

knih

ÚSTAV ZEMĚDĚLSKÝCH A POTRAVINÁŘSKÝCH
INFORMACÍ

ODBORNÁ KNIHOVNA
ministerstva zemědělství

PRAHA 1 - TĚŠNOV 6. 65

ROSTLINNÁ VÝROBA

PLANT PRODUCTION

2

ROČNÍK 39 (LXVI)
PRAHA 1993
CS ISSN 0370-663X

ČESKÁ AKADEMIE ZEMĚDĚLSKÝCH VĚD
SLOVENSKÁ AKADEMIA PÔDOHOSPODÁRSKYCH VIED

ROSTLINNÁ VÝROBA

PLANT PRODUCTION

VOLUME 39 (1993)

Redakční rada - Editorial Board

Předseda - Chairman

Doc. ing. Josef Š i m o n , CSc. (Výzkumný ústav rostlinné výroby, Praha-Ruzyně)

Členové - Members

Doc. ing. Pavol B a j č i , CSc. (Vysoká škola poľnohospodárska, Nitra)

Ing. Helena D o n á t o v á , CSc. (Vysoká škola zemědělská, Praha)

Prof. ing. Václav F r i c , DrSc. (Vysoká škola zemědělská, Praha)

Ing. Jozef H a b o v š t i a k , CSc. (Výskumný ústav lúk a pasienkov, pracovisko Krivá na Orave)

Ing. Alois C h a l u p a , CSc. (Výzkumný ústav technických plodín a luskovin, Šumperk)

Prof. ing. Vladimír K r a j č o v i č (Výskumný ústav lúk a pasienkov, Banská Bystrica)

Prof. ing. Lubomír M i n x , DrSc. (Vysoká škola zemědělská, Brno)

Ing. Timotej M i š t i n a , CSc. (Výskumný ústav rastlinnej výroby, Piešťany)

Ing. Josef P a ř í z e k (ZEAINVENT, a. s., Tmava)

Ing. Jaromír P r o c h á z k a , CSc. (Výzkumný ústav pícninářský, Troubsko u Brna)

Prof. ing. Stanislav P r o c h á z k a , DrSc. (Vysoká škola zemědělská, Brno)

Ing. Vlastimil R a s o c h a , CSc. (Výzkumný ústav bramborářský, Havlíčkův Brod)

Prof. ing. Jozef R e p k a , DrSc. (Vysoká škola poľnohospodárska, Nitra)

Doc. ing. Miron S u š k e v i č , DrSc. (Výzkumný ústav ekoagrotechniky, Hrušovany u Brna)

RNDr. Vladimír Š k r d l e t a , CSc. (Mikrobiologický ústav AV ČR, Praha)

Prof. ing. Václav V a n ě k , DrSc. (Vysoká škola zemědělská, Praha)

Ing. Marie V á ň o v á , CSc. (Výzkumný ústav obilnářský, Kroměříž)

Ing. Jaroslav V o š k e r u š a , CSc. (Výzkumná stanice olejnin, Opava)

Doc. ing. František V r k o č , DrSc. (Výzkumný ústav rostlinné výroby, Praha-Ruzyně)

Vedoucí redaktorka - Editor-in-Chief

RNDr. Eva S t ř í b r n á

INDUKCE ANDROGENEZE *IN VITRO* U PŠENICE A JEČMENE

J. Vagera, L. Ohnoutková

*Ústav experimentální botaniky AV ČR, Olomouc
Moravský šlechtitelský ústav, Kroměříž*

V příspěvku jsou posouzeny problematika, dosažené výsledky a možné aplikace androgenyze *in vitro* u pšenice a u ječmene se zřetelem k čs. materiálům. Jsou charakterizovány složení kultivačního média, genotypová specifita reakce, reprezentativnost embryogenního procesu, aplikace mutagenů, spontánní a indukovaná polyhaploidizace a některé praktické aspekty. U vybraných vzorků jarního a ozimého ječmene a jarní a ozimé pšenice čs. provenience byly přímou či nepřímou androgenézou odvozeny spontánně dihaploidní linie. Je demonstrována genotypová specifita reakce, mutagenní ovlivnění procesu a vylepšení kultivačního média.

Androgenyze *in vitro* představuje jediný postup, kterým získáváme kompletní rostlinu ze samčí gamety (mikrospory) bez účasti gamety samičí. Podmínky, za kterých je v raném stadiu ontogeneze pylového zrna spuštěn embryogenní vývoj přemostující gametofyt nejsou přesně známy. Iniciační roli zde bezpochybně představuje trauma vyvolané excízí prašníku z integrovaného systému celistvé rostliny. Dosud známé postupy při získávání kompletních rostlin z jedné z gamet spočívaly hlavně ve vyhledávání semen se spontánním výskytem dvou a více embryí. Četnost partenogeneze byla nízká a šlo o matroklinní haploidy vznikající častěji ze synergid než z oosféry. U vyselektovaných genotypů s vysokou frekvencí partenogeneze lze získat androgenní rostliny z oplozené vaječné buňky na základě samostatného vývoje samčího jádra. Cílené narušení vitality jádra oosféry před či v průběhu oplození jejich procento zvyšuje. Přesto je frekvence androgenních jedinců vzniklých *in situ* vždy velmi nízká (K a s p e r b a u e r, 1990). Teprve získání výrazně vyšších počtů kompletních androgenních rostlin pomocí explantátové techniky - t.j. indukovanou androgenézou *in vitro* - se stalo biotechnologicky významné. Umožnilo rychlou detekci stupně heterozygotnosti u donorového materiálu a otevřelo nové selekční možnosti. Spontánní nebo indukovaná polyhaploidizace (dihaploidizace) androgenních regenerantů vedla k rychlému získání čistých linií v maximálně možném stupni genetické

homozygotnosti a představuje dnes jeden z nejvýznamnějších biotechnologických postupů.

První kompletní androgeneze *in vitro* byla u pšenice a u ječmene indukována před necelými 20 lety - tedy později a technicky obtížněji v porovnání s jinými objekty. U pšenice i u ječmene se sporofytickým vývojem indukovaným v podmínkách *in vitro* vytváří z nezralé mikrospory následujícími buněčnými děleními buď diferencované embryo, které záhy prorůstá v kompletní rostlinu (přímá androgeneze), nebo nediferencovaný kalus, ze kterého kompletní rostlina teprve regeneruje (nepřímá androgeneze). Mikrosporiální kalus nebo embryo mohou vznikat buněčným dělením na základě vytvoření dvou ekvivalentních jader v embryogenní mikrospoře nebo z jádra vegetativního či generativního nebo z jádra vzniklého splynutím obou (M i n g h , C h a n g , 1987). Optimálním stadiem mikrospory, které je vhodné pro indukci sporofytického vývoje, je jednojaderná fáze volné mikrospory (D u n w e l l , 1985), jsou však zaznamenány případy indukce androgeneze na úrovni pylových tetrad (M i n g h , C h a n g , 1987) nebo až u tříjaderných mikrospor. U pšenice i u ječmene lze kultivovat *in vitro* celé klasy (W i l s o n , 1977; D a t t a , 1987) obsahující prašníky s responzivními mikrosporami, jednotlivé klásky s prašníky, celé izolované prašníky, části prašníků nebo izolované mikrospory (D a t t a , W e n z e l , 1987). Není dosud známo, jak velkou část intaktní rostliny můžeme kultivovat *in vitro*, abychom ještě získali androgenní regeneranty. Prašníky jsou kultivovány buď na povrchu zpevněných médií (agarem, gelritem, škrobem , agarózou), nebo v tekutých médiích, do kterých obvykle z plovoucích prašníků volné mikrospory vypadávají. Realizovat lze i přímou kultivaci čerstvě izolovaných mikrospor. Přes dílčí úspěchy zůstávají ječmen i pšenice objekty, u kterých je androgenní produktivita nízká. Na její zvýšení je celosvětově zaměřeno široké spektrum často různorodých manipulací. Zaměříme se stručně na nejdůležitější z nich.

Druh a složení kultivačního média

Kompletní složení několika vybraných a dnes u pšenice a u ječmene používaných indukčních kultivačních médií uvádí tab. I. Obecně nezbytnou složkou kultivačního média je cukr - zpravidla sacharóza - který kromě nutriční funkce zastává i roli osmotika (Z h o u a kol., 1991). B a l l a kol. (1992) našli pro pšenici vysoce průkaznou interakci mezi koncentrací sacharózy a komponentami ovlivňujícími výtěžnost prašnickové kultury. Zatímco u některých dvouděložných rostlin lze kompletní androgenezi indukovat na

I. Androgenní reakce v F₁ potomstvech u ozimého ječmene - Androgenetic response of winter barley in F₁ progenies

Číslo potomstva ¹	Odvozeno z křížení ²	Počet kultivovaných prašníků ³	Kalusy ⁴		Zelené rostliny ⁵	
			počet ⁶	%	počet ⁶	%
12	2095 x 2140	290	52	17,90	3	1,03
13	2096 x 2104	125	29	23,20	2	1,60
14	2097 x 2103	180	94	52,30	1	0,55
25	2104 x 2115	300	30	10,00	3	1,00
34	2112 x 2123	925	206	22,30	11	1,18
35	2112 x 2129	450	26	5,80	1	0,22
36	2112 x 2134	1520	213	14,00	8	0,52
54	2138 x 2123	790	77	9,70	5	0,63
61	2140 x 2110	415	105	25,30	2	0,48
Celkem ⁷		4995	832		36	

¹number of progeny, ²derived from cross-hybridization, ³number of cultured anthers, ⁴calluses, ⁵green plants, ⁶number, ⁷total

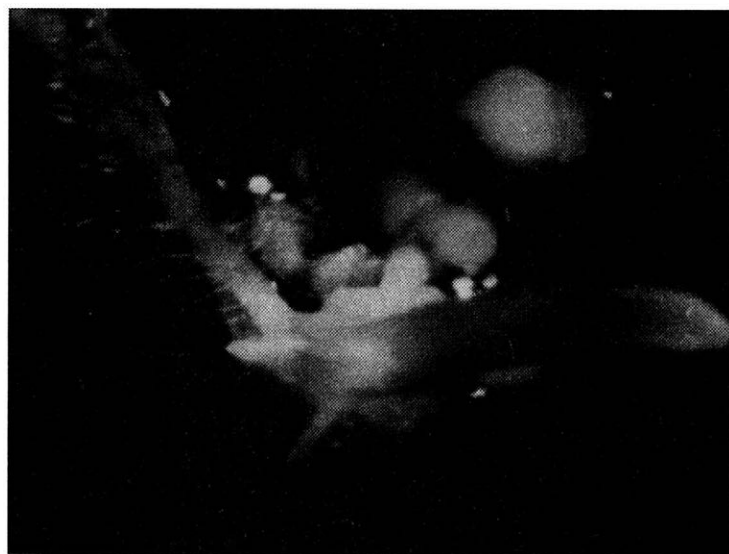
médiu obsahujícím pouze vodu, cukr a chelátované železo (V a g e r a , H a v r á n e k , 1982), pšenice i ječmen striktně vyžadují kompletní médium doplněné fytohormony. Nutriční požadavky na kultivační médium - zejména organické složky - se obvykle zvyšují, kultivujeme-li izolované mikrospory. Iniciační androgeneze u ječmene a pšenice vyžaduje především zvýšenou koncentraci cukrů - zpravidla od 6 do 12 %. Pokud je v kultivačním médiu přítomen škrob, je-li médium místo agaru škrobem přímo zpevněno anebo je-li sacharóza škrobem nahrazena, může explantát pomocí amyláz škrob rozkládat a využít nutričně (S o r v a r i , S c h i e d e r , 1987).

Testování androgenní schopnosti u vybraných šlechtitelských linií ječmene čs. provenience na bramborovém a pšeničném škrobovém médiu bez sacharózy demonstrovalo nízkou frekvenci indukovaných mikrosporiálních kalusů (0 až 1,1 %), které prokazovaly velmi intenzivní růst bez výrazné regenerační schopnosti (V a g e r a , nepubl.).

Pro pšenici i ječmen byla vyvinuta kultivační média doplněná bramborovým extraktem, označovaná Po I až Po IV (C h u a n g a kol., 1978). Ve srovnání s dalším účinným médiem bez rostlinných extraktů - médiem N6 - obsahují tzv. bramborová média nižší hladinu anorganických a organických komponentů, které jsou vyváženy obsahovým složením bramborového extraktu.

U čs. materiálů pšenice a ječmene byla na bramborových médiích indukovaná androgenese v roce 1985 (V a g e r a , O h n o u t k o v á , 1986a, 1986b; V a g e r a , 1988, 1989). Bylo kultivováno 41 200 prašníků od 24 genotypů ječmene zahrnujících odrůdy Korál, Bonus, Jaspis a 21 rozpracovaných šlechtitelských materiálů. Pozitivně reagovalo 21 % (5 položek). Androgenní rezpozivita se pohybovala mezi 0,5 až 2,7 %. K regeneraci rostlin, z nichž byla většina albinotických, docházelo u 30 % kalusů, v 70 % již na původním iniciačním médiu. Současná regenerace albinotických a zelených rostlin z téhož mikrosporiálního kalusu nebyla zaznamenána. U čs. odrůdy ječmene Jaspis byla v roce 1985 na médiu Potato I poprvé indukovaná přímá androgenese *in vitro*. Z mikrospor vznikaly perfektní pylové embryoidy, které beze zbytku prorůstaly v kompletní rostliny (obr. 1). Albikátní embryoidy převažovaly v poměru 15:1, polovina ze získaných kompletních zelených rostlin byla spontánně dihaploidních. Z nich odvozená potomstva (populace) jsou dovedena do generace F9. Ze 30 položek pšenice byla v prvním pokusu pozitivní reakce zaznamenána jen u odrůdy Sylva, Rena a jedné šlechtitelské linie, kde androgenně reagovalo 2,1 % kultivovaných prašníků. Regenerovala polovina mikrosporiálních kalusů. Mezi regeneranty převažovaly zelené rostliny.

V poslední době se ukázalo, že významnou roli v kultivačním médiu mají jednoduché cukry, záměna agaru za gerlit a použití Ficollu. U pšenice docílili C h u a kol. (1990) záměnou sacharózy za glukózu (tekuté médium, 0,21M koncentrace) až desetinásobné zvýšení androgenní odezvy. Podobný efekt vy-



1. Indukce přímé androgenese u československé odrůdy ječmene Jaspis; kompletní rostlina prorůstá z pylového embryoidu - Induction of one-step androgenesis in Czechoslovak barley cultivar Jaspis; the complete plant originates from pollen embryo

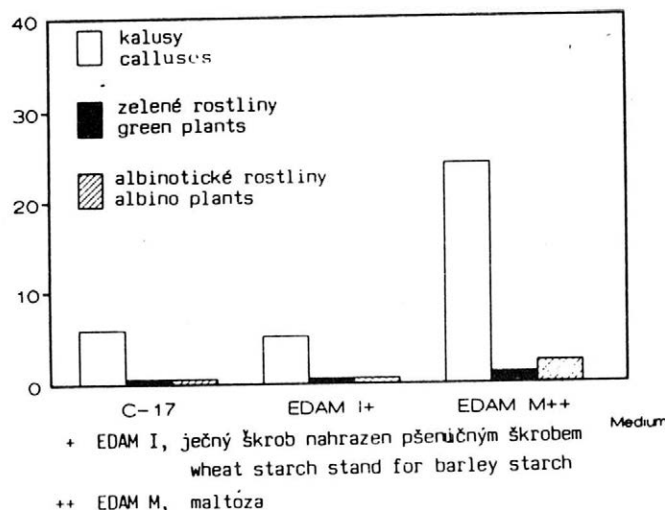
kazovaly i fruktóza a manitol. Genetická specifičnost reakce u 15 genotypů však posunuta nebyla.

I osmotická hodnota média ovlivněná koncentrací cukrů může rozhodovat o tvorbě zelených regenerantů. O r s h i n s k y a kol. (1990) zaznamenali výrazné zvýšení frekvence indukce mikrosporiálních kalusů i frekvence indukce zelených prýtlů u šesti hybridů pšenice, jestliže do tekutého média aplikovali maltózu. Na médiu Potato IV s vyšší koncentrací maltózy (135 g/l) byl v prašnickové kultuře pšenice zdvojnásoben počet zelených regenerantů v porovnání s 90 g/l (Z h o u a kol., 1991). Dobré účinky maltózy jsou vesměs vysvětlovány jejími nutričními vlastnostmi. Vliv manitolu na androgenezi zaznamenali Z i a u d d i n a kol. (1990). Účinek manitolu (tří- až čtyřdenní předpůsobení) byl stejný jako 28denní předpůsobení nízkou teplotou. Pro androgenní vývoj izolovaných mikroskop byla rozhodující 0,3M koncentrace manitolu. Manitol působil při maceraci prašníků a uvolňování mikroskop. Z mikroskop uvolněných ze 100 prašníků bylo vyprodukováno v průměru 265 zelených rostlin, z nichž většina byla dihaploidní. R o b e r t s - O e h l s c h l a g e r , D u n w e l l (1990) považují čtyřdenní předpůsobení média s manitolem na prašníky (při 25 °C) za účinnější než standardní postup vyžadující čtyřdenní inkubaci v chladu (při 4 °C). R o b e r t s - O e h l s c h l a g e r a kol. (1990) zjistili, že předpůsobení manitolem na prašníky ječmene způsobovalo zvýšení obsahu glukózy. Prašníky analyzovali v prvních stadiích kultivace. Na médiích obsahujících maltózu došlo po předpůsobení ještě k dalšímu zvýšení frekvence androgeneze.

U čs. materiálů bylo na androgenní rezpozivitu s použitím varianty média s maltózou testováno 38 položek (kříženci v F1) ozimého ječmene (O h n o u t k o v á a kol., 1990). U devíti reagujících variant kolísala androgenní rezpozivita prašníků mezi 6 až 52 %, výrazný vliv maltózy ve variantě s nejvyšším počtem zelených regenerantů je patrný z obr. 2.

Podle pokusů provedených u pšenice doporučuje K u č e r a (nepubl.) používat médium doplněné ještě Ficolem (umožňuje flotaci kultivovaných prašníků). K u č e r a , K u č e r o v á (1992) studovali komplexně vliv obměněných médií N6 a C17 (změny v zastoupení cukrů, aplikace Ficollu, prolinu a iontů Ag) chladového a hormonálního předpůsobení i genotypu na iniciaci a průběh androgeneze u *Triticum aestivum* a *Triticosecale*. I zde se potvrdilo, že všechny faktory v kultivačním médiu ovlivňující androgenezi *in vitro* u pšenice a ječmene nadále působí příliš specificky, a to na výrazném genetickém pozadí donorového materiálu (V a g e r a , 1990).

Průměrný počet na 100 kultivovaných prašníků
Mean number per 100 cultured anthers



2. Vliv složení vybraných kultivačních médií na frekvenci androgeneze u responzivní varianty ozimého ječmene - The effect of composition of selected culture media on androgenesis in responsive winter barley cultivar

Genotypová specifita reakce

Již první práce s androgenézí u pšenice a ječmene demonstrovaly výraznou závislost reakce na genotypu donorových rostlin. U ječmene to na úrovni klasické genetické analýzy a křížení dvojic inbreedingových linií demonstrovali D u n w e l l a kol. (1987) a na základě dialelní analýzy responsivity P o w e l l (1990).

Skutečná efektivnost androgeneze reprezentovaná počtem kompletních zelených rostlin je výslednicí tří autonomních genetických systémů. První rozhoduje o produkci mikrosporiálních kalusů nebo embryoidů, druhý o regeneraci kompletních rostlin a třetí o podílu zelených regenerantů. U téhož genotypu lze pak výtěžnost androgeneze modifikovat v hranicích optimalizace kultivačních podmínek. Z h o u a kol. (1991) docílili u pšenice optimalizací osmotického potenciálu kultivačního média až dvojnásobné zvýšení počtu zelených regenerantů. U ječmene, kde byla zaznamenána různá androgenní responsivita u mikrospor pocházejících z různých klonů téže rostliny (K a o a kol., 1991), byl poměr mezi zelenými a albikátními regeneranty měněn změnou kultivačních podmínek v rozmezí 1 : 9 až 9 : 1. Řada recentních pokusů přitom demonstrovala, že frekvence albinotických rostlin mezi androgenními regeneranty pšenice či ječmene je záležitost spíše genotypová než nutriční (C h u a kol., 1990). Genotypovou diferencí androgenní odezvy na komerčních kultivarech německých pšenic demonstrovali F o r o u g h i -

Wehr, Zeller (1990). Nejresponzivnější odrůda ozimé pšenice Florida byla přitom karyologicky charakterizována podle přítomnosti specifické translokace na chromozómu (pšenično-žitná translokace 1B/1R). K obdobným závěrům dospěli Luckett a kol. (1991) u 12 genotypů australských pšeníc. Též Lu a kol. (1991) prokázali genetickou závislost androgenní responzivity u *Triticum aestivum*. Přitom prašníky odebrané z rostlin pěstovaných na poli byly androgenně responzivnější než prašníky, které byly odebrány z rostlin pěstovaných v klimaboxech. Přes genetickou determinaci androgenní responzivity opakovaná prašnicková kultura v průměru frekvenci indukované pylové embryogeneze nezvyšuje (Karsai a kol., 1991).

V našich experimentech s opakovanou androgenezí u tří generací dihaploidních linií ječmene odrůdy Jaspis nebylo v dihaploidních populacích zvýšení průměrné androgenní responzivity zaznamenáno. Rozdíly však byly mezi populacemi odvozenými z jednotlivých dihaploidních potomstev, jejichž příčinu lze vidět v přirozené variabilitě výchozího materiálu.

Dosud neznáme optimální podmínky nezbytné k indukci androgeneze jak u kultivarů, tak odrůd a druhů u ječmene i u pšenice. Účinky zlepšených kultivačních podmínek mohou proto někde překrývat genetickou specifitu reakce definovanou na jiných médiích a za jiných kultivačních podmínek. U čtyř odrůd ozimé a dvou odrůd jarní pšenice současný vliv genotypu i zlepšených kultivačních podmínek demonstrovali např. Han-Min a kol. (1990). O celé složitosti a komplexnosti androgenní reakce svědčí skutečnost, že se na ní geneticky podílejí i cytoplazmatické faktory. Androgenní responzivitě hexaploidní pšenice výrazně ovlivnila substituovaná cytoplazma různých druhů rodu *Aegilops* (Sagi, Barnabás, 1989). Přitom byla cytoplazmaticky ovlivněna frekvence tvorby embryogenních kalusů, aniž by byly dotčeny regenerační schopnost a poměr mezi zelenými a albikátními regeneranty. Za důkaz cytoplazmatického ovlivnění androgeneze považují Hasan, Konzak (1991) výsledky svých pokusů u alloplazmatických linií pšenice. Manifestovala se cytoplazmatická i jaderná variabilita procesu a jejich interakce. Přitom iniciace procesu, regenerace rostlin a poměr mezi zelenými rostlinami a albíny byly geneticky nezávisle kontrolovány.

U čs. materiálů (sedm odrůd ozimé pšenice včetně odrůdy Zdar) zjistili Kučera, Kučerová (1990) v různých generacích hybridních potomstev statisticky významné rozdíly v genetické specifitě reakce. Závislost tvorby kalusů a pylových embryí na rodičovských komponentech u zkoumaných kříženců ozimého ječmene demonstrovali Ohnoutková a kol. (1990a, b, c). Rozdíly v androgenně responzivních variantách uvádí tab. II.

II. Vybraná média používaná k indukci androgeneze u pšenice a ječmene - The most frequently used media for androgenesis in wheat and barley

Složky ¹ (mg/l)	Označení média ²										
	P2	N6	MN6	85D12-3	CHU	C17	MC17	EDAM I	K42 ^x	BAC3 ^{xx}	MN6/B
KNO ₃	1000	2830	2850	1400	1415	1400	1400	2830	2500	2600	2850
(NH ₄) ₂ SO ₄	100	463	463		232			463	67	400	463
KH ₂ PO ₄	200	400	400	400	200	400	400	400	170	170	400
CaCl ₂ ·2H ₂ O		166	166	150	83	150	150	166	445	600	166
MgSO ₄ ·7H ₂ O	12,5	185	185	150	93	150	150	185	310	300	185
NH ₄ NO ₃				300		300	300		600	200	
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	100										
KCl	35								150		70
KH ₂ CO ₃									50	50	
Na ₂ HPO ₄ ·H ₂ O									75		
Na ₂ HPO ₄										150	
MnSO ₄ ·H ₂ O		4,4	4,4	11,0	5,0	11,2	11,2	4,4	10,0	6,6	4,4
ZnSO ₄ ·7H ₂ O		1,5	1,5	9,0	5,0	8,6	8,6	1,5	2,0	2,0	1,5
H ₃ BO ₃		1,6	1,6	6,0	5,0	6,2	6,2	1,5	3,0	5,0	1,6
KI		0,8	0,8	0,8	0,4	0,83	0,83	0,8	0,75	0,8	0,8
CuSO ₄ ·H ₂ O				0,025	0,0125	0,025	0,025		0,025	0,025	
CoCl ₂ ·6H ₂ O				0,025	0,0125	0,025	0,025		0,025	0,025	
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O					0,0125				0,25	0,25	
AgNO ₃										10,0	
Na ₂ EDTA·2H ₂ O				37,0		37,25		37,3			37,3
FeSO ₄ ·7H ₂ O				27,0		27,85		27,8			27,8
FeNa ₂ EDTA	42,1	42,1	42,1		32,0		40,0				
Sequestren 330Fe									28,0	40,0	
Thiamin HCl	1,0	1,0	2,0	0,5	2,5	1,0	1,0	1,0	2,0	1,0	2,0
Pyridoxin HCl		0,5	2,0	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	1,0	0,5	2,0
Kyselina nikotinová		0,5	2,0	1,5	0,5	0,5	0,5	0,5	1,0	0,5	2,0
Myo-inositol		500	80		300	100	100		100	2000	80

Glutamin		100	146		1000		150		100		146
Glycin		2,0	3,0	6,0	1,0	2,0	2,0	2,0			3
Biotin			2,0	2,0	0,25	1,5	1,5		0,005		2
Kyselina listová						0,5	0,5		0,2		
Kyselina askorbová					0,5				1,0	1,0	
Panthotenan vápenatý					0,25				0,5		
Serin		100									
Hydrolyzovaný kasein			550						250	300	
Sacharóza	90000	90000		75000		90000			30000	60000	
Glukóza					40000				1000	17500	
Maltóza			80000				97000	60000-120000			80000
Xylóza									250		
Agar	7000	8000		5800 ^x		5500	5500				
Ficoll 400				100000 ^x					400000	300000	100000
Bramborový extrakt	10%										
Ječný škrob								60000			
2,4D	1,5	0,5 - 2,0	2,0		0,5	2,0	2,0		2,0		2,0
NAA			0,5								0,5
IAA								1,0		2,5	
Kinetin	0,5		0,5	1,0	0,5	0,5			0,5		0,5
BAP								1,0			
p-chlorfenoxycetová kyselina				2,0							
Zeatin										0,5	
pH	5,8	5,8	5,8	5,8	5,4	5,8	5,8	5,8	5,8 - 6,0	6,2	5,8

^x Médium³ K42 ještě doplněno⁴: CaH₄(PO₄)₂·H₂O, 100; cholin chlorid, 0,5; kyselina p-aminobenzoová, 0,01; kyselina maleinová, 10,0; kyselina fumarová, 10,0; kyselý pyruvát, 5,0; kyselina citronová 10,0; kokosové mléko, 10,0;

^{xx} Médium³ BAC ještě doplněno⁴: kyselý pyruvát, 10,0; kyselina citronová, 10,0

¹ components, ² designation of medium, ³ medium, ⁴ added

Později screening 30 šlechtitelských linií a novošlechtění získaných křížením čs. odrůd potvrdil, že genotyp je rozhodující faktor androgenní responzibility. Frekvence androgeneze byla porovnána s dvěma modelovými odrůdami, čínskou jarní pšenicí odrůdou Dansheng 15 a německou ozimou pšenicí odrůdou Florida. Na kultivačním médiu C17 se frekvence androgeneze pohybovala od 10,6 do 19,6 %, u responzibilních čs. křížení od 1,4 do 5,23 % (K u č e r a , nepubl.). Jde stále o frekvence nízké, ale tyto výsledky jsou povzbudivé a pro praktické účely již použitelné.

Reprezentativnost embryogenního procesu

Je významné, aby embryogenní mikrospory rovnoměrně zahrnovaly všechny možné genetické kombinace charakterizující genotyp donorové rostliny. Haploidní či dihaploidní sporofyt nemohou přirozeně vytvořit mikrospory s jakoukoli letální vlohou. Výsledky androgeneze u jarního ječmene (F r i e d t , F o r o u g h i - W e h r , 1986) však naznačily, že může docházet k preferenčnímu vývoji z pozitivně selektované části gametofytů. T h o m p s o n a kol. (1991) použili u linií ječmene odvozených androgenezí k monitorování segregace alel 10 markerů zahrnujících RFLP analýzu, bílkovinný polymorfismus i juvenilní habitus rostlin. Odchytky od Mendelistických poměrů byly zaznamenány jen v jednom případě, kdy se objevila diference mezi spontánními dihaploidy a dihaploidy indukovanými působením kolchicinu. Podle posledních prací pylová embryogeneze u ječmene není omezena pylovým dimorfismem. Kterékoli pylové zrno (mikrospora) se může stát embryogenní (R o b e r t s - O e h l s c h l a g e r , D u n w e l l , 1991). I to snižuje pravděpodobnost výraznější preference určitých genotypů. Poměr mezi haploidními a spontánně dihaploidními regeneranty však může být ovlivněn zachycením vhodného vývojového stadia mikrospory. H a s s a w i , L i a n g (1990) zjistili, že z raně jednojaderného stadia mikrospory u pšenice a tritikale spontánně polyhaploidní regeneranti nevznikají.

Albinotické rostliny

Výskyt albinotických androgenních rostlin je typický právě pro pšenici a ječmen. Souvisí bezpochybně s ontogenezí mikrospor a je primárně geneticky determinován (D u n w e l l , 1985; B a j a j , 1990). Třebaže albinismus u regenerantů není bezesbýtku objasněn (X u , 1990), jde o komplexní proces. Konečným výsledkem je delece plastomu. Albinotické rostliny vzni-

kají častěji ze starších mikrospor. Stejná závislost na stáří byla zaznamenána i v suspenzní kultuře odvozené z mikrosporiálního kalusu (J ä h n e a kol., 1991). Suspenze starší než rok produkovaly embryogenní kalus, ze kterého již regenerovali jen albíni. V posledních pracích je uvedeno, že albinismus ovlivňuje spíše konkrétní genotyp než složení kultivačního média a jiné vlivy (C h u a kol., 1990). Jak zjistili L a r s e n a kol. (1991), donorové rostliny ječmene tvořily dvě geneticky determinované androgenní skupiny. První s 27 až 52 % zelených regenerantů a druhou s 0 až 7 % zelených regenerantů. Je pravděpodobné, že albinismus v prašníkových kulturách ječmene je podobný albinismu v prašníkových kulturách pšenice a je ovládán z jádra. Potvrdily to i poslední práce jak u pšenice (T u v e s s o n a kol., 1990; O r s i n s k y a kol., 1990; H a n - M i n a kol. 1990; Z h o u a kol., 1991), tak u ječmene (K a o a kol., 1991). Genetické difference v androgenní produktivitě u pšenice kolísaly mezi 5 až 90 % responzivních prašníků a zelené rostliny vytvářelo až 40 % embryoidů. Zbytek embryoidů vytvářel albíny (Z h o u a kol., 1991). C h u a kol. (1990) zase našli genotyp, u kterého se podařilo na 100 kultivovaných prašníků odvodit až 360 zelených androgenních rostlin. Třebaže za albinismus zodpovídají z větší části kvantitativně i kvalitativně různé delece plastidového genomu (H u a n g 1986; X u , 1990), není zcela zřejmé, proč a kdy se delece v procesu mikrosporigeneze či rané pylové embryogeneze začínají realizovat. Velká proměnlivost ve frekvenci zelených regenerantů byla totiž zaznamenána i mezi klasy z téže donorové rostliny (K a o a kol., 1991).

Pozorování tvorby a vývoje pylových embryoidů v průběhu kultivace u čs. odrůdy jarního ječmene Jaspis (V a g e r a , 1988) ukázalo, že zelené a albikátní rostliny bylo možné vizuálně odlišit již ve stadiu globulárního embryoidu. Ze všech zelených embryoidů kontinuálně prorůstaly kompletní zelené rostliny, zatímco albikátní embryoidy tvořily kompletní rostliny přibližně s 30% frekvencí. Po přenosu izolovaných globulárních embryoidů na čerstvé médium prorůstaly embryoidy v kompletní rostliny jen tehdy, bylo-li jich současně přeneseno několik. Konečný poměr mezi kompletními zelenými a albikátními regeneranty se tedy neshodoval s poměrem mezi zelenými a albikátními embryoidy a byl posunut ve směru zelených regenerantů.

Další rozhodující faktory

První z nich se uplatňují již na úrovni donorových rostlin. Zde jsou nejdůležitější ty vlivy, které v konečném důsledku zasahují mikrosporigenezi. Např. aplikace gametocidu ethrel (P i c a r d a kol., 1987) indukovala v prů-

běhu gametogeneze u pšenice extramitotická dělení. Narušením procesu vznikaly čtyř- až pětibuněčné mikrospory (pylová zrna) s menším obsahem škrobu, které byly schopné realizovat sporofytický vývoj. Průběžným jevem takovýchto zásahů je však celkové snížení fertility donorových rostlin. Pozitivně by se mělo projevit indukované zvýšení genetické heterogenity výchozího materiálu. Semena vybraných druhů pšenice z diploidní, tetraploidní a hexaploidní skupiny (*Triticum monococcum*, *T. dicoccoides*, *T. carthlicum*, *T. polonicum*, *T. durum*, *T. spelta*), semena kontrastní dihaploidní populace jarní *T. aestivum* odvozené z linie HE 1994 a semena srovnávané androgenně responzivní odrůdy čínské pšenice Dansheng 15 byla ovlivněna chemomutageny MNU (N-nitrózo-N-methylmočovina) a EMS (etylmetansulfonát). Z ovlivněných semen byly dopěstovány donorové rostliny. Nízké koncentrace mutagenů (0,2mM MNU, 10mM EMS při 24h působení na semena) u druhů a odrůd s nízkou androgenní responzivitou (0,5 až 1,5 % reagujících prašníků) počet responzivních prašníků stimulovaly relativně nejvíce (dvoj- až trojnásobné zvýšení). U materiálů s vysokou androgenní responzivitou (28 % responzivních prašníků u odrůdy Dansheng 15) došlo jen ke 20% zvýšení. Regenerační schopnost mikrosporiálních kalusů aplikací mutagenů ovlivněna nebyla. Stimulaci vysvětlujeme zvýšením genetické heterogenity donorového - vesměs homozygotního - materiálu způsobeným indukci bodových mutací. Obdoba stimulace v porovnání s kontrolou byla zaznamenána ve variantách ovlivněných 0,2mM koncentrací MNU na dihaploidních liniích ječmene odvozených androgenezí od odrůdy Jaspis.

Ovlivnění procesu androgeneze je významné i z hlediska získání spontánních či indukovaných polyhaploidních rostlin. Získání spontánních polyhaploidů je výhodné v tom, že eliminuje možné dodatečné chromozomální změny způsobované vedlejším účinkem kolchicinu. Ke spontánní diploidizaci dochází na základě fúze jader téže embryogenní mikrospory. U ječmene může mít podobu prosté fúze dvou ekvivalentních jader nebo splynutí vegetativního jádra s jádrem generativním (M i n g h , C h a n g , 1987), přičemž jádro generativní hraje spíše aktivní roli. Migrace jádra generativního k jádru vegetativnímu vzdáleně připomíná proces oplození. Po devíti dnech kultivace lze již dobře zaregistrovat dělicí se diploidní buňky vytvářející základ proembrya nebo mikrosporiálního kalusu.

Intenzita (frekvence) spontánní polyhaploidizace je za standardních podmínek materiálově specifická. Zatímco u jarního ječmene vznikalo v našich pokusech v závislosti na odrůdě či genotypu v androgenně responzivních variantách 40 až 70 % spontánních dihaploidů, u pšenice nebyla v první sérii pokusů spontánní dihaploidizace zaznamenána vůbec - hodnoceno 400 klasů na androgenních rostlinách (V a g e r a , 1988). Až u dalších materiálů pše-

nice se podařilo navodit spontánní dihaploidizaci čtyř- až sedmidenním chladovým předpůsobením při 4 °C na izolované klasy. Nejúčinnějším prostředkem užívaným k indukované polyploidizaci u pšenice i u ječmene je stále kolchicin (H a s s a w i , L i a n g , 1991). U pšenice jej lze účinně aplikovat přímo na mikrosporiální kalusy. V našich pokusech s ječmeny se osvědčila jednoduchá metoda aplikace kolchicinu na úrovni zelených regenerantů. Flow-cytometricky detekované haploidní rostliny byly vyjmuty z květináčů, z kořenů byla odstraněna zemina a listy zkráceny na jednu třetinu. Na 5 h byli regeneranti ponořeni do roztoku 0,5% kolchicinu a 1,5% DMSO. Rostliny byly po aplikaci oprány destilovanou vodou a opět zasazeny do zeminy. K diploidizaci docházelo asi v 80 % ovlivněných případů. Uvedená frekvence je procentuálně jen o něco vyšší než zaznamenaná spontánní polyploidizace u stejných materiálů. Poměr mezi haploidními a spontánně polyploidními albikátními regeneranty u ječmene odrůdy Jaspis hodnocený flow-cytometricky se podstatně nelišil od poměru mezi haploidními a polyploidními zelenými regeneranty hodnocenými podle jejich fertility.

Praktické aspekty a perspektivy

Ačkoli již byly pomocí androgeneze *in vitro* jak u ječmene, tak u pšenice získány první významné šlechtitelské materiály - přehled uvádějí D u n - w e l l (1986), B a j a j (1990), O h n o u t k o v á a kol. (1990a, b) - je ve srovnání s klasickými metodami podíl této biotechnologické metody ve šlechtění stále velmi malý. Androgeneze přitom skýtá výjimečnou možnost rychle získat geneticky izogenní materiál. Je-li odvozen žádaný genotyp, je stabilizován v průběhu jedné generace. To převažuje nevýhodou představovanou snížením průměrů některých kvantitativních vlastností, které je dáno vysokým stupněm genetické homozygotnosti androgenních polyhaploidů. Androgeneze *in vitro* umožňuje získání nových materiálů zvláště u vzdálených hybridů jak pšenice, tak ječmene. Od sekundárních mezidruhových hybridů (hexaploidní *Triticale*, oktoploidní *Triticum - Agropyron*) byli získáni regeneranti významní karyologicky i morfologicky. Protože se cestou androgeneze *in vitro* mohou realizovat všechny odlišné rekombinace, dají se získat nové rostliny s novými stabilními chromozomálními sestavami. Právě v čeledi *Triticeae* byla odvozena řada linií se substituovanými či translokovanými chromozómy (H u a kol., 1988). Umožňuje to selektovat rezistentní materiál i formy se změněnou dobou dozrávání či s krátkým stéblem. Přímé selekční využití pylové embryogeneze demonstrovali Y e a kol. (1987). Prašníky dvou odrůd ječmene odlišně citlivých k Na_2SO_4 a prašníky jejich reciprokových

hybridů byly kultivovány v tekutých selekčních médiích obsahujících zvyšující se koncentrace soli. Další manipulace se 138 získanými zelenými androgenními rostlinami ukázaly, že uvedený postup účinně eliminuje potomstva citlivá na Na_2SO_4 . Vyselektované linie s vyšší tolerancí ke koncentracím soli byly zřejmě výsledkem rekombinací v F_1 hybridech použitých v podobě donorových rostlin. Mc Beth a kol. (1990) aplikovali na mikrosporiální kalusy pšenice (s vytvořenými zelenými regeneračními centry) extracelulární enzymy padlí. Neembryogenní kalusy a kalusy s bílými regeneranty byly eliminovány. Embryogenní kalusy byly několikanásobně děleny na malé kousky a průběžně subkultivovány. Asi 3000 mikrosporiálních kalusů bylo ovlivněno extracelulárními enzymy houby *Sclerotinia borealis*. Podařilo se izolovat klony se zvýšenou rezistencí. První úspěšné práce s odvozením embryogenních suspenzních kultur ječmene z mikrosporiálních kalusů (Jähnle a kol., 1991) nastiňují další možnosti selekčního využití procesu indukované androgenyze *in vitro*. Vypracování metody oddělené kultivace jednotlivých mikrospor a možnosti jejich transformace mikroinjektáží cílené informace přímo do jejich jader (Bolik, Kopp, 1991) je věcí budoucnosti.

ZÁVĚR

Biotechnologické využití procesu indukované androgenyze *in vitro* přináší nové možnosti pro selekci, pro genetickou stabilizaci i pro rozšíření proměnlivosti jak u pšenice, tak u ječmene. Třebaže je androgenní rezpozivita silně závislá na genotypu, zdaleka nejsou vyčerpány možnosti jejího ovlivnění. S novými modifikacemi kultivačních podmínek a s hlubšími znalostmi biochemie, fyziologie a genetiky indukčních a regulačních procesů pylové embryogeneze se spektrum rezpozivních variant výrazně rozšiřuje. Podařilo se to demonstrovat i na čs. materiálech. Řada z nich byla vybrána i z hlediska jejich šlechtitelského využití. Androgenyze *in vitro* lze charakterizovat jako jednu z nosných a stále perspektivních metod umožňujících jak nová teoretická studia, tak praktické aplikace v rostlinné výrobě.

Literatura

- BAJAJ, Y. P. S.: *In vitro* production of haploids and their use in cell genetics and plant breeding. In: Biotechnology in Agriculture and Forestry 12, Berlin, Springer Verlag 1990, s. 3-44.
- BALL, S. T. - ZHOU, H. - KONZAK, C. F.: Sucrose concentration and its relationship to anther culture in wheat. Crop Sci., 32, 1992, s. 149-154.

- BOLIK, M. - KOOP, H. U.: Identification of embryogenic microspores of barley (*Hordeum vulgare* L.) by individual selection and culture and their potential for transformation by microinjection. *Protoplasma*, 162, 1991, s. 61-68.
- DATTA, S. K.: Plant regeneration by pollen embryogenesis from cultured whole spikes of barley (*Hordeum vulgare*). *Theor. appl. Genet.*, 74, 1987, s. 121-124.
- DATTA, S. K. - WENZEL, G.: Isolated microspore derived plant formation via embryogenesis in *Triticum aestivum* L. *Pl. Sci.*, 48, 1987, s. 49-54.
- DUNWELL, J. M.: Cereal Tissue and Cell Culture. Dordrecht, Martinus Nijhoff 1985, s. 1-4.
- DUNWELL, J. M.: Pollen ovule and embryo culture as tools in plant breeding. *Plant Tissue Culture and Its Agricultural Application*. Butterworths, London Guildford 1986, s. 375-404.
- DUNWELL, J. M. - FRANCIS, R. J. - POWELL, W.: Anther culture of *Hordeum vulgare* L.: A genetic study of microspore callus production and differentiation. *Theor. appl. Genet.*, 74, 1987, s. 60-64.
- FOROUGH-WEHR, B. - ZELLER, F. J.: *In vitro* microspore reaction of different German wheat cultivars. *Theor. appl. Genet.*, 79, 1990, s. 77-80.
- FRIEDT, W. - FOROUGH-WEHR, B.: Agronomic value of androgenetic doubled haploid lines as compared to conventionally selected spring barley. *Genetic Manipulation in Plant Breeding*, Berlin, Walter de Gruyter Co. 1986, s. 299-302.
- HAN-MIN, Y. - KEPPE, V. D. - BAENZIGER, P. S. - BERKE, T. - LIANG, G. H.: Effect of genotype and medium on wheat (*Triticum aestivum* L.) anther culture. *Pl. Cell Tissue Org. Cult.*, 21, 1990, s. 253-258.
- HASAN, E. - KONZAK, C. F.: Nuclear and cytoplasmic control of anther culture response in wheat: I. Analyses of alloplasmic lines. *Crop Sci.*, 31, 1991, s. 1421-1427.
- HASSAWI, D. S. - LIANG, G. H.: Effect of cultivar incubation temperature and stage of microspore development on anther culture in wheat and triticale. *Pl. Breed.*, 105, 1990, s. 332-336.
- HASSAWI, D. S. - LIANG, G. H.: Antimitotic agents. Effects on double haploid production in wheat. *Crop Sci.*, 31, 1991, s. 723-726.
- HU, H. - TAO, Y. Z. - WANG, G.: Creating new types of wheat via anther culture. In: *Proc. 7th Conf. Cambridge*, 1988, s. 1101-1104.
- HUANG, B.: Ultrastructural aspects of pollen embryogenesis in *Hordeum*, *Triticum* and *Paeonia*. In: *Haploids of Higher Plants in vitro*, Springer-Verlag 1986, s. 91-117.
- CHU, C. C. - HILL, R. D. - BRULE-BABEL, A. L.: High frequency of pollen embryoid formation and plant regeneration in *Triticum aestivum* L. on monosaccharide containing media. *Pl. Sci.* 66, 1990, s. 255-262.
- CHUANG, C. C. - OUYANG, T. W. - CHIA, H. - CHOU, S. M. - CHING, C. K.: A set of potato media for wheat anther culture. In: *Proc. Symp. Pl. Tissue Cult.*, Beijing, Sci. Press 1978, s. 51-56.
- JÄHNE, A. - LAZZER, P. A. - JÄGER-GUSSEN, M. - LÖRZ, H.: Plant regeneration from embryogenic cell suspensions derived from anther cultures of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theor. appl. Genet.*, 82, 1991, s. 74-80.
- KAO, K. N. - SALEEM, M. - ABRAMS, S. - PEDRAS, M. - HORN, D. - MALLARD, C.: Culture conditions for induction of green plants from barley microspores by anther culture methods. *Pl. Cell Rep.*, 9, 1991, s. 595-601.
- KARSAI, I. - BEDŐ, Z. - BALLA, L.: The effect of repeated anther culture on *in vitro* androgenesis of wheat. *Cereal Res. Commun.*, 19, 1991, s. 425-430.
- KASPERBAUER, M. M.: Haploids: Derivation and evaluation. In: KASPERBAUER, M. J. (ed.): *Biotechnology in Tall Fescue Improvement*, CRC Press 1990, s. 79-96.

- KUČERA, L. - KUČEROVÁ, D.: Vliv genotypu a média na indukci androgeneze u pšenice. In: Sbor. Manipulace *in vitro* u vyšších rostlin, Olomouc, ÚEB ČSAV 1990, s. 118.
- KUČERA, L. - KUČEROVÁ, D.: Problematika indukované androgeneze *in vitro* u pšenice a tritikale. In: Bull. Fyziol. Rostl. VI. Dny rostl. Fyziol., 3, 1992, s. 52.
- LARSEN, E. T. - TUVESSON, I. K. D. - ANDERSEN, S. B.: Nuclear genes affecting percentage of green plants in barley (*Hordeum vulgare* L.) anther culture. Theor. appl. Genet., 82, 1991, s. 417-420.
- LU, C. S. - SHARMA, H. C. - OHM, H. W.: Wheat anther culture: Effect of genotype and environmental conditions. Pl. Cell Tissue Org. Cult., 24, 1991, s. 233-236.
- LUCKETT, D. J. - VENKATANAGAPPA, S. - DARVEY, N. L. - SMITHARD, R. A.: Anther culture of Australian wheat germplasm using modified C 17 medium and membrane rafts. Austral. J. Pl. Physiol., 18, 1991, s. 357-367.
- MCBEATH, J. H. - MEHDIZADEGEN, F. - LOCKWOOD, H.: Anther culture selection to enhance snow mold disease resistance in winter wheat. In: NIJKAMP, H. J. I. - PLAS, L. H. W. van der - AARTRIJK, J. van (eds): Progress in Plant Cellular and Molecular Biology. Dordrecht, Boston, London, Kluwer Acad. Publ. 1990, s. 258-263.
- MINGH, F. L. - CHANG, C. C.: Nuclear fusion in cultured microspores of barley. Pl. Cell Rep., 6, 1987, s. 191-193.
- OHNOUTKOVÁ, L. - DOLEŽEL, J. - MINAŘÍK, F.: Ječmen. In: Biotechnologické metody ve šlechtění polních plodin. Bratislava, Příroda 1990a, s. 79-90.
- OHNOUTKOVÁ, L. - HANIŠ, M. - DOLEŽEL, J.: Pšenice. In: Biotechnologické metody ve šlechtění polních plodin. Bratislava, Příroda 1990b, s. 61-78.
- OHNOUTKOVÁ, L. - RAIMANOVÁ, I. - ŠPUNAR, J.: Pylová embryogeneze u F₁ generaci ozimého ječmene. In: Sbor. Manipulace *in vitro* u vyšších rostlin, Olomouc, ÚEB ČSAV 1990c, s. 124.
- ORSHINSKY, B. R. - MCGREGOR, L. J. - JOHNSON, G. I. E. - HUCL, P. - KARTHA, K. K.: Improved embryoid induction and green shoot regeneration from wheat anthers cultured in medium with maltose. Pl. Cell Rep., 9, 1990, s. 365-369.
- PICARD, E. - HOURS, C. - GREGOIRE, S. - PHAN, T. H. - MEUNIER, J. P.: Significant improvement of androgenetic haploid and doubled haploid induction from wheat plants treated with a chemical hybridization agent. Theor. appl. Genet., 74, 1987, s. 289-297.
- POWELL, W.: Environmental and genetical aspects of pollen embryogenesis. In: Biotechnology in Agriculture and Forestry 12. Berlin, Springer-Verlag 1990, s. 45-65.
- ROBERTS-OEHLSCHLAGER, S. L. - DUNWELL, J. M.: Barley anther culture: Pretreatment on mannitol stimulates production of microspore-derived embryos. Pl. Cell Tissue Org. Cult., 20, 1990, s. 235-240.
- ROBERTS-OEHLSCHLAGER, S. L. - DUNWELL, J. M.: Barley anther culture: The effect of position on pollen development *in vivo* and *in vitro*. Pl. Cell Rep., 9, 1991, s. 631-634.
- ROBERTS-OEHLSCHLAGER, S. L. - DUNWELL, J. M. - FAULKS, R.: Changes in the sugar content of barley anthers during culture of different carbohydrates. Pl. Cell Tissue Org. Cult., 22, 1990, s. 77-85.
- SÁGI, L. - BARNABÁS, B.: Evidence for cytoplasmic control of *in vitro* microspore embryogenesis in the anther culture of wheat (*Triticum aestivum* L.). Theor. appl. Genet., 78, 1989, s. 867-872.
- SORVARI, S. - SCHIEDER, O.: Influence of sucrose and melibiose on barley anther cultures in starch media. Pl. Breed., 99, 1987, s. 164-171.

- THOMPSON, D. M. - CHALMERS, K. - WAUGH, R. - FORSTER, B. P. - THOMAS, W. T. B. - CALIGARI, P. D. S. - POWELL, W.: The inheritance of genetic markers in microspore-derived plants of barley *Hordeum vulgare* L. Theor. appl. Genet., 81, 1991, s. 487-492.
- TUVESSON, I. K. D. - PEDERSEN, S. - ANDERSEN, S. B.: Nuclear genes affecting albinism in wheat (*Triticum aestivum* L.) anther culture. Theor. appl. Genet., 78, 1989, s. 879-883.
- VAGERA, J.: Některé aspekty androgeneze *in vitro* u obilovin. In: Sbor. Biotechnologické metody v šlechtění rostlin, BIOS 88, Nitra, 1988, s. 129-136.
- VAGERA, J.: Androgeneze *in vitro* indukovaná u ječmene a pšenice (*Hordeum vulgare*, *Triticum aestivum*). In: Sbor. V. Dny rostl. fyziol. Brno, UJEP 1989, s. 108.
- VAGERA, J.: Indukovaná samčí partenogeneze. In: Sbor. Manipulace *in vitro* u vyšších rostlin, Olomouc, ÚEB ČSAV 1990, s. 60-64.
- VAGERA, J. - HAVRÁNEK, P.: Effect of minimization of culture medium on the process of androgenesis *in vitro* (*Nicotiana tabacum* L. var. White Burley, *Datura innoxia* Mill.). Biochem. Physiol. Pfl., 117, 1982, s. 266-274.
- VAGERA, J. - OHNOUTKOVÁ, L.: Indukce androgeneze *in vitro* u vybraných kultivarů ječmene (*Hordeum vulgare* L.). In: Zbor. IV. Dni rastl. fyziol. Košice, 1986a, s. 190-191.
- VAGERA, J. - OHNOUTKOVÁ, L.: Inducirovanje androgeneze *in vitro* u izbranných kultivarov *Hordeum vulgare* i *Triticum aestivum*. In: Sbor. Teoretické i praktické aspekty selekcie i semenovodstva pšenice, rži, jačmenja i tritikale, Praha-Ružyně, 1986b, č. 1, s. 44.
- WILSON, H. M.: Culture of whole barley spikes stimulated high frequencies of pollen calluses in individual anthers. Pl. Sci. Lett., 9, 1977, s. 233-238.
- XU ZHI-HONG: Barley (*Hordeum vulgare* L.): Anther culture and production of haploids. In: Biotechnology in Agriculture and Forestry, 12, Berlin, Springer Verlag 1990, s. 125-175.
- YE, J. M. - KAO, K. N. - HARVEY, B. L. - ROSSNAGEL, B. G.: Screening salt-tolerant barley genotypes via F₁ anther culture in salt stress media. Theor. appl. Genet., 74, 1987, s. 426-429.
- ZHOU, J. - ZHENG, Y. - KONZAK, C. F.: Osmotic potential of media affecting green plants percentage in wheat anther culture. Pl. Cell Rep., 10, 1991, s. 63-66.
- ZIAUDDIN, A. - SIMION, E. - KASHA, K. J.: Improved plant regeneration from shed microspore culture in barley (*Hordeum vulgare* L.) cv. Igri. Pl. Cell Rep., 9, 1990, s. 69-72.

Došlo 29. 9. 1992

VAGERA, J. - OHNOUTKOVÁ, L. (Institute of Experimental Botany, Academy of Sciences of the Czech Republic, Olomouc; Moravian Breeding Institute, Kroměříž):

***In vitro* induction of androgenesis in wheat and barley.**

Rostl. Výr., 39, 1993 (2): 97-114.

In vitro androgenesis represents an important biotechnological tool to obtain complete plants directly from a male gamete. It promotes a rapid detection of the initial plant material heterozygosis, production of lines characterized by the peak level of homozygosis, stabilization of chromosomal sets in remote hybrids and accomplishment of novel selection procedures. An inevitable prerequisite to induce the sporophytic development of microspores consists in the removal of an anther together with immature microspores out of an integrated intact plant system, and subsequent axenic microspore culture on nutrient-optimized media. In wheat and barley the following factors

were assessed: type and composition of the culture media, genotype specificity of the androgenic response, representativeness of the embryogenesis process, albino regenerants, physiological and genetic effects on donor plants, spontaneous and induced polyhaploidization, practical aspects and further perspectives. A survey is given of selected culture media composition. The contribution comprises some experimental results dealing with *in vitro* androgenesis induction and regulation in the Czechoslovak cultivars of wheat and barley. In 1985 the first successful attempt was recorded to induce direct androgenesis in spring barley cultivar Jaspis on the culture medium Potato I. Perfect pollen embryoids proliferated to give complete, in 50 % spontaneously dihaploid plants. *Ex-vitro* dihaploid populations were brought up to F₉ generation. There was no increase in the average androgenic response in the derived dihaploid populations. It could be distinguished between green and albino plants as early as at the level of globular embryoids. A reduced regeneration ability of some of the albino embryoids led to a change in the final green: albino regenerants ratio. Out of 24 materials only five gave the androgenic response (i.e. 0.5 - 2.7 % responsive anthers), out of 30 hexaploid wheat accessions just three (0.3 - 2.1 % responsive anthers). A total of nine developmentally and morphologically contrasting dihaploid wheat populations were derived from F₁ generation of the Czechoslovak origin and carried to F₅ generation.

The usage of the culture media containing maltose and Ficoll broadened the scope of variants with the androgenic response even within Czechoslovak wheat and barley materials. Out of 38 winter barley crosses nine gave the androgenic response with the number of androgenic anthers varying between 6 and 52 %. The haploid: spontaneously polyhaploid albino regenerants ratio assessed by means of flow-cytometry did not differ from the haploid: polyhaploid green regenerants ratios evaluated according to their fertility. The application of adequate concentrations of N-nitroso-N-methyl urea and ethylmethanesulphonate in selected diploid, tetraploid and hexaploid wheat accessions and Czechoslovak spring wheat (*T. aestivum*) materials stimulated the number of androgenic anthers more in the variants with a low androgenic responsiveness compared to those characterized by the standard androgenic response. The stimulation can be explained by the increase in the genetic heterogeneity of a donor - mostly homozygous - material due to the induction of an adequate number of point mutations. Spontaneous polyploidization in the process of spring wheat androgenesis was remarkably stimulated by cool pre-treatment of donor plant isolated spikes. The paper offers possibilities of the expected selection against the stress factors at the level of androgenic cultures.

Kontaktní adresa:

Doc. RNDr. Jiří V a g e r a , CSc., Ústav experimentální botaniky AV ČR, Sokolovská 6, 772 00 Olomouc

MICROPROPAGATION OF COMMON BEAN (*PHASEOLUS VULGARIS* L.) BY MULTIPLE SHOOT INDUCTION

K. Kalantidis¹, M. Griga²

¹University of Agriculture, Praha

²Research Institute of Technical Crops and Legumes, Šumperk

A micropropagation method for the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) via meristem and shoot tip culture was developed. The optimum combination and concentration of growth regulators for micropropagation was defined. In addition, the effect of the initial explant (location on the plant) and genotype on the efficiency of the micropropagation method was studied. The highest frequency of multiple shoots was observed on MS media with the addition of 10 μM BAP alone or together with 0.1 μM NAA. Rooting was obtained on MS media without growth regulators or with the addition of 0.1 to 1 μM NAA. The highest efficiency of micropropagation was achieved when the axillary buds of the cotyledons were used in the initial cultures and with genotypes Magna, KR 355, and Kreola. Rooted shoots were grown to maturity in a greenhouse and viable seeds were harvested.

The common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is a highly self-fertilizing species. Therefore *in vitro* propagation techniques are not necessary to multiply inbred lines; on the other hand, self-fertilization makes it difficult to use those selection methods where a large number of seeds from cross-pollination is needed (recurrent selection). In these cases *in vitro* propagation can be very useful providing a sufficient number of heterozygotes and therefore reducing the time needed for a selection cycle. Vegetative propagation with the use of meristem or shoot tips may be also of interest in (1) propagation of unique genotypes (male-sterile or self-incompatible ones), (2) isolation of solid mutants from chimeric tissues, (3) production and propagation of pathogen-free germplasm, and (4) long-term preservation (Allavena, 1984). Even though meristem-tip culture is one of the simplest *in vitro* techniques, only a few papers were published in *Phaseolus* species resulting in complete plant regeneration or in efficient micropropagation system (Allavena, Sharp, 1981; Kartha et al., 1981; Martins, Sondahl, 1984a, b; Rubluo, Kartha, 1985; Allavena, Rossetti, 1986; Saam et al., 1987).

The present study was conducted to develop a reliable and efficient micro-propagation protocol for selected bean cultivars with emphasis to Czechoslovak ones.

MATERIALS AND METHODS

The Czechoslovak variety Magna was used as a model genotype in most experiments; for genotype evaluation we used the following cvs.: Perlička (PA), Kreola (KR), Luna (L), Magna (MA), Štýrská Lastovičí (ŠL), Wachs Goldjuwel (WG), E-396, land-race 355 (KR 355).

Seeds with undamaged seed coat were surface sterilized in 70% ethanol for 1 min and subsequently in 3-10% commercial bleach (Savo, Lachema) for 15 min. Finally the seeds were rinsed three times with sterile distilled water.

In all experiments the basal medium consisted of MS-salts, 3% sucrose and 0.8% agar. This formula was used for aseptic seed germination; for explant culture the basal medium was modified with BAP and NAA. pH of the media was adjusted to 5.6 to 5.8 prior to autoclaving (15 min, 100 kPa, 120 to 125 °C). The cultures were maintained in a growth chamber with 16/8 light/dark cycle, 25 ± 2 °C day/20 ± 2 °C night. Light was supplied by cool white fluorescent tubes providing a quantum density of 2000-4000 lx.

For the statistical evaluation of the data the X^2 test was used (K á b a et al., 1981).

Experiment 1 - Effect of phytohormones on multiple shoot induction

Apical meristems (0.2-0.3 mm in size) from 7-10 day-old seedlings (cv. Magna) were cultured on the basal media supplemented with BAP (0; 0.1; 1; 5; 10 and 20 µM) and NAA (0; 0.1; 1; 5 and 10 µM) in a factorial combination (Tab. I) to define optimum conditions for multiple bud induction.

Experiment 2 - Effect of initial explant on multiple shoot induction

Buds (3-4 mm in size, Fig. 1A) from three different locations on the plant (cv. Magna) - shoot apical buds, axillary buds of first true leaves and axillary buds of cotyledons - were cultured on five modifications of the basal medium.

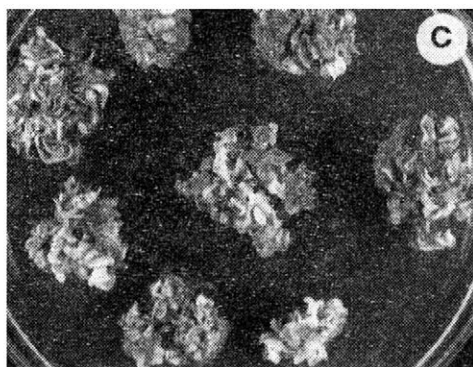
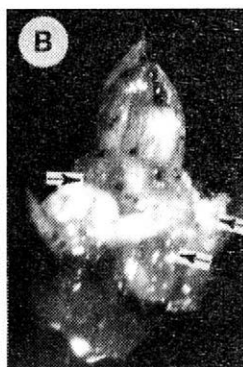
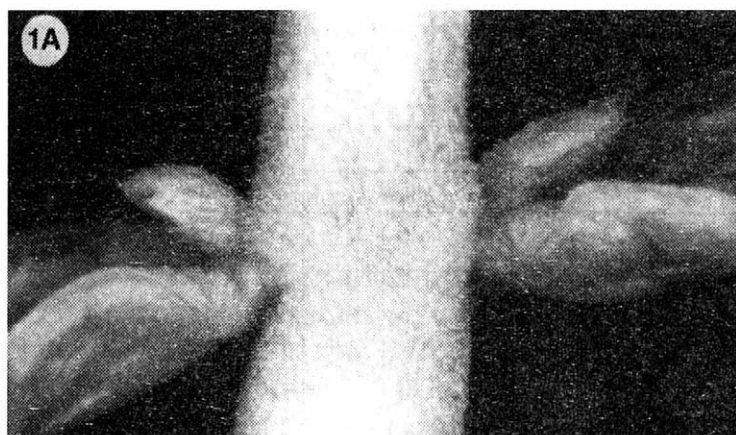
Experiment 3 - Effect of genotype on multiple shoot induction

Axillary buds of the cotyledons of eight genotypes were cultured on four modifications of basal medium.

I. The frequency of single shoot and multiple shoot formation (%) from common bean shoot apical meristems (cv. Magna) after eight weeks of culture; the data represent the mean of two replicates, each consisted of 10 explants

Medium number	Phytohormones (μM) +		Single shoot formation (%)	Multiple shoot formation (%)
	BAP	NAA		
1	0	0	25	0
2	0	0.1	25	0
3	0	1	15	0
4	0	5	0	0
5	0	10	10	0
6	0.1	0	35*	10
7	0.1	0.1	15	0
8	0.1	1	15	10
9	0.1	5	5	5
10	0.1	10	0	0
11	1	0	15	10
12	1	0.1	25	15
13	1	1	5	5
14	1	5	0	30
15	1	10	0	0
16	5	0	0	45*
17	5	0.1	15	35
18	5	1	0	20
19	5	5	0	10
20	5	10	0	5
21	10	0	0	70*
22	10	0.1	0	70*
23	10	1	0	25
24	10	5	0	30
25	10	10	0	20
26	20	0	0	20
27	20	0.1	0	5
28	20	1	0	0
29	20	5	0	10
30	20	10	0	0

* Statistically significantly higher than the mean of selected variants at significance level $\alpha = 0.05$



1A. Axillary buds of cotyledons of an aseptically germinated bean seedling (cv. Magna) - optimum initial explant for micropropagation purposes in our experiments

1B. Axillary bud after 10-day culture on MS-medium with 10 μ M BAP; development of multiple bud primordia (arrows)

1C,D. Multiple shoot forming bean explants (cv. Magna) cultured on MS-medium with 10 μ M BAP after 12 weeks of culture

Each experimental variant (e.g. medium modification x genotype) consisted of minimally of 10 explants in two replicates. All experiments were repeated at least twice. The data (single shoot and multiple shoot formation) were recorded after eight weeks of culture.

The best variants (medium x explant x genotype) were micropropagated as shoot clumps in a long-term culture.

Rooted shoots obtained in individual experiments were transferred into greenhouse and grown to maturity.

RESULTS

Experiment 1

The frequency of explants with multiple shoots (Fig. 1B,C,D) for each of the 30 culture media is shown in Tab. I. The highest frequency of multiple shoot formation (70 %) was obtained when the apical meristems were cultured on media with 10 μ M BAP in the absence of NAA or with low NAA concentration (0.1 μ M) - maximum of 10 shoot buds per explant was observed. When BAP was added at lower concentrations, single shoot formation often occurred. Higher NAA concentrations (5 or 10 μ M) had a negative effect both on the quantity and the quality of multiple shoots (strongly deformed tissues).

NAA alone at a low concentration (0.1; 1 μ M) induced rhizogenesis in some explants in the culture period studied. Later on, this response could be made use for rooting of well developed shoots.

Experiment 2

The frequencies of explants (buds from different locations on the plant) with multiple shoot formation on three modifications of basal medium are shown in Tab. II. The capacity for multiple shoot formation decreased in the direction from the shoot basis to the shoot apex, axillary buds of cotyledons being the most responsive explants. Nevertheless the difference between the response of cotyledonary buds (63 %) and axillary buds of primary leaves (56 %) was not significant. On the other hand, a significant decrease in the number of explants forming multiple shoots was observed when apical buds were cultured on multiple shoot induction media.

II. The effect of initial explant type and selected medium (BAP and NAA combination) on single shoot and multiple shoot formation frequency (%); cv. Magna, evaluated after eight weeks of culture

Explant type	Single shoot formation (%)			Multiple shoot formation (%)			
	medium			medium			
	1	6	mean	17	21	22	mean
Cotyledonary buds	20	30	25	40	60	90	63*
Axillary buds of leaves	10	20	15	40	60	70	56
Shoot apex buds	10	-	10	10	10	30	16

* Explant with the significantly higher frequency of multiple shoot formation than the mean of the whole experiment at significance level $\alpha = 0.05$

Medium 1: without phytohormones

6: 0.1 μ M BAP

17: 5 μ M BAP + 0.1 μ M NAA

21: 10 μ M BAP

22: 10 μ M BAP + 0.1 μ M NAA

III. The effect of genotype on multiple shoot formation frequency (%); evaluated after eight weeks of culture; each experimental variant (genotype x medium) consisted of 10 explants in two replicates

Medium	Multiple shoot formation (%); genotype								
	WG	L	PA	E396	KR	KR355	SL	MA	mean
6	0	0	0	0	10	0	0	10	2.5
12	30	0	0	40	37.5	25	10	15	19.7
21	60	20	40	50	50	55	60	70*	50.6
22	55	40	60	60	70	70	20	70	55.6

* Statistically significantly higher than mean at significance level $\alpha = 0.05$

Medium: 6: 0.1 μ M BAP

17: 5 μ M BAP + 0.1 μ M NAA

21: 10 μ M BAP

22: 10 μ M BAP + 0.1 μ M NAA

Experiment 3

Tab. III shows the frequency of explants from eight different genotypes forming multiple shoots after eight weeks of culture on four combinations of BAP and NAA. When the whole buds instead of meristems were used in the initial culture, a higher frequency of multiple shoot forming explants was observed in all genotypes, though differences between genotypes are evident.

The best results were obtained (70 % of multiple shoot forming explants) with the cotyledonary buds of the genotypes Magna, land race 355, and Kreola on MS-medium with 10 μ M BAP.

In general, it can be claimed that in contrast with the effect of growth regulators the effect of genotype on multiple shoot formation is mainly quantitative. The effect of three studied factors, i.e growth regulators, location of buds on the seedling and genotype was statistically tested by means of the χ^2 test (Tab. IV). In the case of growth regulators and for the purposes of χ^2 test, the variants with very few or none multiple shoot formation had to be eliminated (22 out of 30 BAP and NAA combinations).

IV. Evaluation of the effect of individual factors on multiple shoot formation frequency (%) by means of χ^2 test

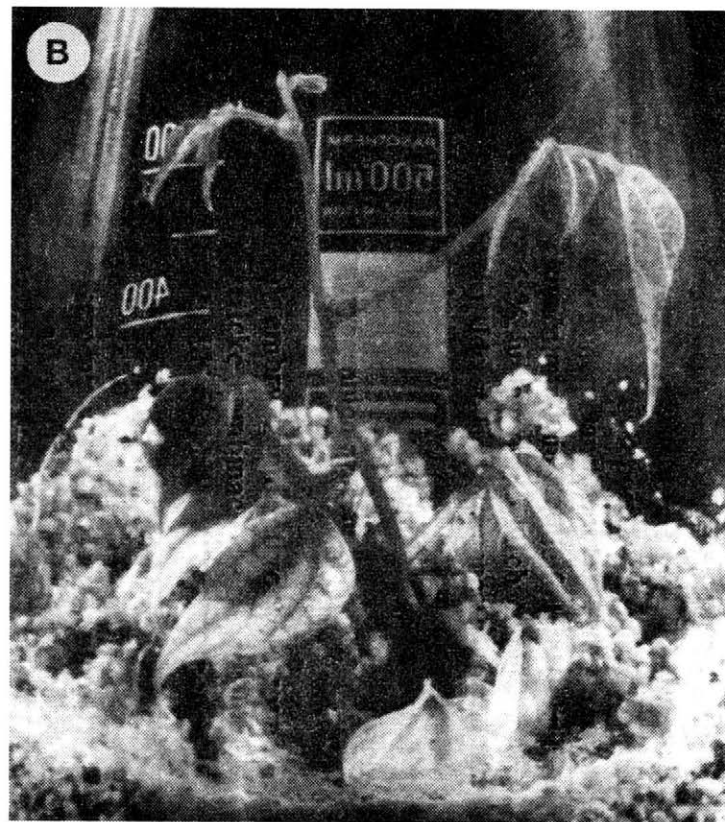
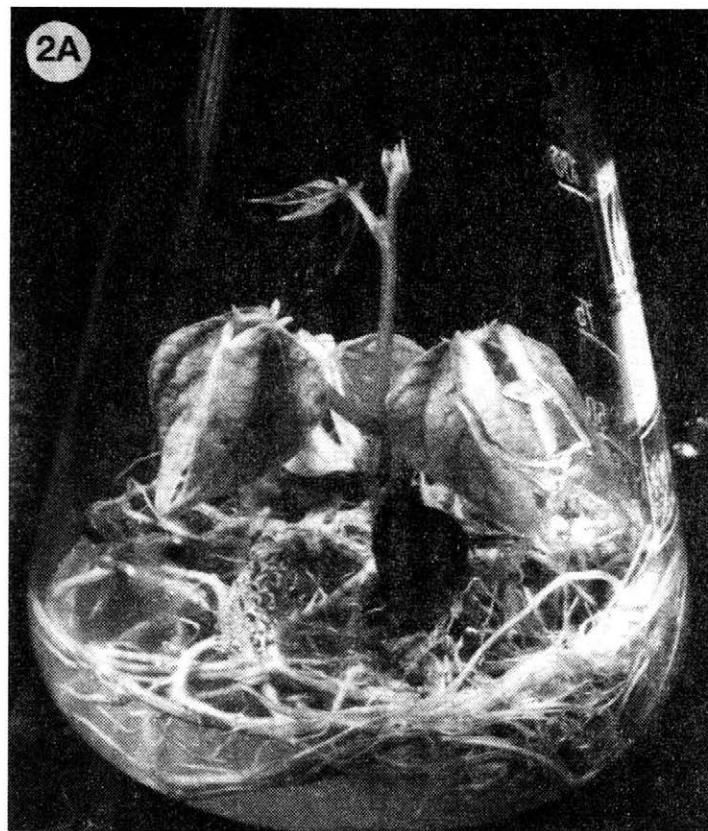
Source of variation	df	χ^2
Medium	7	22.1529**
Explant type	2	8.3937*
Genotype	7	18.6029**

* Statistically significant for $\alpha = 0.05$

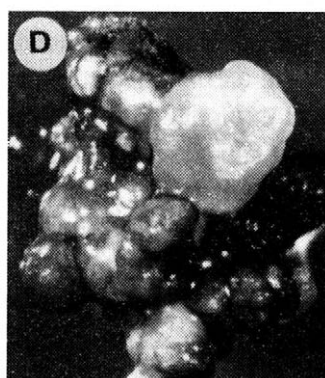
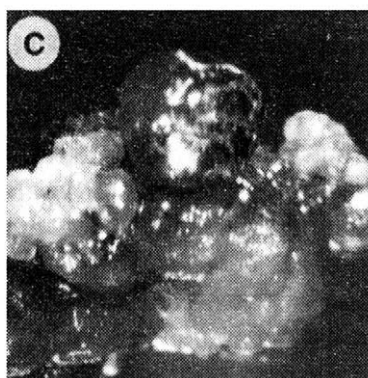
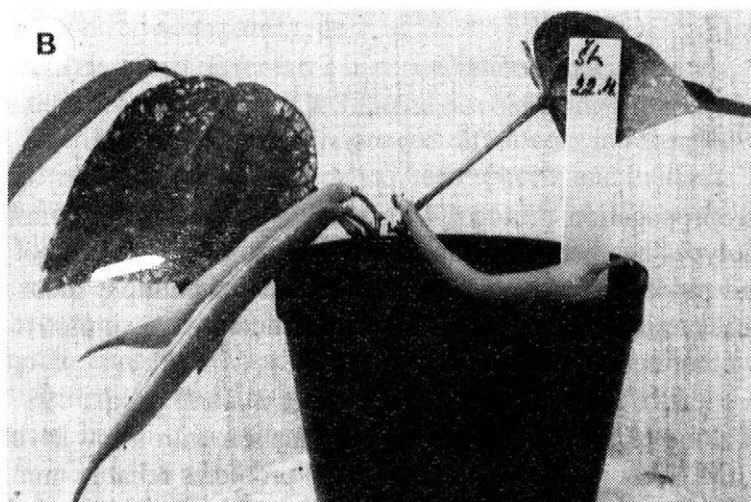
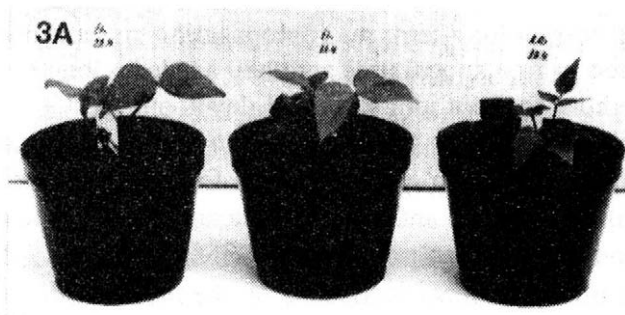
** Statistically significant for $\alpha = 0.001$

The shoots (at least 2 cm long and healthy-looking) continuously obtained in individual experiments were rooted on MS-medium without growth regulators. The addition of NAA (0.1 to 1 μ M) had generally a positive effect on rooting, but the increase in rooting frequency was not significant. Higher NAA concentrations negatively influenced the quality of roots. The mean frequency of rooting in the series of experiments was 25 %. After eight weeks of culture on root-inducing medium the roots were well developed (Fig. 2A) and complete plantlets were able to be transferred to non-sterile conditions. Plantlets were transferred from agar medium to perlite saturated with a half-strength MS medium (aseptic conditions, Fig. 2B) and after several weeks to pots with the soil mixture (soil, peat, sand and perlite) in a greenhouse (Fig. 3A), where the plants flowered and set seeds (Fig. 3B).

The explants exhibiting good multiple shoot formation capacity (cvs. Kreola, Magna, KR 355; medium with 10 μ M BAP or 10 μ M BAP + 0.1 μ M NAA) were maintained as a shoot culture in four-week subculture intervals for 12 months. The multiple shoot forming capacity decreased with prolonged culture and the abundant callus formation was frequently observed. The



2A. Root formation on an isolated bean shoot cultured eight weeks on MS-medium without phytohormones
 2B. Transfer of a rooted shoot to perlite saturated with half-strength MS-medium (mineral part); aseptic conditions



3A. Bean plants well adapted to the non-sterile conditions in the greenhouse

3B. Bean regenerant with pods (cv. Štýrská Lastovičí), originated from micropropagated shoot culture

3C,D: Development of globular embryo-like structures on the shoot apical meristem explants of bean subcultured on MS-medium with $5 \mu\text{M}$ BAP and $1 \mu\text{M}$ NAA; cv. Magna

shoots isolated from a long-term micropropagation culture rooted worse than the ones isolated in first subcultures and they needed a longer culture interval on rooting medium for root induction and development.

In some cases the flower formation *in vitro* was observed at the end of eight-week culture period on explants which formed complete plants directly from isolated buds (media 6 and 12). This phenomenon was recorded in genotypes with good regeneration potential (KR 355, WG).

The culture of shoot apical meristems on the media with medium concentration of phytohormones (1 μM NAA + 1 μM BAP, 1 μM NAA + 5 μM BAP) resulted sporadically in the formation of smooth, globular embryo-like structures (Fig. 3C,D).

DISCUSSION

A micropropagation protocol with plant regeneration for *Phaseolus vulgaris* genotypes has been developed with the use of multiple shoot induction effect. The phytohormone requirements needed for multiple shoot formation from apical meristems or buds in our experiments were similar to those reported by other authors (K a r t h a et al., 1981; M a r t i n s , S o n d a h l , 1984b; A l l a v e n a , R o s s e t t i , 1986; S a a m et al., 1987); in general BAP alone (0.5 to 20 μM) or in combination with a low level of auxin (0.1 to 1 μM NAA; 0.025 to 0.1 μM 2,4-D) promotes reliably multiple shoot formation in bean. Similar phytohormone combinations inducing multiple buds were reported also for other grain legume species, namely for pea, soybean, faba bean, chickpea, peanut (K a r t h a et al., 1981; G r i g a et al., 1986; G r i g a , 1988; G r i g a , H e j t m á n k o v á , 1990).

The bean explants responded very sensitively to exogenously applied phytohormones (Tab. I) - basal medium without phytohormones and low concentrations of BAP (0.1, 1 μM) as well as NAA (0.1, 1 μM) alone or in combination induced reproducibly well elongating single shoots and in some cases (media 1, 2, 6, 7, 12) complete plantlets developed (K a r t h a et al., 1981). Even in the conditions described above we could observe some explants with multiple shoots (Tab. I). But the maximum frequency of multiple shoot developing explants was recorded on media 21 and 22. Similarly like in soybean (S a k a et al., 1980; G r i g a , H e j t m á k o v á , 1990) and faba bean (G r i g a , 1988), the BAP concentrations (5 to 10 μM) leading to the highest frequency of multiple shoot formation negatively influenced the elongation of shoots and also caused non-desirable callogenesis. This character was still more emphasized in successive subcultures on the same medium

(Fig. 1C,D; see also the figures in Kartha et al., 1981; Allavena, 1984; Griga, Hejtmánková, 1990) and could be mentioned as the critical step of the micropropagation protocol. We observed that the high number of shoot buds per explant is very often in negative correlation with the quality of shoots (morphology, physiology) and their ability to produce complete plants.

As to the three factors studied (phytohormones; explant type; genotype), the qualitative *in vitro* response of bean meristems and buds is basically affected by the used ratio of auxin and cytokinin; the intensity of the morphogenetic response (quantitative aspect) is influenced by phytohormones as well as genotype and initial explant type.

There were observed differences in regeneration capacity between the eight genotypes tested - cv. Magna, KR 355 and Kreola being the most responsive under the described conditions. Pronounced differences in regeneration potential of meristems and buds between the bean species and cultivars were also reported in literature (Rublů, Kartha, 1985; Allavena, Rosssetti, 1986; Saam et al., 1987).

The location of initial explant on the seedling had a quantitative effect, i.e. the morphogenetic response of various explants on certain medium was the same, only the intensity of response differed. Axillary buds of cotyledons exhibited the better regeneration potential than apical buds, which is an analogous situation like in pea and horse bean (Griga et al., 1986; Gould et al., 1987; Griga, 1988; Selva et al., 1989).

Root formation could be easily induced on single shoots developing directly from meristems or buds in initial culture (media with low levels of BAP and NAA); shoots isolated from explants subcultured on cytokinin-rich media rooted significantly worse. For the whole plant regeneration, the transfer of explants with multiple shoots into neutral media could be recommended - this transfer could positively affect the shoot elongation as well as the following rooting procedure.

In some cases we observed the formation of embryo-like structures on meristem explants. We did not follow this phenomenon in detail in our work, but the recent studies in pea (Kyselý, Jacobsen, 1990) and some *Phaseolus* species (Malik, Saxena, 1992) show the possibility of somatic embryogenesis induction from shoot apices or the regions adjacent to the shoot apex, hypocotyl and cotyledonary axils. Interestingly in *Phaseolus* species (in contrast with most of other legumes) somatic embryogenesis could be induced by BAP (Malik, Saxena, 1992).

The protocol presented here was reproducibly applied to selected Czechoslovak common bean cultivars. The limiting factors are: (1) decrease of shoot

regeneration potential in long-term culture connected with intensive callus formation on BAP-rich media, (2) non-stable rooting ability, particularly in shoots isolated from long-term micropropagation culture.

Abbreviations

MS: culture medium after Murashige, Skoog (1962); BAP: 6-benzylaminopurine; NAA: α -naphthaleneacetic acid

References

- ALLAVENA, A.: Bean (*Phaseolus*). In: SHARP, W. R. - EVANS, D. A. - AMMIRATO, P. V. - YAMADA, Y. (eds): Handbook of plant cell culture. Vol. 2. New York, MacMillan, 1984, pp. 137-168.
- ALLAVENA, A. - ROSSETTI, L.: Micropropagation of bean (*Phaseolus vulgaris* L.); effect of genetic, epigenetic and environmental factors. Sci. Hort., 30, 1986, pp. 37-46.
- ALLAVENA, A. - SHARP, W. R.: Adventitious shoot and plantlet development of *Phaseolus vulgaris* apical buds grown *in vitro*. Proc. XXV Meet. Ital. Soc. Agric. Genet., 1981, pp. 43-44.
- GOULD, K. S. - CUTTER, E. G. - YOUNG, J. P. W. - CHARLTON, W. A.: Positional differences in size, morphology, and *in vitro* performance of pea axillary buds. Can. J. Bot., 65, 1987, pp. 406-411.
- GRIGA, M.: Studium rozdílů v regenerační schopnosti u různých genotypů *Vicia faba* L. v meristémové kultuře *in vitro*. Rostl. Výr., 34, 1988, pp. 613-626.
- GRIGA, M. - HEJTMÁNKOVÁ, H.: Klonování sóje [*Glycine max* (L.) Merr.] využitím kultury vzrostných vrcholů a děložních nodů. Rostl. Výr., 36, 1990, pp. 287-294.
- GRIGA, M. - TEJKLOVÁ, E. - NOVÁK, F. J. - KUBALÁKOVÁ, M.: *In vitro* clonal propagation of *Pisum sativum* L. Pl. Cell Tiss. Organ Cult., 6, 1986, pp. 95-104.
- KÁBA, B.: Statistika pro obory fyto technika, zootechnika, meliorace a tropické a subtropické zemědělství. Skripta VŠZ, Praha, PEF, 1981.
- KARTHA, K. K. - PAHL, K. - LEUNG, N. L. - MROGINSKI, L. A.: Plant regeneration from meristems of grain legumes: soybean, cowpea, peanut, chickpea, and bean. Can. J. Bot., 59, 1981, pp. 1671-1679.
- KYSELY, W. - JACOBSEN, H. J.: Somatic embryogenesis from pea embryos and shoot apices. Pl. Cell Tiss. Organ Cult., 20, 1990, pp. 7-14.
- MALIK, K. A. - SAXENA, P. K.: Somatic embryogenesis and shoot regeneration from intact seedlings of *Phaseolus acutifolius* A., *P. aureus* (L.) Wilczek, *P. coccineus* L., and *P. wrightii* L. Pl. Cell Rep., 11, 1992, pp. 163-168.
- MARTINS, I. S. - SONDAHL, M. R.: Axillary bud development from nodal cultures of bean seedlings (*Phaseolus vulgaris* L.). Turrialba, 34, 1984a, pp. 157-161.
- MARTINS, I. S. - SONDAHL, M. R.: Multiple shoot formation from shoot apex cultures of *Phaseolus vulgaris* L. J. Pl. Physiol., 115, 1984b, pp. 205-208.
- MURASHIGE, T. - SKOOG, F.: A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant., 15, 1962, pp. 473-497.
- RUBLUO, A. - KARTHA, K. K.: *In vitro* culture of shoot apical meristems of various *Phaseolus* species and cultivars. J. Pl. Physiol., 119, 1985, pp. 425-433.

SAAM, M. M. - HOSFIELD, G. L. - SAUNDERS, J. W.: *In vitro* propagation of dry bean from seedling shoot tips. J. Amer. Soc. Hort. Sci., 112, 1987, pp. 852-855.

SAKA, H. - VOQUI-DINH, T. H. - CHENG, T. Y.: Stimulation of multiple shoot formation on soybean stem nodes in culture. Pl. Sci. Lett., 19, 1980, pp. 193-201.

SELVA, E. - STOUFFS, B. - BRIQUET, M.: *In vitro* propagation of *Vicia faba* L. by micro-cutting and multiple shoot induction. Pl. Cell Tiss. Organ Cult., 18, 1989, pp. 167-179.

Received on September 29, 1992

KALANTIDIS, K. - GRIGA, M. (Vysoká škola zemědělská, Praha; Výzkumný ústav technických plodin a luskovin, Šumperk):

Mikropropagace fazolu obecného (*Phaseolus vulgaris* L.) indukci tvorby mnohonásobných prýtů.

Rostl. Výr., 38, 1993 (2): 115-128.

Byla vyvinuta metoda mikropropagace u fazolu obecného (*Phaseolus vulgaris* L.) a prověřena na souboru osmi převážně československých odrůd a genotypů. Jako výchozí explantáty byly testovány stonkové apikální meristémy (velikost 0,2 - 0,3 mm), vzrostné vrcholy a axilární pupeny děloh (obr. 1A) a prvních pravých listů (velikost 3 - 4 mm), izolované z asepticky pěstovaných klíčnicích rostlin. Vstupní testování faktoriální kombinace 6-benzylaminopurinu (BAP; 0; 0,1; 1; 5; 10 a 20 μ M) a kyseliny α -naftyloctové (NAA; 0; 0,1; 1; 5 a 10 M) na pozadí základního média (Murashige, Skoog, 1962) s 3% sacharózou a 0,8% agarem ukázalo optimální tvorbu mnohonásobných prýtů (podmínka multiplikačního efektu) při aplikaci 10 μ M BAP samotného-nebo v kombinaci s nízkou koncentrací NAA (0,1 μ M) - (obr. 1B, C, D, tab. I). Nižší koncentrace BAP indukovaly tvorbu jednoduchých prýtů. Koncentrace NAA nad 5 μ M negativně ovlivňovaly počet i kvalitu mnohonásobných prýtů (silné malformace explantátů). Samotná NAA v nízké koncentraci (0,1; 1 μ M) indukovala tvorbu kořenů.

Lokalizace výchozích explantátů na klíčnicí rostlině ovlivňovala morfogenní odezvu na médiích indukujících tvorbu mnohonásobných prýtů (tab. II). Kapacita tvorby mnohonásobných prýtů stoupala ve směru od vzrostného vrcholu přes axilární pupeny listů po axilární pupeny děloh. Pro účely prosté mikropropagace je jednodušší a efektivnější využití pupenů ve srovnání s meristémy.

Testování osmi různých genotypů potvrdilo obecnou použitelnost metody u *Phaseolus vulgaris*, i když rozdíly v morfogenní odezvě mezi genotypy existují (tab. III). Nejlepší výsledky byly získány u genotypů Magna, krajové odrůdy 355 a Kreola při použití axilárních pupenů děloh. Z hlediska významnosti studovaných faktorů ovlivňovaly tvorbu mnohonásobných prýtů především použité růstové regulátory a genotypy, méně pak typ výchozího explantátu (tab. IV).

Prýty minimální délky 2 cm byly zakořeňovány na MS-médiu bez růstových regulátorů. Aplikace NAA (0,1 a 1 μ M) pozitivně ovlivňovala tvorbu kořenů, avšak zvýšení frekvence zakořeňování nebylo statisticky průkazné. Po osmi týdnech kultivace na

zakořeňovacích médiích byly kořeny dostatečně vyvinuté (obr. 2A) a kompletní rostlinky mohly být převedeny přes perlit s 1/2 MS-médiem - minerální část (obr. 2B) do nesterilních podmínek ve skleníku (obr. 3A), kde rostliny kvetly a tvořily lusky (obr. 3B).

Explantáty vykazující dobrou schopnost tvorby mnohonásobných prýtů byly subkultivovány jako stonková kultura po dobu 12 měsíců. Kapacita tvorby mnohonásobných prýtů klesala s pokračující subkultivací a byla pozorována zvýšená tendence ke tvorbě kalusu. Prýty izolované z dlouhodobé kultury kořenily hůře a vyžadovaly delší kultivační interval na zakořeňovacím médiu ve srovnání s prýty izolovanými během prvních měsíců po založení kultury. Na některých kombinacích růstových regulátorů (1 μ M NAA + 1 μ M BAP; 1 μ M NAA + 5 μ M BAP) byla ojediněle pozorována tvorba hladkých, globulárních embryu podobných struktur (obr. 3C, D).

Contact Address:

Ing. Kriton Kalantidis, Vysoká škola zemědělská, 165 21 Praha 6 (present address: Department of Life Sciences, University of Nottingham, NG7 2RD Nottingham, U.K.)

RNDr. Miroslav Gríga, CSc., Výzkumný ústav technických plodin a luskovin, 787 01 Šumperk

DIPLOIDIZACE A CYTOLOGICKÁ KONTROLA HAPLOIDŮ *BRASSICA NAPUS* L.

M. Vyvadilová, S. Zelenková, D. Tomášková, J. Košner

Výzkumný ústav rostlinné výroby, Praha-Ruzyně

Diploidizace haploidních rostlin *Brassica napus* L. z prašníkových a mikrosporových kultur byla prováděna ponořením celých rostlin do roztoku kolchicinu. Pro cytologickou kontrolu ploidie v kořenech a mladých lístcích byly použity modifikace postupů, které uveřejnili La Cour (1941) a Feulgen, Rossenbeck (1926). Výťažnost dihaploidů byla v průměru 69 %. Nebyl pozorován statisticky významný rozdíl mezi genotypy, dobou působení (16 a 48 h) ani koncentracemi kolchicinu (0,05 a 0,1 %).

U některých druhů rodu *Brassica* je možné za určitých podmínek navodit přímou pylovou embryogenezi v prašníkových a mikrosporových kulturách (Lichter, 1981, 1985; Chuong, Berversdorf, 1985). Vznikají tak rostliny s haploidním počtem chromozómů, které představují vhodný materiál pro genetické studie, a předpokládá se jejich využití pro genetické manipulace a mutačně-selekční systémy. Po diploidizaci haploidů lze získat homozygotní linie jako výchozí šlechtitelský materiál (Lichter et al., 1988).

Praktická aplikace metody je však dosud limitována relativně nízkým výnosem embryí u některých genotypů a nízkou účinností diploidizace haploidů. Většina dosud používaných metod - aplikace kolchicinu na kořeny a postranní větve, ovlivnění meristémů (např. injekční metoda), embryí a *in vitro* rostlin - má buď nízké procento účinnosti, nebo některé jiné nevýhody (Naleczynska, Cegielska, 1984; Currah, Ockendon, 1987; Lichter et al., 1988). Součástí tvorby dihaploidních linií je cytologická kontrola počtu chromozómů u regenerovaných rostlin.

Tato práce je zaměřena na vyhledání účinné metody diploidizace a cytologické kontroly v časných stádiích vývoje rostlin.

MATERIÁL A METODA

Pro pokusy byly použity haploidní rostliny z prašníkových kultur odrůdy Darmor, Jet Neuf, Topas, Solida, F₁ hybridů - F₁157, F₁118, F₁42, F₁179 ze

ŠS Slapy u Tábora, z mikrosporových kultur dihaploidních linií odrůdy Darmor (D 36, D 10) a tři autoinkompatibilní linie.

Byly zkoušeny roztoky kolchicinu o koncentraci 0,1 % a 0,05 %, pH 5,8. Celkem bylo hodnoceno 234 rostlin. Malé rostlinky ve stadiu 3 až 4 pravých listů byly po vyjmutí z agarového média, opláchnutí v destilované vodě a zastřížení kořínků vloženy po třech do 100ml baněk se 30 ml roztoku kolchicinu tak, aby byly jejich vegetační vrcholy ponořeny. Po dobu působení kolchicinu byly umístěny v klimaboxu při 23/18 °C, při nízké intenzitě osvětlení a fotoperiodě 16/8 h. Doba působení kolchicinu byla 16 nebo 48 h. Po ovlivnění byly rostliny opláchnuty vodou a ponořeny do 0,15% vodného roztoku fungicidu Previcur na 15 min. Rostliny pak byly vysazeny do zeminy, přikryty 5 až 6 dnů porofólií, která udržovala dostatečně vysokou vlhkost; 109 rostlin bylo jarovizováno v podmínkách *in vitro* před kolchicinováním, 125 rostlin po 2 týdnech od vysazení do zeminy 6 týdnů při 4 až 6 °C.

Statistické vyhodnocení výsledků bylo prováděno χ^2 testem. Ploidie regenerantů byla hodnocena podle morfologických znaků (habitus a stavba květu) a cytologicky. Cytologický rozbor počtu chromozómů u rostlin z podmínek *in vitro* a zakořeněných regenerantů byl realizován většinou u mladých lístků (3 až 5 mm), někdy i u kořenových špiček.

Rychlé roztlačové metody byly aplikovány podle těchto postupů:

A. Barvení Feulgenovou reakcí (F e u l g e n , R o s s e n b e c k , 1926) a acetoorceinem:

1. předpůsobení - 0,002M roztok oxychinolinu, 3 h, 20 až 22 °C;
2. promývání vodou - 15 min;
3. fixace - 99% kyselina octová, minimálně 30 min; objekty je možné uchovávat ve fixáži několik dní při 4 °C;
4. promývání vodou 15 min;
5. hydrolýza - 1N HCl, 60 °C, 10 min;
6. barvení *in toto* v Schiffově reagens, 30 min; po obarvení v Schiffově reagens je možné objekty uchovávat asi 10 dní v destilované vodě při 4 °C.
7. dobarvení roztlaku v 1% acetoorceinu.

B. Barvení acetoorceinem (L a C o u r , 1941):

1. předpůsobení a fixace se provede stejným způsobem jako u výše uvedené metody;
2. přenesení objektu bez promývání na hodinové sklíčko do směsi 1N HCl (1 díl) a 1% acetoorceinu (10 dílů), která se opatrně 3x zahřeje; tekutina nesmí vřít;
3. barvení rozcupovaného materiálu se provede na podložním skle v kapce 1% acetoorceinu, 5 až 10 min; po zhotovení roztlaku pod krycím sklíčkem preparát opatrně zahřejeme.

Preparáty se převedou do trvalého stavu pomocí suchého ledu (C o n g e r , F a i r c h i l d , 1953) a zalijí do Euparalu. Acetoorceinové preparáty lze po orámování krycího sklíčka Solakrylem dočasně uchovat několik dní v ledniče.

VÝSLEDKY

Podíl získaných dihaploidů v jednotlivých variantách po zhodnocení nepřímou a cytologickou metodou byl v průměru 69 %. Nebyly nalezeny statisticky významné rozdíly mezi genotypy, délkou působení ani koncentracemi roztoku kolchicinu. Cytologickým vyhodnocením bylo zjištěno, že koncentrace kolchicinu 0,1 a 0,05 % při působení 16 nebo 48 h byly dostatečné ke zdvojnásobení počtu chromozómů. Jako vhodnější se však ukazuje 0,05% koncentrace kolchicinu pro svoji nižší toxicitu (tab. I až III).

I. Vliv koncentrace kolchicinu na frekvenci fertálních a sterilních rostlin (1991) - The effect of colchicine concentrations on the frequency of fertile and sterile plants (1991)

I. pokus ¹		Genotyp ²	Počet rostlin celkem ³	Fertilní ⁴		Sterilní ⁵	
				počet ⁶	%	počet ⁶	%
48 h	0,05 %	D 36	17	9	53	8	47
		F 157	16	10	62,5	6	37,5
		celkem ⁷	33	19	58	14	42
48 h	0,1 %	D 36	13	8	62	5	38
		F 157	17	10	59	7	41
		celkem ⁷	30	18	60	12	40

¹experiment, ²genotype, ³total number of plants, ⁴fertile, ⁵sterile, ⁶number, ⁷total

II. Vliv doby působení kolchicinu na frekvenci fertálních a sterilních rostlin (1991) - The effect of colchicine treatment time on the frequency of fertile and sterile plants (1991)

I. pokus ¹		Genotyp ²	Počet rostlin celkem ³	Fertilní ⁴		Sterilní ⁵	
				počet ⁶	%	počet ⁶	%
16 h	0,05 %	D 36	23	16	70	7	30
	0,1 %	D 36	15	12	80	3	20
48 h	0,05 %	D 36	10	8	80	2	20
	0,1 %	D 36	17	13	76,5	4	23,5

For¹⁻⁶ see Tab. I

III. Využití metody kolchicinování pro diploidizaci regenerantů různých genotypů řepky (1991)
 - The use of colchicine treatment method for regenerated plants diploidization in different rape genotypes (1991)

I. pokus ¹		Genotyp ²	Počet rostlin celkem ³	Fertilní ⁴		Sterilní ⁵	
				počet ⁶	%	počet ⁶	%
16 h	0,05 %	Topas	11	8	73	3	27
		Solida	6	4	67	2	33
		F 42	12	7	59	5	42
		F 118	5	2	40	3	60
		F 179	4	3	75	1	25
		D 10	4	2	50	2	50
		D 36	5	3	60	2	40
		AI 9	20	15	75	5	25
		AI 24	4	3	75	1	75
		AI 44	35	28	80	7	20
		celkem ⁷	106	75	71	31	29

For ¹⁻⁷ see Tab. I

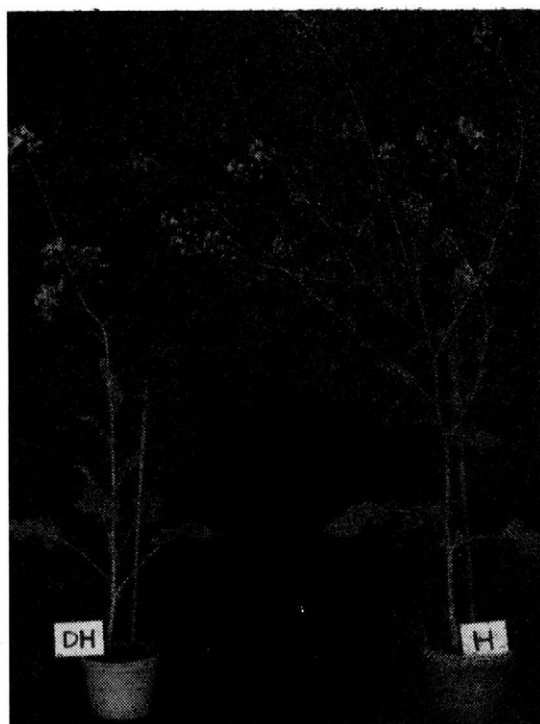
Haploidní rostliny mají celkově slabší habitus, protáhlý ve vertikální ose, s častým větvením, listy jsou užší bez výrazného vykrajování čepele, květenství je řidší, celkově protáhlé a nevytvářejí se téměř žádné šesule. Korunní lístky jsou menší a užší než u diploidních květů, prašníky jsou buď zakrnělé, nebo zcela chybějí (obr. 1 a 2).

Vzhledem k tomu, že mitotická aktivita v meristémech kořenových špiček rostlin *in vitro* byla nízká, použili jsme většinou ke karyologické kontrole haploidů a dihaploidů mladé listy regenerantů pěstovaných ve skleníku. Postup, který uveřejnil L a C o u r (1941), byl při rutinním hodnocení většího počtu rostlin časově nenáročný, a proto jsme mu dávali přednost před jinými metodami. Feulgenovo barvení jsme naopak aplikovali u kořenových špiček, kde se acetoorceinem chromozómy špatně barvily.

U regenerantů byl v průměru zjištěn 12% výskyt spontánních dihaploidů. Mimo haploidních (obr. 3) a diploidních (obr. 4) počtů chromozómů byly u regenerantů pozorovány ojediněle aneuploidní odchylky. U všech genotypů se často objevovaly chimerické rostliny (obr. 5).

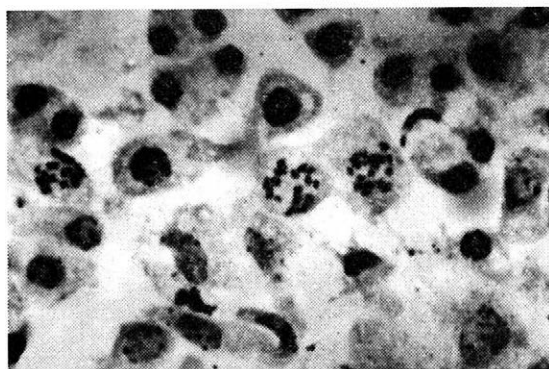
Ztráty rostlin jarovizovaných po ovlivnění kolchicinem dosáhly v průměru 30 %, zatímco u varianty jarovizované *in vitro* činily pouze 6 % a zdravotní

1. Habitus dihaploidní a haploidní rostliny řepky ozimé - The habitus of winter rape dihaploid and haploid plants

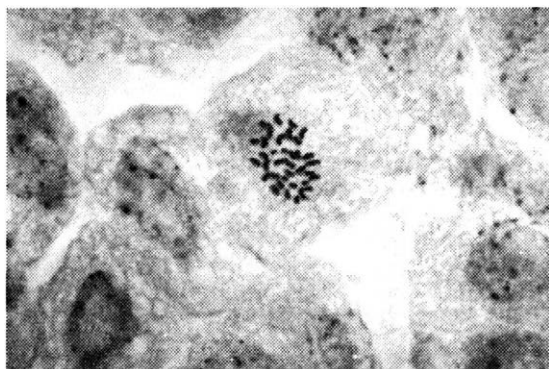


2. Detail květenství haploidní řepky ozimé - A detail view of the inflorescence of haploid winter rape

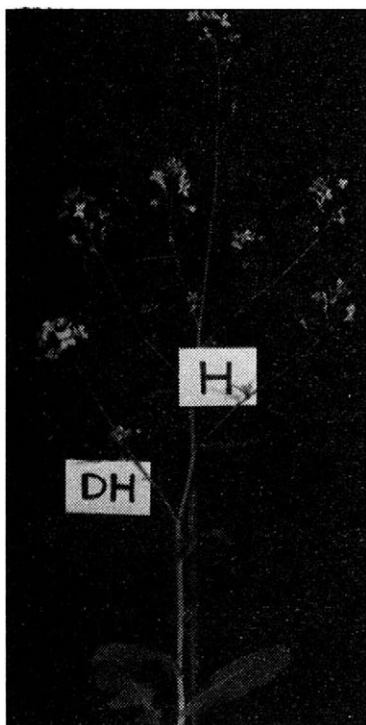




3. Metafáze mitotického dělení haploidní řepky ($n = 19$) - The metaphases of mitotic division of haploid rape ($n = 19$)



4. Metafáze mitotického dělení diploidní řepky ($2n = 38$) - The metaphases of mitotic division of diploid rape ($2n = 38$)



5. Chimerická rostlina s haploidními a dihaploidními sektory květenství - A chimeric plant with haploid and dihaploid sectors of inflorescence

stav rostlin byl podstatně lepší. U rostlin jarovizovaných *in vitro* však docházelo k deformacím nejmladších listů, ke zpomalení růstu a vývoje a často byla také porušena apikální dominance.

DISKUSE

Hlavním kritériem pro posouzení metody diploidizace byl požadavek na snížení pracnosti a technické náročnosti při kolchicinování haploidních rostlin.

Metody, které jsme dosud používali, měly určité nedostatky. U metody kolchicinování bočních větví byla účinnost jen 40 %, za další komplikace lze považovat zdouhlost postupu a náročnost na skleníkovou plochu. Při kolchicinování mladých rostlin přes kořenový systém se účinnost pohybovala také pouze kolem 40 % a navíc bylo nutné opakované přesazování rostlin po ovlivnění kolchicinem. Avšak výhodou obou metod je možnost snadného zjištění ploidie rostlin před ovlivněním a časná identifikace spontánních dihaploidů. Účinnost injekční aplikace kolchicinu do vrcholového meristému v průběhu jarovizace je sice vysoká (asi 75 %), nevýhodou je však vysoká cena a nedostatek vhodných mikrojehel, rovněž i dlouhodobá manipulace s kolchicinem. Zkoušená metoda měla tyto nevýhody řešit.

Ve shodě s údaji, které uveřejnili C u r r a h , O c k e n d o n (1987), se koncentrace kolchicinu 0,05 % ukázala jako dostačující pro diploidizaci a přitom výhodnější z hlediska menší toxicity nižší koncentrace kolchicinu. Ukázalo se, že mezi použitými dobami působení, koncentracemi kolchicinu a citlivostí odrůd nejsou rozhodující rozdíly, které by vytvářely předpoklady pro zásadní zlepšení metody.

Při diploidizaci ponořením celých mladých rostlin do roztoku kolchicinu byla výtěžnost dihaploidů v průměru 69 %. Tyto výsledky jsou srovnatelné s jinými metodami, např. s mikroinjekční aplikací (O c k e n d o n , 1986), kde je udávána frekvence diploidů okolo 70 %.

Ve shodě s výsledky, které uveřejnili C h a r n e et al. (1988), bylo zjištěno při cytologické kontrole 12 % spontánních dihaploidů. Potiže však někdy působily ztráty diploidizovaných rostlin infekcí (viróza, padlí, hlenka). Tento jev lze spojovat s oslabením rostlin vlivem kolchicinu a vysokým infekčním tlakem prostředí, ve kterém byly rostliny pěstovány. Výrazně nižší ztráty byly pozorovány u varianty jarovizované *in vitro*.

Literatura

- CONGER, A. D. - FAIRCHILD, L. N.: A quick-freeze method for making smears slides permanent. *Stain. Technol.*, 28, 1953, s. 281-283.
- CURRAH, L. - OCKENDON, D. P.: Chromosome doubling of mature haploid brussels sprout plants by colchicine treatment. *Euphytica*, 36, 1987, s. 167-173.
- FEULGEN, R. - ROSSENBECK, H.: Die Nuklealfärbung. *Handb. biol. Arb-Meth.*, 1926, s. 213.
- CHARNE, D. G. - PUKACKI, P. - KOTT, L. S. - BEVERSDORF, W. D.: Embryogenesis following cryopreservation isolated microspores of rapeseed (*Brassica napus* L.). *Pl. Cell Rep.*, 7, 1988, č. 6, s. 407-409.
- CHUONG, V. - BEVERSDORF, W. D.: High frequency embryogenesis through isolated microspore culture in *Brassica napus* L. and *B. carinata* Braun. *Pl. Sci.*, 39, 1985, s. 219-226.
- LA COUR, L.: Acetic orcein - a new stain fixative for chromosomes. *Stain Technol.*, 16, 1941, s. 169-174.
- LICHTER, R.: Anther culture of *Brassica napus* in a liquid culture medium. *Z. Pfl.-Physiol.*, 103, 1981, s. 229-237.
- LICHTER, R.: From microspores to rape plants: A tentative way to low glucosinolate strains. In: SORESENSEN, H. (ed.): *World crops: production, utilization, description*. Lancaster. DrW. Jung Publ. 1985.
- LICHTER, R. - GROOT, E. - FIEBIG, D. - SCHWEIGER, R. - GLAND, A.: Glucosinolates determined by HPLC in the seeds of microspore-derived homozygous lines of rapeseed (*Brassica napus* L.). *Pl. Breed*, 100, 1988, č. 3, s. 209-221.
- MATHIAS, R. - ROBBELEN, G.: Effective diploidization of microspore derived haploids of rape (*Brassica napus* L.) by *in vitro* colchicine treatment. *Pl. Breed*, 106, 1991, č. 1, s. 82.
- NALECZYNSKA, A. - CEGIELSKA, T.: Dihaploid production in *Brassica napus* L. by *in vitro* androgenesis. *Genet. Pol.*, 25, 1984, č. 3, s. 271-276.
- OCKENDON, D. J.: Utilization of anther culture in breeding brussels sprouts. In: HORN, W. - JENSEN, C. J. - ODENBACH, W. - SCHEITEL, O. (eds.): *Genetic manipulation in plant breeding*. Berlin, 1986.

Došlo 8. 10. 1992

VYVADILOVÁ, M. - ZELENKOVÁ, S. - TOMÁŠKOVÁ, D. - KOŠNER, J. (Research Institute for Crop Production, Praha-Ruzyně):

Diploidization and cytological control of *Brassica napus* L. haploids.

Rostl. Výr., 39, 1993 (2): 129-137.

The objective of the present paper was to search for an effective method of diploidization and cytological control at early developmental stages of regenerated plants in anther and microspores cultures. A reduction of labour consumption and lower technical requirements for colchicine treatment of haploid plants were the main criterion of diploidization method of evaluation. In these experiments regenerated plants from anther cultures of the varieties Darmor, Jet Neuf, Topas, Solida were used, then from F_1 hybrids F_{1157} , F_{1118} , F_{142} , F_{1179} coming from the Slapy near Tábor Plant Breeding

Station, from microspore cultures of dihaploid lines of the Darmor variety (D 36, D 10) and three self-incompatible lines represented another experimental material.

Colchicine solutions at concentrations 0.1 % and 0.05 % and pH value 5.8 were used for plant treatment. A total of 234 plants was evaluated. After small plantlets at the stage of three to four true leaves were taken out from agar medium, rinsed with distilled water and after their rootlets were trimmed, three plantlets were always put into 100ml flasks with 30 ml of colchicine solution and fixed in such a way that their growing points were covered with the solution. The conditions of treatment: the treatment lasted 16 or 48 hours, temperature of 23/18 °C, photoperiod 16/8 h with low illumination.

Regenerated plants ploidy was evaluated from their morphological traits (Figs 3, 4) and cytologically. The number of chromosomes in plants from *in vitro* culture and in rooted regenerated plants was determined in root-tips and in young leaves (3 to 5 mm). The preparations were stained in Feulgen's reaction (Feulgen, Rossenbeck, 1926) and with acetoorceine after La Cour (1941). The proportion of dihaploids obtained in the different treatments was on average 69 % when indirect and cytological methods were used for evaluation. There were no statistically significant differences between the genotypes, treatment time and colchicine solution concentrations. The used colchicine concentrations of 0.1 % and 0.05 % in 16h and 48h treatments were sufficiently effective to induce chromosome doubling. The 0.05% colchicine concentration was found to be better as a result of its lower toxicity (Tabs I to III).

As the mitotic activity in root-tip meristems of *in vitro* plants was low, young leaves of regenerated plants grown in a greenhouse were mostly used for the caryological control. The procedure after La Cour (1941) did not take much time for routine evaluation of a higher number of plants, hence we preferred to use this procedure. Feulgen's staining was applied to root-tips where the acetoorceine staining of chromosomes was not clear enough. Regenerated plants showed on average the 12% presence of spontaneous dihaploids. In addition to haploids (Fig. 1) and dihaploids (Fig. 2) aneuploid aberrations were scarcely observed in regenerated plants. Chimeric plants were frequent in all genotypes (Fig. 5).

Kontaktní adresa:

Ing. Miroslava Vyvalilová, CSc., Výzkumný ústav rostlinné výroby, 161 06 Praha 6-Ružyně



**VÝHODNÝ LEASING
STROJŮ A ZAŘÍZENÍ
NEJEN PRO ZAČÍNÁJÍCÍ
PODNIKATELE**

ADEKO a. s. Vám nabízí

- ☐ kapitálovou účast v jiných podnikatelských subjektech
- ☐ společné podnikání
- ☐ poradenskou, konzultační a zprostředkovatelskou činnost v oboru ekologie
- ☐ investorskou a investiční činnost
- ☐ řešení odbytových potíží výrobcům a obchodním organizacím formou leasingového financování

**ADEKO a. s.
Slezská 7
120 56 Praha 2**

**tel.: 258 342
fax: 207 229**



MOŽNOSTI NEPŘÍMÉHO URČENÍ ÚROVNĚ PLOIDIE U REGENERANTŮ BRAMBORU *IN VITRO*

P. Kostřica, J. Domkářová

Výzkumný ústav bramborářský, Havlíčkův Brod

Z primárních kalusů tří dihaploidů bramboru byly získávány regeneranty za účelem mitotického zdvojení. V souborech regenerantů byla určována úroveň ploidie prostřednictvím počtu chloroplastů ve svěracích buňkách průduchů na rostlinách *in vitro*. Efektivnost této metody byla srovnávána s toutéž technikou použitou po výsadbě rostlin ve skleníku a s určením úrovně ploidie podle habitu rostlin v polních podmínkách. Získané výsledky ukazují na použitelnost techniky *in vitro* k poměrně přesnému vymezení kategorie tetraploidních (zdvojených) regenerantů. Problematické zůstává její využití k rozlišení diploidních, případně triploidních regenerantů, především pro posun v zjišťovaných počtech chloroplastů směrem k vyšším absolutním hodnotám. Prověřovaná nepřímá metoda určení ploidie umožní provádět selekci žádoucích tetraploidních regenerantů již v prostředí *in vitro* a snížit tak objem materiálu vysazovaného k dalším testům ve skleníkových podmínkách.

Dihaploidy bramboru (*Solanum tuberosum* L.) představují šlechtitelsky cenné materiály umožňující překonání mezidruhové nekřížitelnosti uvnitř rodu *Solanum*, selekci na diploidní úrovni ploidie a následné odvození výchozích genotypů s vysokým podílem homozygotnosti znaků a vlastností. Zapojení dihaploidů do konečné fáze šlechtění však předpokládá zdvojení jejich genomu na tetraploidní úroveň, která je u bramboru z hlediska vitality optimální.

Pro rychlé rozlišení genotypů s rozdílnou úrovní ploidie mají velký význam nepřímé metody její detekce. Určení ploidie na základě habitu rostlin vychází z často pozorovaného subtilnějšího růstu diploidních genotypů, které se dále vyznačují úzkými čepelemi lístků, případně bohatším větvením stonků (M a g o o n et al., 1958; Z a d i n a , K u l c o v á , 1974). Diagnostické využití morfologie svěracích buněk průduchů je založeno na jejich rozdílné velikosti u dihaploidních a zdvojených tetraploidních genotypů (R o s s et al., 1967) a zejména pak na empiricky zjištěné úzké vazbě mezi úrovní ploidie a počtem chloroplastů v párových svěracích buňkách.

Po shrnutí vlastních poznatků a srovnání výsledků jiných autorů usuzují Z a d i n a et al. (1975) a Z a d i n a , H o r á č k o v á (1977) na diploidní

úroveň ploidie v případě výskytu méně než 15 chloroplastů v párových svěracích buňkách průduchů, pro rozmezí 15,1 až 20,0 chloroplastů je definován triploid, při 20,1 a více chloroplastech tetraploid. Použití tohoto klasifikačního schématu se postupně stalo rutinní technikou k selekci dihaploidů z populací semenáčů po mezidruhově hybridizaci u rodu *Solanum* (Z a d i n a et al., 1975).

Pro předběžné stanovení ploidie u regenerantů odvozených v tkáňové kultuře dihaploidů je však důležitá možnost aplikace této metody již v prostředí *in vitro*. Kromě orientačních výsledků průkopnické práce (S c h r e i t e r et al., 1989) však zatím v tomto směru podrobnější údaje chybějí. Cílem předloženého článku bylo proto zjistit přesnost nepřímé metody detekce ploidie pomocí počtu chloroplastů ve svěracích buňkách průduchů u rostlin *in vitro* a posoudit její použitelnost k selekci tetraploidních klonů v souborech regenerantů z primárních kalusů výchozích dihaploidních genotypů.

MATERIÁL A METODA

K pokusům byly vybrány tři dihaploidy udržované v ozdravené podobě v genobance VÚB v Havlíčkově Brodě. Dva z těchto genotypů (DH 165 a DH 169) byly primárními dihaploidy odrůdy Apta, třetí (DH 160) byl interdiaploid se čtvrtinovým podílem genomu této odrůdy.

Po nařízkování *in vitro* byly z rostlin výchozích genotypů odebírány internodální a listové explantáty, které byly kultivovány s cílem vyvolat kalogenezi a následnou organogenezi výhonů z primárních explantátových kalusů. Regenerované výhony byly evidovány a dále množeny jako samostatné klony podle postupu, který uvádějí K o s t ř i c a et al. (1993).

Úroveň ploidie každého klonu byla zjišťována nepřímo stanovením počtu chloroplastů ve svěracích buňkách průduchů v listech rostlin *in vitro*, stejným postupem po výsadbě klonů do skleníku a podle habitu rostlin pěstovaných v polních podmínkách.

Jako kritérium pro rozlišení klonů s různou úrovní ploidie podle habitu byla zvolena intenzita zbarvení listů a listový index. Listový index byl určen jako průměrná hodnota poměrů mezi délkou a šířkou čepele terminálního lístku (H e r m s e n , B o e r , 1971; Z a d i n a , K u l c o v á , 1974) u deseti plně vyvinutých listů pěti rostlin klonu. Habitus rostlin jednotlivých klonů byl dále srovnáván s habitem trsu kontrolních rostlin příslušného výchozího dihaploidního genotypu.

K počítání chloroplastů byly z rostlin *in vitro* a *in vivo* odebírány segmenty z čepele nejmladších plně vyvinutých listů, které byly barveny barvicí směsí

obsahující 1% roztok jódu v 1% roztoku jodidu draselného (F r č e k , 1988). Po probarvení struktur byly počítány chloroplasty u 20 nahodile vybraných párů svěřacích buněk průduchů ve spodní epidermis listu daného klonu a byl vypočten jejich aritmetický průměr. Pro zařazení klonu do skupiny s příslušnou úrovní ploidie podle počtu chloroplastů bylo použito citované klasifikační schéma (Z a d i n a , H o r á č k o v á , 1977).

Na základě uvedených metod byly soubory regenerantů rozděleny do skupin s diploidní, triploidní a tetraploidní úrovní ploidie a byl srovnán rozsah těchto skupin sestavených postupem *in vitro* s technikami *in vivo*.

VÝSLEDKY

Základní rozdělení klonů regenerovaných ze tří výchozích dihaploidů do skupin podle úrovně ploidie stanovené na základě habitu rostlin, počtu chloroplastů ve svěřacích buňkách průduchů u rostlin *in vivo* a u rostlin *in vitro* zachycuje tab. I.

Soubory rostlin dihaploidních a zdvojených tetraploidních klonů odvozených od DH 160 a DH 169 byly ve svém habitu dosti uniformní a navzájem od sebe zřetelně rozlišitelné. Morfologický popis těchto klonů uvádějí K o s t ř i c a et al. (1993). V souborech nezdvojených regenerantů činila průměrná hodnota listového indexu 2,51 (DH 160) a 2,76 (DH 169). U sytě zelených listů zdvojených klonů dosahoval listový index průměrné hodnoty jen 1,87 (DH 160) a 2,06 (DH 169). Nepočtená skupina triploidních klonů zahrnovala přechodné typy se světle zelenými širšími lístky.

I. Rozdělení regenerantů podle úrovně ploidie stanovené třemi nepřímými metodami - Distribution of regenerants according to the ploidy level settled by three indirect methods

Diagnostická metoda ploidie ¹		Habitus rostlin ⁴			Počet chloroplastů ⁵					
Výchozí genotyp ²	regenerantů celkem ³	2x	3x	4x	<i>in vivo</i>			<i>in vitro</i>		
					2x	3x	4x	2x	3x	4x
DH 160	48	24	2	22	21	9	18	14	12	22
DH 165	161				67	46	48	24	38	99
DH 169	278	109	18	151	31	100	147	36	67	175

¹diagnostic method of ploidy, ²initial genotype, ³total number of regenerants, ⁴plant habit, ⁵chloroplast count

U DH 165 nebyla úroveň ploidie podle habitu trsu stanovena pro subvitální charakter růstu rostlin diploidních i tetraploidních klonů a vysokou variabilitu v hodnotách listového indexu u mladších a starších listů téže rostliny.

Vztah mezi úrovní ploidie stanovenou na základě habitu trsu a podle počtu chloroplastů *in vitro* zachycuje tab. I a II. V souborech regenerantů z obou hodnocených výchozích genotypů je nápadná shoda mezi oběma metodami pro detekci tetraploidních klonů (DH 160: 95,5 %, DH 169: 98,0 %). U klonů podle habitu dihaploidních však bylo zaznamenáno rozložení klonů do všech tří kategorií ploidie při posuzování ploidie z hlediska počtu chloroplastů *in vitro*. Shody obou metod při stanovování dihaploidních klonů bylo dosaženo pouze z 54,1 % (DH 160) a 33,0 % (DH 169).

Obdobný trend lze zaznamenat při srovnávání ploidie regenerovaných klonů metodou stanovení počtu chloroplastů na rostlinách v prostředí *in vivo* a *in vitro* (tab. I, III). Zatímco u skupiny tetraploidů bylo metodou *in vitro* určeno shodně 88,8 % (DH 160), 97,9 % (DH 165) a 98,0 % (DH 169) klonů, nacházejí se dihaploidy určené *in vivo* téměř rovnoměrně rozloženy ve skupinách dihaploidů a triploidů stanovených *in vitro*. Shodná diagnóza dihaploidů byla konstatována pouze u 52,4 % (DH 160), 34,3 % (DH 165) a 38,7 % (DH 169) klonů.

II. Stanovení úrovně ploidie u regenerantů na základě habitu rostlin a počtu chloroplastů *in vitro*
- Determination of the ploidy level in regenerants on the basis of plant habit and chloroplast count *in vitro*

Výchozí genotyp ¹	Ploidie dle habitu ³	Listový index ⁴	Počet regenerantů ⁵ (= 100 %)	Ploidie - chloroplasty ⁶ <i>in vitro</i>		
				2x počet ⁷ (%)	3x počet (%)	4x počet (%)
DH 160	2x	2,51	24	13 (54,2)	10 (41,7)	1 (4,1)
	3x		2	1 (50,0)	1 (50,0)	-
	4x	1,87	22	-	1 (4,5)	21 (95,5)
Regenerantů celkem ²			48	14	12	22
DH 169	2x	2,76	109	36 (33,0)	50 (45,9)	23 (21,1)
	3x		18	-	14 (77,8)	4 (22,2)
	4x	2,06	151	-	3 (2,0)	148 (98,0)
Regenerantů celkem			278	36	67	175

¹initial genotype, ²total number of regenerants, ³ploidy after habit, ⁴leaf index, ⁵number of regenerants, ⁶ploidy - chloroplasts, ⁷count (number)

Určité vysvětlení příčiny těchto vztahů vyplývá z obr. 1. Ve třech souborech regenerovaných klonů rozdělených podle konkrétních hodnot počtu chloroplastů zjišťovaných *in vivo* a *in vitro* lze vysledovat tyto skutečnosti:

Při hodnocení *in vivo* je rozptýl průměrných hodnot v počtech chloroplastů charakterizujících určitou úroveň ploidie celkově nižší než při stanovení *in vitro*. To umožňuje odlišit *in vivo* jednotlivé úrovně ploidie zřetelněji než v prostředí *in vitro*.

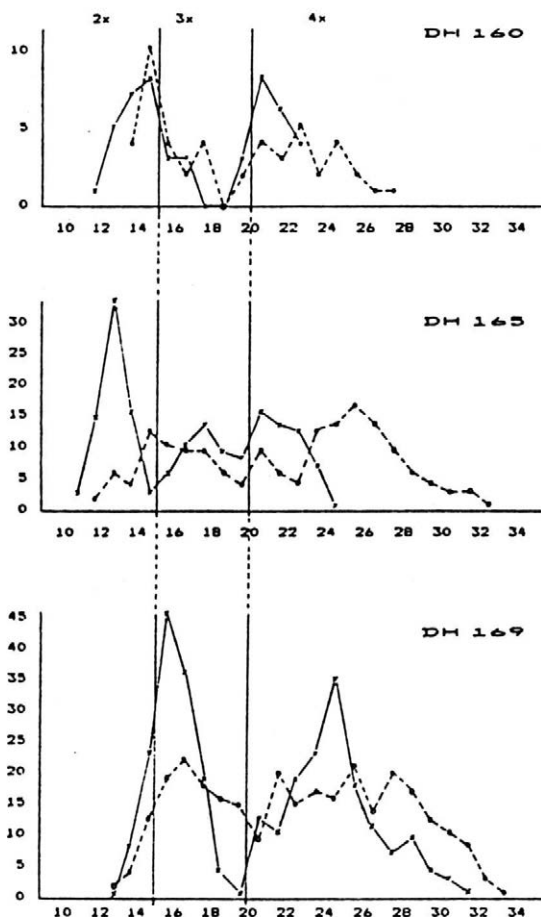
Při hodnocení *in vivo* kopírují klony odvozené z DH 165 a DH 160 poměrně přesně Zadinovo konvenční klasifikační schéma. U klonů regenerovaných z DH 169 je však patrný posun v průměrných počtech chloroplastů k vyšším absolutním hodnotám, které u dihaploidních klonů často zjevně překračují hranici 15 chloroplastů.

Počty chloroplastů nalézané ve svěracích buňkách průduchů *in vitro* dosahují pro jednotlivé úrovně ploidie zpravidla vyšších absolutních hodnot ve srovnání s hodnocením *in vivo*, a to zvláště u klonů odvozených z DH 165 a DH 169. Tato skutečnost pak má za následek řazení určitého počtu di-

III. Stanovení úrovně ploidie u regenerantů na základě počtu chloroplastů *in vivo* a *in vitro* -
Determination of the ploidy level in regenerants on the basis of chloroplast count *in vivo* and *in vitro*

Výchozí genotyp ¹	Ploidie chloroplasty ³ <i>in vivo</i>	Počet regenerantů ⁵ (= 100 %)	Ploidie - chloroplasty ⁶ <i>in vitro</i>		
			2x počet ⁷ (%)	3x počet (%)	4x počet (%)
DH 160	2x	21	11 (52,4)	9 (42,9)	1 (4,7)
	3x	9	2 (22,2)	2 (22,2)	5 (55,6)
	4x	18	1 (5,6)	1 (5,6)	16 (88,8)
Regenerantů celkem ²		48	14	12	22
DH 165	2x	67	23 (34,3)	32 (47,8)	12 (17,9)
	3x	46	1 (2,1)	5 (10,9)	40 (87,0)
	4x	48	-	1 (2,1)	47 (97,9)
Regenerantů celkem		161	24	38	99
DH 169	2x	31	12 (38,7)	11 (35,5)	8 (25,8)
	3x	100	23 (23,0)	54 (54,0)	23 (23,0)
	4x	147	1 (0,7)	2 (1,3)	144 (98,0)
Regenerantů celkem		278	36	67	175

For^{1,2,5-7} see Tab. II, ³ploidy - chloroplasts



1. Frekvence regenerantů ve vztahu k zjišťovanému počtu chloroplastů ve svěracích buňkách průduchů - Frequency of regenerants in relation to the estimating count of chloroplasts in guard cells of stomata

Vysvětlivky - Explanations:

plná čára: stanovení v podmínkách *in vivo* - full line: determination in *in vivo* conditions

přerušovaná čára: stanovení v podmínkách *in vitro* - broken line: determination in *in vitro* conditions

svislice: konvenční hranice úrovně ploidie - vertical line: conventional limits of ploidy level

osa x: počet chloroplastů - x axis: chloroplast counts

osa y: počet regenerantů - y axis: regenerant counts

haploidních regenerantů do intervalu vyhrazeného klasifikačním schématem pro triploidy, případně přimísení určitého procenta triploidů mezi tetraploidní klony.

DISKUSE

Oddělení dihaploidních a tetraploidních genotypů podle habitů rostlin je u rodu *Solanum* rychlou a poměrně spolehlivou metodou (Z a d i n a et al., 1975). Při hodnocení habitů je za nejprůkaznější kvantitativní kritérium považován listový index. Listový index a intenzita zeleného zbarvení listu byly základními ukazateli již při klasickém určování zdvojených rostlin po působení kolchicinu na semena planých druhů rodu *Solanum* (M a g o o n et al.,

1958). Také při srovnávání listového indexu deseti odrůd a z nich odvozených dihaploidů činila rozdílnost hodnot listového indexu 4,0 až 34,1 % a rozdíly mezi listovým indexem odrůdy Apta a jejími šesti dihaploidy byly vždy vysoce statisticky průkazné (Z a d i n a , K u l c o v á , 1974).

Rovněž v našich pokusech umožňoval habitus rostliny zřetelné rozlišení dihaploidů od zdvojených tetraploidních klonů. Správnost tohoto rozdělení byla u 40 namátkou vybraných klonů DH 169 potvrzena i cytologickým stanovením počtu chromozómů v kořenových špičkách. Problematické však zůstává použití listového indexu pro klasifikaci klonů u genotypů se subvitalním růstem a pro jednoznačné určení triploidů (Š u b o v á , M i c h a l i d e s o v á , 1990).

Metoda stanovení ploidie podle počtu chloroplastů ve svěracích buňkách průduchů je nejspolehlivější pro vyčlenění tetraploidních genotypů v potomstvech semenáčů s různou úrovní ploidie (Z a d i n a , H o r á č k o v á , 1977; Š u b o v á , M i c h a l i d e s o v á , 1990). Konvencí vymezená dolní hranice 20 chloroplastů je zde stanovena poměrně přesně a pouze nezvykle vysoký počet chloroplastů (nad 35 ve svěracích buňkách průduchu) může signalizovat výskyt raritních genotypů s hexa- až oktoploidní úrovní ploidie (F r a n d s e n , 1967; S r e e - R a m u l u et al., 1983; K o s t ř i c a , 1991).

Pro určení dihaploidních genotypů je však tato metoda již méně spolehlivá. W e r n e r (1970) nacházel ve svěracích buňkách diploidů devět až 19 chloroplastů, Š u b o v á , M i c h a l i d e s o v á (1990) popisují 16 cytologicky prověřených dihaploidních genotypů, z nichž u 12 byla stanovena průměrná hodnota nad 15 chloroplastů. Podobných výsledků dosáhli rovněž Z a d i n a , K u l c o v á (1970) a Z a d i n a et al. (1975) pro některé plané diploidní druhy rodu *Solanum* i dihaploidy odrůdy Apta.

Na základě uvedených poznatků lze v těchto případech předpokládat buď výskyt cytochimér majících vrstvu L3 diploidní a triploidní vrstvu L1, nebo je horní hranice 15 chloroplastů pro vymezení kategorie diploidů nízká. Nelze rovněž vyloučit určitou souvislost mezi počtem chloroplastů ve svěracích buňkách a vitalitou dihaploida. Pro tuto eventualitu svědčí naše výsledky při srovnání počtu chloroplastů u regenerantů subvitalního dihaploida DH 165 a vitalního DH 169 (obr. 1). Také Z a d i n a et al. (1975) pozorovali v několika případech průměrné počty chloroplastů vyšší než 15 u cytologicky definovaných vitálních dihaploidních genotypů zařazovaných podle habitu do kategorie dihaploid - triploid.

Přesnost nepřímé metody založené na stanovení počtu chloroplastů v prostředí *in vitro* poněkud komplikuje kolísající velikost fyziologicky nezcela funkčních průduchů, což má za následek i větší rozptyl hodnot

v počtech chloroplastů zjišťovaný v rámci téhož klonu. Námi *in vitro* pozorované vyšší absolutní hodnoty v počtech chloroplastů v rámci jednotlivých skupin ploidie potvrdili rovněž Schreiter et al. (1989), kteří doporučují využít uvedenou techniku především k předselekcí klonů zdvojených *in vitro*. Toto doporučení potvrzují i naše výsledky, neboť skupina tetraploidů určených *in vitro* obsahovala přes svou určitou různorodost vždy téměř všechny tetraploidy, stanovené oběma nepřímými technikami *in vivo*. Metoda *in vitro* bude proto zřejmě použitelná s dostatečnou přesností v první řadě k vyloučení většiny netetraploidních regenerantů, což umožní snížit objem dále vedeného materiálu o nežádoucí genotypy a zefektivnit tak navazující šlechtitelskou práci.

Literatura

FRANDSEN, N. O.: Chromosomenverdoppelung und chimärenbildung nach Colchicinbehandlung haploider Kartoffelsamen. Eur. Potato J., 10, 1967, s. 1-15.

FRČEK, J.: Nepřímá metoda pro stanovení fertility pylu odrůd bramboru *Solanum tuberosum* L. Genet. a Šlecht., 24, 1988, s. 85-86.

HERMSEN, J. G. Th. - BOER, J. A. E. De: The effect of colchicine treatment on *Solanum acaule* and *S. bulbocastanum*; a complete analysis of ploidy chimeras in *S. bulbocastanum*. Euphytica, 20, 1971, s. 171-180.

KOSTŘICA, P.: Využití somaklonální variability a indukované mutagenese *in vitro* ve šlechtění bramboru. [Kandidátská disertace.] Havlíčkův Brod, 1991. - Výzk. Úst. bramb.

KOSTŘICA, P. - ZÁŠKODOVÁ, J. - KRATOCHVÍLOVÁ, D.: Možnosti využití mitotické polyploidizace *in vitro* u dihaploidů bramboru. Rostl. Výr., 39, 1993, (v tisku).

MAGOON, M. L. - COOPER, D. C. - HOUGHAS, R. W.: Induced polyploids of *Solanum* and their crossability with *S. tuberosum*. Bot. Gaz., 119, 1958, s. 224-231.

ROSS, R. W. - DIONNE, L. A. - HOUGHAS, R. W.: Doubling the chromosome number of selected *Solanum* genotypes. Eur. Potato J., 10, 1967, s. 37-52.

SCHREITER, J. - MUZERT, B. - MOLL, A.: Bestimmung der Ploidiegrades durch Chloroplastenzählungen in Stomata bei *In-vitro*-Kallusregeneraten von Kartoffeln. Arch. Zücht.-Forsch., 19, 1989, s. 69-73.

SREE-RAMULU, K. - DIJKHUIS, P. - ROEST, S.: Phenotypic variation and ploidy level of plants regenerated from protoplasts of tetraploid potato (*Solanum tuberosum* L. cv. Bintje). Theor. appl. Genet., 65, 1983, s. 329-338.

ŠUBOVÁ, D. - MICHALIDESOVÁ, I.: Nepriame a priame metódy detekcie ploidity a ploidita v rôznych typoch hybridizácie u zemiakov. Genet. a Šlecht., 26, 1990, s. 63-70.

WERNER, E.: Haploidy ziemniaka i ich zastosowanie w hodowli. In: Ziemniak. Bonin. Inst. Ziemniaka 1970, s. 9-47.

ZADINA, J. - DOBIÁŠ, K. - HORÁČKOVÁ, V. - MIČÁNKOVÁ, D. - KUPKOVÁ, L.: Studium možnosti využití haploidů pro šlechtění bramborů. [Závěrečná zpráva.] Havlíčkův Brod, VÚB 1975.

ZADINA, J. - HORÁČKOVÁ, V.: Efektivnost detekce dihaploidů brambor nepřímými metodami. Věd. Práce Výzk. Šlecht. Úst. bramb. Havl. Brod, 6, 1977, s. 19-27.

ZADINA, J. - KULCOVÁ, N.: Počet chloroplastů ve vztahu k ploidii brambor a s ohledem na produkci haploidů. Rostl. Výr., 16, 1970, s. 677-682.

ZADINA, J. - KULCOVÁ, N.: Úroveň některých vlastností a znaků u dihaploidů brambor. Genet. a Šlecht., 10, 1974, s. 227-238.

Došlo 29.9.1992

KOSTŘICA, P. - DOMKÁŘOVÁ, J. (Potato Research Institute, Havlíčkův Brod):

Possibilities of indirect determination of the ploidy in potato regenerants *in vitro*.
Rostl. Výr., 39, 1993 (2): 139-148.

Dihaploids of potato (*Solanum tuberosum* L.) represent breeding-valuable materials enabling coping with inter-species uncrossability inside the genus *Solanum*, selection on diploid level of ploidy and subsequent derivation of initial genotypes with a high proportion of homozygosity of traits and properties. Engagement of dihaploids to the final stage of breeding, however, presupposes duplication of their genomes to tetraploid level which is very optimum in potatoes in view of viability.

Indirect methods of detection of ploidy are of high importance for fast differentiation of genotypes with different level of ploidy. A possibility to apply such a method *in vitro* is valuable for preliminary determination of ploidy in regenerants derived in tissue culture of dihaploids. Except results of orientation of the pioneer work (Schreier et al., 1989), there is a lack of detailed data in this aspect till now. The present article is aimed at finding the accuracy of indirect methods of ploidy detection by the number of chloroplasts contained in guard cells of stomata in plants *in vitro* and at estimating its usability for selection of duplicated tetraploid clones in sets of regenerants from primary calluses of initial dihaploid genotypes.

Three dihaploids kept in recovered form in the genebank of the Potato Research Institute at Havlíčkův Brod were selected for trials. From explanted calluses of leaf and stalk origins offshoots, which were recorded and propagated as independent clones according to the procedure as referred by Kostřica et al. (1993), were regenerated.

The level of ploidy of each clone was finding indirectly by determining the chloroplasts in guard cells of stomata in plant leaves *in vitro*. The same procedure was applied after planting of clones into a glasshouse and according to the habit of plants cultivated in field conditions (leaf index). To count chloroplasts from plants *in vivo* and *in vitro* were taken segments of the blades of the youngest fully developed leaves coloured with colouring mixture containing 1% iodine solution in 1% potassium iodide solution (Frček, 1988). To include a clone into the group with particular level of ploidy according to the number of chloroplasts a classification scheme as quoted in the introduction was used (Zadina, Horáček, 1977).

Sets of regenerants were classified into groups with diploid, triploid and tetraploid levels of ploidy on the basis of above-mentioned methods and the ranges of these groups classified by *in vitro* method were compared with those using *in vivo* method.

Tabs I and II show the relations between ploidy level determined on the basis of the habit and after the number of chloroplasts *in vitro*. Sets of regenerants of both assessed initial genotypes are marked for conspicuous congruency between both methods for detection of tetraploid clones (DH 160: 95.5 %; DH 169: 98.0 %). In dihaploid clones after their habit, the classification into all three ploidy categories was recorded in evaluating the ploidy in view of the number of chloroplasts *in vitro*. Congruency of both methods in determining dihaploid clones was achieved solely for 54.1 % (DH 160) and 33.0 % (DH 169).

A similar tendency can be observed in comparing the ploidy of regenerated clones with the method of determining the number of chloroplasts *in vivo* and *in vitro* (Tabs I, III). While in the group of tetraploids by the *in vitro* method, congruently 88.8 % (DH 160), 97.9 % (DH 165) and 98.0 % (DH 169) of clones were determined, dihaploids determined *in vivo* are almost identically distributed in the groups dihaploids and triploids set *in vitro*. Identical diagnosis of dihaploids was settled only in 52.4 % (DH 160), 34.3 % (DH 165) and 38.7 % (DH 169) of clones.

Some explanation of the reason of these relations follows from Fig. 1. Chloroplast counts found in guard cells of stomata *in vitro* for different levels of ploidy achieve usually higher absolute values in comparison with determination *in vivo*, in particular in clones derived from DH 165 and DH 169. This fact can result in classification of some count of dihaploid regenerants with an interval reserved for triploids by classification scheme, eventually mixing of some percentage of triploids with tetraploid clones. It can be said on the basis of this knowledge that upper limit of 15 chloroplasts is too low for limiting the category of dihaploids *in vitro*.

Presented indirect method of ploidy detection *in vitro* is therefore usable (with sufficient accuracy) to eliminate most non-tetraploid regenerants, thus enabling the reduction of the volume of further recorded material by undesired genotypes and to make more efficient the breeding work linked up with it.

Kontaktní adresa:

RNDr. Petr K o s t ě i c a , CSc., Výzkumný ústav bramborářský, 580 03 Havlíčkův Brod

IMUNOCHEMICKÉ STANOVENÍ DELTA-ENDOTOXINU *BACILLUS THURINGIENSIS*

D. Cikánek, M. Luhový, M. Navrátil

Výzkumný a šlechtitelský ústav zelinářský, Olomouc

V práci byly porovnány metody imunochemického stanovení delta-endotoxinu *Bacillus thuringiensis*, který je známý svými insekticidními účinky především na zástupce rodu *Lepidoptera*. Pomocí připravených králičích protilátek proti delta-endotoxinu *B. thuringiensis* je možno ELISA testem detekovat až 1 ng toxinu v 1 ml roztoku. ELISA testem s enzymovou amplifikací se dá detekovat méně než 0,1 ng.ml⁻¹. Dot-blot technikou na nitrocelulóзовé membráně bylo při kontaktním způsobu barvení dosaženo citlivosti 50 ng.ml⁻¹ a po úpravě vzorku spočívající v extrakci chlorofylu z rostlinného pletiva acetonem a následném přímém barvení membrány citlivosti 2 ng.ml⁻¹. Ověřované techniky se prokázaly jako dostatečně citlivé pro detekci delta-endotoxinu v pletivu rostlin transformovaných genem pro delta-endotoxin.

Insekticidní účinky delta-endotoxinu, produkovaného baktériemi *B. thuringiensis*, na hmyzí škůdce jsou více než 20 let využívány v zemědělství pro výrobu biopesticidů (např. Dipel, Biobit, Bathurin). Rozvoj metod molekulární biologie umožnil izolovat bakteriální gen pro delta-endotoxin a vnést ho do rostlinného genomu s cílem dosáhnout produkce toxinu v rostlinných pletivech a vyvolat tak rezistenci vůči hmyzím škůdcům (Barton et al., 1987; Vacek et al., 1987; Cheng et al., 1992).

Přítomnost cizího genu a jeho aktivní přepis v pokusných rostlinách lze sledovat na úrovni DNA, RNA nebo proteinu. Imunochemické metody detekce umožňují stanovit koncentraci delta-endotoxinu *B. thuringiensis* v rostlinných pletivech a provést předběžný screening velkého počtu potenciálně transgenních rostlin. Jeho zařazení před biologický test, který je zdlouhavý a náročný na množství rostlinného materiálu, snižuje počty biologicky testovaných jedinců a usnadňuje výběr transformovaných rostlin produkujících delta-endotoxin.

V tomto sdělení je popsáno využití technik dot-blot a ELISA testu s vysokou citlivostí pro stanovení delta-endotoxinu.

MATERIÁL A METODA

Jako antigen byl použit delta-endotoxin (směs protoxinů CryIA(a), CryIA(b) a CryIA(c)), izolovaný z *B. thuringiensis* ssp. *kurstaki* kmen HD1. Purifikovaný delta-endotoxin izolovaný podle metody, kterou uveřejnili Yan, McCarty (1991), poskytl Dr. M. Geiser (Ciba-Geigy, Švýcarsko).

Antiséra byla připravena imunizací králíků šesti podkožními injekcemi ve dvoutýdenních intervalech. První imunizace byla provedena s kompletním Freundovým adjuvans, zbývající imunizace s nekompletním Freundovým adjuvans. Dávka antigenu na jednu imunizaci králíka byla 1 mg delta-endotoxinu. Krev byla odebrána 7 dní po poslední imunizaci. Imunoglobuliny byly izolovány na DEAE Affi-Gel Blue (Bio-Rad). Konjugace protilátek s alkalickou fosfatázou byla provedena jednostupňovou glutaraldehydovou metodou (Mat, 1980).

Imunoenzymatické stanovení delta-endotoxinu bylo prováděno ELISA testem podle Clarka, Adamsa (1977). Reakce probíhaly na mikrotitračních destičkách Biogen (ÚMG ČSAV Praha) ve 100 µl reakčních objemech. Reakce byla zastavena po 1 h inkubace při pokojové teplotě 50 µl 3 mol.l⁻¹ roztoku KOH. Jako standard byl používán roztok delta-endotoxinu v pufru CB (0,1 mol.l⁻¹ Na₂CO₃/NaHCO₃, pH = 9,6). Ředění delta-endotoxinu pro stanovení kalibračních křivek a citlivosti bylo prováděno v ELISA konjugačním pufru v rozmezí od 1 µg.ml⁻¹ do 0,02 ng.ml⁻¹. Zároveň byla kontrolována nespecifická reakce s dvakrát ředěnou šťávou rostlin *Nicotiana tabacum* L. cv. Samsun, *Brassica oleracea* L. cv. Zora a *Brassica napus* L. cv. Westar PBS pufrem (10 mmol.l⁻¹ Na₂HPO₄/KH₂PO₄, 140 mmol.l⁻¹ NaCl, pH = 7,4). Vzhledem k tomu, že nebyly k dispozici transgenní rostliny produkující delta-endotoxin, byly nahrazeny rostlinnými vzorky s přidavkem purifikovaného delta-endotoxinu v celém rozsahu sledovaných koncentrací kalibrační křivky. Delta-endotoxin byl přidáván k listovému pletivu před homogenizací s ELISA extrakčním pufrem (1 : 2) v třecích miskách. Připravené vzorky byly odstředěny (10 min, 10 000 g).

Pro amplifikační koncovku ELISA testu (ELISA + EA) byl používán enzymový systém alkohol dehydrogenáza - lipoamid dehydrogenáza, pracující v prostředí NADP (beta-nikotinamid-adenin dinukleotid fosfát) a INT (p-iodonitrotetrazolium violet) (Heuvel, Peters, 1989). Výsledný objem reakční směsi byl 165 µl a reakce byla zastavena po 15 min inkubace při pokojové teplotě 30 µl 3 mol.l⁻¹ H₂SO₄.

Nosičem pro dot-blot (Tijssen, 1985) byla nitrocelulóza (Serva). Čistý delta-endotoxin byl rozpuštěn v CB pufru s přidavkem hovězího sérového

albuminu (BSA) $0,1 \text{ mg.ml}^{-1}$. Roztoky v koncentračním rozsahu 1 mg.ml^{-1} až 1 ng.ml^{-1} byly připraveny ředěním zásobního roztoku delta-endotoxinu uhlíčitavým CB pufrům s BSA.

Vzorky z listů řepky (*B. napus* L. cv. Westar) a tabáku (*N. tabacum* L. cv. Samsun) byly připraveny dvěma způsoby. V obou případech byla produkce delta-endotoxinu nahrazena přidávkou delta-endotoxinu k rostlinnému pletivu před zpracováním vzorků. Pro kontaktní vybarvování dot-blotů byly listy rozetřeny v třecí misce s dvojnásobným množstvím CB pufru. Homogenát byl po 10 min třepání odstředěn (15 min, 10 000 g). Vzorky se připravovaly při 4°C . Supernatanty byly nanášeny v množství $1 \mu\text{l}$ na nitrocelulózovou membránu a vysušeny při pokojové teplotě. Membrána byla vysycena v PBS pufru s přidávkou 1% odtučněného sušeného mléka. Blokovací roztok byl po 1 h třepání vyměněn za roztok konjugátu ředěného 1000krát v blokovacím roztoku. Po 1 h třepání byla membrána promyta třikrát po 5 min v 0,05% roztoku Tweenu 20. Poté byla ponechána 5 min v $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ Tris/HCl pufru $\text{pH} = 9,6$ a pokryta nitrocelulózovou membránou obsahující substrátový pufr s NBT (4-nitro blue tetrazolium chlorid) a X-P (5-bromo-4-chloro-3-indolyl fosfát, dvojsodná sůl) připravený podle katalogu firmy B o e h r i n g e r (1991). Vybarvení bylo hodnoceno po 1 h inkubace při 37°C . Reakce byla zastavena roztokem 10 mmol.l^{-1} EDTA (kyselina ethylendiamin tetraoctová, dvojsodná sůl).

Pro přímé barvení dot-blotů byly vzorky zmrazeny, rozetřeny v acetonu při -20°C v poměru 1 : 10, 10 min třepány a odstředěny (15 min, 10 000 g). Extrakce sedimentu acetonem se ještě dvakrát opakovala. Zbytky acetonu byly ze vzorku vakuově odpařeny. Vzorky byly extrahovány pufrům CB a dále zpracovány výše uvedeným postupem. Dot-bloty byly barveny přímo a vizuálně hodnoceny po 1 a 6 h inkubace.

Jako kontrola byly zařazeny rostlinné vzorky bez přidávky delta-endotoxinu.

VÝSLEDKY A DISKUSE

Koncentrace delta-endotoxinu v transgenních rostlinách se pohybuje v rozmezí 0,02 až 0,0001 % celkových rozpustných proteinů (V a e c k et al., 1987), resp. 0,5 až 0,001 % celkových rozpustných proteinů (F u c h s et al., 1990). Při našem extrakčním postupu (1 díl listového pletiva : 2 díly pufru) to odpovídá $25 \mu\text{g.ml}^{-1}$ až 5 ng.ml^{-1} . Práce byla soustředěna na vývoj imunochemické detekční techniky umožňující spolehlivě stanovit méně než 50 ng.ml^{-1} delta-endotoxinu.

Delta-endotoxin se projevil jako dobrý imunogen. Připravené protilátky byly hodnoceny pro použití v ELISA testu. Pro aktivaci ELISA destiček byla optimální koncentrace 1 až 2 μg imunoglobulinu (IgG) v 1 ml ELISA potahovacího pufru. Připravený konjugát bylo možno použít v ředění 125 až 1000krát, kdy pozadí reakce nepřevyšovalo po 1 h barvení hodnotu absorbance 0,05 a detekční limit delta-endotoxinu byl nižší než 50 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$.

ELISA testem bylo možné detekovat čistý delta-endotoxin ředěný v ELISA extrakčním pufru do koncentrace 1 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ při ředění konjugátu 125krát a koncentraci vazebných protilátek 1 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Při ředění konjugátu 500krát byl detekční limit 5 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$. Ředění delta-endotoxinu ve šťávě z rostlin tabáku i řepky ovlivnilo detekční limit maximálně o jeden krok zředovací řady, tj. na 2 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$, resp. na 10 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$. F u c h s et al. (1990) uvádějí citlivost ELISA testu přibližně 5 ng toxinu/mg rostlinné bílkoviny. V a e c k et al. (1987) dosáhli ELISA testem citlivosti 0,1 až 1 ng delta-endotoxinu v 1 ml vzorku. Použili přitom směs čtyř monoklonálních protilátek, specifických k oblasti mezi 29. až 222. aminokyselinou z N-konce proteinu.

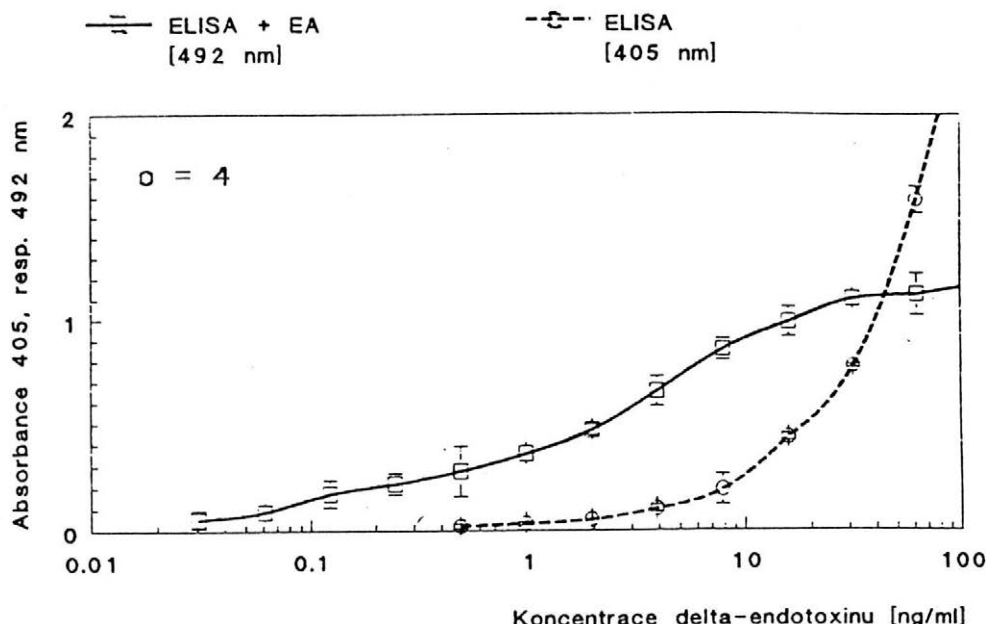
Snížení detekčního limitu stanovení pod 0,1 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ bylo dosaženo amplifikační enzymovou reakcí ELISA testu, jak je dobře patrné z obr. 1.

Výsledky enzymoimunoanalytických stanovení prokázaly vysokou specifčnost připravených protilátek vůči delta-endotoxinu, bez křížové reakce se šťávou *N. tabacum* L. cv. Samsun, *B. oleracea* L. cv. Zora a *B. napus* L. cv. Westar.

Metodou dot-blot bylo možné stanovit purifikovaný delta-endotoxin do koncentrace 2 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$. Při použití rostlinných vzorků s obsahem chlorofylu zabarvení pozadí znemožňovalo hodnocení výsledků v rozsahu potřebných koncentrací 0,5 až 0,001 % rozpustných proteinů. Kontaktní technika barvení zcela vyloučila negativní vliv chlorofylu ve vzorcích a umožnila tak detekovat delta-endotoxin do koncentrace 50 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ (tj. 0,001 % rozpustných proteinů). Prodlužování inkubace nad 1 h však již nezvýšilo citlivost reakce. Zvýšení citlivosti reakce bylo dosaženo opakovanou acetonovou extrakcí chlorofylu ze vzorků při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po 1 h barvení byla citlivost reakce srovnatelná s kontaktní technikou. Barvotvorná reakce se však dala prodloužit až na 6 h, přičemž se dosáhlo citlivosti 2 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ (0,00004 % rozpustných proteinů).

Další zvýšení citlivosti dot-blot techniky umožňuje vakuové dot-blot zařízení (Bio-Rad), kde lze na jedno stanovení použít až 500 μl vzorku místo 1 μl v našem uspořádání.

Citlivost kvantitativního stanovení delta-endotoxinu *B. thuringiensis* ve šťávě *N. tabacum* dosažené různými imunochemickými metodami včetně porovnání s citlivostí biologického testu jsou přehledně uspořádány v tab. I.



1. Stanovení delta-endotoxinu ELISA testem; závislost absorbance na koncentraci čistého delta-endotoxinu ředěného ve šťávě z rostlin *N. tabacum* (hodnota absorbance šťávy *N. tabacum* pro ELISA + EA: $x = 0,070$, $sx = 0,012$; pro ELISA: $x = 0,024$, $sx = 0,010$; hodnoty absorbance byly měřeny proti blanku - extrakční pufr) - ELISA determination of delta-endotoxin; dependence of absorbance on concentration of pure delta-endotoxin diluted in tobacco plant sap (absorbance value of *N. tabacum* sap for ELISA + EA: $x = 0,070$, $sx = 0,012$; for ELISA: $x = 0,024$, $sx = 0,010$; absorbance values assessed against blank - extraction buffer)

x : průměr - mean

sx : směrodatná odchylka - standard deviation

Vzhledem ke koncentraci delta-endotoxinu v transgenních rostlinách (0,5 až 0,0001 % rozpustných proteinů) jsou všechny testované metody potenciálně vhodné pro výběr aktivně přepisujících transgenních rostlin.

I přesto, že nebylo možné uvedené metody ověřit na transgenních rostlinách, lze předpokládat že připravené polyklonální protilátky budou zachycovat také modifikované biologicky aktivní molekuly delta-endotoxinu produkované transgenními rostlinami.

Z praktického hlediska je pro primární screening transformovaných rostlin vhodnější dot-blot technika, protože pro stanovení je třeba jen cca 20 mg rostlinného pletiva, což je snáze dosažitelné než odběr 100 mg nutný pro ELISA test. Nevýhodou je ovšem vyšší pracnost a cena dot-blot testu.

I. Citlivost kvantitativního stanovení delta-endotoxinu dosažená různými postupy - Sensitivity of delta-endotoxin quantitative determination carried out by different methods

Metoda ¹	Detekční limit ² [ng.ml ⁻¹]
ELISA	1 - 5
ELISA + EA ³	< 0,1
Dot-blot:	
kontaktní barvení ⁴	50
přímé barvení ⁵ (1 h)	50
přímé barvení ⁵ (6 h)	2
Biologický test ⁶ :	
<i>Manduca sexta</i> (V a e c k et al., 1987)	100
<i>Manduca sexta</i> (F u c h s t et al., 1990)	< 1 ng toxinu na mg rostlinné bílkoviny ⁷

¹method, ²detection limit, ³enzyme amplification, ⁴sandwich (contact) staining, ⁵direct staining, ⁶biological test, ⁷toxin per mg of plant protein

Literatura

BARTON, K. A. - WHITELEY, H. R. - YANG, N. S.: *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin expressed in transgenic *Nicotiana tabacum* provides resistance to lepidopteran insect. *Pl. Physiol.*, 85, 1987, s. 1103-1109.

BOEHRINGER MANNHEIM, Molecular biology: Biochemicals for molecular biology, 1991, s. 114.

CLARK, M. F. - ADAMS, A. N.: Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.*, 34, 1977, s. 475-483.

FUCHS, R. L. - MACINTOSH, S. C. - DEAN, D. A. - GREENPLATE, J. T. - PERLAK, F. J. - PERSHING, J. C. - MARRONE, P. G. - FISCHHOFF, D. A.: Quantification of *Bacillus thuringiensis* insect control protein as expressed in transgenic plants. In: HICKLE, L. A. - FITCH, W. L. (eds): *Analytical chemistry of Bacillus thuringiensis*. ACS Symp. Ser. 432, Amer. Chem. Soc., Washington, DC 1990, s. 105-113.

CHENG, J. - BOLYARD, M. G. - SAXENA, R. C. - STICKLEN, M. B.: Production of insect resistant potato by genetic transformation with a delta-endotoxin gene from *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. *Pl. Sci.*, 81, 1992, s. 83-91.

MAAT, D. Z.: Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Res. Inst. Pl. Protect.*, Wageningen, Netherlands, 1980, 14 s.

TIJSSSEN, P.: Practice and theory of enzyme immunoassays. In: BURTON, R. H. - KNIPPENBERG, P. H. van (eds): *Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology*, Amsterdam, Elsevier, 15, 1985, s. 314-318.

VAECK, M. - REYNERTS, A. - HOFTE, H. - JANSSENS, S. - BEUCKELEER, M. de - DEAN, C. - ZABEAU, M. - MONTAGU, M. van - LEEMANS, J.: Transgenic plants protected from insect attack. *Nature*, 328, 1987, s. 33-37.

HEUVEL, J. F. J. M. van den - PETERS, D.: Improved detection of potato leafroll virus in plant material and in aphids. *Phytopathology*, 79, 1989, s. 963-967.

YAN, X. - MCCARTHY, W. J.: Chemical modification of *Bacillus thuringiensis* subsp. *thuringiensis* (HD-524) trypsin-activated endotoxin: Implication of tyrosine residues in lepidopteran cell lysis. *J. Invertebr. Path.*, 57, 1991, s. 101-108.

Došlo 8. 10. 1992

CIKÁNEK, D. - LUHOVÝ, M. - NAVRÁTIL, M. (Research Institute of Vegetable Growing and Breeding, Olomouc):

Immunochemical determination of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin.

Rostl. Výr., 39, 1993 (2): 149-156.

Immunochemical methods enable to determine *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin concentration and to carry out a pre-screening of great numbers of potentially transgenic plants. Its position before the biological test decreases the numbers of biologically tested specimens and facilitates the selection of delta-endotoxin producing transformed plants.

The present paper gives the results of immunochemical determination of delta-endotoxin in a pure form and in the leaf tissue of *Nicotiana tabacum* and *Brassica* sp.

For antisera preparation rabbits were immunized by delta-endotoxin (a mixture of protoxins CryIA[a], CryIA[b], CryIA[c]) provided by Dr. M. Geiser (Ciba-Geigy AG, Switzerland), isolated from *Bacillus thuringiensis* ssp. *kurstaki*, strain HD1.

Delta-endotoxin was assessed by means of ELISA, ELISA with enzyme reaction amplification and a dot-blot method.

ELISA test (Clark, Adams, 1977) potentiated to detect pure delta-endotoxin diluted in ELISA-extraction buffer up to the concentration of 1 ng.ml^{-1} , i.e. 0.00002% soluble proteins at 125-fold conjugate dilution and binding antibodies concentration $1 \text{ } \mu\text{g.ml}^{-1}$. At 500-fold conjugate dilution the detection limit was 5 ng.ml^{-1} . Dilution of delta-endotoxin in tobacco and rape plant sap shifted the detection limit at the most by one step of the dilution range, i.e. up to 2 ng.ml^{-1} and 10 ng.ml^{-1} , resp. Further increase in sensitivity of the reaction (below 0.1 ng.ml^{-1} ; Fig. 1) was achieved by ELISA test with enzyme reaction amplification (Heuvel, Peters, 1989).

The dot-blot method (Tijssen, 1985) enabled to detect pure delta-endotoxin diluted in carbonate buffer CB (0.1 mol.l^{-1} , pH = 9.6) up to the concentration of 2 ng.ml^{-1} , i.e. 0.00004% soluble proteins. The presence of delta-endotoxin in tobacco and rape plant tissues was simulated by the addition of pure delta-endotoxin before sample preparation. Plant samples were extracted by means of carbonate buffer CB supplemented with BSA (0.1 mg.ml^{-1}).

Sample discolouration with chlorophyll and its bond to nitrocellulose hampered to determine delta-endotoxin by means of dot-blot. This obstacle can be overcome by modification of the colour-generating enzyme reaction procedure. The second nitrocellulose membrane soaked with colouring solution is firmly fixed to the original

dot-blot one. The generating dye gives rise to a colour reprint (copy) of the initial dot-blot membrane but without the colour chlorophyll background. The sensitivity of this contact method is equal to 50 ng delta-endotoxin per 1 ml sample, i.e. 0.001% soluble proteins.

For direct colouring the nitrocellulose membrane it is inevitable to remove chlorophyll by means of acetone at -20 °C before carbonate buffer CB extraction which will enable to detect reliably up to 2 ng delta-endotoxin per 1 ml sample, i.e. 0.00004% soluble proteins (tab. I).

Delta-endotoxin concentration in transgenic plants is ranging between 0.02 and 0.0001% soluble proteins (V a e c k et al., 1987), and between 0.5 and 0.001 % soluble proteins (F u c h s et al., 1990), resp. In view of the delta-endotoxin detection limits in plant tissues all the methods under study were found feasible for screening large numbers of potentially transgenic plants preceding more sophisticated biological procedures.

Kontaktní adresa:

Ing. Daniel C i k á n e k , CSc., Výzkumný a šlechtitelský ústav zelinářský, 772 36 Olomouc

SYMBIOTIC TRAITS, GROWTH, AND CLASSIFICATION OF PEA NODULATION MUTANTS*

K. Novák, V. Škrdleta, M. Němcová, L. Lisá

*Laboratory of Biological Nitrogen Fixation, Institute of Microbiology,
Academy of Sciences of the Czech Republic, Praha*

Forty-five pea (*Pisum sativum* L.) symbiotic mutants derived from cv. Finale were characterized using ten symbiotic and growth traits. Twenty-seven nodule-forming mutants were subdivided into fifteen clusters, using seven traits: nodule number, nodule dry mass, total nitrogenase activity, top dry mass, nodulation index, single nodule dry mass, and nitrogen content in shoots. Conditional expression of nodulation and fixation traits was observed in some lines. Four mutants, which were originally described as Nod⁺, were able to nodulate and fix dinitrogen under the given experimental conditions, and two other mutants, non-fixing according to the original description, were indistinguishable from the wild type plants. Based on a high nodule number, as well as low sensitivity of nodulation and C₂H₂ reduction to high nitrate level, mutant RisfixC was identified as a new supernodulating mutant of pea.

Plants from the family *Viciaceae* (legumes) form symbiotic nodules with bacteria from the genera *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, allowing the host plant to utilize dinitrogen via bacteria mediated fixation. In the nodule of the indeterminate type, as exemplified in pea (*Pisum sativum* L.), at least eight developmental stages were distinguished (cf., e.g., Vincent, 1980; Nap, Bisseling, 1990). Nodule development can be arrested at any stage by physiological or genetic reasons, e.g. by a bacterial mutation (Long, 1989). The approach using plant symbiotic mutants may be considered as equivalent because plants as well as bacterial mutations are supposed to interfere with the nodule development at similar, if not identical, stages (Kneen et al., 1990). Consequently, most of the plant nodulation mutants can be ascribed to the known bacterial blocks and *vice versa*. Plants forming aberrant nodules induced with mutant bacteria can be treated as phenocopies

*A part of this paper was presented as a poster at the 5th International Symposium on the Molecular Genetics of Plant - Microbe Interactions, 9 - 15 September, 1990, Interlaken, Switzerland (communication P392).

of the proper nodulation mutants of the host plant provided that the block occurs at the same stage.

Wider exploitation of plant nodulation mutants has been restricted till now (Vance et al., 1988), partly by the limited number of the symbiotic mutant lines available. It is particularly true for non-fixing, but still nodulating (Nod^+Fix^-) mutants, in contrast to nodulation mutants in the strict sense (Nod^-). In pea, the only non-fixing mutants that were described in detail are FN_1 from cv. Rondo (Postma et al., 1987; Postma et al., 1990) and sym_{13} from cv. Sparkle. Additional 10 Fix^- mutants were obtained by Duc, Messager (1989) in cv. Frisson. The largest set of nodulation mutants of pea is the collection obtained in Risø National Laboratory (Engvild, 1987), which includes over twenty mutants described as Nod^+Fix^- . Exact phenotypic classification of nodulation mutants, especially mutants from the apparently artificial class Nod^+Fix^- , is a necessary precondition of their further exploitation for the genetic analysis of symbiosis and nodule development. In this paper, we provide the basic description of these mutants, and we report on an effort to group this set into phenotypic classes according to nodulation phenotype, symbiotic performance, and growth.

MATERIALS AND METHODS

Plants

The studied plant genotypes originate from a set of nodulation and fixation mutants of pea (*Pisum sativum* L.) that were obtained by means of chemical mutagenesis from cv. Finale (Engvild, 1987). Non-nodulating lines according to the original description are denoted Risnod1 - Risnod31. Risnod11, -13, -16, -18, and Risnod24 were not included in this study. The lines that were originally described as nodulating, but with impaired dinitrogen fixation, are denoted RisfixA - RisfixV. RisfixG and RisfixR were not included, and RisfixJ does not exist (Engvild, 1987; Engvild, personal communication).

Plant inoculation and cultivation

Surface sterilized seeds, pre-selected with 10% tolerance in mass, were germinated for three days at 28 °C. Seedlings were inoculated with 4 mL of soil extract (1:10, w/v, sterile distilled water/air dried soil), and cultivated in perlite irrigated with nutrient solution under the standard growth conditions

(Škrdl et al., 1980; Škrdl et al., 1991). The agriculturally exploited brown soil from Kunratice (a locality near Prague, Czech Republic), originating from a plot where pea was cultivated in the preceding season, was used as inoculum. Nutrient solution was changed twice a week. The used levels of nitrogen were 0.625 and 10 mmol $\text{NO}_3^- \text{L}^{-1}$. The composition of low and high N solutions was as described (Škrdl et al., 1980), except for the decreased concentration of KH_2PO_4 in low N solution (0.29 mmol L^{-1}). pH was adjusted to 6.7.

Plant evaluation

Plants were harvested six (on low N solution) or seven (on high N solution) weeks after germination, at the stage of early flowering. Each plant was evaluated for nitrogenase activity, nodule appearance, nodule number, dry mass of shoots, roots and nodules, and nitrogen content in shoots and nodules, using standard techniques. Nitrogenase activity was determined as the acetylene-reducing activity of excised root systems (Škrdl et al., 1987). The nitrogen content in dried and homogenized plant tissues was determined with a CHN analyzer (LECO Co.) by the automated Dumas method.

Statistics and cluster analysis

Three plants were evaluated in each line. The significance of differences was determined for each trait using multiple range test analysis with 95% Tukey HSD intervals. Cluster analysis was performed on the mean values of quantitative traits. Before the distances were computed, the data were standardized by subtracting the mean of each variable and dividing the obtained values by the standard deviation of the mean.

RESULTS AND DISCUSSION

Forty five independently obtained nodulation mutants of pea were characterized and classified using symbiotic and growth traits. The most important directly measured or derived characteristics of the mutant plants are included in Tab. I.

Nodule formation in mutant lines

Those mutants which are included individually in Tab. I exhibited nodule formation under the given experimental conditions. Nodules were formed in

I. Symbiotic and growth traits in pea nodulation mutants cultivated at a low nitrogen level ($0.625 \text{ mmol NO}_3^- \text{ L}^{-1}$); the means not indexed with the same letter are significantly different at 95% Tukey HSD intervals; ND - not determined

Pea line ^A	Nodule colour ^E	Nodule number ^C (plant ⁻¹)	Nodule DM (mg.plant ⁻¹)	Single nodule DM (mg.nodule ⁻¹)	Top DM (g.plant ⁻¹)	Nodulation index ^D	TNA ($\mu\text{mole h}^{-1}$ root ⁻¹)	SNA ($\mu\text{mole}^{-1} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ nodule DM)	N content of nodules (% of DM)	N content of shoots (% of DM)	N yield in shoots (mg.plant ⁻¹)
Nod ^B	-	0	-	-	0.51	-	-	-	-	1.5	7.6
9	white	8 ^{a-e}	0.3 ^a	0.04 ^{a-g}	0.43 ^a	0.1 ^a	0 ^a	0 ^a	ND	1.7	7.2
F	white	8 ^{a-e}	0.4 ^a	0.04 ^{a-g}	0.43 ^a	0.1 ^a	0 ^a	0 ^a	ND	1.5	6.1
26	white	9 ^{a-e}	0.8 ^a	0.09 ^{a-g}	0.56 ^a	0.1 ^a	0 ^a	0 ^a	ND	1.5	8.4
A	white	11 ^{a-e}	0.4 ^a	0.02 ^{a-f}	0.49 ^a	0.1 ^a	0 ^a	0 ^a	ND	1.6	7.8
4	pink	47 ^{a,c,e,f}	73.7 ^{d-f}	1.68 ^{l-n}	0.82 ^{a,b}	9.3 ^{d,e}	9.4 ^{a-f}	122 ^{f-i}	7.4	4.4	36.0
E	pink	112 ^{f,g}	79.5 ^{d-g}	0.71 ^{i-k}	0.80 ^{a,b}	10.1 ^{d-g}	7.3 ^{a-e}	92 ^{c-g}	7.1	4.7	37.5
29	pink	123 ^{f,g}	295.7 ^l	2.54 ⁿ	2.91 ^e	10.3 ^{d-g}	27.6 ^{g-i}	94 ^{d-g}	6.3	4.2	122.3
Finale	pink	139 ^{g,f}	241.3 ^{k,l}	1.81 ^{m,n}	2.60 ^{d,e}	9.4 ^{d-f}	29.5 ⁱ	125 ^{g-j}	6.7	4.1	104.5
P	pink	147 ^{f-i}	185.3 ^{h-l}	1.25 ^{k-m}	2.30 ^{c-e}	8.1 ^{c,d}	30.3 ^{h,i}	164 ^k	6.9	4.1	94.1
15	pink	155 ^{f-i}	209.7 ^{h-l}	1.34 ^{k-m}	2.23 ^{c-e}	9.6 ^{d-g}	18.7 ^{e-h}	88 ^{c-f}	6.7	4.2	93.5
S	pink	166 ^{g-j}	157.7 ^{g-k}	0.96 ^{j-l}	1.82 ^{b-e}	8.6 ^d	23.4 ^{g-i}	146 ^{h-k}	6.9	4.6	83.9
5	green	177 ^{g-k}	117.7 ^f	0.49 ^{h-j}	1.01 ^{a,b}	11.2 ^{d-i}	18.8 ^{e-h}	159 ^{l,k}	6.4	3.8	40.1
I	pink	193 ^{g-k}	112.5 ^{c-i}	0.58 ^{h-k}	0.70 ^{a,b}	16.1 ^{j-l}	5.0 ^{a,b}	45 ^{a-c}	4.6	2.4	16.9
31	pink	205 ^{g-k}	184.3 ^{h-l}	0.90 ^{j-k}	1.65 ^{b,c}	11.0 ^{d-i}	20.6 ^{f-i}	114 ^{e-h}	6.7	4.3	70.8

17	brown	232 ^{g-k}	9.3 ^{a,b}	0.04 ^{a-g}	0.53 ^a	1.9 ^{a,b}	0 ^a	0 ^a	ND	1.4	7.4
D	pink > green	250 ^{g-k}	4.7 ^{b-d}	0.17 ^{b,d,f-h}	0.27 ^a	14.8 ^{i-k}	1.2 ^a	29 ^{a,b}	5.2	2.6	7.1
B	pink > green	273 ^{g,i-l}	69.7 ^{d-f}	0.27 ^{g-i}	0.53 ^a	12.8 ^{e,g-j}	5.1 ^{a-c}	67 ^{b-d}	6.3	3.4	18.2
L	white	308 ^{i-l}	56.0 ^{c-f}	0.18 ^{b,d,f-h}	0.49 ^a	11.5 ^{d-i}	0 ^a	0 ^a	3.6	1.5	7.4
O	white	326 ^{j-l}	47.7 ^{c-e}	0.15 ^{a-h}	0.38 ^a	12.7 ^{e,g-j}	0 ^a	0 ^a	3.5	1.4	5.3
N	brown	335 ^{j-l}	15.0 ^{a-c}	0.10 ^{a-g}	0.34 ^a	4.4 ^{b,c}	0.3 ^a	18 ^a	4.4	1.7	5.8
K	brown	370 ^{k-m}	55.0 ^{c-f}	0.15 ^{a-h}	0.31 ^a	18.3 ^{k,m}	1.3 ^a	22 ^a	5.0	2.3	7.1
H	brown	374 ^{k-m}	50.0 ^{c-e}	0.16 ^{b,d,f-h}	0.47 ^a	10.7 ^{d-h}	0 ^a	0 ^a	3.6	1.5	7.1
Q	pink > green	379 ^{k-m}	69.0 ^{d-f}	0.18 ^{b,d,f-h}	0.48 ^a	14.8 ^{i-k}	1.5 ^a	21 ^a	4.7	1.6	7.6
3	white or pink > brown	478 ^{l,m}	69.0 ^{d-f}	0.14 ^{a-h}	0.46 ^a	14.5 ^{h-k}	5.9 ^{a-d}	78 ^{c-e}	5.1	2.2	10.2
T	green	479 ^{l,m}	82.0 ^{d-g}	0.18 ^{b,d,f-h}	0.52 ^a	15.9 ^{j-l}	0 ^a	0 ^a	3.5	1.2	6.2
M	pink > green	598 ^{m,n}	90.3 ^{d-g}	0.15 ^{b,d,f-h}	0.50 ^a	18.3 ^{k-m}	0 ^a	0 ^a	3.4	1.3	6.5
C	pink	806 ⁿ	215.3 ^{i,k,l}	0.27 ^{g-i}	1.12 ^{a,b}	19.7 ^{l,m}	16.9 ^{b,d-g}	79 ^{c-e}	7.4	6.6	73.8
V	greenish	1224 ^o	110.7 ^{e-h}	0.09 ^{a-g}	0.55 ^a	20.7 ^m	2.7 ^a	22 ^a	4.2	2.0	10.9

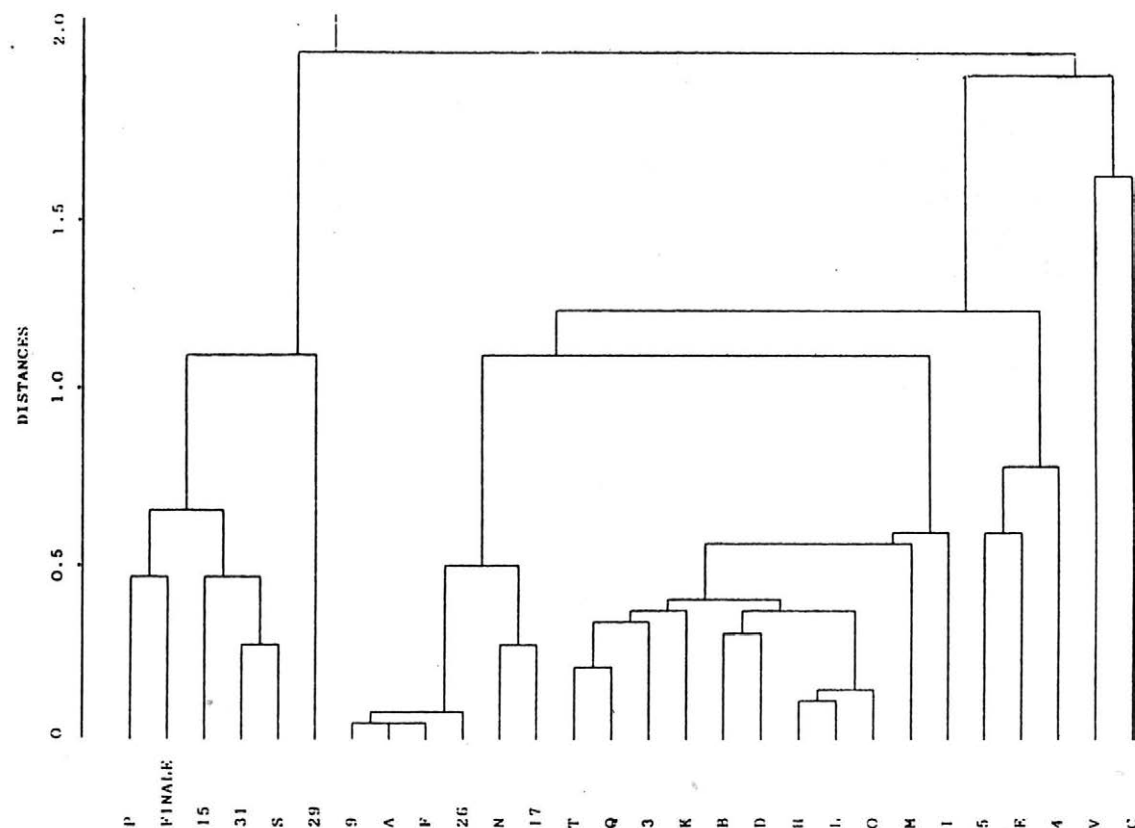
^APea lines are denoted with the appropriate number (Risnod lines) or letter (Risfix lines); ^BNod- line contains mean values for non-nodulating mutants; All Nod- mutants were statistically indistinguishable from one another; ^CMutants are arranged according to nodule number; ^DNodulation index was calculated as [nodule DM/top DM x 100]; ^E>Denotes change of colour

all mutants that were originally described as Nod⁺ (E n g v i l d , 1987), as well as in several mutants that were originally denoted Nod⁻, namely mutants Risnod3, -4, -5, -15, -17, -26, -29, and Risnod31. Risnod15, -29, and Risnod31 were even indistinguishable from the wild type by their nodule number and dry mass accumulation, and Risnod29 and Risnod31 did not differ significantly neither by total (TNA) nor by specific (SNA) nitrogenase activity (Tab. I). The observed discrepancy might be ascribed to the increased sensitivity of nodulation to the external nitrate taking into account that the original verification of the symbiotic Nod⁻ phenotype in M₃ plants was carried out in a commercial potting mixture, without specification of the N content (E n g v i l d , 1987). Another probable reason for the conditional nodulation might be a wider spectrum of rhizobia in the used inoculum in comparison to the strain mixture used for the nodulation mutant isolation. The cases of host specificity were described in several legume species (e.g. D e v i n e , 1988; W e i n m a n et al., 1991). In pea, the strain-specific nodulation resistance has been described for the cultivars originating from Middle East and Central Asia (L i e , 1978; Y o u n g , M a t t h e w s , 1982; K n e e n , L a - R u e , 1984) and Southern Turkey (L i e et al., 1987). The unstable nodulation of the studied mutants resembles the behaviour of these cultivars, the more so because a possibility to break through the nodulation resistance by European indigenous populations of rhizobia was shown for Afghanistan pea (J e n s e n et al., 1986).

The assumed mechanisms of Nod⁻ phenotype instability merit further experimental verification. Unfortunately, the original *Rhizobium* strain mixture was not further specified (E n g v i l d , 1987). In contrast, no conditional expression of Nod⁻ phenotype was detected in the set of pea mutants obtained from cv. Frisson (D u c , M e s s a g e r , 1989).

Classification of non-fixing lines

The variability of nodule colour, which reflects the presence and state of leghemoglobin (V a n c e et al., 1988), indicates that the developmental block occurs at different stages in different lines (Tab. I). The nodule development blocks are also reflected by lower nodule size in most of mutants (Tab. I). As the classification of mutants according to the individual traits does not provide a clear survey, the data were processed by means of cluster analysis (Fig. 1), using seven quantitative traits: number of nodules, total dry mass of nodules, single nodule dry mass, shoot dry mass, nodulation index, TNA, and nitrogen content in shoots. The pattern of the tree graphs was not too dependent on the used linkage type when single, complete and average



1. Tree diagram representing dissimilarity between pea nodulation mutants; mutants Risnod and Risfix are denoted with the appropriate number/letter; Euclidean distances based on seven traits were processed with the average linkage joining algorithm

joining algorithms were applied. The most distinct clustering was achieved using average linkage and Euclidean metric. All studied mutants can be divided into fifteen clusters (Tab. II) at the arbitrarily selected dissimilarity

level 0.435. The observed clusters can be characterized by the values of the most important traits: the presence of leghemoglobin, TNA, nitrogen yield, and nodule number per plant. It is necessary to take into account that the proposed division is partly dependent on the cultivation conditions and the inoculum used.

The distinguished classes are supposed to reflect at least fifteen different kinds of symbiotic defects, particularly the developmental blocks of aberrant nodules. The observed high number of phenotypic classes allows an important conclusion upon the high complexity of nodule development. This agrees with the notion about the complexity of the genetic control of nodulation that is based on the estimated number of plant mutant complementation groups (Duc, Messenger, 1989).

II. Proposed phenotypic classes of Nod⁺ symbiotic mutants from cv Finale

Class	Lines included ^A	Nodule colour	Nodule number (plant ⁻¹)	N yield in shoots ^B (mg.plant ⁻¹)
I	29	pink	123	122
II	Finale	pink	139	104
II	P	pink	147	94
IV	15	pink	155	93
V	31, S	pink	166 - 205	71 - 84
VI	C	pink	806	74
VII	5	green	177	40
VIII	E	pink	112	38
IX	4	pink	47	36
X	3, B, D, H, K, L, O, Q, T	white, pink > green, green, brown	250 - 479	5 - 18
XI	I	pink	193	17
XII	V	greenish	1224	11
XIII	M	pink > green	598	7
XIV	N, 17	brown	232 - 335	6 - 7
XV	9, A, F, 26	white	8 - 11	6 - 8

^ADenotation of mutant lines is like in Tab. I; ^BClasses are arranged according to the maximum value of nitrogen yield

The Nod^+ mutants tend to form more nodules than the wild type plants (Tab. I). If we do not consider four mutants from proposed group XV, forming sparse nodules with negligible mass, only Risnod4 forms significantly fewer nodules than the wild type. We can hypothesize that the increased nodule number in most mutants reflects the plant response that should compensate the decreased activity of nodules.

The markedly high nodule number in mutants RisfixC and RisfixV suggests that these mutants are the supernodulating ones as proposed by Jacobsen, Feenstra (1984) and Carroll et al., (1985). The supernodulating phenotype is supposed to result from the release of the systemic regulation of nodulation (Carroll et al., 1985). RisfixC forms nodules of normal appearance and of medium size while the nodules of RisfixV are tiny, oblonge, and after reaching the stage of leghemoglobin synthesis they instantly degrade and turn green. In view of the linkage of the supernodulating phenotype with nitrate-tolerant nodulation (Carroll et al., 1985), both mentioned mutants were tested at a high nitrate level in parallel with other Nod^+ mutants (Tab. III). The chosen level of $10 \text{ mmol NO}_3^- \text{ L}^{-1}$ corresponds to the reported concentrations used for the diagnosis of the nts phenotype (Postma et al., 1988; Hansen et al., 1989; Wu, Harper, 1990). In all tested lines, the number and total mass of nodules decreased, despite the longer cultivation period and higher shoot mass. The degree of nodule number reduction is different in individual lines. Full block of nodule formation in Risnod3 indicates that the increased sensitivity to external nitrate may be the reason for the original description of this line as Nod^- (Engvild, 1987).

The lowest response of nodule number to nitrate was observed in line RisfixC. This finding confirms its classification as a typical supernodulator (Carroll et al., 1985), in contrast to RisfixV, which reacts markedly to the nitrate increase. The mutants forming an elevated number of nodules, but still nitrate-sensitive, can be denoted as hypernodulating (Wu, Harper, 1990) or copious nodulating (Park, BATTERY, 1988). RisfixC is probably the sixth supernodulating mutant of pea isolated up to now, besides the mutant nod_3 , which was isolated from cv. Rondo (Jacobsen, Feenstra, 1984) and four supernodulating mutants isolated from cv. Frisson (Duc, Messenger, 1989). On the other hand, the behaviour of RisfixV closely resembles plants carrying natural nod_1nod_2 alleles (Jacobsen, Feenstra, 1984).

III. Selected traits in pea nodulation mutants cultivated at a high nitrate level (10 mmol NO₃⁻ L⁻¹); the means not indexed with the same letter are significantly different at 95% Tukey HSD intervals; ND - not determined

Pea line ^A	Nodule number ^B		Nodule DM ^B		Top DM	
	plant ⁻¹	% of low N plants ^C	plant ⁻¹	% of low N plants ^C	plant ⁻¹	% of low N plants ^C
9	0a	0	0a	0	1.72a - f	404
F	0 ^a	0	0 ^a	0	6.80 ^{e,g}	1565
26	0 ^a	0	0 ^a	0	3.08 ^{a-g}	548
A	0 ^a	0	0 ^a	0	5.93 ^{a,c,e-g}	1208
4	13 ^{a-c}	28	26.3 ^{c-g}	36	4.23 ^{a-g}	516
E	30 ^{a-d}	26	1.5 ^{a-c}	2	1.69 ^{a-e}	212
29	38 ^{a-f}	31	46.5 ^g	16	6.18 ^{a,c,e-g}	212
Finale	49 ^{c-g}	35	34.0 ^g	14	3.48 ^{a-g}	134
P	73 ^{c-h}	49	29.0 ^{c,d,f,g}	16	4.06 ^{a-g}	177
15	74 ^{d-h}	48	44.3 ^g	21	4.06 ^{a-g}	183
S	51 ^{c-h}	30	28.5 ^{c-g}	18	4.94 ^{a-g}	271
5	104 ^{d-h}	59	32.0 ^g	27	3.79 ^{a-g}	359
I	ND	ND	ND	ND	ND	ND
31	67 ^{c-h}	33	27.0 ^{c-g}	15	4.05 ^{a-g}	246
17	ND	ND	ND	ND	ND	ND
D	37 ^{a,c-e}	15	2.3 ^{a-e}	6	1.03 ^{a,b}	374
B	108 ^{d-h}	39	15.6 ^{a-g}	22	3.53 ^{a-g}	661
L	30 ^{a-d}	10	2.0 ^{a-d}	4	0.86 ^a	174
O	64 ^{c-h}	20	5.2 ^{a-f}	11	3.80 ^{a-g}	1004
N	0 ^a	0	0 ^a	0	1.11 ^{a-d}	323
K	131 ^{e-i}	35	19.0 ^{a-g}	35	3.28 ^{a-g}	1061
H	45 ^{a,c-f}	12	11.0 ^{a-g}	22	1.04 ^{a-c}	222
Q	141 ^{f,h-i}	37	28.6 ^{d,f,g}	41	4.33 ^{a-g}	908
3	0 ^a	0	0 ^a	0	2.66 ^{a-g}	573
T	134 ^{d-i}	28	20.5 ^{a-g}	25	5.82 ^{a-g}	1124
M	235 ⁱ	39	34.0 ^g	38	4.99 ^{a-g}	1004
C	595 ^j	74	129.3 ^h	60	2.45 ^{a-g}	209
V	251 ⁱ	21	17.6 ^{a,c-g}	16	2.81 ^{a-g}	515

^ADenotation of lines is like in Tab. I; ^BThe replicate data of nodule number per plant and nodule DM were transformed into the square root of (x + 1) before the statistical processing; ^CFor values of low N cultivated plants see Tab. I

Growth and nitrogen fixation

In view of the uniform growth of the Nod⁻ mutants (Tab. I), we were not able to detect multiple mutations nor the pleiotropic action of the main mutation under the used cultivation conditions (Hansen et al., 1989; Keen et al., 1990). Nodule formation itself did not cause any detectable differences in dry mass yield and nitrogen content, as illustrated by comparison of Nod⁺ lines with zero nitrogen fixation to Nod⁻ lines (Tab. I). As the original Fix⁻ phenotype of the studied set of mutants was confirmed by less than 20% C₂H₂ reduction in comparison to the wild type (Engvild, 1987), each line possessing the higher activity (Tab. I) can be considered as a case of conditional expression of Fix⁻ phenotype. TNA of RisfixP exceeded, and that of Risnod29, Risnod31, and RisfixS did not differ significantly from the wild type. The phenomenon of nitrogenase conditional expression merits further attention, particularly in those lines where the plant/*Rhizobium* incompatibility may be the case.

Similarly, the highest values of SNA are reached by mutants RisfixP, RisfixS, and Risnod5 (Tab. I), and not by the wild type plants. On the other hand, the mutant Risnod15 is characterized by decreased SNA and by almost normal nodule size in parallel. However, we are not facing the full absence of nitrogenase activity in nodules of normal structure as described for non-fixing mutant FN₁ (Postma et al., 1987).

In contrast with the original classification of RisfixC as Fix⁻ (Engvild, 1987), this line is actively fixing under our conditions. However, the increased nodulation leads to neither superior TNA and SNA nor higher shoot dry mass accumulation. The latter represents less than a half of the wild type value, and total nitrogen accumulation is lower, even if not significantly, than in the wild type. Total mass of nodules is comparable to the wild type in spite of the almost six times higher nodule number. On the other hand, RisfixC plants have the highest nitrogen content in nodules of all lines, as well as by 60 % higher nitrogen content in shoot in comparison with the wild type. This deviation might reflect the wrong sensing and regulation of the internal N metabolite level. The same fault can be connected with the nodulation feedback breakage that was proposed as a basis of the supernodulation phenotype (Carroll et al., 1985).

Our results confirm findings reported by Day et al. (1987), who pointed out the worse growth of soybean supernodulating mutant nts382, and by Hansen et al. (1989), who evaluated another soybean mutant nts1007. A supernodulating mutant of pea nod₃ was also inferior to the wild type plants in shoot mass (Rosen Dahl et al., 1989) and length (Postma et al.,

1988). The lower effectiveness of supernodulating mutants can be ascribed to a defect in the source/sink balance (J a c o b s e n , F e e n s t r a 1984; C a r r o l l e t a l . , 1985; H a n s e n e t a l . , 1989) or to the pleiotropic effect of the main mutation on the plant morphogenesis (J a c o b s e n , F e e n s t r a , 1984; C a r r o l l e t a l . , 1985; P o s t m a e t a l . , 1988; D u c , M e s s a g e r , 1989).

Acknowledgements

The authors are very indebted to Dr. K. C. E n g v i l d for supplying the pea mutants used.

References

- CARROLL, B. J. - McNEIL, D. L. - GRESSHOFF, P. M.: Isolation and properties of soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] mutants that nodulate in the presence of high nitrate concentrations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 1985, pp. 4162-4166.
- DAY, D. A. - PRICE, G. D. - SCHULLER, K. A. - GRESSHOFF, P. M.: Nodule physiology of a supernodulating soybean (*Glycine max*) mutant. *Austral. J. Pl. Physiol.*, 14, 1987, pp. 527-538.
- DEVINE, T. E.: Role of the nodulation restrictive allele *Rj4* in soybean evolution. *J. Pl. Physiol.*, 132, 1988, pp. 453-455.
- DUC, G. - MESSENGER, A.: Mutagenesis of pea (*Pisum sativum* L.) and the isolation of mutants for nodulation and nitrogen fixation. *Pl. Sci.*, 60, 1989, pp. 207-213.
- ENGVILD, K. C.: Nodulation and nitrogen fixation mutants of pea, *Pisum sativum*. *Theor. appl. Genet.*, 74, 1987, pp. 711-713.
- HANSEN, A. P. - PEOPLES, M. B. - GRESSHOFF, P. M. - ATKINS, C. A. - PATE, J. S. - CARROLL, B. J.: Symbiotic performance of supernodulating soybean [*Glycine max* (L.) Merrill.] mutants during development on different nitrogen regimes. *J. Exp. Bot.*, 40, 1989, pp. 715-724.
- JACOBSEN, E. - FEENSTRA, W. J.: A new pea mutant with efficient nodulation in the presence of nitrate. *Pl. Sci. Lett.*, 33, 1984, pp. 337-344.
- JENSEN, E. S. - SÖRENSEN, L. H. - ENGVILD, K. C.: Danish *Rhizobium leguminosarum* strains nodulating 'Afghanistan' pea (*Pisum sativum*). *Physiol. Pl.*, 66, 1986, pp. 46-48.
- KNEEN, B. E. - LaRUE, T. A.: Peas (*Pisum sativum* L.) with strain specificity for *Rhizobium leguminosarum*. *Heredity*, 52, 1984, pp. 383-390.
- KNEEN, B. E. - LaRUE, T. A. - HIRSCH, A. M. - SMITH, C. A. - WEEDEN, N. F.: *sym13* - a gene conditioning ineffective nodulation in *Pisum sativum*. *Pl. Physiol.*, 94, 1990, pp. 899-905.
- LIE, T. A.: Symbiotic specialization in pea plants: the requirement of specific *Rhizobium* strains for peas from cv. Afghanistan. *Ann. Appl. Biol.*, 88, 1978, pp. 462-465.
- LIE, T. A. - GÖKTAN, D. - ENGIN, M. - PIJNEBORG, J. - ANLARSAL, E.: Co-evolution of the legume - *Rhizobium* association. *Pl. Soil*, 100, 1987, pp. 171-181.
- LONG, S.: *Rhizobium* genetics. *Ann. Rev. Genet.*, 23, 1987, pp. 483-506.
- NAP, J. P. - BISSELING, T.: The roots of nodulins. *Physiol. Pl.*, 79, 1990, pp. 407-414.

- PARK, S. J. - BUTTERY B. R.: Nodulation mutants of white bean (*Phaseolus vulgaris* L.) induced by ethyl-methane sulphonate. *Can. J. Pl. Sci.*, 68, 1988, pp. 199-202.
- POSTMA, J. G. - JACOBSEN, E. - BISSELING, T. - FEENSTRA, W. J.: A mutant of pea (*Pisum sativum*) possibly disturbed in the production of a compound required for the induction of nitrogenase activity in bacteroids. In: VERMA, D. P. S. - BRISSON, N. (eds): *Molecular Genetics of Plant - Microbe Interactions*. Martinus Nijhoff, Dordrecht, vol. 1, 1987, pp. 91-93.
- POSTMA, J. G. - JACOBSEN, E. - FEENSTRA, W. J.: Three pea mutants with an altered nodulation studied by genetic analysis and grafting. *J. Pl. Physiol.*, 132, 1988, pp. 424-430.
- POSTMA, J. G. - JAGER, D. - JACOBSEN, E. - FEENSTRA, W. J.: Studies on a non-fixing mutant of pea (*Pisum sativum* L.). I. Phenotypical description and bacteroid activity. *Pl. Sci.*, 68, 1990, pp. 151-161.
- ROSENDAHL, L. - VANCE, C. P. - MILLER, S. S. - JACOBSEN, E.: Nodule physiology of a supernodulating pea mutant. *Physiol. Pl.*, 77, 1989, pp. 606-612.
- ŠKRDLETA, V. - LISÁ, L. - NĚMCOVÁ, M.: Comparison of peas nodulated with a hydrogen-uptake positive or negative strain of *Rhizobium leguminosarum*. I. Nodulation, acetylene-reducing, dihydrogen and carbon-dioxide evolving activities. *Folia Microbiol.*, 32, 1987, pp. 226-233.
- ŠKRDLETA, V. - NĚMCOVÁ, M. - HYNDRAKOVÁ, A.: Symbiotic dinitrogen fixation as affected by short-term application of nitrate to nodulated *Pisum sativum* L. *Folia Microbiol.*, 25, 1980, pp. 155-161.
- ŠKRDLETA, V. - NĚMCOVÁ, M. - LISÁ, L. - NOVÁK, K. - KOVÁŘOVÁ, D.: Comparative response of *Pisum sativum* nodulated with indigenous soil *Rhizobium* populations and/or co-inoculated with a *Rhizobium leguminosarum* strain. *Folia Microbiol.*, 36, 1991, pp. 271-276.
- VANCE, C. P. - EGLI, M. A. - GRIFFITH, S. M. - MILLER, S. S.: Plant regulated aspects of nodulation and N₂ fixation. *Pl. Cell Environ.*, 11, 1988, pp. 413-427.
- VINCENT, J. M.: Factors controlling the legume - *Rhizobium* symbiosis. In: NEWTON, W. E. - ORME-JOHNSON, W. H. (eds): *Nitrogen Fixation II*. University Park Press, Baltimore, 1980, pp. 103-129.
- WEINMAN, J. J. - DJORDJEVIC, M. A. - HOWLES, P. A. - ARIOLI, T. - LEWIS-HENDERSON, W. - McIVER, J. - OAKES, M. - CREASER, E. H. - ROLFE, B. G.: The use of the genus *Trifolium* for the study of plant - microbe interactions. In: HENNECKE, H. - VERMA, P. D. S. (eds): *Advances in Molecular Genetics of Plant - Microbe Interactions*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, vol. 1, 1991, pp. 168-173.
- WU, S. - HARPER, J. E.: Nitrogen fixation of nodulation mutants of soybean as affected by nitrate. *Pl. Physiol.*, 92, 1990, pp. 1142-1147.
- YOUNG, J. P. W. - MATTHEWS, P.: A distinct class of peas (*Pisum sativum* L.) from Afghanistan that show strain specificity for symbiotic *Rhizobium*. *Heredity*, 48, 1982, pp. 203-210.

Received on September 29, 1992

NOVÁK, K. - ŠKRDLETA, V. - NĚMCOVÁ, M. - LISÁ, L. (Laboratoř biologické fixace dusíku, Mikrobiologický ústav AV ČR, Praha):

Symbiotické znaky, růst a klasifikace nodulačních mutantů hrachu.

Rostl. Výr., 39, 1993 (2): 157-170.

Celkem 45 symbiotických mutantů hrachu (*Pisum sativum* L.) bylo charakterizováno pomocí 10 symbiotických a růstových znaků. 27 linií tvořících hlízky bylo

rozděleno do 15 shluků na základě sedmi znaků: počet hlízek, sušina hlízek, celková aktivita nitrogenázy, sušina nadzemních částí, nodulační index, sušina jedné hlízky a obsah dusíku v nadzemních částech. Byla pozorována podmíněná exprese znaků nodulace a fixace. Čtyři mutanty, které byly původně popsány jako nenodulující (Nod⁻), byly schopné nodulace a fixace dusíku za daných experimentálních podmínek. Dva další mutanty, které byly nefixující podle původního popisu, byly neodlišitelné od rostlin divokého typu. Mutant RisfixC byl na základě vysokého počtu hlízek a nízké citlivosti nodulace a redukce C₂H₂ k vysoké hladině nitrátu klasifikován jako nový supernodulující mutant hrachu.

Contact Address:

RNDr. Vladimír Škrdleta, CSc., Laboratoř fyziologické fixace dusíku, Mikrobiologický ústav AV ČR, Vídeňská 270, 142 20 Praha 4 - Krč

BIOTECHNOLOGICKÉ METODY VE ŠLECHTĚNÍ TYKVOVITÝCH ZELENIN

A. Lebeda, E. Křístková, M. Kubaláková, T. Havlický, J. Vagera, P. Binarová

Konvenční šlechtitelské metody používané u tykvovitých zelenin byly shrnuty v publikované monografii (B a s s e t t , 1986). Ve šlechtění okurek se dosud uplatňují zcela výhradně klasické šlechtitelské postupy založené na vnitrodruhovém sexuální hybridizaci vybraných rodičovských komponentů a následné selekci jednotlivých rostlin v segregujících F₂, F₃ nebo backcross populacích. Vhodní rekombinanti jsou podrobeni inbrídinku a tvorbě nových linií. Tento postup byl úspěšně uplatňován např. při šlechtění okurek na odolnost k některým chorobám.

Na rozdíl od řady jiných druhů zelenin (např. *Lactuca sativa*, *Lycopersicon esculentum*), je u *C. sativus* známa poměrně omezená genetická variabilita. Ta je především podmíněna určitou genetickou izolací tohoto druhu. Překonání hybridizační bariéry, rozšíření genetické diverzity a její následné využití ve šlechtitelských programech okurek je jedním z hlavních cílů výzkumu. Současné možnosti šlechtění okurek jsou určitým způsobem limitovány (K n e r r et al., 1989). Právě tato skutečnost vede ke snaze více využívat mezidruhovou hybridizaci (N i j s , C u s t e r s , 1990) ve spojení s nekonvenčními (biotechnologickými) metodami. Možnosti použití těchto metod u *C. sativus* souhrnně zpracoval M a l e p s z y (1988).

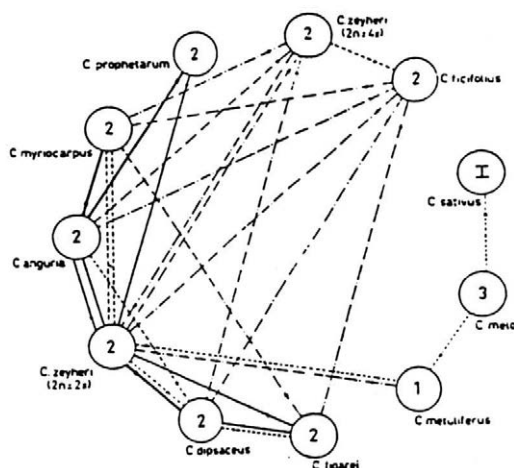
Vzdálená hybridizace

Zaměříme se pouze na otázky vzdálené hybridizace u rodu *Cucumis*. Možnost mezidruhově hybridizace v rámci tohoto rodu je primárně limitována cytogenetickým základem, tedy počtem chromozómů. Tím je také v podstatě podmíněna bariéra mezi skupinou *C. sativus* a ostatními druhy, které jsou součástí tzv. africké skupiny. Podrobné cytologické a cytogenetické údaje týkající se křížitelnosti v rámci rodu *Cucumis* shrnuli L e b e d a , K ř í s t k o v á (1993). Vzájemná křížitelnost druhů podrodů *Cucumis* a *Melo* je znázorněna na obr. 1. Vzhledem k tomu, že z praktického hlediska má největší význam překonání nekřížitelnosti mezi *C. sativus* a *C. melo*, případně některými dalšími druhy africké skupiny, zaměříme se dále především na tuto problematiku.

První pokusy o získání mezidruhovými kříženci mezi *C. sativus* a *C. melo* spadají do období 30. a 40. let tohoto století. Jedním z prvních, kdo se o to pokusil, byl

B a t r a (1953), který po opylení zaznamenal vývoj plodů, aniž se však projevila tvorba vitálních semen. Také D e a k i n et al. (1971) a F a s s u l i o t i s (1977) získali při křížení okurky s melounem plody obsahující relativně velké množství semen, ale bez známek vývoje embrya. Od roku 1971 se snažila skupina holandských autorů získat křížence okurky a melounu. R u i t e r (1973) popsal tvorbu plodů obsahujících 10 až 15 dobře vyvinutých semen, z nichž se podařilo získat F1 rostliny s dobrou fertilitou. Po samosprášení byly rostliny F2 podobné rostlinám F1. Většina F1 rostlin měla 19 chromozómů a morfologicky byly podobné oběma rodičům. Na základě izoenzymové analýzy rostlin F1 se však ukázalo, že rostliny byly mutanti a ne skuteční mezidruhovi hybridi (R o b i n s o n et al., 1979).

Vzhledem k tomu, že klasická metoda křížení nevedla k úspěchu, snažili se mnozí autoři použít nejrozličnější další techniky. K n a a p , R u i t e r (1978) uvádějí, že při křížení *C. sativus* x (*C. sativus* + *C. melo*) směsí pylu získali asi 2 % hybridních rostlin. Rostliny F1 generace, získané po opylení směsí pylu, byly naprosto odlišné od obou rodičovských linií. Plody byly intermediární, hruškovitého tvaru. Růst hybridních rostlin byl pomalý, přičemž měly velmi krátká internodia. Rostliny byly označeny Megurk podle holandského meloen a augurk. Rovněž v tomto případě následná izoenzymová analýza prokázala, že nešlo o křížence, ale patrně o mutanta v jednom recesivním genu.



1. Polygon křížitelnosti druhů rodu *Cucumis*; I. *Cucumis* podrod *Cucumis*, *Cucumis* podrod *Melo*, skupina: 1. *Metuliferus*, 2. *Anguria*, 3. *Melo*; šipky směřují k mateřskému rodiči; středně až silně autofertilní a „cross“ fertilní hybridy ———; vzácně autofertilní a středně „cross“ fertilní hybridy ———; autosterilní, obvykle ne „cross“ fertilní hybridy - - - - -; neživotná semena nebo hybridy - - - - -; absence linie vyznačuje, že nebyly získány plody se semeny; upraveno podle N i j s , C u s t e r s (1990) - Polygon of crossability of the species of the genus *Cucumis*; I. *Cucumis*, subgenus *Cucumis*, *Cucumis* subgenus *Melo*, group: 1. *Metuliferus*, 2. *Anguria*, 3. *Melo*; arrows are directed to the maternal parent; medium to strong autofertile and „cross“-fertile hybrids ———; rarely autofertile and medium „cross“-fertile hybrids ———; autosterile, usually not „cross“-fertile hybrids - - - - -; lifeless seeds or hybrids - - - - -; absence of the line indicates that no fruit with seeds were obtained; adjusted after N i j s , C u s t e r s (1990)

Jako jedna z možností překonání nekřížitelnosti bylo použito hormonální ovlivnění mateřských rostlin. Smith, Venkat Ram (1954) použili lanolinovou pastu s IBA, případně s 4-chlorfenoxycetovou kyselinou, které aplikovali na květní stopky v době opylení. Plody se dobře vyvíjely. Semena měla kvalitní testu, byla však pouze vyplněna želatinovým materiálem, aniž by došlo k tvorbě embryí. Loy (1982) poukázal na možnost využití BAP a AVG (amino-ethoxyvinylglycin). Tuto metodu později využili Chatterjee, More (1991). Dosud však žádná z těchto metod nevedla k vyřešení problému nekřížitelnosti. Také naše dosavadní experimentální výsledky, založené na různých modifikacích těchto technik, potvrzují výše uvedené poznatky.

Rovněž byly prováděny pokusy s použitím ozářeného pylu. Custers, Bergervoet (1984) aplikovali ozářený pyl melounu s předpokladem, že ozáření povede k selektivní eliminaci chromozómů *C. melo* v hybridních buňkách mladých embryí *C. sativus* x *C. melo*. Vyvíjející se plody byly odděleny od rostliny za tři týdny po opylení. S rostoucí dávkou ozáření klesal počet a velikost embryí a endosperm.

Z uvedených výsledků je zřejmé, že se dosud nepodařilo úspěšně využít mezidruhové hybridizace *C. sativus* a *C. melo* k přenosu významných hospodářských vlastností, zejména pak rezistence vůči chorobám a škůdcům. Úspěšné vyřešení tohoto problému by mělo podstatný vliv na rozvoj šlechtění okurek. V tomto směru lze do budoucna potenciálně využít některé biotechnologické metody.

Embryokultury

Úspěšnost mezidruhové hybridizace u rodu *Cucumis* je do značné míry závislá na možnosti využití embryokultur a následném dopěstování vitálních rostlin F1 generace. Niemirowicz-Szczytt, Wyszogrodská (1976) zjistili, že při křížení *C. sativus* x *C. melo* standardní opylovací technikou dochází k oplodnění a vývoji zárodků až po globulární stadium, pak je vývoj embrya inhibován. Pro dopěstování těchto embryí v kultuře *in vitro* tuto autoři použili médium vhodné pro nezralá okurková embrya. Médium se však neosvědčilo a nepodařilo se získat hybridní rostliny ani po několikanásobném opakování tohoto pokusu. Rovněž Nijs, Custers (1990) uvádějí neúspěch s dopěstováním embryí z křížení okurky a melounu. Tato embrya *in situ* v globulárním stadiu nepokračují po přenesení do kultury *in vitro* v diferenciaci a do měsíce hynou. Autoři vyslovili předpoklad, že příčinou je spíše nevybalancovaná chromozómová sádka než interakce embryo - endosperm. Tento stav lze hypoteticky překonat indukci kalusu z hybridního embrya. V něm pak dojde k chromozómové přestavbě a eliminaci nevybalancovaných chromozómových kompletů. Takový kalus by pak mohl být schopen regenerace. Custers, Bergervoet (1984) se o tento způsob řešení pokoušeli, ale nepodařilo se jim odvodit kalus z hybridního embrya.

V našich pokusech byly ověřovány embryokultury u 15 genotypů rodu *Cucumis*. Embrya byla extirpována v různém stadiu vývoje, od globulárních až po téměř zralá. Vyzkoušena byla dvě základní média, MS (Murashige, Skoog, 1962) a RS (Ranga swamy, 1961) s různými koncentracemi IAA, kinetinu a BAP. Celkem

bylo nasazeno 360 embryí. Rostliny se podařilo dopěstovat u devíti genotypů. Dva měsíce po nasazení na médium tyto rostliny již kvetly v baňkách a bez problémů je bylo možno přesadit do nesterilních podmínek. Mezi médii nebyl zjištěn podstatný rozdíl, na RS byl vývoj rostlin pomalejší a listy byly menší. Přidání regulátorů do média není nutné. Od srdčitého stadia embryo pokračuje ve vývoji i na médiu bez regulátorů růstu. Médium s 1 g/l casein hydrolyzátu (Difco) stimuluje růst. Příliš vysoké koncentrace IAA (5-10 μM) vedou k tvorbě kalusu, při použití 5 μM BAP dochází k silnému zkrácení internodií a ztloustnutí celé rostliny. Pro dopěstování rostlin z hybridních embryí bude asi nutné nejdříve indukovat tvorbu kalusu a z něj pak indukovat regeneraci. Kromě genotypů *C. sativus*, se nám podařilo úspěšně regenerovat rostliny i z embryí řady planých druhů jako např. *C. africanus*, *C. anguria*, *C. dipsaceus*, *C. ficifolius*, *C. myriocarpus*, *C. prophetarum*.

Regenerace *in vitro* a buněčné kultury

Výzkum regenerace z *in vitro* kultur *C. sativus* zaznamenal v poslední době velký pokrok. Podařilo se získat regeneranty z *in vitro* kultivovaných laterálních pupenů (H a n d l e y , C h a m b l i s s , 1979), i apikálního meristému (R u t e et al., 1978). Regenerace bylo rovněž dosaženo u kalusových kultur (C h e e , 1990, 1991; C h e e , T r i c o l i , 1988) i buněčných suspenzních kultur (C a l l e b a u t et al., 1987).

V našich experimentech jsme se zaměřili na studium regenerace celkem 123 genotypů *Cucumis sativus*, *Cucurbita pepo* a *C. moschata*. Jako zdroj primárních explantátů byla použita pletiva děloh a hypokotylu. Pro odvození kalusových i buněčných kultur sloužilo jako bazální MS médium (M u r a s h i g e , S k o o g , 1962). Indukce kalusů z primárních explantátů probíhala na médiu MS + 1,2 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l KIN. Po čtyřech týdnech kultivace ve tmě byly kalusy přeneseny na regenerační médium MS + 1 mg/l NAA + 0,5 mg/l KIN. Tyto kultury byly kultivovány na světle po dobu dvou týdnů. Pak byly kalusy přeneseny na pevné médium (bez růstových regulátorů) nebo do tekutých médií (MS + 1 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l KIN nebo do tekutého média MS bez růstových regulátorů). Regeneranti s dostatečně vyvinutým kořenovým systémem byli přeneseni z média MSO do perlitu a následně do volné půdy ve skleníku.

Celkem u 35 % kalusů odvozených z genotypů *C. sativus* byla pozorována regenerace po týdnu kultivace na regeneračním médiu na světle. Nejvyšší procento regenerujících kalusů bylo zaznamenáno u odrůdy Bílská, u které se rovněž podařilo regenerovat rostliny. U kalusů genotypů *C. pepo* docházelo k intenzivní tvorbě kořenů, aniž se projevila iniciace prýtlů.

U kalusů získaných z odrůd *C. sativus* Bílská a SM-5048 se podařilo odvodit intenzivně rostoucí buněčné suspenzní kultury, u nichž byla úspěšná regenerace cestou somatické embryogeneze. U buněčných suspenzí *C. pepo* a *C. moschata* docházelo, podobně jako v kalusové kultuře, pouze k intenzivní rhizogenezi.

Z hlediska dalšího pokroku ve šlechtění tykvovitých, zvláště okurek, se ukazuje jako velice významná otázka izolace a regenerace protoplastů. První úspěšnou regeneraci protoplastů *C. sativus* odvozených z děložních listů popsali C o l i j n - H o o y -

m a n s et al. (1988). U C. melo B o k e l m a n n et al. (1991) a M o r e n o et al. (1984) úspěšně odvodili kulturu protoplastů z pletiva listů, včetně následné regenerace. Cílem těchto prací je vyvinout metodu heterologní fúze protoplastů s možností jejího využití při mezidruhové hybridizaci u rodu *Cucumis*. Tím by byl vytvořen předpoklad k přenosu některých efektivních zdrojů rezistence z planých druhů rodu *Cucumis*. Naše další práce se rovněž bude ubírat tímto směrem.

Produkce haploidů *in vitro*

Spontánní výskyt haploidních jedinců v čeledi *Cucurbitaceae* je sice u některých druhů o něco vyšší než u druhů z jiných čeledí. Není však přímo vázán na výskyt zygotických dvojčat a lze jej navodit např. i vlivem sucha. Pro praktické aplikace je však příliš nízký.

Indukce sporofytického vývoje samčí gamety, tj. androgenese *in vitro*, nebyla dosud v čeledi *Cucurbitaceae* úspěšná. Proembryoidy prokazatelně odvozené z nezralých pylových zrn (mikrospor) zastavovaly vývoj po čtyřech děleních buněčného jádra a takto vytvořené buněčné útvary se již dále nevyvíjely (D r y a n o v s k a , 1985). Kompletní rostliny z kultivovaných prašníků okurky získali již dříve L a z a r t e , S a s e r (1982), kteří použili standardní kultivační média Nitsch a MS. Regeneranti však vznikali ze zelených center na indukovaném kalusu a nebyli zřejmě mikrosporiálního původu. V našich pokusech prováděných s prašníkovou kulturou okurky odrůdy Pálava jsou získávány embryoidy (reaguje až 30 % prašníků) na jednoduchém médiu N6 (C h u et al., 1975).

Podstatně úspěšnější byla indukovaná gynogeneze. U melounu byl parthenogenetický vývoj vajíčka stimulován sprášením pylem ozářeným paprsky gama (S a u t o n , 1988). Embrya nacházející se v globulárním nebo srdčitém stadiu byla z vyvíjejících se semen extirpována a dopěstována na médiu podle D u m a s d e V a u l x et al., (1981). Snadněji byla gynogeneze indukována u okurky, a to kultivací části nezralých semeníků (příčných řezů) s neoplozenými vajíčky na agarových médiích obsahujících cytokininy (u parthenokarpických variant) nebo auxiny (u neparthenokarpických variant). Byly tak dopěstovány kompletní haploidní, resp. dihaploidní rostliny (D i r k s , M a r j a n v a n B u g g e n u m , 1991). Frekvence gynogeneze je kromě dalších vlivů výrazně závislá na stavu donorových rostlin. U *Cucumis sativus* bylo demonstrováno (N i e m i r o w i c z - S z c z y t t , D u m a s d e V a u l x , 1989) zvýšení parthenogeneze koncem léta, kdy lze *in vitro* dopěstovat kompletní rostliny téměř z poloviny haploidních embryí. Tyto techniky kultivace se mohou uplatnit i při vzdálené hybridizaci.

Využití biochemických markerů ve šlechtění tykvovitých

Jako všeobecně známé a vhodné biochemické markery v genetických a systematických studiích jsou používány izoenzymy. Využívá se tzv. zymogramové techniky,

při které jsou izoenzymy elektroforeticky separovány na různých druzích gelů a pomocí histochemických technik barveny na svou specifickou aktivitu. Tato technika je vhodná pro systematické, evoluční a fylogenetické studie rostlin (G o t t l i e b , 1977), ale je ji možné účelně využít i ve šlechtění.

Jedním z nejvýznamnějších rysů izoenzymové variability je jednoduchá dědičnost. S izoenzymy je spojena řada charakteristik jako např. kodominance alel, nezávislost na epistatické a pleiotropické interakci, nezávislost na vlivech prostředí, přítomnost v mnoha pletivech (G o t t l i e b , 1981). To je důvodem, proč je izoenzymová variabilita výborným genetickým markerem s širokou možností využití v základním výzkumu, ale i v praktickém šlechtění.

U tykvovitých rostlin je této problematice věnována zvýšená pozornost až v posledních letech, přičemž středem zájmu je především rod *Cucurbita*. První práce u tohoto rodu byly zaměřeny na studium esteráz (S c h w a r z et al., 1964) a variabilitu peroxidáz (D v o ř á k , Č e r n o h o r s k á , 1967). Přehledně celou problematiku zpracovali W e e d e n , R o b i n s o n (1990). Pomocí izoenzymového polymorfismu byla odhalena řada fylogenetických závislostí (P u c h a l s k i , R o b i n s o n , 1990), přičemž *C. pepo* je druhem, který vykazuje značnou izoenzymovou diverzitu (K i r k p a t r i c k et al., 1985).

Rod *Cucumis* není v tomto směru zdaleka tak prostudován. Z dosavadních poznatků je zřejmé, že jeho genetická diverzita je omezena. K n e r r et al. (1989) analyzovali genetickou rozmanitost u 757 genotypů *C. sativus* na základě 40 izoenzymů, jež reprezentují 74 biochemických lokusů. Polymorfismus byl nalezen u 18 kódujících lokusů. Rovněž na základě elektroforetického srovnání 29 jaderně kódovaných enzymů byla stanovena genetická vzdálenost 21 druhů rodu *Cucumis* (P e r l - T r e v e s et al., 1985).

Izoenzymy mohou v některých případech sloužit jako markery rezistence k patogenům. Např. u rodu *Cucurbita* byla nalezena závislost mezi rezistencí k viru mozaiky vodního melounu (WMV) a přítomností jednoho aldolázového proužku (W e e d e n , R o b i n s o n , 1990).

R e u v e n i et al. (1990) publikovali metodu stanovení celkové peroxidázové aktivity jako markeru pro rezistenci k *Pseudoperonospora cubensis* u *C. melo*. Z našich předběžných výsledků lze usuzovat, že stanovení relativní celkové aktivity peroxidáz a kyselých fosfatáz může být použito jako jedno ze selekčních kritérií při studiu polní rezistence *C. sativus* vůči *P. cubensis*. Rovněž se nám podařilo nalézt určité rozdíly v izoenzymových spektrech, jež mohou být použity jako selekční marker. Obdobné předběžné závěry lze učinit i ze studia *C. melo* a *C. pepo* ve vztahu k variabilitě rezistence vůči *P. cubensis*.

Závěr

Z dosavadních poznatků o možnosti využití planých druhů rodu *Cucumis* v mezidruhově hybridizaci je zřejmé, že jde o velmi komplikovaný problém. Pomocí klasických hybridizačních technik se dosud nepodařilo překonat genetické bariéry mezi

druhy podrodů *Cucumis* a *Melo*. Zdá se, že je však reálný předpoklad tento problém vyřešit za pomoci některých biotechnologických metod. Současné výsledky a poznatky biotechnologického výzkumu (embryokultury, prašnickové kultury, somatická embryogeneze a regenerace rostlin z protoplastů) poskytují dobrý základ pro úspěšné využití technik somatické hybridizace v mezidruhovém křížení u rodu *Cucumis*. Pro tuto práci se ukazuje jako nezbytné rozpracování a využití metod pro stanovení biochemických markerů (např. izoenzymové variability). Jejich použití se ukazuje jako velmi efektivní zejména při šlechtění na rezistenci k chorobám.

Literatura

- BASSETT, M. J.: Breeding vegetable crops. AVI Publ. Comp., Inc., Westport, Connecticut, 1986.
- BATRA, S.: Interspecific hybridization in the genus *Cucumis*. Sci. Cult., 18, 1953, s. 445-446.
- BOKELMANN, G. S. - JARL, C. I. - KOOL, A. J.: Plant regeneration of protoplasts from different cultivars of melon (*Cucumis melo*). Cucurbit Genet. Coop. Rep., 14, 1991, s. 78-80.
- CALLEBAUT, A. - MOTTE, J. C. - CAT, W. DE: Substrate utilization by embryogenic and non-embryogenic cell suspension cultures of *Cucumis sativus* L. J. Pl. Physiol., 127, 1987, s. 271-280.
- COLIJN-HOOYMANS, C. M. - BOUWER, R. - DONS, J. J. M.: Plant regeneration from cucumber protoplasts. Pl. Cell Tissue Organ Cult., 12, 1988, s. 147-150.
- CUSTERS, J. B. M. - BERGERVOET, J. H. W.: *In vitro* adventitious bud formation on seedling and embryo explants of *Cucumis sativus* L. Cucurbit Genet. Coop. Rep., 7, 1984, s. 2-4.
- DEAKIN, J. R. - BOHN, G. W. - WHITAKER, T. W.: Interspecific hybridization in *Cucumis*. Econ. Bot., 25, 1971, s. 195-211.
- DIRKS, R. - MARJAN VAN BUGGENUM: Regeneration of plants from mesophyll protoplasts of haploid and diploid *Cucumis sativus* L. Physiol. Plant., 82, 1991, A18. (Poster Abstr.)
- DRYANOVSKA, O. A.: Induced callus *in vitro* from ovaries and anthers of species from *Cucurbitaceae* family. C. R. Acad. Bulg. Sci., 38, 1985, s. 1243.
- DUMAS DE VAULX, R. - CHAM BONNET, D. - POCHARD, E.: Culture *in vitro* d'anthères de piment (*Capsicum annum* L.): amélioration des taux d'obtention de plantes chez différents génotypes par des traitements à +35 °C. Agronomie, 1, 1981, s. 859-864.
- DVOŘÁK, M. - ČERNOHORSKÁ, J.: Peroxidases of different parts of the pumpkin plant (*Cucurbita pepo* L.). Biol. Plant., 9, 1967, s. 308-316.
- FASSULIOTIS, G.: Self-fertilization of *Cucumis metuliferus* Naud. and its cross-compatibility with *C. melo*. J. Amer. Soc. hort. Sci., 102, 1977, s. 336-339.
- GOTTLIEB, L. D.: Electrophoretic evidence and plant systematic. Ann. Missouri Bot. Gard., 64, 1977, s. 161-180.
- GOTTLIEB, L.: Electrophoretic evidence and plant population. In: REINHOLDT, L. et al. (eds): Progress in phytochemistry, 7, New York, Pergamon 1981.
- HANDLEY, L. W. - CHAMBLISS, O. L.: *In vitro* propagation of *Cucumis sativus* L. Hort Sci., 14, 1979, s. 22-23.
- CHATTERJEE, M. - MORE, T. A.: Techniques to overcome barrier of interspecific hybridization in *Cucumis*. Cucurbit Genet. Coop. Rep., 14, 1991, s. 66-68.
- CHEE, P. P.: High frequency of somatic embryogenesis and recovery of fertile cucumber plants. Hort Sci., 25, 1990, s. 792-793.

- CHEE, P. P.: Somatic embryogenesis and plant regeneration of squash *Cucurbita pepo* L. cv. YC 60. Pl. Cell Rep., 9, 1991, s. 620-622.
- CHEE, P. P. - TRICOLI, D. M.: Somatic embryogenesis and plant regeneration from cell suspension cultures of *Cucumis sativus* L. Pl. Cell Rep., 7, 1988, s. 274-277.
- CHU, C. C. - WANG, C. C. - SUN, C. S. - HSU, C. - YIN, K. C. - CHU, C. Y. - BI, F. Y.: Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. Sci. Sin., 18, 1975, s. 659-668.
- KIRKPATRICK, D. J. - DECKER, D. S. - WILSON, H. D.: Allozyme differentiation in the *Cucurbita pepo* complex: *C. pepo* var. *medullosa* vs. *C. texana*. Econ. Bot., 39, 1985, s. 289-299.
- KNAAP B. J. VAN DER - RUITER, A. C. DE: An interspecific cross between cucumber (*Cucumis sativus*) and muskmelon (*Cucumis melo*). Cucurbit Genet. Coop. Rep., 1, 1978, s. 6-8.
- KNERR, L. D. - STAUB, J. E. - HOLDER, D. J. - MAY, B. P.: Genetic diversity in *Cucumis sativus* L. assessed by variation at 18 allozyme coding loci. Theor. appl. Genet., 78, 1989, s. 119-128.
- LAZARTE, J. E. - SASSER, C. C.: Asexual embryogenesis and plantlet development in anther culture of *Cucumis sativus* L. Hort Sci., 17, 1982, s. 88.
- LEBEDA, A. - KRŠTKOVÁ, E.: Genetická variabilita tykvoovitých zelenin a její využití ve šlechtění. Genet. Šlecht., 39, 1993 (v tisku).
- LOY, J. B.: Comparison of the effectiveness of BA and AVG in promoting fruit set in muskmelon. Cucurbit Genet. Coop. Rep., 5, 1982, s. 23.
- MALEPSZY, S.: Cucumber (*Cucumis sativus* L.). In: BAJAJ, Y. P. S. (ed.): Biotechnology in agriculture and forestry, 6. Berlin and Heidelberg, Springer-Verlag 1988, s. 277-293.
- MORENO, V. - ZUBELDIA, L. - ROIG, L. A.: A method for obtaining callus cultures from mesophyll protoplasts of melon (*Cucumis melo* L.). Pl. Sci. Lett., 34, 1984, s. 195-201.
- MURASHIGE, T. - SKOOG, F.: A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant., 15, 1962, s. 474-497.
- NIEMIROWICZ-SZCZYTT, K. - DUMAS DE VAULX, R.: Preliminary data on haploid cucumber (*Cucumis sativus* L.) induction. Cucurbit Genet. Coop. Rep., 12, 1989, s. 24-25.
- NIEMIROWICZ-SZCZYTT, K. - WYSZOGRODZKA, A.: Embryo culture and *in vitro* pollination of excised ovules in the family *Cucurbitaceae*. In: NOVAK, F. J. (ed.): Use of tissue cultures in plant breeding, Proc. Int. Symp. Olomouc, 6-11 Sept., 1976, s. 571-576.
- NIJS, DEN A. P. N. - CUSTERS, J. B. M.: Introducing resistances into cucumbers by interspecific hybridization. In: BATES, D. M. - ROBINSON, R. W. - JEFFREY, Ch. (eds): Biology and utilization of the *Cucurbitaceae*, Comstock Publ. Assoc., Cornell Univ. Press, Ithaca and London, 1990, s. 382-396.
- PERL-TREVES, R. - ZAMIR, D. - NAVOT, N. - GALUN, E.: Phylogeny of *Cucumis* based on isozyme variability and its comparison with plastome phylogeny. Theor. appl. Biol., 71, 1985, s. 430-436.
- PUCHALSKI, J. T. - ROBINSON, R. W.: Electrophoretic analysis of isozyme in *Cucurbita* and *Cucumis* and its application for phylogenetic studies. In: BATES, D. M. - ROBINSON, R. W. - JEFFREY, Ch. (eds): Biology and utilization of the *Cucurbitaceae*, Comstock Publ. Assoc., Cornell Univ. Press, Ithaca and London, 1990, s. 60-76.
- RANGASWAMY, N. S.: Experimental studies on female reproductive structures of *Citrus microcarpa* Bunge. Phytomorphology, 11, 1961, s. 109-127.
- REUVENI, R. - SHIMONI, M. - KARCHI, Z.: A rapid assay for monitoring peroxidase activity in melon as a marker for resistance to *Pseudoperonospora cubensis*. J. Phytopath., 129, 1990, s. 333-338.

- ROBINSON, R. W. - PUCHALSKI, J. T. - RUITER, A. C. DE: Isozyme analysis of the megurk. *Cucurbit Genet. Coop. Rep.*, 2, 1979, s. 17-18.
- RUITER A. C. DE: Interspecific cross between cucumber (*Cucumis sativus*) and muskmelon (*Cucumis melo*). *Eucarpia*, Montfavet-Avignon, 1973, s. 77-78.
- RUTE, T. N. - BUTENKO, R. G. - MAURINIA, H. K.: Vlijanieuslovi vyraszcvania na morfo-genez apikalnych meristemov rastenij ogurca v kulture *in vitro*. *Fiziol. Rast.*, 25, 1978, s. 556-563.
- SAUTON, A.: Effect of season and genotype on gynogenetic haploid production in muskmelon, *Cucumis melo* L. *Sci. Hort.*, 35, 1988, s. 71-75.
- SCHWARZ, H. M. - BIEDRON, S. I. - HOLDT, M. M. VON - REHM, S.: A study of some plant esterases. *Phytochemistry*, 3, 1964, s.189-200.
- SMITH, P. G. - VENKAT RAM, B. R.: Interspecific hybridization between muskmelon and cucumber. *J. Hered.*, 45, 1954, s. 24.
- WEEDEN, N. F. - ROBINSON, R. W.: Isozyme studies in *Cucurbita*. In: BATES, D. M. - ROBINSON, R. W. - JEFFREY, Ch. (eds): *Biology and utilization of the Cucurbitaceae*. Comstock Publ. Assoc., Cornell Univ. Press, Ithaca and London, 1990, s. 51-59.

Biotechnological methods in breeding of cucurbit vegetables

The spread of genetic diversity of cucumber (*Cucumis sativus*) is in a close correlation to the solving of the problem of inter-specific hybridization within the genus *Cucumis*. Classical methods were not successful till now to obtain fertile hybrid plants. As a prospective the use of some biotechnological methods seems to be in this direction. This is mainly the case of embryocultures and the fusion of protoplasts. In this association, the use of some biochemical methods seems to be very purposeful, e.g. the study of a spectrum of isoenzymes as genetic markers. Inter-specific hybridization between *C. sativus* and *C. melo* is now considered as the most important. Its successful materialization should lead to the formation of materials with resistance to the number of serious diseases of cucumbers, especially downy mildew of cucurbits (*Pseudoperonospora cubensis*) and powdery mildew (*Erysiphe cichoracearum* and *Sphaerotheca fuliginea*).

Ing. Aleš Lebeda, CSc.,
SEMO, Šlechtitelská stanice zelenin, 798 17 Smržice

Upozornění pro přispěvatele a čtenáře časopisu
ROSTLINNÁ VÝROBA

Pro lepší zpřístupnění výsledků našeho výzkumu zahraničí rozhodla redakční rada časopisu Rostlinná výroba uveřejňovat prioritní vědecké práce v anglickém jazyce. Práce musí být do redakce zaslána v angličtině (za jazykovou správnost odpovídá autor), bude obsahovat krátké anglické resumé a bude doplněna rozšířeným českým, resp. slovenským souhrnem.

Dále upozorňujeme autory i čtenáře, že příspěvky uveřejňované v češtině, resp. slovenštině budou obsahovat krátký český, resp. slovenský souhrn a rozšířený, podrobně zpracovaný anglický souhrn (s odkazy na tabulky a obrázky) v rozsahu ca dvou rukopisných stran, který si autoři dodají přímo v angličtině. Zároveň budou uveřejňovány anglické ekvivalenty všech popisů tabulek a obrázků.

Redakční rada časopisu Rostlinná výroba otevírá možnost též zahraničním přispěvatelům publikovat v časopise Rostlinná výroba.

Doufáme, že se tato opatření setkají s příznivým ohlasem jak autorů, tak i čtenářů našeho časopisu.

Redakce časopisu

PŘEDBĚŽNÉ SDĚLENÍ

PYLOVÁ EMBRYOGENEZE A PRODUKCE HAPLOIDŮ U PÍCNÍCH TRAV

J. Janeček

Využití haploidů a homozygotních linií ve šlechtění nových odrůd pícních trav je mimořádně lákavé. U diploidních a polyploidních cizosprašných druhů trav je možné na haploidní úrovni analyzovat založení geneticky podmíněných znaků mnohem lépe a bezprostředněji. Po převodu haploidů na homozygotní linie a jejich následné analýze lze provádět záměrné křížení a výběry nejvhodnějších potomstev. Haploidní genotypy mohou být také ideálním zdrojem protoplastů pro parasexuální hybridizaci, genové manipulace, přenos genů a získávání transgenozních rostlin. Z tohoto důvodu patří rostlinné biotechnologie ve šlechtění píce ke strategickým oblastem (N i j s , E l g e r s m a , 1991).

První pokus o získání haploidů z prašníkových kultur jílku vytrvalého byl proveden před 20 lety (C l a p h a m , 1970). Do roku 1987 byly použity různé způsoby získávání haploidů (aplikace gametocidů, kultivace celých květenství a jejich částí, kultury prašníků a mikrospór); užívané postupy však vedly k negativním výsledkům nebo byly ojediněle získány kompletní, převážně albinotické rostliny (A n d e r s e n et al., 1991). Obdobný stav byl také u nás (J a n e č e k , 1991).

Díky mimořádnému úsilí mnoha týmů pracujících s obilninami a novým postupům (X u , 1990) se však situace změnila, což umožnilo získávat haploidy v širším měřítku také u pícních trav.

V současné době nejefektivnějším postupem získávání haploidů trav je indukce pylové embryogeneze v kulturách prašníků a jednojaderných mikrospór (O l e s e n et al., 1988; B o p p e n m e i e r et al., 1989, J a n e č e k , 1991; O p s a h l - F e r s t a d , 1991). Pylovou embryogenezi však ovlivňuje řada faktorů (složení kultivačních médií, genotyp, předpůsobení, vývojové stadium mikrospór, pozice prašníků atd.). Ty mají významný vliv na získání dostatečného množství zelených haploidů a jejich následné využití ve šlechtění.

Předmětem tohoto sdělení je analýza současného stavu ve světě i u nás.

PRINCIPY A FAKTORY PYLOVÉ EMBRYOGENEZE

Diferenciace mikrospór, dělení jader a následný vývoj haploidního kalusu nebo přímá indukce pylové embryogeneze *in vitro* se u jílků, kostřav a jejich hybridů liší od vývoje mikrospór *in vivo* (R o s e et al., 1987b). U trav, tak jako u jiných druhů,

byl prokázán polymorfismus při vývoji mikrosfér pylových zrn a dimorfismus z hlediska velikosti a vytváření mikrosfér s diploidním, neredukovaným počtem chromozómů (S a l a et al., 1991). Pylová zrna se podle počátečního dělení a dalšího vývoje mohou vyvíjet v podmínkách *in vitro* různými způsoby, které jsou ve svém průběhu značně shodné se schémata, uváděnými u obilnin (R o s e et al., 1987b; B a j a j, 1990). Vlastní pylová embryogeneze *in vitro* je podmíněna celou řadou faktorů.

Genotyp

Významná genotypová závislost byla pozorována ve všech pracích a u všech studovaných druhů trav. A n d e r s e n et al. (1991) dosáhli v Dánsku hybridizací responzivních genotypů jílku vytrvalého zvýšení této schopnosti v potomstvech 10 až 50krát s produkcí 11 až 59 zelených rostlin na 100 prašníků. Genetická podmíněnost tohoto znaku byla vysoká (57 až 73 % z celkové variability) a podařilo se kombinovat geneticky podmíněnou schopnost vytvářet pylová embrya a regenerovat zelené rostliny a současně dosáhnout odpovídajícího stupně dominance pro oba znaky.

Po testování 65 norských genotypů *L. perenne* bylo prokázáno, že existují průkazné rozdíly mezi genotypy v jednotlivých populacích, avšak nikoliv mezi celými populacemi, a že všechny genotypy by mohly být responzivní (O p s a h l - F e r s t a d, 1991).

B o p p e n m e i e r et al. (1989) při testování 33 genotypů jílku vytrvalého získali osm producentů zelených rostlin s velmi výraznými rozdíly v produkci pylových embryí a regeneraci zelených a albinotických rostlin mezi genotypy. Pylová embryogeneze byla použita k získání donorů rezistence k BYDV (virové zakrslosti ječmene). Rovněž O l e s e n et al. (1988) zjistili, že mezi 30 di- a tetraploidními genotypy jílku vytrvalého jsou značné rozdíly jak z hlediska responzibility prašníků a mírou vytváření embryí, tak i regeneraci zelených rostlin a tyto znaky spolu vzájemně nesouvisí.

Původ a podmínky pěstování donorových rostlin

U genotypů jílku vytrvalého, kultivovaných v polních podmínkách, bylo dvakrát více embryí na prašník než u těch, které byly před odběrem pěstovány ve skleníku (O l e s e n et al., 1988). Lepší reakce prašníků byla u rostlin pěstovaných při 20 °C než u rostlin pěstovaných při 25 až 28 °C (R o s e et al., 1987a). Při pěstování donorových rostlin jílku mnohokvětého ve skleníkových podmínkách v zimním období byly získány pylovou embryogenezí jen albinotické rostliny (J a n e č e k, nepubl.), ale u donorových rostlin jílku vytrvalého, košťavy rákosovité a hybridů *Lolium x Festuca*, pěstovaných v polních podmínkách s přirozenou jarovizací, byly získány kompletní zelené i albinotické rostliny (J a n e č e k, 1991). B o p p e n m e i e r et al. (1989) dosáhli dobrých výsledků u rostlin jílku vytrvalého pěstovaných v polních podmínkách i u těch, které byly jarovizovány v komoře při 2 až 3 °C v režimu 8/16 světlo/tma tři měsíce a přeneseny do normálních podmínek do režimu 14/10.

Předpůsobení

Rozsáhlejší studie o vlivu předpůsobení u jílků, košťavy luční a hybridů *Lolium x Festuca* realizovali R o s e et al. (1987a), kteří stanovili závislosti délky předpůsobení vzhledem k užitému typu média a genotypu. Optimální délka předpůsobení byla u *L. temulentum* a *F. pratensis* 28 dnů při 7 °C, pro hybridy *Lolium x Festuca* 21 až 42 dnů při 4 °C. Při sledování vývoje mikrospór u těchto druhů prokázali, že délka předpůsobení má značný vliv na vývoj určitých částí stěny prašníku a následně na aktivaci vývoje mikrospór, které jsou s touto stěnou v kontaktu. Tento vliv se uplatnil v podmínkách jak *in vivo*, tak *in vitro*.

Většina prací však uvádí předpůsobení 2 až 5 dnů při 4 °C. Jak vyplynulo ze srovnání, jednotlivé genotypy reagovaly na délku předpůsobení chladem 4 až 7 °C velmi rozdílně. Některé genotypy jílku vytrvalého reagovaly velmi dobře i bez předpůsobení (B a n t e et al., 1990), hybridy *Lolium multiflorum x Festuca arundinacea* po 2 dnech (J a n e č e k , 1991). O l e s e n et al. (1988) uvádějí pro dánské genotypy jílku vytrvalého 3 až 5 dnů při 3 až 5 °C a R o s e et al. (1987a) 5 až 14 dnů pro košťavu luční. U některých genotypů se s prodlužující délkou předpůsobení embryogeneze výrazně snižovala (R o s e et al., 1987b).

Vývojové stadium mikrospór

Nejčastěji jsou ke kultivaci užívány ty prašníky, jejichž mikrospóry se nacházejí ve středním až pozdním jednojaderném stadiu vývoje; (O l e s e n et al., 1988; B o p p e n m e i e r et al., 1989; A n d e r s e n et al., 1991). V některých případech byly použity jednojaderné mikrospóry ve velmi raném stadiu, prakticky po jejich uvolnění z tetrad (J a n e č e k , 1991). R o s e et al. (1981a) zjistili, že jednojaderné mikrospóry ve středním stadiu vývoje se po 21 dnech předpůsobení změnilly na dvoujaderné s následným rozdílným typem vývoje, souvisejícím s dimorfismem mikrospór. Po 3 dnech kultivace se mikrospóry vyvíjely typem A nebo C se zřetelnými rozdíly mezi jednotlivými klásky. Rovněž v rámci klásků byl sledován různý typ vývoje mikrospór s tím, že jeden převládal nad ostatními. U některých genotypů jílku byl zjištěn v souvislosti s pylovým dimorfismem vývoj neredukovaných diploidních pylových zrn (až 100 %), což může být příčinou heterogenity pylu (S a l a et al., 1989) a příčinou rozdílné rezpozivity. Rovněž spontánní diploidizace haploidů nemusí být tak častá, neboť rostliny by mohly vznikat i z neredukovaných diploidních mikrospór.

Složení kultivačního média

Většina úspěšných experimentů uskutečněných v poslední době vycházela z nových formulí složení kultivačního média. Agar byl doplněn bramborovým extraktem, případně nahrazen škrobem nebo gerlitem. Sacharóza byla často nahrazena maltózou. Pro kultivaci prašníků jílku vytrvalého se osvědčila média s 90 g/l ječného škrobu pro indukční médium a s gerlitem pro dopěstování embryí (B o p p e n m e i e r et al., 1989), která svým složením vycházela z médií užívaných pro obilniny. O p s a h l - F e r s t a d (1991) vyzkoušela média 109-2 a P II doplněná různými koncentracemi

aktivního uhlí, přičemž nejlepší pro tvorbu embryoidů bylo médium 109-2, naproti tomu nejvíce zelených rostlin bylo odvozeno na médiích P II s 2 g aktivního uhlí. Na médiích LS a LS-Bante nebyla tvorba embryoidů vůbec zaznamenána. Média s agarózou, sladinkovým extraktem a gerlitem byla použita pro kultivaci prašníků jílku vytrvalého, kostřavy rákosovité a hybridů *Festuca x Lolium* (J a n e č e k , 1991). Jako vhodné se ukázalo pouze médium s gerlitem a maltózou. Kultivace mikrospór jílku vytrvalého v tekutých médiích doplněných ficollem v atmosféře CO₂ je zkoušena v současné době v Nizozemí (B o u t e r , os. sděl.) a postup vychází z údajů získaných u pšenice.

Pro indukci pylové embryogeneze byla užita média pro obilniny bez jakýchkoliv změn ve složení růstových regulátorů - P II (O l e s e n et al., 1988) nebo bylo složení modifikováno. B o p p e n m e i e r et al. (1989) užili pro indukci pylové embryogeneze u jílku médium FOROUGH-WEHR, u kterého byla IAA nahrazena 2 mg/l NAA. Pro regeneraci rostlin bylo použito totéž médium s 1 mg/l NAA a 0,4 mg/l BAP se 30 g/l sacharózy a 0,2 % gerlitu. R o s e et al. (1987a, b) použili médium doplněné 1,5 mg/l 2,4 D a 0,5 mg/l kinetinu. J a n e č e k (1991) použil médium s gerlitem a maltózou doplněné 0,5 mg/l NAA, 0,5 mg/l dicamby (DC) a 1 mg/l BAP pro indukci pylové embryogeneze u hybridů *Lolium x Festuca* a jílku mnohokvětého (J a n e č e k , nepubl.). Pro regeneraci rostlin bylo použito médium N₆ s 0,2 mg/l 2,4 D, 45 g/l maltózy, 15 g/l sacharózy a 1,6 % gerlitu.

Vhodná média mohou u responzibilních genotypů vést ke zvýšené produkci embryí. Jak uvedla O p s a h l - F e r s t a d (1991), na modifikovaných médiích bylo u jílku získáno 900 až 1500 embryí na 100 prašníků, zatímco na klasických médiích (L i n s m a i e r , S k o o g , 1965) a LS-BANTE (B a n t e et al., 1990) nebyla vytvořena žádná embrya nebo jich bylo jen velmi málo.

Kultivační podmínky

V kulturách prašníků jílku vytrvalého byl sledován vliv kultivační teploty (B o p p e n m e i e r et al., 1989). Po čtyřtýdenní kultivaci prašníků *L. perenne* při 22 a 30 °C byly mezi genotypy zjištěny značné rozdíly. Nárůst kalusů a lepší diferenciaci zelených rostlin byla u některých genotypů lepší při 22 °C, u jiných při 30 °C. Nejčastěji byly prašníky kultivovány v temnu a teplotě 24±2 °C po 4 až 6 týdnů, pylová embrya a zelené rostliny pak na světle při stejné teplotě.

Embryogeneze a regenerace rostlin, problém albinismu

Jak bylo uvedeno, na vytváření pylových embryí a následnou regeneraci rostlin má značný vliv genotyp, předpůsobení a složení kultivačního média. Geneticky podmíněná responzivita pro tvorbu kalusů, míra vytváření pylových embryí a produkce zelených rostlin jsou znaky na sobě nezávislé. Hybridizace vysoce embryogenních genotypů a producentů zelených rostlin však může vést k výraznému zvýšení podílu zelených

roślin na 100 prašníků (A n d e r s e n et al., 1991). Produkce zelených rostlin je výslednicí tří veličin: produkce embryí na 100 prašníků, regenerace rostlin na 100 prašníků a procenta zelených rostlin na 100 prašníků.

Přestože po roce 1987 nastal přelom v regeneraci rostlin z prašníků, častý výskyt albinismu limituje využití androgenetických rostlin v praktickém šlechtění. O l e s e n et al. (1988) získali u jílku vytrvalého 463 zelených rostlin, což představovalo 3,6 % z celkového počtu odvozených rostlin a 1 až 2 zelené rostliny na 100 prašníků. O p s a h l - F e r s t a d (1991) získala u jílku 75 % albinotických rostlin a 8 zelených rostlin na 100 prašníků. J a n e č e k (1991) získal u hybridů *Lolium x Festuca* 38 zelených rostlin (73 %), což představovalo 6,9 rostlin na 100 prašníků. Jak bylo uvedeno, v Dánsku byl tento problém částečně vyřešen hybridizací vysoce embryogenních genotypů spolu s producenty zelených rostlin a v potomstvu byly nalezeny genotypy produkující až 59 zelených rostlin na 100 prašníků.

Cytologie a segregace lokusů izoenzymových markerů

Cytologické analýzy regenerantů z prašníkových kultur ukázaly, že většina rostlin byla haploidních. O l e s e n et al. (1988) uvádějí, že z androgenetických rostlin bylo 50 až 60 % spontánně diploidních, 50 až 40 % zůstalo haploidních. U spontánních diploidů bylo prokázáno, že šlo o dihaploidizaci (H a y w a r d et al., 1990). B o p p e n m e i e r et al. (1989) udávají, že u jílku vytrvalého bylo 70 % haploidů, 29 % diploidů, 1 rostlina byla tetraploidní, 1 triploidní a pár polyploidních. J a n e č e k (1991) zjistil, že všechny rostliny získané z prašníkových kultur hybridů jílku a kostřavy byly haploidní (dihaploidní) s počtem chromozómů $n=14$. O p s a h l - F e r s t a d (1991) zjistila, že 80 % zelených rostlin jílku, které byly zkoumány, bylo haploidních.

Na základě segregace izoenzymových systémů PGI, GOT a EST u donorových a získaných rostlin bylo prokázáno, že většina diploidů pocházejících z heterozygotních donorových rostlin byla homozygotní (H a y w a r d et al., 1990), avšak segregace alel neodpovídala očekávanému mendelistickému štěpení. U různých donorových rostlin byly selektovány různé alely tak průkazně, že lze předpokládat vazbu mezi geny pro schopnost regenerovat zelené rostliny, letálními geny a alelami izoenzymových systémů. O p s a h l - F e r s t a d (1991) na základě analýzy zelených rostlin pomocí PGI a GOT zjistila, že některé diploidní rostliny byly heterozygotní a některé měly jinou strukturu zymogramů než donorové. J a n e č e k , D o l e ž a l (1992) zjistili u rostlin odvozených z prašníkových kultur hybridů jílku a kostřavy, že zelené i albinotické rostliny bylo možno zařadit do čtyř základních skupin na základě podobnosti spekter EST, které však nekorespondovaly s jejich začleněním do tří morfologicky odlišných typů. V souvislosti s častým výskytem spontánních diploidů u jílku je zajímavá práce (S a l a et al., 1989) upozorňující na častý výskyt neredukovaných $2n$ pylových zrn (u některých genotypů až 100 %). V některých případech by mohly být spontánně diploidizované rostliny vlastně dihaploidy.

MOŽNÝ VLIV NA ŠLECHTITELSKÉ POSTUPY, ŠLECHTĚNÍ A PĚSTOVÁNÍ TRAV

Na základě hybridizace vybraných, vysoce responzivních genotypů a analýzy jejich potomstev bylo prokázáno, že schopnost produkce zelených haploidů pylovou embryogenezi byla ve srovnání s výchozími genotypy 10 až 50krát vyšší (Halberg et al. - cit. Andersen et al., 1991). Snaha o přenos responzibility z vysoce responzivních genotypů tzv. induktorů do hospodářsky významných genotypů by prakticky znamenala, že by bylo možné získávat haploidy od všech požadovaných genotypů. Tím by zároveň bylo umožněno zvýšení schopnosti indukovat pylovou embryogenezi i u induktorů.

Haploidní genotypy cizosprašných druhů píceňích trav mají pro šlechtění nových odrůd mimořádný význam pro relativně rychlé získání homozygotních linií. Při použití metod genetického inženýrství je přenos genů a detekce jakýchkoliv změn na haploidní úrovni mnohem jednodušší a snazší. Velký význam má i negativní selekce letálních a semiletálních genů a jejich vazbových skupin z výchozích materiálů. To by mohlo vést ke zvýšení vitality nových odrůd.

Literatura

- ANDERSEN, S. B. - OLESEN, A. - HALBERG, N. - MADSEN, S.: Haploids in grasses based on knowledge from cereals. In: NIJS, A. P. - ELGRSMA, A. (eds): Fodder crop breeding: Achievements, novel strategies and biotechnology. Proc. 16th Meet. Fodder Crop Sect. Eucarpia, Pudoc Wageningen, 1991, s. 129-133.
- BANTE, I. - SONKE, T. - TANDLER, R. F. - BRUEL, A. M. van der - MEIJER, E. M.: Anther culture of *Lolium perenne* and *Lolium multiflorum*. Acta Bot. Neerl., 39, 1990, č. 1, s. 103.
- BAJAJ, Y. P. S.: Biotechnology in agriculture and forestry 12. Haploids in crop improvement I., Berlin - Heidelberg, Springer-Verlag 1990.
- BOPPENMEIER, J. - ZUCHNER, S. - FOROUGH-WEHR, B.: Haploid production from barley draw virus resistant clones of *Lolium*. Pl. Breed., 103, 1989, s. 216-220.
- CLAPHAM, D.: *In vitro* development of callus from the pollen of *Lolium* and *Hordeum*. Z. Pfl.-Zücht., 65, 1970, s. 285-292.
- HAYWARD, M. D. - OLESEN, A. - DUE, I. K. - JENKINS, R. - MORRIS, P.: Segregation of isozyme marker loci amongst androgenetic plants of *Lolium perenne* L. Pl. Breed., 104, 1990, s. 68-71.
- JANEČEK, J.: Factors affecting pollen embryogenesis in grasses. Sci. Stud. Res. Inst. Fodder Plants, Troubsko, 12, 1991, s. 41-46.
- JANEČEK, J. - DOLEŽAL, K.: Production of complete plants from pollen embryos of *Lolium* x *Festuca* hybrids and their assay by EST isozymes. Proc. XIIIth Eucarpia Meet., Angers, France, 1992, s. 169-170.
- LINSMAIER, E. M. - SKOOG, F.: Organic growth requirements of tobacco tissue culture. Physiol. Plant., 18, 1965, s. 100-127.
- NIJS, A. P. - ELGRSMA, A. (eds): Fodder crop breeding: Achievements, novel strategies and biotechnology. Proc. 16th Meet. Fodder Crop Sect. Eucarpia, Pudoc Wageningen, 1991.

- OLESEN, A. - ANDERSEN, S. B. - DUE, I. K.: Anther culture response in perennial ryegrasses (*Lolium perenne* L.). Pl. Breed., 101, 1988, s. 60-65.
- OPSAHL-FERSTAD, H.-G.: Androgenetic response in *Lolium perenne*: 90 genotypes screened, cold pretreatment, 5 media. In: NIJS, A. P. - ELGRSMA, A. (eds): Fodder crop breeding: Achievements, novel strategies and biotechnology. Proc. 16th Meet. Fodder Crop Sect. Eucarpia, Pudoc Wageningen, 1991, s. 199-200.
- ROSE, J. B. - DUNWELL, J. M. - SUNDERLAND, N.: Anther culture of *Lolium temulentum*, *Festuca pratensis* and *Lolium x Festuca* hybrids. I. Influence of pretreatment, culture medium and culture incubation conditions on callus production and differentiation. Ann. Bot., 60, 1987a, s. 191-201.
- ROSE, J. B. - DUNWELL, J. M. - SUNDERLAND, N.: Anther culture of *Lolium temulentum*, *Festuca pratensis* and *Lolium x Festuca* hybrids. II. Anther and pollen development *in vivo* and *in vitro*. Ann. Bot., 60, 1987b, s. 203-214.
- SALA, C. A. - COMARDO, E. L. - SALABERRY, M. T. - MENDIBURU, A. O.: Cytological mechanism of $2n$ pollen formation and unilateral sexual polyploidization in *Lolium*. Euphytica, 43, 1989, s. 1-8.
- XU, Z.-H.: Barley (*Hordeum vulgare* L.): Anther culture and production of haploids. In: BAJAJ, Y. P. S. (ed.): Biotechnology in agriculture and forestry 12. Haploids in crop improvement I. Berlin - Heidelberg, Springer-Verlag 1990, s. 125-175.

Pollen embryogenesis and haploid production in herbage grasses

The contribution summarizes the knowledge obtained till now, the present state and prospects of production and the use of haploids in herbage grasses. The effect of different factors limiting the pollen embryogenesis and achieving the haploids is commented on the results proper and the literature data. The use of haploids in breeding is discussed in conclusion.

RNDr. Josef Janěček, CSc.,
Univerzita Palackého, přírodovědecká fakulta, 771 46 Olomouc

Dear contributors and readers of

PLANT PRODUCTION

Pay attention to the following information

For better availability of results of our research to foreign readers, the editorial board of the journal *Rostlinná výroba* - Plant Production has made a decision on priority publishing of scientific papers and contributions in English. The contribution should be sent to the editor's address written in English (the author is responsible for language correctness), containing short summary in English and supplement with enlarged Czech or Slovak summaries.

We draw readers' and contributors' attention to the fact that contributions published in Czech or Slovak should contain brief Czech or Slovak summaries, and enlarged detailed English summary (with references to tables and figures), within the extent of about two pages, submitted by authors directly in English. At the same time, text of tables and figures will also be in English.

The editorial board of the journal *Rostlinná výroba* will enable foreign contributors to publish their papers in this journal.

We hope that this information will be much appreciated both by the authors and readers of our journal.

Editorial Staff

VYUŽITÍ BIOTECHNOLOGICKÝCH POSTUPŮ PŘI PRODUKCI SADBY BRAMBOR V ČESKÉ REPUBLICE

F. Novák, A. Krpálková

Získávání výchozího materiálu v podmínkách *in vitro* přináší řadu výhod, pro které se tato metoda uplatnila při produkci sadby brambor v rozvinutých i rozvojových zemích světa. V některých zemích (Dánsko, Kanada aj.) je získáván výchozí materiál pro množení brambor z rostlin *in vitro* úplně, v jiných zemích (Nizozemí, SRN) z podstatné části.

Biotechnologické metody se začaly ve vyspělých zemích světa uplatňovat při množení sadby brambor v 70. letech. Přestože u nás první práce v této oblasti byly zahájeny již v 60. letech, první praktické výsledky s využitím tkáňových kultur byly získány ve VÚB v Havlíčkově Brodě až v posledních deseti letech. Nejprve byly ověřeny metody ozdravování od virů, mikropropagace a kultivace *in vitro*, později byly rozpracovány postupy při vedení rostlin v technických izolátech, kontrola zdravotního stavu a kontrola pravosti množných meriklonů.

Od roku 1991 je v provozu nové pracoviště biotechnologií VÚB v Havlíčkově Brodě. Na tomto pracovišti jsou vytvořeny předpoklady pro uchovávání genotypů brambor v podmínkách *in vitro*, pro tvorbu nových genotypů a pro množení výchozího materiálu pro produkci sadby brambor. Z pracoviště jsou oděbratelům dodávány rostliny *in vitro*, zakořeněné rostliny v původním substrátu a hlízy z technických izolátů. Skutečnou produkci zakořeněných zkumavkových rostlin intenzivního množení odrůd a kříženců v roce 1992 udává tab. I.

Je předpoklad, že roční produkce rostlin brambor se bude na pracovišti biotechnologií VÚB v Havlíčkově Brodě dále zvyšovat. Množení brambor v podmínkách *in vitro* zahájily ve spolupráci s tímto pracovištěm i další firmy.

I. Produkce rostlin brambor zakořeněných ve skleníku na pracovišti biotechnologií VÚB Havlíčkův Brod v roce 1992

Odběratelé rostlin	Počty rostlin (tis. kusů)
Šlechtitelské stanice	54
Ostatní zemědělské podniky	146
Rostliny pro produkci hlíz na vlastním pracovišti	37

Do roku 1992 byl hlízový materiál z tkáňových kultur po přemnožení v polních podmínkách přihlašován k uznávacímu řízení pouze na šlechtitelských stanicích. Rozsah těchto ploch je uveden v tab. II.

II. Plochy porostů přihlášené k uznávacímu řízení ve stupni S1 na šlechtitelských stanicích ze základního materiálu původem z tkáňových kultur (TK)

Rok	Výměra porostů S1 z TK (ha)	Přihlášené plochy S1 celkem (ha)	Podíl ploch S1 z TK (%)
1989	5,0	128,8	3,88
1990	23,5	97,5	24,10
1991	16,5	133,4	12,37
1992	40,7	207,8	19,59

V roce 1992 byly k uznávacímu řízení přihlášeny první plochy přímo u zemědělských družstev a soukromých zemědělců, které byly osázeny hlízami sklizenými z technických izolátů. Postupně se i na šlechtitelských stanicích vytvářejí technické podmínky k tomu, aby porosty přihlašované ve stupni S1 byly vysazovány přímo z hlíz sklizených z technických izolátů. Všechny šlechtitelské stanice rovněž využívají možnosti získat využitím tkáňových kultur rozsáhlý zdravý výchozí materiál pro množení nově povolených odrůd.

Z uvedeného je zřejmé, že po období ověřovacích pokusů v 80. letech se na začátku 90. let prosazuje využití tkáňových kultur při produkci sadby brambor v České republice již jako standardní metoda. Díky jejímu využití a zdokonalení je možné zvýšit kvalitu sadby u nás.

*Ing. František Novák, CSc.,
Výzkumný ústav bramborářský, 580 03 Havlíčkův Brod*

BIOTECHNOLOGIE - VÝZKUM A VYUŽITÍ VE ŠLECHTĚNÍ KULTURNÍCH ROSTLIN

A. Horák

Pod výše uvedeným názvem byl v ČR v roce 1991 otevřen nový resortní výzkumný úkol (R 329 103) financovaný z dotací MZe ČR a z vlastních zdrojů řešitelských pracovišť. V této souvislosti vzniká otázka (1), jak a kdy nové techniky v molekulární biologii naváží na úspěch tradičního šlechtění u krmných a potravinářských plodin, nebo (2), zda tyto techniky přispějí k rozšíření plodin produkujících zajímavé a průmyslově využitelné finální produkty (energie, vlákna, olej).

Česká republika díky relativně dostatečným, v minulosti někdy však nesprávně cíleným investicím do výzkumu rostlinných biotechnologií dnes disponuje sítí fungujících a poměrně stabilizovaných biotechnologických laboratoří roztroušených zejména v tzv. plodinových výzkumných ústavech, ale i v ústavech České akademie věd, na některých vysokých školách i ve šlechtitelských stanicích. Výzkumný úkol R 329 103 tato pracoviště strukturálně propojuje na horizontální úrovni, netvoří definitivně uzavřené schéma, ale naopak představuje dynamický model umožňující jeho managementu pohotově reagovat na věcné, organizační a finanční podněty. Projekt je profilován tak, aby výstupy ať již ve formě nových šlechtitelských materiálů či experimentálních metod adresně sloužily potřebám nejen vědy jako takové, ale i praktickému šlechtění. *Ad hoc* sestavené týmy se soustředily na cíleně vybraný soubor objektů polních, ovocných, okrasných a lesních rostlin (dřevin) v devíti dílčích úkolech:

- Genetické inženýrství ve šlechtění obilnin (VÚRV, Praha - Ruzyně),
- Výzkum a využití biotechnologických metod pro tvorbu výchozích šlechtitelských materiálů luskovin (VÚTPL, Šumperk),
- Cílená tvorba pícnin technikami genetického inženýrství (VÚP, Troubsko),
- Metody explantátových kultur, buněčných a genových manipulací - aplikace ve šlechtění technických plodin (VÚTPL, Šumperk),
- Rostlinné biotechnologie ve šlechtění bramboru (VÚB, Havlíčkův Brod),
- Buněčné a genové manipulace v genetice a šlechtění zeleniny (*Allium*, *Brassica*) a řepy (VŠÚZ, Olomouc),
- Rostlinné biotechnologie ve šlechtění ovocných rostlin (VŠÚO, Holovousy),
- Využití explantátových kultur, buněčných a genových manipulací ve šlechtění okrasných rostlin (VÚOZ, Průhonice),

- Využití explantátových kultur, buněčných a genových manipulací při množení a šlechtění lesních stromů a při záchraně genofundu lesních dřevin (VÚLHM, Jíloviště - Strnady).

Podle dostupných informací (M i l b o u r n , 1992) se ve světě zatím podařilo geneticky transformovat asi 30 rostlinných druhů (včetně jedné třetiny hlavních plodin). Prakticky využitelné výsledky jsou však poměrně úzce vymezeny: jde spíše o toleranci k herbicidům (např. řepky olejky a cukrovky ke glyphosatu), virům a hmyzu než o dosahování vyšších výnosů či zlepšené kvality. Přitom úspěšnější jsou experimenty s dvouděložnými rostlinami jako brambor, rajče, sója a bavlník. Jednoděložné rostliny (obilniny) se obtížněji modifikují, jsou komplikovanější z hlediska stability genů a jednotlivé znaky jsou determinovány komplexem multigenních faktorů.

Teprve za 10 až 25 let zřejmě genetické inženýrství pozitivně ovlivní výnosy a kvalitu plodin. Za strategické záměry jsou považovány:

- modifikace růstu kořenů a zvýšení suchovzdornosti,
- zvýšení produkce celkové biomasy jako výsledku účinnější fotosyntézy,
- manipulace s vázanými mastnými kyselinami u některých olejnin mírného pásma pro využití v olejářském, farmaceutickém a chemickém průmyslu,
- rozšíření nepotravního využití pomocí modifikací plodin jako hrách, brambor a cukrovka k náhradě pektinů, škrobu a cukrů v průmyslových procesech,
- transfer fixace dusíku do komerčně užitkových obilnin, který si však podle předpovědi odborníků vyžádá ještě alespoň 30 let,
- tvorba rostlin jako zdrojů biomasy pro produkci papíru, paliv a škrobu.

Práce uveřejněné v čísle 2/1993 časopisu Rostlinná výroba dokumentují úroveň výzkumu rostlinných biotechnologií v ČR zaměřených na aplikace ve šlechtění.

*Ing. Antonín H o r á k , CSc.,
Výzkumný ústav technických plodin a luskovin, 787 01 Šumperk*

OBSAH - CONTENTS

Biotechnologie v rostlinné výrobě - Biotechnologies in plant production

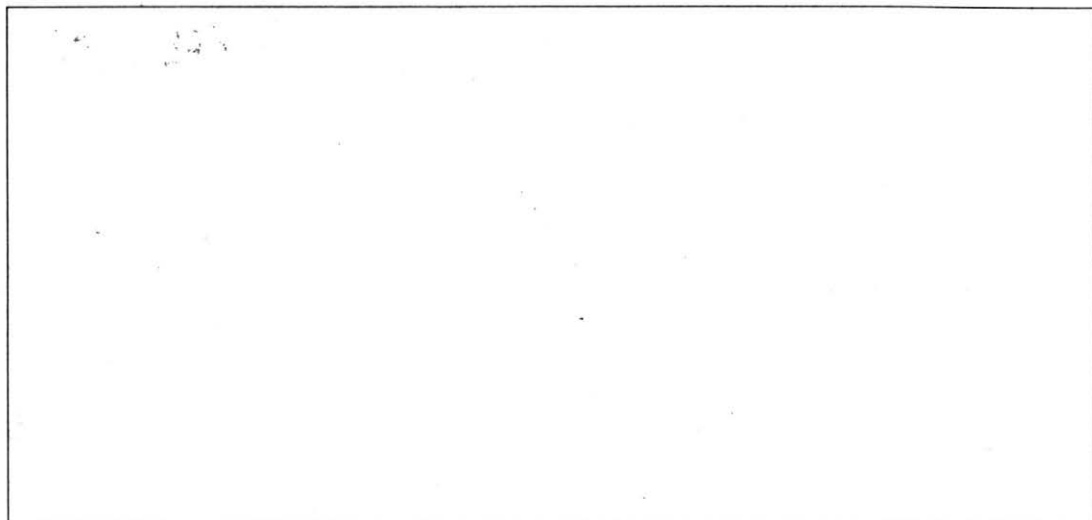
Vagera J., Ohnoutková L.: Indukce androgeneze <i>in vitro</i> u pšenice a ječmene - <i>In vitro</i> induction of androgenesis in wheat and barley.	97
Kalantidis K., Griga M.: Mikropropagace fazolu obecného (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) indukci tvorby mnohonásobných prýtů - Micropropagation of common bean (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) by multiple shoot induction.	115
Vyvadilová M., Zelenková S., Tomášková D., Košner J.: Diploidizace a cytologická kontrola haploidů <i>Brassica napus</i> L. - Diploidization and cytological control of <i>Brassica napus</i> L. haploids.	129
Kostřica P., Domkářová J.: Možnosti nepřímého určení úrovně ploidie u regenerantů bramboru <i>in vitro</i> - Possibilities of indirect determination of the ploidy in potato regenerants <i>in vitro</i>	139
Cikánek D., Luhový M., Navrátil M.: Imunochemické stanovení delta-endotoxinu <i>Bacillus thuringiensis</i> - Immunochemical determination of <i>Bacillus thuringiensis</i> delta-endotoxin.	149
Novák K., Škrdleta V., Němcová M., Lisá L.: Symbiotické znaky, růst a klasifikace nodulačních mutantů hrachu - Symbiotic traits, growth and classification of pea nodulation mutants.	157

PŘEDBĚŽNÉ SDĚLENÍ - PRELIMINARY REPORT

Lebeda A., Křístková E., Kubaláková M., Havlícký T., Vagera J., Binarová P.: Biotechnologické metody ve šlechtění tykvovitých zelenin - Biotechnological methods in breeding of cucurbit vegetables.	171
Janeček J.: Pylová embryogeneze a produkce haploidů u píceň trav - Pollen embryogenesis and haploid production in herbage grasses.	181

INFORMACE - INFORMATION

Novák F., Krpálková A.: Využití biotechnologických postupů při produkci sadby brambor v České republice.	189
Horák A.: Biotechnologie - výzkum a využití ve šlechtění kulturních rostlin.	191



Vědecký časopis ROSTLINNÁ VÝROBA ● Vydává Česká akademie zemědělských věd a Slovenská akadémia pôdohospodárskych vied - Ústav zemědělských a potravinářských informací ● Vychází měsíčně ● Redaktorka: RNDr. Eva Stříbrná ● Redakce: Slezská 7, 120 56 Praha 2, tel.: 02/257541 ● Sazba: Studio DOMINO - ing. Jakub Černý, Popovice 144, 267 01 Králův Dvůr, tel.: 0311/22959 ● Tisk: OSTRAVSKÉ TISKÁRNY, Novinářská 7, 709 70 Ostrava 1 ● © Ústav zemědělských a potravinářských informací, Praha 1993

Rozšiřuje PNS. Informace o předplatném podá a objednávky přijímá každá administrace PNS, doručovatel tisku a Administrace centralizovaného tisku, Kafkova 19, 160 00 Praha 6.