

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **1998-3998**
 (22) Přihlášeno: **04.06.1997**
 (30) Právo přednosti: **04.06.1996 NL 1996/1003261**
12.11.1996 US 1996/748212
 (40) Zveřejněno: **15.09.1999**
(Věstník č. 9/1999)
 (47) Uděleno: **22.09.2008**
 (24) Oznámení o udělení ve Věstníku: **29.10.2008**
(Věstník č. 44/2008)
 (86) PCT číslo: **PCT/NL1997/000313**
 (87) PCT číslo zveřejnění: **WO 1997/046080**

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:
A01H 5/12 (2006.01)
A01H 1/06 (2006.01)

(56) Relevantní dokumenty:

Ecnink, A.H., Dieleman, F.L.: „Resistance of Lactuca accessions to leaf aphids. Components of resistance....“, Proc. 5th Symp. Insect-Plant Relationships, Wageningen, 349-355, 1982; Ecnink A.H. and Dieleman F.L.: „Inheritance of resistance to the leaf aphid Nasonovia ribis-nigri in the wild lettuces species lactuca virosa“, EUPHYTICA, vol. 32, 691-695, 1983; Dunn, J.A.: „The Biology of Lettuce Root Aphid“, Annals of Applied Biology 47 (3), 475-491, 1959; Reinink K. et al.: „Comparison of sources of resistance to leaf aphids in lettuce“, EUPHYTICA, vol. 40, 21-29, 1989.

(73) Majitel patentu:

RIJK ZWAAN ZAADTEELT EN ZAADHANDEL B.
 V., De Lier, NL

(72) Původce:

Jansen Johannes Petrus Antonius, Zwijndrecht, NL

(74) Zástupce:

KOREJZOVÁ & SPOL., v.o.s., JUDr. Zdeňka
 Korejzová, advokátka, Korunní 104/E, Praha 10, 10100

(54) Název vynálezu:

Rostliny odolné proti mšicím

(57) Anotace:

Rostliny, odolné proti mšicím z čeledi Compositae, odolné proti mšicím Nasonovia ribisnigri v důsledku přítomnosti genu Nr pro odolnost v genomu se liší od jiných tím způsobem, že genetická informace, v jejímž důsledku se vytváří fenotyp CRA v genomu rostliny chybí alespoň do takového rozsahu, že nedochází k expresi fenotypu CRA. Popsán je také způsob selekce těchto rostlin.

Rostliny odolné proti mšicím

Oblast techniky

Vynález se týká rostlin, odolných proti mšicím z čeledi Compositae, zvláště salátu z rodu *Lactuca*. Jde o rostliny, odolné proti mšicím *Nasonovia ribisnigri*, které mohou být významné ze zemědělského hlediska.

Dosavadní stav techniky

Mšice způsobují značné škody na zelenině. Živí se rostlinnou tkání včetně cévního systému a tím vyvolávají snížení nebo abnormální růst. Přítomnost mšic mimoto činí sklizené produkty neprodejnými. Mimoto vytváří sladký sekret mšic lepkavou vrstvu na listech zeleniny. Kromě přímého poškození mohou mšice také šířit virové choroby rostlin a jsou proto krajně nežádoucí.

Nasonovia ribisnigri je čeleď mšic, která je v Evropě na porostech polního salátu nejrozšířenější. Jde o zvláště škodlivé organismy vzhledem k tomu, že napadají převážně mladé listy rostlin. Mšice jsou při tom snadno zachyceny v zavírajících se hlávkách salátů a tím jsou nesnadno zasažitelné pesticidy. Zvláště u těch typů salátů, které vytvářejí pevné hlávky, je tento problém velmi závažný. Pěstitelé se snaží často omezit poškození, způsobené mšicemi opakovaným postřikem rostoucích rostlin pesticidy, zvláště v případě, že počasí je příznivé pro množení mšic. Používání vysokého množství pesticidů je však nežádoucí z hlediska životního prostředí. Mimoto není možno zaručit, že pesticidy skutečně zasáhnou mšice, například v případě zavírajících se hlávek salátu.

Odolnost rostlin, na nichž se mohou mšice vyskytovat, to znamená odolnost hostitelských rostlin je alternativou k použití pesticidů, přičemž tato alternativa by byla velmi výhodná z hlediska životního prostředí. Z tohoto důvodu byly prováděny četné pokusy, dokud jde o odolnost proti *N. ribisnigri* a o dědičnost tohoto typu odolnosti. Byla již popsána částečná odolnost pro řadu kultivarů salátu proti *N. ribisnigri* podle publikace Dunn J. A. a Kempton D. P. H., 1980, *Tests of Agrichemical and Cultivars*, č. 1, Ann. appl. Biol. 94, doplněk, str. 58 až 59. Téměř úplná odolnost k *N. ribisnigri* byla prokázána u divoké variety salátu *Lactuca*, *L. virosa* L. podle Eenink A. H. a Dieleman F. L., 1983, *Euphytica* 32, 691 až 695. Tato odolnost u *L. virosa* byla způsobena jediným dominantním genem, který byl označen Nr.

V roce 1981 byly vytvořeny v Institute for Horticultural Plant Breeding (IVT, nyní část CPRO-DLO) ve Wageningen rostliny *L. sativa*, které ve svém genomu obsahovaly fragment chromosomu *L. virosa* s genem Nr pro odolnost proti *N. ribisnigri*. Tyto rostliny byly výsledkem programu hybridizace *L. virosa* a *L. sativa*, přičemž byla k přemostění použita *L. serriola*. Taková čeleď se užívá v případě, že jiné dvě čeledi mohou být spolu jen omezeně zkříženy, tak, jak tomu je v případě *L. virosa* a *L. sativa*.

Vytvořené rostliny však měly nežádoucí fenotyp a agronomické vlastnosti, nevytvářely žádoucí hlávky a jejich kultivace byla obtížná.

Vzhledem k uvedeným nežádoucím vlastnostem byly tyto rostliny užity pro účely křížení jako rodičovské rostliny pro hybridizaci k získání dalších rostlin pomocí genetické rekombinace a selekce tak, aby mohlo být dosaženo kombinace odolnosti proti *N. ribisnigri* s dobrými agronomickými vlastnostmi.

L. sativa je jednoletá rostlina, avšak v případě pěstování za umělého světla při vyšší teplotě je možno v průběhu jednoho roku vyprodukovat 2 až 5 generací. Zpětné křížení je obecně známý a vhodný postup pro křížení genů z "dárce" do genetického základu za získání cenného agro-

nomického materiálu. Obecně je možno zajistit uložení dominantního genu do agronomicky přijatelného fenotypu v průběhu 3 až 5 zpětných křížení, následovaných 2 až 3-násobným samoopylením. K získání ní agronomicky přijatelných rostlin s požadovaným genem v jejich genomu je tedy zapotřebí 5 až 8 generací v průběhu 3 až 5 let. Přestože rostliny, obsahující gen Nr byly
 5 připraveny již v roce 1981 s možností dodávky pro osev, úspěšný přenos tohoto genu do agronomicky přijatelných rostlin salátu nebyl až dosud s úspěchem uskutečněn.

Vynález si klade za úkol vytvořit rostliny z čeledi Compositae, zvláště nové rostliny salátu, které by spojovaly odolnost proti mšicím z čeledi Nasonovia ribisnigri s agronomicky vhodnými
 10 vlastnostmi.

Vynález je založen na zjištění, které bylo prokazováno v průběhu selekčního postupu, že totiž při přenosu genu pro odolnost rostlin salátu chromosomovým fragmentem L. virosa dochází vlivem tohoto chromosomu ke zhoršení agronomických vlastností salátových rostlin. Jde o vedlejší
 15 účinek chromosomového fragmentu, v němž je gen Nr uložen, na genom L. sativa. Ve srovnání s pěstovanými salátovými rostlinami, které nenesou gen pro tuto odolnost jsou homozygotní rostliny s genem Nr menšího vzrůstu, mají světlezelenou barvu a ve starších listech dochází k urychlenému rozkladu chlorofylu u generativních rostlin. V důsledku toho mají generativní rostliny starší listy bělavé nebo zcela bílé a/nebo mají sníženou výšku rostlin. Tento agronomicky
 20 nežádoucí fenotyp bude dále v průběhu přihlášky označován jako fenotyp CRA (Compact growth and Rapid Ageing). Na obr. 1 je znázorněn příklad rozdílu mezi normálními rostlinami. salátu a rostlinami fenotypu CRA. Ve vegetativním stadiu jsou příznaky zvláště zjevné v případě, že rostliny rostou za méně výhodných podmínek, například při nižší teplotě.

25 Podstata vynálezu

Podstatu vynálezu tvoří rostliny, odolné proti mšicím, obsahující ve svém genomu gen Nr pro odolnost, přičemž genetická informace pro vznik fenotypu CRA v rostlinách chybí alespoň do
 30 takového rozsahu, že nedochází k expresi tohoto fenotypu.

Vynález je založen na poznatku, že fenotyp CRA není důsledkem přítomnosti genu Nr, nýbrž genetickou informací z blízkosti tohoto genu. Z tohoto důvodu bylo pozorováno, že existuje souvislost mezi odolností rostlin a fenotypem CRA. Při přerušení spojení mezi genem Nr a
 35 některými složkami v jeho blízkosti je však možno vypěstovat odolné a agronomicky přijatelné rostliny. Z literatury bylo zjištěno, že v průběhu křížení bylo pozorováno, že také jiný materiál z L. virosa bývá často příčinou vzniku fenotypů CRA, například podle publikace Maxon Smith a Langton, The Grower, 21. 9. 1989, str. 54 až 55, kde se popisuje souvislost mezi kompaktním růstem a odolností proti Bremia lactucea, přenesené do pěstovaného salátu z L. virosa. CRA
 40 fenotyp je recesivní vlastnost, k expresi tohoto fenotypu dochází pouze u homozygotně odolných rostlin. Na základě tohoto poznatku je však možno uvedený problém vyřešit.

Na základě svrchu uvedených skutečností je zásadně možno vybírat rostliny, u nichž byla z blízkosti genu Nr odstraněna genetická informace pro fenotyp CRA nebo byla pozměněna
 45 natolik, že již nedochází k současné expresi odolnosti a fenotypu CRA. Jako příklad se v průběhu přihlášky uvádí gen Nr pro odolnost, avšak zásadně je možno vynález aplikovat i na jiné vlastnosti, spojené s fenotypem CRA při použití materiálu z L. virosa.

Odstranění nebo změna genetické informace, v jejímž důsledku dochází ke vzniku fenotypu CRA je možno uskutečnit rekombinací v blízkosti genu. V současné době není zcela prokázáno, zda
 50 informace pro fenotyp CRA leží na pravé nebo levé straně genomu nebo zda je uložena po obou jeho stranách. V případě, že je genetická informace pro fenotyp CRA uložena na obou stranách genu pro odolnost, odstraní se nebo se změní s výhodou obě části této genetické informace. Podle vynálezu se tedy s výhodou vybírají rostliny, u nichž došlo nejméně ke dvěma rekombinačním
 55 jevům. K této rekombinaci nemusí samozřejmě dojít v průběhu jedné generace, i rekombinační

postupy, probíhající v po sobě následujících generacích, mohou ve svém důsledku vést k odstranění nebo ke změně genetické informace na obou stranách genu pro odolnost. V případě, že informace pro fenotyp CRA je uložena pouze na jedné straně genu, stačí samozřejmě uskutečnit jedinou rekombinaci.

- 5 Pod pojmem „rekombinační jev“ se rozumí meiotický crossing-over.

Rostliny bez fenotypu CRA je možno získat běžnou hybridizací. Je však zapotřebí použít správných kritérií pro selekci. Podle vynálezu byla nyní správná kritéria pro selekci definována, jde zejména o úplnou nebo částečnou nepřítomnost nebo neúčinnost části genetické informace z blízkosti genu pro odolnost. Podle vynálezu je nepodstatné, do jakého rozsahu byla genetická
10 informace v blízkosti genu pro odolnost odstraněna nebo jakým způsobem byl gen nebo byly geny pro CRA deaktivovány, pokud je fenotyp CRA nepřítomen rostlině i jejím potomstvu.

Aby bylo možno vyhledat rostliny, u nichž došlo k rekombinaci mezi genem Nr a geny, které vyvolávají fenotyp CRA se systematicky sledují oddělené populace nebo potomstvo těchto populací k získání rostlin, obsahujících rekombinantní fenotyp, to znamená homozygotní odolnost proti *N. ribisnigri* v kombinaci s nepřítomností fenotypu CRA. Přesto že je možno získat vhodné rekombinantní rostliny tímto způsobem, jak je také zřejmé z příkladů, existuje přesto řada příčin, v jejichž důsledku může dojít ke komplikacím při nacházení agronomicky cenných rekombinantních rostlin.

20 Při selekci na spojení odolnosti s dobrými agronomickými vlastnostmi bylo prokázáno, že rostliny, které spojují odolnost proti *N. ribisnigri* s agronomicky cenným fenotypem téměř vždy nejsou výsledkem rekombinace v chromosomu, ale jsou heterozygotní z důvodu přenesení chromosomového fragmentu *L. virosa*. Bylo prokázáno, že fenotyp CRA se dělí recesivně. Vzhledem k tomu, že gen Nr je dominantní u rostlin s jedinou kopií chromosomového fragmentu *L. virosa*, budou tyto rostliny spojovat odolnost s normálním fenotypem, odlišným od CRA. Potomstvo takových rostlin se však bude dělit a budou se v něm objevovat rostliny s fenotypem CRA, takže komerční využití nebude možné vzhledem k tomu, že využitelné variety salátu musí být čisté linie, odpovídající přísným požadavkům na genetickou homogenitu, jinak nemohou být použity.
25 Bylo dále zjištěno, že exprese odolnosti je biologická vlastnost, která závisí na různých pokusných podmínkách a i na okolních podmínkách, takže při zkoušce na odolnost je určitý podíl rostlin klasifikován nesprávně, takže rostliny s obsahem genu Nr jsou považovány za neodolné a rostliny bez tohoto genu jsou naopak považovány za odolné. Totéž platí o hodnocení fenotypu CRA u jednotlivých rostlin v polních podmínkách nebo ve skleníku. V závislosti na pokusných a
30 okolních podmínkách bude určitý podíl rostlin, obsahujících chromosomový fragment *L. virosa* hodnocen jako normální rostlina, zatímco řada rostlin, v nichž je chromosomový fragment přítomen za heterozygotních podmínek nebo zcela chybí, může mít vlastnosti, v jejichž důsledku budou rostliny zařazeny do fenotypu CRA.

- 40 Přes svrhu popsané potíže, k nimž může dojít je zřejmé, že selekce požadovaných rostlin s genetickou informací bez fenotypu CRA je běžným způsobem možná. Tento způsob selekce však vyžaduje poměrně velkou populaci nebo velký počet hybridizací.

Z uvedených důvodů může být účinnější využít pro selekci vhodných rostlin molekulární biologii. Výjimečně vhodným způsobem je způsob AFLP, popsáný v publikaci Vos P. a další, *Nucleic Acids Research*, 1995, sv. 23, č. 21, 4407 až 4414. Tento postup je založen na zjištění polohy markerů DNA, které jsou genericky spojeny s genem Nr, takže je možno poměrně jednoduchým způsobem prokázat, zda došlo k rekombinaci v blízkosti genu Nr v potomstvu při hybridizačním pokusu. V případě, že vázaný marker chybí, došlo ke crossin-over mezi genem Nr a tímto markerem. Volbou markerů v různé vzdálenosti od genu je rovněž možno stanovit, jak velký úsek sekvence byl z blízkosti genu odstraněn. Potomstvo, v němž jeden nebo větší počet markerů chybí, tedy má odstraněnou alespoň část nežádoucí sekvence z blízkosti genu, takže tyto rostliny mají větší než průměrnou naději, že obsahují chromosom s genem Nr bez genetické informace, v jejímž důsledku dochází ke vzniku fenotypu CRA. Účinnost selekce rostlin s kom-

binací homozygosity pro gen Nr a nepřítomnosti fenotypu CRA je tedy možno při použití molekulárních markerů významně zvýšit.

Mapování generických markerů v blízkosti genu je postup, který může snadno provést běžný odborník a který byl popsán například v publikacích Lefebvre V. a Chevre A. M., Tools for marking plant disease and pest resistance genes: a review, *Agronomie* 15, 1995, (1): 3 až 19, Michelmores R. W. Molecular approaches to manipulation of disease resistance genes, *Annual Review of Phytopathology* 33, 1995, 393 až 427, Michelmores R. W., Kesseli R. V. a Ryder E. J., Genetic mapping in lettuce, v R. L. Phillips a I. K. Vasil, eds., *DNA-based markers in plants*, Kluwer Acad. Publishers, Dordrecht, 1994, str. 223 až 239, Winter P. a Kahl G., Molecular marker technologies for plant improvement, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 1995, (4), 438 až 448. Obecné informace o technologii AFLP je možno nalézt ve svrhu uvedené publikaci Vos P. a další. V příkladu 2 bude dále vysvětleno použití technologie AFLP pro selekci rostlin podle vynálezu.

Vynález je v průběhu přihlášky osvětlen na pěstovaných rostlinách salátu *Lactuca sativa*. Každému odborníkovi je však zřejmé, že principy vynálezu jsou zcela obecné a aplikovatelné nejen na další čeledi rodu *Lactuca*, nýbrž obecněji na rostliny *Compositae*. Údaje, týkající se *L. sativa*, by tedy neměly být chápány jako omezení rozsahu vynálezu.

Podle vynálezu se s výhodou užívá genu pro odolnost z *L. virosa*. Rostliny podle vynálezu jsou samozřejmě zcela fertillní a dokud jde o gen pro odolnost homozygotní. Vzhledem k nepřítomnosti genetické informace pro fenotyp CRA nemají snížený růst ani méně syté zelené zbarvení listů ani u nich nedochází k předčasnému rozpadu chlorofylu u rostlin v generativní fázi.

Pod pojmem „pěstovaný salát“ nebo „pěstované rostliny salátu“ se rozumí salát, který je vhodný pro spotřebu a může splnit požadavky na komerční využití. Mimoto by měly obsahovat salátové rostliny materiál, vhodný pro další propagaci těchto rostlin. Příkladem materiálu, vhodného pro další propagaci rostlin salátu jsou orgánové tkáně, například listy, stonky, kořeny, výhonky a podobně, protoplasty somatické embrya, prašníky, blizny, burky v kultuře a podobně. Deriváty, vhodné pro další propagaci rostlin jsou například semena. Rostliny podle vynálezu je možno pěstovat nebo množit běžným způsobem, avšak také pomocí tkáňových kultur z některých částí těchto rostlin.

Rostliny podle vynálezu, které jsou charakterizovány nepřítomností fenotypu CRA v přítomnosti genu Nr při homozygotním stavu je možno použít k přenosu odolnosti proti *N. ribisnigri* na další agronomicky cenné typy salátu. Toho je možno dosáhnout například pomocí standardního zpětného křížení pro dominantní gen, například podle publikace Briggs F. N. a Knowles P. F., 1967, v *Principles of plant breeding*, str. 162 až 167 s následným samoopylením rostlin po nejméně dvě generace s následnou selekcí linií, které jsou homozygotní pro gen pro odolnost.

V určitém stupni selekce je možno užít zkříženého opylení. Zkřížené opylení u rostlin schopných samoopylení však vyžaduje zábranu samoopylení u rostliny, užitá jako samičí rostlina. Toho je možno dosáhnout ručním odstraněním samčích částí reprodukčních orgánů. Je také možno použít jiného fyzikálního odstranění, chemického odstranění a/nebo použití vody. Všechny tyto postupy pro odstranění nebo vyvolání disfunkce samčích částí reprodukčních orgánů jsou známy. Potomstvo této hybridizace je možno získat odebráním semen z hybridizované samičí rostliny, s následným výsevem semen F1 nebo semen po zpětném křížení k získání nových rostlin. Rostliny F1 mohou být schopné samoopylení za vzniku generace F2 nebo mohou být zpětně zkříženy s rodičovskou rostlinou. Tyto zpětně zkřížené rostliny mohou být znovu zpětně zkříženy s rodičovskou rostlinou ke zlepšení agronomické hodnoty rostlin v následující generaci nebo může dojít k samoopylení k získání rostlin, homozygotních pro gen Nr.

Podle prvního specifického provedení vynálezu je možno získat rostliny *L. sativa* L. linie RZ 96.85123, získání těchto rostlin bude dále podrobněji vysvětleno v příkladu 2. Rostliny této linie

jsou homozygotní vzhledem ke genu Nr a neobsahují genetickou informaci, která vede ke vzniku fenotypu CRA. Rostliny nejsou malé a/nebo zažloutlé jako rostliny CRA. V případě, že rostliny nejsou ani malé ani zažloutlé, je zřejmé, že chybí dostatečná část generické informace pro fenotyp CRA nebo byla tato genetická informace dostatečně deaktivována. Semena rostlin linie RZ 96.85123 byla uložena do sbírky NCIMB pod číslem 40804 dne 16. května 1996 pod podmínkou, že vzorky uložených semen mohou být do udělení patentu vydávány pouze odborníkům.

Podle dalšího specifického provedení vynálezu se uvádějí výsledky běžné hybridizace a specifické selekce podle příkladu 1, jejichž výsledkem byly rostliny linie RZ 96.75906. Tyto rostliny jsou rovněž homozygotní pro gen Nr a chybí jim genetická informace pro fenotyp CRA. Semena rostlin linie RZ 96.75906 byla rovněž uložena do sbírky NCIMB pod číslem 40803 16. května 1996.

Součástí podstaty vynálezu tvoří potom způsob získávání rostlin podle vynálezu, který spočívá v tom, že se vybere rodičovská rostlina, která je heterozygotní pro odolnost typu genu Nr, vytvoří se potomstvo ve formě segreganční populace a potomstvo této populace a u tohoto potomstva se prokáže přítomnost odolnosti a přítomnost fenotypu CRA. Segreganční populaci je možno vytvořit různým způsobem, například samoopylením heterozygotní rodičovské rostliny, křížením heterozygotní rodičovské rostliny s odolnou rostlinou a použití dvojitého haploidního postupu u heterozygotní rodičovské rostliny. V tomto případě se nové rostliny pěstují z dvojitých gamet rostliny. Gamety mohou pocházet ze samčích reprodukčních orgánů (androgenese) nebo ze samičích reprodukčních orgánů (gynogenese). Kultura zdvojených aploidů obvykle vyžaduje stupeň, provedení in vitro. Výhoda tohoto postupu při vyhledávání rekombinantů spočívá v tom, že gamety, z nichž rostlina pochází, jsou výsledkem meiotické rekombinace v heterozygotní rodičovské rostlině, kdežto výsledné zdvojené haploidy jsou zcela homozygotní, takže nemůže dojít k maskování účinků heterozygotních jedinců.

U rostlin, získaných postupem s použitím zdvojených haploidů může být výsledný rekombinant okamžitě rozpoznán. Jde o rostlinu s odolností a bez CRA. V liniích, získaných samovolným opylením rostlin ze segregančních populačních linií je možno rekombinantní rostliny rozeznat tak, že celá linie je odolná, avšak v linii se stále vyskytují rostliny s CRA, nebo má linie normální fenotyp, avšak objevují se v ní odolné rostliny nebo je linie odolná a všechny rostliny mají normální fenotyp.

Účinnost tohoto postupu je možno podstatně zvýšit tak, že před získáním potomstva od v podstatě každé rostliny se provádí předběžná zkouška na rostlinách, na nichž se jeví výsledky požadované rekombinace. Taková předběžná zkouška může být provedena při použití metod molekulární biologie, například pomocí AFLP. Selektace tímto postupem je založena na detekci rekombinace v blízkosti uložení genu Nr v genomu rostliny ve sledované populaci.

Vynález bude dále osvětlen souvislosti s příklady provedení, které jsou určeny pro popis jednotlivých praktických provedení vynálezu, nemají však sloužit k omezení rozsahu vynálezu.

Příklady provedení vynálezu

Nejprve budou obecněji popsány jednotlivé postupy a pak budou v jednotlivých příkladech uvedeny specifické podrobnosti jednotlivých pokusů.

Materiály a metody

1. Zkouška na odolnost

Odolnost proti *N. ribisnigri* je možno prokázat tak, že se populace rostlin pěstuje a každá rostlina se naočkuje určitým počtem mšic *N. ribisnigri*, například 15. Odolnost je prokázána v případě, že po určité době, například 7 dnů je počet mšic na rostlině O nebo méně než počáteční počet, zatímco u rostlin bez odolnosti dojde po této době ke zvýšení počtu mšic.

- Rostliny bez odolnosti jsou pěstovány současně jako rostliny kontrolní. U těchto kontrolních rostlin musí dojít prokazatelně k množení mšic, aby bylo možno test zařadit do pokusu. Zkouška se s výhodou provádí při teplotě 18 až 24 °C při minimální délce dne 14 hodin. Pro naočkování *N. ribisnigri* se s výhodou užijí malé rostliny ve vegetativní fázi s přibližně 1 až 3 pravými listy, i když je možno použít i starší rostliny. Pokusy na odolnost proti mšicím *N. ribisnigri* je možno provádět jak za polních podmínek, tak také ve skleníku.

- Mšice, použité pro uvedenou zkoušku, byly mšice červeného biotypu, označované WN1, tento biotyp je možno získat z Department of Entomology of the Agricultural University of Wageningen. Před pokusem se mšice pěstují na rostlinách salátu. Je samozřejmě možno použít také zeleně zbarvené mšice. Při zkoušce na odolnost byla semena vysévána do kompostových bloků a mšice byly přeneseny na mladé rostlinky salátu 2 týdny po vysetí.

2. Hybridizace

- Pro první hybridizaci se užije jedna z rodičovských rostlin, která je homozygotní, pokud jde o odolnost proti *N. ribisnigri* a která má agronomicky nežádoucí vlastnosti, jako snížený růst, méně intenzivní zelenou barvu a/nebo časný rozpad chlorofylu v generativní fázi. Jako druhá rostlina se užije rostlina, která není odolná proti *N. ribisnigri* a nemá agronomicky nežádoucí vlastnosti.
- Rostliny F1, získané hybridizací je možno zpětně křížit s původní rodičovskou rostlinou bez odolnosti proti *N. ribisnigri* nebo jinou rostlinou bez této odolnosti je možno ji pěstovat v generaci F2, získané samoopylením. Takto získané rostliny BC1 po zpětném křížení nebo F2 je také možno pěstovat v další generaci samoopylením nebo je možno je znovu užít jako rodičovské rostliny pro hybridizaci. Zjištění rostlin, u nichž došlo k rekombinaci v blízkosti uložení genu *Nr* pro odolnost při použití AFLP nebo jiného postupu s použitím molekulového značení je možno úspěšně uskutečnit v populaci, která se dělí na rostliny, obsahující nebo neobsahující gen *Nr*. Může jít o populaci, získanou samoopylením heterozygotní rostliny, jak bude dále uvedeno v příkladu 2, nebo o populaci, získanou zpětným křížením heterozygotní rostliny, s výhodou rostliny z odolné rodičovské linie. Selektce pro rekombinaci mezi odolností proti *N. ribisnigri* a fenotypem CRA je možno účinně uskutečnit na populaci inbredních linií rostlin z populace, která se dělí na rostliny, obsahující a neobsahující gen *Nr*.

Pod pojmem linie se rozumí skupina semen nebo rostlin, získaná samoopylením jediné rostliny.

- Účinnost selektce při použití molekulového značení je možno zvýšit při použití předběžné selektce. Pak se dále sledují na odolnost a na přítomnost fenotypu CRA pouze rostliny, u nichž bylo pomocí značení prokázáno, že došlo k rekombinaci v blízkosti místa uložení genu *Nr*.

- Rozrušení spojení odolnosti a fenotypu CRA je možno prokázat u populace linií (po případně předběžné selekci pomocí molekulového značení) tak, že se určitý počet rostlin v jedné linii, například 25 rostlin sleduje na odolnost proti *N. ribisnigri* a tytéž nebo jiné rostliny, například opět v počtu 25 rostlin se sledují na přítomnost fenotypu CRA. Na bázi těchto dvou zkoušek je možno každou linii klasifikovat podle následujících kritérií:

- Odolnost:

- a) homogenní odolnost,
- b) dělení na odolné a neodolné rostliny,
- c) homogenně neodolné rostliny.

- Fenotyp CRA:

- a) uniformní fenotyp CRA,
- b) dělení na rostliny s fenotypem CRA a na rostliny s normálním fenotypem,
- c) homogenní normální fenotyp.

Rekombinantní rostliny, které jsou homozygotní pro gen Nr bez fenotypu CRA je možno nalézt:

1) v liniích, které jsou homogenně odolné proti *N. ribisnigri* a ne všechny rostliny mají fenotyp CRA a

2) v liniích, které uniformně mají normální fenotyp a ne všechny rostliny jsou bez odolnosti proti *N. ribisnigri*.

V prvním případě byly pro produkci semen zvoleny rostliny bez fenotypu CRA. Potomstvo, získané samoopylením těchto rostlin bylo znovu podrobena zkouškám na odolnost a na přítomnost fenotypu CRA a linie, které byly homogenně odolné a současně měly normální fenotyp, byly uchovány.

Ve druhém případě, byly pro produkci semen zvoleny odolné rostliny. Potomstvo po samoopylení těchto rostlin bylo opět podrobena zkouškám na odolnost a na přítomnost fenotypu CRA a linie, které byly homogenně odolné a měly normální fenotyp, byly uchovány.

3. Selektce pomocí AFLP

Z každé rostliny se pro provedení zkoušek odebere malá část listu, například 50 mg a extrahuje se DNA. Aby bylo možno provést zkoušku na vazbu mezi značením AFLP a genem Nr, musí být každá rostlina rovněž podrobena zkouškám na odolnost proti *N. ribisnigri*. Detekci AFLP nebo jiného molekulového značení, vázaného na gen Nr je možno uskutečnit srovnáním přítomnosti značení v jednotlivých odolných nebo neodolných rostlinách nebo tak, že se smísí DNA ze skupin neodolných nebo odolných rostlin a sleduje se přítomnost značení v těchto směsích DNA. Na bázi přítomnosti značení v jednotlivých rostlinách dělicí se populace je možno zanést značení, spojené s genem Nr do příslušné mapy a určit tak genetickou vzdálenost mezi dvojím značením a mezi značením a genem Nr. Způsoby detekce stupně genetického spojení vzájemně mezi značením a mezi značením a genem pro určitou vlastnost náleží mezi běžné postupy, uvedené v příručkách. Obvykle je k dispozici počítačový software pro provádění těchto studií, jde například o program Joinmap (CPRO-DLO, Wageningen).

Při použití značení, vázaného v blízkosti místa uložení genu Nr je možno zjistit rostliny, u nichž došlo k jedné nebo většímu počtu rekombinací blízkosti místa uložení genu Nr. Rostliny s touto rekombinací jsou charakterizovány tím, že část značení, spojená s genem Nr byla nahrazena značením z rostliny bez odolnosti, avšak s normálním fenotypem bez přítomnosti CRA.

Vývoj značení a průkazu značení pro tyto postupy byl uskutečněn v Keygene NV, Agro Business Park 90, Post Box 216, 6700 AE, Wageningen. Byl použit pouze postup AFLP, vyvinutý a patentovaný Keygene. Podrobnosti jsou uvedeny v publikaci P. Vos a další, AFLP: A new technique for DNA fingerprinting, Nucleic Acids Research, 1995, 23, (21), 4407 až 4414.

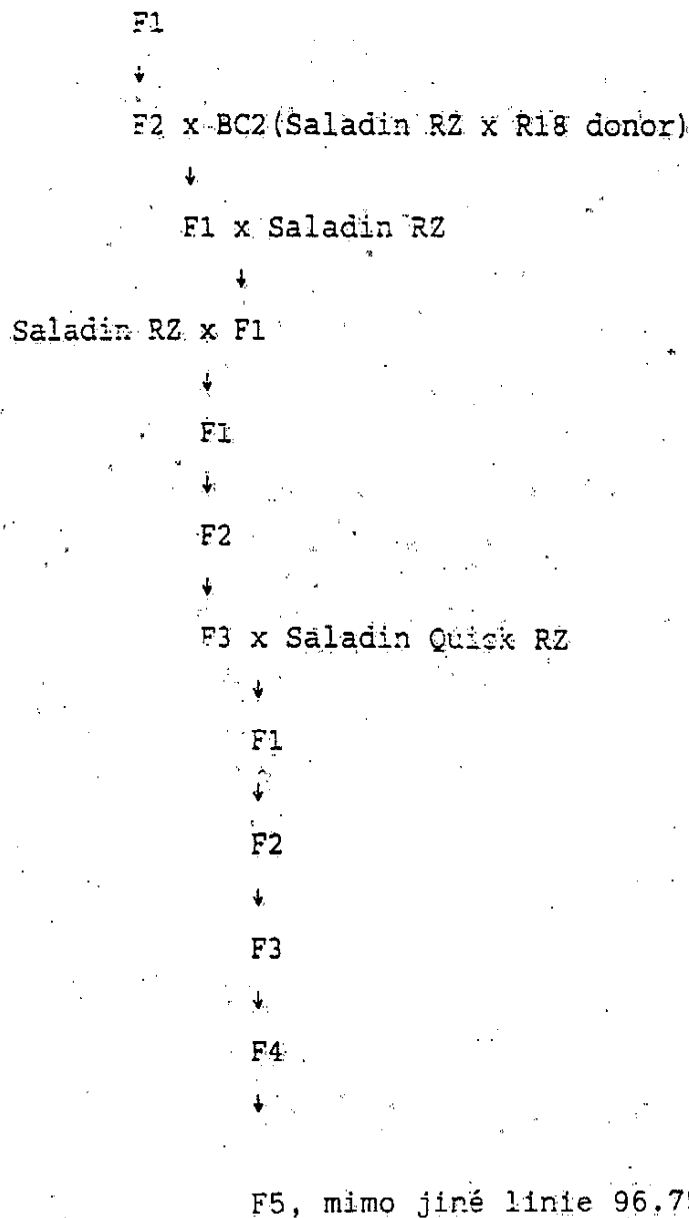
Technika AFLP je nyní dodávána z různých zdrojů a může ji provést každý odborník. Pro běžné odborníky je tedy nyní detekce značení, spojeného s genem, běžnou záležitostí, pokud jsou k dispozici vhodné populace rostlin. Je zřejmé, že při volbě vhodných restričních enzymů a primerů je možno vytvořit velké množství odlišného značení AFLP a toto značení spojit s určitým genem za získání řady blízce spojených značení k průkazu meiotické kombinace v blízkosti určeného místa, rozhodující je pouze počet použitých značení a jejich distribuce v chromosomovém fragmentu, v němž má být rekombinace prokázána.

Příklad 1

Běžná hybridizace

Rostliny *L. sativa* L. podle vynálezu byly získány podle následujícího schematu:

Linie 793202 x BC2 (Calona x donor)



- 5 Rostlina z linie IVT 793202, jedna z linií s genem Nr, vyvinutý v roce 1981 z Institute for Horticultural Plant Breeding (IVT), Wageningen, byla zkřížena s rostlinou naší vlastní selekční linie salátu s plnou odolností proti plísni, vyvolané *Bremia lactucae* (BC2 (Calona x R18 donor)). Semena F1 tohoto křížence byla vyseta a dále pěstována do stadia F2. Rostliny F2 byly podrobeny zkouškám na odolnost proti *N. ribisnigri* a na morfologii a vybraná odolná rostlina F2 byla
- 10 zkřížena s rostlinou typu Saladin s plnou odolností proti *B. Lactucae*, BC2 („Saladin RZ“ x R18 donor). Rostliny F1 z tohoto křížení byly sledovány na odolnost proti *N. ribisnigri* a zpětně zkříženy s rostlinou „Saladin RZ“. Rostliny F1 z tohoto křížení byly sledovány na odolnost proti *N. ribisnigri* a znovu kříženy s rostlinou typu „Saladin RZ“. Semena F1 z tohoto křížení byla
- 15 vyseta a pěstována k získání rostlin F2, které byly sledovány na odolnost proti *N. ribisnigri* a pro morfologii a odolná rostlina F2 s křehkou hlávkou byla pěstována v linii F3. Linie F3 byly znovu zkoušeny na odolnost a na fenotyp a rostlina F3, vybraná pro křehkou hlávkou byla zkřížena s rostlinou typu „Saladin Quick RZ“. Generace F1 z tohoto křížení byla sledována na odolnost proti *N. ribisnigri* a pěstována k získání rostlin F2. Rostliny z generací F2, F3 a F4, pocházející z jedné rostliny F1 z této hybridizace byly podrobeny zkouškám na odolnost proti *N. ribisnigri* a

na fenotyp. Vybrané rostliny F2 a F3, spojující odolnost s požadovaným fenotypem, odlišným od CRA byly vždy heterozygotní, pokud jde o gen Nr. Avšak v generaci F4 tohoto křížení byla nakonec nalezena linie, která měla normální fenotyp s křehkou hlávkou bez příznaků CRA a mimoto se stále ještě dělila na rostliny neodolné a odolné proti *N. ribisnigri*. V dalších generacích
5 několika rostlin F4 (mimo jiné šlo o linii RZ 96.75906) již nedocházelo k dělení na rostliny neodolné a odolné proti *N. ribisnigri* a rostliny byly homozygotní, pokud jde o gen Nr a současně neobsahovaly CRA a měly agronomicky cenný fenotyp.

Je nutno uvést, že tento příklad popisuje historii, vznik a vývoj rostlin podle vynálezu. Nepopisuje všechny generace, získané těmito hybridizacemi, ale pouze ty generace, které jsou přímým potomstvem uvedených rostlin. Byly sledovány ještě další hybridizační větve podle uvedeného
10 schématu selekce, avšak prozatím bez požadovaného výsledku, to znamená bez získání homozygotních rostlin bez příznaků CRA, odolných proti *N. ribisnigri*.

15 Příklad 2

Detekce rekombinantních rostlin předchozí selekci pomocí značení AFLP

Rostliny *L. sativa* L. podle vynálezu byly získány z jediného křížence mezi linií, odolnou proti
20 *N. ribisnigri*, IVT 793202 z Institute for Horticultural Pland Breeding a rostlinou salátu s křehkou hlávkou, variety „Ultra RZ“. Z rostliny F1 tohoto křížení byla odebrána semena, semena F2 byla vyseta a z řady rostlin byla získána semena F3.

Z tohoto křížení bylo podrobena zkouškám na odolnost 140 rostlin linie F3, dělicí se podle odol-
25 nosti a pocházející z jediné rostliny F2, heterozygotní, pokud jde o gen Nr. Ze zkoumaných rostlin bylo 95 rostlin odolných, 32 neodolných a u tří rostlin nebylo možno odolnost jasně vyhodnotit. Z rostlin F3 s jednoznačnou odolností byl odebrán materiál z listů pro analýzu DNA. Výchozím bodem pro detekci značení AFLP, spojeného s genem Nr byla v první řadě skupina DNA z pěti odolných linií salátu včetně odolné donorové linie IVT 793202, DNA ze tří neodol-
30 ných linií, včetně Ultra RZ, dvě směsi DNA z neodolných variet a 44 jednotlivých rostlin ze svrchu uvedené linie F3, získané hybridizací mezi IVT 793202 a Ultra RZ. Při těchto předběžných zkouškách byl identifikován jeden ko-dominantní značící prvek AFLP, který byl plně spojen s genem pro odolnost ve skupině 44 rostlin. Pomocí tohoto prvku je možno od sebe odlišit homozygotně a heterozygotně odolné rostliny.

Pomocí svrchu uvedeného ko-dominantního prvku bylo zkoušeno celkem 121 rostlin F3 z hybridizace mezi IVT 793202 a Ultra RZ. Bylo tedy možno rozdělit uvedené rostliny F3 na 35 homo-
35 zygotně odolných, 60 heterozygotně odolných a 26 neodolných. DNA homozygotně odolných rostlin a homozygotně neodolných rostlin byla odděleně smíšena. Z této „odolné“ a „neodolné“ směsi bylo provedeno 96 analýz sekvence. Bylo získáno 4300 pásů AFLP, z nichž 110 bylo spojeno s genem Nr a 25 bylo spojeno s allelou v tomto místě. 19 značících prvků AFLP bylo použito pro rekombinaci v blízkosti místa uložení genu Nr. Z těchto 19 prvků bylo 14 spojeno s genem Nr, vyvolávajícím odolnost a 5 bylo spojeno s allelou neodolných rostlin.

Na bázi této zkoušky s ko-dominantním značícím prvkem AFLP byly identifikovány dvě rostliny
45 F3, které byly heterozygotní, pokud jde o gen Nr. Ze semen F4 těchto rostlin bylo vyseto v linii F4 800 rostlin. Byl odebrán materiál z listů těchto rostlin a byla izolována DNA. V DNA celkem 1575 rostlin F1 byla sledována rekombinace v případě 19 zvolených značících prvků AFLP. Při prvním stanovení byla nalezena rekombinace u 206 rostlin. Těchto 206 rostlin bylo znovu
50 podrobena zkoušce na přítomnost 19 značících prvků AFLP. Rekombinace pak byla potvrzena v blízkosti místa uložení genu Nr v případě 162 rostlin.

Byla pěstována semena F5 z 1575 uvedených rostlin. Semena F5 byla získána z 89 ze 162 rostlin, u nichž byla prokázána rekombinace značícího prvku na bázi analýzy AFLP. Získaných 89 linií

F5 bylo podrobeno zkouškám na odolnost proti *N. ribisnigri* a na fenotyp. V průběhu těchto zkoušek byla nalezena linie 94.85338, která se již nedělila podle odolnosti a byla homozygotně odolná v důsledku přítomnosti genu *Nr*, která se však stále ještě dělila na základě fenotypu CRA. 50 rostlin linie 94.85338 bylo analyzováno pomocí řady značících prvků AFLP. Po analýze při použití 22 prvků AFLP, spojených s genem *Nr* byla nalezena jedna rostlina, homozygotně rekombinantní pro 12 z 22 použitých značících prvků. Ze semen F6 této linie 95.85051 bylo získáno další potomstvo. Linie pak byla znovu podrobena zkouškám na fenotyp i na odolnost a všechny rostliny této linie byly opět odolné proti *N. ribisnigri* a současně měly normální fenotyp bez příznaků CRA.

Z 11 rostlin linie 95.85051 byla vypěstována semena F7. Mimo jiné byla získána semena 96.85123, která byla uložena do sbírky.

Příklad 3

Uložení genu pro odolnost a určení místa uložení pomocí techniky AFLP

Obě rekombinantní linie RZ 96.85123 a RZ 96.75906 a několik kontrolních linií bylo podrobeno zkouškám při použití 21 značících prvků AFLP, které byly navázány na allele pro odolnost (značení cis). Značící prvky byly vyvinuty při křížení IVT 793202 x Ultra. Z předchozích zkoušek byla také známa nejpravděpodobnější sekvence různých značících prvků v genomu salátu. Byly sledovány následující genotypy:

1. IVT 793202 (vytvořená linie, Nasonovia–odolnost + CSV,
2. Ultra (BOTERSLARAS bez odolnosti proti Nasonovia, bez CSV,
3. Saladin (varietá salátu Iceberg bez odolnosti proti Nasonovia, bez CSV),
4. RZ 96.85123 (rekombinantní linie z příkladu 2, odolná proti Nasonovia, bez CSV),
5. RZ 96.75906 (rekombinantní linie z příkladu 1, odolná proti Nasonovia, bez CSV).

Výsledky, získané při použití značících prvků jsou uvedeny v následující tabulce.

Tabulka 1

Výsledky, získané při použití pěti linií salátu, podrobených zkouškám s použitím 21 značících prvků AFLP, vázaných na allele pro odolnost (značení cis), prvky byly pravděpodobně uloženy mezi sekvencemi genomu.

linie/ varietá	značení cis ¹																				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1
IVT793202	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ultra	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Saladin	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
96.85123	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
96.75906	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-

¹+ : značící prvek je přítomen

- : značící prvek chybí

Z výsledků, uvedených v tabulce 1 je zřejmé, že při použití trojího značení cis (číslo 3, 7 a 15) bylo dosaženo positivity i u variety salátu „Saladin“ a nejde tedy o polymorfii mezi varietou, neodolnou proti *Nasonomia* a oblastí z *L. virosa* v IVT 793202. Z hodnocení zbývajících

značících prvků vyplývá, že rekombinantní linie 96.85123 a 96.75906 odpovídají levé části vložené oblasti. U obou linií došlo k rekombinaci mezi značícími prvky 12 a 13. Vlevo od značícího prvku 13 neobsahuje ani jedna z linií značení cis. Z tohoto důvodu je velmi pravděpodobné, že gen nebo geny, které jsou kódovými geny pro CSV, jsou uloženy vlevo od značícího prvku 13 ve vloženém fragmentu z *L. virosa*. Linie 96.75906 se liší od druhé rekombinantní linie v tom smyslu, že je rozdělena také na pravé straně. Mezi značícími prvky č. 15 a 16 došlo v linii 96.75906 k rekombinaci a tato linie neobsahuje značení cis vpravo od značícího prvku 15. Je tedy možno uzavřít, že gen pro odolnost proti *Nasonovia* je uložen přibližně mezi značícími prvky 12 a 16.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Rostliny, odolné proti mšicím z čeledi Compositae, odolné proti mšicím *Nasonovia ribisnigri* v důsledku přítomnosti genu Nr pro odolnost v genomu, ve kterých genetická informace, v jejímž důsledku se vytváří fenotyp CRA v genomu rostliny chybí alespoň do takového rozsahu, že nedochází k expresi fenotypu CRA.

2. Rostliny, odolné proti mšicím podle nároku 1, ve kterých gen Nr pro odolnost je přítomen homozygotně.

3. Rostliny, odolné proti mšicím podle nároku 1 nebo 2, kterými jsou rostliny salátu rodu *Lactuca*, zvláště *L. sativa* L.

4. Rostliny, odolné proti mšicím podle některého z nároků 1, 2 nebo 3, získatelné tak, že se

a) vybere rodičovská rostlina, která je heterozygotní, pokud jde o odolnost Nr,

b) vytvoří se dělicí populace,

c) z v podstatě každé rostliny této populace se získá potomstvo,

d) získané potomstvo se podrobí zkouškám na odolnost a na přítomnost fenotypu CRA,

e) z potomstva se vybírají rostliny, které jsou odolné nebo které nemají fenotyp CRA,

f) z těchto rostlin se samoopylením získají semena a ze semen potomstvo, tvořící linii, načež se

g) linie podrobí zkouškám na odolnost a na přítomnost fenotypu CRA a vybírají se linie, které jsou uniformně odolné a současně nemají fenotyp CRA.

5. Rostliny, odolné proti mšicím podle nároku 4, u kterých se dělicí populace získá samoopylením rodičovské rostliny, zkřížením rodičovské rostliny s odolnou rostlinou nebo zdvojenou haploidní technikou.

6. Rostliny, odolné proti mšicím podle nároku 4 nebo 5, kde vhodné potomstvo ze stupně e) je potomstvo, v němž rostliny jsou uniformně odolné proti *N. ribisnigri*, přičemž nemají všechny fenotyp CRA, nebo jde o rostliny, které nemají fenotyp CRA a nejsou všechny neodolné proti *N. ribisnigri*.

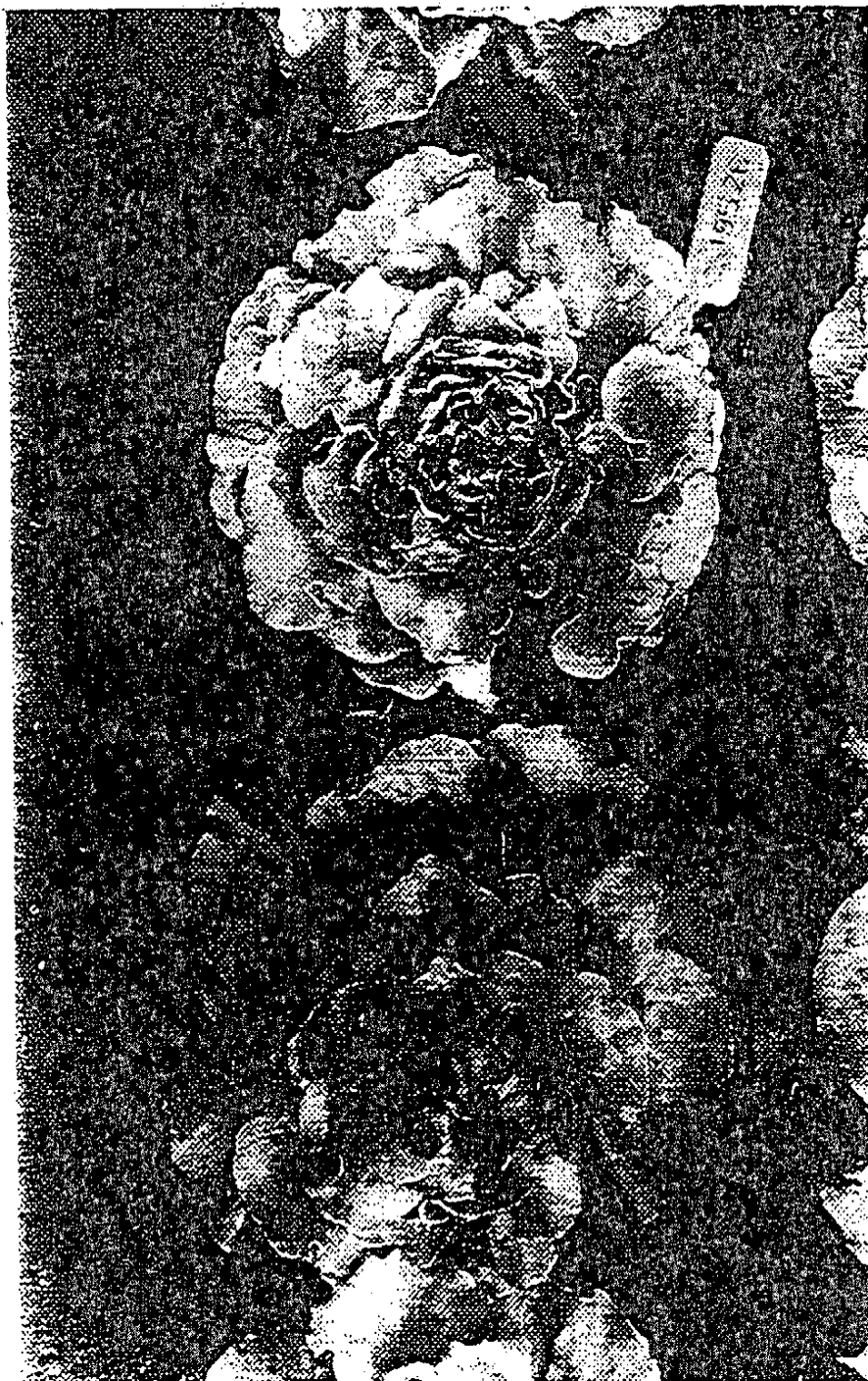
7. Rostliny, odolné proti mšicím podle nároku 4 nebo 5, kde vhodné potomstvo ze stupně e) je potomstvo, v němž rostliny jsou uniformně odolné proti *N. ribisnigri* a současně uniformně nemají fenotyp CRA, v tomto případě se neprovádějí stupně f) a g) uvedeného postupu.

8. Rostliny, odolné proti mšicím podle některého z nároků 4 až 7, kde zkouška ve stupni d) je založena na nepřítomnosti fenotypu CRA, sledovaného okem.

9. Rostliny, odolné proti mšicím podle některého z nároků 4 až 8, kde před stupněm c) se provádí předběžná selekce rostlin pomocí molekulární biologie tak, že se sleduje případný výskyt rekombinace mezi genetickou informací pro odolnost a genetickou informací pro fenotyp CRA.
- 5 10. Rostliny, odolné proti mšicím podle nároku 9, kde se jako postup molekulární biologie užije technika AFLP.
11. Potomstvo rostlin, odolných proti mšicím podle nároků 1 až 10, získané generativním nebo vegetativním způsobem.
- 10 12. Části nebo deriváty rostlin, odolných proti mšicím, podle nároků 1 až 11 vhodné pro množení.
13. Části nebo deriváty rostlin podle nároku 12, kterými jsou tkáně, například listy, stonky, kořeny, výhonky, protoplasty, somatická embrya, prašníky, blizny, buňky v kultuře nebo semena.
- 15 14. Části nebo deriváty rostlin podle nároků 1 až 11, vhodné ke spotřebě.
15. Části nebo deriváty rostlin podle nároku 14, kde částmi, vhodnými ke spotřebě, jsou například hlávky nebo listy.
- 20 16. Způsob získávání rostlin podle nároků 1 až 10, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že se
- a) vybere rodičovská rostlina, která je heterozygotní, pokud jde o odolnost Nr,
- b) vytvoří se dělicí populace,
- 25 c) z v podstatě každé rostliny této populace se získá potomstvo,
- d) získané potomstvo se podrobí zkouškám na odolnost a na přítomnost fenotypu CRA,
- e) z potomstva se vybírají rostliny, které jsou odolné nebo které nemají fenotyp CRA,
- f) z těchto rostlin se samoopylením získají semena a ze semen potomstvo, tvořící linii, načež se
- g) linie podrobí zkouškám na odolnost a na přítomnost fenotypu CRA a vybírají se linie, které
- 30 jsou uniformně odolné a současně nemají fenotyp CRA.

1 výkres

35



Konec dokumentu
