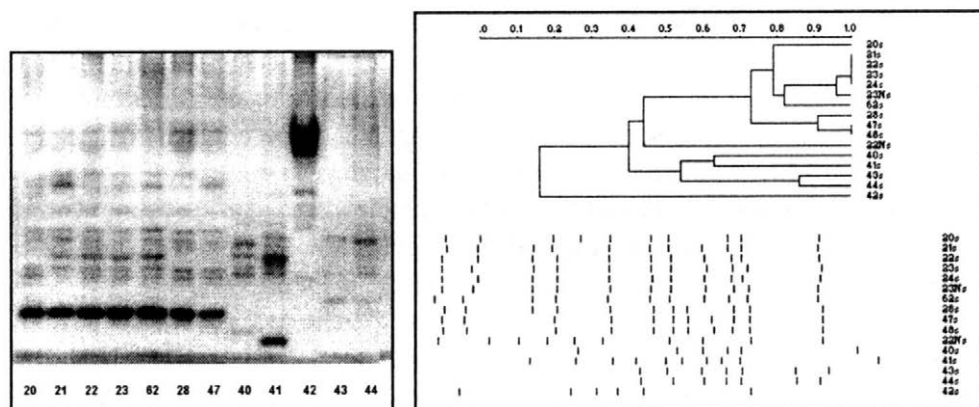
Izoenzymové markery

Izoenzymové markery (enzymové systémy ACP, LAP, SDH, EST, AAT, některé další dehydrogenázy) lze využívat ke kontrole čistoty šlechtitelského materiálu

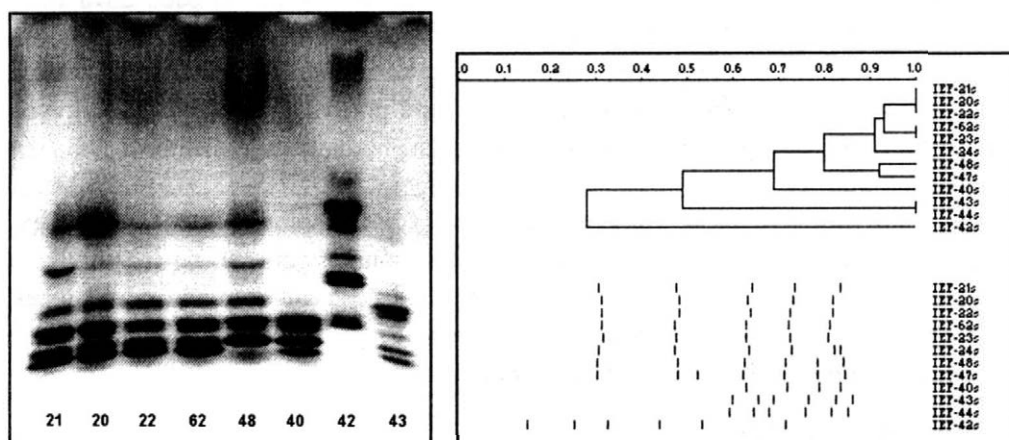
a odrůd. Kombinací několika izoenzymových markerovacích systémů je možné rychle a poměrně dobře detekovat míru homogenity v testovaném vzorku. Problematické zůstává využití těchto markerů pro účely jednoznačné identifikace odrůdy. S kontrolou čistoty šlechtitelského materiálu souvisí i kontrola čistoty a charakteristika komerčního osiva brukvovitých plodin.

Izoenzymy esteráz

Esterázové izoenzymy byly hodnoceny ze semen a děložních lístků. Stabilnější a lépe hodnotitelné spektrum bylo získáno ze semen. Na obr. 4 a 5 jsou výsledky analýz semenných esteráz po separaci metodou diskontinuální nadenaturační PAGE, resp. IEF.



4. Izoenzymy esteráz ze semen – dendrogram a spektrum izoenzymových proužků



5. IEF izoenzymů esteráz ze semen

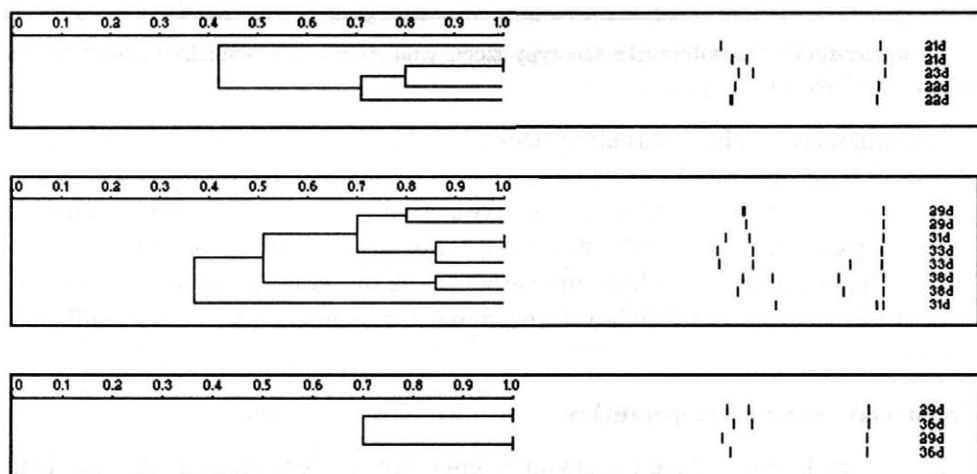
Izoenzymy esteráz extrahované ze suchých semen jsou charakteristické zřetelným, dobře separovaným a rozlišitelným spektrem. Pouze u hořčice bílé (odrůda Zlata) byla v oblasti okolo $R_f = 0,29$ výrazná nerozlišitelná zóna. Spektrum EST bylo nepříliš variabilní v souboru sledovaných odrůd. Lze poměrně dobře rozlišit skupinu odrůd řepky (s nepatrnými odchylkami ozimá/jarní), dále pak skupiny odrůd řepic (odlišné spektrum ozimá/jarní), hořčice bílé a barevných hořčic.

V případě použití izoelektrické fokusace pro separaci esterázových izoenzymů bylo výsledkem velice zřetelné (zaostřené) a dobře rozlišitelné, ale nevariabilní spektrum, bez detekovatelných odrůdových odchylek mezi řepkami (ozimými i jarními). Řepice mají mírně odlišný charakter spektra, výrazně odlišné spektrum od této skupiny mají opět hořčice.

Analýza esterázových izoenzymů a zejména pak technika IEF je vhodná pro hodnocení dané skupiny odrůd/genotypů na vyšší taxonomické úrovni (obdobně jako SDS-proteinové markery), rozdíly mezi testovanými odrůdami řepky byly minimální.

Izoenzymy kyselé fosfatázy

Izoenzymy kyselé fosfatázy poskytují u řepky dvě výrazné a dobře rozlišitelné zóny enzymatické aktivity. Zóna ACP-1 je reprezentována jedním invariabilním proužkem s $R_f = 1$ (tento pruh se kryje s čelem gelu) a několika proužky v zóně ACP-3. U některých odrůd řepky a častěji pak u hořčic se objevují i proužky v zóně ACP-2. Výsledky analýzy izoenzymů ACP jsou prezentovány na obr.6.

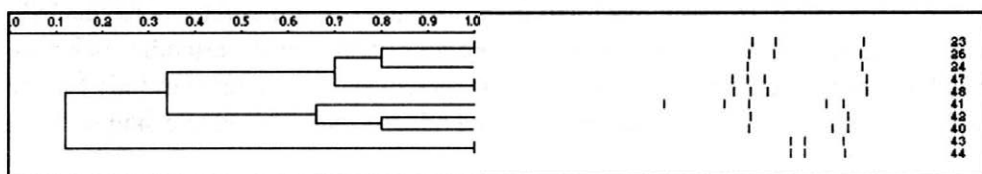


6. Variabilita v elektroforetickém fenotypu izoenzymů ACP u řepky

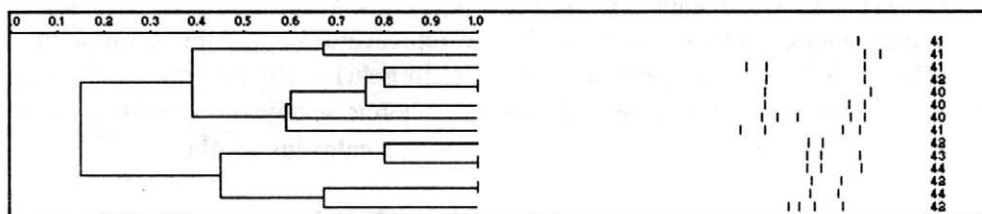
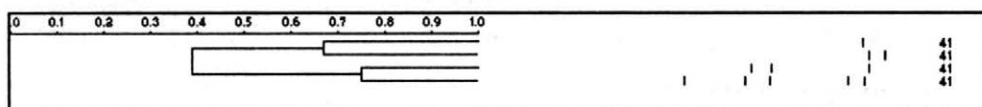
Odrůda Ceres (23) nevykazovala detekovatelnou variabilitu (ani u izoenzymů ACP, ani u žádného dalšího analyzovaného enzymového systému). Odrůda Arabella

(21) a Sonáta (22) vykazují minimálně dva elektroforetické fenotypy. Míra odlišnosti (variability) je na úrovni 60, resp. 30 %. Obdobně odlišnost mezi standardním a variabilním elektroforetickým fenotypem u odrůd SL-20 (39), Mar (33), SL-506 (38), SL-525 (36) je na úrovni 20–30 %, u odrůdy Marex (31) na úrovni 70 %.

a) dendrogram – podobnostní matice, citlivost 5 dpi



b/



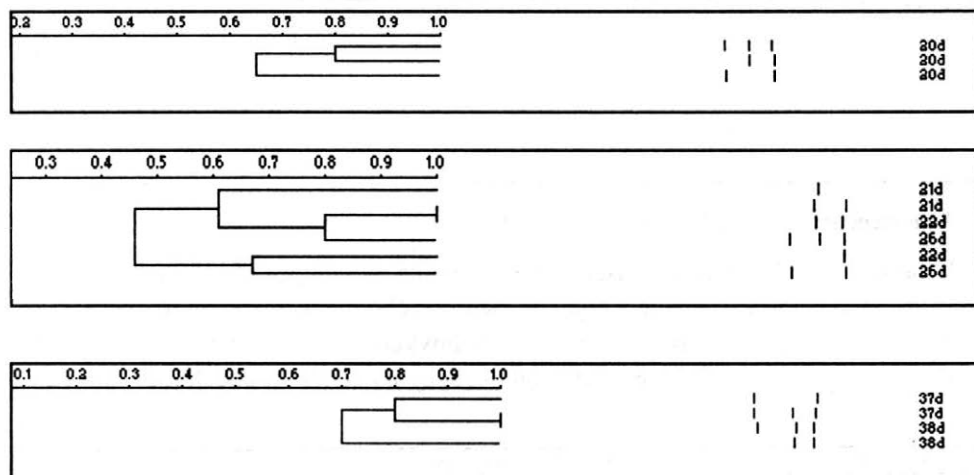
7. Charakteristické elektroforetické fenotypy izoenzymů ACP u taxonomicky různých skupin brukvovitých plodin

Dendrogramy na obr. 7 shrnují výsledky u řepic a hořčic. Na obr. 7a jsou charakteristická (resp. majoritní) spektra řepic a hořčic porovnána s typickými spektry některých odrůd jarních a ozimých řepk. Výsledky ukazují výraznou odlišnost mezi skupinou řepk a řepic/hořčic – míra odlišnosti těchto dvou skupin je na úrovni 65–90 %.

Obr. 7b dokumentuje vysokou míru variability ve sledované populaci řepic a hořčic z hlediska izoenzymů ACP (u jiných enzymových systémů nebyla tato variabilita tak výrazná).

Izoenzymy leucin aminopeptidázy

Izoenzymy kyselý fosfatázy poskytují u řepky dvě zóny enzymatické aktivity. Tyto zóny nevykazují tak vysoký polymorfismus jako izoenzymy ACP a rovněž nejsou tak výrazně separované. Zóna LAP-1 je představována u řepky dvěma proužky s výrazně vyšší intenzitou zabarvení než u zóny LAP-2. Zóna LAP-2 je variabilnější, byla zde prokázána přítomnost 1–2 proužků enzymatické aktivity. U hořčice bílé a řepic je spektrum izoenzymů LAP výrazněji odlišné.



8. Variabilita v elektroforetickém fenotypu izoenzymů LAP

U mnohých analyzovaných odrůd byly nalezeny i dosti odlišné elektroforetické fenotypy izoenzymů LAP, které se lišily nejen mobilitou jednotlivých proužků enzymatické aktivity (Mira – 26, Solida – 20, Arabella – 21), ale i počtem izoenzymových proužků. Míra odlišnosti jednotlivých variabilních izoenzymových fenotypů u těchto odrůd se pak pohybovala na úrovni 20–55 %.

Z tohoto pohledu lze obdobně jako u enzymového systému ACP využít izoenzymy leucin aminopeptidázy pro účely hodnocení čistoty materiálu (jako doplněk enzymového systému ACP), odlišení jednotlivých odrůd může být z důvodu nízkého polymorfismu tohoto enzymového systému problematické.

Analýzy dihaploidních linií řepky

Velmi vhodné je využití enzymových markerů pro detekci variability u dihaploidních linií řepky (pocházejících z prašníkových nebo pylových kultur). Pomocí této metody je možné rychle, ve velmi raných fázích zjistit nehomogenitu při zachování celistvosti rostliny a pomoci šlechtitelskému pracovišti v aplikaci tohoto biotechnologického přístupu ve šlechtění.

Dendrogramy na obr. 9–12 zobrazují míru podobnosti jednotlivých linií, resp. skupin fenotypů, které byly u dané linie nalezeny.

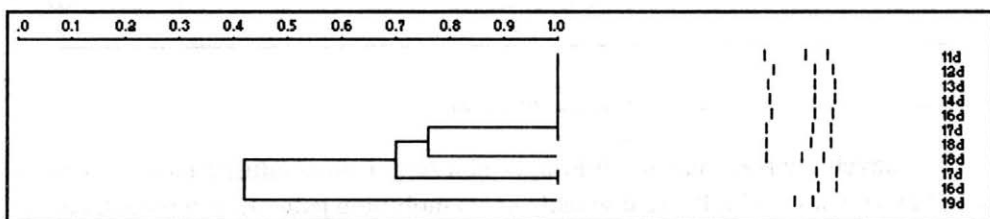
Dendrogramy ukazují vysokou podobnost linií 12, 13, 14, 15 a linií 16 a 18 (se třemi proužky aktivity ACP v zóně ACP-3), rozdíly mezi těmito liniemi jsou kolem 10 % (resp. míra podobnosti mezi jejich spektry se blíží 0,9). Naopak výrazně vizuálně odlišné elektroforetické fenotypy linií 17, 19, 16 (minoritní skupiny v rámci těchto linií) leží i v tomto případě v jiném bloku. Koeficient podobnosti je 0,3–0,7.



9. Androgenetické linie řepky – izoenzymy ACP

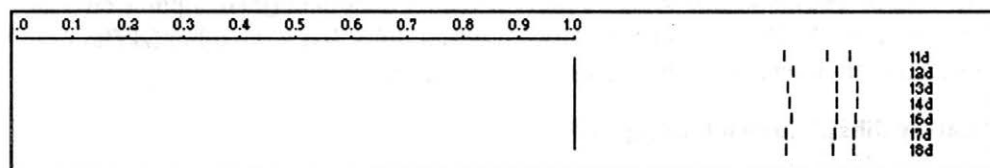
V rámci linií 11–14 nebyla detekována variabilita přesahující 5 %. Linie lze charakterizovat jako velmi vyrovnané z pohledu sledovaného biochemického markeru.

Analýzy byly prováděny i u dalších enzymových systémů – EST, GDH, MDH, LAP. Výsledky pro izoenzymy LAP jsou uvedeny na dendrogramech (obr. 10–12).

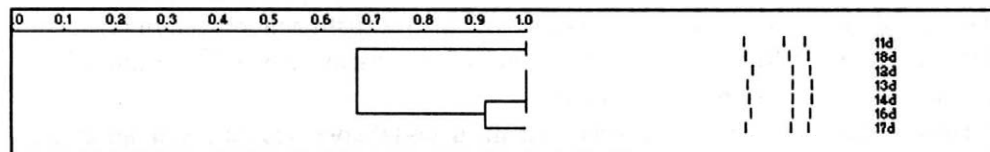


10. Androgenetické linie řepky – izoenzymy LAP z děložních lístků

a) podobnostní matice – citlivost 15 dpi



b) podobnostní matice – citlivost 3 dpi



11. Androgenetické linie řepky – izoenzymy LAP; dendrogram – standardní spektra linií (2 proužky v zóně LAP-1, 1 proužek v zóně LAP-2)

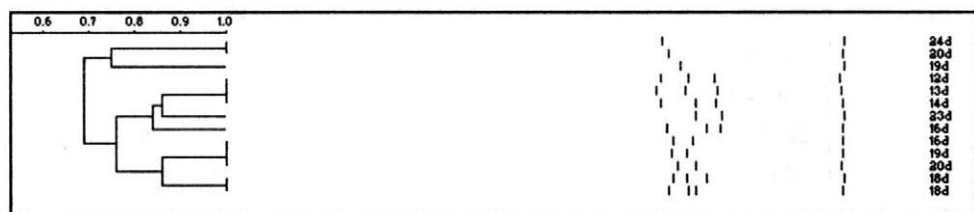
Standardní elektroforetický fenotyp pro izoenzymy leucinaminopeptidázy u sledovaných androgenetických linií byl charakterizován dvěma proužky v zóně LAP-1 a jedním proužkem v zóně LAP-2. Při porovnávání těchto fenotypů nebyl mezi

liniemi zjištěn žádný rozdíl (obr. 11a), izoenzymový obrazec byl invariabilní. Při zvýšení citlivosti při výpočtu podobnostní matice (obr. 11b) je sice možné nalézt rozdíly mezi liniemi, ale tento výsledek je způsoben použitím neoptimální matematické korekce při výpočtu.

Na obr. 10 je vyhodnocena variabilita (míra odlišnosti) všech zjištěných elektroforetických fenotypů. V horní části dendrogramu jsou opět uspořádány nevariabilní standardní spektra linií. Zjištěná odchylná spektra u linií 16–19 se pak od těchto standardních fenotypů výrazněji odlišují, míra podobnosti je 0,4–0,7 (resp. odlišnost je na úrovni 30–60 %).

U izoenzymů ACP bylo prováděno i porovnání androgenetických linií (linie 11 až 19) a výchozích odrůd použitých pro založení prašnickových kultur. Na obr. 12 jsou uvedeny míry podobnosti pro izoenzymy kyselé fosfatázy u androgenetických linií a výchozích odrůd.

dendrogram – podobnostní matice, citlivost 15 dpi



12. Elektroforetický fenotyp izoenzymů ACP androgenetických linií a odrůd řepky

Elektroforetický fenotyp linií a jejich výchozích odrůd je ve většině případů podstatně odlišný, mnohdy je zřetelnější podobnost mezi nepříbuznými liniemi a odrůdami. U izoenzymů LAP nejsou vzhledem k nižšímu polymorfismu tyto vztahy tak patrné.

Biochemické genetické markery na úrovni izoenzymů a proteinů bez detekovatelné enzymatické aktivity jsou obecně využitelné i ve šlechtění brukvovitých plodin. Specifika využití jsou vázána na genetickou charakteristiku sledované skupiny rostlin a na šíři genetické variability přítomnou v rámci sledovaného spektra šlechtitelských materiálů a odrůd.

Výsledky ukazují na možné aplikace a využití techniky biochemických markerů ve šlechtění brukvovitých plodin. Vzhledem k poměrně úzké genetické základně materiálů používaných v současné době ve šlechtitelských programech u řepky je i úroveň polymorfismu jednotlivých biochemických markerů relativně nízká.

Izoenzymové biochemické markery je vhodné používat jako doplňkový markerovací systém při testování čistoty šlechtitelských materiálů a komerčního osiva. Výraznější uplatnění izoenzymových markerů lze spatřovat v kontrole čistoty androgenetických linií řepky.

I. Přehled analyzovaných vzorků

Číselné označení	Odrůda	Číselné označení	Odrůda
řepka ozimá			
11–19	D.H. linie	15	Ceres „33“
11	Jet Neuf „24“	16	Solida „27“
12	Darmor „25“	17	Solida „54“
13	Ceres „31“	18	F ₁ Ceres x Solida „350“
14	Ceres „32“	19	F ₁ Ceres x Solida „404“
20	Solida	34	Idol
21	Arabella	35	Madora
22	Sonáta	36	SL-525
23	Ceres	37	SL-524
24	Darmor	38	SL-506
25	Jet Neuf	39	SL-20
26	Mira	54	ZV112 x Lirajet
27	Boxer	55	SL-538 x Lirajet
28	Lirajet	56	Ceres x Lirajet 1
29	B-001	57	Ceres x Lirajet 5
30	Tor	58	Ceres x Sonáta 1
31	Marex	59	Ceres x Sonáta 2
32	Bienvenue	60	Ceres x Arabella 1
33	Mar	61	Ceres x Arabella 2
		62	Falcon
řepka jarní			
47	Lirawell	48	Golda
řepice jarní		řepice ozimá	
40	Jumbuck	41	Rex
hořčice bílá		hořčice sareptská	
42	Zlata	44	Bulharská
hořčice černá			
43	Rumunská		
květák		krmná kapusta	
46	Bora F ₁	52	nšl. VV-AR

Při aplikaci izoenzymových markerů v oblasti popisu a charakterizování šlechtitelského materiálu a odrůd je nutné využívat širšího spektra enzymových systémů a materiál posuzovat komplexněji. Širší využívání biochemických markerů by mělo být spojeno i s modifikacemi šlechtitelských postupů s ohledem na charakter izoenzymových spekter jednotlivých genotypů.

Literatura

- ACQUAAH, G. (1992): Practical Protein Electrophoresis for Genetic Research. Portland, Oregon, Dioscorides Press.
- ARÚS, P. (1983): Genetic Purity of Commercial Seed Lots. In: TANKSLEY, S. D., ORTON, T. J. (1983): Isozymes in Plant Genetics and Breeding. Part A. Amsterdam-Oxford-New York, Elsevier Sci. Publ.: 415-423.
- ARÚS, P., CHEVRE, A. M., DELOURME, R., EBER, F., KERLAN, M. C., MARGALE, E., QUIROS, C. F. (1991): Isoenzyme nomenclature for eight enzyme systems in three Brassica species. In Proc. 8th Int. Rapeseed Congr., July 9-10, 1991, Saskatoon.
- ARÚS, P., ORTON, T. J. (1983): Inheritance and linkage relationships of isozyme loci in Brassica oleracea. J. Heredity, 74: 405-412.
- ARÚS, P., QUIROS, C. F., CHEVRE, A. M., DELOURME, R., EBER, F. (1992): Procedures of starch gel electrophoresis of isozymes in Brassica. INRA Stat. D'Amélioration des Plantes: 1-9.
- ARÚS, P., SHIELDS, C. R. (1983): Cole Crops (*Brassica oleracea* L.). In: TANKSLEY, S. D., ORTON, T. J. (1983): Isozymes in Plant Genetics and Breeding. Part B. Amsterdam-Oxford-New York, Elsevier Sci. Publ.: 339-350.
- ARÚS, P., SHIELDS, C. R., ORTON, T. J. (1985): Application of isozyme electrophoresis for purity testing and cultivar identification of F_1 hybrids of *Brassica oleracea*. Euphytica, 34: 651-657.
- ARÚS, P., TANKSLEY, S. D., ORTON, T. J., JONES, R. A. (1982): Electrophoretic variation as a tool for determining seed purity and for breeding hybrid varieties of *Brassica oleracea*. Euphytica, 31: 417-428.
- BECKER, H. C., DAMGAARD, C., KARLSSON, B. (1992): Environmental variation for outcrossing rate in rapeseed (*Brassica napus*). Theor. Appl. Genet., 84: 303-306.
- BREWER, G. J., SING, C. F. (1970): An Introduction to Isozyme Techniques. New York - London, Acad. Press.
- ČURN, V. (1992): TEMPUS activity report. Leicester, U.K., De Montfort Univ.: 1-39.
- ČURN, V. (1995): Acid phosphatase and leucine aminopeptidase isozymes as biochemical markers of homogeneity in oil seed rape androgenetic lines. Plant Growth Reg., 16: 59-63.
- ČURN, V., SÁKOVÁ, L., GRAMAN, J. (1994): Seed and leaf proteins and enzymes as biochemical markers for testing the homogeneity in breeding population of fodder

cabbage. Biomedical Engineering Biotechnology, Book of Abstracts of the International Technology-Exchange Conf., Prague, November 10–11, 1994: 7–8.

ČURN, V., SÁKOVÁ, L., GRAMAN, J. (1995): Elektroforéza isoenzymů a neenzymatických bílkovin – metody a aplikace v genetice a šlechtění rostlin. Genet. a Šlecht., xx: xx-xx..

DASS, H., NYBOM, N. (1967): The relationships between *Brassica nigra*, *B. campestris*, *B. oleracea*, and their amphidiploid hybrids studied by means of numerical chemotaxonomy. Can. J. Genet. Cytol. 9: 880–890.

DAVIK, J. (1993): Identification of oilseed turnip (*Brassica rapa* L. var. *oleifera*) cultivar groups by their fatty acid and glucosinolate profiles. J. Sci. Food Agric., 63: 385–390.

DELOURME, R., FOISSET, N. (1991): Isozyme variability in *Brassica napus*. In: Proc. 8th Intern. Rapeseed Congr., July 9 to 11, 1991, Saskatoon, Canada.

DENFORD, K. E., VAUGHAN, J. G. (1977): A comparative study of certain seed isoenzyme in the ten chromosome complex of *Brassica campestris* and its allies. Ann. Bot., 41: 411–418.

FÁBRY A. et al. (1992): Olejniny. Praha, MZ ČR.

FERGUSON, A. (1980): Biochemical Systematics and Evolution. Glasgow and London, Blackie.

FORSBERG, J., LANDGREN, M., GLIMELIUS, K. (1994): Fertile somatic hybrids between *Brassica napus* and *Arabidopsis thaliana*. Plant Sci., 95: 213–223.

FUSSELL, G. E. (1966): Farming Technique from Prehistoric to Modern Times. Oxford–London–Edinburgh, Pergamon Press.

GASANOVA, N. D. (1990): Evaluation of cabbage genetic purity by isoenzyme phenotypes. Res. Bull. N. I. Vavilov Inst. Plant Industry, 197: 24–25.

GOTTLIEB, L. D. (1981): Electrophoretic Evidence and Plant Populations. In: REINHOLD, L., HARBORNE, J. B., SWAIN, T. (Eds.): Progress in Phytochemistry. Vol. 7. Oxford, Pergamon Press: 1–46.

GUPTA, S. K., RÖBBELEN, G. (1986): Identification of rapeseed (*Brassica napus*) cultivars by electrophoresis. Plant Breed., 96: 363–370.

HARRIS, H., HOPKINSON, D. A. (1976): Handbook of Enzyme Electrophoresis in Human Genetics. North-Holland, Amsterdam.

HILLIS, D. M., MORITZ, C. (1990): Molecular Systematics. Sinauer Ass., Inc., Sunderland, MA.

HOELZEL, A. R. (1992): Molecular Genetic Analysis of Populations. New York, IRL Press at Oxford Univ. Press.

HORVÁTH, . (1993): Biochemické, molekulárne a morfometrické techniky v semenárskej kontrole, odrodovom skúšobníctve a právnej ochrane odrd rastlín v Slovenskej republike. Ponohosp. skúšobníctvo, 1: 17–20.

HORVÁTH, L., HORVÁTH, L. (1994): Automatizovaný systém pre popis a identifikáciu odrd v ÚKSÚP. Ponohosp. skúšobníctvo, 2: 5–7.

- HU, J., QUIROS, C. F. (1991): Identification of broccoli and cauliflower cultivars with RAPD markers. *Plant Cell Rep.*, 10: 505-511.
- CHEN, B. Y., HENEEN, W. K. (1989): Resynthesized *Brassica napus* L.: A review of its potential in breeding and genetic analysis. *Hereditas*, 111: 255-263.
- CHEN, B. Y., HENEEN, W. K., SIMONSEN, V. (1989): Comparative and genetic studies of isozymes in resynthesized and cultivated *Brassica napus* L., *B. campestris* L. and *B. alboglabra* Bailey. *Theor. Appl. Genet.*, 77: 673-679.
- CHEVRE, A. M., THIS, P., EBER, F., DESCHAMPS, M., RENARD, M., DELSENY, M., QUIROS, C. F. (1991): Characterization of disomic addition lines *Brassica napus* - *Brassica nigra* by isozyme, fatty acid, and RFLP markers. *Theor. Appl. Genet.*, 81: 43-49.
- JENSEN, U., FAIRBROTHERS, D. E. (1983): *Proteins and Nucleic Acids in Plant Systematics*. Berlin-Heidelberg, Springer Verlag.
- JURÁČEK, J., MÚDRY, P. (1994): Význam a systém testovania odrd kultúrnych rastlín vo Francúzsku. *Ponohosp. skúšobníctvo*, 2: 17-18.
- KATO, M., TOKUMASU, S. (1979): An electrophoretic study of esterase and peroxidase isozymes in *Brassicoraphanus*. *Euphytica*, 28: 339-349.
- LABANA, K. S., GUPTA, M. L. (1993): Importance and Origin. In: LABANA, K. S., BANGA, S. S., BANGA, S. K. (Eds.): *Breeding Oilseed Brassicas*. Berlin-Heidelberg a New Delhi, Springer-Verlag a Narosa Publ. House pp.: 1-7.
- LINSKENS, H.-F., JACKSON, J. F. (1992): *Seed Analysis*. Berlin-Heidelberg, Springer-Verlag.
- LUHOVÝ, M., REŇÁKOVÁ, M. (1989): Rychlé stanovení hybridnosti růžičkové kapusty elektroforézou isoenzymů kyselý fosfatázy. *Bull. výzk. šlecht. úst. zelin.*, Olomouc, 33: 61-66.
- MARŠÁLEK, L., PROVAZNÍKOVÁ, E., BOROVEC, V. (1989): Isoenzymy jako genetické markery intaktních rostlin a regenerantů u květáku. *Acta Univ. Agric. (Brno), fac. agron., XXXVII*: 33-41.
- MAY, B. (1992): Starch Gel Electrophoresis of Allozymes. In: HOELZEL, A. R. (Ed.): *Molecular Genetic Analysis of Populations*. New York, IRL Press at Oxford Univ. Press.
- MOORE, G. A., COLLINS, G. B. (1983): New Challenges Confronting Plant Breeders. In: TANKSLEY, S. D., ORTON, T. J. (Eds.): *Isozymes in Plant Genetics and Breeding*. Part A. Amsterdam-Oxford-New York, Elsevier Sci. Publ.: 25-58.
- MÜNDGES, H., DIEDERICHSEN, E., KÖHLER, W. (1989): Comparison of isozyme patterns in resynthesized amphihaploid rapeseed (*Brassica napus*) and their parental species *Brassica campestris* and *Brassica oleracea*. *Plant Breed.*, 103: 258-261.
- MÜNDGES, H., KÖHLER, W., FRIEDT, W. (1990): Identification of rapeseed cultivars (*Brassica napus*) by starch gel electrophoresis of enzymes. *Euphytica*, 45: 179-187.
- MURPHY, D. J. (1994): *Designer Oil Crops. Breeding. Processing and Biotechnology*. Weinheim-New York, VCH Verlagsgesellschaft mbH.

- NIELSEN, G. (1985): The use of isozymes as probes to identify and label plant varieties and cultivars. *Isozymes: Current Topics in Biol. and Med. Res.*, 12: 1-32.
- NIJENHUIS, B. T. E. (1971): Estimation of the proportion of inbred seed in Brussels sprouts hybrid seed by acid phosphatase isoenzyme analysis. *Euphytica*, 20: 498-507.
- PARENT, J. G., PAGÉ, D. (1992): Identification of raspberry cultivars by norradioactive DNA fingerprinting. *HortSci.*, 27: 1108-1110.
- PASTEUR, N., PASTEUR, G., BONHOMME, F., CATALAN, J., BRITTON-DAVIDIAN, J. (1988): *Practical Isozyme Genetics*. Chichester, Ellis Horwood Ltd.
- RIPLEY, V., THORPE, M., ILER, S., MIZIER, K., BEVERSDORF, W. D. (1992): Isozyme analysis as a tool for introgression of *Sinapis alba* germ plasm into *Brassica napus*. *Theor. Appl. Genet.*, 84: 403-410.
- SÁNCHEZ-YÉLAMO, M. D., ORTIZ, J. M., GOGORCENA, Y. (1992): Comparative electrophoretic studies of seed proteins in some species of the genera *Diplotaxis*, *Erucastrum*, and *Brassica* (Cruciferae: Brassicaceae). *Taxon*, 41: 477-329.
- SCANDALIOS, J. G. (1969): Genetic control of multiple molecular forms of enzymes in plants: A review. *Biochem. Genet.*, 3: 37-79.
- SCANDALIOS, J. G. (1974): Isozymes in development and differentiation. *Ann. Rev. Plant. Physiol.*, 25: 225-258.
- SCARISBRICK, D. H., ATKINSON, L., ASARE, E. (1989): Oilseed rape. *Outlook on Agric.*, 18: 152-159.
- SCHENCK, H. R., WOLF, G. (1986): Characterization of somatic *Brassica napus* hybrids by polyacrylamide gel electrophoresis. *Plant Breed.*, 97: 72-74.
- SEEBOHM, M. E. (1976): *The Evolution of the English Farm*. EP Publ., Ltd.
- SHANNON, L. M. (1968): Plant Isoenzymes. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 19: 187-210.
- SJÖDIN, C., GLIMELIUS, K. (1989): *Brassica naponigra*, a somatic hybrid resistant to *Phoma lingam*. *Theor. Appl. Genet.*, 77: 651-656.
- SOLTIS, D. E., SOLTIS P. S. (1990): *Isozymes in Plant Biology*. London, Chapman and Hall.
- SONG, K. M., OSBORN, T. C., WILLIAMS, P. H. (1988): Brassica taxonomy based on nuclear restriction fragment length polymorphisms (RFLPs). *Theor. Appl. Genet.*, 76: 593-600.
- SOZINOV, A. A. (1985): Protein polymorphism and its importance in genetics, breeding and evolution. In: SOZINOV, A. A. (Ed.): *Molekulyarnye Mekhanizmy Geneticheskikh Protessov. Molekulyarnaya Genetika, Evolyutsiya i Molekulyarno-Geneticheskie Osnovy Seleksii.*, Nauka, Moscow: 219-238.
- STRUSS, D., QUIROS, C. F., RÖBBELEN, G. (1992): Mapping of molecular markers on Brassica B-genome chromosomes added to *Brassica napus*. *Plant Breed.*, 108: 320-323.
- SUNDBERG, E., GLIMELIUS, K. (1986): A method for production of interspecific hybrids within Brassicaceae via somatic hybridization, using resynthesis of *Brassica napus* as a model. *Plant Sci.*, 43: 155-162.

- SUNDBERG, E., GLIMELIUS, K. (1991): Production of cybrid plants within Brassicaceae by fusing protoplasts and plasmolytically induced cytoplasts. *Plant Sci.*, 79: 205–216.
- SUURS, L. C. J. M. (1986): Routine large-scale electrophoresis for plant breeding. An example with F₁ seeds of Brussels sprouts (*Brassica oleracea* var. *gemnifera*). *Euphytica*, 36: 147–151.
- SÝKOROVÁ, S. (1992): Využití elektroforézy bílkovin při komerčním hodnocení zemědělských produktů. *Věstník ČSAZ* 10/92: 542–543.
- SÝKOROVÁ, S., HADAČOVÁ, V. (1992): Využití izoenzymů pro určování některých hospodářsky důležitých druhů a jejich kultivarů. *Rostl. Vyr.*, 38: 861–875.
- ŠAŠEK, A., ČERNÝ J., FOLK, A. (1978): Elektroforetická analýza semenných bílkovin řepky olejky (*Brassica napus* L. var. *arvensis*). *Rostl. Vyr.*, 24: 409–417.
- ŠAŠEK, A., ČERNÝ, J., SÝKOROVÁ, S. (1983): Enzymatické bílkovinné markery obilovin. *Genet. a Šlecht.*, 19: 23–35.
- TANKSLEY, S. D., ORTON, T. J. (1983a): *Isozymes in Plant Genetics and Breeding, Part A*. Amsterdam-Oxford-New York, Elsevier Sci. Publ.
- TANKSLEY, S. D., ORTON, T. J. (1983b): *Isozymes in Plant Genetics and Breeding, Part B*. Amsterdam-Oxford-New York, Elsevier Sci. Publ.
- TANKSLEY, S. D., YOUNG, N. D., PATERSON, A. H., BONIERBALE, M. W. (1989): RFLP mapping in plant breeding: new tools for an old science. *Bio/Technol.*, 7: 257–264.
- THORPE, M. L., DUKE, L. H. (1993): Status of Isoenzyme Research. In: LABANA, K. S., BANGA, S. S., BANGA, S. K. (Eds.): *Breeding Oilseed Brassicas*. Berlin-Heidelberg a New Delhi, Springer-Verlag a Narosa Publ. House: 168–180.
- TRUCO, M. J., ARÚS, P. (1987): Comparative study on the isozymes of *Brassica campestris*, *B. oleracea* and *B. napus*. *Cruciferae Newsletter*, 12: 18–19.
- TSUKAMOTO, C., FURUYA, M., CHIKAYASU, K., OKUBO, K., HINATA, K. (1993): Chemotaxonomic markers in *Brassica* seeds at the species and subspecies levels. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 57: 653–654.
- VAŠÁK, J., FÁBRY, A. (1994): Řepka – konjunktura extenzity. *Úroda*, 42: 7–11.
- VAUGHAN, J. G., DENFORD, K. E. (1968): An acrylamide gel electrophoretic study of the seed proteins of *Brassica* and *Sinapis* species, with special reference to their taxonomic value. *J. Exp. Bot.*, 19: 724–732.
- VAUGHAN, J. G., DENFORD, K. E., GORDON, E. I. (1970): A study of the seed proteins of synthesized *Brassica napus* with respect to its parents. *J. Exp. Bot.*, 21: 892–898.
- VAUGHAN, J. G., GORDON, E. I. (1973): A taxonomic study of *Brassica juncea* using the techniques of electrophoresis, gas-liquid chromatography and serology. *Ann. Bot.*, 37: 167–184.
- VAUGHAN, J. G., WAITE, A. (1967): Comparative electrophoretic studies of the seed proteins of certain species of *Brassica* and *Sinapis*. *J. Exp. Bot.*, 18: 100–109.

VAUGHAN, J. G., WAITE, A., BOULTER, D., WAITERS, S. (1966): Comparative studies of the seed proteins of *Brassica campestris*, *Brassica oleracea*, and *Brassica nigra*. J. Exp. Bot., 17: 332-343.

WAUGH, R., POWELL, W. (1992): Using RAPD markers for crop improvement. TIBTECH, 10: 186-191.

WEEDEN, N. F. (1983): Evolution of Plant Isozymes. In: TANKSLEY, S. D., ORTON T. J. (1983): Isozymes in Plant Genetics and Breeding. Part A. Amsterdam-Oxford - New York, Elsevier Sci.Publ.: 175-205.

WEEDEN, N. F., WENDEL, J. F. (1990): Genetics of Plant Isozymes. In: SOLTIS, D. E., SOLTIS, P. S. (Eds.): Isozymes in Plant Biology. London, Chapman and Hall: 46-72.

WENDEL, J. F., WEEDEN, N. F. (1990): Visualization and Interpretation of Plant Isozymes. In: SOLTIS, D. E., SOLTIS, P. S. (Eds.): Isozymes in Plant Biology. London, Chapman and Hall: 5-45.

WILLS, A. B., FYFE, S. K., WISEMAN, E. M. (1979): Testing F₁ hybrids of *Brassica oleracea* for sibs by seed isoenzyme analysis. Ann. Appl. Biol., 91: 263-270.

WILLS, A. B., WISEMAN, E. M. (1980): Acid phosphatase isoenzymes of *Brassica oleracea* seedlings and their applications to sib testing in F₁ hybrids. Ann. Appl. Biol. 94: 137-142.

WOODS, S., THURMAN, D. A. (1976): The use of seed acid phosphatases in the determination of the purity of F₁ hybrid Brussels sprout seed. Euphytica, 25: 707-712.

YADAVA, J. S., CHOWDHURY, J. B., KAKAR, S. N., NAINAWATEE, H. S. (1979): Comparative electrophoretic studies of proteins and enzymes of some *Brassica* species. Theor. Appl. Genet., 54: 89-91.

ZIMMER, E. A., WHITE, T. J., CANN, R. L., WILSON, A. C. (1993): Molecular Evolution. Producing the Biochemical Data. Methods in Enzymology. Vol. 224. San Diego-New York-London, Acad. Press.

Utilization of biochemical markers in breeding systems of oil seed rape and allied plants

Biochemical markers (isozymes or proteins without detectable enzymatic activity) have become a useful tool in plant genetics and breeding. Isozymes and storage proteins have been used as markers for identification and characterisation of cultivated varieties and breeding materials/genotypes of agricultural crops, horticultural and ornamental plants.

In this contribution the utilisation of the method of isozyme and protein electrophoresis in oil seed rape breeding is discussed. The narrow genetic diversity of recent oil seed rape varieties is mirrored also in the relatively narrow isozyme and protein polymorphism. Isozyme markers should be utilised in the systems of purity testing of seed lots, and especially in the testing of homogeneity and identification of androgenetic lines.

Kontaktní adresa:

Dr. Ing. Vladislav Čurn, Jihočeská univerzita, Zemědělská fakulta
Studentská 13, 370 05 České Budějovice, Česká republika
Tel./fax: + 420 38 777 24 50, e-mail: curn@zf.jcu.cz

Z VĚDECKÉHO ŽIVOTA

Osmá mezinárodní konference o NIR spektroskopii

Ve dnech 15. až 19. září 1997 se v prostorách Haus der Technik e.V., Essen, SRN, konala 8th International Conference on Near-Infrared Spectroscopy, tentokrát pod názvem Spectroscopy-Sensors-Chemometrics. Pořádal ji Mezinárodní výbor pro spektroskopii v blízké infračervené oblasti (ICNIRS) za předsednictví F. E. Burtona II (USA), pod záštitou prof. Dr. H. W. Sieslera z Ústavu fyzikální chemie Univerzity v Essenu. Konference se koná každé dva roky, vždy na jiném místě.

Zaznělo tu 43 plenárních referátů vysoké odborné úrovně (v devíti sekcích) a bylo prezentováno 189 posterů (v jedenácti sekcích). Mimo hlavní sál předváděli zástupci 14 předních firem produkty technologie NIRS. V neděli, těsně před zahájením konference, byl pro zájemce uspořádán speciální kurz k teorii, instrumentálním otázkám, aplikacím NIRS a základům chemometrie. Hlavního (pětidenního) jednání se zúčastnilo přes 400 účastníků z Evropy i zámoří, vedle toho ca 150 zájemců za zlevněné jednodenní vložné. Pro doprovodné osoby účastníků konference byl uspořádán kulturně poznávací program, po skončení konference si každý mohl vybrat některou z cest. Dva nejlepší postery byly odměněny zvláštní cenou. Organizace konference byla precizní, dávala velký prostor neformálním kontaktům mezi účastníky mimo oficiální jednání, společenská úroveň byla přiměřená.

První den byl věnován základním problémům NIR spektroskopie, druhý den aplikaci optických senzorů v chemických výrobcích a v kontrole životního prostředí, dále aplikaci NIRS v lékařství, třetí den aplikaci NIRS ve farmaceutickém průmyslu, petrochemii a technologii plastů, čtvrtý den aplikaci NIRS v potravinářství a pátý den v zemědělství. Jednání se aktivně zúčastnil zakladatel techniky NIRS Karl Norris (75 let) a Dr. John S. Shenk, světoznámý tvůrce software pro NIRS techniku (oba USA).

K zajímavým referátům patří zpráva of fy Zeiss Jena o miniaturizaci přístrojů NIRS (s využitím laserů), které budou přenosné a budou na trhu už v roce 1998. Zajímavý trend představuje využití optických senzorů, které umožní přímé vpichy sondy do měřených materiálů, aniž by materiál bylo třeba upravovat a pak plnit do měřících kyvet stabilních přístrojů. Lékař E. N. Lewis představil nové směry využití NIRS v kardiologii, zejména k vizualizaci změn průchodnosti tepen a cév, změn na mozku a jiných orgánech. G. B. Osborne z Austrálie představil aplikaci NIRS při měření stupně zmažovatelnosti škrobu při chemických úpravách potravin. Prof. Murray ze Skotska podal tradičně pečlivě připravený referát, tentokrát zaměřený na techniku měření autooxidace rybích tuků po ošetření antioxidanty. Dr. Batten z Austrálie pojednal o možnostech nasazení techniky NIRS k objektivnímu stanovení pálivosti papriky, pepře a jiného koření, ačkoli chemické stanovení je přinejmenším problema-

tické. Přítomné zaujalo příslovečné žoviální vystoupení Johna Shenka, dokladované trefnými diapozitivy, jak dnes placená poradenská služba v USA využívá NIRS k mapování zapojenosti a složení golfových a fotbalových trávníků, k hodnocení jejich výživného stavu, aktuální potřeby závlahy a ošetření po zátěži.

V zemích EU byl proveden kruhový test a nyní se dopracovávají detaily propojení jednotlivých laboratoří NIRS ke stanovení vlhkosti, dusíkatých látek a oleje v řepce s využitím kalibrací v neurální síti. Další příspěvky v zemědělské sekci byly zaměřeny na vývoj rutinního měření kvality silážní kukuřice, měření průběhu degradace vlákniny píce v batoru, měření orientace celulózy v fibrilách v lignifikovaných pletivech, k měření drsnosti povrchu a barvy rostlin aj. Pozornost byla též věnována problémům spojeným s přenosem univerzálních kalibračních rovnic a potřebě „místních“ kalibrací pro určitý okruh vzorků v dosahu dané laboratoře NIRS.

Z posterů byla nejpočetnější sekce „agro“ (45) s tematicky různorodým zaměřením: od aplikací NIRS pro listovou analýzu k identifikaci odrůd rýže, k hodnocení sladké chuti jablek (aniž by plody bylo třeba při měření poškodit), biologické aktivity tříslovin a polyfenolů leguminóz v batoru, neurotoxinů, složení batorové šťávy, kvality odrůd luskovin, aminokyselin v zrnech ječmene až po sestavování směsí tabáku podle senzorických vlastností. Zde byl prezentován i můj poster *Využití diskriminační analýzy pro predikci botanického složení lučního porostu**. Z ČR se zúčastnila konference též G. Budínová (z VŠCHT Praha) s posterem G. Budínová, L. Čurda, K. Volka: *Studium laktace za použití spektroskopie v blízké infračervené oblasti a FT Ramanovy spektroskopie: stanovení bílkovin v lidském mléce*, který byl zařazen do sekce potravinářské.

Pro účastníky konference byl vydán pracovní sborník referátů a dále abstrakta posterů s tím, že oficiální sborník z konference vyjde na jaře 1998 jako zvláštní číslo vědeckého časopisu *Journal of NIR Spectroscopy* (Chichester, U.K.) včetně CD-ROM.

Další, tj. devátá mezinárodní konference o NIR spektroskopii (NIR 99), se bude konat ve Veroně (Itálie) ve dnech 13. až 18. 6. 1999 pod názvem *Toward the 3rd Millenium*.

Konference potvrdila, že spektroskopie v blízké infračervené oblasti se v posledním desetiletí stala respektovanou metodou, **ve výrobě** postupně nahrazující zdlouhavé a náročné konzervativní techniky stanovení kvality surovin, meziproduktů i finálních výrobků, **při monitoringu** změn na nejrůznějších objektech, od lidského těla až po životní prostředí, **studiu procesů** atd. V zemědělství a potravinářství má své pevné místo jako velice operativní (měření trvá ca 2 minuty), nedestrukční (změřené semeno lze vysít), vzorek „nekonsumující“, přitom dostatečně přesná a při sériovém měření levná metoda. Není to žádná „černá skříňka“, do které se z jedné strany vkládá vzorek a z druhé „padají“ výsledky, měření je postaveno na exaktních fyzikálních principech

* s podporou GA ČR v rámci grantového projektu č. 503/95/1457

a chemických vlastnostech látek. Proti chemickým metodám má sice některá omezení, ale na druhé straně také možnosti „dát něco navíc“. Těm je třeba porozumět a snažit se co nejlépe využít obrovského potenciálu, který skýtá, ale neočekávat od ní, čeho *a priori* schopna není.

Konference určitě přispěla v tomto smyslu k rozšíření obzorů a diskusi účastníků nad problémy, hlavně ale k získání dalších podnětů a k posílení chuti dále přemýšlet, hledat, zkoušet, tak aby se **technika NIRS stala mnohostranným pomocníkem laboratorní kontroly a diagnostiky v moderním pojetí.**

Ing. Václav Míka, DrSc.

ŽIVOTNÍ JUBILEA

Pěťasedmdesátiny šlechtitele Ing. Josefa Břenka



Počátkem letošního roku slavil své životní jubileum – 75 let – Ing. Josef Břenek, významný šlechtitel bramborů a některých dalších zemědělských plodin a květin.

Ing. Josef Břenek se narodil 22. ledna 1922 ve Žďáru nad Sázavou-Mělkovicích jako syn rolníka. V roce 1942 absolvoval reálku v Novém Městě na Moravě. Během německé okupace pracoval v zemědělství – na hospodářství svého otce. Po osvobození se přihlásil ke studiu na Vysoké škole zemědělské v Brně, kterou v roce 1948 zakončil druhou státní zkouškou.

Po ukončení vysokoškolského studia byl v roce 1948 přijat do zaměstnání v družstvu pro ušlechtilá osiva a sadbu Elita v Brně jako šlechtitelský asistent na nově zřízenou šlechtitelskou stanici v Bystřici nad Pernštejnem. Poněvadž s vlastním šlechtěním na stanici Bystřice n. P. bylo započato až v roce 1949, prodělal nejdrívě šlechtitelskou praxi na šlechtitelských stanicích v Čelechovicích na Hané, v Horních Moštěnicích u Přerova a jejich pracovištích ve Staré Vsi a Zahatí a dále na stanici Stránecká Zhoř. Na těchto šlechtitelských stanicích získal šlechtitelské zkušenosti od význačných šlechtitelů, jako byli šlechtitelé obilnin Konrád Dvorský, Ing. dr. Josef Vajdík a Josef Hlaváček a šlechtitel brambor Ing. Václav Starý.

V roce 1949 byl přearozán do funkce šlechtitele a v roce 1958 do funkce vedoucího šlechtitele. V roce 1977 byl jmenován vedoucím oddělení šlechtění brambor a současně vedoucím odboru šlechtění na stanici Bystřice n. P., do něhož vedle řízení oddělení šlechtění brambor náleželo řízení oddělení obilnin, lnu a květin. Současně vedle šlechtitelských prací vykonával v letech 1949–1958 funkci vedoucího šlechtitelské stanice Bystřice n. P.

Šlechtitelská činnost Ing. Josefa Břenka byla velmi pestrá – pracoval ve šlechtění brambor, žita, ovsa, hrachu, lnu, některých zelenin a květin. Hlavní náplní jeho šlechtitelské práce však byly brambory – pracoval jak v novošlechtění, tak i v udržovacím šlechtění.

V novošlechtění brambor pracoval Ing. Břenek od roku 1954, kdy byl stanici Bystřice n. P. přidělen úkol zaměřený na vyšlechtění polorané až polopozdní žluto-dužinné odrůdy brambor s dobrou stolní hodnotou a polorané odrůdy typu odrůdy Krasava s vyšším obsahem škrobu. V roce 1970 však bylo novošlechtění brambor na stanici Bystřice n. P. obdobně jako na několika dalších bramborářských stanicích)

ukončeno v důsledku koncentrace novošlechtění brambor na dvě šlechtitelské stanice: Keřkov a Hrádek u Pacova. V důsledku toho začal Ing. Břenek v letech 1975 až 1985 spolupracovat se šlechtitelskou stanicí Keřkov na řešení tematických šlechtitelských úkolů zaměřených jednak na vyšlechtění velmi rané odrůdy brambor vhodné k předklíčování a závlaze a jednak na vyšlechtění polorané až polopozdní stolní odrůdy. Tato spolupráce spočívala v každoroční výsadbě cca 20 000 kříženců brambor v generaci ramš na šlechtitelské stanici Bystřice n. P., dodaných ze šlechtitelské stanice Keřkov, a jejich šlechtitelském vedení po tři roky, načež byli zbylí kříženci vraceni zpět na šlechtitelskou stanici Keřkov k dalšímu šlechtitelskému vedení.

Výsledkem šlechtitelské práce Ing. Josefa Břenka v novošlechtění brambor na stanici Bystřice n. P. bylo povolení polopozdní konzumní odrůdy Alma (1978–1982), jejímž je hlavním šlechtitelem. Z kříženců selektovaných na šlechtitelské stanici Bystřice n. P. v rámci spolupráce se šlechtitelskou stanicí Keřkov je spoluautorem dvou keřkovských odrůd – velmi rané odrůdy Klára (povolena v roce 1986) a rané odrůdy Karla (povolena v roce 1988).

V udržovacím šlechtění brambor Ing. J. Břenek úspěšně pracoval na šlechtění 18 odrůd: Višňovské rohlíčky (1949–1950), Ackersegen (1949–1958), Voran (1949 až 1957), Kitting (1950–1956), Bintje (1950–1958), Reneta (1950–1954), Norma (1950–1951), Krasava (1953–1958), Mirka (1956–1957), Kardinál (1959–1967), Aquila (1961), Oslava (1961–1964), Sperber (1963), Saskia (1972–1979), Tera (1972–1973), Astra (1974), Alma (1978–1984) a Kera (1983–1984).

Ve šlechtění ostatních zemědělských plodin pracoval na udržovacím šlechtění ozimého žita Zenit (1950–1961), ovsů Chlumecký žlutý (1949–1951), Flemmingsgold (1950–1951) a Český žlutý (1952–1961). Dále na udržovacím šlechtění lnu Domanínský (1951–1952), hrachu Židlochovická Viktoria (1949–1950), Zborovická Viktoria (1949–1950), Milion zelený (1951–1952) a Milion žlutý (1951–1952) a některých zelenin – zelí Kodaňské tržní (1951–1956) aj.

Velice úspěšný byl Ing. Břenek ve šlechtění jirín (*Dahlia*) – v novošlechtění i v udržovacím šlechtění. V novošlechtění jirín pracoval v letech 1957–1977 – v roce 1977 bylo novošlechtění na stanici Bystřice ukončeno. V uvedeném období vyšlechtil (jako autor či hlavní autor) 16 nových odrůd: Rumělka (rok povolení 1961), Svratka (1961), Český Granát (1962), Luna (1965), Lila (1966), Venuše (1966), Alice (1967), Kamila (1967), Růženka (1967), Sylva (1967), Pavlína (1968), Jitka (1968), Ribana (1968), Krystal (1977), Uran (1977) a Zora (1977). V udržovacím šlechtění jirín pracoval v letech 1970–1977; v roce 1977 bylo celé udržovací šlechtění jirín předáno na šlechtitelskou stanici Sempry v Turnově. V uvedeném období pracoval na udržovacím šlechtění 33 odrůd vyšlechtěných na stanici v Bystřici n. P. a 12 odrůd zahraničních, povolených na návrh stanice Bystřice n. P. v letech 1969–1971.

Rozsah šlechtitelských úkolů, na nichž Ing. Břenek během své šlechtitelské činnosti v letech 1949-1985 pracoval (v roce 1985 odešel do důchodu), a jím dosažených výsledků dokladuje jeho pracovitost a píli, ale i odborné znalosti o problematice plodin, jejichž šlechtěním se zabýval. Svou pracovitost a píli získal v mládí, kdy o prázdninách, ale i během studia pracoval na otcově hospodářství, které mu v pozdějších letech činilo četné osobní problémy. Svě odborné znalosti získával od těch význačných šlechtitelů, u nichž se zacvičoval před započatím svých šlechtitelských prací a s nimiž i později zůstal v úzkém kontaktu; u brambor pak trvalými kontakty s pracovníky Výzkumného ústavu bramborářského v Havlíčkově Brodě a se šlechtiteli bramborářské šlechtitelské stanice v Keřkově, pro kterou sám vykonával mnoho jako člen šlechtitelského týmu stanice Keřkov v letech 1973-1985. Svě vlastní poznatky a zkušenosti ze šlechtění brambor uplatňoval a předával v rámci šlechtitelské rady, jejímž členem byl v letech 1961-1985.

Nelze také opomenout zásluhy Ing. Josefa Břenka o budování šlechtitelské stanice Bystřice n. P. Objekt, na němž stanice byla budována, svým rozsahem a výstavbou zdaleka nevyhovoval a stanici bylo nutno dobudovat. A v tomto směru mnoho vykonané práce bezprostředně souviselo s osobou Ing. Břenka, prvního vedoucího šlechtitelské stanice.

Při příležitosti významného životního jubilea přejeme Ing. Josefu Břenkovi do dalších let pevné zdraví a mnoho pohody v osobním životě.

Ing. Josef Zadina, CSc.

INSTITUTE OF AGRICULTURAL AND FOOD INFORMATION

Slezská 7, 120 56 Praha 2, Czech Republic

Fax: + 420 2 24 25 79 39, e-mail: editor@login.cz

In this institute scientific journals dealing with the problems of agriculture and related sciences are published on behalf of the Czech Academy of Agricultural Sciences. The periodicals are published in the Czech or Slovak languages with summaries in English or in English with summaries in Czech or Slovak.

Subscription to these journals be sent to the above-mentioned address

Journal	Number of issues per year	Yearly subscription in USD	
		Europe	overseas
Rostlinná výroba (Plant Production)	12	177,-	195,-
Czech Journal of Animal Science (Živočišná výroba)	12	177,-	195,-
Zemědělská ekonomika (Agricultural Economics)	12	177,-	195,-
Lesnictví – Forestry	12	177,-	195,-
Veterinární medicína (Veterinary Medicine – Czech)	12	145,-	152,-
Czech Journal of Food Sciences (Potravinářské vědy)	6	84,-	88,-
Zemědělská technika (Agricultural Engineering)	4	56,-	58,-
Plant Protection Science (Ochrana rostlin)	4	56,-	58,-
Genetics and Plant Breeding (Genetika a šlechtění)	4	56,-	58,-
Zahradnictví (Horticultural Science)	4	56,-	58,-

RECENZE

Klonové šlechtění vinné révy v Německu

Klon-Züchtung bei Weinreben in Deutschland

(Od antického množení výběrem až po systematické udržovací šlechtění)

Harald Schöffling, Günther Stellmach, Waldkirchel 1993, 818 s.

Autoři této rozsáhlé publikace jsou předními odborníky v dané oblasti. Dr. Schöffling zastával mimo jiné místo vedoucího Ústředí pro klonový výběr v Trevíru a Sekretariátu výboru pro odrůdové zkoušky vinné révy při Zemském výukovém a výzkumném ústavu pro zemědělství, vinařství a zahradnictví v Trevíru. Dr. Stellmach byl vedoucím virologických laboratoríí Ústavu pro ochranu rostlin ve vinařství v Bernkastel-Kues na Moseli.

První část publikace je věnována historii klonového šlechtění. První zprávy pocházejí z roku 1787, kdy na základě dekretu kurfürsta Václava z Trevíru byl prováděn negativní a pozitivní výběr. Během sta let došlo k více než dvojnásobnému zvýšení výnosu na 7 120 l vína na hektar. Přešlo se na systematický individuální výběr s následnými testy. Dnes pěstované odrůdy jsou viruprosté a skýtají běžně 10 000 l/ha vína poměrně dobré jakosti, i když pokrok docílený v tomto směru není dosud plně uspokojivý. Naproti tomu zcela úspěšné bylo šlechtění na zdravotní stav. Ve federální listině odrůd je nyní zapsáno 53 odrůd zahrnujících 450 klonů. Ty jsou v péči 48 šlechtitelů, z nichž je 69 % soukromých a 31 % státních. Klonové šlechtění bude dále zaměřeno na získání viruprostých materiálů množением *in vitro* a eliminací patogenů tepelným ošetřením.

V další kapitole rozebírají autoři účelnost moderního klonového šlechtění, které je zaměřeno především na získávání rezistence vůči virům, bakteriím, houbám a organismům podobným mykoplasmům. Dalším motivem pak jsou genetické změny – mutace vyskytující se v meristemech vegetativně množných rostlin. Vznikají tak pupenové mutanti, kteří zvyšují proměnlivost uvnitř odrůdy a jsou základem klonového šlechtění.

Třetí kapitola je věnována směrnicím systematického klonového šlechtění. Je popsán postup při výběru zdravých keřů, jsou uvedeny testy a další ošetření a využití odebraných řízků. Vlastní udržovací šlechtění je prováděno jako klonové šlechtění s výběrem keřů a zkoušením potomstev ve třech generacích, nebo jako subklonové šlechtění opírající se o přezkoušený klon a zkoušky potomstev ve dvou generacích. Trvalý výběr klonů a subklonů se provádí jako negativní nebo pozitivní hromadný výběr a jako výběr keřů se zkoušením potomstev v jedné generaci. Jsou stanoveny cíle šlechtění z hlediska fyziologického, patologického a výkonnostního.

Ve čtvrté kapitole jsou popsány zkoušky výkonu jednotlivých keřů a jejich potomstev. Jsou uvedeny pracovní směrnice pro jednotlivé kroky šlechtění, jako je výběr jednotlivých keřů, subklonové šlechtění a trvalý výběr, předzkoušky, mezizkoušky a hlavní zkoušky, rozsahy, doby trvání a požadavky na statistické zpracování, které zahrnuje kromě běžných postupů vícefaktorové modely a využívá i korelací, regresi a faktorové analýzy.

Pátá kapitola pojednává o nákladech klonového šlechtění. Ukončený výběr je odhadován na 50 až 150 tis. DEM. Navrhované cesty vedoucí ke snižování nákladů se týkají především zdravotních opatření.

Šestá kapitola je věnována bibliografii německých šlechtitelů zabývajících se klonovým šlechtěním vinné révy. Současně je zvažována úloha státních institucí a jejich přínos pro soukromé šlechtitele. Přitom je zdůrazněna důležitost zachování dostatečně širokého genofondu, který by mohl být ohrožen při snaze o zvyšování výkonnosti.

Zákonné rámcové podmínky pro získání certifikátu rostlinného materiálu a popis komplexu zkoušek jsou popsány v sedmé kapitole. Registrované vinice, které slouží k odběru zušlechtěných řízků nebo k množení podnoží, jsou podrobeny trvalému výběru, což je podmínkou pro získání každoročního Úředního uznání a povolení k odběru rostlinných materiálů.

V navazující osmé kapitole jsou vyloženy zásady a směrnice pro vývoz uznaného materiálu do zámoří a evropských zemí.

Devátá kapitola je výčtem vědeckých zařízení a jejich poslání. Ty zahrnují širokou škálu vědeckých, šlechtitelských a kontrolních úkolů řešených státními ústavy a soukromými společnostmi.

Výsledky jejich práce shrnuje další stať, v níž je věnována pozornost především šlechtitelským programům, které jsou zaměřeny na výkonnost, stabilitu a proměnlivost, a to především s ohledem na choroby, jakost a výkonnost. Dále je studována afinita a adaptace, rezistence vůči mrazu a suchu. S tím souvisí i přechod na viruprostý materiál, vykazující jiné růstové charakteristiky. Závěrem je uveden rozsah úkolů a prací zajišťovaných státem.

V jedenácté kapitole podávají autoři přehled o možnostech odborného vzdělávání a na něj navazujících zájmových a zaměstnaneckých organizací. Poslední (dvanáctá) kapitola je věnována perspektivám klonového šlechtění v Německu. Klonový výběr je považován za hlavní směr moderního systematického udržovacího šlechtění, které umožňuje zlepšovat genetický a zdravotní potenciál odrůd vinné révy. Je zvažována i ekonomická stránka s ohledem na možnost snižování nákladů.

Publikace je bohatě ilustrována a doplněna řadou tabulek a grafů, má podrobný věcný rejstřík a každá kapitola má seznam použité literatury. Knihu je možno odborníkům i zájemcům o vinařství plně doporučit.

prof. dr. Jan Rod, DrSc.

NOVÉ ODRŮDY – NEW VARIETIES

Pšenice ozimá Šárka

Povolena: Česká republika 1996

Šlechtitelská práva: SELGEN a.s., Praha, Česká republika

Šlechtitel: Výzkumný ústav rostlinné výroby Praha a SELGEN a.s.,
Šlechtitelská stanice Úhřetice

Udržovatel: SELGEN a.s., Šlechtitelská stanice Úhřetice

Rodokmen: UH 677/Mironovskaja nizkoroslaja//Avalon/Mironovskaya nizkoroslaja

Metoda šlechtění: Odrůda je výsledkem šlechtitelského programu navazujícího na hodnocení rodičů a hybridů F_2 generace výběrem rostlin nesoucích pozitivní geny zakrslosti (*Rht* geny) projevující se necitlivostí na aplikovaný giberelin (Genet. a Šlecht., 33, 1997: 99–106). Metoda šlechtění byla rodokmenová podle standardního postupu. Reselekce vybraných linií s necitlivostí na giberelin byly prováděny od generace F_6 . Zkoušení ve státních odrůdových pokusech probíhalo v letech 1993–1996 pod označením RU 23 (povolení v generaci F_{12}).

Odolnost k chorobám: Je rezistentní ke rzi plevové (9) a rzi travní (7–8). K této rzi, rase 11, má specifickou rezistenci. Je středně odolná ke rzi pšeničné (5–6) v polních podmínkách a vykazuje specifickou rezistenci k některým jejím izolátům. Má dobrou odolnost vůči padlí travnímu a střední až vyšší odolnost k fuzarióze klasu.

Jakost pekařská B₅–A₆: Vykazuje nižší obsah mokrého lepku (21–22 %), ale vysoký obsah bílkovin (13 %). Sedimentační objem v prostředí SDS se pohyboval v rozmezí 42–52 ml (Hana: 46–62 ml), číslo poklesu 330–350 s. Měrný objem pečiva byl v průměru 494 cm³/100 g. Odolnost k porůstání zrna v klase je dobrá.

Mrázuvzdornost je vyšší, hodnocená stupněm 6; kritická teplota LT 50 = –17°C.

Výnos zrna je nadprůměrný. V průběhu SOP v letech 1994–1996 byla o 2–14 % výnosnější než výkonné kontrolní odrůdy. Nejlépe se uplatnila v řepařské (obilnářské) oblasti, kde překonávala kontroly o 10–12 %. Výnosy soustavně převyšující průměr zkoušených výkonných odrůd dokládají vysokou obecnou adaptabilitu odrůdy ve výnosu zrna.

Ostatní vlastnosti: Je raná až poloraná, s kratší délkou stébla (85–90 cm). Je nositelem genu zakrslosti *Rht2*. Vyznačuje se vysokou odolností k poléhání (stéblo je krátké, pevné). Klas je bílý, jehlancovitý, na špičce dlouze osinkatý. Významnou předností je vysoký sklizňový index (0,56) a stabilně vysoká hmotnost 1000 zrn (45–55 g), vyšší než u obdobně krátkostébelných odrůd s *Rht* geny necitlivosti na giberelin (Ritmo, Versailles).

Winter Wheat Šárka

Registered: Czech Republic 1996

Breeders rights: SELGEN a.s., Prague, Czech Republic

Breeder: Research Institute of Crop Production (RICP), Prague-Ruzyně
SELGEN a.s., Plant Breeding Station Úhřetice

Maintainer: SELGEN a.s., Plant Breeding Station Úhřetice

Pedigree: UH 677/Mironovskaya nizkoroslaya//Avalon/Mironovskaya nizkoroslaya

Breeding method: Careful selection of parents and F₂ crosses preceded the selection of plants for GA insensitivity (presence of *Rht* genes) in F₃ generation (Genet. a Šlecht., 33, 1997: 99–106). Afterwards the standard pedigree method of selection for important characters was applied. Reselection of GA insensitive lines started in F₆. Selected line, denominated as RU 23, was tested in official trials from 1993 to 1996 and then registered as variety Šárka in 1996.

Disease resistance: Šárka has resistance to yellow rust and to stem rust (race 11). Resistance to leaf rust in the field is medium. It has specific resistance to some leaf rust isolates. Resistance to powdery mildew and to Fusarium head blight is higher than average.

Quality B5–A6: Low wet gluten content (21–22%) but high protein content (13%). SDS sedimentation volume ranged from 42 to 52 ml (Hana: 46–62 ml) and falling number from 330 to 350 s. The average loaf volume in Rapid Mix test was 494 cm³/100 g. Šárka has also good sprouting resistance.

Frost resistance is above-average (value 6), with critical temperature (LT 50) around –17 °C.

Grain yield: In official trials for three years this variety outyielded standards each year in all the growing regions. Particularly high yields were reached in sugar beet (cereal) growing region (110–112%). Above-average grain yields in different environments indicate general adaptability in this character.

Other characters: It is an early variety, with short, stiff straw (*Rht2* gene), high harvest index (0.56) and very good resistance to lodging. The spike is white and of tapered shape. Long scurs occur in the upper part of the spike. Grain weight is exceptionally high in comparison with other varieties that carry GA insensitive *Rht* genes (Ritmo, Versailles).

Ing. Václav Šíp, CSc., Miroslav Škorpík

Výzkumný ústav rostlinné výroby, 161 06 Praha-Ruzyně

tel.: 02/360 851, fax: 02/365 228

Ing. Pavel Amler, Ing. Ludmila Bobková, CSc.

SELGEN a.s., Šlechtitelská stanice Úhřetice, 538 32 Úhřetice

tel.: 0455/692 913, fax: 0455/692 939

Instructions for authors

Manuscripts in duplicate should be addressed to: RNDr. Marcela Braunová, Ústav zemědělských a potravinářských informací, Slezská 7, 120 56 Praha 2, Czech Republic.

Manuscript should be typed with a wide margin, double spaced on standard A4 paper. Articles on **floppy disks** are particularly welcome. Please indicate the editor programme used.

Text

Full research manuscript should consist of the following sections: Title page, Abstract, Keywords, a short review of literature (without "Introduction" subtitle), Materials and Methods, Results, Discussion, References, Tables, Legends to figures. A title page must contain the title, the complete name(s) of the author(s), the name and address of the institution where the work was done, and the telephone, fax and e-mail numbers of the corresponding author. The Abstract shall not exceed 120 words. It shall be written in full sentences and should comprise base numerical data including statistical data. As a rule, it should not give an exhaustive review of literature. In the chapter Materials and Methods, the description of experimental procedures should be sufficient to allow replication of trials. Organisms must be identified by scientific name. Abbreviations should be used if necessary. Full description of abbreviation should follow the first use of an abbreviation. The International System of Units (SI) and their abbreviations should be used. Results should be presented with clarity and precision. Discussion should interpret the results. It is possible to combine Results and Discussion in one section. References in the text to citations comprise the author's name and year of publication. If there are more than two authors, only the first one should be named in the text, followed by the phrase "et al.". References should include only publications quoted in the text. They should be listed in alphabetical order under the first author's name, citing all authors, full title of an article, abbreviation of the periodical, volume number, year, first and last page numbers.

Tables and Figures

Tables, figures and photos shall be enclosed separately. The text must contain references to all these annexes. Figures should be referred solely to the material essential for documentation and for the understanding of the text. Duplicated documentation of data in figures and tables is not acceptable. All illustrative material must be of publishing quality. Figures cannot be redrawn by the publisher. All figures should be numbered. Photographs should exhibit high contrast. Both line drawings and photographs are referred to as figures. Each figure should contain a concise, descriptive legend.

Offprints: Forty offprints of each paper are supplied free of charge to the author.

Authors have full responsibility for the contents of their papers. The board of editors of this journal will decide on paper publication, with respect to expert opinions, scientific importance, contribution and quality of the paper.

OBSAH – CONTENTS

Blažková V., Bartoš P., Škorpík M., Hanušová R.: Wheat cultivar Thelvar as a source of bunt (<i>Tilletia</i> spp.) resistance – Odrůda pšenice Tjelvar jako zdroj rezistence k snětím <i>Tilletia</i> spp.	241
Martynková R., Ovesná J., Kučera L. Evaluation of wheat (<i>Triticum aestivum</i> L.) cultivars with standard <i>Gli/Glu</i> alleles using PCR and leaf tissue as a direct template – Hodnocení odrůd pšenice se standardními <i>Gli/Glu</i> alelami metodou PCR s použitím listového pletiva jako přímého templátu	251
Šíp V., Vacke J., Chrpová J., Škorpík M.: Genetická diversita a dědičnost rezistence k viru žluté zakrslosti ječmene u ječmene jarního – Genetic diversity and mode of inheritance of resistance to barley yellow dwarf virus in spring barley.....	261

PŘEHLEDY – REVIEW

Čurn V., Sáková L.: Využití biochemických markerů ve šlechtění řepky a dalších brukvovitých plodin – Utilization of biochemical markers in breeding systems of oil seed rape and allied plants	281
--	-----

NOVÉ ODRŮDY – NEW VARIETIES

Škorpík M., Šíp V., Amler P., Bobková L.: Pšenice ozimá Šárka – Winter wheat Šárka.....	315
---	-----

Z VĚDECKÉHO ŽIVOTA

Cagaš B.: XVIII. Mezinárodní travinářský kongres	280
Míka V.: Osmá mezinárodní konference o NIR spektroskopii	306

ŽIVOTNÍ JUBILEA

Zadina J.: Pětasedmdesátiny šlechtitele Ing. Josefa Břenka	309
--	-----

RECENZE

Rod J.: Schöffling H., Stellmach G. – Klon-Züchtung bei Weinreben in Deutschland	313
--	-----

Vědecký časopis GENETIKA A ŠLECHTĚNÍ ♦ Vydává Česká akademie zemědělských věd – Ústav zemědělských a potravinářských informací, Praha ♦ Redakce: Slezská 7, 120 56 Praha 2, tel.: 02/251 098, fax: 02/242 539 38, e-mail: fofo@uzpi.cz ♦ Sazba: RNDr. Marcela Braunová, Nad Palatou 54, 150 00 Praha 5 ♦ Tisk: ÚZPI Praha ♦ © Ústav zemědělských a potravinářských informací, Praha 1997

Rozšiřuje Ústav zemědělských a potravinářských informací, referát odbytu, Slezská 7, 120 56 Praha 2