

Chmelařský institut s.r.o.



Chmelařský institut s.r.o.

**METODIKA ŠLECHTĚNÍ CHMELE NA ODOLNOST
K *VERTICILLIUM NONALFALFAE* S VYUŽITÍM
GENETICKÝCH ZDROJŮ**

Vladimír Nesvadba a kol.

CERTIFIKOVANÁ METODIKA PRO PRAXI

**METODIKA ŠLECHTĚNÍ CHMELE NA ODOLNOST K VERTICILLIUM
NONALFALFAE S VYUŽITÍM GENETICKÝCH ZDROJŮ**
Metodika pro praxi

VEDOUcí AUTORTSKÉHO KOLEKTIVU

Ing. Vladimír Nesvadba, Ph.D.

SPOLUAUTOŘI

Ing. Josef Patzak, Ph.D.

Ing. Petr Svoboda, CSc.

Ing. Jitka Charvátová

Sabina Trnková

RECENZENTI

Ing. Vlastimil Zedek

Prof. Ing. Josef Pulkrábek, CSc.

Pracovník státní správy MZe

ČZU v Praze

Metodika vznikla za finanční podpory Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy a je výstupem řešení mezinárodního výzkumného projektu EUREKA E! 12662 „Tvorba genotypů chmele odolných k Verticillium nonalfalfae vhodných pro pěstování v České republice i v rámci Evropské unie“

Vydavatel Petr Svoboda
ISBN 978-80-86836-48-5

OBSAH

1. Cíl metodiky	3
2. Dedikace	4
3. Úvod	4
4. Vlastní metodika	5
4.1 Testování výchozího materiálu	6
4.1.1 Využití molekulárně-genetických markerů pro identifikaci odolnosti k <i>Verticillium nonalfalfae</i>	6
4.1.2 Umělé infekce	11
4.1.3 Přirozené infekce	15
4.2 Šlechtění chmele	17
4.2.1 Metody šlechtění chmele	17
4.2.2 Selektce šlechtitelského materiálu	18
4.2.3 Výběry nadějných genotypů	19
4.2.4 Testování odolnosti k <i>Verticillium nonalfalfae</i>	20
4.2.5 Ověření odolnosti	20
4.3 Hodnocení odolných genotypů chmele	20
4.3.1 Agrotechnické aspekty	20
4.3.2 Pivovarské využití	22
4.4 Uplatnění odolných odrůd chmele v praxi	24
5. Porovnání novosti postupů	25
6. Popis uplatnění metodiky	25
7. Ekonomické aspekty	25
8. Seznam použité literatury	26
9. Seznam publikací, které metodice předcházely	27
Abstrakt	28
Abstract	28

1. Cíl metodiky

První výskyt patogena *Verticillium nonalfalfae* v České republice byl registrován v roce 2017. V České republice není řešena tato problematika testace odolnosti k patogenu z důvodu karanténní choroby, proto byl podán společný projekt s partnerem z Anglie, se spoluprací s pracovištěm ve Slovinsku. V těchto zemích mají zkušenost s testováním chmele i šlechtěním chmele na odolnost k *Verticillium nonalfalfae*. Společný projekt s Anglií zahrnuje i šlechtitelský postup při tvorbě genetického materiálu. Cílem metodiky je vytvořit šlechtitelský postup, včetně testace výchozího materiálu, pro tvorbu nových odolných genotypů chmele k *Verticillium nonalfalfae*. Základem výchozího materiálu je kolekce genetických zdrojů chmele, která je součástí Národního programu konzervace a využívání genetických zdrojů rostlin a biodiversity (MZe 33083/03-300 6.2.1. – MZe ČR), které podporuje MZe. Metodika bude určena pro zefektivnění šlechtění chmele na odolnost k *Verticillium nonalfalfae* v České republice. Metodika bude k dispozici všem uživatelům.

Metodika zahrnuje šlechtitelský postup pro tvorbu nových odolných genotypů, které by byly vhodné pro pěstelskou i pivovarskou aplikaci. Metodika současně zahrnuje i metody testování na odolnost k *Verticillium nonalfalfae* jak u stávajícího genofondu chmele, tak i u perspektivního šlechtitelského materiálu. Cílem je, aby bylo možné testovat jakoukoliv chmelovou odrůdu chmele, která by se začala pěstovat v podmínkách České republiky.

2. Dedikace

Metodika je získána v rámci plánovaného výsledku řešeného projektu EUREKA LTE2018 „Tvorba genotypů chmele odolných k *Verticillium nonalfalfae* vhodných pro pěstování v České republice i v rámci Evropské unie“. Projekt je řešen s podporou Evropské unie. Poskytovatelem finančních prostředků je Ministerstvo školství, mládeže a tělovýchovy České republiky.

3. Úvod

V České republice se v roce 2017 poprvé vyskytla karanténní choroba *Verticillium nonalfalfae*, která způsobuje vadnutí chmelových rostlin. Tato choroba způsobuje vysoké ztráty v produkci chmele (Lutz K. et al., 2019). V současné době není přímé ochrany proti tomuto patogenu (Radišek S., 2009). Příznaky výskytu *Verticillium nonalfalfae* byly pozorovány inspektory ÚKZÚZ v červenci 2017 na dvou chmelnicích o výměrách 2,65 a 2,54 ha, v

Olomouckém kraji v okrese Přerov. Vzdálenost napadených chmelnic byla asi 800 m. Na každé chmelnici bylo napadeno odhadem 15-25 % rostlin. Příznaky zahrnovaly hnědnutí a usychání listů, lodyh a celých rostlin a hnědnutí cévních svazků. Intenzita příznaků byla různá od středních až po vážné, včetně odumírání celých rostlin.

Od roku 2018 je problematika tvorby nových odolných genotypů chmele k *Verticillium nonalfalfae* řešena v rámci mezinárodního projektu „Tvorba genotypů chmele odolných k *Verticillium nonalfalfae* vhodných pro pěstování v České republice i v rámci Evropské unie“ v rámci programu EUREKA. První částí projektu je testace výchozího materiálu pro šlechtění chmele na odolnost k *Verticillium nonalfalfae*. Do současné doby se na tuto chorobu netestoval ani současný sortiment odrůd chmele ani šlechtitelský materiál. Po prvním výskytu tohoto patogena v provozních chmelnicích je nutné zahájit testování na výskyt *Verticillium nonalfalfae* a vytvořit nový šlechtitelský genofond chmele vykazující odolnost k této karanténní chorobě. Současně se bude pracovat na využití molekulárně-genetických metod pro identifikaci genu rezistence Ve1 ve stávajících odrůdách chmele a následném šlechtitelském materiálu (Flajsman M. et al., 2017; Willaert L., et al., 2019). Cílem bude nalézt potencionální molekulárně-genetické markery pro zefektivnění šlechtitelského procesu.

Testace na odolnost k *Verticillium nonalfalfae* provádí jediné pracoviště v Evropě a to ve slovinském Ústavu pro výzkum a šlechtění chmele v Žalci. Získané výsledky jsou velmi důležité pro výběr matečných rostlin pro šlechtění chmele na odolnost k *Verticillium nonalfalfae*. Je důležité u těchto genotypů hodnotit výkonnost v českých podmínkách, protože ta může být velmi rozdílná od výkonnosti v zemi původu.

Vlivem vysoké variability povětrnostních podmínek v průběhu vegetace v posledních letech se preferuje stabilita výkonnosti v průběhu pěstování chmele (Nesvadba V., Krofta K., 2003). Proto je v posledních letech šlechtění chmele zaměřeno na stabilitu výkonnosti u aromatických odrůd chmele využívaných v českých pivovarech, které budou vykazovat vyšší odolnost než Žatecký poloraný červeňák.

4. Vlastní metodika

Metodika zahrnuje postup testace a tvorby genotypů chmele na odolnost k *Verticillium nonalfalfae*. Součástí metodiky je i aplikace nových genotypů chmele do pěstitelské i pivovarské praxe.

4.1 Testování výchozího materiálu

Základem výchozího šlechtitelského materiálu je kolekce genetických zdrojů chmele. Genetické zdroje chmele jsou důležitým zdrojem šlechtitelského materiálu (Charvátová a kol., 2017). Kolekce je charakteristická širokou genetickou variabilitou, která je využívána pro šlechtitelské cíle. V České republice je Ministerstvem zemědělství podporován "Národní program konzervace a využívání genetických zdrojů rostlin a agrobiodiversity", jehož součástí je polní kolekce chmele. Udržovatelem této kolekce je Chmelařský institut s.r.o. v Žatci.

Genetické zdroje chmele zařazené do této unikátní kolekce jsou děleny dle způsobu jejich získání do těchto skupin:

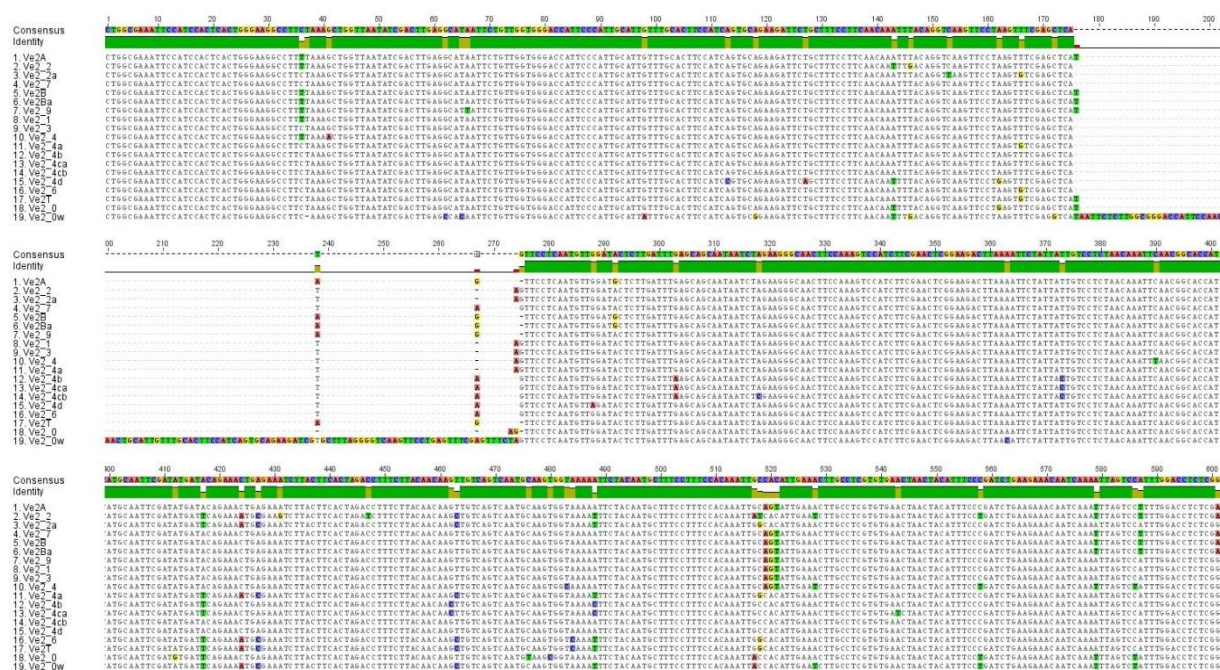
- a) Krajské a primitivní formy.
- b) Pěstované a restringované odrůdy.
- c) Ostatní biologický materiál (nová šlechtění, význačné komponenty hybridů).
- d) Plané chmele.

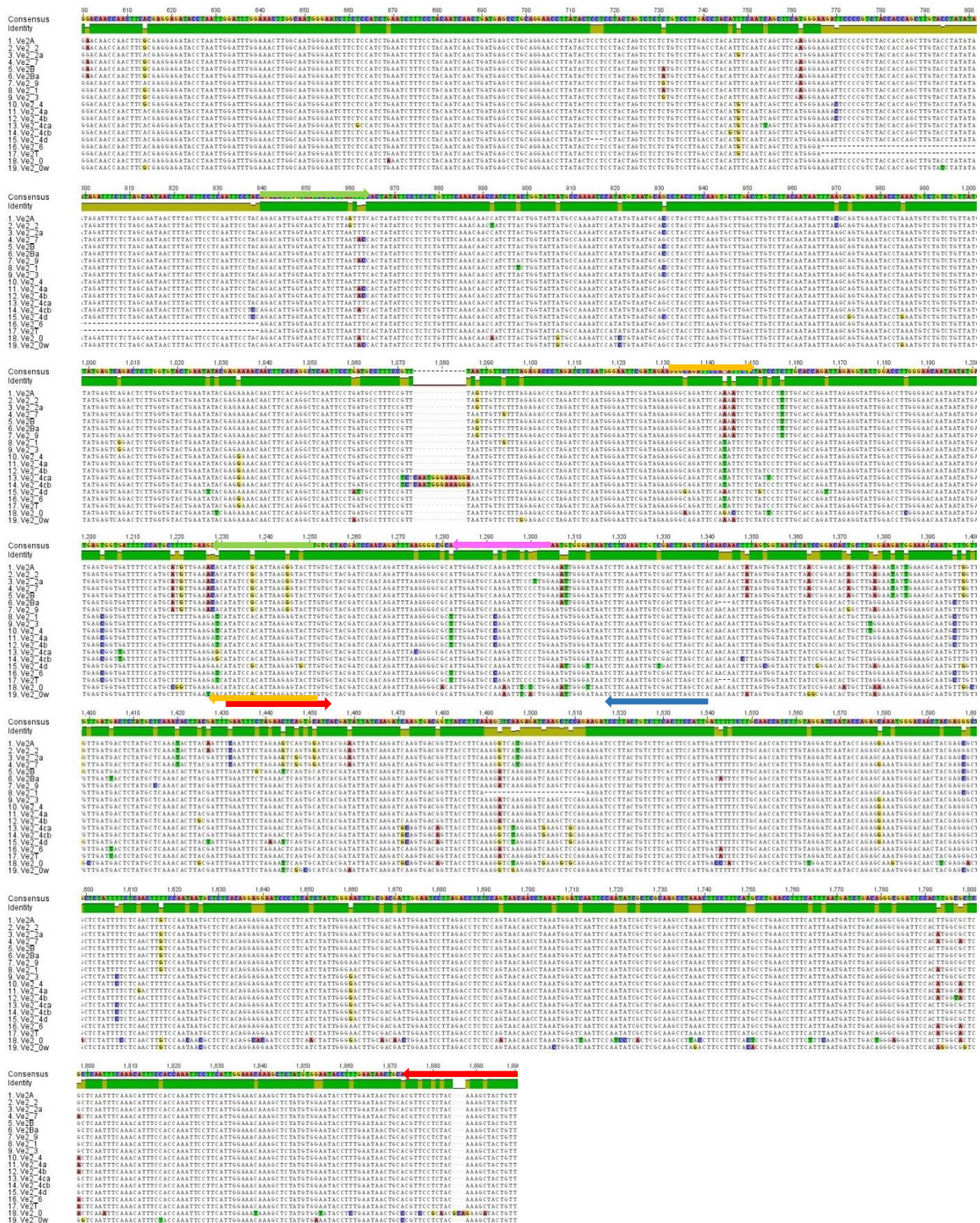
Kolekce chmele je udržována v polní kolekci (*ex situ*), což má velkou výhodu, že všechny položky jsou použitelné pro šlechtění chmele každý rok. Současně je řada položek duplikována v *in vitro* nebo kryo kolekci. Pro testování vybraných genotypů chmele na odolnost k *Verticillium nonalfalfae*, jsou genotypy odebírány z této kolekce, čímž se zaručuje původ testovaných odrůd chmele. Množení chmele pro testování je prováděno klasickým řízkováním ze zelených výhonů.

4.1.1 Využití molekulárně-genetických markerů pro identifikaci odolnosti k *Verticillium nonalfalfae*

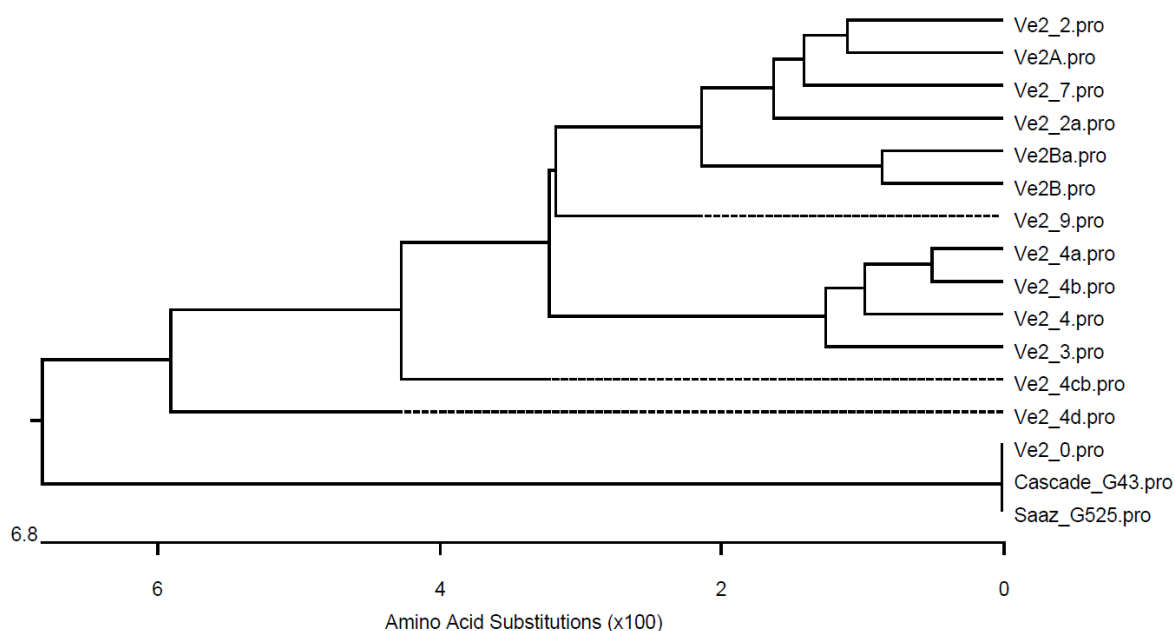
Obecně platí, že rezistence k mnoha patogenům je založena na strategii genu rezistence proti genu virulence patogena. Ukazuje se, že se během evoluce vyvíjely geny rezistence k *Verticillium* u rostlin společně (Song et al., 2017). Při evoluci docházelo k časté mutagenézi, duplikacím a translokacím genů, ruku v ruce s evolucí patogena a jeho virulentních kmenů. Jako jeden z účinných genů u rostlin byl popsán gen *Ve1* (Song et al., 2017). U chmele se šlechtitelskou prací podařilo získat odrůdu Wye Target, která byla odolná k *Verticillium* vadnutí (Darby, 2001). Na základě šlechtitelských a molekulárně-genetických analýz bylo získáno několik kandidátních homologických sekvencí (Jakše et al., 2013; Majer et al., 2014). V současné době jsou již k dispozici genomy odrůd Cascade (Hill et al., 2017; Padgitt-Cobb et

al., 2021) a ŽPČ (Natsume et al., 2015), kde se vyskytuje několik variant genu Ve1. Jedná se o varianty Ve1-1 (cotnigy Saaz/2020057/112540, Cascade000008F), Ve1-2 (cotnigy Saaz/2020057/525, Cascade000080F) a sekvenčně podobné (cotnigy Saaz/2020057/128049, Saaz/2020057/123138, Cascade006953F). Dvě základní varianty Ve1-1 a Ve1-2 se vyskytují ve všech molekulárně testovaných genotypech chmele. Rezistence byla pozorována pouze u genu Ve1-2, kde byla nalezena u Wye Targetu sekvenčně odlišná varianta 2A a 2B. V experimentech na tabáku byla prokázána 75% účinnost rezistence k *Verticillium* u sekvenční varianty Ve1-2A, kdežto u sekvenční varianty Ve1-2B pouze 10% (Song et al., 2017). Tyto sekvenční varianty genu Ve1-2 nejsou jediné, když bylo dříve charakterizováno dalších 9 variant (Majer et al., 2014). Naši další sekvenční analýzou byly zjištěny ještě nové varianty genů z planých druhů chmele, které ukazuje obrázek 1. Ne všechny varianty však mohou být translatovány do proteinu, když mají porušený čtecí rámec. Jedná se o varianty Ve1-2.1, Ve1-2T, Ve1-2.4ca, Ve1-2.6, Ve1-2.5, Ve1-2.8 a variantu základní sekvence Ve1-2.0 z planých českých chmelů. Bohužel není ověřeno, jak jsou účinné jednotlivé varianty genu rezistence Ve1-2. Na základě proteinové homologie (obrázek 2) jsou nejbližší variantě Ve1-2A sekvenční varianty Ve1-2.2, Ve1-2.2a a Ve1-2.7.





Obrázek 1.: Sekvenční homologie a polymorfismus jednotlivých sekvenčních variant genu rezistence Ve1-2 s vyznačenou pozicí jednotlivých PCR primerů (Geneious Pro 4.8.2, Biomatters Ltd., Auckland, New Zealand).



Obrázek 2: Fylogenetický strom jednotlivých sekvenčních variant genu Ve1-2 na základě homologie aminokyselinové sekvence proteinů (MegAlign module, LASERGENE systém v. 7.1, DNASTar, Madison, WI, USA).

Pro rezistentní šlechtění chmele je přínosné znát, jaké varianty genu Ve1-2 se nacházejí v genomu výchozích genetických zdrojů pro šlechtění. Využití molekulárně-genetických markerů je jednou z nejúčinnějších a nejpresnějších metod, jak tyto znalosti získat. Na základě našich výsledků, homologie a variability jednotlivých variant genu Ve1-2 byly navrženy sady PCR primerových kombinací pro detekci jednotlivých variant genu (Tabulka 1). Molekulárně-genetické analýzy jednotlivých markerů jsou prováděny podle metodiky Patzaka a Matouška (2013). Metodika zahrnuje tři základní fáze: izolaci DNA, vlastní PCR (polymerázovou řetězovou reakci) a vyhodnocení produktů pomocí elektroforetické separace v gelu a následné detekce pomocí UV transiluminátoru. K izolaci DNA jsou využívány komerční izolační kity, jako například DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, SRN) a EZNA Plant DNA Kit (Omega Bio-tek, Norcross, GA, USA), nebo lze použít modifikovanou extrakční CTAB metodu. Koncentrace vyizolované DNA je kvantifikována absorbcí UV záření vlnové délky 260 nm na UV-VIS spektrofotometru (UV-1601, Shimadzu, Japonsko), následně upravena pro PCR na doporučenou koncentraci 10 ng na mikrolitr a pro další použití skladována v mrazicím boxu při -20°C. Pro PCR je použit standardní protokol. Do sterilních mikrozkušavek o objemu 200 mikrolitrů napipetujeme PCR reakční směs (25 mikrolitrů) skládající se z: 50 ng templatové genomické DNA, 1x PCR master mixu (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 200

□M dNTPs, 1,25 U termostabilní Taq DNA polymerázy (Qiagen, Hilden, SRN) a 20 pmol forward a reverse primeru pro jednotlivé markery (Tabulka x). Vlastní PCR amplifikace probíhá v termocykleru. Vzorky byly nejprve denaturovány 5 minutovou inkubací při 94°C. Polymerázová řetězová reakce měla následující časový a teplotní profil: 35 cyklů – denaturace 30 s při 94°C, „annealing“ primerů 30 s při 54 - 60°C a elongace 60 s při 72°C. Reakce je ukončena závěrečnou 10 minutovou elongací při 72°C a zchlazením na 4°C. Amplifikované PCR produkty jsou separovány elektroforetickou analýzou v 2% horizontálním agarózovém (SeaKem LE, FMC Bioproducts, Philadelphia, PA, USA) gelu v TBE pufru (90 mM Tris-borát, 2 mM EDTA pH=8,0) při napětí 2 V/cm. Dobře rozdělené produkty jsou barveny ethidium bromidem, vizualizovány UV zářením vlnové délky 302 nm na UV transiluminátoru a fotografovány CCD kamerou přes hardwarové a softwarové rozhraní (Bio-Print CX4, Vilber Lourmat, Collégien, Francie) do paměti osobního počítače. Molekulární velikosti jednotlivých PCR produktů jsou odečteny pomocí molekulárních standardů pGEM DNA markeru a 100 bp ladderu (Promega, Madison, WI, USA).

Tabulka 1: Nukleotidové sekvence sad specifických PCR primerů pro amplifikaci fragmentů jednotlivých alel genu Ve1-2

Primerová kombinace	Forward primer (5' → 3')	Reverse primer (5' → 3')	Varianty genu Ve1-2
Ve1-2a	TCAATTTCTAGAAGTCAGTGGATC	AACAGTAGCTTTGTAGAGGAACG	2A, 2.2, 2.2a, 2.7
Ve1-2b	GGGCAGATTCCAAAATCTCTATCCTT	CCACTGACTTCTAGAAATTGAAATT	2A, 2.2
Ve1-2c	GGGCAGATTCCAAAATCTCTATCCTT	CAATGGAAGTGAAGACAGTAAGGA	2A, 2B, 2Ba, 2.2, 2.2a, 2.7, 2.9
Ve1-2d	GTCAATCAGCTTCATGGGAAGAC	CCAGGGGAATCTGGGCATCCAAA	2.4, 2.4a, 2.4b, 2.6, 2T
Ve1-2e	AGACATTGGTAATCATCTTAGTTT	AGTACCCTTAATGCGGATATGTGT	2A, 2.2
Ve1-2f	AGACATTGGTAATCATCTTAATAC	AGTACCCTTAATGCGGATATGTGT	2.7, 2.9
Ve1-2g	AGACATTGGTAATCATCTTAATT	CCAGGGGAATCTGGGCATCCAAA	2.1, 2.3, 2.4, 2.6, 2T

Pro ověření jednotlivých variant genu Ve1-2 lze PCR produkty naklonovat a osekvenovat. Jednotlivé molekulárně-genetické markery byly využity pro analýzu variant genu Ve1-2 v 300 odrůdách světového sortimentu chmele, 85 genotypch šlechtitelského materiálu a 40 planých chmelech. Odlišné varianty základní sekvence genu Ve1-2 se nevyskytují v genomu chmele často, výsledky analýz jsou shrnuty v tabulce 2. Účinná varianta genu rezistence Ve1-2A se vyskytuje pouze v odrůdě Wye Target a novošlechtěncích N11, 12 a 13 pro nízkou konstrukci. U českých odrůd byla zjištěna pouze varianta genu Ve1-2.9 u odrůd

Kazbek, Agnus, Vital, Gaia a Mimosa (Tabulka 2). Ve šlechtitelském materiálu byly nalezeny ještě varianty genu Ve1-2.3, 2.4a, 2.4cb a 2.9 a nefunkční 2T, 2.4ca a 2.6 (Tabulka 2).

Tabulka 2: Varianty genu rezistence k *Verticillium* Ve1-2 ve vybraných genotypch a novošlechtěních

Varianta genu Ve1-2	Genotypy
2A, 2B, 2Ba	Wye Target, N11, N12, N13
2T	Wye Target, Late Cluster, N11, N12, N13
2.1	S1001.001
2.2	S1019.001, Santiam
2.2a	Styrian Dragon, Kirin II
2.3	Chinook, Columbus, 5164, 5166, 5169, 5190, 5193, 5196, 5197
2.4	S1401.001
2.4a	Ariana, Styrian Dragon, Columbus, Kirin II, Crystal, Santiam, 5164, 5166, 5169, 5195, 5196, 5461
2.4b	plané USA
2.4ca	Kanada 50M, 5495, 5501, 5503, 5507
2.4cb	Late Cluster, 5618
2.4d	Chinook
2.6	Wye Target, Late Cluster, Willamete, Ringwood Special, Pride of Ringwood, Pilot, Pioneer, Columbia, Smooth Cone, Callicross, 5461, 5501, 5512, 5606, 5617
2.7	Comet
2.9	Galena, Nugget, Brewers Gold, Kazbek, Agnus, Vital, Gaia, Mimosa, Comet, Blisk, Marynka, Atlas, Horizon, Alta, Oktawia, Bullion, Outeniqua, Southern Star, 4964, 5164, 5166, 5169, 5189, 5193, 5194, 5196, 5398, 5462, 5463, 5495, 5501, 5503, 5507, 5606, 5621, 5668

4.1.2 Umělé infekce

Metodou umělé infekce je možné stanovit stupeň citlivosti/rezistence k danému patogenu v relativně kontrolovaných podmínkách mimo pěstitelskou plochu.

Inokulum se připravuje pěstováním letálních izolátů *V. nonalfalfae* (116VT a 117VT izolovaných z ohnisek verticilliového vadnutí v ČR v roce 2017) v kapalném médiu třepáním na rotační třepačce (50 ot./min) při pokojové teplotě po dobu 5 dnů ve tmě. Spory jsou následně odděleny od biomasy filtrací a upraveny na koncentraci 5×10^6 konidií na ml sdH_2O . Dvanáct rostlin na genotyp je potom naočkováno ponořením jejich kořenů do inokula na 10 minut. Rostliny jsou pěstovány ve 4 litrových květináčích a udržovány jako samostatné rostliny. Inokulace se dle stavu rostlin provádí v období duben až květen.

Pro hodnocení stupně infekce jsou používány následující referenční odrůdy chmele se známým stupněm citlivosti/rezistence k infekci: Wye Target (R - rezistentní), Wye Challenger (SR/SC – středně rezistentní/ středně citlivý) Fuggle (C/VC - citlivý/vysoce citlivý), Celeia (VC – vysoce citlivý).

Hodnocení infekce se provádí po objevení prvních příznaků ve 14 denních intervalech a pro posouzení rozsahu infekce se používá stupnice 0-5 podle podílu listů postižených příznaky vadnutí. Stupeň 0 znamená žádné příznaky listů, 1 = 1 až 20 % zvadlé listové plochy, 2 = 21 až 40 % zvadlé listové plochy, 3 = 41 až 60 % zvadlé listové plochy, 4 = 61 až 80 % zvadlé listové plochy a 5 = 81 až 100 % zvadlé plochy listů. Na konci hodnocení vnějších příznaků se vyšetřují cévní pletiva rostlin v příčných řezech stonků a kořenů (0 = žádné příznaky onemocnění, 1 = středně hnědá, 2 = silně hnědá). Na závěr jsou stonky seříznuty 0-5 cm nad úroveň terénu. Pro opětovnou izolaci patogenu a konformaci infekce se vaskulární tkáň nanese na bramborový dextrózový agar (PDA) a druhová identifikace izolátu se kontroluje světelnou mikroskopií. Konečné hodnocení stupně citlivosti/rezistence daného genotypu je vyjádřeno jako průměrný stupeň vadnutí 12 replikovaných rostlin (infikovaných) při posledním hodnocení listů a na základě toho hodnocení jsou genotypy klasifikovány do čtyř kategorií citlivost/rezistence:

- 0-1 rezistentní (R)
- <1-2 středně rezistentní (SR)
- <2-3 středně citlivý (SC)
- <3-4 citlivý (C)
- <4-5 vysoce citlivý (VC)

Rostliny, u kterých po uhynutí napadených výhonů dochází k opětovnému růstu, jsou považovány za přítomné a zahrnuty do dalšího hodnocení.

Po testování je z fytosanitárních důvodů nezbytně nutné veškerý rostlinný materiál zničit parní sterilizací a tepelným kompostováním v komerčním kompostovacím zařízení.

Vlastní testování rezistence je realizováno na izolovaném pozemku v kontrolovaných podmínkách ve Slovinsku (Výzkumná stanice SIHP – Migojnice, Žalec). Rostliny jsou inokulovány metodou máčení kořenů 10 minut v suspenzi virulentních izolátů *V. nonalfalfae*. Rostliny byly pěstovány v květináčích a udržovány jako jedno révové.

První příznaky infekce byly pozorovány 4 týdny po inokulaci. Podle hodnocení příznaků a srovnání s referenčními kultivary byla stanovena následující citlivost k patogenu *Verticillium nonalfalfae* u českých odrůd. U každé odrůdy jsou vedeny protokoly napadení a projevu patogena. Výsledky poukazují na odolnost (obr. 3 - odrůda Agnus) nebo naopak na

citlivost (obr. 4 - odrůda ŽPČ). Protokoly jsou uvedeny v angličtině z důvodu jednotného světového hodnocení. Po testování byl veškerý rostlinný materiál zničen parní sterilizací.

GENOTYPE: Agnus Mean wilt score of infected plants (1.7) Class: moderately resistant (MR) - because of high downy mildew infection and low re-isolation rate we recommend additional trial for this genotype							
Plant	Leaf symp. (10.6)	Leaf symp. (24.6)	Leaf symp. (15.7)	Cross section (roots)	Cross section (stem)	Re-growth	Reisolation
1	0	0	0	0	0	-	-
2*	0	1	1	1	0	-	-
3	0	1	1	1	1	-	-
4*	/	/	/	/	/	/	/
5	0	0	1	0	1	-	-
6	0	0	1	1	1	-	-
7	0	1	1	1	0	-	+
8*	0	1	2	1	1	-	+
9	1	1	2	1	1	-	+
10*	0	0	1	0	0	-	-
11*	/	/	/	/	/	/	/
12*	/	/	/	/	/	/	/

Obrázek 3: Protokol hodnocení odrůdy Agnus

GENOTYPE: Osvald's clone 72 Mean wilt score of infected plants (5,0) Class: highly susceptible (HS) - because of high downy mildew infection we recommend additional trial for this genotype							
Plant	Leaf symp. (10.6)	Leaf symp. (24.6)	Leaf symp. (15.7)	Cross section (roots)	Cross section (stem)	Re-growth	Reisolation
1*	3	3	4	2	2	+	-
2*	2	4	5	2	2	-	+
3*	3	4	5	2	2	+	+
4*	3	4	5	2	2	-	+
5*	1	2	3	1	1	-	-
6*	3	5	5	2	2	-	+
7*	2	4	4	2	2	-	-
8*	2	3	3	2	2	-	-
9*	3	4	5	2	2	-	+
10*	3	5	5	2	2	+	-
11*	3	5	5	2	2	-	+
12*	1	3	4	2	2	+	-

Obrázek 4: Protokol hodnocení odrůdy ŽPČ

V letech 2019 a 2020 bylo provedeno v nádobách testování citlivosti vybraných českých odrůd k infekci patogenem *Verticillium nonalfalfae*. Byly hodnoceny české odrůdy Osvaldův klon 72, Agnus, Harmonie, Bohemie a Saaz Late. Infekce byla provedena pomocí směsi izolátů původem z České republiky. Referenční odrůdy Wye Target (rezistentní), Wye Challenger (středně rezistentní/středně citlivý), Fuggle (citlivý/silně citlivý), Celeia (silně citlivý), byly inokulovány stejným způsobem, použity byly izoláty původem z Anglie.

Výsledky 2019:

Osvaldův klon 72 - silně citlivý

Agnus – středně rezistentní

Harmonie – středně citlivý

Bohemie – silně citlivý

Saaz Late – citlivý

Referenční odrůdy byly hodnoceny následně:

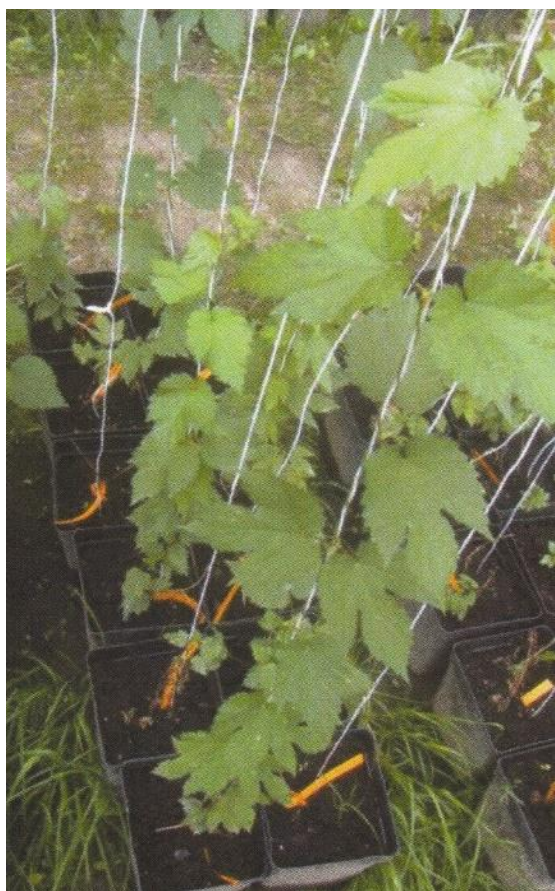
Wye Challenger (UK) – středně citlivý

Wye Target (UK) – rezistentní

Fuggle (UK) – citlivý

Celeia (Slo) – silně citlivý

Na obrázcích 5 (Agnus) a 6 (ŽPČ) jsou patrné rozdíly projevu *Verticillium nonalfalfae*.
Žatecký poloraný červeňák je vysoce citlivá odrůda.



Obrázek 5: Agnus
(Foto: Radišek)



Obrázek 6: Osvaldův klon 72
(Foto: Radišek)

V roce 2020 byly hodnoceny další české odrůdy Osvaldův klon 72, Agnus, Harmonie, Bohemie a Saaz Late. Infekce byla provedena pomocí směsi izolátů původem z České republiky. Referenční odrůdy Wye Target (rezistentní), Wye Challenger (středně rezistentní/středně citlivý), Fuggle (citlivý/silně citlivý), Celeia (silně citlivý), byly inokulovány stejným způsobem, použity byly izoláty původem z Anglie.

Výsledky 2020:

Boomerang – středně rezistentní

Saaz Brillinat – mírně citlivý

Saaz Comfort – citlivý

Harmonie - citlivý

Country – citlivý

Referenční odrůdy byly hodnoceny následně:

Wye Target (UK) – středně rezistentní

Wye Challenger (UK) – středně citlivý

Fuggle (UK) – silně citlivý

Celeia (Slo) – silně citlivý

Na základě dosažených výsledků v letech 2019 a 2020 lze rozdělit testované české odrůdy dle odolnosti k *Verticillium nonalfalfae*:

Středně rezistentní: Agnus, Boomerang

Mírně citlivý: Saaz Brilliant

Citlivý: Saaz Late, Saaz Comfort, Harmonie, Country

Silně citlivý: Žatecký poloraný červeňák, Bohemie

4.1.3 Přirozené infekce

Vybrané odrůdy jsou vysazeny do chmelnice s vysokým infekčním tlakem *Verticillium nonalfalfae*. Hodnocení je nutné provádět v průběhu celého vegetačního období. Řada rostlin je napadena a poškozena už na počátku růstu. Později tyto rostliny uschnou. Ale často dochází k symptomům choroby až po tvorbě chmelových hlávek, tj. v srpnu. Pravděpodobně dojde k poškození révy a patogen infikuje rostlinu, která zaschne.

Přirozené infekce se provádí v Anglii. Od roku 2018 bylo zahájeno testování některých českých odrůd chmele na odolnost k *Verticillium nonalfalfae* v provozních podmínkách. Výsadba se provede ve chmelnici s vysokým výskytem *Verticillium nonalfalfae* a to v 6

opakováních. Odolnost se hodnotí dle procentického napadení testovaných odrůd chmele. Výsledky z let 2019 a 2020:

Sládek 20% poškození - Vysoce tolerantní

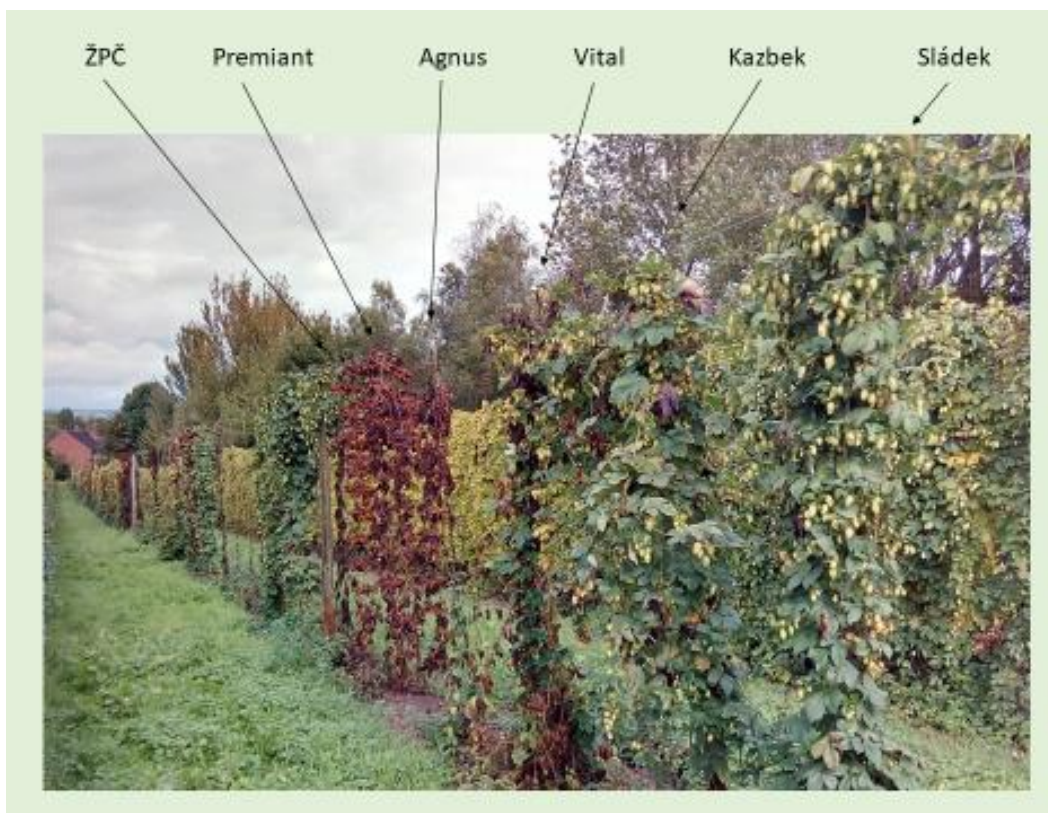
Kazbek a Vital 40% poškození - Tolerantní

Agnus 60% poškození - Středně tolerantní

Premiant 80% poškození - Citlivý

ŽPČ 100% poškození - Velmi citlivý

Z výsledků je patrné, že nejvyšší toleranci vykazuje odrůda Sládek a následně Kazbek a Vital. Naopak do podmínek, kde se vyskytuje *Verticillium nonalfalfae* nelze vysazovat Premiant a ŽPČ (obr. 7).



Obr. 7: Poškození testovaných odrůd chmele přirozenými infekcemi v Anglii (foto: Nesvadba)

4.2 Šlechtění chmele

4.2.1 Metody šlechtění chmele

Základní metodou šlechtění chmele na odolnost je křížení. Jedná se o záměrné opylení samičí rostliny vybraným samčím chmelem. Chmel je vysoce heterozygotní rostlina, proto potomstva vykazují širokou variabilitu. Z potomstev jsou vybírány nejlepší rostliny, které jsou namnoženy a sledovány. Touto metodou vznikly české odrůdy (Sládek, Premiant, Agnus, Vital, Kazbek atd.). V současné době je křížení vhodných samčích a samičích rostlin nejrozšířenější metodou ve šlechtění chmele na světě. Hlavním cílem šlechtitelů je získání nového šlechtitelského materiálu s vysokou výkonností (výnos chmele a obsah chmelových pryskyřic) a odolností k houbovým chorobám.

Postup je založen na izolaci matečných rostlin. Před tvorbou blizen (obrázek 8) je nutné část chmelové rostliny zaizolovat papírovým izolátorem. Z vybraných samčích rostlin (obrázek 9) je odebrán pyl tak, že jsou pazochy odstříhnuty a do druhého dne ponechány ve sklenici s vodou. Pod pazochy je papír, na který se druhý den opatrně sklepá pyl. Štětečkem jsou odstraněny nečistoty a pyl je pak uchován ve zkumavce v lednici.



Obrázek 8: Samičí květenství
(Foto: Trnková)



Obrázek 9: Samčí květenství
(Foto: Nesvadba)

V době vytvoření blizen v izolátorech je vnesen pyl do izolátoru (obrázek 10). Optimální je tento proces 2x až 3x opakovat. Izolátor je stále uzavřený až do doby vytvoření chmelových hlávek. Po vytvoření chmelových hlávek jsou izolátory protrženy, aby nebyl omezen přístup světla v době tvorby a zrání semen (obrázek 11). Chmelové hlávky se semeny jsou sklizeny až ve fyziologické zralosti, tj. na přelomu září/říjen. Sklizené chmelové hlávky jsou sušeny v přirozených suchých podmínkách, aby nedošlo k poškození semen. Například vysokou teplotou v sušárně se sníží klíčivost semen nebo vlhkým prostředím by došlo zplsnivění semen. Když jsou hlávky suché tak se ručně semena oddělí z chmelových hlávek a vyčistí. Do výsevu jsou uchovány v mrazáku. Před uskladněním je stanovena hmotnost tisíce semen (HTS).



Obrázek 10: Izolátory pro křížení chmele
(Foto: Charvátová)



Obrázek 11: Zrání semen
(Foto: Charvátová)

4.2.2 Selektce šlechtitelského materiálu

Selektce je prováděna z potomstev ze semen z realizovaného křížení. Výsev semen se provádí do bedýnek se substrátem a nechá se v přirozených venkovních podmínkách

vymrznout. Následně se vnese do skleníku, kde jsou jednotlivé rostliny přepikýrované do rašelinových květináčů a ve druhé polovině května jsou vysazeny do šlechtitelské školky. Před výsadbou lze pomocí DNA analýz identifikovat samčí rostliny a pak provést výsadby pouze samičích rostlin. Což má za efekt vyřazení nežádoucích samčích rostlin z jednotlivých křížení.

Potomstva v prvním roce pěstování dosahují výšky 4 až 7 m a nelze u nich hodnotit všechny znaky. V prvním roce pěstování se nehodnotí hospodářské znaky, ale zle sledovat odolnost k houbovým chorobám nebo obsah chmelových pryskyřic. Ve druhém roce pěstování rostliny dosahují plné plodnosti a nejlepší genotypy hodnoceny podle klasifikátoru chmele (Rígr a Fáberová, 2000). Na základě dosažených výsledků jsou nejlepší rostliny předány do Hybridní školky kmenových matek (HŠKM).

4.2.3 Výběry nadějných genotypů

V HŠKM jsou vybrané genotypy vysazeny po 2 rostlinách a jejich plné hodnocení je až ve druhém roku po výsadbě. Hodnocení je zaměřeno na odolnost k houbovým chorobám, výnos chmele, obsah a složení chmelových pryskyřic i silic a mechanické rozborů suchých chmelových hlávek. Velký důraz je kladen na sledování variability kvalitativních a kvantitativních znaků. Jsou provedeny podrobné chemické analýzy na obsah a složení chmelových pryskyřic i silic (Krofta, 2018). Po pětiletém hodnocení jsou nejlepší genotypy namnoženy a jsou připraveny pro zařazení do Kontrolní školky (KŠ). Tyto rostliny jsou současně testovány na odolnost k *Verticillium nonalfalfae* pomocí DNA metod. Do KŠ jsou zařazeny pouze genotypy, které vykazují geny odolnosti k *Verticillium nonalfalfae*.

V KŠ jsou vybrané genotypy vysazeny min po 12 rostlinách ve třech opakováních. Plné hodnocení je opět až ve druhém roku po výsadbě. Ověřují se znaky, pro které byly nejlepší genotypy vybrány, např. odolnost k houbovým chorobám, výnos chmele, obsah a složení chmelových pryskyřic i silic, nízká variabilita, agrotechnické vlastnosti, pivovarské testy, bonitace a mechanické rozborů suchých chmelových hlávek. Velký důraz je kladen na projev sledovaných znaků a jejich stabilitu. Po tříletém hodnocení jsou nejlepší genotypy namnoženy. Nejlepší genotypy z KŠ jsou testovány na odolnost k *Verticillium nonalfalfae* pomocí umělých infekcí.

Po pětiletém hodnocení jsou nejlepší genotypy přihlášeny do registračních zkoušek, které provádí Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský (ÚKZÚZ). Tyto genotypy jsou současně vysazeny do chmelnic s výskytem *Verticillium nonalfalfae* pro ověření odolnosti. Cílem je získat nové odrůdy chmele a jejich ověřenou odolnost k *Verticillium nonalfalfae*.

4.2.4 Testování odolnosti k *Verticillium nonalfalfae*

První testování šlechtitelského materiálu je vhodné udělat u nadějných výběrů v HŠKM s využitím molekulárně-genetických markerů pro identifikaci odolnosti k *Verticillium nonalfalfae*. Jedná se o rychlou a levnější metodu (screening). V této první fázi testování na odolnost je nutné určit, zda vybrané genotypy chmele mají geny rezistence. Toto je první předpoklad tvorby odolných genotypů chmele. Testování se provede dle postupu uvedeného v kapitole 4.1.1.

4.2.5 Ověření odolnosti

Ověření odolnosti se provádí pouze u nejlepších genotypů z KŠ a to z finančních důvodů. Tyto genotypy z KŠ jsou namnoženy pro testování pomocí umělých infekcí. Postup podle metodiky bodu 4.1.2. Genotypy, které ykazují odolnosti jsou dále vysazeny do porostů s výskytem *Verticillium nonalfalfae*, kde se ověří jejich odolnost v polních podmínkách. Postup podle metodiky bodu 4.1.3.

4.3 Hodnocení odolných genotypů chmele

Odolné genotypy jsou vysazeny do polních pokusů o minimálním počtu 100 rostlin v pěti odlišných lokalitách (půdní složení, nadmořská výška atd.). Cílem je hodnotit variabilitu požadovaných kvalitativních i kvantitativních znaků mezi lokalitami a tím se stanoví stabilita těchto znaků. Druhým významným krokem hodnocení je sledování časové řady vybraných genotypů od založení HŠKM. Lze předpokládat, že tyto genotypy vykazují od výsadby již desetiletou časovou řadu. Hodnocení stability kvalitativních i kvantitativních hospodářských znaků je velmi důležitý znak jak pro pěstitelskou, tak pivovarskou praxi.

4.3.1 Agrotechnické aspekty

Z pohledu pěstitel chmele u nových odrůd chmele je nutné zajistit rentabilitu výkonnosti po celou dobu pěstování chmele, tj. 10 až 15 let. Jedná se především o hospodářsky významné znaky. Agrotechnické aspekty musí současně splňovat i znaky pro zachování kvality chmele pro obchod s chmelem. Požadované agrotechnické aspekty jsou uvedeny v těchto bodech:

1. **Tolerance k významným chorobám.** Jedná se především o choroby, které jsou v České republice: nejrozšířenější je peronospora chmelová (*Pseudoperonospora humuli*) a méně rozšířené je padlí chmelové (*Podosphaera macularis*).
2. **Vysoký výnos.** Důležitý parametr z hlediska rentability pěstování chmele. Tento cíl je sledován u nově vznikajících odrůd chmele, kde je nastaveno výnosové minimum nad 2 t/ha. U odrůd s vysokým obsahem chmelových pryskyřic se tato hranice zvyšuje. Ale u některých typů odrůd chmele není výnos tak důležitý jako preference požadovaných znaků (např. jemné aroma, specifické vůně chmele atd.)
3. **Požadovaný obsah a složení chmelových pryskyřic a silic.** Tento znak je úzce spojen s pivovarskými vlastnostmi chmele. Dle současného seznamu IHGC se řadí odrůdy do 3 kategorií na aromatické, hořké a ostatní.
4. **Stabilita kvalitativních a kvantitativních parametrů.** Jeden z nejdůležitějších šlechtitelských cílů. Chmel je pěstován na chmelnici 10 až 15 let (při dobré kondici porostu je řada chmelnic i nad 20 let), proto musí po celou dobu pěstování vykazovat požadovaný výnos chmele i kvalitu.
5. **Pěstitelské požadavky.** Velmi důležitá je citlivost k řezu chmele. Některé odrůdy jsou velmi citlivé na mechanizovaný řez a po několika letech pěstování nevytváří dostatečné množství rév potřebných k zavedení. Důležitým znakem je schopnost „samovedení“ rév, protože pak nemůže docházet k samovolnému odklánění vegetačních vrcholů. Některé odrůdy (Saaz Late) mají nízkou pevnost pazochů a dochází u nich k jejich vylamování, především ve větrných polohách. Dalším znakem je nízká variabilita velikosti hlávek, protože vysoká variabilita způsobuje velké problémy při sušení chmele. Při sklizni musí mít dobrou česatelnost (hustota a výška nasazení chmelových hlávek) a především vyrovnanost chmelových hlávek z hlediska posklizňového sušení.
6. **Index stárnutí (HSI).** Po sklizni vlivem oxidace dochází ke stárnutí chmele a tím i jeho snižování kvality. U některých odrůd dokonce ke snížení obsahu chmelových pryskyřic i silic. Jsou známy velké rozdíly mezi odrůdami. Například dobrou skladovací schopnost vykazuje odrůda Premiant a naopak nízkou má odrůda Agnus.

Nové odolné odrůdy chmele musí splňovat všechny pěstitelské parametry, aby nevznikaly další náklady na výrobu. Např. když jsou chmelové hlávky velmi velké a věténka silná, tak se doba sušení prodlužuje až o 2 hod., což zvyšuje náklady na sušení

chmele min. o 20 %. Cílem tvorby nových odolných odrůd je zachování všech vlastností, které mají současné české registrované odrůdy chmele.

4.3.2 Pivovarské využití

Z pohledu šlechtění chmele na odolnost a pěstování chmele v provozních podmínkách lze považovat pivovarské testy za méně významné. Naopak z pohledu obchodu s chmelem a pivovarského využití jsou velmi důležité. Chmel má především pivovarské využití, proto se už v průběhu šlechtitelského procesu provádí pivovarské testy u nových nadějných genotypů chmele. Testy poukazují, do jaké kategorie nebo do jakého pivního stylu lze budoucí odrůdu chmele využít. Nelze opomenout i další využití chmele, jako např. pro farmacii, potravinářství nebo kosmetiku. Šlechtění chmele se zaměřuje pouze na obsah farmaceuticky významných látek, a to obsah xanthohumolu a desmethylxanthohumolu. Pro potravinářství a kosmetiku nejsou speciální odrůdy.

Jak je výše uvedeno, aby se začala pěstovat nová odrůda chmele, tak musí mít nejdříve zajištěný odbyt a to po celou dobu pěstování (10 až 15 let). Právě pivovarské testy nabízejí pivovarům, jak novou odrůdu používat a hlavně jaký má odrůda vliv na daný pivní styl. Z pivovarského pohledu jsou odrůdy chmele rozděleny do dvou kategorií:

1. Piva spodně kvašená. Do spodně kvašených piv se používají hořké a aromatické odrůdy chmele, které mají chmelové aroma. Hořké odrůdy s obsahem nad 10 % alfa hořkých kyselin se používají pro první a někdy pro druhé chmelení. Aromatické s obsahem alfa kyselin 5 až 10 % se používají pro druhé a třetí chmelení. Do aromatických odrůd se řadí i skupina jemně aromatických chmelů, které mají v původu Žatecký poloraný červeňák. Tyto jemně aromatické odrůdy jsou charakteristické obsahem alfa kyselin do 6 %, vyrovnaným poměrem obsahu alfa a beta kyselin, nižším podílem kohumulonu (do 30 % rel.) a podílem silice Farnesenu 10 až 25 % rel. Aromatické chmele se používají především pro druhé a třetí chmelení pro jeho příznivé chmelové aroma. Použití jednotlivých skupin chmelů není striktní, protože některé pivovary používají hořké nebo aromatické odrůdy jako „single“ chmelení, tzn. 100% chmelení jednou odrůdou. Pro hodnocení spodně kvašených piv jsou důležité parametry uvedené v degustačním lístku (obrázek 12).



Chmelařský institut s.r.o.
Kadaňská 2525, 438 46 Žatec

DEGUSTACE POKUSNÝCH PIV

Vzorek č.	Chuť a vůně (max. 25 b.)	Příjemnost hořkosti (max. 15 b.)	Dojem po napití (max. 10 b.)	Celkem bodů (max. 50 b.)	Pořadí (1 – n)	Poznámka

Datum:

Podps:

Obrázek 12: Degustační lístek pro ležácká piva

2. Piva svrchně kvašená. U svrchně kvašených je široká řada pivních stylů, do kterých se používá i široká rozmanitost chmelových odrůd chmele. Do stylu ALE jsou vhodné odrůdy „anglického typu“ s kořenitou, bylinnou až česnekovou vůní. Do stylu IPA (India pale ale) jsou vhodné odrůdy s ovocnou, kořenitou, květinovou nebo bylinnou vůní. Do stylu amerických APA (american pale ale) nebo NEIPA (New England IPA) jsou vhodné odrůdy s vůní ovocnou, citrusovou, tropických plodů atd. Styl belgických pív požaduje směs vůní kořenité, bylinné, dřevité i pryskyřičné. To jsou uvedeny pouze některé pivní styly svrchně kvašených pív. Celkově lze konstatovat, že do svrchně kvašených pív se používají odrůdy, které nemají pouze chmelové aroma. Právě proto je u těchto odrůd nutné dělat pivovarské testy, aby bylo zřejmé, do kterého pivního stylu je nová odrůda vhodná. U svrchně kvašených pív se hodnotí především intenzita a charakter hořkosti a především vůně, kterou ovlivňuje chmel (obrázek 13).



Číslo vzorku	Intenzita vůně (1-5)	Charakter vůně (1-5)	Intenzita hořkosti (1-5)	Charakter hořkosti (1-5)	Dojem po na pití (1-5)	Pitelnost (oblíba) (1-5)	Pořadí (1 až ...)	Poznámka
1								
2								
3								
4								
5								
6								

Hodnocení (známkování):

Intenzita vůně i hořkosti: 1 – velmi silná, 2 – silná, 3 – střední, 4 – slabá, 5 – velmi slabá

Charakter vůně i hořkosti: 1 – příjemná až 5 – nepříjemná

Dojem po napití, pitelnost: 1 – nejlepší až 5 – nejhorší

Podpis:

Obrázek 13: Degustační lístek pro svrchně kvašená piva

Pivovarské testy se provádí v pokusném pivovaru Chmelařského institutu s.r.o. Žatec nebo ve spolupráci s VÚPS Praha. V posledních letech se osvědčila spolupráce s malými pivovary nebo Cechem domovarníků, kde je potřeba pouze malé množství chmele pro ověřovací várky pív.

4.4 Uplatnění odolných odrůd chmele v praxi.

Odolné odrůdy chmele budou mít velké uplatnění v lokalitách s výskytem *Verticillium nonalfalfae*. V současné době je to v Tršické oblasti na ploše 5 ha. V roce 2021 se zaznamenal další výskyt této choroby a to v Žatecké oblasti na výměře 6 ha. Lze předpokládat, že tato choroba se bude v budoucnu dále rozšiřovat a pak se v těchto chmelnicích budou moci pěstovat pouze odolné odrůdy k *Verticillium nonalfalfae*. Velmi důležité je uplatnění nových odrůd chmele v pivovarech, kde se využijí výsledky z pivovarských testů.

5. Porovnání novosti postupů

Do současné doby se v České republice nešlechtil chmel na odolnost k *Verticillium nonalfalfae*. Jedná se o první metodický postup, jak získat nové české odrůdy chmele vykazující odolnost k *Verticillium nonalfalfae* a současně splňující agrotechnické i pivovarské aspekty. Novost je dána jak postupem testace chmelů na odolnost, tak i uplatněním do pěstitelské a pivovarské praxe. Výsledky jsou aplikovatelné do praxe.

6. Popis uplatnění metodiky

Metodiku využijí všechny šlechtitelské firmy v České republice a bude též využita jako studijní materiál pro vysokoškolská studia. Metodika má velký význam pro Svaz pěstitelů chmele České republiky, který má eminentní zájem o tvorbu českých odrůd chmele odolných k *Verticillium nonalfalfae*.

7. Ekonomické aspekty

Lze předpokládat, že pomocí metodiky chmele se podaří získat odolné odrůdy chmele v průběhu 10 let. Tím se sníží tvorba odrůdy v průměru o 5 let. Náklady na šlechtění chmele jsou každoročně ve výši téměř 5 mil. Kč. Vyšlechtění vlastní české odrůdy chmele zajistí českému pěstiteli chmele možnost použít odolnou odrůdu chmele do lokalit s výskytem *Verticillium nonalfalfae*. Tuzemská chmelová sadba pro pěstitutele chmele je ekonomicky méně náročná než nákup odolných odrůd chmele ze zahraničí.

Do ekonomických aspektů lze zahrnout i výsadbu nových odolných odrůd chmele na plochu 11 ha (současný výskyt choroby), což představuje výrobu min 30 tis. ks sadby. Při současné ceně 30 Kč/ks sadby to jsou tržby 900 tis. Kč. Při výnosu 2t/ha lze předpokládat každoroční produkci chmele z 11 ha ve výši 22 t. Při současné ceně 250 tis. Kč/t chmele, se předpokládají každoroční tržby ve výši 5,5 mil Kč.

8. Seznam použité literatury

- DARBY, P. (2001) Single gene traits in hop breeding. In: Seigner, E. Proceedings of the Scientific Commission of the International Hop Growers Convention, Canterbury, UK, p. 76–80.
- FLAJSMAN M., MANDELIC S., RADÍŠEK S., JAVORNIK B, 2017: Xylem sap extraction method from hop plants. Boi-protocol Vol. 7.
- HILL, S.T., SUDARSANAM, R., HENNING, J., HENDRIX, D. (2017) HopBase: a unified resource for *Humulus* genomics. Database 2017: bax009.
- JAKŠE, J., ČERENAK, A., RADÍŠEK, S., ŠATOVIC, Z., LUTHAR, Z., JAVORNIK, B. (2013) Identification of quantitative trait loci for resistance to *Verticillium* wilt and yield parameters in hop (*Humulus lupulus* L.). Theor. Appl. Genet. 126: 1431-1443.
- CHARVATOVA J., STEFANOVA L., NESVADBA V., 2017: Collection of hop genetic resources in the Czech Republic. In: F. WEIHRAUCH, ed. Proceedings of the Scientific-Technical Commission 25 – 29 June 2017, St. Stefan am Walde, Austria. Wolnzach: Scientific-Technical Commission of the International Hop Growers' Convention, p. 98.
- KROFTA, K., 2008: Hodnocení kvality chmele 4/08, Metodika pro praxi 4/2008, Chmelařský institut Žatec.
- LUTZ K., EURINGER S., SEIGNER E., VON TUCHER S.: Effect of lethal hop wilt strains (*Verticillium nonalfalfae*) and different nitrogen fertilizer levels on the indicator plant eggplant (*Solanum melongena* L.). Proceedings of the Scintific-Technical Commission, Bischoffsheim, Alsace, France 07-11 July 2019: 42-44
- MAJER, A., JAVORNIK, B., ČERENAK, A., JAKŠE, J. (2014) Development of novel EST-derived resistance gene markers in hop (*Humulus lupulus* L.). Mol. Breed. 33: 61-74
- NATSUME, S., TAKAGI, H., SHIRAISHI, A., MURATA, J., TOYONAGA, H., PATZAK, J., TAKAGI, M., YAEGASHI, H., UEMURA, A., MITSUOKA, C., YOSHIDA, K., KROFTA, K., SATAKE, H., TERAUCH, R., ONO E. (2015) The draft genome of hop (*Humulus lupulus*), an essence for brewing. Plant Cell Physiol. 56: 428-441.
- NESVADBA, V., KROFTA, K.; 2003: Practical knowledge and criteria influencing effectivity of breeding process in the CR. International Hop Growers Convention, Proceedings of the Scientific Commission, Dorna - Žalec, Slovenia 24 - 27 June 2003: 101 – 105
- NESVADBA V., ŠTEFANOVÁ L., CHARVÁTOVÁ J.: Hodnocení výnosu a KH u českých odrůd chmele v udržovacím šlechtění. Chmelařství. 2019, 92(3), 29-32.
- PADGITT - COBB, L.K., KINGAN, S.B., WELLS, J., ELSE, J., KRONMILLER, B., MOORE, D., CONCEPCION, G., PELUSO, P., RANK, D., JAISWA, L P., HENNING, J., HENDRIX, D.A. (2021) A draft phased assembly of the diploid Cascade hop (*Humulus lupulus*) genome. Plant Genome 2021: e20072.
- PATZAK, J., MATOUŠEK, J. (2013) Metodika využití molekulárně-genetických markerů sekvencí genů a genetických elementů ve šlechtění a managementu chmele (*Humulus lupulus*). Certifikovaná metodika, Žatec: Chmelařský institut s.r.o., 40 s. ISBN 978-80-86836-94-2.
- RADÍŠEK S., 2009: *Verticillium* wit. In: Mahaffee W.F., Pethybridge S.J., Gent D.H (eds), Compendium oh hop diseases and pests. APS Press, St. Paul: 33-36
- RÍGR, A., FABEROVÁ, I. (2000): Klasifikátor chmele *Humulus lupulus* L.
- SONG, Y., ZHANG, Z., SEIDL, M.F., MAJER, A., JAKŠE, J., JAVORNIK, B., THOMMA, B.P.H.J. (2017) Broad taxonomic characterization of *Verticillium* wilt resistance genes reveals an ancient origin of the tomato Ve1 immune receptor. Molecular Plant Pathology 18(2): 195-209.
- WILLAERT L., DEBODE J., RADÍŠEK S., HEUNGENS K. 2019: Molecular detection of *Verticillium nonalfalfae*. Proceedings of the Scintific-Technical Commission, Bischoffsheim, Alsace, France 07-11 July 2019: 45

9. Seznam publikací, které metodice předcházely

- SVOBODA P., NESVADBA V., PATZAK J., VOSTŘEL J., 2018: Tvorba genotypů chmele odolných k *Verticillium nonalfalfae* vhodných pro pěstování v České republice i v rámci Evropské unie, projekt Eureka LTE218007. *Chmelařství* 11_12/2018, 141 -143
- NESVADBA V., CHARVÁTOVÁ J., 2019: Hodnocení odrůd chmele s tolerancí vůči *Verticillium nonalfalfae*. *Úroda - recenzovaný časopis pro rostlinnou produkci*. 2019, 67(11), 78-81
- NESVADBA V., CHARVÁTOVÁ J., VOSTŘEL J., WERSCHALLOVÁ M., 2020: Evaluation of Czech hop cultivars since 2010 till 2019. *Plant, Soil and Environment*. 2020, 66(12), 658-663. ISSN 1214-1178, E-ISSN 1805-9368. DOI: 10.17221/430/2020-PSE
- NESVADBA V., CHARVÁTOVÁ J., 2020: Stabilita výkonnosti odrůd chmele s tolerancí k *Verticillium nonalfalfa*. *Rostlinolékař* 3/3020: 13 – 16. ISSN 1211-3565.
- NESVADBA V., CHARVÁTOVÁ J., 2020: Hodnocení výkonnosti českých odrůd chmele (*Humulus lupulus* L.). *Kvasný*. 2020, 2(4), 26-31. ISSN 2571-3868.
- NESVADBA V., CHARVÁTOVÁ J., TRNKOVÁ S., 2020: Hodnocení výkonnosti a variability českých odrůd chmele (*Humulus lupulus* L.) s tolerancí k *Verticillium nonalfalfae*. *Úroda - recenzovaný časopis pro rostlinnou produkci*. 2020, 68(9), 67-69. ISSN 0139-6013.
- NESVADBA V., CHARVÁTOVÁ J., TRNKOVÁ S., 2020: Hodnocení světových odrůd chmele v polní kolekci genetických zdrojů. *Chmelařství*. 2020, 93(3), 28-33.
- NESVADBA V., SVOBODA P., CHARVÁTOVÁ J., 2020: Hodnocení stability výkonnosti odrůd chmele s tolerancí k *Verticillium nonalfalfae*. *Chmelařství*. 2020, 93(7-9), 86-91.
- NESVADBA V., CHARVÁTOVÁ J., TRNKOVÁ S., 2020: Hodnocení variability hmotnosti hlávek u českých aromatických odrůd chmele (*Humulus lupulus* L.). In: P., HRIC, ed. *Vedecké práce katedry rastlinnej výroby a trávnych ekosystémov: Zborník online vedeckých prác*. Nitra: Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, 2020, s. 186-195.
- NESVADBA V., CHARVÁTOVÁ J., ŠTEFANOVÁ L., TRNKOVÁ S., 2020: Hodnocení výnosu a obsahu KH u českých odrůd chmele (*Humulus lupulus* L.). In: P., HRIC, ed. *Vedecké práce katedry rastlinnej výroby a trávnych ekosystémov: Zborník online vedeckých prác*. Nitra: Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, 2020, s. 196-202. ISBN 978-80-552-2244-8.
- NESVADBA V., SVOBODA P., CHARVÁTOVÁ J., 2021: Hodnocení vybraných českých odrůd chmele (*Humulus lupulus* L.) na odolnost k *Verticillium nonalfalfae* a jejich výkonnost. *Rostlinolékař*. 2021, 32(3), 19-22

Abstrakt

Metodika uvádí postupy hodnocení chmele na odolnost k *Verticillium nonalfalfae*. Jedná se o využití molekulárně-genetických markerů pro identifikaci genů odolnosti, umělé a přirozené infekce. Základem testace jsou genetické zdroje chmele. Součástí metodiky je postup šlechtění chmele na tvorbu nových genotypů chmele s odolností k *Verticillium nonalfalfae*. Velmi důležitá je část hodnocení a aplikace nových získaných perspektivních genotypů chmele do praxe. Metodiku využijí všechny šlechtitelské firmy v České republice a bude též využita jako studijní materiál pro vysokoškolská studia. Metodika má velký význam pro Svaz pěstitelů chmele České republiky, který má eminentní zájem o tvorbu českých odolných odrůd chmele k *Verticillium nonalfalfae*.

Klíčová slova: chmel, *Humulus lupulus* L., *Verticillium nonalfalfae*, odolnost, šlechtění

Abstract

The methodology describes the procedures for evaluating hops for resistance to *Verticillium nonalfalfae*. This involves the use of molecular genetic markers to identify resistance genes, artificial and natural infections. The basis of testing is the genetic resources of hops. Part of the methodology is the process of hop breeding for the creation of new hop genotypes with resistance to *Verticillium nonalfalfae*. Part of the evaluation and application in practice of new acquired promising hop genotypes is very important. The methodology will be used by all breeding companies in the Czech Republic and will also be used as a study material for university studies. The methodology is of great importance for the Association of Hop Growers of the Czech Republic, which has an eminent interest in the creation of Czech resistant varieties of hops to *Verticillium nonalfalfae*.

Key words: hops, *Humulus lupulus* L., *Verticillium nonalfalfae*, resistance, breeding