

ÚSTAV ZEMĚDĚLSKÝCH A POTRAVINÁŘSKÝCH INFORMACÍ

Czech Journal of
**GENETICS AND
PLANT BREEDING**

Genetika a šlechtění

ČESKÁ AKADEMIE ZEMĚDĚLSKÝCH VĚD

2

**VOLUME 34
PRAGUE
JUNE 1998
CS ISSN 0862-8629**

Genetics and Plant Breeding Genetika a šlechtění

An international journal published under the authorization by the Ministry of Agriculture of the Czech Republic and under the direction of the Czech Academy of Agricultural Sciences

Mezinárodní vědecký časopis vydávaný z pověření Ministerstva zemědělství České republiky a pod gescí České 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 Čermý, 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, preliminary reports, short communications and reviews. Paper are published in English, Czech, or in Slovak.

Periodicity: The journal is published quarterly. Volume 34 appearing in 1998.

Acceptance of manuscripts: Two copies of manuscript should be addressed to: RNDr. Marcela Braunová, editor-in-chief, Institute of Agricultural and Food Information, Slezská 7, 120 56 Praha 2, Czech Republic, tel.: + 420 2 25 10 98, fax: + 420 2 242 538 39, e-mail: editor@login.cz. Both the dates of the reception of the manuscript and of the acceptance by the editorial board for publishing will be indicated in the printed contribution.

Subscription information: Subscription orders can be entered only by calendar year and should be sent to the contact address. Subscription price for 1998 is 56 USD (Europe) and 58 USD (overseas).

Cíl a odborná náplň: Časopis publikuje původní vědecké práce, předběžná a krátká sdělení a odborná review. Práce jsou publikovány v angličtině, češtině nebo ve slovenštině.

Periodicita: Časopis vychází čtvrtletně. Ročník 34 vychází v roce 1998.

Přijímání rukopisů: Rukopisy ve dvou kopiích je třeba zaslat na adresu redakce: RNDr. Marcela Braunová, vedoucí redaktorka, Ústav zemědělských a potravinářských informací, Slezská 7, 120 56 Praha 2, Česká republika, tel.: 02/25 10 98, fax: 02/24 25 39 38, e-mail: editor@login.cz. V uveřejněném příspěvku se uvádí jak datum doručení rukopisu do redakce, tak i jeho přijetí redakční radou k publikaci.

Informace o předplatném: Objednávky na předplatné jsou přijímány na celý rok na adrese: Ústav zemědělských a potravinářských informací, Slezská 7, 120 56 Praha 2. Cena předplatného pro rok 1998 je 224 Kč.

SELECTION OF EMBRYOGENIC GENOTYPES OF ALFALFA (*MEDICAGO SATIVA* L.) AND THEIR UTILISATION IN THE SELECTION OF PLANTS RESISTANT TO FUSARIC ACID*

SELEKCE EMBRYOGENNÍCH GENOTYPŮ VOJTĚŠKY (*MEDICAGO SATIVA* L.) A JEJICH VYUŽITÍ PŘI SELEKCI ROSTLIN REZISTENTNÍCH KE KYSELINĚ FUSAROVÉ

J. Řepková¹, J. Nedělník²

¹ Masaryk University, Faculty of Science, Department of Genetics and Molecular Biology, Brno, Czech Republic

² Forage Crop Research Institute, Ltd., Troubsko, Czech Republic

ABSTRACT: Sixteen varieties and newly-bred varieties of alfalfa (*Medicago sativa* L.) were tested for regeneration potential. Only explants of the variety Zuzana were capable of regenerating *in vitro*. Of a set of 30 plants tested only two produced regenerants from cotyledons and hypocotyls. During the testing of the second cycle of regeneration in the variety Zuzana 36% of petiole explants initiated embryoids and plant formation. The suspension culture derived from the petioles of the regenerants was used for *in vitro* selection for resistance to fusaric acid. The optimum concentration of the toxin for selection at the cellular level was determined. The concentrations of 5 µg/ml and 1 µg/ml promoted the resistant cell culture formation and subsequent regenerants.

Medicago sativa; alfalfa; embryogenic genotypes; fusaric acid; selection

ABSTRAKT: Šestnáct odrůd a novošlechtění vojtěšky *Medicago sativa* L. bylo testováno na regenerační schopnost. Pouze explantáty odrůdy Zuzana byly schopny regenerovat *in vitro*. Ze souboru 30 testovaných rostlin se u dvou vytvářely regeneranty z děloh a hypokotylů. Při testování 2. cyklu regenerace u odrůdy Zuzana byla u 36 % řápkových explantátů iniciována tvorba embryoidů a rostlin. Suspenzní kultura odvozená z řápků těchto regenerantů byla využita pro selekci *in vitro* vůči kyselině fusarové. Byla zjištěna optimální koncentrace tohoto toxinu, vhodná pro selekci na úrovni buněk. Při použití koncentrací 5 µg/ml a 1 µg/ml byly získány rezistentní buněčné kultury a z nich regenerované rostliny.

Medicago sativa; vojtěška; embryogenní genotypy; kyselina fusarová; selekce

INTRODUCTION

Species of the genus *Fusarium* produce a number of toxic compounds, such as e.g. fusaric acid (5-butylpicolinic acid). As *Fusarium* spp. cause diseases of the vascular system, symptomatologically manifested as wilt and rots in many crops of agricultural importance (cotton, peas, tomatoes, alfalfa, banana plants), it is believed that toxic metabolites, including fusaric acid, play an important role in the process of pathogenesis.

Some studies of the toxin were already performed in the past (Kern, 1972), but in the last ten years the toxin has received increasing attention (Matsui, Watanabe, 1988; Mégnéneau, Branchard,

1988; Julien, 1988; Löffler, Mouris, 1992). It has been proved that fusaric acid is toxic to many prokaryotic and eukaryotic organisms (Marasas et al., 1984). Although there is a lack of comprehensive findings about the role of this toxin in plant pathogenesis, a great number of studies have stressed its importance (Ouchi et al., 1989; Chawla, Wenzel, 1987). Fusaric acid acts negatively on the permeability of membranes (Gaumann, 1958) and their electrical potential (Marre et al., 1993), it also affects the cellular ATP level (Kohler, Bentrup, 1983), etc.

An essential prerequisite of successful application of selection *in vitro* is the regeneration of plants from resistant cell lines and the correlation between resis-

* The research was supported by project of the Ministry of Agriculture of the Czech Republic No. IE 0950975067.

tance at the cellular level and at the whole-plant level. The primary object of the present study was therefore the selection of embryogenic genotypes of alfalfa (*Medicago sativa* L.) among the agriculturally important varieties and increased somatic embryogenesis through regenerated plants used as sources of explants. The material obtained in this way was used in the selection of cell lines tolerant or resistant to the toxin (fusaric acid) and in the regeneration of plants from these lines.

MATERIAL AND METHODS

Embryogenic material

To assess embryogenic potential, 16 varieties or newly-bred varieties (Zuzana, Pálava, Morava, ŽE XXX, P.S. 8920, Arrow, LI POP II, LI R6 ŽE, Magnab, Topaz, Viking, Sigma, OS-11, Alkiva, Regio, Lucia) were used. After surface sterilisation (30% SAVO for 30 minutes, 40% SAVO for 10 min.) the seeds produced seedlings *in vitro* on liquid culture medium of Phillips and Collins (Phillips, Collins, 1979), liquid basal MS medium (Murashige, Skoog, 1962) contained 1/10 of concentration of macroelements and microelements, full concentration of vitamins, 1/4 of concentration of myoinositol, full concentration of iron and 1% sucrose.

Primary explants were segments of hypocotyls, petioles and cotyledons 1 cm long. Initiation medium B1 (Blaydes, 1966) was supplemented with growth substances 50 μ M 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), 5 μ M kinetin (KIN) and 2 g/l of yeast extract. After 8 to 10 days of cultivation the cultures were plated on regeneration medium B1 with growth substances 1.07 μ M naphthalene acetic acid (NAA), 9.3 μ M KIN and 2 g/l of yeast extract (Novák, Konečná, 1982). The plants with less developed root systems were placed on basal medium B1 lacking growth substances.

The regenerated plants were vegetatively propagated *in vitro* on MS medium with 1/2 concentration of macroelements and microelements, full concentration of vitamins, 1/4 of concentration of myoinositol, full concentration of iron and 1% of sucrose (Phillips, Collins, 1979). Callus cultures were derived again from the petioles and plant regeneration was initiated on the same media.

Suspension cultures

From primary explants of regenerated plants callus cultures were derived on basal medium SH (Shenk, Hildebrandt, 1972) with growth substances 2,4-D (5 μ M) and KIN (1 μ M) (Binarová et al., 1990). Callus cultures were maintained at 25 °C. After 5 weeks of cultivation plant cell suspension cultures were derived from callus cultures on liquid B1 medium supple-

mented with growth substances coincident with those for callus cultures (5 μ M 2,4-D, 1 μ M KIN). Suspension cultures were maintained at 25 °C under a photoperiodic regime (LD 16:8). Cell viability was determined by fluorescent colorant fluorescein diacetate (5 mg/1 ml acetone).

Selection

Suspension cultures in the exponential growth phase with a density of about 10^4 viable cells/1 ml of suspension were suitable for selection at the cellular level. The toxic substance used was fusaric acid (5-butylpicolinic acid, Sigma company). 10 ml of agar selective medium in Petri dishes contained basal medium SH, 5 μ M 2,4-D, 1 μ M KIN and fusaric acid at concentrations of 1, 5, 10 μ g/ml. Each concentration was replicated three times. The surface of selective medium was covered with 1 ml of cell suspension (Binarová et al., 1990). The cells were cultured on the medium at 25 °C for 5 weeks in the dark. The cells generating micro-colonies were placed on regeneration medium (Novák, Konečná, 1982). The regenerated plants were transferred to non-sterile conditions.

RESULTS AND DISCUSSION

On initiation medium a certain percentage of explants necrotized. Only part of explants formed calluses on the medium. There were apparent varietal differences, as shown in Table I. Of 16 varieties only the explants of the variety Zuzana were capable of regeneration *in vitro*. In a group of 30 plants two (Z/5, Z/9) produced regenerated plants from cotyledons and hypocotyls. In the variety Topaz and ŽE XXX the formation of embryoids was initiated but they did not grow into regenerated plants (Table I). In the testing of the second cycle of regeneration in the variety Zuzana, the formation of embryoids and plants was initiated in 36% of petiole explants.

The second cycle of regeneration considerably improved the regeneration potential of the initial material used in the experiments. The selection of genotypes with good regeneration potential in agriculturally important varieties is of great benefit especially in other applications, such as selection at the cellular level, protoplast fusion and somatic hybrids obtaining. The range of genotypes with good regeneration potential is relatively narrow. For different applications genotypes of alfalfa with declared embryogenic potential are used, e.g. Regen S (Bingham et al., 1975), Rambler, Rangeland (Arcioni et al., 1987).

Somatic embryogenesis in alfalfa (*Medicago sativa* L.) is coded by 2 dominant loci (Crea et al., 1995; Wan et al., 1988). Regeneration is genotype-specific and only several genotypes within the variety may have regeneration potential (Arcioni et al., 1990). Bingham et al. (1975) discovered a high level of heritability

I. Initiation of callogenesis, formation of embryoids and regenerated plants in tested varieties and newly-bred varieties of alfalfa (*Medicago sativa* L.)

Variety	Number of test plants	% of plants forming		
		callus on initiation medium	embryoids	regenerants
Zuzana	30	86	7	6.6
Pálava	30	82	0	0
Morava	30	71	0	0
ŽE XXX	30	42	4	0
P.S. 9820	30	47	0	0
Arrov	30	32	0	0
LI POP II	30	28	0	0
LI R6 ŽE	30	30	0	0
Magnab	30	68	0	0
Topaz	30	94	9	0
Viking	30	76	0	0
Sigma	30	36	0	0
OS-11	30	42	0	0
Alkiva	30	28	0	0
Regio	30	33	0	0
Lucia	30	30	0	0

II. Number of micro-colonies, embryoids and regenerated plants formed after selection of alfalfa (*Medicago sativa* L.) cells to different concentrations of toxin (fusaric acid)

Concentration of fusaric acid µg/ml	Mean no. of		
	micro-colonies/P. dish	embryoids/explant	regenerants/explant
0	77.0 ± 8.11	15.0 ± 1.22	12.3 ± 1.45
1	20.3 ± 8.76	7.0 ± 0.89	0.6 ± 0.19
5	6.1 ± 1.74	7.2 ± 0.75	0.1 ± 0.08
10	0	0	0

lity of embryogenesis which helped to increase the regeneration potential of the variety from 12% to 67% during 2 cycles of recurrent selection. In the embryogenic genotype obtained in our work the embryogenic potential can be increased by using explants from the regenerated plant.

Calluses derived from the petioles of regenerated plants were used to establish suspension cultures which were used in selection for fusaric acid. After 6 weeks of cell cultivation on the selective medium micro-calluses were formed from the cells theoretically tolerant to the toxin. After selection for 5 µg/ml of fusaric acid the cells generated micro-calluses only sporadically, 1 to 10 colonies 0.5–1 mm in diameter on 1 Petri dish. On the medium supplemented with 1 µg/ml of fusaric acid 5 to 45 colonies (1.5–2 mm/Petri dish) were formed. At the highest concentration of 10 µg/ml no micro-colonies were generated on the selective medium (Table II). This concentration is too high and inapplicable for selection at the cellular level. The control, cells unaffected by fusaric acid, formed 77 micro-calluses on the average. The micro-calluses were placed on initiation and regeneration media. The numbers of regenerated plants are summarised in Table II. These regenera-

ted plants have not been analysed for the resistance to *Fusarium* so far.

Fusaric acid was used as a selection agent in the formation of resistant calluses of tomato (Toyoda et al., 1984). Wenzel et al. (1984) used this toxin in the selection of micro-spores of barley. In the selection of callus cultures of barley after 4 selection cycles the authors obtained 8–11 % of calluses resistant to fusaric acid and subsequently verified resistance in the regenerated plants (Chawla, Wenzel, 1987). The experiments utilizing this toxin for selection *in vitro* were also reported in lily (Löffler, Mouris, 1992), tomato (Gapillout et al., 1996), gladiolus (Remotti et al., 1997).

In alfalfa the filtrate of *Fusarium oxysporum* f. sp. *medicaginis* (Binarová et al., 1990; Hartman et al., 1984) was successfully used for the selection of resistant cells and subsequent regenerated plants. Concerning the purified toxins, T pathotoxin produced by *Helminthosporium maydis* was used in maize (Gengenbach, Green, 1975) and *Pseudomonas* and *Alternaria* toxins in tobacco (Thonutong et al., 1983).

The selection conducted in the manner as described above can increase the effectiveness of breeding proce-

dures, but it cannot replace conventional techniques and can be only one of the complementary methods.

REFERENCES

- ARCIONI, S. – PEZZOTTI, M. – DAMIANI, F. (1987): *In vitro* selection of alfalfa plants resistant to *Fusarium oxysporum* f. sp. *medicaginis*. Theor. Appl. Genet., 74: 700–705.
- ARCIONI, S. – DAMIANI, F. – PUPILLI, F. – PEZZOTTI, M. (1990): Somatic embryogenesis and somaclonal variation in *Medicago sativa* L. J. Genet. Breed., 43: 223–230.
- BINAROVÁ, P. – NEDÉLNÍK, J. – FELLNER, M. – NE-DBÁLKOVÁ, B. (1990): Selection for resistance to filtrates of *Fusarium* spp. in embryogenic cell suspension culture of *Medicago sativa* L. Plant Cell Tissue Organ Cult., 22: 191–196.
- BINGHAM, E. T. – HURLEY, L. V. – KAATZ, D. V. – SAUNDERS, J. W. (1975): Breeding alfalfa which regenerates from callus tissue in culture. Crop Sci., 15: 719–721.
- BLAYDES, D. F. (1966): Interaction of kinetin and various inhibitors in the growth of soybean tissue. Physiol. Plant, 19: 748–753.
- CHAWLA, H. S. – WENZEL, G. (1987): *In vitro* selection for fusaric acid resistant barley plants. Plant Breed., 99: 159–163.
- CREA, F. – BELLUCCI, M. – DAMIANI, F. – ARCIONI, S. (1995): Genetic control of somatic embryogenesis in alfalfa (*Medicago sativa* L. cv. Adriana). Euphytica, 81: 151–155.
- GAPILLOUT, I. – MILAT, M. L. – BLEIN, J. P. (1996): Effects of fusaric acid on cells from tomato cultivars resistant or susceptible to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Eur. J. Plant Path., 102: 127–132.
- GAUMANN, E. (1958): The mechanisms of fusaric acid injury. Phytopathology, 48: 670–686.
- GENGENBACH, B. G. – GREEN, C. E. (1975): Selection of T-cytoplasm maize callus cultures resistant to *Helminthosporium maydis* race T pathotoxin. Crop Sci., 15: 645–649.
- HARTMAN, C. L. – MCCOY, T. J. – KNOUS, T. R. (1984): Selection of alfalfa (*Medicago sativa*) cell lines and regeneration of plants resistant to the toxin(s) produced by *Fusarium oxysporum* f. sp. *medicaginis*. Plant Sci. Lett., 34: 183–194.
- JULIEN, M. (1988): Effects of the *Fusarium* sp. toxins and selection of crude toxin resistant strains in mesophyll cell cultures of *Asparagus officinalis*. Plant Physiol. Biochem., 26: 123–72.
- KERN, H. (1972): Phytotoxins produced by fusaria. In: WOOD, R. K. S. et al. (eds.): Phytotoxins in Plant Diseases. London, Academia Press: 35–48.
- KOHLER, K. – BENTRUP, F. W. (1983): The effect of fusaric acid upon electrical membrane properties and ATP level in photoautotrophic cell suspension cultures of *Chenopodium rubrum*. L. Z. Pflanzenphysiol., 109: 355–36.
- LOFFLER, H. J. M. – MOURIS, J. R. (1992): Fusaric acid: phytotoxicity and *in vitro* production by *Fusarium oxysporum* sp. *lilii*, the causal agent of basal rot in lilies. Neth. J. Pl. Path., 98: 107–115.
- MARASAS, W. F. O. et al. (1984): Toxigenic *Fusarium* species: Identification and mycotoxicology. Pennsylvania State University Press.
- MARRE, M. T. – VERGANI, P. – ALBERGONI, F. G. (1993): Relationship between fusaric acid uptake and its binding to cell structures by leaves of *Egeria densa* and its toxic effects on membrane permeability and respiration. Physiol. Mol. Plant Pathol., 42: 141–157.
- MATSUI, Y. – WATANABE, M. (1988): Quantitative analysis of fusaric acid in the culture filtrate and soybean plants inoculated with *Fusarium oxysporum* var. *redolens*. J. Rakuno Gakuen Univ., 13: 159–167.
- MÉGNÉNEAU, B. – BRANCHARD, M. (1988): Toxicity of fusaric acid observed on callus cultures of various *Cucumis melo* genotypes. Plant Physiol. Biochem., 26: 585–588.
- MURASHIGE, T. – SKOOG, F. (1962): A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant, 15: 473–479.
- NOVÁK, F. J. – KONEČNÁ, D. (1982): Somatic embryogenesis in callus and cell suspension cultures of alfalfa (*Medicago sativa* L.). Z. Pfl.-Physiol., 105: 279–284.
- OUCHI, S. et al. (1989): A promising strategy for the control of fungal disease by the use of toxin-degrading microbes. In: GRANITI, A. et al.: Phytotoxins and Plant Pathogenesis. NATO ASI Series Vol. 27. Berlin, Springer Verlag: 301–317.
- PHILLIPS, G. C. – COLLINS, G. B. (1979): *In vitro* tissue culture and plant regeneration from callus cultures of red clover (*T. pratense*). Crop Sci., 19: 50–64.
- REMOTTI, P. C. et al. (1997): Selection of cell lines and regeneration of plants resistant to fusaric acid from *Gladiolus xgrandiflorus* cv. Peter Pears. Euphytica, 96: 237–245.
- SCHENK, R. – HILDEBRANDT, A. (1972): Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. Can. J. Bot., 29: 199–204.
- THONUTONG, P. – FURUSAWA, I. – YAMAMOTO, M. (1983): Resistant tobacco plants from protoplast-derived calluses selected for their resistance to *Pseudomonas* and *Alternaria* toxins. Theor. Appl. Genet., 66: 209–215.
- TOYODA, H. H. et al. (1984): Selection of resistant tomato calli to fusaric acid. Ann. Phytopath. Soc. Japan, 50: 538–540.
- WAN, Y. – SORESENSEN, E. L. – LIANG, G. H. (1988): Genetic control of *in vitro* regeneration in alfalfa (*Medicago sativa* L.). Euphytica, 39: 3–9.
- WENZEL, G. – KOHLER, F. – SCHUCHMANN, R. – FO-ROUGH, B. (1984): Selection *in vitro* for resistances. In: LANGE, W. – ZEVEN, A. C. – HOGENBOOM, N. G. (eds.): Efficiency in plant breeding. Proc. Xth EUCARPIA Congr., Wageningen, the Netherlands, June 1983. Pudoc Wageningen: 224–227.

Received on March 18, 1998

Contact Address:

RNDr. Jana Řepková, CSc., Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, Katedra genetiky a molekulární biologie, Kotlářská 2, 611 37 Brno, Česká republika, tel.: 00 420 5 41 12 95 46, fax: 00 420/5 41 21 12 14, e-mail: repkova@sci.muni.cz

ODRŮDA PŠENICE AMIGO A LINIE W49 JAKO ZDROJE REZISTENCE K CHOROBÁM

WHEAT CULTIVAR AMIGO AND LINE W49 AS SOURCES OF DISEASE RESISTANCE

P. Bartoš, R. Hanušová, V. Blažková, M. Škorpík

Research Institute of Plant Production, Prague-Ruzyně, Czech Republic

ABSTRACT: Line W49 possessing translocation from *Thinopyrum intermedium* with wheat leaf rust resistance gene *Lr38* was crossed with Czech winter wheat cultivars Zdar and Regina with the aim to transfer *Lr38* into agronomically more valuable genotypes. The same aim was followed in the crosses of the cv. Amigo (TIAL.1RS) possessing resistance genes *Lr24*, *Sr24*, *SrAmigo*, *Pm17* with cvs. Zdar and Regina. Transmission of *Lr38* from the line W49 into the progeny was reduced, particularly when transferred by male gametes. Transmission of resistance genes from the cv. Amigo was regular. Resistance genes *Lr38*, *Lr24* and stem rust resistance of the cv. Amigo were effective to all rust races used in our trials. Gene *Pm17* was effective only to about a half of the powdery mildew isolates of our collection. Cv. Amigo proved resistance also to the bunt (*Tilletia caries* and *Tilletia laevis*, races T-1 and L-5, respectively). Selected F_5 and F_6 lines resistant to powdery mildew and/or leaf rust were also tested in field trials for earliness, height and powdery mildew and rust reaction. Lines derived from the cross Amigo x Regina were on the average as early as Regina, with comparable yield but a longer straw (average 104 cm). Lines derived from the cross W49 x Regina were by 1–3 days later than Regina, had the average length of straw 100 cm and a lower yield. In spite of the advanced generation (F_6), and continuous yearly selection for resistance, susceptible plants to leaf rust still appeared.

wheat; cv. Amigo; line W49; resistance; leaf rust; stem rust; powdery mildew; common bunt

ABSTRAKT: Linii W49 mající translokaci z *Thinopyrum intermedium*, na níž je gen rezistence ke rzi pšeničné *Lr38*, jsme křížili s odrůdami Zdar a Regina s cílem přenosu tohoto genu do agronomicky hodnotných genotypů. Se stejným cílem a s týmiž odrůdami jsme křížili odrůdu Amigo (TIAL.1RS), která má geny rezistence *Lr24*, *Sr24*, *SrAmigo* a *Pm17*. Přenos genu *Lr38* z linie W49 do potomstev byl snížen, zejména přenos pylu. Přenos genů rezistence z odrůdy Amigo byl pravidelný. Geny *Lr38*, *Lr24* a rezistence odrůdy Amigo ke rzi travní byly účinné ke všem rasám rzi testovaným v našich pokusech. Gen *Pm17* byl účinný jen k polovině izolátů naší kolekce padlí travního. Odrůda Amigo byla odolná také ke sněti mazlavé (rase T-1) a k sněti hladké (rase L-5). U vybraných kmenů bylo v polních pokusech sledováno přezimování, ranost, délka stébla a napadení rzi pšeničnou a padlí travním.

pšenice setá; odrůda Amigo; linie W49; rezistence; rez pšeničná; rez travní; padlí travní; sněť hladká a mazlavá

ÚVOD

V poslední době se jako zdrojů odolnosti pro získání rezistence pšenice seté k chorobám stále častěji používá příbuzných kulturních nebo planých druhů. Přenos bývá zpravidla vícestupňový. Během prvního stupně se rezistence přenáší do hexaploidní linie, dobře křížitelné s agronomicky vhodnými odrůdami. Další stupně spočívají v postupném odstraňování nežádoucích vlastností výběry v potomstvech či ve zlepšování vhodných agronomických vlastností a znaků dalším křížením. Naše práce popisuje přenos rezistence ke rzi pšeničné z málo produktivní linie W49 s translokací z *Thinopyrum intermedium* a přenos rezistence ke rzi pšeničné, rzi travní a padlí travnímu z odrůdy Amigo (translokace TIAL.1RS) do českých odrůd pšenice ozimé Regina a Zdar.

MATERIÁL A METODY

Linie W49 byla získána laskavostí prof. F. J. Zellerera z Technické univerzity v Mnichově, katedry pěstování a šlechtění rostlin. Vyšlechtila ji Dr. A. Wienhues s cílem přenosu rezistence ke rzi z částečného amfiploida *T. aestivum* – *Th. intermedium* ($2n = 8x = 56$) s adicí 7 chromozomů z *Thinopyrum intermedium* ke genomu hexaploidní pšenice. Zpětným křížením tohoto amfiploida s odrůdou Heines IV získala adiční linie s chromozomy z pýru v genetickém pozadí odrůdy Heines IV. Tyto linie jednak křížila s monosomickými liniemi Chinese Spring, jednak je po ozáření rentgenovými paprsky zpětně křížila s odrůdou Heines IV s cílem získat v prvním případě substituční a ve druhém případě translokační linie rezistentní ke rzi. Gen rezistence ke

rzi pšeničné obsažený v linii W49 byl označen symbolem *Lr38* (Friebe et al., 1992).

Odrůda Amigo byla rovněž získána laskavostí prof. F. J. Zeller. Byla vyšlechtěna zpětným křížením octoploidního tritikale Gaucho (Chinese Spring x žito In-save) s dvěma liniemi pšenice a následným ozářením rentgenovými paprsky (Wood et al., 1974 – cit. Zeller, Fuchs, 1983). Ze žita získala odrůda Amigo segment chromozomu 1R, který je lokalizován na chromozomu 1A (TIAL.1RS). Z linie TAP 48 (hybrid pšenice s *Thinopyrum ponticum*) byla přenesena do odrůdy Amigo translokace z pýru. Na translokaci ze žita je lokalizován gen rezistence k padlí travnímu *Pm17* (Zeller, Fuchs, 1983), který je alelický s genem *Pm8* (Hsam, Zeller, 1997), dále symbolem dosud neoznačený gen rezistence ke rzi travní (možná alela genu *Sr31*) a gen rezistence k *Schizapis graminum* (Rondani) – *Gb2* (Sebesta, Wood, 1978 – cit. Hsam, Zeller, 1997; Sebesta et al., 1994). Na translokaci z pýru jsou lokalizovány geny rezistence ke rzi pšeničné *Lr24* a ke rzi travní *Sr24*, které jsou ve vazbě. Translokace z pýru se nachází na satelitu chromozomu 1B (T1BL.1BS-3Ae 1L). Na ní lokalizované geny rezistence nejsou ve vazbě s geny na translokaci TIAL.1RS. Negativní vliv TIAL.1RS na kvalitu je nižší než u T1BL.1RS (Graybosch et al., 1993).

Linie W49 a odrůda Amigo byly kříženy s odrůdou Regina, pocházející z křížení (Jubilejné x Zora) x Tardorna a mající gen *Pm5* a *SuPm8*, a s odrůdou Zdar, pocházející z křížení Caribo x Derenburger St.6290, mající geny *Pm4b* a *Pm5* a nepopsaný gen rezistence ke rzi travní. V odrůdách Regina ani Zdar nebyly zjištěny specifické geny rezistence ke rzi pšeničné.

V polních pokusech byly prováděny výběry na odolnost k padlí travnímu a rzi pšeničné při přirozeném napadení a na agronomicky vhodné typy. Ve skleníku bylo k testům rezistence užito různých ras rzi pšeničné, rzi travní a padlí travního, jak je uvedeno ve výsledcích.

V roce 1995 jsme rovněž orientačně vyzkoušeli reakci několika kříženců a odrůdy Amigo k *Tilletia* spp. směsí chlamydospor sněti mazlavé (*Tilletia caries*, rasa T-1) z Kroměříže a sněti hladké (*Tilletia laevis* rasa L-5) z Ruzyně. Vzorky osiva jsme inokulovali protřeptáním s chlamydosporami sněti (10 mg spor/10 g osiva) a vysévali na pole. Před sklizní pšenice jsme napadení hodnotili procentem napadených klasů z celkového počtu klasů.

Reciproké křížení odrůdy Amigo a linie W49 s odrůdami Regina a Zdar bylo provedeno v roce 1991, v dalších letech následovaly výběry na odolnost k padlí travnímu a rzi pšeničné u potomstva kříženců s odrůdou Amigo a na odolnost ke rzi pšeničné u potomstva křížení s linií W49. Současně se vybíraly fenotypy blízké odrůdám Regina a Zdar. V roce 1994 bylo vyseto 72 rostlin z neštěpících odolných F_3 kmenů z předešlého roku, a to 57 rostlin z křížení Amigo x Regina, které se ukazovalo jako nejperspektivnější, čtyři rostliny z křížení W49 x Zdar, tři rostliny z křížení W49 x

Regina a dvě rostliny z křížení Zdar x W49. V roce 1995 byla vyseta potomstva nejlepších rostlin z F_4 předešlého roku s odolností ke rzi pšeničné nebo kombinovanou odolností ke rzi pšeničné a padlí travnímu, a to 45 rostlin z křížení Amigo x Regina, dvě z křížení W49 x Regina, dvě z křížení W49 x Zdar a jedna z křížení Zdar x W49. Potomstva jednotlivých rostlin byla vysévána do dvou řádků o délce 1 m. V roce 1996 bylo sklizeno nejlepších 45 kmenů generace F_5 , z toho pouze jeden z křížení W49 x Regina. Z této sklizně byly vybrány nejlepší rostliny; z nich získané osivo bylo pak vyseto na parcely 2,4 m² secím strojem Seedmatic bez opakování. Během vegetace této F_6 generace byl sledován stav po zimě, plné metání, výška porostu, napadení padlím a výnos zrna. Stejně osivo bylo užito pro skleníkové testy na reakci k padlí travnímu (6 různých izolátů avirulentních k *Pm17*) a rzi pšeničné (rasa 61Sa-Ba, izolát 628). Napadení v polním pokusu bylo hodnoceno stupnicí 9 až 1 (9 odolné – 1 náchylné). Infekční typy (IT) byly popsány podle autorů Stakman et al. (1962). V této stupnici (0 až 4) znamená 0 absenci napadení, 0; chlorózy, 1 drobné kupky s chlorózami, 2 větší kupky s chlorózami, 3 a 4 kupky bez chloróz, přičemž infekční typ 4 má velké kupky charakterizující vysokou náchylnost. Pokus ve Švýcarsku byl hodnocen tamní užívanou opačnou stupnicí (1 odolné – 9 náchylné).

VÝSLEDKY A DISKUSE

Štěpné poměry v F_2 a F_3 generacích kříženců s linií W49 (tab. I a II) naznačují účinnost jednoho dominantního genu rezistence, avšak ukazují nepravidelný přenos rezistence, zřejmě způsobený translokovaným segmentem chromozomu z pýru. Naše výsledky se liší od předpokladu publikovaného v práci autorů Friebe et al. (1992), totiž že štěpní rezistence v F_2 ke rzi pšeničné v křížení linie W49 s jinými odrůdami by mělo být normální, a sice 3 rezistentní : 1 náchylná. Odpovídají však údajům, které později publikovali Dyck a Friebe (1993) pro translokaci téhož genu, avšak z jiné linie. V jejich pokusech byl přenos translokace samčím gametami redukován. Rovněž v našich kříženích byl zjištěn nižší přenos pylu.

S nižším počtem rezistentních rostlin proti očekávanému štěpnému poměru 3 : 1 se u translokací setkáváme dosti často. Odchytky mohou být různé také v závislosti na partnerské odrůdě užité v křížení, jak bylo zjištěno např. u translokací T1BL.1RS (Bartoš, 1993).

Dyck a Friebe (1993) přenesli segment chromozomu z pýru s genem *Lr38* do jarní odrůdy Thatcher. Zjistili však výrazně negativní vliv na výnos. Linie k tomu použitá, označená jako T7, měla na chromozomu 7A nejdelší segment chromozomu z *Th. intermedium* ze všech testovaných translokačních linií. Námi použitá translokace W49 měla menší segment 7Ai 2L. Mohla by být tedy z agronomického hlediska

I. Štěpení reakce ke rzi v F_2 generaci kříženců – Segregation of rust reactions in F_2 generation of the crosses

Křížení ¹	Rez – rasa/izolát ²	Počet rostlin ³			Předpokládaný štěpný poměr ⁷	χ^2	P
		R ⁴	S ⁵	celkem ⁶			
Zdar x W49	<i>P. recondita</i> 61SaBa/628	110	111	221	3 : 1	75,0	<0,01
W49 x Zdar	<i>P. recondita</i> 61SaBa/628	168	81	249	3 : 1	7,53	<0,01
Zdar x W49	<i>P. recondita</i> 14SaBa/600	75	51	126	3 : 1	16,9	<0,01
Amigo x Regina	<i>P. recondita</i> 14SaBa/600	59	18	77	3 : 1	0,108	0,5–0,2
Amigo x Zdar	<i>P. recondita</i> 14SaBa/600	65	16	81	3 : 1	1,08	0,5–0,2
Amigo x Regina	<i>P. graminis</i> 21/G69	65	4	69	15 : 1	0,02	0,99–0,95
Amigo x Zdar	<i>P. graminis</i> 21/G69	73	10	83	15 : 1	4,7	0,05–0,01

¹cross, ²rust – race/isolate, ³number of plants, ⁴resistant, ⁵susceptible, ⁶total, ⁷expected segregation ratio

II. Štěpení reakcí ke rzi v F_3 generaci potomstev rezistentních rostlin vybraných v F_2 ve fázi 1–2 listů po inokulaci rzi pšeničnou rasou 61SaBa (628) – Segregation of rust reactions at the first leaf stage in F_3 generation of the progenies of resistant plants selected in F_2 generation after inoculation with leaf rust race 61SaBa (isolate 628)

Křížení ¹	Počet linií ²				Předpokládaný poměr ⁷	χ^2	P
	R ³	S ⁴	štěpí ⁵	celkem ⁶			
W49 x Zdar	15	12	46	73	37 : 12 : 24	13,04	<0,01
W49 x Regina	13	13	12	38	19 : 6 : 13	9,08	0,05–0,01

¹cross, ²number of lines, ³resistant, ⁴susceptible, ⁵segregate, ⁶total, ⁷expected segregation ratio

perspektivnějším zdrojem rezistence než linie, kterou použili Dyck a Friebe (1993). Při dalším šlechtitelském využití bude nutné pokračovat v odstraňování nežádoucích vlastností. Výhodou tohoto zdroje rezistence je, že jde o nový gen, popsáný v roce 1992, šlechtitelsky dosud nevyužitý. Nevýhodou je, že jde o nehomoeologní translokaci, jež bývá agronomicky méně vhodná.

Jako výhodnější zdroj rezistence se ukazuje linie z křížení s odrůdou Amigo, zejména kombinace s odrůdou Regina. Přenos rezistence ke rzi pšeničné i travní do potomstva byl pravidelný s výjimkou jediného případu, kdy byl poněkud nižší počet odolných rostlin proti předpokladu 15 náhylných : 1 odolná při dvou dominantních genech rezistence ke rzi travní (tab. I). Nevýhodou však je, že translokace T1AL.1RS je provázána, podobně jako translokace T1BL.1RS, nižší pečarskou kvalitou. Na rozdíl od linie W49, která přenáší pouze gen *Lr38*, mají kříženci s odrůdou Amigo sice větší počet genů rezistence, avšak ve vazbě jsou pouze některé geny.

Výsledky polních pozorování z VÚV Praha-Ruzyň jsou shrnuty v tab. III, z FAL Zürich-Reckenholz v tab. IV. V Ruzyňi byl stav pokusu po zimě dobrý. Metání linií z křížení Amigo x Regina (35 kmenů) se pohybovalo v rozpětí 2. června až 10. června a v průměru bylo shodné s odrůdou Regina. Nežádoucím znakem byla délka stébla (průměr 104 cm, rozpětí 95–120 cm), větší než u odrůdy Regina. Průměrný výnos byl 841 g/m², pouze dvě linie měly vyšší výnos než Regina, u pěti linií přesáhl výnos 1 000 g/m². Srovnání reakcí k padlí travnímu v polním a skleníkovém pokusu umožňuje tab. III. V polním pokusu byla hodnocena

odolnost k padlí travnímu nejvyšším stupněm 9 u devíti kmenů, stupněm 8 u pěti kmenů a stupněm 7 rovněž u pěti kmenů. Všechny tyto kmeny s výjimkou jednoho byly hodnoceny alespoň k jednomu izolátu padlí travního infekčním typem 0–1 ve skleníku. Ve skleníkovém pokusu se většinou lišily reakce k použitým izolátům padlí travního. Ke všem izolátům bylo ve skleníku odolných (IT 0–2) 13 linií; všechny byly hodnoceny v polním pokusu stupněm 9 nebo 8. Ke rzi pšeničné byly ve skleníku kromě čtyř odolné všechny linie, přičemž ke rzi pšeničné i padlí travnímu bylo odolných 11 kmenů.

U rzi pšeničné je možné jen částečné srovnání polních a skleníkových údajů (tab. III a IV), neboť v Ruzyňi nemohlo být napadení rzi pšeničnou pro slabý výskyt hodnoceno. Z křížení Amigo x Regina testovaných rzi pšeničnou ve skleníku bylo jen u pěti kmenů hodnoceno napadení na poli ve Švýcarsku. Všechny tyto kmeny vyznačující se infekčními typy 0;1 byly na poli hodnoceny stupni 0–2, tedy jako odolné. Z křížení s W49 byly na poli dva kmeny hodnoceny jako odolné (IT1), další dva jako středně napadené. Ve skleníkovém pokusu tento materiál štěpil.

Z křížení W49 x Regina jsme v polním pokusu zkoušeli pouze čtyři kmeny, které byly o jeden až tři dny pozdnější než Regina, s delším stéblem (průměr 100 cm) a nižším výnosem. Všechny čtyři kmeny byly odolné ke rzi pšeničné (IT 0;) avšak u tří z nich vyštěpily náhylné rostliny.

Polní pozorování ve Švýcarsku ukázalo, že kmeny z křížení Amigo x Regina byly v průměru pozdnější než kontrolní české odrůdy. Pouze dva kmeny byly o jeden den ranější a čtyři kmeny se shodovaly v ra-

III. Výsledky polního pokusu a skleníkových testů (Praha-Ruzyně 1997) potomstev křížení Amigo x Regina (2/3-56/1) a W49 x Regina (58/1-58/5) (F₆ generace) – Results of the field and greenhouse tests with progenies of crosses Amigo x Regina (2/3-56/1) and W49 x Regina (58/1-58/5) (Praha-Ruzyně 1997) (F₆ generation)

Výběr z kmene ¹	Stav po zimě ²	Plné metání (den) ³	Padlí – pole ⁴	Výška ⁵ (cm)	Výnos ⁶ (g/m ²)	Skleník – IT ⁹		Výběr z kmene ¹	Stav po zimě ²	Plné metání (den) ³	Padlí – pole ⁴	Výška ⁵ (cm)	Výnos ⁶ (g/m ²)	Skleník – IT ⁹	
						padlí travní ⁷ x	rez pšeničná ⁸ xx							padlí travní ⁷ x	rez pšeničná ⁸ xx
2/3	8	6,6	6	105	804	3–4	;1	38/1	7	7,6	8	100	850	0	;
3/1	9	7,6	5	105	879	1–4	;	39/1	8	6,6	7	100	906	0–4	;
4/1	8	8,6	7	105	1 024	0–2–3	;1–2	41/1	9	2,6	3	105	721	0–4	;
5/3	8	10,6	6	100	748	0–4	;	42/1	8	6,6	3	105	724	3–4	;
6/1	8	8,6	8	110	889	0–4	;	44/1	8	7,6	5	95	915	3–4	;
7/1	8	9,6	7	105	810	3–4	;1–2	45/1	8	6,6	4	110	808	3–4	;
8/1	7	9,6	9	105	846	0	;	46/1	8	9,6	4	100	867	3–4	;
10/1	8	9,6	7	105	760	0–3	;1–2	49/1	7	9,6	5	110	678	4	;
12/1	9	8,6	9	105	848	0–3	;	50/1	8	7,6	9	100	744	3–4	;
13/1	9	7,6	9	115	950	0–1	;	53/1	7	5,6	9	95	1 134	0–1	;
14/1	8	7,6	7	120	1 029	1–4	4	54/1	7	10,6	9	100	1 011	0–1	;
16/1	8	7,6	9	120	724	0–1	4	55/1	7	9,6	9	115	1 009	0–1–2	;
17/1	8	3,6	5	105	754	1–2–4	;	56/1	8	3,6	8	105	1 008	0–1–2	;
18/2	8	2,6	6	105	791	2–4	;								
19/1	7	3,6	8	120	776	0–1	4								
29/1	8	2,6	5	110	739	3–4	4?	58/1	7	8,6	6	100	1 010	–	;+3
30/1	9	7,6	5	110	565	3–4	;	58/3	8	10,6	8	90	829	–	;
31/1	8	8,6	4	105	824	2–4	;	58/4	8	9,6	8	110	771	–	0+4
32/1	8	9,6	9	115	931	0–1	;	58/5	9	9,6	8	100	–	–	0+4
34/1	9	8,6	9	110	857	0–1	;								
35/1	7	10,6	8	110	704	0–1	;								
36/1	8	3,6	5	100	804	3–4	;	Regina	9	7,6	3–4	80	1 025	3–4	4

^x Rozpětí reakcí k 6 izolátům padlí travního – Spread of reactions to 6 powdery mildew isolates

^{xx} Reakce k rase 61SaBa (izolát 628) rzi pšeničné – Reaction to race 61, isolate 628

¹selection from the strain, ²state after winter (9 best), ³full heading (date), ⁴resistance to powdery mildew in the field trial (9 best), ⁵height, ⁶yield, ⁷powdery mildew (infection type), ⁸leaf rust (infection type), ⁹greenhouse

Křížení ¹	Kmen ²	Počet dní do metání od 1. 1. ³	Výška ⁴ (cm)	Padlí travní ⁵	Rez plevová ⁶	Rez pšeničná ⁷
Amigo x Regina	9	154	110	1	3	0
	32	150	110	1	2	1
	40	150	115	2	2	2
	50	149	104	1	3	0
	56	149	105	1	4	0
	35	154	97	2	3	1
	42	150	112	1	2	2
	47	154	115	1	4	3
	65	155	117	1	4	4
	66	154	112	2	4	3
	67	150	116	1	4	0
	71	151	115	1	2	2
W49 x Regina	80	153	130	2	2	2
	85	153	130	2	2	2
W49 x Zdar	58	153	115	4	3	4
Zdar x W49	59	159	112	6	2	1
Samanta	71	160	76	4	3	1
Mona	68	157	135	3	3	5
Arina	–	150	104	2	2	3
Regina	–	148	112	2	3	5
	–	154	110	3	3	7
	–	155	102	4	1	6

Disease scoring: 1 resistant – 9 susceptible

¹progeny of the cross, ²strain, ³number of days till heading from 1 January, ⁴height, ⁵powdery mildew, ⁶yellow rust, ⁷leaf rust

nosti s odrůdou Samanta, v průměru však byly o 1,5 dne pozdější než tato odrůda. Kmeny byly v průměru o 9 cm delší než odrůda Samanta. Jak ukázaly kontrolní odrůdy, napadení padlím travním bylo v polním pokusu poměrně slabé, takže hodnocení stupněm 1–2 se málo liší od kontrolních odrůd Samanta a Mona (hodnoceny stupněm 2). Ke rzi pšeničné byly všechny linie s výjimkou tří odolnější než uvedené kontroly. Některé linie byly náchylnější ke rzi plevové než kontrolní odrůdy. Kříženci s linií W48 se vyznačovaly kromě jednoho rovněž dlouhou slámou, pozdností a vesměs náchylností k padlí travnímu. Jen dvě linie ze čtyř byly odolné ke rzi pšeničné.

Ve skleníkových pokusech byly geny rezistence *Lr24* i *Lr38* účinné ke všem našim nejvýznamnějším rasám rzi pšeničné (61SaBa, 61, 77SaBa, 14, 14SaBa, 53SaBa). Rovněž gen *Sr24*, který je ve vazbě s *Lr24*, je v našich podmínkách plně účinný (testováno izoláty rzi travní G964, G702, G334, G425, G605, G530), kdežto gen rezistence *Pm17* je účinný jen k některým rasám padlí travního (zhruba k polovině izolátů z naší kolekce). Pokus se směsí chlamydospor sněti mazlavé a hladké ukázal (tab. V), že odrůda Amigo je odolná k *Tilletia* spp. a že se rezistence dobře přenáší do potomstev křížení. Naše výsledky tedy potvrdily starší údaj z Maďarska (Szunics, Szunics, 1990) o odolnosti této odrůdy k sněti mazlavé. Odrůdy

s translokací T1BL.IRS nejsou k sněti mazlavé rezistentní (Blažková, Bartoš, 1995), což však nevylučuje gen rezistence k *Tilletia* spp. na translokaci T1AL.IRS u odrůdy Amigo, poněvadž segmenty IRS ze žita uvedených translokací nejsou identické. Rezistence může také pocházet ze segmentu chromozomu z pýru, případně z jiných chromozomů rodičů odrůdy Amigo. Na rozdíl od odrůdy Amigo a jejich kříženců žádný kmen z křížení s W49 odolnost k *Tilletia* spp. neprokázal (tab. V).

Výsledky, které jsme získali při studiu zdrojů rezistence odrůdy Amigo a linie W49, tedy charakterizují vhodnost těchto zdrojů rezistence z hlediska účinnosti genů rezistence ke rzi; gen rezistence *Pm17* k padlí travnímu v odrůdě Amigo však překonává přibližně polovina naší populace padlí travního. Z kříženců s těmito zdroji byly vybrány rezistentní kmeny fenotypově blízké odrůdě Regina. Odrůda Amigo může sloužit i jako zdroj rezistence k sněti mazlavé a hladké. Negativním znakem potomstev obou křížení je delší stéblo, u kříženců s linií W49 navíc vyštěpování rostlin náchylných ke rzi pšeničné.

Poděkování

Děkujeme Dr. M. Winzelerovi, FAL, Zürich-Reckenholz, za polní test s našimi liniemi ve Švýcar-

Odrůda/kmen(č.) ¹	Počet klasů ²			Procento sněživých klasů ⁶
	zdravé ³	sněživé ⁴	celkem ⁵	
Amigo	94	0	94	0
Amigo x Regina(9)	56	0	56	0
Amigo x Regina(38)	66	1	67	1,49
Zdar x W49(68)	28	4	32	12,50
W49 x Zdar(71)	15	5	20	25,00
W49 x Regina	36	16	52	30,77
Regina	59	32	91	35,16

¹cultivar/strain, ²number of ears, ³healthy, ⁴diseased, ⁵total, ⁶percentage of diseased ears

sku a prof. Dr. F. J. Zellerovi za vzorky osiva odrůdy Amigo a linie W49.

LITERATURA

- BARTOŠ, P. (1993): Chromosome 1R of rye in wheat breeding. *Plant Breed. Abstr.*, 63: 1203–1211.
- BLÁŽKOVÁ, V. – BARTOŠ, P. (1995): Odolnost českých a slovenských odrůd pšenice ozimé k sněti mazlavé a sněti hladké. *Genet. a Šlecht.*, 31: 267–276.
- DYCK, P. L. – FRIEBE, B. (1993): Evaluation of leaf rust resistance from wheat chromosomal translocation lines. *Crop Sci.*, 33: 687–690.
- FRIEBE, B. – ZELLER, F. J. – MUKAI, Y. – FORSTER, B. P. – BARTOŠ, P. – MCINTOSH, R. A. (1992): Characterization of rust-resistant wheat-*Agropyron intermedium* derivatives by C-banding, in situ hybridization and isozyme analysis. *Theor. Appl. Genet.*, 83: 775–782.
- GRAYBOSCH, P. A. – PETERSON, C. J. – HANSEN, L. E. – WORRALL, D. – SHELTON, D. R. – LUKASZEWSKI, A. (1993): Comparative flower quality and protein character-

istic of 1BL/1RS and 1AL/1RS wheat-rye translocation lines. *J. Cereal Sci.*, 17: 95–106.

HSAM, S. L. K. – ZELLER, F. J. (1997): Evidence of allelism between genes *Pm8* and *Pm17* and chromosomal location of powdery mildew and leaf rust resistance genes in the common wheat cultivar „Amigo“. *Plant Breed.*, 116: 119–122.

SEBESTA, E. E. – WOOD, E. A., Jr. – PORTER, D. R. – WEBSTER, J. A. – SMITH, E. L. (1994): Registration of Amigo wheat germ plasm resistant to greenbug. *Crop Sci.* 34: 293.

STAKMAN, E. C. – STEWART, P. M. – LOEGERING, W. Q. (1962): Identification of physiologic races of *Puccinia graminis* var. *tritici*. *Minn. Agric. Exp. Sci. J. Ser. Paper* 4691.

SZUNICS, L. – SZUNICS, L. (1990): Adatok a búzafajták közös fertőzőfőkérdő (Data on common bunt infection in wheat varieties). *Növénytermelés*, 39: 297–304.

ZELLER, F. J. – FUCHS, E. (1983): Cytologie und Krankheitsresistenz einer 1A/1R- und mehrerer 1B/1R-Weizen-Roggen-Translokationen. *Z. Pfl.-Zücht.*, 90: 285–296.

Došlo 13. 5. 1998

Kontaktní adresa:

Ing. Pavel Bartoš, DrSc., Výzkumný ústav rostlinné výroby, 161 06 Praha 6-Ruzyně, Česká republika, tel.: + 00 420 2/33 02 22 43, fax: + 00 420 2/36 52 28, e-mail: bartos@hb.vurv.cz

STANOVENÍ GENETICKÉ STRUKTURY ODRŮDY JEČMENE JARNÍHO TRUMPF POMOCÍ HORDEINOVÝCH SIGNÁLNÍCH GENŮ

DETERMINATION OF GENETIC STRUCTURE OF SPRING BARLEY VARIETY TRUMPF BY MEANS OF HORDEIN SIGNAL GENES

J. Černý¹, A. Šašek², K. Popová¹, J. Bradová², I. Langer³

¹*Czech University of Agriculture, Faculty of Agronomy, Prague, Czech Republic*

²*Research Institute of Crop Production, Prague, Czech Republic*

³*SELGEN, Plant Breeding Station, Stupice, Czech Republic*

ABSTRACT: Genetic structure of the spring barley model variety Trumpf was studied by means of SGE hordeins (HRD). Endosperm bisected grains were used for HRD electrophoretic analysis and embryonic bisected grains for sowing and plant production. A total of 144 grains randomly taken from a sample of Trumpf variety were analyzed in 1995. Embryonic bisected grains were kept in aseptic conditions. Following root formation, 33 plants were set out in an outdoor spring barley nursery located in the experimental field of Czech Agricultural University in Prague. Four HRD lines of Trumpf variety (line A, line B, line C and F) were singled out and propagated. Individual progenies of the singled out HRD lines were sown at Stupice Plant Breeding Station in 1996. These traits were evaluated in HRD lines: 1,000-grain weight, grain portion above the sieve with oval meshes 2.5 x 22 mm and 2.2 x 22 mm in size, undersized grain, plant length, resistance to leaf rust of barley, number of vegetation days to heading and extract content in dry malt. The singled out HRD lines were compared by means of a *t*-test. Singling out of the main HRD lines A and C and secondary HRD lines B and F demonstrated hordein polymorphism of Trumpf variety. Different agronomic and technological value of singled out HRD lines was demonstrated. The singled out HRD lines are potential gene resources of more productive culm (line C), 1,000 grain weight (line C), higher portion of grain above 2.5mm mesh sieve (line C) and higher extract content in dry malt (line F). HRD electrophoretic analysis (SGE) of endosperm bisected grains is suitable to single out homozygous genotypes – HRD lines – from barley varieties of the population type.

barley; electrophoresis; hordeins; genetic structure; Trumpf variety

ABSTRAKT: Pomocí SGE hordeinů (HRD) byla modelově studována genetická struktura odrůdy ječmene jarního Trumpf. Endospermální poloviny zrn byly použity k elektroforetické analýze HRD a embryonální poloviny zrn k výsevu a dopěstování rostlin. V roce 1995 bylo analyzováno celkem 144 zrn, náhodně odebraných z ramšového vzorku odrůdy Trumpf. Embryonální poloviny hodnocených zrn byly uchovány v aseptických podmínkách. Po zakořenění bylo na jaře 1995 vysazeno celkem 33 rostlin do polní školky ječmene jarního na experimentálním poli ČZU v Praze. Celkem byly vyčleněny a rozmnoženy čtyři HRD linie odrůdy Trumpf (linie A, linie B, linie C a F). Výsev individuálních potomstev vyčleněných HRD linií byl uskutečněn v roce 1996 na ŠS Stupice. U zmíněných HRD linií byly hodnoceny tyto znaky: HTZ, podíl zrna nad sítím s podélnými otvory 2,5 x 22 mm a 2,2 x 22 mm, propad, délka rostlin, odolnost proti rzi ječné, počet vegetačních dnů do metání a obsah extraktu v sušině sladu. Jednotlivé vyčleněné HRD linie byly porovnávány metodou *t*-testu. Byl prokázán hordeinový polymorfismus odrůdy Trumpf vyčleněním hlavních HRD linií A a C a vedlejších HRD linií B a F. Byla prokázána odlišná agronomická a technologická hodnota vyčleněných HRD linií. Vyčleněné HRD linie představují možné genetické zdroje produktivnějšího stébla (linie C), HTZ (linie C), vyššího podílu zrna nad sítím 2,5 mm (linie C) a vyššího obsahu extraktu v sušině sladu (linie F). Metoda elektroforetické analýzy HRD (SGE) endospermálních polovin zrn je vhodná pro vyčlenění homozygotních genotypů – HRD linií – z odrůd ječmene typu populací.

ječmen; elektroforéza; hordeiny; genetická struktura; odrůda Trumpf

ÚVOD

Cílem práce bylo stanovení genetické struktury odrůdy jarního ječmene Trumpf pomocí hordeinových signálních genů, vyčlenění homozygotních hordeinových linií z této odrůdy a stanovení jejich agronomické hodnoty.

MATERIÁL A METODY

Ramšový vzorek osiva odrůdy Trumpf dodal v roce 1995 ZVÚ Kroměříž. Odrůda Trumpf [*Hordeum vulg.* L., convar. *distichon* L.) Alef. var. *nutans* (Rode/Alef)] byla vyšlechtěna v Německu složitým kombinačním křížením těchto odrůd a linií: Diamant x St. 14029/64 x (Alsa X S 3170) x Hadm. 117119/59 x Firlbeck's Union.

Odrůda Trumpf byla povolena v ČR v roce 1976. Pro ztrátu rezistence proti padlí travnímu (*Erysiphe graminis*) a silnějším napadání rzi ječnou byla v roce 1981 restringována. Je to intenzivní silně odnožující pozdní výnosná odrůda s krátkým stéblem a s vysokou odolností proti poléhání. Řadí se ke sladovnický jakostním odrůdám.

Z ramšového vzorku osiva odrůdy Trumpf bylo metodou „embryonálních polovin zrn“ (Šašek et al., 1989) analyzováno celkem 144 náhodně odebraných zrn. Byla provedena elektroforetická analýza HRD ve škrobovém gelu (SGE) a vyčleněny alelické HRD bloky z endospermálních částí zrn způsobem, který publikovali Šašek et al. (1994).

Embryonální poloviny hodnocených zrn byly uchovány v aseptických podmínkách (Černý et al., 1985). Sterilní výsev byl proveden 22. 3. 1995 v laboratoři rostlinných explantátů Katedry genetiky a šlechtění AF ČZU v Praze.

Od 29. 3. do 5. 4. 1995 bylo postupně přesazeno do květináčů a umístěno do skleníku celkem 33 mladých rostlinek ječmene.

Po zakořeňení bylo 19. 4. 1995 vysazeno celkem 33 rostlin do polní školky jarního ječmene na experimentálním poli ČZU v Praze. (Bylo sklizeno 29 rostlin generace V_0 , z toho 11 rostlin linie A, 2 rostliny linie B, 14 rostlin linie C a 2 rostliny linie F.) Sklizené klasy jednotlivých rostlin se ručně vydrhly a připravily pro výsev generace K_m v roce 1996.

Na jaře 1996 bylo na ŠS Stupice pomocí bezezbytkového secího stroje Seedmatic-6 zaseto 29 vzorků HRD linií ječmene jarního odrůdy Trumpf v jednom opakování po 1,8 m².

Sklizeň jednotlivých HRD linií byla použita pro stanovení sladovnické jakosti a pro mechanické rozboru zrna. Během vegetace byly hodnoceny růstové a vývojové znaky.

U vyčleněných hordeinových linií byly sledovány tyto agronomické znaky: HTZ, podíl zrna nad sítím s podélnými otvory 2,5 mm x 22 mm, délka rostlin, odolnost proti rzi ječné, datum metání a extrakt v sušině sladu.

Extrakt v sušině sladu byl stanoven pomocí přístroje INFRATEC 225 GRAIN ANALYZER švédské firmy TECATOR.

K statistickému hodnocení rozdílů v agronomických znacích mezi jednotlivými vyčleněnými hordeinovými liniemi byl použit *t*-test, který byl zpracován pomocí počítačového programu STATGRAPHICS VERS. 4.0.

VÝSLEDKY A DISKUSE

Pomocí škrobové gelové elektroforezy lze určit celkem sedm skupin hordeinů označených jako A, B, C, D, E, F a G hordeiny determinované geny *Hrd-A*, *Hrd-B*, *Hrd-C*, *Hrd-D*, *Hrd-E*, *Hrd-F* a *Hrd-G*, umístěnými v krátkém ramenu chromozomu 5.

Pro hordeinové geny *Hrd-A*, *Hrd-B* a *Hrd-F* je typické vytváření alelických sérií. Alelám těchto genů odpovídají alelické bloky zón, složek elektroforetického spektra hordeinů (Pomorcev et al., 1985; Sozinov, 1985; Šašek et al., 1991, 1995).

Hordeinové geny *Hrd-C*, *Hrd-D* a *Hrd-E* jsou charakterizovány pouze dominantní nebo recesivní alelou. Dominantní alely těchto genů podmiňují manifestaci příslušné hordeinové složky, recesivní alely vyvolávají nepřítomnost zmíněných složek (zón).

Při škrobové elektroforeze se řadí jednotlivé hordeiny v elektroforetickém spektru podle relativní elektroforetické mobility v pořadí *HRD-A* – *HRD-E* – *HRD-C* – *HRD-D* – *HRD-B* – *HRD-G* – *HRD-F*. Hordeiny A jsou nejpomalejšími hordeiny, F hordeiny pak nejrychlejšími složkami, zónami elektroforetického spektra hordeinů. Výhodou SGE hordeinů je nepřekrývání zón A, B a F hordeinů, což umožňuje identifikaci jednotlivých alelických hordeinových bloků zón (Sozinov, 1985).

V současné době je pomocí SGE katalogizováno celkem 29 alelických bloků A hordeinu, 34 alelických bloků B hordeinu, 4 alelické bloky F hordeinu a tzv. nulový blok, kdy F hordeiny v elektroforetickém hordeinovém spektru některých genotypů ječmene chybí (Sozinov, 1985; Pomorcev et al., 1985; Šašek et al., 1991, 1995).

Hordeinový polymorfismus odrůdy Trumpf

Celkem bylo elektroforeticky analyzováno 144 zrn, náhodně odebraných z ramšového vzorku osiva. Na základě elektroforetické analýzy HRD bylo z odrůdy Trumpf vyčleněno 8 hordeinově homozygotních linií, které jsou uvedeny v tab. I. Z počtu 127 embryonálních polovin zrn vyklíčilo pouze 26 %. Nízká klíčivost embryonálních polovin zrn byla pravděpodobně zapříčiněna stářím osiva.

Do polní školky ječmene jarního na experimentálním poli ČZU v Praze bylo vysazeno 33 mladých rostlin vypěstovaných z embryonálních polovin zrn (12 rostlin linie A, 3 rostliny linie B, 14 rostlin linie C; linie E a H byly zastoupeny jednou rostlinou a linie F

I. HRD linie vyčleněné elektroforetickou analýzou endospermálních polovin zrn z odrůdy Trumpf – HRD lines singled out by electrophoretic analysis of endosperm bisected grains of Trumpf variety

HRD linie ¹	HRD alelické bloky lokusů ²				Četnost ³ (%)
	A	B	F	C, D, E, G	
A	2	19	1	0	30,7
B	2	21	1	0	11,8
C	2	8	2	D	26,0
E	1	21	1	0	7,1
F	32	21	1	0	16,5
(F)	(32)	21	1	E, C	4,7
G	1	1	3	E, C	0,8
H	12	21	1	0	2,4

¹HRD lines, ²HRD allelic blocks of loci, ³frequency

dvěma rostlinami). Během vegetace v roce 1995 uhybnuly 4 rostliny. K úbytku po jedné rostlině došlo v liniích A, B, E a H. Z původního počtu 8 vyčleněných linií HRD mohla být provedena sklizeň (generace V₀) individuálních rostlin HRD linií A, B, C a F.

Z elektroforetické analýzy vyplývá, že odrůda Trumpf je hordeinově polymorfni. Z této odrůdy byly vyčleně-

ny čtyři HRD linie A, B, C a F. Odrůda Trumpf tedy představuje odrůdu-populaci složenou nejméně ze čtyř homozygotních linií s odlišnými hordeinovými elektroforetickými spektry. Jednotlivé vyčleněné HRD linie byly mezi sebou porovnávány ve zvolených agronomických znacích. Elektroforeogramy vyčleněných HRD linií odrůdy Trumpf jsou uvedeny na obr. 1.

Získaná elektroforetická spektra hordeinů jsou uvedena v podobě souborů hordeinových alelických bloků v tab. I.

Charakteristiku zjištěných alelických hordeinových bloků zón uvádí tab. II.

K posouzení stupně genetické příbuznosti vyčleněných hordeinových linií byly stanoveny indexy identity elektroforetických spekter pomocí vzorce (Ellis, 1971):

$$ii = \frac{\text{počet shodných zón} \times 100}{\text{počet všech zón u všech genotypů}}$$

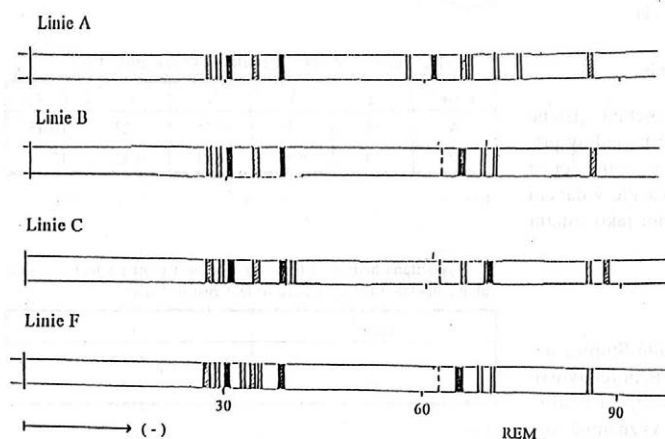
Místo porovnávání počtu shodných a celkových zón elektroforetických spekter bylo použito počtu ze spekter vyčleněných hordeinových alelických bloků zón. Indexy identity jsou uvedeny v tab. III.

Hodnoty indexů identity HRD alelických bloků zón prokazují, že linie A, B a F mají charakter sesterských

II. Charakteristiky alelických hordeinových bloků zastoupených v elektroforetických spektrech hordeinů odrůdy Trumpf – Characteristics of allelic hordein blocks represented in electrophoretic spectra of Trumpf variety hordeins

HRD alelický blok ¹	Relativní elektroforetická mobilita (REM) a intenzita zabarvení jednotlivých zón ² (....)
A – 2	28,0(4) – 29,5(2–3) – 31,0(5) – 35,0(4) – 39,0(5)
A – 32	28,0(4) – 29,5(3) – 31,0(5) – 33,5(3) – 35,0(4) – 36,0(3) – 39,0(5)
B – 8	62,0(1) – 66,0(3) – 69,5(4) – 70,0(5) – 85,0(3)
B – 19	58,0(2) – 62,0(5) – 66,5(3) – 67,5(2) – 71,5(2) – 75,0(2)
B – 21	62,5(1–2) – 66,0(5) – 69,0(2) – 71,0(2)
F – 1	86,0(4)
F – 2	88,0(4)
D – 1	41,0(2)

¹HRD allelic block, ²relative electrophoretic mobility and color intensity of the particular zones



1. Elektroforeogramy jednotlivých HRD linií vyčleněných z odrůdy Trumpf – Electrophoregrams of the particular HRD lines singled out from Trumpf variety

III. Indexy identity HRD alelických bloků zón – HRD identity indexes for allelic blocks of zones

Porovnávání HRD linií ¹	Indexy identity HRD alelických bloků zón ²
A : B	75
A : C	25
A : F	50
B : C	25
B : F	75
C : F	0

¹HRD lines compared, ²HRD identity indexes for allelic blocks of zones

linií, vykazují vysoké hodnoty $\bar{u}$ (50 až 75). Naproti tomu nízké hodnoty $\bar{u}$ linie C s ostatními liniemi (0 až 25) sesterský charakter linie C dostatečně neprokazují.

Hodnocení vegetačních pozorování

Vegetační pozorování jednotlivých potomstev HRD linií jsou uvedena v tab. IV. Vzhledem k omezenému počtu semen sklizených z jednotlivých rostlin kmenových matek (V_0) byla tato potomstva – kmeny (K_m) – vyseta pouze v jednom opakování.

Hodnocení odolnosti proti rzi ječné

Během vegetace v roce 1996 došlo v pokusné lokalitě Stupice k spontánnímu napadení ječmene rzi ječnou. Naproti tomu napadení ostatními houbovými chorobami bylo slabé a znemožnilo hodnocení HRD linií ke zmíněným patogenům.

Nízký počet potomstev HRD linií B a F znemožnil použít pro jejich srovnání t -testu. Z tohoto důvodu mohly být porovnány pouze hodnoty polní odolnosti proti rzi ječné u linie A a linie C. HRD linie C, vyznačující se maximální odlišností od ostatních vyčleněných HRD linií, inklinuje ke střední odolnosti proti rzi ječné ($\bar{x} = 6,94$), zatímco HRD linie A ($\bar{x} = 7,18$) vykazuje tendenci k vyšší odolnosti. Zjištěný rozdíl je však statisticky nevýznamný (tab. V a VI).

Hodnocení počtu vegetačních dnů do metání

Rozdíly v počtu vegetačních dnů do metání zjištěné mezi vyčleněnými HRD liniemi jsou až na jediný případ nevýznamné, HRD linie C, výrazně se odlišující ve skladbě hordeinů od linií A, B a F, vykazuje v daném kritériu stejnou délku vegetace do metání jako ostatní HRD linie (tab. VII a VIII).

Hodnocení délky rostlin

Během vegetace v roce 1996 v lokalitě Stupice nemožnil charakter srážek hodnocení nepolehávosti. Proto jako další kritérium byla zvolena délka rostlin. V délce rostlin byly zjištěny statisticky významné roz-

IV. Vegetační charakteristiky HRD linií odrůdy Trumpf – Vegetation characteristics of HRD lines of Trumpf variety

Polní číslo ¹	Původ ²	Datum metání ³ (VI.)	Délka rostliny ⁴ (cm)	Odolnost proti rzi ječné ⁵ (9–1)
2568	10 – A/44	20.	71	6
2569	14 – A/55	20.	72	6
2571	17 – A/72	19.	78	8
2572	20 – A/78	18.	70	8
2573	23 – A/87	18.	65	8
2575	25 – A/107	19.	67	8
2576	27 – A/113	19.	72	7
2577	35 – A/137	19.	72	7
2578	36 – A/138	20.	71	7
2579	38 – A/142	19.	65	7
2581	39 – A/144	20.	76	7
2582	43 – B/23	20.	68	6
2583	54 – B/127	20.	72	6
2584	55 – C/5	21.	83	6
2585	56 – C/8	19.	74	6
2586	57 – C/12	19.	74	5
2587	60 – C/37	19.	75	6
2588	61 – C/41	17.	75	6
2589	63 – C/46	19.	76	5
2591	64 – C/50	19.	81	8
2592	66 – C/50	21.	79	7
2593	70 – C/81	18.	74	8
2594	74 – C/88	18.	76	8
2595	81 – C/119	20.	79	8
2596	84 – C/144	19.	80	8
2597	85 – C/139	21.	80	8
2598	87 – C/145	21.	82	8
2599	98 – F/57	21.	73	8
2601	110 – F/111	20.	74	8

Bodové hodnocení: 9 = nejlepší, 1 = nejhorší

Score evaluation: 9 = highest, 1 = lowest

¹field no., ²origin, ³heading date, ⁴plant length, ⁵resistance to leaf rust of barley

V. Odolnost proti rzi ječné – Resistance to leaf rust of barley

Linie ¹	n	$\bar{x}$	s	$s_{\bar{x}}$	V (%)
A	11	7,18	0,75	0,23	10,45
C	14	6,94	1,21	0,32	17,42

¹line

VI. Vypočítaná hodnota t -testu pro odolnost proti rzi ječné – t -test value calculated for resistance to leaf rust of barley

Linie ¹	C
A	$t = 0,64$
C	

¹line

VII. Počet vegetačních dnů do metání – Number of vegetation days to heading

Linie ¹	n	$\bar{x}$ (dnů ²)	s	s_x	V (%)
A	11	65,2	0,75	0,23	1,15
B	2	65,5	0,71	0,50	1,08
C	14	65,4	1,23	0,34	1,95
F	2	66,5	0,71	0,50	1,06

¹line, ²days

VIII. Vypočítané hodnoty t-testu pro délku vegetace do metání – t-test values calculated for vegetation length to heading

Linie ¹	B	C	F
A	$t = -0,554186$	$t = -0,402736$	$t = -2,29591^*$
B		$t = 0,151744$	$t = -1,41421$
C			$t = -1,21395$
F			

* $P \leq 0,05$

¹line

díly mezi vyšší HRD linií C a HRD liniemi A a B s nižším stéblem (tab. IX a X).

Hodnocení HTZ

HTZ představuje významný prvek tvorby výnosu zrna. Z výnosotvorných prvků se vyznačuje zřejmě nejvyšší dědivostí (Lekeš a kol., 1985). Je proto vhodným kritériem rozlišení agronomické hodnoty HRD linií vyčleněných z odrůdy Trumpf.

HRD linie A, B a C se vyznačují vysokou hodnotou HTZ a překračují tak požadavek na HTZ, který uvádějí Prugar a Hraška (1989) pro superkvalitní sladovníčky ječmen. Linie C, maximálně odlišná od ostatních vyčleněných hordeinových linií, vykazuje ještě vyšší hodnotu HTZ, kterou se statisticky významně liší od ostatních HRD linií odrůdy Trumpf (tab. XI a XII).

Hodnocení výtěžnosti zrna

Technologická hodnota zrna je podmínována především výtěžností zrna nad sítím 2,5 mm. Tato hodnota má činit 85–94 % při HTZ 43 až 44 g (Lekeš a kol., 1985).

Tab. XIII a XIV ukazují podíly zrna stanovené na Steineckerově prosévadle s podélnými otvory 2,5 mm x 22 mm u jednotlivých HRD linií odrůdy Trumpf.

V hodnoceném znaku (tj. v podílu zrna nad sítím 2,5 mm) se statisticky významně liší maximálním podílem od ostatních HRD linií linie C. Ostatní zjištěné rozdíly jsou statisticky nevýznamné.

Hodnocení obsahu extraktu v sušině sladu

Obsah extraktu v sušině sladu je významným selekčním kritériem jakostních sladařských ječmenů na

IX. Délka rostlin – Plant length

Linie ¹	n	$\bar{x}$ (cm)	s	s_x	V (%)
A	11	70,82	4,07	1,23	5,75
B	2	70,00	2,83	2,00	4,04
C	14	77,71	3,20	0,85	4,11
F	2	73,50	0,71	0,50	0,96

¹line

X. Vypočítané hodnoty t-testu pro délku rostlin – t-test values calculated for plant length

Linie ¹	B	C	F
A	$t = 0,267896$	$t = -4,75106^*$	$t = -0,897704$
B		$t = -3,21728^*$	$t = -1,69775$
C			$t = 1,80634$
F			

* $P \leq 0,05$

¹line

XI. Hmotnost tisíce zrn (HTZ) – 1,000-grain weight

Linie ¹	n	$\bar{x}$ (g)	s	s_x	V (%)
A	11	51,25	3,18	0,96	6,21
B	2	51,13	1,59	1,13	3,11
C	14	55,68	2,41	0,64	4,33
F	2	47,50	0,71	0,50	1,49

¹line

XII. Vypočítané hodnoty t-testu pro HTZ – t-test values calculated for 1,000-grain weight

Linie ¹	B	C	F
A	$t = 0,0529403$	$t = -3,96576^*$	$t = 1,60398$
B		$t = -2,5527^*$	$t = 2,9445$
C			$t = 4,64577^*$
F			

* $P \leq 0,05$

¹line

počátku šlechtitelského procesu. Ve srovnání s vlastnostmi působilými na jakost sladařských ječmenů se extrakt v sušině sladu vyznačuje nejvyšší dědivostí (Lekeš et al., 1985; Prugar, Hraška, 1989). Je proto vhodným kritériem hodnocení vyčleněných hordeinových linií z odrůdy Trumpf. Obsah extraktu v sušině jednotlivých HRD linií odrůdy Trumpf a hodnoty t-testu mezi těmito liniemi jsou uvedeny v tab. XV a XVI.

Linie A odrůdy Trumpf má HRD blok A2 B19. U této linie byl zjištěn obsah extraktu v sušině sladu 78,36 %. Linie B s HRD blokem A2 B21 přesahuje uváděnou extraktivnost o 0,24 %, linie C s HRD blokem A2 B8 vykazuje hodnotu vyšší o 1,41 %.

XIII. Podíl zrna nad sítím 2,5 mm x 22 mm – Grain portion above the sieve with meshes 2.5 mm x 22 mm in size

Linie ¹	n	$\bar{x}$ (g)	s	$s_{\bar{x}}$	V (%)
A	11	84,45	4,85	1,46	5,75
B	2	84,75	0,28	0,20	0,33
C	14	91,63	22,44	0,66	2,66
F	2	78,48	10,29	7,28	13,11

¹line

XIV. Vypočítané hodnoty t-testu pro podíl zrna nad sítím 2,5 mm x 22 mm – t-test values calculated for grain portion above the sieve with meshes 2.5 mm x 22 mm in size

Linie ¹	B	C	F
A	$t = -0,083435$	$t = -4,8332^*$	$t = 1,39604$
B		$t = -3,87708^*$	$t = 0,862217$
C			$t = 4,8146^*$
F			

* $P \leq 0,05$

¹line

XV. Obsah extraktu v sušině sladu – Extract content in dry malt

Linie ¹	n	$\bar{x}$ (%)	s	$s_{\bar{x}}$	V (%)
A	11	78,36	0,50	0,15	0,63
B	2	79,20	0,71	0,50	0,89
C	14	77,86	0,68	0,18	0,88
F	2	79,75	0,21	0,15	0,27

¹line

XVI. Vypočítané hodnoty t-testu pro obsah extraktu v sušině sladu – t-test values calculated for extract content in dry malt

Linie ¹	B	C	F
A	$t = -2,09549$	$t = 2,03419$	$t = -3,77517^*$
B		$t = 2,57895^*$	$t = -1,05361$
C			$t = -3,77385^*$
F			

* $P \leq 0,05$

¹line

Maximální hodnotou extraktu se vyznačuje HRD linie F, která statisticky významně překonává v extraktu HRD linii A a HRD linii C, která vykazuje statisticky významně nižší obsah extraktu i ve srovnání s HRD linií B. Nejnižším obsahem extraktu v sušině sladu se HRD linie C opět odlišuje od HRD linií B, F i A.

LITERATURA

- ČERNÝ, J. – ŠAŠEK, A. – DOSTÁL, J. – BRADOVÁ, J. – HANIŠOVÁ, A. – KUBÁNEK, J. – KURZOVÁ, E. (1985): Selection of homozygous genotypes in wheat B.c. 1-F₂ generations by means of gliadin markers. *Scientia Agric. bohemoslov.*: 153–162.
- ELLIS, R. P. (1971): Electrophoresis of grain proteins: Detection of rye proteins in wheat x rye hybrids. *J. Nat. Inst. agric. Bot.*, 12: 236–241.
- LEKEŠ, J. a kol. (1985): Ječmen. Praha, Státní zemědělské nakladatelství.
- POMORCEV, A. A. – NECVETAJEV, V. P. – SOZINOV, A. A. (1985): Polimorfizm kulturnogo jačmeňa (*Hordeum vulgare* L.) po gordeinam. *Genetika*, 21: 629–639.
- PRUGAR, J. – HRAŠKA, Š. (1989): Kvalita jačmeňa. Bratislava, Příroda.
- SOZINOV, A. A. (1985): Polimorfizm belkov i jeho značenie v genetike i selekcii. Moskva, Nauka.
- ŠAŠEK, A. – BRADOVÁ, J. – ČERNÝ, J. (1995): Hordeinové signální geny povolených českých a slovenských odrůd ječmene setého (*Hordeum vulgare* L.). *Potrav. Vědy*, 13: 57–69.
- ŠAŠEK, A. – ČERNÝ, J. – BRADOVÁ, J. (1991): Kontrola odrůdové pravosti genetických zdrojů ječmene setého elektroforézou hordeinů. *Rostl. Výr.*, 37: 565–574.
- ŠAŠEK, A. – ČERNÝ, J. – SÝKOROVÁ, S. (1983): Enzymatické bílkovinné markery obilovin. *Genet. a Šlech.*, 19: 1–15.
- ŠAŠEK, A. – ČERNÝ, J. – DOSTÁL, J. – HANIŠOVÁ, A. (1989): Autorské osvědčení č. 255259/1989 na vynález: Způsob získávání genotypů embryí pšenice. Úřad pro vynálezy a objevy v Praze, 15. 3. 1989.
- ŠAŠEK, A. – SÝKOROVÁ, S. – BRADOVÁ, J. – ČERNÝ, J. (1994): Využití elektroforézy bílkovinných genetických markerů pšenice a ječmene v kontrole odrůd a osiv. Praha.

Došlo 9. 9. 1997

Kontaktní adresa:

Prof. Ing. Jiří Černý, CSc., Česká zemědělská univerzita, Agronomická fakulta, Kamýcká 129, 165 21 Praha 6-Suchbát, Česká republika, tel.: 02/24 38 25 54, fax: 02/24 38 28 01

IDENTIFIKACE A KLASIFIKACE VYBRANÝCH ODRŮD BRUKVOVITÝCH PLODIN A DIHAPLOIDNÍCH LINIÍ ŘEPKY POMOCÍ RAPD MARKERŮ*

IDENTIFICATION AND CLASSIFICATION OF SELECTED CRUCIFEROUS SPECIES AND RAPE DOUBLE HAPLOID LINES USING RAPD MARKERS

L. Sáková, V. Čurn

University of South Bohemia, Faculty of Agriculture, České Budějovice, Czech Republic

ABSTRACT: Fragments of random amplified polymorphic DNA (RAPDs) were used as markers to distinguish different *Brassica* species (*Brassica nigra*, *B. juncea*, *B. hirta* and *B. rapa*), six *Brassica napus* cultivars – Ceres, Solida, Falcon, Lirajet, Sonata a Arabella and ten *Brassica napus* doubled haploid lines which have been produced in the Research Institute of Plant Production in Prague-Ruzyně. The DNA template was extracted by DNeasy Plant Mini supplied by QIAGEN. The screening of 40 primers – kit OPA and OPB (Operon Technologies, Inc., Alameda, CA) was performed and OPA-01, -03, -09, -13 a OPB-01, -06, -11, -17 primers were used for detailed RAPD analysis. The primer OPB-06 generates the largest numbers of polymorphic bands in species and doubled haploid lines as well. This polymorphic marker identified lines by their accessions. Smaller polymorphism of *Brassica napus* cultivars was detected. The classification of *Brassica napus* cultivars where accessions are very close is mostly difficult using RAPD markers. The highest level of polymorphism (71.43%) was expressed in *Brassica* species. Our results show that the RAPD technique is a sensitive and precise tool for genomic analysis in *Brassica* species, but less sensitive for classification of *Brassica napus* cultivars, which have close relationships.

Brassica species; *Brassica napus* cultivars; *Brassica napus* double haploid lines; RAPDs markers

ABSTRAKT: Pomocí RAPD analýzy byla provedena charakteristika různých druhů rodu *Brassica* (*Brassica nigra*, *B. juncea*, *B. hirta* a *B. rapa*), šesti odrůd *Brassica napus* – Ceres, Solida, Falcon, Lirajet, Sonata a Arabella a deseti dihaploidních linií *Brassica napus*, které nám byly poskytnuty z VÚRV Praha-Ruzyně. Templátová DNA byla extrahována pomocí DNeasy Plant Mini Kitu od firmy QIAGEN. Po skríninku vhodných 40 primerů z kitu OPA a OPB (Operon Technologies, Inc., Alameda, CA) byly vybrány primery OPA-01, -03, -09, -13 a OPB-01, -06, -11, -17 pro detailní analýzy RAPD markerů. Největší polymorfismus se projevil u primeru OPB-06 pro odrůdy řepky i pro linie. Linie bylo možné rozdělit do tří skupin podle původu. Největší polymorfismus u odrůd byl zaznamenán rovněž u primeru OPB-06. Shodná spektra měly pouze odrůdy Ceres a Falcon, které jsou geneticky velmi příbuzné. Nízký polymorfismus u odrůd svědčí o velmi obtížné identifikovatelnosti odrůd řepky ozimé pomocí RAPD markerů. Naopak vysoký polymorfismus (71,43 %) se projevil mezi druhy.

druhy rodu *Brassica*; odrůdy *Brassica napus* L.; dihaploidní linie *Brassica napus* L.; RAPDs markery

ÚVOD

Odrůdy jsou v prvé řadě identifikovány na základě pěstitelských, morfologických a fyziologických popisů. V genetickém výzkumu se používají k identifikaci odrůd biochemické markerovací systémy založené na analýze izoenzymů a zásobních proteinů. V poslední době se objevuje stále více aplikací molekulárních markerů na úrovni DNA. V roce 1984 byla poprvé použita metoda PCR (Saiki et al., 1988), jejíž obrovský roz-

voj vedl k vývoji několika metod. Jednou z těchto metod je RAPD (random amplified polymorphic DNA) analýza, vytvářející fylogeneticky konzervované produkty, specifické pro jedince, náhodně rozdělené v genomu templátové DNA (Williams et al., 1990). Mendelistická segregace, stabilita a dominantní dědičnost RAPD markerů byla pozorována u geneticky různých plodin, např. u sóji, ječmene a vojtěšky (Williams et al., 1990; Echt et al., 1992; Tinker et al., 1993). Úroveň genetického rozlišení RAPD marke-

* Výsledky prezentované v tomto příspěvku byly získány v rámci řešení projektu č. RE 0960996207 NAZV MZe ČR.

rů je ekvivalentní RFLP při určení genetických příbuzných vztahů mezi liniemi *Brassica oleracea* L. a *B. napus* L. (Santos et al., 1994; Halliden et al., 1994). RAPD markery byly úspěšně používány v genetickém fingerprintingu, při analýze odrůd různých druhů, mezi nimi *Brassica* (Demek et al., 1992; Jain et al., 1994). Dále jsou využitelné při analýze původů (Scott et al., 1992; Lerceteau et al., 1997) a genetickém mapování (Reiter et al., 1992; Uzunova et al., 1995).

Naše práce navazuje na grantové projekty zabývající se biochemickými markery u brukvovitých plodin. Vzhledem k našim zkušenostem jsme považovali za účelné pokračovat s charakteristikou brukvovitých plodin na kvalitativně nové úrovni molekulárních markerů.

MATERIÁL A METODY

Pro charakteristiku různých druhů rodu *Brassica* byly vybrány hořčice černá [*Brassica nigra* L. (Koch.) odrůda Rumunská, hořčice sarepská [*Brassica juncea* L. (Coss.) odrůda Bulharská, hořčice bílá (*Brassica hirta* Moench) odrůda Zlata, řepice ozimá [*Brassica rapa* ssp. *oleifera* (L.m.) Metzg] odrůda Rex a šest odrůd řepky ozimé [*Brassica napus* L. ssp. *oleifera* (Metzg Sinsk. f. *biennis*)] – Ceres, Solida, Falcon, Lirajet, Sonata a Arabella. Osivo odrůd bylo dodáno přímo ze šlechtitelských pracovišť (byla garantována pra-

vost a čistota osiva, stupeň S_0). Dihaploidní linie 1–9 nám poskytl VÚRV Praha-Ruzyně (tab. I). Byly získány mikrosporovou embryogenezí z F_1 kříženců homozygotních autoinkompatibilních (AI) linií s donory 00 kvality, za účelem dosažení kombinace znaků AI a 00 kvality. Linie 10 pochází ze šlechtitelského materiálu ŠS Slapy u Tábora. Osivo dihaploidních linií pochází z generace R_1 .

DNA extrakční technika

Z každé odrůdy, resp. linie různých druhů rodu *Brassica* a DH linií *Brassica napus* bylo odebráno 0,1 g materiálu z děložních lístků ze dvou až tří rostlin do mikrozskumavky. Po rozdrobení byl k materiálu přidán extrakční pufr podle použité metody. Z několika CTAB (cetyltrimetylamoniumbromid) a SDS (sodium-dodecylsulfát) metod byla jako neoptimálnější vybrána modifikovaná metoda podle autorů Edwards et al. (1991). Extrakční pufr v této metodě obsahuje detergent SDS. Z důvodu zvýšení čistoty DNA, která se ukázala jako rozhodující pro PCR reakci, jsme zařadili před precipitací krok vedoucí k lepší purifikaci nukleových kyselin. K supernatantu byla přidána směs chloroform : izoamylalkohol (24 : 1) v poměru 1 : 1 a tento krok byl zopakován. Standardní vzorky DNA byly získány pomocí DNeasy Plant Mini kitu od firmy QIAGEN. Templátová DNA je po vyčištění rozpuštěna ve 100 μ l vody a skladována při teplotě -20°C .

I. Rodiče a země původu studovaných odrůd a linií – Parents and country of origin of *Brassica* cultivars and lines

Odrůda ¹ /Linie ²	Rodiče ³	Země původu ⁴
4 – Ceres	Ledos x (Rapol x Hector)	SRN
5 – Solida	Rod 1129/75, Rod 3981, BNW-17 NDR a KM2	ČR – ŠS Slapy
6 – Falcon	Ledos x (Rapol x Hector) x Jet Neuf	SRN
7 – Lirajet	Lindora x Jet Neuf	SRN
8 – Sonata	(Bronowski x Zero) x K2040	ČR – VÚOL Opava
9 – Arabella	linie ⁵ 142/79 x A3/82	SRN
Linie 1 – OP 600/19 SP	Liropa 1/88 x 284	SRN (Liropa), VÚRV Ruzyně (284 – donor 00 kvality ⁷)
Linie 2 – OP 600/28 SP	Liropa 1/88 x 284	SRN (Liropa), VÚRV Ruzyně (284 – donor 00 kvality)
Linie 3 – OP 600/41 SP	Liropa 1/88 x 284	SRN (Liropa), VÚRV Ruzyně (284 – donor 00 kvality)
Linie 4 – OP 584/1b SP	spontánní dihaploid ⁶ x 309	neznámý původ ⁸ (dihaploid), VÚRV Ruzyně (309 – donor 00 kvality)
Linie 5 – OP 584/5 SP	spontánní dihaploid x 309	neznámý původ (dihaploid), VÚRV Ruzyně (309 – donor 00 kvality)
Linie 6 – OP 584/6 SP	spontánní dihaploid x 309	neznámý původ (dihaploid), VÚRV Ruzyně (309 – donor 00 kvality)
Linie 7 – WRG 12/2 SP	WRG x 00 linie (F2)	SRN (WRG), VÚRV (00 linie)
Linie 8 – WRG 12/3 SP	WRG x 00 linie (F2)	SRN (WRG), VÚRV (00 linie)
Linie 9 – WRG 12/5 SP	WRG x 00 linie (F2)	SRN (WRG), VÚRV (00 linie)
Linie 10 – DH 5/96 VSP	SL 501	ČR – ŠS Slapy u Tábora

¹cultivars, ²lines, ³parents, ⁴country of origin, ⁵lines, ⁶spontaneous dihaploid, ⁷00 quality donor, ⁸unknown origin

RAPD protokol

PCR reakce byla prováděna v objemu 25 µl obsahujícím 10 mM Tris-HCl, pH 8,3, 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 1% Triton X-100, 100 µM každého dATP, dCTP, dGTP a dTTP, 1 U Taq polymerázy (Promega), 10 pM primeru (Operon Technologies, Inc., Alameda, CA) a 25 ng templátové DNA. Byl proveden skřínink vhodných primerů z kitů OPA 1-20 a OPB 1-20. Vybrány byly primery, které poskytovaly jasné pruhy, tzn. u kitu OPA primery: OPA-01, OPA-03, OPA-09 a OPA-13 a u kitu OPB primery: OPB-01, OPB-06, OPB-11, OPB-17. Nukleotidové sekvence uvedených primerů jsou uvedeny v tab. II.

Amplifikace DNA probíhala v termocyklu PRO-GENE (Technique – Cambridge, Ltd.). Termální cyklus byl 93 °C (5 min) pro počáteční separaci DNA řetězců, následovalo 45 cyklů 92 °C (1 min) – denaturační teplota, 35 °C (2 min) – nasedací teplota, 72 °C (3 min) – elongační teplota a konečná elongační teplota 72 °C (10 min). Amplifikační produkty byly analyzovány elektroforézou na 1,5% agarózových gelech (v TAE pufru) a detekovány barvením ethidium bromidem. Doba trvání elektroforézy byla při napětí 70 V 2,5 až 3 hodiny. Gely byly fotografovány pod UV-světlem pomocí Polaroid GelCam Camera System (film Pola-

roid 667). Jako marker byl používán PCR marker a Lambda DNA/EcoRI + HindIII marker.

Vyhodnocení

Získané elektroforeogramy jsme zpracovávali s využitím barevného stolního scanneru s vysokou rozlišovací schopností (600 dpi) a speciálního softwaru – Gel-Manager for Windows (BioSystematica, U.K.) pro vyhodnocování. Obrázky byly před vlastním hodnocením upraveny v programu Adobe Photoshop 4.0. Výsledkem analýzy spekter je seskupení podobných spekter na základě výpočtu podobnostní matice – koeficientů podobnosti každého vzorku se všemi ostatními z vybrané databáze. Výsledky matice byly pak podrobeny clusterové analýze (UPGMA – unweighted pair group method averages) – jsou zobrazeny jako dendrogramy.

VÝSLEDKY

Vedle celkového počtu amplifikačních produktů 70 bylo v rámci odrůd řepky ozimé spočítáno 11 polymorfních pruhů (RAPDs), což odpovídá 15,71 %, v rámci linií 10 polymorfních pruhů (RAPDs) pak 14,29 %. Zatímco při hodnocení různých druhů byl zaznamenán výrazně vyšší polymorfismus (50 polymorfních pruhů, což odpovídá 71,43 %). Souhrn všech detekovaných RAPD markerů je uveden v tab. III.

Velmi nízký polymorfismus se projevuje zejména u primerů skupiny OPA, kdy pro OPA-03, OPA-09 a OPA-13 nebyl detekován žádný polymorfismus, i když byl úspěšně amplifikován rozsah monomorfních pruhů. Pro OPA-01 byly zjištěny pouze dva polymorfní pruhy. Na základě vizuálního hodnocení elektroforeogramů a z výsledků clusterové analýzy je zřejmé, že odrůdy Ceres, Solida, Falcon a Sonata se od sebe neodlišovaly. Odrůdy Lirajet a Arabella se lišily pouze s pravděpodobností 10 %, což lze přisoudit pouze chybě rozlišovací schopnosti. Ve skupině primerů OPB byl polymorfismus vyšší – tři primery (OPB-01, OPB-11 a OPB-17) měly dva polymorfní pruhy, primer OPB-06

II. Náhodné primery používané pro identifikaci odrůd a DH linií rodu *Brassica* pro RAPDs – Random primers used for identification of cultivars and DH lines of the genus *Brassica* for RAPDs

Primer	Sekvence ¹
OPA-01	CAGGCCCTTC
OPA-03	AGTCAGCCAC
OPA-09	GGGTAACGCC
OPA-13	CAGCACCCAC
OPB-01	GTTTCGCTCC
OPB-06	TGCTCTGCC
OPB-11	GTAGACCCGT
OPB-17	AGGGAACGAG

¹sequence

III. Souhrn detekovaných RAPD markerů u druhů rodu *Brassica*, odrůd a DH linií řepky – Summary of the detection of RAPD markers in *Brassica* species, cultivars and DH lines

Celkový počet primerů (Total number of primers)	40
Počet vybraných polymorfních primerů (Number of polymorphic primers)	8
Celkový počet pruhů amplifikovaných z polymorfních primerů (Total number of bands amplified from polymorphic primers)	70
Rozsah velikosti amplifikovaných produktů (Size range of amplification products)	300–3 800 bp
Průměrný počet pruhů na polymorfní primer (Average number of bands per polymorphic primer)	8–9
Celkový počet identifikovaných polymorfních pruhů /RAPDs/ v rámci (Total number of polymorphic bands /RAPDs/ identified):	
– odrůd řepky ¹ (<i>Brassica napus</i> cultivars)	11 (15,71 %)
– druhů r. <i>Brassica</i> ² (<i>Brassica</i> species)	50 (71,43 %)
– DH linií řepky ³ (<i>Brassica napus</i> DH lines)	10 (14,29 %)

¹in rape cultivars, ²in species of the genus *Brassica*, ³in rape DH lines

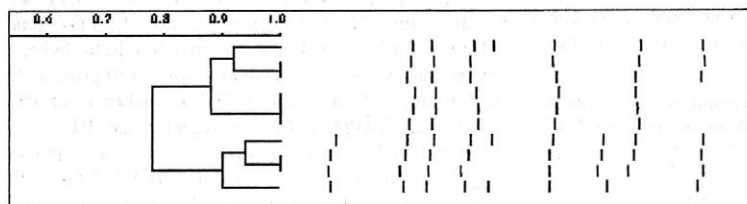
tří polymorfní pruhy. Detekce odrůd podle OPB-01 a OPB-11 je nejasná, obtížné je i vytvoření skupin odrůd. Při použití primeru OPB-17 měly stejné elektroforetické spektrum odrůdy Ceres, Falcon a Sonata, druhou skupinu tvořily Solida a Lirajet a od všech se odlišovala Arabella. Největší polymorfismus se projevil u primeru OPB-06, kdy pouze Ceres a Falcon měly shodná spektra. Ostatní odrůdy měly odlišná spektra, která by mohla být pro ně charakteristická.

Pro charakteristiku 10 dihaploidních androgenních linií byly vybrány shodné primery jako pro odrůdy. Stupeň polymorfismu byl téměř stejný, i když pro jednotlivé primery rozdílný. Nulový polymorfismus a výskyt pouze monomorfních pruhů byl zaznamenán u primerů OPA-01, OPA-09 a OPB-01. U primerů OPA-03, OPB-11 a OPB 17 se objevil vždy jeden polymorfní proužek, ale nebylo možné od sebe jednoznačně oddělit linie podle původu. Největší polymorfismus, ve 4 pruzích, byl u primeru OPA-13 a ve 3 pruzích u OPB-06, které dovolily rozdělit linie podle původu do tří skupin po třech; poslední linie stojí samostatně. Tento závěr dokládají i dendrogramy clusterové analýzy (obr. 1 až 4).

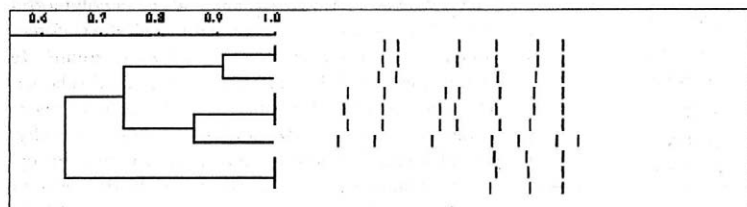
Pro všechny primery s vysokým polymorfismem byl charakteristický výskyt druhově specifického markeru *Brassica napus* jak u všech odrůd, tak i u všech linií odvozených z *Brassica napus*. Velikost markerů u jednotlivých primerů je tato: **B-06**: 620 bp, **B-17**: 900 bp, **A-13**: 750 bp a **A-01** dva markery blízko u sebe ve velikosti kolem 500 bp.

DISKUSE

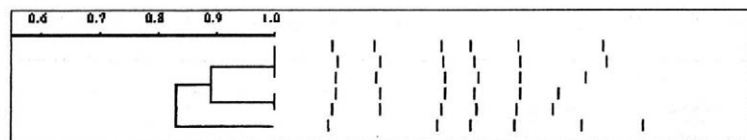
Morfologické charakteristiky odrůd, které jsou součástí standardních postupů UPOV, jsou ovlivněny prostředím, a proto je pro taxonomickou klasifikaci často požadováno důkladné a rozsáhlé hodnocení dospělých rostlin. DNA fingerprinting ale nabízí rychlejší a přesnější způsob určení příbuzenských vztahů mezi jedinci, aniž by DNA molekulární analýza byla ovlivněna vnějšími faktory. V posledním období je doporučováno zařazení molekulárních markerů do testů DUS (Černý, osobní sdělení). K molekulární analýze druhů rodu *Brassica* a vybraných odrůd a DH linií *Brassica napus*



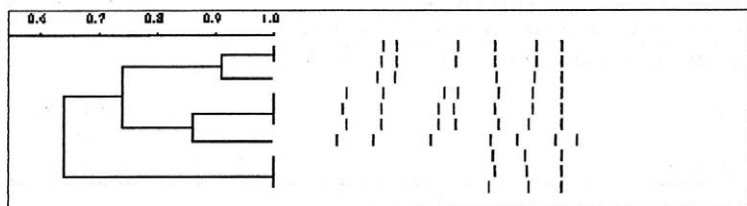
1. Dendrogram – dihaploidní linie řepky, primer OPB-6 – Dendrogram – dihaploid lines of rape, OPB-6 primer



2. Dendrogram – dihaploidní linie řepky, primer OPA-13 – Dendrogram – dihaploid lines of rape, OPA-13 primer



3. Dendrogram – odrůdy řepky, primer OPB-17 – Dendrogram – rape cultivars, OPB-17 primer



4. Dendrogram – odrůdy řepky, primer OPB-6 – Dendrogram – rape cultivars, OPB-6 primer

L. byla využita RAPD technika. RAPD markery vznikají při asymetrické polymerázové řetězové reakci (PCR) amplifikací s jednoduchými primery náhodné nukleotidové sekvence (Williams et al., 1990). Pro PCR reakci bylo důležité optimalizovat metodu extrakce templátové DNA k dosažení odpovídající čistoty templátu. Vhodná extrakce byla podle autorů Edwards et al. (1991), modifikovaná zařazením dvakrát zopakovaného kroku k čištění nukleových kyselin (chloroform : izoamylalkohol, 24 : 1). Jako nevhodné se ukázalo zařazení fenolu před tento krok, jak doporučují Mikkelsen et al. (1996). I přes pečlivé odstranění fenolu neproběhla PCR reakce u některých vzorků odrůd. U linií, u kterých se projevila výrazně vyšší citlivost na čistotu DNA, PCR reakce neproběhla vůbec. Reprodukovatelné standardní elektroforeogramy jsme získali po extrakci DNA pomocí DNeasy Plant Mini Kitu QIAGEN, při kterém se čištění DNA děje přes kolonu QIAshredder, v dalším kroku se DNA zachytí na DNeasy spin koloně, ze které se vymývá DNA elučním roztokem. Konečným produktem je 100 µl vzorku templátové DNA.

Při hodnocení výsledků (elektroforeogramů) bylo nutné přihlídnout k předpokládanému rozdílnému polymorfismu RAPD markerů v rámci odrůd řepky ozimé, odvozených DH androgenních linií z řepky ozimé a různých druhů v rámci rodu *Brassica* (řepka, hořčice černá, hořčice sarepská, hořčice bílá a řepice).

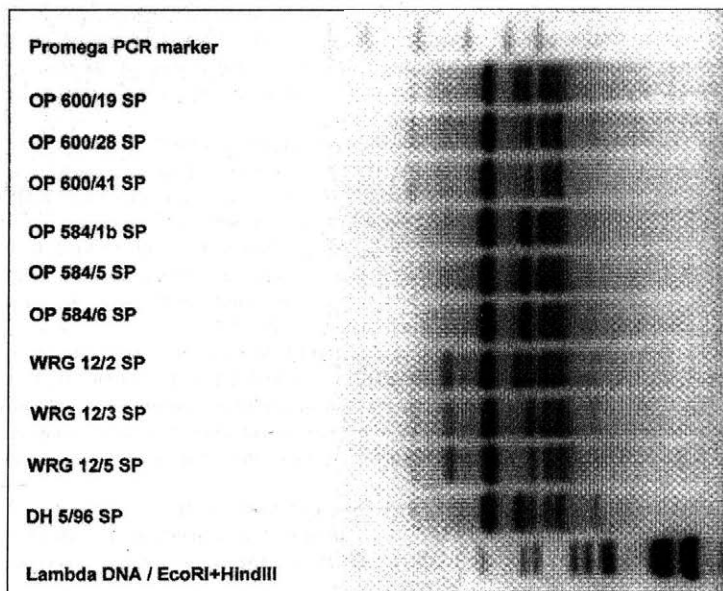
Nízký polymorfismus, zjištěný při analýze odrůd, svědčí o velmi obtížné identifikovatelnosti odrůd řepky ozimé pomocí RAPD markerů, neboť některé odrůdy se podle elektroforetického spektra jeví jako shodné. Opakovaně shodná spektra odrůd Ceres a Falcon odpovídají jejich největší genetické příbuznosti (tab. 1). Obdob-

ný charakter výsledků, tj. skupiny příbuzných genotypů a nejednoznačná identifikace odrůd, byly získány i po analýze biochemických markerů (Čurn, Sáková, 1997). Iqbal et al. (1997) dospěli k podobným závěrům u bavlíku, kdy pomocí clusterové analýzy mohlo být 17 odrůd dáno do dvou skupin s podobností v rozsahu 81,51 až 93,41 %. Jak se předpokládalo, většina analyzovaných odrůd bavlíku měla úzký genetický základ.

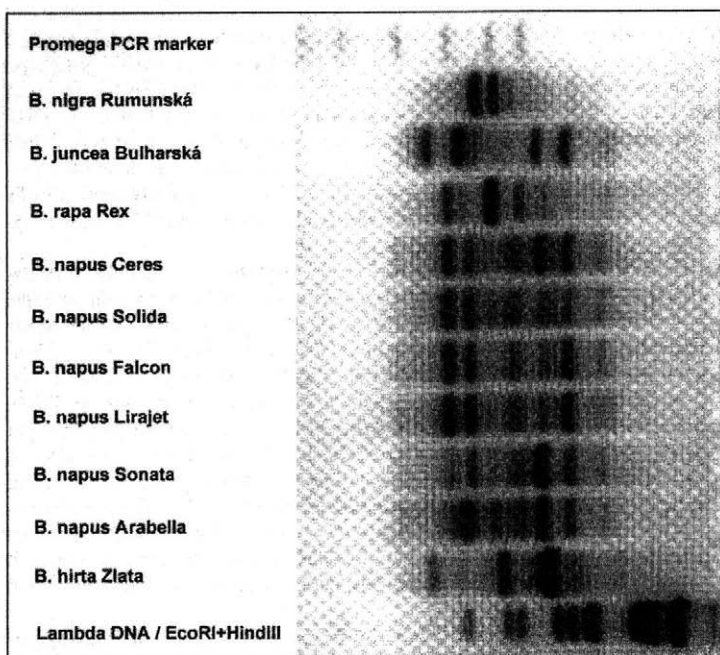
Při vyhledávání polymorfních pruhů může u některých elektroforetických spekter vznikat dojem, že nejde o polymorfismus, že pruhy se od sebe odlišují pouze svou intenzitou. Po zopakování PCR reakce byla intenzita pruhů shodná, což by mohlo potvrzovat závěr, který uvádějí Thormann et al. (1994), kteří po amplifikaci DNA provedli „Southern“ hybridizaci. Rozdíly v intenzitě pruhů mohou být spojovány se stupněm homologie mezi primerem a daným místem na templátu DNA, kde se primer napojuje, nikoliv s počtem amplifikovaných sekvencí v rostlinném genomu. Pro doplnění fingerprintů je vhodné využívat absorbančních profilů, které mohou lépe poukazovat na různou intenzitu pruhů (Sáková, Čurn, 1997).

Dalším postupem při analýze genomu brukvovitých plodin bude vyhledání a využití více specifických oligonukleotidů/primerů získaných na základě porovnání konzervativních sekvencí genů pomocí PCR reakce.

Z údajů zde prezentovaných je patrné, že RAPD markery je možné použít pro fingerprinting jednotlivých genotypů v omezené míře, jestliže se jedná o geneticky blízké původy v rámci jednoho druhu, jako je tomu u odrůd řepky ozimé. Dihaploidní linie rozdílných původů bylo ale možné od sebe rozlišit při použití vhodných kombinací primerů (obr. 5). U geneticky



5. Záznam RAPD markerů – dihaploidní linie řepky, primer OPB-6 – RAPD marker record – dihaploid lines of rape, OPB-6 primer



6. Záznam RAPD markerů – odrůdy řepky, řepice a hořčice, primer OPA-1 – RAPD marker record – cultivars of rape, turnip rape and mustard, OPA-1 primer

rozdílných linií může RAPD analýza být užitečná pro selekci možných rodičů při hybridním šlechtění a pro zakládání a mapování populace. Vysoký polymorfismus (71,43 %) se projevil mezi druhy, což může mít svůj význam při kontrole čistoty osiva (obr. 6).

Významným předpokladem stanovení odrůdové pravosti a čistoty odrůd je i stanovení genetické struktury odrůd řepky. Vzhledem k použitému extrakčnímu postupu, kdy pro získání optimálního množství DNA byly vzorky odebírány z jedné až dvou klíčících rostlin, není možné přesně charakterizovat genetickou strukturu odrůdy. Z tohoto důvodu bude extrakce DNA optimalizována pro získání templátu DNA z jedné rostliny.

LITERATURA

- COLLINS, G. G. – SYMONS, R. H. (1993): Polymorphism in grapevine detected by the RAPD PCR technique. *Plant Mol. Biol. Rep.*, 11: 105–112.
- ČURN, V. – SÁKOVÁ, L. (1997): Využití biochemických markerů ve šlechtění řepky a dalších brukvovitých plodin. *Genet. a Šlecht.*, 33: 281–305.
- DEMEKE, T. – ADAMS, R. P. – CHIBBAR, R. (1992): Potential taxonomic use of random amplified polymorphic DNA (RAPD): a case study in *Brassica*. *Theor. Appl. Genet.*, 84: 990–994.
- EDWARDS, K. – JOHNSTONE, C. – THOMPSON, C. (1991): A simple and rapid method for preparation of plant genomic DNA for analysis. *Nucl. Acids Res.*, 19: 1349.
- ECHT, C. S. – ERDAHL, L. A. – MCCOY, T. J. (1992): Genetic segregation of random amplified polymorphic DNA in diploid cultivated alfalfa. *Genome*, 35: 84–87.
- HALLDEN, C. – NILSSON, N. O. – RADING, T. M. – SALL, T. (1994): Evaluation of RFLP and RAPD markers in a comparison of *Brassica napus* breeding lines. *Theor. Appl. Genet.*, 88: 123–128.
- JAIN, A. – BHATIA, S. – BANGA, S. S. – PRAKASH, S. – LAKSHMIKUMARAN, M. (1994): Potential use of the random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique to study the genetic diversity in Indian mustard (*Brassica juncea*) and its relationship to heterosis. *Theor. Appl. Genet.*, 88: 116–122.
- LERCETEAU, E. – ROBERT, T. – PÉTIARD, V. – GROUZILLAT, D. (1997): Evaluation of the extent of genetic variability among *Theobroma cacao* accessions using RAPD and RFLP markers. *Theor. Appl. Genet.*, 95: 10–19.
- MIKKELSEN, T. R. – JENSEN, J. – JORGENSEN, R. B. (1996): Inheritance of oilseed rape (*Brassica napus*) RAPD markers in a backcross progeny with *Brassica campestris*. *Theor. Appl. Genet.*, 92: 492–497.
- REITER, R. S. – WILLIAMS, J. G. K. – FELDMANN, K. A. – RAFALSKI, J. A. – TINGEY, S. D. – SCOLNIK, P. A. (1992): Global and local genome mapping in *Arabidopsis thaliana* by using recombinant inbred lines and random amplified polymorphic DNAs. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 89: 1477–1481.
- SAIKI, R. K. – GELFAND, D. H. – STOFFEL, S. – SCHARF, S. J. – HIGUCHI, R. – HORN, G. T. – MULLIS, K. B. – EHRlich, H. A. (1988): Primer-directed enzymatic

amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science, 239: 487–491.

SÁKOVÁ, L. – ČURN, V. (1997): Variabilita RAPD markerů u dihaploidních linií řepky a vybraných odrůd brukvovitých plodin. In: Sbor. Abstr. Předn. Problematika N-látek v rostlinných produktech, Kroměříž, 24.–25. 9. 1997: 7.

SANTOS, J. B. dos – NIENHUS, J. – SKROCH, P. – TIVANG, J. – SLOCUM, M. K. (1994): Comparison of RAPD and RFLP genetic markers in determining genetic similarity among *Brassica oleracea* L. genotypes. Theor. Appl. Genet., 87: 909–915.

SCOTT, M. – HAYMES, M. – WILLIAMS, S. M. (1992): Parentage analysis using RAPD PCR. Nucleic Acids Res., 20: 5493.

TINKER, N. A. – FORTIN, M. G. – MATHER, D. E. (1993): Random amplified polymorphic DNA and pedigree relationships in spring barley. Theor. Appl. Genet., 85: 976–984.

THORMANN, C. E. – FERREIRA, M. E. – CAMARGO, L. E. A. – TIVANG, J. G. – OSBORN, T. C. (1994): Comparison of RFLP and RAPD markers to estimating genetic relationships within and among cruciferous species. Theor. Appl. Genet., 88: 973–980.

UZUNOVA, M. – ECKE, W. – WEISSELEDER, K. – RÖBBELEN, G. (1995): Mapping the genome of rapeseed (*Brassica napus* L.). I. Construction of an RFLP linkage map and localization of QTLs for seed glucosinolate content. Theor. Appl. Genet., 90: 194–204.

WILLIAMS, J. G. K. – KUBELIK, A. R. – LIVAK, K. J. – RAFALSKI, J. A. – TINGEY, S. V. (1990): DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res., 18: 6531–6535.

Došlo 5. 12. 1997

Kontaktní adresa:

Ing. Lenka S á k o v á, CSc., Jihočeská univerzita, Zemědělská fakulta, Studentská 13, 370 05 České Budějovice, Česká republika, tel.: 00 420 3/87 77 24 55, fax: 00 420 3/824 50

Z VĚDECKÉHO ŽIVOTA

25. semenářský kongres ISTA v Pretorii (Jihoafrická republika)

International Seed Testing Association považuje za svou prvořadou povinnost neustálé zlepšování Mezinárodních pravidel pro zkoušení semen. Asociace má bohatou historii. První stanici pro zkoušení semen založil Friedrich Nobbe v roce 1869 v Tharandt (Sasko). Již v roce 1875 se pak sešlo 31 vedoucích stanic pro zkoušení osiv v Grazu (Rakousko), aby vypracovali první směrnice pro zkoušení osiv. V roce 1924 pak na čtvrtém zasedání v Cambridge (United Kingdom) byla založena ISTA, vedoucí světová organizace pro zkoušení osiv. V letošním roce se konal v Pretorii již 25. kongres ISTA. V příštím roce (1999) při příležitosti 75. výročí této organizace) se bude světová semenářská konference konat v Cambridge.

The Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) je mezinárodní fórum, ke kterému patří 29 zemí ze čtyř kontinentů, včetně České republiky, avšak některé z jeho aktivit jsou otevřeny i nečlenským zemím. Každoročně vydává Seznam odrůd, které připadají v úvahu pro certifikaci OECD; musí být oficiálně uznány jako odlišné a alespoň v jedné zemi musí mít akceptovatelnou hodnotu. K tomu se používá odrůdová certifikace na základě DUS (Distinction, Uniformity and Stability). Tento seznam obsahuje odrůdy, s nimiž se obchoduje mezinárodně (v roce 1974 obsahoval 2,6 tisíce odrůd, v roce 1997 přes 18 tisíc). Hlavními požadavky jsou pravost typu, odrůdová identita (tj. zda odrůda odpovídá popisu odrůdy během celé doby množení, zvláště při množení v zahraničí) a čistota, daná minimálními hodnotami, kterým musí odpovídat.

Používá se šest tzv. Schemat:

- píce od roku 1958, v roce 1973 rozšířené o osiva olejnin – toto Schema je aplikováno v 45 zemích;
- obilniny od roku 1966 – 42 zemí;
- cukrovka a krmná řepa od roku 1968 – 29 zemí;
- zeleniny a od roku 1971 – 20 zemí;
- *Trifolium subterraneum* a podobné druhy od roku 1974 – 4 země;
- kukuřice od roku 1977, rozšířené o *Sorghum* v roce 1993 – 34 zemí.

Schemata používají tyto kategorie osiva, s přesně stanoveným počtem generací a technickými podmínkami: osivo předzákladní (pre-basic), základní (basic) a certifikované (certified). Certifikace OECD používá

metody ISTA (pokud je to nutné, používá podobné metody) pro vzorkování a zkoušení.

Pokud některé země přistoupí ke Schematům OECD, nemusí všechna doma produkovaná osiva podle nich hodnotit, ale slouží k zavedení jasných a spolehlivých metod jak pro vnitřní, tak zejména pro zahraniční obchod. Schemata autorizují používání návesek a certifikátů.

Letos se koncem dubna konala konference ISTA, semenářský kongres a výroční zasedání příslušné skupiny OECD v Pretorii. Jednání se zúčastnilo asi 300 zahraničních účastníků a asi 100 účastníků domácích. Oficiálním delegátem zastupujícím Českou republiku na konferenci ISTA a zasedání OECD byla Dr. Z. Polanecká z ÚKZÚZ. Oficiální zástupce ISTA v ČR je Ing. M. Houbá, CSc., z téhož ústavu.

Na jednání ISTA bylo schváleno, že od roku 1999 bude vitalita osiva hrachu a sóje, hodnocená podle vodivosti výluhu ze semen, oficiálním ukazatelem kvality (čím vyšší je vodivost, tím horší je vitalita, protože se vyluhuje mnoho elektrolytů). Lze očekávat, že od příští konference ISTA se stanou oficiální metodou hodnocení odrůdové identity molekulární markery, i když se na tom dosud *ad hoc* svolaná porada neshodla. Na kongresu bylo rovněž prezentováno mnoho zajímavých příspěvků; za ČR uvedl O. Chloupek výsledky hodnotící vitality oblek ječmene v závislosti na odrůdových rozdílech a provenienci. Pozoruhodný je rozvoj výzkumu zabývajícího se rekalcitrantními semeny (s omezenou životností, nesnášející vysušení, např. kokosový ořech), zlepšováním kvality osiva (priming, osmoconditioning, hydropriming, solid matrix priming, aerated priming, advancing aj.), metodami zjišťování takto ovlivněných semen, stárnutím semen, nechemickým mořením osiv (teplou vodou, ozařováním elektrony, mikrovlnným zářením), možnostmi nestátních semenářských laboratoří (v USA jsou již obvyklé), semenářstvím v rozvíjejících se zemích aj. V USA je nejrozšířenější zkoušková vitalita test urychleným stárnutím (u velkých semen klíčivost po 72 hodinách po umístění v prostředí s maximální vzdušnou vlhkostí při asi 40 °C, u malých semen po 24 hodinách po umístění ve vodě při 45 °C; semena s nízkou vitalitou ztrácejí klíčivost rychleji). Každý stát USA má však vlastní předpisy.

Prof. O. Chloupek, DrSc., Dr. Z. Polanecká

SELEKCE ROSTLIN *IN VITRO* NA ODOLNOST VŮČI VYBRANÝM PATOGENŮM S VYUŽITÍM SEKUNDÁRNÍCH TOXICKÝCH METABOLITŮ*

PLANT SELECTION *IN VITRO* FOR RESISTANCE TO SOME
PATHOGENS USING SECONDARY TOXIC METABOLITES

J. Nedělník, J. Řepková

Forage Crop Research Institute, Ltd., Troubsko, Czech Republic

ABSTRACT: Processes of variability formation and selection of genotypes with specific characteristics can be transferred to laboratories as a result of development of plant manipulations *in vitro*. Recent knowledge of the use of toxic products from secondary metabolism of fungal and bacterial pathogens at selections for resistance is summarized in the introductory section. Experimental procedures used for preparation of selection agents, formation of embryonic plant material and proper selections are demonstrated in the second part of the paper. Unconventional techniques cannot fully replace classical procedures but breeding efficiency may be increased.

plants; resistance; selection *in vitro*; pathogens; breeding efficiency

ABSTRAKT: Procesy formování variability a selekce genotypů se specifickými vlastnostmi lze s rozvojem rostlinných *in vitro* manipulací přenášet do laboratorních podmínek. Práce shrnuje v úvodní části některé poznatky o využití toxických produktů sekundárního metabolismu houbových a bakteriálních patogenů při selekcích na rezistenci. Ve druhé části práce jsou na modelovém příkladu demonstrovány experimentální postupy při přípravě selekčních agens, tvorbě embryonického rostlinného materiálu a vlastních selekcích. Nekonenční techniky nemohou plně nahradit klasické postupy, ale mohou zvýšit efektivitu šlechtění.

rośliny; rezistence; selekce *in vitro*; patogeny; efektivita šlechtění

ÚVOD

Jednou z překážek, které brání tomu, aby zemědělské plodiny optimálně realizovaly svůj výnosový potenciál, je působení fytopatogenních činitelů. V mnoha případech z nejrůznějších důvodů (ekologické, ekonomické, citlivost organismů) nepřipadá v úvahu přímá aplikace pesticidů. Je proto nutné v rámci integrované ochrany rostlin hledat jiné formy účinných zásahů. Mezi ekonomicky i ekologicky akceptovatelné metody patří šlechtění rezistentních odrůd. S rozvojem technik rostlinných *in vitro* manipulací se při tvorbě materiálu rezistentního především k houbovým a bakteriálním patogenům začaly uplatňovat netradiční selekční metody. Předložená práce v první části shrnuje dostupné poznatky o těchto nekonvenčních metodách a ve druhé části

dokumentuje jejich praktickou aplikaci v systému pěstí leguminózy x *Fusarium* spp.

Choroby rostlin jsou vyvolávány mnoha různými činiteli. Nejdůležitější z hlediska rozšíření, rozmanitosti a způsobovaných škod jsou houby a bakterie. Část z těchto patogenních organismů produkuje toxické metabolity hrající významnou roli v patogenezi.

K popisu sloučenin produkovaných houbami a bakteriemi s toxickými účinky na rostliny a hrajícími roli v expresi symptomů bylo užito mnoha termínů. V současnosti je terminologicky zřejmě nejspřávnější označovat metabolity houbových organismů jako mykotoxiny, metabolity bakterií jako bakteriální toxiny a termín fyto toxin ponechat pro označování látek produkovaných rostlinami a toxických pro jiné organismy.

Poměr bakteriálních a houbových patogenů produkujících toxiny není znám, ale jejich počet se stále zvyšuje.

* Problematika byla řešena v rámci projektu č. IE 0950975067 NAZV MZe ČR.

šuje. Postupem doby umožnily nové nebo zdokonalené techniky v chromatografii a spektroskopii izolaci a charakteristiku toxinů. I přes tuto vědeckou aktivitu je do dnešní doby komplexně charakterizováno pouze několik desítek toxických sloučenin. I když u některých toxinů je objasněn i mechanismus působení, kompletní průběh patogeneze se všemi mezipřechody včetně ovlivňování enzymatických procesů není dosud znám pro žádný toxin.

Mikrobiální toxiny mají některé specifické vlastnosti. Část z nich má extrémně vysokou hostitelskou specifickou, tj. poškozují pouze některé rostlinné druhy nebo odrůdy. Na druhé straně některé toxiny mají specifickou působení odlišnou od organismu, kterým jsou produkovány, nebo specifickou postrádají. V této skupině jsou některé makromolekulární sloučeniny, které vyvolávají např. vadnutí rostlin, a to spíše porušením fyziologických pochodů vodního režimu než přímou interferencí s metabolickými procesy hostitele nebo narušením buněčné integrity.

Objasnění specifických biochemických interakcí mezi rostlinami a patogeny, resp. toxiny je jedním z neaktuálnějších problémů současného výzkumu. Otázka náchylnosti či rezistence rostlin vůči patogenům mikroorganismů je velmi složitá. Metabolická odpověď rostlinné buňky na patogena je regulována genetickým aparátem. Biochemické reakce napadené rostliny probíhají postupně ve dvou fázích. V první fázi „poznání“ patogena mají klíčový význam metabolické odpovědi rostlinných buněk, které růst a vývoj patogena buď podporují, nebo brzdí. Ve druhé fázi dochází k indukci takových biochemických a strukturálních změn, které podmiňují stupeň kompatibility rostliny a patogena. Rostliny mohou na patogena reagovat jednak specificky na principu hypotézy „gene for gene“ (Flor, 1956) a jednak nespecificky na základě nespecificky indukovaných změn v metabolismu rostlin (tvorba papil, syntéza fytoalexinů, fenolických látek, enzymatických inhibitorů atd.) (Frič, 1987).

Klasifikace toxinů v rostlinné patologii

Toxické metabolity mikroorganismů lze rozdělovat podle různých hledisek (Durbín, 1981).

1. Chemická charakteristika – jako skupina nemají toxiny společné strukturální znaky. Jsou řazeny do skupin peptidů, terpenoidů, glykosidů, fenolů, polyacetátů, polysacharidů nebo kombinací těchto skupin a mnohých jiných.
2. Typ produkujícího organismu – houby, bakterie.
3. Biologická aktivita – inhibitory enzymů, antimetabolity, sloučeniny porušující membrány aj.
4. Hostitelská specifická či nespecifická (host-specific or nonspecific toxins).

Patogenní houby a bakterie produkují jeden nebo více toxinů. Produkty toxických metabolitů jsou druhy rodů *Alternaria*, *Ceratocystis*, *Fusicoccum*, *Fusarium*, *Helminthosporium*, *Rhynchosporium*, *Stemphylium* aj. Toxiny nebyly izolovány z hub vyvolávajících rzi, sně-

ti a padlí. Z bakteriálních producentů lze uvést zástupce rodů *Xanthomonas*, *Pseudomonas*, *Corynebacterium*.

Toxiny lze izolovat při růstu mikroorganismů za vhodných kultivačních podmínek. Nejvhodnějším prostředím pro produkci těchto látek a jejich následnou extrakci jsou syntetická média, zatímco různé rostlinné a živočišné výluhy v médiu ztěžují purifikační proces. Purifikace toxinů je poměrně obtížná. Mikroorganismus je z kultivačního média odstraněn filtrací a centrifugací, látky ve filtrátu (tj. roztoku, který zůstane po odstranění pevných částic) mohou být separovány na základě rozdílné molekulové hmotnosti. Pro relativně malé molekuly může být použita přímá extrakce s následnou purifikací vysokotlakou kapalinovou chromatografií (HPLC), chromatografií na tenké vrstvě (TLC) nebo plynovou chromatografií (GLC). Tyto techniky jsou v posledním období doplňovány hmotnostní spektroskopií, RIA, ELISA apod. (Bata et al., 1983; Plattner, Bennett, 1983; Schuchmann, 1985; Krämer, 1986).

Jednoduššími metodami pro zjištění toxicity jsou biologické testy. Existuje celá řada kvantitativních postupů užívaných např. rostlin, semen, živočichů ryb apod. Nevýhodou těchto testů je, že jimi nelze určit druh ani množství toxických metabolitů.

Využití toxických metabolitů ve šlechtění

Aplikace toxinů v selekcích na rezistenci se uvádí jako jedna z netradičních metod na úrovni rostlinných *in vitro* kultur.

Výhody rostlinných *in vitro* kultur ve šlechtění:

- a) Oproštění od vlivu klimatu a přírodních podmínek umožňuje snadněji měřit kvantitativní rozdíly u polygenně děděné rezistence.
- b) Možnost kultivovat a ovlivňovat velké množství jedinců na malém prostoru.
- c) Manipulace s mikrosporami a haploidy, jednoduchými genomy, jež dovolují odhalit recesivní nebo aditivní znaky v malé populaci.
- d) Masový screening rezistentních mutantů.

Dnešní příklady ukazují, že procesy formování variability a selekce výkonných genotypů lze částečně nebo zcela přenášet z pole do laboratoře, ale tyto technologie musí být kombinovány a doplněny klasickým šlechtěním. Nekonenční techniky nemohou tedy plně nahradit klasické metody, ale mohou zvýšit efektivitu šlechtění. Navíc je třeba v každém konkrétním selekčním systému důkladně studovat vztah účinnosti *in vitro* selekce a odolnosti rostlinných pletiv a celistvých rostlin v závislosti především na mechanismech odolnosti a jeho projevech na buněčné úrovni a úrovni rostlin.

Zájem o využití toxinů v selekčním procesu byl stimulován získáním rezistentních rostlin *Nicotiana tabacum* vůči *Pseudomonas syringae* (Carlson, 1973). Autor použil methionine sulfoximin (MSO), který mimikruje symptomy přirozeného toxinu na tabákových listech. MSO byl použit jako selekční činitel v proto-

plastových a buněčných kulturách. Jak MSO, tak tab-toxin inhibovaly syntézu glutaminu. Regenerované rostliny ze selektovaných mutantních linií vykazovaly rezistenci k MSO, která byla kontrolována jedním nebo dvěma geny. Podobné výsledky byly získány i o 10 let později pro tabákové kultury selektované na rezistenci k toxinu *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (Tha-nu-tong et al., 1983).

Kalusová kultura *Zea mays* rezistentní k *Helminthosporium maydis* byla získána po několikanásobné kultivaci na médiích s kultivačním filtrátem tohoto patogena. Indukovaná rezistence byla stabilní i po 127 dnech růstu kalusů na netoxickém médiu (Gengenbach, Green, 1975).

Behnke (1979, 1980a, b) referuje o 25% redukcii počtu nekrotických lézí po inokulaci regenerovaných rostlin *Solanum tuberosum* houbou *Phytophthora infestans*. Tyto rostliny byly získány regenerací z kalusů selektovaných v prostředí kultivačního filtrátu patogena.

První zprávou o úspěšném získání rostlin *Oryza sativa* rezistentních k *Helminthosporium oryzae* cestou selekce *in vitro* je práce autorů Ling et al. (1985). Autoři získali dvě rostliny ze somatických buněk kultivovaných na 25% toxickém médiu. Získání rezistence bylo potvrzeno v R₂ generaci.

Další druh rodu *Helminthosporium* byl studován v interakci s rostlinami *Avena sativa*. Kultivací kalusů na médiích s různým obsahem viktorinu, toxinu produkovaného *Helminthosporium victoriae*, byly získány „toxin-necitlivé“ kalusové linie, z nichž byly regenerovány rostliny se sníženou citlivostí k toxinu. Cytologické analýzy meiotických buněk regenerovaných rostlin neprokázaly žádné chromozomové defekty podmiňující nižší citlivost k toxinu. Podle autorů Rines a Luke (1985) lze touto cestou selektovat rezistentní materialy.

Houby rodu *Fusarium* jsou patogeny vyvolávajícími u *Hordeum vulgare* padání klíčnicích rostlin, kořenové hniloby a jiné patologické změny. Vyšlechtění rezistentních odrůd by vyřešilo mnohé problémy. Jedním z toxinů *Fusarium* spp. je kyselina fusarová. Autoři ji použili pro selekci v embryogenní kalusové kultuře. Čtyřnásobnou selekci na médiích s 0,8 mM kyseliny získali kalusy a rostliny s vysokou toxin-rezistencí (Chawla, Wenzel, 1987).

Hordeum vulgare a *Triticum aestivum* se staly modelovými objekty při selekci na rezistenci k toxinům *Helminthosporium sativum*. Z obou plodin byly odvozeny embryogenní kalusy, které pak byly vystaveny selekčnímu tlaku purifikovaného kultivačního filtrátu. V práci je experimentálně potvrzen kladný korelační vztah mezi reakcí kalusů na toxiny *in vitro* a regenerovaných rostlin na vlastního patogena *in vivo* (Chawla, Wenzel, 1987).

Další důkaz o pozitivní korelaci mezi reakcí *in vitro* a *in vivo* je v práci autorů Ishida, Kumashiro (1988). AT-toxin extrahovaný z kultivačního filtrátu *Alternaria alternata* byl aplikován do médií pro kultivaci buněčných suspenzí kultur *Nicotiana tabacum*.

Buněčné suspenze odvozené z rostlin citlivých k patogenovi reagovaly mnohem intenzivněji na přítomnost toxinu než buňky odvozené z rezistentních rostlin.

Fytotoxicitu jednoho z fusariotoxinů, deoxynivalenolu, pro pšenici a z ní odvozené kultury (segmenty koleoptile, kalusy, embrya) a možnosti v rezistentním šlechtění studovali Bruins et al. (1993).

Rostliny sóji rezistentní k hostitelsky specifickému toxinu obsaženému v kultivačním filtrátu houby *Septoria glycines* získali američtí autoři Song et al. (1994).

Důležitou chorobou rajčat je patologické vadnutí vyvolávané houbou *Fusarium eumartii*. Výsledky dosažené při použití filtrátu v selekci na úrovni kalusů umožňují podle autorů Botta et al. (1994) využití ve šlechtitelském procesu.

Přehled výše citovaných prací i některých dalších příkladů spojených s danou problematikou je souhrnně uveden v tab. I.

Aplikace selekcí *in vitro* na odolnost vůči *Fusarium* spp. u jeteleVIN

V chronologickém sledu prací týkajících se využití netradičních selekčních metod záměrně chybí zmínka o publikacích zabývajících se k selekcím jeteleVIN na odolnost vůči houbám rodu *Fusarium*. Výsledky těchto prací spolu s podrobnějším popisem toxických metabolitů těchto hub a použitelných pracovních postupů jsou diskutovány v následující části této publikace.

Houby zařazované imperfektním vývojovým stadiem do rodu *Fusarium* Link. ex Fr. patří mezi závažné patogeny vaječnicku (*Medicago sativa* L.) i jetele lučního (*Trifolium pratense* L.). Spolu s dalšími mikroorganismy se podílí na vaskulárním vadnutí i krčkových a kořenových hnilobách. V rámci integrované ochrany rostlin se prosazuje nechemický způsob boje proti těmto organismům. Jako perspektivní se ukazuje především vyšlechtění rezistentních odrůd.

O houbách rodu *Fusarium* je známo, že produkují biologicky aktivní sekundární metabolity, které jsou mj. i fytotoxické. I když jejich role v patogenезi není dosud zcela objasněna a je předmětem četných diskusí, připisuje se jim významný podíl na kolonizaci hostitelských pletiv patogeny (Hartman-Mitchell et al., 1983; Scheffer, 1984). Předpokládá se, že místem působení toxinů jsou tři buněčné komponenty: buněčné membrány, mitochondrie a specifické enzymy. Z důležitých poznatků je zřejmé, že fusariotoxiny působí změny permeability membrán rostlinné buňky a inhibici některých jejich základních funkcí, mj. oddělují transport elektronů od fotofosforylace, narušují syntézu proteinů, působí inhibici DNA proteosyntézy a hydrolyzu proteinů apod. (Tatsuno et al., 1973; Michalíková, 1988).

Fusariotoxiny jsou chemicky řazeny do několika skupin:

1. **Trichotheceny** – tetracyklické sesquiterpenoidy. Krystalické, bezbarvé látky vysoce stabilní v kyselém prostředí, méně stabilní v silně alkalickém prostředí.

I. Selekcce rostlin *in vitro* na odolnost k patogenům s využitím mikrobiálních toxinů – Plant selection *in vitro* for resistance to pathogens using microbial toxins

Patogen ¹	Toxin ²	Hostitel ³	Rostlinný materiál ⁴	Reakce ⁵	Publikace ⁶
<i>Pseudomonas phaseolicola</i>	kultivační filtrát ⁷	<i>Phaseolus vulgaris</i>	kalusy ¹⁴ , buněčné suspenze ¹⁵	inhibice růstu do 77 % ¹⁹	Bajaj, Saettler (1970)
<i>Pseudomonas syringae</i>	metionin sulfoximin	<i>Nicotiana tabacum</i>	haploidní protoplasty ¹⁶	metionin-rezistentní rostliny ²⁰	Carlson (1973)
<i>Helminthosporium maydis</i> race T	Hm T-toxin	<i>Zea mays</i>	kalusy	toxin-rezistentní buňky a rostliny ²¹	Gengenbach
<i>Helminthosporium sacchari</i>	crude extrakt	<i>Saccharum officinarum</i>	buněčné suspenze	rezistentní klony ²²	Gengenbach et al. (1977)
<i>Alternaria solani</i>		<i>Solanum tuberosum</i>	protoplasty ¹⁷	částečná rezistence ²³	Matern et al. (1978)
<i>Phytophthora infestans</i>	kultivační filtrát ⁸	<i>Solanum tuberosum</i>	kalusy	rezistentní rostliny ²⁴	Behnke (1979)
<i>Fusarium oxysporum</i>	kultivační filtrát	<i>Solanum tuberosum</i>	kalusy	zvýšení rezistence ²⁵	Behnke (1980)
<i>Phoma lingam</i>	kultivační filtrát	<i>Brassica napus</i>	buněčné suspenze	50–75% tolerantních rostlin v potomstvu ²⁶	Sacristan (1982)
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i>	částečně purifikovaný tabtoxin ⁹	<i>Nicotiana tabacum</i>	kalusy	26 % rezistentního potomstva ²⁷	Thanutong et al. (1983)
<i>Alternaria alternata</i>	toxické frakce z filtrátu ¹⁰	<i>Nicotiana tabacum</i>	kalusy	9 % rezistentního potomstva	Thanutong et al. (1983)
<i>Helminthosporium sacchari</i>	částečně purifikovaný HS-toxin	<i>Nicotiana tabacum</i>		zvýšená rezistence ²⁸	Larkin et al. (1983)
<i>Fusarium oxysporum</i>	kultivační filtrát	<i>Medicago sativa</i>	kalusy	rezistentní rostliny ²⁹	Hartman et al. (1984)
<i>Helminthosporium victoriae</i>	victorin	<i>Avena sativa</i>	kalusy	rezistentní rostliny	Rines, Luke (1985)
<i>Helminthosporium oryzae</i>	crude extract	<i>Oryza sativa</i>	buněčné suspenze	rezistentní rostliny	Ling et al. (1985)
<i>Fusarium</i> spp.	kyselina fusarová ¹¹	<i>Hordeum vulgare</i>	kalusy	toxin-rezistentní rostliny ³⁰	Chawla, Wenzel (1987)
<i>Helminthosporium sativum</i>	purifikovaný filtrát ¹²	<i>Hordeum vulgare</i>	kalusy	rezistentní rostliny	Chawla, Wenzel (1987)
<i>Fusarium oxysporum</i>	kultivační filtrát	<i>Medicago sativa</i>	kalusy	rezistentní rostliny	Arcioni et al. (1987)
<i>Alternaria alternata</i>	AT-toxin	<i>Nicotiana tabacum</i>	buněčné suspenze		Ishida, Kumashiro (1988)
<i>Fusarium oxysporum</i>	kultivační filtrát	<i>Medicago sativa</i>	buněčné suspenze	rezistentní rostliny	Binarová et al. (1990)
<i>Verticillium albo-atrum</i>	filtrát ¹³	<i>Medicago sativa</i>	buněčné suspenze	rezistentní rostliny	Frame et al. (1991)
<i>Septoria glycidis</i>	filtrát	<i>Glycine max</i>	embryo kultury ¹⁸	rezistentní rostliny	Song et al. (1994)
<i>Fusarium eumartii</i>	filtrát	<i>Solanum tuberosum</i>	kalusy	rezistentní rostliny	Botta et al. (1994)
<i>Colletotrichum kahawae</i>	purifikovaný filtrát	<i>Coffea arabica</i>	kalusy	rezistentní rostliny	Nyange et al. (1995)
<i>Fusarium solani</i>	filtrát	<i>Glycine max</i>	buněčné suspenze	rezistentní rostliny	Jin et al. (1996)

¹pathogen, ²toxin, ³host, ⁴plant material, ⁵reactions, ⁶reference, ⁷culture filtrate, ⁸culture filtrate, ⁹partly purified, ¹⁰toxic fractions of filtrate, ¹¹fusaric acid, ¹²purified filtrate, ¹³filtrate, ¹⁴calluses, ¹⁵cellular suspensions, ¹⁶haploid protoplasts, ¹⁷protoplasts, ¹⁸embryonic cultures, ¹⁹growth inhibition up to 77%, ²⁰methionine-resistant plants, ²¹toxin-resistant cells and plants, ²²resistant clones, ²³partial resistance, ²⁴resistant plants, ²⁵resistance increase, ²⁶50-75% of tolerant plants in progeny, ²⁷26% of resistant progeny, ²⁸increased resistance, ²⁹resistant plants, ³⁰toxin-resistant plants

Molekulová hmotnost v rozmezí 200–500. Všechny přirozeně se vyskytující trichothecény obsahují vazné C₉ a C₁₀ a epoxy-skupinu na C₁₂ a C₁₃ a obvykle hydroxyl- nebo esterovou skupinu na C₃, C₇, C₈ a C₁₅. Jedná se o látky termostabilní. Např. deoxynivalenol při teplotě 160 °C po dobu 60 minut nemění své vlastnosti. V poslední době se dělí na trichothecény (= major metabolites) a apotrichothecény (= minor metabolites), které se liší velikostí molekuly a stereochemií kruhu. LD₅₀ u většiny trichothecénů je srovnatelná s aflatoxiny. Názvy některých trichothecénů: T-2 toxin, HT-2 toxin, acetoscirpenol, diacetoxyscirpenol, nivalenol, deoxynivalenol.

2. Zearalenon – bílá krystalická látka sumárního vzorce C₁₈H₂₂O₅. Termostabilní (150 °C po dobu 44 hodin bez změny toxické aktivity), LD₅₀ (orálně u krys) nad 10 000 mg.kg⁻¹.

3. Moniliformin – bílá krystalická látka sumárního vzorce C₄H₃O₃Na (sodná sůl) nebo C₄H₃O₃K (draselná sůl).

4. Kyselina fusarová (5n-butyl picolinic acid) – popsána v roce 1952 jako „wilt toxin“. Je detekovatelná v rostlinných pletivech po inokulaci *Fusarium* spp.

5. Fumonisin – sloučeniny na bázi aminopolyalkoholů se strukturou podobnou sfingolipidům. Má vysokou akutní toxicitu pro živočichy a člověka.

Pro selekce *in vitro* je nejčastěji užíván kultivační filtrát, objevují se však již také práce užívající jako selekční agens purifikované toxiny. Selekčnímu tlaku mohou být vystaveny kalusové nebo buněčné suspenzní kultury. Hartman et al. (1984) a Arcioni et al. (1987) při selekci v kalusové kultuře vojtěšky na rezistenci k filtrátu *Fusarium oxysporum* f. sp. *medicaginis* získali rezistentní kalusy. Rostliny z nich regenerované se vyznačovaly zvýšenou rezistencí vůči infekci danou houbou *in vivo*. Buněčné suspenzní kultury mají ve srovnání s kulturami kalusovými pro selekci *in vitro* nesporné výhody – např. vyšší počet buněk vystavených selekci, možnost získat větší počet regenerovaných rostlin apod. Vysocembryogenní buněčnou suspenzi vojtěšky použili pro selekce na rezistenci Binarová et al. (1990). Po ovlivnění filtrátem *Fusarium oxysporum* bylo získáno 52 buněčných linií se stabilní rezistencí, z nichž bylo regenerováno více než 500 jedinců. U 167 z nich byla prokázána vyšší rezistence ve srovnání s kontrolními regeneranty.

Metody izolace, kultivace a uchovávání patogenů

Metody popsané v této kapitole platí s malými odchylkami pro většinu druhů rodu *Fusarium*. Čisté, přesně determinované kultury hub lze získat ze sbírek čistých kultur (např. CCM Brno, Sběrka mikroorganismů při UK Praha apod.) nebo vlastní izolací z napadených rostlin. Pro izolace se odebírají segmenty poškozených pletiv, které se po povrchové dezinfekci (etanol) a omytí sterilní destilovanou vodou ukládají na živný agar (bramborovo-sacharózový agar – PSA, Bilajovo živné médium a 2 % sacharózy – BA). Segmenty pletiv odebíráme z vnitřních částí kořenů, abychom se vyhnuli

li zkraslení izolací houbovou mikroflórou korových a svrchních podkorových pletiv. Kultivace segmentů na agarových plotnách probíhá v termostatu při teplotě 25 ± 1 °C. Kolonie hub se v počátečních fázích růstu přenášejí na čerstvou živnou půdu až do vyčištění kultury. Determinace izolátů podle charakteristických znaků (rychlost růstu, charakter a barva mycelia, tvorba a velikost mikro- a makrokonidií a chlamydospor, barva reverzu atd.) lze provádět z monosporických izolací podle monografií (Booth, 1971; Bilaj, 1977; Nelson et al., 1983; Nirenberg, 1989).

Uchování patogenních mikroorganismů

Nejvýhodnější metodou uchování izolátů, při které většinou nedochází ke změnám patogenity, je lyofilizace nebo uchování v pískovém substrátu v chladničce při teplotě 4–5 °C. Příprava pískového substrátu: Malé zkumavky naplnit z 1/4 směsí písek, perlit (1 : 1) a vysterilizovat. Do sterilní směsi nakapat sterilní pipetou 0,3–0,5 ml sporové suspenze daného izolátu, uzavřít vatovou zátkou a nechat při laboratorní teplotě asi týden vysušit. Takto připravené kultury uchovávat v chladničce. Při následném použití vysypat pískovou směs na agarovou plotnu a dále postupovat běžným způsobem. Další možností je uchovávat kultury na šikmých agarrech ve zkumavkách při teplotě 5 °C. U tohoto způsobu je vždy po půl roce nutné přeočkování na čerstvou půdu. Nejméně výhodné je uchovávání přímo v laboratoři, které vyžaduje časté přeočkování a je zde nebezpečí rychlé ztráty virulence.

Příprava sporových suspenzí

Pro přípravu sporových suspenzí (inokula) se používají 7 až 10 dní staré kultury. Inokulum se připravuje seškrábnutím narostlé kultury skalpelem do sterilní vody. Po důkladném promíchání se roztok přefiltruje přes monofil. Hustota spor v suspenzi se zjišťuje v Bürkerově počítací komůrce, pro inokulaci se upraví ředěním na 5.10⁶ spor.ml⁻¹. Sporové suspenze se připravují pro každý druh zvlášť, směsí potom spojením příslušných objemů jednotlivých suspenzí. Veškeré práce spojené s přípravou inokula je nutné provádět asepticky.

Příprava kultivačních filtrátů

Kultivační médium podle Bilajové (Bilaj, 1974) s 2 % sacharózy se inokuluje sporovou suspenzí daného houbového izolátu (20 ml suspenze o titru 5.10⁶ spor.ml⁻¹ na 100 ml média). Po čtyřtydenní stacionární kultivaci v termostatu při teplotě 24 ± 2 °C je mycelium s konidiemi odstředěno a supernatant filtrován přes bakteriologický filtr (velikost pórů 0,2 μm).

Biostat fytoxicity filtrátů

K biostatům jsou užívány pětitydenní rostliny druhů, u kterých chceme selektovat na rezistenci. Rostliny

jsou předpěstovány ve skleníku. Po vyjmutí rostlin ze substrátu a omytí kořenů jsou rostliny umístěny v roztočce filtrátu (10 rostlin ve 30 ml filtrátu). Biotest se hodnotí průběžně, konečné hodnocení se provede po 7 dnech. Hodnotí se hmotnost testovaných rostlin a změna habitu podle pětibodové stupnice:

- 1 – zelené listy
- 2 – chlorotické listy
- 3 – listová nekróza s chlorózou nebo bez ní a listy stočené na méně než 50 % rostlin
- 4 – listové nekrózy a stočení listů na více než 50 % rostlin
- 5 – 100 % uvadlých rostlin

Výsledkem tohoto hodnocení je průměrný stupeň poškození (PSP).

Odvození buněčné suspenzní kultury

Pro selekce se užívají vysoce embryogenní buněčné suspenze, např. *Medicago sativa* L. $2n = 4x = 32$ (označená G13/K5). Detaily o odvození a udržování i růstové charakteristiky jsou uvedeny v pracích autorů Binarová, Novák (1985) a Binarová, Doležel (1988). Metoda odvození suspenzních kultur u rodu *Trifolium* je shrnuta v pracích autorek Bartošová, Nedbálková (1995) a Bartošová, Řepková (1996). Při praktické aplikaci je perspektivní využití selektovaného embryogenního materiálu hospodářsky významných odrůd.

Selekce in vitro

Buněčná suspenze nacházející se v exponenciální fázi růstu o hustotě asi $2-10 \cdot 10^4$ živých buněk ml^{-1} je vysévána na Petriho misky. Užívá se metoda rozlivu podle autora Hughes (1984) s použitím média BL pro vojtešku (Blaydes, 1966) s $5 \mu\text{M}$ 2,4 D a $1 \mu\text{M}$ KIN a pro jetel média L2 s $4,6 \mu\text{M}$ 2,4D, $4,4 \mu\text{M}$ KIN a $0,4 \mu\text{M}$ PIC. Filtráty užívané k selekcím jsou před přidáním do média sterilizovány filtrací přes bakteriologický filtr.

Inhibiční vliv filtrátů na dělení buněk a růst buněčných kolonií je vyjádřen údajem RPE (relativní efektivnost výsevu). Výchozí hodnotou je PE (efektivnost výsevu) dosahovaná na půdě kontrolní, která je vypočtena obvyklým způsobem.

$$PE = \frac{\text{počet kolonií}}{\text{počet vysetých jednotek}} \cdot 100$$

Životnost buněk před výsevem je zjišťována barvením fluorescein diacetátem (Widholm, 1974). RPE pak vyjadřuje snížení PE v procentech na půdách s filtráty. Počet kolonií na půdách kontrolních i selekčních byl zjišťován po třech týdnech. Toxická koncentrace užívaná k selekcím musí být vždy pro nový filtrát stanovena jako koncentrace redukující růst buněčných kolonií 500–1 000krát (tj. RPE = 0,1–0,2 %). Pro jednotlivé filtráty se v našich experimentech tato toxická koncentrace pohybovala od 5 do 20 %.

Po třech týdnech kultivace na selekčních půdách jsou rezistentní buněčné linie přenášeny na standardní BL médium a zde kultivovány dva až tři měsíce. Po této době je část kalusu znovu umístěna na médium s toxiny ke zjištění stability znaku rezistence, což je ověřováno jako přírůstek čerstvé hmoty zjišťovaný po třech týdnech kultivace. Další část kalusu je přenesena na médium BL bez růstových regulátorů, kde dochází k diferenciaci somatických embryí. Rostliny jsou postupně převáděny do půdy. U některých rostlin může být zjišťován v kořenových špičkách počet chromozomů, a to barvením karbol-fuchsinem (Carr, Walker, 1961).

U regenerovaných rostlin odvozených z rezistentních a kontrolních buněčných linií musí být testována jejich náchylnost k použitým izolátům *Fusarium* spp. Rostliny jsou před inokulací vyjmuty z půdy, po omytí kořenů destilovanou vodou jsou seříznuty kořenové špičky a rostliny jsou ponořeny na 24 hodin do inokula. Poté jsou individuálně přesazeny do tepelně sterilizovaného substrátu. Kultivace rostlin probíhá ve skleníku při teplotách 22–30 °C. Kritériem hodnocení je počet rostlin rostoucích i po infekci a zdravotní stav kořenového systému 8 týdnů po inokulaci. Rostliny s rezistentní reakcí mohou být vegetativně namnoženy a sledovány v polních podmínkách.

LITERATURA

- ARCIONI, S. – PEZZOTTI, M. – DAMIANI, F. (1987): *In vitro* selection of alfalfa plants resistant to *Fusarium oxysporum* f. sp. *medicaginis*. Theor. appl. Genet., 74: 700–705.
- BAJAJ, Y. P. S. – SAETLER, A. W. (1970): Effect of halo toxin-containing filtrates of *Pseudomonas phaseolicola* on the growth of bean callus tissue. Phytopathology, 60: 1065–1067.
- BARTOŠOVÁ, L. – NEDBÁLKOVÁ, B. (1995): Tvorba buněčných suspenzních kultur a následná embryogeneze u rodu *Trifolium*. Sbor. věd. Prací VÚP Troubsko, 13: 9–20.
- BARTOŠOVÁ, L. – ŘEPKOVÁ, J. (1996): Evaluation of suspension culture technique in genus *Trifolium*. Sbor. věd. Prací VÚP Troubsko, 14: 39–44.
- BATA, A. et al. (1983): Simultaneous detection of some fusariotoxins by gas-liquid chromatography. J. Assoc. Off. Anal. Chem., 66: 577.
- BEHNKE, M. (1979): Selection of potato callus for resistance to culture filtrates of *Phytophthora infestans* and regeneration of resistant plants. Theor. appl. Genet., 55: 69–71.
- BEHNKE, M. (1980a): General resistance to late blight of *Solanum tuberosum* plants regenerated from callus resistant to culture filtrates of *Phytophthora infestans*. Theor. appl. Genet., 56: 151–152.
- BEHNKE, M. (1980b): Selection of dihaploid potato callus for resistance to the culture filtrate of *Fusarium oxysporum*. Z. Pflanzenzüchtung, 85: 254–258.
- BILAJ, V. I. (1974): Fusarii. Kijev. 442 s.
- BINAROVÁ, P. – NOVÁK, F. J. (1985): A study on embryogenesis in two different types of cell culture of *Medicago sativa*. Acta Univ. Agric. Brno, XXXII (3): 294–297.

- BINAROVÁ, P. – DOLEŽEL, J. (1988): Alfalfa embryogenic cell suspension culture: growth and ploidy level stability. *J. Plant Physiol.*, 133: 561–566.
- BINAROVÁ, P. – NEDĚLNÍK, J. – FELLNER, M. – NE-DBÁLKOVÁ, B. (1990): Selection for resistance to filtrates of *Fusarium* spp. in embryogenic cell suspension culture of *Medicago sativa* L. *Pl. Cell, Tissue and Organ Cult.*, 22: 191–196.
- BLAYDES, J. F. (1996): Interaction of kinetin and various inhibitors of the growth of soybean tissue. *Physiol. Plant.*, 19: 748–753.
- BOOTH, C. (1971): The Genus *Fusarium*. Kew, England, CMI.
- BOTTA, G. L. – DIMARCO, M. P. – MELEGARI, A. L. – HUARTE, M. A. – BARASSI, C. A. (1994): Potential of a *Fusarium eumartii* culture filtrate on the screening for wilting resistance in potato. *Euphytica*, 80: 63–69.
- BRUINS, M. B. M. – KARSAI, I. – SCHEPERS, J. – SNIJDERS, C. H. A. (1993): Phytotoxicity of deoxynivalenol to wheat tissue with regard to *in vitro* selection for *Fusarium* head blight resistance. *Plant Sci.*, 94: 195–206.
- BULK, R. W. van den (1991): Application of cell and tissue culture *in vitro* selection for disease breeding – a review. *Euphytica*, 56: 269–285.
- CARR, D. H. – WALKER, J. E. (1961): Carbol fuchsin as a strain for human chromosomes. *Stain Technol.*, 36: 233–236.
- CARLSON, P. S. (1973): Methionine sulfoximine resistant mutants of tobacco. *Science*, 180: 1366–1368.
- DURBIN, R. D. (1981): Toxins in plant disease. New York, Academic Press. 515 s.
- FLOR, H. H. (1956): The complementary genic systems in flax and flax rust. *Adv. Genet.*, 8: 29–54.
- FRAME, B. et al. (1991): *In vitro* selection for resistance to verticillium wilt in alfalfa (*Medicago sativa* L.) using a fungal culture filtrate. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 39: 325–340.
- FRÍČ, F. (1987): Biochemické pristupy pri štúdiu vzťahu hostiteľ – patogén. In: Sbor. Využití fytopatologických metod ve šlechtění zelenin a rezistenci k chorobám a škůdcům, Olomouc: 98–113.
- GENGENBACH, B. G. – GREEN, C. E. (1975): Selection of T. cytoplasm maize callus cultures resistant to *Helminthosporium maydis* race T. pathotoxins. *Crop Sci.*, 15: 645–649.
- GENGENBACH, B. G. et al. (1977): Inheritance of selected pathotoxin resistance in maize plants regenerated from cell cultures. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 74: 5113–5117.
- HARTMAN, C. L. – MCCOY, T. J. – KNOWS, T. R. (1984): Selection of alfalfa (*Medicago sativa* L.) cell lines and regeneration of plants resistant to the toxins produced by *Fusarium oxysporum* f. sp. *medicaginis*. *Plant Sci. Letters*, 34: 183–194.
- HARTMAN-MITCHELL, C. – KNOWS, T. R. – MCCOY, T. J. (1983): Toxic components produced by *Fusarium oxysporum* f. sp. *medicaginis* and their use in alfalfa cell culture selection techniques. *Phytopathology*, 73: 829.
- HIJANO, E. H. – BARNES, D. K. – FROSHEISER, F. I. (1983): Inheritance of resistance to *Fusarium* wilt in alfalfa. *Crop Sci.*, 23: 31–34.
- HUGHES, K. (1984): Selection for herbicide resistance. In: EVANS, D. J. – SHARP, W. R. – AMIRATO, P. V. – YAMADA, Y. (eds): Handbook of plant cell culture. Vol. 1, New York, Mac Millan Publ. Co., 441–459.
- CHAWLA, H. S. – WENZEL, G. (1987): *In vitro* selection of barley and wheat for resistance against *Helminthosporium sativum*. *TAG*, 74: 841–846.
- CHAWLA, H. S. – WENZEL, G. (1987): *In vitro* selection for fusaric acid resistant barley plants. *Plant Breeding*, 99: 159–163.
- ISHIDA, Y. – KUMASHIRO, T. (1988): Expression of tolerance to the host-specific toxin of *Alternaria alternata* (AT toxin) in cultured cells and isolated protoplasts of tobacco. *Plant Disease*, 72: 892–895.
- JIN, H. et al. (1996): Regeneration of soybean plants from embryogenic suspension cultures treated with toxic culture filtrate of *Fusarium solani* and screening of regenerants for resistance. *Phytopathology*, 86: 714–718.
- KRÄMER, R. (1986): Darstellung und Teilcharakterisierung des Toxins von *Corynebacterium michiganense* pv. *michiganense* (Smith) Jensen. *Zentralbl. Mikrobiol.*, 141: 327–335.
- LARKIN, P. J. et al. (1983): Somaclonal variation and eyespot toxin tolerance in sugar cane. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 2: 111–122.
- LING, D. H. et al. (1985): *In vitro* screening of rice germplasm for resistance to brown spot disease using phytotoxin. *Theor. appl. Genet.*, 71: 133–135.
- LATUNDE-DADA, A. O. – LUCAS, J. A. (1983): Somaclonal variation and reaction to Verticillium wilt in *Medicago sativa* L. plants regenerated from protoplast. *Plant Sci. Letters*, 32: 205–211.
- MATERN, E. et al. (1978): Reaction to phytotoxins in a potato population derived from mesophyll protoplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75: 4935–4939.
- MICHALÍKOVÁ, A. (1988): Toxické mikromycety a hostitelské rostliny. Houba proti houbě. *Slovensko*, III: 15–16.
- MIROCHA, T. J. – CHRISTENSEN, T. M. (1986): Mycotoxins and the fungi that produce them. *Proc. of Amer. Phytopathol. Soc.*, 3: 110–125.
- NEDĚLNÍK, J. (1987): Toxinogenní vlastnosti *Fusarium* spp., jejich detekce a možnosti využití. *Sbor. ÚVTIZ – Ochr. Rostl.*, 23: 229–230.
- NELSON et al. (1983): *Fusarium* species: An Illustrated Manual for Identification. The Pennsylvania St. Univ.
- NIRENBERG (1989): Identification of fusaria occurring in Europe on cereals and potatoes. In: CHELKOWSKI (ed.): *Fusarium: Mycotoxins, Taxonomy and Pathogenicity*. Amsterdam, Elsevier Sc. Publ. BV. PLATTNER, R. D. – BENNETT, G. A. (1983): Rapid detection of *Fusarium* mycotoxins in grains by quadrupole mass spectrometry/mass spectrometry. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 66: 1470–1477.
- RINES, H. W. – LUKE, H. H. (1985): Selection and regeneration of toxin-intensive plants from tissue cultures of oats (*Avena sativa*) susceptible to *Helminthosporium victoriae*. *Theor. Appl. Genet.*, 71: 16–21.
- SACRISTAN, M. D. (1982): Resistance responses to *Phoma lingam* of plants regenerated from selected cell and embryonic cultures of haploid *Brassica napus*. *Theor. appl. Genet.*, 61: 193–200.

- SCHEFFER, R. P. (1983): Toxins as chemical determinants of plant disease. In: DALY, M. – DEVERALL, B. J. (eds). New York, Academic Press: 1–40.
- SCHUCHMANN, R. (1985): Methode zur relativen Konzentrationsbestimmung von *Fusarium* Toxinen durch Messung der Respirationsrate. Nachr.-Bl. Dtsch. Pfl. Schutzdienst, 37: 81–84.
- SONG, H. S. – LIM, S. M. – WIDHOLM, J. M. (1994): Selection and regeneration of soybeans resistant to the pathotoxic culture filtrates of *Septoria glycines*. Phytopathol., 84: 948–951.
- TATSUNO, T. et al. (1973): Chemical and biological detection of 12, 13-epoxytrichothecenes isolated from *Fusarium* species. Pure appl. Chem., 35: 308–313.
- THANUTONG, P. et al. (1983): Resistant tobacco plants from protoplast-derived calluses selected for their resistance to *Pseudomonas* and *Alternaria* toxins. Theor. appl. Genet., 66: 209–215.
- WENZEL, G. (1985): Strategies in unconventional breeding for disease resistance. Ann. Rec. Phytopathol., 23: 149–172.
- WIDHOLM (1972): The use of fluorescein diacetate and phenosafranine for determining viability of cultured plant cells. Stain Technol., 47: 189–195.

Došlo 5. 12. 1997

Kontaktní adresa:

RNDr. Jan Nedělník, Výzkumný ústav pícninářský, spol. s r. o., Troubsko, 664 41 Troubsko, Česká republika, tel.: 05/47 22 73 80-4, fax: 05/47 22 73 85, e-mail: vupt@brno.ics.muni.cz

NOVÉ ODRŮDY – NEW VARIETIES

Jarní ječmen Tolar

Povoleno: Česká republika 1997

Slovenská republika 1997

Šlechtitelská práva: PLANT SELECT, s. r. o., Hrubčice

Šlechtitel a udržovatel: PLANT SELECT, s. r. o., Hrubčice

Rodokmen: HE 4710 x HWS 78267/83

Metoda šlechtění: Křížení bylo provedeno v únoru 1988 ve skleníku. F₁ a F₂ generace byly dopěstovány v tomtéž roce ve vegetační hale. Individuální výběr rostlin z původní populace byl proveden v generaci F₃ v polních podmínkách. F₄ potomstva rostlin byla vyseta v příštím roce na parcelkách o velikosti 1 m². Základem odrůdy Tolar se stalo potomstvo rostliny označené 2.1. V generaci F₅–F₆ byly založeny výnosové zkoušky v 1–4 opakováních na 1–3 lokalitách. Od generace F₅ bylo prováděno testování na odolnost proti padlí travnímu (*Erysiphe graminis*), rzi ječné (*Puccinia hordei*) a hnědé skvrnitosti (*Helminthosporium teres*) v provokačních testech (fytoskolka) v polních podmínkách na dvou lokalitách. Odolnost proti padlí byla testována i v mimovegetačním období ve skleníku. Od této generace probíhalo rovněž testování na sladovnickou jakost. V generaci F₆ byla vyseta výběrová parcela linie 2.1., a založeno tak udržovací šlechtění odrůdy. V roce 1993 v generaci F₇ byl zařazen do mezistančních předzkoušek. Do prvního roku státních zkoušek byl přihlášen v roce 1994 a po třiletém ověřování v SOP povolen pod názvem Tolar.

Odolnost k chorobám: Tolar nemá gen specifické odolnosti k padlí travnímu, polní odolnost vůči této chorobě vykazuje na střední úrovni. Má dobrou až velmi dobrou odolnost ke rzi ječné. Vysokou rezistenci pak vykazuje proti listovým skvrnitostem (*Pyrenophora teres* a *Rhynchosporium secalis*).

Sladovnická jakost: Slad vyrobený ze zrna odrůdy Tolar se vyznačuje příznivým obsahem extraktu a silnou aktivitou proteolytických enzymů. Aktivita β amylázy je na vynikající úrovni, také dosažitelný stupeň prokvašení vykazuje výborné hodnoty. Relativní extrakt dosahuje průměrných hodnot. Vynikající cytologické rozluštění je prováděno příznivě nízkým obsahem β glukanu ve sladině. Vzhledem k dosaženým hodnotám technologických znaků byl Tolar zařazen do skupiny výběrových odrůd.

Výnos zrna: Nadprůměrných výnosů zrna dosahuje Tolar v oblasti řepařské, bramborářské a horské. V suchých podmínkách výrobního typu kukuřičného jsou výnosy zrna průměrné.

Ostatní vlastnosti: Tolar je poloraná odrůda diamantového typu se střední až dobrou odolností vůči poléhání. Plucha je jemně vráščitá, slámově žluté barvy. Specifické požadavky na agrotechniku nemá.

Spring barley Tolar

Certification: Czech Republic 1997

Slovak Republic 1997

Breeding rights: PLANT SELECT, s. r. o., Hrubčice

Breeder and maintainer: PLANT SELECT, s. r. o., Hrubčice

Pedigree: HE 4710 x HWS 78267/83, in official trials as

Breeding procedure: Crossing in a greenhouse in February 1988. F₁ and F₂ generations were grown in the same year in a vegetation hall. Individual selection of plants from original population took place in F₃ generation under field conditions. F₄ progenies of these plants were sown to plots 1 m² in size next year. Progeny of plant 2.1 constituted Tolar variety. Yield tests were established in F₅ and F₆ generations at 1 and 3 localities with 1 and 4 replications, resp. Resistance to powdery mildew (*Erysiphe graminis*), brown rust of barley (*Puccinia hordei*) and net blotch of barley (*Helminthosporium teres*) was tested since F₅ generation in field provocation tests where the crop is frequently grown at two localities. Resistance to powdery mildew was also proved in a greenhouse provocative test with prevailing races in out-of-season period. Tests of malting quality started in the same generation. A selection plot with line 2.1 was sown in F₆ generation: this line established maintenance breeding of the variety concerned. It was included in preliminary station test in F₇ generation in 1993, in the first year of official test in 1994, and it was certified by Official Variety Trials after three-year test under the name Tolar.

Resistance to diseases: Tolar does not have any gene of specific resistance to powdery mildew, field resistance to this disease is at an intermediate level. It has good to very good resistance to brown rust of barley. Its resistance to leaf blotches (*Pyrenophora teres* and *Rhynchosporium secalis*) is high.

Malting quality: Malt made of Tolar variety grains has a sufficiently high extract content and high activity of proteolytic enzymes. Beta-amylase activity is at an excellent level, attenuation also attains very good values. Relative extract has average values. Excellent cytological modification is accompanied by a favorably low content of beta-glucans in brewer's worth. Tolar was classified into the group of choice varieties by the values of technological traits (index of malting quality is 7, the standard varieties Akcent 6, Rubin 6).

Grain yield: Tolar produces above-average grain yields (in average of locations by 3.9%), in particular in low- and highland areas by 5.7 and 6.8%, respectively in comparison to the standard varieties (Akcent, Novum, Orbit). Grain yields are at an average level in arid conditions.

Other characteristics: Tolar is a semi-early variety of „Diamant“ type with intermediate to good lodging resistance. Tillering is good. Grain is of medium size, yield of large grains is high. Palea is finely wrinkled, straw yellow in color. No specific cultural treatments are required.

Ing. Petr Svachina

PLANT SELECT, s. r. o., Hrubčice, 798 21 Bedihošť

Tel.: 00 420 508/368 446, fax: 00 420 508/368 282

Jarní ječmen Heris

Povolen v ČR: 1998

Šlechtitelská práva: PLANT SELECT, s. r. o., Hrubčice

Šlechtitel a udržovatel: PLANT SELECT, s. r. o., Hrubčice

Rodokmen: HE 4436 x CE 431

Metoda šlechtění: Křížení bylo provedeno v červnu 1989 v polních podmínkách. Generace F₁–F₃ byly dopěstovány v mimovegetačním období 1989–1990 ve vegetační hale, kde byl v generaci F₃ proveden i individuální výběr rostlin. F₄ potomstva rostlin byla vyseta na parcelkách cca 1 m². V této generaci byla provedena reselektace – individuální výběry rostlin v polních podmínkách. Základem odrůdy Heris se stalo potomstvo 3.7 (z rostliny 2.8). V generaci F₆–F₇ byly založeny výnosové zkoušky v 1–4 opakováních na 1–3 lokalitách. Od generace F₆ bylo provedeno testování na odolnost proti padlí travnímu (*Erysiphe graminis*), rzi ječné (*Puccinia hordei*) a hnědé skvrnitosti (*Helminthosporium teres*) ve fytoškolce v polních podmínkách na dvou lokalitách. Odolnost na padlí byla testována také v mimovegetačním období ve skleníku. Od této generace se rovněž datuje testování na sladovnickou kvalitu. V generaci F₇ byla vyseta výběrová parcela linie 3.7, která dala základ udržovacímu šlechtění odrůdy. V roce 1994 byl ječmen zařazen do mezistaničních předzkoušek, do prvního roku registračních zkoušek zařazen v roce 1995 a po třiletém ověřování povolen pod názvem Heris.

Odolnost k chorobám: Jarní ječmen Heris je v současné době nejzdravější odrůdou v sortimentu jarních ječmenů. Vykazuje absolutní odolnost k padlí travnímu (gen *Mlo*), vysoká je rovněž odolnost vůči rzi ječné, která je kontrolována genem *Pa7*. Velmi dobrou úroveň rezistence vykazuje pak i na listové skvrnitosti (*Pyrenophora teres* a *Rhynchosporium secalis*). Heris se vyznačuje také dobrou odolností proti viru žluté skvrnitosti ječmene (*BYDV*) (Vacke et al., 1997 – Genet. a Šlecht., 33, 1997: 33–44).

Kvalitativní ukazatele: V hodnocení sladovnické kvality dosáhl Heris 3,3 bodů USJ. Ažkoliv v žádném z 8 sledovaných znaků neměl hodnocení 1, pro sladovnický průmysl představuje pouze doplňkovou odrůdu. Pro nadprůměrné výnosy, ale zejména pak pro vynikající zdravotní stav, který při absenci aplikace fungicidů podstatně zlevní jeho pěstování, obohatí Heris sortiment odrůd jarních ječmenů určených k výrobě zrna ke krmeným účelům.

Výnos zrna: Během třiletého zkoušení v registračních zkouškách Státních odrůdových pokusů prokázal Heris nadprůměrné výnosové výsledky ve všech výrobních oblastech ČR, nejvyšších výnosů dosáhl pak v suchých podmínkách VTK.

Ostatní vlastnosti: Poloraná odrůda diamantového typu s dobrou odolností vůči poléhání a lámání stébla po přezrání. Komplexně vysoká úroveň odolnosti vůči listovým chorobám. Zrno je velké s vysokou HTS, podíl zrna nad sítím 2,5 mm je velmi dobrý. Specifické požadavky na agrotechniku nemá.

Spring barley Heris

Certification in CR: 1998

Breeding rights: PLANT SELECT, s. r. o., Hrubčice

Breeder and maintainer: PLANT SELECT, s. r. o., Hrubčice

Pedigree: HE 4435 x CR 431

Breeding procedure: Crossing in field conditions in June 1989. F₁–F₃ generations were grown in out. season period 1989–1990 in a vegetation hall, where individual plant selection in F₃ generation took place. F₄ progenies of these plants were sown to plots ca. 1 m². Reselections – individual plant selections under field conditions took place in this generation. Progeny 3.7 (of plant 2.8) constituted Heris variety. Yield tests were established in F₆ and F₇ generations at 1 and 3 localities with 1 and 4 replications, resp. Resistance to powdery mildew (*Erysiphe graminis*), brown rust of barley (*Puccinia hordei*) and net blotch of barley (*Helminthosporium teres*) was tested since F₆ generation in a field nursery at two localities where

the crop is frequently grown. Resistance to powdery mildew was also proved in a greenhouse provocative tests with prevailing races in out-of-season period. Tests of malting quality started in the same generation. A selection plot with line 3.7 was sown in F₇ generation: this line established maintenance breeding of the variety concerned. It was included in preliminary station test in 1994, in the first year of official tests in 1995, and it was certified after three-year tests under the name Heris.

Resistance to diseases: Spring barley Heris is currently the healthiest variety in a spring barley collection. It has high resistance to powdery mildew due to *Mlo* gene, its resistance to brown rust of barley controlled by *Pa7* gene is also high. The resistance level to barley net blotch and leaf blotch (*Pyrenophora teres*) and *Rhynchosporium secalis* is also satisfactory. Heris exhibits high resistance to barley yellow dwarf virus (BYDV) (V a c k e et al., 1997 – Genet. a Šlecht., 33, 1997: 33–44).

Qualitative characteristics: Malting quality is under-averaged, characterized by malting index 3.3 (9 the best quality), even if the content of glucans is low. Although none of the eight traits composing malting index received the value 1, it seems to be only an additional variety for the malting industry. Heris will enrich the collection of spring barleys used for grain production for feeding purposes due to above-average yield, and especially due to its excellent disease resistance, which will make its production less expensive since no fungicides need to be applied.

Grain yield: Heris produced above-average yields in all production areas of Czech Republic during three-year testing within certification tests of official trials (in average by 4.3%), the highest yields were achieved under arid conditions of the country (precipitations about 500–550 mm/year), where the yield was higher by 7.1% in comparison to the average of the five standard varieties (Akcent, Forum, Novum, Orbit, Pax).

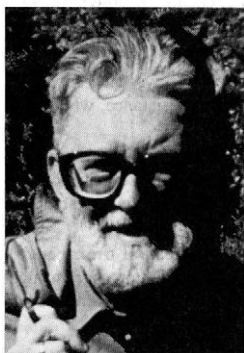
Other characteristics: Semi-early variety of „Diamant“ type, good resistance to lodging and stem break at overripeness. High level of resistance to leaf diseases (*Erysiphe*, *Puccinia*, *Pyrenophora*, *Rhynchosporium*) in general. Large grain high 1 000-seed weight, grain proportion above 2.5 mm mesh sieve is very satisfactory (88%). No specific cultural treatments are required.

Ing. Petr Svačina

PLANT SELECT, s. r. o., Hrubčice, 798 21 Bedihošť

Tel.: 00 420 508/368 446, fax: 00 420 508/368 282

Za docentem RNDr. Janem Nečáskem, CSc.



Dne 29. března letošního roku odešel náhle, ve věku 73 let, významný český genetik doc. RNDr. Jan Nečas, CSc. Žák a pokračovatel profesora Karla Hrubého promoval na doktora přírodních věd v roce 1948 na Přírodovědecké fakultě Univerzity Karlovy v Praze. Po krátkém působení jako univerzitní asistent odešel do Vý-

zkumného ústavu antibiotik v Roztokách u Prahy, kde se brzy stal vedoucím oddělení mikrobiologie a zabýval se genetickými studiemi a šlechtěním kmenů hub a mikroorganismů s ohledem na produkci antibiotik. Podílel se spoluautorstvím na monografii Antibiotika (Praha, ČSAV 1957). V roce 1961 se vrátil zpět na Přírodovědeckou fakultu UK do oddělení genetiky, aby se v roce 1966 habilitoval a stal se docentem obecné a mikrobiální genetiky a zároveň i vedoucím katedry genetiky, mikrobiologie a biofyziky. Experimentálně pracoval s houbou *Coprinus cinereus* – mutace a s *Corynebacterium* – genetická příprava kmenů pro průmyslovou výrobu l-lyzinu. Po návratu ze stáže na Harvardově univerzitě se věnoval studiu dědičnosti (mutace, kvantitativní buněčná genetiky) u houby *Schizophyllum commune*.

Šedesátá léta byla obdobím velkého rozmachu mutační a mikrobiální genetiky, jichž byl zesnulý předním představitelem u nás. Experimentální výsledky obou disciplín odstartovaly éru molekulární genetiky. V té

době byl již Dr. Nečas v Ústavu experimentální botaniky ČSAV (později Ústav molekulární biologie rostlin AV ČR) v Českých Budějovicích. Stal se vedoucím oddělení, které se zabývalo transformací rostlin pomocí plazmidových vektorů. Se svými spolupracovníky sledoval transformaci pomocí T-DNA u řepky olejné a rajčete. Po svém odchodu na odpočinek napsal středoškolskou učebnici genetiky a věnoval se úloze genetiky v evoluci (Nečas, Pavličíková, Jihočeská univerzita 1997).

Dr. Nečas publikoval přes 70 vědeckých prací a byl spoluautorem nebo autorem 10 knižních publikací. Z nich je bezesporu nejvýznamnější Obecná genetiky (Nečas, Cetyl a kol., Praha 1979). Přehled jeho publikací viz Czech Mycology, 49: 59, 1996. Nelze dost dobře popsat jeho rozsáhlou činnost pedagogickou a popularizační. Byl aktivním členem Čsl. mikrobiologické společnosti a České vědecké společnosti pro mykologii. Houby byly jeho velkou láskou, ke které se vždy znovu vracel. Byl zakladatelem České genetické společnosti J. G. Mendela a jejím dlouholetým předsedou. Nelze nevzpomenout ani jeho styk se šlechtiteli. Jeho zásluhy o rozvoj české genetické vědy byly oceněny udělením zlaté medaile J. G. Mendela Československou akademií věd, pamětní medailí J. G. Mendela Moravským muzeem a zlatou medailí Přírodovědecké fakulty UK. Pokud bych měl charakterizovat jeho osobnost, pak to byla především píle a nezměrná pracovitost, která mu umožňovala stavět se k vědeckým problémům genetiky, ale i biologie vždy erudovaně. Za všechnu jeho práci, kterou na poli vědy udělal, věnujme zesnulému svoji vzpomínku a zachovejme ho v paměti. Plně si to zaslouží.

RNDr. Karel Pešina, CSc.

CHARACTERISTICS OF WINTER WHEAT VARIETIES AND LINES CARRYING 'NORIN 10' DWARFING GENES*

CHARAKTERISTIKA ODRŮD A LINIÍ OZIMÉ PŠENICE NESOUCÍCH GENY ZAKRSLOSTI Z 'NORIN 10'

V. Šíp¹, J. Chrpová¹, M. Škorpík¹, L. Bobková²

¹Research Institute of Crop Production, Prague-Ruzyně, Czech Republic

²SELGEN, a.s., Breeding Station Úhřetice, Czech Republic

ABSTRACT: Out of 36 winter wheat varieties registered in the Czech Republic in 1997 the varieties Vlada, Ilona, Astella, Šárka, Versailles, Ritmo and Athlet showed insensitivity to applied gibberellic acid (GA₃), which indicates the presence of 'Norin 10' dwarfing (*Rht*) gene. By hybridological analyses in F₂ generation the presence of gene *Rht1* was detected in the varieties Vlada, Ilona and Astella, and the presence of gene *Rht2* in the varieties Šárka, Versailles, Ritmo, Athlet and in the advanced breeding line RU488. Two high yielding new Czech varieties Šárka and RU488 were developed after selection for taller GA insensitive plants. The results from analyses of hybrid material and registered varieties that carry Norin 10 *Rht* genes showed the importance of differentiation between "*Rht1*" and "*Rht2*" materials. Under conditions of Central Europe it is more likely to get very high yielding ("intensive") medium – late genotypes by selecting for *Rht2* gene, while early, good breadmaking quality genotypes result from selection for *Rht1* gene. The identification of *Rht* gene in parental varieties and the choice of promising crosses segregating for particular *Rht* gene are important prerequisites of success, especially in breeding programmes that include selection of GA insensitive plants.

winter wheat; GA response; identification of *Rht* genes; characteristics of *Rht1* and *Rht2* genotypes

ABSTRAKT: V sortimentu 36 odrůd ozimé pšenice z Listiny povolených odrůd 1997 byla přítomnost genu zakrslosti (*Rht*) a necitlivosti na aplikovaný giberelin (GA₃) zjištěna u odrůd Vlada, Ilona, Astella, Šárka, Versailles, Ritmo a Athlet. Na základě hybridologických analýz v generaci F₂ byl u odrůd Vlada, Ilona a Astella detekován gen *Rht1* a u odrůd Šárka, Versailles, Ritmo, Athlet a linie RU488 gen *Rht2*. Výsledkem orientace šlechtitelského výběru na delší typy ("tall dwarfs") s *Rht* geny, projevujícími se necitlivostí na aplikovaný giberelin, je vyšlechtění vysoce výnosných odrůd ozimé pšenice Šárka a RU488. Výsledky analýzy hybridního materiálu a moderních odrůd s *Rht* geny, které pocházejí z odrůdy Norin 10, ukázaly rozdíly ve vlastnostech materiálů nesoucích geny *Rht1* a *Rht2*. Ve sledovaných podmínkách je mnohem pravděpodobnější získat vysoce výnosné, intenzivní, středně rané až pozdnější odrůdy při výběru na přítomnost genu *Rht2* a ranější odrůdy, s dobrou pekařskou kvalitou při výběru na přítomnost genu *Rht1*. Identifikace *Rht* genu u rodičovských odrůd a zaměření na vhodné kombinace křížení je významným předpokladem k dosažení šlechtitelského úspěchu, a to zvláště v programech, jejichž součástí je výběr na přítomnost *Rht* genů pocházejících z odrůdy Norin 10.

ozimá pšenice; reakce na GA₃; identifikace *Rht* genů; charakteristika genotypů s *Rht1* a *Rht2*

INTRODUCTION

The Norin 10 dwarfing genes (*Rht1* and *Rht2*) that can be selected for by their insensitivity to applied gibberellic acid (GA), have been widely exploited in wheat breeding. A higher yielding ability of genotypes carrying these genes is only partly due to the effect on straw length and prevention of lodging. The results from analyses of random lines and isogenic lines suggest that *Rht1* and *Rht2* are associated with increased grain fertility which counteracts the negative effects on grain size observed with all *Rht* genes (Gale, Yous-

sefian, 1985). The *Rht1* and *Rht2* genes may cause about 1% protein reduction and reduction of test weight as a consequence of reduced grain size (Allan, Pritchett, 1980), but other aspects of breadmaking quality seem to be unaffected by these genes (Gale, Youssefian, 1985). It has not been clearly shown that *Rht1* and *Rht2* alleles have different pleiotropic effects on various characters. According to our previous studies (Bobková et al., 1988; Šíp et al., 1988), selection in the examined conditions of Czech Republic was advantageous for tall GA insensitive genotypes which had high ear productivity through in-

* The study was supported by the Ministry of Agriculture of the Czech Republic (Project of the National Agency for Agricultural Research No. EP 6413).

creased grain size, though grain number remaining at the level of shorter genotypes.

In the older GA insensitive Czech and Slovak winter and spring wheat varieties only gene *Rht1* was detected (Šíp et al., 1995a; Škorpík et al., 1995), but lately four winter wheat varieties that carry *Rht2* gene have been registered in the Czech Republic.

The purpose of this study was to identify GA insensitive *Rht* genes in the modern winter wheat varieties and characterize the material carrying genes *Rht1* and *Rht2*.

MATERIAL AND METHODS

The presence of *Rht* genes showing insensitivity to applied gibberellic acid (GA_3) in winter wheat varieties and lines was tested by means of a seedling GA response test (Gale, Gregory, 1977; Šíp et al., 1986). Out of 36 winter wheat varieties registered in the Czech Republic in 1997 seven showed insensitivity to GA_3 (Vlada, Ilona, Astella, Šárka, Versailles, Ritmo and Athlet). With aim to identify *Rht* gene, these varieties and the advanced breeding line RU488 (3rd year in the Official Trials) were crossed with the differentials for genes *Rht1* and *Rht2* (near-isogenic lines carrying genes *Rht1* and *Rht2* in the genetic background of the winter wheat variety Mironovskaya 808, the variety Siete Cerros – gene *Rht1* and Brigand – gene *Rht2*). The presence of gene *Rht1* in the variety Siete Cerros and gene *Rht2* in the variety Brigand was indicated by Gale et al. (1981). Siete Cerros and Brigand were also used as donors of genes *Rht1* and *Rht2* for near-isogenic lines in the variety Mironovskaya 808. *Rht* gene was in the tested varieties determined according to segregation pattern in F2 hybrid generation.

The modern above mentioned winter wheat varieties that carry Norin 10 genes were analyzed in the 1995–1997 Official Trials of Czech Republic for grain yield, yield components, plant height, heading date and breadmaking quality using standard methods of evaluation of field trials applied in the Institute for Supervising and Testing in Agriculture.

The analyzed hybrid material consisted of selected 67 GA insensitive F6 lines coming from the six winter wheat crosses (BR-1522/Contra, ST-467/Contra, UH-515/Contra, Contra/UH-555, Beaver/Ronos and UH-6192/Recital). According to the pedigree studies all the used GA insensitive parents are supposed to carry gene *Rht2* (Contra and Beaver – gene *Rht2* from the British varieties; Recital – gene *Rht2* from the Mexican variety CIANO). As these lines of the Breeding Station Úhřetice, SELGEN a.s., could only be designated as carriers of the gene *Rht2*, the properties of 49 doubled haploid GA insensitive lines from the cross Florida/Vlada (*Rht1*) were studied to make a comparison. In correlation studies the following characters were included: 1) Grain yield (from the plots of $3 \times 2.5 \text{ m}^2$ in "*Rht1*" material and $1 \times 7 \text{ m}^2$ in "*Rht2*"

material – expressed in t/ha), 2) Days to heading from the 1st of January (heading date was the estimate of 50% of emerged ears on a plot), 3) Plant height at maturity (cm), 4) 1000 grain weight (g), 5) Sodium dodecyl sulphate (SDS) sedimentation volume (ml), 6) Wet gluten content (%). Grain quality characters (5 and 6) were determined from the harvested seed using standard procedures of the Breeding Station Úhřetice, SELGEN, a.s.

RESULTS AND DISCUSSION

Identification of *Rht* genes in the GA insensitive winter wheat varieties tested in the Official Trials

It is clear from the results of hybridological analyses in F2 generation (Tab. I) that the varieties Vlada, Ilona and Astella carry gene *Rht1*. The presence of gene *Rht2* in these varieties was eliminated owing to segregation at the 15 : 1 ratio (with dominance for insensitivity to GA_3) after crossing with the "*Rht2* gene" differential varieties (lines). On the contrary, the varieties Šárka, RU488, Versailles, Ritmo and Athlet did not segregate when crossed with varieties (lines) carrying gene *Rht2*, but *Rht2* segregated with *Rht1*. Therefore these five varieties carry gene *Rht2*.

Results of the Official Trials with the GA insensitive winter wheat varieties are given in Tab. II. The new Czech varieties Šárka and RU488 were bred for the presence of *Rht2* within the "gibberellic programme", lasting for about 10 years (Škorpík et al., 1997), in which selection was oriented to "taller dwarfs" (Bobková et al., 1988; Šíp et al., 1988). Both varieties were very high yielding in the Official Trials and had on average a high thousand grain weight. The level of thousand grain weight in certain environments was not a deciding factor for reaching high yield (insignificant correlation between yield and grain weight). In contrast the other "*Rht2*" varieties: Ritmo, Versailles and Athlet showed significant environmental correlation coefficients between grain yield and grain weight (0.61^{**} , 0.46^* , 0.42^* , resp.). All the varieties that carry gene *Rht2* had higher yields and headed later than the "*Rht1* varieties" and their breadmaking quality was not high. In comparison with carriers of gene *Rht2* all the registered varieties with gene *Rht1* headed earlier (are better suited to warmer growing conditions of the maize growing region) and their breadmaking quality was higher. Also the other seven older varieties, in which gene *Rht1* was detected (Šíp et al., 1995b), were either early winter or spring wheats.

Differences in properties of the "*Rht1*" and "*Rht2*" hybrid material

The differences in properties of the two groups of GA insensitive varieties could also be explained on the basis of analyses of the "*Rht1*" and "*Rht2*" hybrid

I. GA₃ response in F₂ generation crosses between the tested variety and *Rht* gene differential (gene *Rht1*: Siete Cerros and/or near-isogenic line in the variety Mironovskaya 808; gene *Rht2*: Brigand and/or near isogenic line in the variety Mironovskaya 808)

Tested variety	<i>Rht</i> gene tested	Number of F ₂ plants			Fitness to 15 : 1 ratio χ^2
		total	insensitive	sensitive	
Vlada	<i>Rht1</i>	100	100		
	<i>Rht2</i>	99	93	6	0.006
	<i>Rht1</i>	98	98		
Ilona	<i>Rht2</i>	100	93	7	0.096
	<i>Rht2</i>	94	88	6	0.165
	<i>Rht1</i>	92	92		
Astella	<i>Rht2</i>	92	84	8	0.939
	<i>Rht2</i>	296	90	6	0.023
Šárka	<i>Rht1</i>	94	84	10	3.079
	<i>Rht2</i>	88	88		
	<i>Rht2</i>	94	94		
RU488	<i>Rht1</i>	90	82	8	1.071
	<i>Rht1</i>	95	88	7	0.202
	<i>Rht2</i>	97	97		
Versailles	<i>Rht1</i>	89	83	6	0.037
	<i>Rht2</i>	94	94		
	<i>Rht2</i>	81	81		
Ritmo	<i>Rht1</i>	88	80	8	1.818
	<i>Rht2</i>	85	85		
	<i>Rht2</i>	85	85		
Athlet	<i>Rht1</i>	96	92	4	0.714
	<i>Rht1</i>	86	81	5	0.028
	<i>Rht2</i>	97	97		

$$\chi^2_{0.95}(1) = 3.84$$

II. Means for the selected characters in the winter wheat varieties carrying Norin 10 genes in the 1995–1997 Official Trials of the Czech Republic

<i>Rht</i> gene	Cultivar	Country of origin	Number of locations	Grain yield (t/ha)	Class of quality*	Days to heading*	Plant height (cm)	Ear No./m ²	1000-grain wt. (g)
1	Vlada*	CZ	11	6.31	A	150	94	755	38.8
	Ilona	SK	33	7.49	E	150	93	688	40.7
	Astella	SK	33	7.90	B	151	88	693	41.0
2	Šárka	CZ	27	8.40	B	153	91	697	48.5
	RU488**	CZ	18	8.45	B	158	93	645	49.9
	Versailles	NL	27	8.35	C	158	84	669	45.5
	Ritmo	NL	27	7.89	C	160	84	719	42.0
	Athlet	D	27	7.98	C	160	96	627	44.9

*C = not suitable for breadmaking; + from the 1st of January; *1995, **1996–1997

material (doubled haploid lines Florida/Vlada – *Rht1*; F₆ lines of six crosses – *Rht2*, Tabs. III and IV). The presence of gene *Rht1* was accompanied by a positive correlation between grain yield and SDS sedimentation volume ($r = 0.36^{**}$; $n = 49$), while this correlation was negative when gene *Rht2* was present ($r = -0.30^*$; $n = 67$). SDS sedimentation volume was significantly lower in later heading material of both groups (r for “*Rht1*”:

-0.48^{**} ; “*Rht2*”: -0.40^{**}). As selection for *Rht2* was concentrated on high yielding “tall dwarfs” that were later in heading (Šip et al., 1988), the effect on quality (not quantity) of proteins is expected to be negative. Selection for taller GA insensitive plants with *Rht1* in the cross Florida/Vlada should positively influence SDS sedimentation volume and negatively wet gluten content (Tab. III), which does not correspond with a usually

III. Correlation coefficients and means of the examined traits in the randomly selected GA insensitive doubled haploid lines of the cross Florida/Vlada (*Rht1*)

I	1	2	3	4	5	6
1 Grain yield (t/ha)	1					
2 Days to heading	-0.112	1				
3 Plant height (cm)	0.503**	-0.264	1			
4 1000 grain wt. (g)	-0.045	0.020	0.206	1		
5 SDS sedimentation vol. (ml)	0.364**	-0.478**	0.418**	0.016	1	
6 Wet gluten content %	-0.415**	-0.003	-0.368**	0.175	-0.015	1
Mean	9.22	160	84	44.0	51	26.4

$n = 49$; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$

IV. Correlation coefficients and means of the examined traits in the selected GA insensitive F6 lines (supposed presence of gene *Rht2*) from the six winter wheat crosses (see Material and Methods)

I	1	2	3	4	5	6
1 Grain yield (t/ha)	1					
2 Days to heading	0.215	1				
3 Plant height (cm)	-0.111	0.097	1			
4 1000 grain wt. (g)	-0.117	0.211	0.119	1		
5 SDS sedimentation vol. (ml)	-0.298*	-0.396**	-0.041	0.181	1	
6 Wet gluten content %	0.023	0.208	0.279*	0.232	-0.069	1
Mean	10.06	156	87.5	49.3	41.4	29.8

$n = 67$; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$

V. Correlation coefficients and means of examined traits in the selected GA insensitive F6 lines of the cross UH 6192 / Recital (*Rht2* from the CIANO variety)

I	1	2	3	4	5	6
1 Grain yield (t/ha)	1					
2 Days to heading	0.650**	1				
3 Plant height (cm)	0.638**	0.593**	1			
4 1000 grain wt. (g)	0.502*	0.674**	0.636**	1		
5 SDS sedimentation vol. (ml)	-0.366	-0.634**	-0.320	-0.380	1	
6 Wet gluten content %	0.523*	0.631**	0.522*	0.211	-0.378	1
Mean	10.42	155	89.4	47.0	42.3	30.0

$n = 20$; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$

detected decrease of wet gluten content at reduced height (as in the "*Rht2*" material – Tabs. IV and V; Šíp et al., 1988). However, for the explanation of these differences a larger extent of examined material is undoubtedly needed. In the material carrying gene *Rht1*, plant height was significantly positively correlated with grain yield ($r = 0.50^{**}$) but not with heading date ($r = -0.11$). Therefore, the selection for earlier and taller dwarfs might guarantee to reach both high yield and high breadmaking quality. But to combine earliness, high yield and good quality with the presence of *Rht2* appears to be very difficult with the examined material and under the experimental conditions. It is thus not surprising that high breadmaking quality has not yet been reached in varieties that carry gene *Rht2*.

It cannot be concluded from this study that the above mentioned differences were due to different pleiotropic effects of *Rht1* and *Rht2* genes on the examined characters. For a long time in the Czech Republic donors of gene *Rht1* were spring types (successfully e.g. Siete Cerros or Nadadores 63 – Šíp et al., 1995a; Škorpík et al., 1995) with a short vegetation period and high growth rate, while donors of gene *Rht2* were mainly high yielding British varieties with lower breadmaking quality and delayed heading. However, the examination of the cross with the early French variety Recital (gene *Rht2* from the Mexican variety CIANO) (Tab. V) did not show in general a similar correlation pattern as found in the material carrying gene *Rht1* (Tab. III). In any case, the presented findings, which

are in accordance with the results of breeding, indicate that selection for *Rht1* and *Rht2* gene will require different approaches (strategy) to reach success in the examined conditions of Central Europe. Yamada (1989) reported that the geographical distribution of the *Rht* genotypes in the Japanese wheat varieties was clearly localized suggesting that *Rht1* and *Rht2* genotypes have a different adaptability to agro-ecological environments. Such accumulated information on these genes will certainly be useful for the breeders in devising their strategies to develop high yielding wheat varieties with improved grain quality.

Acknowledgement

The authors are grateful to Ing. P. Pařízek, Ing. D. Jurečka and Ing. J. Hartmann, CSc., from the Variety Testing Section of the Institute for Supervising and Testing in Agriculture, Brno, for providing data from the Official Trials.

REFERENCES

ALLAN, R. E. – PRITCHETT, J. A. (1980): Registration of 16 lines of club wheat germplasm. *Crop Sci.*, 20: 832–833.
BOBKOVÁ, L. – ŠÍP, V. – ŠKORPÍK, M. (1988): The use of the method of detecting *Rht* genes by means of applied gibberellic acid in wheat breeding. *Genet. a Šlecht.*, 24: 65–74 (in Czech).
GALE, M. D. – GREGORY, R. S. (1977): A rapid method for early generation selection of dwarf genotypes in wheat. *Euphytica*, 26: 733–738.

GALE, M. D. – YOUSSEFIAN, S. (1985): Dwarfing genes in wheat. In: RUSSELL, G. E. (ed.): *Progress in Plant Breeding*. London, Butterworth Co.: 1–35.
GALE, M. D. – MARSHALL, G. A. – RAO, M. V. (1981): A classification of the Norin 10 and Tom Thumb dwarfing genes in British, Mexican, Indian and other hexaploid bread wheat varieties. *Euphytica*, 30: 355–361.
ŠÍP, V. – ŠKORPÍK, M. – TÁBORSKÁ, J. (1986): A method of testing the response to applied gibberellin for detection of dwarfing genes in wheat. *Genet. a Šlecht.*, 22: 133–141 (in Czech).
ŠÍP, V. – ŠKORPÍK, M. – CHRPOVÁ, J. (1995a): Identification of *Rht* genes in the three Czech spring wheat varieties. *Genet. a Šlecht.*, 31: 25–33 (in Czech).
ŠÍP, V. – AMLER, P. – BOBKOVÁ, L. – ŠKORPÍK, M. (1988): Efficiency of early generation selection for *Rht2* in a Czechoslovak wheat breeding programme. In: *Proc. 7th Int. Wheat Genet. Symp.*, Cambridge: 1175–1180.
ŠÍP, V. – ŠKORPÍK, M. – CHRPOVÁ, J. – DOTLAČIL, L. (1995b): GA insensitive dwarfing genes of wheat in the conditions of Czech Republic. In: *Abstr. XIVth EUCARPIA Congr. on Adaptation in Plant Breeding*, Jyväskylä, Finland: 40–41.
ŠKORPÍK, M. – ŠÍP, V. – CHRPOVÁ, J. (1995): The gibberellic acid insensitive dwarfing genes in the Czech and Slovak winter wheat varieties. *Genet. a Šlecht.*, 31: 91–98 (in Czech).
ŠKORPÍK, M. – ŠÍP, V. – BOBKOVÁ, L. – CHRPOVÁ, J. (1997): Possibility of early generation selection for GA insensitive dwarfing genes in winter wheat. *Genet. a Šlecht.*, 33: 99–106 (in Czech).
YAMADA, T. (1989): Identification of GA-insensitive *Rht* genes in Japanese modern varieties and landraces of wheat. *Euphytica*, 43: 53–57.

Received on June 11, 1998

Contact Address:

Ing. Václav Šíp, CSc., Výzkumný ústav rostlinné výroby, 161 06 Praha 6-Ruzyně, Česká republika, tel.: 00 420 2 330 22 365, fax: 00 420 2 330 22 286, e-mail: sip@hb.vurv.cz

**Nejčerstvější informace o časopiseckých článcích
poskytuje automatizovaný systém**

Current Contents

na disketách

Ústřední zemědělská a lesnická knihovna odebírá časopis „**Current Contents**“ řadu „**Agriculture, Biology and Environmental Sciences**“ a řadu „**Life Sciences**“ na disketách. Řada „Agriculture, Biology and Environmental Sciences“ je od roku 1994 k dispozici i s abstrakty. Obě tyto řady vycházejí 52krát ročně a zahrnují všechny významné časopisy a pokračovací sborníky z uvedených oborů.

Uložení informací z Current Contents na disketách umožňuje nejrozmanitější referenční služby z prakticky nejčerstvějších literárních pramenů, neboť báze dat je **doplňována každý týden** a neprodleně expedována odběratelům. V systému si lze nejen prohlížet jednotlivá čísla Current Contents, ale po přesném nadefinování sledovaného profilu je možné adresně vyhledávat informace, tisknout je nebo kopírovat na disketu s možností dalšího zpracování na vlastním počítači. Systém umožňuje i tisk žádanek o separát apod. Kumulované vyhledávání v šesti číslech Current Contents najednou velice urychluje rešeršní práci.

Přístup k informacím Current Contents je umožněn dvojím způsobem:

- 1) Zakázkový přístup** – po vyplnění příslušného zakázkového listu (objednávky) je vhodný především pro mimopražské zájemce.

Finanční podmínky: – použití PC – 15 Kč za každou započatou půlhodinu

– odborná obsluha – 10 Kč za 10 minut práce

– vytištění rešerše – 1 Kč za 1 stranu A4

– žádanky o separát – 1 Kč za 1 kus

– poštovné + režijní poplatek 15 %

- 2) „Self-service“** – samoobslužná práce na osobním počítači v ÚZLK.

Finanční podmínky jsou obdobné. Vzhledem k tomu, že si uživatel zpracovává rešerši sám, je to maximálně úsporné. (Do kalkulace cen nezapočítáváme cenu programu a databáze Current Contents.)

V případě Vašeho zájmu o tyto služby se obraťte na adresu:

Ústřední zemědělská a lesnická knihovna

Dr. Bartošová

Slezská 7

120 56 Praha 2

Tel.: 02/24 25 79 39, l. 520, fax: 02/24 25 39 38

Na této adrese obdržíte bližší informace a získáte formuláře pro objednávku zakázkové služby. V případě „self-servisu“ je vhodné se předem telefonicky objednat. V případě zájmu je možné si objednat i průběžné sledování profilu (cena se podle složitosti zadání pohybuje čtvrtletně kolem 100 až 150 Kč).