



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

255259

(11)

(B1)

(51) Int. Cl.⁴

A 01 H 1/04

(22) Přihlášeno 07 12 84

(21) PV 9516-84

(40) Zveřejněno 16 07 87

(45) Vydáno 15 03 89

(75)

Autor vynálezu

ŠAŠEK ANTONÍN ing. CSc., ČERNÝ JIŘÍ ing. CSc., PRAHA,
DOSTÁL JOSEF ing., JENEČ, HANIŠOVÁ ALENA ing., PRAHA

(54) Způsob získávání genotypů embryí pšenice

Řešení se týká způsobu získávání genotypů embryí pšenice pomocí bílkovinných - gliadinových markerů, což umožňuje získání žádaných potomstev rostlin ve šlechtitelské praxi. Způsob výroby podstatně zkracuje dobu mezi vývojem nové odrůdy pšenice a zavedením odrůdy do praxe.

Předmětem vynálezu je způsob získávání genotypů embryí pšenice bílkovinnými-gliadinovými markery k určení, rozlišení a využití homozygotních a heterozygotních genotypů u hybridizačních programů, v programech mutačních šlechtění a při výběru z odrůd - populací pšenice.

K tvorbě nových výkonnějších a jakostnějších odrůd pšenice se využívá především metody křížení, umožňující vhodně kombinovat stávající genetické dispozice rodičovských forem. Pokud nejsou k dispozici žádané genetické zdroje, vyvolávají se v procesu mutačního šlechtění. Cenné genetické zdroje, pro potřebu hybridizačního programu, lze získat vyčleněním žádaných genů výběrem z odrůd - populací. Výběrové postupy dosud používané ve šlechtění obilovin jsou založeny na fenotypovém výběru rostlin generace F 2 a na prověrce jejich semenného potomstva v následných generacích F 3 až F 7. Kvantitativní vlastnosti, např. pekařská jakost pšenice, mrazuvzdornost aj. se v této počáteční fázi šlechtění, tj. generacích F 2 až F 3 nedají hodnotit. Tyto vlastnosti lze určit pouze v pozdějších generacích na základě víceletých zkoušek a na více lokalitách. Současný způsob výběru a hodnocení šlechtitelských materiálů neumožňuje rozlišit v ranných etapách šlechtitelského procesu, tj. v generaci F2 nebo F 3 homozygotní nebo heterozygotní genotypy. Geneticky stabilizované linie se stabilizovanými hospořáckými vlastnostmi poskytují pouze homozygotní genotyp. Při současném způsobu výběru je jejich zjištění a potvrzení až F 8. Tento způsob neumožňuje výběr žádaných genotypů, tj. rekombinantů, mutantů v první štěpicí generaci ani jejich urychlené rozmnožování např. ve skleníku. Stávající systém výběru a hodnocení šlechtitelských materiálů umožňuje proto vytvoření a povolení odrůdy v časovém rozpětí 10 až 15 let. Zmíněný způsob se vyznačuje vysokou spotřebou energií, se značnou náročností na pracovní síly a větší plošnou výměru na pokusnou plochu.

Uvedené nevýhody jsou v podstatné míře odstraněny způsobem výroby genotypů pšenice bílkovinnými - gliadinovými markery, jehož podstata spočívá v tom, že obilky získané ze štěpicích populací se mechanicky rozdělí na část embryonální a část endospermální. Část embryonální tvoří z celé obilky 25 až 45 %. Obě části se shodně označí. Všechny endospermální části rozdělených obilek se elektroforeticky testují pomocí bílkovinných - gliadinových markerů a z nich se vybírají pouze homozygotní genotypy se žádanými markerovými znaky. Příslušné embryonální části se za účelem získání potomstva kultivují při teplotách 18 až 22 °C, intenzivně umělého osvětlení 8 000 až 12 000 luxů po dobu 8 až 12 dnů v aseptických podmínkách při použití 0,5 až 2 % fungicidu a 1 až 10 % protiplísňový a protibakteriální roztok antibiotik.

Způsob výroby genotypů embryí obilovin bílkovinnými markery podle vynálezu přináší řadu výhod z nichž nejpodstatnější spočívá v tom, že umožňuje nahradit nevyhovující stávající způsoby výběru rostlin podle fenotypu výběrem embryí podle genotypu. To znamená, že pomocí elektroforezou získaných bílkovinných - gliadinových markerů lze elektroforeticky rozlišit homozygotní a heterozygotní genotypy již v první štěpicí generaci. Tím lze již na počátku šlechtitelského procesu vybrat a urychleně vyrobit požadované rekombinace, transgrese a mutace. Další výhodou způsobu podle vynálezu je skutečnost, že geneticky určená embrya podle bílkovinných - gliadinových markerů umožňují výběr homozygotních genotypů již v první štěpicí generaci, což intenzifikuje tvorbu odrůdy. Způsob podle vynálezu umožňuje při stejných hodnotách rodičovských forem markerových vlastností jako je pekařská jakost, nebo mrazuvzdornost, stanovit zda genetická determinance u rodičů je stejná nebo odlišná. V případě odlišné genetické výbavy lze záměrně křížením a výběrem v hybridním potomstvu získat linii s vyšší hodnotou znaků. Analogicky lze vybrat vhodně kombinující rodiče, doplňující se ve vlastnostech značených bílkovinnými-gliadinovými markery. Tak lze záměrně kombinovat v hybridním potomstvu pšenice rezistenci k mrazu s vyšší pekařskou jakostí. Značnou výhodou je možnost posouzení kvantitativních znaků jako např. pekařská jakost podle gliadinového spektra jedné obilky v generaci F 2. Nespornou výhodou je možnost posuzování šlechtitelského materiálu z hlediska poznatků molekulární genetiky, což intenzifikuje šlechtitelský proces.

Příklad 1

K získání homozygotních hybridních linií pomocí vynálezu byla použita generace B.c.1-F2 kombinace SLAVIA/2 x ODĚSKA - JA 16. Celkem bylo hodnoceno 1 450 zrn v plné zralosti generace B.c.1-F2. Zrna byla rozdělena příčným řezem na embryonální a endospermální části. Endospermální části zrn byly použity k elektroforetické analýze gliadinů ve škrobovém gelu. Zjištěná gliadinová spektra byla použita k určení homo a heterozygotního stavu gliadinových bloků 1A1-1A2, 1B1-1B4, 1D1-1D5, 6A1-6A3, 6B1-6B2 a 6D1-6DN1. Z analyzovaných 1 450 endospermálních částí zrn generace B.c.1-F2 bylo vyloučeno 1 175 zrn, heterozygotních ve většině gliadinových bloků, tj. celkem 81,03 % jedinců štěpící populace. Vybrané homozygotní, embryonální části 275 zrn byly skladovány při teplotě 5 °C po dobu 1 až 3 měsíců a dále kultivována v aseptických podmínkách s přidáním růstových stimulátorů při teplotě 20 °C při umělém osvětlení s intenzitou 10 000 luxů po dobu 10 dnů. Naklíčené rostliny byly jarovizovány na světle při intenzitě světla 10 000 luxů v jarovizační komoře při teplotě 5 °C po dobu 42 dnů. Jarovizované rostliny byly vysazeny do pole s kořenovými baly. V generaci B.c.1-F3 byla vybrány podle gliadinových bloků-markerů celkem 64 genotypy, rostliny homozygotní ve většině gliadinových bloků. Kupříkladu v gliadinovém bloku - markeru vysoké pekařské jakosti 1B1 bylo získáno ze 180 sklizených rostlin generace B.c.1-F3 celkem 39 rostlin (homozygotních v daném bloku). V následné generaci B.c.1-F4 byla opakovaně stanovena gliadinová spektra získaných homozygotních linií. V 33 případech z hodnocených 39 linií byla prokázána identita homozygotní konstituce gliadinového bloku 1B1 rostlin generace B.c.1-F3 a jejich potomstev B.c.1-F4. Homozygotní konstituce bloku 1B1 byla tak potvrzena 84,60 %. Současně bylo identifikováno 22 rostliny generace B.c.1-F3 homozygotních v alternujícím gliadinovém bloku - markeru nižší pekařské jakosti 1B4. V generaci B.c.1-F4 byla potvrzena identita homozygotní konstituce bloku 1B4 u 19 potomstev tj. v 86,36 % analyzovaných linií. V generaci B.c.1-F3 byly rovněž zjištěny 2 rostliny heterozygotní s genotypem 1B1/1B4. Zmíněná heterozygotnost byla potvrzena v potomstvu B.c.-F4 obou zmíněných linií. Celková identita homozygotních a heterozygotních konstitucí bloků 1B1, 1B4 a 1B1/1B4 obou sledovaných generací B.c.1-F3 a B.c.1-F4 byla zjištěna u 60 linií z celkového počtu 64 linií, tj. dosáhla 93,75 %. Z celkového počtu 384 alelických gliadinových bloků, zjištěných u vybraných 64 linií generace B.c.1-F3 byla potvrzena identita genetické konstituce analyzovaných bloků /1A1-1A2, 1B1-1B4, 1D1-1D5, 6A1-6A3, 6B1-6B2 a 6D1-6DN1/ v generaci B.c.1-F4 a 306 bloků, tj. v 79,69 %. Použitím vynálezu bylo tak dosaženo v štěpící generaci B.c.1-F2 úspor na rozsahu analýz, potřeby pracovních sil, materiálové krytí atd.

Příklad 2

K zjištění heterogenity odrůd pšenice typu syntetických populací a k zjištění heterogenity nových šlechtění v procesu jejich udržovacího šlechtění byla použita jako model jugoslávská odrůda pšenice SUPER ZLATNA. Podle vynálezu bylo analyzováno 300 zrn, odebraných ze 75 typových rostlin introdukované odrůdy SUPER ZLATNA ze sklizně 1982 na StOZ ÚKZÚZ Sedlec u Prahy. Bylo zjištěno, že introdukovaná odrůda SUPER ZLATNA představuje složitou syntetickou populaci, skládající se z 10 odlišných homozygotních linií a z 6,70 % heterozygotních jedinců. Analyzovaná odrůda byla heterogenní v genu 1ld 1A, kde bylo zjištěno 6 různých alelických gliadinových bloků, v genech Gld 1B, Gld 1D a Gld 6B, kde bylo zjištěno po 3 odlišných alelických gliadinových blocích. V genu 6D byly zjištěny 2 gliadinové alelické bloky a v genu 6A pouze 1 alelický gliadinový blok. Ve vyčleněných souborech gliadinových alelických bloků byly zjištěny hospodářsky významné bloky-markery vyšší pekařské jakosti (1B1), vyšší mrazuvzdornosti (1A2, 6D2) a odolnosti ke rzi travní žitného typu (1B3). Jedna ze zjištěných linií nese gliadinový blok - marker vyšší pekařské jakosti 1B1, čtyři linie nesou gliadinové bloky - markery vyšší mrazuvzdornosti 1A2, 6D2 a dvě linie jsou vybaveny gliadinovým blokem - markerem odolnosti ke rzi travní žitného typu 1B3. U analyzovaných heterozygotních zrn byly zjištěny další významné gliadinové bloky - markery vyšší mrazuvzdornosti, tj. 1D5 a 1A1. Tyto genotypy lze převést do homozygotního stavu v další štěpící generaci pomocí vynálezu (viz příklad 1). Analýza struktury syntetické populace odrůdy SUPER ZLATNA pomocí vynálezu na jednotlivá homozygotní linie, genotypy umožňuje racionální

využití jednotlivých homozygotních linií této odrůdy jako genetických zdrojů vyšší pekařské jakosti či lepší mrazuvzdornosti nebo odolnosti ke rzi travní žitného typu, respektive ke rzi pšeničné v hybridizačních programech. Metoda tak umožňuje zvýšit účinnost hybridizace až 10násobně.

P ř í k l a d 3

Při gliadinovou analýzu jsou obilky pūleny na část endospermální, která je použita k elektroforetické analýze a část embryonální, ze které jsou vypěstovány rostliny s vhodnými vlastnostmi. Ve statisticky hodnotitelných pokusech byly porovnány klíčící rostliny vyrostlé z poloviny a celých obilek u odrůdy Grana, Vala, UR 750, Mironovská a Jara.

Výsledky byly následující:

Č.	Varianta	Délka listu v mm	Rozdíl průměrů
1.	Grana-polov.obilky	43,2	14,2
2.	Grana-celá obilka	29,0	
3.	Vala - polov. obilky	47,5	9,5
4.	Vala - celá obilka	38,0	
5.	UH 750 - polov. obilky	50,8	8,5
6.	UH 750 - celá obilka	42,3	
7.	Mironovská - polov. obilky	52,5	0,4
8.	Mironovská - celá obilka	52,1	
9.	Jara - polov. obilky	43,6	2,6
10.	Jara - celá obilka	41,0	

Bylo zjištěno, že v žádném případě není negativně ovlivněn růst klíčících rostlin rozdělením obilky na dvě části, ale že u některých odrůd dochází ke stimulaci růstu. Ke zhoršení klíčivosti dochází při delším skladování v nevhodných podmínkách.

P ř í k l a d 4

Při ověřování aseptických podmínek uvedeného způsobu výroby podle vynálezu bylo použito 0,5procentního roztoku 1-(4-chlorfenoxy)-3,3-dimethyl-1- 1,2,4-triazol-1-yl -2-butanonu a 2% roztoku Ampicilinu a Nystatina bylo zjištěno, že úhyn kultivovaných embryí a rostlin byl do 15 % sledovaného souboru v ojedinělém případě, při nedodržení techniky přesazování rostlin činil úhyn rostlin 34,54 %. Při nedodržení výše uvedených aseptických podmínek dochází nejméně k 95% úhynu embryí a rostlin následkem jejich zničení bakteriálními a houbovými kulturami. Při kultivaci embryí in vitro bylo dosaženo v pokusech prováděných ve VÚRV Ruzyně, kde aseptické podmínky byly zajištěny sterilací obilek běžnými technikami, úhyn kultivovaných embryí nepřesahoval 10 % sledovaného souboru.

P Ř E D M Ě T V Y N Á L E Z U

Způsob získávání genotypů embryí pšenice vyznačující se tím, že obilky štěpicích populací se mechanicky rozdělí na část embryonální a část endospermální, přičemž část embryonální tvoří 10 % až 45 % části všech rozdělených obilek se elektroforeticky testují pomocí bílkovinných - gliadinových markerů a vybírají se pouze homozygotní genotypy se žádanými markerovými znaky, k nim příslušné embryonální části se kultivují in vitro nebo in vivo při teplotách 18 až 22 °C po dobu 8 až 12 dní v aseptických podmínkách při použití roztoku 0,5 až 2 % objem. fungicidu a 1 % až 10 % objem. protiplísňových a protibakteriálních antibiotik.