

Agrotest fyto, s.r.o.

Nová metoda získávání hybridů pro potřeby šlechtění pšenice
(New method of obtaining hybrids for wheat breeding purposes)

Certifikovaná metodika

Petr Martinek

2018

Metodika byla certifikována Ústředním kontrolním a zkušebním ústavem zemědělským v Brně vydáním osvědčení č. 166508/2018 a jeho odsouhlasením Odborem vědy, výzkumu a vzdělání MZeČR.



Metodika je poskytována bezplatně a je veřejně přístupná na adrese
www.vukrom.cz

Metodika vznikla za finanční podpory projektu NAZV QJ1510206
Ministerstva zemědělství České republiky

Abstrakt

U pšenice (*Triticum aestivum* L.) běžná konvenční metoda křížení je založena na kastraci samčích pohlavních orgánů u mateřské rodičovské komponenty a na opylení ponechaných samičích pohlavních orgánů pylem vybrané otcovské komponenty. Je popsána nová metoda hybridizace využívající mutantní formu pšenice produkující tři pestíky (TP) v kvítku. TP mutace umožňuje vývoj až tří zrn v kvítku a je podmíněna jedním dominantním genem *Pis1* na chromozomu 2DL (Peng a kol., J. Appl. Gen., 49, 2008: 135-139). Rozvíjející se tři pestíky tlačí zevnitř na obalové vrstvy a tím vyvolávají otevřenost kvítků. Otevřené kvítky mohou být spontánně opyleny pylem okolních rostlin. Tohoto efektu je použito pro předkládanou metodu hybridizace. Vybranou "mateřskou populaci" s TP vyséváme do mezipásů mezi šlechtitelské pokusy (parcely), jež představují potenciální otcovské komponenty. Tato mateřská populace je spontánně opylena pylem z rostlin pěstovaných v okolních pokusech. Ve zralosti jsou sklizeny pouze TP-rostliny, jež jsou dobře viditelné v porostu. Sklizená zrna jsou směsí homozygotů a heterozygotů pro znak TP. V následující generaci heterozygoti štěpí na TP rostliny a normální rostliny v poměru 3:1. Rostliny s jedním pestíkem v kvítku jsou produktem spontánní hybridizace a mohou být použity v následném šlechtění. Zrna z TP-rostlin jsou obvykle menší a mohou být oddělena od normálních pomocí sít. Zrno z TP rostlin může být použito pro výsev další generace mateřské populace pro křížení s otcovskými rostlinami v dalším roce. Spontánní křížení vyžaduje synchronizaci doby kvetení. V naší praxi používáme spontánní hybridizaci s rostlinami s různými termíny kvetení rostoucími v okolních parcelách. V těchto případech nevíme, který z otcovských komponent byl opylovač. Pro studium úspěšnosti spontánního křížení je vhodné, aby mezi okolními otcovskými parcelami byly rovněž zařazeny linie pšenice s odlišnou barvou zrna. Například linie s purpurovým perikarpem nebo modrým aleuronem. Barevná zrna mohou být použita jako vizuální markery cizosprašení. Frekvenci alogamie lze posoudit podle zastoupení normálních rostlin bez TP. Výhodou navrhované metody je, že eliminuje klasickou kastraci a poskytuje velký počet hybridních zrn. Nevýhodou je, že přesně nevíme, kteří rodiče se účastnili hybridizace. S počtem let využívání této metody lze očekávat zvýšení jejího uplatnění.

Klíčová slova: pšenice setá, metoda hybridizace, tři pestíky, cizosprašnost, barevné zrno

Abstract

In wheat (*Triticum aestivum* L.) conventional hybridization method is based on the anthers emasculation of selected maternal component and its pollination by pollen of selected paternal component. The new method of hybridization based on the use of mutation producing three pistils (TP) in a floret has been described. TP allows development of up to three kernels in a floret. The TP mutation is determined by a single dominant gene *Pis1* on chromosome 2DL (Peng et al., J. Appl. Gen., 49, 2008: 135-139). The developing TP push on floret perianths and thus induce open flowering. The open florets may be spontaneously pollinated by surrounding plants' pollen. This effect is used for the proposed alternative hybridization method. Selected "maternal population", which represents mixture of plants with TP (TP-plants) is usually sown among the breeding plots into the roads. This maternal population is spontaneously pollinated by pollen from plants grown in the surrounding plots. At maturity, only the TP-plants which are well visible in the stand are harvested. Harvested grain is a mixture of homozygotes and heterozygotes for TP trait. The heterozygotes segregate to TP- and normal plants in a ratio of 3:1 in the next generation. The plants with one pistil in a floret are products of spontaneous hybridization and can be used in subsequent breeding. The grains from TP-plants are usually smaller and can be also particularly separated from the normal grains by the sieves. The harvested grain from remaining TP-plants can be used for sowing into the next generation – as a new "maternal population" for crossing with paternal forms during the next year. The success of cross-pollination depends on flowering synchronisation. In our practice we use the spontaneous hybridization with plants with different flowering time grown in surrounding plots. In these cases we don't know which paternal component was the pollinator. For the study of the spontaneous cross-pollination frequency, it is preferable to also sow lines with different colour of grain among the surrounding paternal plots, e.g., lines with purple pericarp or blue aleurone. This coloured grain can be used as a visual marker of cross-pollination. According to the frequency of normal plants without three pistils we can assume the effectivity of allogamy. The advantage of this method is that it eliminates classical castration and provides a large number of hybrid kernels. The disadvantage is that we do not know what kind of parents participated in the hybridization. The relevance of this method can be increased with the number of years of its use.

Keywords: common wheat, hybridization method, three pistils, cross-pollination, coloured grain

Obsah

1. CÍL UPLATNĚNÉ METODIKY	5
2. VLASTNÍ POPIS METODIKY	5
2.1 Úvod	5
2.2 Šlechtění a hybridizace.....	5
2.3 Hybridizace ve šlechtění pšenice a pletiva v zrna	7
2.4 Pšenice se třemi pestíky (TP) v kvítku jako rodičovský komponent navrhované metody	8
2.4.1 Objev a studium TP mutantů	8
2.4.2 Přeměna prašníků na struktury podobné pestíkům	9
2.4.3 Vytvoření ozimých forem pšenice s TP	10
2.5 Princip metody	11
2.6 Výběr mateřské komponenty.....	12
2.6.1 První rok: pěstování mateřské komponenty a její spontánní hybridizace	12
2.6.2 Druhý rok: pěstování následující (1.) generace.....	13
2.6.3 Třetí rok: pěstování následující (2.) generace	14
2.7 Využití zrna z TP-rostlin pro opakované cykly křížení	15
2.8 Regenerace mateřské populace	19
2.9 Genetické vztahy v samosprašné a cizosprašné populaci.....	19
2.10 Komentář k navrhované metodice a doporučení	20
3. SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ	21
4. POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY.....	21
5. EKONOMICKÉ ASPEKTY	21
6. SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY	22
7. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE	25
8. KONTAKTNÍ ADRESY OPONENTŮ, AUTORA A OSVĚDČENÍ O CERTIFIKACI.....	25

1. CÍL UPLATNĚNÉ METODIKY

Cílem metodiky je popsat novou metodu hybridizace pšenice seté (*Triticum aestivum* L.), jež je alternativou běžně využívanému klasickému kombinačnímu křížení u pšenice. Metoda je založena na zcela novém postupu získávání hybridů, využívající speciální formy pšenice, schopné vzhledem ke svému morfologickému uspořádání květních orgánů vykazovat částečnou cizosprašnost. Na rozdíl od běžného postupu, založeného na kastraci a umělém opylení, navržená metoda přináší některá specifika, která jsou popsána. Metoda umožňuje získávat velké množství hybridních zrn, jež jsou předpokladem pro využití v následném postupu liniového šlechtění.

2. VLASTNÍ POPIS METODIKY

2.1 Úvod

Pšenice setá (*Triticum aestivum* L.) je alohexaploidní druh mající 3 genomy B, A a D, pocházející z předchůdce dnešního *Aegilops speltoides* (B), *Triticum urartu* (A) a *Aegilops squarrosa* (D). Celkem má 42 somatických chromosomů, vyskytuje se v ozimé, jarní a přesívkové formě. Domovem pšenice je blízkovýchodní genové centrum, označované též jako oblast úrodného půlměsíce, odkud docházelo k postupnému rozšiřování pšenice do jiných částí světa. Nejstarší archeologické nálezy z doby před 19 tisíci lety dokládají, že plané formy pšenice se nacházely v blízkosti lidských ohnišť a zřejmě mohly být součástí potravy již pravěkého člověka (Damania a kol., 1988; Harlan, 1992). Oteplení, které nastalo před 12 – 10 tisíci lety, umožnilo rozvoj zemědělství a počátky domestikace pšenice. Stáří hexaploidní pšenice se podle archeologických vykopávek odhaduje asi na 10 tisíc let. Za tu dobu prošla pšenice řadou různých změn vedoucích k podstatnému zvýšení výnosů a užitkovosti až na úroveň současných odrůd. Jednou z těchto změn bylo prohloubení míry samosprašnosti, související s omezením distribuce genů do prostředí pouze na rozšiřování pomocí semen. To umožnilo eliminaci nekontrolovaného sprášení pylem z cizích rostlin a větší míru kontroly u vybíraného materiálu. Současná výnosová úroveň odrůd pšenice, její užitná hodnota, dobře zvládnutelná pěstební technologie a možnost dlouhodobého skladování produkce vedly k jejímu významnému rozšíření. V současnosti zaujímá největší pěstební plochy na světě, přičemž na ní závisí asi třetina lidské populace. Její poměrně vysoký obsah bílkovin a škrobu v zrna představuje důležitý zdroj živin pro lidskou výživu (statistiky FAO). Je nejvýznamnější surovinou pro výrobu mouky k využití v pekárnictví, pečivárnictví a těstárnictví. Lze jí využít ke krmným účelům, pro výrobu škrobu, bioethanolu, případně jako alternativní zdroj energie.

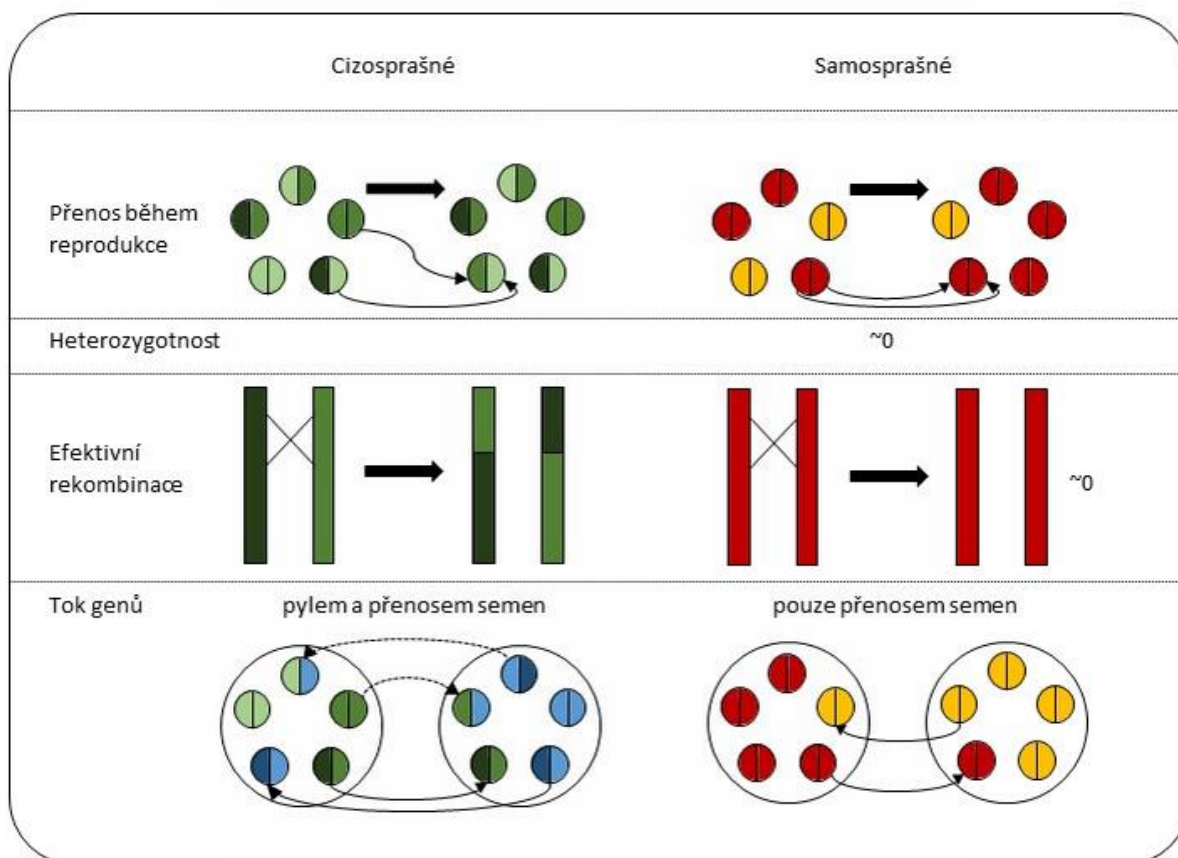
2.2 Šlechtění a hybridizace

Klasické šlechtění pšenice, založené na kombinačním křížení, vychází z vnitrodruhové nebo mezidruhové diverzity s cílem zkombinování vlastností zlepšujících užitnou hodnotu rodičovských komponent. V tomto procesu má velký význam dostatek vhodných genetických zdrojů. Kromě hybridizace existují i jiné metody pro zabudování požadovaných genů, jež využívají metod molekulární genetiky (transgenoze, editace genů CRISPR - Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats, které jsou v zemích EU považovány za genetické modifikace) a případně indukované mutagenese. Základním postupem však je kombinační křížení, jež nejlépe probíhá na úrovni homologních chromosomových sad.

Tvorba odrůd samosprašných rostlin je založena na výběru nejlepších rodičů s navzájem komplementárními pozitivními vlastnostmi, jejich hybridizaci, výběru požadované formy z hybridní populace a postupnému vytvoření požadované homogenní linie. Během tohoto procesu dochází ke

stabilizaci genotypu a vzniku homozygotů. Výsledkem je odrůda liniového typu, jež je charakteristická vysokou mírou homozygotnosti a fenotypové uniformity. Linie jsou souborem geneticky shodných jedinců, spíše výjimečně odrůda představuje směs několika geneticky odlišných linií stejného morfortypu. Zatímco pro plané druhy je typičtější cizosprašnost, zajišťující druhu možnost větší míry adaptace, u většiny starých domestikovaných plodin došlo k upevnění míry samosprašnosti. Vývoj samosprašných plodin z původně cizosprašných je nejčastějším z evolučních přechodů u oboupohlavních (hermafroditních) druhů rostlin a i zvířat (Burgarella a Glémin, 2017).

Oproti cizosprašným, samosprašení snižuje heterozygotnost (s každou generací míra heterozygotů klesá na polovinu), efektivní míru rekombinací (homologní rekombinace mezi geneticky shodnými chromosomy pozbývají smysl) a migrace genů (omezení na distribuci genotypů v prostředí pomocí semen, nikoli pylem), přičemž se výrazně zvyšuje genetický drift (ztráta alel z populace zvláště se snižujícím se počtem jedinců). Důsledkem samosprašnosti jsou pak druhy se sníženou a méně strukturovanou genetickou diverzitou, degradací genomu a nižším adaptačním potenciálem, protože toto méně odpovídá podmínkám běžným pro přírodní selekci (Obr. 1). Potenciálně nebezpečné důsledky genetické eroze představují velkou výzvu pro šlechtění pšenice. Šlechtitelský úspěch je podmíněn využitím vhodných genetických zdrojů, včetně cenných vlastností planých forem prostřednictvím vzdálené hybridizace. Přenos genů pocházejících z planých forem *Aegilops tauschii* lze provádět pomocí k tomuto účelu vytvořených syntetických pšenic (Mujeeb-Kazi a Hettel, 1995).



Obr. 1. Schéma rozdílů mezi cizosprašnými (alogamními) a samosprašnými (autogamními) organismy (upraveno podle Burgarella a Glémin, 2017)

Pšenice setá je silně autogamní, nicméně může u ní dojít k cizosprašení v případech, kdy selže samosprašení. U pšenice opylení probíhá kleistogamicky kdy prašníky dozrávají ještě před otevřením kvítků. Otvírání kvítků umožňující cizosprašení se vyskytuje zcela výjimečně a je navozováno extrémními

podmínkami prostředí. K otevírání kvítků dochází, pokud jsou zárodky neoplodněné. Neoplodněné zárodky výrazněji rostou, během kvetení tlačí na pleny (lodikuly) a plušku a tím otevírají kvítky. Nepřítomnost fertilního pylu není s tímto mechanismem přímo spojena. První fáze otevření kvítků během kvetení je krátká, a je vyvolána napnutím lodikuly. Některé pšeničné kvítky se mohou znovu za několik dní otevřít, což je označováno jako "druhé otevření", příčiny tohoto jevu nejsou dostatečně známy. U neoplodněných zárodků obalové vrstvy oplodí (perikarpu) neprocházejí degenerací, k jaké dochází u běžně se vyvíjejících zrn, ale místo toho zůstávají buňky prerikarpu neporušené a zvětšené. To vede ke zduření vaječníků, a tím může být navozeno otevření kvítků pro sprášení cizím pylem. To může přispět k šíření genetické rozmanitosti u samosprašných plodin (Okada a kol., 2018). Velikost kalichu květu u pšenice může ovlivnit hmotnost zrn (Millet, 1986).

Přestože samosprašování může vést k okamžitým výhodám (šlechtění samosprašných je snazší než u cizosprašných právě tím, že nevyžaduje věnovat pozornost šíření genů pomocí pylu a velmi efektivně se u pšenice podílelo na uskutečnění šlechtitelského pokroku označovaném „zelená revoluce“), nemusí být pro druh prospěšné a může vést k jeho zániku v delším časovém horizontu. Lidská činnost (například domestikace, chov, ekosystémové změny) tak mohou způsobovat systémové posuny v párování chromosomů v populaci, ovlivňovat její vývoj a potenciálně ohrožovat její životaschopnost.

Vyšlechtění výnosných odrůd pšenice a jejich relativně snadné pěstování umožnily zásobovat rostoucí lidskou populaci požadovanými zdroji energie, bílkovin a dalších důležitých látek. Velké rozšíření pšenice vedlo však i k postupnému prohlubování některých zdravotních problémů (celiakie a nespecifické alergické reakce na příjem lepku). Potřeba pestřejších potravin z pšenice byla motivací ke zvyšování zájmu o staré pšenice v posledních několika desetiletích. Domestikace pšenice, následovaná intenzivním šlechtěním v posledních dvou stoletích, vedla nejen ke zvýšení výnosů, ale též k určité stagnaci kvality zrna v důsledku tendence snížení obsahu bílkovin, vitamínů a minerálních látek v zrně. To také přispělo k poklesu rozmanitosti potravin kvůli ztrátě genetické variability oproti pšenicím z doby starověku, zvláště z oblastí Blízkého východu. Riziko genetické eroze nyní vyžaduje revitalizaci nerealizovaných potenciálů různých druhů rodu pšenice jako je jednozrnka, dvouzrnka, špalda a domestikovaní předci moderní tvrdé a seté pšenice (krajové odrůdy). Tito předkové by měli být využíváni za účelem maximalizace udržitelného zásobování obilními zdroji bílkovin (včetně nových bílkovinných podjednotek gluteninů a gliadinů), vlákniny, minerálů a dalších látek hlavně s antioxidačními vlastnostmi. Kromě toho může být využívána biologická rozmanitost staré pšenice k zajištění udržitelné produkce pšenice v kontextu klimatických změn a systémů ekologického zemědělství (Arzani a Ashraf, 2017).

2.3 Hybridizace ve šlechtění pšenice a pletiva v zrně

Hybridizace se provádí běžně pomocí křížení. Při ní se uplatňuje mechanická manipulace s pohlavními orgány, jež je prováděna v kontrolovaných podmínkách za použití izolátorů pro zabránění nežádoucího opylení. U pšenice, která je jednodomým oboupohlavním samosprašným druhem, je potřeba vybrat požadovaný mateřský a otcovský komponent a před vlastní hybridizací mateřský komponent zbavit samčích pohlavních orgánů kastrací. Kastrace se provádí v době, kdy prašníky nejsou dozrálé a jsou ještě zelené. Opylení se provádí v době, kdy je blizna zralá a je schopná přijmout pyl. Vlastní křížení může být prováděno na poli, ve skleníku nebo v laboratoři na odstřiženém stéble. Každý šlechtitelský podnik si obvykle přizpůsobuje metodiku křížení s ohledem na vlastní zkušenosti a tradice. Podrobný popis různých postupů křížení je popsán v certifikované metodice (Balounová a kol., 2010). Kromě běžného liniového šlechtění existuje rovněž hybridní šlechtění založené buď na využití gametocidů (chemických agens pro vyvolání sterility prašníků), případně pomocí cytoplasmatické pylové sterility.

U vyšších rostlin dochází ke dvojímu oplození. Ve zralém pylu existuje vegetativní a generativní buňka. Vegetativní buňka zajišťuje tvorbu pylové láčky, generativní diploidní buňka se rozdělí na dvě spermatické buňky, přičemž v průběhu oplození jedna splyne s vaječnou pohlavní buňkou a dá vzniknout

diploidnímu embryu (polovina genetické informace jádra + genetická informace cytoplasmy je obsažena ve vaječné buňce, jež je oplozena samčí spermatickou buňkou pylu, obsahující rovněž polovinu genetické informace jádra), druhá spermatická buňka splyne s diploidní buňkou zárodečného vaku a tím dá základ vzniku triploidního endospermu (vyživovacího pletiva pro zásobování rozvíjejícího se embrya v nejranějším stádiu jeho růstu) (Grando a de Morales-Fernandes, 1997). Pletiva vzniklá na základě dvojího oplození (diploidní embryo, triploidní endosperm) jsou v semeni na povrchu kryta osemením (testa) a oplodím (pericarp). Tato pletiva jsou vývojově zbytkem somatických pletiv pestíku a jsou tedy geneticky shodná s mateřskou rostlinou. Pletiva zrna vzniklá oplozením můžeme proto pokládat za následující generaci (Watanabe a kol., 2015).

2.4 Pšenice se třemi pestíky (TP) v kvítku jako rodičovský komponent navrhované metody

2.4.1 Objev a studium TP mutantů

U pšenice byla nalezena mutace umožňující zvýšení počtu zrn v kvítku. Jedná se o spontánní mutaci projevující se výskytem tří pestíků (three pistils TP) v kvítku (Obr. 2, Obr. 3). Pšenice nesoucí tuto mutaci lze označit názvem TP-pšenice (TP-wheat). Tato mutace zatím nemá praktické využití. Zřejmě první zmínka o její existenci pochází z roku 1983 (Chen a kol., 1983), kdy byla nalezena v populaci čínské krajové odrůdy. TP mutant se vyznačuje normální morfologií klasu, ale na rozdíl od běžných pšenic produkuje tři pestíky v kvítku (Tong a Tong, 1984). Kvítky TP-pšenice mají pluchu, plevu, dvě lodikuly, tři tyčinky a tři pestíky (Murai a kol., 2002). V jednom kvítku se mohou vyvinout až tři plodná zrna, což vede ke zvýšení počtu zrn klasu. Peng (2003) zjistil, že výskyt TP je podmíněn jediným dominantním genem. Peng a kol. (2004) tento gen označili *Pis1* a lokalizovali ho na chromosomu 5B za použití substitučních linií odvozených od odrůdy Chinese spring, kde každý chromosomových párů B, A a D byl nahrazen homoeologickým párem genu E^e , pocházejícím z *Lophopyrum elongatum* (Host) Löve. (Host). Pro svou analýzu ale použil poněkud neobvyklou metodu detekce, takže jeho výsledek lokalizace na chromosomu 5B se neshoduje s pozdějšími výsledky jiných autorů, kteří u téhož materiálu prokázali přítomnost genu *Pis1* na 2DL (Peng a kol., 2008; Wang a kol., 2007, 2009). Již v prvních publikacích (Chen a kol., 1983) jsou zmiňovány určité rozpory v dědičnosti znaku TP.

Projev TP byl rovněž pojmenován různým způsobem, například multi-ovary, tri-grain, multi-grain nebo multi-gynoecia a v literatuře se vyskytují různé údaje o genetickém založení vztahující se k těmto označením. Shen a kol. (1992a, b) určili, že multi-ovary je kontrolován geny s komplementárními účinky ($m1$ a $m2$) na krátkých ramenech chromosomu 5D a na chromosomu 6B za použití aneuploidní série chromosomů Chinese Spring. Wu a kol. (2000) zjistili různou expresi znaku multi-ovary v F_1 u reciprokých kříženců a na základě segregace v F_2 zjistili, že se jedná o recesivní znak řízený jedním genem. Cytoplasma rodičů pro znak multi-ovary způsobovala rozdílnou fenotypovou expresi v F_1 a F_2 generaci. Proto Ma a kol. (2000; 2002) studovali možnost využití multi-ovary pro tvorbu hybridní pšenice. Wang a kol. (2005) detekovali RAPD marker spojený s dominantním genem pro multi-ovary u pšenice. Wang a kol. (2007) zmapovali dominantní gen pro znak multi-grain. Uvádějí, že není dobře objasněno, který typ genů určuje fenotyp znaku multi-grain. Znak tri-grain byl řízen jediným dominantním genem, buď s ovlivněním cytoplasmatickými účinky (Wu a kol. 2000) nebo bez ovlivnění cytoplasmatickými účinky (Zhi a kol., 2002; Peng 2003; Ma a kol. 2006), případně byl podmíněn recesivními geny (Shen a kol. 1992a; Ma a kol. 2000). Geny pro znak tri-grain byly lokalizovány na chromosomech 5DS, 6BS a 6B pomocí monosomických a ditelosomických analýz (Shen a kol., 1992b; Ma a kol., 2000). Wang a kol. (2005) identifikovali jeden RAPD DNA marker ve vazbě na multi-gynoecia gen. Zvýšený počet pestíků byl rovněž nalezen u jedné linie *Tritipyrum* (mezirodový hybrid *Triticum durum* a *Thinopyrum bessarabicum*) jako výsledek působení dvou recesivních genů, kde jeden pochází z *T. durum* a druhý z *Th. bessarabicum* (Miller a kol., 2000). Lze tedy předpokládat, že existují rozdílné vzorky s projevem tří pestíků v kvítku způsobenými rozdílnými geny.

V roce 2004 přivezl Ing. Martinek do České republiky vzorek TP pšenice z Číny (Martinek, 2004), který zde získal osobně od profesora Zheng Song Penga (Peng a kol., 2003). Jednalo se o jarní bezosinnou pšenici. Projev výskytu tří pestíků v kvítku byl u tohoto získaného vzorku podmíněn jedním dominantním genem *Pis1* na dlouhém rameni chromosomu 2D (Peng a kol., 2008). Zřejmě stejný gen označený *Mg* (multi-gynoecia) byl popsán později na stejném chromosomu jinými autory (Wang a kol., 2009; Tiwari a kol., 2011). Podrobné mapování genu *Pis1* pomocí GBS-SNP (genotyping-by-sequencing single-nucleotide polymorphism) markerů a vytvoření podrobné mapy vazeb genů provedli Yang a kol. (2017). Kromě TP-pšenice pocházející z Číny existuje pšenice s TP pocházející z CIMMYT v Mexiku, která je označovaná jako multi-ovary, kde je tento projev spojován s translokací 7DL.7Ag, nesoucí segment chromosomu z *Lophopyrum elongatum* (Host) Á. Löve (Monneveux a kol., 2003; Reynolds a kol., 2005). Do Kroměříže byla získána rovněž i tato forma, která je jarní, osinatá a vyznačuje se nižší mírou otevírání kvítků.



Obr. 2. Morfoty klasu TP-pšenice, kde se v kvítcích mohou vyskytovat jedno (A), dvě (B) a tři (C) zrna (použit obrázek z práce Peng, 2003)



Obr. 3. Vlevo – tři prašníky z vypreparovaného kvítku, uprostřed – trojice zrn z různých pohledů, vpravo jeden pestík z vypreparovaného kvítku (foto Martinek)

2.4.2 Přeměna prašníků na struktury podobné pestíkům

V souvislosti s výskytem tří pestíků v kvítku je v literatuře zmiňován projev tak zvané homeotické transformace prašníků na struktury podobné pestíkům (Peng a kol., 2013), jenž je označován termínem „pistillody“. Tímto názvem se označuje tyčinek v kvítku, která způsobuje jejich přeměnu na struktury podobné pestíkům. Tento projev byl pozorován u téměř izogenní linie odvozené od „Chinese Spring“ nesoucí gen *Pis1*, která se vyznačovala třemi pestíky a zároveň přeměnou některých prašníků na pestíkům podobné struktury. U TP-pšenice s projevem pistillody mají kvítky tři pestíky, které jsou zároveň

doprovázeny jednou až třemi strukturami podobnými pestíkům, které vyrůstají na místech tyčinek. Postupně byla pomocí samosprašování po několika generacích vytvořena linie se stabilním výskytem pistillody, která byla nazvána HTS-1. Projev pistillody tedy vede k dalšímu zvýšení počtu pestíků a pestíků podobných struktur v kvítku, a tím ke snížení produkce pylu. Světelná mikroskopie ukázala, že některé zcela transformované tyčinky vykazovaly dobře vyvinuté zárodky s normální plodností. Přeměna tyčinek na struktury podobné pestíkům nastává v průběhu raného stádia vývoje tyčinek. Každá rostlina linie HTS-1 vykazovala charakter pistillody za v běžných podmínkách pěstování. Expres projevu pistillody však je různá v různých místech klasu a u různých kvítků klásku. Analýza dědičnosti kříženců HTS-1 s normálními komerčními odrůdami pšenice ukázala, že pistillody je určena interakcí dvou recesivních jaderných genů *hts1* a *hts2* (Peng a kol., 2013; Yang a kol., 2011).

Transformace tyčinek na struktury podobné pestíkům byla popsána rovněž u jiných rostlin ve starší literatuře (Leighty a Sando, 1924; Hanson, 1991; Li a kol., 2007), přičemž se zřejmě jedná o faktor, jenž mohl být analogický evolučnímu přechodu od jednodomých rostlin k dvoudomým rostlinám (Mitchell a Diggle, 2005). Tento projev přeměny květních orgánů vzbudil velkou pozornost a stal se velmi studovaným fenoménem u rostlin (Meguro a kol., 2003; Hama a kol., 2004; Saraike a kol., 2007; Mizumoto a kol., 2009; Yang a kol., 2018).

2.4.3 Vytvoření ozimých forem pšenice s TP

Původní jarní TP-pšenice byla získána v roce 2004 od profesora Zheng-Song Penga (Sichuan Normal College, Nanchong, Sichuan 637002, China) a byla zařazena do pracovní kolekce genetických zdrojů v Kroměříži. Byly u ní prováděny klasové výběry s cílem stabilizace znaku TP a vytvoření dostatečně uniformního materiálu vhodného pro uložení rovněž do Genové banky v Praze. Stabilizace převedením do homozygotního stavu ale nebyla u této pšenice v běžných polních bez prostorové izolace od ostatních rostlin úspěšná. Stále docházelo k vyštěpování odchylných forem včetně rostlin bez výskytu tří pestíků. Také bylo prováděno křížení této pšenice s ozimými formami pšenice seté s dobrou mrazuvzdorností. Od roku 2006, kdy jsme se na pracovišti v Kroměříži začali zabývat pšenicemi s odlišným zabarvením zrna pšenice se v parcelách TP-jarní pšenice začaly vyskytovat rovněž rostliny s barevným zrnem, což bylo nepochybným důkazem spontánního opylování TP-rostlin pylem z rostlin s odlišnou barvou zrna rostoucích v okolí. Během pěstování jsme si uvědomili, že projev TP v kvítku je spojen s vysokou mírou otevřenosti kvítků, které mohou být opyleny cizím pylem z okolních rostlin. Přitom bylo zjištěno, že k opylení jednotlivých pestíků v kvítcích dochází nezávisle a rovněž že dochází k nezávislé segregaci vloh při samoopylení F_1 rostlin hybridů homozygotních pro gen *Pis1* a heterozygotních v genu pro modrý aleuron zrna - konkrétně v genu *Ba1* (*Blue aleurone 1*) pocházejícím z donoru UC66049. V důsledku volné kombinovatelnosti genů pro modrý aleuron po samoopylení heterozygotních F_1 TP-rostlin bylo možné nalézt rostlin v TP kvítcích čtyři rozdílné typy zabarvení trojic zrn: 1) všechna tři zrna červená, 2) dvě zrna červená + jedno modré, 3) jedno zrna červené + dvě modrá, 4) všechna tři zrna modrá. Po samoopylení F_1 rostlin bylo možné na základě četnosti zmíněných čtyř typů zabarvení zrn v kvítcích potvrdit nezávislou segregaci genu *Ba1* a skutečnost, že tři pestíky v kvítku neovlivňují tuto segregaci (Watanabe a kol., 2015). Postupně byly vytvořeny ozimé TP-pšenice (zimovzdorné rostliny pomohly vyselektovat holomrazy během zimního období 2011/2012 v Kroměříži), které byly využitelné jako mateřské komponenty pro odvození předkládané metody získávání hybridů ke šlechtitelským účelům. Postupně byly vyselektovány rovněž ozimé TP-pšenice v kombinaci s jinými specifickými znaky, jako jsou například dlouhá pleva a purpurový perikarp. Na Obr. 4 je ukázka TP-pšenice s purpurovým perikarpem zrna.



Obr. 4. TP-pšenice s purpurovým perikarpem zrna, v květech jsou zřetelné trojice purpurově zbarvených zrn (foto Martinek)

2.5 Princip metody

U TP-pšenice tlačí vyvíjející se tři pestíky v květku na obaly kvítku a tím otevírají kvítky, v nichž dochází k obnažení pohlavních orgánů (pestíky, tyčinky). Samičí pohlavní orgány pak mohou být opyleny pylem okolních rostlin. Znamená to, že přítomnost dominantní mutace pro tři pestíky v květku (gen *Pis1*) vyvolá částečnou cizosprašnost. Toho lze využít pro tvorbu hybridů v polních podmínkách, kdy mateřská TP-pšenice je opylena pylem přeneseným větrem přenášeným z okolních rostlin. Pokud se nechají TP-rostliny (*Pis1Pis1*) spontánně opylovat pylem z rostlin s jedním pestíkem (*pis1pis1*), k tomuto opylení dojde jen u některých TP-rostlin respektive některých TP-kvítků. U zbývajících dojde k samoopylení nebo cizosprašení pylem z TP-rostlin, takže genetická sestava zůstane *Pis1Pis1*. Následující F_1 generace rostlin bude obsahovat kromě homozygotů *Pis1Pis1* také heterozygoty *Pis1pis1* vzniklé cizosprašením s normálními rostlinami s jednopestíkovými kvítky. V následující F_2 generaci se vyskytnou rostliny s normálními kvítky s jedním pestíkem, které budou opět samosprašné. Tyto rostliny se sklídí a budou využity v následujícím šlechtitelském postupu pšenice. Zbývající TP-rostliny se mohou použít pro výsev nové TP-mateřské populace pro další cyklus spontánní hybridizace v následujícím. Navržená metoda hybridizace je vhodná především pro polní podmínky a konkrétně pro případy, kdy není příliš důležité přesně znát identitu otcovského pylu. Oproti klasické metodě, využívající ruční kastraci a opylení v kontrolovaných podmínkách, tento postup umožňuje získání velkého množství hybridních zrn.

Vzhledem k tomu, že gen *Pis1* pro TP leží na chromosomu 2D, lze navrhouvanou metodu využít pro šlechtění hexaploidní pšenice obsahující genom D. Pro šlechtění tetraploidní pšenice by bylo nutné nejprve vytvořit vhodné mateřské tetraploidní TP komponenty se zabudovaným genem pro TP do některého z chromosomů B nebo A.

2.6 Výběr mateřské komponenty

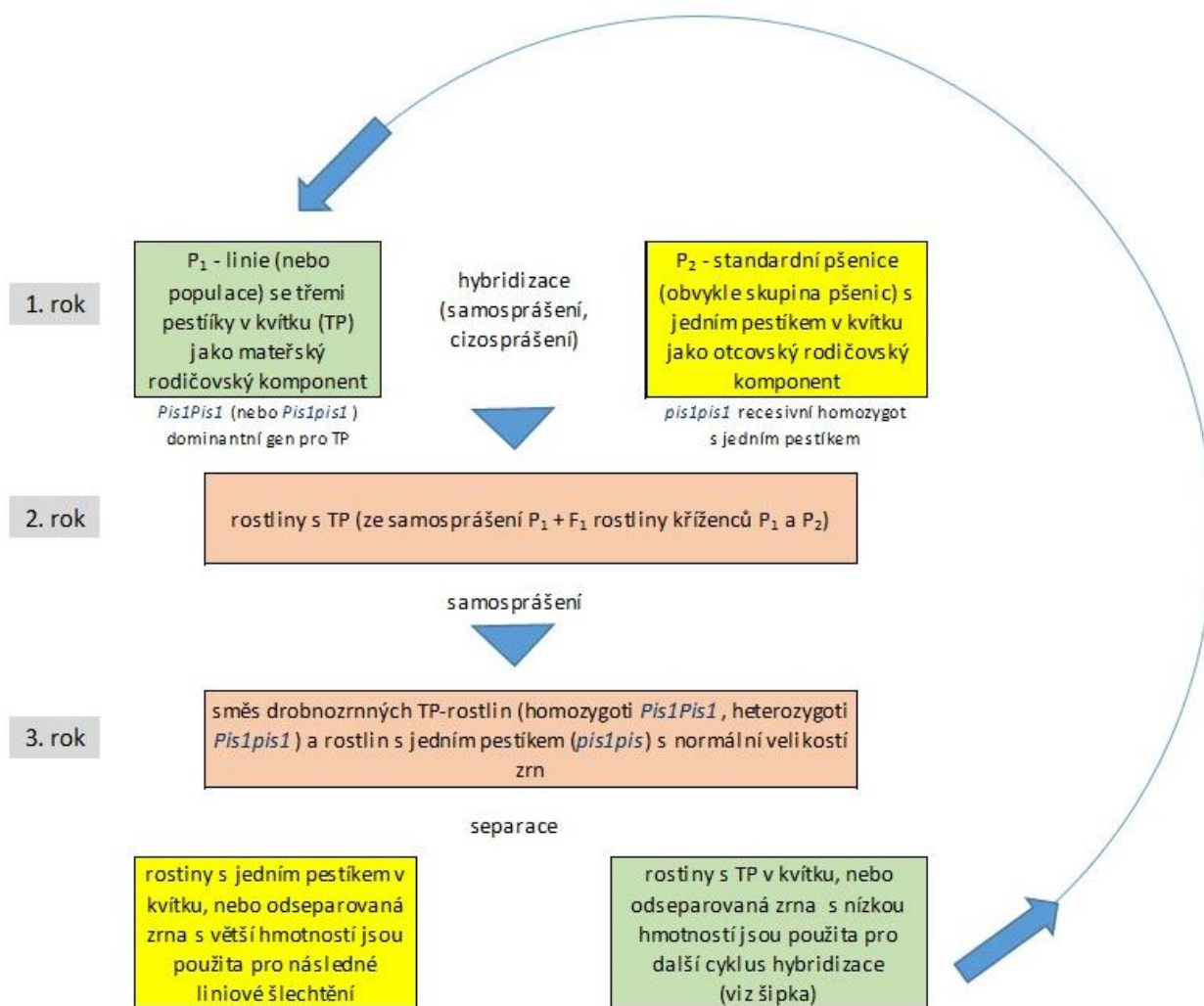
Pokud má šlechtitel k dispozici rozpracované hybridní populace kříženců s TP-pšenice, není obvykle těžké takové mateřské TP-formy vytvořit běžným postupem pomocí odděleně vysetých vybraných potomstev rostlin nebo klasů. Je ale potřeba mít na paměti určitou obtížnost získání homozygotních TP-formů vzhledem k jejich částečné cizosprašnosti. V případě zájmu může vhodné výchozí TP-pšenice poskytnout firma Agrotest fyto, s.r.o. Kroměříž, případně si je nechat vytvořit podle vlastního zadání.

Mateřskou TP-pšenici je potřeba zvolit s ohledem na předpokládané další šlechtitelské zaměření. Pro potřebu šlechtění ozimé pšenice by měla mít dostatečnou úroveň mrazuvzdornosti, obdobně pro účel šlechtění jarní pšenice je potřeba použít vhodnou jarní mateřskou formu. Pochopitelně je žádoucí, aby mateřské formy měly uspokojivou úroveň odolnosti k biotickým a abiotickým faktorům prostředí, přijatelnou délku stébla ranost a vhodný habitus rostliny. Lze použít i mateřské TP-pšenice, do kterých lze cíleně přenést specifické znaky. Například lze vytvořit TP-pšenice s purpurovým nebo modrým zrnem, se změněnou morfologií klasu, specifickými geny rezistence a podobně. Pro vytvoření takových pšenic lze využít například opakované zpětné křížení příslušné F_1 generace na recipientní TP genotyp a průběžný výběr na požadovaný přenášený znak.

2.6.1 První rok: pěstování mateřské komponenty a její spontánní hybridizace

Vybranou mateřskou TP-pšenici je vhodné vysévat do mezipásů nebo cest, které se obvykle používají pro oddělení šlechtitelských bloků nebo odrůdových pokusů s pšenice s normálními (jendopestíkovými) kvítky (Obr. 5 a 6). Obvykle při zakládání šlechtitelských školek se používají cesty mezi pokusy o šířce okolo 6m, které jsou potřebné pro otáčení maloparcelkového kombajnu. Tyto cesty se běžně osévají nějakou pšenicí, aby plocha nezůstala nevyužita. V Kroměříži se osvědčilo tuto plochu využívat pro pěstování TP-pšenice k hybridizačním účelům. Okolní parcely s běžnými pšenice s normálními pestíky pak slouží jako otcovské rodičovské komponenty, jejichž pylem se opylí mateřská TP-pšenice. K opylení dojde za předpokladu určité synchronizace doby kvetení obou rodičovských komponent. Vzhledem k tomu, že v parcelách okolních pokusů jsou obvykle vysévány linie s rozdílnou dobou kvetení, požadavek na synchronizaci kvetení otcovských komponent s mateřskou TP-pšenicí není tak podstatný, protože obvykle se vždy v okolí vyskytují různě rané linie, z nichž některé právě kvetou a produkují pyl vhodný pro přenos větrem a pro cizosprašení. Pochopitelně je vhodné brát tuto okolnost v úvahu a vysévat mateřské TP-pšenice do blízkosti samčích rodičovských komponent vhodných pro hybridizaci.

Mateřské komponenty s TP jsou ponechány spontánnímu opylení pylem přeneseným větrem, kde velký podíl pylu pochází z rostlin z okolních pšenic s normálními kvítky. Pochopitelně v okolním prostředí se může vyskytovat i pyl z okolních TP-rostlin, takže po opylení mateřské formy zrno představuje směs homozygotů v genech pro TP *Pis1Pis1* (rostliny ze samosprašení nebo cizosprašení TP-rostlin mateřské populace) a heterozygotů v genu pro tři pestíky *Pis1pis1* (rostliny z cizosprašení mateřské TP-komponenty pylem otcovských komponent s jedním pestíkem v kvítku).



Obr. 5. Schéma navrhované metody (vysvětlení v textu)

2.6.2 Druhý rok: pěstování následující (1.) generace

Sklizené zrna je vhodné vyset do samostatné parcely. Velikost parcely je vhodné zvolit s ohledem na požadavek získání dostatečného množství zrna pro další šlechtění. U této generace se neprovádí žádná selekce. Při zavádění metody je ale důležité důsledně odstranit případné příměsi rostlin s jedním pestíkem (které zde mohou například vyrůst z výdrolu z předcházejících ročníků). Sklizené zrna TP-rostlin se použije pro další výsev.



Obr. 6. Umístění mateřské komponenty V1-190-14 TP+LG do mezipásmu mezi šlechtitelské parcely. Mateřská populace uprostřed je obklopena z obou stran novošlechtěními (foto Martinek)

2.6.3 Třetí rok: pěstování následující (2.) generace

Tato generace bude složena z:

- a) rostlin, jež jsou homozygotně dominantní v genu pro tři pestíky v kvítku *Pis1Pis1*, které vznikly buď samosprášením mateřské TP-pšenice, nebo opylením pylem nesoucím geny pro TP, který může pocházet z homozygotně dominantních rostlin nebo i heterozygotních rostlin pro TP. Těchto rostlin lze očekávat největší počet,
- b) rostlin F_2 se třemi pestíky v kvítku, které jsou heterozygoty v genu pro tři pestíky v kvítku *Pis1pis1*,
- c) rostlin F_2 s normálními kvítky s jedním pestíkem, které jsou homozygotně recesivní v genu pro tři pestíky v kvítku *pis1pis1* a jsou požadovaným produktem spontánní hybridizace. Jejich zrna jsou předmětem našeho zájmu,
- d) z malého množství F_1 rostlin vzniklých na základě vzájemného spontánního křížení mezi rostlinami, ke kterému došlo v předchozí generaci mezi:
 - (i) homozygoty *Pis1Pis1* a heterozygoty *Pis1pis1* - tedy jedná se o jedince s genetickými sestavami *Pis1Pis1* a *Pis1pis1*,
 - (ii) heterozygoty *Pis1pis1* navzájem, tedy jedná se o jedince s genetickými sestavami *Pis1Pis1*, *Pis1pis1* a *pis1pis1*. Tyto F_1 rostliny ale nelze fenotypově odlišit od F_2 rostlin s genetickými sestavami popsanými v předchozích bodech a), b) a c).

Tuto generaci (populaci) lze pěstovat na větší ploše. Velikost pěstební plochy lze zvolit s ohledem na následující šlechtitelský záměr. Je potřeba zohlednit, že v této generaci se bude vyskytovat několik procent (obvykle asi do 10%) dobře vizuálně detekovatelných rostlin bez tří pestíků se standardní velikostí obilek, zatímco okolní rostliny se třemi pestíky budou většinou poskytovat obilky drobnější s poněkud odlišným tvarem, ovlivněným počtem zrn vyvinutých v jednotlivých kvítcích TP-rostlin.

Z této populace je potřeba získat zrno pocházející z rostlin s jedním pestíkem. Rostliny s jedním pestíkem jsou od ostatních dobře rozlišitelné ve zralosti. Tyto rostliny lze ale poměrně snadno vizuálně odlišit již v době metání, kdy TP rostliny mají výrazně širší bazální části kvítků, které lze od běžných klasů rostlin s jedním pestíkem dobře rozlišit při pohledu z boku nejlépe proti slunci. Ve průběhu dozrávání a ve zralosti jsou potom velmi snadno od sebe vizuálně odlišitelné. Zrno z rostlin s jedním pestíkem lze získat:

a) vytrháním rostlin bez tří pestíků a vymláčením vytrhaných rostlin dohromady. Získané zrno je vhodné následně vyset v řídkém sponu do výběrové populace pro potřeby dalšího šlechtění.

b) sklizením celé plochy populace kombajnem a následným tříděním zrn na sítích s vhodně zvolenou velikostí otvorů. Platí, že s vyšší velikostí zrna stoupá pravděpodobnost, že tato zrna pocházejí z rostlin s jedním pestíkem. Naopak drobné zrno obvykle pochází z TP-rostlin, především z kvítků obsahujících dvě nebo tři zrna. Obvykle je dobré použít více sít s různou velikostí otvorů. Pro vytrídění zrna pocházejícího z rostlin s jedním pestíkem často stačí použít síto se standardní velikostí otvorů 2,5 mm, pokud se použije síto s většími otvory (2,8 mm, případně 3,00 mm), získá se adekvátně menší podíl zrn o vyšší hmotnosti 1000 zrn. Volbu vhodné velikosti síta je potřeba provést s ohledem na velikost zrna v daném ročníku a jeho množství tak, aby bylo získáno co největší zrno v dostatečném množství pro následný výsev do výběrové parcely. Odseparované zrno vyséváme do výběrové parcely v řídkém sponu. V následujícím roce se z ní budou vybírat opět rostliny nebo klasy s jedním pestíkem v kvítku, jež se použijí v dalším šlechtitelském postupu (obvykle pro výsev odděleně setých potomstev). Použití sít pro oddělení zrna z jednopestíkových rostlin vede pouze k hrubému oddělení těchto zrn. Může se stát, že nad sítím zůstane obilka z TP-rostliny, zvláště z kvítků, kde se vyvinula jen jedna obilka. To ale v následující generaci nemusí moc vadit, protože tato generace je následně obvykle využívána pro výběr jednokvítkových rostlin nebo klasů, které se odděleně vymílají a jejichž zrna se použije pro výsev kmenové školky potomstev rostlin nebo klasů.

2.7 Využití zrna z TP-rostlin pro opakované cykly křížení

Pro další hybridizační využití lze s výhodou použít i drobné zrno z TP-rostlin, jež zůstalo po vytrhání rostlin bez tří pestíků (ad **a**), případně zrno, které zůstalo pod sítím s malými otvory (nejlépe volit zrna, jež propadla pod sítem o velikosti otvorů 1,8 - 2,0 mm) (ad **b**). Rostliny z této frakce mohou být použity jako nová „mateřská populace“ pro další cyklus hybridizace (viz kapitola 2.6.1). V tomto případě ovšem mateřská TP komponenta bude složena z geneticky pestřejší směsi TP-rostlin, složené jak z homozygotů *Pis1Pis1*, tak i z heterozygotů *Pis1pis1*. (Ojediněle ovšem může obsahovat i zrno z jednopestíkových rostlin *pis1pis1*, které propadlo jako zrna malými otvory použitého síta. To ale nemusí vadit, pokud byla důsledně provedeno odstranění příměsí jednopestíkových rostlin ve druhém roce pěstování po zavedení metody - viz kapitola 2.6.2., protože v tomto případě se jedná o hybrida z předcházejícího cyklu křížení.)

Výhoda tohoto opakovaného použití TP-rostlin spočívá v tom, že heterozygotní rostliny *Pis1pis1* mohou být opakovaně opyleny pylem v dalším cyklu křížení a mohou tak představovat opakované (složené) křížení typu *Pis1pis1* x *pis1pis1*, jehož se může účastnit potenciálně více otcovských rodičovských komponent. Opakované použití TP-rostlin pro další cykly křížení je výhodné tím, že mezi TP-rostlinami může docházet rovněž ke vzájemné hybridizaci, což vede ke zvyšování genetické rozmanitosti této mateřské populace. Hybridizaci lze používat opakovaně každý rok tak, že se vždy vysejí TP-rostliny

z předcházející generace, ty se nechají opylit pylem z okolních rodičovských parcel a v každém následujícím sklizňovém roce se z populace odeberou rostliny s jedním pestíkem, jejichž zrna bude využito pro další šlechtitelské účely. Se stoupajícím počtem cyklů hybridizace bude stoupat četnost vyštěpených rostlin bez tří pestíků, tedy bude postupně stoupat výtěžnost metody.

S počtem opakovaných cyklů se bude zároveň postupně vylepšovat genetické pozadí a zvyšovat genetická pestrost TP-rostlin, protože se budou postupně obohacovat o pylem přenesené geny od otcovských rostlin v předchozích cyklech křížení. Opakované použití TP-rostlin jako mateřské populace svým charakterem představuje částečně cizosprašnou (alogamní) fázi, v níž se mohou uskutečňovat ve větší míře efektivní rekombinace mezi geneticky neshodnými homologními chromosomy, bude zde rovněž stoupat podíl heterozygotů. Zvyšování genetické rozmanitosti TP mateřské populace povede k zefektivnění metody, kdy širší genetická variabilita bude umožňovat selekci rostlin s dobrou adaptací na dané podmínky prostředí. Vybrané rostliny bez tří pestíků z těchto populací budou produktem cizosprašení (případně i opakovaného cizosprašení) a budou opět samosprašné.

V Kroměříži byla tato metoda experimentálně odzkoušena. Pro hybridizaci byly využity dvě odlišné TP-pšenice V1-193-14 TP a V1-190-14 TP+LG (Tab. 1). Tyto pšenice byly vysévány do cest jako mateřské populace. Porosty mateřských populací sloužily jako mezipásky pro oddělení parcel výnosových zkoušek. Protože v Kroměříži probíhal výzkumný projekt NAZV QJ1510206 zaměřený na výzkum pšenice s barevným zrnem, mezi okolními parcelami výnosových zkoušek se vyskytovala asi polovina parcel s barevným (purpurovým a modrým) zrnem. Zahájení hybridizace bylo započato v roce 2014 a pokračovalo do roku 2018. Pro další následující cyklus pěstování bylo použito vždy pouze zrna TP rostlin z předcházející generace. V každém roce byl sledován v mateřské populaci počet rostlin se třemi pestíky a bez tří pestíků na 1m². Byl proveden odhad frekvence alele *pis1* v mateřské populaci pomocí Hardy-Weinbergova zákona (vysvětleno v kapitole 2.10). Mezi rostlinami bez tří pestíků v kvítku se nacházely rovněž rostliny s odlišnou barvou zrna. Přítomnost těchto rostlin s barevným zrnem byla přibližně poloviční a potvrdila úspěšnost uskutečněného cizosprašení a využitelnost metody (Tab. 1).

Tab. 1. Zastoupení počtu rostlin na 1m² lišících se výskytem tří pestíků (TP) v kvítku ve dvou populacích v různých letech

Ročník	Počet rostlin na 1m ²			Procento rostlin bez TP	Odhad frekvence alel <i>pis1</i> v populaci	Počet rostlin bez tří pestíků s purpurovým zrnem	Počet rostlin bez tří pestíků s modrým zrnem
	Celkem	se TP	bez TP				
1. populace (V1-193-14 TP)							
2014	280	275	5	1,8	0,027	2	0
2015	310	298	12	4,0	0,060	7	1
2016	265	234	31	13,2	0,199	13	4
2017	285	244	41	16,8	0,252	15	12
2018	320	268	52	19,4	0,291	16	14
2. populace (V1-190-14 TP+LG)							
2014	253	248	5	2,0	0,030	3	1
2015	295	267	28	10,5	0,157	9	5
2016	321	281	40	14,2	0,214	12	9
2017	307	262	45	17,2	0,258	16	10
2018	305	257	48	18,7	0,280	19	12

Pozn.: první populace se vyznačovala na počátku použitím rostlin se třemi pestíky (TP), druhá populace se vyznačovala dlouhou plevou (LG - long glume) přenesenou z *Triticum polonicum* L. Obě populace měly zpočátku standardní zabarvení zrna.

V průběhu pěti hodnocených ročníků byla sledována rovněž frekvence barevných obilek ve vybraných velikostních frakcích zrna sklizeného kombajnem (Tab. 2). Kombajnová sklizeň umožnila

v různých ročnících sklídit různě velká množství zrna, jež byla použita pro stanovení zastoupení barevných zrn ve velikostních frakcích obilek (tříděno na třídíče Petkus). Průměrná frekvence zrn vzniklých spontánní hybridizací se v opakovaně vysévané populaci zvyšovala. Lze to dokumentovat na postupně se zvyšujícím počtu barevných zrn u obou testovaných populací (1. populace: purpurová $1,4 < 4,2 < 7,6 < 8,8 < 9,9$; modrá $0,0 < 0,5 < 3,4 < 7,8 < 7,8$; 2. populace: purpurová $1,0 < 7,7 < 7,7 < 10,2 < 10,8$; modrá $0,1 < 3,4 < 6,0 < 6,6 < 8,9$). Ve frakcích s větším zastoupením velkých zrn byla zaznamenána větší četnost barevných zrn. To lze vysvětlit tím, že nad většími otvory síta zůstávají větší zrna pocházející z jednopestíkových rostlin – tedy z rostlin hybridů. Tato zrna nemají v sobě obsaženy dominantní geny pro tři pestíky v kvítku, proto jsou větší. Ve vytríděných frakcích s drobnými zrny jsou tak více zastoupeny rostliny vzniklé samosprašením TP rostlin (tedy homozygotní v dominantních genech *Pis1Pis1*) nebo heterozygotní rostliny hybridů *Pis1pis1*, které fenotypově nelze od sebe odlišit. Mezi těmito rostlinami ovšem rovněž existuje hybridizace a postupně se zvyšujícím se počtem cyklů používání této metody migrují geny pro odlišné zabarvení také do rostlin se třemi pestíky (Obr. 7). Se zvyšujícím se počtem ročníků používání metody frekvence barevných obilek mezi velikostními frakcemi obilek má tendenci se postupně vyrovnávat. Využití pšenic s purpurovým zrnem pro detekci cizosprašení je výhodnější než využití pšenic s modrým zrnem, protože v případě purpurového zrna se neprojevuje segregace barvy zrna uvnitř klasu, navíc tyto rostliny mají většinou purpurově zabarvená stébla. Jsou proto mnohem lépe odlišitelné od rostlin s modrým zrnem, kde modré zrno se nemusí vyskytovat u všech obilek v klasu.



Obr. 7. Pohled do mateřské komponenty, přítomnost cizosprašení lze dokumentovat výskytem pšenice s barevným zrnem. Jsou vidět klasy se třemi pestíky i bez tří pestíků s purpurovým i normálním zabarvením zrn. (foto Martinek)

Tab. 2. Zastoupení barevných zrn v rozdílných velikostních frakcích zrn ve dvou mateřských populacích

Ročník	Znak	Velikostní frakce zrn				Celkem	Počet barevných zrn %
		pod 1,8 mm	1,8-2,5 mm	2,5-3,0 mm	nad 3,0 mm		
1. populace (V1-193-14 TP)							
2014	Hmotnost zrna (kg)	2,3	5,8	8,8	3,1	20,0	
	HTS (g)	23,7	33,6	44,2	55,4	40	
	Počet purpurových zrn v 1000 zrn	1	3	21	23	14	1,4
	Počet modrých zrn v 1000 zrn	0	0	0	0	0	0,0
2015	Hmotnost zrna (kg)	3,4	8,2	10,6	2,7	24,9	
	HTS (g)	21,7	32,1	43,1	54,7	37,8	
	Počet purpurových zrn v 1000 zrn	5	15	67	74	42	4,2
	Počet modrých zrn v 1000 zrn	1	3	7	12	5	0,5
2016	Hmotnost zrna (kg)	4,2	10,6	12,3	5,2	32,3	
	HTS (g)	22,4	31,5	44,6	53,9	38,9	
	Počet purpurových zrn v 1000 zrn	23	58	102	95	76	7,6
	Počet modrých zrn v 1000 zrn	19	27	39	49	34	3,4
2017	Hmotnost zrna (kg)	12,5	45,6	28,6	1,5	88,2	
	HTS (g)	18,3	30,3	40,2	49,9	32,1	
	Počet purpurových zrn v 1000 zrn	48	72	129	126	88	8,8
	Počet modrých zrn v 1000 zrn	45	72	102	85	78	7,8
2018	Hmotnost zrna (kg)	12,8	30,2	15,4	2,8	61,2	
	HTS (g)	17,4	29,8	41,2	50,2	31,0	
	Počet purpurových zrn v 1000 zrn	56	88	145	152	98,6	9,9
	Počet modrých zrn v 1000 zrn	36	79	108	95	78	7,8
2. populace (V1-190-14 TP+LG)							
2014	Hmotnost zrna (kg)	2,9	10,5	7,5	2,0	22,9	
	HTS (g)	24,1	32,7	48,1	55,0	38,6	
	Počet purpurových zrn v 1000 zrn	0	1	10	70	10	1,0
	Počet modrých zrn v 1000 zrn	0	0	1	2	1	0,1
2015	Hmotnost zrna (kg)	4,6	16,5	15,4	3,2	39,7	
	HTS (g)	22,8	30,7	44,6	54,3	37,1	
	Počet purpurových zrn v 1000 zrn	4	43	120	152	77	7,7
	Počet modrých zrn v 1000 zrn	7	31	43	46	34,1	3,4
2016	Hmotnost zrna (kg)	1,8	11,2	8,4	2,9	24,3	
	HTS (g)	24,1	31,4	45,2	52,9	38,2	
	Počet purpurových zrn v 1000 zrn	42	57	105	97	77	7,7
	Počet modrých zrn v 1000 zrn	31	55	71	66	60	6,0
2017	Hmotnost zrna (kg)	26,5	69,4	35,6	3,6	135,1	
	HTS (g)	20,2	31,4	39,7	48,6	31,8	
	Počet purpurových zrn v 1000 zrn	68	97	136	115	102	10,2
	Počet modrých zrn v 1000 zrn	44	51	108	88	66	6,6
2018	Hmotnost zrna (kg)	34,5	45,8	32,1	1,9	114,3	
	HTS (g)	18,6	33,2	37,5	49,6	30,3	
	Počet purpurových zrn v 1000 zrn	69	98	106	127	91	9,1
	Počet modrých zrn v 1000 zrn	42	84	116	120	80	8,0

Pozn.: první populace se vyznačovala na počátku použitím rostlin se třemi pestíky (TP), druhá populace se vyznačovala dlouhou plevou (LG - long glume) přenesenou z *Triticum polonicum* L. Obě populace měly zpočátku standardní zabarvení zrna.

2.8 Regenerace mateřské populace

Opakovanými cykly využívání metody postupně stoupne frekvence výskytu rostlin bez tří pestíků, jež teoreticky může dosáhnout 25% (což odpovídá monohybridnímu křížení a štěpnému poměru 1:3). Je nutné mít na paměti, že zrna pocházející z TP-rostlin se rovněž vyznačují o něco menší klíčivostí a vzházivostí než zrna o normální velikosti. Proto, pokud se pro výsev další generace mateřské populace používají drobná zrna propadlá sítem s malými otvory, mohou se tam dostat i zadinová zrna od rostlin s normálními pestíky. To by sice nemuselo příliš vadit, protože v opakovaných cyklech se stejně většinou jedná o zrna ze spontánní hybridizace, nicméně podíl rostlin bez tří pestíků by mohl v důsledku jejich většího fitness v následující populaci rychleji stoupat. Pokud četnost rostlin bez tří pestíků dosáhne v populaci asi 15-20 % je potřeba provést regeneraci TP-populace. K tomu je vhodné využít klasové výběry TP klasů, které se odděleně vysejí klasovým secím strojem (Seedmatic), následně se vyberou pokud možno uniformní TP potomstva s uspokojivými parametry. Pro další hybridizaci se použije buď vybrané namnožené klasové potomstvo, nebo lépe směs TP-potomstev.

2.9 Genetické vztahy v samosprašné a cizosprašné populaci

Pšenice setá je hermafroditní organismus, kde fungují samičí i samčí pohlavní orgány na každém jedinci (Goodwillie a kol., 2005; Jarne a Auld, 2006; Billiard a kol., 2012). Během domestikace došlo u ní k upevnění samosprašnosti omezením distribuce genů na šíření semen. Příímým důsledkem samosprašnosti je odhalování recesivních škodlivých alel, jež se u běžných cizosprašných jedinců vyskytují v heterozygotním stavu. Ty se u samosprašných rostlin mohou dostat do homozygotního stavu, a tím snižovat vitalitu (fitness) jedinců. Toto snížení fyzické kondice, označované jako inbrední deprese, je univerzální fenomén a představuje genetické omezení. Proto u planých rostlin převažuje cizosprašnost, jež je obvykle spojená s morfologickými a fyziologickými mechanismy omezujícími samooplodnění. Během evoluce pšenice zřejmě mohlo docházet do určité míry k eliminaci škodlivých recesivních alel, nebo k jejich překrytí dominantními alelami, nacházejícími se v podobných pozicích na homeologických chromosomech. Dlouhodobé využívání TP-mateřských rostlin v hybridizačním programu by vedlo k zavedení „cizosprašné“ fáze, jež by umožnila generování větší míry heterozygotů, a tím i vznik smysluplných rekombinantů mezi heterozygotními chromosomy (viz Obr. 1). Během klasického kombinačního křížení je heterozygotní fáze omezena jen na F_1 generaci, s tím, že postupně doznívá s klesajícím podílem heterozygotů na polovinu s každou následující generací. V panmiktické populaci (ve které se mezi sebou jedinci oplozují zcela náhodně) lze podle Hardy-Weinbergova zákona pro případ, kdy v jednom lokusu existují dvě alely A a a , vyjádřit jejich frekvence následovně: A bude mít frekvenci p a a frekvenci q , přičemž platí, $p + q = 1$. Protože hodnoty genotypové i genové frekvence vyjadřujeme vždy jako relativní podíl jednotlivých genotypů nebo genů platí zároveň $P + H + Q = 1$ (kde P je podíl dominantních homozygotů, H je podíl heterozygotů a Q je podíl recesivních homozygotů) a mezi hodnotami genových a genotypových frekvencí platí zároveň vztahy: $p = P + 1/2H$, $q = Q + 1/2H$ (Nečásek a kol., 1980). Zároveň platí $p^2 + 2pq + q^2 = 1$, což koresponduje s monohybridním štěpným poměrem $1AA : 2Aa : 1aa$.

V našem případě lze odhadnout četnosti recesivních alel *pis1* (podmiňujících jeden pestík v kvítku) z procenta jednokvítkových rostlin, jež představují homozygoty *pis1pis1* ($= Q$) a z očekávané frekvence heterozygotů *2Pis1pis1* ($= H$), které ovšem nelze fenotypově odlišit od homozygotů *Pis1Pis1* ve zbývajících částech populace. Odhad lze odvodit pomocí vzorce $q = Q + 1/2H$; je uveden v Tab. 1.

U populace, jež není panmiktická a vyskytuje se v ní určitá míra samosprašnosti, lze provést korekci pomocí koeficientu: $F_{IS} = \sigma/(2 - \sigma)$, přičemž pro úplnou samosprašnost platí ($\sigma = 1$) a $F_{IS} = 1$, kdy populace je složena pouze z homozygotů. V tomto případě očekávané frekvence jsou: $f(AA) = p^2 + F_{IS} pq$; $f(Aa) = 2pq (1 - F_{IS})$; $f(aa) = q^2 + F_{IS} pq$, kde F_{IS} kvantifikuje stupeň odklonu od Hardy-Weinbergova zákona. Pokud $F_{IS} = 0$, znamená to, že v populaci není zvýhodněno samosprašení a populace je plně panmiktická.

Pokud $F_{IS} > 0$ znamená to, že zde existuje posun ve prospěch homozygotů jako výsledek samosprášení. Podrobně jsou tyto vztahy a vliv samosprášení popsány v práci David a kol. (2007). Frekvenci homozygotů F_{IS} lze exaktně odhadnout například pomocí genetických markerů.

Zdrojem rozmanitosti v genomu eukaryot je rekombinace, což je genetická výměna mezi dvojicí vláken DNA, která probíhá během meiózy. Pokud však k rekombinaci dochází mezi identickými nebo téměř identickými chromosomy kvůli vysoké homozygotnosti, účinnost rekombinace je u samosprašných nižší než u cizosprašných. Pokud označíme četnost fyzické rekombinace symbolem r , můžeme rovněž vyjádřit efektivní rekombinaci symbolem r_e (Nordborg, 2000); pak platí: $r_e = (1 - F_{IS}) r$. Důsledkem této efektivní rekombinace je zvýšení vazebné nerovnováhy mezi lokusy v gametách podél větších genomických oblastí, případně i mezi různými (homeologickými) chromozomy. Při úplném samosprášení ($F_{IS} = 1$) je efektivní rekombinace r_e nulová, jak ukazuje Obr. 1.

Samosprašnost zvyšuje genetický drift. Genetický drift generuje stochastické změny frekvence alel při přenosu z jedné generace na druhou. Často se kvantifikuje pomocí efektivní populační velikosti (Pollak, 1987; Nordborg, 2000). Jestliže N představuje počet jedinců v populaci schopných náhodné vzájemné hybridizace (panmiktická populace), potom efektivní velikost populace N_e při úplném samoopylení ($F_{IS} = 1$) se sníží na polovinu a lze použít vztah: $N_e = N / (1 + F_{IS})$ (Ingvarsson, 2002; Whitlock a Barton, 1997).

Výše popsané genetické účinky mají přímý vliv na druhovou rozmanitost a její distribuci. Výhoda samosprašnosti spočívá v tom, že zvyšuje výtěžnost selekce, vede však rovněž k imbretní depresi. Pokud nedojde k velmi vysoké imbretní depresi (Charlesworth, 2006), může být časem překonána tím, že se populace postupně vyčistí od silně škodlivých recesivních mutací, jež výrazně snižují fitness, a jež jsou vyloučeny z populace. Po určité době se další imbretní deprese ve shodě s prve použitým případem může snižovat (Lande a Schemske, 1985; Lande a kol., 1994). Přejít k samosprašnosti může vést k rozpadu komplexních systémů genetické inkompatibility, případně ke zhoršení kvality reprodukčních orgánů a funkcí (Sicard a Lenhard, 2011). Životnost většiny samosprašných forem je oproti cizosprašným kratší. Využití TP rostlin v navrhované metodě hybridizace představuje fázi s vyšší mírou cizosprašnosti. Tato fáze může vést k rozšíření genetické variability jako důležitého východiska pro efektivní šlechtění.

2.10 Komentář k navrhované metodice a doporučení

U klasického postupu křížení výběr rodičovských forem závisí na úvaze šlechtitele. Toto nelze realizovat u navrhované metody. Navržená metoda využívá mateřskou formu, jež je následně používána v následujících cyklech křížení. Pokud jako otcovské formy budou používány odrůdy nebo novošlechtění s dobrou adaptací na dané podmínky prostředí (obvykle tomu tak ve šlechtitelských provozech je), po opakovaných cyklech křížení bude možné předpokládat, že bude genetický základ mateřské populace rostlin s TP rovněž zlepšován tím, že její genetický základ se bude postupně přibližovat požadavkům na odrůdu pro dané prostředí. V důsledku částečné cizosprašnosti TP-rostlin dojde k širší distribuci genů přenosem pylu, která bude fungovat po celou dobu používání metody. Tato distribuce nebude omezena na jednorázové křížení, jež je u běžného kombinačního křížení. Vzájemné cizosprašení mezi rostlinami s TP v mateřské populaci navzájem může vést k výraznému rozšíření genetické variability v důsledku zvýšení efektivní míry rekombinací (homologní rekombinace mezi geneticky rozdílnými chromosomy), a omezení vlivu genetického driftu (ztráty alel z populace). Navržený postup umožní vytvořit postupně „vylepšenou“ TP mateřskou populaci, kterou bude možné v důsledku opakovaného používání označit jako „univerzální matka“. Nevýhodou navrhovaného řešení je, že tímto způsobem prakticky ztrácíme informaci, jací rodiče se účastní na straně otce. Pokud bychom potřebovali mít přesně definovaný otcovský komponent, musela by být mateřská populace obseta otcovskou pšenicí a musela by být nepochybně dodržena určitá izolační vzdálenost od jiných zdrojů pylu. (U žita, jež je cizosprašné, je v jeho šlechtění potřeba dodržovat asi dvoukilometrovou izolační vzdálenost. Lze předpokládat, že podobnou izolační vzdálenost by bylo

potřeba dodržovat i u pšenice). V tomto případě klasická metoda kastrace je pochopitelně mnohem výhodnější.

Výhodou této alternativní metody je, že odpadá potřeba kastrace a metoda umožňuje získávat každoročně velký počet hybridních zrn v závislosti na velikosti vysévané parcely mateřské populace. Lze předpokládat, že její uplatnění ve šlechtění povede k tvorbě odrůd s dobrou adaptací na dané podmínky prostředí. Ve firmě Agrotest fyto, s.r.o. v Kroměříži je tato metoda využívána již pátým rokem. Výsledky potvrzují její využitelnost ve šlechtění.

3. SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ

Vydávaná metodika je druhou metodikou zaměřenou na popis techniky křížení pšenice. První metodiku publikovala Balounová a kol. (2010). Metodika přináší zcela nový postup hybridizace pšenice, využívající částečnou cizosprašnost specifického genetického materiálu se třemi pestíky v kvítku. Navržený postup ve svém důsledku více odpovídá obecným evolučním principům planých cizosprašných druhů. Navrhovaná metodika umožňuje získávat každoročně poměrně velké množství hybridních zrn kříženců, které lze uplatnit následně v běžně používané rodokmenové metodě šlechtění pšenice. S počtem opakovaných ročníků lze očekávat zvyšování efektivity navržené metody. Metoda umožňuje vyšší míru rekombinací mezi nehomologními chromosomy a přispívá k omezení genetického driftu. Tím umožní omezit degradaci pšeničného genomu a měla by umožňovat získávání forem s lepší adaptací k daným půdně-klimatickým podmínkám. Metodika přináší nové praktické poznatky, doporučení a technické zkušenosti. Oproti běžným metodám kombinačního křížení metoda neumožňuje přesnou kontrolu, které rodičovské komponenty vstupují do hybridizace.

4. POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY

Metodika je uplatňována v průběhu tvorby nových linií ozimé pšenice na pracovišti Agrotest fyto, s.r.o. Kroměříž. Je rovněž využívána pro tvorbu genotypů s barevným zrnem v rámci řešeného projektu MZeČR QK1910343, pro přípravu linií s dlouhou plevou, případně s mnohořadým klasek v rámci projektu institucionální podpory MZe-RO1118 a bude využita pro řešení projektu MZe ČR QK1810067.

Metodika je určena šlechtitelům. Při jejím postupném zavedení je doporučováno zpočátku ji využívat souběžně s klasickou metodou kombinačního křížení pro možnost vzájemného porovnání obou metod.

Metodika bude přístupná na webové stránce: www.vukrom.cz, poskytnutí pšenice s TP uživatelům bude uskutečněno na základě k tomuto účelu uzavřené smlouvy.

5. EKONOMICKÉ ASPEKTY

Náklady na zavedení postupů uvedených v předložené metodice nejsou vysoké. Odhadem cca 10 tis. Kč jako počáteční investice na pronájem pozemku, výsev vybrané TP-pšenice jako mateřské komponenty do mezipásů polních pokusů, na sklizeň (individuální výběr nebo kombajnovou sklizeň) a na zpracování sklizeného zrna (mlácení, třídění na sítích). Určité náklady lze také kalkulovat ve spojitosti se získáním vhodných výchozích TP-pšenic, jež jsou zcela nezbytné pro zavedení metody. V procesu křížení může dojít k finanční újmě, pokud v počátečních fázích nebude respektován požadavek na pěstování mateřské populace na bezplevelném pozemku, kde nehrozí výskyt příměsí v půdě z výdrolu. V takovém případě existuje nebezpečí záměn rostlin hybridů bez tří pestíků s rostlinami příměsí rovněž bez tří

pestíků. Vzhledem k tomu, že současné odrůdy pšenice jsou si morfologicky a v zrně navzájem dost podobné, je vhodné pro kontrolu míry cizosprášení mezi okolní parcely zařadit výrazně odlišný genotyp, nejlépe s purpurovým perikarpem (tyto rostliny obvykle mají i purpurová stébla a jsou dobře odlišné v porostu). Potom ve štěpící F_2 generaci je možné rovněž vedle rostlin se standardním zabarvením detekovat též rostliny s purpurovým zabarvením, což lze pokládat za potvrzení, že došlo k cizosprášení. Použití rostlin se znaky vhodnými pro vizuální kontrolu cizosprášení však není nezbytně nutné, protože rostliny bez tří pestíků jsou vizuálně velmi dobře odlišitelné od rostlin se třemi pestíky v kvítku. Ekonomický přínos dané metodiky pro uživatele lze spatřovat ve snížení pracovní náročnosti, kterou by bylo potřeba vynaložit na ruční křížení (výběr rodičů, kastraci, izolaci, výdrol hybridních zrn), které představuje výraznou pracovní špičku. Dle kvalifikovaného odhadu by mohla u středně velké šlechtitelské firmy činit úspora práce cca 100 tis. Kč ročně.

6. SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY

- Arzani A., Ashraf M.: Cultivated ancient wheats (*Triticum* spp.): A potential source of health-beneficial food products. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16, 2017: 477–488.
- Balounová M, Vaculová K, Ehrenbergerová J, Hrstková P: Metodika křížení - ječmen, pšenice, Kroměříž Agrotest fyto, s.r.o. 2010
- Billiard S, Lopez-Villavicencio M, Hood ME, Giraud T: Sex, outcrossing and mating types: unsolved questions in fungi and beyond. *Journal of Evolutionary Biology*, 25, 2012: 1020–1038.
- Burgarella C, Glémin S: Population genetics and genome evolution of selfing species. eLS, 2001 - Wiley Online Library, First published: 16 January 2017, <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0026804>
- Damania AB, Valkoun J, Willcox G, Qualset CO: The origins of agriculture and crop domestication. The Harlem Symposium, California. UC/GRCP, 1998. 352 s.
- David P, Pujol B, Viard F, Castella V and Goudet J: Reliable selfing rate estimates from imperfect population genetic data. *Molecular Ecology*, 16, 2007: 2474–2487.
- FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations: <http://www.fao.org/faostat/en/#data>
- Goodwillie C, Kalisz S and Eckert CG: The evolutionary enigma of mixed mating systems in plants: occurrence, theoretical explanations, and empirical evidence. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 36, 2005: 47–79.
- Grando MF, de Moraes-Fernandes IB: Two point deterministic model for acquisition of in vitro pollen grain androgenetic capacity based on wheat studies. *Brazilian Journal of Genetics*, 20(3), 1997: Print version ISSN 0100-8455 On-line version ISSN 1678–4502
- Guo JL, Li Z, Zhang GS, Tang HL, Song QL, Song YL, Ma SC, Niu N, Wang JW: Special heterogeneous cytoplasm suppresses the expression of the gene producing multi-ovary in common wheat. *Euphytica*, 213, 2017: 247. <https://doi.org/10.1007/s10681-017-1963-8>
- Hama E, Takumi S, Ogiwara Y and Murai K: Pistillody is caused by alterations to the class-B MADS-box gene expression pattern in alloplasmic wheats. *Planta*, 218, 2004: 712–720.
- Harlan JR, Crops and man, 2nd edn. American Society of Agronomy, Inc., Madison, 1992
- Charlesworth D: Evolution of plant breeding systems. *Current Biology*, 16, 2006: 726–735.
- Chen JS, Zhang LH, Wu BL: A preliminary report on the discovery and breeding of the “trigrain wheat”. *Acta Agronomica Sinica*, 9, 1983: 69–72.
- Ingvarsson P: A metapopulation perspective on genetic diversity and differentiation in partially self-fertilizing plants. *Evolution*, 56, 2002: 2368–2373.
- Jarne P, Auld JR: Animals mix it up too: the distribution of self-fertilization among hermaphroditic animals. *Evolution: International Journal of Organic Evolution*, 60, 2006: 1816–1824.
- Lande R, Schemske DW, Schultz ST: High inbreeding depression, selective interference among loci, and the threshold selfing rate for purging recessive lethal mutations. *Evolution*, 48, 1994: 965–978.

- Lande R, Schemske DW: The evolution of self-fertilization and inbreeding depression in plants. I. Genetic models. *Evolution*, 39, 1985: 24–40.
- Leighty CE, Sando WJ: Pistillody in wheat flowers. *J. Hered.*, 15, 1924: 263–268.
- Li Y, Xu P, Zhang H, Peng H, Zhang Q, Wang X, Wu X: Characterization and identification of a novel mutant fon(t) on floral organ number and floral organ identity in rice. *J. Genet. Genome*, 34, 2007: 730–737.
- Ma SC, Zhang GH, Li HR, Zhao CS: Genetic analysis of multi-ovary character of wheat line Duoll. *J. Triticeae Crops*, 26, 2006: 35–37.
- Ma SC, Zhang GS, Liu HW, Wang JW: Studies on the application of multi-ovary character to hybrid wheat. I. Multi-ovary gene loci and cytoplasm effect. *Acta Botanica Boreali-occidentalia Sinica*, 20, 2000: 949–953.
- Ma SC, Zhang GS, Liu HW, Wang JW: Studies on the application of multi-ovary character to hybrid wheat. II. Heterosis and utilization of multi-ovary wheat. *Acta Botanica Boreali-occidentalia Sinica*, 22, 2002: 1295–1299.
- Martinek P: Cestovní zpráva. Čínská lidová republika, 2004, 12 s., 2 obr., Zemědělský výzkumný ústav Kroměříž, s.r.o.
- Meguro A, Takumi S, Ogihara Y, Murai K: WAG, a wheat AGAMOUS homolog, is associated with development of pistil-like stamens in alloplasmic wheats. *Sexual Plant Reproduction*, 15(3): 221–230.
- Miller TE, King IP, Hassani HS, Caligari PDS, Reader SM: *Tritipyrum*, a potential new cereal with salt tolerance. John Innes Centre & Sainsbury Laboratory Annual Report 1998/1999, John Innes Centre & Sainsbury Laboratory, Norwich, UK. 2003: 68–69.
- Millet E: Relationships between grain weight and the size of floret cavity in the wheat spike. *Annals of Botany*, 58(3), 1986: 417–423.
- Mitchell CH, Diggle PK: The evolution of unisexual flowers: morphological and functional convergence results from diverse developmental transitions. *American Journal of Botany*, 92, 2005: 1068–1076.
- Mizumoto K, Hatano H, Hirabayashi C, Murai K, Takumi S: Altered expression of wheat AINTEGUMENTA homolog, WANT-1, in pistil and pistil-like transformed stamen of an alloplasmic line with *Aegilops crassa* cytoplasm. *Development Genes and Evolution*, 219(4), 2009: 175–187.
- Monneveux P, Reynolds MP, Gonzalez J, Singh RP: Effects of 7DL.7Ag translocation from *Lophopyrum elongatum* on wheat yield and related morphophysiological traits under different environments. *Plant Breeding*, 122, 2003: 379–384.
- Mujeeb-Kazi A, Hettel GP: Utilising wild grass biodiversity in wheat improvement: 15 years of wide cross research at CIMMYT. CIMMYT Research Report No. 2, CIMMYT, Mexico, D.F. 1995: pp. 1–140.
- Murai K, Takumi S, Koga H, Ogihara Y: Pistilloidy, homeotic transformation of stamens into pistil-like structures, caused by nuclear-cytoplasm interaction in wheat. *Plant Journal*, 29, 2002: 169–181.
- Nordborg M: Linkage disequilibrium, gene trees and selfing: an Ancestral recombination graph with partial self-fertilization. *Genetics*, 154, 2000: 923–929.
- Nečásek J, Cetl I, Avratuščuková N, Benec S, Kníže B, Ondřej M, Pokorný V, Romanovský A, Vondrejs V: *Obecná genetika*, 1979, 568 s, vydalo SPN v Praze jako publikaci č. 66-03-13/2, Vydání 2.
- Okada T, Jayasinghe J, Nansamba M, Baes M, Warner P, Kouidri A, Correia D, Nguyen V, Whitford R, Baumann U: Unfertilized ovary pushes wheat flower open for cross-pollination. *Journal of Experimental Botany*, 69(3), 2018: 399–412.
- Peng ZS, Martinek P, Kosuge K, Kuboyama T, Watanabe N: Genetic mapping of a mutant gene producing three pistils per floret in common wheat. *Journal of Applied Genetics*, 49(2), 2008: 135–139.
- Peng ZS, Yang J, Wei SH, Zeng JH: Characterization of common wheat (*Triticum aestivum* L.) mutation line producing three pistils in a floret. *Hereditas*, 141, 2004: 15–18.
- Peng ZS, Yang ZJ, Ouyang ZM and Yang H: Characterization of a novel pistillody mutant in common wheat. *Australian Journal of Crop Science*, 7, 2013: 159–164.

- Peng ZS: A new mutation in wheat producing three pistils in a floret. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 189(4), 2003: 270–272.
- Pollak E: On the theory of partially inbreeding finite populations. I. Partial selfing. *Genetics*, 117, 1987: 353–360.
- Reynolds MP, Pellegrineschi A, Skovmand B: Sink-limitation to yield and biomass: a summary of some investigations in spring wheat. *Annals of Applied Biology*, 146, 2005: 39–49.
- Saraike T, Shitsukawa N, Yamamoto Y, Hagita H, Iwasaki Y, Takumi S, Murai K: Identification of a protein kinase gene associated with pistillody, homeotic transformation of stamens into pistil-like structures, in alloplasmic wheat. *Planta*, 227(1), 2007: 211–221.
- Shen GH, Tong YZ, Shen GZ: Localization of the gene multi-ovary on chromosome arm of common wheat using monosomic and ditelosomic analyses. *Acta Genetica Sinica*, 19, 1992a: 513–516.
- Shen, GH, Tong YZ, Shen GZ: Localization of the 'multi-ovary' gene on chromosome and chromosomal arm of common wheat using monosomic and ditelosomic analyses. *Chinese Journal of Genetics*, 19(4), 1992b: 335–338.
- Sicard A, Lenhard M: The selfing syndrome: a model for studying the genetic and evolutionary basis of morphological adaptation in plants. *Annals of Botany*, 107, 2011: 1433–1443.
- Tiwari VK, Lopez K, Riera-Lizarazu O, Kianian SF, Jeffrey M: Physical mapping of compactum and three pistil loci on wheat chromosome 2D using radiation hybrids. *Plant and Animal Genomic XIX Conference*, January 15–19. 2011: San Diego, California USA., (poster)
- Tong YZ, Tong PD: Studies on the multi-ovary character to wheat. I. The morphological appearance and gene loci of multi-ovary wheat. *Journal of Shanghai Normal University* 2, 1984: 48–53.
- Wang JW, Zhang GS, Liu HW, Song YZ, Niu N: Detection of a RAPD marker linked to dominant multi-ovary gene in wheat (*Triticum aestivum*). *J. Agric. Biotech.*, 13, 2005: 553–556.
- Wang ZG, Xu DH, Ji JM, Wang J, Wang M, Ling H, Sun G, Li J: Genetic analysis and molecular markers associated with multi-gynoecia (*Mg*) gene in Trigrain wheat. *Canadian Journal of Plant Science*, 89, 2009: 845–850.
- Wang ZG, Xu DH, Li JM, Wang J, Li WG: Mapping of multi-grain trait in common wheat. In Abstracts of the 111th meeting of Japanese Society of Breeding, Mito, Ibaraki, Japan, 30–31 March 2007. *Breed Res.*, 9 (extra issue 1), 2007: 295.
- Wang Z, Xu D, Ji J, Wang J, Wang M, Ling H, Sun G, Li J: Genetic analysis and molecular markers associated with multi-gynoecia (*Mg*) gene in Trigrain wheat. *Can. J. Plant Sci.* 89, 2009: 845–850.
- Watanabe N, Moshiba M, Martinek P, Peng, ZS: Blue aleurone trait diagnoses developmental origin of three pistils in a floret in common wheat. *Plant Breeding*, 134(3), 2015: 641–645.
- Whitlock MC, Barton NH: The effective size of a subdivided population. *Genetics*, 146, 1997: 427–441.
- Wu J, Li BQ, Zhao JX: Genetic analysis of multi-ovary character of trigrain wheat. *Acta Univ Agriculture Boreali-occidentalis*, 28, 2000: 58–60.
- Yang Q, Yang Z, Tang H, Yu Y, Chen Z, Wei S, Sun Q, Peng ZS: High-density genetic map construction and mapping of the homologous transformation sterility gene (*hts*) in wheat using GBS markers. *BMC Plant Biol.*, 18(1), 2018: p301. doi: 10.1186/s12870-018-1532-x.
- Yang ZJ, Peng ZS, Wei SH, Yu Y, Cai P: Identification of differentially expressed genes in three-pistil mutation in wheat using annealing control primer system. *Gene*, 485(2), 2011: 81–84.
- Yang ZJ, Peng ZS, Wei SH, Yu Y: Cloning and characterization of endo- β -1,4-glucanase genes in the common wheat line three pistils. *Genetics and Molecular Biology*, 36(3), 2013: 400–407.
- Yang ZJ, Chen ZY, Peng ZS, Yu Y, Liao MG, Wei SH: Development of a high-density linkage map and mapping of the three-pistil gene (*Pis1*) in wheat using GBS markers. *BMC Genomics*, 18 2017: p567. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-3960-7>
- Zhi JQ, Chen TY, Jia ZS, Wu HL, Jia CH: Report on the appearance and heredity of the wheat with three pistils. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 17, 2002: 85–87. doi: 10.3321/j.issn:1000-7091.2002.z1.018

7. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE

- Liao M, Peng ZS, Yang Z, Wei S, Martinek P: Identification of differentially expressed genes in a pistillody common wheat mutant using an annealing control primer system. *Genetics & Molecular Research*, 2015, 14(2): 3995–4004.
- Martinek P, Watanabe N, Peng, ZS: Gene resources of wheat (*Triticum aestivum* L.) with different arrangement of spikelets in spike. 7th International Wheat Conference, Mar del Plata, Argentina, 2005, p. 341. (poster)
- Peng ZS, Martinek P, Kosuge K, Kuboyama T, Watanabe N: Genetic mapping of a mutant gene producing three pistils per floret in common wheat. *Journal of Applied Genetics*, 49(2), 2008: 135–139.
- Watanabe N, Moshiba M, Martinek P, Peng, ZS: Blue aleurone trait diagnoses developmental origin of three pistils in a floret in common wheat. *Plant Breeding*, 134(3), 2015: 641–645.

8. KONTAKTNÍ ADRESY OPONENTŮ, AUTORA A OSVĚDČENÍ O CERTIFIKACI

Oponenti:

Ing. Ondřej Veškrna, Ph.D.

SELTON, s.r.o.

Stupice 24

250 84 Sibřina

veskrna@selgen.cz

Ing. Petr Sedlák, Ph.D.

Česká zemědělská univerzita v Praze

FAPPZ/AF212

Kamýcká 129

165 00 Praha 6 - Suchbátka

sedlak@af.czu.cz

Ing. Vladimíra Horáková

Ústřední kontrolní ústav zemědělský

Pracoviště pšenic, tritikále a žita

Hroznová 63/2

656 06 Brno

vladimira.horakova@ukzuz.cz

Autor:

Ing. Petr Martinek, CSc.

Agrotest fyto, s.r.o.

Havlíčková 2787/121

767 01 Kroměříž

Tel.: +420 573 317 152

martinek@vukrom.cz


 Ústřední kontrolní
 a zkušební ústav zemědělský
 Držitel certifikátu ISO 9001

Hroznová 2
656 06 Brno

www.ukzuz.cz
 ID DS: ugbaq7

IČO: 00020338
 DIČ: CZ00020338

v y d á v á

OSVĚDČENÍ

UKZUZ 166508/2018

o uznání metodiky v souladu s podmínkami Metodiky hodnocení výzkumných organizací a programů účelové podpory výzkumu, vývoje a inovací, schválené usnesením vlády dne 8. února 2017, číslo 107 a její samostatné přílohy č. 4 schválené usnesením vlády dne 29. listopadu 2017 č. 837.

Název metodiky: **Nová metoda získávání hybridů pro potřeby šlechtění pšenice**

Autor/autoři: **Ing. Petr Martinek, CSc.**

Název organizace/cí: **Agrotest fyto, s.r.o.**

Místo vydání: **Kroměříž, Agrotest fyto, s.r.o.**

Rok vydání: **2018**

Metodika byla vypracována v rámci výzkumného projektu/podpory na rozvoj výzkumné organizace MZe ČR NAZV QJ1510206

Využívá projekt „Pravidla pro odvětví zemědělství, lesnictví, rybolov“? **ANO x NE**

V případě, že projekt využívá „Pravidla pro odvětví zemědělství, lesnictví a rybolovu“, je výsledek typu N_{met} zdarma k dispozici všem zájemcům na webové stránce: www.vukrom.cz

Brno 19. 12. 2018

Razítko odborného orgánu státní správy

Jméno zástupce odborného útvaru státní správy
 Funkce zástupce odborného útvaru státní správy:

Ing. Daniel Jurečka
 ředitel ústavu

Podpis zástupce odborného útvaru státní správy

Souhlas ředitelky Odboru vědy, výzkumu a vzdělávání MZe:

V dne 21.12.2018

Ing. Pavlína Adam, Ph.D.

ISBN 978-80-87555-17-0

Vydal: Agrotest fyto, s.r.o., Kroměříž