

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Šárka Stuchlíková

Geny rezistence obilnin proti houbovým chorobám a metody pro jejich detekci

Resistance genes against fungal diseases in cereals and methods for their detection

Bakalářská práce

Vedoucí práce: RNDr. Veronika Dumalasová, Ph.D.

Konzultant: RNDr. Lukáš Fischer, Ph.D.

Praha, 2019

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze,

Šárka Stuchlíková

Abstrakt

Práce se zabývá možnostmi detekce genů rezistence k houbovým chorobám u původních evropských obilnin, jako jsou pšenice, ječmen, žito a oves. Podává přehled o nejdůležitějších genech rezistence pro šlechtění. Význam genů rezistence hodnotí na základě škodlivosti jednotlivých houbových chorob obilnin a také významu jednotlivých druhů obilnin. Popisuje možnosti detekce genů rezistence pomocí molekulárních markerů a srovnává různé typy molekulárních markerů. Hledá odpověď na otázku, ve kterých případech šlechtění na rezistenci a tedy i využití molekulárních markerů přináší největší užitek.

Klíčová slova: geny rezistence, houbové choroby, molekulární markery, RFLP, RAPD, AFLP, STS, SSR, SNP

Abstract

The paper deals with the possibilities of detection fungal disease resistance genes in the original European cereals, such as wheat, barley, rye and oats. It provides an overview of the most important resistance genes for breeding. The significance of the resistance genes is evaluated on the basis of the harmfulness of the individual cereal fungal diseases, as well as the importance of the individual cereal species. It describes the possibilities of detecting resistance genes using molecular markers and compares various types of molecular markers. It seeks answers to the question of where the breeding on resistance and therefore the use of molecular markers brings the greatest benefit.

Key words: genes of resistance, fungal diseases, molecular markers, RFLP, RAPD, AFLP, STS, SSR, SNP

Obsah

1	Úvod	5
1.1	Seznam zkratk	6
2	Zemědělsky významné původní evropské obilniny	7
2.1	Pšenice	7
2.2	Ječmen	8
2.3	Žito	8
2.4	Oves	8
3	Houbové choroby	9
3.1	Rzi	11
3.1.1	Rez pšeničná	11
3.1.2	Rez travní	12
3.1.3	Rez plevová	12
3.2	Klasové fuzariózy	13
3.3	Padlí	13
4	Geny rezistence	14
4.1	Genetický původ genů rezistence	15
4.2	Geny rezistence ke rzi pšeničné (<i>Lr</i> geny)	15
4.3	Geny rezistence ke rzi travní (<i>Sr</i> geny)	16
4.4	Geny rezistence ke rzi plevové (<i>Yr</i> geny)	17
4.5	Geny rezistence k padlí (<i>Pm</i> geny)	17
4.6	Geny rezistence k fuzariózám (<i>Fhb</i> geny)	17
5	Metody detekce genů rezistence	18
5.1	Fenotypová analýza	18
5.2	Hybridologická analýza	19
5.3	Molekulární markery	19
5.3.1	RFLP	21
5.3.2	RAPD	22
5.3.3	AFLP	22
5.3.4	STS	23
5.3.5	SSR	25
5.3.6	SNP	26
6	Vyhlídky do budoucna	27
7	Závěr	29
8	Seznam literatury a zdrojů	30

1 Úvod

Proč se vůbec zabývat šlechtěním rezistentních odrůd obilnin? Biotechnologie a využití moderních poznatků v molekulární biologii otevírají nové dveře pro vylepšování a zvyšování výnosů kulturních plodin, což je při neustále narůstajícím počtu lidí nutností.

Pěstování odrůd citlivých k patogenům je riskantní, protože hrozí, že při větší epidemii budou ztráty až nebezpečně vysoké. Právě proto je nutné věnovat pozornost zkoumání genů navozujících odolnost vůči významným patogenům a souvisejícímu šlechtění.

Molekulární markery jsou poměrně novým nástrojem pro usnadnění šlechtění a identifikace genů rezistence.

První kapitola podává literární přehled o původních evropských zemědělsky významných obilovinách, jakými jsou pšenice, ječmen, oves a žito.

V druhé kapitole jsou krátce charakterizovány houbové choroby napadající tyto obilniny vybrané podle závažnosti a výskytu na území České republiky. Rzi jsou zařazeny z důvodu častého výskytu na našem území a působení nepříjemných ztrát na výnosech. Klasové fuzariózy mají v práci své místo vzhledem ke zvýšenému výskytu na našem území v některých letech a z důvodu akumulace nebezpečných toxinů v zrně. Padlí je hospodářsky významnou chorobou obilnin se schopností negativně ovlivňovat množství a kvalitu zrn.

Třetí část práce se zabývá stručným přehledem genů rezistence k vybraným houbovým chorobám. Důraz je kladen hlavně na aktuálně důležité geny vhodné pro další šlechtění. Prostor je věnován také krátkému sdělení, z jakých genetických zdrojů mohou pocházet významné geny pro rezistenci.

Čtvrtá kapitola se zabývá metodami detekce genů rezistence. Kromě fenotypové a hybridologické analýzy jsou v poslední době stále více důležité molekulární markery. Práce předkládá výběr některých významných molekulárních markerů. Srovnává jejich výhody, nevýhody a možnosti využití v každodenní praxi.

1.1 Seznam zkratek

AFLP	amplified fragment length polymorphism (polymorfismus délky amplifikovaných fragmentů)
APR	adult plant resistance (rezistence dospělých rostlin)
DNA	deoxyribonukleová kyselina
<i>Fhb</i>	geny rezistence proti fuzáriím
Gbp	miliardy párů bází
<i>Lr</i>	leaf rust (geny rezistence proti rzi pšeničné)
MAS	marker assisted selection (markery asistovaná selekce)
PCR	polymerase chain reaction (polymerázová řetězová reakce)
<i>Pm</i>	powdery mildew (geny rezistence proti padlí)
RAPD	random amplification of polymorphic DNA (náhodná amplifikace polymorfní DNA)
RFLP	restriction fragment length polymorphism (polymorfismus délky restričních fragmentů)
SCAR	sequence characterized amplified region (amplifikovaná oblast charakterizovaná sekvencí)
SNP	single nucleotide polymorphism (jednonukleotidové polymorfismy)
<i>Sr</i>	stem rust (geny rezistence proti rzi travní)
SSR	simple sequence repeats (jednoduché sekvenční motivy o několika nukleotidech)
STS	sequence-tagged site (markery pro detekci unikátní sekvence DNA)
<i>Yr</i>	yellow rust (geny rezistence proti rzi plevová)
QTL	quantitative trait locus (lokus pro kvantitativní znaky)

2 Zemědělsky významné původní evropské obilniny

Zemědělsky významné obilniny z čeledi lipnicovité (*Poaceae*) představují důležitý zdroj potravy po celém světě. Práce se zaměřuje na pšenici setou, ječmen setý, oves a žito, které jsou původními evropskými obilovinami hojně pěstovanými na území České republiky.

2.1 Pšenice

Do rodu *Triticum* zařazujeme planě rostoucí i šlechtěné druhy. Pšenice je typickou obilninou, která tvoří více než 20 % kalorického příjmu pro téměř dvě třetiny lidí na světě (Brenchley a kol., 2012).

V rámci taxonomického členění rodu rozlišujeme 3 podskupiny na základě ploidie. Diploidní pšenice planá jednozrnka byla pravděpodobně první pěstovanou pšenicí. Polyploidizační událostí došlo ke vzniku tetraploidních pšeníc, kam řadíme pšenici dvouzrnku, pšenici tvrdou nebo pšenici naduřelou (Dvořák a kol., 1993).

Další polyploidizace vedla ke vzniku hexaploidní pšenice špaldy a pšenice seté (Charmet, 2011). Genom kulturní pšenice je velký 17 Gbp (EnsemblPlants, 2018), kdežto lidský genom má velikost 3,2 Gbp (Cell biology by the numbers), což je 5x více. I proto je výzkum genů pšenice komplikovanou záležitostí.

Velká velikost genomu je způsobena polyploidizací a vysokým obsahem repetitivní DNA tvořené především transpozibilními elementy. Transpozóny jsou významným činitelem v evoluci, jelikož významně zvyšují variabilitu a mohou způsobovat i mutace poskytující nové výhodné vlastnosti, kam patří mimo jiné i zvýšená odolnost proti abiotickým a biotickým stresům (Vicient a Casacuberta, 2017).

I přesto, že se genom pšenice vlivem polyploidizačních událostí mnohonásobně zvětšil, mezi negativní vlivy domestikace stále patří ztráty potenciálně užitečných genů. Problém byl zaviněn šlechtěním jen na některé výhodné vlastnosti (výnos, kvalita zrna), kdy často docházelo k přehlížení jiných důležitých znaků, typicky právě různých typů odolností (Charmet, 2011).

2.2 Ječmen

U nás v České republice je ječmen po pšenici druhou nejpěstovanější obilninou (Míša, 2001).

Kulturní ječmen setý (*Hordeum vulgare L.*) má diploidní genom a patří tak v podstatě k modelovým organismům z kategorie obilovin. Velikost genomu ječmene je 5 Gbp (EnsemblPlants, 2018).

V zemědělské praxi rozlišujeme ječmen jarní a ozimý. Ječmen se používá ke krmeným účelům, k výrobě sladu, pro přímou konzumaci a pečení. Rozdrcený mladý ječmen je v poslední době populární doplněk výživy díky vysokému obsahu minerálních látek a vitamínů (Vostal a Zitta, 1999).

2.3 Žito

Žito seté (*Secale cereale L.*) se v našich podmínkách pěstuje v ozimé formě. Jde o poměrně nenáročnou obilninu. I přesto, že je žito označováno jako odolnější proti chorobám a bývá oceňováno i díky schopnosti efektivně soupeřit s plevelem. I přes svou větší odolnost však může být napadáno některými houbovými chorobami (Štolcová, 2009).

Žito seté je diploidní a velikost genomu je přibližně 8 Gbp. Po srovnání s uspořádáním genů v ječmenu a pšenici byla patrná podobnost mezi těmito třemi druhy (Bauer a kol., 2016). I to napovídá, že mezidruhové a mezirodové křížení je v rámci šlechtění odolných odrůd možné.

2.4 Oves

Oves setý je z uvedených plodin nejmladší a do naší oblasti se dostal jako plevelná rostlina mezi kulturami pšenice a ječmene. Není tak přesně známý fylogenetický původ, ale předpokládá se, že oves setý (*Avena sativa L.*) se vyvinul z ovsa hluchého (*Avena fatua L.*). Této skutečnosti napovídá i fakt, že oba druhy mají stejný počet chromozomů (42) a mohou se mezi sebou křížit (Moudrý, 1993).

Je zajímavé, že oves je houbami napadán výrazně méně v porovnání s předchozími uvedenými druhy obilnin. Vykazuje velkou odolnost proti chorobám pat stébel obilnin (Vostal a Zitta, 1999).

3 Houbové choroby

Houbové choroby představují nebezpečný problém ohrožující každoroční výnosy obilnin. Udává se, že mohou až za 60 % ztrát na úrodě obecně způsobených fytopatogeny (Vostal a Zitta, 1999).

To je jasným důkazem, že je nutné věnovat pozornost pochopení mechanismů nákazy a věnovat se hledání ochrany ve formě fungicidů, agrotechnických opatření i odolných odrůd.

Pro ochranu před houbovými chorobami na obilninách se používají fungicidní přípravky. Doporučený seznam účinných látek je k dispozici na stránkách Ústředního kontrolního a zkušebního ústavu zemědělského (ÚKZÚZ). Problém s častým využíváním fungicidů u jinak náchylných odrůd spočívá ve vytvoření možné odolnosti patogenní houby vůči přípravku.

Kvůli tomu je vhodné kombinovat a střídat látky s rozdílnými mechanismy účinku. Výraznou pomocí je také zařazení odrůd obilnin, která vykazují vyšší míru rezistence proti patogenům často se vyskytujícím na daném území. V takovém případě je možné snížit či vynechat aplikaci fungicidů, což je žádoucí či nezbytné například pro pěstování v rámci zásad ekologického zemědělství (Jørgensen, 2014).

Uvedené houbové choroby nepředstavují kompletní přehled patogenů působících na obilninách, ale jde o uvedení aktuálně významných chorob, které jsou sledovány na území České republiky Ústředním kontrolním a zkušebním ústavem zemědělským.

Tabulka 1: Přehled houbových chorob napadajících obilniny na území České republiky

Obilnina	Houbové choroby
Pšenice	černá rzivost trav (<i>Puccinia graminis</i>), černání kořenů a báze stébel obilnin (<i>Gaeumannomyces graminis</i>), hnědá rzivost pšenice (<i>Puccinia recondita</i> f. sp. <i>tritici</i>), mazlavá snětivost pšenice (<i>Tilletia caries</i> , <i>T. laevis</i>), padlí travní (<i>Blumeria graminis</i>), prašná snětivost pšenice (<i>Ustilago tritici</i>), růžovění klasů pšenice (<i>Gibberella zeae</i> , <i>Fusarium culmorum</i> , <i>Gibberella avenacea</i> , <i>Fusarium poae</i> , <i>F. sporotrichioides</i>).
Ječmen	černání kořenů a báze stébel obilnin (<i>Gaeumannomyces graminis</i>), hnědá rzivost ječmene (<i>Puccinia hordei</i>), padlí travní (<i>Blumeria graminis</i>), prašná snětivost ječmene (<i>Ustilago nuda</i>), růžovění klasů ječmene (<i>Gibberella zeae</i> , <i>Fusarium culmorum</i> , <i>Gibberella avenacea</i> , <i>Fusarium poae</i> , <i>Fusarium sporotrichioides</i>).
Žito	černání kořenů a báze stébel obilnin (<i>Gaeumannomyces graminis</i>), hnědá rzivost žita (<i>Puccinia recondita</i>), mazlavá snětivost žita (<i>Tilletia caries</i> , <i>T. laevis</i>), padlí žita (<i>Blumeria graminis</i>), růžovění klasů žita (<i>Gibberella</i> spp.), sněžná plísňovitost obilnin (<i>Monographella nivalis</i> var. <i>nivalis</i>), spála žita (<i>Rhynchosporium secalis</i>), stéblolam a další choroby bází stébel, zakrslá snětivost žita (<i>Tilletia controversa</i>).
Oves	hnědá skvrnitost ovsa (<i>Pyrenophora avenae</i>), padlí ovsa (<i>Blumeria graminis</i>) nebo prašná snětivost ovsa (<i>Ustilago avenae</i>)

(Zdroj dat: Rostlinolékařský portál, ÚKZUZ)

3.1 Rzi

Rzi jsou houbové choroby, jejichž původcem jsou stopkovýtrusné houby rodu *Puccinia*. Obecně jsou rzi významnými chorobami, které napadají čeled' *Poaceae*. Jednotlivé druhy rzí se liší podle hostitelského organismu, bez kterého nejsou schopné vývoje a rozmnožování. Některé z nich mají mezihostitele, na kterém probíhá část vývojového cyklu (Hanzalová, 2008).

U rzi rozlišujeme různé fyziologické rasy. V rámci sledování rezistence jednotlivých odrůd je určujícím faktorem virulence. To je schopnost patogenu překonat obranné mechanismy hostitelského organismu a vyvolat projevy choroby ovlivňují kvalitu a množství výnosu.

3.1.1 Rez pšeničná

Rez pšeničná (*Puccinia triticina*), je původce hnědé rzivosti pšenice, která působí ztráty v každém roce. V našich podmínkách dokáže způsobit ztráty v rozmezí 5 až 15 % sklizně (Hanzalová, 2008).

Rez pšeničná napadá zejména pšenici a ječmen. Má ráda vyšší teploty během vegetačního období, kdy se zvyšuje její škodlivost. To může být aktuálním problémem vzhledem k oteplování se klimatu. Zvyšující se tlak po odolnosti i proti této chorobě zvyšuje množství registrovaných odrůd nesoucích geny rezistence (Bolton a kol., 2008).

Na našem území se rez pšeničná vyskytuje hlavně v teplejších oblastech Moravy, kde v posledních letech překonala odolnost odrůdy s dosud rezistentním genem *Lr28*. Zajímavé však bylo, že v jiných částech České republiky zůstala stejná odrůda odolná. To napovídá o rozdílném rasovém spektru rzi pšeničné na našem území a vlivu klimatických podmínek pro rozvoj infekce (Hanzalová a Bartoš, 2018).

3.1.2 Rez travní

Rez travní (*Puccinia graminis*) je původcem černé rzivosti trav. Z uvedených rzí je nejnáročnější na teplo, kdy pro úspěšné infikování plodin potřebuje teploty minimálně 15 až 20 C (Hanzalová a kol., 2008).

Rozvoj infekce je zaznamenávám hlavně od roku 2013, kdy se zvýšila četnost výskytu rzi travní na našem území. Při pěstování náchylné odrůdy ztráty po napadení touto chorobou činit až 90 % (Hanzalová a Bartoš, 2018).

Napadení rzí travní zpočátku vypadá podobně jako při napadení rzí pšeničnou. Později se však infekce rozšíří až na stéblo a do klasu, což má devastující dopad na celou rostlinu (Hanzalová a Bartoš, 2018).

3.1.3 Rez plevová

Rez plevová (*Puccinia striiformis*) způsobuje chorobu zvanou jako žlutá rzivost pšenice a napadá pšenici, ječmen, a dokonce i oves spolu s dalšími 10 druhy trav (Urban a Marková, 2009). Potenciálně jde tedy o velmi nebezpečnou chorobu, u které je nutné nepodcenit včasný vývoj rezistentních odrůd.

Mezi první příznaky patří výskyt žlutých až oranžových kupek obsahujících urediospory, které se později uspořádají do charakteristických pruhů na listech. Počáteční výskyt na listech se může rozšířit až na celou rostlinu (Hanzalová a Bartoš, 2015).

Životní cyklus rzi plevové je vázaný na mezihostitele, kterým jsou v tomto případě druhy dřívěšáku (*Berberis sp.*) (Rodriguez-Algaba a kol., 2014), což může být důležitým poznatkem pro pěstitelskou praxi.

Nedávné epidemické výskyty rzi plevové se v České republice objevili mezi lety 2001 až 2003 a v letech 2014, 2015. Problém spočíval hlavně v rozšíření nových ras rzi (Hanzalová a Bartoš, 2015).

V dalších letech však bylo pozorováno slábnutí epidemie a v sezóně v roce 2017 se již objevovala pouze ojediněle, za což se pravděpodobně zasloužilo pěstování odolnějších odrůd a správně prováděné fungicidní zásahy (Hanzalová a Bartoš, 2018).

3.2 Klasové fuzariózy

Původcem klasových fuzarióz jsou druhy z rodu *Fusarium*. Napadají zejména pšenici, ječmen a žito. Nevyhýbají se však ani ovsu. Na území Evropy dnes převládá druh *Fusarium culmorum* (Wisniewska a kol., 2014) spolu s *Fusarium graminearum* (Polišenská a kol., 2010).

Zvyšující se frekvenci výskytu můžeme pozorovat také u druhu *F. poae* (Lindblad a kol., 2013). Na našem území se běžně vyskytují druhy *F. culmorum* a *F. avenaceum* (Chrpová a kol., 2016).

Nebezpečí klasových fuzarióz spočívá hlavně v kontaminaci zrn mykotoxiny. Existuje více druhů fuzarióz, které mohou produkovat různé mykotoxiny. Rod *Fusarium* dokáže produkovat široké spektrum mykotoxinů dokonce i v reakci na různé podmínky (Vogelgsang a kol. 2008). Každý rok je tak možné pozorovat jiné spektrum látek s jinými podíly v napadených rostlinách.

Z dlouhodobého hlediska je sledována přítomnost deoxynivalenolu, zearalenonu a fumonisinů. Pro všechny tři uvedené látky existují legislativou stanovené limity maximálního množství přítomného v obilovinách (Chrpová, 2015).

3.3 Padlí

Padlí travní (*Blumeria graminis*) je jednou z nejrozšířenějších houbových chorob napadajících rostliny, kromě jiných i pšenici, ječmen a žito. Rozeznáváme více než 650 druhů, které se vzájemně liší morfologií, anatomií a preferovanými hostitelskými organismy (Braun a kol., 2002).

Příznaky napadení padlím se objevují na konci jara a začátkem léta. Infekce je rozpoznatelná pouhým pohledem, kdy na rostlině vidíme bílé vatovité kupky. Barva těchto útvarů se postupně mění na šedou až hnědou. Silně napadený list žloutne a odumírá. Pšenice je odolnější k napadení během raných fází vývoje v porovnání s ječmenem (Häni a kol., 1993).

Rozvoji infekce padlí nahrávají podmínky v podobě mírné zimy a vysoké vzdušné vlhkosti v období časného jara. Nejkratší inkubační době je při teplotě 20 °C, kdy stačí 3 až 4 dny. Příliš nízké (5 °C a méně) nebo naopak vysoké (25 °C a více) nepodporují šíření a rozvoj napadení (Häni a kol., 1993).

Rizikovým faktorem je nedostatečná výživa porostu nebo naopak přehnojení dusíkem (Glawe, 2008). Při takto vhodných podmínkách dokáže padlí způsobit ztráty až kolem 50 % úrody. Průměrné ztráty se běžně pohybují kolem 20 % (Tratwal a Bocianowski, 2014).

4 Geny rezistence

Odolnost neboli rezistence je schopnost rostliny potlačit nebo zpomalit škodlivé působení patogenu. Jde hlavně o vlastnost dědičnou. Na základě vizuálního pozorování a změn v metabolismu jsme schopni pozorovat stupeň odolnosti. Rozeznáváme kvalitativní a kvantitativní, krátkodobou a dlouhodobou, specifickou a nespecifickou odolnost. Protikladem odolnosti je náchylnost (Vostal a Zitta, 1999).

V podmínkách, kde se stresový faktor nevyskytuje, nejsou rostliny nuceny vyvíjet mechanismy pro odpověď na stres. Pokud se však v prostředí vyskytne stresový faktor, v tomto případě houbový patogen, rostlina se snaží nepříznivé podmínky alespoň tolerovat. A ústupně tak může docházet k rozvoji rezistence.

Z pohledu reakce na jednotlivé rasy patogena rozlišujeme rezistenci nespecifickou, označovanou také jako polygenní, a rasově specifickou (Hanzalová a kol., 2008)

Odhalení rostlin nesoucích konkrétní gen rezistence je poměrně snadné díky různých druhům molekulárních markerů popsanych v další části práce.

Další druh rezistence funguje jen u dospělých rostlin. Označuje se zkratkou APR (z anglického adult plant resistance). Jde o rezistenci podmíněnou specifickými geny. Podle výsledků je tento druh odolnější a trvanlivější v porovnání s rasově specifickou odolností (Alam, 2011).

U některých odrůd se můžeme setkat s takzvanou polní nebo částečnou rezistencí, která je formou horizontální rezistence. V praxi to znamená, že se napadení rostlin projevuje jen slabě, postup infekce je pomalejší a ztráty jsou nižší (Hanzalová a kol., 2008).

Pro dosažení odolnosti proti různým druhům houbových chorob nebo proti více rasám konkrétní choroby se využívá takzvané pyramidování genů, kdy jde o kombinaci více genů rezistence v jednom genotypu. S využitím molekulárních markerů je možné provádět efektivní selekci a křížení právě za účelem pyramidování genů (Collard a Mackill, 2007).

V reakci na existenci genů pro zvýšenou odolnost se vyvíjí nové virulentní formy patogenů, které dříve či později danou bariéru překročí a rostlina s tímto genem přestane být odolná proti nové virulentní rase. Riziko rychlé adaptace patogenu a vytvoření nové virulentní formy je vyšší při plošném využívání jedné odrůdy. Příkladem může být gen *Yr17* pro rezistenci ke rzi plevové, který byl zpočátku účinný při pěstování na malé ploše. Jakmile se však odrůda rozšířila a pěstební plocha se zvětšila, objevili se nové a více virulentní rasy rzi a gen přestal poskytovat dostatečnou odolnost (Bayles a kol., 2000). Proto se doporučuje kombinovat několik odrůd s různými stupni odolnosti a s přítomností odlišných genů pro rezistenci. Šlechtění nových kultivarů pro zvýšení rezistence obilnin je tak nekončící činností.

Velká část genetické variability přínosné pro objevování rezistentních genů a jejich skupin se liší podle lokalit. Z toho důvodu je nutné zaměřit se na lokální šlechtění s důrazem na používání kultivarů vykazujících odolnost proti místně se vyskytujícím druhům chorob.

4.1 Genetický původ genů rezistence

Geny pro rezistenci k houbovým chorobám mohou být do genomu kulturní obilniny přeneseny mezidruhovým nebo mezirodovým křížením. Děje se to hlavně u kulturní hexaploidní pšenice.

Slibným zdrojem variability pro budoucí šlechtění s ohledem na odolnost proti patogenům jsou divoce rostoucí příbuzné druhy. V případě pšenice jde například o přenos genů rezistence ke rzi travní (*Sr* geny) a ke rzi pšeničné (*Lr* geny) z druhů rodu *Aegilops* (Valkoun, 2001).

Bohužel vnesení nových genů do šlechtěných kultivarů nemusí mít vždy úspěch. Existuje riziko ztráty důležitých genů ovlivňujících klíčové vlastnosti kulturní odrůdy. Složitě může být také odbourání nechtěných vlastností přenesených z planých druhů (Foolad, 2007), jak se ukazuje i při práci s jinými kulturními plodinami.

Další variantou jsou přenosy genů z jiných druhů kulturních obilnin.

Významná je například translokace části chromozómu ze žita v úseku 1BL/1RS přenesená do pšenice, protože tento úsek nese několik genů rezistence *Lr26*, *Sr31*, *Yr9* a *Pm8* (Rabinovich, 1998).

4.2 Geny rezistence ke rzi pšeničné (*Lr* geny)

Prozatím bylo k roku 2017 identifikováno alespoň 81 genů rezistence ke rzi pšeničné (*Lr* geny) (Aktar-Uz-Zaman a kol., 2017).

S velkou pravděpodobností se stále nejedná o číslo konečné, protože v porovnání s minulými léty se počet genů rezistence zvyšuje.

V rámci zkoumání virulence rzi pšeničné na rostlinách nesoucích jednotlivé geny rezistence se pro testování využívají téměř isogenní linie (near isogenic lines - NILs) s přítomností pouze jednoho *Lr* genu (Mesterházy a kol., 2000).

Z genů pro rezistenci ke rzi pšeničné se mezi testovanými odrůdami v České republice nejčastěji objevuje *Lr37* (Hanzalová a kol., 2015).

Gen *Lr37* se nachází na translokaci z mnohoštetu (*Aegilops ventricosa*). Výhodou je fakt, že tento gen je v genetické vazbě spolu s genem *Yr17* pro rezistenci ke rzi plevové a genem *Sr38* pro rezistenci ke rzi travní. Tento gen u nás zároveň patří mezi nejvíce využívané a nejdéle účinné (Seah a kol., 2001).

Mezi dalšími odrůdami registrovanými v České republice byla molekulárními metodami prokázána přítomnost genů *Lr10*, *Lr24*, *Lr26*, *Lr28* a již zmíněný *Lr37* (Hanzalová a kol., 2015).

Gen rezistence *Lr26* na translokaci 1BL.1RS ze žita byl zpočátku účinný ke všem rasám, ale později se objevili nové virulentní rasy a dnes jeho účinnost není tak velká. Translokace ze žita je populární i díky pozitivnímu vlivu na výnos a další zemědělsky ceněné vlastnosti (Rabinovich, 1998).

Pro budoucí šlechtění jsou velmi důležité geny *Lr34* a *Lr46* s horizontální rezistencí, jejichž projevem je výrazné zpomalení projevu infekce. Jejich výhodou je navození dlouhodobě fungující odolnosti, která účinkuje v různých prostředích a proti různým rasám patogenu (Schnurbusch a kol., 2004).

4.3 Geny rezistence ke rzi travní (*Sr* geny)

Používání odrůd s geny rezistence ke rzi travní se ukazuje jako poměrně efektivní řešení. Ovšem i v tomto případě se objevují nové virulentní rasy. Příkladem silné rasy rzi travní, která si dokázala poradit s velkým množstvím dosud známých genů rezistence a způsobila epidemie je rasa Ug99, která se poprvé vyskytla v Ugandě v roce 1999. Problém spočíval v tom, že rasa překonávala hlavně gen rezistence z žitné translokace, tedy gen *Sr31*, který byl v té době přítomný ve značném množství pěstovaných odrůd (Singh a kol., 2011).

Přesto je v některých částech světa i v Evropě gen *Sr31* stále účinný, protože se zde zatím nevyskytuje virulentní rasa Ug99 (Singh a kol., 2011).

Proti této rase rzi jsou účinné například geny *Sr2*, *Sr13*, *Sr22*, *Sr25*, *Sr26*, *Sr35*, *Sr39* a *Sr40* (Singh a kol., 2011).

Aktuálně je důležitý gen rezistence proti rzi travní *Sr38*, který zatím nebyl na našem území překonán (Hanzalová a Bartoš, 2018).

4.4 Geny rezistence ke rzi plevové (*Yr* geny)

Gen *Yr17* významný ve Velké Británii a na evropském kontinentu ztratil účinnost v roce 1994. Zvýšila se totiž plocha, na které byla pěstována odrůda s tímto genem. Výsledkem byla epidemie, která se postupně rozšířila do Dánska, Francie a Německa (Bayles et al. 2000).

V České republice byl hojně rozšířený gen *Yr9*, který leží na translokaci ze žita, bohužel i k tomuto genu již existují virulentní formy rzi plevové (Hanzalová a Bartoš, 2015).

Ve studiu z roku 2009 byla prověřena virulence 7 izolátů rzi plevové odebraných z rozdílných lokací (Dánsko, USA, Mexiko, Eritrea). Výsledky ukázaly přetrvávající rezistenci proti všem testovaným izolátům u rostlin nesoucích geny *Yr4*, *Yr15* a *Yr32* (Milus, 2009).

4.5 Geny rezistence k padlí (*Pm* geny)

Lokalizace *Pm* genů v genomu není nahodilá, jsou uspořádány v klastrech v genově bohatých oblastech genomu (gene-rich regions), (Gill et al., 1996).

Zajímavý je i gen označovaný jako *Pm3*. Jde o sérii 10 alel nesoucích předpoklady pro rezistenci a každá z nich má specifitu k určité rase. (McIntosh a kol., 2008)

Nedávno byl objeven gen rezistence proti padlí označovaný jako *PmAF7DS* (Reddy a kol., 2016).

4.6 Geny rezistence k fuzariózám (*Fhb* geny)

zapříčiněných patogeny rodu *Fusarium*. Jak ukazují studie, dědičnost rezistence k fuzariózám je převážně kvantitativního charakteru (Anderson a kol., 2001). Pro odhalování úseků a skupin genů rezistence se tak jeví jako nejlepší analýza QTL neboli mapování lokusů kvantitativních znaků (Buerstmayr, 2009).

Významný je zejména lokus na chromosomu 3B u pšenice seté označovaný jako *Fhb1*, který navozuje poměrně silnou rezistenci proti fuzariózám. Pro detekci hledané oblasti genů byly zavedeny SNP markery (Bernardo a kol., 2012).

Druhým významným a již poměrně dobře zmapovaným úsekem je *Fhb2*, který leží na chromosomu 6BS (Cuthbert, 2007).

Odolnost obilnin k fuzariózám by měla být jedním z cílů při šlechtění nových odrůd. Vzhledem k tomu, že jde hlavně o nespecifickou rezistenci podmíněnou větším množstvím genů malého účinku, je klíčová snaha o pochopení principů dědičnosti těchto mechanismů a jejich vzájemné kombinace s cílem vytvořit co možná nejvíce odolnou odrůdu.

5 Metody detekce genů rezistence

Hledání a vybírání výhodných znaků/genů u zemědělsky využívaných plodin v rámci klasického šlechtění je stejně staré jako jejich domestikace. Tehdy lidé ještě nevěděli, co způsobuje, že mají některé rostliny větší klasy a větší výnosy. Časem ale zjistili, že se tyto vlastnosti mohou přenášet. Vybírali nejlepší kusy, ze kterých část semen použili pro další sezónu. V kombinaci s přírodními zákony o přežití nejsilnějšího a nejodolnějšího docházelo k vybírání rostlin, které zvládly ve svém genomu skloubit odolnost proti biotickým a abiotickým stresům a zároveň poskytly větší a lepší výnosy.

S rozvojem vědy a znalostí genetiky se objevovalo stále více metod, jak určit a vybrat rostliny se správnými geny.

V rámci dnešní detekce genů rezistence k houbovým patogenům se kombinují tři metody - fenotypová a hybridologická analýza a předpoklad přítomnosti genu pro rezistenci díky využití molekulárních markerů, které jsou s daným genem ve vazbě (Hanzalová a Bartoš, 2015).

5.1 Fenotypová analýza

U fenotypové analýzy pracujeme s reakcí rostliny, případně odrůdy, na působené patogena. Porovnává se reakce analyzované odrůdy s téměř isogenními liniemi (NILs - *nearly isogenic lines*). Isogenní linie se získávají zpětným křížením odrůd, u kterých se nachází příslušný gen rezistence (Mesterházy a kol., 2000). U vybrané odrůdy se testují reakce na vybrané rasy patogenů.

Reakce je hodnocena podle stupnice se škálou 1 až 9, přičemž 1 označuje náchylnou odrůdu s velkým napadením rží a 9 označuje rezistentní odrůdu bez výskytu infekce (Hanzalová a Bartoš, 2015).

V případě, že je reakce testované odrůdy shodná s reakcí rostlin z isogenní linie, dá se předpokládat, že se v dané odrůdě nalézá příslušný gen rezistence.

Pro reprezentativní výsledky je vhodné použití většího množství různých ras houbové choroby. Reakce vybrané odrůdy se následně porovná s reakcí téměř isogenní linie. Fenotypová analýza však není vhodná v případě, kdy má odrůda více genů rezistence. V každém případě je vhodné získané výsledky podpořit například analýzou molekulárními markery (Hanzalová a kol., 2008).

5.2 Hybridologická analýza

Spočívá v křížení analyzované odrůdy s téměř izogenní linií, případně více liniemi, u nichž se předpokládá shodný gen rezistence. V F2 generaci se zjišťuje, zda jsou všechny rostliny rezistentní. Pokud ano, dá se předpokládat shoda v lokusech rezistence. Pokud se vyštěpí náchylné rostliny v poměru 1 náchylná ku 15 odolných, pravděpodobně se jedná o dva různé dominantní geny rezistence. Při třech různých genech je poměr 1:63. Analýza je komplikovanější kvůli genové vazbě mezi analyzovanými lokusy a výskytu genetických interakcí, jako jsou například supresory genů rezistence. Výsledky se doporučuje ověřit v F3 generaci, případně podpořit analýzou pomocí molekulárních markerů (Hanzalová a kol., 2008).

5.3 Molekulární markery

Genetické markery, českým slovem značky, jsou specifická místa v genomu vykazující polymorfismus, jejichž polohu v genomu známe, případně ji můžeme dohledat. Klasickými a prvně používanými markery byly morfologické znaky. Dnes se hojně využívají molekulární markery, které vychází z rozdílů v sekvenci DNA (DNA markery) nebo v sekvenci proteinů (isozymové markery) (Lörz a Wenzel, 2008).

Rozvoj molekulárních technik na úrovni DNA zaznamenal obrovský rozvoj hlavně druhé polovině 20. století, kdy Watson a Crick (1953) rozluštili dvoušroubovicovou strukturu DNA.

Dalším významným milníkem pro vytvoření nových postupů a použití molekulárních markerů bylo vynalezení metody polymerázové řetězové reakce (polymerase chain reaction - PCR) Mullisem v roce 1983.

V dnešní době získáváme obrovské množství informací o genomech díky sekvenování celých genomů, ale stále je důležité i genetické mapování, které se používá u plodin s neznámým genomem. Tvorbu genetických map umožnily molekulární markery, které se dále dají využít i pro přímou identifikaci genů našeho zájmu.

To vede k tomu, že se molekulární markery staly revoluční pomůckou pro potřeby selekce vhodných rostlin pro další šlechtění. Jde o metodu označovanou zkratkou MAS (marker-assisted selection), kdy se pomocí molekulárních markerů odhalují šlechtitelsky zajímavé geny, nebo se blíže zkoumají odrůdy s neznámým genotypem. (Vida a kol., 2009)

Použití MAS je výhodné pro určování odolnosti, která je jinak hůře rozpoznatelná. Metoda pomáhá urychlit šlechtitelský proces a je vhodnou cestou k pyramidování genů rezistence, což může poskytovat stabilnější a déle trvající rezistenci proti většímu spektru patogenů. Na druhou stranu je však stále problematické sledovat pomocí molekulárních markerů dědičnost rezistence, jež je založena na větším množství genů malého účinku (Leonova, 2013).

Výhodou MAS je i fakt, že informaci o předpokládané přítomnosti genů rezistence ve vazbě s markerem je možné zjistit z téměř jakékoliv části rostliny (zrno, mladý list), u které se dá provést analýza s pomocí molekulárních markerů. Není tak nutné vypěstovat dospělou rostlinu, jako je tomu pro potřeby fenotypové či hybridologické analýzy, což je časově i prostorově náročnější.

Úskalí při používání MAS však spočívá v možné neúplné genové vazbě, kdy výsledek selekce nemusí přinést očekávané výsledky jako při selekci s využitím genů v úplné vazbě.

Pokud však dojde k objevení a publikaci molekulárního markeru ve vazbě s genem pro rezistenci, nemusí to nutně znamenat jeho běžné rutinní používání. Rozdílné výsledky při opakování metody z určité publikace mohou být zapříčiněny testováním odrůd s rozdílným genotypem či chybou způsobené kvůli citlivosti metody a reprodukce výsledků si často žádá optimalizaci, než je možné její víceméně spolehlivé používání (Blasczyk a kol., 2008).

Molekulární markery se používají nejenom pro detekci genů rezistence u obilnin, ale slouží i k výzkumu jednotlivých ras patogenů. I díky těmto technikám je možné odhalovat nové rasy, které mohou překonávat rezistenci u některých odrůd, a sledovat jejich šíření (Lewis a kol., 2018). Díky tomu je možné doporučovat vhodné odrůdy, které mají předpoklad odolnosti proti aktuálně šířené rase houbového patogena působícího na konkrétním území.

5.3.1 RFLP

Prvním vyvinutým systémem molekulárních markerů byla technika RFLP, která se ze začátku využívala hlavně pro mapování lidského genomu (Botstein a kol., 1980).

Jedná se o techniku nazývanou polymorfismus délky restrikčních fragmentů, anglicky *restriction fragment length polymorphism* s používanou zkratkou RFLP.

Při použití RFLP markeru se ke štěpení DNA využívají restrikční enzymy endonukleázy. Princip je založen na rozdílném cílovém místě, které je endonukleázou rozpoznáno. Například u jedné odrůdy může docházet ke štěpení v daném místě, ale jiná odrůda nebude v konkrétním místě štěpena a nezískáme stejný velký fragment.

Oblast štěpení volíme podle toho, jaký druh endonukleázy použijeme, protože každá z nich reaguje na jiné cílové místo se specifickým pořadím basí. Velikost jednotlivých fragmentů zjistíme použitím gelové elektroforézy, kde se fragmenty rozdělí podle velikosti.

V případě analýzy velkých eukaryotických genomů se získané fragmenty DNA převádí z gelu na membránu, kde jsou vybrané fragmenty označeny hybridizační sondou s fluorescenčním nebo radioaktivním značením (Southern, 1975 cit. podle Kumar, 2009).

Nakonec probíhá detekce v závislosti na použitém značení.

Výhodami jsou poměrně dobrá reprodukovatelnost a možnost použití na různých druzích organismů. RFLP markery jsou kodominantní. (Powell a kol., 1996)

Dnes se pro rutinní identifikaci genů rezistence příliš nepoužívá. Větší pozornosti se těší molekulární markery založené na PCR.

Nevýhodou metody je potřeba poměrně velkého množství DNA. Čím větší genom, tím je potřeba větší množství DNA (Kumar, 2009), což je zrovna u obilnin nepříjemným problémem. Dalšími překážkami pro běžné rutinní použití jsou nutnost předem charakterizovat markery, vysoká cena a pomalejší provedení.

Markery RFLP se uplatnily například při pátrání po úsecích s geny *Lr34* a *Yr18*, které jsou zodpovědné za zpomalení průběhu a zmírnění negativních projevů infekce (Lagudah a kol., 2006).

5.3.2 RAPD

Náhodná amplifikace polymorfní DNA (anglicky randomly amplified polymorphic DNA, zkratka RAPD) je metoda založená na PCR. Používá se pouze jeden primer, nejčastěji o délce 10 nt, který může nasedat na protiběžných řetězcích DNA v určité amplifikované vzdálenosti. Úseky se shodnými vazebnými místy se namnoží a mohou být vizualizovány pomocí gelové elektroforézy (Lynch a Milligan, 1994).

Hlavní výhodou je možnost použití u organismů s dosud nezmapovaným genomem. Jako primery se používají univerzální náhodné sekvence. Stejný primer je tak možné použít v rámci různých odrůd i druhů plodin (Nybom, 2004).

Nevýhodou je nízká reprodukovatelnost a problém s porovnáním výsledků vzhledem k velké citlivosti metody k různým parametrům. Používané markery jsou dominantní. Správná interpretace výsledků může být komplikovanější (Kumar, 2009).

Dnes se tato metoda spíše nepoužívá, protože se častěji uplatňují specifické markery, jako jsou STS. Jde však o dobrou strategii pro analýzu málo zmapovaného genomu, kde nemáme znalosti sekvence pro přípravu specifických primerů.

5.3.3 AFLP

Amplified fragment length polymorphism je metoda založená na PCR s možností současné polymorfismů v genomové DNA. Princip je založen na kombinaci štěpení dvěma restričními endonukleázami a využití PCR metody.

Prvním krokem je naštěpení genomové DNA s výsledným velkým množstvím fragmentů. Druhým krokem je ligace, kdy se k fragmentům připojují specifické adaptory na označení začátků a konců známých sekvencí. Pro amplifikaci se použijí primery komplementární k adaptorům s několikanukleotidovým přesahem (ve dvou krocích pro získání analyzovatelného počtu fragmentů). Separace fragmentů podle velikosti probíhá pomocí elektroforézy na gelu. Primery jsou značeny fluorescenční barvou, takže výsledné fragmenty jsou viditelné po excitaci zářením (Vos a kol., 1995).

Výhodné je použití několika markerů současně, kdy nepotřebujeme znát přesné informace o sekvenci. I případné opakování metody je snazší v porovnání například s RAPD (Paun a Schönswehler, 2012).

AFLP markery mají vysokou citlivost a schopnost rozlišení polymorfismu. Jde tedy o vhodnou metodu pro studium genetické variability například v rámci jednotlivých odrůd obilnin, případně pro sledování populací houbových patogenů (Barrett a Kidwell, 1998).

Nevýhodou je potřeba vysoce čisté DNA s vysokou molekulovou hmotností. Žádoucí není ani fakt, že jde o dominantní markery, takže není možné spolehlivé odhalení heterozygotního genotypu. (Kumar a kol., 2009).

Pro rutinní stanovování přítomnosti genů rezistence se dnes tato metoda používá spíše méně. Její uplatnění spočívá spíše ve studování celých genomů. Dnes jsou AFLP markery z velké části nahrazovány používáním mikrosatelitů nebo STS markerů.

5.3.4 STS

Markery pro detekci konkrétní unikátní sekvece DNA (sequence-tagged site, zkratka STS) jsou krátké unikátní sekvence amplifikovatelné pomocí PCR. Fungují na základě znalosti konkrétního polymorfismu lokusu v genomu. Vhodný marker může být odvozen například pomocí metody RFLP (Gupta a kol., 1999).

Výhodou je vysoká specifita, díky které se STS markery nabízí jako vhodné řešení pro rutinní využití. Použité markery mohou mít dominantní nebo kodominantní charakter (Jones a kol., 2009).

Mezi další výhody patří snadná proveditelnost v průměrně vybavené laboratoři a poměrně nízká cena pro analýzu jednoho vzorku (Kumar, 2009).

Nevýhodou je nutnost znalosti sekvece pro vytvoření odpovídajících primerů.

První použitý STS marker odhalil gen *Lr9*. (Schachermayr a kol., 1994) A dnes se tento druh markerů používá pro detekci velkého množství genů rezistence.

5.3.4.1 SCAR

Na podobném principu fungují také markery SCAR. Jde o amplifikovanou oblast charakterizovanou sekvencí (anglicky Sequence Characterized Amplified Region se zkratkou SCAR). Odvozují se od metody RAPD a na základě takto získané sekvence vzniká pár specifických primerů pro detekci hledaného genu. (Paran a Michelmore, 1993).

Výhodou je v případě rutinního používání SCAR markeru rychlá a snadná analýza s pomocí PCR a následné vizualizace pomocí elektroforézy na gelu. Použití SCAR markeru většinou umožňuje poměrně dobrou reprodukovatelnost. Není nutné velké množství DNA a analýza vzorku není příliš finančně náročná. SCAR marker je kodominantního charakteru. Díky tomu je SCAR marker vhodný pro mapování genů a MAS.

Pomocí SCAR markeru je možné stanovit přítomnost například genů *Lr19* (Gupta a kol., 2006a) nebo *Lr24* (Gupta a kol., 2006b).

5.3.5 SSR

Markery založené na repetičích jednoduchých sekvenčních motivů o několika nukleotidech (anglicky Simple Sequence Repeats, zkratka SSR) je jiným názvem označováno jako mikrosatelity. Pro vývoj této metody bylo důležité poznání, že krátké tandemové repetice o velikosti 1 až 6 bazí se nachází v genomech všech eukaryotických organismů a počty opakování se liší, takže jde o lokusy s velkou mírou polymorfismu (Tautz a Renz, 1984).

S tímto objevem vznikla nová metoda molekulárních markerů založená na PCR, která je vhodná pro genetické mapování, hledání genetické diverzity a hlavně pro MAS.

Pro amplifikaci se používá pár specifických předem navržených primerů, které nasednou do konzervovaných úseků v blízkosti tandemových repetic. Ideální velikost produktu se pohybuje v rozmezí 100-250 bp. Pro zobrazení se využívá elektroforéza na agarózovém nebo polyakrylamidovém gelu (Vieria a kol., 2016).

Výhodou metody je vysoký polymorfismus, nízká cena a poměrně snadná možnost automatizace.

Markery jsou kodominantní (Morgante a kol., 2002). Pro detekci není vyžadována vysoká čistota DNA a díky použití PCR stačí menší množství, přibližně do 100 ng pro reakci (Kumar, 2009).

SSR markery jsou hojně využívány pro detekci úseku DNA nacházejícího se v blízkosti genu rezistence a tvorbu postupů, které je možné rutinně opakovat s poměrně dobrou reprodukovatelností díky delším používaným primerům (Hayden a kol., 2006).

Markery je možné použít i pro multiplex PCR analýzu, kdy je možné během jedné analýzy detekovat několik různých lokusů na základě rozdílných délek získaných fragmentů. To pomáhá zefektivnit a zlevnit proces analýzy (Ghislain a kol., 2004 cit. podle Kumar, 2009).

Nevýhoda spočívá v potřebě nalezení sekvence pro vytvoření optimálního primeru, což ztěžuje studium druhů, u kterých zatím není známa sekvence DNA.

Při porovnání s jinými dostupnými metodami vychází SSR markery jako velmi vhodný způsob pro identifikaci odrůd a sledování vybraných genů při šlechtění.

5.3.6 SNP

Jednonukleotidové polymorfismy, anglicky Single Nucleotide Polymorphism (SNP) jsou pouhé změny jednoho jediného nukleotidu. Je až překvapivé, jak hojně se vyskytují v rámci genomu a jsou tak efektivním nástrojem pro genetické mapování (Soleimani, 2003).

Změna jednoho nukleotidu může, ale i nemusí mít vliv na vlastnosti týkající se odolnosti nebo naopak náchylnosti k onemocnění.

Počet jednonukleotidových polymorfismů se liší na úrovni druhů i jedinců. (Agarwal a kol., 2008), takže jde o velmi pestré spektrum kombinací. Zkoumání, zda má změna jednoho nukleotidu vliv na rezistenci je problematické. A s velkou pravděpodobností je šance, že SNP marker bude nalézat zrovna v místě ovlivňujícím odolnost je v souvislosti s velkým genomem například u pšenice, velmi malá. SNP markery jsou však důležité pro detekci jednotlivých ras houbových patogenů.

Příkladem je použití SNP markerů pro zjištění původu populace rzi travní ve Velké Británii. Výsledky ukázaly příbuznost se rzí travní izolovanou v Etiopii a podobnost se vzorky odebranými ve Švédsku a Dánsku, což ukázalo na příslušnost k jedné rasové linii (Lewis a kol., 2018).

U rostlin se používá detekce jednonukleotidových polymorfismu pomocí biočipů. V čipu jsou přítomny sondy, které odhalí případný polymorfismus na základě komplementarity. V případě pšenice byl navržen například čip pro 90 000 SNP (Wang a kol., 2014).

Výhodou jednonukleotidových polymorfismů je kodominantní charakter markerů. Jakmile je odhaleno místo SNP, připraví se vhodné primery a metodu je možné snadno automatizovat. Metoda je dobře reprodukovatelná (Kumar, 2009).

Nevýhodou metody jsou vysoké náklady pro objevení místa polymorfismu.

6 Vyhledky do budoucna

Šlechtění na rezistenci proti houbovým patogenům je žádoucí z několika důvodů. V první řadě jde o hledisko spolehlivosti ochrany, kdy je u některých houbových chorob v případě používání fungicidních přípravků velmi nejistý výsledek ovlivněný vnějšími podmínkami. Samotné používání chemických přípravků pro ošetření osiva a rostlin navíc není v souladu s pravidly ekologického zemědělství a zatěžuje životní prostředí. Používání odolných odrůd je také levnější. Výběrem odolnějších odrůd se totiž sníží potřeba množství aplikovaných fungicidních přípravků nejméně o jeden, což se rovná úspoře zhruba 700 korun na hektar. (Hanzalová a Bartoš, 2015)

Úspěšné šlechtění a detekce důležitých genů by byla mnohem obtížnější bez možností sekvenování a genetického mapování. I když jde zatím o metody s převážně vědeckým využitím, poskytují cenný podklad pro vývoj technik k rutinnímu stanovování vybraných genů, odlišování odrůd a porovnání jejich příbuznosti. Vývoj nových rezistentních odrůd by byl mnohem pomalejší bez základního výzkumu, na jehož výsledcích staví výzkum aplikovaný pomalu přecházející k využití v běžné praxi.

Již dnes máme pro obilniny vytvořené genetické mapy bohatě osázené nejrůznějšími objevenými geny pro rezistenci k houbovým chorobám. Zbývá pokračovat ve výzkumu a snažit se co možná nejlépe převést získané informace do praxe a vytěžit z nich maximum při vytváření potravinové bezpečnosti, jejíž nedílnou součástí je právě odolnost pěstovaných odrůd obilnin.

Použití molekulárních markerů může najít své využití pro další šlechtění rezistentních odrůd se snahou získávat různé kombinace více genů pro rezistenci přítomných v jedné rostlině. Kromě genů velkého účinku je potřeba zaměřit se i na nespecifickou horizontální rezistenci podmíněnou souborem genů malého účinku.

V úvahu je potřeba vzít také potenciální výnosnost a kvalitu zrn pro další zpracování. Je otázka, jak a jestli vůbec může přítomnost genů rezistence ovlivňovat jiné vlastnosti daných odrůd obilnin.

Klíčové je propojení znalostí ohledně struktury a uspořádání genomu daných obilnin. Je potřeba brát v úvahu genové vazby a vzájemné interakce jednotlivých genů.

Selekce využívající molekulární markery je důležitá i z pohledu relativní bezpečnosti a právní jednoduchosti v porovnání s transgenními obilninami, u kterých jsou prováděny cílené

zásahy a jejichž pěstování je regulováno. Nově vyšlechtěné odrůdy na základě identifikace rezistentních genů a jejich kombinace bez nutnosti zásahů genového inženýrství jsou společensky přijatelné bez žádných větších otázek ohledně jejich bezpečnosti.

Detekování genů pomocí markerů má potenciál i pro využití v potravinářském průmyslu pro správnou identifikaci odrůd pro správné použití s ohledem na kvalitativní vlastnosti.

U komerčních odrůd stále rozhoduje hlavně výnos a kvalita, s čímž nemůže řada nově vzniklých „polotovarů odrůd“ vycházejících ze šlechtění se zaměřením na rezistence konkurovat. Možnou cestou by tedy mohla být snaha o kombinaci obou faktorů - tj, šlechtění s ohledem na výnos a kvalitu spojené se zušlechťováním pomocí odrůd s geny rezistence. Pro úspěch a uspokojivou rychlost tohoto procesu je důležité co nejlépe zmapovat genom dané obilniny, objevit vazby mezi klíčovými geny a dozvědět se co nejvíce o jejich vzájemném ovlivňování. Stále však existuje celá řada procesů, jejichž identifikace a vysvětlení mechanismu fungování zůstává záhadou. Například jak dochází k expresi jednotlivých genů, kdy, jak a proč se objevují inhibitory důležitých genů velkého či malého účinku a podobně.

Molekulární zkoumání polygenní horizontální rezistence je obecně složitější, ale mohlo by poskytnout důležité výsledky. Situaci však komplikuje velikost genomu obilnin, což by mohlo být řešitelné pomocí moderních metod a možností bioinformatiky a sekvenčních knihoven. Dnes již existují poměrně obsáhlé databáze s osekvenovanými genomy, nebo vybranými částmi (například NCBI, TREP).

7 Závěr

Pšenice, ječmen, žito a oves tvoří velkou část jídelníčku obyvatel Evropy, ale i dalších kontinentů. Spolehlivé a udržitelné pěstování těchto plodin bez přílišných ztrát na výnosech je tedy velmi důležité. Místo klasických postupů šlechtění se v poslední době stále více používají moderní metody molekulární biologie. Cílem šlechtění je zkombinovat důležité vlastnosti obilovin, jako jsou výnos, kvalitativní vlastnosti zrna, odolnost proti stresovým biotickým (viry, bakterie a právě i houbové choroby) a abiotickým vlivům (sucho a podobně).

Právě rezistence proti nejčastěji se vyskytujícím houbovým patogenům je hodně sledovaným faktorem. Použití molekulárních markerů otevírá nové cesty pro urychlení a zefektivnění vývoje nových odrůd. Žádoucí je hlavně kumulování genů rezistence pro různé druhy houbových patogenů, protože odrůda téměř dokonale odolná proti určité chorobě může být náchylná proti jiné, která se daný rok zrovna objeví a stejně dojde k velkým ztrátám.

V práci jsem se pokusila shrnout význam vybraných molekulárních markerů a jejich vhodnost pro použití v každodenní praxi.

Studium genů rezistence obilnin s použitím molekulárních technik nemá tak dlouhou tradici v porovnání s klasickým šlechtěním pomocí výběru fenotypově odolných rostlin. V budoucnu jistě nastane ještě další velký vývoj a kontrola či selekce odrůd na základě molekulárních markerů se může stát běžnou praxí.

8 Seznam literatury a zdrojů

- AGARWAL M, SHRIVASTAVA N, PADH H (2008) Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *Plant Cell Reports* **27**(4), 617-631
- AKTAR-UZ-ZAMAM M, TUHINA-KHATUN M, HANAFI M a SAHEBI M (2017) Genetic analysis of rust resistance genes in global wheat cultivars: an overview. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* **31**(3), 431-445
- ALAM A, XUE F, WANG CH, W, JI W (2011) Powdery Mildew Resistance Genes in Wheat: Identification and Genetic Analysis. *Journal of Molecular Biology Research* **1**(1)
- ANDERSON JA, STACK RW, LIU S, et al. (2001) DNA markers for Fusarium head blight resistance QTLs in two wheat populations. *Theoretical and Applied Genetics* **102**(8), 1164-1168
- BARRETT, B. A. a K. K. KIDWELL (1998) AFLP-Based Genetic Diversity Assessment among Wheat Cultivars from the Pacific Northwest. *Crop Science* , **38**(5)
- BAUER E, SCHMUTZER T, BARILAR I, et al. (2017) Towards a whole-genome sequence for rye (*Secale cereale* L.). *The Plant Journal*, **89**(5), 853-869 ISSN 09607412.
- BAYLES R.A., FLATH K., HOVMØLLER M.S., DEVALAVIEILLE-POPE C.(2000): Breakdown of the Yr17 resistance to yellow rust of wheat in northern Europe. *Agronomie* **20**: 805-11.
- BERNARDO AN, MA H, ZHANG D, BAI G (2012) Single nucleotide polymorphism in wheat chromosome region harboring Fhb1 for Fusarium head blight resistance. *Molecular Breeding* **29**(2), 477-488
- REDDY BL, CHANDRASEKHAR K, ZEWDU Y, DINOOR A, KELLER B, BEN-DAVID R (2016) Identification and genetic mapping of PmAf7DS a powdery mildew resistance gene in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theoretical and Applied Genetics***129**(6), 1127-1137
- BŁASZCZYK L, KRAMER I, ORDON F, CHEŁKOWSKI J, TYRKA M, VIDA G, KARSAI I (2008) Validity of selected DNA markers for breeding leaf rust resistant wheat. *Cereal Research Communications* **36**(2), 201-213
- BOLTON, MELVIN D, KOLMER J, GARVIN D (2008) Wheat leaf rust caused by *Puccinia triticina*. *Molecular Plant Pathology* **9**(5), 563-575
- Botstein D & W, Skolnick RL, MH, RONALD D (1980) Construction of a Genetic Linkage Map in Man Using Restriction Fragment Length Polymorphisms. *American journal of human genetics*. **32**. 314-31
- BRAUN U, COOK RTA, INMAN AJ, SHIN H-D (2002): The taxonomy of powdery mildew fungi. st. 13–55. Bélanger, R.R., Bushnell, W.R., Dik, A.J., and Carver, T.L.W. *The Powdery Mildews: A Comprehensive Treatise*. APS Press. St. Paul.
- BRENCHLEY R, SPANNAGL M, PFEIFER M, et al. (2012) Analysis of the bread wheat genome using whole-genome shotgun sequencing. *Nature* **491**(7426), 705-710

- COLLARD B, CY MACKILL D (2008) Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **363**(1491), 557-572
- CUTHBERT PA, SOMERS JD, BRULÉ-BABEL A (2007) Mapping of Fhb2 on chromosome 6BS: a gene controlling Fusarium head blight field resistance in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theoretical and Applied Genetics* **114**(3), 429-437
- DVOŘÁK J, TERLIZZI P, ZHANG H-B, RESTA P (1993) The evolution of polyploid wheats: identification of the A genome donor species. *Genome* **36**(1), 21-31
- FOOLAD RM (2007) Genome Mapping and Molecular Breeding of Tomato. *International Journal of Plant Genomics* 1-52
- GLAWE DA (2008): The Powdery Mildews: A Review of the World's Most Familiar (Yet Poorly Known) Plant Pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 46: 27 – 51.
- GUPTA PK, VARSHNEY RK, SHARMA PC, RAMESH B (1999) Review Molecular markers and their applications in wheat breeding. *Plant Breeding* **118**(5), 369-390
- GUPTA SK, CHARPE A, KOUL S, HAQUE QMR PRABHU KV (2006b) Development and Validation of SCAR Markers Co-Segregating with an Agropyron Elongatum Derived Leaf Rust Resistance Gene Lr24 in Wheat. *Euphytica* **150**(1-2), 233-240
- GUPTA SK, CHARPE A, PRABHU KV, HAQUE QMR (2006a) Identification and validation of molecular markers linked to the leaf rust resistance gene Lr19 in wheat. *Theoretical and Applied Genetics* **113**(6), 1027-1036
- HÄNI F, REINHARD H, SCHWARZ A, TANNER K, VORLET M (1993): *Obrazový atlas chorob a škůdců polních plodin*. Scientia, Praha
- HANZALOVÁ A, BARTOŠ P, SUMÍKOVÁ T (2015) Molekulární analýza genů rezistence ke rzi pšeničné. *Úroda*, 63(12): 18 – 20
- HANZALOVÁ A, BARTOŠ P (2018) Výskyt rzi na pšenici a prognóza jejich rozšíření. *Agromanual*
- HANZALOVÁ A, BARTOŠ P (2015) *Rez plevová na pšenici a ochrana proti ní*. Praha: Výzkumný ústav rostlinné výroby, ISBN 978-80-7427-184-7
- HANZALOVÁ A (2008) *Možnosti snížení ztrát působených rzemi na pšenici*. Praha: Výzkumný ústav rostlinné výroby, ISBN 978-80-87011-66-9.
- HAYDEN MJ, STEPHENSON P, LOGOJAN AM, *et al.* (2006) Development and genetic mapping of sequence-tagged microsatellites (STMs) in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theoretical and Applied Genetics* **113**(7), 1271-1281
- Hordeum vulgare. *Ensembl Plants Home* ,Dostupné z: https://plants.ensembl.org/Triticum_aestivum/Info/Annotation/
- How big are genomes?. *Cell biology by the numbers*, Dostupné z: <http://book.bionumbers.org/how-big-are-genomes/>
- CHARMET G (2011) Wheat domestication: Lessons for the future. *Comptes Rendus Biologies* **334**(3), 212-220

- CHRPOVÁ J, ŠÍP V, SUMÍKOVÁ T, SALAVA J, PALICOVÁ J, ŠTOČKOVÁ L, DŽUMAN Z, HAJŠLOVÁ J (2016): Occurrence of *Fusarium* species and mycotoxins in wheat grain collected in the Czech Republic *World Mycotoxin Journal*, 9 (2): 317 – 327
- CHRPOVÁ J (2015) Přehání se význam fuzarióz obilnin – ano, nebo ne? *Úroda*, Dostupné z: <https://uroda.cz/prehani-se-vyznam-fuzarioz-obilnin-ano-nebo-ne/>
- VALKOUN J (2001) Wheat pre-breeding using wild progenitors. *Euphytica* **119**(1/2), 17-23
- JONES N, OUGHAM H, THOMAS H, PAŠAKINSKIENĚ I (2009) Markers and mapping revisited: finding your gene. *New Phytologist*, **183**(4), 935-966
- JØRGENSEN LN, HOVMØLLER MS, HANSEN JG, et al. (2014) IPM Strategies and Their Dilemmas Including an Introduction to www.eurowheat.org. *Journal of Integrative Agriculture* **13**(2), 265-281
- KUMAR P, GUPTA VK, MISRA AK, MODI RD, PANDEY BK (2009) Potential of Molecular Markers in Plant Biotechnology. *Plant Omics*. 2. 141-162.
- LAGUDAH ES, MCFADDEN H, SINGH RP, HUERTA-ESPINO J, BARIANA HS, SPIELMEYER M (2006) Molecular genetic characterization of the Lr34/Yr18 slow rusting resistance gene region in wheat. *Theoretical and Applied Genetics* **114**(1), 21-30
- LEONOVA IN (2013) Molecular markers: Implementation in crop plant breeding for identification, introgression and gene pyramiding. *Russian Journal of Genetics: Applied Research* **3**(6), 464-473
- LEWIS CM, PERSOONS A, BEBBER DP, et al. (2018) Potential for re-emergence of wheat stem rust in the United Kingdom. *Communications Biology* **1**(1)
- LINDBLAD M, GIDLUND A, SULYOK M, BORJESSON T, KRŠKA R, OLSEN M, FREDLUND E (2013) Deoxynivalenol and other selected *Fusarium* toxins in Swedish wheat occurrence and 6 correlation to specific *Fusarium* species. *International Journal of Food Microbiology* 167: 284-291.
- LÖRZ H, WENZEL G (2008) *Molecular marker systems in plant breeding and crop improvement*. New York: Springer ISBN 978-354-0740-063.
- LYNCH M, MILLIGAN BG (1994) Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular Ecology* **3**(2), 91-99
- MCINTOSH RA, YAMAZAKI Y, DUBCOVSKY J, ROGERS J, MORRIS C, SOMERS DJ, APPELS R, DEVOS KM (2008) Catalogue of gene symbols for wheat
- MESTERHÁZY A, BARTOŠ P, GOYEAU H, NIKS ER, CSÖSZ M (2000) European virulence survey for leaf rust in wheat. *Agronomie* **20**(7), 793-804
- MILUS EA, KRISTENSEN K, HOVMØLLER MS (2009) Evidence for increased aggressiveness in a recent widespread strain of *Puccinia striiformis* f.sp. *tritici* causing stripe rust of wheat. *Phytopathology* **99**: 89-94
- MÍŠA P (2001) Pěstování ječmene jarního v číslech. *Úroda* [online]. [cit. 2018-12-10]. Dostupné z: <https://uroda.cz/pestovani-jecmene-jarniho-v-cislech/>

- MORGANTE M, HANAFEY M, POWELL W (2002) Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes. *Nature Genetics* **30**(2), 194-200
- MOUDRÝ J (1993) *Základy pěstování ovsa*. Praha: Institut výchovy a vzdělávání Ministerstva zemědělství, 32 s.
- NYBOM H (2004) Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Molecular Ecology* **13**(5), 1143-1155
- PARAN I, MICHELMORE RW (1993) Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theoretical and Applied Genetics* **85**(8), 985-993
- PAUN O a SCHÖNSWETTER P (2012) Amplified Fragment Length Polymorphism: An Invaluable Fingerprinting Technique for Genomic, Transcriptomic, and Epigenetic Studies. SUCHER, Nikolaus J., James R. HENNELL a Maria C. CARLES, ed. *Plant DNA Fingerprinting and Barcoding*. Totowa, NJ: Humana Press, 2012-2-7, s. 75-87 *Methods in Molecular Biology*.
- POLIŠENSKÁ I, JIRSA O, SALAVA J, MATUŠINSKY P, PROKEŠ J (2010): Fuzáriové mykotoxiny a patogeny *Fusarium* v obilovinách sklizně roku 2009. *Obilnářské listy*, 18, 12-16. ISSN: 1212- 138X
- POWELL W, MORGANTE M, ANDRE CH, HANAFEY M, VOGEL J, TINGEY S, RAFALSKI A (1996) The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular Breeding* **2**(3), 225-238
- RABINOVICH SV (1998) Importance of wheat-rye translocations for breeding modern cultivars of *Triticum aestivum* L. *Euphytica* 1998, **100**(1/3), 323-340
- RODRIGUEZ-ALGABA J, WALTER S, SØRENSEN CK , HOVMØLLER MS, JUSTESEN AF (2014) Sexual structures and recombination of the wheat rust fungus *Puccinia striiformis* on *Berberis vulgaris*. *Fungal Genet. Biol.* **70**: 77-85.
- SEAH S, BARIANA H, JAHIER J, SIVASITHAMPARAM K, LAGUDAH ES (2001) The introgressed segment carrying rust resistance genes Yr17, Lr37 and Sr38 in wheat can be assayed by a cloned disease resistance gene-like sequence. *Theoretical and Applied Genetics* **102**(4), 600-605
- SHENDUR J, JI H (2008) Next-generation DNA sequencing. *Nature Biotechnology* **26**(10), 1135-1145
- SCHACHERMAYR G, SIEDLER H, GALE MD, WINZELER H, WINZELER M, KELLER B (1994) Identification and localization of molecular markers linked to the Lr9 leaf rust resistance gene of wheat. *Theoretical and Applied Genetics* **88**(1), 110-115
- SCHNURBUSCH T, PAILLARD S, SCHORI A, MESSMER M, SCHACHERMAYR G, WINZELER M, KELLER B (2004) Dissection of quantitative and durable leaf rust resistance in Swiss winter wheat reveals a major resistance QTL in the Lr34 chromosomal region. *Theoretical and Applied Genetics* **108**(3), 477-484
- SINGH RP, HODSON DP, HUERTA-ESPINO J, *et al.* (2011) The Emergence of Ug99 Races of the Stem Rust Fungus is a Threat to World Wheat Production. *Annual Review of Phytopathology* **49**(1), 465-481
- SOLEIMANI VD, BAUM BR, JOHNSON DA (2003) Efficient validation of single nucleotide polymorphisms in plants by allele-specific PCR, with an example from barley. *Plant Molecular Biology Reporter* **21**(3), 281-288
- ŠTOLCOVÁ M (2009) *Speciální fytotechnika*. V Praze: Česká zemědělská univerzita, Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, ISBN 978-80-213-1893-9

- TAUTZ D, RENZ M (1984) Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Research* **12**(10), 4127-4138
- TRATWAL A, BOCIANOWSKI J (2014) *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* virulence frequency and the powdery mildew incidence on spring barley in the Wielkopolska province. *Journal of Plant Protection Research* **54**(1), 28-35
- Triticum aestivum Assembly and Gene Annotation. *Ensembl Plants Home* [online]. [cit. 2019-01-07]. Dostupné z: https://plants.ensembl.org/Triticum_aestivum/Info/Annotation/
- URBAN Z, MARKOVÁ J (2009) *Catalogue of rust fungi of the Czech and Slovak Republics*. V Praze: Karolinum, ISBN 9788024616643.
- VICIENT CM, CASACUBERTA JM (2017) Impact of transposable elements on polyploid plant genomes. *Annals of Botany* **120**(2), 195-207
- VIDA G, GÁL M, UHRIN A, VEISZ O, SYED NH, FLAVELL AJ, WANG Z, BEDŮ Z (2009) Molecular markers for the identification of resistance genes and marker-assisted selection in breeding wheat for leaf rust resistance. *Euphytica* **170**(1-2), 67-76
- VIEIRA MLC, SANTINI L, DINIZ AL, MUNHOZ CF (2016) Microsatellite markers: what they mean and why they are so useful. *Genetics and Molecular Biology* , **39**(3), 312-328
- VOGELGSANG S, SULYOK M, BÄNZIGER I, KRŠKA R, SCHUHMACHER R, FORRER HR (2008): Effect of fungal strain and cereal substrate on in vitro mycotoxin production by *Fusarium poae* and *Fusarium avenaceum*. Food additives and contaminants part a – *Chemistry analysis control exposure & risk assessment* 25: 745-757
- VOS P, HOGERS R, BLEEKER M, *et al* (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* **23**(21), 4407-4414
- VOSTAL J, ZITTA M (1999) *Obečná fyto technika*. Vyd. 2. upr. Praha: Česká zemědělská univerzita, ISBN 80-213-0524-x
- WANG S, WONG D, FORREST K, *et al*. (2014) Characterization of polyploid wheat genomic diversity using a high-density 90 000 single nucleotide polymorphism array. *Plant Biotechnology Journal* **12**(6), 787-796
- WATSON JD, CRICK FHC (1953): Molecular Structure of Nucleic Acids. *Nature*. 737 – 738.
- Wisniewska H, Stepień L, Waskiewicz A, Beszterda M, Góral T, Belter J (2014): Toxigenic *Fusarium* species infecting wheat heads in Poland. *Central European Journal of Biology* 9: 163-172