



Fakulta zemědělská
a technologická
Faculty of Agriculture
and Technology

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

Metodický postup pro identifikaci genů účastnících se obranných drah aktivovaných při napadení *P. brassicae*

Metodika byla vypracována jako výstup projektu NAZV QK1910070 – Využití biotechnologických metod a netradičních genetických zdrojů k charakterizaci a tvorbě uniformních linií brukvovité zeleniny se specifickými parametry kvality, výnosu a rezistence k významným chorobám



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

České Budějovice, 2023

**Metodický postup pro identifikaci genů účastnících se obranných drah
aktivovaných při napadení *P. brassicae***

Metodika byla vypracována jako výstup projektu NAZV QK1910070 – Využití biotechnologických metod a netradičních genetických zdrojů k charakterizaci a tvorbě uniformních linií brukvovité zeleniny se specifickými parametry kvality, výnosu a rezistence k významným chorobám

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

České Budějovice, 2023

Metodický postup pro identifikaci genů účastnících se obranných drah aktivovaných při napadení *P. brassicae*

Hejna O. et al. 2023
hejna@fzt.jcu.cz

Katedra genetiky a biotechnologií, FZT JU v Českých Budějovicích, České Budějovice
www.fzt.jcu.cz, <http://biocentrum.zf.jcu.cz>

Vypracováno za podpory projektu NAZV QK1910070 – Využití biotechnologických metod a netradičních genetických zdrojů k charakterizaci a tvorbě uniformních linií brukvovité zeleniny se specifickými parametry kvality, výnosu a rezistence k významným chorobám

Recenzenty metodiky byli:

doc. Ing. František Hnilička, Ph.D. – FAPPZ ČZU v Praze
Ing. Tomáš Mezlík – ÚKZÚZ Brno

Text: ©2023 Hejna O. a kol.
Vydáno bez jazykové úpravy
ISBN: 978-80-7694-041-3

ISBN 978-80-7694-041-3



9 788076 940413

Obsah

Uvedení problému a cíl metodiky	7
Vlastní popis metodiky	9
Úvod	9
Postup identifikace genů zapojených do reakce na napadení <i>P. brassicae</i>	13
Zdroj patogenu, inokulace rostlin a hodnocení napadení	13
Bioinformatické analýzy	15
Příklady výstupů a interpretace výsledků	17
Srovnání novosti postupů	23
Popis uplatnění metodiky	23
Ekonomické aspekty	24
Seznam použité literatury	25
Seznam publikací předcházející metodice	29

Uvedení problému a cíl metodiky

Současný vysoký tlak patogenů na hospodářské plodiny představuje pro šlechtění náročné úkoly. Jedním z vážných problémů, které současné moderní šlechtění řeší, představuje nádorovitost košťálovin. Toto onemocnění způsobuje půdní biotrofní patogen *Plasmodiophora brassicae*. V současnosti představuje tento patogen závažné problémy pro většinu brukvovitých plodin v celosvětovém měřítku. Možnosti regulace této nemoci jsou nyní relativně omezené a z ekonomického hlediska se jeví jako jediná efektivní možnost pěstování rezistentních či tolerantních odrůd k tomuto patogenu. Do současné doby bylo identifikováno několik genetických zdrojů rezistence pro šlechtění, nicméně jejich použití při šlechtění do jisté míry brání neznalost principu rezistence a příčinného elementu.

Cílem metodiky je představení postupu hodnocení odolnosti genetických zdrojů a šlechtitelských materiálů k nádorovitosti:

Identifikace míry rezistence je vyjádřena jako disease index (DI) – hodnoty DI jsou následně porovnávány s transkriptomickými daty získanými po RNAseq. Toto porovnání dat vychází ze dvou různých přístupů asociativní transkriptomiky. V prvním případě se jedná o využití SNP markerů detekovaných v RNAseq datech pro jednotlivé genotypy a hodnot DI k provedení asociativní analýzy. Výstupem z této analýzy jsou hodnoty asociace jednotlivých SNP markerů k porovnávanému znaku, v tomto případě DI pro nádorovitost. Vyšší počet asociovaných SNP markerů v určité úzké oblasti pak určuje jejich polohu v genomu a vazbu s klíčovými geny ovlivňujícími DI.

Druhým přístupem je využití míry exprese jednotlivých genů získaných také z RNAseq dat. Expresní profily jednotlivých genů napříč genotypy jsou pomocí asociativní analýzy porovnány s profilem DI získaného pro stejnou skupinu genotypů. Výsledkem této analýzy je asociace DI k jednotlivým genům, které byly do hodnocení zařazeny. Míra asociace jednotlivých genů poté vyjadřuje důležitost tohoto genu v reakci na napadení *P. brassicae*.

V posledním kroku jsou geny v oblasti asociovaných SNP markerů a vysoce asociované geny na základě expresních profilů podrobeny anotační analýze GO a InterPro. Na základě těchto anotačních analýz jsou vytipovány klíčové geny v obranných reakcích proti nádorovitosti.

Vlastní popis metodiky

Úvod

Jedním ze současných problémů pěstování brukvovitých zelenin a olejnin je onemocnění známé jako nádorovitost košťálovin. Toto onemocnění způsobuje obligátní biotrofní patogen *Plasmodiophora brassicae*, který má schopnost velice dlouho přežívat v půdě (Wallenhammar 1996). V současnosti představuje toto onemocnění v celosvětovém měřítku jedno z nejzávažnějších problémů pěstování brukvovitých plodin. Možnosti boje proti nádorovitosti jsou v současnosti relativně omezené. Tradiční metodou je vápnění, použití fungicidů nebo pěstování rezistentních/tolerantních odrůd. Vzhledem k tomu, že vápnění není dostatečně účinné, použití fungicidů je finančně náročné a omezeno kvůli potenciální zdravotní zavadnosti, představuje vyšlechtění a použití rezistentních odrůd jedno z nejlepších řešení. Navzdory tomu, že je v současnosti identifikováno několik šlechtitelských zdrojů rezistence, jen u velice malého množství je známa jejich podstata, která by byla efektivně použitelná pro marker asistované šlechtění (MAS) při tvorbě efektivních genotypů s několika rezistentními mechanismy. Současné rezistentní/tolerantní odrůdy jsou často vyšlechtěné z jednoho rezistentního materiálu a obsahují pouze jeden gen rezistence. U takovýchto odrůd je rezistence často patotypově specifická a při silném infekčním tlaku ji patogen překoná v rámci několika let nebo je genotyp napaden jiným patotypem, který se na daném místě také nachází.

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). Rozsah hostitelských rostlin tohoto onemocnění je široký. *P. brassicae* dokáže parazitovat jak na dvouděložných, tak i jednoděložných rostlinách (Neuhauser et al. 2014). Majoritním hostitelem jsou rostliny čeledi Brassicaceae (Dixon 2009). Hostitelské rostliny jsou k napadení citlivé v jakékoli růstové fázi, zvláště pak v počátečním stádiu vývoje. Dosavadní studie předpokládají, že první fáze napadení může probíhat v kterémkoli z druhů čeledi brukvovitých (Howard et al. 2010). Široké spektrum druhů, ve kterých je *P. brassicae* schopna dokončit celý životní cyklus zakončený tvorbou trvalých spor, zahrnuje velké množství ekonomicky významných plodin. K hospodářsky nejvíce zasaženým patří například *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), *B. napus* s poddruhy ssp. *oleifera* (řepka olejka), ssp. *napobrassica* (tuřín), *B. juncea* s poddruhem ssp. *oleifera* (řepice olejná) a *Raphanus sativus* s poddruhy ssp. *major* (ředkev), ssp. *radicula* (ředkvička), ssp. *oleiferus* (ředkev olejná) a další. Z planých druhů, které se mohou podílet a zvyšování nebo udržení životaschopných spor v půdě, patří například *Raphanus raphanistrum* (ředkev ohnice), *Thlaspi arvense* (penízek rolní), *Capsella bursa-pastoris* (kokoška pastuší tobolka) a mnoho dalších (Rennie et al. 2013).

V České republice byla nádorovitost monitorována od poloviny osmdesátých let dvacátého století. Rod (1986) ve své studii uvádí přítomnost patogenu téměř na celém území České republiky. Nejsilněji byly zasaženy oblasti s tradicí pěstování zeleniny (Brno, Hradec Králové, Litoměřice, Mělník, Pardubice, Prostějov a Olomouc). Zelí, kapusta, květák a kedluben patřily k nejvíce napadeným plodinám. Největší škody kolem 30 procent byly zaznamenány na kapustě, kvěťáku, hlávkovém zelí a řepce (Rod 1986). S rozšiřující se plochou s brukvovitými zeleninami a olejninami v České republice roste i oblast a intenzita zamoření nádorovitostí (Říčařová et al. 2016). V současnosti jsou nejvíce zasažené kraje Moravskoslezský a Liberecký s 36 % resp. 27 % napadené půdy (Říčařová et al. 2016). Lokálně silný výskyt zůstává v tradičních oblastech pěstujících hlávkové zelí: Darkovice, Hlučín, Kravaře, Semily a Veselí nad Lužnicí (Kopecky and Dusek 2012; Říčařová et al. 2016).

Boj s nádorovitostí vyžaduje striktní agrotechnická opatření, používání chemických nebo biologických přípravků sebou nese velké finanční výdaje. Vynechání brukvovitých plodin z osevního postupu je pro tradiční zelinářské oblasti nereálné a vzhledem k vzrůstající poptávce po řepkovém oleji je pěstitele těžko představitelné i pěstování řepky v odstupu více jak 5-7 let. Z těchto důvodů je velká pozornost věnována šlechtění brukvovitých plodin, které by byly vůči nádorovitosti odolné a představovaly by trvalé řešení v boji proti nádorovitosti brukvovitých (Diederichsen et al. 2009). Do současné doby bylo identifikováno několik odolných genotypů u druhů *B. rapa*, *B. oleracea*, *B. napus* a *B. nigra*. Naopak rezistentní genotypy zatím nebyly nalezeny u méně významných plodin spadající mezi druhy *B. juncea* a *B. carinata* (Diederichsen et al. 2009). Dané rezistentní genotypy však představují jen malé skupiny specifických plodin z velice různorodé skupiny brukvovitých. Odolné odrůdy *B. rapa* se nacházejí mezi vodnicemi, podobně u *B. napus* mezi tuříny. Částečně rezistentní odrůdy druhu *B. oleracea* byly objeveny mezi kadeřávkami. Prvotním problémem je nepřítomnost odolných genotypů u velmi žádaných olejnatých zástupců *B. napus*, zelných kultivarů *B. rapa* a celé řady různorodých morfotypů *B. oleracea*. Získání rezistentní linie požadovaného typu vyžaduje křížení a následně velice náročné zpětné křížení pro dosažení žádaného

morfotypu 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). Daný fakt dokládá i příklad první rezistentní odrůdy ozimé řepky 'Mendel', jejíž monogenní rezistence byla prolomena záhy po tom, kdy byla uvolněna na trh (Diederichsen et al. 2014).

Základním předpokladem šlechtění proti nádorovitosti je identifikace cílových patotypů. Takováto identifikace se provádí pomocí biotestů, ve kterých je připravené inokulum v kontrolních podmínkách aplikováno na vhodně vybrané genotypy. Prvním navrženým a stále používaným souborem čtyř genotypů Williams (1966) lze rozlišit 16 možných patotypů. Soubor se skládá ze dvou genotypů kapusty *B. oleracea* a dvou linií tuřínů *B. napus* (Williams 1966). Nejvíce propracovaný a mezinárodně uznávaný soubor testovaných genotypů byl publikován v práci Buczacki et al. (1975) pod označením ECD (European clubroot differential). Kolekce je složena z 15 různých genotypů, 5 od každého druhu *B. rapa*, *B. oleracea* a *B. napus*. Odhaduje se, že tento zatím nejpropracovanější systém dokáže reálně odlišit 23 různých patotypů (Diederichsen et al. 2009). Kvůli nekvalitní rozlišovací schopnosti některých evropských patotypů byl pro *B. napus* navržen doplňkový soubor třech genotypů (Some et al. 1996). Kolekce se skládá ze třech genotypů *B. napus* a je schopná rozlišit 8 různých patotypů *P. brassicae*.

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. 2015; Peng et al. 2018). Rezistentní lokusy v genomu *B. oleracea* se vyskytují na všech devíti chromozomech a u starších studií nemusí lokalizace odpovídat dnešní představě o uspořádání genomu *B. oleracea*, vzhledem k tomu, že autoři neměli k dispozici referenční sekvenci tohoto genomu.

Postup identifikace genů zapojených do reakce na napadení *P. brassicae*

Zdroj patogenu, inokulace rostlin a hodnocení napadení

Patogenní materiál

Patogenní materiál použitý pro testování citlivosti rostlin k nádorovitosti byl nasbírán v oblastech České republiky, které byly uvedeny v rámci publikace Říčařová et al. (2016). Po namnožení polních sběrů, byli jednotlivé patotypy *P. brassicae* převedeny na geneticky uniformní populace a určeny do jednotlivých skupin podle práce Williams et al (1966).

Příprava inokula

Po namnožení patogenního materiálu byly napadené kořeny s nádory uloženy do mrazícího 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).

Pěstování rostlin a způsob aplikace inokula

Od každého testovaného genotypu bylo vyseto 6 rostlin ve čtyřech opakováních, které byly infikovány spory a po 7 týdnech vyhodnocena míra napadení. Substrát pro výsev byl vytvořen smícháním standardního zahradního substrátu B (Florestina) 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.

Vyhodnocení úrovně napadení

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).

Použité přístroje a pomůcky:

- mrazicí box -26°C
- autokláv
- mixer
- Bürkerova komůrka
- mikroskop
- pinzeta
- kultivační box/fytotron
- sadbovače

Chemikálie:

- destilovaná voda
- chloramin T
- zahradnický substrát
- perlit

Bioinformatické analýzy

SNP analýza

Asociační SNP analýza slouží k nalezení SNP markerů, které jsou v těsné vazbě s externím znakem. 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. Detailnější popis asociační SNP analýzy použité v této práci lze dohledat ve studii Harper et al. (2012) a Havlickova et al. (2018).

GEM asociační analýza

Ke stanovení vazby mezi genovou expresí a indexem napadení DI byla použita asociační analýza, která využívá lineární regresi mezi expresním profilem genu v kolekci jako závislá proměnná a profilem indexu napadení jako nezávislá proměnná. Expresní profily byly získány z míry exprese vyjádřená v RPKM pro jednotlivé geny. Expresie 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). Detailnější popis GEM asociační analýzy lze najít ve studii Havlickova et al. (2018).

Anotace a predikce kandidátních genů

Pro označení oblastí s kandidátními geny SNP analýzy byly stanoveny dvě prahové hodnoty vymezující 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.

Použité přístroje a pomůcky:

- výpočetní server
- software pro bioinformatiku

Příklady výstupů a interpretace výsledků

Ukázka výstupu – Williamsova klasifikace izolátů *P. brassicae*:

Systém pro stanovení jednotlivých patotypů *Plasmodiophora brassicae* (Williams 1966)

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)

Přiřazení vzorků k jednotlivým patotypům dle Williamsova systému

Při napadení 0–20 % rostlin byla odrůda označená jako rezistentní. Naopak při napadení více jak 20 % rostlin byla odrůda označená jako citlivá. Výsledky byly porovnány s předchozí tabulkou.

	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)

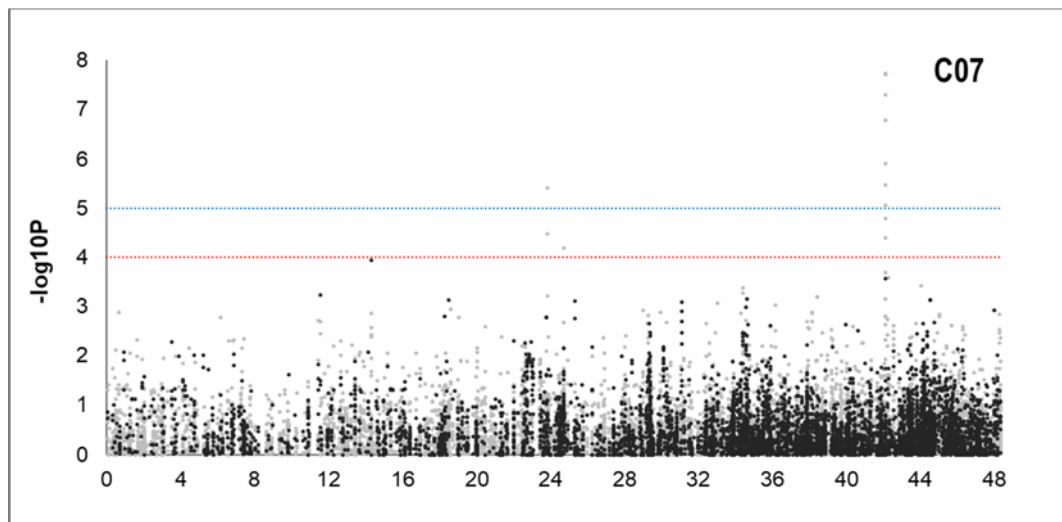
Příklady fotodokumentace výsledků napadení *P. brassicae*

Na obrázcích je zřetelné 100 % napadení odrůdy ECD 13 patotypem An4969-s1 a naopak rezistence vůči napadení u odrůd ECD 10, ECD 11 a Laurentian.

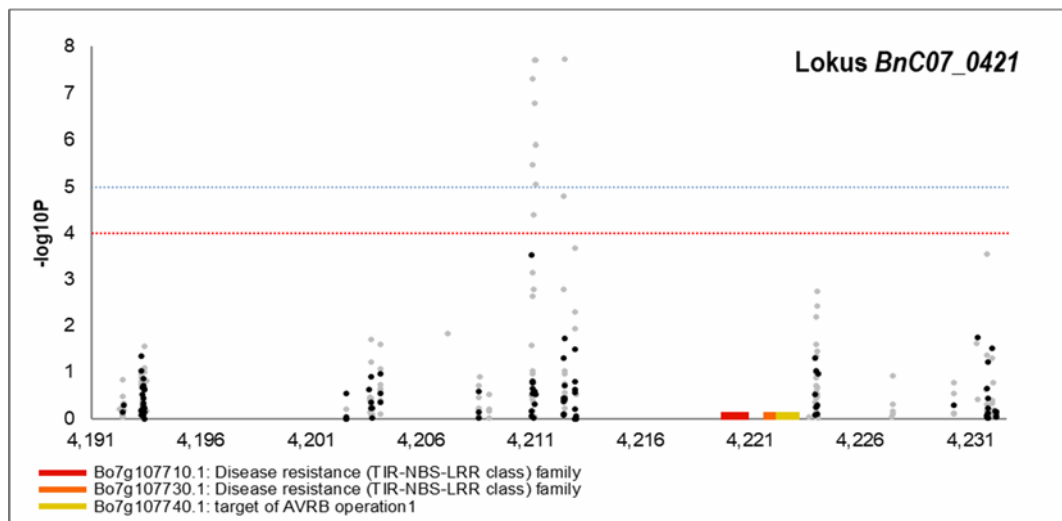


Výběr kandidátních genů účastnících se obranných drah aktivovaných při napadení patogenem *P. brassicae*

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

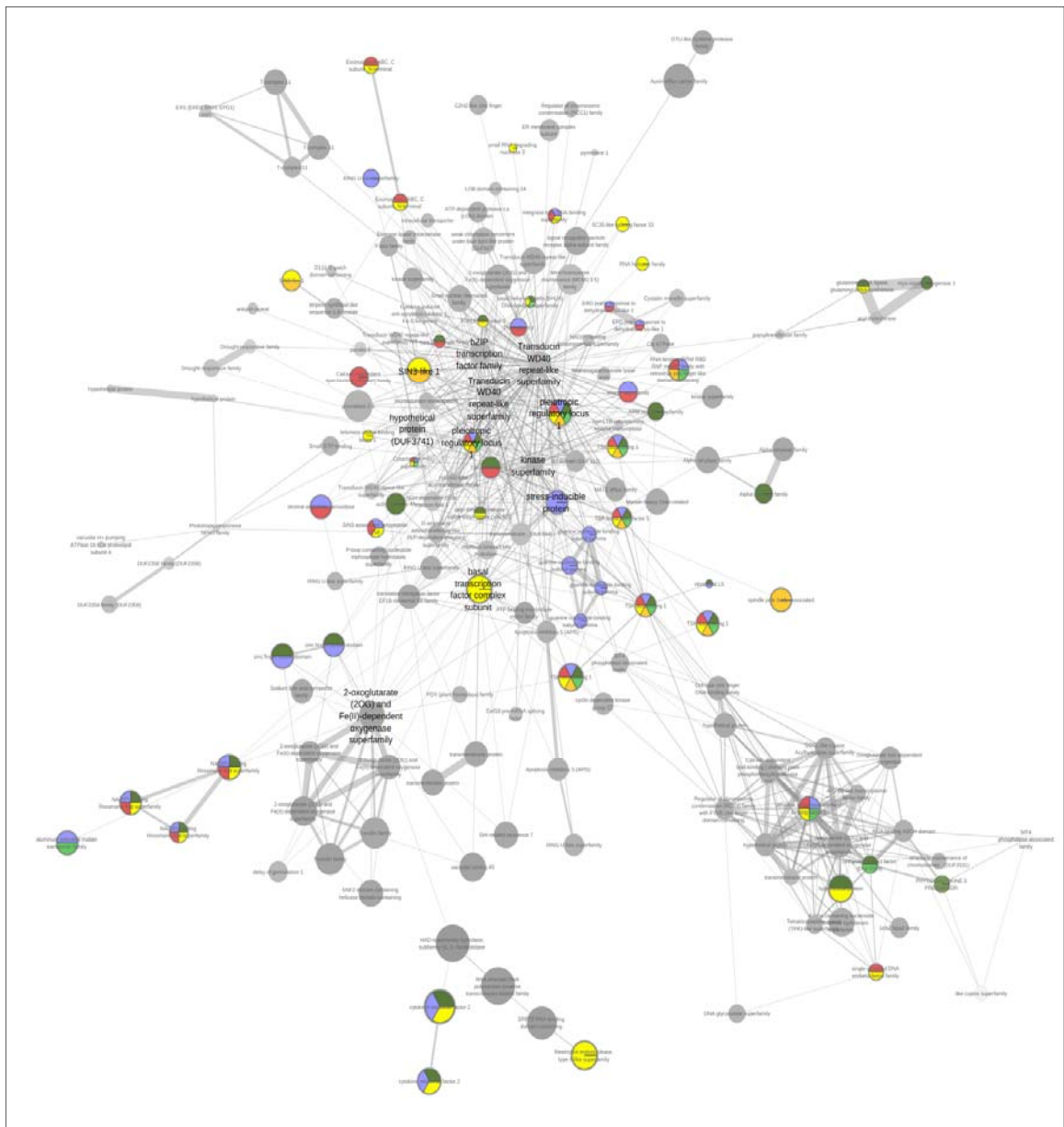


Manhattan plot SNP asoiační analýzy pro chromozom C07.



Manhattan plot SNP asoiační 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 se 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).

Srovnání novosti postupů

Předkládanou metodiku s názvem “Metodický postup pro identifikaci genů účastnících se obranných drah aktivovaných při napadení *P. brassicae*“ lze hodnotit jako novou metodiku, neboť v současné době není šlechtitelské praxi k dispozici ucelená metodika popisující identifikaci patotypů, hodnocení odolnosti genotypů brukvovitých rostlin (hodnocení indexu napadení, DI) a identifikace genů zapojených do reakce na napadení *P. brassicae*. Dosud dostupné informace jsou jen dílčí a rozptýlené ve vědeckých publikacích a monografiích. Navíc se tyto informace často týkají řepky, nikoliv brukvovitých zelenin. Komplexní metodický postup tedy k dispozici není.

Identifikace genů rezistence, resp. genů zapojených do reakce rostliny na napadení *P. brassicae* (reakce na biotický stres) pomocí moderního přístupu založeném analýze fenotypových a molekulárních dat (asociativní transkriptomika) je postup doposud ve šlechtitelské praxi nepoužívaný. Limity pak představuje požadavek na kvalitní fenotypová data a molekulární data získaná po sekvenování transkriptomu. Další limitou je dostupnost „know-how“ a potřeba specializované bioinformatické analýzy dat. Předkládaná metodika pak popisuje všechny kroky analýzy od přípravy rostlinného materiálu, inokulace a hodnocení indexu napadení (stupně rezistence) po představení principů vlastní bioinformatické analýzy tak, aby bylo možné identifikovat geny zapojené do reakce na biotický stres.

Popis uplatnění metodiky

Využití metodiky pro hodnocení indexu napadení a identifikaci genů spojených s reakcí rostlin na napadení je možné ve specializovaných šlechtitelských a aplikačních laboratořích či v laboratořích, které se zabývají molekulárně-biologickými analýzami. Metodika v první části zahrnuje teoretický úvod do problematiky. V praktické části jsou uvedeny metodické postupy fenotypizace (klasifikace patotypů, hodnocení indexu napadení) a bioinformatické analýzy, která vede k identifikaci genů zapojených do reakce na napadení rostliny *P. brassicae*.

Tato metodika byla vyvinuta a optimalizována pro přesnou a spolehlivou detekci odolných rostlin, resp. rostlin se zvýšenou odolností k napadení a identifikaci genů pro aplikaci postupů MAS (marker asistované selekce) nebo GS (genomické selekce). Právě možnost cíleného výběru šlechtitelských materiálů s vyšší tolerancí k biotickému stresu je naprosto klíčová pro úspěšné šlechtění rostlin, které budou poskytovat optimální výnos a kvalitu i podmínkách infekčního tlaku nádorovky. Tato

metodika pak může umožnit přenos znalostí a postupů z akademických pracovišť do běžného provozu např. šlechtitelských laboratoří.

Uživatelé metodiky jsou výzkumná pracoviště, laboratoře šlechtitelských firem, které mohou dle svých laboratorních možností využít tyto analýzy pro zefektivnění šlechtitelského procesu. Metodika bude uplatněna prostřednictvím šlechtitelské firmy Oseva Pro s.r.o. S tímto subjektem byla uzavřena smlouva o uplatnění metodiky.

Ekonomické aspekty

Analýzy popisované v této metodice mají značný ekonomický význam z pohledu šlechtitelských pracovišť. V důsledku závažnosti nádorovitosti, zvyšujícímu se infekčnímu tlaku a nedostupnosti odolných odrůd se šlechtění na odolnost či toleranci k biotickému stresu stává vysoce aktuální. Klíčové pro úspěšné šlechtění pak je znalost genů rezistence a rovněž tak znalost o rozšíření patotypů nádorovky.

Pomocí navrženého metodického postupu lze objektivně klasifikovat jednotlivé izoláty *P. brassicae* a přesně stanovit jednotlivé patotypy. Pomocí uvedených metodických postupů je možné rovněž stanovit index napadení (stupeň rezistence) u testovaných genotypů brukvovitých rostlin a na základě bioinformatické a molekulární analýzy identifikovat geny, které hrají klíčovou roli v rezistenci. Genotypy s těmito geny pak mohou být základem pro další šlechtění.

Pro provedení analýz je potřebné disponovat vybavenou fytopatologickou a molekulárně-biologickou laboratoří. Náklady na klasifikaci patotypů jsou přibližně 2000 Kč. Náklady na bioinformatickou analýzu jsou představovány mzdovými náklady pracovníka/bioinformatika (v tomto případě neuvažujeme náklady na transkriptomickou analýzu, kdy data z RNAseq jsou dostupná v genomické databázi). Pro šlechtitelské pracoviště je uvedený metodický postup zcela zásadním přínosem, kdy umožní získání novošlechtění/odrůd s vyšší tolerancí k biotickému stresu.

Seznam použité literatury

- 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.
- DIEDERICHSEN, Elke, Martin FRAUEN a Jutta LUDWIG-MUELLER, 2014. Special Issue: Clubroot disease management challenges from a German perspective. *Canadian Journal of Plant Pathology* **36**, 85–98.
- DIXON, Geoffrey R., 2009. *Plasmodiophora brassicae* in its Environment. *Journal of Plant Growth Regulation* **28**(3), 212–228.
- HARPER, Andrea L, Martin TRICK, Janet HIGGINS, Fiona FRASER, Leah CLISSOLD, Rachel WELLS, Chie HATTORI, Peter WERNER a Ian BANCROFT, 2012. Associative transcriptomics of traits in the polyploid crop species *Brassica napus*. *Nature Biotechnology* **30**(8), 798–802.
- 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.
- HAVLICKOVA, Lenka, Zhesi HE, Lihong WANG, Swen LANGER, Andrea L. HARPER, Harjeevan KAUR, Martin R. BROADLEY, Vasilis GEGAS a Ian BANCROFT, 2018. Validation of an updated Associative Transcriptomics platform for the polyploid crop species *Brassica napus* by dissection of the genetic architecture of erucic acid and tocopherol isoform variation in seeds. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* **93**(1), 181–192.
- HOWARD, Ronald J., Stephen E. STRELKOV a Michael W. HARDING, 2010. Clubroot of cruciferous crops – new perspectives on an old disease. *Canadian Journal of Plant Pathology* **32**(1), 43–57.

- CHYTILOVÁ, Věra a Karel DUŠEK, 2007. *Metodika testování odolnosti brukvovitých plodin k nádorovitosti*. Praha: Výzkumný ústav rostlinné výroby. ISBN 978-80-87011-23-2.
- KOPECKY, P. a K. DUŠEK, 2012. Screening the Brassicas Czech National Collection for Sources of Clubroot Resistance. In: A. BALLIU a N. GRUDA, ed. *V Balkan Symposium on Vegetables and Potatoes*. Leuven 1: Int Soc Horticultural Science, s. 147–150.
- 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, 2015. Genotyping-by-sequencing map permits identification of clubroot resistance QTLs and revision of the reference genome assembly in cabbage (*Brassica oleracea* L.). *DNA Research* dsv034. ISSN 1340-2838, 1756-1663.
- 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.
- 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.
- NEUHAUSER, Sigrid, Martin KIRCHMAIR, Simon BULMAN a David BASS, 2014. Cross-kingdom host shifts of phytomyxid parasites. *Bmc Evolutionary Biology* **14**, 33.
- PALMA, Kristoffer, Qingguo ZHAO, Yu Ti CHENG, Dongling BI, Jacqueline MONAGHAN, Wei CHENG, Yuelin ZHANG, Xin LI, 2007. Regulation of plant innate immunity by three proteins in a complex conserved across the plant and animal kingdoms. *Genes Dev.* **21**(12), 1484-93.
- 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.
- POPESCU, Andrei-Alin, Andrea L. HARPER, Martin TRICK, Ian BANCROFT a Katharina T. HUBER, 2014. A Novel and Fast Approach for Population Structure Inference Using Kernel-PCA and Optimization. *Genetics* **198**(4), 1421-31.

- R Core Team, 2020. A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria; URL <https://www.R-project.org/>.
- 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.
- ROD J. 1986. Dosavadní zjišťování výskytu nádorovitosti /*Plasmodiophora brassicae* Wor./ v Československu. X. Czechoslovak Plant Protec. Conf. Brno Sep. 2 – 5, s. 103–104.
- ŘÍČAŘOVÁ, V., J. KAZDA, K. SINGH a P. RYŠÁNEK, 2016. Clubroot caused by *Plasmodiophora brassicae* Wor.: a review of emerging serious disease of oilseed rape in the Czech Republic. *Plant Protection Science* **52**(No. 2), 71–86.
- SIEMENS, Johannes, Simon BULMAN, Frank REHN a Thomas SUNDELIN, 2009. Molecular Biology of *Plasmodiophora brassicae*. *Journal of Plant Growth Regulation* **28**(3), 245–251.
- SOME, A., M. J. MANZANARES, F. LAURENS, F. BARON, G. THOMAS a F. ROUXEL, 1996. Variation for virulence on *Brassica napus* L. amongst *Plasmodiophora brassicae* collections from France and derived single-spore isolates. *Plant Pathology* **45**(3), 432–439.
- 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. ISSN 0167-4412, 1573-5028.
- WALLENHAMMAR, A.-C., 1996. Prevalence of *Plasmodiophora brassicae* in a spring oilseed rape growing area in central Sweden and factors influencing soil infestation levels. *Plant Pathology* **45**(4), 710–719.
- 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. GOSEN, 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.

Seznam publikací předcházející metodice

- Hejna, O., Kopecký, P., Čurn, V. (2019): Hledání genetických zdrojů rezistence k nádorovitosti košťálovin. *Úroda* 12, roč. LXVII, 2019, vědecká příloha, s. 121 – 125. ISSN 0139-6013.
- Kopecký, P., Duchoslav, M., Hýbl, M. (2019): Hodnocení odolnosti vybraných šlechtitelských linií hlávkového zelí vůči nádorovitosti kořenů brukvovitých. *Úroda* 12, roč. LXVII, 2019, vědecká příloha, s. 139 – 143. ISSN 0139-6013.
- Hejna O., Havlickova L., He Z., Bancroft I., Curn V. (2019): Analysing the genetic architecture of clubroot resistance variation in *Brassica napus* by associative transcriptomics. *Molecular Breeding*, 39, 112.
- Kopecký, P., Duchoslav, M., Hýbl, M. (2019): Hodnocení odolnosti vybraných šlechtitelských linií hlávkového zelí vůči nádorovitosti kořenů brukvovitých. *Úroda* 12, roč. LXVII, 2019, vědecká příloha, s. 139 – 143. ISSN 0139-6013.
- Kopecký P., Hýbl M., Petrželová I, Duchoslav M. (2020): Odolnost vybraných genotypů ředkvičky vůči nádorovitosti kořenů brukvovitých. *Úroda* 12, roč. LXVIII, 2020, vědecká příloha, s. 93 – 98. ISSN 0139-6013.

Název: Hejna O. a kol. (2023): Metodický postup pro identifikaci genů účastnících se obranných drah aktivovaných při napadení *P. brassicae*

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

Vydal: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Fakulta zemědělská a technologická
Studentská 1668
370 05 České Budějovice

Vydáno bez jazykové úpravy

Metodika byla schválena Ministerstvem zemědělství ČR, dopisem ze dne 12.1.2024 (č.j. MZE-3367/2024-13132; osvědčení č. UKZUZ 219305/2023), jako certifikovaná metodika s doporučením pro její využití v zemědělské praxi.

Kontakt na autory: hejna@fzt.jcu.cz

ISBN: 978-80-7694-041-3

ISBN 978-80-7694-041-3



9 788076 940413