



Fakulta zemědělská
a technologická
Faculty of Agriculture
and Technology

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

Technologie detekce nositelů odolnosti vůči *Plasmodiophora brassicae* do šlechtitelského programu řepky

Technologie byla vypracována jako výstup projektu TAČR TREND
FW10010461 – Moderní technologie ve šlechtění olejnin a luskovin - zavedení
tvorby dihaploidů a molekulární identifikace donorů rezistence ve šlechtitelských
programech olejnin a luskovin

Autoři:

Mgr. et. Ing. Ondřej Hejna, Ph.D., Ing. Marie Pichová,
prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.

České Budějovice, 2025

Ověřená technologie:

Technologie detekce nositelů odolnosti vůči *Plasmodiophora brassicae* do šlechtitelského programu řepky

Autorský kolektiv: Mgr. et. Ing. Ondřej Hejna, Ph.D., Ing. Marie Pichová,
prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.

Fakulta zemědělská a technologická, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Obsah

Anotace technologie ČJ	1
Anotace technologie AJ	1
A. Předmět a cíl technologie	3
<i>Schéma infekčních experimentů, hodnocení indexu napadení, identifikace genů odolnosti a patotypů patogena:</i>	7
<i>Návrh postupů pro implementaci uvedených postupů do šlechtitelského programu:</i>	10
B. Vlastní popis technologie	12
<i>A. Hodnocení úrovně napadení a výběr donorů odolnosti k jednotlivým patotypům nádorovky na základě indexu napadení</i>	12
<i>B. Identifikace genů zapojených do reakce na napadení P. brassicae</i>	13
<i>C. PCR detekce kandidátních genů odolnosti a selekce vhodných rostlin na základě molekulární analýzy</i>	16
<i>D. Identifikace patotypů P. brassicae na základě biotestů</i>	20
<i>E. Molekulární identifikace patotypů P. brassicae</i>	20
C. Testování vlastní technologie – protokol o ověření	25
<i>1/ Ověření vypovídací schopnosti a spolehlivosti hodnocení indexu napadení</i>	25
<i>2/ Ověření postupu identifikace patotypů P. brassicae na základě biotestů a standardní Williamsovy klasifikace</i>	30
<i>3/ Ověření funkčnosti analýzy transkriptomu a postupu identifikace genů zapojených do reakce na napadení patogenem</i>	33
<i>4/ Ověření funkčnosti molekulárního postupu identifikace patotypů P. brassicae</i>	35
<i>Příklad kombinovaného postupu fenotypového hodnocení indexu napadení a molekulární detekce patotypů:</i>	36
Shrnutí	39
Použitá literatura	41

Anotace technologie ČJ

Ověřená technologie je výsledkem projektu TAČR TREND FW10010461 – Moderní technologie ve šlechtění olejnin a luskovin - zavedení tvorby dihaploidů a molekulární identifikace donorů rezistence ve šlechtitelských programech olejnin a luskovin.

V technologii je popsán komplexní postup inokulačních experimentů, získání patogenního materiálu, přípravy inokula, pěstování rostlin a způsobů aplikace inokula a vyhodnocení úrovně napadení rostlin, V druhé části technologie jsou pak uvedeny postupy molekulárních a bioinformatických analýz, anotace a predikce kandidátních genů rezistence a postupů pro detekci patotypů nádorovky.

Technologie tak uvádí ucelené postupy pro fenotypové a molekulární hodnocení genetických zdrojů rostlin a izolátů patogena a umožňuje zavedení těchto technologických postupů do šlechtitelského programu řepky.

Výsledkem využití této technologie mohou být genotypy řepky manifestující zvýšenou odolnost vůči jednotlivým patotypům nádorovky a znalost distribuce patotypů nádorovky v pěstitelské oblasti. Tyto informace pak mohou vést k cílenému šlechtění a pěstování genotypů řepky se zvýšenou odolností k patotypu, který se v dané oblasti převážně vyskytuje.

Anotace technologie AJ

The verified technology is the result of the project TAČR TREND FW10010461 – “Modern technologies in the breeding of oilseed and leguminous crops – introduction of doubled haploid production and molecular identification of resistance donors in oilseeds and legumes”.

The technology describes a comprehensive procedure for inoculation experiments, including the sampling of pathogenic material, inoculum preparation, plant cultivation, methods of inoculum application, and evaluation of the level of plant infection. The second part of the technology then presents the procedures for molecular and bioinformatics analyses, annotation and prediction of candidate resistance genes, and procedures for the detection of clubroot pathotypes.

The technology thus presents comprehensive procedures for phenotypic and molecular evaluation of plant genetic resources and pathogen isolates and enables the introduction of these technological procedures into the rapeseed breeding program.

The result of using this technology can be rapeseed genotypes exhibiting increased resistance to individual clubroot pathotypes and knowledge of the distribution of clubroot pathotypes in the cultivation area. This information can then lead to targeted breeding and cultivation of rapeseed genotypes with increased resistance to the pathotype that predominantly occurs in the given area.

A. Předmět a cíl technologie

Jedním ze současných problémů pěstování brukvovitých zelenin a olejnin je onemocnění známé jako nádorovitost košťálovin. Toto onemocnění způsobuje obligátní biotrofní patogen *Plasmodiophora brassicae*. Původce nádorovitosti košťálovin – nádorovka kapustová, *Plasmodiophora brassicae* – je řazena do superskupiny Rhizaria, kmene Cercozoa a třídy Phytomyxea (Cavalier-Smith a Chao 2003; Siemens et al. 2009; Neuhauser a Kirchmair 2011). Majoritním hostitelem jsou rostliny čeledi Brassicaceae a je původcem nádorovitosti košťálovin. Po infekci vytváří nádorovka na kořenech a hypokotylu „nádory“, které následně způsobí snížení toku živin a vody, což vede ke žloutnutí a deformaci listů, vadnutí, zastavení růstu rostlin a v pozdějším stádiu až smrt hostitelské rostliny (Malinowski et al. 2019; Javed et al. 2023). K hospodářsky nejvíce zasaženým patří například *B. napus* s poddruhy ssp. *oleifera* (řepka olejka), ssp. *napobrassica* (tuřín), *B. juncea* s poddruhem ssp. *oleifera* (řepice olejná), *B. rapa* s poddruhy ssp. *rapa* (vodnice), ssp. *chinensis* (čínské zelí), ssp. *pekinensis* (pekingské zelí), *B. oleracea* s poddruhy ssp. *italica* (brokolice), ssp. *botrytis* (květák), ssp. *capitata* (zelí), *gongyloides* (kedluben) ssp. *sabellica* (kadeřávek), ssp. *sabauda* (hlávková kapusta), ssp. *gemmifera* (růžičková kapusta), *Raphanus sativus* s poddruhy ssp. *major* (ředkev), ssp. *radicula* (ředkvička), ssp. *oleiferus* (ředkev olejná) (Rennie et al. 2013). V současnosti představuje nádorovka závažné problémy pro většinu brukvovitých olejnin a zelenin v celosvětovém měřítku, způsobuje významné ekonomické ztráty v zemědělství (Dixon 2009).

Z těchto důvodů je velká pozornost věnována šlechtění brukvovitých plodin, které by byly vůči nádorovitosti odolné. Do současné doby bylo identifikováno několik donorů odolnosti u druhů *B. rapa*, *B. oleracea*, *B. napus* a *B. nigra*. Donory odolnosti u *B. rapa* se nacházejí mezi vodnicemi, podobně u *B. napus* mezi tuříny. Částečně rezistentní odrůdy druhu *B. oleracea* byly objeveny mezi kadeřávkami. Naopak rezistentní genotypy zatím nebyly nalezeny u méně významných plodin spadající mezi druhy *B. juncea* a *B. carinata* (Diederichsen et al. 2009). Získání rezistentní linie požadovaného typu vyžaduje křížení a následně velice náročné zpětné křížení pro dosažení žádaného morfortypu a vyštěpením nežádoucích znaků. Druhým výrazně závažnějším problémem při šlechtění proti nádorovitosti představuje existence mnoha patotypů *P. brassicae* a schopnost vzniku nových (Diederichsen et al. 2009). Většina identifikovaných rezistentní genotypů představuje patotypově specifickou (kvalitativní) rezistenci, která často bývá založena pouze na jednom rezistentním (R) genu (monogenní rezistence). Kvantitativní (patotypově nespecifická) rezistence, často založená na mnoha genech menšího účinku (polygenní rezistence) byla pozorována převážně u *B. oleracea*, nicméně

nedosahuje takového efektu jako v případě kvalitativních rezistencí u *B. rapa*. Podle současných studií dochází u nádorovitosti k prolomení monogenní rezistence v průběhu 3 až 5 cyklů v závislosti na infekčním tlaku a vhodných podmínkách (LeBoldus et al. 2012). Do současné doby bylo nejvíce rezistentních lokusů a *R* genů objeveno v genomu *B. rapa*. Rezistence je v případě toho druhu často založena na jediném *R* genu, který byl pro dva rezistentní lokusy CRa a Crr1 naklonován (Ueno et al. 2012; Hatakeyama et al. 2013). Velice přesně bylo lokalizováno sedm dalších rezistentních lokusů v genomu *B. rapa* a předpokládá se přítomnost nejméně 10 dalších lokusů (Yu et al. 2017). Na rozdíl od *B. rapa* se v genomu *B. oleracea* doposud nepodařilo najít větší množství dominantních *R* lokusů. Rezistence je v tomto případě většinou založena na větším množství genů s menším účinkem, které většinou nezávisí na patotypu nádorovitosti (Zhang et al. 2016). Dominantní účinek je předpokládán u šesti rezistentních lokusů (Dakouri et al. 2018). Zbývající *R* oblasti jsou typické menším účinkem (Lee et al. 2016; Peng et al. 2018).

Druhým základním předpokladem šlechtění proti nádorovitosti je identifikace cílových patotypů *P. brassicae*. Identifikace patotypů je standardně prováděna biotesty. Nejstarší a stále často používaná klasifikace pomocí biotestů je Williamsova klasifikace (Williams et al. 1966). Pomocí této klasifikace je možné rozlišit 16 různých patotypů. Další možný testovaný soubor genotypů, který je mezinárodně uznávaný, nese označení ECD (European Clubroot Differential). Je využíván hlavně v Evropě (Buczacki et al. 1975). Tento soubor se skládá z pěti různých genotypů *B. rapa*, *B. oleracea* a *B. napus*. Hodnotí se projev napadení u 15 odlišných genotypů, podle kterých je možné reálně odlišit až 23 různých patotypů, teoreticky až 48 (Diederichsen et al. 2009). Pro *B. napus* byl dále, pro lepší rozlišovací schopnost evropských patotypů, navržen doplňkový soubor třech testovacích linií. Pomocí těchto třech genotypů je možno rozlišit dalších 8 patotypů *P. brassicae* (Some et al. 1996).

Rozvoj molekulárních/omics technologií umožňuje analýzu celých genomů a to otevírá možnosti pro identifikaci genů zapojených do reakce na napadení patogenem a vývoje molekulárních selekčních markerů a v případě analýzy genomu patogena tyto přístupy umožňují identifikaci jednotlivých patotypů na základě dat z celogenomového sekvenování.

Cílem této technologie je uvést detailní komplexní postup detekce donorů zvýšené odolnosti vůči *P. brassicae* a identifikace jednotlivých patotypů patogena na základě fenotypových a molekulárních analýz či jejich kombinace. Zavedení této technologie

do šlechtitelské praxe umožní výběr odpovídajících genetických zdrojů a selekci genotypů se zvýšenou odolností k nádorovce ve šlechtitelských populacích a cílené šlechtění na odolnost k jednotlivým patotypům. Získané genotypy/odrůdy pak mohou být cílené do pěstitelských oblastí s výskytem daného patotypu.

Schéma infekčních experimentů, hodnocení indexu napadení, identifikace genů odolnosti a patotypů patogena:

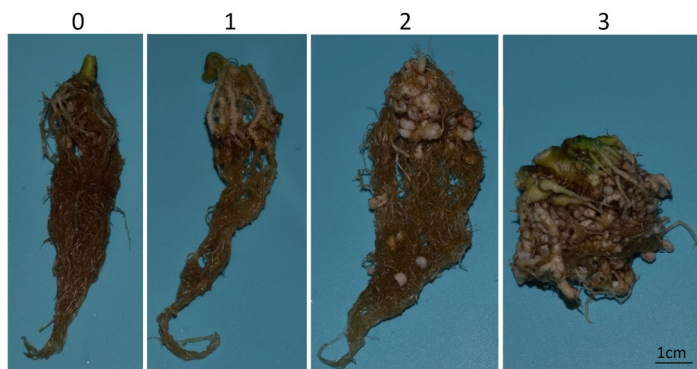
A. Hodnocení úrovně napadení a výběr donorů odolnosti k jednotlivým patotypům nádorovky na základě indexu napadení

1. Namnožení patogenního materiálu, příprava inokula a inokulace rostlin

2. Pěstování rostlin po inokulaci



3. Hodnocení míry napadení a tvorby nádorů



Čtyři kategorie poškození kořenového systému.

4. Vyhodnocení úrovně napadení a výpočet indexu napadení



B. Identifikace genů zapojených do reakce na napadení *P. brassicae*

1. Vyhodnocení úrovně napadení na základě indexu napadení u testované kolekce genotypů
2. SNP a GEM asociační analýza
3. Anotace a predikce kandidátních genů
4. Validační experiment a výběr vhodných genů/markerů pro selekci

C. Identifikace patotypů *P. brassicae* na základě biotestů

1. Získání geneticky uniformní populace jednotlivých patotypů
2. Příprava inokula a inokulace rostlin
3. Vyhodnocení úrovně napadení u testovacího souboru
4. Interpretace výsledků biotestů na základě Williamsovy klasifikace



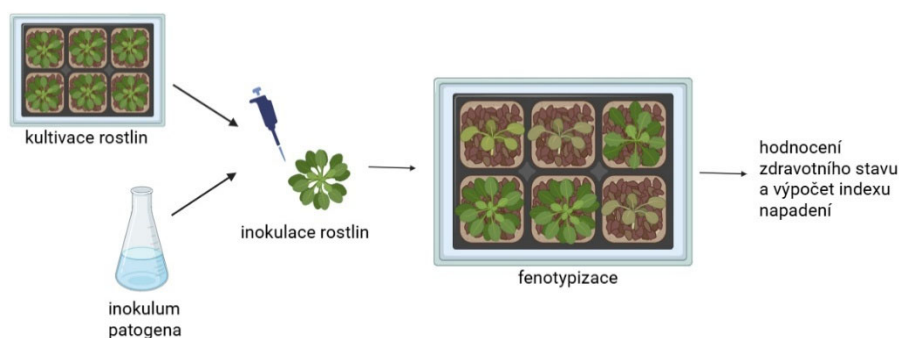
D. Molekulární identifikace patotypů *P. brassicae*

1. Extrakce a purifikace dormantních spór
2. Extrakce DNA ze spór, příprava sekvenační knihovny a NGS sekvenování
3. Bioinformatické zpracování sekvenačních dat
4. Identifikace oblastí genomu patogena s unikátní sekvencí pro daný patotyp a návrh primerů pro PCR detekci patotypu
5. PCR analýza a identifikace patotypů *P. brassicae*

Návrh postupů pro implementaci uvedených postupů do šlechtitelského programu:

I. Fenotypové postupy hodnocení indexu napadení a identifikace patotypů na základě biotestů

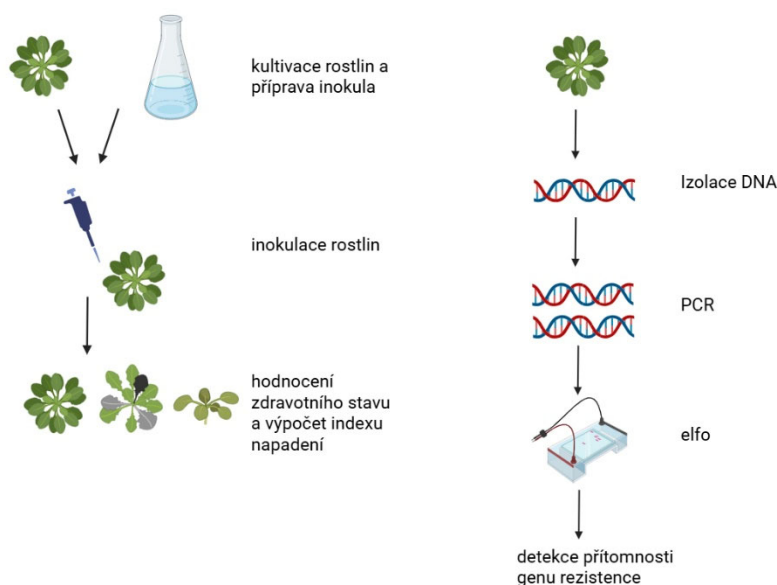
(v případě, že pracoviště nedisponuje molekulární laboratoří)



Created in BioRender.com

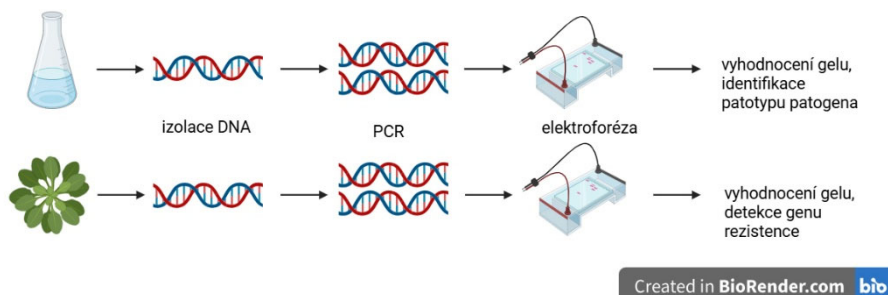
II. Kombinace fenotypových postupů hodnocení indexu napadení doplněné o PCR detekci kandidátních genů odolnosti a PCR detekce patotypů *P. brassicae*

(v případě, že pracoviště disponuje standardně vybavenou molekulární laboratoří pro PCR analýzy)



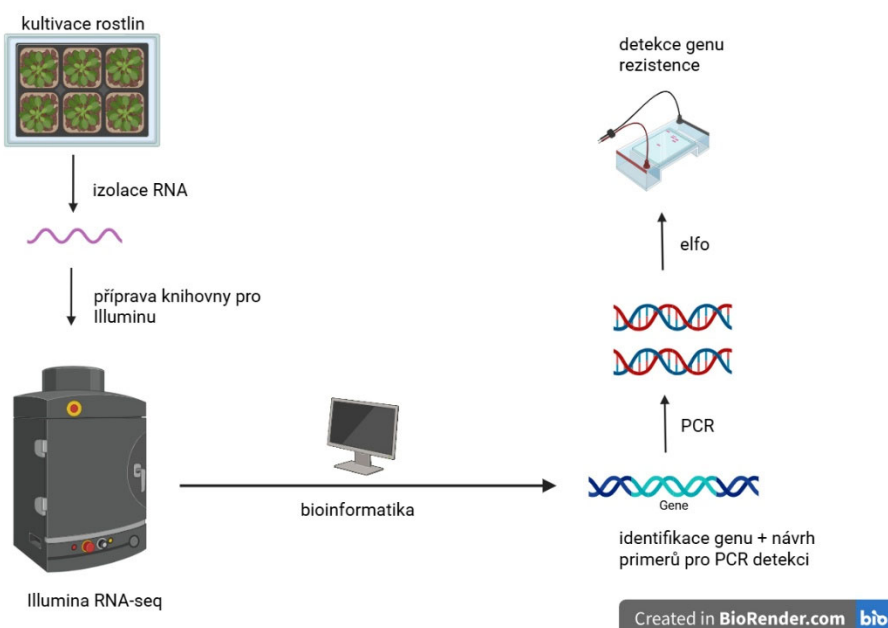
Created in BioRender.com

III. PCR detekce kandidátních genů odolnosti a selekce vhodných rostlin na základě molekulární analýzy a PCR detekce patotypů *P. brassicae*
(v případě, že pracoviště disponuje standardně vybavenou molekulární laboratoří pro PCR analýzy)



IV. Identifikace genů odolnosti, vývoj selekčních markerů a molekulární identifikace patogena

(v případě že pracoviště disponuje molekulární laboratoří pro pokročilé analýzy transkriptomu, přípravu knihoven, sekvenování a technologiemi pro bioinformatické zpracování dat a vývoj markerů a protokolů pro molekulární detekci)



B. Vlastní popis technologie

A. Hodnocení úrovně napadení a výběr donorů odolnosti k jednotlivým patotypům nádorovky na základě indexu napadení

Patogenní materiál použitý pro testování citlivosti rostlin k nádorovitosti byl nasbíráán v ČR v pěstitelských oblastech s potenciálním výskytem tohoto patogena. Po namnožení polních sběrů, byly jednotlivé patotypy *P. brassicae* převedeny na geneticky uniformní populace a určeny do jednotlivých skupin podle práce Williams et al (1966) a byl namnožen materiál pro infekční experimenty. Napadené kořeny s nádory uloženy do mrazicího boxu při teplotě -26 °C. Při přípravě nového inokulačního media byly nejprve nádory rozmrazeny, mechanicky očištěny a opláchnuty v destilované vodě. Následně byly nádory společně s destilovanou vodou rozmixovány v mixeru. Po 5 minutách mixování byla výsledná suspenze přefiltrována přes jemnou tkaninu a poté centrifugována 20 minut na nejvyšší otáčky. V posledním kroku byly pozorované shluky spor přeneseny do zkumavky s destilovanou vodou a za pomoci Bürkerovy komůrky byl roztok dále ředěn až na požadovanou koncentraci 10^8 spor na 1 ml inokulačního media (Chytilová and Dušek 2007).

Infekční experimenty byly prováděny po 6 rostlinách na testovaný genotyp ve čtyřech opakováních. Rostliny byly infikovány sporami a po 7 týdnech vyhodnocena míra napadení. Substrát pro výsev byl vytvořen smícháním standardního zahradního substrátu B (Forestina) a perlitu v poměru 1:1. Připravený mix byl rozsypan do sadbovačů o velikosti 4 x 4 cm. Do každé buňky sadbovače bylo umístěno jedno semeno do cca 0,5cm hluboké jamky, do které bylo pomocí pipety aplikováno 1 ml připraveného roztoku spor o koncentraci 10^6 spor na 1 ml inokula. Testované rostliny byly pěstovány za laboratorních podmínek v kultivačních místnostech při teplotě 20 °C přes den a 18 °C v noci. Intenzita osvětlení dosahovala 80 – 100 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ po dobu 16 hodin. Po dvou týdnech zalévání vodou byly rostliny přihnojovány plno spektrálním hydroponickým hnojivem Jungle Garden - base a Jungle Garden - listová zelenina dle specifikace výrobce.

Jako kontrola správné inokulace byla použita velmi citlivá odrůda čínského zelí *B. rapa* var. *pekinensis* 'Granaat', u které byla provedena kontrola 4. týden od výsevu, zda dochází k tvorbě nádorů. Ostatní testované odrůdy a genotypy byly hodnoceny na přítomnost nádorů na kořenech po 7 týdnech od výsevu.

Míra napadení kořenového systému u testovaných rostlin byla provedena standardní metodou, jejíž výsledkem je hodnota indexu napadení DI (disease index)

pro každý genotyp. Po 7 týdnech od výsevu byly kořeny hodnoceny podle míry poškození na čtyřstupňové škále (0, 1, 2, 3), kde jednotlivé hodnoty odpovídají následovně: 0 = bez příznaků napadení, 1 = malé nádory na postranních kořenech, 2 = nádory se vyskytují i na hlavním kořenu, 3 = celý kořenový systém je kompletně deformovaný nádory (Buczacki et al. 1975). Ze získaných hodnot byl pak pro každou tetovanou rostlinu vypočítán DI následující rovnicí:

$$DI = [(n_1 + 2n_2 + 3n_3) / (N_T \times 3)] \times 100$$

n_1 = počet rostlin daného genotypu se stupněm 1

n_2 = počet rostlin daného genotypu se stupněm 2

n_3 = počet rostlin daného genotypu se stupněm 3

N_T = celkový počet rostlin daného genotypu

Pro popis odolných a citlivých genotypů byla použita terminologie citlivé $DI > 80$, odolné $DI < 20$ (Chytilová and Dušek 2007; Li et al. 2016).

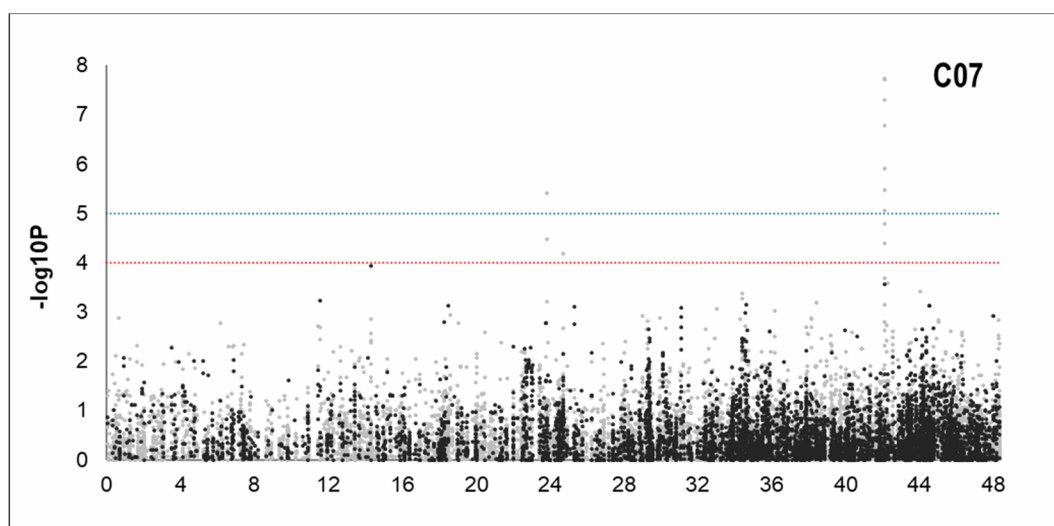
B. Identifikace genů zapojených do reakce na napadení *P. brassicae*

Pro bioinformatické analýzy byla použita data z analýzy transkriptomu (RNA-seq analýza kolekce brukvovitých rostlin) a fenotypová data z infekčních experimentů. Asociační analýzy vedou k nalezení SNP markerů, které jsou v těsné vazbě s externím znakem, nebo ke stanovení vazby mezi genovou expresí a indexem napadení. Podle polohy asociovaných SNP markerů lze dohledat úzkou oblast, skupinu genů nebo dokonce i přímo příčinný gen stojící za externím znakem. K provedení asociační analýzy byl použit program R (R core team 2013) s integrovaným balíčkem Genome Association and Prediction Integrated Tool (GAPIT) využívající smíšený lineární model zahrnující fixní a náhodné efekty (Lipka et al. 2012). Do programu bylo nahrána Q matice reflektující strukturu populace vygenerovaná metodou PSIKO (Popescu et al. 2014) a sada SNP markerů. Bylo použito 256 397 SNP markerů, které se nacházely nad prahovou hodnotou $MAF > 0,01$. Na základě GEM asociační analýzy byla stanovena vazba mezi genovou expresí a indexem napadení DI a tato asociační analýza využívá lineární regresi mezi expresním profilem genu v kolekci jako závislou proměnnou a profilu indexu napadení jako nezávislou proměnnou. Expresní profily byly získány z míry exprese vyjádřená v RPKM pro jednotlivé geny. Expresce jsou vypočítané z RNAseq dat jednotlivých genotypů. Celkem byla použito 53 889 genů ($RPKM > 0,4$). K provedení

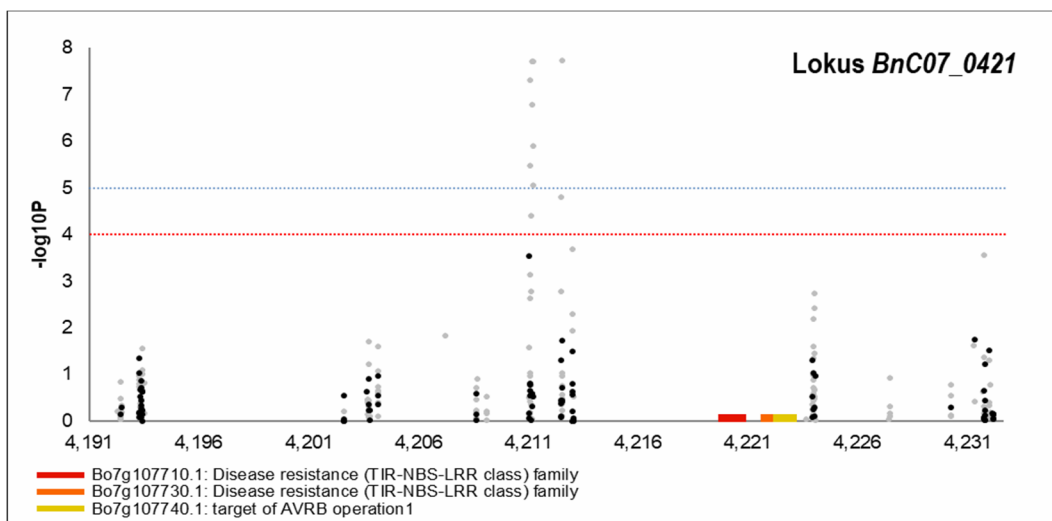
asociační analýzy a zpracování grafického výstupu byl použit program R (R core team 2013).

Pro označení oblastí s kandidátními geny SNP analýzy byly stanoveny dvě prahové hodnoty vymežující užší a širší oblast. Potenciálně důležité geny byly umístěny ve vzdálenosti 200 000 bp od SNP s hodnotou $-\log_{10}P > 4$ a samotné kandidátní geny byly vybírány z užší oblasti do 100 000 bp v rámci polohy na chromozomech. Skupiny genů, ze kterých byly vybrány kandidátní geny pro GEM analýzu, zahrnovaly všechny geny s hodnotami významnosti $-\log_{10}P > 3,5$. Anotace genů, přidružení GO termínů a InterPro analýza byla provedena na základě podobnosti (blastn, e-hodnota $\leq 1E-03$) mezi všemi identifikovanými geny v *Brassica napus* (He et al. 2017) a geny *Arabidopsis thaliana* z aktuální verze genomu araport11 z databáze TAIR (<https://www.arabidopsis.org>). K přidružení GO termínů byla použita nejvíce zastoupená kategorie biologických procesů (BP) získána také v databázi TAIR. V případě InterPro analýzy byla použita databáze EMBL-EBI (<https://www.ebi.ac.uk/interpro>). Na základě takto anotovaných genů byly vybrány finální kandidátní geny pro jednotlivé analýzy.

Grafický výstup SNP asociační analýzy je vyjádřen ve formě tzn Manhattan plotu, který představuje na horizontální ose polohu všech testovaných SNP markerů na pseudomolekule DNA a vertikální osa zobrazuje záporné hodnoty $\log_{10}P$, představující míru asociace s měřeným znakem, v tomto případě DI nádorovitosti.

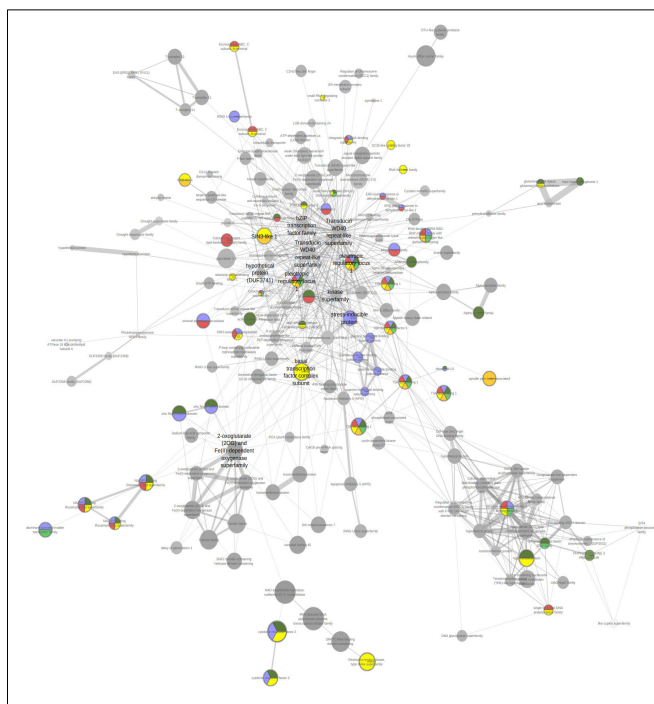


Manhattan plot SNP asociační analýzy pro chromozom C07.



Manhattan plot SNP asociční analýzy pro lokus BnC07_0421.

Bioinformatická analýza WGCNA (Weighted gene co-expression network analysis), na základě vytvoření koexpresních sítí ukázala na potenciálně velké množství kandidátních genů zapojených do obranné reakce k nádorovitosti. Vzhledem k velkému počtu kandidátních genů byla provedena navazující analýza umožňující se zaměřit jen na klíčové, předpokládáme, že nejdůležitější geny zapojené do obranné reakce. Konkrétně byla provedena analýza označovaná jako Hub Gene Analysis (analýza hub genů).



Příklad výstupu WGCNA analýzy a vizualizace koexpresní sítě genů zapojených do reakce na napadení *P. brassicae*.

Pro nalezení nejdůležitějších (klíčových) genů v koexpresní síti volné topologie lze využít informace o počtu identifikovaných spojení mezi geny v síti. Horních 5 % nejvíce propojených genů bylo považováno za „hub“ geny (klíčové geny). Z předchozích analýz vyplývá, že do reakce na infekci *P. brassicae* jsou zapojeny řádově nižší stovky genů, z nichž 11 genů překročilo 5% hranici po Hub Gene Analysis. Jedná se o geny (BnaC04g51160D, Bo7g099220.1, Bo3g034720.1, Bo9g148100.1, Bo3g103420.1, Bo9g095710.1, Bo8g033950.1, BnaC04g26030D, Bo2g098970.1, Cab035124.1, BnaA03g07940D). Počet interakcí těchto genů shrnuje následující tabulka.

hub gene	connection
BnaC04g51160D	94
Bo7g099220.1	71
Bo3g034720.1	63
Bo9g148100.1	42
Bo3g103420.1	40
Bo9g095710.1	36
Bo8g033950.1	35
BnaC04g26030D	27
Bo2g098970.1	27
Cab035124.1	25
BnaA03g07940D	22

Z tabulky je patrné, že bylo vyžadováno alespoň 22 interakcí s ostatními geny v síti. Následná anotace těchto genů ukázala, že se většinou jedná o transkripční faktory s doménou obranných a stresových reakcí, především doménou WD40 (BNAC04G51160D, BO7G099220.1). Dále se zde objevují geny s vysokou podobností k PRL1 (BO3G103420.1, BO8G033950.1). Tento gen byl již dříve potvrzen jako klíčový pro základní obranné mechanismy u rostlin (Palma et al 2007).

C. PCR detekce kandidátních genů odolnosti a selekce vhodných rostlin na základě molekulární analýzy

Na základě analýzy transkriptomických a fenotypových dat bylo vytipovány kandidátní geny podmiňující rezistenci vůči jednotlivým patogenům *P. brassicae*. Na příkladu čtyřech genů je uveden postup molekulární detekce SNP markerů a výběru rostlin s potenciálem vyšší odolnosti k *P. brassicae*.

Izolace DNA z rostlinného materiálu

Izolace je prováděna z děložních nebo prvních pravých listů rostlin. Semena jsou vyseta do výsevního substrátu nebo perlitu. Rostliny se nechají vyrůst do fáze plně vyvinutých děložních lístků, tento proces trvá přibližně jeden týden. Odběr vzorků pro izolaci DNA v této fázi se jeví jako optimální, protože koncentrace DNA je velmi vysoká a děložní lístky jsou velmi měkké a je možné je velmi snadno homogenizovat. Dalším typem materiálu jsou plně vyvinuté první pravé listy. Z odebraného vzorku listu (disk o průměru 8-10 mm) je izolována DNA např. pomocí modifikované CTAB-PVP metody (Doyle 1991).

Metoda je založena na schopnosti CTAB (cetyltrimetylamoniumbromid) vytvářet komplex s nukleovými kyselinami, který je při vysoké koncentraci solí rozpustný (0,7M NaCl), ale při snížené koncentraci solí (0,45M NaCl) vytváří sraženinu (Murray a Thompson, 1980). CTAB zároveň působí jako detergenční činidlo, které uvolňuje DNA z komplexu membrán a proteinů. Na základě rozdílné rozpustnosti CTAB v porovnání s DNA jej lze oddělit a získat dostatečně čistou rostlinnou DNA. Tato izolační metoda je vhodná pro izolaci DNA z většího množství rostlinného materiálu. Získaná DNA je velmi kvalitní a čistá, při dlouhodobém skladování nedegraduje.

Pracovní postup:

- homogenizace vzorku pomocí homogenizátoru (např. Beat Ruptor 96) po dobu 30 sec a při maximální frekvenci
- ke zhomogenizovanému materiálu přidat 1000 μ l extrakčního pufru (990 μ l 2x CTAB-PVP +10 μ l β -merkaptoethanol), materiál promíchat s pufrem (v případě čerstvého materiálu nebo menšího množství listů je možné objem extrakčního pufru snížit na polovinu). Použitému objemu je nutné vybrat vhodný objem mikrocentrifugačních zkumavek (1,5 nebo 2,0 ml)
- nechat 45-60 min inkubovat při 65 °C ve vodní lázni, promíchat každých 15 minut
- centrifugovat na 14 000 rpm (maximum) 10 minut – v případě velkého znečištění je možné tento krok prodloužit na 15 minut
- převést supernatant do nových mikrocentrifugačních zkumavek
- přidat 750 μ l chloroformu : IAA (24 : 1) a 10 min nechat protřepávat (v případě použití polovičního objemu extrakčního pufru se přidává pouze 500 μ l chloroformu : IAA)
- centrifugovat 5 min na maximum
- přepipetovat vodnou fázi do nových mikrocentrifugačních zkumavek
- přidat 1/5 (cca 100-200 μ l) 5% CTAB a promíchat
- přidat 750 μ l chloroformu : IAA (24 : 1) a 10 minut protřepávat (v případě použití polovičního objemu extrakčního pufru se přidává pouze 500 μ l chloroformu : IAA)
- centrifugovat 5 min na maximum
- přepipetovat vodnou fázi do nových mikrocentrifugačních zkumavek

- přidat 2/3 izopropanolu, 2-3x promíchat
- nechat v -20 °C přes noc
- centrifugovat 5 minut na maximum při 4 °C
- odstranit supernatant
- přidat 300 µl TE pufru a nechat 30-60 minut rozpouštět na třepačce při 37 °C
- přidat 2 objemy (600 µl) 96% studeného ethanolu (z mrazáku), 2-3x promíchat
- nechat v -20 °C 20 min - 12 hod (přes noc)
- centrifugovat 10 minut na maximum při 4 °C
- odstranit supernatant
- přidat 1000 µl 70% studeného etanolu (z mrazáku) a promíchat
- centrifugovat 2 min na maximum
- odstranit supernatant
- přidat 1000 µl 70% studeného etanolu a promíchat
- centrifugovat 2 min na maximum
- přebytečnou tekutinu odpipetovat a nechat sušit při 37 °C po dobu 15-20 minut (nenechat pelet přeschnout, špatně se rozpouští)
- přidat 100 - 200 µl TE pufru (podle množství peletu) a cca 40 minut nechat rozpouštět při 37 °C
- skladovat v -20 °C

Koncentrace a kvalita DNA jsou ověřeny spektrofotometricky (BioSpec-nano, Shimadzu, Japonsko), koncentrace DNA je vyjádřena v ng/µl, poměr 260/280 by měl být v ideálním případě v rozmezí 1,8-2,0 a poměr 260/230 by měl mít hodnoty od 2,0 do 2,2. Vysoce kvalitní genomová DNA z každého izolátu je následně použita pro PCR testy.

PCR analýza a elektroforéza v agarózovém gelu:

Vzhledem k cíli analýz – detekce SNPs je nutno použít specifické DNA polymerázy pro highfidelity PCR (Hi-Fi PCR). Získané amplikony jsou sekvenovány a po vyhodnocení sekvenačních dat jsou identifikované rostliny nesoucí příslušný SNP marker.

Kandidátní geny podmiňující rezistenci vůči *P. brassicae*, patotyp P2:
Cab028881.1

Kandidátní geny podmiňující rezistenci vůči *P. brassicae*, patotyp P4:
BnaA03g45000D

Kandidátní geny podmiňující rezistenci vůči *P. brassicae*, patotyp P7:
Bo3g087130.1

Detekovaný gen	Sekvence primerů (5' – 3')	Teplota nasedání
Cab028881.1	F: ACTGCGCTGCACATCAATTG R: ATGCGGACATAGCGAGTGAG	65 °C
BnaA03g45000D	F: TGCAGGTAAGCTCCCTTTGG R: CCCTGCAAAGAACCCAACG	65 °C
Bo3g087130.1	F: AATCTTCCCCAGCTTCCACG R: TCGCCCCCATCTTTTGTCAG	65 °C

Reakce probíhá v objemu 10 µl a složení PCR reakce pro amplifikaci cílových sekvencí je následující:

- 5 µl Master Mix s Hi-Fi DNA polymerázou (např. Phusion High-Fidelity DNA Polymerase)
- 3,75 µl PCR vody
- 0,1 µl každého primeru (10 pmol)
- 0,05 µl BSA
- 1 µl DNA (5-10 ng/µl)

Teplotní cyklus:

počáteční denaturace	5 min	94 °C
30 cyklů	30 s	95 °C
	30 s	<i>teplota nasedání dle primeru</i>
	1 min	72 °C
konečná elongace	5 min	72 °C
stop	∞	4 °C

PCR produkty jsou separovány a vizualizovány pomocí gelové elektroforézy v agarózovém gelu, PCR fragmenty jsou vyříznuty z gelu a přečištěny pomocí např. NucleoSpin® Gel a PCR Clean-up kitu (Macherey-Nagel). Poté jsou fragmenty odeslány do sekvenační laboratoře a sekvenovány. Na základě získaných sekvencí jsou vybrány rostliny nesoucí požadovaný SNP marker.

D. Identifikace patotypů *P. brassicae* na základě biotestů

Patogenní materiál, příprava inokula, pěstování rostlin, inokulace a vyhodnocení úrovně napadení byla provedena podle postupů uvedených v bodu "A" této technologie.

Jako kontrola správné inokulace byla použita velmi citlivá odrůda čínského zelí *B. rapa* var. *pekinensis* 'Granaat', u které byla provedena kontrola 4. týden od výsevu, zda dochází k tvorbě nádorů. Ostatní testované genotypy byly hodnoceny na přítomnost nádorů na kořenech po 7 týdnech od výsevu.

Pro klasifikaci patotypů byla využita Williamsova klasifikace izolátů *P. brassicae* (Williams 1966) a inokulovány byly čtyři genotypy testovacího souboru:

Brassica oleracea var. *capitata* cv. Jersey Queen – ECD13

Brassica oleracea var. *capitata* cv. Badger shipper – ECD 11

Brassica napus ssp. *rapifera* cv. Wilhelmsburger – ECD10

Brassica napus ssp. *napobrassica* cv. Laurentian – LAU.

Na základě zjištěného DI u tohoto testovacího souboru byl určen patotyp patogena.

E. Molekulární identifikace patotypů *P. brassicae*

Molekulární identifikace patotypů byla provedena na základě celogenomového sekvenování a identifikace unikátních oblastí v genomu jednotlivých patotypů. Pro účely celogenomového sekvenování byly infekční experimenty provedeny hydroponicky v perlitu, aby se minimalizovalo znečištění substrátem. Po devíti týdnech od inokulace byly nádory na kořenech omyty od perlitu a uloženy v mrazicím boxu při teplotě $-26\text{ }^{\circ}\text{C}$ až do dalšího zpracování. Pro extrakci DNA byl pro každý vzorek vybrán vhodný nádor o hmotnosti přibližně 25 g. Poté byla provedena důkladná povrchová dezinfekce v třicetiprocentním roztoku sava po dobu 10 minut, následně 1 minutu v devadesátiprocentním etanolu a 20 minut ve dvouprocentním roztoku chloraminu T. V posledním kroku byly nádory opláchnuty ve sterilní destilované vodě. Povrchově dezinfikovaný nádor byl umístěn do sterilní nádoby mixéru s 250 ml sterilní destilované vody. Po 5 minutách mixování byla kapalina přeceděna přes tři vrstvy sterilní netkané textilie. Část vzniklého roztoku se spórami byla nalita do zkumavky o objemu 50 ml a centrifugována 10 minut při 2000 RCF. Poté byl odstraněn supernatant a přidána další část přecezeného roztoku. Proces centrifugace a odstranění supernatantu se opakoval, dokud nebyl zpracován celý přecezený roztok. Po finálním odstranění supernatantu bylo do zkumavky přidáno 5 ml šedesátiprocentní sacharózy. Zkumavka byla důkladně

protřepána a opět centrifugována 10 minut při 2000 RCF. Výsledný supernatant byl přelit do nové zkumavky a doplněn destilovanou vodou na přibližně 40 ml. Po ručním protřepání byl roztok opět centrifugován a supernatant odstraněn. Stěny zkumavky lze opatrně opláchnout vodou, aby nedošlo k poškození peletu se spórami. Přechozí kroky s přidáním vody a centrifugací byly zopakovány ještě dvakrát pro odstranění sacharózy. V posledním kroku byl pelet důkladně protřepán v 5 ml vody, čímž bylo získáno 5 ml vysoce koncentrovaného roztoku extrahovaných spór. Extrahovaný roztok spór je nutné důkladně přečistit. K tomuto účelu byl použit zjednodušený Ludoxový gradient. K 5 ml koncentrovaného roztoku spór bylo přidáno 5 ml Ludoxu HS 40 a roztok byl důkladně promíchán. Poté bylo do zkumavky po stěně opatrně pipetou přidáno 5 ml čtyřicetiprocentního, třicetiprocentního, dvacetiprocentního a desetiprocentního Ludoxu. Posledních 5 ml tvořila destilovaná voda. Zkumavka byla opatrně přenesena do centrifugy, kde se centrifugovala 30 minut při 1000 RCF. Ve vzniklém Ludoxovém gradientu byla vizuálně identifikována vrstva spór, která byla opatrně přenesena pipetou do nové zkumavky. Následně byly provedeny kroky k odstranění Ludoxu z roztoku. Desetkrát byla do zkumavky přidána voda, spory promíchány, centrifugovány 10 minut při 2000 RCF a supernatant odstraněn. Výsledný pelet přečištěných spór byl pipetou rozmíchán v 5 ml vody a přenesen do tří mikrozkuvek, které byly v posledním kroku opět centrifugovány. Výsledný pelet extra čistých spór byl poté použit k izolaci genomové DNA.

Purifikované spóry patogenu ve formě peletu byly ponechány v 2ml mikrozkuvkách a byla provedena izolace DNA. V prvním kroku extrakce genomové DNA byly do zkumavek přidány ocelové kuličky, a obsah byl třepán v homogenizátoru třikrát po 1 minutě při 20 otáčkách za sekundu. Následně byla použita standardní extrakční metoda CTAB. V poslední fázi byl vysušený pelet DNA rozpuštěn ve 40 μ l TE pufru ve vodní lázni při teplotě 37 °C. Z izolované DNA byly připraveny knihovny pro sekvenování a samotné sekvenování bylo provedeno na přístroji Illumina NovaSeq. Na každý vzorek bylo vygenerováno minimálně 10 milionů párových sekvencí o délce 150 bp. Toto množství by mělo zajistit více než stonásobné pokrytí genomu *P. brassicae*, jehož velikost je odhadována na 25 Mb.

Získaná sekvenační data byla podrobena bioinformatické analýze. V prvním kroku byla kvalita dat vyhodnocena programem FastQC. Standardně bylo přistoupeno k odstranění malého množství nekvalitních sekvencí nebo k jejich zkrácení. Na základě použitého sekvenačního protokolu byly vyhledány adaptorové sekvence, které byly následně validovány programem BBtools. Filtrace na základě kvality a přítomnosti zbytkových adaptorových sekvencí byla provedena programem Trimmomatic. Výsledky tohoto kroku byly opět zkontrolovány programem FastQC. I přes vysokou čistotu použitých spór data ukázala na přítomnost malého množství hostitelské DNA. Z tohoto důvodu bylo přikročeno k jejímu odstranění na základě referenční genomické sekvence hostitelské rostliny. Mapování sekvencí na

referenční genom bylo provedeno programem STAR. Všechny namapované hostitelské sekvence byly z dalšího zpracování vyřazeny.

Vzhledem k nepředvídatelnosti patogenních genomů byl při rekonstrukci zvolen opatrný přístup, kdy byly testovány dva různé assembly a dva programy pro scaffolding. Prvotní rekonstrukce genomů jednotlivých vzorků byla provedena metodou de novo, protože jsme se snažili co nejvíce zachytit změny v jednotlivých patotypech. K tomuto účelu byly vybrány dva programy, SPAdes a Unicycler, u kterých máme z předchozích zkušeností výborné výsledky pro organismy podobného typu a velikosti genomu. Výsledkem tohoto kroku bylo sestavení sekvencí do contigů. Všechny rekonstruované sekvence kratší než 500 bp byly z dalšího zpracování vyřazeny.

Výhodou sekvenování pomocí technologie Illumina je vysoká přesnost a relativně nízká cena za osekvenovanou bázi. Nevýhodou však je, že získané sekvence jsou pouze 150 bp dlouhé. I když jsou v párech, bez jasného překryvu nelze určit, jak jsou jednotlivé páry od sebe vzdálené. Tímto vzniká problém při překlenutí repetitivních oblastí, jejichž délka přesahuje 150 bp. Dlouhé repetitivní oblasti jsou s těmito daty prakticky nepřekonatelné. Pro naše účely nejsou tyto oblasti důležité, nicméně pro rekonstrukci genomu na úrovni chromozómů je nutné spojit jednotlivé contigy pomocí scaffolding. K tomuto účelu byly opět použity dva různé programy, Medusa a Ragout. Jako referenční sekvence chromozómů byla použita sekvence GCA_036867785.1_ULAVAL_Pb3A_genomic.fna stažená z databáze NCBI. Vzhledem k tomu, že izolovaná DNA obsahuje také mitochondriální sekvenci, byla přidána ještě referenční sekvence mitochondria CM077642.1 z databáze NCBI.

Celkově byly pro každý ze sekvenovaných vzorků sestaveny čtyři různé genomy, které vznikly použitím kombinací dvou de novo assemblerů (SPAdes, Unicycler) a dvou scaffolderů (Medusa, Ragout). Nejlepší kombinace byla vybrána na základě tří různých kritérií: podobnosti, kompletnosti a přesnosti. K hodnocení podobnosti byl použit program QUAST, jehož výstup posuzoval hlavně celkovou délku, počet sestavených sekvencí v porovnání s počtem chromozómů v referenční sekvenci, statistické hodnoty N50, NG50 a další. Kompletnost byla hodnocena pomocí programu BUSCO. Jako referenční databáze genů byla zvolena eukaryota_odb10, protože bližší soubor genů nádorovitosti v systému zatím není k dispozici. Klíčovou hodnotou pro porovnání byl počet nalezených BUSCO genů a jejich fragmentů. Přesnost sestavených genomů byla vyhodnocena na základě výstupu z programu Qualimap, přičemž byla hodnocena primárně chybovost a uniformita pokryvu.

Na základě kritérií podobnosti, kompletnosti a přesnosti byla jako nejvhodnější varianta vybrána kombinace programů de novo assembler SPAdes a scaffolder Ragout. Obecně lze říci, že žádný z programů nevygeneroval špatný výsledek, a jakákoli kombinace by pro naše účely byla dostačující.

Pro každý vzorek byl vybrán genom vytvořený pomocí programů SPAdes a Ragout. Ostatní možnosti byly vyřazeny z dalšího zpracování. V poslední fázi tvorby genomu byl použit program Pilon, jehož úkolem je využít sekvenované páry k dalšímu

Velikost produktu: 583

Složení PCR reakce:

10 μ l	PPP Master Mix
1 μ l	F primer
1 μ l	R primer
1 μ l	templátová DNA
7 μ l	PCR H ₂ O

Průběh PCR reakce:

<u>Kroky</u>	<u>Teplota</u>	<u>Doba</u>	<u>Počet cyklů</u>
Úvodní denaturace	94 °C	10 min	1
Denaturace	94 °C	15 s	30
Nasednutí primerů	60 °C	15 s	30
Extenze	72 °C	1 min	30
Finální extenze	72 °C	10 min	1
Chlazení	4 °C	∞	1

C. Testování vlastní technologie – protokol o ověření

Ověření navrženého technologického postupu bylo provedeno u všech čtyřech bodů uvedených v kapitole „Vlastní popis technologie“, tj. u dvou postupů založených na fenotypovém hodnocení na základě biotestů a u dvou postupů založených na molekulárních analýzách.

1/ Ověření vypovídací schopnosti a spolehlivosti hodnocení indexu napadení

Vyhodnocení indexu napadení bylo provedeno na kolekci genetických zdrojů řepky. Výsledky jsou uvedeny v následující tabulce. Za GZ odolný k *Plasmodiophora brassicae* lze považovat materiál, jehož ID dosahuje hodnot 0–10. V pokusném souboru bylo determinováno 14 GZ, vykazujících jistou míru odolnosti k napadení. V případě velmi odolných GZ (ID 0) se jednalo o odrůdy tzv. pícního typu (např. Wilma, Dino, Napoleon), jako velmi perspektivní se ale jeví i moderní DH linie z opavského šlechtění. Vybrané materiály jsou vhodné k využití ve šlechtitelských programech.

Výsledky testu odolnosti vybraných GZ k smíšenému polnímu izolátu *Plasmodiophora brassicae*.

ECN	Název	Stupeň 0	Stupeň 1	Stupeň 2	Stupeň 3	počet rostlin	ID
15001	Adriana	7	0	15	11	33	63,64
15001	Ametyst	2	0	5	21	28	86,90
15001	ANTEZAK	22	5	4	1	32	16,67
15001	Aquila	10	13	12	3	38	40,35
15001	Artus	8	7	14	7	36	51,85
15001	Astrid	17	0	7	3	27	28,40
15001	Axel	16	8	5	2	31	25,81
15001	B001 Samorai	5	9	6	14	34	61,76
15001	Bachus	9	7	9	14	39	57,26
15001	Bazalt	20	0	1	1	22	7,58
15001	Bono	11	7	14	12	44	53,79
15001	Cabriolet	6	2	7	8	23	57,97
15001	Cando	20	0	0	5	25	20,00
15001	Caroline	9	16	11	5	41	43,09
15001	Corida	2	3	9	33	47	85,11
15001	Corzar	10	4	10	20	44	63,64
15001	Croquet	39	0	0	0	39	0,00
15001	Diego	8	3	8	15	34	62,75
15001	Dino	41	0	0	0	41	0,00
15001	Elgar	0	0	2	34	36	98,15

ECN	Název	Stupeň 0	Stupeň 1	Stupeň 2	Stupeň 3	počet rostlin	ID
15001	ES Valegro	9	5	4	30	48	71,53
15001	Finley	8	8	10	6	32	47,92
15001	Frity	14	0	14	21	49	61,90
15001	Harvey	8	8	1	15	32	57,29
15001	Iggy	3	0	7	15	25	78,67
15001	Iwan	3	3	7	22	35	79,05
15001	Jeremy	1	7	3	25	36	81,48
15001	Kuba	3	7	13	16	39	69,23
15001	Licapo	0	0	1	40	41	99,19
15001	Liforum	40	0	0	0	40	0,00
15001	Mandril	11	1	6	17	35	60,95
15001	Marley	0	3	3	20	26	88,46
15001	Marvin	5	7	8	12	32	61,46
15001	Murphy	9	9	8	7	33	46,46
15001	Napoleon	38	0	0	0	38	0,00
15001	NK Bravour	4	5	9	27	45	77,04
15001	Onca	8	11	7	8	34	48,04
15001	OP-BN-8135	9	8	9	1	27	35,80
15001	OP-BN-8137	35	0	0	0	35	0,00
15001	OP-BN-8148	38	0	0	0	38	0,00
15001	Pamela	7	6	8	10	31	55,91
15001	Prestige	4	8	5	10	27	59,26
15001	Quincy	1	4	6	14	25	77,33
15001	Randy	1	4	2	6	13	66,67
15001	Renzo KWS	0	3	6	21	30	86,67
15001	Salute	22	0	1	2	25	10,67
15001	Sammy	10	4	3	5	22	37,88
15001	Santana	2	10	9	12	33	64,65
15001	Sherwood	5	6	9	9	29	58,62
15001	Skye	5	5	4	15	29	66,67
15001	SL-853 Sněžka	5	4	11	14	34	66,67
15001	Sparker	3	8	7	14	32	66,67
15001	Stanley	20	5	3	13	41	40,65
15001	Status	6	6	1	17	30	65,56
15001	SY Ilona	6	4	7	11	28	60,71
15001	SY Rokas	7	3	6	22	38	71,05
15001	Timothy	4	5	1	20	30	74,44
15001	Tom	38	2	1	0	41	3,25
15001	Wally	7	4	5	18	34	66,67
15001	Wilma	40	0	0	0	40	0,00
15001	Winny	10	7	12	13	42	55,56
1500100324	BNW 1.68-84	15	9	8	15	47	49,65
1500100325	BNW 1.88/86	8	5	8	12	33	57,58
1500100326	BNW 1.90/86	24	7	7	3	41	24,39
1500100327	BNW 1.91/86	30	0	1	1	32	5,21

ECN	Název	Stupeň 0	Stupeň 1	Stupeň 2	Stupeň 3	počet rostlin	ID
1500100328	BNW 1.100/87	4	3	13	16	36	71,30
1500100329	BNW 1.89/86	20	10	11	7	48	36,81
1500100330	BOH 5	40	0	0	0	40	0,00
1500100331	BOH 283	40	0	0	0	40	0,00
1500100332	BOH 384	37	0	3	0	40	5,00
1500100333	BK-257	5	4	13	11	33	63,64
1500100334	GN-33/84	3	3	12	14	32	71,88
1500100335	MAH-386	9	8	10	8	35	49,52
1500100336	PB-1278	3	3	3	15	24	75,00
1500100337	PB-1065	4	4	5	19	32	73,96
1500100338	POB 128/83	18	1	3	14	36	45,37
1500100339	POB 286	0	0	2	31	33	97,98
1500100340	POB 488	8	1	0	8	17	49,02
1500100341	R 29/85	44	3	7	7	61	20,77
1500100342	R 257/84	15	6	6	13	40	47,50
1500100343	Lirafit	2	6	0	30	38	84,21
1500100344	Lirakotta	3	0	3	9	15	73,33
1500100345	Janus	35	0	3	2	40	10,00
1500100346	Snitynskij	6	6	12	13	37	62,16
1500100347	Otradnenskij	6	7	9	13	35	60,95
1500100348	Libravo	2	2	12	18	34	78,43
1500100349	Annika	7	3	3	23	36	72,22
1500100350	VSB 1.96-87	1	3	15	15	34	76,47
1500100351	Ariana	1	5	7	26	39	82,91
1500100352	Falcon	1	1	3	39	44	93,94
1500100353	Liborius	2	10	9	8	29	59,77
1500100354	Lirajet	1	2	4	30	37	90,09
1500100355	Olymp	3	2	23	13	41	70,73
1500100356	Susana	0	0	1	39	40	99,17
1500100357	VSB 1.94-87	2	11	15	18	46	68,84
1500100358	Shogun	2	9	16	18	45	70,37
1500100359	Kentan Nova	0	14	15	10	39	63,25
1500100360	Pasha	0	4	10	9	23	73,91
1500100361	Viva	8	14	12	9	43	50,39
1500100362	Mikado	4	13	19	8	44	56,82
1500100363	Hobson	2	8	14	27	51	76,47
1500100364	Lonto	2	8	18	16	44	69,70
1500100365	Chrysander	3	15	10	7	35	53,33
1500100366	Panter 2	0	10	23	8	41	65,04
1500100367	PHP 2/90	2	1	15	10	28	72,62
1500100368	PHP 5/90	0	20	8	3	31	48,39
1500100369	PHP 14/90	0	7	19	30	56	80,36
1500100370	PHP 17/90	0	20	13	3	36	50,93
1500100371	Il.16	0	8	10	20	38	77,19
1500100372	Silex	3	5	10	12	30	67,78

ECN	Název	Stupeň 0	Stupeň 1	Stupeň 2	Stupeň 3	počet rostlin	ID
1500100373	Zeus	1	8	9	18	36	74,07
1500100374	Wotan	0	14	13	13	40	65,83
1500100375	Silvia	0	0	12	31	43	90,70
1500100376	Rasant	4	11	12	18	45	65,93
1500100377	Cathy	3	7	6	30	46	78,99
1500100378	AGR.89-3	6	12	14	11	43	56,59
1500100379	Indore	3	12	5	19	39	67,52
1500100380	Dwarf Essex	1	0	1	41	43	96,90
1500100381	Boxer	1	6	13	18	38	75,44
1500100382	Coriander	4	6	9	24	43	74,42
1500100383	Geurander	15	7	10	3	35	34,29
1500100384	Baraska	6	5	8	20	39	69,23
1500100385	Local	33	3	8	3	47	19,86
1500100386	Janek	23	6	7	5	41	28,46
1500100387	Nuvator	7	9	21	14	51	60,78
1500100388	Nuva	1	4	8	17	30	78,89
1500100389	Nutiva	15	10	18	12	55	49,70
1500100390	Nusi	9	3	8	17	37	63,06
1500100391	Granulo	20	7	4	13	44	40,91
1500100392	Barcoli	1	10	11	14	36	68,52
1500100393	Giriza	15	1	11	14	41	52,85
1500100394	Tomek	0	1	1	24	26	96,15
1500100395	Dolnoslaski	8	2	9	26	45	72,59
1500100396	Meander	0	4	4	14	22	81,82
1500100397	Liberator	0	2	23	10	35	74,29
1500100398	Lirektor	0	0	10	40	50	93,33
1500100399	Idol	0	2	10	40	52	91,03
1500100400	BNW 1.96-87	0	0	2	9	11	93,94
1500100401	BNW 1.98-87	5	5	5	7	22	54,55
1500100402	BNW 1.94-87	0	0	1	30	31	98,92
1500100403	BNW 1.75-85	5	5	10	17	37	68,47
1500100404	BNW 1.82-86	20	10	10	0	40	25,00
1500100405	BNW 1.84-86	15	15	10	12	52	45,51

Hodnocení indexu napadení bylo prováděno i po inokulaci rostlin individuálními patotypy nádorovky. Příklad výsledků reakce rostlin na inokulaci patotypem P2 je uveden v následující tabulce.

Výsledky testování odolnosti odrůd a šlechtitelských materiálů k patotypu nádorovky P2.

	Celkem	Citlivé	Citlivé %	Odolné	Odolné %
SY ALIBABA	6	2	33	4	67
CROCUS	6	0	0	6	100
SY Ilona	6	6	100	0	0
Gemini	6	6	100	0	0
SG-C1	6	0	0	6	100
SG-C2	2	1	50	1	50
CU 1079/24	6	6	100	0	0
CU 1100/24	2	2	100	0	0
CU 1107/24	6	6	100	0	0
CU 1144/24	6	6	100	0	0
CU 1150/24	6	6	100	0	0
CU 1197/24	6	6	100	0	0
CU 1203/24	6	2	33	4	67
CH 1233/24	6	6	100	0	0
CH 1234/24	6	6	100	0	0
CH 1241/24	4	4	100	0	0
CH 1311/24	5	5	100	0	0
CH 1496/24	4	4	100	0	0
CH 1512/24	5	5	100	0	0
CH 1532/24	5	0	0	5	100
CH 1560/24	5	0	0	5	100

2/ Ověření postupu identifikace patotypů *P. brassicae* na základě biotestů a standardní Williamsovy klasifikace

Po provedení inokulace rostlin testovacího souboru a vyhodnocení indexu napadení byly tyto výsledky porovnány s referenčními hodnotami pro Williamsovu klasifikaci izolátů *P. brassicae*.

Referenční hodnoty testovacího sortimentu (odolná/náchylná) pro systém pro stanovení jednotlivých patotypů *Plasmodiophora brassicae* (Williams 1966) jsou uvedeny v následující tabulce.

patotyp	Lau	ECD10	ECD11	ECD13
P1	+	+	-	+
P2	+	-	+	+
P3	+	-	-	+
P4	+	+	+	+
P5	-	-	-	-
P6	-	-	-	+
P7	-	-	+	+
P8	+	-	-	-
P9	+	+	-	-
P10	-	+	+	+
P11	+	+	+	-
P12	-	+	-	+
P13	+	-	+	-
P14	-	+	+	-
P15	-	-	+	-
P16	-	+	-	-

(+ citlivá odrůda, - rezistentní odrůda)

Příklad reakce rostlin testovacího souboru na inokulaci izolátem patogena An4969-s1 je uveden na následujících obrázcích. Na obrázcích je zřetelné 100 % napadení odrůdy ECD 13 a naopak rezistence reakce u odrůd ECD 10, ECD 11 a Laurentian.



Na základě tohoto výsledku hodnocení odolnosti/náchylnosti k testovanému izolátu patogena lze tento izolát klasifikovat jako patotyp P6.

	Lau	ECD 10	ECD 11	ECD 13	patotyp
An4969-s1	-	-	-	+	P6

Obdobným způsobem byly klasifikovány i ostatní izoláty *P. brassicae* a přiřazení jednotlivých izolátů k patotypům je uvedeno v následující tabulce.

	Lau	ECD 10	ECD 11	ECD 13	patotyp
Lor-s1	-	-	+	+	P7
Hor-s1	+	+	+	+	P4
Jin-s1	+	+	+	+	P4
P3-s1	+	-	-	+	P3
Phl-s1	+	-	-	-	P8
Trg-s1	-	-	-	+	P6
Cu1888-s1	+	-	+	+	P2
An4969-s1	-	-	-	+	P6
Tu4875-s1	-	-	-	-	P5
Fo4947-s1	+	-	+	+	P2
Tu4884-s1	+	-	-	+	P3

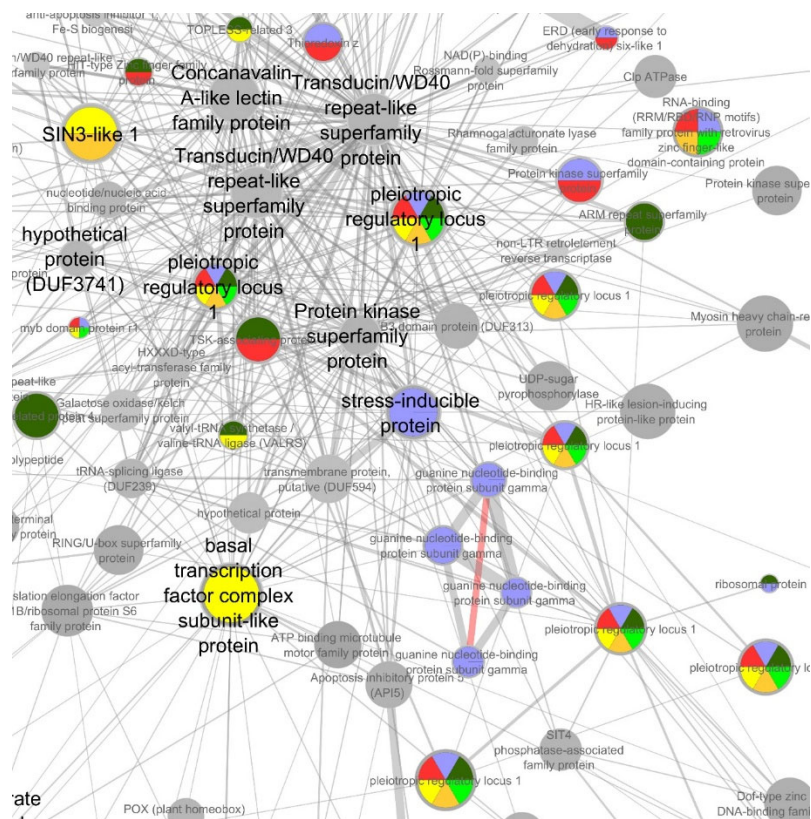
(+ citlivá odrůda, - rezistentní odrůda)

3/ Ověření funkčnosti analýzy transkriptomu a postupu identifikace genů zapojených do reakce na napadení patogenem

V rámci této aktivity byl analyzován soubor 245 genotypů. Inokulum *P. brassicae* bylo tvořeno vysoce agresivním patotypem, který byl na základě ECD metody identifikován jako patotyp 17/31/31. Rostliny byly kultivovány v kontrolovaných podmínkách fytozonu po dobu 7 týdnů a poté byla hodnocena míra napadení na základě DI (Disease Index). Vysoce sensitivní genotypy měly hodnotu DI více než 80%, vysoce rezistentní rostliny měly hodnotu DI pod 20%.

Pro všechny analyzované genotypy byla k dispozici data z analýzy transkriptomu, v této studii byl použit soubor expresních dat pro 53889 genů. Pro analýzu vztahů (sítě) mezi jednotlivými geny byla použita metoda WGCNA (weighted gene co-expression network analysis) a byly identifikovány moduly, které byly signifikantně korelovány se sledovaným znakem – odolnost k *P. brassicae* vyjádřená pomocí DI. Vizualizace genové sítě byla provedena v programu Cytoscape. GO analýza (Gene Ontology) byla provedena v programu Cytoscape pomocí nástroje "The Biological Networks Gene Ontology tool" (BiNGO). Pro identifikaci klíčových genů byla použita "hub gene analysis", na základě které byly identifikovány nejvýznamnější geny v rámci analyzované sítě.

Ukázka vizualizace genové sítě a vazeb mezi jednotlivými geny v modulu.



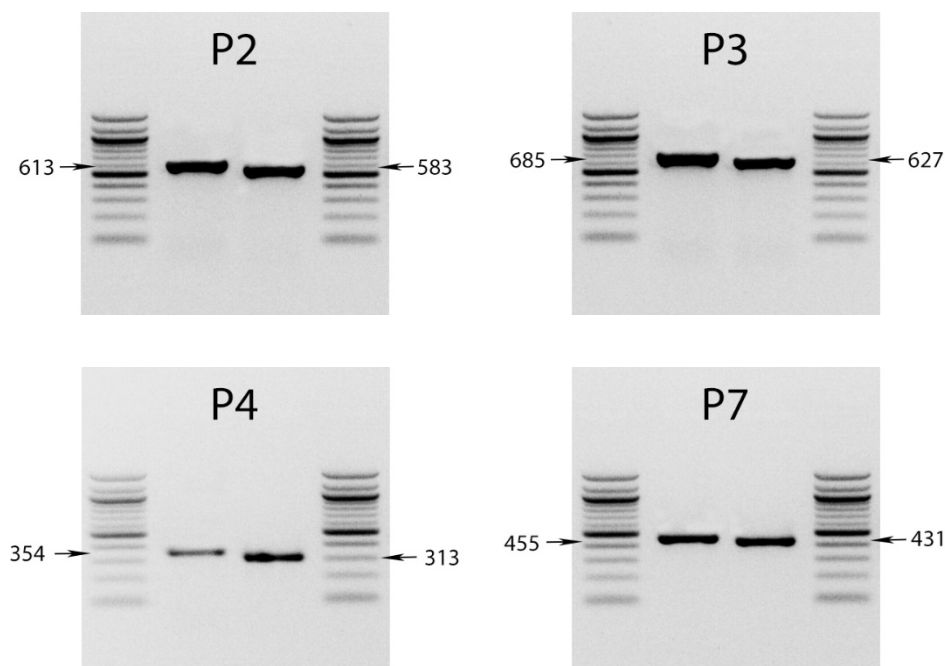
Ukázka biologické interpretace analyzovaných modulů na základě Gene Ontology analýzy.



4/ Ověření funkčnosti molekulárního postupu identifikace patotypů *P. brassicae*

Na základě celogenomového sekvenování patotypů *P. brassicae* a bioinformatického zpracování sekvenačních dat byly identifikovány unikátní sekvence pro jednotlivé patotypy. Pro tyto sekvence byly navrženy primery a byla provedena PCR analýza. Byla ověřena i specificita navrženého postupu PCR detekce patotypů, primery navržené pro dva úseky v rámci genomu každého z patotypů byly zcela specifické a poskytovaly výsledky (amplikony) jen u patotypu pro než byly určeny.

Příklad výsledků PCR analýza a molekulární identifikace/detekce patotypů *P. brassicae* je uveden na následujících obrázcích.



Příklad kombinovaného postupu fenotypového hodnocení indexu napadení a molekulární detekce patotypů:

umožňuje rychlou a precizní identifikaci patotypu *P. brassicae* za využití postupů uvedených v této technologii a metodickém postupu molekulární detekce patotypů (Hejna 2024). Pro tuto PCR detekci patotypů jsou dostupné primery, metodický postup izolace DNA patogena a postup pro provedení PCR analýzy a jejího vyhodnocení. PCR analýzu je možné provádět v multiplexu a tím i snížit náklady na molekulární analýzy. PCR detekce/identifikace patogena je možná v molekulární laboratoři se základním přístrojovým vybavením. Reakce GZ rostlin – odrůd, šlechtitelských materiálů, DH linií, na napadení patogenem, resp. jednotlivými patotypy patogena je pak provedena na základě inokulačních/infekčních experimentů a fenotypového hodnocení indexu napadení. Hodnocení indexu napadení lze provést v laboratoři s běžně vybavenou kultivační místností a hodnocení míry napadení jednotlivých rostlin je možné na základě porovnání hodnocené rostliny se vzorovým klasifikátorem (velikost a množství nádorů na kořenech), případně lze použít systémy pro digitální obrazovou analýzu. Tento způsob umožňuje relativně jednoduchou identifikaci donorů zvýšené odolnosti či rezistence k jednotlivým patotypům bez nutnosti složitějších postupů molekulární analýzy, identifikace příčinných genů a vývoje selekčních markerů.

Příklad tohoto kombinovaného hodnocení je uveden v následující tabulce. Výsledky testování tohoto vzorového souboru ukázaly na značné rozdíly v odolnosti jednotlivých genotypů vůči čtyřem testovaným patotypům nádorovitosti (*Plasmodiophora brassicae*). Nejvyšší míru odolnosti napříč všemi patotypy vykazovaly genotypy SY Alibaba, SG-C1, SG-C2, CH1532/24 a CH1560/24, což naznačuje jejich potenciál pro využití ve šlechtitelských programech. Naopak většina genotypů z řady CU a odrůdy SY Ilona a Gemini prokázaly citlivost ke všem testovaným patotypům.

Výsledky testování odolnosti odrůd a šlechtitelských materiálů k jednotlivým patotypům nádorovky.

	P7	P3	P4	P2
SY ALIBABA	0	0	0	0
CROCUS	0	0	0	0
SY Ilona	0	0	0	0
Gemini	0	0	0	0
SG-C1	0	0	0	0
SG-C2	0	0	0	0
CU 1079/24	0	0	0	0
CU 1100/24	0	0	0	0
CU 1107/24	0	0	0	67
CU 1144/24	0	0	0	0
CU 1150/24	0	0	0	0
CU 1197/24	0	0	0	0
CU 1203/24	0	0	0	0
CH 1233/24	0	0	0	0
CH 1234/24	0	0	0	0
CH 1241/24	67	33	67	100
CH 1311/24	71	75	100	100
CH 1496/24	88	100	100	100
CH 1512/24	100	40	100	67
CH 1532/24	100	80	100	50
CH 1560/24	100	67	100	100

V průběhu testování technologie byla ověřena:

- vypovídací schopnosti a spolehlivosti hodnocení indexu napadení
- postupu identifikace patotypů *P. brassicae* na základě biotestů a standardní Williamsovy klasifikace
- funkčnost analýzy transkriptomu a postupu identifikace genů zapojených do reakce na napadení patogenem
- funkčnost molekulárního postupu identifikace patotypů *P. brassicae*



V Českých Budějovicích, 1.12.2025

prof. Ing. Vladislav Čurn, PhD.

JIHOČESKÁ UNIVERZITA (61)
 V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
 Fakulta zemědělská a technologická
 Katedra genetiky a biotechnologií
 Na Sádkách 1780, 37005 České Budějovice

Shrnutí

Výsledky získané během ověřování technologie potvrdily vhodnost a použitelnost fenotypového a molekulárního přístupu k hodnocení odolnosti či náchylnosti genetických zdrojů a šlechtitelských materiálů řepky k napadení patogenem *P. brassicae* a identifikaci jednotlivých patotypů nádorovky.

Během testování jednotlivých postupů – biotestů a molekulární detekce byly na modelovém souboru genotypů řepky a patotypů patogena ověřeny použité metodické postupy a jejich opakovatelnost. SOučasně byly navrženy tři varianty pro implementaci technologie na šlechtitelském pracovišti v závislosti na vybavenosti laboratoří a zkušenostech pracovníků laboratoře. Kombinace fenotypového hodnocení míry napadení (biotesty) a molekulární detekce patotypů poskytuje spolehlivé a výsledky dosažitelné i v laboratořích s běžným vybavením. Postupy uvedené v technologii jsou plně využitelné v laboratořích šlechtitelských pracovišť a ověřená technologie je tak rutinně využitelná pro aplikaci v programu rezistentního šlechtění řepky.

Výsledkem využití této technologie mohou být genotypy řepky manifestující zvýšenou odolnost vůči jednotlivým patotypům nádorovky a znalost distribuce patotypů nádorovky v pěstitelské oblasti. Tyto informace pak mohou vést k cílenému šlechtění a pěstování genotypů řepky se zvýšenou odolností k patotypu, který se v dané oblasti převážně vyskytuje.

Použitá literatura

BUCZACKI, S. T., H. TOXOPEUS, P. MATTUSCH, T. D. JOHNSTON, G. R. DIXON a L. A. HOBOLTH, 1975. Study of physiologic specialization in *Plasmodiophora brassicae*: Proposals for attempted rationalization through an international approach. *Transactions of the British Mycological Society*. 65(2), 295–303.

CAVALIER-SMITH, T. a E. E. Y. CHAO, 2003. Phylogeny and classification of phylum Cercozoa (Protozoa). *Protist*. 154(3–4), 341–358.

DAKOURI, Abdulsalam, Xingguo ZHANG, Gary PENG, Kevin C. FALK, Bruce D. GOSSSEN, Stephen E. STRELKOV a Fengqun YU, 2018. Analysis of genome-wide variants through bulked segregant RNA sequencing reveals a major gene for resistance to *Plasmodiophora brassicae* in *Brassica oleracea*. *Scientific Reports*. 8(1), 17657.

DIEDERICHSEN, Elke, Martin FRAUEN, Enrico G. A. LINDERS, Katsunori HATAKEYAMA a Masashi HIRAI, 2009. Status and Perspectives of Clubroot Resistance Breeding in Crucifer Crops. *Journal of Plant Growth Regulation*. 28(3), 265–281.

DIXON, Geoffrey R., 2009. *Plasmodiophora brassicae* in its Environment. *Journal of Plant Growth Regulation*. 28(3), 212–228.

DOYLE, J. DNA Protocols for Plants. In: HEWITT, G.M., A.W.B. JOHNSTON a J.P.W. YOUNG, eds. *Molecular Techniques in Taxonomy*. Berlin, Heidelberg: Springer, 1991. NATO ASI Series (Series H: Cell Biology), vol. 57.

HATAKEYAMA, Katsunori, Keita SUWABE, Rubens Norio TOMITA, Takeyuki KATO, Tsukasa NUNOME, Hiroyuki FUKUOKA a Satoru MATSUMOTO, 2013. Identification and Characterization of Crr1a, a Gene for Resistance to Clubroot Disease (*Plasmodiophora brassicae* Woronin) in *Brassica rapa* L. *PLoS ONE*. 8(1), e54745.

HEJNA, Ondřej, Marie PÍCHOVÁ, Adéla PÍCHOVÁ, Vladislav ČURN, 2024. Metodika odlišení patotypů *Plasmodiophora brassicae*. FZT JU České Budějovice.

CHYTILOVÁ, Věra a Karel DUŠEK, 2007. *Metodika testování odolnosti brukvovitých plodin k nádorovitosti*. Praha: Výzkumný ústav rostlinné výroby.

JAVED, M.A., SCHWELM, A., ZAMANI-NOOR, N., SALIH, R., SILVESTRE VAÑÓ, M., WU, J., GONZÁLEZ GARCÍA, M., HEICK, T.M., LUO, C., PRAKASH, P., PÉREZ-LÓPEZ, E. 2023. The clubroot pathogen *Plasmodiophora brassicae*: A profile update. *Mol Plant Pathol*. 24(2):89-106.

- LEBOLDUS, J. M., V. P. MANOLII, T. K. TURKINGTON a S. E. STRELKOV, 2012. Adaptation to Brassica Host Genotypes by a Single-Spore Isolate and Population of *Plasmodiophora brassicae* (Clubroot). *Plant Disease*. 96(6), 833–838.
- LEE, Jonghoon, Nur Kholilatul IZZAH, Beom-Soon CHOI, Ho Jun JOH, Sang-Choon LEE, Sampath PERUMAL, Joodeok SEO, Kyounggu AHN, Eun Ju JO, Gyung Ja CHOI, Ill-Sup NOU, Yeisoo YU a Tae-Jin YANG, 2016. Genotyping-by-sequencing map permits identification of clubroot resistance QTLs and revision of the reference genome assembly in cabbage (*Brassica oleracea* L.). *DNA Research*. 23(1), 29–41.
- LIPKA, Alexander E., Feng TIAN, Qishan WANG, Jason PEIFFER, Meng LI, Peter J. BRADBURY, Michael A. GORE, Edward S. BUCKLER a Zhiwu ZHANG, 2012. GAPIT: genome association and prediction integrated tool. *Bioinformatics*. 28(18), 2397–2399.
- MALINOWSKI, R., TRUMAN, W., BLICHARZ, S. 2019. Genius architect or clever thief – how *Plasmodiophora brassicae* reprograms host development to establish a pathogen-oriented physiological sink. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 32, 1259–1266.
- NEUHAUSER, Sigrid a Martin KIRCHMAIR, 2011. *Sorosphaerula* nom. n. for the Plasmodiophorid Genus *Sorosphaera* J. Schroter 1886 (Rhizaria: Endomyxa: Phytomyxea: Plasmodiophorida). *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 58(5), 469–470.
- PALMA K, ZHAO Q, CHENG YT, BI D, MONAGHAN J, CHENG W, ZHANG Y, LI X., 2007. Regulation of plant innate immunity by three proteins in a complex conserved across the plant and animal kingdoms. *Genes Dev*. 21(12), 1484–1493.
- PENG, Lisha, Lili ZHOU, Qinfei LI, Dayong WEI, Xuesong REN, Hongyuan SONG, Jiaqin MEI, Jun SI a Wei QIAN, 2018. Identification of Quantitative Trait Loci for Clubroot Resistance in *Brassica oleracea* With the Use of Brassica SNP Microarray. *Frontiers in Plant Science*. 9, 822.
- R CORE TEAM, 2025. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- RENNIE, Derek C., Victor P. MANOLII, Marcie PLISHKA a Stephen E. STRELKOV, 2013. Histological analysis of spindle and spheroid root galls caused by *Plasmodiophora brassicae*. *European Journal of Plant Pathology*. 135(4), 771–781.
- SIEMENS, Johannes, Simon BULMAN, Frank REHN a Thomas SUNDELIN, 2009. Molecular Biology of *Plasmodiophora brassicae*. *Journal of Plant Growth Regulation*. 28(3), 245–251.
- UENO, Hiroki, Etsuo MATSUMOTO, Daisuke ARUGA, Satoshi KITAGAWA, Hideo MATSUMURA a Nobuaki HAYASHIDA, 2012. Molecular characterization of the

CRA gene conferring clubroot resistance in *Brassica rapa*. *Plant Molecular Biology*. 80(6), 621–629.

WILLIAMS, P. H., 1966. A system for the determination of races of *Plasmodiophora brassicae* that infect Cabbage and Rutabaga. *Phytopathology*. 56(6), 624–626.

YU, Fengqun, Xingguo ZHANG, Gary PENG, Kevin C. FALK, Stephen E. STRELKOV a Bruce D. GOSSEN, 2017. Genotyping-by-sequencing reveals three QTL for clubroot resistance to six pathotypes of *Plasmodiophora brassicae* in *Brassica rapa*. *Scientific Reports*. 7(1), 4516.

ZHANG, H., J. FENG, S.-F. HWANG, S. E. STRELKOV, I. FALAK, X. HUANG a R. SUN, 2016. Mapping of clubroot (*Plasmodiophora brassicae*) resistance in canola (*Brassica napus*). *Plant Pathology*. 65(3), 435–440.