

ÚSTAV ZEMĚDĚLSKÝCH A POTRAVINÁŘSKÝCH INFORMACÍ

*Czech Journal of*  
**GENETICS AND  
PLANT BREEDING**

Genetika a šlechtění

ČESKÁ AKADEMIE ZEMĚDĚLSKÝCH VĚD

**1**

VOLUME 36  
PRAGUE 2000  
ISSN 1212-1975

# CZECH JOURNAL OF GENETICS AND PLANT BREEDING

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

Mezinárodní vědecký časopis vydávaný z pověření Ministerstva zemědělství České republiky a pod gesci 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

V. Šíp (Prague, Czech Republic) – Chairman

I. Bos (Wageningen, The Netherlands)

B. Čagaš (Zubří, Czech Republic)

J. Černý (Prague, Czech Republic)

P. Dědič (Havlíčkův Brod, Czech Republic)

V. A. Dragavcev (St. Petersburg, Russia)

M. Griga (Šumperk, Czech Republic)

A. Hanišová (Sibřina, Czech Republic)

O. Chloupek (Brno, Czech Republic)

A. Jahoor (Roskilde, Denmark)

A. Mesterházy (Szeged, Hungary)

J. Ovesná (Prague, Czech Republic)

J. Pešek (Brno, Czech Republic)

J. Rod (Telč, Czech Republic)

J. Řepková (Brno, Czech Republic)

P. Ruckebauer (Tulln, Austria)

E. Schwarzbach (Míroslav, Czech Republic)

J. Špunar (Kroměříž, Czech Republic)

J. Tupý (Prague, Czech Republic)

M. Užík (Piešťany, Slovak Republic)

**Editor-in-Chief:** Ing. Marie Černá, CSc.

**Aims and scope:** The journal publishes original scientific papers, short communications and reviews from the field of theoretical and applied plant genetics, plant biotechnology and plant breeding. Papers are published in English, Czech, or in Slovak.

**Periodicity:** The journal is published quarterly, Volume 36 appearing in 2000.

**Acceptance of manuscripts:** Two copies of manuscript should be addressed to: Ing. Marie Černá, CSc., editor-in-chief, Institute of Agricultural and Food Information, Slezská 7, 120 56 Praha 2, Czech Republic, tel.: 02/24 25 34 89, fax: 02/24 25 39 38, e-mail: cerna@uzpi.cz.

**Subscription information:** Subscription orders can be entered only by calendar year (January–December) and should be sent to: Institute of Agricultural and Food Information, Slezská 7, 120 56 Praha 2. Subscription price for 2000 is 62 USD (Europe), 64 USD (overseas).

**Vedoucí redaktorka:** Ing. Marie Černá, CSc.

**Cíl a odborná náplň:** Časopis publikuje původní vědecké práce, krátká sdělení a odborná review z oblasti teoretické a aplikované genetiky rostlin, rostlinných biotechnologií a šlechtění rostlin. Práce jsou publikovány v angličtině, češtině nebo slovenštině.

**Periodicita:** Časopis vychází čtvrtletně. Ročník 36 vychází v roce 2000.

**Přijímání rukopisů:** Rukopisy ve dvou vyhotoveních je třeba zaslat na adresu redakce: Ing. Marie Černá, CSc., vedoucí redaktorka, Ústav zemědělských a potravinářských informací, Slezská 7, 120 56 Praha 2, Česká republika, tel.: 02/24 25 34 89, fax: 02/24 25 39 38, e-mail: cerna@uzpi.cz.

**Informace o předplatném:** Objednávky na předplatné jsou přijímány pouze na celý rok (leden–prosinec) a měly by být zaslány na adresu: Ústav zemědělských a potravinářských informací, vydavatelské oddělení, Slezská 7, 120 56 Praha 2. Cena předplatného pro rok 2000 je 232 Kč.

# RESPONSE OF SELECTED WINTER WHEAT VARIETIES TO WHEAT DWARF VIRUS INFECTION AT AN EARLY GROWTH STAGE\*

## REAKCE VYBRANÝCH ODRŮD OZIMÉ PŠENICE NA INFEKCI VIREM ZAKRSLOSTI PŠENICE V RANÉ RŮSTOVÉ FÁZI

J. Vacke, R. Cibulka

*Research Institute of Crop Production, Division of Plant Medicine, Prague-Ruzyně, Czech Republic*

**ABSTRACT:** Response to wheat dwarf virus (WDV) infection was studied in 40 registered varieties of winter wheat in small-plot trials with a controlled infection system. The varieties were infected at a tillering stage in the fall. The tested assortment did not include any resistant variety. The following varieties were classified as very susceptible, showing a 100% reduction in grain yield: Alana, Asta, Athlet, Brea, Danubia, Ebi, Estica, Hana, Iris, Košutka, Livia, Ritmo, Samanta, Samara, Sida, Simona, Siria, Sofia, Torysa, Trane, Vega, Versailles, Vlada and Zdar. Varieties Alka, Blava, Rexia, Sparta, Šarka and Viginta were rated as susceptible. The category of moderately susceptible varieties with a yield reduction of 82.5–92.6% comprised Astella, Boka, Bruneta, Bruta, Ilona, Ina, Mona, Regina, Saskia and Senta.

**Keywords:** winter wheat; wheat dwarf virus; response to infection

**ABSTRAKT:** V maloparcelkových polních pokusech při řízené infekci byla zjišťována reakce na infekci virem zakrslosti pšenice u 40 povolených odrůd ozimé pšenice. Tyto odrůdy byly infikovány na podzim ve fázi odnožování. V testovaném sortimentu nebyla zjištěna žádná odolná odrůda. Mezi silně náchylné, se 100% redukcí výnosu zrna, patřily odrůdy Alana, Asta, Athlet, Brea, Danubia, Ebi, Estica, Hana, Iris, Košutka, Livia, Ritmo, Samanta, Samara, Sida, Simona, Siria, Sofia, Torysa, Trane, Vega, Versailles, Vlada a Zdar. Jako náchylné byly klasifikovány odrůdy Alka, Blava, Rexia, Sparta, Šarka a Viginta. Do kategorie mírně náchylných, s redukcí výnosu 82,5–92,6 %, byly zařazeny odrůdy Astella, Boka, Bruneta, Bruta, Ilona, Ina, Mona, Regina, Saskia a Senta.

**Klíčová slova:** ozimá pšenice; virus zakrslosti pšenice; reakce na infekci

### INTRODUCTION

Wheat dwarf virus (WDV) is a leafhopper *Psammotettix alienus* Dahlb. transmitted geminivirus which was described for the first time in the former Czechoslovakia (Vacke, 1961), later in other European countries. The WDV strain adapted to barley, not transmissible to wheat, was identified in the early nineties (Lindsten and Vacke, 1991). The virus isolates from wheat currently occurring in the Czech territory are not infectious for barley. WDV is mostly distributed in the CR at lower elevations above sea level where it causes local epidemics in some years. The most severe infections by WDV were recorded in winter wheat and winter barley crops in the last years.

Protection against this virus is provided by complex agrotechnical and, as the case may be, chemical measures aimed at the control of vectors and sources of infection. Amplification of the efficiency of these measures can be ensured by growing of resistant varie-

ties. Determination of such varieties in winter wheat was carried out in small-plot experiments with artificial infection of plants (Vacke, 1989). At that time the set of 120 varieties and breeding lines contained 13 materials only that were classified as moderately resistant. The other materials were rated by different degrees of susceptibility.

This communication deals with resistance and/or susceptibility to WDV in the present registered assortment of winter wheat.

### MATERIAL AND METHODS

Trials were conducted with 40 registered varieties of winter wheat. Varieties were sown onto plots 1 m<sup>2</sup> in size at a plant spacing 8 x 8 cm. The trials consisted of two variants, infectious and control ones, each being three times repeated. Infection of plants was carried out in nylon isolators at the beginning of tillering. Leafhoppers *Psammotettix alienus* collected on volunteer growth

\* The research was supported by the Grant Agency of the Czech Republic (Project No. 522/97/0668).

of cereals were used for WDV transmission. Their acquisition feeding on infection sources (infected spring wheat variety Jara) lasted for 6 days. A Ru-W isolate of the wheat strain of the WDV was used for wheat infection. Inoculation feeding of leafhoppers on tested plant materials, 2 vectors per plant, lasted for 14 days. During the growing season experimental plots were kept under an insecticide shield.

Response of the varieties to WDV infection was evaluated in the next growing season. A reduction in plant height, mortality rate, proportion of heading plants and grain yield were used as criteria to evaluate plant resistance or susceptibility. Sixty plants of each variety were evaluated. Most varieties were tested for two years (1997–1998), some of them one year only (1998).

Relative virus content in the leaf sap of infected plants was determined by DAS-ELISA according to Clark and Adams (1977) in selected varieties of particular groups of the winter wheat. Leaf samples immediately after collection were frozen to  $-20^{\circ}\text{C}$  and stored at this temperature until their use. This material was homogenized under simultaneous addition of extraction buffer. Absorbancy values were statistically processed by the SAS program.

## RESULTS AND DISCUSSION

Intensity of infection of the winter wheat varieties ranged between 92 and 100%. It is obvious that the action of 2 virus-transmitting vectors (infectivity 52–60%) per plant produced an infection pressure resulting in a high percentage of infected plants. Varietal materials were infected in the fall; it coincides with the first stage (mostly prevailing) of natural infections occurring during migration of leafhoppers *Psammotettix alienus* to emerged winter wheat stands.

Symptoms of infection in plants of particular varieties appeared in spring, at the early vegetative stage as different kind of dwarfing, suppressed heading or ear reduction, leaf yellowing or reddening and necrotic spots on leaf blades.

The tested winter wheat collection could be divided into three groups according to severity of principal symptoms.

The first group comprised varieties with 70 to 90% height reduction of infected plants. Plants of this group of varieties failed to head and remained without any yield. Leaves of virus-infected plants were shorter than those of healthy plants, with intensive yellowing from tips and margins, or reddening in some varieties. Many smaller necrotic spots appeared on their leaf blades that coalesce into larger areas in the later vegetative stage. The bulk of the plants of these varieties died before heading of uninfected controls. Heading was observed in several plants of three varieties, the ears were severely reduced and without seeds. This group which included Alana, Asta, Athlet, Brea, Danubia, Ebi, Estica, Hana, Iris, Košútka, Livia, Ritmo, Samanta, Samara, Sida (Fig. 1), Simona, Siria, Sofia, Torysa, Trane,

Vega, Versailles, Vlada and Zdar varieties was classified as highly susceptible (Tab. 1). As the most susceptible appeared varieties Hana and Versailles with height reduction reaching 87.8% and 89.3% respectively. The most severe leaf necrotization and fastest dying of entire plants were observed in these varieties.

Varieties with a height reduction of infected plants up to 60–70% were included in the second group. Heading occurred in the bulk of these varieties (43–65%), but their ears were severely dwarfed and sterile. A small amount of underdeveloped grains was produced in two varieties only (Rexia and Viginta). Smaller necrotic spots appeared on leaves. Dying of infected plants was slower than in highly susceptible varieties. This group was classified as susceptible, containing the varieties Alka, Blava (Fig. 2), Rexia, Sparta, Šárka and Viginta (Tab. 1).

The third group contained 10 varieties with a 45 to 60% reduction in the height of infected plants (Tab. 1). Heading occurred in more than 80% of plants. Their ears were substantially smaller than in healthy plants, a part of spikelets was sterile. Grain yield reduction in infected plants ranged from 82.5 to 92.6%. This group which included varieties Astella, Boka, Bruneta, Bruta, Ilona, Ina, Mona, Regina, Saskia and Senta (Fig. 3) was

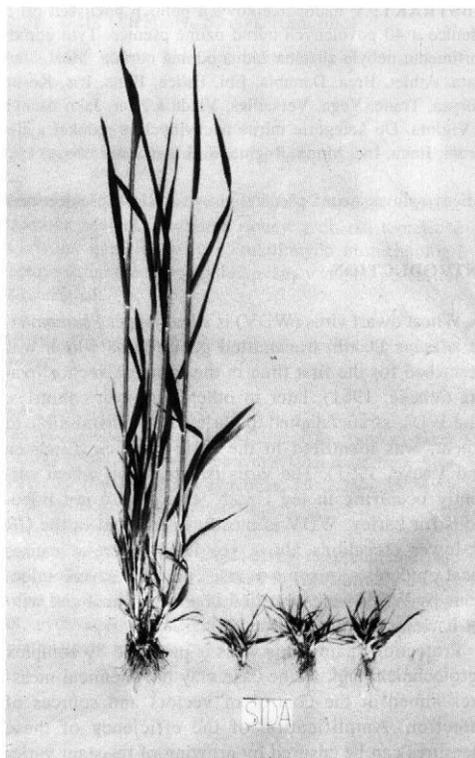


Fig. 1. Symptoms of WDV infection in very susceptible variety Sida; uninfected plant on the left

Table 1. Average values of studied traits characterizing winter wheat response to the infection with WDV in two (1997–1998) or one (1998) year trials

Variety	Plant height		Percent of heading plants	Grain yield		Elisa abs. 405 nm (l)	Degree of susceptibility
	cm (l)	100 (l/C).100		g/plant (l)	100 (l/C).100		
Alana	20.6	75.8	2.0	0	100	1.875	VS
Alka	29.2	61.2	55.2	0	100	1.746	S
Asta	21.3	70.8	0	0	100	1.916	VS
Astella	36.8	45.3	96.2	1.0	82.5	1.557	MS
Athlet*	16.9	80.1	0	0	100	1.727	VS
Blava	29.8	60.7	50.6	0	100		S
Boka	39.9	47.4	89.0	0.9	91.9		MS
Brea*	11.2	83.5	0	0	100	1.593	VS
Bruneta	40.1	48.9	98.0	0.7	90.1	1.013	MS
Bruta	36.0	51.3	81.5	0.6	88.6		MS
Danubia	13.9	79.5	0	0	100	1.781	VS
Ebi	26.7	81.5	0	0	100		VS
Estica	17.8	76.3	3.5	0	100	1.600	VS
Hana	8.6	87.8	0	0	100	1.840	VS
Ilona	33.2	52.9	97.3	0.8	92.6	1.644	MS
Ina	35.8	50.7	90.6	1.6	86.3		MS
Iris	13.7	80.3	0	0	100		VS
Košútka	15.8	75.4	0	0	100		VS
Lívia	12.0	80.0	0	0	100		VS
Mona	32.9	56.1	91.0	0.6	88.5		MS
Regina	35.8	55.3	92.0	0.7	92.3		MS
Rexia	22.8	69.6	46.5	0.1	98.6	1.533	S
Ritmo*	10.8	85.6	0	0	100	1.803	VS
Samanta	14.3	80.1	0	0	100	1.664	VS
Samara	19.1	75.7	0	0	100		VS
Saskia	34.3	50.8	89.8	1.8	83.3	1.190	MS
Senta	44.1	56.3	98.0	0.8	90.4	1.558	MS
Sida	13.8	81.9	0	0	100		VS
Simona	15.6	80.5	0	0	100		VS
Síria	20.2	75.4	0	0	100		VS
Sofia	24.2	77.0	5.0	0	100		VS
Sparta	39.8	60.9	43.1	0	100	1.695	S
Šárka	27.4	65.8	55.3	0	100	1.661	S
Torysa	16.0	76.4	0	0	100		VS
Trane	15.5	81.3	0	0	100		VS
Vega	16.7	75.1	0	0	100		VS
Versailles*	7.50	89.3	0	0	100		VS
Viginta	33.1	68.5	65.0	0.02	99.7	1.428	S
Vlada	13.5	80.9	0	0	100	1.615	VS
Zdar	11.8	85.1	0	0	100		VS

(l) – infected variant  
(C) – uninfected variant  
100 – (l/C).100 – percent reduction  
\* – varieties tested for one year

VS – very susceptible  
S – susceptible  
MS – moderately susceptible

classified as moderately susceptible. Varieties Astella and Saskia manifesting the lowest reduction in grain yield (82.5%, 83.3%) seemed to be the best of this set.

The results of DAS-ELISA demonstrated differences in relative virus contents in the sap from WDV-infected wheat leaves among the particular groups, as determined by absorption values. Average absorbent value reached 1.747 in highly susceptible, 1.600 in susceptible and 1.392 in moderately susceptible varieties

(Tab. 1). A highly significant difference ( $p = 0.01$ ) in relative virus content was determined between moderately susceptible and susceptible varieties as well as highly susceptible ones. The difference between susceptible and moderately susceptible was insignificant. Relative virus content in leaves was demonstrated to rise with increasing susceptibility of varieties. But a possibility of its use as a reliable indicator of susceptibility and/or resistance level is disputable for the time being. Analy-

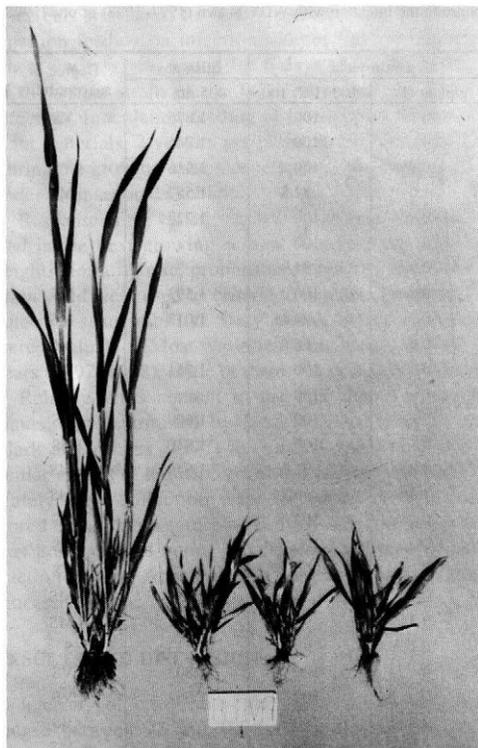


Fig. 2. Symptoms of WDV infection in susceptible variety Blava; uninfected plant on the left

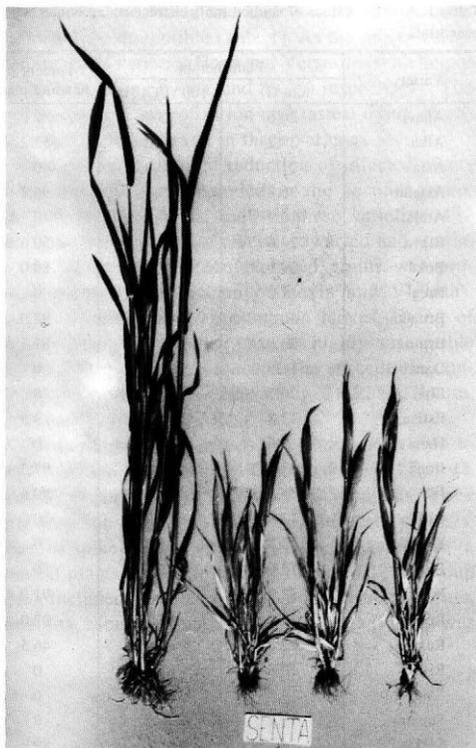


Fig. 3. Symptoms of WDV infection in moderately susceptible variety Senta; uninfected plant on the left

ses of a larger number of susceptible and resistant materials could contribute to the solution of this problem.

As indicated by the results of winter wheat testing, the present Czech registered assortment of winter wheat does not contain any variety resistant to WDV infection at an early growth stage. Most of these varieties (24) are highly susceptible ones in which a 100% loss of grain yield is caused by the virus. Similar damage occurred in susceptible varieties. Moderately susceptible varieties (10) after infection at an early stage have some grain yields of inferior quality. Their yield losses are lower after secondary infections at a later stage, i.e. in spring and summer. It is documented by data from analyses of plants infected in trials carried out for different reasons. In this case, grain yield was reduced by 72% in highly susceptible varieties (10 evaluated), by 35% in susceptible ones (5 evaluated) and by 21% in moderately susceptible (5 evaluated). Hence moderately susceptible varieties are important for protection

against WDV. Their use in the areas with high virus incidence can be an additional measure to agrotechnical or chemical measures taken to control WDV.

#### REFERENCES

- Clark M. F., Adams A. N. (1977): Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.*, 34: 475–483.
- Lindsten K., Vacke J. (1991): A possible barley adapted strain of wheat dwarf virus (WDV). *Acta Phytopath. Entomolog. Hung.*, 26: 175–180.
- Vacke J. (1961): Wheat dwarf virus disease. *Biol. Plant.*, 3: 228–233.
- Vacke J. (1989): Metody a výsledky testování odolnosti ozimé pšenice k viru zakrslosti pšenice. In: *Plant Virology, Proc. 10th Conf. Czechoslovak Plant Virologists, Praha*, 27–30 June: 205–206.

Received for publication on December 12, 1999

#### Contact Address:

Ing. Josef Vacke, CSc., Výzkumný ústav rostlinné výroby, 161 06 Praha 6-Ruzyně, Česká republika, tel.: +420 2/33 02 21 11, fax: +420 2/36 52 28, e-mail: vacke@hb.vurv.cz

# HODNOCENÍ ÚSPĚŠNOSTI HYBRIDIZACE U JARNÍHO JEČMENE POMOCÍ GENETICKÉHO MARKERU\*

## EVALUATION OF HYBRIDIZATION SUCCESS IN SPRING BARLEY BY MEANS OF A GENETIC MARKER

M. Špunarová<sup>1</sup>, I. Kraus<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Agricultural Research Institute, Ltd., Kroměříž, Czech Republic*

<sup>2</sup>*Research Institute of Brewing and Malting, Malting Institute, Brno, Czech Republic*

**ABSTRACT:** The SSR marker (Single Sequence Repeat) was used to evaluate success at hybridization of a spring barley collection cultivated in the Czech Republic. The collection of cultivars was represented by 2-row spring barley cultivars of Czech breeding – Akcent, Amulet, Forum, Olbram, Rubín, Viktor, Slovak cvs. – Kompakt, Sladko, German cvs. – Krona, Scarlett, and Danish cv. Caminant. The SSR marker is situated in the area of starch synthase locus (HVWAXY) which may be detected with primers 5'AAGACGTGGTTCGTGTG3' and 5'ATGGTCCAGGGGTAAGTTC3'. These primers detected in the locus HVWAXY the SSR marker in size 190 bp in cultivars of malting barley Akcent, Forum, Krona, Viktor, Scarlett, Caminant, Amulet, Kompakt, Olbram and Rubín, which were used for hybridization as mother components, and 205 bp in variety Sladko used as a father component. As this marker manifests co-dominant fashion of inheritance, both forms were detected in hybrid grains obtained from successful combination. If the combination manifested as unsuccessful, probably self-pollination came into existence and only the mother form occurred. Application of this marker is advantageous for evaluation of hybridization already in the phase of developed leaves, which enables to work with much lower amount of individuals (if the self-pollinated ones were excluded) at the early stages of breeding process and contributes to acceleration of selection as a decisive phase during the breeding process.

**Keywords:** barley; hybridization; SSR marker

**ABSTRAKT:** Pro vyhodnocení úspěšnosti hybridizace souboru odrůd jarního ječmene pěstovaných v ČR, reprezentujících nejlepší dvouřadé sladovnické odrůdy šlechtění českého – Akcent, Amulet, Forum, Olbram, Rubín, Viktor, slovenského – Kompakt, Sladko, německého – Krona, Scarlett a dánského – Caminant bylo použito SSR markeru (Single Sequence Repeat) nacházejícího se v oblasti lokusu pro škrobovou syntázu (HVWAXY), který je detekovatelný primery 5'AAGACGTGGTTCGTGTG3' a 5'ATGGTCCAGGGGTAAGTTC3'. Tyto primery detekovaly v lokusu HVWAXY SSR marker o velikosti 190 bp u odrůd sladovnického ječmene Akcent, Forum, Krona, Viktor, Scarlett, Caminant, Amulet, Kompakt, Olbram a Rubín, které byly pro křížení použity jako mateřské komponenty, a 205 bp u odrůdy Sladko použité jako otcovský komponent. Protože tento marker vykazuje kodominantní způsob dědičnosti, jsou u hybridních zrn získaných z úspěšných kombinací detekovány obě formy. U kombinací neúspěšných jde o případ samoopylení, kde se fenotypově projevila pouze mateřská forma. Aplikace tohoto markeru je výhodná pro zhodnocení hybridizace již v generaci F<sub>1</sub>, což umožní v počátečních etapách šlechtitelského procesu pracovat s mnohem nižším počtem jedinců (po vyloučení nevhodných samoopylených) a přispěje k urychlení selekce jako rozhodující fáze při šlechtění.

**Klíčová slova:** ječmen; hybridizace; SSR marker

### ÚVOD

Proces šlechtění obecně představuje postup, při kterém jsou z vysokého počtu genotypů výchozího materiálu selektováni jedinci se šlechtitelsky odpovídajícím genotypem. Doposud nejúspěšnější metodou k získání nového materiálu ječmene (i všech ostatních obilovin) je hybridizace. Je to počátek zdlouhavé šlechtitelské

práce, jejímž výsledkem je nová odrůda, výkonnější a lepší než odrůda stará. Vlastní proces křížení zahrnuje etapu kastrace a opylování mateřských rostlin. V těchto etapách dochází k vytvoření nového jedince spojením samčích pohlavních buněk jedné rostliny se samičími pohlavními buňkami druhé rostliny.

Po provedené hybridizaci a získání hybridních zrn následuje přemnožování materiálu v generaci F<sub>1</sub>. V další

\* Práce byla uskutečněna s podporou Ministerstva zemědělství ČR (projekt č. EP 7283).

generaci  $F_2$  se vysévají zrna do širšího sponu pro možnost provádění individuálních výběrů nejlepších rostlin. Potomstva každé rostliny se v generaci  $F_3$  vysévají odděleně se zařazením rodičovských rostlin. Většinou až v této nebo další generaci je dostatek jedinců pro výběr, který umožní rozhodnout, zda křížení bylo správně provedeno. Přestože se slabá a podprůměrná potomstva vylučují, představuje to velké množství potomstva hybridního, ale i nehybridního charakteru, které se musí hodnotit, aniž víme, zda došlo k nakřížení. Urychlení procesu selekce a umožnění tak už v počátečních etapách šlechtitelského procesu pracovat s mnohem nižším počtem jedinců je možné aplikací markerů. Techniky, které využívají tyto markery zejména pro cílenou selekci v raných filiačních generacích, jsou označovány jako „Marker Assisted Selection“ (MAS). Genetické markery jsou jednoznačně a rychle detekovatelné vlastnosti organismů, které jsou v těsné korelaci s často komplexními, hospodářsky významnými vlastnostmi, např. kvalitou, odolností (Vejl, 1997). Genetické markery mohou být založeny na morfologicko-anatomických vlastnostech nebo na biochemických vlastnostech organismů. Pokrok v oblasti biochemie a molekulární biologie umožnil aplikaci dalších typů biochemicko-genetických markerů založených na polymorfismu DNA (Williams *et al.*, 1990). Mezi historicky novější DNA markery patří markery využívající polymorfismy v mikrosatelitních oblastech chromozomální DNA neboli repetici jednotlivých sekvencí (SSR, Single Sequence Repeat) (Becker, Huen, 1995; William *et al.*, 1997).

Cílem naší práce bylo najít vhodný marker, kterým je možné charakterizovat velmi raná ontogenetická stadia u hybridních zrn a vyloučit materiály nevhodné pro další šlechtitelský postup.

## MATERIÁL A METODY

### Rostlinný materiál a SSR marker

Pro hybridizaci byly použity odrůdy jarního ječmene uvedené v Listině doporučených odrůd pěstovaných v ČR, reprezentované nejlepšími dvouřadými sladovnickými odrůdami šlechtění českého – Akcent, Amulet, Forum, Olbram, Rubín, Viktor, slovenského – Kompakt, Sladko, německého – Krona, Scarlett a dánského – Caminant. Jednotlivé odrůdy byly vysety po 10 zrnech do samostatných nádob a umístěny ve skleníku. Osivo otcovské odrůdy Sladko bylo vyseto do pěti nádob. Doba křížení v podzimním období (září–listopad) vyžadovala prodloužení světelného dne od 17 do 23 hodin a od 4 do 7 hodin. Rostliny v nádobách byly udržovány při optimální půdní vlhkosti a teplotě 21–23 °C. Vlastní kastrace se prováděla na mateřských rostlinách odstraněním všech tří nezralých prašníků. Vykastrovaný klas se zabalil listovou pochvou a izoloval pergamenovým sáčkem. Třetí den po kastraci se přenesly jeden až tři prašníky z otcovských rostlin a klas se znovu izoloval.

Pro kontrolu úspěšnosti hybridizace byl po předchozím ověření zvolen SSR marker nacházející se v oblasti

lokusu pro škrobovou syntázu (HVWAXY), který je detekovatelný primery 5' AAGACGTGGTGTTCGTGTG3' a 5' ATGGTTCCAGGGGTAAGTTC3'. Tyto primery detekovaly v lokusu HVWAXY SSR marker o rozdílných velikostech pro odrůdy použité v křížení jako mateřské a otcovské.

### Izolace DNA

Pro izolaci DNA bylo z rodičovských rostlin ve fázi sloupkování odebráno vždy po jednom listu. Izolace byla provedena podle standardního protokolu za použití Dneasy Plant Mini Kit (Qiagen). Z obalek vytvořených na mateřských rostlinách po křížení byla DNA izolována obdobným způsobem.

### PCR (Polymerase Chain Reaction) a detekce SSR (Single Sequence Repeat) markeru

PCR amplifikace byla provedena v 25 µl objemu za těchto podmínek: 30 ng templátu DNA se 100 µM dNTPs, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 ng každého primeru, 1,6 Taq DNA polymerázy (Promega). Reakce byla provedena na termocykleru PTC 200 (MJ Research) za těchto reakčních podmínek: úvodní denaturace při 94 °C po dobu 2 min, 40 cyklů při 92 °C (1 min), 58 °C (1 min), 72 °C (1 min). Reakce byla ukončena extenzí při 72 °C po dobu 5 min.

Amplifikační produkty byly separovány na 2% agarózovém gelu, obarveny ethidium bromidem a vyhodnoceny na UV-transiluminátoru.

## VÝSLEDKY A DISKUSE

Výsledky analýz hybridních zrn získaných po provedené hybridizaci jsou uvedeny v tab. 1. Z označených kombinací křížení je vidět, že pro opylení bylo použito jediného otce. Výběr odrůdy Sladko jako otcovského partnera pro všechny kombinace byl učiněn na základě dat získaných z analýzy DNA 13členného souboru odrůd, kde tato odrůda vykázala největší střední genetickou distanci ( $D = 0,237$ ). Naopak nejtěsnější genetickou příbuznost ( $D = 0,013$ ) měly odrůdy Krona a Caminant (Kraus, Špunarová, 1998; Kraus *et al.*, 1999). Kontrola hybridizace pomocí SSR markeru ukázala, že ne u všech kombinací došlo k nakřížení (úspěšné kombinace jsou označeny křížkem, kombinace, u kterých nedošlo k nakřížení, znaménkem minus). Protože tento marker vykazuje kodominantní způsob dědičnosti, jsou u hybridních zrn získaných z úspěšných kombinací detekovány obě formy. Obdobné použití kodominantního DNA markeru uvádějí Weising *et al.* (1995) a Paltridge *et al.* (1998). U kombinací neúspěšných (označených minus) jde o případ samoopylení, kde se fenotypově projevila pouze mateřská forma. Skutečnost, že u některých kombinací nedošlo k nakřížení, je možné vy-

Tab. 1. Hodnocení hybridizace SSR markerem pro lokus HVWAXY – Evaluation of hybridization by SSR marker for locus HVWAXY

Číslo vzorku <sup>1</sup>	Označení křížených rostlin <sup>2</sup>	Matka <sup>3</sup>	Otec <sup>4</sup>	Nakříženo <sup>5</sup> (+) Nenakříženo <sup>6</sup> (-)
1	5 x 123	Akcent	Sladko	-
2	5 x 123	Akcent	Sladko	-
3	12 x 128	Forum	Sladko	-
4	38 x 132	Viktor	Sladko	+
5	38 x 132	Viktor	Sladko	+
6	37 x 101	Viktor	Sladko	+
7	47 x 102	Scarlett	Sladko	-
8	61 x 131	Amulet	Sladko	-
9	61 x 131	Amulet	Sladko	+
10	61 x 131	Amulet	Sladko	-
11	61 x 131	Amulet	Sladko	-
12	61 x 131	Amulet	Sladko	-
13	61 x 114	Amulet	Sladko	+
14	61 x 114	Amulet	Sladko	+
15	61 x 114	Amulet	Sladko	+
16	62 x 110	Amulet	Sladko	+
17	77 x 131	Kompakt	Sladko	-
18	77 x 131	Kompakt	Sladko	-
19	77 x 131	Kompakt	Sladko	-
20	77 x 131	Kompakt	Sladko	-
21	76 x 131	Kompakt	Sladko	+
22	93 x 125	Rubín	Sladko	+
23	93 x 125	Rubín	Sladko	+
24	98 x 126	Rubín	Sladko	+
25	98 x 126	Rubín	Sladko	+
26	98 x 126	Rubín	Sladko	+
27	98 x 126	Rubín	Sladko	+
28	98 x 126	Rubín	Sladko	+
29	98 x 126	Rubín	Sladko	+
30	98 x 126	Rubín	Sladko	+
31	21 x 118	Krona	Sladko	0
32	81 x 130	Olbram	Sladko	0
33	57 x 115	Caminant	Sladko	0

\* Číslo rostlin jednotlivých odrůd vysetých v nádobách – Plant numbers of the varieties sown into plots: Akcent 1–10, Forum 11–20, Krona, 21–30, Viktor 31–40, Scarlett 41–50, Caminant, 51–60, Amulet 61–70, Kompakt 71–80, Olbram 81–90, Rubín 91–100, Sladko 101–110, Sladko 111–115, Sladko 116–117, Sladko 118–126, Sladko 127–133

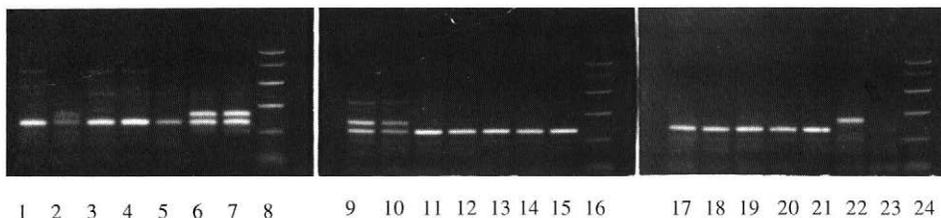
<sup>1</sup>sample no., <sup>2</sup>designation of crossed plants, <sup>3</sup>mother, <sup>4</sup>father, <sup>5</sup>crossed, <sup>6</sup>not crossed

světlit pozdě provedenou kastrací, kdy prašníky na mateřské rostlině byly natolik vyžralé, že samoopylily bliznu. V tabulce jsou uvedeny i plánované kombinace Krona x Sladko, Caminant x Sladko, Olbram x Sladko, které se vůbec neuskutečnily z důvodu zcela sterilních

klásků matky. Důvodem neúspěšnosti bylo zřejmě období podzimních měsíců, za kterých bylo křížení výjimečně uskutečněno, navíc podmínky skleníkového prostředí, které i při dosvětlování neposkytly dostatek světla pro optimální vývoj rostlin. Ke sterilitě většinou nedochází při hybridizaci prováděné podle osvědčeného postupu s výsevem do volné půdy a křížením v průběhu měsíce května (Špunar, 1979).

Pro účely ověřování úspěšnosti hybridizace jarního ječmene byla potvrzena možnost využití DNA markeru detekujícího polymorfismus v mikrosatelitní oblasti nacházející se ve vazbě s genem pro škrobovou syntázu (síla vazby nebyla v této práci prokazována). Předností tohoto markeru je, že pro potřebu sledování úspěšnosti hybridizace není potřebné posuzovat jeho vazebnou sílu ke konkrétním znakům. Informační výtěžnost o přenosu významných znaků z rodičů na filiační generace je však velmi spekulativní. Pro potřebu sledování přenosu konkrétních vlastností z rodičů na potomstvo je však nutné pracovat s markery, které jsou v silné vazbě s těmito vlastnostmi. Takto byly využity RFLP markery pro komplex Mla lokusů determinujících rezistenci k *Erysiphe graminis* (padlí travní) u ječmene (Czembor, Talbert, 1997), AFLP markery (Schwarz *et al.*, 1999) nebo RAPD markery pro stejnou rezistenci, ale založenou na dosud nejúčinnějším genu mlo (Manninen *et al.*, 1997). Obdobně i pro další významné choroby ječmene *Pyrenophora teres* a rez ječnou (*Puccinia hordei*) u donorů z DH linií a nositelů v generacích F<sub>2</sub> byly využity RFLP markery (Richter *et al.*, 1998; Ivandic *et al.*, 1998). Rovněž byly využity RAPD markery pro detekci rezistence k viru žluté mozaikovitosti ječmene založené na genu ym4 (Weyen *et al.*, 1996) a kodominantní PCR-marker pro gen Yd2 (rezistence k viru žluté zakrslosti ječmene) metodou AFLP (Paltridge *et al.*, 1998). MAS se začíná uplatňovat nejen pro sledování přenosu genů rezistence k patogenům, ale i pro sledování sladařsky významných znaků, jako je obsah beta-glukanů, Kolbachovo číslo, friabilita, viskozita, extrakt (Poulsen *et al.*, 1996). Tuto perspektivu účinnější selekce genotypů ječmene na sladovnické znaky pomocí markerů potvrdili i další autoři (Han *et al.*, 1997; Lee, Penner, 1997). Podle nejnovějších prací autorů Ellis *et al.* (1999) je možné pomocí SSR markerů u DH linií ječmene definovat lokusy, které podmiňují jednotlivé sladovnické znaky (energie mletí sladu, třídění mouky, friabilita, extrakt, charakter škrobových zrn aj.)

Na obr. 1 jsou dokumentovány analyzované rostliny, včetně rodičů, tj. hybridního mateřského a otcovského fenotypu. Vzorky rodičů separované na agarózové elektroforóze současně se vzorky DNA markeru jako velikostního standardu (50, 150, 300, 500, 750, 1 000 bp) mají velikost SSR markeru 190 bp u odrůd sladovnického ječmene Akcent, Forum, Krona, Viktor, Scarlett, Caminant, Amulet, Kompakt, Olbram a Rubín, které byly pro křížení použity jako mateřské, a 205 bp u odrůdy Sladko, která byla použita jako otcovská. Na snímcích jsou příklady některých úspěšných křížení, kde došlo k opylení otcovským pylem, vykazujících



Obr. 1. Hodnocení úspěšnosti křížení použitím SSR markeru spojeného s lokusem HVWAXY – Evaluation of hybridization success by utilization of SSR marker for locus HVWAXY

Hybridní fenotyp – úspěšné křížení (+), fenotyp matky – neúspěšné křížení (–), rodičovské odrůdy, velikostní marker 1000, 750, 500, 300, 150, 50 bp (M) – Hybrid phenotype – successful hybridization (+), phenotype of mother – non successful hybridization (–), parental varieties, size marker 1000, 750, 500, 300, 150, 50 bp (M)

Vzorky zleva – kombinace křížení (rostliny): 1 (–) Akcent x Sladko /5 x 123/, 2 (+) Viktor x Sladko /38 x 132/, 3 (–) Scarlet x Sladko /47 x 102/, 4 (–) Amulet x Sladko /61 x 131/, 5 (–) Amulet x Sladko /61 x 131/, 6 (+) Amulet x Sladko /61 x 114/, 7 (+) Amulet x Sladko /62 x 110/, 8 (M), 9 (+) Kompakt x Sladko /76 x 131/, 10 (+) Rubín x Sladko /98 x 126/; rodičovské odrůdy – mateřské: 11 Akcent, 12 Forum, 13 Krona, 14 Viktor, 15 Scarlet, 16 (M), 17 Caminant, 18 Amulet, 19 Kompakt, 20 Olbram, 21 Rubín; otcovské: 22 Sladko, 23 kontrolní PCR bez polymerázy, 24 (M)

Samples from left – cross combination (plants): 1 (–) Akcent x Sladko /5 x 123/, 2 (+) Viktor x Sladko /38 x 132/, 3 (–) Scarlet x Sladko /47 x 102/, 4 (–) Amulet x Sladko /61 x 131/, 5 (–) Amulet x Sladko /61 x 131/, 6 (+) Amulet x Sladko /61 x 114/, 7 (+) Amulet x Sladko /62 x 110/, 8 (M), 9 (+) Kompakt x Sladko /76 x 131/, 10 (+) Rubín x Sladko /98 x 126/; parental components – mother: 11 Akcent, 12 Forum, 13 Krona, 14 Viktor, 15 Scarlet, 16 (M), 17 Caminant, 18 Amulet, 19 Kompakt, 20 Olbram, 21 Rubín; father: 22 Sladko, 23 control PCR without polymerase, 24 (M)

vzdálenosti obou forem o velikosti 190 i 210 bp. Znázornění neúspěšných křížení (např. vzorky č. 1, 3, 4, 5) vzniklých samoopylením odpovídá mateřskému fenotypu SSR markeru 190 bp.

## LITERATURA

- Becker J., Huen M. (1995): Barley microsatellites: allele variation and mapping. *Plant Mol. Biol.*, 27: 835–845.
- Czembor J. H., Talbert L. E. (1997): Evaluation of STS-PCR and RFLPs as molecular markers for the *Mla* locus conferring powdery mildew resistance in barley. *Plant Breed. Seed Sci.*, 41: 1–14.
- Ellis R. P., Ferguson E., Swanston J. S., Forrest J., Fuller J., Lawrence P., Powell W., Russell J., Tester R. F., Thomas W. T. B., Young G. (1999): Use of DNA marker-based assays to define and select malting characteristics in barley. HGCA Project Report, No. 183.
- Han F., Romagosa I., Ullrich S. E., Jones B. L., Hayes P. M., Wesenberg D. M. (1997): Molecular marker-assisted selection for malting quality traits in barley. *Mol. Breeding*, 3: 427–437.
- Ivandić V., Walther U., Graner A. (1998): Molecular mapping of a new gene in wild barley conferring complete resistance to leaf rust (*Puccinia hordei* Otth). *Theor. Appl. Genet.*, 97: 1235–1239.
- Kraus I., Špunarová M. (1998): Identifikace (DNA fingerprinting) odrůd ječmene a rozpracovaného šlechtitelského materiálu pro využití ve šlechtění a sladařském průmyslu. [Výroční zpráva projektu EP 7283.] Brno, VÚPS.
- Kraus I., Špunarová M., Hartman J. (1999): The effective set of primers for identification of malting barley varieties grown in Czech Republic and genetic diversity of these varieties. *J. Inst. Brewing* (v tisku).
- Lee S. J., Penner G. A. (1997): The conversion of RFLP markers to allele specific amplicons linked to QTLs governing malting quality in barley. *Mol. Breeding*, 3: 457–462.
- Manninen O. M., Turpeinen T., Nissila E. (1997): Identification of RAPD markers closely linked to the *mlo*-locus in barley. *Plant Breeding*, 116: 461–464.
- Paltridge N. G., Collins N. C., Bendahmane A., Symons R. H. (1998): Development of YLM, a codominant PCR marker closely linked to the *Yd2* gene for resistance to barley yellow dwarf disease. *Theor. Appl. Genet.*, 96: 1170–1177.
- Poulsen D. M. E., Johnston R. P., Henry R. G. and Irwin J. A. G. (1996): Molecular markers: their potential use to barley breeding in north-east Australia. In: *Proc. VII IBGS, Saskatoon, Vol. 1: 289–291*.
- Richter K., Schondelmaier J., Jung C. (1998): Mapping of quantitative trait loci affecting Drechslera teres resistance in barley with molecular markers. *Theor. Appl. Genet.*, 97: 1225–1234.
- Schwarz G., Michalek W., Mohler V., Wenzel G., Jahoor A. (1999): Chromosome landing at the *Mla* locus in barley (*Hordeum vulgare* L.) by means of high-resolution mapping with AFLP markers. *Theor. Appl. Genet.*, 98: 521–530.
- Špunar J. (1979): Metody urychlení šlechtitelského procesu u obilovin. *Stud. Inform. ÚVTIz. Rostl. Vyr.*, č. 2. 64 s.
- Vejl P. (1997): Polymerázová řetězová reakce. Česká zemědělská univerzita Praha. 64 s.
- Weising W. H., Wolff K., Meyer W. (1995): Applications of DNA fingerprinting in plants and fungi. In: *DNA Fingerprinting in plants and fungi*. Boca Raton, CRC Press: 171–191.
- Weyen J., Bauer E., Graner A., Friedt W. and Ordon F. (1996): RAPD tagging of barley chromosome 3L with spe-

cial consideration of the BaMMV/BaYMV resistance gene ym4. In: Proc. VII IBGS, Saskatoon, Vol. 1: 307–309.

William M., Dorocizc I. and Kasha K. J. (1997): Use of microsatellite DNA to distinguish malting and nonmalting barley cultivars. J. Am. Soc. Brew. Chem., 55: 107–111.

Williams J. G. K., Kubelik A. R., Liva K. J., Rafalski J. A., Tingey S. V. (1990): DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucl. Acids Res., 18: 6531–6535.

Došlo 11. 11. 1999

---

*Kontaktní adresa:*

Ing. Marie Š p u n a r o v á, CSc., Zemědělský výzkumný ústav Kroměříž, s. r. o., Havlíčkova 2787, 767 41 Kroměříž, Česká republika, tel.: 0634/31 71 82, e-mail: spunarova@vukrom.cz

---

# Z VĚDECKÉHO ŽIVOTA

## Lucerne and Medics for the XXI Century

Pod výše uvedeným názvem se ve dnech 13. až 16. září 1999 konalo v italském městě Perugia již XIII. zasedání Eucarpia – Medicago Group. Jednání konference v mnohém navazovalo na předchozí setkání této pracovní skupiny, uskutečněné v roce 1996 v Brně a Troubsku. Organizátoři v čele s prof. Veronesim vytvořili účastníkům konference příjemné pracovní prostředí.

Jednání konference bylo rozděleno do čtyř sekcí, ve kterých zaznělo více než 25 referátů a koreferátů a bylo prezentováno přes 40 posterových sdělení. Konference se zúčastnilo 50 vědeckých a výzkumných pracovníků a šlechtitelů nejen z evropských zemí, ale i z USA, Kanady, Japonska a dalších mimoevropských zemí. Odborná náplň jednotlivých sekcí byla zaměřena na aktuální trendy ve šlechtění i využívání vojtěšky i dalších druhů rodu *Medicago*.

V první sekci věnované hodnocení odrůd a genových plazem byly mimo jiné uvedeny výsledky z různých evropských lokalit dokumentující nejen význam vojtěšky, ale také její velkou plasticitu a vhodnost i do extrémních podmínek. Do této sekce byl zařazen i příspěvek Ing. Jiřího Babince, CSc., z firmy AGROGEN Troubsko, přibližující výsledky směšného pěstování vojtěšky s travami a jetelem lučním.

Druhá sekce byla věnována genetice a šlechtění. Vedle některých klasických přístupů ke tvorbě nového materiálu (např. vícesečnost, tolerance k zasolení apod.) zaujal především příspěvek prof. Ing. Oldřicha Chloupka, DrSc. (MZLU Brno), o selekci na velikost kořenového systému a samozřejmě i příspěvky o tvorbě transgenických odrůd vojtěšky. V této oblasti lze začátkem příštího století očekávat povolení prvních transgenických odrůd s vnesenými novými vlastnostmi (např. zvýšená tvorba enzymů, rezistence k biotickým činitelům, tolerance k abiotickým stresům). Především komerční výzkum šlechtitelských a semenářských firem zaznamenává v této oblasti rychlý vývoj. V posterové části této

sekce byl prezentován příspěvek autora tohoto sdělení ve spolupráci s RNDr. M. Smolíkové s výsledky identifikace odrůd vojtěšky pomocí RAPD markerů.

Picininářská kvalita a využití vojtěšky byly tématem třetí sekce. Mimo příspěvky zaměřené na možnosti selekce materiálu s vyšší stravitelností či rychlejší degradací proteinů vyvolal diskusi příspěvek italských autorů, shrnující poznatky o dehydrataci vojtěšky. Systém sušení vojtěškové biomasy a výroba granulovaných či balíkových produktů má nejen v Itálii, ale také ve Francii a Španělsku velkou tradici. Diskutabilní je především ekonomika takové výroby. Italští kolegové nejen na konferenci, ale i při následné návštěvě jedné z dehydratačních továren potvrdili, že bez relativně vysokého příspěvku ze zdrojů Evropské unie by taková výroba nebyla možná.

Poslední sekci věnovanou méně tradičním druhům z rodu *Medicago* uvedl přednáškou výkonný sekretář North American Alfalfa Improvement Conference (NAAIC) Dr. Bauchan. Široké využití jednoletých druhů *Medicago* v USA je inspirací i pro Evropu.

Na závěrečném business meetingu byl zvolen nový výbor této pracovní skupiny. Předsedou se stal Dr. Huyghe z INRA Lusignan, místopředsedy paní Scotti z Itálie a prof. Chloupek z ČR. Členové pracovní skupiny vyjádřili zájem o otevřenou spolupráci se všemi zájemci o danou skupinu plodin. Navázaná spolupráce mezi evropskými odborníky a jejich kolegy ze zamoří sdruženými v NAAIC může přispět k prohloubení znalostí o těchto zemědělsky důležitých plodinách.

Při návštěvě experimentálních stanic, šlechtících vojtěšku, jsme se s kolegy z České republiky znovu přesvědčili nejen o poněkud odlišných šlechtitelských a manažerských přístupech při tvorbě nových odrůd, ale i o tom, že úroveň českého šlechtění a semenářství i celková úroveň technologie pěstování v ničem nezaostává za evropským standardem.

RNDr. Jan Nedělník, PhD.

Výzkumný ústav picininářský, spol. s r. o., Troubsko

# DETEKCE POLYMORFISMU DNA U BRAMBOR TECHNIKOU RAPD<sup>\*</sup>

## DETECTION OF DNA POLYMORPHISM IN POTATO CULTIVARS USING RAPD TECHNIQUE

H. Polzerová, J. Ptáček

*Potato Research Institute, Ltd., Havlíčkův Brod, Czech Republic*

**ABSTRACT:** The RAPD procedure was used to study genetic diversity of 30 potato (*Solanum tuberosum*) genotypes, representing mainly Czech potato cultivars. Genomic DNA was isolated by five methods and these techniques were compared. These DNA were used as template in RAPD amplification and no variations in the banding patterns were found between reactions made from various DNA extractions. Some variations between RAPD products were observed when different DNA polymerases were used. Therefore, it's necessary to focus on this problem during optimization of RAPD procedure. Amplification with six decamer primers generated 66 DNA fragments, ranging in size from 178 bp to 1847 bp, of which 46 were polymorphic products. The similarities of RAPD profiles were estimated by the Jaccard's coefficient and then the data were processed by cluster analysis (UPGMA). Each genotype was identified and distinguished from the others. Our results indicate that RAPD technology is a rapid technique usable for identification of potato genotypes.

**Keywords:** potato; *Solanum tuberosum*; DNA polymorphism; RAPD; cultivar identification

**ABSTRAKT:** Genetická diverzita 30 genotypů bramboru (*Solanum tuberosum*), reprezentujících převážně české odrůdy, byla hodnocena pomocí techniky RAPD. Amplifikací se šesti dekamerickými primery bylo vytvořeno 66 fragmentů DNA, z toho 46 bylo polymorfních. Velikost amplifikačních produktů se pohybovala v rozmezí od 178 do 1847 bp. K hodnocení podobnosti RAPD profilů byl využit Jaccardův koeficient, a takto získaná data byla dále postoupena klastrové analýze (UPGMA). Každý genotyp byl identifikován a rozlišen od ostatních. Naše výsledky naznačují, že metoda RAPD je rychlá technika, která by se mohla využívat při identifikaci genotypů brambor.

**KLÍČOVÁ SLOVA:** brambory; *Solanum tuberosum*; polymorfismus DNA; RAPD; identifikace odrůd

### ÚVOD

Současný sortiment odrůd brambor povolených v ČR zahrnuje 91 odrůd, z toho je 30 odrůd českých. Tyto odrůdy jsou popsány pomocí morfologických a hospodářských znaků. Pro přesnou a rychlou identifikaci neznámého vzorku se však tato charakteristika ukazuje jako nedostatečná. S pokroky v molekulární biologii je zaváděna řada molekulárních a biochemických technik, které se staly účinným nástrojem stanovení genetické rozdílnosti a umožňují proto charakterizaci genotypů. Mezi prvními byly vyvinuty techniky založené na polymorfismu proteinů. Nevýhodou analýzy polymorfismu zásobních bílkovin a izoenzymů je to, že jsou dostupné pouze pro limitované množství genů a jsou ovlivněné vývojovým stadiem rostliny (Desborough, Piloquin, 1968). Dalšími technikami, u nichž je identifikace genotypu založena již na DNA markerech, jsou techniky RFLP (restriction fragment length polymorphism) a AFLP (amplified fragment length polymorphism). Analýza polymorfismu restričních fragmentů (RFLP) vyžaduje re-

lativně velké vzorky a otestování je technicky i časově velmi náročné (Gebhardt *et al.*, 1989). Podobně analýza polymorfismu délky amplifikovaného fragmentu je materiálově poměrně náročná a navíc je patentem firmy Keygene (Holandsko), což dovoluje její použití pouze pro laboratorní a vědecké účely. Další účinná a značně rozvíjená je technika analýzy mikrosatelitních sekvencí nebo též jednoduchých repetitivních sekvencí (SSR). Jedná se o krátké sekvence jednoho až pěti nukleotidů, které se tandemově opakují a jsou rovnoměrně rozptýleny v eukariotickém genomu. Tyto sekvence s kodo-  
minantní dědičností se vyznačují hojností a polymorfismem, který spočívá ve variabilním počtu repetitivních elementů. Tento přístup je založen na metodě PCR (polymerase chain reaction) a vyžaduje proto znalost sekvence DNA, aby bylo možné navrhnout příslušné primery (Ramel, 1997).

S těmito limitujícími faktory se nesetkáme při použití techniky RAPD (random amplified polymorphic DNA), která je založena na amplifikaci genomové DNA metodou PCR za použití krátkých oligonukleotidů (ob-

\* Tato problematika byla řešena s podporou NAZV, č. projektu: EP 9111 (program I – Podnikatelsky využitelný výzkum).

vykle dekamerů) náhodné sekvence. Výsledkem tohoto procesu je vznik různých amplifikačních produktů, které tvoří na elektroforeogramu charakteristický obraz, a ten je možné hodnotit (Penner, 1996). Variabilita zjištěná pomocí RAPD je poměrně vysoká – bez znalosti sekvence se analyzuje velký počet lokusů v jednom vzorku, přičemž dědičnost analyzovaných znaků je dominantní. Výhodou metody je bezesporu snadnost, rychlost a technická nenáročnost. Zřejmě proto je metoda hojně využívána při identifikaci a studiu genomů různých druhů kulturních rostlin, např. rýže (Martin *et al.*, 1997), rajčat (Rom *et al.*, 1995), pšenice (Zhang *et al.*, 1996), fazolí (Bai *et al.*, 1997), mrkve (Nakajima *et al.*, 1997) a jiných. U druhu *Solanum tuberosum* je metoda používána a rozvíjena řadu let. Mezi první publikace o úspěšném využití RAPD při identifikaci odrůd je možné zařadit práce autorů Demeke *et al.* (1993) nebo Hosaka *et al.* (1994) a brzy poté se „fingerprinting“ stává součástí celkové charakteristiky nově zavážených odrůd (Lynch *et al.*, 1994). Metodu využili Paz a Veilleux (1997) při studiu genetické vzdálenosti mezi genotypy monoploidů odvozených od *S. phureja* a diploidními heterozygotními „otcovskými“ rostlinami. Rasmussen *et al.* (1997) použili RAPD analýzu k charakterizaci interspecifických asymetrických hybridů rodu *Solanum*. Mandolino *et al.* (1996) se zabývali stabilitou charakteristiky RAPD u bramboru srovnáváním výsledků získaných u hlíz a mikrohlízek. U mikrohlízek autoři pozorovali odchylku (1 band) od výsledků získaných u hlíz. Tento rozdíl vysvětlují jako možnou variaci specifickou pro mikrohlízky.

V podmínkách naší republiky dosud nebyly tyto metody u brambor propracovány natolik, aby se mohly rutinně využívat v praxi. Přitom je identifikace pomocí genetických markerů velmi žádaná. Naše studie poskytuje protokol pro rutinní provedení RAPD reakce a naše zkušenosti s touto metodou, které jsme získali testováním 30 odrůd brambor.

## MATERIÁL A METODY

### Rostlinný materiál

Polymorfismus DNA jsme zjišťovali u 30 odrůd registrovaných v ČR:

- velmi rané: Karmela, Koruna, Krasa, Krystala, Satina, Vera, Rosara a Impala
- rané: Karin, Kobra, Kreta, Veronika, Vilma, Secura a Dali
- polorané: Keřkovské rohlíčky, Korela, Krista, Tara Velox, Vladan, Granola a Folva
- polopozdní: Amylex, Javor, Ornella, Pacov, Zlata, Saturna a Asterix.

### Izolace DNA

DNA byla extrahována z nadzemních částí rostlin (*in vitro*, skleník, pole) a z hlíz. Bylo při tom porovnáváno pět různých postupů izolace DNA:

- izolace genomové DNA podle autorů Saghai-Marouf *et al.* (1984), která využívá cetyltrimetylamonium bromid (CTAB) k extrakci DNA a RNázu k odstranění RNA a ssDNA;
- metoda izolace DNA podle autorů Demeke *et al.* (1993), která využívá podobný princip (s drobnými odchylkami) jako metoda (1) a je optimalizovaná pro menší objemy výchozího materiálu;
- izolace genomové DNA podle autorů Deragon *et al.* (1992), využívající celulázu a maceráciu k narušení buněčné stěny, DNA je po lyzi buněk vysrážena amonium acetátem a isopropanolem;
- Plant DNA Isolation Kit (Boehringer Mannheim);
- Dneasy Plant Mini Kit (Qiagen).

### Metoda RAPD

Amplifikační reakce byla uskutečněna v objemech 25  $\mu$ l a obsahovala 200 ng templátové DNA, 200  $\mu$ M každého nukleotidu dATP, dCTP, dGTP a dTTP (Sigma), 3,2  $\mu$ M primeru (IDT – Integrated DNA Technologies, Inc.), 1x DyNAzyme<sup>TM</sup> II polymerázový reakční pufr (10mM Tris-HCl, pH 8,8 při 25 °C, 1,5mM MgCl<sub>2</sub>, 50mM KCl a 0,1% Triton X-100), 0,7 U DyNAzyme<sup>TM</sup> II polymerázy (Finnzymes).

Reakce RAPD probíhala v termocyklieru PTC-100, kde byl naprogramován tento průběh reakce: počáteční denaturace 3 min při 94 °C, následovalo 41 cyklů 1 min při 94 °C, 1 min 40 s při 37,5 °C a 2 min při 72 °C; závěrečným krokem bylo 10 min při 72 °C a následně chlazení na 4 °C. Použité primery jsou uvedeny v tab. 1.

Elektroforéza byla provedena v 1,2% agarózovém gelu, který obsahoval 0,25  $\mu$ g/ml ethidium bromidu.

### Statistické vyhodnocení

Data byla získána určením přítomnosti (1) či absence (0) produktu RAPD na gelu. Podobnost takto popsanych odrůd byla počítána pomocí Jaccardova koeficientu

Tab. 1. Sekvence použitých primerů a výsledky amplifikace DNA z 30 vybraných odrůd brambor – Sequences of the used primers and results of DNA amplification of 30 selected potato cultivars

Primer <sup>1</sup>	Sekvence <sup>2</sup> 5' - 3'	Počet bandů <sup>3</sup>	
		celkem <sup>4</sup>	polymorfních <sup>5</sup>
308	AGCGGCTAGG	12	8
131	GAAACAGCGT	9	8
184	CAAACGGCAC	13	8
SC10-4	TACCGACACC	14	8
P71	GCATCTACGC	8	6
P72	CGGCCACTGT	10	8

308, 131, 184 (Demeke *et al.*, 1993); SC10-4 (Waugh *et al.*, 1992); P71 a P72 jsou náhodně zvolené sekvence – P71 and P72 are random chosen sequences

<sup>1</sup>primers, <sup>2</sup>sequence, <sup>3</sup>bands scored, <sup>4</sup>total, <sup>5</sup>polymorphic

Tab. 2. Porovnání metod izolace DNA – Comparison of the methods used for DNA isolation

Metoda	Saghai-Marooif	Demeke <i>et al.</i>	Deragon <i>et al.</i>	Dnaesy plant mini kit (QIAGEN)	Plant DNA isolation kit (Boehringer – Mannheim)
1. Nutná návážka	2,5 g	0,6 g	≤ 100 mg	≤ 100 mg	≤ 100 mg
2. Průměrné množství izolované DNA na 1 g rostlinné tkáně	121,6 µg	166,7 µg	velmi nízká	188 µg	310 µg
3. Procento případů čistoty 1,7–1,9 ( $A_{260}/A_{280}$ )	55	100	–	85	85
4. Kvalita	vysokomolekulární jaderná a plazmidová DNA bez přítomnosti nízkomolekulární složky	vysokomolekulární jaderná a plazmidová DNA, vyšší koncentrace jaderné DNA ve srovnání s ostatními použitými metodami	–	vysokomolekulární jaderná a plazmidová DNA	vysokomolekulární jaderná a plazmidová DNA, ovšem velké množství nízkomolekulární balastové DNA
5. Izolace z hlíz	možná	možná	není možná	možná	možná
6. Časová náročnost	tři dny	tři dny	tři dny	2,5–3 h	3–3,5 h

1. Necessary weight of plant tissue
2. Average amount of isolated DNA from 1 g plant material
3. % cases of purity between 1.7–1.9 ( $A_{260}/A_{280}$ )
4. Quality: high molecular weight genome and plasmid DNA by using each method was isolated, but in sample isolated by Plant DNA isolation kit sharing was evident
5. Isolation of DNA from tubers: in all cases except the method developed by Deragon *et al.* isolation was possible
6. Time requirement: three days for Saghai-Marooif, Demeke *et al.*, Deragon *et al.*; 2.5–3 h for Dnaesy plant mini kit (Qiagen), 3–3.5 for Plant DNA isolation kit (Boehringer – Mannheim)

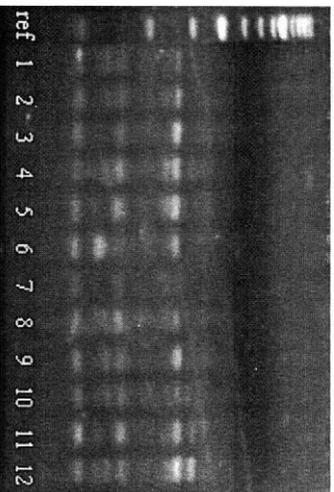
(1908). Na základě těchto výsledků byla provedena klastrová analýza pomocí UPGMA metody (unweighted pair group average). Statistické výpočty byly uskutečňeny pomocí softwaru SPSS Base+.

#### VÝSLEDKY A DISKUSE

Porovnání metod izolace DNA je shrnuto v tab. 2. Je možné konstatovat, že mezi těmito přístupy nejsou výrazné rozdíly v kvalitě izolované DNA a ve výtečnosti, s výjimkou metody podle autorů Deragon *et al.* (1992), která se vyznačuje velmi nízkou vytečností. Kromě toho je tato metoda značně pracná, poměrně nákladná a neumožňuje izolaci DNA z hlíz. Takto izolovaná DNA nebyla dále využívána. DNA izolovaná ostatními metodami byla použita jako substrát pro amplifikaci pomocí PCR, nebyla však zjištěna žádná variabilita v produktech RAPD. Ke stejnému závěru dospěli i Samec a Našinec (1996). Na základě všech těchto výsledků se nám jako nejvhodnější jeví kit firmy Qiagen (dobrá kvalita DNA, časová nenáročnost). Tento způsob izolace byl používán v další práci.

Polymorfismus byl pozorován u vybraných 30 kultivarů při amplifikaci DNA pomocí kiterhokoliv ze šesti primerů použitých v této studii (tab. 1). Velikost amplifikovaných DNA fragmentů se pohybovala v rozmezí 178 až 1 847 párů bází. Primery SC10-4 a P72 vedly k nejvyššímu polymorfismu a každý z nich jednoduše rozlišil 15 odrůd (obr. 1). Primer 308 rozlišil 10 odrůd a použitý primer 131 umožnilo identifikovat 8 kultivarů. Primery SC10-4 a P72 společně rozlišily 29 vybraných odrůd (obr. 2). Sada náhodně vybraných primerů do reakce RAPD je schopna rozlišit uvedené odrůdy, z čehož vyplývá značný potenciál této metody pro rozlišování a identifikaci odrůd bramboru.

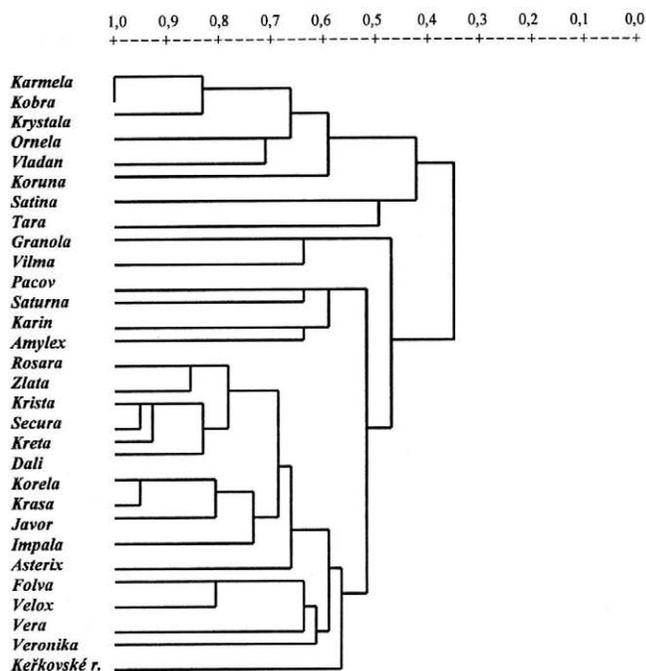
Ačkoli některé primery produkují většími bandů nových (např. P71), produkty reakce RAPD za použití



Obr. 1. Ukázka výsledku RAPD reakce primeru P72 – Amplification of genomic DNA from 12 potato genotypes with primer P72

1 – Vera, 2 – Karin, 3 – Anyalex, 4 – Rosara, 5 – Impala, 6 – Keřovské rohličky, 7 – Pacov, 8 – Korla, 9 – Javor, 10 – Krasa, 11 – Saturna, 12 – Asteria, ref – Imunositní marker (250 bp ladder) 1–12 – potato cultivars, ref – weight marker (250 bp ladder)

Podobnost Jaccardových koeficientů



Obr. 2. Odlíšení odrůd pomocí primerů SC10-4 a P72 – Distinction of potato cultivars using primers SC10-4 and P 72

Dendrogram sestavený z 30 vybraných odrůd byl vytvořen pomocí metody UPGMA (unweighted pair-group method with arithmetical averages), podkladem pro jeho sestavení byla podobnostní matice vypočítaná s využitím Jaccardova koeficientu. Dendrogram ukazuje podobnost RAPD profilů jednotlivých genotypů, které byly vytvořeny za využití primerů SC10-4 a P72 – Dendrogram of 30 selected potato cultivars constructed using UPGMA (unweighted pair-group method with arithmetical averages) based on similarity matrix of Jaccard's coefficients. The dendrogram shows the similarity of RAPD's profile of selected genotypes, which were produced by using SC10-4 and P72 primers  
Scale above is the similarity of Jaccard's coefficients

jiných primerů (např. SC10-4, P72, 308) jsou značně polymorfni a vhodné pro identifikaci. Celkem bylo s použitím šesti primerů amplifikováno 66 produktů, z toho 46 bylo polymorfních. Většina polymorfních, náhodně amplifikovaných produktů může být tvořena u jednoho nebo více kultivarů. Skutečnost, že polymorfni produkt byl přítomen pouze v jednom případě, se v našich datech nevyskytovala. Nejnižší sledovaný počet produktů se rovnal šesti u primeru SC10-4 (fragment o velikosti 898 pb) a poměrně častým jevem byla nepřítomnost pouze jednoho bandu. Například u primeru SC10-4 byl tímto bandem u odrůdy Asterix produkt o velikosti 341 pb, dále byl tento jev pozorován u odrůdy Folva za použití primeru 308 (224 pb) nebo u odrůdy Zlata a primeru 131 (233 pb).

Co se týče přesnosti a reprodukovatelnosti výsledků, je možné říci, že ve většině případů byly výrazné produkty opravdu stabilní. Nicméně je nutné podotknout, že jsme se u některých primerů setkali s určitou variabilitou (jednalo se zejména o produkty extrémních velikostí, pod 250 pb a nad 1500 pb), která se projevila buď mizením některých produktů při následném opakování, nebo změnou spektra amplifikovaných produktů (tzn. amplifikovaly se vždy shodné produkty, ale různé intenzivně, což se projevilo změnou celkového vzhledu gelu po obarvení). Výrazně se to projevilo u primeru 131. Na tento problém naráží ve svých pracích řada autorů, např. van Eck *et al.* (1995), Demeke *et al.* (1993) nebo Hallden *et al.* (1996). Tento jev je vysvět-

lován méně efektivní amplifikací sekundárních a terciálních produktů, což může být následek chybného nasazení nebo slabší vazby primerů v úvodu reakce k jednomu či více místům, a tak je ovlivněn celý průběh reakce (Demeke *et al.*, 1993). Nicméně tento jev může být minimalizován standardizací procesu a precizním provedením. Jak vyplynulo z našich zkušeností, podstatnou úlohu v této problematice hraje použitá polymeráza, a proto je nutné se při standardizaci na tuto problematiku zaměřit.

Závěrem, po otestování části spektra povolených odrůd v ČR se zaměřením na české odrůdy, je možno konstatovat, že rozlišování odrůd pomocí RAPD se ukazuje jako možné.

#### Poděkování

Naše poděkování patří Mgr. Pavlu Lízalovi za spolupráci při statistickém hodnocení.

#### LITERATURA

- Bai Y. H., Michels T. E., Pauls K. P. (1997): Identification of RAPD markers linked to common bacterial blight resistance in *Phaseolus vulgaris* L. Genome, 40: 544–551.  
Demeke T., Kawchuk L. M., Lynch D. R. (1993): Identification of potato cultivars and clonal variants by random amplified polymorphic DNA analysis. Am. Pot. J., 70: 561–570.

- Deragon J. M., Landry B. S. (1992): RAPD and other PCR-based analyses of plant genomes using DNA extracted from small leaf disks. *PCR Met. and Appl.*, *1*: 174–180.
- Desborough S., Piloquin S. J. (1968): Potato variety identification by use of electrophoretic parents of tuber proteins and enzymes. *Am. Potato J.*, *45*: 220–229.
- Gebhardt C., Blomendahl C., Schachtschabel U., Debener T., Salamini F., Ritter E. (1989): Identification of 2a breeding lines and 4a varieties of potato (*Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum*) with RFLP-fingerprints. *Theor. Appl. Genet.*, *78*: 16–22.
- Hallden C., Hansen M., Nilsson N. O., Hjerdin A., Sall T. (1996): Competition as a source of errors in RAPD analysis. *Theor. Appl. Genet.*, *93*: 1185–1192.
- Hosaka K., Mori M., Ogawa K. (1994): Genetic relationships of Japanese potato cultivars assessed by RAPD analysis. *Am. Pot. J.*, *71*: 535–546.
- Jaccard, P. (1908): Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bull. Soc. Vaud. Sci. Nat.*, *44*: 223–227.
- Lynch R., Schaupmeyer C., Kawchuk L. M., Tarn T. R., Rex B., Holley J., Waterer D., Panford J., Pritchard M. K. (1994): Ac Ptarmigan: An early maturing potato cultivar with good chipping and fresh market quality. *Am. Pot. J.*, *71*: 387–393.
- Mandolino G., De Marco S., Faeti V., Bagatta H., Carboni A., Ranalli P. (1996): Stability of fingerprints of *Solanum tuberosum* plants derived from conventional tubers and vitrotubers. *Plant Breed.*, *115*: 439–444.
- Martin C., Juliano A., Newberry H. J., Lu B. K., Jakson H. T., Fordlloyd B. V. (1997): The use of RAPD markers to facilitate the identification of *Oryza* species within a germplasm collection. *Genet. Res. Crop. Evol.*, *44*: 175–186.
- Nakajima Y., Yamamoto T., Oeda K. (1997): Genetic variation of mitochondrial and nuclear genomes in carrots revealed by random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Euphytica*, *95*: 259–267.
- Paz M. M., Veilleux R. E. (1997): Genetic diversity based on randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) and its relationship with the performance of diploid potato hybrids. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, *122*: 740–747.
- Penner G. A. (1996): RAPD analysis of plant genomes. In: Jauhar P. P. (ed.): *Methods of genome analysis in plants*. Florida 33481, USA, Boca Raton: 251–268.
- Ramel C. (1997): Mini and microsatellites. *Environ. Health. Perspect.*, *105*: 781–789.
- Rasmussen J. O., Waara S., Rasmussen O. S. (1997): Regeneration and analysis of interspecific asymmetric potato – *Solanum* ssp. hybrid plants selected by micromanipulation or fluorescence-activated cell sorting (FACS). *Theor. Appl. Genet.*, *95*: 41–49.
- Rom M., Bar M., Rom A., Pilowsky M., Gidoni D. (1995): Purity control of F-1 hybrid tomato cultivars by RAPD markers. *Plant Breed. Z. Pfl.-Zücht.*, *114*: 188–190.
- Samec P., Našinec V. (1996): The use of RAPD technique for the identification and classification of *Pisum sativum* L. genotypes. *Euphytica*, *00*: 1–5.
- Saghai-Marooif M. A., Soliman K. M., Jorgensen R. A., Allard R. W. (1984): Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics. *Proc. National Acad. Sci. USA*, *81*: 8014–8018.
- Van Eck H. J., van der Voort J. K., Draaistra J., van Zandvoort P., van Enckevort E., Segers B., Peleman J., Jacobsen E., Helder J., Bakker J. (1995): The inheritance and chromosomal localisation of AFLP markers in a non-inbred potato offspring. *Mol. Breed.*, *1*: 397–410.
- Waugh R., Baird E., Powell W. (1992): The use of RAPD markers for the detection of gene introgression in potato. *Plant Cell Rep.*, *11*: 466–469.
- Zhang X. Y., Dong Y. S., Wang R. R. C. (1996): Characterization of genomes and chromosomes in partial amphiploids of the hybrid *Triticum aestivum* x *Thinopyrum ponticum* by in situ hybridization, isozyme analysis, and RAPD-PCR. *Plant Sci.*, *121*: 39–46.

Došlo 4. 11. 1999

---

*Kontakní adresa:*

Mgr. Hana Polzerová, Výzkumný ústav bramborářský, Dobrovského 2366, 580 01 Havlíčkův Brod, Česká republika, tel.: 0451/46 62 22, fax: 0451/215 78

---

## Významné životní jubileum Ing. Ivo Bareše, DrSc.



Dne 2. března 2000 se dožívá významného životního jubilea 75 let nestor a zakladatel výzkumu genových zdrojů u nás Ing. Ivo Bareš, DrSc., vedoucí vědecký pracovník Výzkumného ústavu rostlinné výroby v Praze-Ruzyni, kde pracuje od roku 1951 až do současné doby.

Již před nástupem do VÚRV pracoval na

pokusných polích Státních výzkumných ústavů zemědělských v Doksanech nad Ohří. Ve VÚRV se zpočátku zaměřil na genové zdroje u obilnin a luskovin a od roku 1961 se soustředil převážně na pšenici. Od roku 1955 jako předseda Národní rady pro světové sortimenty kulturních rostlin při VÚRV koordinoval výzkum této problematiky ve všech specializovaných ústavech v Československu. V letech 1964–1966 byl vedoucím oddělení genetických zdrojů a taxonomie v odboru genetiky a šlechtění. Všestranné zhodnocení genetických zdrojů pšenice, mj. z hlediska genealogie, biologických znaků a využití u nás, bylo také tématem jeho úspěšně obhájené kandidátské (1963) i doktorské (1985) disertační práce.

U jubilanta byla oceňována jeho úzká spolupráce se šlechtitelskou a zemědělskou praxí. Rozhodujícím způsobem tak ovlivňoval využívání vybraných zdrojů pro šlechtění i pro přímé využití v prvovýrobě. Podílel se

tak na zavádění zahraničních odrůd do praxe i jako spoluautor na vyšetření řady našich odrůd pšenice a luskovin.

Ing. Ivo Bareš, DrSc., má velkou zásluhu na tom, že se ve VÚRV podařilo v roce 1988 vybudovat národní genovou banku. V souvislosti s tím byl autorem koncepce dlouhodobého skladování genových zdrojů, vybuvoval základy informačního systému genových zdrojů, opakovaně publikoval rozsáhlé indexy seminum a podílel se na vydání celkem 23 klasifikátorů. Ing. Ivo Bareš, DrSc., publikoval téměř 200 původních vědeckých a odborných článků a několik knižních publikací. Zasloužil se výrazně o rozvoj mezinárodní spolupráce při studiu a využití genových zdrojů. Dlouhá léta pracoval v odboru rostlinné výroby ČSAZ, vedl komisi genetiky a šlechtění, byl členem několika redakčních a šlechtitelských rad, státní odrůdové komise a členem vědeckých rad několika ústavů. Jeho práce v ČSAZ byla také oceněna několika plaketami a čestnými uznáními. Bohatá byla i jeho pedagogická činnost v Institutu tropického a subtropického zemědělství České zemědělské univerzity v Praze i výchova nových vědeckých pracovníků.

Úspěšná činnost Ing. Ivo Bareše, DrSc., zasahovala i do jiných oblastí rostlinné výroby a dodnes jsou výsledky jeho práce oceňovány jak doma, tak i v zahraničí. Stal se tak uznávanou vědeckou osobností. Výsledky jeho výzkumné práce významným způsobem ovlivnily u nás studium genetických zdrojů kulturních rostlin. Patří právem mezi přední pracovníky našeho zemědělského výzkumu.

Do dalších let života mu jménem všech kolegů a přátel přejeme hodně zdraví a tvůrčí energie.

*Doc. Ing. František Vrkoč, DrSc.*

## GENETICKÁ TRANSFORMACE PÍCNÍCH A TRÁVNÍKOVÝCH TRAV

### GENETIC TRANSFORMATION OF FODDER AND AMENITY GRASSES

J. Janeček<sup>1</sup>, L. Ohnoutková<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Plant Breeding Station, Hladké Životice, Czech Republic

<sup>2</sup> Institute of Experimental Botany, Academy of Sciences of the Czech Republic, Olomouc, Czech Republic

**ABSTRACT:** Current grass plant breeding is focused on looking for new sources of genetic variability to establish new varieties with improved agronomic characters. Essential and sufficient sources are listed varieties, ecotypes and land races, interspecific and intergeneric hybridisation in many grass species. Genetic transformation is a new way to change grass genome by introgression of genes from distant or not related grass species or foreign genes. Agrobacterium mediated transformation of recalcitrant monocotyledonous species, forage and amenity grasses included, was not possible but in the last ten years an alternative transformation procedure has been developed. The first step for genetic transformation is development of an efficient regeneration system from embryogenic protoplast or suspension cultures for each grass species. These systems have been developed for *Lolium perenne*, *L. multiflorum*, *L. temulentum*, *Festuca pratensis*, *F. rubra* and *F. arundinacea*, *Dactylis glomerata* and *Agrostis palustris* during the last ten years. Recent grass transformation programmes have been based on development of protocols for incorporation of reporter and selection genes (*gus A*, *bar*, *hpt*, *kanamycin*, *luc*), but not yet for genes with agronomic importance (Table I).

**Keywords:** grasses; fodder and amenity grasses; genetic transformation; resistance; selection; *Lolium*; *Festuca*; *Agrostis*; *Dactylis*

**ABSTRAKT:** Literární přehled o genetické transformaci pícních a trávnickových trav uvádí současný stav využití genetických transformací u některých hlavních pícních druhů, zejména jílku mnohokvětého a vytrvalého (*Lolium perenne*, *L. multiflorum*), kostřavy luční, červené a rákosovité (*Festuca pratensis*, *F. rubra* a *F. arundinacea*), a u srhy (*Dactylis glomerata*) a u trávnickových trav, zejména u jílku vytrvalého (*Lolium perenne*), kostřavy červené a rákosovité (*Festuca rubra*, *F. arundinacea*) a psinečku bahenního (*Agrostis palustris*). Jsou uvedeny hlavní šlechtitelské cíle a skupiny genů, které by pomoci genetických manipulací tyto cíle mohly v budoucnu naplnit. Přehled uvádí doposud užívané metody a způsoby genetické transformace trav a výsledky, jakých bylo dosaženo.

**Klíčová slova:** trávy; pícní a trávnickové trávy; genetická transformace; transgenozie; rezistence; selekce; *Lolium*; *Festuca*; *Agrostis*; *Dactylis*

#### ÚVOD

Trávy jsou mimořádně důležitou složkou vegetačního krytu a zemědělsky využívané krajiny. Nejdůležitějšími zemědělsky i nezemědělsky využívanými druhy jsou v současnosti jilek mnohokvětý (*Lolium multiflorum*), jilek vytrvalý (*L. perenne*), kostřava luční, červená a rákosovitá (*Festuca pratensis*, *F. rubra*, *F. arundinacea*), hybridy jílku a kostřavy (*Festulolium*), srha říznačka (*Dactylis glomerata*), lipnice luční (*Poa pratensis*), bojínek luční (*Phleum pratense*) a psinečky (*Agrostis sp.*). Současné šlechtění trav je podle způsobu

využití jednotlivých druhů zaměřeno dvěma směry – na šlechtění pícních odrůd trav a trávnickových odrůd trav. U pícních trav je hlavním cílem šlechtění tvorba výnosově stabilních odrůd s vysokou stravitelností a konverzí živin, vytrvalostí a odolností k biotickým a abiotickým faktorům, a to zejména u jílku, kostřavy a jejich hybridů, srhy a bojínku. Šlechtění trávnickových trav je zaměřeno na rozhodující vlastnosti nových odrůd, jako je nízká produkce biomasy, barva, hustota a pevnost dnu. Velmi důležitou vlastností je odolnost k biotickým faktorům (chorobám a škůdcům) a abiotickým stresovým faktorům (odolnost k sešlapávání, častému sese-

kávání, suchu, vlhku, zasolení apod.), zejména u jílku vytrvalého, lipnice, úzkolistých druhů kostřav a psinečků. Dokladem významnosti pícních a trávníkových trav mohou být tyto údaje: v současnosti (k 1. 7. 1999) je v LPO zapsáno 164 odrůd trav 26 druhů. Ročně se u nás vyrábí a prodá cca 6 000 až 8 000 tun osiv trav a exportuje se cca 4 500 tun trav v hodnotě 6 až 7 mil. USD. Výměra trvalých travních porostů představuje plochu 786 000 ha.

### Šlechtitelské cíle z pohledu genetických transformací

K současným perspektivám šlechtění trav patří:

**U pícních trav** je to zejména manipulace s geny, které ovlivňují:

- sezonní dynamiku výnosu, zejména geny řídící jarovizaci a kvetení, geny řídící reprodukci, zejména inkompatibilitu a apomixii, geny řídící fotosyntézu a stárnutí, distribuci asimilátů a jejich přeměnu na primární a sekundární metabolity;
- kvalitu výnosu, zejména stravitelnost a následnou konverzi živin, což souvisí se složením buněčné stěny, lignifikací a celkovým metabolismem a vhodným poměrem proteinů a cukrů, fenolických látek a jejich složením a degradací;
- reaktivitu na biotické a abiotické faktory, zejména distribuci asimilátů a jejich přeměnu v zásobní a sekundární metabolity včetně alelopatických látek, toleranci ke klimatickému stresu, zejména suchu, zimě a rezistenci k chorobám a škůdcům.

**U trávníkových druhů**, kde jsou šlechtitelské cíle diametrálně odlišné, je to manipulace s geny ovlivňujícími zejména:

- hustotu trsu, výšku růstu a toleranci k častému a nízkému sesekávání, tj. s geny ovlivňujícími tvorbu a lokalizaci ukládaných rezervních látek ve prospěch generativního růstu;
- stále zelenou atraktivní barvu a vzhled, což souvisí s geny kontrolujícími stárnutí (stay-green) listů;
- odolnost ke stresu, zejména suchu a mrazu, chorobám a škůdcům;
- odolnost k zátěži a sešlapávání, zejména listovou architekturu, formu růstu a uložení meristémů, regenerační schopnost, tvorbu odnoží, typ a obsah vlákniny, poměr hemicelulóz a lignocelulóz;
- odolnost a toleranci k herbicidům a látkám znečišťujícím životní prostředí apod.

Většina uvedených cílů však není v současnosti pomocí genového inženýrství řešitelná, a proto velmi efektivním a šlechtitelsky využívaným způsobem manipulace s geny je introgrese cizorodých genů hybridizací a v současné době pak vzdálenou hybridizací. U druhů rodu *Lolium* a *Festuca*, u kterých bylo dosaženo nejpronikavějších výsledků, je využitím DNA markerů a *in situ* hybridizace již možné přímo detekovat a selektovat rekombinované genotypy (Zwierzykowski *et al.*, 1998; Pašakinskiene *et al.*, 1999; Zeller, 1999). Metoda je spolu s indukci polyploidie široce užívána v praktickém šlechtění. Přehled o doposud vyšlechtěných odrů-

dách na základě introgrese genů vzdálenou hybridizací v České republice a zejména v Šlechtitelské stanici Hladké Životice shrnul Fojtík (1994).

Transformace a kotransformace trav však mohou umožnit mnohem cílenější manipulaci s jednotlivými geny a jejich skupinami a cizorodými geny (Vain *et al.*, 1995). Souvisí to s rozvojem molekulárněgenetických metod studia genomu trav a identifikací jednotlivých genů a jejich skupin (Hayward *et al.*, 1998; Rongli *et al.*, 1999). V neposlední řadě je to i rozvoj technik umožňujících detekci introgrese a transgenozie genů, jako jsou DNA markery, FISH a GISH, flow-cytometrie a další metody studia organizace a struktury genomu trav obecně (Jauhar, Chibbar, 1999).

### Metody používané pro vnašení cizorodé DNA u trav

Souhrn metod transformace jednoděložných plodin a jejich výsledky v minulosti shrnuli Vain *et al.* (1995), u trav Rybczynski a Kozłowska (1994) a současně poznatky a aspekty transgenozie pak Ondřej (1999). Vzhledem k tomu, že řada krytozemenných rostlin není citlivá vůči *Agrobacterium tumefaciens*, byly k vnašení klonovaných genů do trav vypracovány alternativní metody přímého a nepřímého vnašení DNA.

- U přímých metod je přenos uskutečňován pomocí:
  - polyetylglykolu (polyethylene glycol – **PEG**) – permeabilizací cytoplazmatické membrány
  - elektroporace (electroporation – **EP**) – permeabilizací cytoplazmatické membrány
  - mikroprojektilového přenosu DNA (particle bombardment – **PG**) – vstřelováním částic kovů obalových DNA
  - karbidu křemíku (silicon-carbide whiskers – **SC**) – mechanickým narušením v roztoku DNA.

- U nepřímých metod je přenos uskutečňován pomocí:
  - transformace endofyty (endophytes mediated transformation – **EM**) – transformovanými endofytními houbami
  - pomocí *Agrobacterium tumefaciens* – u pícních a trávníkových trav (zatím ve fázi experimentů).

U pícních a trávníkových trav je nejčastěji užíváným způsobem transformace trav použití PEG a PG (tab. 1). K nejnovějším způsobům genetické transformace pícních a trávníkových trav však může v brzké době patřit využití modifikovaného přenosu pomocí *Agrobacterium tumefaciens* a nesporně zajímavým způsobem transformace rostlin je využití transformovaných endofytních hub (Bacon *et al.*, 1997).

### Používané kultury a pletiva

K tomu, aby přenos DNA byl úspěšný, jsou potřebné funkční indukční i regenerační systémy, které musí být u jednotlivých druhů vypracovány. Zpravidla jsou k transformaci využívány modelové linie embryogenních suspenzí s vysokou regenerační schopností, např.

Tab. 1. Genetická transformace píceňích a trávníkových trav – současný stav – Genetic transformation of forage and amenity grasses – present state

Druh <sup>1</sup>	Transformovaný materiál <sup>2</sup>	Geny <sup>6</sup>	Plazmid <sup>7</sup>	Metoda <sup>8</sup>	Selekce <sup>9</sup>	Výsledek <sup>10</sup>	Reference
<i>Agrostis palustris</i> Huds. (Pšineček bahenní)	suspenní kultura <sup>3</sup>	<i>gusA</i> , <i>hpt</i>	?	PG	hygromycin	transgenní rostliny <sup>11</sup>	Zhong <i>et al.</i> (1993)
	suspenní kultura	<i>gusA</i> , <i>hptII</i>	pSLIO2011, pBARGUS	PG	bialaphos	transgenní rostliny	Hartman <i>et al.</i>
<i>Dactylis glomerata</i> L. (Srha říznačka)	mladé listy <sup>4</sup>	<i>gusA</i> , <i>uidA</i> , <i>bar</i> (PAT)	pAHC25	PG	bialaphos	kalus <sup>12</sup> , transgenní rostliny	Denchev <i>et al.</i> (1997)
	protoplasty <sup>5</sup>	<i>hptIV</i>	pCIB709	PEG, EP	hygromycin	transgenní rostliny	Horn <i>et al.</i> (1988)
<i>Festuca rubra</i> L. (Kostřava červená)	protoplasty	<i>gusA</i> , <i>hpt</i>	?	PEG	Basta	transgenní rostliny	Spangerberg <i>et al.</i> (1994)
	suspenní kultura	<i>gusA</i> , <i>bar</i> (PAT)	pDM803	PG	bialaphos	transgenní rostliny	Gao <i>et al.</i> (1999)
<i>Festuca pratensis</i> L. (Kostřava luční)	protoplasty	<i>hpt</i>	pGL2	PEG	hygromycin	transgenní rostliny	Wang <i>et al.</i> (1993)
<i>F. arundinacea</i> Scheb. (Kostřava rákosovitá)	protoplasty	<i>hph</i> , <i>bar</i> (PAT)	pGL2, pDHbar	PEG	hygromycin, bialaphos	transgenní rostliny	Wang <i>et al.</i> (1992)
	suspenní kultura	<i>gusA</i> , <i>hpt</i>	pZO1052	EP	hygromycin	transgenní rostliny	Ha <i>et al.</i> (1992)
	protoplasty	<i>gusA</i> , <i>hph</i>	pZO1052	EP	hygromycin	transgenní rostliny	Penmetsa, Ha (1994)
	protoplasty	<i>hph</i> , <i>bar</i>	pROB5, pGL2	PEG	hygromycin, bialaphos	kalus, transgenní rostliny	Dalton <i>et al.</i> (1995)
	protoplasty	<i>hpt</i> , <i>bar</i>	pROB5, pAHC27	SC	hygromycin, bialaphos	transgenní rostliny	Dalton <i>et al.</i> (1998)
<i>Lolium perenne</i> L. (Jílek vytrvalý)	suspenní kultura	<i>gusA</i> , <i>bar</i> (PAT)	pDM803	PG	bialaphos	transgenní rostliny	Folling <i>et al.</i> (1998)
	suspenní kultura	<i>hpt</i> , <i>gusA</i>	?	PG	bialaphos	transgenní rostliny	Maas <i>et al.</i> (1994)
	protoplasty	<i>gusA</i> , <i>bar</i> (PAT), <i>gusA</i> , <i>uidA</i>	pBin1935SG, pHP23	PEG	bialaphos, kanamycin	transgenní rostliny, kalus	Wang <i>et al.</i> (1997)
	protoplasty	<i>gusA</i> , <i>uidA</i> , <i>bar</i> (PAT)	pDM803	PEG	bialaphos	transgenní rostliny	Folling <i>et al.</i> (1998)
	suspenní kultura	<i>hpt</i>	pROB5	SC	hygromycin	transgenní rostliny	Dalton <i>et al.</i> (1998)
	suspenní kultura	<i>gus</i> , <i>hpt</i>	?	PG	bialaphos	transgenní rostliny	Dalton <i>et al.</i> (1999)
<i>Lolium multiflorum</i> Lam. (Jílek mnohokvětý)	protoplasty	<i>gusA</i> , <i>bar</i> (PAT), <i>gusA</i> , <i>uidA</i>	pBin1935SG, pHP23	PEG	bialaphos, kanamycin	transgenní rostliny, kalus	Wang <i>et al.</i> (1997)
	suspenní kultura	<i>hph</i> , <i>gusA</i>	pAch1	PG	hygromycin	transgenní rostliny	Ye <i>et al.</i> (1997)
	protoplasty	<i>hpt</i> , <i>gusA</i> , <i>bar</i>	pROB5, co pAHC27	SC	hygromycin	transgenní rostliny	Dalton <i>et al.</i> (1998)
<i>Lolium temulentum</i> (Jílek mámivý)	suspenní kultura	<i>hph</i> , <i>gus</i>	?	PG	hygromycin	transgenní rostliny	Dalton <i>et al.</i> (1999)
<i>Zoysia japonica</i> Steud.		<i>hph</i> , <i>gus</i>	pBC1	PEG		transgenní rostliny	Inokuma <i>et al.</i> (1998)

Vysvětlivky – Explanations: PEG – polyethylene glycol, EP – electroporation, PG – particle bombardment, SC – silicon-carbide whiskers, EM – endophytes mediated transformation

<sup>1</sup>grass species, <sup>2</sup>transformed material, <sup>3</sup>suspension culture, <sup>4</sup>young leaves, <sup>5</sup>protoplasts, <sup>6</sup>genes, <sup>7</sup>plasmid, <sup>8</sup>method, <sup>9</sup>selection, <sup>10</sup>result, <sup>11</sup>transgenic plants, <sup>12</sup>callus

u *L. perenne* genotypy Lp8-1, Lp6-1 a u *L. multiflorum* genotypy Lm2-7, Lm3-1 (Dalton *et al.*, 1998). U trav se mechanický přenos DNA prováděl často do buněk suspenzní kultury a izolovaných protoplastů, které byly nejčastěji získávány z embryogenních suspenzních kultur (tab. 1). Tyto kultury byly odvozeny z apikálních meristémů, mladých květenství či štítku embryí nebo byla použita pletiva nebo celistvé orgány, např. u srhy, u které byly díky přímé somatické embryogenezi použity mladé listy (Denchev *et al.*, 1997).

#### Používané geny, promotory

K přenosu jednotlivých genů jsou jako vektory často využívány chimérické geny, obsahující promotory virů. U plazmidů, které byly inkorporovány do trav, to často bývá promotor 35S viru CaMV (virus mozaiky kvěťáku). Často používaný plazmid pDHbar obsahuje gen *bar* (nebo syntetický *pat*) pro enzym fosfinitricin acetyltransferázu (PAT), který je tolerantní ke glutamátu, analogu fosfinitricinu (PPT). Herbicidy Basta a Herbicide obsahují amonnou sůl glukofosinátu nebo tripeptidovou formu (bialaphos) z PPT, které jsou vhodné pro selekci. Oba geny jsou řízeny ubiquitinným (*Ubi1*) kukuřičným promotorem.

#### Metody kontroly přenosu a exprese genů

Kontrola přenosu a exprese inkorporovaných genů je jedním z důležitých kroků celého transformačního postupu a je závislá na metodách detekce na úrovni pletiv, transformovaných rostlin a jejich potomstev. U pícních i trávníkových trav jsou používané metody kontroly přenosu a exprese inkorporovaných genů shodné s metodami u ostatních druhů (Ondřej, 1999). Cílená studia efektu selekčního tlaku na transformační frekvenci v závislosti na počtu kopií u *Festuca arundinacea* prováděli Dalton *et al.* (1995), transformační frekvenci u *Lolium perenne* hodnotili Folling *et al.* (1998) a stabilitu a dlouhodobou expresi inkorporovaných genů v kalusech *L. perenne* Maas *et al.* (1994).

#### Dosažené známé výsledky

Genetická transgenozie trav je novou metodou pro vnášení nových genů a jejich skupin do původního genomu trav. V souvislosti s hospodářským významem byla většina transgenozí provedena zejména na jílku vytrvalém a mnohokvětém u pícních druhů a na psinečku bahenním a kostřavě rákosovité a červené u trávníkových druhů. Srha byly použity jako objekt s nejlépe propracovaným systémem regenerace kompletních rostlin z různých typů kultur a zejména pro velmi vysokou úroveň regenerace přímou somatickou embryogenezi z mladých listů (Denchev *et al.*, 1997), což značně zkracuje a usnadňuje celý postup transformace, neboť není nezbytné pracovat se suspenzemi a kulturami protoplastů.

Dosavadní výsledky (tab. 1) však slouží zejména pro vypracování metod a postupů pro genetické transgenozie a příslušných metod kontroly přenosu a selekce transgenozních pletiv a rostlin. Pro transformace byly použity vybrané modelové genotypy s dobrou regenerační schopností zelených rostlin z protoplastových a suspenzních kultur, které se vyznačují vysokou embryogenní responsivitou. Užití vnesené geny nemají praktický šlechtitelský význam a jsou pomocnými prostředky pro kontrolu a snadnější vizualizaci transgenů (*GUS*, *luc*). Geny typu *hph* nebo PAT jsou užívány pro selekci transformantů a podle dosavadních známých a dostupných údajů však hospodářsky významný gen nebyl u trav doposud použit.

#### Výhled a perspektivy, dopad do šlechtění trav

Využití genetických transformací u trav souvisí, stejně jako u jiných plodin, s postupem a rozvojem metod transgenozie a identifikace a s úrovní selekce na straně jedné a identifikací genů a jejich skupin a rychlostí studia genomu jednotlivých druhů trav na straně druhé. Genetická mapa je vytvářena již několik let u jílku vytrvalého, v roce 1999 byla publikována obrysová mapa kostřavy luční. Tyto mapy mohou sloužit jako podklad pro izolaci genů a jejich klastérů a následnou transgenozii. Současně jsou vytvářeny cDNA knihovny v rámci ILGI (Internationale Lolium Genom Initiative) a u dalších druhů, zejména kostřav, v IGGI (Internationale Grass Genom Initiative). Na těchto projektech se podílí celá řada nejprogressivnějších akademických a univerzitních pracovišť z celého světa, která se výzkumem trav zabývají.

Nejnovější poznatky genomiky trav by mohly využití genetických transformací u trav výrazně posunout vpřed zejména v případech, kdy je založení hospodářských znaků známo a podmíněno jednotlivými geny nebo jejich klustery vázanými do jedné vazbové skupiny nebo na známém místě chromozomu v těsném sousedství (některé geny rezistence ke rzi, stay-green gen, apomixie apod.). Dalším limitem je rozvoj transformačních metod a metod detekce a selekce transformantů a jejich začlenění do praktického šlechtění. Jejich využití je do jisté míry doposud omezeno také proto, že pro transformace jsou používány modelové genotypy. U cizoprašných rostlin je proto praktická aplikace takových metod vždy obtížnější, neboť odrůda je tvořena populací geneticky heterozygotních jedinců. Nejnovější poznatky ze zahraničních pracovišť však naznačují, že doposud užívané postupy by mohly být doplněny o transgenozii trav pomocí *Agrobacterium* nebo endofytních hub (Bacon *et al.*, 1997).

Výhledy ve využití geneticky transformovaných trav pro trávníky a další nezemědělské využití trav byly v současné době publikovány autory Johnson, Riordan (1999) a Duncan, Carrow (1999).

Pozornost musí být věnována i bezpečnosti využívání a šíření transformovaných trav v praktickém zemědělství a životním prostředí (Nurminiemi *et al.*, 1998; Giddings *et al.* 1997).

V České republice je metoda transgenozy trav zatím ve stadiu příprav a její dílejší využití lze předpokládat v průběhu následujících pěti let.

## LITERATURA

- Bacon C. W., Richardson M. D., White J. F. (1997): Modification and uses of endophyte-enhanced turfgrasses: A role for molecular technology. *Crop Sci.*, 37: 1415–1425.
- Canter P. H., Pašakinskiene I., Jones R. N., Humphreys M. W. (1997): Chromosome substitutions and recombination in the amphiploid *Lolium perenne* x *Festuca pratensis* cv. Prior ( $2n = 4x = 28$ ). *Theor. Appl. Genet.*, 98: 809–814.
- Dalton S. J., Bettany A. J. E., Timms E., Morris P. (1995): The effect of selection pressure on transformation frequency and copy number in transgenic plants of tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.). *Plant Sci.*, 108: 63–70.
- Dalton S. J., Bettany A. J. E., Timms E., Morris P. (1998): Transgenic plants of *Lolium multiflorum*, *Lolium perenne*, *Festuca arundinacea* and *Agrostis stolonifera* by silicon carbide fibre-mediated transformation of cell suspension cultures. *Plant Sci.*, 132: 31–43.
- Dalton S. J., Bettany A. J. E., Timms E., Morris P. (1999): Co-transformed, diploid *Lolium perenne* (perennial ryegrass), *Lolium multiflorum* (Italian ryegrass) and *Lolium temulentum* (darnel) plants produced by microprojectile bombardment. *Plant Cell Rep.*, 18: 721–726.
- Denchev P. D., Songstad D. D., McDaniel J. K., Conger B. V. (1997): Transgenic orchardgrass (*Dactylis glomerata*) plants by direct embryogenesis from microprojectile bombarded leaf cells. *Plant Cell Rep.*, 16: 813–819.
- Duncan R. R., Carrow R. N. (1999): Turfgrass molecular genetic improvement for abiotic/edaphic stress resistance. *Adv. Agron.*, 67: 233–305.
- Fojtík, A. (1994): Methods of grass improvement used in Plant Breeding Station Hladké Žitovice. *Gen. Pol.*, 35A (4): 25–32.
- Folling M., Pedersen C., Olesen A. (1998): Reduction of nuclease activity from *Lolium* protoplasts: effect on transformation frequency. *Plant Sci.*, 139: 29–40.
- Gao C., Pedersen C. (1999): Analysis of transgenic red fescue (*Festuca rubra* L.) plants. DLF-Trifolium (osobní sdělení).
- Gao C., Gertz A., Pedersen C. (1999): Efficient production of transgenic plants of red fescue (*Festuca rubra* L.). DLF-Trifolium (osobní sdělení).
- Giddings G. D., Sackville Hamilton N. R., Hayward M. D. (1997): The release of genetically modified grasses. Part 1: Pollen dispersal to traps in *Lolium perenne*. *Theor. Appl. Genet.*, 94: 1000–1006.
- Ha S. B., Wu F. S., Thorne T. K. (1992): Transgenic turf-type tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) plants regenerated from protoplasts. *Plant Cell Rep.*, 11: 601–604.
- Hartman C. L., Lee L., Day P. R., Tumer N. E. (1994): Herbicide resistant turfgrass (*Agrostis palustris* Huds.) by biolistic transformation. *Bio-Technol.*, 12: 919.
- Hayward M. D., Foster J. W., Jones J. G., Dolstra O., Evans C., McAdam N. J., Hossain K. G., Stammers M., Will J., Humphreys M. O., Evans G. M. (1998): Genetic analysis of *Lolium*. I. Identification of linkage groups and the establishment of a genetic map. *Plant Breeding*, 117: 451–455.
- Horn M. E., Shillito R. D., Conger B. V., Harms C. T. (1988): Transgenic plants of Orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) from protoplasts. *Plant Cell Rep.*, 7: 469–472.
- Inokuma C., Sugiura K., Imaizumi N., Cho C. (1998): Transgenic Japanese lawngrass (*Zoysia japonica* Steud.) plants regenerated from protoplasts. *Plant Cell Rep.*, 17: 334–338.
- Jauhar P. P., Chibbar, R. N. (1999): Chromosome-mediated and direct gene transfers in wheat. *Genome*, 42: 570–583.
- Johnson P. G., Riordan T. P. (1999): A review of issues pertaining to transgenic turfgrasses. *Hort. Sci.*, 34: 594–598.
- Maas H. M., Jong E. R., Rueb S., Hensgens L. A. M., Krens F. A. (1994): Stable transformation and long-term expression of the *gusA* reporter gene in callus lines of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Plant Mol. Biol.*, 24: 401–405.
- Nurminieni M., Tufto J., Nilsson N. O., Rongli A. (1998): Spatial models of pollen dispersal in forage grass meadow fescue. *Evol. Ecol.*, 12: 487–502.
- Ondřej M. (1999): Úvod do problematiky transgenozy rostlin. *Czech J. Genet. Plant Breed.*, 35: 95–108.
- Pašakinskiene I., Ananthawat-Jonsson K., Humphreys M. W., Jones R. N. (1999): Novel diploid following chromosome elimination and somatic recombination in *Lolium multiflorum* x *Festuca arundinacea* hybrids. *Heredity*, 78: 464–469.
- Penmetsa R. V., Ha S. B. (1994): Factors influencing transient gene expression in electroporated tall fescue protoplasts. *Plant Sci.*, 100: 171–178.
- Rongli A., Vibeke A., Busso, C. (1999): Construction of AFLP- and RFLP-based linkage map in meadow fescue (*Festuca pratensis* Huds.). In: EUCARPIA, 22nd Fodder Crops and Amenity Grasses Sec., Sankt Petersburg, Russia, October 17–21 (poster).
- Rybczynski J. J., Kozłowska W. (1994): Processes of plant differentiation *in vitro* and their utilisation in genome modification of crop grasses. II. Manipulation on cell level. *Gen. Pol.*, 35A (4): 49–58.
- Spangenberg G., Wang, Z. Y., Nagel J., Potrykus I. (1994): Protoplast culture and generation of transgenic plants in red fescue (*Festuca rubra* L.). *Plant Sci.*, 97: 83–94.
- Thomas H., Morgan W. G., Thomas A. M., Ougham H. J. (1999): Expression of the stay-green character introgressed into *Lolium temulentum* Ceres. from a senescence mutant of *Festuca pratensis*. *Theor. Appl. Genet.*, 99 (1–2): 92–99.
- Vain P., De Buyser J., Bui Trang V., Haicour L., Henry Y. (1995): Foreign gene delivery into monocotyledonous species. *Biotechnol. Adv.*, 13: 653–671.
- Wang G. R., Binding H., Posselt U. K. (1997): Fertile transgenic plants from direct gene transfer to protoplasts of *Lolium perenne* L. and *Lolium multiflorum* Lam. *J. Plant Physiol.*, 151: 83–90.
- Wang Z. Y., Valles M. P., Montavon P., Potrykus I., Spangenberg G. (1993): Fertile plant regeneration from protoplasts of meadow fescue (*F. pratensis* Huds.). *Plant Cell Rep.*, 12: 95–100.
- Wang Z. Y., Takamizo T., Iglesias V. A., Osusky M., Nagel J., Potrykus I., Spangenberg G. (1992): Transgenic plants of tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) obtained by direct gene transfer to protoplasts. *Bio-Technol.*, 10: 691–696.

- Ye X., Wang Z. Y., Wu X., Potrykus I., Spangenberg G. (1997): Transgenic Italian ryegrass (*Lolium multiflorum*) plants from microprojectile bombardment of embryogenic suspension cells. *Plant Cell Rep.*, 16: 379–384.
- Zeller F. J. (1999): Gene transfer with the aid of genome and chromosome manipulations between *Festuca* and *Lolium* species. *J. Appl. Bot. Agew. Bot.*, 73 (1–2): 43–49.
- Zhong J., Bolyard M. G., Srinivasan C., Stricklen M. B. (1993): Transgenic plants of turfgrass (*Agrostis palustris* Huds.) from microprojectile bombardment of embryogenic callus. *Plant Cell Rep.*, 13: 1–6.
- Zwierzykowski Z., Tayylar R., Brunell M., Lukaszewski A. J. (1998): Genome recombination in intergeneric hybrids between tetraploid *Festuca pratensis* and *Lolium multiflorum*. *J. Hered.*, 89: 324–328.

Došlo 24. 11. 1999

---

*Kontakní adresa:*

RNDr. Josef Janěček, CSc., Šlechtitelská stanice Hladké Životice, Fulnecká 95, 742 47 Hladké Životice, Česká republika, tel.: 0656/75 61 30, fax: 0656/75 61 32, e-mail: jj@pbhz.cz

---

# NOVÉ ODRŮDY – NEW VARIETIES

## Ječmen jarní Maridol

**Registrován:** Česká republika, 1999

**Šlechtitelská práva:** Zemědělský výzkumný ústav Kroměříž, s. r. o., Česká republika

**Šlechtitel a udržovatel:** Zemědělský výzkumný ústav Kroměříž, s. r. o.

**Rodokmen:** KM-B 358 x KM 743. Volba výchozích rodičovských materiálů byla provedena na základě difference mezi rodičovskými formami v projevu morfologických a hospodářských znaků. Rodičovská linie KM-B 358 se vyznačovala genetickým základem odolnosti k padlí travniny podmíněným genem Mla (N81), který pochází z originálního zdroje Nepal 81. Linie KM 743 (v roce 1992 povolena jako odrůda Ladík) byla donorem vysoké produktivity, vysoké hmotnosti zrna a krátkostébelnosti.

**Metoda šlechtění – rodokmenová:** Křížení rodičovských komponent B 358 x KM 743 bylo provedeno v roce 1990. V generaci F<sub>1</sub> bylo po přemnožení získáno 350 rostlin. Z této populace bylo individuálním výběrem v F<sub>2</sub> generaci vybráno 9 rostlin. V následujících generacích F<sub>3</sub>, F<sub>4</sub> a F<sub>5</sub> pokračovala selekce 6 vybraných linií ve zkouškách výkonu. Z nich byla v generaci F<sub>6</sub> vybrána linie KM 1559 pro testování v mezistaničních zkouškách. Testy a selekce na odolnost vůči padlí travniny byly prováděny v polních a umělých podmínkách, na ostatní choroby (rez ječnou, *Pyrenophora teres*) pouze v polních podmínkách. Hodnocení kvality začalo již v F<sub>4</sub> a F<sub>5</sub> generacích. Státní odrůdové zkoušky byly zahájeny v roce 1996 a v roce 1999 bylo novošlechtění KM 1559 zaregistrováno pod názvem Maridol.

**Odolnost k chorobám:** Odrůda má vysokou odolnost k napadení padlím travním, založenou na novém genu odolnosti Mla (N81), středně odolná až odolná je proti rzi ječné, středně až méně odolná k listovým skvrnitostem.

**Kvalitativní ukazatele:** Odrůda Maridol je zařazena do skupiny sladovnických odrůd, neboť vyniká optimálním obsahem bílkovin v zrně, vysokým obsahem extraktu, Kolbachovým číslem a friabilitou. V relativním extraktu, diastatické mohutnosti a obsahu beta-glukanů ve sladině je na střední úrovni. Hmotnost 1 000 zrn je střední, výtěžnost předního zrna na síť 2,5 mm je velmi dobrá.

**Výnos zrna:** V průběhu registračních zkoušek v letech 1996–1998 dosáhla ve srovnání se standardními odrůdami výnosu v průměru všech oblastí 102 %. Zvláště v řepařském a bramborařském výrobním typu překonává kontrolní sladovnické odrůdy v průměru o 3 %. Odrůda má zrno středně velké, barvy slámově žluté.

**Ostatní vlastnosti:** Maridol je poloraná až raná odrůda, nízkého vzrůstu s dobrou odolností k poléhání a s větší náročností na vláhu.

## Spring barley Maridol

**Registered:** Czech Republic, 1999

**Breeder's rights:** Agricultural Research Institute Kroměříž, Ltd., Czech Republic

**Breeder and maintainer:** Agricultural Research Institute Kroměříž, Ltd.

**Pedigree:** B 358 x KM 743. The selection of the parents was due to the difference between them in manifestation of morphological and economical traits. Parental line KM-B 358 was characterized by gene of resistance to powdery mildew Mla (N81) which originate from Nepal 81. The line KM 743 (registered in 1992 as variety Ladík) was donor of high productivity, high 1 000 grain weight and short stem.

**Breeding method – pedigree:** Initial parental components B 358 x KM 743 were crossed in 1990. F<sub>1</sub> generation was obtained by multiplication of 350 plants. From this population the individual selection of 9 plants in F<sub>2</sub> generation was carried out. Selection of 6 lines continued in successive generations F<sub>3</sub>, F<sub>4</sub>, and F<sub>5</sub>. The line KM 1559 was selected in interstational performance tests in F<sub>6</sub> generation. Screening and selection for resistance to powdery mildew were conducted under both field and artificial conditions, resistance to other diseases (rust, net blotch) were evaluated only under field conditions. Grain quality was evaluated since F<sub>4</sub> generation. The line KM 1559 was included in the Official Trials of the Czech Republic in 1996. On the basis of positive results in the period of 1996–1998 the line KM 1559 was registered as variety Maridol in 1999.

**Resistance to diseases:** The variety has good resistance to powdery mildew, based on incorporation of new gene Mla (N81), it has medium to high resistance to rust. Resistance to net blotch and scald is considered as medium.

**Quality parameters:** The variety Maridol proved medium to high malting quality characterized by optimal protein content in grain, by high extract content and Kolbach value. The relative extract, diastatic power and beta-glucan content reached medium level. Volume weight is medium and proportion of the grain over 2.5 mm sieve is high.

**Grain yield:** The variety Maridol was superior to check varieties on the average of all locations in Official Trials. It reached 102% of standard varieties during Official Trials in 1996–1999. The highest performance manifested in sugar beet and potato growing regions. It reached 103% in comparison with standard malting varieties.

**Other characteristics:** Maridol is semi-early to early variety, it has short stem and very good resistance to lodging.

*Ing. Marie Špunarová, CSc.*

*Zemědělský výzkumný ústav Kroměříž, s. r. o., Havlíčkova 2787, 767 41 Kroměříž, Česká republika*

## Brambor Katka

Zkoušena pod označením KE 36/33

**Registrována:** Česká republika, 2000

**Šlechtitelská práva:** Sativa Keřkov, a. s., Šlechtitelská stanice Keřkov, Česká republika

**Rodokmen:** Matěský komponent: Karin (Rita x Hera)

Otcovský komponent: A 509/28 (II.69.766 x I.65.751/132)

**Metoda šlechtění:** Křížení bylo provedeno v roce 1987. Výběr rodičů byl zaměřen na získání odrůdy konzumní, rané a kvalitní.

**Semenáče:** Výsadba ve skleníku v roce 1988. Od této kombinace bylo vypěstováno 31 860 jedinců.

**Ramšové generace:** Hodnoceny v letech 1989 a 1990 v polních podmínkách. Selektce za vegetace i po sklizni byla vedena proti nevhodným typům neodpovídajícím šlechtitelskému cíli.

**Klonové generace:** V 1. klonové generaci bylo individuálně vysázeno 817 klonů. Ve 3. a 4. klonové generaci byl kříženec zařazen do staničního pokusu a v 5. a 6. generaci do mezistaničních zkoušek. V těchto zkouškách byly podrobně hodnoceny další vlastnosti – výnosové a kvalitativní i odolnost proti chorobám. V letech 1992 až 1997 byla v provokačních zkouškách hodnocena odolnost proti rakovině brambor a hádátku bramborovému.

V roce 2000 byla po třiletém zkoušení v registračních zkouškách odrůda registrována pod jménem Katka. Udržovací šlechtění začala v roce 1997 tradičním způsobem – klonovým šlechtěním. Od roku 1999 bylo rozšířeno o meristémové množení.

**Vegetační doba:** Raná odrůda (130–134 dní), zralostní typ jako Karin, pomaleji vzhází.

**Odolnost k chorobám:** Je odolná proti rakovině brambor biotypu D 1 a náchylná k hádátku bramborovému. Má vyšší odolnost ke strupovitosti hlíz a střední ke kořenomorce brambor. V natí má střední až vyšší odolnost proti plísní bramborové, černání stonku i hnědé skvrnitosti. Je středně až více odolná proti mozaikovým i svinutkovým virům.

**Konzumní jakost:** Odrůda vykazuje v průměru 16 % škrobnatosti. Je vhodná pro přímý konzum během celého skladovacího období. Má po uvaření pevnější dužinu, která bývá lehce moučnatá se středně dobrou chutí a varným typem BC s vyšším obsahem vitamínu C, barva hranolků je příznivá (7), tmavnutí za syrova je poměrně rychlé.

**Výnos hlíz:** Katka je středně výnosný typ odrůdy, při nasazení 12–14 hlíz pod trsem. Podle výsledků ÚKZÚZ dosáhla v průměru let 1997–1999 výnosu 101,3 % ve srovnání s kontrolními odrůdami. Hlízy jsou průměrné velikosti, dobře vyrovnané.

**Ostatní vlastnosti:** Hlíza je oválná až dlouzeoválná, očka jsou mělká, dužina světle žlutá až žlutá, značně odolává mechanickému poškození. Trs je středně vysoký listového typu, kvete velmi slabě – bíle.

## Potato Katka

Tested under designation KE 36/33

**Registered:** Czech Republic, 2000

**Breeders' rights:** Sativa Keřkov, a.s., Keřkov Breeding Station, Czech Republic

**Pedigree:** Maternal component: Karin (Rita x Hera)

Paternal component: A 509/28 (II.69.766 x I.65.751/132)

**Breeding method:** Crossing was carried out in 1987. Such parental components were selected that would produce a table, early and high-quality variety.

**Seedlings:** Planted in a greenhouse in 1988. A total of 31 860 plants were produced from this combination.

**Bulk sample generations:** They were evaluated in 1989 and 1990 in field conditions. Unsuitable types not complying with the breeding goal were negatively selected in the growing season and after harvest.

**Clonal generations:** 817 clones were individually planted in the 1st clonal generation. Crosses were included in station trials in the 3rd and 4th clonal generations, and into inter-station tests in the 5th and 6th generations. Other traits were evaluated in detail in these tests – yielding performance, quality and resistance to diseases. Provocative tests were conducted in 1992–1997 to evaluate resistance to potato wart and to potato root eelworm.

The variety was registered under the name Katka in 2000 after three-year testing in registration tests. Maintenance breeding started in 1997 in a traditional way – by clone breeding. Meristem propagation was introduced in 1999.

**Vegetation period:** Early variety (130–134 days), maturity type like Karin, slower emergence.

**Resistance to diseases:** Resistant to potato wart biotype D 1 and susceptible to potato root eelworm. Higher resistance to tuber scab and intermediate resistance to *Rhizoctonia* disease. The leaves have intermediate to higher resistance to late blight of potato, black leg of potatoes and early blight of potato. Its resistance to mosaic and leafroll viruses is at a medium or higher level.

**Consumer quality:** Starch content amounts to 16% on average. The variety is suitable for direct consumption during the whole storage period. Pulp is tough after cooking, a little mealy, it tastes fairly good, it is a cooking type BC with higher content of vitamin C, the color of French fries is acceptable (7), raw pulp darkening is relatively fast.

**Tuber yield:** The variety Katka gives intermediate yields while 12–14 tubers are set under the hill. The results of the Central Institute for Supervising and Testing in Agriculture indicated its yield 101.3% in 1997–1999 in comparison with control varieties. Most of the tubers are of medium size without larger fluctuations.

**Other characteristics:** Oval or long oval tubers, shallow buds, pulp light yellow or yellow in color, highly resistant to mechanical injury. The hill is of medium height, leafy type, very few white blossoms.

Ing. Vratislav Voral, CSC.

Sativa Keřkov a. s., Šlechtitelská stanice Keřkov, 582 22 Příbyslav, Česká republika

# Instructions for authors of papers submitted to the Czech Journal of Genetics and Plant Breeding

*Czech Journal of Genetics and Plant Breeding* is an international journal covering any field of genetics and breeding of higher plants with focus on temperate zone crops. The journal publishes original full research papers, short communications, descriptions of new varieties, review articles, short reports and book reviews. Papers are published in English (translations should be submitted by authors), in Czech or in Slovak.

Author is fully responsible for the paper originality, and for correctness of its subject-matter, language and formal attributes. Author's statement should be enclosed declaring that the paper has not been published anywhere else.

If the paper is to be published in Czech or in Slovak, it should be submitted with an extended English abstract. If it is to be published in English, it should be submitted with an English abstract, and an extended abstract in Czech or Slovak. For foreign authors the translations of abstracts into Czech are made in the Editorial Office. Paper should be clearly and concisely written in a correct language. It is the responsibility of the authors to provide for a high quality translations. Manuscripts including all figures and tables should be submitted in two hard copies and on the disk. A text editor used for the paper preparation should be mentioned in an accompanying letter. It is also advisable to submit tables and figures in EXCEL on disk including spreadsheets.

FULL RESEARCH PAPERS should consist of the following sections: Title page, Abstracts (short + long), Keywords, Introduction, Material and methods, Results, Discussion, Acknowledgements, References, Tables and Figures with legends. The manuscript should not exceed 15 pages in length including all tables, figures, etc.

SHORT COMMUNICATION should consist of the following sections: Title page, Abstract, Keywords, Main text, Acknowledgements, References, Tables and Figures with legends. The manuscript should not exceed 4 pages in length.

REVIEW ARTICLE summarizes the findings in the field concerned. The manuscript should not exceed 20 pages in length. Short abstracts in English and in Czech should be submitted with this article.

## Title page

The title of the paper should be short and informative, of not more than 85 strokes. It must not contain any abbreviations and superfluous words (such as evaluation, study, description, brief results, preliminary information). Do not ever use any subtitles of papers. The title should be given in English and in Czech or in Slovak.

Authors names should have the form of the first name initials and surnames.

Authors departments, institutions should be given in an official version in English. If authors are from several institutions, their names should be designated by a digit corresponding to the same digit in a list of institutions.

Grant funding of the paper: besides the grant number, the full name of grant agency or institution should be given.

Abstract should not have more than 150 words. It should contain important information on methods used to solve the problem, clear description of results and their statistical significance, and brief and unambiguous conclusions drawn from the results. References and discussion of results should not be included in the abstract.

Keywords should clearly characterize the studied problem.

Extended abstract should not have more than 60 lines. It should contain the goal of the study, a more detailed description of methods and results that can be confronted with the results of other researchers, and unambiguous conclusions. Important papers included in the list of references can be cited, and it is also possible to include references to tables and figures.

INTRODUCTION section should provide an information on the present state of research in the field concerned and on the goal of the study. References to literary sources document such present findings that are used by the authors, not all that have been published until now. References in the text should agree with those in the list of references. It is recommended to include references to papers from peer periodicals only.

MATERIAL AND METHODS section should provide a clear description of:

- Machines, instruments and equipment, chemicals, diagnostic kits, etc. (model, source or manufacturer, country of origin) and ways of their use.
- Plants (exact definition of the species, variety in cultivated crops, data about origin and number of examined plants, their sampling, storage and inclusion in experimental and control groups, description of technology of sowing and growing and obtaining data on examined characters, characteristics of growing conditions, etc.); similarly it is necessary to characterize the animal species if involved in the studies.
- Methods (their detailed description or references to papers containing the method description); it is not admissible to cite any paper referring to the method used but not containing its description; it is necessary to describe any modifications of the cited methods in an unambiguous way; if the methods were not employed by the authors themselves, it should be indicated who provided the results (the authors name and institution).
- Methods of results evaluation (statistical method and software used).

RESULTS should be processed in a clear way, and if possible, represented graphically or arranged in tables. Parallel documentation of identical results in tables and in figures is not admissible. Statistical processing should be reasoned and based on adequate methods. The results should include data making their verification possible (e.g. mean, number of determinations and standard deviation should be given if significance of difference between two means is evaluated). Explicit and clear illustration of statistically significant differences in tables or figures is desirable. It is not possible to include any results that were provided by the procedure neither described nor cited in the Method section.

**DISCUSSION** can be combined with result presentation into one section or it can be a separate section, but it must not contain any result description in the latter case. Discussion section should contain a comparison of results presented in the paper with the present knowledge, showing clearly what findings are quite new, how the results differ from those presented by other authors or how they coincide with published conclusions. The importance of results should be emphasized, and new problems and the need of their solution should be highlighted in discussion. It should be stated in the last paragraph of the Discussion section whether the goal set in the introductory section was achieved, and what are the authors conclusions.

**Acknowledgements** make it possible to thank for help with result interpretation, for paper reviewing and for another help with its preparation, for financial or any other aid, for technical assistance, for provision of materials or important information, for examinations carried out by those who did not participate actively and creatively in the study or project, for translation of the text or its language correction, etc.

**REFERENCES** should contain all papers cited in the text. They should be arranged in alphabetical order by name of the first author. The name(s) of author(s) is(are) followed by year of publishing (if several papers that appeared within a year are cited, letters a, b, c ... should be used both in the text and in the References section). If the paper was written by more than two authors, all authors should be cited in the list of references, but only the first author plus et al. and year should be given in the text. Surnames are printed in small letters, followed by the first name initials, year in brackets and colon, the full title of the paper, official abbreviation of the journal (abbreviations of periodicals are given in agreement with Science Citation Index or Current Contents), volume and extent (page numbers).

Examples of references in the list:

Gaudet D. A., Kozub G. C. (1991): Screening winter wheat for resistance to cottony snow mold under controlled conditions. *Can. J. Plant Sci.*, 71: 957–965.  
Green A. G. (1986): Genetic modification of seed fatty acid composition in *Linum usitatissimum* L. *J. Austral. Inst. Agric. Sci.*, 52: 175–176.  
Töpfer R., Martini N., Schell J. (1995): Modification of plant lipid synthesis. *Science*, 268: 681–686.  
Papers published in monographs or proceedings should be cited like this:  
Sprague G. F. (1983): Heterosis in maize: theory and practice. In: Frankel R. (ed.): Heterosis. Reappraisal of theory and practice. Berlin, Springer-Verlag: 47-70.

References should consist of peer periodicals. It is not possible to cite abstracts from conferences, research reports, textbooks and monographs that do not describe and cite experimental papers, popular or daily press and hardly available (in foreign countries unavailable) sources. Only exceptionally can unpublished findings or results be cited in the Discussion section, mentioning the author and using the note (unpublished) or (personal communication).

The papers not referred to in the text cannot be included in the list of references. Examples of references in the text:

.....described by Sprague (1983) ...described by a number of authors (Green, 1986; Töpfer R. *et al.*, 1995)...

**Tables and figures** should be supplied separately, and references in the text to all tables and figures are necessary. Illustrations should be of printable quality. Photographs and graphs should be mentioned in the text as figures, labelled with sequential numbers. Every figure should have a short and pregnant legend.

**Contact Address** of one of the authors to whom correspondence will be mailed should be given in Czech or Slovak (in English in foreign authors) at the end of the paper. Besides the address itself, it should contain telephone and fax numbers and e-mail address.

### Other requirements

The hard copy of the manuscript should be printed in common fonts, size 12, spacing approaching 30 rows per page and 60 letters per row. Other technical requirements (presentation of figures and possibilities of photograph use, recommended text editors, formats of digital versions of figures, etc.) are available in the Editorial Office. The paper manuscript on disk including figures should always be accompanied by mailing two hard copies of the paper. When preparing electronic manuscripts, leave the right-hand margin unjustified and turn the hyphenation option off. Please, use wide margins, double spaces and quarto format. If graphs were produced in EXCEL, they should be supplied in this software (not imported to WORD software).

Abbreviations and symbols used in the text should be explained when used for the first time. Units should comply with the SI measure system.

**Expert opinion** should be read by the authors very carefully; they should revise the manuscript as soon as possible and send it back to the Editorial Office. If the manuscript with reviewers comments was sent to them, it should be returned along with revised manuscript. It is necessary to respond to all comments made by reviewers and to state unambiguously how they were accepted (what alterations were made in the text) or if there are any authors objections to these comments and why they cannot be respected. The authors can disagree with the reviewers opinion but they should reason their own opinion in written form. Editors will consider authors opinions carefully but they are not obliged to accept their objections.

**Proofs** should be made within two days of receipt, using common proof-reading marks (their list is available in the Editorial Office). The word IMPRIMATUR, date and signature should be placed in the right upper corner of page 1 as a sign of proofreading. It is not possible to make any other alterations in the text except corrections or any alterations that would modify authors statements or conclusions in the manuscript accepted for publication.

**Offprints:** Authors will receive 20 free offprints of the paper.

# Pokyny pro autory příspěvků do vědeckého časopisu Czech Journal of Genetics and Plant Breeding

Časopis uveřejňuje původní experimentální práce, krátká sdělení, přehledy, studie, informace a recenze. Práce jsou uveřejňovány v angličtině (v překladu dodaném autory), češtině nebo slovenštině.

Autor je plně odpovědný za původnost práce a za její věcnou, jazykovou a formální správnost. K práci musí být přiloženo prohlášení autora o tom, že práce nebyla publikována jinde.

Práci určenou k uveřejnění v češtině nebo ve slovenštině dodají autoři s rozšířeným anglickým abstraktem, práci určenou k uveřejnění v angličtině dodají v anglické verzi s anglickým abstraktem; a dále s rozšířeným abstraktem v češtině či slovenštině. Autoři jsou povinni zajistit kvalitní překlad do angličtiny. Rukopisy se všemi přílohami se dodávají ve dvou vyhotoveních a na disketě. V průvodním dopisu je třeba uvést editor použitý ke zpracování rukopisu na PC. Tabulky a grafy zpracované v programu EXCEL je vhodné rovněž dodat na disketě včetně tabulek dat.

**EXPERIMENTÁLNÍ PRÁCE** by měla sestávat z těchto částí: titulní strana, abstrakt (krátký + rozšířený), klíčová slova, úvod, materiál a metody, výsledky, diskuse, poděkování, literatura, tabulky a obrázky (grafy) v výstižným popisem. Rozsah práce by neměl přesáhnout 15 stran včetně tabulek, obrázků atd.

**KRÁTKÉ SDĚLENÍ** by mělo obsahovat tyto části: titulní strana, abstrakt, klíčová slova, hlavní text, poděkování, literatura, tabulky a obrázky s popisem. Rozsah práce by neměl přesáhnout 4 strany.

**PŘEHLEDNÝ ČLÁNEK (STUDIE, REVIEW)** obsahuje souhrn poznatků dané problematiky. Rozsah článku by neměl být větší než 20 rukopisných stran a zpracovaná literatura by měla být z období posledních 20 let. K článku je třeba připojit krátký abstrakt v angličtině a češtině (slovenštině).

## Titulní strana

**Název práce (titul)** musí výstižně informovat o zaměření práce a neměl by přesáhnout 85 úhozů. Nesmí obsahovat zkratky a nadbytečná slova (hodnocení, studium, popis, stručné výsledky, předběžné informace apod.). Jsou vyloučeny podtituly článků. Uvádí se v angličtině a v češtině nebo slovenštině.

**Autoři** se uvádějí zkratkou křestního jména a příjmením.

**Pracoviště** autorů se uvádí v angličtině v oficiální verzi. Pokud jsou autoři z více pracovišť, uvádí se u jejich jména číslo odpovídající stejnému číslu v seznamu pracovišť.

**Grant**, ze kterého byla práce financována: kromě čísla grantu se uvádí i plný název grantové agentury nebo instituce.

**Abstrakt** se předkládá v rozsahu 150 slov. Musí obsahovat podstatné údaje o metodickém přístupu k řešení problému, výstižně popsané dosažené výsledky a jejich statistickou významnost a stručné a jednoznačné závěry, které z nich autoři vyvozují. V abstraktu se necitují žádné publikace a nediskutují výsledky.

**Klíčová slova** musí co nejlépe charakterizovat studovaný problém.

**Rozšířený abstrakt** je uveřejňován v angličtině (u anglických prací v češtině či slovenštině) v rozsahu do 60 řádků a má význam stručného sdělení. Měl by proto obsahovat cíl práce, podrobnější popis metodiky a výsledků, které mohou být konfrontovány s výsledky jiných autorů, a jednoznačný závěr autorů. V rozšířeném abstraktu je třeba uvést odkazy na tabulky a obrázky a je možné citovat důležité práce, uvedené v seznamu literatury.

**ÚVOD** by měl informovat o aktuálním stavu výzkumu v daném tématu a o cíli práce. Citovanými publikacemi se dokládá stav současných poznatků, z nichž autoři vycházejí, nikoliv vše, co již bylo uveřejněno. Citace uvedené v textu musí souhlasit s údaji v seznamu literatury. Doporučuje se uvádět pouze citace z lektorovaných periodik.

**MATERIÁL A METODY** musí poskytnout jasný popis použitého materiálu a použitých metod získání výsledků:

- U strojů, přístrojů a zařízení, chemikálií, diagnostických souprav apod., nejsou-li obecně známé, je třeba uvést typ, zdroj nebo výrobce, stát odkud pocházejí a způsob jejich použití.
- U rostlin je třeba uvést přesnou definici druhu (u kulturních rostlin též odrůdu), údaje o počtu a původu rostlin, jejich rozdělení do pokusných a kontrolních skupin, způsobu a podmínkách pěstování, hodnocení stavu, odběru vzorků, jejich uchování do zpracování, způsobu získání hodnot sledovaných znaků apod. Podobně je nutné charakterizovat i eventuálně použité živočišné druhy.
- Metody musí být podrobně popsány nebo citovány dostupné práce, v nichž jsou popsány. Je nepřijatelné citovat práci, která pouze odkazuje na metodu, ale neuvádí její popis. Modifikace citovaných postupů musí být jednoznačně popsány; pokud metody neprovádějí autoři práce, musí být uvedeno, kdo dodal výsledky (jméno a pracoviště).
- Zřejmý musí být způsob hodnocení výsledků – použitá statistická metoda, program apod.

**VÝSLEDKY** musí být zpracovány přehledně a pokud možno vyjádřeny graficky nebo v tabulkách. Není přípustná dokumentace stejných výsledků jak v tabulkách, tak pomocí grafů. Experimentální výsledky získané z opakovaných pokusů musí být statisticky vyhodnoceny s uvedením použitého modelu (např. nepárový *t*-test, analýza rozptylu dvojného třídění apod.). Statistické charakteristiky (průměr, rozdíly, korelační koeficient atd.) musí být doplněny údajem o jejich statistické významnosti, jednoznačně a přehledně v tabulkách nebo grafech. Výsledky by měly obsahovat všechny údaje potřebné pro jejich ověření. V práci nelze uvádět výsledky získané postupem, který není popsán nebo citován v metodice.

**DISKUSE** může být spojena s popisem výsledků nebo uvedena v samostatné části, ale v tom případě se v diskusi popis výsledků nesmí opakovat. Diskuse má jednoznačně vyjádřit srovnání dosažených výsledků s dosud známými poznatky, aby bylo zřejmé, co je ve výsledcích zcela novým poznatkem, v čem se dosažené výsledky liší od nálezů jiných autorů nebo v čem se s nimi shodují. Diskuse má zdůraznit význam výsledků a upozornit na nově otevřené otázky a na potřebu jejich řešení. V posledním odstavci diskuse by mělo být uvedeno, zda bylo dosaženo cíle, výtčeného v úvodu, a jaké z toho autoři vyvozují závěry.

**Poděkování** vyjadřuje uznání autorů za pomoc s interpretací výsledků, za posouzení práce a příspěví k jejímu zpracování, za finanční nebo jinou podporu, za technickou spolupráci, za poskytnutí materiálů nebo důležitých informací, za provedení vyšetření bez aktivní tvůrčí spoluúčasti na řešení, za překlad nebo jazykovou úpravu apod. Poděkování je také cestou k odlišení autorů od spolupracovníků nebo jiných účastníků, kteří k práci přispěli svým námětem, radou, poskytnutím metodik, resp. pokusného materiálu z jiných experimentů či umožnili využití přístrojů apod., ale neúčastnili se sami aktivně a tvůrčím způsobem řešení popisovaného problému.

**LITERATURA** musí zahrnovat všechny uváděné práce, citované v textu jménem autorů a rokem vydání jejich publikace (v případě citací více prací z jednoho roku se v textu i v seznamu literatury odlišují písmeny a, b, c...). Pokud má práce více než dva autory, uvádějí se v seznamu prací všichni, v textu však jen první s dodatkem *et al.* a rokem vydání. Autoři se uvádějí malými písmeny, křestní jména iniciálami, v závorce rok vydání, za dvojtečkou název citované práce, oficiální zkratka časopisu, svazek, stránkový rozsah.

Příklad citací v seznamu (zkratky časopisů se uvádějí podle Science Citation Index nebo Current Contents):

Gaudet D. A., Kozub G. C. (1991): Screening winter wheat for resistance to cottony snow mold under controlled conditions. *Can. J. Plant Sci.*, 71: 957–965.

Green A. G. (1986): Genetic modification of seed fatty acid composition in *Linum usitatissimum* L. *J. Austral. Inst. Agric. Sci.*, 52: 175–176.

Töpfer R., Martini N., Schell J. (1995): Modification of plant lipid synthesis. *Science*, 268: 681–686.

Práce v monografiích a ve sbornících se uvádějí podle následujícího vzoru:

Sprague G. F. (1983): Heterosis in maize: theory and practice. In: Frankel R. (ed.): *Heterosis. Reappraisal of theory and practice*. Berlin, Springer-Verlag: 47–70.

Literatura by měla sestávat z lektorovaných periodik. Nelze citovat abstrakta z konferencí, z výzkumných zpráv, z učebnic a monografií, které nepopisují a necitují experimentální práce, z populárního nebo denního tisku a z obtížně dostupných (pro zahraničí zcela nedostupných) zdrojů. Jen výjimečně lze v diskusi připustit citaci nepublikovaného názoru nebo výsledku s uvedením autora a s poznámkou (nepublikováno) nebo (osobní sdělení). Tato citace se neuvádí v seznamu citovaných prací.

V seznamu literatury nelze uvádět práce, které nejsou citovány v textu. Příklad citace v textu: ...popsal Sprague (1983) ...popsala řada autorů (Green, 1986; Töpfer R. *et al.*, 1995)...

**Tabulky a obrázky** se dodávají zvlášť a na všechny musí být odkaz v práci. Všechny ilustrativní materiály by měly mít

kvalitu vhodnou pro tisk. Fotografie i grafy jsou v textu uváděny jako obrázky a jsou číslovány průběžně. Každý obrázek musí mít stručný a výstižný popis. U prací uveřejňovaných v češtině nebo slovenštině musí být tabulky opatřeny také popisem v angličtině, poskytujícím jejich úplné vysvětlení.

**Kontaktní adresa** jednoho z autorů, na kterého může být zaslána korespondence, je uváděna v češtině nebo slovenštině (popř. v angličtině u zahraničních autorů) na konci práce. Kromě poštovní adresy obsahuje čísla telefonu a faxu a e-mailovou adresu.

### Další požadavky

Rukopis práce se dodává vytištěn běžnými fonty ve velikosti 12 a ve formátu odpovídajícím zhruba 30 řádkům na stránce a 60 písmen na řádku. Další technické požadavky (zpracování obrázků a možnost uveřejnění fotografií, doporučené textové editory, formáty digitalizovaných obrázků apod.) si lze vyžádat v redakci. Rukopis včetně obrázků na disketě musí být vždy doplněn i současným odesláním vytištěné verze v požadovaném počtu dvou výtisků. Textový soubor se na disketu ukládá bez dělení slov a zarovnání bloků. Rukopis musí být psán s širokým okrajem, dvojitými mezerami mezi řádky a na papíru formátu A4. Jestliže jsou grafy vytvořeny v programu EXCEL, je potřeba je dodat uložené v tomto programu (nestačí grafy naimportované do programu WORD).

**Zkratky a symboly** používané v práci je nutné při jejich prvním uvedení vysvětlit. Používané jednotky musí odpovídat soustavě měrových jednotek SI.

**Lektorský posudek** autoři pečlivě prostudují a práci podle připomínek co nejdříve upraví a vrátí redakci. Současně s upravenou prací se vrací i původní rukopis, pokud byl zaslán autorům s poznámkami lektorů. Na připomínky lektorů je třeba odpovědět úplně a s jednoznačným vyjádřením, jak byly akceptovány (jaké změny jsou v textu upravené práce) nebo jaké výhrady mají autoři k připomínkám a proč je nemohou respektovat. Autoři mají právo odmítnout stanovisko lektora, musí však svůj názor písemně zdůvodnit. Redakce pečlivě zvažuje stanovisko autorů, nemusí však jejich námitkám proti připomínkám lektorů vyhovět.

**Korektury** se provádějí do dvou dnů s použitím běžných korektorských značek (možno vyžádat v redakci). Provedení korektury se označuje slovem *Imprimatur* v pravém horním rohu první strany, datem a podpisem. Při korekturách nelze provádět větší změny textu nebo změny, které mění význam sdělení nebo stanoviska autorů v rukopisu, přijatém k uveřejnění.

**Separáty:** Autor obdrží zdarma 20 separátních výtisků práce.

## INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

Original scientific papers, short communications, and selectively reviews, that means papers based on the study of technical literature and reviewing recent knowledge in the given field, are published in this journal. Published papers are in Czech, Slovak or English. Each manuscript must contain a short and a longer summary (including key words).

The author is fully responsible for the originality of his paper, for its subject and formal correctness. The author shall make a written declaration that his paper has not been published in any other information source.

The board of editors of this journal will decide on paper publication, with respect to expert opinions, scientific importance, contribution and quality of the paper.

The paper extent shall not exceed 15 typescript pages, including tables, figures and graphs.

**Manuscript layout:** quarto, 30 lines per page, 60 strokes per line, double-spaced typescript. A PC diskette should be provided with the paper and graphical documentation. Tables, figures and photos shall be enclosed separately. The text must contain references to all these annexes.

If any abbreviation is used in the paper, it is necessary to mention its full form at least once to avoid misunderstanding. The abbreviations should not be used in the title of the paper nor in the summary.

The title of the paper shall not exceed 85 strokes. Subtitles of the papers are not allowed either.

**Abstract** is an information selection of the subject and conclusions of the paper, it is not a mere description of the paper. It must present all substantial information contained in the paper. It shall not exceed 170 words. It shall be written in full sentences, not in form of keynotes, and comprise basic numerical data including statistical data. It must contain key words. It should be submitted in English and if possible also in Czech or Slovak.

**Introduction** has to present the main reasons why the study was conducted, and the circumstances of the studied problems should be described in a very brief form.

**Review of literature** should be a short section, containing only literary citations with close relation to the treated problem.

Only original method shall be described, in other cases it is sufficient enough to cite the author of the used method and to mention modifications of this method. This section shall also contain a description of experimental material.

In the section **Results** figures and graphs should be used rather than tables for presentation of quantitative values. A statistical analysis of recorded values should be summarized in tables. This section should not contain either theoretical conclusions or deductions, but only factual data should be presented here.

**Discussion** contains an evaluation of the study, potential shortcomings are discussed, and the results of the study are confronted with previously published results (only those authors whose studies are in closer relation with the published paper should be cited). The sections Results and Discussion may be presented as one section only.

The section **References** should preferably contain reviewed periodicals. The citations are arranged alphabetically according to the surname of the first author. References in the text to these citations comprise the author's name and year of publication. Only the papers cited in the text of the study shall be included in the list of references. All citations shall be referred to in the text of the paper.

The author shall give his full name (and the names of other collaborators), academic, scientific and pedagogic titles, full address of his workplace and postal code, telephone and fax number or e-mail.

The manuscript will not be accepted to be filed by the editorial office if its formal layout does not comply with the instructions for authors.

**Detailed instructions to authors are published in No. 1 of this volume.**

## POKYNY PRO AUTORY

Časopis uveřejňuje původní vědecké práce, krátká sdělení a výběrově i přehledné referáty, tzn. práce, jejichž podkladem je studium literatury a které shrnují nejnovější poznatky v dané oblasti. Práce jsou uveřejňovány v češtině, slovenštině nebo angličtině. Rukopisy musí být doplněny krátkým a rozšířeným souhrnem (včetně klíčových slov).

Autor je plně odpovědný za původnost práce a za její věcnou i formální správnost. K práci musí být přiloženo prohlášení autora o tom, že práce nebyla publikována jinde.

O uveřejnění práce rozhoduje redakční rada časopisu, a to se zřetelem k lektorským posudkům, vědeckému významu a přínosu a kvalitě práce.

Rozsah vědeckých prací nesmí přesáhnout 15 strojopisných stran včetně tabulek, obrázků a grafů. V práci je nutné používat jednotky odpovídající soustavě měřových jednotek SI (ČSN 01 1300).

**Vlastní úprava rukopisu:** formát A4, 30 řádek na stránku, 60 úhozů na řádku, mezi řádky dvojitě mezery. K rukopisu je třeba přiložit disketu s prací pořízenou na PC a s grafickou dokumentací. Tabulky, grafy a fotografie se dodávají zvlášť, nepodlepují se. Na všechny přílohy musí být odkazy v textu. Pokud autor používá v práci zkratky jakéhokoliv druhu, je nutné, aby byly alespoň jednou vysvětleny (vypsány), aby se předešlo omylům. V názvu práce a v souhrnu je vhodné zkratky nepoužívat.

**Název práce** (titul) nemá přesáhnout 85 úhozů. Jsou vyloučeny podtitulky článků.

**Krátký souhrn (Abstrakt)** je informačním výběrem obsahu a závěru článku, nikoliv však jeho pouhým popisem. Musí vyjádřit všechno podstatné, co je obsaženo ve vědecké práci, a má obsahovat základní číselné údaje včetně statistických hodnot. Musí obsahovat klíčová slova. Nemá překročit rozsah 170 slov. Je třeba, aby byl napsán celými větami, nikoliv heslovitě. Je uveřejňován a měl by být dodán ve stejném jazyce jako vědecká práce.

**Rozšířený souhrn (Abstract)** je uveřejňován v angličtině, měly by v něm být v rozsahu cca 1–2 strojopisných stran komentovány výsledky práce a uvedeny odkazy na tabulky a obrázky, popř. na nejdůležitější literární citace. Je vhodné jej (včetně názvu práce a klíčových slov) dodat v angličtině, popř. v češtině či slovenštině jako podklad pro překlad do angličtiny. **Úvod** má obsahovat hlavní důvody, proč byla práce realizována, a velmi stručnou formou má být popsán stav studované otázky.

**Literární přehled** má být krátký, je třeba uvádět pouze citace mající úzký vztah k problému.

**Metoda** se popisuje pouze tehdy, je-li původní, jinak postačuje citovat autora metody a uvádět jen případné odchylky. Ve stejné kapitole se popisuje také pokusný materiál.

**Výsledky** – při jejich popisu se k vyjádření kvantitativních hodnot dává přednost grafům před tabulkami. V tabulkách je třeba shrnout statistické hodnocení naměřených hodnot. Tato část by neměla obsahovat teoretické závěry ani dedukce, ale pouze faktické nálezy.

**Diskuse** obsahuje zhodnocení práce, diskutuje se o možných nedostatecích a práce se konfrontuje dříve publikovanými (požaduje se citovat jen ty autory, jejichž práce mají k publikované práci bližší vztah). Je přípustné spojení v jednu kapitolu spolu s výsledky.

**Literatura** by měla sestávat hlavně z lektorovaných periodik. Citace se řadí abecedně podle jména prvních autorů. Odkazy na literaturu v textu uvádějí jméno autora a rok vydání. Do seznamu se zařadí jen práce citované v textu. Na práce v seznamu literatury musí být odkaz v textu.

Na zvláštním listě uvádí autor plně jméno (i spoluautorů), akademické, vědecké a pedagogické tituly a podrobnou adresu pracoviště s PSČ, číslo telefonu a faxu, popř. e-mail.

Rukopis nebude redakcí přijat k evidenci, nebude-li po formální stránce odpovídat pokynům pro autory.

**Podrobné pokyny pro autory jsou uveřejněny v čísle 1 tohoto ročníku.**

# CZECH JOURNAL OF GENETICS AND PLANT BREEDING

Volume 36, 2000, No. 1

## CONTENTS

Vacke J., Cibulka R.: Response of selected winter wheat varieties to wheat dwarf virus infection at an early growth stage (in English).....	1
Špunarová M., Kraus I.: Evaluation of hybridization success in spring barley by means of a genetic marker (in Czech).....	5
Polzerová H., Ptáček J.: Detection of DNA polymorphism in potato cultivars using RAPD technique (in Czech).....	11
INFORMATION – STUDY – REPORTS	
Janeček J., Ohnoutková L.: Genetic transformation of fodder and amenity grasses (in Czech).....	17
NEW VARIETIES	
Špunarová M.: Spring barley Maridol .....	23
Vorel V.: Potato Katka .....	24
Instructions for authors of papers submitted to the Czech Journal of Genetics and Plant Breeding.....	25

## OBSAH

Vacke J., Cibulka R.: Reakce vybraných odrůd ozimé pšenice na infekci virem zakrslosti pšenice v rané růstové fázi.....	1
Špunarová M., Kraus I.: Hodnocení úspěšnosti hybridizace u jarního ječmene pomocí genetického markeru.....	5
Polzerová H., Ptáček J.: Detekce polymorfismu DNA u brambor technikou RAPD .....	11
INFORMACE – STUDIE – ZPRÁVY	
Janeček J., Ohnoutková L.: Genetická transformace píceňích a trávnickových trav .....	17
NOVÉ ODRŮDY	
Špunarová M.: Jarní ječmen Maridol.....	23
Vorel V.: Brambor Katka .....	24
Z VĚDECKÉHO ŽIVOTA	
Nedělník J.: Lucerne and Medics for the XXI Century .....	10
Vrkoč F.: Významné životní jubileum Ing. Ivo Bareše, DrSc.....	16
Pokyny pro autory příspěvků do vědeckého časopisu Czech Journal of Genetics and Plant Breeding.....	27

Vědecký časopis CZECH JOURNAL OF GENETICS AND PLANT BREEDING (GENETIKA A ŠLECHTĚNÍ) ● Vydává Česká akademie zemědělských věd – Ústav zemědělských a potravinářských informací ● Redakce: Slezská 7, 120 56 Praha 2, tel.: 02/24 25 34 89, fax: 02/24 25 39 38, e-mail: cerna@uzpi.cz ● Sazba: Studio DOMINO – Ing. Jakub Černý, Plzeňská 145, 266 01 Beroun, tel.: 0311/229 59 ● Tisk: ÚZPI Praha ● © Ústav zemědělských a potravinářských informací, Praha 2000

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