

Biologické a genetické aspekty rezistence rostlin (k biotickým stresům)



Petr Smýkal

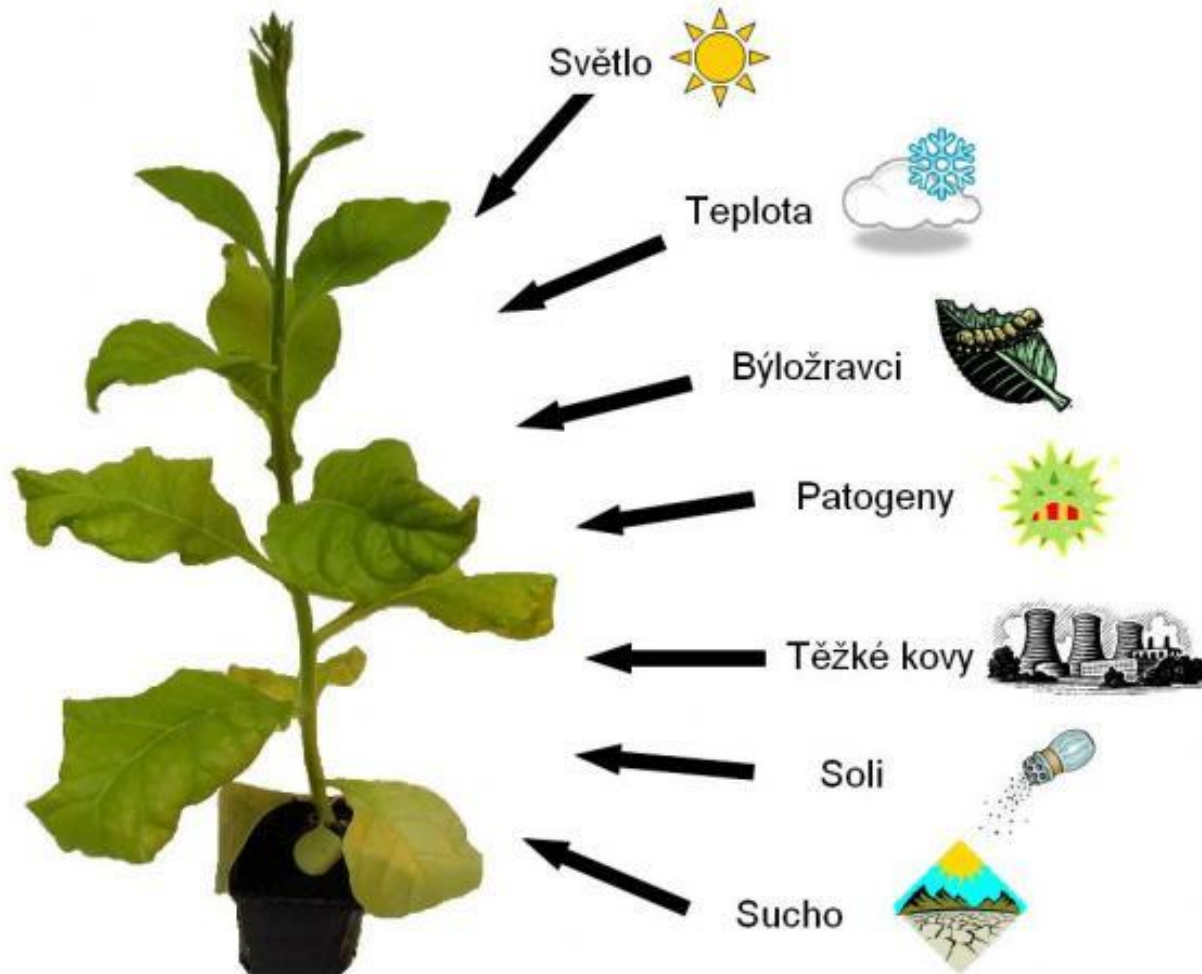
Katedra botaniky

PřF UP, Olomouc

Struktura přednášky

- Přirozené obranné mechanismy rostlin
- Důležitost diverzity, vliv domestikace
- Mapování a využití rezistence ve šlechtění
- Transgenose (GMO) a rezistence

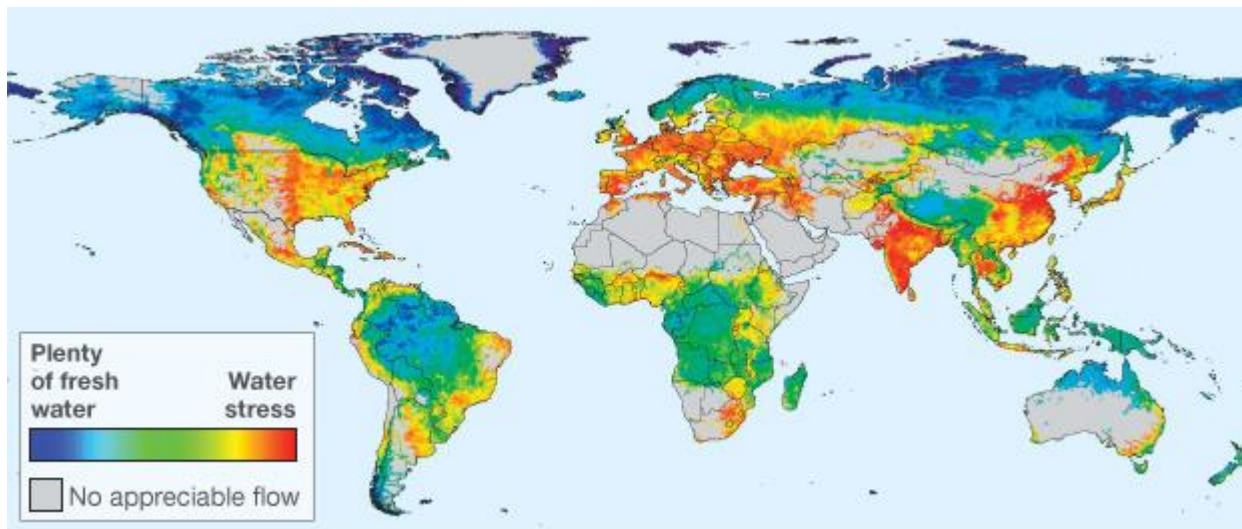
Na rozdíl od živočichů, kteří mohou před nevhodnými podmínkami do jisté míry utéci, jsou rostliny pevně spjaty s místem svého růstu, a proto musí být jejich genetická výbava natolik plastická, aby si s touto nevýhodou poradily.



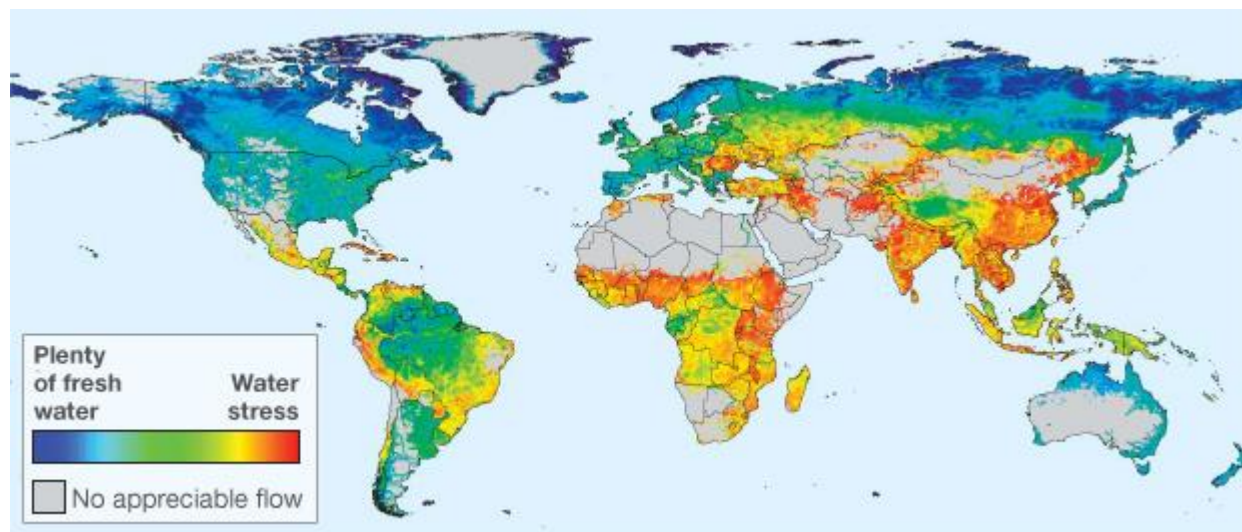
Abiotické stresy

- **Nízká a vysoká teplota** – chladové a heat shock proteiny
- **sucho a vodní deficit** – fyziologické adaptace, dehydriny
- **iontový a osmotický stres, odolnost rostlin k zasolení**
- **Zaplavení a anaerobióza, nedostatek kyslíku - hypoxie a anoxie**
- **Toxický efekt těžkých kovů a pH prostředí**
- **Oxidační stres, kyslíkový stres, vznik reaktivních forem kyslíku**
- **Záření UV, světelné**

Nedostatek vody

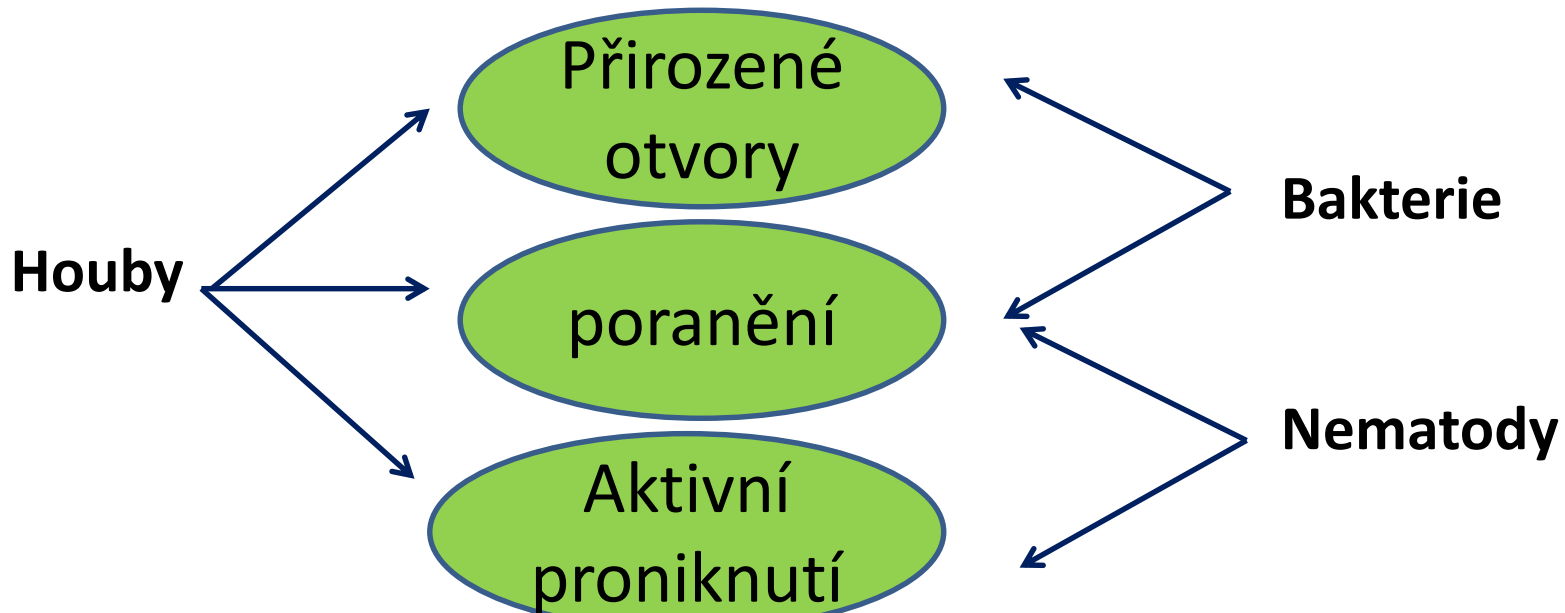


Přirozené ekosystémy

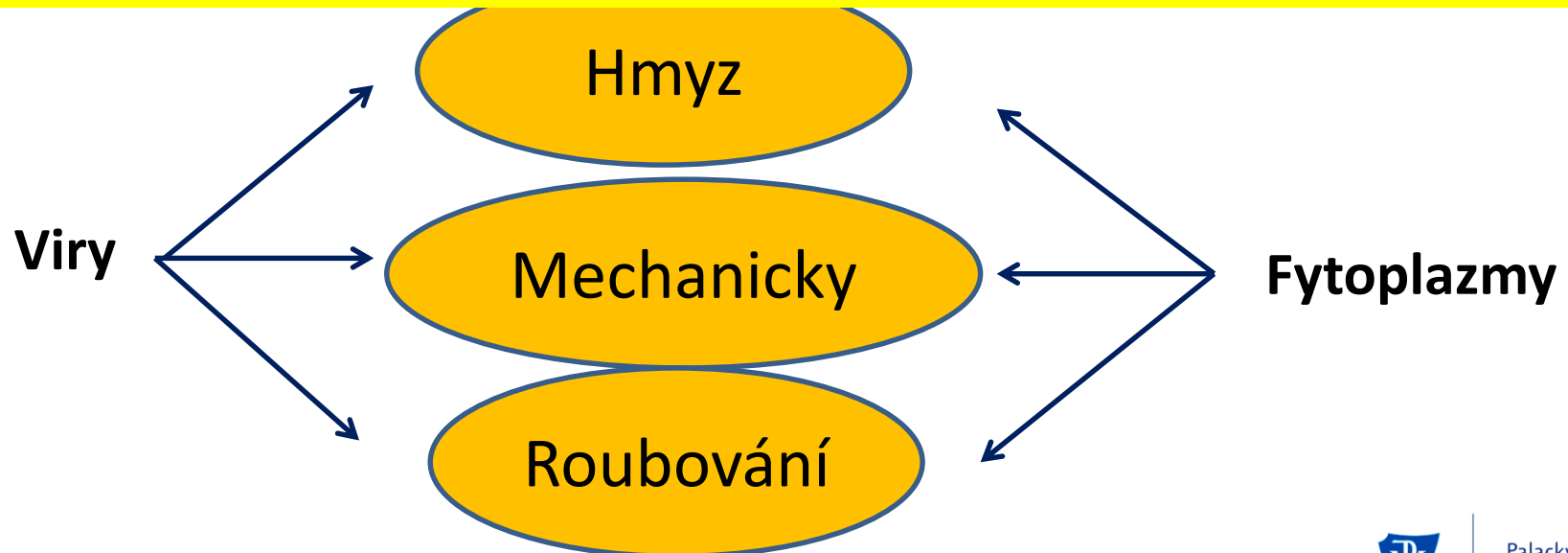


Kulturní ekosystémy

[Nature 467, 555-561 \(30 September 2010\)](#) |



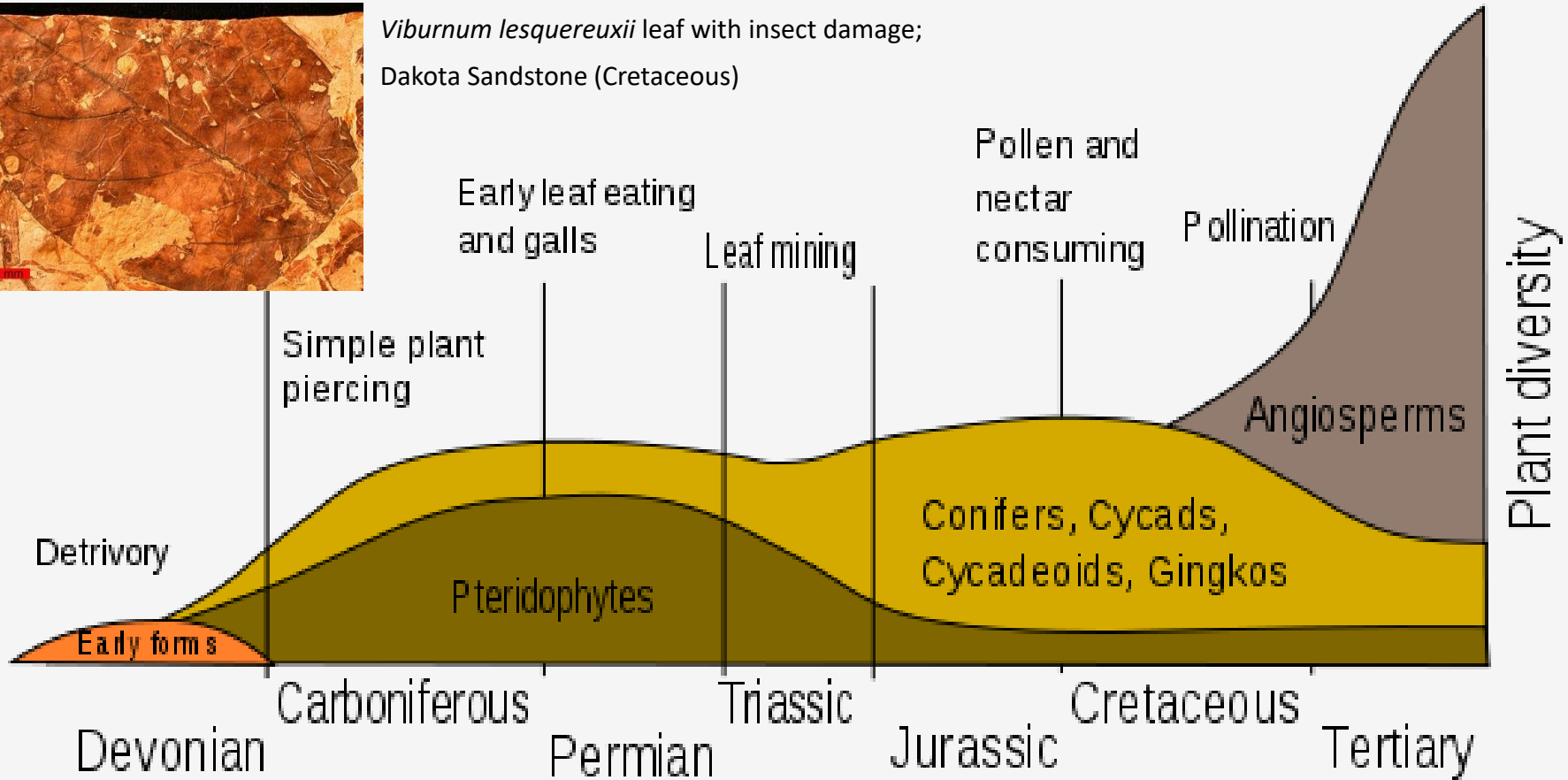
Biotický stres - Patogenní organismy



Evolve obranných mechanismů



Viburnum lesquereuxii leaf with insect damage;
Dakota Sandstone (Cretaceous)



Genetické-biologické založení rezistence

Konstitutivní mechanismy rezistence

Produkty (toxiny) konstitutivních genů rezistence lze zjistit i bez přítomnosti patogena.

Induktivní mechanismy rezistence

Produkty adaptabilních genů (fytoalexiny, R-geny) vznikají až v interakci s patogenem.

Podle způsobu jejich výživy můžeme patogeny rostlin rozdělit na:

biotrofní - získávají živiny z žijících buněk (padlí travní *Blumeria graminis* a rzi)

nekrotrofní - usmrcují buňky hostitele a získávají živiny z odumřelých pletiv (*Fusarium solani*)

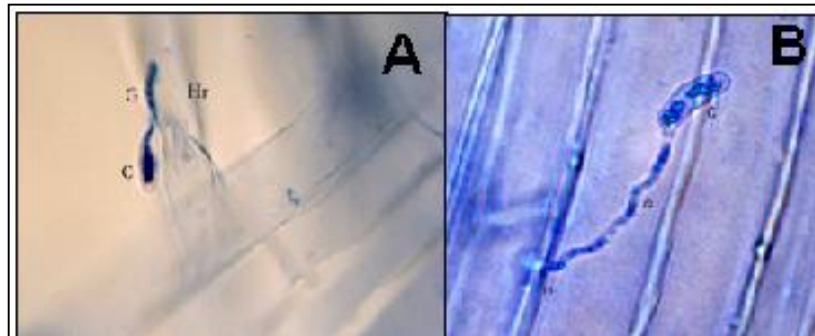
hemibiotrofní - mají zpočátku biotrofní způsob výživy, ale po krátké době přecházejí do nekrotrofní fáze, kdy usmrcují své hostitele.



Proces infekce

Biologická specializace je použita jako základ pro taxonomickou klasifikaci hostitelů a parazitů a tvoří část procesu koevoluce mezi patogenem a jeho hostitelem.

Růst a reprodukce patogena se odehrává buď uvnitř, nebo na povrchu infikované rostliny. Například ektoparazitické houby (padlí travní) produkují všechny vegetativní a reprodukční orgány, kromě haustoria, na povrchu rostlin.



Někteří houboví původci chorob, jako např. rzi mají dva různé hostitele:

„primárního hostitele - hostitele“ a „alternativního hostitele - meziphostitele“.



Například u rzi travní (*Puccinia graminis*), která napadá obilniny a trávy, je primárním hostitelem pšenice nebo různé druhy trav a meziphostitelem je dřevina (*Berberis*)

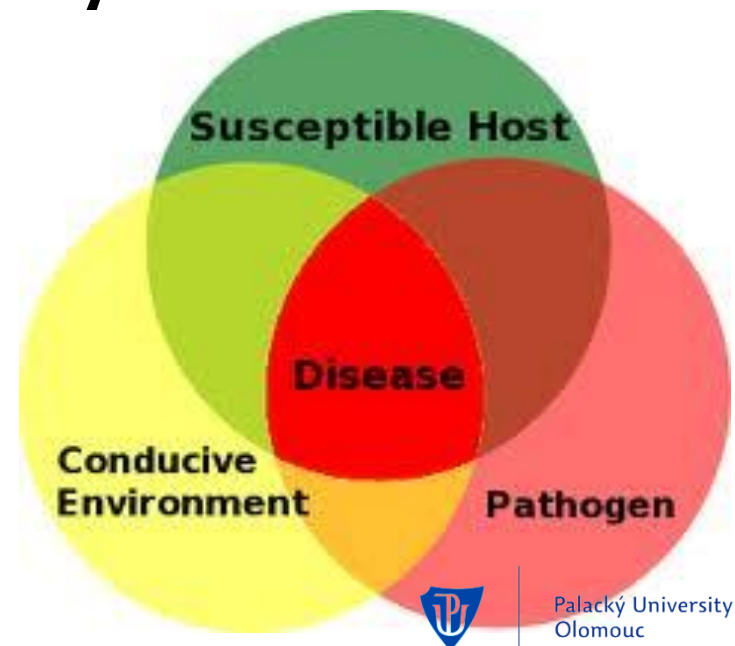
U rzi pšeničné je meziphostitelem rod žluťucha (*Thalictrum* spp.).

Vliv vnějšího prostředí / ontogeneze na vznik a rozvoj chorob

zeměpisná šířka, nadmořská výška, oblasti pěstování,
pro které jsou charakteristické faktory počasí, jako jsou
teplota, srážky, sluneční záření, vítr, apod.

Důležité je také **vývojová fáze rostliny**.

Teplota prostředí ovlivňuje nejen
intenzitu rozvoje choroby,
ale i vnímavost rostlin.



Rezistence rostlin k chorobám a škůdcům

Mechanismy rezistence

Struktury a obsahové látky existující před napadením rostliny

- pokožka
- buněčná stěna
- antimikrobiální látky - metabolity (glukosidy, saponiny)
- antimikrobiální proteiny
- inhibitory enzymů (proteázy)
- enzymy rozkládající toxiny produkované patogeny
- receptory reagující na přítomnost patogena a aktivující obranné mechanismy

Mechanická obrana

Produkované látky tvoří obrannou vnější vrstvu – pryskyřice, latex, vosk, lignin, vnější lepkavé šťávy – gumové klejotoky apod.



Trichomy, trny, chlupy, rafidy obsahující toxické šťavelany, uhličitany vápenaté



Thigmonastie

Mimosa pudica, reakce listů na dotek a jiné podněty



Rostliny takto ukazují spíše „zvadlý“ neatraktivní fenotyp pro herbivory, tato reakce může také přímo fyzicky odmrštit malý hmyz

Mimikry a kamufláž

Listy mučenky (*Passiflora*) mají výrůstky imitující nakladená vajíčka hmyzu, což odrazuje další od klazení (ovidepozice).



Nepřímá obrana

Obrana pomocí poskytnutí útočiště nepřátelům svým vlastním nepřátel - mutualismus

„nepřítel mého nepřítele je můj přítel,,.



Některé druhy *Acacia* (*A. chiapensis*, *A. collinsii*, *A. cornigera*, *A. hindsii*) mají trny poskytující úkryt mravencům na navíc produkují pro ně nektar na bázi svých listů

Chemické látky produkované konstitutivně

Alkaloidy - deriváty aminokyselin

nicotin, caffein, morphin, colchicin, ergolin, strychnin, and quinin. Inhibují nebo aktivují enzymy, nebo mění zásobní cukry a tuky inhibicí tvorby fosfodiesterových vazeb. Váží se na nukleové kyseliny a inhibují syntézu proteinů a ovlivňují opravu DNA. Mění také funkci buněčných membrán a cytoskelu.

Kyanogenní glykosidy – uloženy v neaktivní formě ve vakuole.

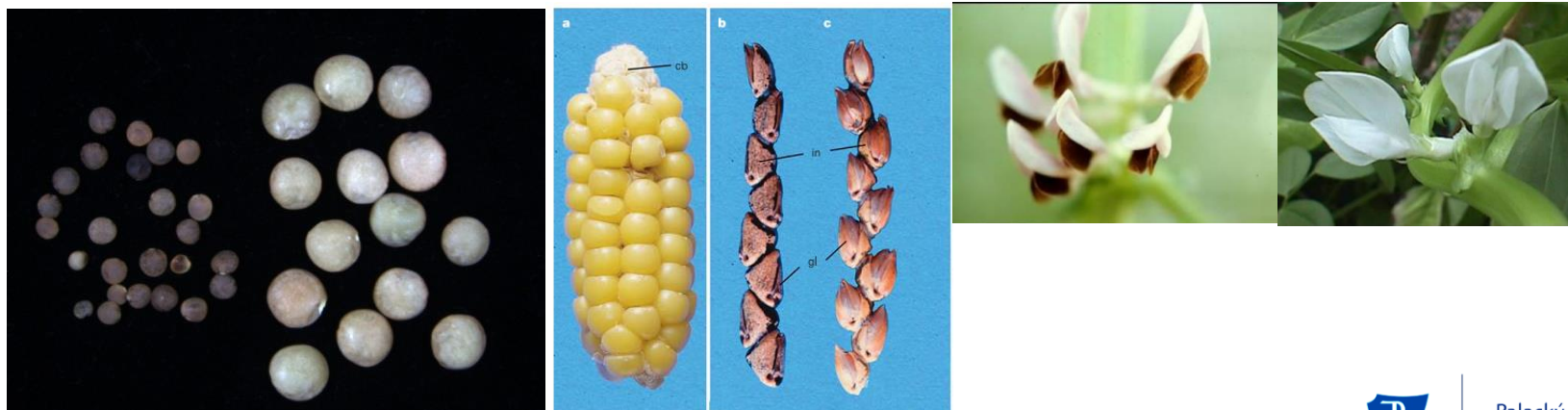
Jejich toxicity je spouštěna narušením stěny, po kontaktu s cytoplasmatickými enzymy kdy dochází k uvolnění kyanovodíku, který blokuje buněčnou respiraci.

Terpenoidy - organické látky příbuzné terpenům.

Monoterpenoidy, se 2 isopreními jednotkami jsou těkavé olejové látky- citronel, limonen, menthol, camphor, and pinen.

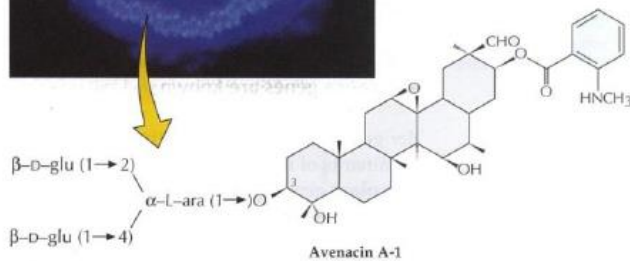
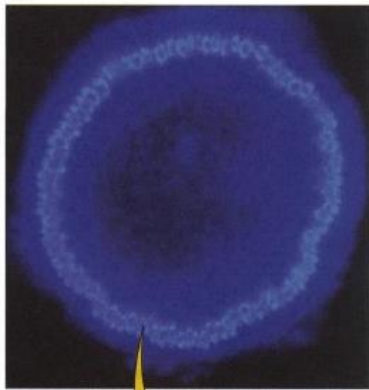
Diterpenoidy, 4 isopreními jednotkami, jsou obsaženy v latexu and pryskyřicích.

- **Fenolické látky** – mající aromatické jádro se 6 uhlíky spojené hydroxy skupinou. Široké spektrum látek od jednoduchých taninů ke složitějším flavonoidům
- Např. **lignin, silymarin a cannabinoidy**, kondensované taniny, polymery složené ze 2 až 50 flavonových molekul, inhibující trávení herbivorů vazbou na proteiny, inhibicí trávicích enzymů.
- **Silikáty a ligniny**, obrušující kusadla hmyzu



Chemické látky produkované konstitutivně

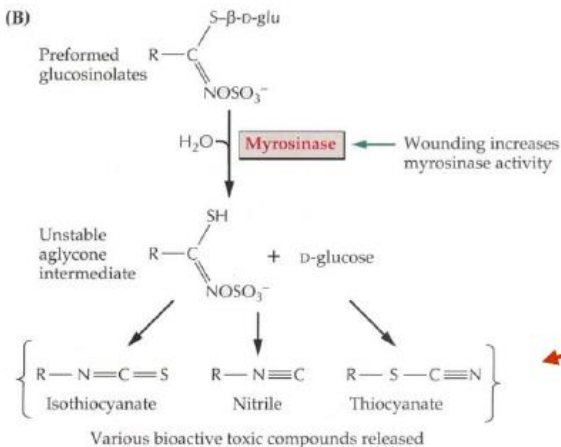
(A)



➤ Saponiny – avenacin

- pod povrchem kořenů
- glykosylované látky
- triterpenoidy, steroidy, steroidní glykoalkaloidy
- **Glykoalkaloid tomatin** – rezistence k *Fusarium* u zelených plodů rajčat

(B)



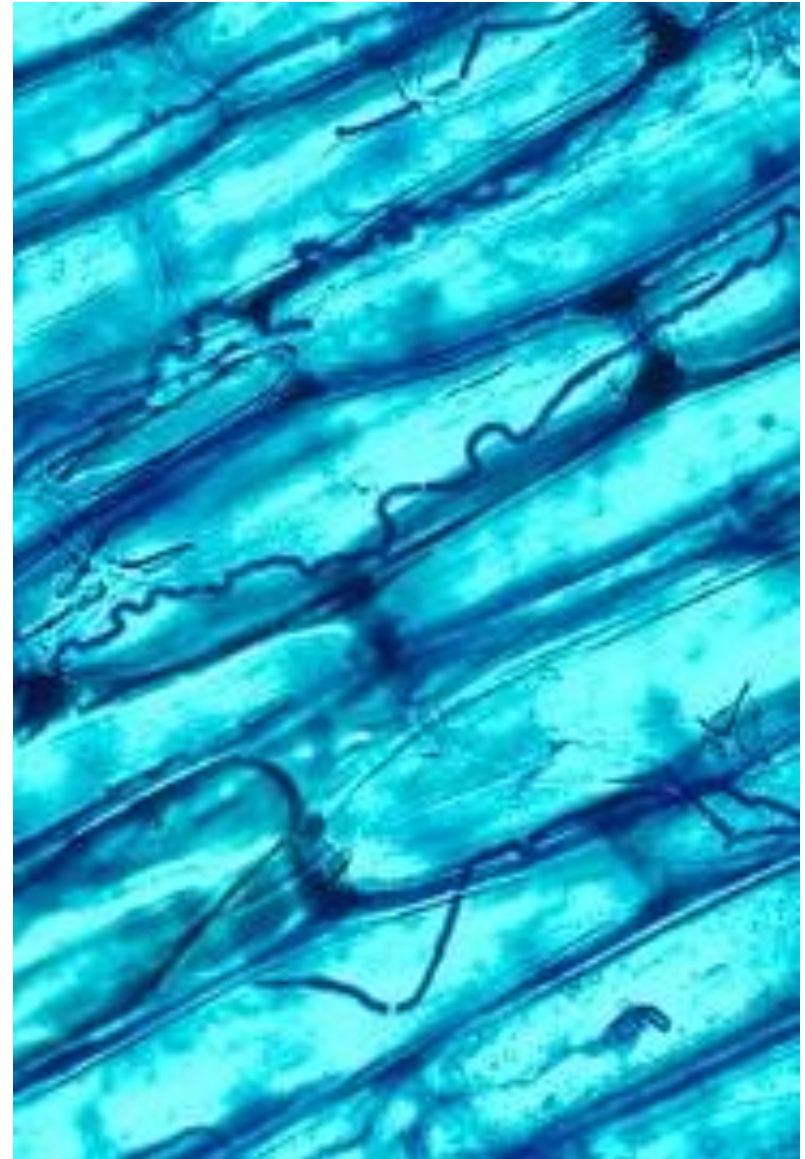
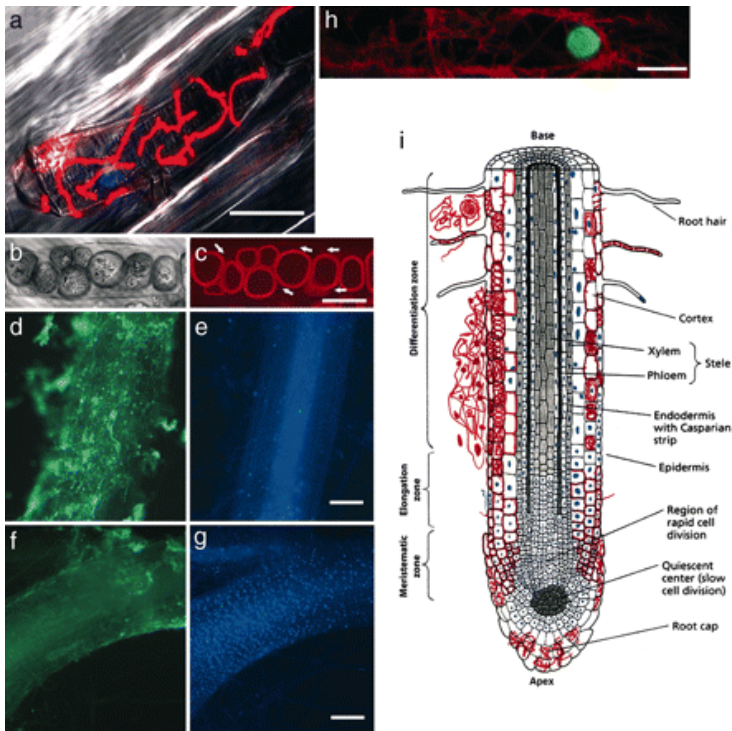
➤ Glukosinoláty

- Glukosidy obsahující síru
- čeleď *Brassicaceae*
- Poškození kořene – jejich hydrolýza a uvolňování řady toxických látek

Využití interakcí mezi organismy k ochraně rostlin

Využití endofytických hub v obraně

Endofytické houby mohou pomoci rostlinám prostřednictvím toxinů inhibujících další organismy.



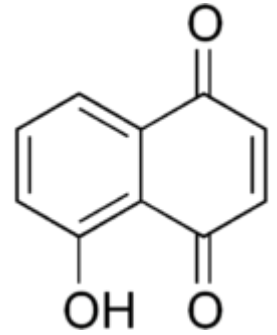
Allelopatie

biologický fenomén, kdy organismus produkuje chemické látky ovlivňující růst, životaschopnost a reprodukci jiného organismu.

Allelochemikálie jsou sekundární metabolity, které nejsou potřebné pro vlastní organismus (růst, vývoj a reprodukci).

Mohou mít **kladný** (positive allelopathy) nebo **negativní** (negative allelopathy) vliv na cílový organismus.

juglone



Junglas nigra



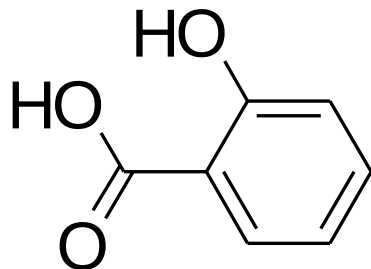
Eucalyptus

Juglon

- vodorozpustný hnědý pigment
- ve stromu vázán ve formě netoxického glykosidu
- přítomen nejenom v kořenech, ale i listech a slupkách plodů
- detekovatelný ještě v hloubce 8 m a vzdálenosti až 27 m od kmene
- **toxická vůči ostatním rostlinám**
- **zabraňuje klíčení semen jiných rostlin (100 % inhibice u semen salátu při dávce 0,002 %)**
- některé rostliny jsou schopny allelopathické toxiny tolerovat

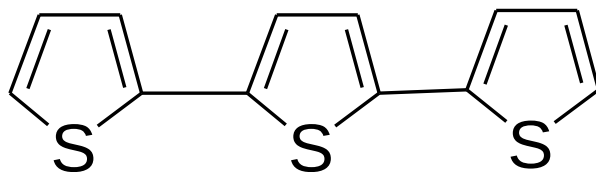


Další zajímavé látky produkované rostlinami a inhibující klíčení semen či růst jiných rostlin



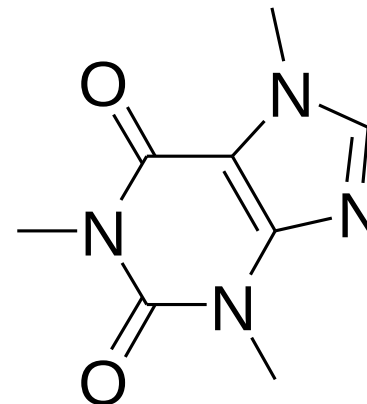
kyselina salicylová

dub (*Quercus*)



α -terthienyl

aksamitník (*Tagetes*)



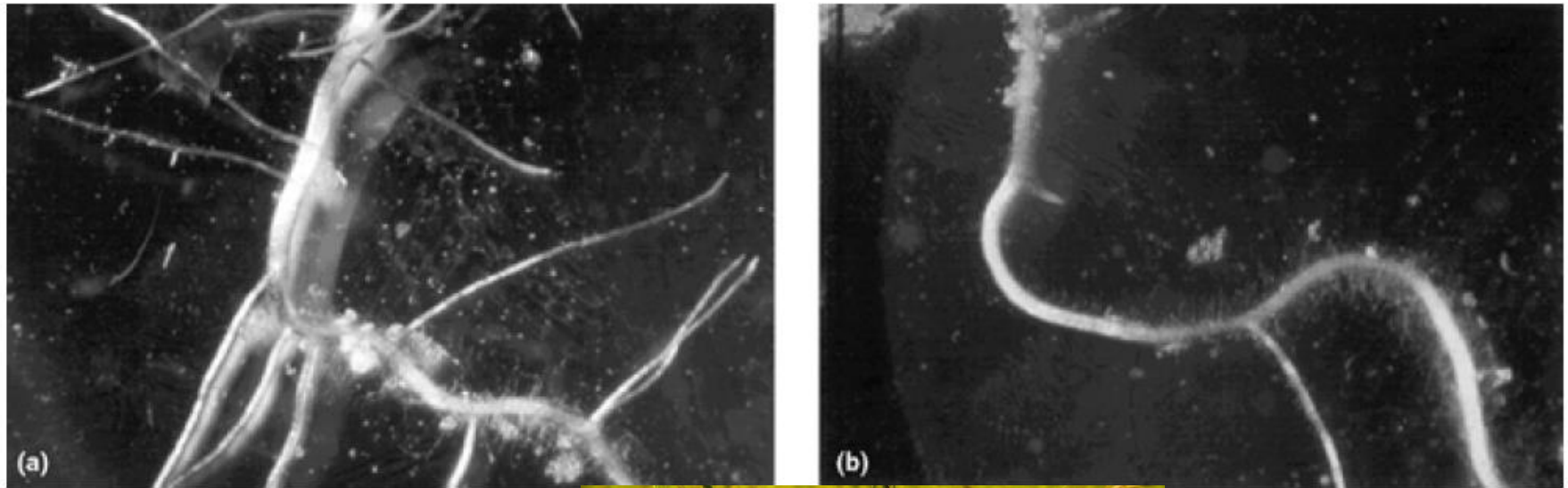
kofein

- má autotoxický efekt
- pravděpodobně autoregulace hustoty porostu
- přírodní střídání vegetace na jedné lokalitě
- udržení biodiversity

Allelopatické látky jsou přírodním modelem pro syntetické herbicidy.

Rýže versus ježatka (*Echinochloa crusgalli*)

Fig. 1: Photomicrographs of *Echinochloa crus-galli* roots grown together with (a) non-allelopathic rice 'Aus 196' or (b) allelopathic rice 'IR 64'. Secondary root growth is inhibited by the allelopathic rice cultivar (Source: Olofsdotter et al., 2002)



**Rice allelopathy and the possibility
for weed management**

T.D. Khanh

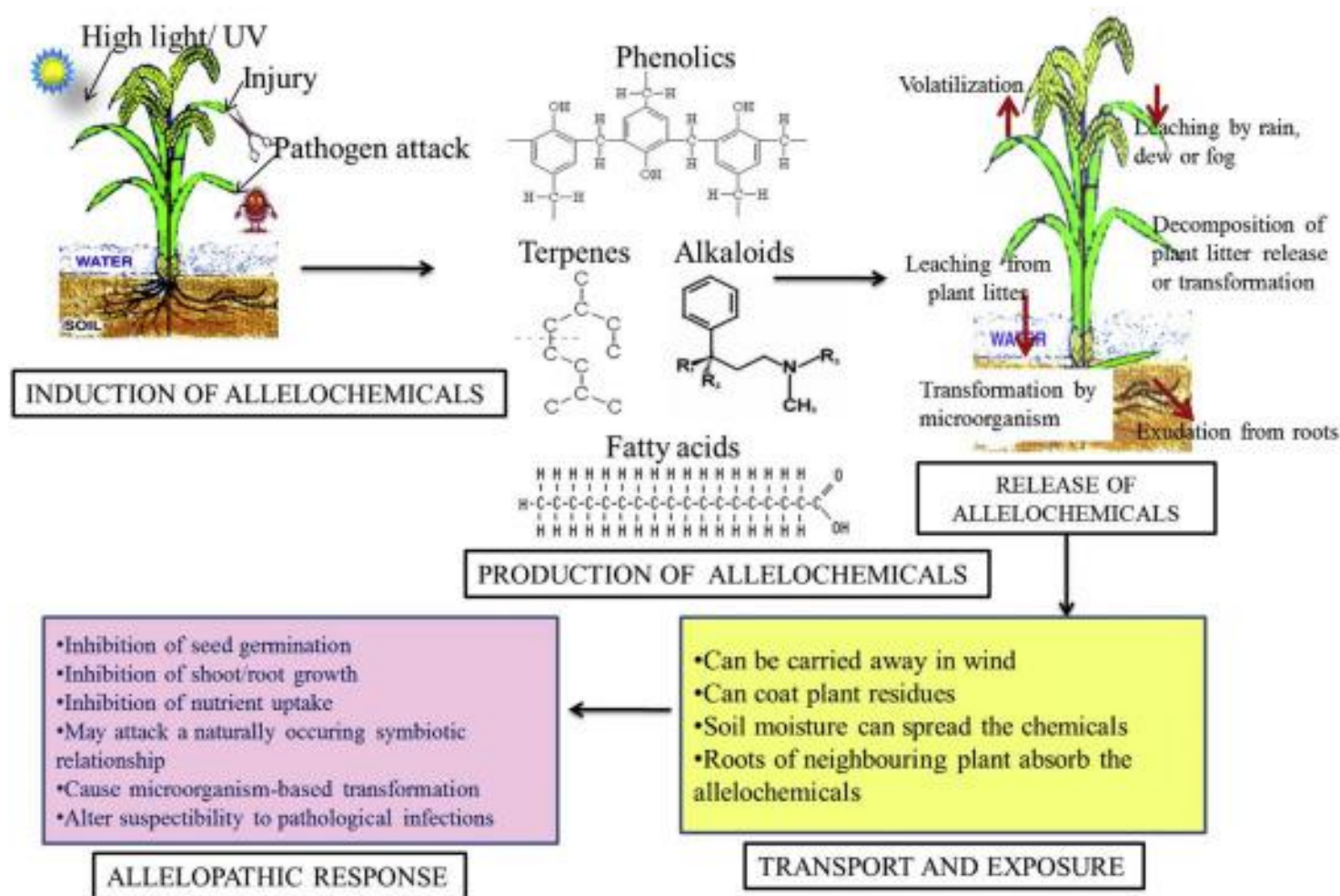
T.D. Xuan

I.M. Chung

<https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2007.00183.x>



Palacký University
Olomouc



Allelopathy: Potential Role to Achieve New Milestones in Rice Cultivation ☆

A.S.Ahluwalia

<https://doi.org/10.1016/j.rsci.2016.06.001>

Smíšené kultury (inter-cropping)



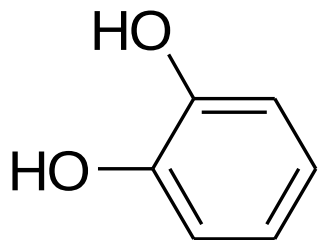
Chemické látky produkované po napadení patogenem

Obranné mechanismy indukované po napadení/infekci

- **zesílení buněčné stěny:** kalosa, lignin, suberin, proteins
- **antimikrobiální sloučeniny:** reactive oxygen species
hydrogen peroxide, or peroxynitrite,
phytoalexiny – genistein, camalexin
- **antimikrobiální proteiny :** defensiny, thioniny
- **antimikrobiální enzymy:** chitinasy, beta-glukanasy,
peroxidasy
- **hypersensitivní reakce** – rychlá buněčná odezva pomocí
R-genů
- **pomoc endofytů:** exudace sloučenin přitahující bakterie
účinných proti patogenním organismům

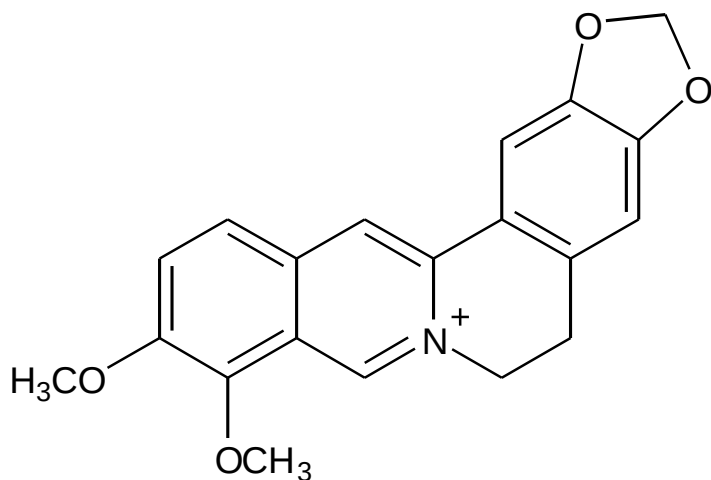
Fytoalexiny a fytotoxiny

- interakce mezi rostlinami a mikroorganismy
- planě rostoucí druhy rostlin jsou obvykle přirozeně rezistentní vůči chorobám způsobeným mikroorganismy



katechol, prohibitin z odolných odrůd cibule

- strukturní základ anthokyanů (barviva), přítomných v různých rostlinách a majících fungicidní účinky
- isoflavonoidy a flavonoidy jsou účinnými fungicidy; vyskytují se např. v rostlinách rodu *Lupinus*

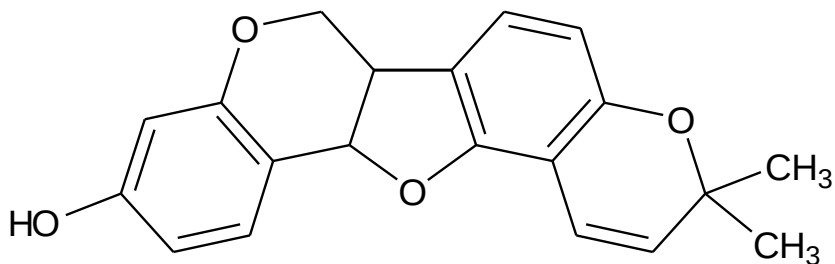


berberin

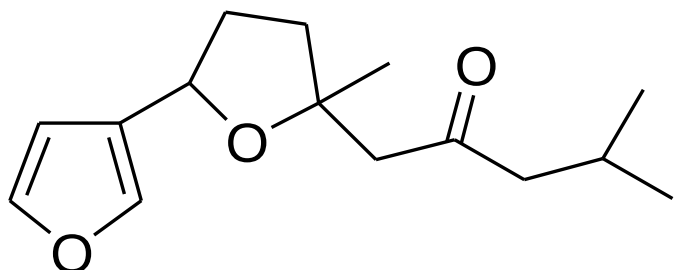
kořeny mahonie, dřšťálu



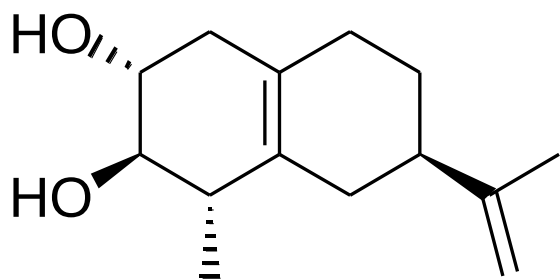
Příklady fytoalexinů



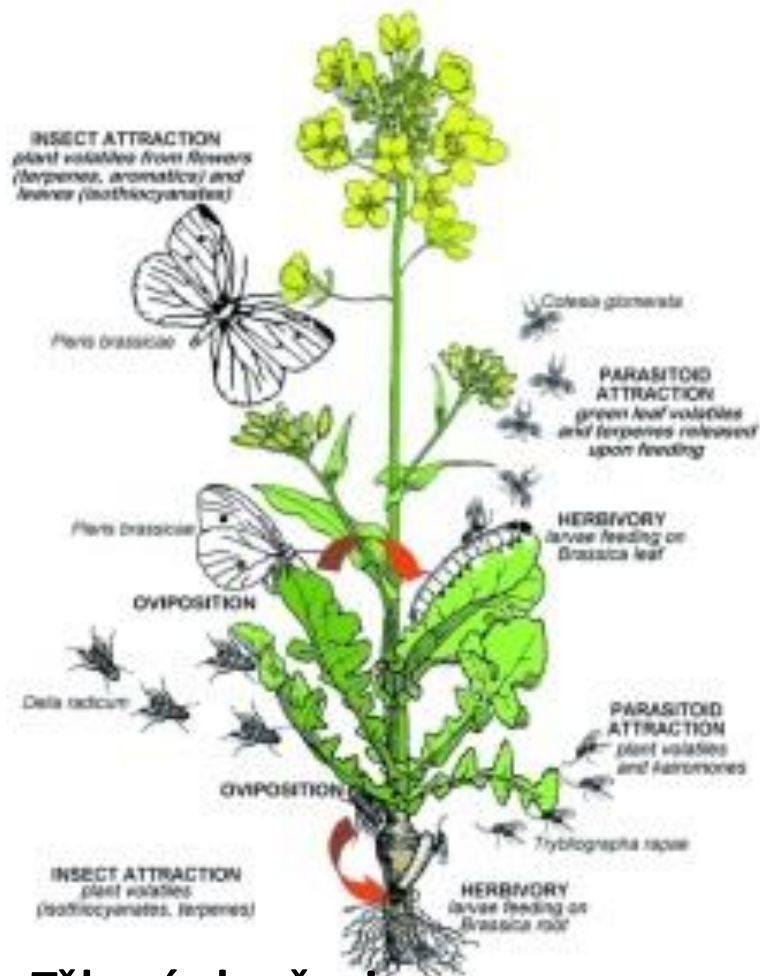
phaseollin, jeden z prvních identifikovaných fytoalexinů; fazol obecný (*Phaseollus vulgaris*)



ipomeamaron (batáta, *Ipomea*)



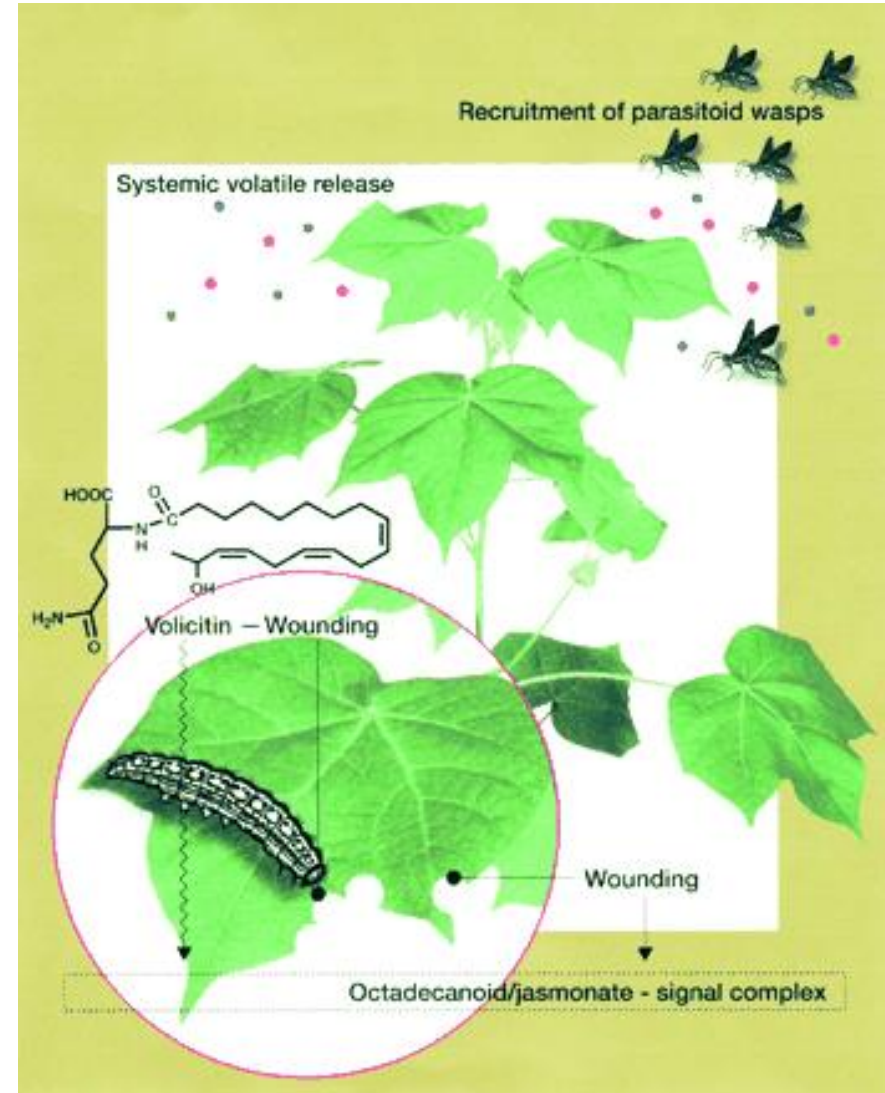
rishitin
(brambory, *Solanum tuberosum*)



Těkavé sloučeniny

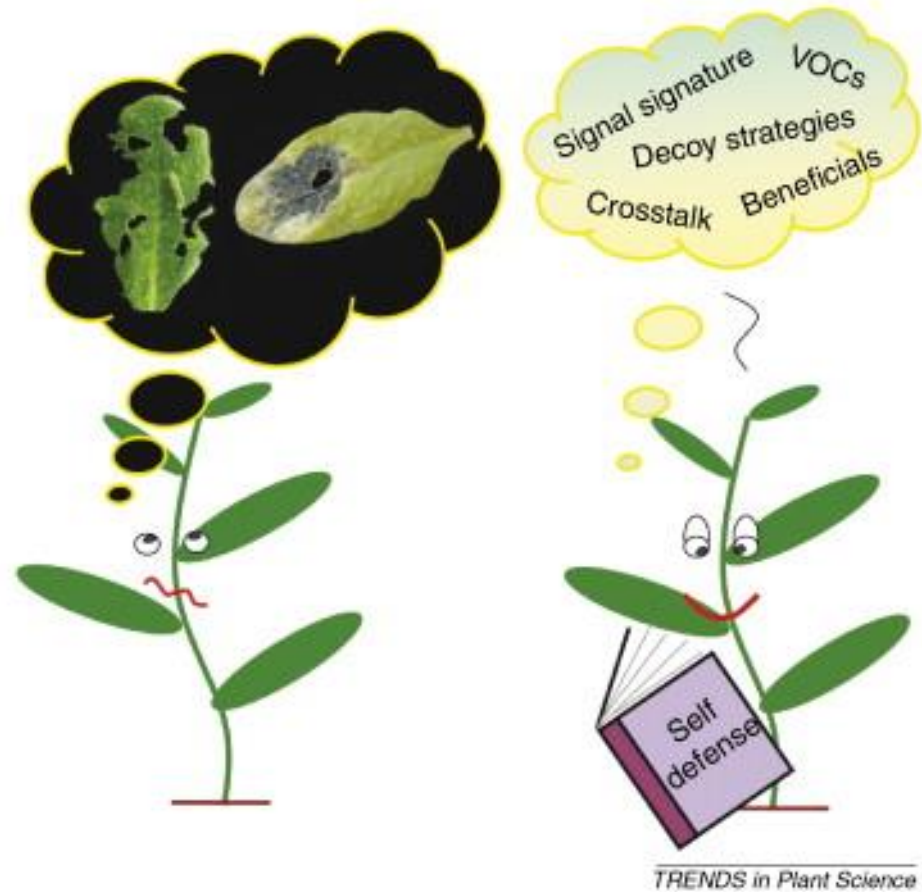
sloužící ke komunikaci mezi organismy.

Allelosloučeniny - allomony, mající obrannou roli v mezidruhovém komunikaci
kairomony, využívané druhy vyšších trofických vztahů k nalezení potravních zdrojů



I obrana něco stojí aneb cena za ochranu a výhody

Obranné struktury a chemické látky jsou nákladné a vyžadující energii, která by se jinak mohla investovat do maximalizace růstu a reprodukce.



Genetika virulence patogena a rezistence hostitele

Koncepce gen proti genu (gene-for-gene)

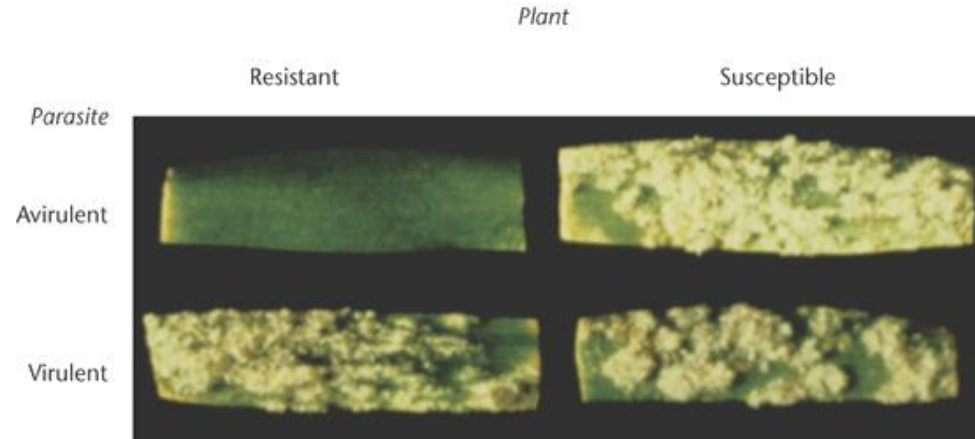
H.H. Flor, 1947

Linum usitatissimum– *Melampsora lini*

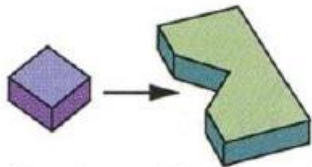
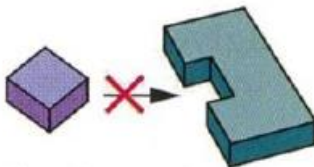
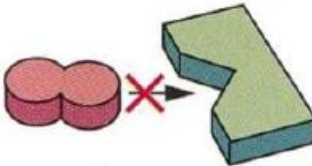
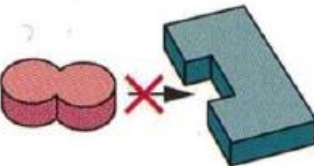
Vznikl koncept „**gen proti genu**“

ke každému genu rezistence existuje korespondující gen avirulence v genomu patogena.

Pokud se setká rostlina nesoucí gen rezistence s patogenem nesoucím příslušný gen avirulence, dojde k inkompatibilní interakci, patogen je rozpoznán a spuštěním obranných mechanismů je mu zabráněno v kolonizaci rostliny.



Její aplikace umožňuje stanovit pravděpodobný počet genů rezistence a virulence a jejich kombinací ve studovaných systémech hostitel- patogen a usnadňuje genetickou analýzu faktorů rezistence. Možnost využití v transgenosi.

Pathogen genotype	Host plant genotype	
	<i>R1</i>	<i>r1</i>
<i>Avr1</i>	 Avr1 R1 protein No disease (Plant and pathogen are incompatible.)	 Avr1 r1 protein Disease (Plant and pathogen are compatible.)
<i>avr1</i>	 avr1 R1 protein Disease (Plant and pathogen are compatible.)	 avr1 r1 protein Disease (Plant and pathogen are compatible.)

produktem *genu rezistence* je specifický proteinový **RECEPTOR** na rostlinném povrchu

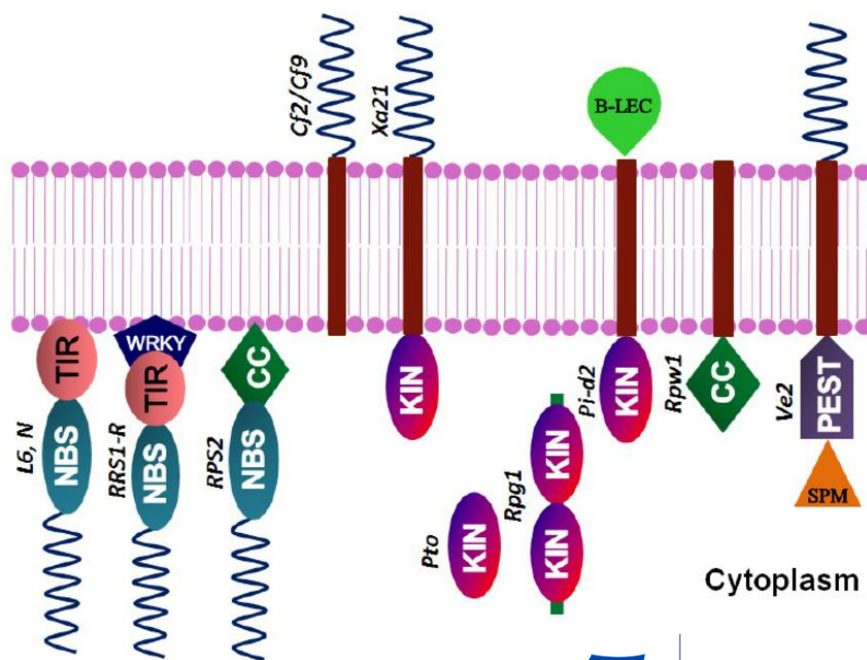
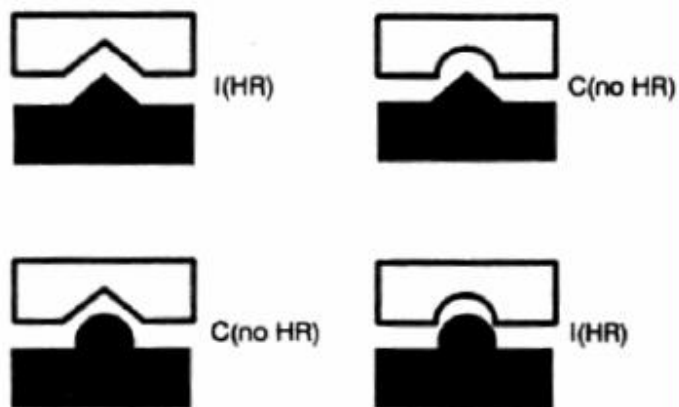
a produktem *genu avirulence* specifické glykoproteinové molekuly – **ELICITOR** na povrchu patogena

Mezi rostlinou a jejím patogenem se odehrává evoluční souboj.

Efektory potlačující vrozenou imunitu mohou být rozpoznány **NB-LRR receptory** rostliny, které spustí další obranné mechanismy.

Patogen se pak vyhne rozpoznání modifikací efektoru nebo jeho náhradou za jiný, a tak se interakce mezi rostlinou a patogenem neustále přesouvá od náchylnosti k rezistenci a zpět.

„cik-cak model“ (JONES A DANGL 2006)



Fáze obranné reakce rostliny

Bezprostřední reakce v místě průniku patogena

Tvorba volných radikálů (kyslíku)

Otevírání iontových kanálů

Fosforylace a defosforylace proteinů

Přeuspořádání cytoskeletu

Hypersenzitivní reakce

Aktivace exprese genů

Lokální reakce a aktivace genů

Změny v biosyntéze sekundárních metabolitů

Zastavení buněčného cyklu

Syntéza PR proteinů

Akumulace kyseliny salicylové 20x – 50x

Tvorba etylénu a kyseliny jasmonové

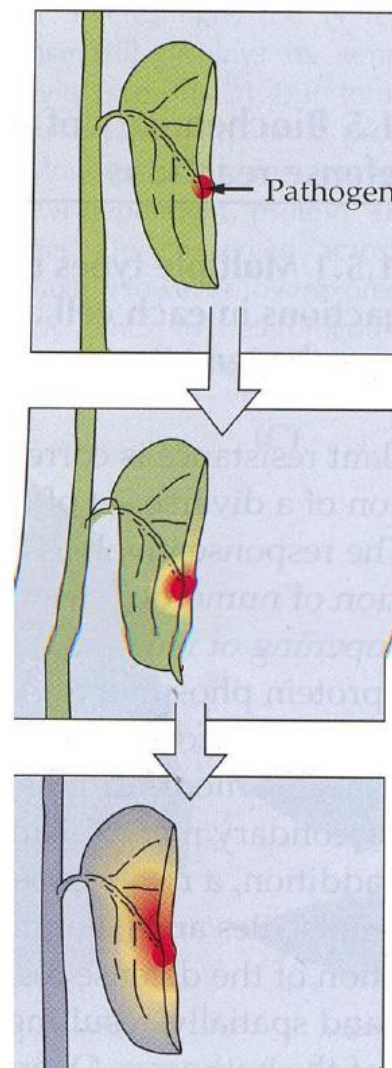
Tvorba ligninu v buněčných stěnách

Systémová reakce a aktivace genů

Glukanázy, Chitinázy

Peroxidázy

Syntéza dalších PR proteinů

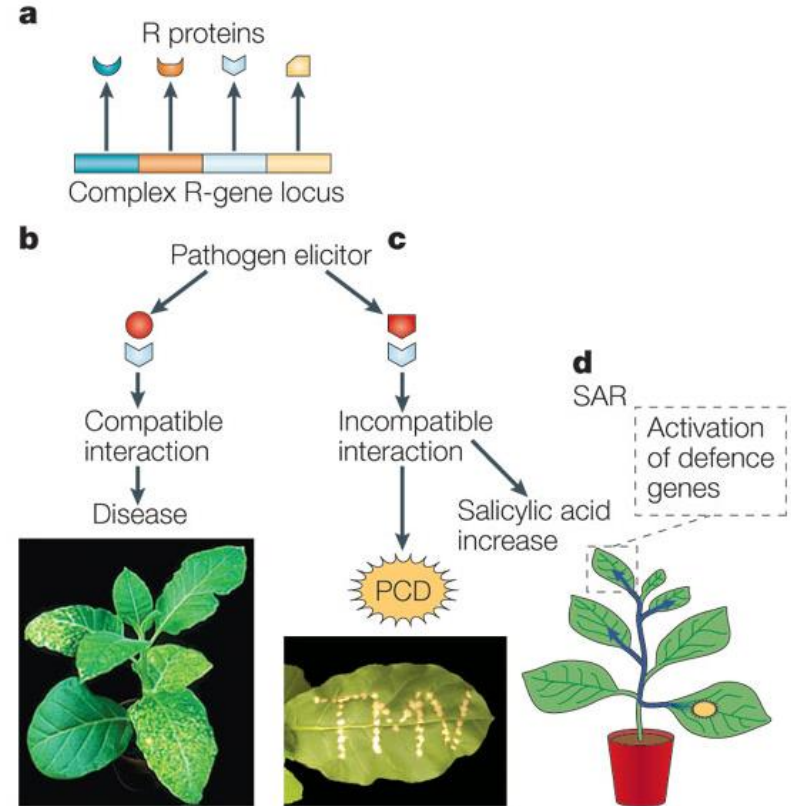


Hypersensitivní reakce (HR)

V tomto rostlinou řízeném procesu odumírají buňky v bezprostřední blízkosti patogena a vytvářejí se tak mikroskopické až okem viditelné ostrůvky nekrotického pletiva, ve kterých zůstává patogen uvězněn.

Z tohoto důvodu je hypersenzitivní reakce účinná především proti biotrofním patogenům.

Nekrotrofové mohou naopak celý mechanismus využívat ve svůj prospěch.



Klíčové regulační prvky v tomto procesu jsou především reaktivní formy kyslíku (ROS), oxid dusnatý, kyselina salicylová a změna koncentrace Ca^{2+} v cytosolu.

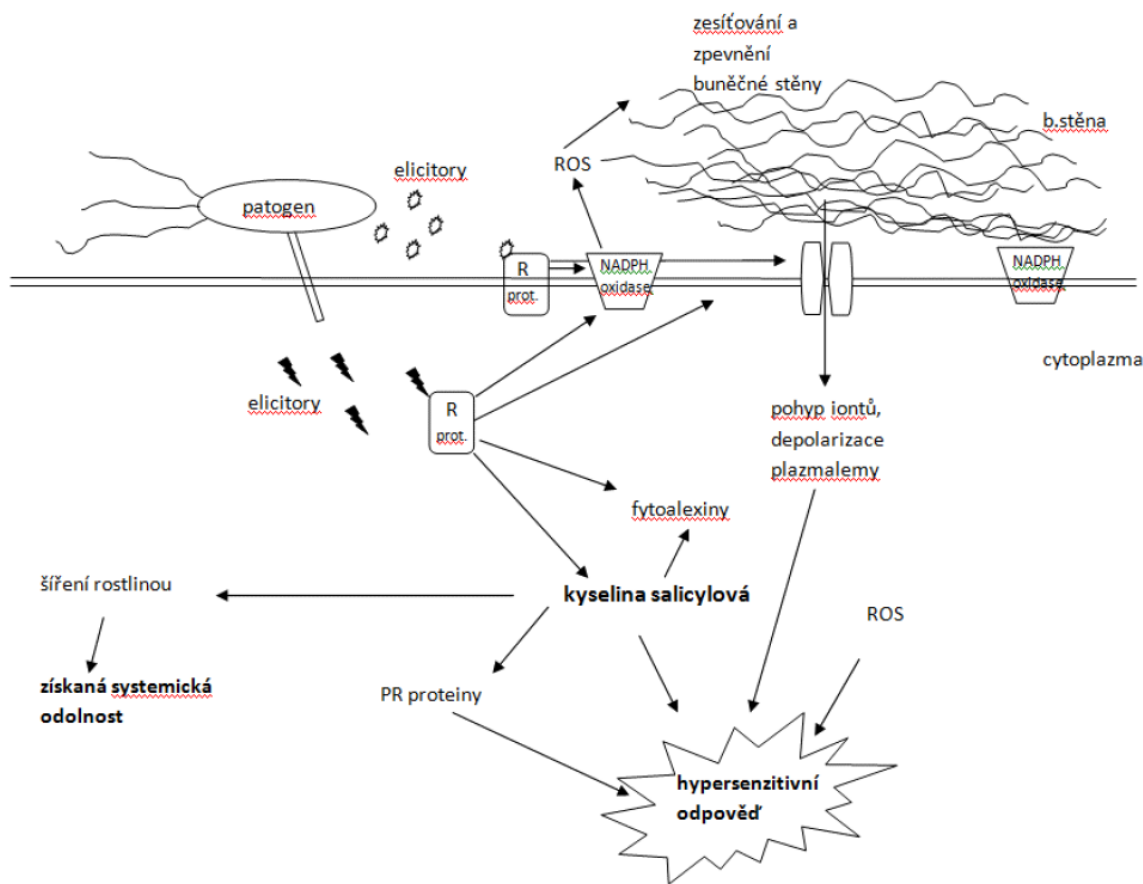
Systémově získaná rezistence

Kyselina salicylová (SA) je v rostlinách indukována zejména při napadení biotrofními patogeny a exogenní aplikace SA zvyšuje rezistenci rostlin proti této skupině patogenů. SA je v rostlinách syntetizována z isochorismátu, jehož syntéza je katalyzována enzymem isochorismát syntázou.

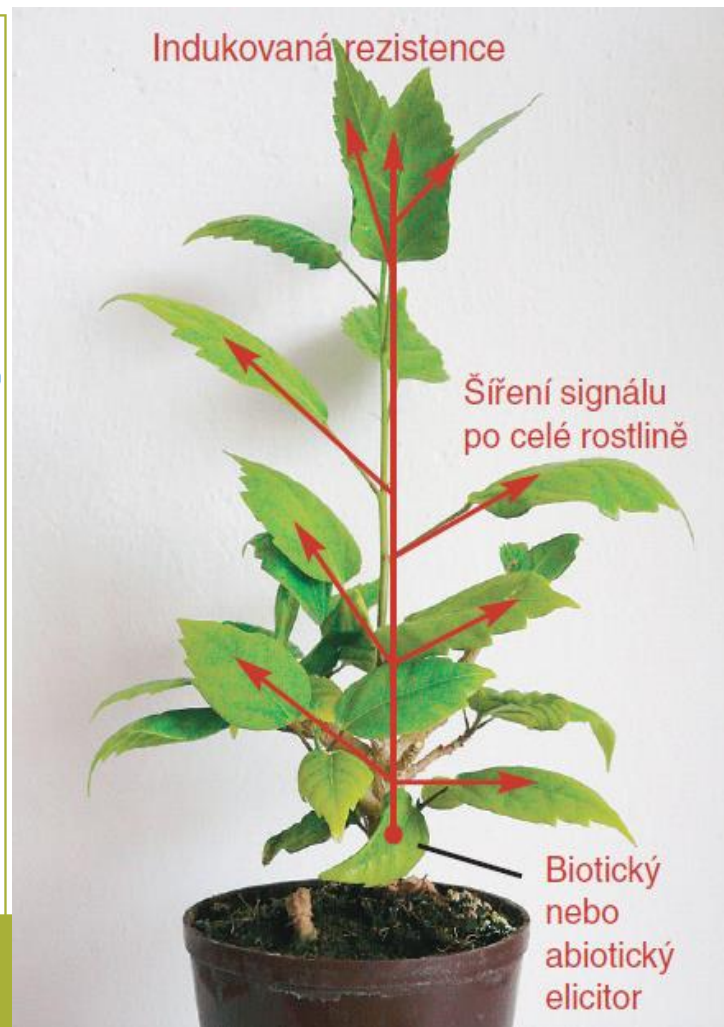
S kyselinou salicylovou je přímo spojen i **fenomén systémově získané rezistence**. Právě při jejím studiu byla SA objevena. Rostliny po inokulaci zpravidla avirulentním patogenem, mohou i v částech vzdálených od místa inokulace vykazovat značnou míru rezistence k virulentním patogenům. Taková rezistence pak může v rostlinách přetrvávat po dlouhou dobu.

Kyselina jasmonová (JA) je indukována především nekrotrofními patogeny a herbivory. Prekurzorem JA je kyselina α -linolenová, která vzniká hydrolýzou membránových fosfolipidů katalyzovanou fosfolipázou A.

Plyn etylén je považován za hormon, který při obranných reakcích rostliny kooperuje s JA a společně antagonizují signální dráhu SA.



Obr. 1. Souhrnné schéma průběhu odpovědi buňky na přítomnost patogena



Koevoluce hostitele a patogena – narušena člověkem během domestikace a především pak globalizace

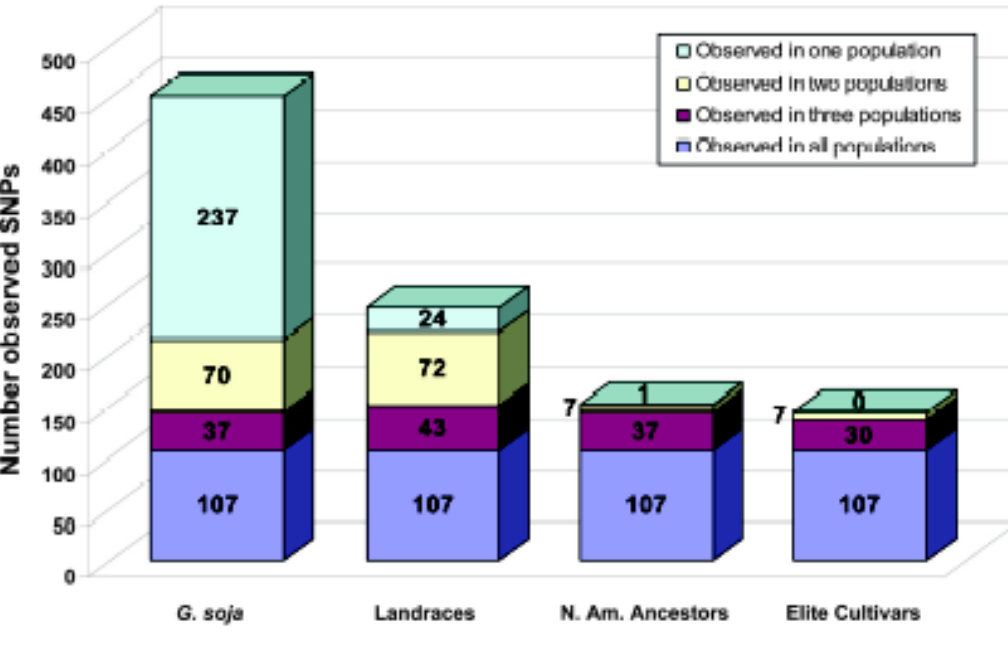


Mšička révokaz

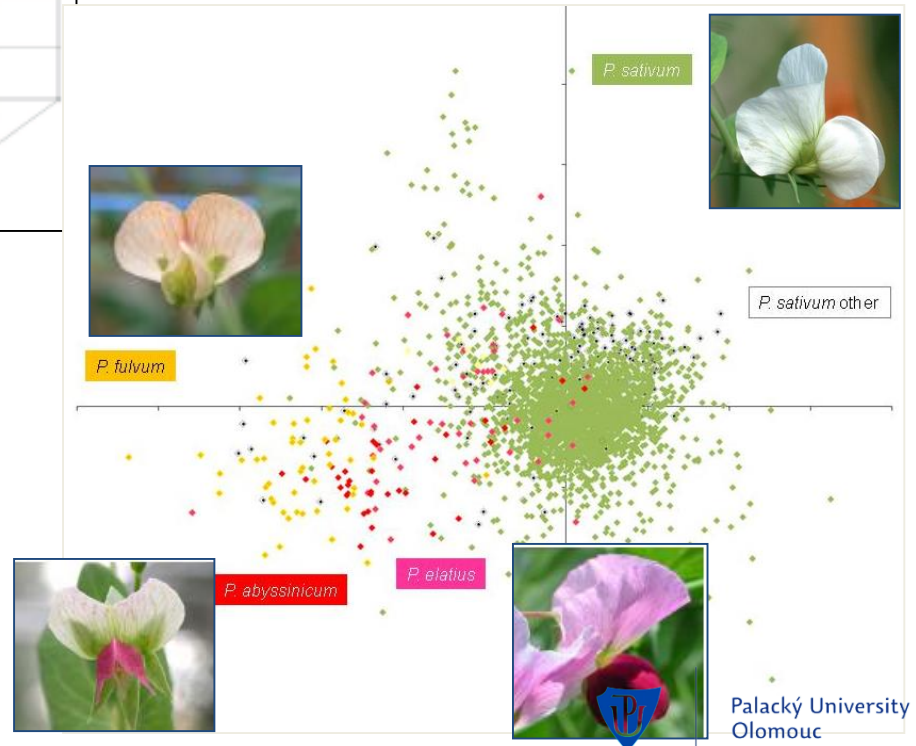
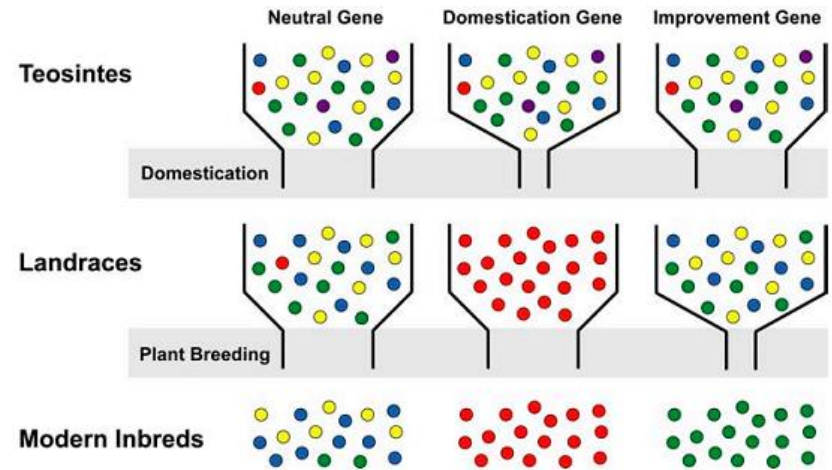
Daktulosphaira vitifoliae, *Phylloxera vitifoliae*

Zavlečena do Evropy díky botanickým sběrům severoamerických druhů révy (1850) – devastace evropských neodolných druhů révy (*V. vinifera*)
Nutnost roubování na podnož amerických druhů *Vitis aestivalis*, *V. rupestris*, a *V. riparia*

Domestikace a výběr



Pěstované formy/druhy
70% diverzity
planých druhů



Význam genetické diversity



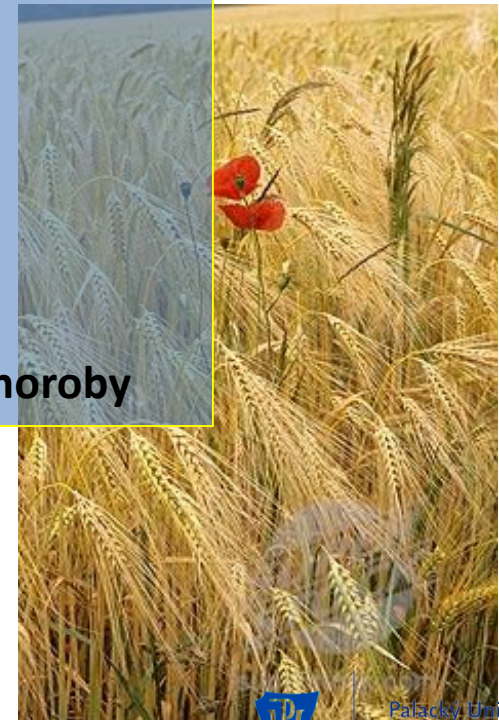
Mayové - monokultura kukuřice - choroby/škůdci/eroze



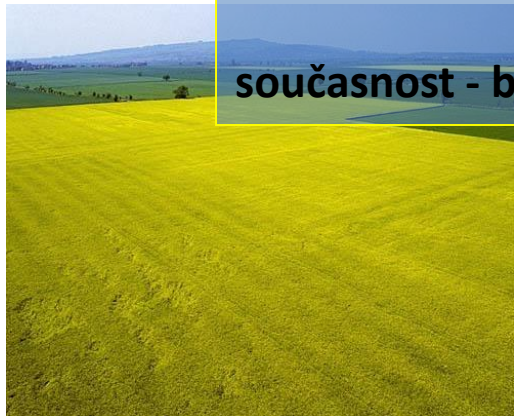
Irsko (1846) - *Phytophthora infestans* u brambor

USA (1970) - kukuřice x *Helminthosporium maydis*
T typ CMS ve vazbě na gen náchylnosti

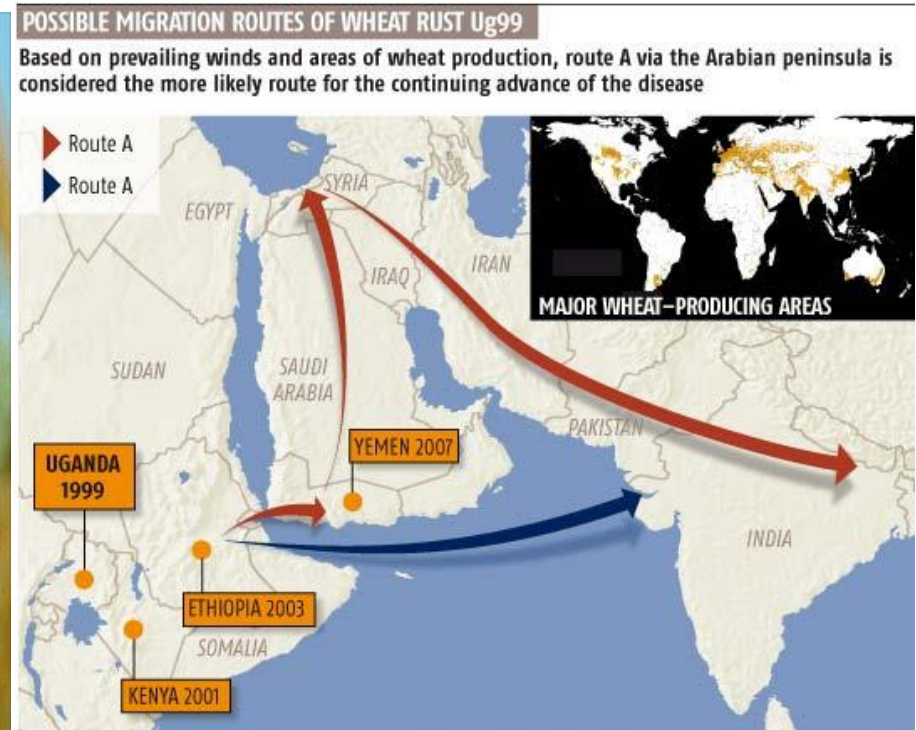
USA - *Xanthomonas campestris* u citrusů



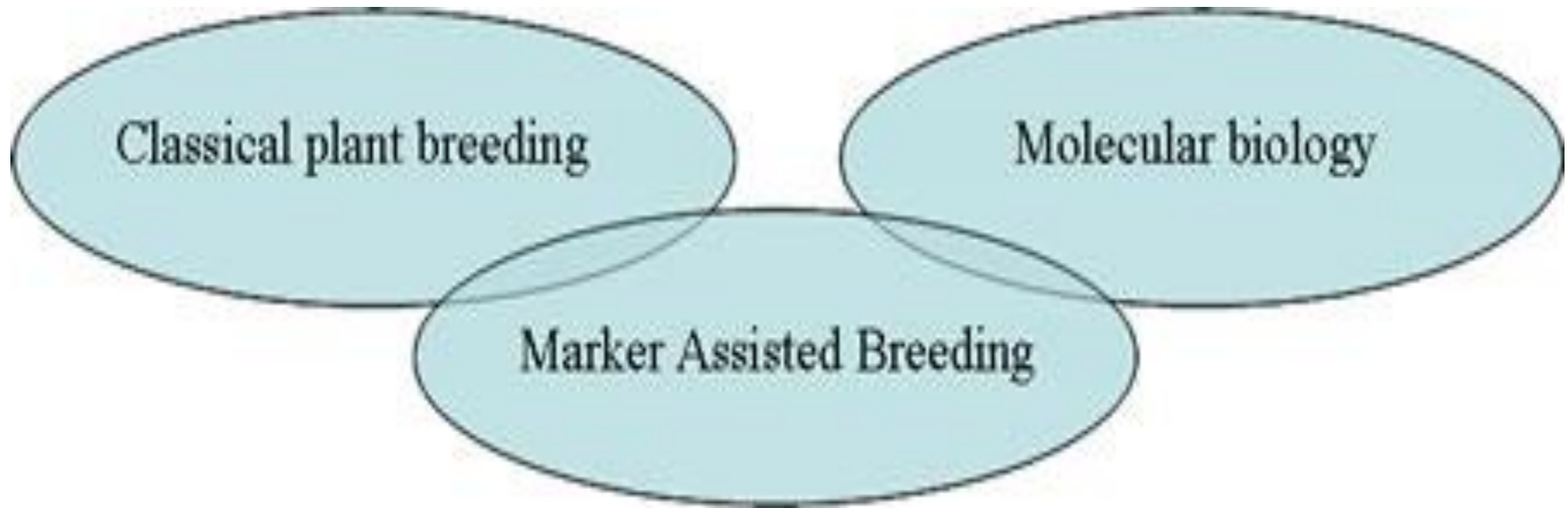
současnost - banánovník cv. Cavendish – houbové choroby



Důsledek zelené revoluce pšenice x rez travní (*Puccinia graminis*)



Využití rezistence ve šlechtění rostlin



Marker Assisted Breeding/Selection (MAS)

Laboratorní, skleníkové, polní testování fenotypu

inokulace



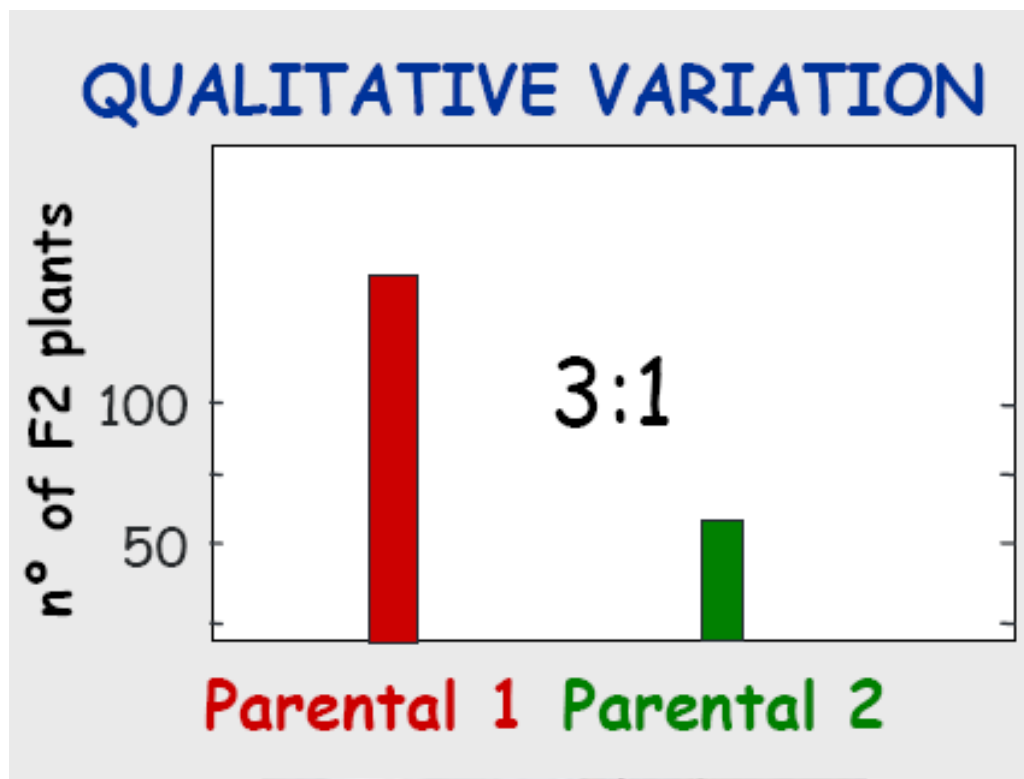
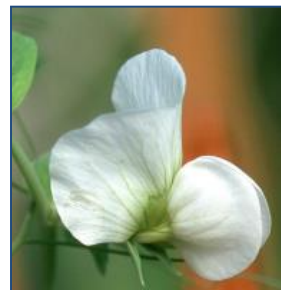
pěstování



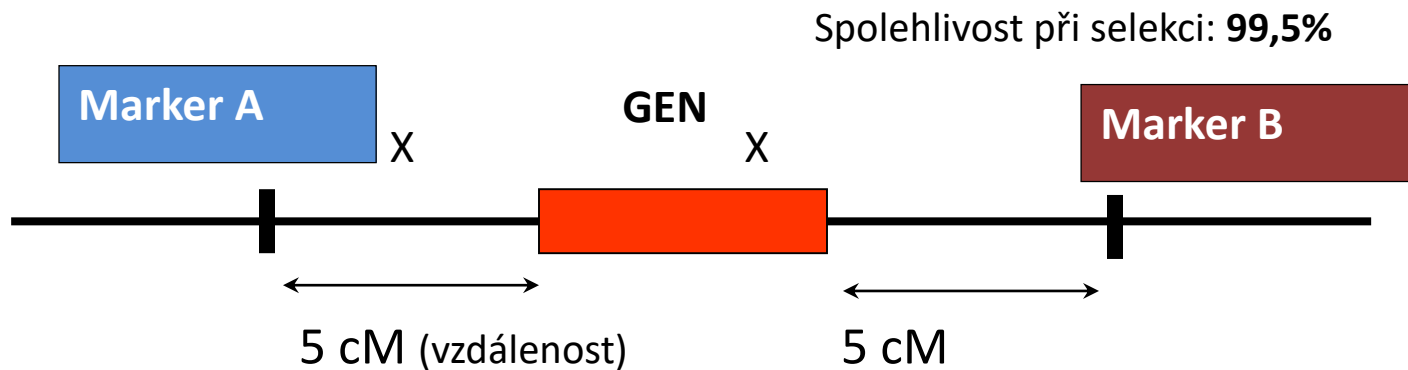
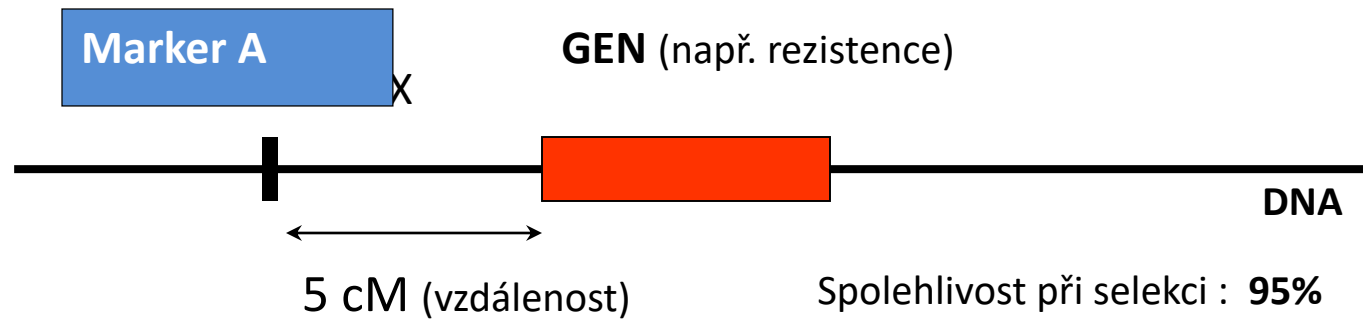
hodnocení



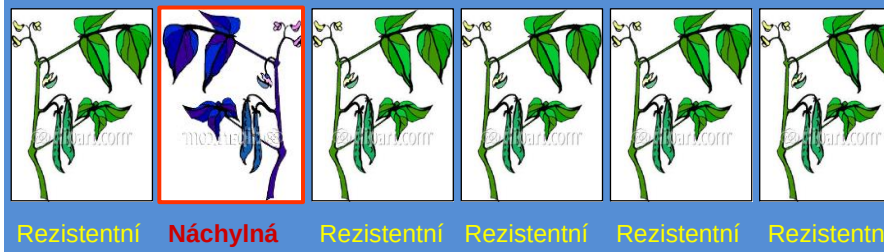
Kvalitativní znaky



Vazba markeru se znakem - nepřímý marker



Výsledek selekce s použitím nepřímého markeru



Viruses - the crop devastating agents

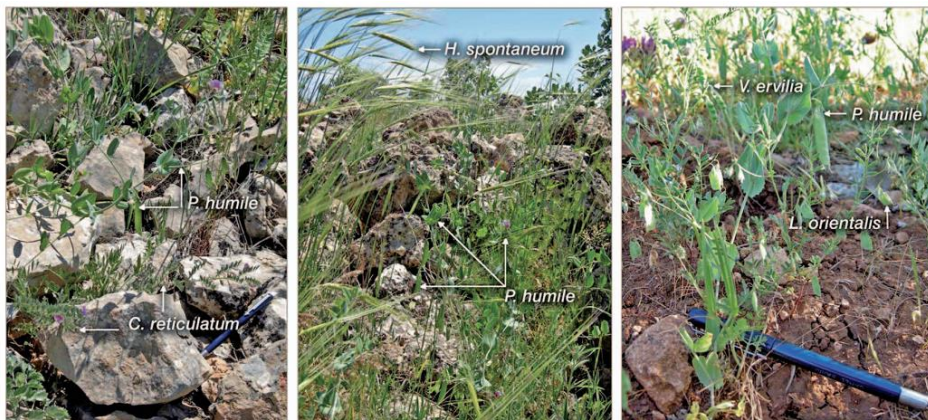
- 73 recognized plant virus genera
- Crop losses around 30- 50% of yield (FAO)
- *Potyvirus* (family *Potyviridae*) contain over 15% of species

The Prehistory of Potyviruses: Their Initial Radiation Was during the Dawn of Agriculture

Adrian J. Gibbs^{1*}, Kazusato Ohshima², Matthew J. Phillips³, Mark J. Gibbs⁴

Table 5. Estimates of the date of the major radiation of potyviruses.

Virus ¹	Rate of evolution ($\times 10^{-4}$ ns/s/yr)	Length of branch from radiation (ns/s)	Estimate ² of radiation date (YBP)	Calibration node date ³ (YBP)	Accuracy ⁴ : radiation years per node decade.
PPV	1.40	0.6354	4532	100	453
Australian potyviruses	1.173	0.7452	6353	75	847
American CABMV's	1.397	0.778	5565	500	111
American PRSV's	1.25	0.747	5976	300	198
Mean of viruses #2-4	1.273	0.7567	5965	-	-



Potyviruses

- infect species of most angiosperm taxa in all temperate and tropical climes
- they are transmitted by aphids, especially species of *Aphidinae*
- some are also transmitted in seeds to the progeny of infected plants.
- agriculture may have triggered the prehistoric emergence of potyviruses and fostered their speciation

Crop (pea) protection

Agricultural:

- control of vectors - aphids - pesticides
- certified seeds
- crop rotation

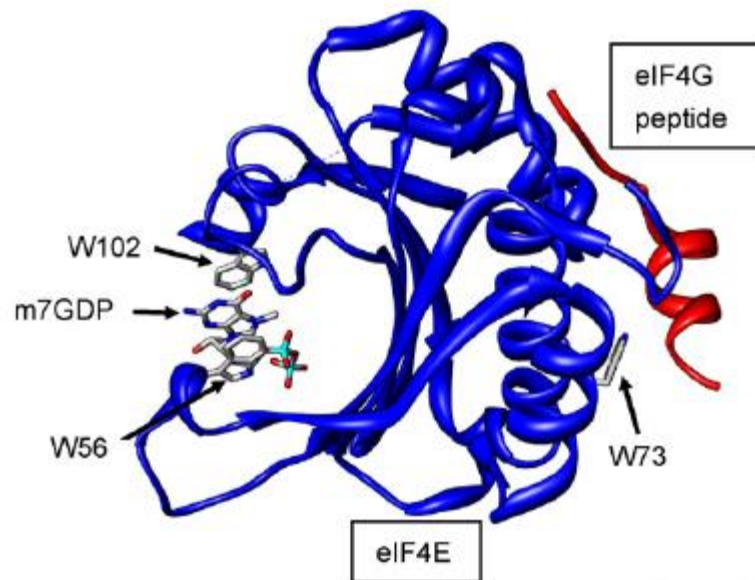
Genetical - breeding:

- source of plant (host) resistance gene/-s

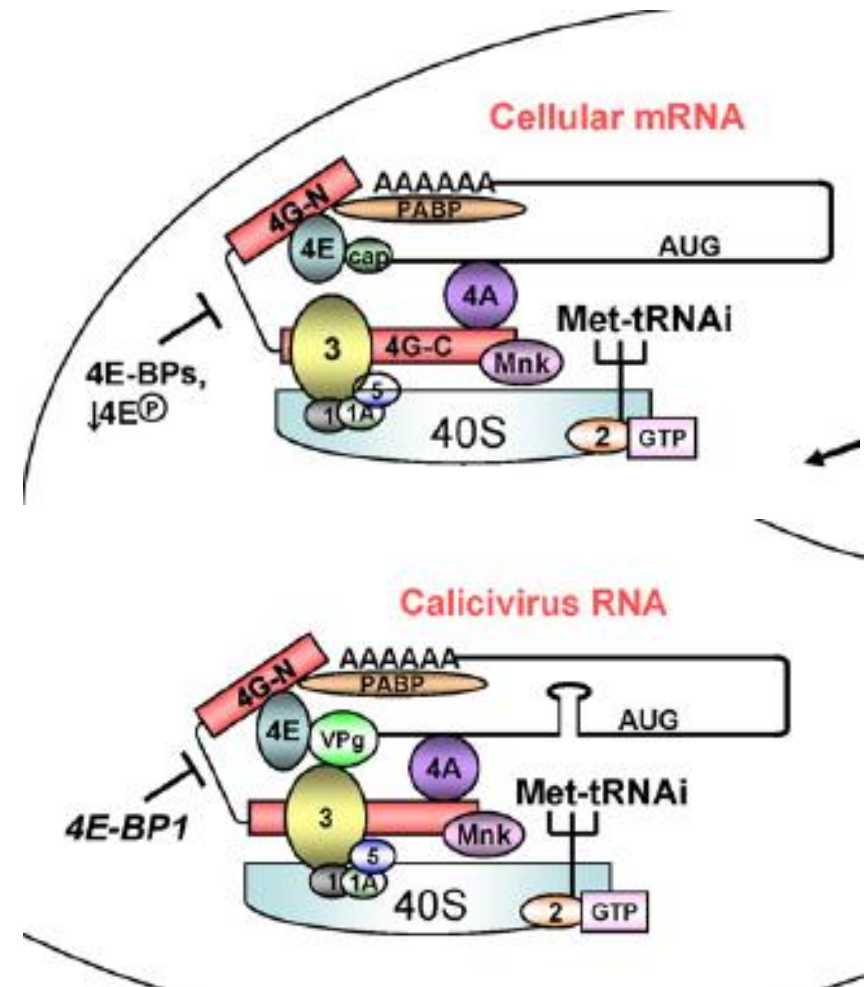
Biotechnological - genetic engineering:

- transgenic (GMO) crop

Eukaryotic translation initiation factor 4E



- **cap-dependent protein synthesis**
- **nuclear export**
- **translation of uncapped viral mRNAs**



Pea seed borne mosaic virus (PSbMV)

Hostitelské rostliny (47 druhů):

- hrách (*Pisum sativum*)
- čočka (*Lens culinaris*)
- cizrna (*Cicer arietinum*)
- bob (*Vicia faba*)

Symptomy:

- rolování listů
- žloutnutí žilek
- zkracování internodií
- zakrslost
- deformace semen



Přenos:

- mšicemi
- semeny
- mechanicky

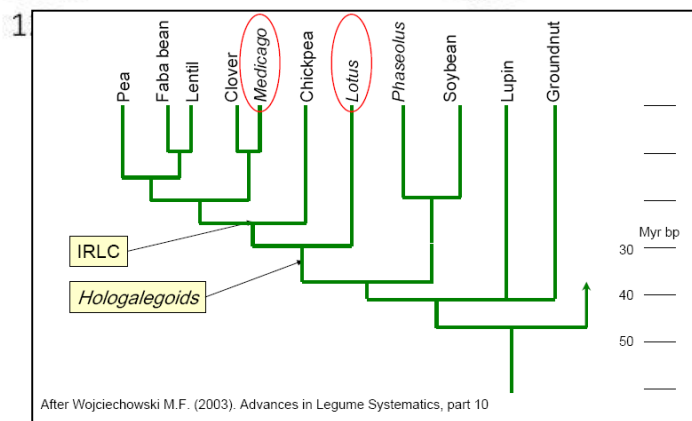
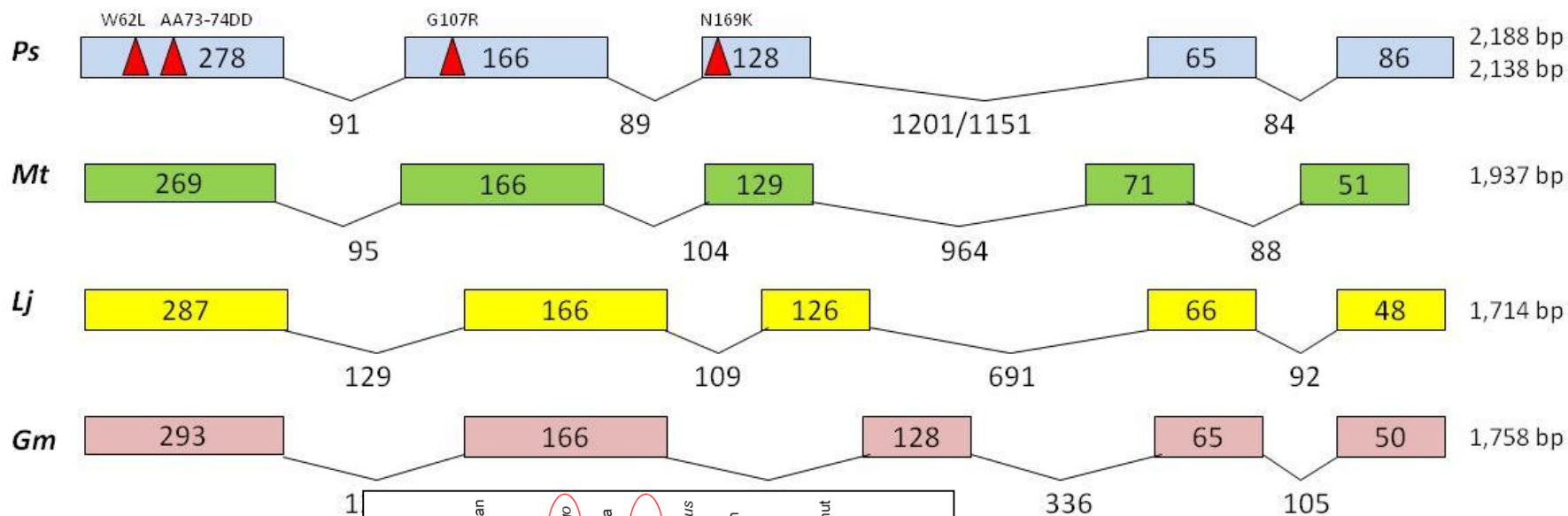


Classical testing of phenotype during the breeding process



Time, space
and
resources
consuming
process

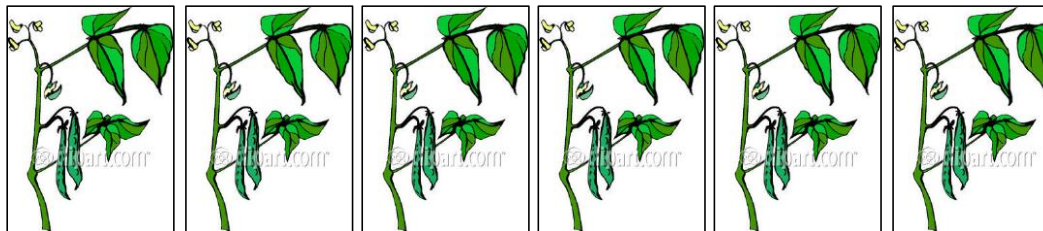
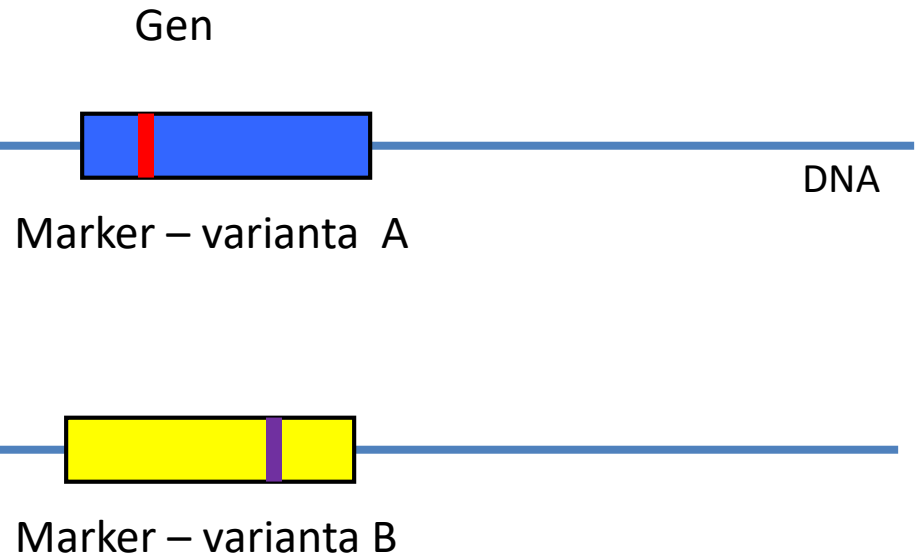




Smýkal et al. 2010 Mol Breeding

Genově specifický (ideální) marker

Detected <i>eIF4E</i> allele	W62L	AA73-74DD	S78	G107R	N169K	Intron 3 size (bp)
<i>SBM-1</i>	W	AA	S	G	N	1,201
<i>SBM-1</i>	W	AA	S	G	N	1,201
<i>SBM-1</i>	W	AA	S	G	N	1,201
<i>SBM-1</i>	W	AA	S	G	N	1,201
<i>sbm-1</i>	W	PD	—	G	N	1,201
<i>sbm-1</i>	W	PD	—	G	N	1,201
<i>sbm-1</i>	W	PD	—	G	N	1,257
<i>sbm-1</i>	W	PD	—	G	N	1,257
<i>sbm-1</i>	L	DD	S	R	K	1,151
<i>sbm-1</i>	L	DD	S	R	K	1,151
<i>sbm-1</i>	L	DD	S	R	K	1,151
<i>sbm-1</i>	L	DD	S	R	K	1,151



R

R

R

R

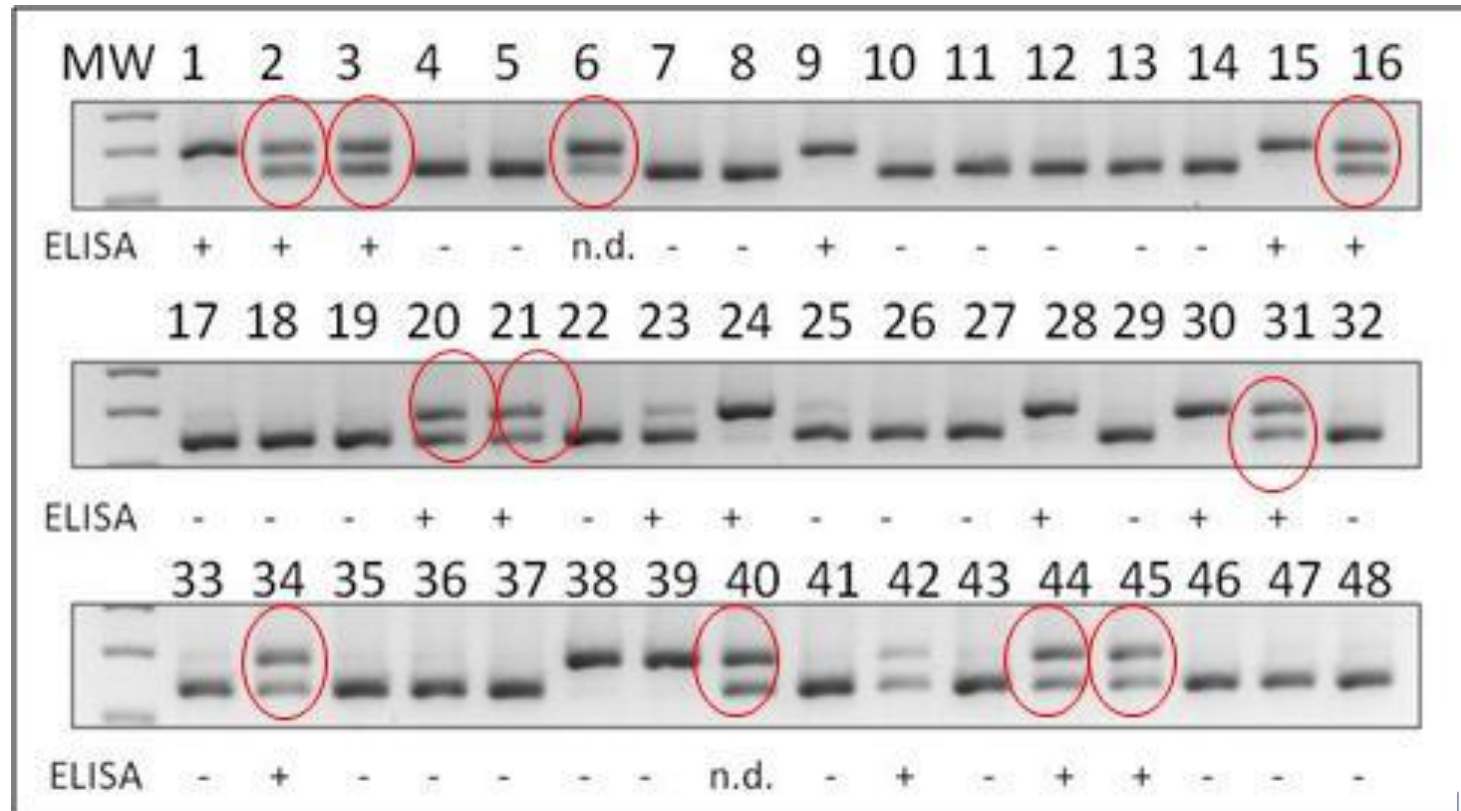
R

R

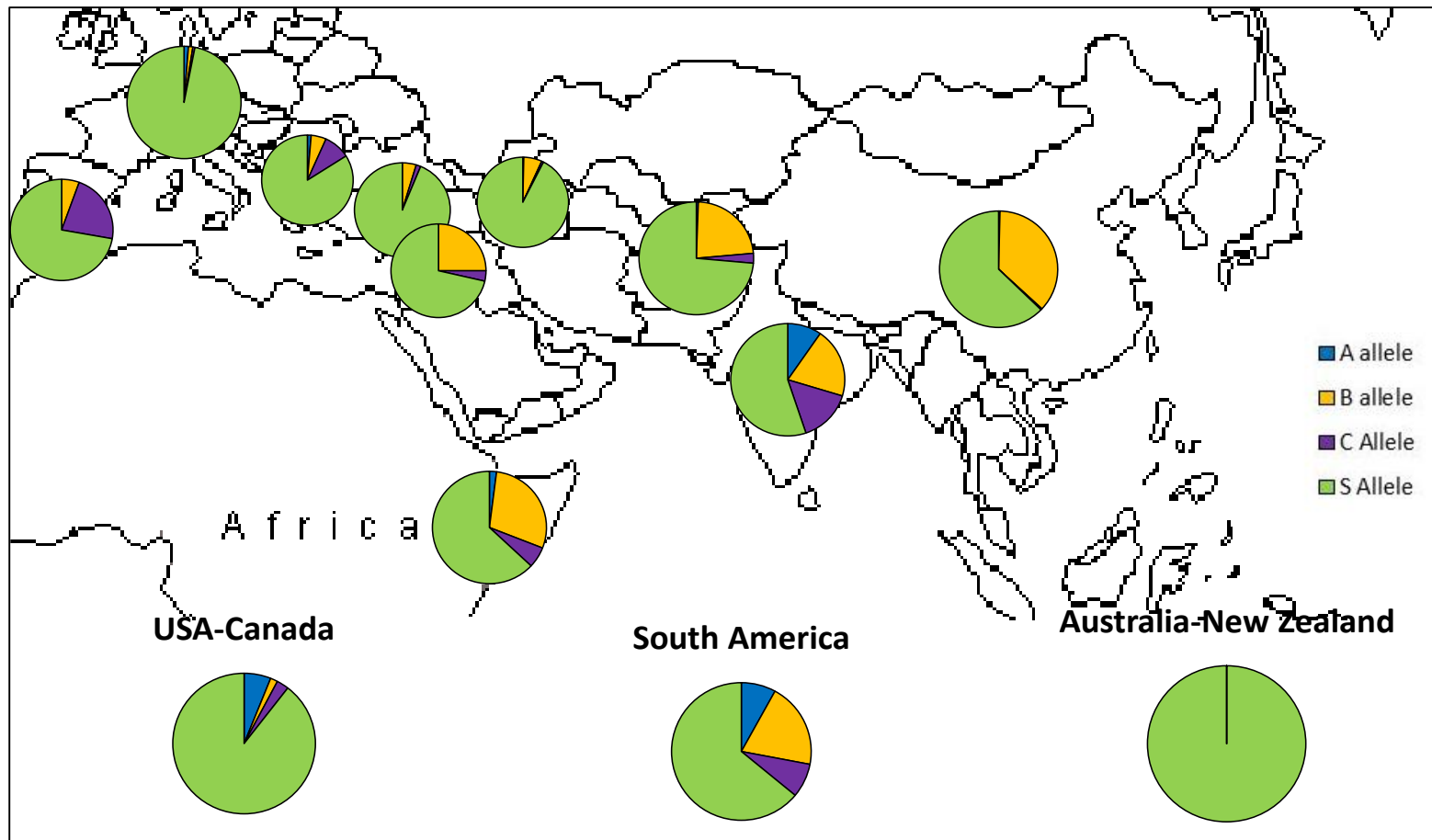
Selekční spolehlivost
100 %

**75% spolehlivost fenotypového hodnocení
versus
100% DNA testování**

příklad rezistence (*eIF4E*) hrachu k PSbMV viru

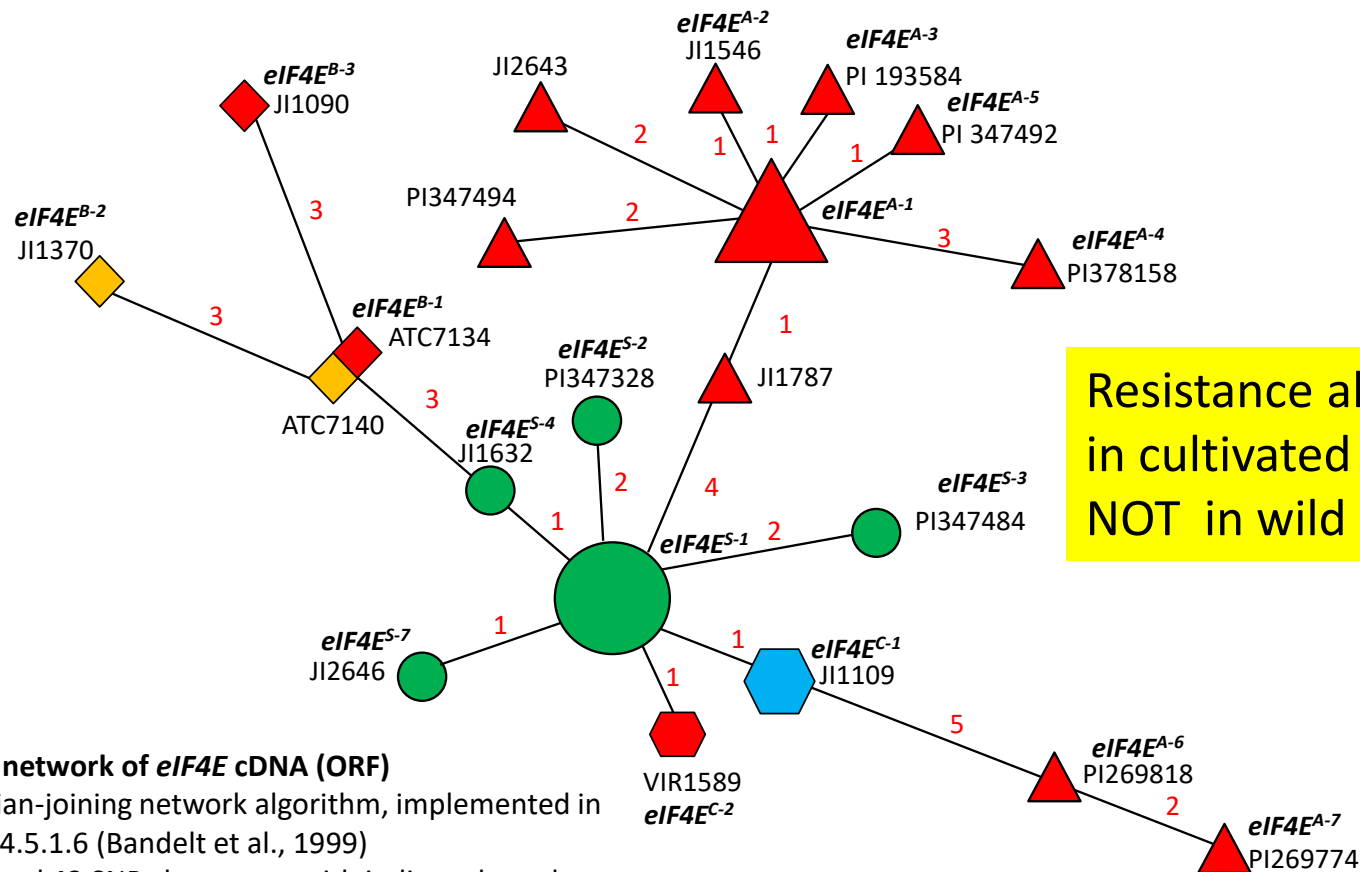


Geographical distribution of *eIF4E* alleles in 2803 pea accessions



Konečná et al. 2014

Evolution of resistance alleles



Konečná et al. 2014

Haplotype network of *eIF4E* cDNA (ORF)

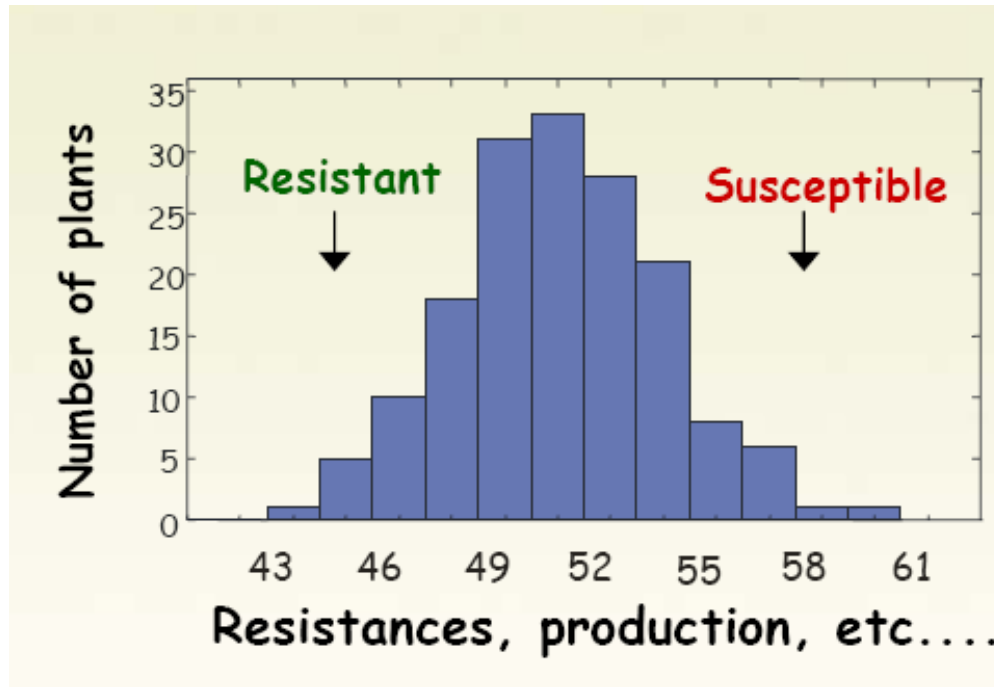
Using median-joining network algorithm, implemented in NETWORK 4.5.1.6 (Bandelt et al., 1999)

Based on total 42 SNP characters, with indicated number of mutated positions (in red)

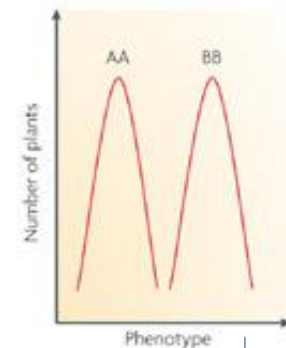
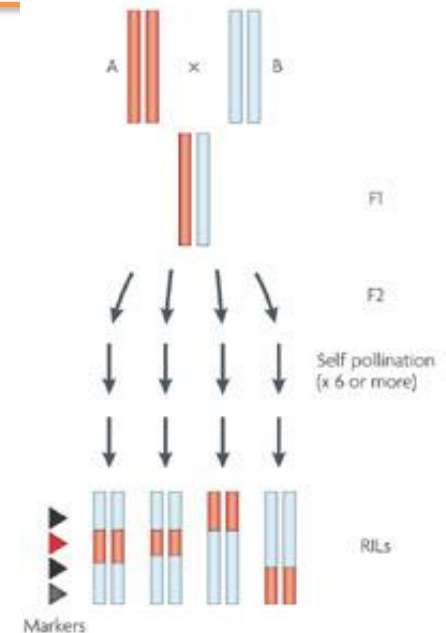
Kvantitativní znaky (QTLs)

Potřeby:

- Mapovací populace (min F2:3, ale spíše F8)
- Markery (desítky, stovky, lépe pak tisíce)
- Fenotypový popis



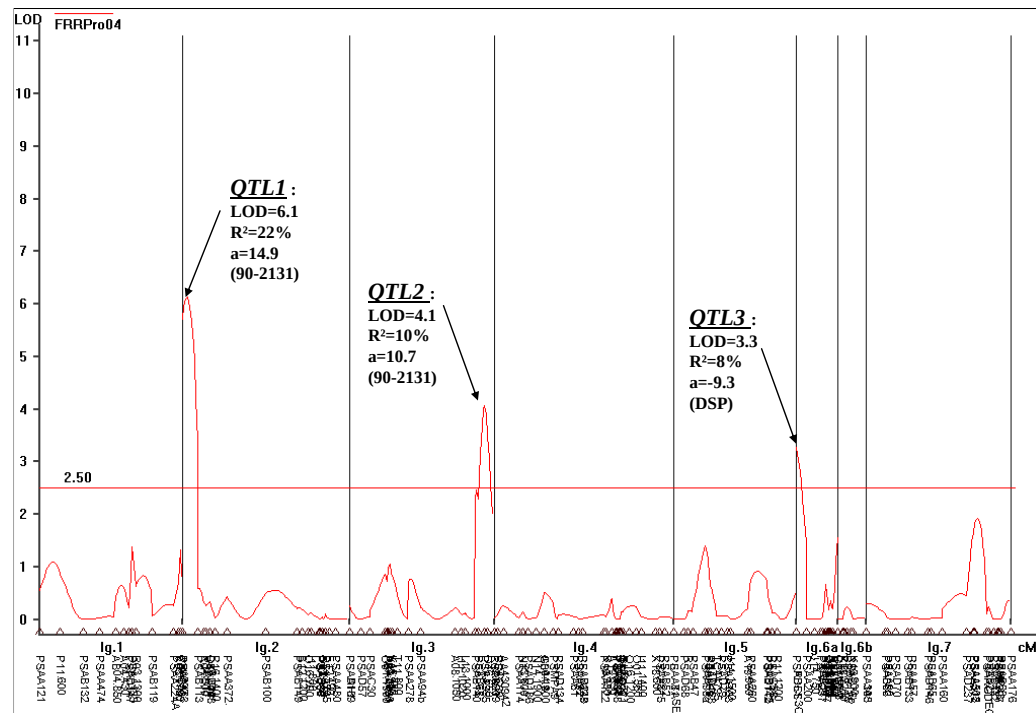
a. QTL mapping



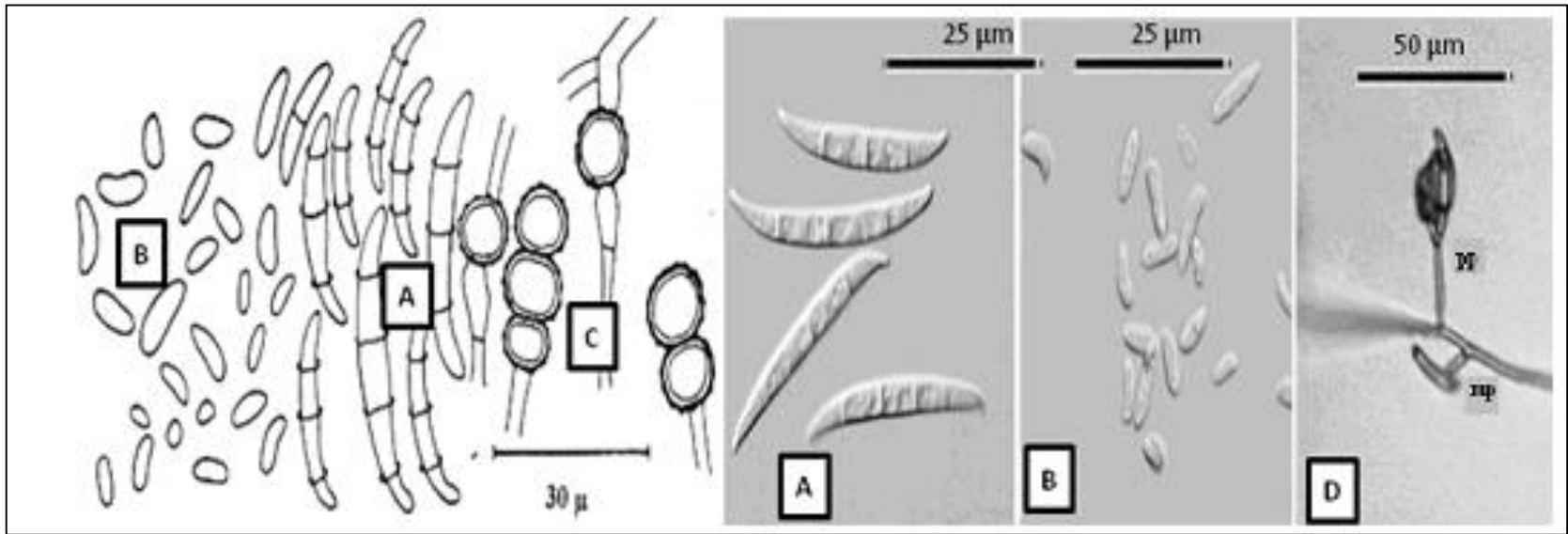
Kvantitativní znaky (QTLs)

Spočívá v analýze statistické závislosti mezi kvantitativními znaky a genetickými markery

2		Fwr1	ACA: C	ACA: C	ACA: C	ACA: C	ACA: C	ACA: C	ACA: C
3		Fwr1	280	210	195	180	150	140	125
4	Marker	Fw	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7
5	Green Arrow	A	A	A	A	A	A	A	A
6	PI 179449	B	B	B	B	B	B	B	E
7	PRIL7-01	A	B	B	B	B	B	A	A
8	PRIL7-02	B	A	A	A	A	B	A	A
9	PRIL7-03	B	B	B	A	B	B	B	E
10	PRIL7-04	B	B	A	A	A	A	A	E
11	PRIL7-05	B	B	B	A	B	B	B	E
12	PRIL7-06	A	B	A	A	A	A	B	A
13	PRIL7-07	A	A	A	A	A	A	B	A
14	PRIL7-08	A	B	A	B	A	B	B	E
15	PRIL7-09	B	B	B	B	B	B	B	E
16	PRIL7-10	B	B	B	B	B	B	A	A
17	PRIL7-11	B	A	A	A	A	A	A	E
18	PRIL7-12	B	A	A	A	B	B	A	A
19	PRIL7-13	A	A	A	A	B	B	B	A
20	PRIL7-14	A	B	A	B	A	A	B	A
21	PRIL7-15	A	A	B	B	B	B	A	A
22	PRIL7-16	A	A	A	A	A	A	B	A
23	PRIL7-17	A	A	B	A	B	B	B	A
24	PRIL7-18	A	B	B	A	B	B	B	A
25	PRIL7-19	B	B	A	B	A	A	A	E
26	PRIL7-20	B	A	B	A	B	B	A	E
27	PRIL7-21	A	B	B	A	B	B	B	A
28	PRIL7-22	A	B	B	A	B	B	A	A
29	PRIL7-23	B	A	A	B	A	A	B	E
30	PRIL7-24	B	A	A	A	A	B	B	E
31	PRIL7-25	A	B	B	B	B	B	B	A
32	PRIL7-26	A	A	A	B	A	A	B	A
33	PRIL7-27	B	B	A	A	A	A	A	E



Fusarium oxysporum f.sp. *pisi*

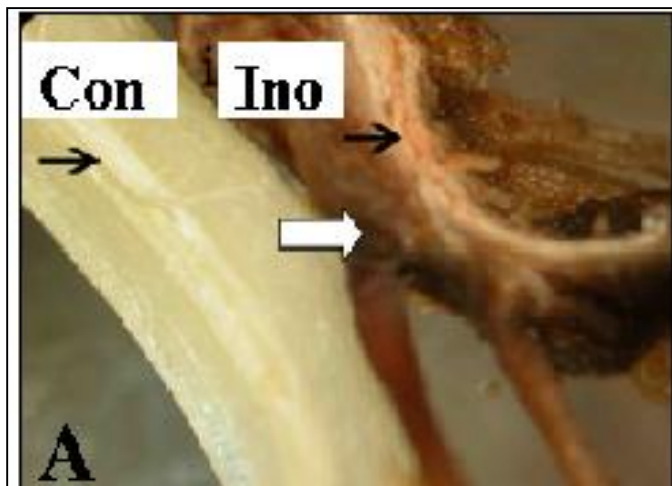


F. oxysporum (A: macroconidia, B: microconidia, C: chlamydospores, D: monophialide (Leslie et Summerell, 2006))

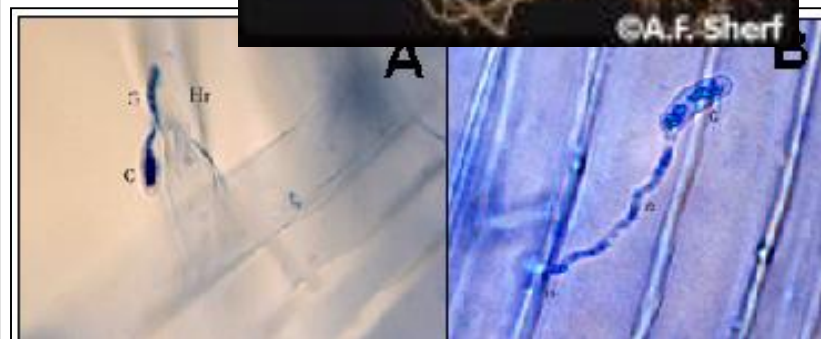


Fusarium solani

Fuzáriová spála (*Fusarium solani*)



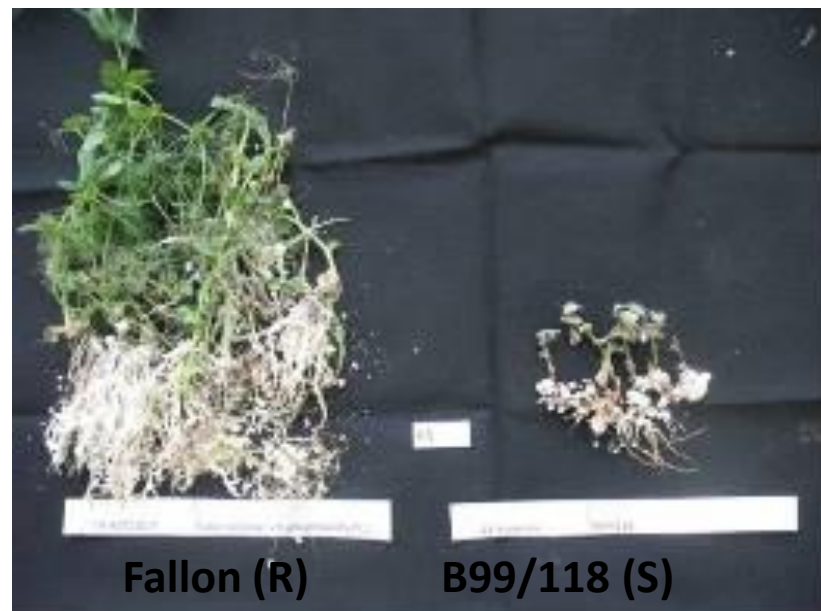
Fuzáriové vadnutí (*Fusarium oxysporum* f.sp. *lisi*)



M. Bani-Master Thesis 2010

Inokulační testy- hodnocení fenotypu rekombinantních linií a vybraných položek kolekce k infekci *Fusarium solani* v kontrolovaných laboratorních testech

		Genotyp	DI (FS)	kontrola
1		Terno	2,27	0
2		Prophet	3,31	0
3		Slovan	2,00	0
4		Sully	2,40	0
5		Starter	1,92	0
6		Velvet	2,58	0
7		Atlas	2,66	0
8		Audit	1,95	0
9		Avantgarde(LAN 4180)	3,04	0
10		Salamanca	2,95	0
11	kontrola	Fallon	1,82	0
12	kontrola	B99/118	3,50	0
13		Gambit	2,67	0
14		SG-L 4794	2,44	0
15		SG-L 5190	2,64	0
16		LN 4206	2,03	0
17		LN 1109	2,10	0
18	AGT210/2	Terno x Starling	2,08	0
19	AGT210/3	GA93P127 x SCHW978935	2,44	0
20	AGT210/4	Kamelot x Mozart	3,00	0
21	AGT210/5	Kamelot x Lifter	3,50	0
22	AGT210/6	SG-L74(06)(SG-L4753) x CDC Gold	2,28	0
23	kontrola	Fallon	2,16	0
24	kontrola	B99/118	3,63	0
25		DSP	3,67	-
26		90-2131	1,50	-
27		PI 180693	1,70	-
28		Baccara	3,50	-
29		linie 260	1,63	-
30	kontrola	Fallon	2,20	0
31	kontrola	B99-118	3,78	0



F. solani (FSVG4 isolát)

genotypy DSP a 90_2131
použité k tvorbě RIL populace

Lokalizace pl39 genu na LG III

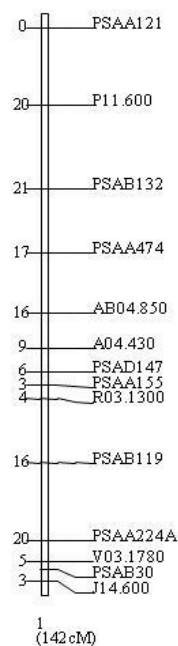
Genetic map DSP x 90-2131

140 linked markers – 991 cM Kos

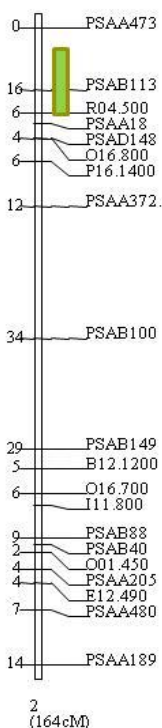


FRR QTL detected
2004 field data

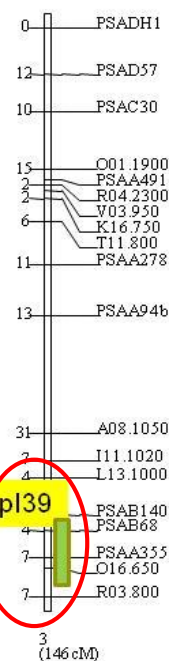
LGI



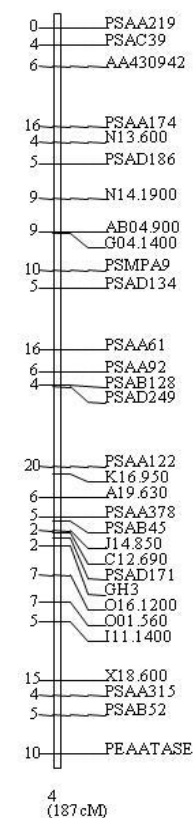
LGII



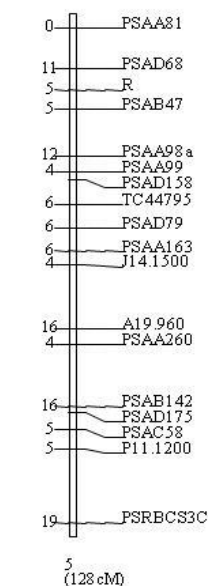
LGIII



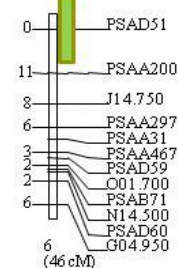
LGIV



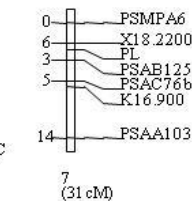
LGVI



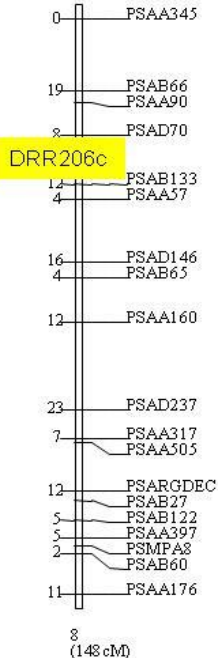
LGVIa



LGVIb



LGVII



DRR206c

pl39

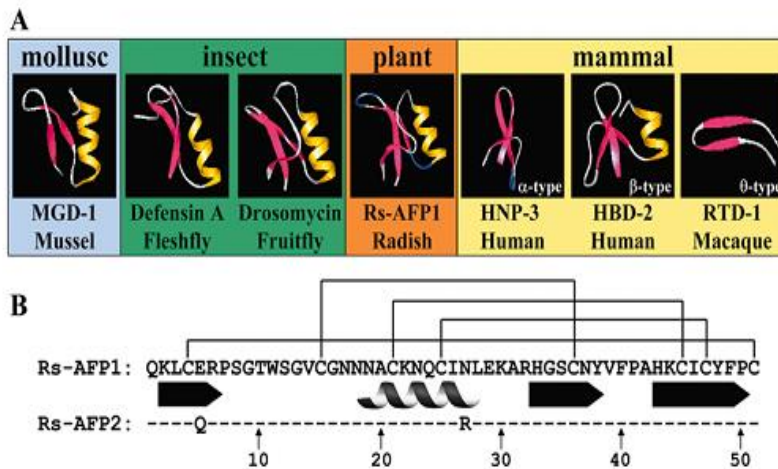
Remaining gaps on LGI (bottom) and LGVI/Loridon et al. 2005
Unsufficient covering in the middle of LGII and LGIII

46 additional unlinked markers



Palacký University
Olomouc

Lokalizace pl39 na LG III vazebnou skupinu do místa FRR2 QTL lokusu a potvrzení tohoto kandidátního genu



Plant Science 163 (2002) 855–864

PLANT
SCIENCE

www.elsevier.com/locate/plantsci

Analysis of the DRR230 family of pea defensins: gene expression pattern and evidence of broad host-range antifungal activity[☆]

Fang-Ming Lai¹, Catherine DeLong, Kangfeng Mei, Tracy Wignes, Pierre R. Fobert^{*}

National Research Council Canada, Plant Biotechnology Institute, 110 Gymnasium Place, Saskatoon, Sask., Canada S7N 0W9

Jedná se o malou genovou rodinu defensinů (Chiang and Hadwiger 1991, Lai et al. 2002), s expresí indukovanou po infekci houbovým (*Ascochyta pinodes*) i bakteriálním patogenem (*Pseudomonas syringae*) a především pak cílovým organismem tohoto projektu *Fusarium solani* (Chiang and Hadwiger 1991, Hadwiger 2008).

Využití transkriptomiky pro studium rezistance

A



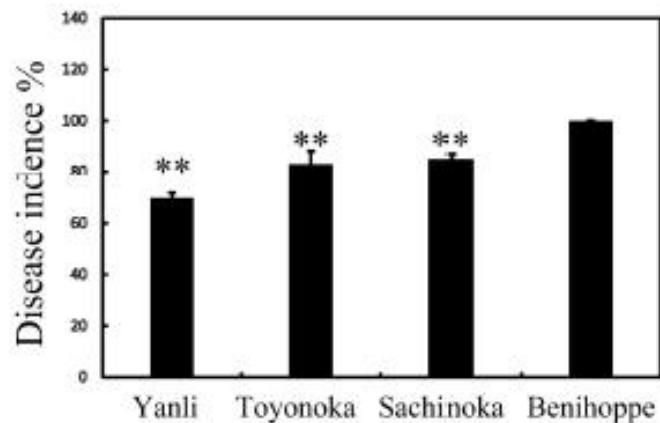
Yanli

Toyonoka

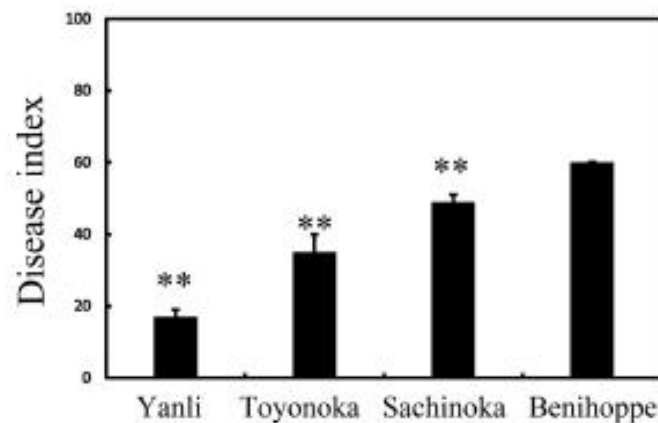
Sachinoka

Benihoppe

B



C



ORIGINAL RESEARCH
published: 15 May 2017
doi: 10.3389/fpls.2017.00779



Comparative Transcriptomics Reveals Differential Gene Expression Related to *Colletotrichum gloeosporioides* Resistance in the Octoploid Strawberry

Feng Wang^{1†}, Feng Zhang^{2,3†}, Mengmeng Chen¹, Zhiheng Liu¹, Zhihong Zhang², Junfan Fu¹ and Yue Ma^{1,2*}

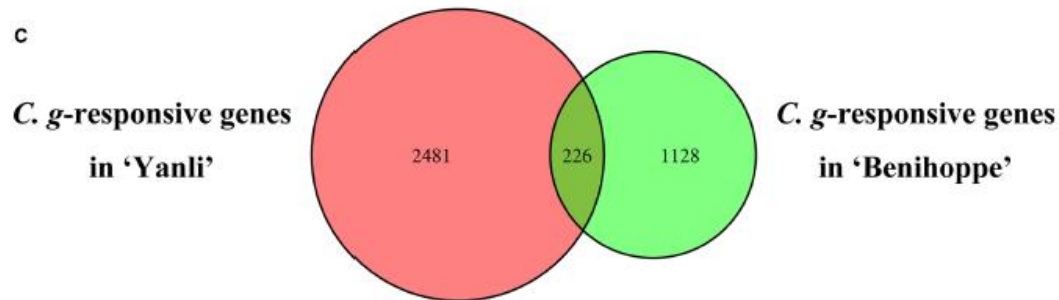
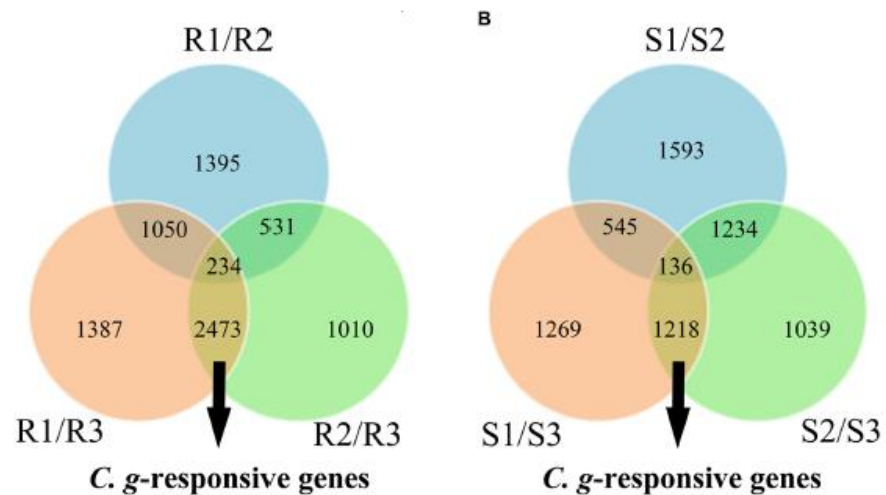
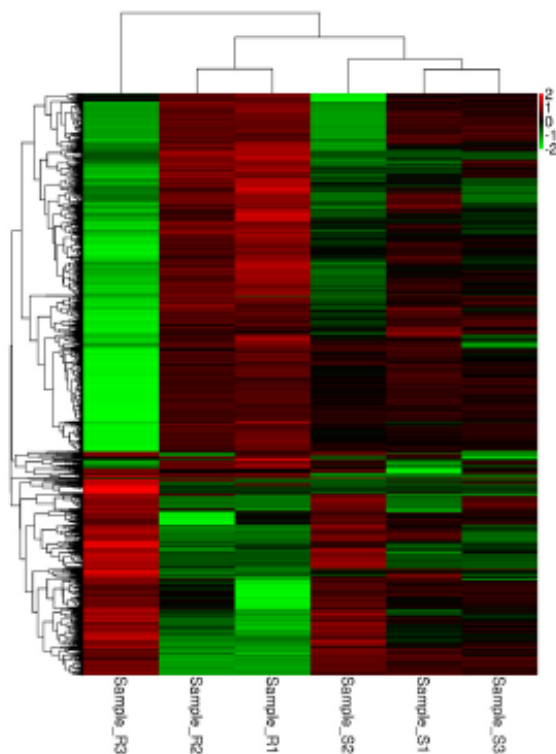


FIGURE 3 | Global changes in *C. gloeosporioides*-responsive genes in resistant and susceptible strawberry cultivars. (A) The number of common and specific DEGs in 'Yanli.' **(B)** The number of common and specific DEGs in 'Benihoppe.' **(C)** The number of common and specific *C. gloeosporioides*-responsive genes in 'Yanli' and 'Benihoppe.'

Využití in vitro selekce – rezistence k houbovým patogenům

Plants	Agronomic traits	References
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Valine resistance	Gaj et al., 1999
Sugarcane	Ametryn	Zambrano et al., 1999
<i>Herbicide resistance:</i>		
Wheat	atrazine, difenzoquat, picloram	
Tobacco	atrazine, amitrole, paraquat, chlorsulfuron	
Brassica	atrazine, phenmedipham	
Maize, barley	glyphosate	
Sugarbeet	chlorsulfuron	
<i>Disease resistance</i>		
Tomato	<i>Clavibacter michiganense</i>	
<i>Gladiolus</i> × <i>grandiflorus</i>	<i>Fusarium lycopersici</i> ,	
	<i>Phytophthora infestans</i>	
	Fusaric acid	
Tobacco	<i>Alternaria alternata</i>	
Potato	<i>Fusarium solani</i> ,	
	<i>F. oxysporum</i> , <i>Phytophthora infestans</i> , <i>Alternaria solani</i>	
	potato leafroll luteovirus	
Strawberry	<i>Phytophthora cactorum</i> ,	
	<i>Rhizoctonia fragariae</i>	
	<i>Botrytis cinera</i>	

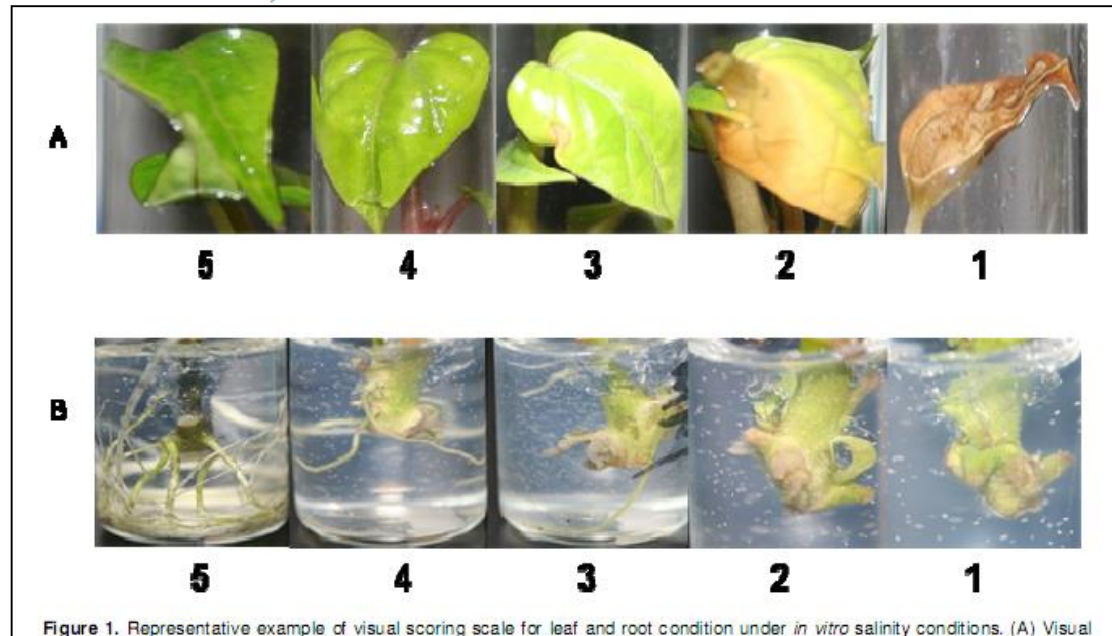


Figure 1. Representative example of visual scoring scale for leaf and root condition under *in vitro* salinity conditions. (A) Visual

see Jain et al., 1998

see Jain et al., 1998

Cristinzeo & Testa, 1999

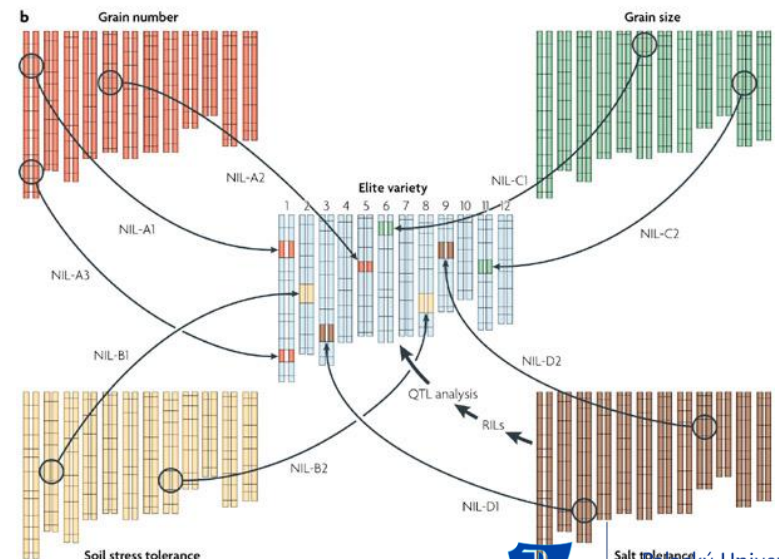
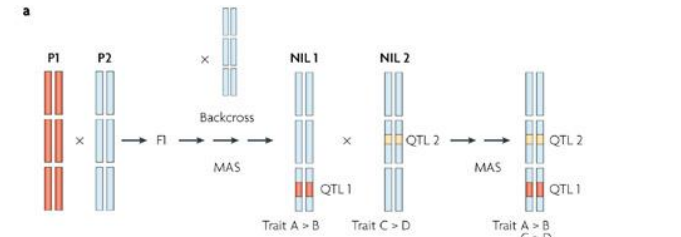
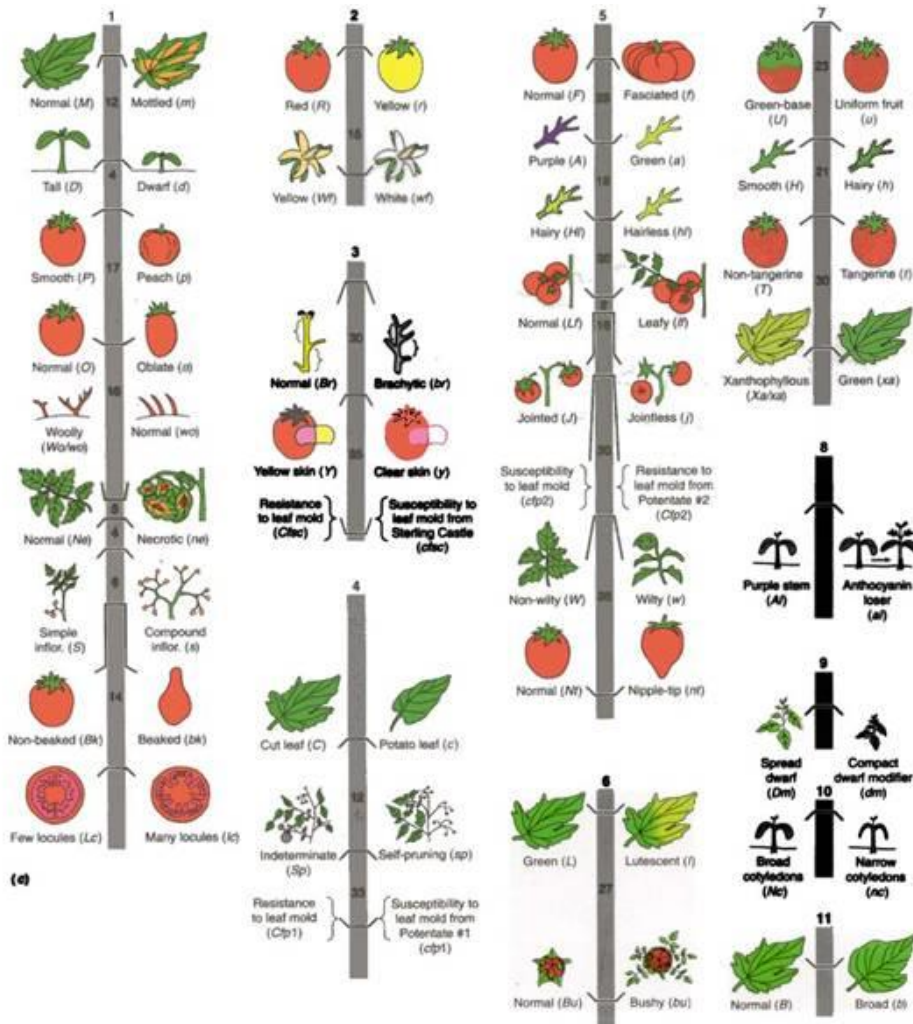
Kawchuk et al., 1997

Battistini & Rosati, 1991;

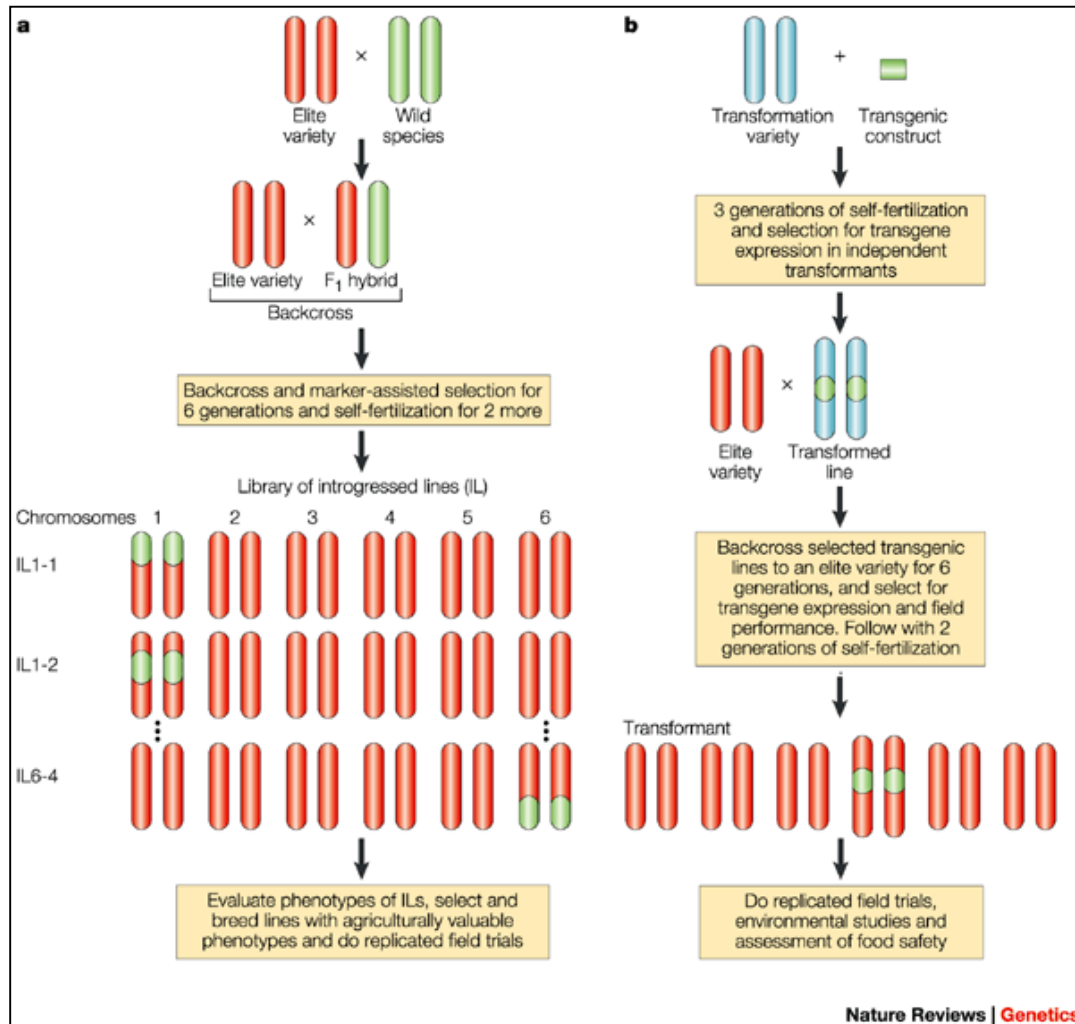
Jain, 1997b; see Remotti, 1998

Orlando et al., 1997

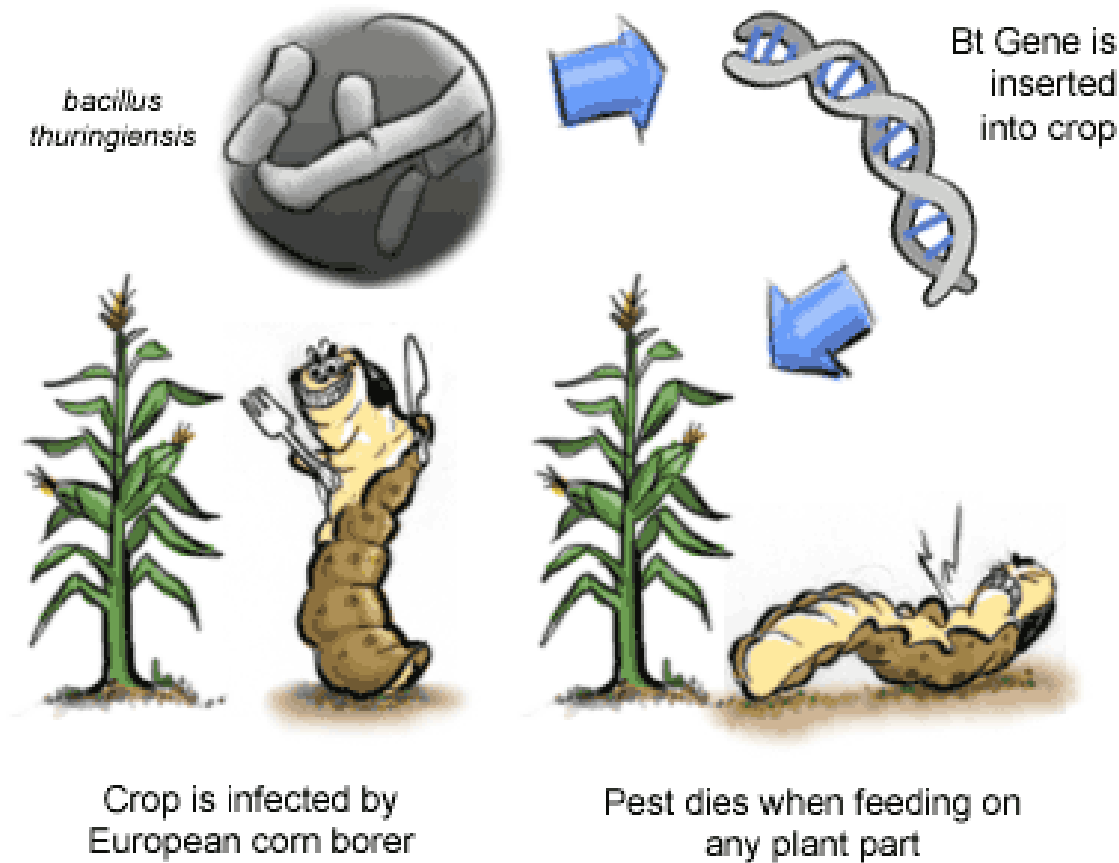
Pyramidování genů - Breeding by design



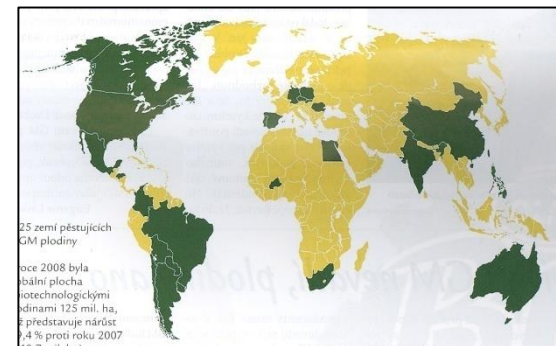
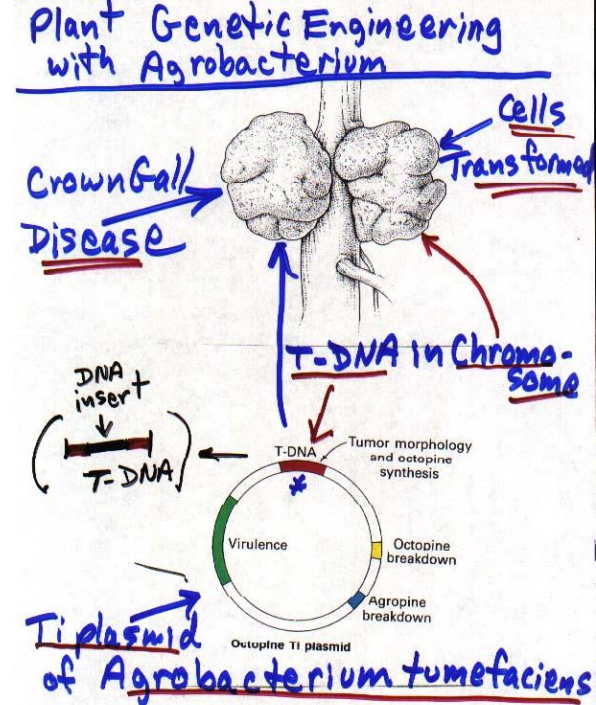
Získání rezistentních plodin introgrese a transgenose



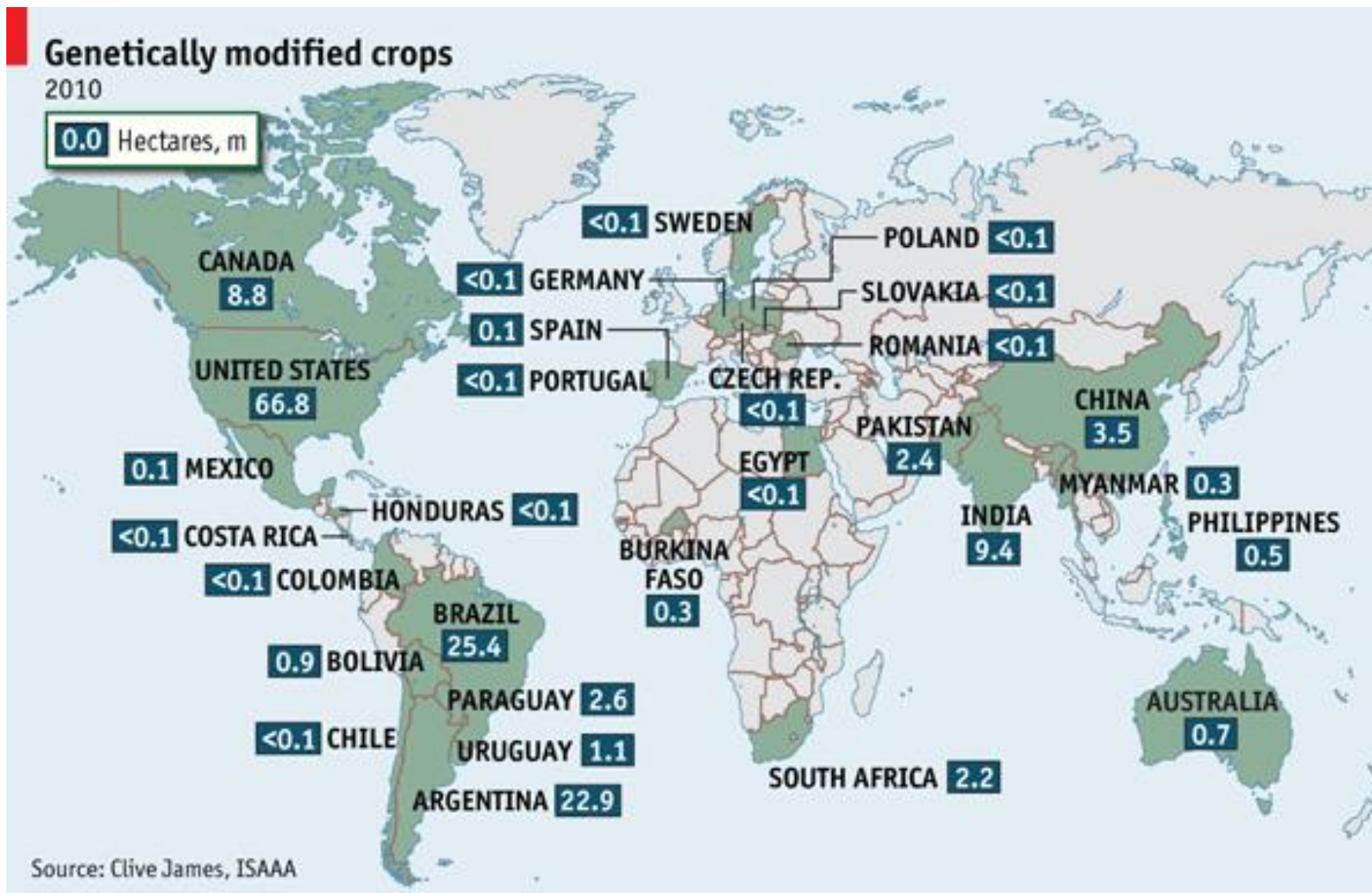
Transgenose (GMO) mezi vědou, etikou a politikou



- 1959 *Agrobacterium* tvorba nádoru
- 1973 první GMO organismus *E.coli*
- 1976 Ti plasmid (Mary-Dell Chilton)
- 1980 Ti plasmid jako vektor cizorodé DNA
- 1983 první GMO rostlina s využitím T-DNA
- 1986 transgenní *Bt* tabák (Plant Genetic Systems, Belgie)
- 1994 FlavrSavr rajče (USA)
- 2009 11 transgeních plodin pěstováno na 150 miliónech hektarů ve 25 zemích



Pěstování GMO rostlin

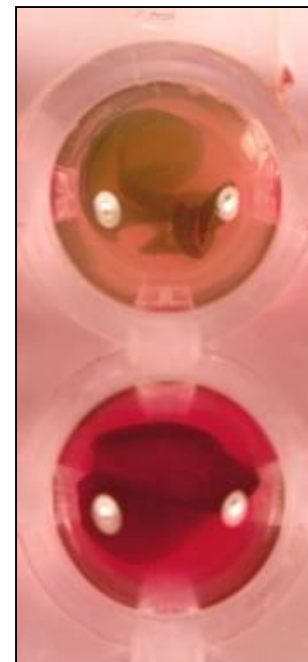
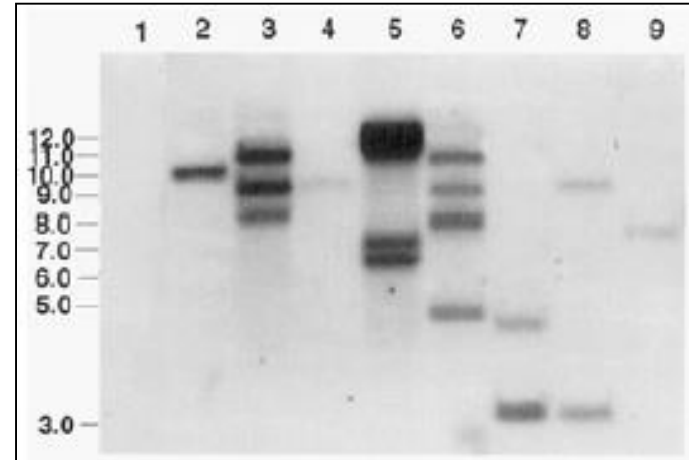
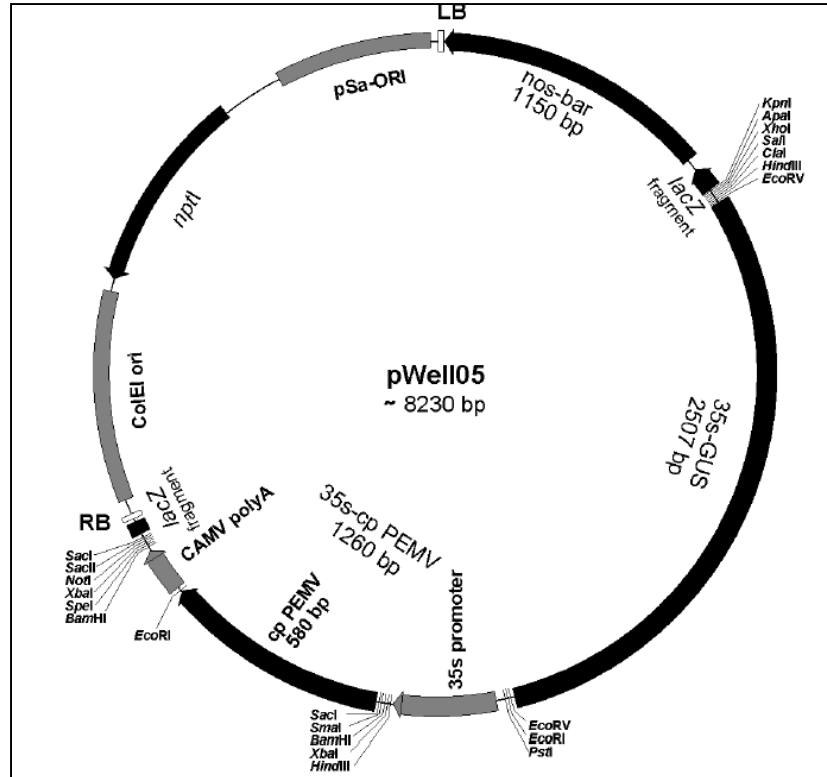


Pěstování *GMO* rostlin

Sója	69 miliónů hektarů	79%
Bavlník	25 miliónů hektarů	49%
Kukuřice	55 miliónů hektarů	31%
Řepka	7 miliónů hektarů	25%



T-DNA transgenose



T-DNA

- selekční marker - NPTII/BAR
- reporterový gen - GUS/GFP
- užitný gen
- promotory

Biolistická metoda transformace



Table 1 The most common genes used for transgenic disease-resistant crops in U.S. field trials application

Gene/trait	Description	Donor(s)	Examples of transgenic crop
Fungal disease resistance			
Polygalacturonase inhibitor protein	Inhibitor of polygalacturonase	Bean, pear	Grape, raspberry, tomato
Protein kinase	Resistance gene	Soybean	Soybean
R-gene	Resistance gene	Barley (<i>Rpg1</i>), rice (<i>Pi9</i>), <i>Solanum bulbocastanum</i> (<i>RB2</i>), soybean (<i>Rps1-k</i>)	Barley, festuca, potato, soybean
Cell death regulator	Cell death regulator	Baculovirus, chicken, nematode	Wheat
Toxin detoxifier	<i>Fusarium</i> toxin detoxifier	<i>Fusarium sporotrichioides</i> (Deoxynivalenol acetyltransferase, 3-hydroxyl tricoecene acetyltransferase)	Barley, wheat
PR proteins	Pathogenesis-related proteins	Alfalfa (<i>PR-2</i>), <i>Arabidopsis</i> (<i>PR-2</i>), grape (<i>PR-5</i>), pea (<i>PR-2</i>), rice (<i>PR-5</i>), tobacco (<i>PR-1</i>)	Cotton, barley, grape, peanut, potato, rice, sweet potato, sorghum, tobacco, wheat
Chitinase	Chitin degradation	Alfalfa, barley, bean, petunia, rice, tobacco	Alfalfa, apple, carrot, cotton, melon, onion, papaya, peanut, rice, squash, tobacco, tomato, wheat
Oxalate oxidase	Reactive oxygen production	Barley, wheat	Cowpea, bean, lettuce, peanut, potato, soybean, sunflower, tobacco
Thionin	Plant defensin	Barley, tobacco	Barley, potato, rice
Antimicrobial peptide	Antimicrobial proteins	African clawed frog (<i>Xenopus laevis</i>) (magainin), cow (lactoferrin), <i>Gastrodia elata</i> (mannose-binding lectin, gastrodianin), <i>Ustilago maydis</i> (<i>KP4</i>), wheat (<i>PGL</i>)	Cotton, grape, plum, poplar, tobacco, wheat
Cecropin	Antimicrobial proteins	Giant silk moths (<i>Hyalophora cecropia</i>)	Cotton, maize, papaya
Stilbene synthase	Polyphenol	Grape	Potato, tobacco
Antimicrobial metabolite	Antimicrobial metabolite	Pea (lignan biosynthesis protein), tomato (coenzymeA reductase, divinyl ether synthase)	Grape, potato, strawberry, tobacco



Viral disease resistance			
G5	Single-stranded DNA binding protein	Bacteriophage M13	Cassava
Movement protein	Viral movement protein	Raspberry bushy dwarf virus, tomato mosaic virus	Raspberry, tomato
Ribonuclease	RNA degradation	Yeast (<i>Schizosaccharomyces pombe</i>)	Pea, potato, wheat
Replicase	RNA replication	Cauliflower mosaic virus, papaya ringspot virus, potato leaf roll virus, tomato yellow leaf curl virus	Cassava, papaya, potato, tomato
Nuclear inclusion protein	Nuclear located protein	Papaya ringspot virus, potato virus Y, wheat streak mosaic virus	Melon, potato, squash, wheat
Coat protein	Capsid protein	More than 30 different plant viruses	Alfalfa, barley, beet, grape, lettuce, maize, melon, papaya, pea, peanut, pepper, pineapple, plum, potato, raspberry, soybean, squash, sugarcane, tobacco, tomato, wheat
Gene/trait	Description	Donor(s)	Examples of transgenic crop
Bacterial disease resistance			
Attacin	Antibacterial proteins	Giant silk moths (<i>Hyalophora cecropia</i>)	Apple
Cecropin	Antimicrobial proteins	Giant silk moths (<i>Hyalophora cecropia</i>)	Apple, papaya, pear, potato, sugarcane
Hordothionin	Antimicrobial proteins	Barley	Rice, tomato
Indolicidin	Antibacterial proteins	Cow	Tobacco
Lysozyme	Antibacterial proteins	Cow, chicken	Citrus, potato, sugarcane
Magainin	Antimicrobial proteins	African clawed frog (<i>Xenopus laevis</i>)	Grape
Protein kinase	Resistance gene	Rice, tomato	Rice, tomato
R-gene	Resistance gene	Pepper, tomato, rice	Tomato
Transcription factor	Promote resistance	Rice, tomato	Tomato

Bt kukuřice (MON 810) - komerční story by

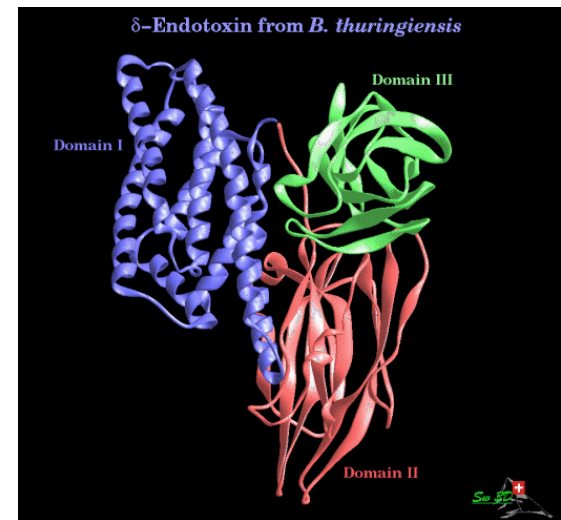


B. thuringiensis

objeveno v roce 1901 v Japonsku

1911 v Německu

Ernst Berliner nemoc housenek motýlů (Schlaffsucht)



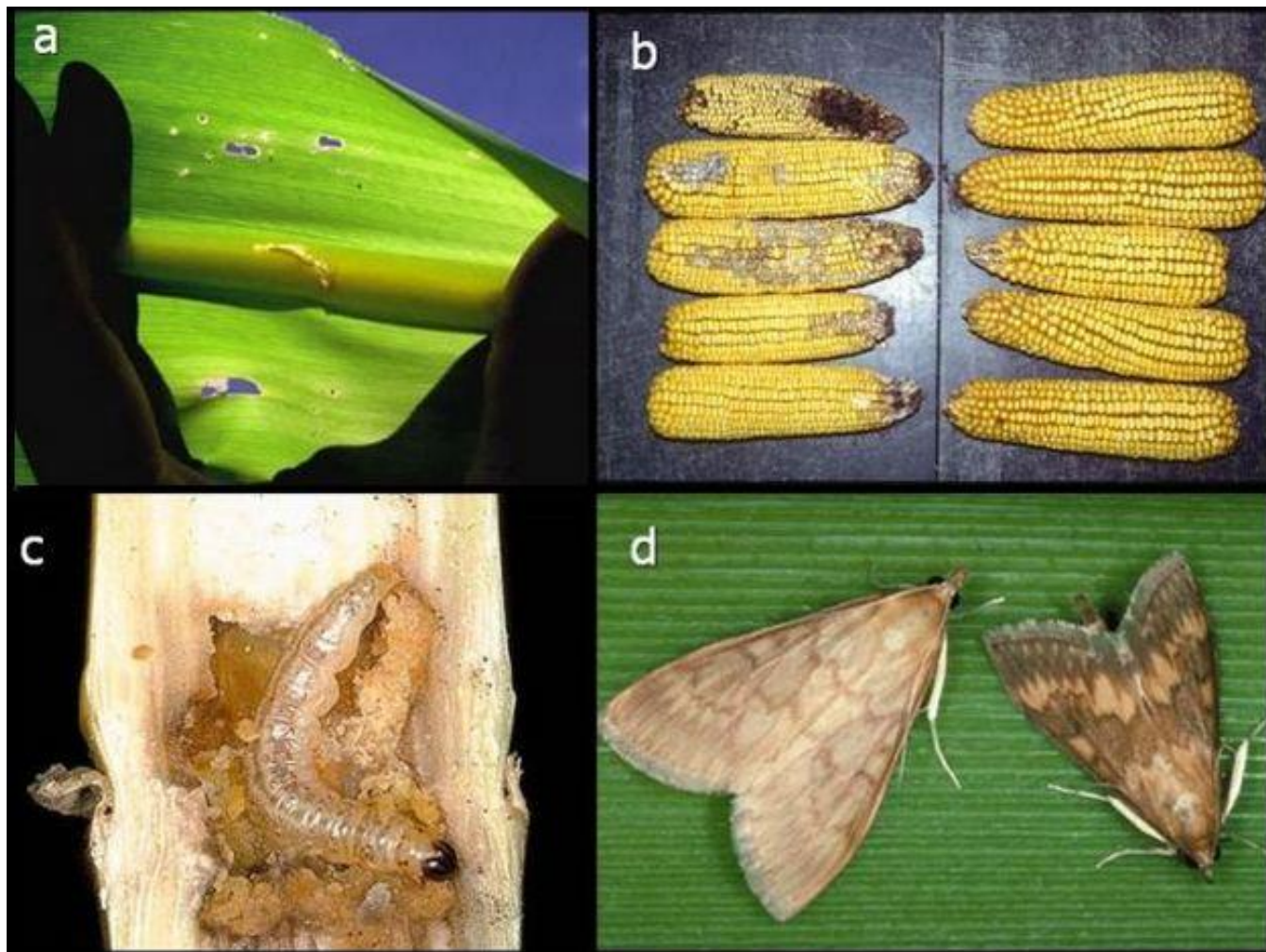
cry gen - protein

StarLink ® kukuřice (Aventis crop Science) 2002

Různé varianty cry proteinu

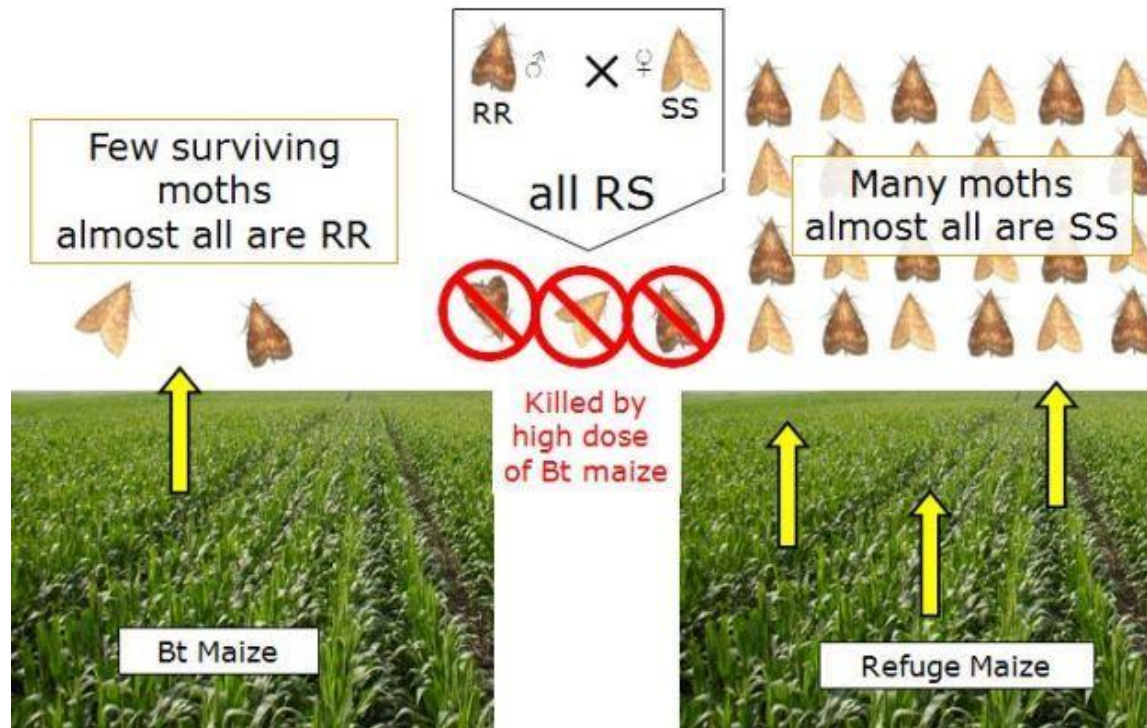
Monsanto YieldGuard Corn Borer YieldGuard Rootworm YieldGuard Plus	Cry 1Ab Cry 3Bb1 Cry 1Ab and Cry 3Bb1	Leps Corn rootworms Leps & corn rootworms
Dow / Pioneer Herculex I Herculex RW Herculex Xtra	Cry 1F Cry 34Ab1 + Cry 35 Ab1 Cry 1F + Cry 34Ab1 + Cry 35 Ab1	Leps Corn rootworms Leps & corn rootworms

Bt kukuřice a zavíječ kukuřičný



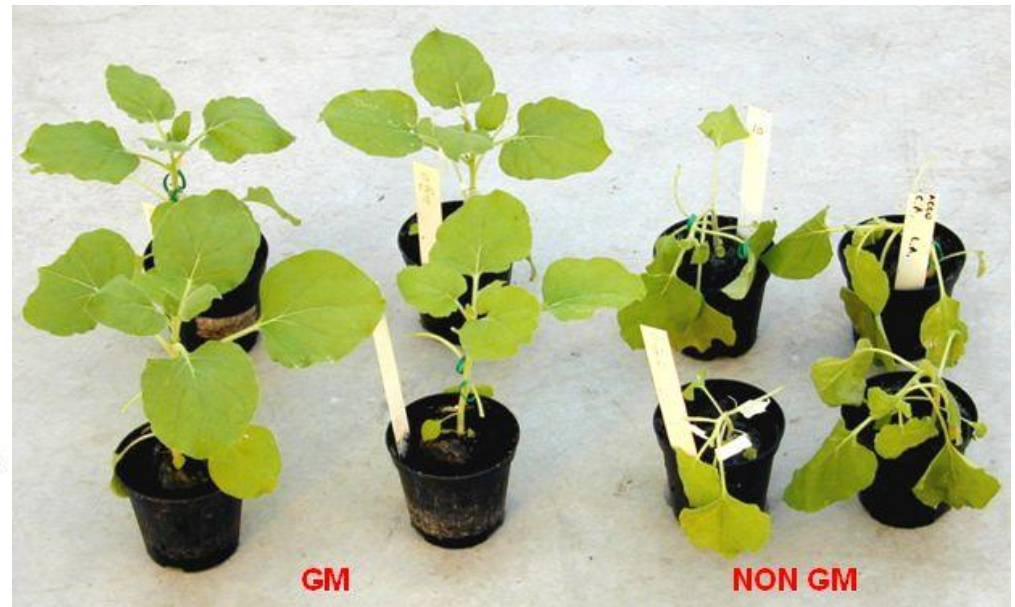
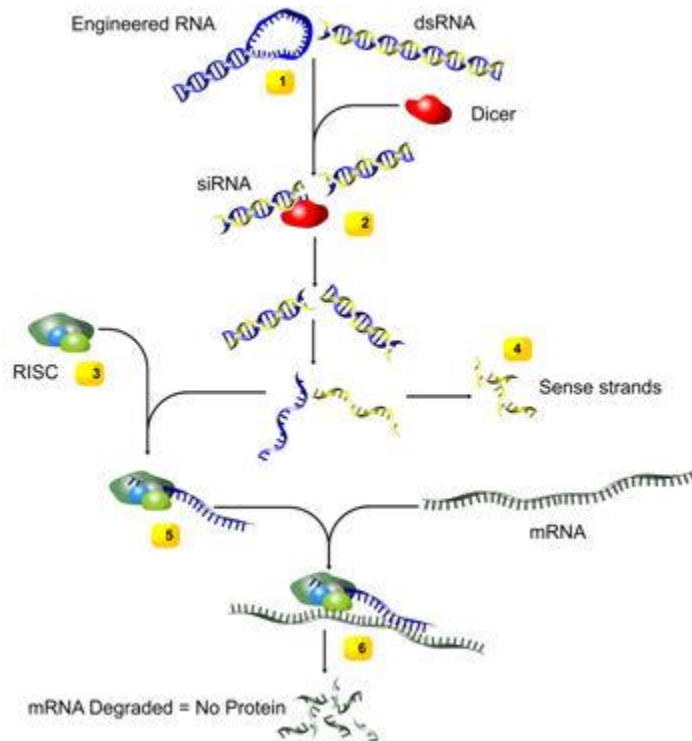
Jak zamezit vzniku rezistence na Bt toxin

IRM: High Dose and Refuge

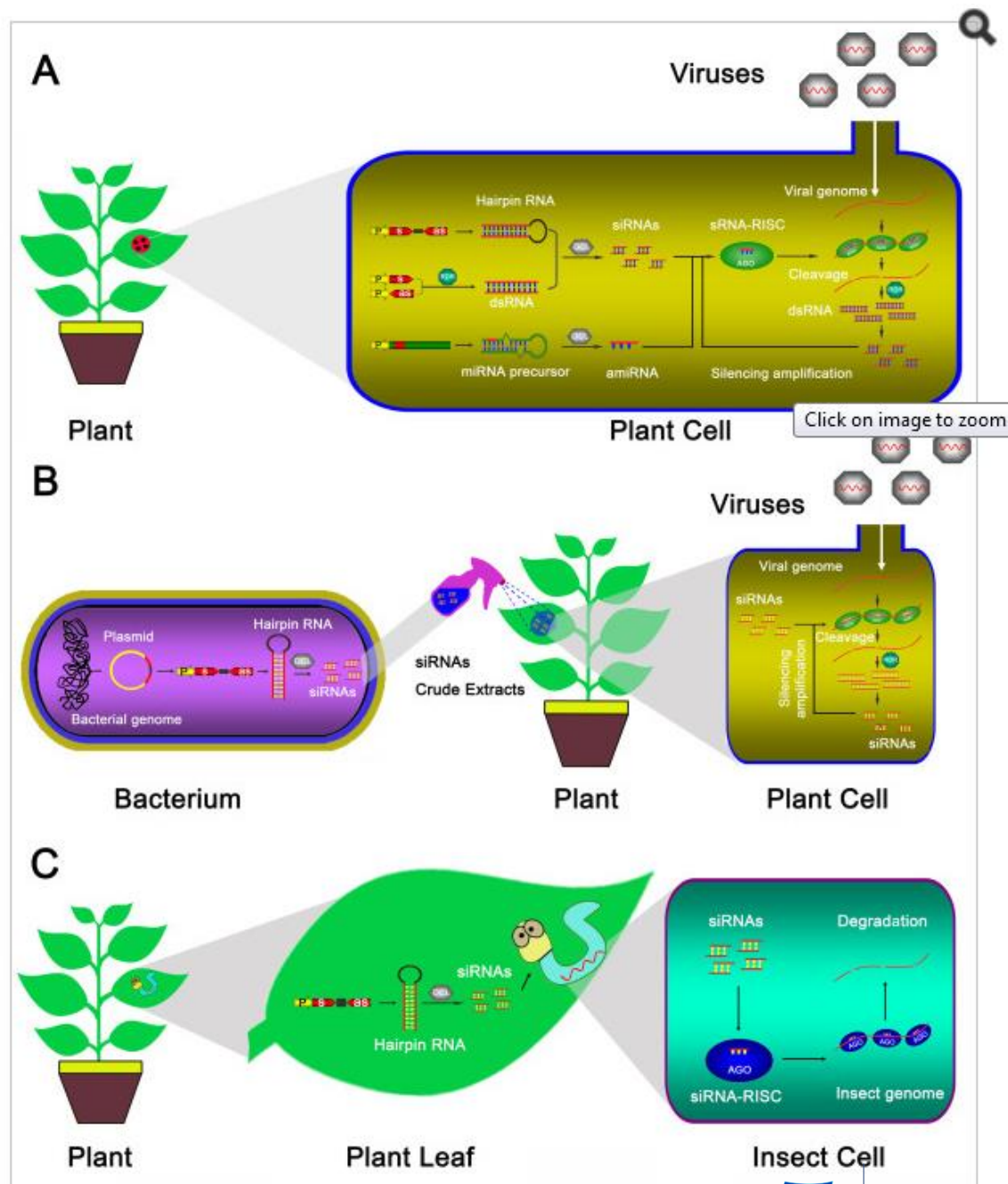


RNA silencing and virus resistance

Post-transcriptional gene silencing (PTGS=RNA interference) is a mechanism of adaptative defence against viruses and mobile genetic elements ubiquitous in eukaryotes.



RNA silencing and plant disease resistance

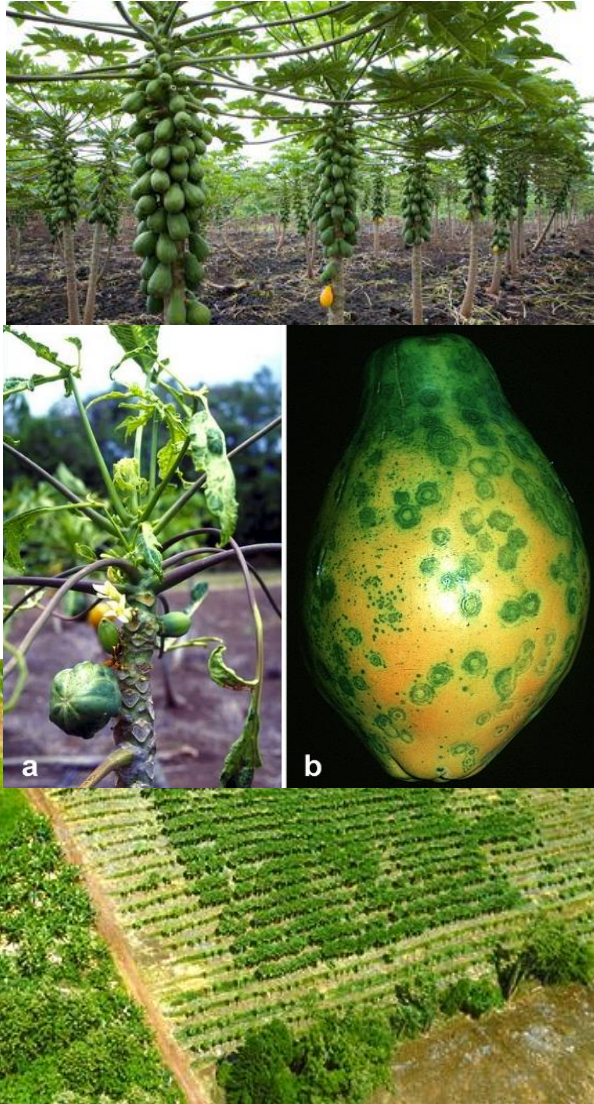


Silence. 2012; 3: 5.
doi: [10.1186/1758-907X-3-5](https://doi.org/10.1186/1758-907X-3-5)

Rostliny GM hrachu po mechanické inokulaci virem PEMV



Papayas papaya cultivation is being threatened by Papaya Ringspot-Virus, a disease that is sharply lowering yields.



In the late 1980s, the University of Hawaii began developing a papaya cultivar resistant to Papaya Ringspot Virus. To do this, certain **viral genes encoding capsid proteins were transferred to the papaya genome. These viral capsid proteins elicit something similar to an "immune response" from the papaya plant.** These new, genetically modified papaya plants are no longer susceptible to infection, allowing farmers to cultivate the fruit even when the virus is widespread.

The first virus resistant papayas were commercially grown in Hawaii in 1999. Transgenic papayas now cover about one thousand hectares, or three quarters of the total Hawaiian papaya crop.

Genetically modified papayas are approved for consumption both in the US and in Canada. Several Asian countries are currently developing transgenic papaya varieties resistant to local viral strains.

Lactoferrin-Derived Resistance against Plant Pathogens in Transgenic Plants

Dilip K. Lakshman,^{*,†} Savithiry Natarajan,[‡] Sudhamoy Mandal,[§] and Amitava Mitra^{*,§}

[†]Floral and Nursery Plants Research Unit and Sustainable Agricultural Systems Laboratory, [‡]Soybean Genomics and Improvement Laboratory, Agricultural Research Service, U.S. Department of Agriculture, Beltsville, Maryland 20705, United States

[§]Department of Plant Pathology, University of Nebraska, Lincoln, Nebraska 68583, United States

■ LACTOFERRIN: A MILK PROTEIN WITH MULTIPLE ANTIMICROBIAL PEPTIDES

Lactoferrin is a protein present in milk, tears, saliva, and mucus membrane of most mammals, and it plays a major role in the immune system of newborns.³⁰ LF is a cationic iron-binding glycoprotein of 80 kDa belonging to the transferrin family. LF may have a role in iron absorption and/or excretion and in gastric health of newborns.³² It has anti-inflammatory and wound-healing properties and detoxicant, antioxidant, and anticancer activities.^{33,34} Another prominent property of LF is its potent activity against a wide range of microorganisms including both Gram-negative and Gram-positive bacteria, as well as fungi and viruses.³⁵ LF consists of two globular domains,

Transgenic

Control



7 Days



9 Days

Figure 2. Detached leaf assay of the fourth leaf of transgenic tobacco seedlings inoculated with *R. solani*. A 5 mm mycelial disk was placed in

Transgenic

Control



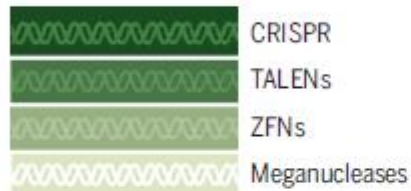
Figure 3. Seedling damping-off bioassay. Twelve-day-old seedlings of two BLF-*Arabidopsis* transgenic lines (top and bottom left) and two vector-only control *Arabidopsis* lines (top and bottom right) were inoculated with *R. solani* inoculum mixed with (0.75% w/w)

When is a GM plant not a GM plant?

A bumper crop of genome-edited plants

Challenging older forms of genetic modification, four recently developed genome-editing methods—meganucleases, zinc finger nucleases (ZFNs), TALENs, and CRISPR—have produced many plant varieties with useful new traits, some highlighted below. A few are in field trials already.

Genome-editing methods



- Drought resistant
- Disease resistant
- Consumer benefits
- Herbicide resistant
- Yield, storage, or processing improvement
- Altered growth

Corn *Zea mays*



DuPont Pioneer plans a CRISPR-altered version of its “waxy corn” variety; Dow AgroSciences is using ZFN technology to make corn simultaneously healthier and herbicide resistant.

Tobacco *Nicotiana spp*



In the 1990s, researchers used enzymes called meganucleases to edit tobacco's genome; TALENs have now helped make a tobacco relative that can synthesize human therapeutic proteins.

Soybean *Glycine max*



Calyxt's TALEN®-edited soybeans may help food companies reduce trans fats in their products by 2018, as required by the United States for health reasons.

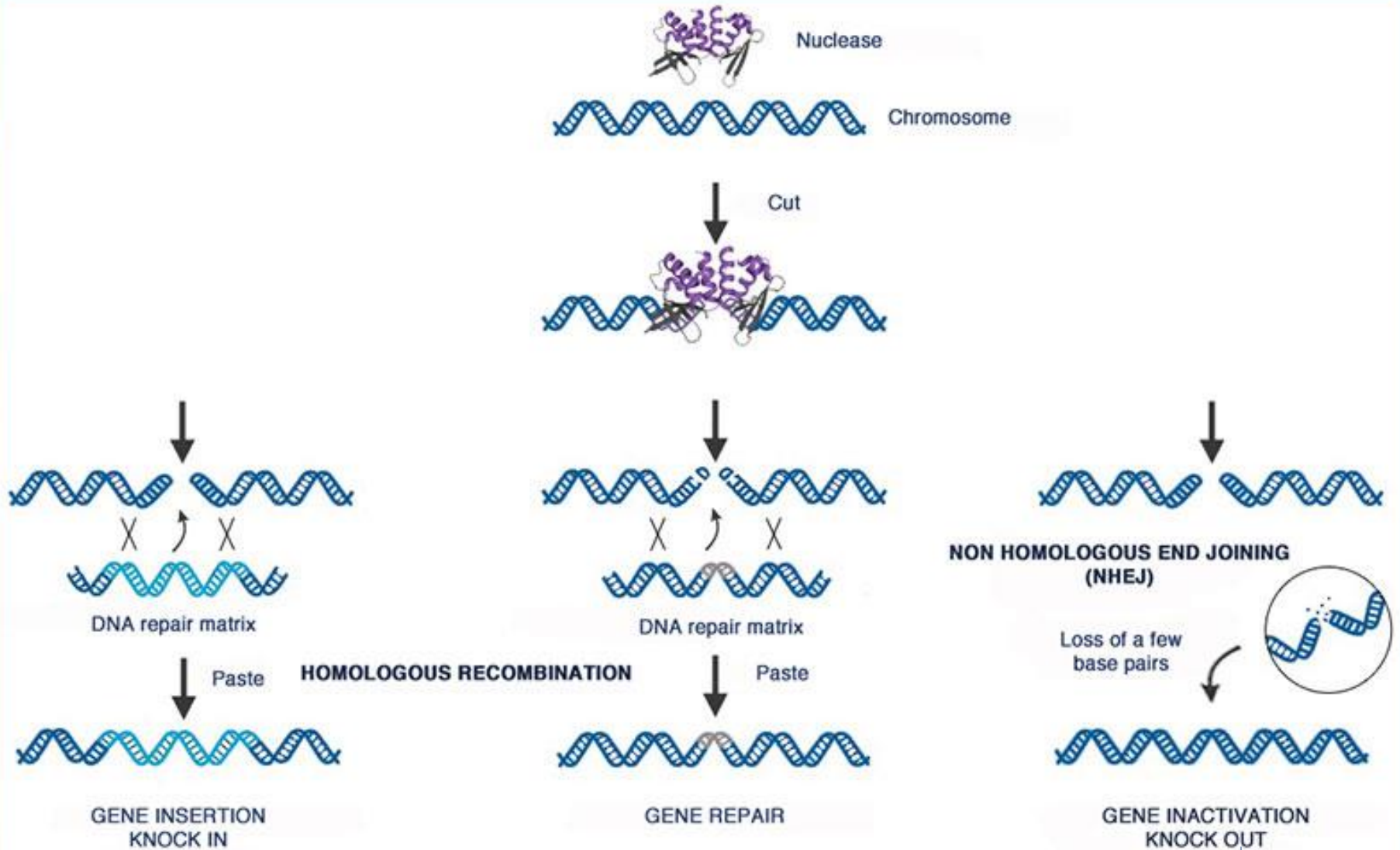
The plant engineer

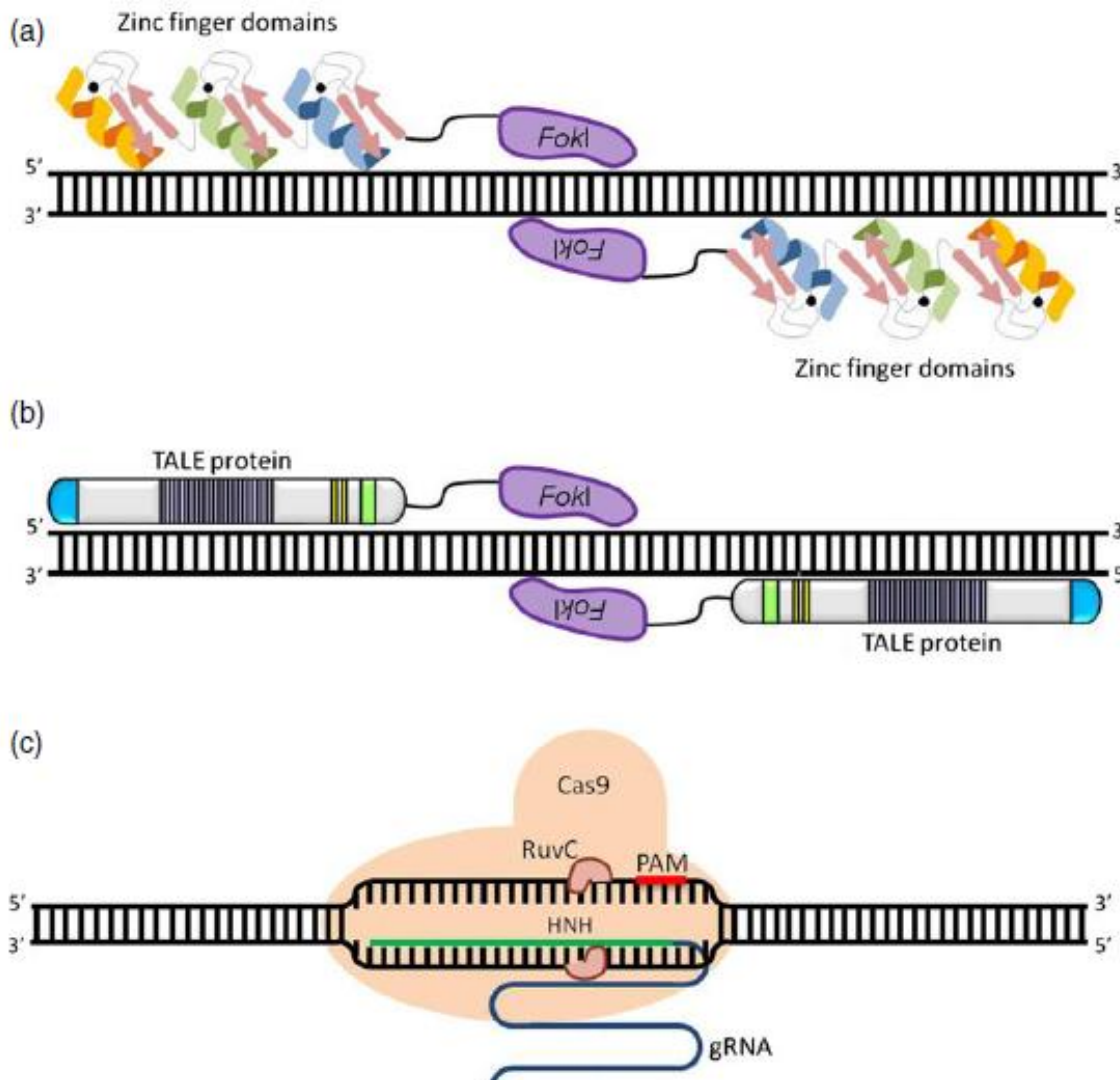
Elizabeth Pennisi (September 15, 2016)
Science 353 (6305), 1220-1224. [doi:
10.1126/science.353.6305.1220]



Palacký University
Olomouc

Editace genomu





Zinc fingers

TALENs

CRISPR/Cas9

Figure 2 Schematic representation of various genome-editing platforms. (a) Zinc finger nucleases (ZFNs) are composed of DNA recognition domains and FokI nuclease catalytic domain fusions. Each zinc finger in the DNA recognition domains binds three nucleotides. On average three to four zinc fingers are fused to recognize 9–12 nucleotides. Two ZFNs are required to produce double-strand breaks (DSB) as the FokI domain requires dimerization to be catalytically active. (b) Transcription activator-like effector nucleases (TALENs) are composed of TAL central DNA-binding repeat domain and FokI catalytic domain fusions. DNA-binding specificity is determined by the 12th and 13th hypervariable residues of each repeat [repeat variable diresidue (RVD)]. Similarly, two TALENs heterodimer binding in a tail-to-tail orientation with proper spacer length to allow dimerization of the FokI domains are required for activity and DSB formation. (c) Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/Cas9 mediates DSBs formation. Cas9 is guided to the 20 nt DNA target by a synthetic single guide RNA (gRNA) molecule composed of crRNA and tracrRNA. Cas9 recognizes a specific protospacer associated motif (PAM) sequence on the DNA (NGG—marked in red) and performs a complete cut with the two active nuclease domains RuvC and HNH.

Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew

Yanpeng Wang^{1,3}, Xi Cheng^{2,3}, Qiwei Shan¹, Yi Zhang¹, Jinxing Liu¹, Caixia

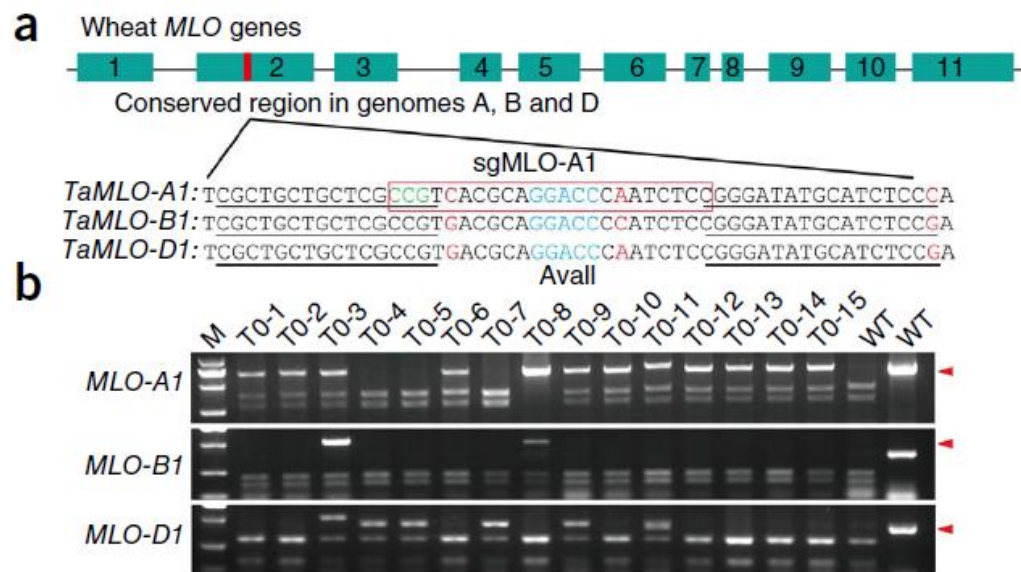


Figure 1 Targeted knockout of *TaMLO* genes using the TALEN and CRISPR-Cas9 systems. (a) Sites within a conserved region of exon 2 of wheat *TaMLO* homoeologs targeted by the TALEN and CRISPR-Cas9 systems. The TALEN-targeted sequences in *MLO-A1*, *MLO-B1* and *MLO-D1* are underlined, and the Avall restriction site in the spacer is blue. Of the three SNPs highlighted in red, two are in the spacer region and one lies near the far right of the TALEN binding site. The CRISPR-Cas9 targeted sequence in *MLO-A1* is indicated in the box, and the

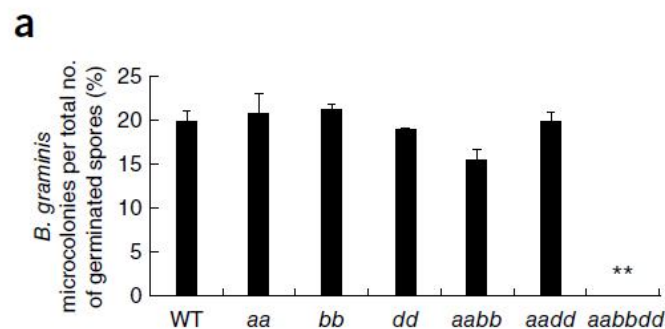
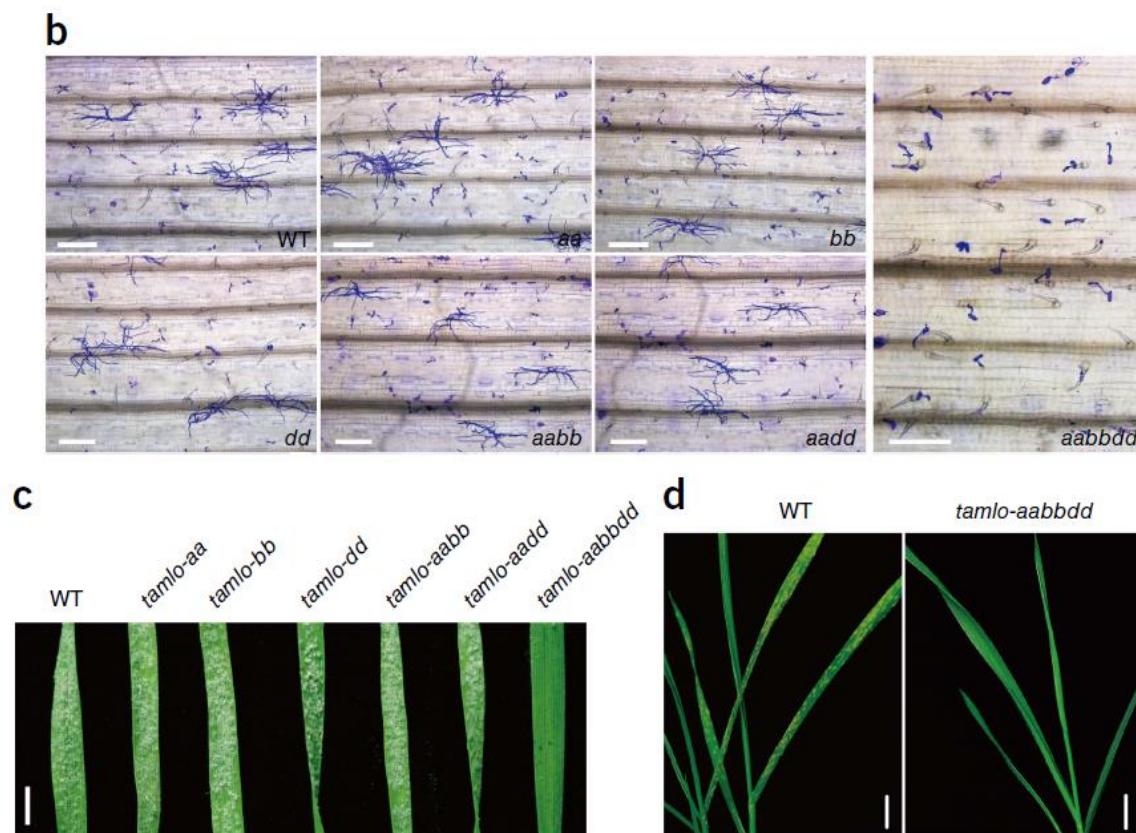
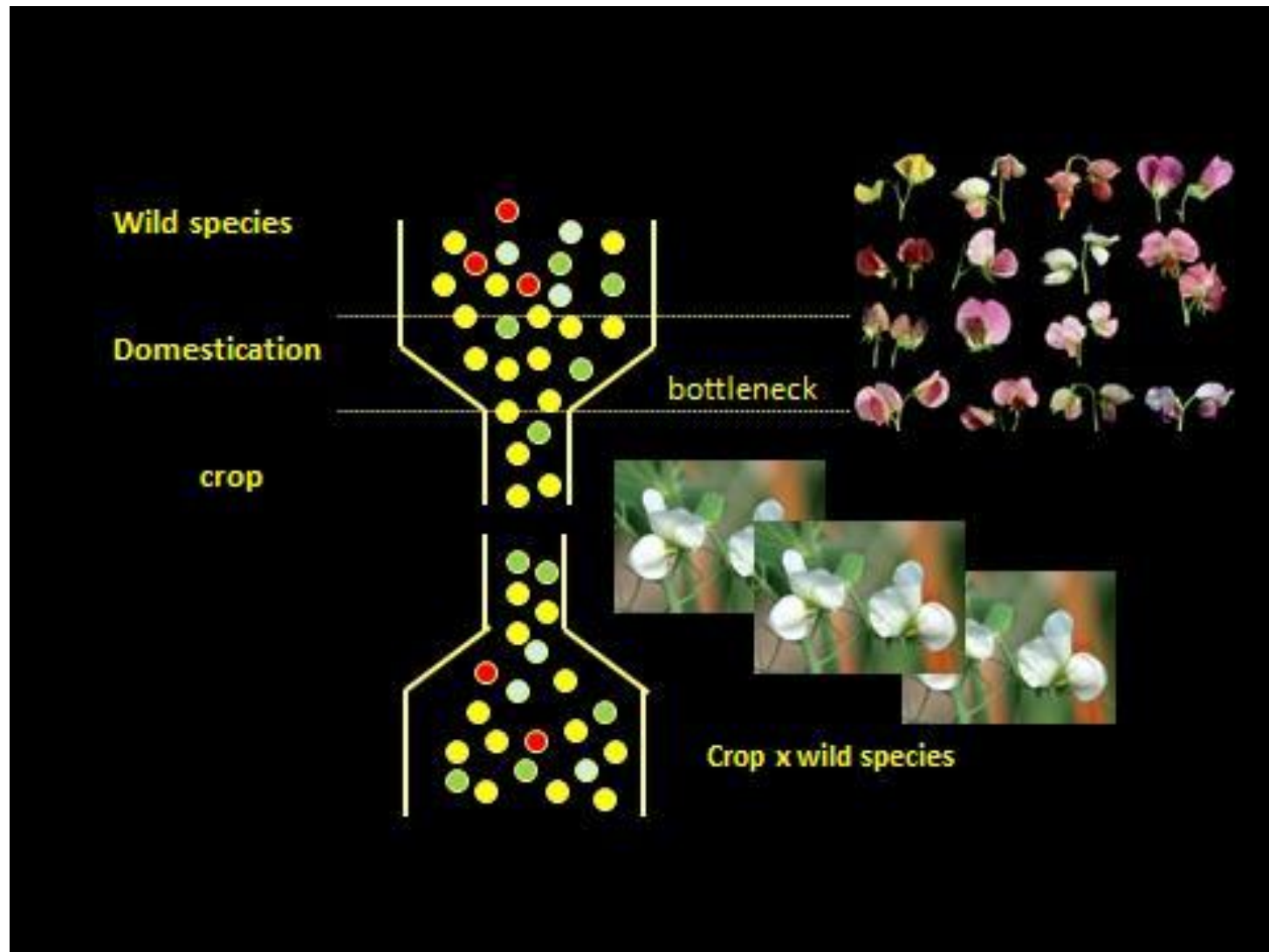


Figure 2 Loss of *TaMLO* function confers resistance of bread wheat to powdery mildew disease. (a) Percentage of microcolonies formed from the total number of germinated spores of *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* (*Bgt*) inoculated on the leaves of wild-type (WT) and various *tamlo* mutants. At least 2,000 germinated spores per genotype per experiment were examined 72 h after inoculation with virulent *Bgt* isolate E09. Values are the mean $\pm$ s.d. of four independent experiments. ** $P < 0.01$ (*t*-test). (b) Micrographs of microcolony formation of *Bgt* on the surfaces of leaves of the indicated genotypes 3 d postinoculation. Powdery mildew spores and colonies were stained with Coomassie blue. Scale bars, 200 μ m. (c) Macroscopic infection phenotypes of representative leaves of WT and the indicated *mlo* mutants 7 d after inoculation of detached leaves with *Bgt*. Scale bar, 1 cm. (d) Disease symptoms of wild-type (WT) and *tamlo-aabbdd* mutant plants. The photograph was taken 7 d after inoculation *in planta*. Scale bars, 2 cm.



Domestication bottleneck and how to broaden diversity



Introgression – exploration of wild crop relatives

CSIRO PUBLISHING

www.publish.csiro.au/journals/ajar

Australian Journal of Agricultural Research, 2008, **59**, 854–862

Genetic analysis of pod and seed resistance to pea weevil in a *Pisum sativum* × *P. fulvum* interspecific cross

O. M. Byrne^{A,C,D}, D. C. Hardie^B, T. N. Khan^B, J. Speijers^B, and G. Yan^A

Breeding Science 57 : 181–184 (2007)

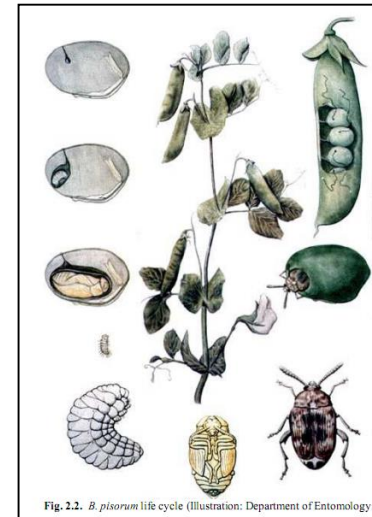


Fig. 2.2. *B. pisorum* life cycle (illustration: Department of Entomology).

Note

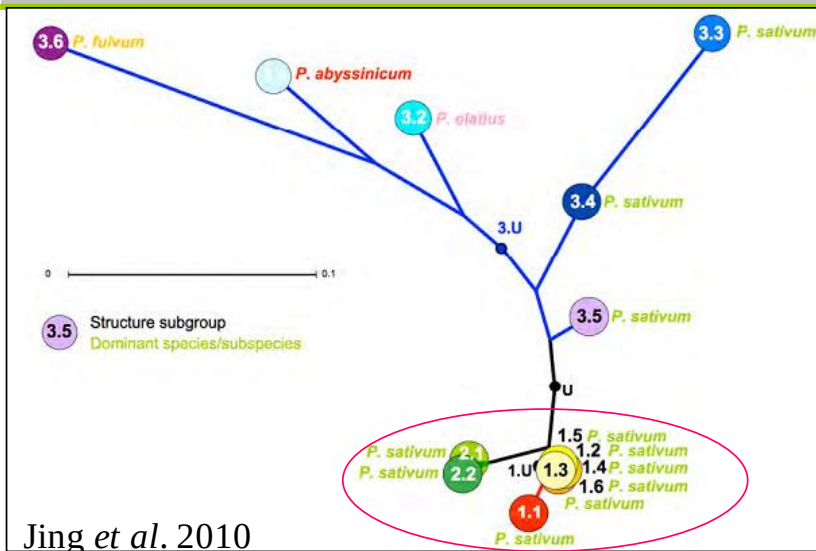
Identification of a New Gene for Resistance to Powdery Mildew in *Pisum fulvum*, a Wild Relative of Pea

Sara Fondevilla^{*1,2)}, Ana María Torres¹⁾, María Teresa Moreno¹⁾ and Diego Rubiales²⁾



Palacký University
Olomouc

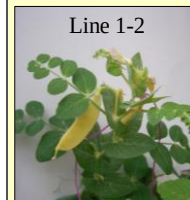
Introgression – exploration of wild crop relatives



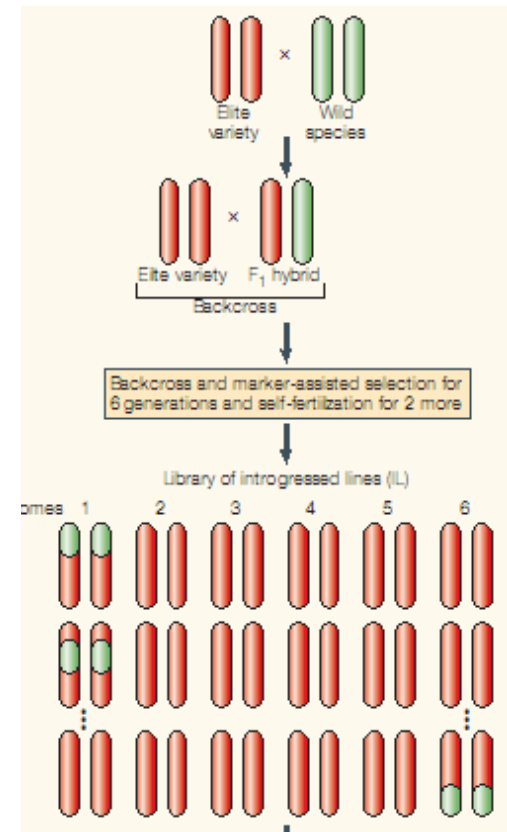
P. fulvum WL2140

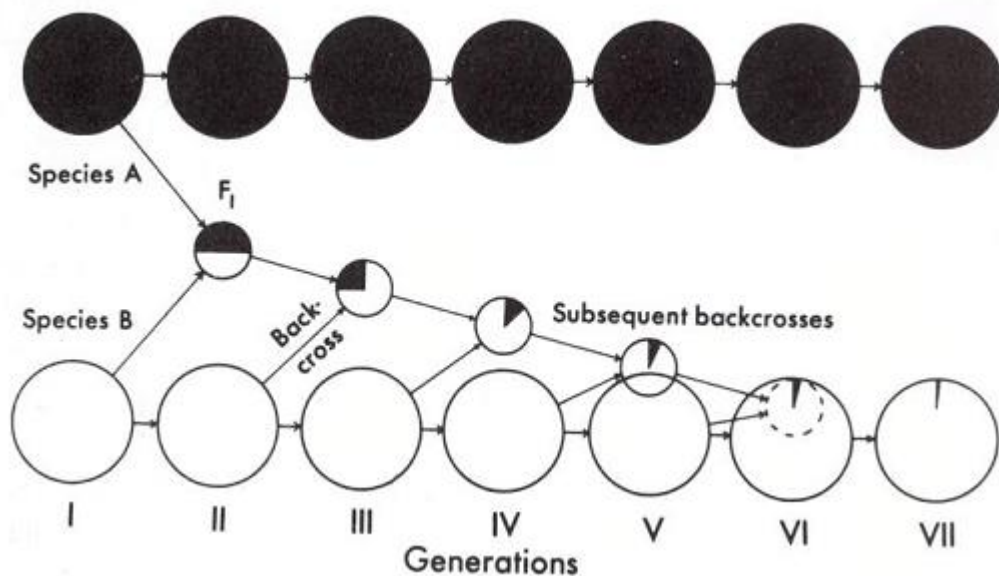


X



P. sativum WL1238





Crop - wild relatives introgression

