

TVORBA NOVÝCH GENOTYPŮ S VYUŽITÍM MAS (MARKER ASSISTED SELECTION) V ROCE 2020 A 2021

CREATION OF NEW GENOTYPES USING MAS (MARKER ASSISTED SELECTION) IN 2020 AND 2021

Renata ŠVECOVÁ, Jiří PTÁČEK, Jaroslava DOMKÁŘOVÁ

Výzkumný ústav bramborářský Havlíčkův Brod, s.r.o.

ŠVECOVÁ, R. – PTÁČEK, J. – DOMKÁŘOVÁ, J.

TVORBA NOVÝCH GENOTYPŮ S VYUŽITÍM MAS (MARKER ASSISTED SELECTION) V ROCE 2020 A 2021

Vědecké práce – Výzkumný ústav bramborářský Havlíčkův Brod, 2025, 31: 61–69

Podařilo se získat charakterizované hybridní materiály. Tyto materiály budou použity v dalších letech k testování na vybrané vlastnosti, k morfologickému hodnocení a k dalšímu zpětnému křížení. Perspektivní materiály budou po ustálení daných vlastností převedeny do genové banky Výzkumného ústavu bramborářského v Havlíčkově Brodě.

zpětné křížení; genetické zdroje; molekulární markery

ÚVOD

Rod *Solanum* obsahuje více než 1000 druhů, které se vyskytují po celém světě. Kulturní brambor *S. tuberosum* ($2n = 4x = 48$) je vegetativně množený druh s tetrasomickou dědičností a vysokou hladinou heterozygotnosti. Bohužel kvůli těsnému vztahu mezi odrůdami je genetická báze moderních odrůd poměrně omezená. Naopak plané druhy *Solanum*, z nichž většina je diploidní ($2n = 2x = 24$), představují výrazně větší zdroj alelové diverzity, než je diverzita u standardních odrůd. Mají také řadu hodnotných znaků, včetně rezistence vůči biotickým a abiotickým stresům (CARPUTO *et al.*, 1997).

Vzdálená hybridizace má mnoho zvláštností, na které musí brát genetici a šlechtitelé zřetel, a které musí znát. Především je typická obtížnějším získáváním hybridů, nízkou fertilitou nebo úplnou sterilitou a rovněž má složitější charakter dědění znaků a vlastností v potomstvu (KOVÁČIK *et al.*, 1983).

Genetické zdroje bramboru tedy představují biologickou rozmanitost tvořenou jak planými a kulturními druhy, tak i odrůdovou skladbou této plodiny. Genetická diverzita existujícího genofondu bramboru je prakticky hlavním zdrojem (pomineme-li indukované mutace) genů a genových komplexů pro další zlepšování rostlin (HAWKES, 1991).

Hlízotvorné *Solanum*, které představuje kulturní brambor a jeho plané příbuzné druhy, je velice diverzní skupina s taxony rozšířenými od Nebrasky, USA, po jižní konec Chile, pokrývající pobřežní pouště i výšiny And (HAWKES, 1990).

Pomocí DNA markerů je možné stanovit rozdíly ve struktuře genomu na základě odlišností (polymorfismu) v sekvencích DNA nesených dvěma nebo více jedinci. Polymorfismus DNA je možné detekovat pomocí různých technik, zde využíváme RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA = náhodně amplifikovaná polymorfní DNA). Ta je založena na amplifikaci genomové DNA metodou PCR za použití krátkých oligonukleotidů (obvykle dekamerů) náhodné sekvence. Výsledkem tohoto procesu je vznik různých amplifikačních produktů, které tvoří na elektroforeogramu charakteristický obraz a ten je možné hodnotit. Metoda RAPD je schopná odhalit polymorfismus i v regionech DNA, u nichž není známá sekvence, funkce nebo lokalizace na chromozomu, přičemž dědičnost analyzovaných znaků je dominantní (PENNER, 1996). Výhodou metody je bezesporu snadnost, rychlost a technická nenáročnost. Navíc variabilita zjištěná pomocí RAPD je poměrně vysoká. Zřejmě proto je metoda hojně využívána při identifikaci a studiu genomů různých druhů kulturních rostlin např. rýže (MARTIN *et al.*, 1997), rajčat, pšenice, fazolí (BAI *et al.*, 1997), mrkve (NAKAJIMA *et al.*, 1997) a jiných. Co se týče druhu *S. tuberosum*, zde je metoda používána a rozvíjena řadu let. Mezi první publikace o úspěšném využití RAPD při identifikaci odrůd je možné zařadit práce DEMEKE *et al.* (1993) nebo HOSAKA *et al.* (1994). Brzy poté se „fingerprinting“ stává součástí celkové charakteristiky nově zaváděných odrůd (LYNCH *et al.*, 1994).

Cílem práce bylo zhodnocení nových genotypů z mezidruhových hybridů, které vznikly klasickým zpětným křížením mezidruhový hybrid (z předešlých generací) x odrůda, pomocí molekulárních metod a využití molekulárních markerů k ověření rezistencí vybraných genotypů planých druhů bramboru z genové banky VÚB.

MATERIÁL A METODY

ČÁST 1 – ZPĚTNÉ KŘÍŽENÍ

Tvorba nových genotypů v roce 2020 byla zaměřena na zpětné křížení: mezidruhový hybrid (z předešlých generací) x odrůda. Mezidruhové hybridy (pracovně označované R13-R19) se postupně získávali v předešlých letech klasickým recipročním křížením ve skleníku, kde se využívaly plané a kulturní druhy rodu *Solanum*, perspektivní tetraploidní kříženci, odrůdy a dihaploidy *Solanum tuberosum*. Plané a kulturní druhy rodu *Solanum*, které se úspěšně podílely na vzniku mezidruhových hybridů, jsou nositeli nejrozličnější řady rezistencí k chorobám, škůdcům a abiotickým faktorům.

Do skleníkových podmínek byla vyseta semena (1126) získaná z křížení klasickými postupy v roce 2019. U vybraných vzešlých rostlin z jednotlivých kombinací byly odebrány vzorky k izolaci DNA a pomocí RAPD byla hodnocena hybridnost. U hybridních materiálů se testovala přítomnost vybraných genů rezistence pomocí DNA markerů.

Ve skleníku bylo vysazeno vybrané množství potvrzených mezidruhových hybridů z předešlých let hlavně jako udržovací materiál pro zpětná křížení. Jednalo se o 42 hlíz mezidruhových hybridů (pracovně označované R12-R16) získané při křížení ve skleníku v letech 2011-2015. Dále 69 hlíz mezidruhových hybridů (označované R17) získané při křížení v roce 2016, 53 hlíz mezidruhových hybridů (označované R18) získané při křížení 2017 a 149 hlíz mezidruhových hybridů (označované R19) získané při křížení 2018. U vybraných mezidruhových hybridů (R12, R13, R14, R15, R16, R17, R18, R19) byly hodnoceny morfologické hospodářské vlastnosti rostlin a hlíz.

Tvorba nových genotypů v roce 2021 byla zaměřena na zpětné křížení: mezidruhový hybrid (z předešlých generací) x odrůda. Mezidruhové hybridy (pracovně označované R13-R20) se postupně získávali v předešlých letech klasickým recipročním křížením ve skleníku, kde se využívaly plané a kulturní druhy rodu *Solanum*, perspektivní tetraploidní kříženci, odrůdy a dihaploidy *Solanum tuberosum*. Plané a kulturní druhy rodu *Solanum*, které se úspěšně podílely na vzniku mezidruhových hybridů, jsou nositeli nejrozličnější řady rezistencí k chorobám, škůdcům a abiotickým faktorům.

Do skleníkových podmínek byla vyseta semena (1137) získaná z křížení klasickými postupy v roce 2020. U vybraných vzešlých rostlin z jednotlivých kombinací byly odebrány vzorky k izolaci DNA a pomocí RAPD byla hodnocena hybridnost. U hybridních materiálů se testovala přítomnost vybraných genů rezistence pomocí DNA markerů.

Ve skleníku bylo vysazeno vybrané množství potvrzených mezidruhových hybridů z předešlých let hlavně jako udržovací materiál pro zpětná křížení. Jednalo se o 175 hlíz mezidruhových hybridů (označované R20) získané při křížení v roce 2019, 55 hlíz mezidruhových hybridů (označované R19) získané při křížení 2018, 36 hlíz mezidruhových hybridů (označované R18) získané při křížení 2017 a 36 hlíz (označované R17) získané při křížení 2016. U vybraných mezidruhových hybridů (R17-R20) byly hodnoceny morfolo-gické hospodářské vlastnosti rostlin a hlíz.

ČÁST 2 – SEMENÁČE

Semena získaná ze zpětného křížení v roce 2019 byla vyseta ve skleníku. Celkem se vyselo 1126 semen od 24 kombinací křížení, z toho se podařilo přesadit 458 rostlinek od 24 kombinací křížení. Pro testování pomocí PCR metod bylo vybráno 93 hybridů od 24 kombinací, které vznikly recipročním křížením mezidruhový hybrid (z předešlých generací) x odrůda a 18 rodičovských genotypů. Semena hybridů byla vyseta ve skleníkových podmínkách, vzešlé rostlinky s dostatečným kořenovým systémem byly přepikýrovány do květináčů. U semenáčů ve stáří 8 týdnů byly odebrány zdravé listy na izolaci DNA. Do testování byl zahrnut úspěšný rodičovský materiál při křížení, který zahrnoval tetraploidního křížence, mezidruhové hybridy a odrůdy *S. tuberosum*. Odrůdy, tetraploidní kříženec a mezidruhové hybridy byly vysazeny do nádob (4l zeminy – směs rašeliny a kompostu v poměru 2 : 1) a pěstovány ve skleníku standardním způsobem. U rodičovského materiálu byly rovněž odebrány zdravé listy na izolaci DNA. Z každé kombinace křížení byli vybráni 1- 4 kříženci pro izolaci DNA, na následnou RAPD k porovnání vzniklých profilů kříženců a jejich rodičů. U materiálů z roku 2018 bylo zjištěno, že 89 kříženců od 23 kombinací je hybridních. U jednotlivých hybridních materiálů se testovala přítomnost vybraných genů rezistence pomocí DNA markerů. Ve skleníku se podařilo u těchto testovaných materiálů sklídit celkem 75 kříženců (pracovně označené R19) od 23 kombinací, u kterých byla prokázána hybridnost RAPD.

Semena získaná ze zpětného křížení v roce 2020 byla vyseta ve skleníku. Celkem se vyselo 1137 semen od 12 kombinací křížení, z toho se podařilo přesadit 195 rostlinek od 12 kombinací křížení. Pro testování pomocí PCR metod bylo vybráno 41 hybridů od 12 kombinací, které vznikly recipročním křížením mezidruhový hybrid (z předešlých generací) x odrůda a 14 rodičovských genotypů. Semena hybridů byla vyseta ve skleníkových podmínkách, vzešlé rostlinky s dostatečným kořenovým systémem byly přepikýrovány do květináčů. U semenáčů ve stáří 8 týdnů byly odebrány zdravé listy na izolaci DNA. Do testování byl zahrnut úspěšný rodičovský materiál při křížení, který zahrnoval tetraploidního křížence, mezidruhové hybridy a odrůdy *S. tuberosum*. Odrůdy, tetraploidní kříženec a mezidruhový hybrid byly vysazeny do nádob (4l zeminy – směs rašeliny a kompostu v poměru 2 : 1) a pěstovány ve skleníku standardním způsobem. U rodičovského materiálu byly

rovněž odebrány zdravé listy na izolaci DNA. Z každé kombinace křížení byli vybráni 1- 4 kříženci pro izolaci DNA, na následnou RAPD k porovnání vzniklých profilů kříženců a jejich rodičů. U materiálů z roku 2020 bylo zjištěno, že 42 kříženců od 12 kombinací je hybridních. U jednotlivých hybridních materiálů se testovala přítomnost vybraných genů rezistence pomocí DNA markerů. Ve skleníku se podařilo u těchto testovaných materiálů sklídit hlízy celkem od 31 kříženců (pracovně označené R21) od 11 kombinací, u kterých byla prokázána hybridnost RAPD.

ČÁST 3 – KLONOVÉ GENERACE

Do skleníkových podmínek bylo vysazeno 160 kříženců mezidruhových hybridů (R12, R13, R14, R15, R16, R17, R18, R19) od 62 kombinací získaných klasickým křížením ve skleníku v roce 2011-2018. U těchto materiálů byly sledovány morfolo-gické charakteristiky rostlin a hlíz s využitím „Klasifikátoru - genus *Solanum* L.“. Vybrané genotypy byly zařazeny do zpětného křížení (viz Část 1).

Do skleníkových podmínek bylo vysazeno 118 kříženců mezidruhových hybridů (R17-R20) od 62 kombinací získaných klasickým křížením ve skleníku v letech 2016-2019. U těchto materiálů byly sledovány morfolo-gické charakteristiky rostlin a hlíz s využitím „Klasifikátoru - genus *Solanum* L.“. Vybrané genotypy byly zařazeny do zpětného křížení.

Část mezidruhových hybridů označených jako R20 byla zařazena do klasického šlechtění. 10 genotypů (R20) bylo vysazeno v polních podmínkách pod tzv. A klony, kde se bonitovaly jednotlivé ukazatele dle platného klasifikátoru („Klasifikátor - genus *Solanum* L.“). Bonitace každého z genotypů byly pečlivě zaznamenávány do polních sešitů. Hodnocení bylo prováděno v pravidelných časových odstupech v závislosti na hlavních růstových bodech rostliny. Důležité znaky, které se sledovaly: sázení – datum, počet hlíz, vzcházení – datum, stejnoměrnost, energie růst, porost – celkový dojem, vyrovnanost, květ – počátek květu, barva, množství, bobule, choroby, plíseň, datum zrání. Na základě morfolo-gického posouzení hlíz a stanovení stolní hodnoty budou tyto genotypy dále zařazeny ve šlechtitelském programu do tzv. klonů B.

DNA byla extrahována z nadzemních částí rostlin pěstovaných ve skleníku pomocí komerční soupravy GeneElute Plant Genomic DNA Isolation Kit (Sigma).

Celý soubor byl testován pomocí DNA markerů a doplněn o pozitivní kontroly adekvátně k původu sledovaného genu rezistence.

Izolovaná DNA byla použita i k potvrzení či vyvrácení hybridnosti jednotlivých křížení metodou RAPD.

Amplifikační reakce byla uskutečněna v objemech 20 µl a obsahovala 200 ng templátové DNA, 10 µl FastStart PCR Master (Roche), 3,2 µM primeru (IDT) a vodu.

Použité primery:

P72	CGGCCACTGT
HEL3	GACGCTATCG

Reakce RAPD probíhala v termocykleru XP cyclor (Bioer), kde byl naprogramován následující průběh reakce: počáteční 3 min denaturace při 94 °C; následovalo 40 cyklů 1 min při 94 °C, 1 min 40 s při 37,5 °C a 2 min při 72 °C; závěrečným krokem bylo 10 min při 72 °C a následné chlazení na 4 °C. Elektroforéza byla provedena v 1,5% agarózovém gelu s ethidiumbromidem.

V roce 2020 byla provedena izolace DNA u 93 hybridů od 24 kombinací, které vznikly recipročním křížením (odrůda, dihaploid, hybrid z předešlých generací x odrůda, dihaploid *S. tuberosum* nebo hybrid z předešlých generací) a 18 rodičovských genotypů.

V roce 2021 byla provedena izolace DNA u 41 hybridů od 12 kombinací, které vznikly recipročním křížením (odrůda, dihaploid, hybrid z předešlých generací x odrůda, dihaploid *S. tuberosum* nebo hybrid z předešlých generací) a 14 rodičovských genotypů.

Detekce přítomnosti genů rezistence byla prováděna pouze u všech hybridních kombinací. Nadále byly používány tři DNA markery, které detekovaly přítomnost genů rezistence (*Hl*, *GroI* a *Sen1*) v genomu testovaných vzorků. Dále byly použity sady primerů (MORI *et al.*, 2011) pro gen *Rx1* (virus X bramboru), sada primerů pro gen rezistence *R2* (plíseň bramboru) a *Rychc* (PVY) a sada primerů pro marker rezistence k viru Y bramboru (*Ry_{sto}*, FLIS *et al.*, 2005)

Amplifikační reakce byla uskutečněna v objemech 20 µl a obsahovala 1 µl templátové DNA, 10 µl FastStart PCR Master (Roche), 0,5 µM primerů a vodu. PCR reakce probíhala v termocykleru XP-cycler (Bioer), kde byl naprogramován následující shodný průběh reakce pro všechny sady primerů: počáteční 3 min denaturace při 94 °C; následovalo 35 cyklů 40 s při 94 °C, 40 s při 55 °C a 60 s při 72 °C; závěrečným krokem bylo 5 min při 72 °C a následné chlazení na 4 °C. Elektroforéza byla provedena v 1,5% agarózovém gelu (TBE) s ethidiumbromidem.

VÝSLEDKY A DISKUSE

Tvorba mezidruhových hybridů klasickými cestami je složitá a dlouhodobá, proto každý takto získaný hybrid, který má alespoň částečně vyhovující stolní hodnotu, je považován za velmi cenný výchozí genetický materiál. Ve zpětném křížení v roce 2020 se podařilo získat semena, která vznikla recipročním křížením: odrůda *Solanum tuberosum* a těchto mezidruhových hybridů: R19.501/3 (187 semen), R19.504/22 (170 semen), R19.508/36 (197 semen), R19.515/88 (102 semen), R19.516/96 (80 semen), R19.517/99 (12 semen), R18.520/109 (31 semen), R19.522/124 (157 semen), R18.545/163 (8 semen), R13.534/126 (193 semen).

V roce 2020 byla provedena izolace DNA u 93 hybridů od 24 kombinací, které vznikly recipročním křížením (odrůda x hybrid z předešlých generací), a 18 rodičovských genotypů. DNA byla extrahována z nadzemních částí rostlin pěstovaných ve skleníku pomocí komerční soupravy GeneElute Plant Genomic DNA Isolation Kit (Sigma).

Celý soubor byl testován pomocí DNA markerů a doplněn o pozitivní kontroly adekvátně k původu sledovaného genu rezistence.

Bylo zjištěno, že 89 kříženců od 23 kombinací je hybridních.

Gen *Hl* pomocí markeru TG689 byl zjištěn u 69, gen *GroI* (marker GroI-4) u 78 hybridů a gen *Sen1* (marker N127) u 59 hybridů a gen *Rysto* (marker GP122) u 70 hybridů. Gen *R2* (marker R2-800), gen *Rx1* (marker PVX) a gen *Rychc* (marker Ry186) nebyl zjištěn u žádného.

Ve zpětném křížení v roce 2021 se podařilo získat semena, která vznikla recipročním křížením: odrůda *Solanum tuberosum* a těchto mezidruhových hybridů: R20.512/48 (44 semen), R20.516/64 (30 semen), R20.511/44 (45 semen)

V roce 2021 byla provedena izolace DNA u 41 hybridů od 12 kombinací, které vznikly recipročním křížením (odrůda x hybrid z předešlých generací) a 14 rodičovských genotypů. DNA byla extrahována z nadzemních částí rostlin pěstovaných ve skleníku pomocí komerční soupravy GeneElute Plant Genomic DNA Isolation Kit (Sigma).

Celý soubor byl testován pomocí DNA markerů a doplněn o pozitivní kontroly adekvátně k původu sledovaného genu rezistence.

Bylo zjištěno, že 41 kříženců od 12 kombinací je hybridních.

Gen *Hl* pomocí markeru TG689 byl zjištěn u 32, gen *GroI* (marker GroI-4) u 29 hybridů a gen *Sen1* (marker N127) u 25 hybridů a gen *Rysto* (marker GP122) u 29 hybridů. Gen *R2* (marker R2-800) byl zjištěn u 4 hybridů a gen *Rx1* (marker PVX) u 28 hybridů.

V rámci charakterizace vybraných položek z hlediska jejich využití pro MAS (marker assisted selection) jsme u genů *Hl*, *GroI*, *Sen1*, *Rx1*, *R2*, *Rysto* a *Rychc* využívali vhodné DNA markery, které dokážou spolehlivě daný gen determinovat. Je zde předkládán efektivní nástroj, jak se vyhnout provokačním zkouškám.

PODĚKOVÁNÍ

Práce vznikla díky institucionální podpoře na dlouhodobý koncepční rozvoj výzkumné organizace reg. č. MZE-RO1623 a Národnímu programu konzervace a využívání genetických zdrojů rostlin a agrobiodiversity MZE-62216/2022-13113/6.2.3.

LITERATURA

- BAI, Y. H. – MICHELS, T. E. – PAULS, K. P. (1997): Identification of RAPD markers linked to common bacterial blight resistance in *Phaseolus vulgaris* L. *Genome*, 40: 544–551.
- CARPUTO, D. – BARONE, A. – CARDI, T. – SEBASTIANO, A. – FRUSCIANTE, L. – PELOQUIN, S. J. (1997): Endosperm balance number manipulation for direct *in vivo* germplasm introgression to potato from a sexually isolated relative (*S. commersonii* Dun.). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Genetics*, 94: 12013–12017.
- DEMEKE, T. – KAWCHUK, L. M. – LYNCH, D. R. (1993): Identification of potato cultivars and clonal variants by random amplified polymorphic DNA analysis. *Am. Pot. J.*, 70: 561–570.
- Flis, B. – Hennig, J. – Strzelczyk-Żyta, D. – Gebhardt, C. – Marczewski, W. (2005): The *Ry-f_{sto}* gene from *Solanum stoloniferum* for extreme resistance to *Potato virus Y* maps to potato chromosome XII and is diagnosed by PCR marker GP122₇₁₈ in PVY resistant potato cultivars. *Mol. Breeding*, 15: 95–101.
- HAWKES, J. G. (1991): The importance of genetic resources in plant breeding. *Biological Journal of the Linnean Society*, 43: 3–10.
- HAWKES, J. G. (1990): *The Potato, Evolution, Biodiversity and Genetic Resources*. London: Belhaven.
- HOSAKA, K. – MORI, M. – OGAWA, K. (1994): Genetic relationships of Japanese potato cultivars assessed by RAPD analysis. *Am. Pot. J.*, 71: 535–546.
- KOVÁČIK, A. – HRAŠKA, Š. – MARŠÁLEK, L. – JANDURA, B. (1983): *Genetika rostlin*. Praha: Státní zemědělské nakladatelství. 488 s. ISBN 07-018-83.
- LYNCH, D. R. – SCHAUPMEYER, C. – KAWCHUK, L. M. – TARN, T. R. – REX, B. – HOLLEY, J. – WATERRER, D. – PANFORD, J. – PRITCHARD, M. K. (1994): AC Ptarmigan: An early maturing potato cultivar with good chipping and fresh market quality. *Am. Pot. J.*, 71: 387–393.
- MARTIN, C. – JULIANO, S. – NEWBURY, H. J. – LU, B. R. – JACKSON, M. T. – FORDLLOYD, B. V. (1997): The use of RAPD markers to facilitate the identification of *Oryza* species within a germplasm collection. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 44(2): 175–183.
- Mori, K. – Sakamoto, Y. – Mukojima, N. – Tamiya, S. – Nakao, T. – Ishii, T. – Hosaka, T. (2011): Development of a multiplex PCR method for simultaneous detection of diagnostic DNA markers of five disease and pest resistance genes in potato. *Euphytica*, 180: 347–355.
- NAKAJIMA, Y. – YAMAMOTO, T. – OEDA, K. (1997): Genetic variation of mitochondrial and nuclear genomes in carrots revealed by random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Euphytica*, 95: 259–267.
- PENNER, G. A. (1996): RAPD analysis of plant genomes. In: JAUHAR, P. P. (ed.): *Methods of genome analysis in plants*. Boca Raton: 251–268.

ŠVECOVÁ, R. – PTÁČEK, J. – DOMKÁŘOVÁ, J.

CREATION OF NEW GENOTYPES USING MAS (MARKER ASSISTED SELECTION) IN 2020 AND 2021

Vědecké práce – Výzkumný ústav bramborářský Havlíčkův Brod, 2025, 31: 61–69

Characterized hybrid materials were obtained. These materials will be used in the following years for testing for selected properties, for morphological evaluation and for further backcrossing. Promising materials will be transferred to the gene bank of the Potato Research Institute in Havlíčkův Brod after the given properties have stabilized.

backcrossing; genetic resources; molecular markers

Kontakt:

RNDr. Jiří PTÁČEK, CSc.

Výzkumný ústav bramborářský Havlíčkův Brod, s.r.o.

Dobrovského 2366

580 01 Havlíčkův Brod

Česká republika

tel.: +420 569 466 244

e-mail: ptacek@vubhb.cz

