

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

DIZERTAČNÍ PRÁCE

**Identifikace genů rezistence k nádorovitosti
pomocí asociativní transkriptomiky**

Mgr. Ing. Ondřej Hejna

2019

Školitel: prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.
Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Zemědělská fakulta

Specialista: Ing. Lenka Havlíčková, Ph.D.
University of York

Poděkování

Mé poděkování patří především Ing. Lence Havlíčkové, Ph.D. a prof. Ing. Vladislavu Čurnovi, Ph.D. za pomoc a cenné rady při vypracování dizertační práce. Dále bych také chtěl poděkovat princezně Apánce za nesmírnou psychickou podporu a jazykovou korekci finálního textu.

Prohlašuji, že jsem dizertační práci vypracoval samostatně na základě vlastních zjištění a za pomoci uvedené literatury.

V Českých Budějovicích dne 4. 10. 2019

Ondřej Hejna

Souhrn

Současný 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 odrůd. Do současné doby bylo identifikováno několik genetických zdrojů rezistence pro šlechtění, nicméně jejich použití při šlechtění do jisté míry brání neznalost principu fungování rezistence. V rámci této práce je hodnocena odolnost kolekce genotypů *B. napus* k nádorovitosti a následně jsou tato data použita pro dvojici analýz založených na metodách asociativní transkriptomiky sloužící k nalezení selekčních markerů a příčinných genů. Při hodnocení reakce 250 genotypů ve variabilní kolekci *B. napus* byl použit směsný patotyp nádorovitosti ECD 17/31/31. Výsledkem tohoto testování bylo nalezení 46 rezistentních genotypů, jejichž index napadení (DI) převyšoval hodnotu 80. Pro 245 genotypů byla získána RNAseq data ze sekvenování jejich transkriptomů. V těchto datech byly identifikovány SNP markery a expresní profily genů, které byly následně použity ve dvou asociativních analýzách. V prvním případě byla na základě 256 397 SNP markerů provedena SNP asociační analýza. Výsledkem této analýzy bylo nalezení 86 SNP markerů, které byly lokalizovány do 9 různých oblastí na šesti chromozomech. Tyto rezistentní lokusy byly pojmenovány podle jejich polohy jako *BnA01_0308*, *BnA02_0265*, *BnA02_0286*, *BnA03_0186*, *BnA03_0263*, *BnA08_0009*, *BnC02_0414*, *BnC07_0238* a *BnC07_0421*. V rámci těchto oblastí bylo nalezeno 392 genů. V případě druhé asociační analýzy byly použity expresní profily 53 889 genů *B. napus*, které vykazovaly určitou míru změny exprese mezi jednotlivými genotypy. Samotná analýza hodnotila míru asociace mezi expresními profily a DI. Na základě této analýzy bylo nalezeno 19 asociovaných genů. V posledním kroku byly provedeny anotační analýzy GO, InterPro a anotace na základě podobnosti s geny *Arabidopsis thaliana* pro geny, které byly výsledkem předchozích asociačních analýz. Na základě těchto dat bylo vybráno 82 kandidátních genů zapojujících se do odolnosti proti nádorovitosti košťálovin. Tyto výsledky představují užitečné informace jak pro samotné šlechtění identifikací asociovaných SNP markerů použitelných pro šlechtění odolných odrůd, tak pro pochopení samotného principu rezistence u *B. napus*.

Klíčová slova: nádorovitost košťálovin, *Plasmodiophora brassicae*, *Brassica napus*, asociativní genomika a transkriptomika

Summary

The current high pathogenic pressure on agriculture crops is the task for breeders. One of the serious problems that modern breeding is struggling to address is clubroot. This disease is caused by the soil biotrophic pathogen *Plasmodiophora brassicae*. At present, this pathogen presents serious problems for most cruciferous crops worldwide. The possibilities for controlling this disease are very limited. From an economic point of view, the most effective option is growing resistant or tolerant varieties against this pathogen. To date, several genetic sources of resistance for breeding have been identified. However, the application of these resources inbreeding is problematic, because there is a lack of knowledge of the basis of the resistance and lack of understanding of causal genes or proteins. In this study, the resistance of the *B. napus* genotypes to clubroot was evaluated. An Associative Transcriptomics approach was used to identify markers and causal genes associated with resistance to clubroot. In assessing the response of a genetic diversity panel comprising 250 accessions of *B. napus*, the mixed pathotype ECD 17/31/31 was used. The result of this testing finds 46 genotypes with disease index (DI) greater than 80. Such varieties can be considered resistant. For 245 genotypes, RNAseq transcriptome data were obtained for use in two associative analyses. In the first assay, SNP association analysis was performed with 256,397 SNP markers distributed across the genome of *B. napus*. The result of this analysis revealed 86 SNP markers located in 9 different regions on chromosomes A01, A02, A03, A08, C02 and C07. Resistant loci were named according to their location as *BnA01_0308*, *BnA02_0265*, *BnA02_0286*, *BnA03_0186*, *BnA03_0263*, *BnA08_0009*, *BnCO02_0414*, *BnCO07_0238* and *BnCO07_0421*. Altogether, 392 genes were found in these regions. For the second association analysis, transcript abundance data of 53,889 genes in the *B. napus* genome were used. The analysis itself evaluated the degree of association between expression profiles and DI profile. Based on this analysis, 19 associated genes were revealed. In the last step, annotation analyzes GO, InterPro, and annotations were performed based on similarity to *Arabidopsis thaliana* genes. Overall, 82 candidate genes were selected to be involved in clubroot resistance. These results provide useful information both for breeding by identifying associated SNP markers useful for breeding resistant varieties and for understanding the elements of resistance in *B. napus*.

Key words: clubroot, *Plasmodiophora brassicae*, *Brassica napus*, associative genomics and transcriptomics

Obsah

1. Úvod.....	1
2. Literární přehled	2
2.1 Nádorovitost košťálovin.....	2
2.1.1 Původ a taxonomické zařazení	2
2.1.2 Životní cyklus a projevy napadení	3
2.1.3 Hostitelské rostliny.....	5
2.1.4 Rozšíření a ekonomické důsledky.....	7
2.2 Způsoby detekce nádorovitosti.....	9
2.2.1 Biotest.....	10
2.2.2 Mikroskopické metody.....	10
2.2.3 Detekce pomocí PCR	11
2.3 Ochranná opatření	11
2.3.1 Preventivní a agrotechnická opatření	12
2.3.2 Pěstování inhibičních a spory vylučujících plodin	13
2.3.3 Chemická ochrana	13
2.3.4 Biologická ochrana.....	15
2.4 Obranné reakce rostlin k patogenům.....	16
2.4.1 Typy interakcí a základních imunitních odpovědí	16
2.4.2 Části imunitního systému rostlinných buněk	19
2.4.2.1 Receptory imunitního systému	19
2.4.2.2 Fytohormony v imunitním systému	21
2.4.2.3 MAP kinázy v imunitním systému	24
2.4.2.4 Transkripční faktory v imunitním systému.....	25
2.4.2.5 RR proteiny a RR metabolity.....	30
2.5 Šlechtění proti nádorovitosti	31
2.5.1 Problémy při šlechtění proti nádorovitosti	31

2.5.2	Klasifikace patotypů při šlechtění proti nádorovitosti	32
2.5.3	Genetické zdroje rezistence.....	33
2.5.3.1	Nalezené rezistentní lokusy a geny u <i>B. rapa</i>	34
2.5.3.2	Nalezené rezistentní lokusy a geny u <i>B. oleracea</i>	35
2.5.3.3	Nalezené rezistentní lokusy a geny u <i>B. napus</i>	36
3.	Hypotézy a cíle disertační práce.....	38
3.1	Hypotézy	38
3.2	Cíle práce.....	38
4.	Materiál a metody.....	39
4.1	Hostitelské rostliny a sekvenování jejich transkriptomu.....	39
4.1.1	Kolekce rostlin	39
4.1.2	Pěstování rostlin pro RNA sekvenování	39
4.1.3	Příprava RNA a sekvenování transkriptomu.....	39
4.1.4	Detekce SNP markerů a kvantifikace transkriptů	40
4.2	Zdroj patogenu, aplikace a hodnocení napadení	41
4.2.1	Patogenní materiál.....	41
4.2.2	Příprava inokula	41
4.2.3	Pěstování rostlin a způsob aplikace inokula.....	41
4.2.4	Vyhodnocení úrovně napadení.....	42
4.3	Bioinformatické analýzy	43
4.3.1	SNP analýza	43
4.3.2	GEM asociační analýza.....	43
4.3.3	Anotace a predikce kandidátních genů.....	43
5.	Výsledky.....	45
5.1	Fenotypová variabilita u testovaných genotypů.....	45
5.2	SNP asociační analýza	50
5.3	GEM analýza.....	71

6.	Diskuze.....	73
6.1	Fenotypová variabilita.....	73
6.2	SNP asociační analýza a kandidátní geny	75
6.2.1	Lokus <i>BnA03_0263</i>	76
6.2.2	Lokus <i>BnC07_0421</i>	77
6.2.3	Lokus <i>BnA03_0186</i>	77
6.2.4	Lokus <i>BnA02_0265</i>	78
6.2.5	Lokus <i>BnA02_0286</i>	79
6.2.6	Lokus <i>BnA01_0308</i>	80
6.2.7	Lokus <i>BnA08_0009</i>	81
6.2.8	Lokus <i>BnC02_0414</i>	82
6.2.9	Lokus <i>BnC07_0238</i>	83
6.3	GEM asociační analýza.....	85
7.	Závěr.....	87
8.	Použitá literatura	89
9.	Příloha	113

1. Úvod

Cílem šlechtění zemědělských plodin je zlepšení žádoucích vlastností jak z pohledu pěstitele požadující vysoký výnos, snadné zpracování a nízké náklady, tak i spotřebitele hledající vysokou kvalitu a zdravotní nezávadnost. Současný vysoký tlak patogenů představuje pro šlechtění náročné úkoly. Jedním ze současných problémů pěstování řepky olejky (brukev řepka, *B. napus* subsp. *napus*) je onemocnění známé jako nádorovitost košťálovin. Toto onemocnění způsobuje obligátní biotrofní patogen *Plasmodiophora brassicae*, který velice dlouho přežívá v půdě (Wallenhammar 1996). V současnosti představuje toto onemocnění v celosvětovém měřítku jedno z nejzávažnějších problémů pěstování brukvovitých plodin (Howard et al. 2010). 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 potencionální zdravotní závadnosti, představuje použití rezistentní odrůd jedno z nejlepších řešení (Dixon 2009). 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 (Ueno et al. 2012). 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 (Diederichsen et al. 2009).

2. Literární přehled

2.1 Nádorovitost košťálovin

Nádorovitost košťálovin je jednou z nejzávažnějších a nejrozšířenějších chorob brukvovitých plodin působící rozsáhlé škody po celém světě. Příčinou této nemoci je půdní, obligátně biotrofní patogen *Plasmodiophora brassicae*. Tento literární přehled shrnuje současné poznatky týkající se nádorovitosti od původu, taxonomie, životního cyklu přes ekonomické dopady až po ochranné opatření a cílené šlechtění plodin tolerantních k tomuto onemocnění.

2.1.1 Původ a taxonomické zařazení

První záznam týkající se nádorovitosti košťálovin pochází od Palladia ze 4. století našeho letopočtu, který pozoroval ztloustlé houbovitě kořeny na brukvích, tuřínech a ředkvích po použití hnoje, který pocházel od dobytka krmného napadenými kořeny (Watson & Baker 1969). Pozdější zmínka o výskytu nádorovitosti v Evropě pochází ze 13. století od Alberta Velikého. První věrohodné záznamy o škodách způsobené nádorovitostí pochází z 18. století z Anglie a později z 19. století z Francie a Německa (Karling 1968). Pro území České republiky je první věrohodný záznam až z 20. století, kdy byla popsána nádorovitost na zelí v okolí Veselí nad Lužnicí (Rod 1996). K identifikaci původce tohoto onemocnění vedla až rozsáhlá epidemie nádorovitosti v Rusku v 19. století. Na tuto událost reagovala ruská zahradnická společnost vypsáním odměny za odhalení příčiny, které vedla k rozsáhlé neúrodě zelí v okolí St. Petersburgu. Tuto cenu získal v roce 1875 ruský vědec Michael Woronin, který jako první identifikoval původce nádorovitosti a nazval tento organismus *Plasmodiophora brassicae* Wor. (Dixon 2009). Tradičně byla *P. brassicae* patřící do skupiny Plasmodiophorida řazena do říše hub. Pozdější fylogenetické analýzy malé ribozomální podjednotky tuto teorii vyvrátily (Cavalier-Smith & Chao 2003). Následné studie aktinu a ubiquitinu přeřadily celou tuto skupinu do říše Protozoa (Archibald & Keeling 2004). Sekvenování celého genomu *P. brassicae* potvrdilo správnost zařazení do kmenu Cercozoa (Siemens et al. 2009). Poslední studie se přiklánějí k zařazení kmenu Cercozoa do říše Rhizaria, proto současné zařazení *P. brassicae* vypadá následovně – říše: Rhizaria, kmen: Cercozoa, třída: Phytomyxea, řád: Plasmodiophorales, čeleď: Plasmodiophoraceae, rod a druh:

Plasmodiophora brassicae, českým názvem nádorovka kapustová (Neuhauser & Kirchmair 2011).

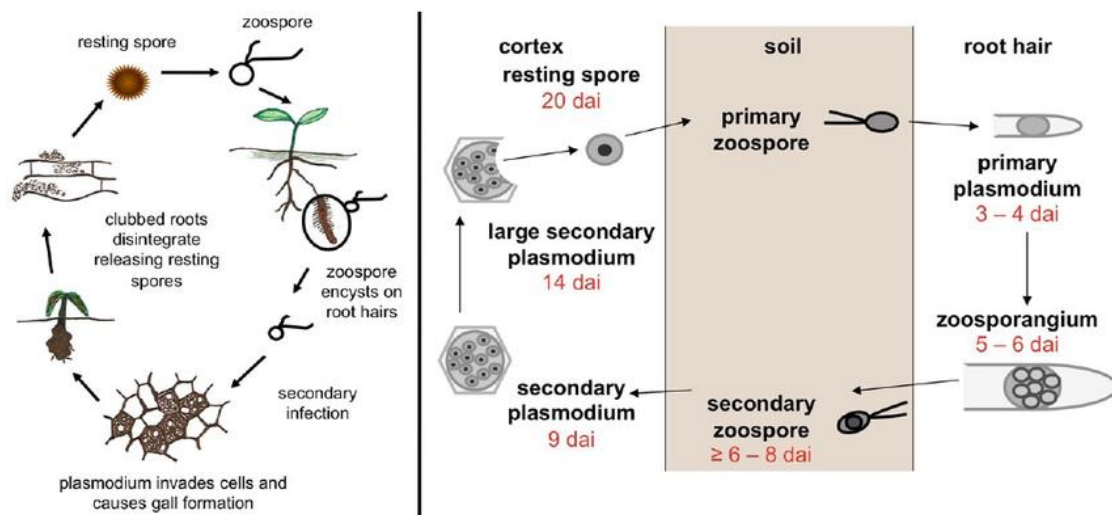
2.1.2 Životní cyklus a projevy napadení

Dle současných poznatků se životní cyklus *P. brassicae* dělí na tři životní fáze: dormantní spory, primární fáze napadení, sekundární fáze napadení. Vytrvalé spory se do půdy dostávají z rozpadajících se nádorů na kořenech brukvovitých rostlin. Jejich velikost se pohybuje od 2 do 3 μm . Největší výskyt je pozorován v horní vrstvě půdy, nicméně dostávají se až do hloubky 40 cm (Dixon 2009). Doba přežití spor může dosahovat i více než 18 let se střední dobou přežití 3 – 4 roky (Wallenhammar 1996; 2010). K aktivaci klíčení vede několik faktorů, převážně však přítomnost kořenů hostitelské rostliny. Spory dokáží rozpoznat hostitele podle látek vylučovaných z kořenů. K aktivaci spor dochází i za přítomnosti jiných druhů rostlin a není proto závislé jen na vhodných hostitelích. Další faktory, které ovlivňují aktivaci trvalých spor je rozsah teplot od 6 – 27 °C, nižší pH půdy, vyšší půdní vlhkost, případně i přítomnost jiných půdních organismů (Karling 1968).

Primární fáze napadení začíná po aktivaci dormantní spory, která se mění na primární zoosporu kapkovitého tvaru se dvěma charakteristickými bičíky umožňující zoospoře aktivní pohyb směrem ke kořeni rostliny. Zoospory se dokáží pohybovat jen na krátkou vzdálenost v půdním prostředí nasyceným dostatečným množstvím vody (Hwang et al. 2012). Pokud se v této velmi zranitelné fázi dokáže dostat ke kořenovému vlásku, mechanicky prorazí buněčnou stěnu pomocí charakteristického penetračního hrotu a pronikne dovnitř (Dixon 2009). Ve vnitřním prostředí buňky ztrácí bičíky a mění se v primární jednojaderné plazmodium. V časovém horizontu 5 – 7 dní dojde k dělení a transformaci na mnohojaderné plazmodium, které dává vzniknout 4 – 8 sekundárním zoosporám vizuálně neodlišitelných od primárních zoospor (Dixon 2009). Mechanicky se většina těchto zoospor dostává zpět do půdního prostředí. Tímto procesem je ukončeno primární napadení, které může probíhat pravděpodobně u všech brukvovitých rostlin. *P. brassicae* může primární fázi realizovat ale i v mnoha dalších rostlinách z čeledi Poaceae, Papaveraceae nebo Rosaceae (Karling 1968).

Sekundární fáze napadení je iniciována opětovným napadením buněk kořenového vlášení případně i dalších epidermálních buněk kořene a hypokotylu. K tomuto kroku dochází přibližně kolem 13. dne po aktivaci trvalé spory (Devos et al. 2005). Sekundární

napadení je na rozdíl od primární fáze charakteristické tím, že sekundární zoospory pronikají hlouběji do vnitřních pletiv kořene, kde se transformují na sekundární plazmodia. Předpokládá se, že část sekundárních zoospor je schopná se přímo přemístit do vnitřních částí kořene bez opuštění rostliny (Feng et al. 2013). Sekundární plazmodia následně narušují rovnováhu regulačních drah cytokininů, auxinů a brassinosteroidů v okolních buňkách. Konkrétní mechanismus není přesně znám, nicméně důsledkem těchto změn dochází k nadprodukci rostlinných hormonů vedoucích ke zmnožení a hypertrofii buněk a dále také ke změně toku živin ve prospěch oblastí s patogenem (Ludwig-Müller et al. 2009). Vizually lze pak pozorovat vytváření nádorů na kořenech rostlin. V této fázi sekundární plazmodia zároveň prochází karyogamií a meiotickým dělením, které dává vzniknout velkému množství haploidní spor. K tomuto kroku dochází přibližně 21. dne od počátku napadení (Devos et al. 2005). Důsledkem silných morfologických změn ztrácí kořenový systém integritu a vlivem dalších půdních organismů dochází k rozpadu nádorů. Tímto způsobem je zajištěno, že se vzniklé trvalé spory dostávají do půdy, kde budou další sezony čekat na podnět k vyklíčení (Ludwig-Müller et al. 2009). Celý životní cyklus patogenu je znázorněn na obr. 1.



Obr. 1: životní cyklus nádorovky (Auer & Ludwig-Müller 2015)

První pozorovatelné symptomy představují abnormálně velké a deformované kořeny označované jako nádory. V prvním stádiu se objevují na postranních kořenech, později je zasažen i hlavní kořen. Tvar nádorů a jejich rozmístění se může lišit podle druhu i odrůdy. Běžné jsou beztvare zvětšeniny na kořenech. U některých druhů nabývají kulovitého, perličkovitého nebo vřetenovitého tvaru. Zpočátku jsou nádory na povrchu

světlé, uvnitř měkké bez dutin, později ale tmavnou, stávají se dřevnaté. V poslední fázi dochází k jejich hnití a rozpadu vlivem půdních mikroorganismů (Brown & Morra 1997). Na nadzemních částech rostlin lze napadení pozorovat v pozdější fázi, kdy může docházet k deformaci hypokotylu, bulvy, případně i vyšších stonkových partií. V této fázi je často poškozen transport vody a minerálních látek i mechanická schopnost kořenového systému, proto se obecně rostliny vyznačují vadnutím při slunečném počasí v důsledku neschopnosti kompenzovat zvýšený odpar vody z listů. Špatné ukotvení rostlin vede k jejich vyvracení (Agrios 2005). Působením patogenu vede též ke zvýšenému toku asimilátů do deformovaných kořenů, což má za následek zakrnělý nebo omezený růst, předčasné kvetení a dozrávání semen, žloutnutí a akumulace antokyanů v listech (Hwang et al. 2012). V případě napadení semenáčků je časté odumření postižené rostliny, při napadení v pozdějších fázích vývoje většinou jedinci přežívají do konce sezony, ale se sníženou produkční schopností (Karling 1968).

2.1.3 Hostitelské rostliny

Rozsah hostitelských rostlin tohoto onemocnění je široký. *P. brassicae* dokáže parazitovat jak na dvouděložných, tak i jednoděložných rostlinách (Neuhauser et al. 2014). Majoritním těžištěm výskytu představuje čeleď Brassicaceae (brukvovité) s přibližně 330 rody zahrnující přes 3700 druhů rostlin (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 patogen schopen dokončit celý životní cyklus zakončený tvorbou dormantních spor, zahrnuje velké množství ekonomicky významných plodin. K hospodářsky nejvíce zasaženým patří například *B. rapa* ssp. *rapa* (vodnice), *B. rapa* ssp. *chinensis* (čínské zelí), *B. rapa* ssp. *pekinensis* (pekingské zelí), *B. oleracea* ssp. *italica* (brokolice), *B. oleracea* ssp. *botrytis* (květák), *B. oleracea* ssp. *capitata* (zelí), *B. oleracea* ssp. *gongyloides* (kedluben), *B. oleracea* ssp. *sabellica* (kadeřávek), *B. oleracea* ssp. *sabauda* (hlávková kapusta), *B. oleracea* ssp. *gemmifera* (růžičková kapusta), *B. napus* ssp. *oleifera* (řepka olejka), *B. napus* ssp. *napobrassica* (tuřín), *B. juncea* ssp. *oleifera* (řepice olejná), *Raphanus sativus* ssp. *major* (ředkev), *Raphanus sativus* ssp. *radicula* (ředkvička), *Raphanus sativus* ssp. *oleiferus* (ředkev olejná) a další.

Tab. 1: Seznam citlivých druhů k nádorovitosti

druh	autor
<i>Armoracia rusticana</i>	Chai et al. (2014)
<i>Beta vulgaris</i>	Ludwig-Muller et al. (1999)
<i>Brassica carinata</i>	Howard et al. (2010)
<i>Brassica juncea</i> ssp. <i>megarrhiza</i>	Chai et al. (2014)
<i>Brassica juncea</i> ssp. <i>crassicaulis</i>	Chai et al. (2014)
<i>Brassica juncea</i> ssp. <i>tumida</i>	Chai et al. (2014)
<i>Brassica juncea</i> ssp. <i>gemmifera</i>	Chai et al. (2014)
<i>Brassica juncea</i> ssp. <i>multisecta</i>	Chai et al. (2014)
<i>Brassica juncea</i> ssp. <i>leucanthus</i>	Chai et al. (2014)
<i>Brassica juncea</i> ssp. <i>longepetiolata</i>	Chai et al. (2014)
<i>Brassica juncea</i> ssp. <i>linearifolia</i>	Chai et al. (2014)
<i>Brassica juncea</i> ssp. <i>strumata</i>	Chai et al. (2014)
<i>Brassica juncea</i> ssp. <i>latipa</i>	Chai et al. (2014)
<i>Brassica juncea</i> ssp. <i>involuta</i>	Chai et al. (2014)
<i>Brassica juncea</i> ssp. <i>multiceps</i>	Chai et al. (2014)
<i>Brassica juncea</i> ssp. <i>rugosa</i>	Chai et al. (2014)
<i>Brassica juncea</i> ssp. <i>foliosa</i>	Chai et al. (2014)
<i>Brassica juncea</i> ssp. <i>oleifera</i>	Chai et al. (2014)
<i>Brassica juncea</i> ssp. <i>utilis</i>	Chai et al. (2014)
<i>Brassica napus</i> ssp. <i>oleifera</i>	Gibbs (1932)
<i>Brassica napus</i> ssp. <i>napobrassica</i>	Gibbs (1932)
<i>Brassica nigra</i>	Howard et al. (2010)
<i>Brassica oleracea</i> ssp. <i>acephala</i>	Gibbs (1932)
<i>Brassica oleracea</i> ssp. <i>botrytis</i>	Gibbs (1932)
<i>Brassica oleracea</i> ssp. <i>capitata</i>	Gibbs (1932)
<i>Brassica oleracea</i> ssp. <i>gemmifera</i>	Gibbs (1932)
<i>Brassica oleracea</i> ssp. <i>ramosa</i>	Gibbs (1932)
<i>Brassica oleracea</i> ssp. <i>italica</i>	Gibbs (1932)
<i>Brassica oleracea</i> ssp. <i>gongyloides</i>	Gibbs (1932)
<i>Brassica oleracea</i> ssp. <i>sabauda</i>	Gibbs (1932)
<i>Brassica oleracea</i> ssp. <i>sabellica</i>	Gibbs (1932)
<i>Brassica rapa</i> ssp. <i>chinensis</i>	Chai et al. (2014)
<i>Brassica rapa</i> ssp. <i>pekinensis</i>	Ludwig-Müller et al. (1999)
<i>Brassica rapa</i> ssp. <i>rapa</i>	Gibbs (1932)
<i>Brassica rapa</i> ssp. <i>sylvestris</i>	Gibbs (1932)
<i>Brassica rapa</i> ssp. <i>trilocularis</i>	Bhattacharya et al. (2014)
<i>Brassica rapa</i> ssp. <i>toria</i>	Bhattacharya et al. (2014)
<i>Camelina sativa</i>	Seguin-Swartz et al. (2009)
<i>Capsella bursa-pastoris</i>	Gibbs (1932)
<i>Diplotaxis muralis</i>	Gibbs (1932)
<i>Eutrema wasabi</i>	Chai et al. (2014)
<i>Erysimum cheiranthoides</i>	Karling (1968)
<i>Lepidium africanum</i>	Gibbs (1932)
<i>Lepidium campestre</i>	Gibbs (1932)
<i>Lepidium sativum</i>	Karling (1968)
<i>Nasturtium officinale</i>	Chai et al. (2014)
<i>Raphanus sativus</i> ssp. <i>longipinnatus</i>	Chai et al. (2014)
<i>Raphanus sativus</i> ssp. <i>radiculus</i>	Chai et al. (2014)
<i>Raphanus sativus</i> ssp. <i>major</i>	Chai et al. (2014)
<i>Raphanus sativus</i> ssp. <i>radicula</i>	Chai et al. (2014)
<i>Raphanus sativus</i> ssp. <i>oleiferus</i>	Chai et al. (2014)
<i>Sinapis alba</i>	Gibbs (1932)
<i>Sinapis arvensis</i>	Karling (1968)
<i>Sisymbrium altissimum</i>	Karling (1968)
<i>Sisymbrium officinale</i>	Gibbs (1932)
<i>Thlaspi arvense</i>	Howard et al. (2010)
<i>Tropaeolum majus</i>	Ludwig-Müller et al. (1999)

Z planých druhů, které se mohou podílet na zvyšování nebo udržení životaschopných spor v půdě, můžeme jmenovat například *Raphanus raphanistrum* (ředkev ohnice), *Thlaspi arvense* (penízek rolní), *Capsella bursa-pastoris* (kokoška pastuší tobolka) a mnoho dalších. Naopak druhy, ve kterých není patogen schopen dokončit svůj životní cyklus, snižují množství trvalých spor v půdě. V tomto případě je životní cyklus patogenu zastaven u druhé fáze a nedochází k destruktivní tvorbě nádorů a vytvoření trvalých spor. K tomuto vývoji dochází například u *Lolium perenne* (jílek vytrvalý), *Agrostis stolonifera* (psineček výběžkatý) a další. Seznam citlivých druhů se přehledně zobrazuje tab. 1. V současnosti vyšlechtěné rezistentní odrůdy *B. napus*, *B. oleracea* a *B. rapa* nejsou odolné proti první fázi napadení, tím sice pozitivně působí na snížení trvalých spor v půdě, ale odolnost proti patogenu není dokonalá. V nezanedbatelném procentu případů lze na kořenech pozorovat malé kulovité nádory, které sice nijak neovlivňují vitalitu rostlin, ale podílejí se na zachování spor v půdě (Rennie et al. 2013).

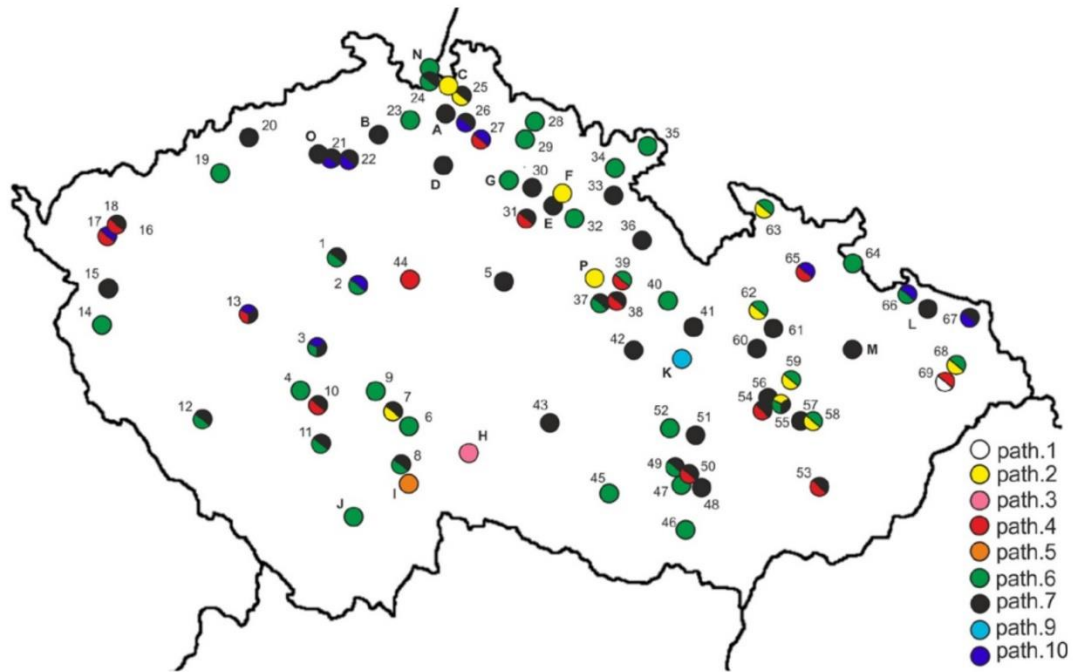
2.1.4 Rozšíření a ekonomické důsledky

V současné době je nádorovitost košťálovin celosvětově rozšířena do všech oblastí s produkcí brukvovitých olejnin a zeleniny (Dixon 2009). Předpokládá se, že prvotní šíření nákazy započalo na Blízkém východě, ze kterého se rozšířila do Číny a Japonska přenosem z původních kultivarů *B. rapa* ssp. *chinensis* a ssp. *pekinensis* (čínské a pekingské zelí). Do Evropy byla pravděpodobně přenesena s kultivary olejnin a pícnin pro dobytek. Rozšíření pěstování brukvovitých plodin došlo v době průmyslové revoluce, která je také obdobím kdy byla zavlečena nádorovitost do Ameriky s krmivem pro dobytek (Dixon 2009). V druhé polovině dvacátého století došlo k mnohonásobnému zvětšení osevních ploch řepky na produkci oleje pro potravinářský průmysl a v 21. století bylo další zvýšení osevních ploch řepky vyvoláno potřebou suroviny pro výrobu biosložky do pohonných hmot (Tolmac et al. 2014). V tuto dobu se *P. brassicae* objevuje v podstatě celosvětově včetně Austrálie. Globální ztráty způsobené tímto patogenem se odhadují na 10 – 15 procent z produkce brukvovitých plodin (Dixon 2006).

Na asijském kontinentu jsou největšími pěstiteli brukvovitých plodin Čína a Indie. V Číně bylo vyzorováno, že významněji je napadena přibližně třetina osevních ploch s brukvovitými plodinami se ztrátami na celkové produkci 20 – 30 procent (Chai et al. 2014). V Indii je velice rozšířená řepice a hořčice. Zde jsou ztráty odhadovány na 32,5 procent (Bhattacharya et al. 2014). Na australském kontinentu jsou napadeny hlavně

brukvovité plodiny pěstované jako zelenina. Zasažena je zde zhruba pětina ploch (Donald & Porter 2014). Největším producentem brukvovitých plodin na americkém kontinentu je Kanada. Začátkem nového tisíciletí zde došlo k velkému rozmachu pěstování jarní řepky. V současnosti je Kanada jedním z největších producentů řepkového oleje na světě (Strelkov & Hwang 2014). Se vzrůstající osevní plochou řepky zde došlo také k velkému rozšíření nádorovitosti. V některých regionech došlo téměř ke stonásobnému nárůstu výskytu nádorovitosti (Strelkov & Hwang 2014). V některých regionech je zasaženo více než 90 procent půdy (Strelkov & Hwang 2014). Celkové ztráty se odhadují na 30 procent produkce v zasažených oblastech (Tewari et al. 2005). Evropa patří k velkým pěstitelům ozimé řepky, a i zde došlo v posledním desetiletí k významnému rozmachu nádorovitosti. Částečně je zasažena většina pěstitelských oblastí jako jsou Skandinávie (Wallenhammar et al. 2014), Anglie (McGrann et al. 2016), Francie (Rouxel et al. 1983), Německo (Diederichsen et al. 2014), Polsko (Korbas et al. 2014) a Česká republika (Říčařová et al. 2016). Některé oblasti v Evropě jsou zasaženy téměř z 80 procent (Wallenhammar et al. 2014).

V České republice byla nádorovitost monitorována od poloviny osmdesátých let 20. 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). V současné době je z ekonomického hlediska problém hlavně u řepky olejky. Osevní plocha této plodiny se za posledních třicet let násobně zvětšila z 102 376 ha (r. 1989) až na současných 411 802 ha (r. 2018) (www.czso.cz – Český statistický úřad). S rozšiřující se plochou s brukvovitými plodinami 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 & Dusek 2012; Říčařová et al. 2016). Současná podoba rozšíření na území České republiky ukazuje Obr. 2.



Obr. 2: mapa rozšíření nádorovitosti v České republice (Říčařová et al. 2016)

2.2 Způsoby detekce nádorovitosti

Identifikace přítomnosti *P. brassicae* a jejich trvalých spor je jednou ze základních ochranných opatření. Navzdory faktu, že se jedná o obligátního parazita, kterého zatím nebylo možno pěstovat v umělých podmínkách, bylo v průběhu posledních let vyvinuto několik detekčních metod. Pomocí těchto technik je možné zjistit přítomnost spor, typ patotypu *P. brassicae* i odhadnout intenzitu infekce ve vzorku. Použité techniky významně pomáhají při volbě ochranných opatření a vhodných plodin pro výsev (Hwang et al. 2012). Wallenhammar et al. (2012) navrhl základní směrnice pro pěstování brukvovitých plodin podle koncentrace trvalých spor v půdě. V případě, že není možno detekovat trvalé spory v půdě, tzn. koncentrace spor je pod detekční hranicí (< 1000 spor v jednom gramu půdy), je možno pěstovat jakékoli odrůdy (Wallenhammar et al. 2012). Při koncentraci 3000 – 130000 spor na jeden gram půdy je žádoucí použít odolné odrůdy nebo zvolit jinou plodinu. Pokud obsah spor překročí hranici 130 000 spor na jeden gram půdy, není vhodné pěstovat ani rezistentní odrůdy. Tlak patogenu je při těchto koncentracích tak velký, že i odolné odrůdy mohou být částečně napadené a je zde daleko větší riziko vzniku nového patotypu *P. brassicae* schopného prolomit obranný mechanismus odolné odrůdy.

2.2.1 Biotest

První metoda vytvořená k detekci trvalých spor je založena na použití citlivých odrůd k napadení nádorovitostí. Tyto odrůdy jsou pěstovány v odebrané půdě po dobu pěti týdnů a následně je odhadnuta míra napadení na čtyřstupňové škále (kořenový systém bez napadení, drobné nádory na postranních kořenech, plně vyvinuté nádory na postranních kořenech, poškození celého kořenového systému včetně hlavního kořenu) (Faggian & Strelkov 2009). Dnes je tato metoda stále používána v různých modifikacích i pro určování patotypů *P. brassicae*. Jako kontrolní odrůda se používá vysoce citlivá odrůda čínského zelí var. Granaat (Hwang et al. 2012). Nevýhodou této metody je citlivost detekce. Hraniční hodnota je detekce spor je přibližně 1000 spor na jeden gram půdy. Další nevýhodou je velká časová a prostorová náročnost (Faggian & Strelkov 2009).

2.2.2 Mikroskopické metody

První metoda k detekci a odhadu množství trvalých spor za použití mikroskopu byla navržena Garrettem (Garrett 1945). Princip metody spočívá v počítání infikovaných vlasových kořínků na určené délce kořenu obarvené jednoprocenním acetokarmínem. Příprava pro tuto metodu spočívá v napěstování týden starých semenáčků v testované půdě. Tato metoda byla později upravena pro přesnější výsledky použitím pětítýdenních rostlin (Colhoun 1957). Protokol této metody byl dále zpřesněn například o systém odběru vzorků, specifikaci pěstebních podmínek a přidružením vysoce citlivé odrůdy čínského zelí var. Granaat (Wallenhammar 1996).

K detekci životaschopných spor byla vyvinuta další technika za použití kombinace dvou fluorescenčních barviv. Calcoflor White M2R je fluorescenční barvivo, které se váže na chitin na povrchu spor. Životaschopnost je pak zjištěna druhým fluorescenčním barvivem ethidium bromidem, který proniká dovnitř buněk a váže se na DNA (Takahashi & Yamaguchi 1988). V současné době jsou stále barvicí metody používány v různých modifikacích za použití například orceinu (Rod 1996) nebo barviva Evans blue (Rennie et al. 2011). Nevýhody těchto metod je nutná preciznost, předchozí zkušenosti, časová náročnost a toxicita používaných barviv.

2.2.3 Detekce pomocí PCR

Novějším přístupem k detekci nádorovitosti je použití polymerázové řetězové reakce (PCR). Pomocí technik na bázi PCR lze detekovat *P. brassicae* jak v hostiteli, tak v půdě. Některými PCR metodami lze i kvantifikovat množství spor. Tento přístup je rychlý, citlivý a relativně levný, ale při přípravě vzorků je nutné překonat některé obtíže, jako jsou například silná a odolná stěna spor, silná vazba na půdní částice a přítomnost inhibitorů PCR reakce v půdě (Kageyama et al. 2003). Příprava vzorku v mnoha případech vyžaduje enzymatickou degradaci stěny spor (Porteous et al. 1994), přečištění DNA pomocí gelové filtrace (Moran et al. 1993) a eliminaci inhibitorů použitím aditiv např. bovine serum albumin (BSA) (Kreader 1996).

První detekční metody na bázi PCR využívaly tzv. nested-PCR k zisku větší citlivosti. Faggian et al. (1999) navrhl dvě dvojice specifických primerů amplifikující ITS oblast *P. brassicae* (Faggian et al. 1999). Stejněho roku byla publikována také metoda založená na dvojici specifických primerů, které cílí na amplifikaci genu pro isopentyl transferázu v genomu *P. brassicae* (Ito et al. 1999). O několik let později byla navržena klasická PCR pro jeden pár specifických primerů amplifikující jednu z ITS oblastí *P. brassicae* (Kageyama et al. 2003). Zatím poslední navržená a dnes nejpoužívanější PCR metoda na základně jednoho páru primerů je popsána ve studii (Cao et al. 2007). Tato PCR metoda je používána i v komerční verzi s citlivostí 1000 spor na jeden gram půdy (Faggian & Strelkov 2009). Poslední známé techniky využívají kvantitativní PCR (qPCR). Tyto metody na bázi PCR dokáží nejen detekovat přítomnost patogenu, ale i odhadnout intenzitu výskytu a množství trvalých spor (Rennie et al. 2011; Wallenhammar et al. 2012). Citlivost qPCR detekčních metod se podobná jako v předchozích případech.

2.3 Ochranná opatření

Navzdory mnoholetému výzkumu nádorovitosti dosavadní znalosti zatím nedokázaly tento nebezpečný patogen brukvovitých plodin zastavit. Naopak v současné době čelíme rychlému rozšiřování ve všech pěstitelských oblastech (Howard et al. 2010). Hlavním problémem dosavadního nezdaru leží pravděpodobně v klíčových vlastnostech tohoto patogenu. Jedná se obligátního vnitrobuněčného parazita velmi malých rozměrů, jehož velmi odolné spory jsou v některých případech životaschopné i po více než 18 letech (Wallenhammar 1996). Primárně dochází k šíření přenosem napadených rostlin a

infikované půdy (Cao et al. 2009). Nicméně bylo zaznamenáno i přenos spor větrem (Rennie et al. 2015), splachem z polí (Strelkov et al. 2011) nebo přes odvodňovací a závlahové systémy (Dixon 2015). Jediná spora může být příčinou napadení (Buczacki & White 1977). Aplikace ochranných opatření musí být komplexní, založená v první řadě na prevenci. V případě napadení je třeba volit kombinaci biologických, chemických, agrotechnických a fyzikálních opatření.

2.3.1 Preventivní a agrotechnická opatření

Jako preventivní opatření ke snížení přenosu nákazy na další nezasazené pozemky jsou klíčová sanitární opatření. Nejčastějším typem rozšíření je přenos nakažené půdy (Cao et al. 2009). Z tohoto důvodu je klíčové vždy očistit zemědělskou techniku od zbytků půdy a plodin před opuštěním pole. Dle doporučení je vhodné postupovat ve třech krocích. Nejdříve je třeba očistit ulpělou zeminu a zbytky plodin. Poté k omytí použít tlakovou trysku s vodou a v posledním kroku je třeba použití vhodného dezinfekčního prostředku (chlornan sodný, peroxid vodíku) a nechat působit po dobu 20 minut (Howard et al. 2010). Bylo potvrzeno, že tato sanitární opatření byla v praxi velice efektivní proti dalšímu šíření (Strelkov et al. 2011). Vždy je třeba brát ohled, co je z infikovaného pozemku odvezeno a zda není možná další infekce například krmivem pro dobytek, kompostováním, chlévskou mrvou, kejdou a podobně.

Agrotechnická opatření slouží především ke snížení a eliminaci infekce na zasažených pozemcích. Kvůli dlouhodobému přežití trvalých spor v půdě je nutné přistoupit k omezení pěstování brukvovitých plodin na infikovaných pozemcích nebo aspoň upravit osevní postup tak, aby časový odstup mezi brukvovitými plodinami byl minimálně čtyři roky. Takovéto opatření se v praxi ukázalo jako významný činitel k snížení infekčního tlaku (Peng et al. 2015). Dalšími faktory snižující množství trvalých spor je snížená vlhkost půdy (Howard et al. 2014), teplota (Gossen et al. 2014) a vitalita rostlin (Howard et al. 2014). Proto je vhodné dle potřeby přistoupit k cíleným opatřením jakou jsou drenážní systém, posunutí výsadby do chladnějšího období a správné hnojení dusíkem a dalšími minerálními látkami, aby docházelo ke zvýšení vitality rostlin (Howard et al. 2014).

2.3.2 Pěstování inhibičních a spory vychytávajících plodin

Jedním z alternativních způsobů ochrany je pěstování inhibičních rostlin nebo rostlin vychytávající spory nádorovitosti. Bylo prokázáno, že některé typy plodin inhibují životaschopnost trvalých spor *P. brassicae* v půdě například *Mentha piperita* (máta peprná), *Satureja hortensis* (saturejka zahradní) nebo *Thymus vulgaris* (tymián obecný) (Reddy 2017). Zařazením těchto druhů do osevního postupu jako předplodin může mít pozitivní vliv na snížení onemocnění u brukvovitých plodin. Další alternativní možností je využití tzv. spory vychytávajících plodin. Klíčení spor *P. brassicae* je vyvoláno nejen přítomností hostitelských rostlin ale i širokého spektra dalších druhů. Tyto druhy provokují spory ke klíčení látkami uvolňovanými z kořenů. Vyklíčené spory však nejsou schopny vyvolat u těchto druhů tvorbu nádorů. Celkově tak dochází k cílenému snižování spor v půdě (Feng et al. 2014). Takovýto efekt byl prokázán například u jílku vytrvalého (*Lolium perenne*) (Friberg et al. 2005). Použitím provokačních rostlin bylo sníženo množství trvalých spor *P. brassicae* o 30 – 60 procent v závislosti na druhu rostliny (Murakami et al. 2001). V případě silného infekčního tlaku, ale nemusí být snížení trvalých spor dostatečné na to, aby došlo následně ke zmírnění projevu onemocnění u brukvovitých plodin (Ahmed et al. 2011). Použití těchto dvou alternativních způsobů ochrany je většinou spjato s vysokými finančními náklady, proto je k nim přistoupeno jen v ojedinělých případech.

2.3.3 Chemická ochrana

Dlouhodobě nejpoužívanější chemická ochrana proti nádorovitosti je vápnění. Vápenaté ionty zvyšují alkalitu půdy, a tím vytvářejí zhoršené podmínky pro napadení a vývoj nádorovitosti (Howard et al. 2010). K účelu vápnění je možné použít uhličitán vápenatý, uhličitán vápenatohorečnatý, hydroxid vápenatý nebo oxid vápenatý. V závislosti na použitém typu, doby aplikace a půdním reakci je odlišná účinnost vápnění proti patogenu (Donald & Porter 2009). Pro efektivní kontrolu nádorovitosti je třeba zvýšit pH půdy na hodnotu větší než 7,2 (Howard et al. 2010). Některé doprovodné prvky jako hořčík nebo bór také potlačují toto onemocnění (Tremblay et al. 2005; Deora et al. 2011). Alternativou k tradičnímu vápnění je použití dusíkatých hnojiv například dusíkatého vápna nebo kyanidu vápenatého, který má i silně fungistatický účinek. Při aplikaci správně zvolené formy kyanidu vápenatého lze kompletně potlačit nádorovitost na

ošetřené ploše (Donald et al. 2004). Použití všech vápenatých derivátů s sebou nese značné výhody v boji proti nádorovitosti. Nicméně jejich aplikace musí být vždy prováděna ve vysokém dávkování, které pro polní použití nese až příliš velké finanční nároky obhajitelné jen pro specifické použití například potlačení začínající infekce, maloplošné parcely a podobně.

Radikálnějšího účinku v boji proti nádorovitosti lze dosáhnout použitím chemických přípravků. Nejstarší a zároveň nejúčinnější fungicidním přípravkem proti *P. brassicae* je chlorid rtuťný prodáváný pod názvem Calomel. Velmi vysoká účinnost je ale vykoupená silnou toxicitou a dlouhou perzistencí v životním prostředí. Z těchto důvodů je již delší dobu tento přípravek zakázán téměř ve všech zemích světa (Buczacki 1998). V některých zemích je možné použít fungicid quintozene prodáváný pod obchodním názvem Terraclor 75WP, Terraclor F, Adobe 75WP, Crusoe 75WP nebo Quintozene 75WP. Tato látka působí na patogen v hostitelské rostlině a inhibuje vytváření nádorů, ale nepůsobí na trvalé spory. Přípravky na bázi tohoto fungicidu jsou povoleny například v Kanadě nebo Austrálii (Donald & Porter 2009). Dalším fungicidním přípravkem proti nádorovitosti je fluazinam prodáváný pod názvy jako Omega, Shirlan nebo Allegro 500F. Tento fungicid působí podobně jako quintozene, a navíc inhibuje trvalé spory. Tento přípravek je také povolen v Kanadě a Austrálii (Donald & Porter 2009). Nepoužívanějším fungicidem v USA je metam sodium, který inhibuje jak spory nádorovitosti, tak i rozvoj nádorů. Tento přípravek je prodáván například pod obchodními názvy Vapam nebo Sectagon. Jeho užití je povoleno také v Kanadě (Hwang et al. 2014). Jeden z nově uvedených přípravků proti nádorovitosti je cyazofamid. Tento přípravek vykazuje vysokou aktivitu v inhibici trvalých spor, potlačení infekce kořenového vlášení a zamezení tvorby nádorů. V současnosti je prodáván například pod názvem Ranman (Mitani et al. 2003). Pro kontrolu nádorovitosti u brukvovité zeleniny je povolen v Kanadě. Silně inhibiční fungicid proti trvalým sporám je také flusulfamide. Na rozdíl od přechodného přípravku však nedokáže zamezit rozvoji patogenu uvnitř hostitele a nemá tudíž inhibiční účinky na rozvoj nádorů. Tento fungicid je prodáván pod názvy jako Nebijin nebo MTF651 (Tanaka et al. 1999). V České republice je registrován jen jediný přípravek proti nádorovitosti dazomet prodáváný pod obchodním názvem Basamid (Chytilová & Dušek 2007).

V boji proti nádorovitosti byly také testovány některé nespecifické syntetické pesticidy ze skupiny neionogenních tenzidů. Pozitivních výsledků na silně infikovaných půdách bylo dosaženo například při použití přípravků Agral (90 % nonylfenoxypolyetoxy

ethanol), Citowett Plus (50 % octylfenoxypolyethoxy ethanol), AquaGro 2000-L (směs 80 % alkyl fenoly, 5 % estery mastných kyselin) a dalších. Problémem těchto typů přípravků může být jejich částečná fytotoxicita (Hildebrand & McRae 1998).

Celkově lze říci, že proti nádorovitosti existují relativně silné a spolehlivé fungicidní přípravky, nicméně jejich použití je vzhledem k jejich toxicitě vázáno na maloplošné ošetření půdy pro brukvovitou zeleninu nikoli však například řepky olejky. V případě jejich použití zde hraje ještě více než u vápnění ekonomické hledisko. Použití všech zmíněných fungicidů je finanční velice náročné a obhajitelné pro polní použití pouze pro lokální aplikaci na nové ložisko choroby případně vzniku nového patotypu *P. brassicae*. V neposlední řadě je také třeba říci, že při silné koncentraci spor žádný ze zmíněných fungicidů není schopen zcela zabránit rozvoji napadení (Hwang et al. 2014).

2.3.4 Biologická ochrana

V biologické ochraně proti nádorovitosti byly testovány dvě hlavní skupiny látek. První testovanou skupinou jsou organické látky, které stimulují trvalé spory ke klíčení v nepřítomnosti hostitelské rostliny. Aplikaci těchto látek dochází k redukcí trvalých spor v půdě. S pozitivním efektem byly testovány například extrakty z mořských rostlin posidonie mořské (*Posidonia oceanica*) a posidonie australské (*Posidonia australis*) nebo látek jako kyselina kávová, kyselina 2-pyron-5-karboxylová a corilagin (Ohi et al. 2003). Dobré účinnosti těchto látek lze dosáhnout při mírně až středně zamořených půdách. U silně infikovaných pozemků by aplikace těchto látek nedosahovala takové úrovně, aby dokázala výrazně snížit následky napadení (Ohi et al. 2003). V neposlední řadě je také třeba říci, že použitím těchto látek podobně jako fungicidů s sebou nese vysokou finanční zátěž a v některých případech i problematickou aplikaci.

Druhou skupinou látek v biologické ochraně proti nádorovitosti jsou přípravky obsahující živé mikroorganismy. Výhodou těchto přípravků je v některých případech možnost aplikace jak klasicky do půdy, tak i ošetření semen před setím. Velice pozitivních výsledků na středně zasažených půdách bylo dosaženo aplikací dvou druhů hub *Phoma glomerata* (Arie et al. 1998) a *Heteroconium chaetospora* (Narisawa et al. 2005). První zmíněný druh se obecně vyznačuje syntézou epoxydonu, který potlačuje vznik nádorů a blokuje aktivitu auxinu. Předpokládá se, že inhibičními účinky na auxin dochází k zabránění vzniku nádorů (Arie et al. 1998). Dalšími testovanými biologickými organismy byly *Bacillus subtilis*, *Gliocladium catenulatum*, *Streptomyces griseoviridis*,

Verticillium dahliae, *Phytophthora cactorum*, *Pythium oligandrum*, *Trichoderma* spp. a podobně (Chytilová & Dušek 2007). V případě prvních dvou zmíněných mikroorganismů (*Bacillus subtilis* a *Gliocladium catenulatum*) prodávány pod obchodními názvy Serenade resp. Prestope je prokázána téměř stoprocentní účinnost na mírně zamořených půdách. Navíc tyto preparáty zvýšily životaschopnost rostlin (Peng et al. 2014). Podobně jako v předchozích případech, biofungicidní přípravky jsou vhodnou a účinnou alternativou k syntetickým fungicidům. Nicméně i v těchto případech je aplikace vhodná jen pro mírně až středně zasažená místa a je také nutné akceptovat vysoké finanční náklady.

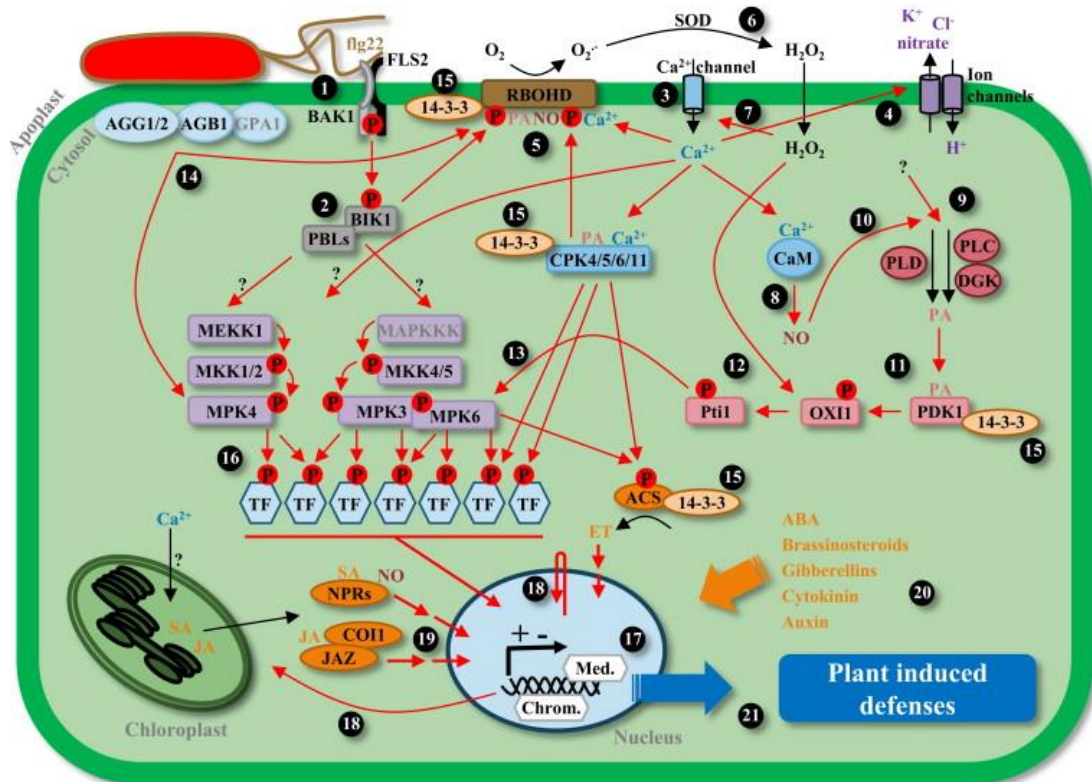
2.4 Obranné reakce rostlin k patogenům

Rostliny představují nepohyblivé organismy, které ve svém přirozeném životním prostředí musí neustále čelit biologickému tlaku z řad patogenních hub, virů a bakterií. Vypořádání se s tímto biotickým tlakem vyžaduje řadu složitých mechanismů, které si rostliny vytvořily v průběhu evoluce (Engelsdorf & Hamann 2014). Na rozdíl od živočichů, rostliny nedisponují oběhovým systémem a primární imunitní reakce je většinou realizována jednotlivými buňkami. Rostlinné buňky disponují řadou antipatogenních látek i schopností vytvořit různé fyzikální a mechanické bariery eliminující víceméně všechny patogeny. Nicméně nepřetržitá tvorba obranných struktur a syntéza antimikrobiálních látek je pro rostlinu energeticky velmi nevýhodná. Omezuje výměnu látek s okolím a mění fyziologické procesy v buňce, které v konečném důsledku negativně ovlivňují růst a vývoj organismu (Bacete et al. 2018). Z tohoto důvodu si rostliny na buněčné úrovni vytvořily složité obranné monitorovací systémy, které cíleně aktivují a regulují adekvátní imunitní reakce (Couto & Zipfel 2016).

2.4.1 Typy interakcí a základních imunitních odpovědí

Interakce na buněčné úrovni probíhá detekcí charakteristických látek indukujících přítomnost patogenu. K tomuto účelu rostlinné buňky disponují širokou paletou rozpoznávacích struktur (receptorů), které jsou obecně známé jako PRR (pattern recognition receptors). Tyto PR (pattern recognition) receptory jsou naprosto klíčové pro iniciaci imunitní odpovědi rostlinné buňky. První typem látek, které PRR rozeznávají se obecně označují jako PAMP (pathogen-associated molecular patterns). Jejich přítomnost

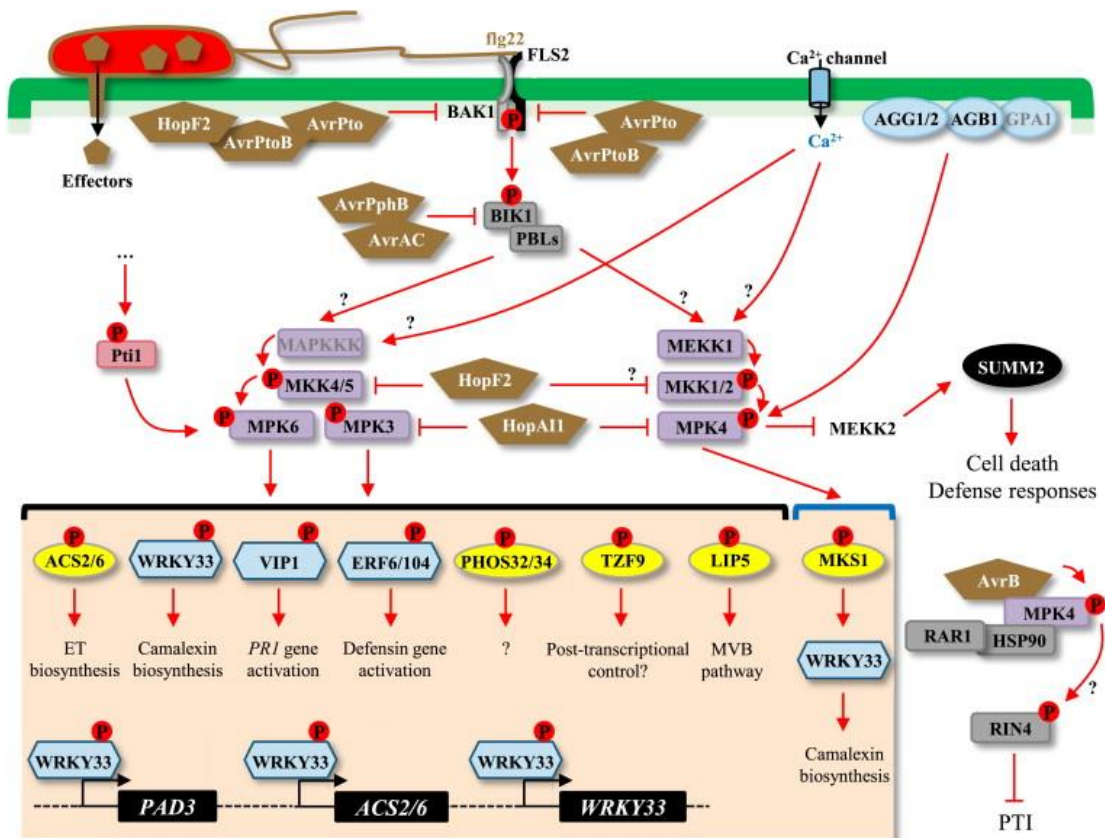
je hlavně důležitá pro obranné reakce s biotrofními a hemibiotrofními patogeny. Mezi tyto látky patří například specifické peptidy, enzymy, metabolity, komponenty buněčných stěn patogenu (Couto & Zipfel 2016). Obranné reakce iniciované PAMP jsou označovány jako PTI (PAMP-triggered immunity) a spouštějí PTI imunitní reakce (Kushalappa et al. 2016). Ukázka současného pochopení PTI reakce je znázorněna na obr. 3.



Obr. 3: Schéma PTI obranné reakce (Bigeard et al. 2015)

Druhým typem látek rozeznávající PRR jsou DAMP (damage-associated molecular patterns). Tyto látky jsou produkovány napadenými buňkami hostitele a slouží jako buněčný signál nebezpečí (Boller & Felix 2009). Mezi tyto látky patří převážně specifická skupina rostlinných signálních molekul. DAMP aktivují v buňce DTI (damage-triggered immunity) imunitní odpověď (Kushalappa et al. 2016). Vzhledem k tomu, že PR receptory rozeznávají obecné struktury jako například flagelin u bakterií nebo chitin u hub, představují základní typ obranných reakcí proti širokému spektru patogenů. Tento typ reakce je označen jako nespecifický (Macho & Zipfel 2015). Pokud je rostlina schopná odvrátit napadení pomocí PTI a DTI imunitní reakcí disponuje tzv. nespecifickou/bazální rezistencí (Kushalappa et al. 2016).

Některé druhy patogenů jsou schopny zablokovat nespecifickou imunitní reakci produkcí tzv. efektorů. Tyto látky například blokují aktivitu PR receptorů nebo jiné procesy v buňce zajišťující plnohodnotnou obrannou reakci, tím je narušena primární imunitní odpověď buňky. Obecně jsou tyto látky označovány jako produkty AVR genů patogenu (Boller & Felix 2009). Produkce efektorů je typická hlavně pro biotrofní typy parazitů. Při prolomení primární imunitní reakce efektor patogenu vstupují do obranných reakcí další typ specifických obranných proteinů, označované jako rezistentní (R) proteiny, které jsou produktem R genů hostitele (Boller & Felix 2009). Při rozpoznání efektorů R proteiny dochází k aktivaci sekundární imunitní odpovědi, označované ETI (effector-triggered immunity), dále ETI imunitní odpověď (Kushalappa et al. 2016). V průběhu evoluce patogenů došlo k vývoji mnoha různorodých efektorů. Existuje proto mnoho typů efektorů, které se liší podle druhu i patotypu patogenu. V případě, že rostlinná buňka je schopna úspěšně aktivovat ETI imunitní odpověď (specifická obranná reakce) jedná se o specifickou rezistenci (Kushalappa et al. 2016). Schéma současného pojetí ETI imunitní odpovědi zobrazuje obr. 4.



Obr. 4: Schéma ETI obranné reakce (Bigeard et al. 2015)

PTI, DTI a ETI imunitní reakce jsou často vzájemně více či méně provázané a výsledný efekt obrany proti napadení je dán kombinací všech těchto mechanismů. Výsledkem imunitních odpovědí není vždy plné potlačení infekčního tlaku, proto je možné najít mnoho stupňů odolnosti od částečné citlivosti až po plnou rezistenci. V tomto případě lze dělit na kvantitativní rezistenci, dochází jen k částečnému potlačení patogenu, a kvalitativní rezistenci, absolutní odolnost proti napadení (Kushalappa et al. 2016).

2.4.2 Části imunitního systému rostlinných buněk

Rychlé a cílené PTI, DTI a ETI imunitní reakce zajišťují maximální životaschopnost rostlin za daného biotického tlaku pomocí správně vyváženého výdeje energie na obranu, který co nejméně narušuje růst a vývoj organismu. Imunitní aparát buněk v konečném důsledku produkuje specifické obranné proteiny a metabolity, které přímo potlačují průnik patogenu (strukturní proteiny a metabolity) nebo přímo eliminují patogen (antimikrobiální proteiny a metabolity). Obecně jsou tyto dvě skupiny látek nazývány jako RRP (resistance-related proteins) a RRM (resistance-related metabolites), dále v textu označované jako RR (resistance-related) proteiny a RR metabolity (Kushalappa et al. 2016). Dále je možno RR proteiny a metabolity dělit podle toho, zda jsou trvale přítomné v buňkách RRC (resistance-related constitutive) nebo jsou produkovány pouze při obranné reakci RRI (resistance-related induced). RR proteiny a metabolity jsou produkty R genů, které jsou aktivovány a regulovány několika stupni imunitního systému rostlinných buněk. Tento obranný systém aktivovaný PTI/DTI/ETI zahrnuje receptory, MAP (mitogen-activated protein) kinázy, fytohormony, transkripční faktory (TF), které vedou k aktivaci R genů a syntéze RR proteinů a RR metabolitů (Kushalappa et al. 2016).

2.4.2.1 Receptory imunitního systému

V boji proti patogenům rostlinné buňky disponují širokou škálou různých receptorů, které jsou součástí plasmatické membrány nebo vnitrobuněčného prostoru. Primární obranná linie zahrnuje receptory v plasmatické membráně, které se skládají ze třech hlavních domén. První doména na C konci proteinu (ektodoména) je umístěna do vnějšího prostoru buňky a slouží jako receptorová část vázající ligandy. Druhá transmembránová doména zakotvuje protein v plasmatické membráně. Poslední část na N konci proteinu je složena z kinázové domény, která je součástí vnitřního prostoru buňky a složí ke spouštění obranné reakce směrem do cytosolu buňky (Kushalappa et al.

2016). Obecně je tento typ receptorů označován jako RLK (receptor-like kinase) a RLP (receptor-like protein). RLP se od RLK liší absencí kinázové domény, a proto jsou doprovázeny doplňkovým receptorem s kinázovou aktivitou, s nímž tvoří receptorový komplex. Tento typ primárních imunitních receptorů je hlavní součástí PTI a DTI imunitní reakce. Jejich ektodomény jsou velmi často uzpůsobeny na rozpoznávání charakteristických struktur patogenů například peptidoglykanu u bakterií nebo chitinu u hub (Couto & Zipfel 2016). Navázáním příslušného ligandu na receptorovou doménu je aktivována vnitrobuněčná kinázová doména, která svou fosforylační aktivitou přenáší signál na obranné dráhy v cytosolu (Kushalappa et al. 2016).

Nejdůležitější částí RLP a RLK je jejich variabilní rozpoznávací ektodoména. Do současnosti bylo objeveno pět typů extracelulárně orientovaných rozpoznávacích ektodomén. Nejvíce zastoupeným typem je leucinový motiv LRR (leucine-rich repeat domain), který byl nalezen u receptorů vážící například elongační faktor Tu, flagelin nebo AtPep peptidy (Zipfel 2014). Druhým početným motivem je lyzinový motiv LysM (lysine motif domain), typický například pro receptory identifikující přítomnost chitinu u houbových patogenů a peptidoglykanu, hlavní složky bakteriální stěny (Zipfel 2014). Třetím objeveným motivem ektodomény je lektinový motiv (lectin S-domain), detekující extracelulární ATP a lipopolysacharidy bakteriálních stěn. Posledním zatím známým motivem ektodomény je motiv epidermálního růstového faktoru (EGF-like domain) podílející se na identifikaci oligogalakturonidázy (Ranf et al. 2015).

Sekundární obranná linie je iniciována receptory ve vnitrobuněčném prostoru. Hlavním typem ektodomény těchto receptorů je NBS-LRR (nucleotide-binding domain leucine-rich repeat). Tyto receptory slouží detekci velkého množství různorodých efektorů narušující imunitní reakci v rostlinné buňce. NBS-LRR receptory mohou dále obsahovat dva druhy známých adaptorů: TIR (Toll/interleukin-1 receptor-like domain) TIR-NBS-LRR receptor a CC (coiled-coil domain) CC-NBS-LRR receptor (McHale et al. 2006). Ke spuštění sekundární obranné reakce NBS-LRR receptory dochází buď přímo rozpoznání patogenního efektoru nebo nepřímo identifikací změn, které efektor inicioval. Tento typ receptorů spouští ETI imunitní odpověď (Couto & Zipfel 2016). Dále bylo objeveno, že se tento typ receptorů uplatňuje při rozpoznání virových patogenů a spouští antivirovou imunitní odpověď (Zorzatto et al. 2015).

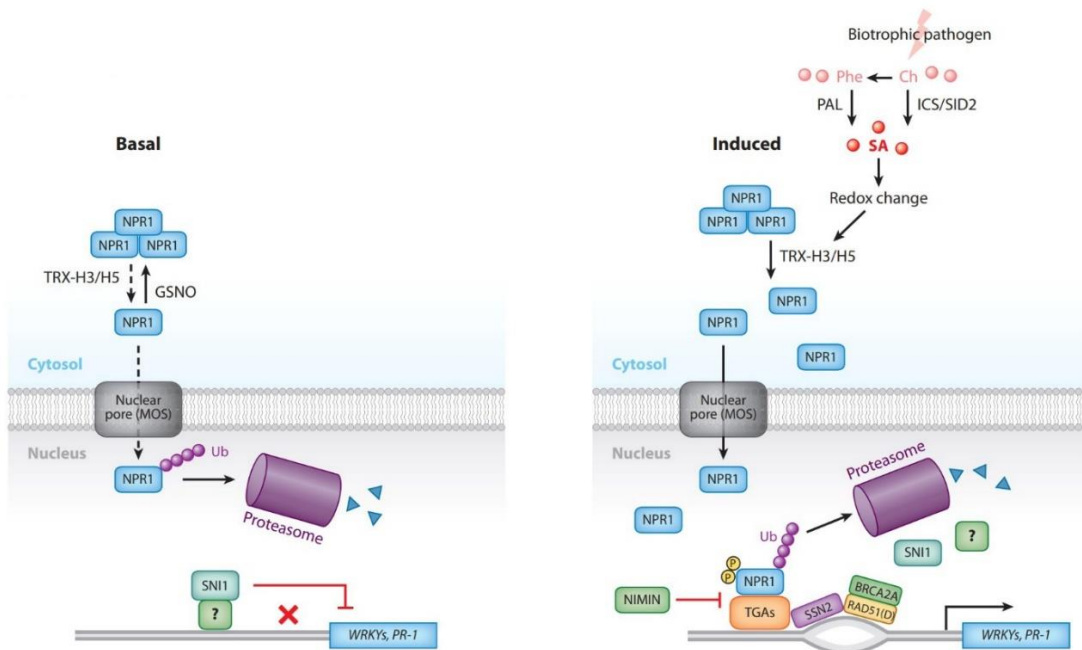
2.4.2.2 *Fytohormony v imunitním systému*

Fytohormony jsou významnými signálními molekulami, které fungují jako regulátory růstu, vývoje a obrany rostlinného organismu. V obranných reakcích hrají klíčovou roli ve zprostředkování imunitní odpovědi, která následuje po prvotním rozpoznání přítomnosti patogenu v případě vnějších imunitních receptorů spouštějící PTI imunitní reakci, tak i v případě detekce efektorů patogenu vedoucí k ETI imunitní odpovědi (Pieterse et al. 2012). Za hlavní rostlinné fytohormony podílející se na imunitních reakcích jsou považované kyseliny salicylová a jasmonová (Pieterse et al. 2012) a etylen (van Loon et al. 2006). Neméně důležitou roli hrají také další fytohormony, jako jsou kyselina abscisová (ABA) (Ton et al. 2009), gibereliny (Navarro et al. 2008), auxiny (Kazan & Manners 2009), cytokininy (Walters & McRoberts 2006) a brassinosteroidy (Nakashita et al. 2003). Podstatou působení rostlinných hormonů při napadení je omezení růstu a vývoje ve prospěch obranných mechanismů rostliny (Walters & Heil 2007; Pieterse et al. 2012).

Salicylová kyselina

Jeden z dvou hlavních fytohormonů podílející se na obranné reakci je kyselina salicylová (SA). Tato látka je indukována převážně při napadení biotrofními a hemibiotrofními patogeny. V případě PTI imunitní reakce je zahájení syntézy SA iniciováno zvýšenou hladinou vápenatých iontů, na kterou reagují enzymy EDS1 (enhanced disease susceptibility1) a PAD4 (phytoalexin deficient4). V případě ETI imunitní reakce je zahájení syntézy vázáno na dvojici enzymů EDS1 a PAD4 nebo NDR1 (non-race-specific disease resistance1) v závislosti na typu imunitního receptoru (Bernoux et al. 2011). Samotná syntéza SA je zprostředkována enzymy PAL (phenylalanine ammonia lyase) nebo ICS (isochorismate synthase) (Mishina & Zeier 2007; Pieterse et al. 2012). Zvýšená koncentrace SA vede v jádře k aktivaci některých RR transkripčních faktorů pro R geny, jakými jsou například WRKY transkripční faktory. Aktivace SA v jedné rostlinné buňce často vede ke dlouhodobému spuštění obranných reakcí proti patogenu v dalších částech rostliny. Tento typ obranné odpovědi je označován jako systemická rezistence SAR (systemic acquired resistance) (Vlot et al. 2009). Zpětná regulace množství tohoto fytohormonu je převážně zajištěna regulačním proteinem NPR1 (non-expressor of pathogenesis related genes1) a některými R geny, jejichž syntéza byla

iniciována TF aktivované SA (Rushton et al. 2010; Pieterse et al. 2012). Znázornění schématu působení SA je zobrazeno na obr. 5.



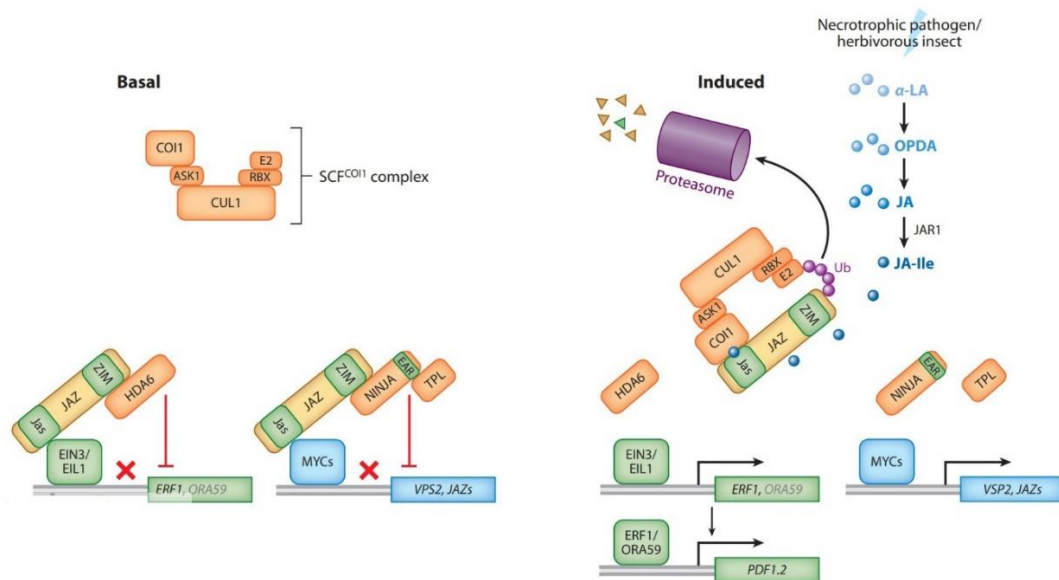
Obr. 5: Schéma aktivace SA při obraných reakcích (Pieterse et al 2012)

Jasmonová kyselina

Druhým hlavním fytohormonem podílející se na obraných reakcích je kyselina jasmonová (JA), pro kterou je typická zvýšená aktivita při napadení nekrotrofními patogeny a fyzického poškození rostliny. Syntéza tohoto fytohormonu začíná α linolenovou kyselinou po oxylipinové dráze s klíčovými enzymy 13-LOX (13-lipoxygenase), 13-AOS (13-allene oxide synthase), AOC (allene oxide cyclase) a OPR3 (OPDA-specific reductase) (Wasternack & Hause 2013). Stresový signál vede k enzymatické reakci za pomoci proteinu JAR1 (jasmonate-resistant1) k transformaci na vysoce aktivní formu jasmonové kyseliny JA-Ile, která dále následně aktivuje širokou paletu R genů. Při ETI imunitní reakci se JA uplatňuje také jako pozitivní regulátor RPS2 (resistant to *P. syringae*2) (Liu et al. 2016). Regulace tohoto fytohormonu je zajištěna enzymy COI1 (coronatine insensitive1), JAZ (jasmonate zim) a receptory kyseliny salicylové NPR3 (non-expresser of PR genes3) a NPR4 (non-expresser of PR genes4) (Liu et al. 2016). Schéma působení JA v imunitní odpovědi znázorňuje obr. 6.

SA a JA často představují vzájemné antagonisty a rostlinná buňka musí velice přesně řídit aktivitu obou těchto fytohormonů. Obranná reakce řízena SA je většinou zaměřena

na biotrofní parazity, které ke svému vývoji potřebují živé buňky rostlin. Velice efektivní obrana je proto hypersenzitivní reakce vedoucí k buněčné smrti a zamezení šíření patogenu do dalších buněk. Naopak obranná reakce vyvolaná JA je převážně cílena na nekrotrofní parazity, které využívají mrtvé buňky a hypersenzitivní reakce by byla prospěšná pouze pro patogen. Z tohoto důvodu dochází k aktivaci jiných R genů (Liu et al. 2016).



Obr. 6: Schéma působení JA v imunitních reakcích (Pieterse et al 2012)

Etylen

Etylen (ET) představuje signální fytohormon v plynné formě, který se významně podílí na opadu listu, otevírání květů, dozrávání plodů, ale také na obranných reakcích proti patogenům. ET je syntetizován z metioninu. Pomocí SAM syntázy dochází k přeměně metioninu na SAM (S-adenosylmethionine). V dalším kroku je SAM přeměněn na ACC (amonicycloopropane-1-carboxylic acid) enzymem ACS (*ACC synthase*). V posledním kroku je za pomoci ACO (*ACC oxidase*) převeden ACC na etylen (Argueso et al. 2007). Narušení produkce ET je primárně v aktivitě enzymu ACS, na který je zaměřená pozornost patogenních efektorů (Han et al. 2010). Samotná signalizace ET v buňce začíná vazbou na etylenové kinázové receptory ETR1 (ethylene response1), ETR2 (ethylene response2), ERS1 (ethylene response sensor1), ERS2 (ethylene response sensor 2) a EIN4 (ethylene insensitive4) (Shigenaga & Argueso 2016). V nepřítomnosti ET negativního regulátoru CTR1 (constitutive triple response1) dochází k zablokování

přesunu EIN2 (ethylene insensitive2) do jádra. Naopak pokud je ET přítomen EIN2 putuje do jádra, kde stabilizuje transkripční faktory s komplexy EIN3/EIL1 (EIN3-like1) a je iniciována exprese ET regulovaných genů (Merchante et al. 2013). Současné studie naznačují, že ET může hrát roli pozitivního nebo negativního regulátoru v závislosti na typu patogenu. Samostatně se uplatňuje hlavně v přítomnosti biotrofních patogenů, nicméně velice často působí synergicky s JA v přítomnosti nekrotrofních patogenů. Aktivita ET a JA působí negativně na obranné reakce regulované SA (Shigenaga & Argueso 2016).

2.4.2.3 *MAP kinázy v imunitním systému*

MAP (mitogen-activated protein) kinázy hrají významnou roli v regulaci mnoha biologických procesů v buňce, významně se také podílejí na obranných reakcích proti patogenům. Tyto proteiny přenášejí signál v kaskádě, podle které jsou obecně označovány jako MAPK (mitogen-activated protein kinase), MAPKK (mitogen-activated protein kinase kinase), MAPKKK (mitogen-activated protein kinase kinase kinase) podle stupně přenosu signálu. Přenos signálu probíhá vzájemnou fosforylací, kdy MAPKKK fosforyluje MAKK a MAKK fosforyluje MAPK. MAPK jako konečný členek MAP kinázové kaskády fosforylací aktivuje cílový produkt například metabolit nebo transkripční faktor. MAP kinázové dráhy se speciálně uplatňují ve stresových reakcích. Doposud byla odhalena řada kinázových drah indukovaných stresovými podmínkami například SAMK (stress-activated MAP kinase), SIMK (salt-stress induced MAP kinase), SIPK (salicylic acid induced MAP kinase) nebo WIPK (wound induced protein kinase) (Thulasi Devendrakumar et al. 2018). Dosud nejlépe popsané MAP kinázové kaskády v imunitních reakcích jsou MEKK1–MKK1/2–MPK4 a MAPKKK3/5–MKK4/5–MPK3/6. Obě se významně podílejí na PTI imunitní reakci. MEKK1–MKK1/2–MPK4 kinázová kaskáda zprostředkovává přenos signálu například od flagelinového receptoru FLS2 (flagellin-sensitive2). Postupnou fosforylací je signál přenesen z MEKK1 na plazmatické membráně až na MPK4 do buněčného jádra, kde je spuštěna exprese R genů (Gao et al. 2008). Druhá velice známá MAP kinázová kaskáda podílející se na imunitní odpovědi MAPKKK3/5–MKK4/5–MPK3/6 hraje roli v aktivaci etylenu, syntéze kamalexinu, indol glukosinolátů a zavírání průduchů při obranných reakcích. Cílové substráty pro poslední MPK3/6 kinázu fosforylují ACS2 a ACS6 vedoucí ke stabilizaci produkce etylenu. Druhý cílový protein MPK3/6 kinázy

představuje transkripční faktor WRKY spouštějící expresi R genů pro syntézu kamalexinu, významného antibakteriálního a fungicidního metabolitu. Cílové enzymy pro MPK3/6 kinázu jsou také MYB (myeloblastosis) transkripční faktory, které se významně podílejí na syntéze indol glukosinolátů, významných antipatogenních proteinů (Thulasi Devendrakumar et al. 2018).

2.4.2.4 *Transkripční faktory v imunitním systému*

Transkripční faktory (TF) jako hlavní regulátory genové exprese řídí a regulují širokou škálu dějů v buňce od vývoje, dělení buněk až po expresi R genů při různých imunitních reakcích. Podle současných studií se do obranných reakcí zapojují specifické skupiny TF. Doposud nejlépe poznané rodiny imunitních TF jsou AP2/ERF (apetala2/ethylene-response element binding factor), bHLH (basic helix-loop-helix), bZIP (basic leucine zipper), MYB (myeloblastosis), NAC (NAM ATAF1,2 CUC2) a WRKY (podle rozpoznávací sekvence W-box WRKYGQK) (Tsuda & Somssich 2015).

Transkripční faktory s AP2/ERF doménou

Početná skupina transkripčních faktorů charakteristická specifickou sekvencí 60 aminokyselin, která je schopná se vázat na komplementární úseky DNA. Tato doména vytváří trojrozměrnou strukturu organizovanou do třech antiparalelních β listů následované jednou paralelní α šroubovicí (Licausi et al. 2013). Podle své specifity se TF AP2/ERF dále dělí na dvě podskupiny. První obsahuje doménu DREB (dehydration-responsive element binding protein) charakteristická pro reakci na abiotický stres a druhá podskupina s doménou ERF (ethylene-response element binding factor) typická pro reakce na biotický stres. DREB doména se specificky váže na sekvenci A/GCCGAC, která se často vyskytuje u genů reagujících na stres chladem a suchem (Licausi et al. 2013). ERF doména váže podobnou sekvenci AGCCGCC nazývanou také jako GCC-box. Tato specifická sekvence je často charakteristická pro některé R geny spojené obrannými reakcemi proti patogenům, regulací etylenu a reakcí na mechanické poškození pletiv (Licausi et al. 2013).

Transkripční faktory s bHLH doménou

TF s bHLH doménou jsou rozsáhlou skupinou TF podílející se na regulaci řady biologických procesů včetně vývoje trichomů, listových průduchů, hormonální signalizace, symbiotické interakce, reakce na stres suchem, obranné reakce proti

biotickému stresu a mechanickému poškození rostliny (Carretero-Paulet et al. 2010). Charakteristická vlastnost těchto TF je přítomnost bHLH domény, která je složená z 60 aminokyselin. Trojrozměrná struktura proteinu se skládá z dvojice hydrofobních α šroubovic, mezi kterými se nachází specifická sekvence aminokyselin tvořící smyčku. Struktura těchto proteinů často umožňuje vytvářet heterodimerní komplexy s přesnější vazností na cílové struktury. Schopnost vázat se na specifickou sekvenci bází v DNA je zprostředkována prvními 20 aminokyselinami na N konci proteinu. Specifická oblast v DNA, na kterou se doména bHLH váže, má konzervativní sekvenci označovanou E-box CA(A/T/G/C)(A/T/G/C)TG. Nejčastější forma E-boxu představuje sekvenci CACGTG, která je též známá jako G-box (Carretero-Paulet et al. 2010). Rostlinné proteiny s bHLH spadají převážně do dvou podskupin. Tradičně je první podskupina označovaná jako A s E-box rozpoznávací schopností. Druhá podskupina B je typická vazností na více specifický G-box a proteiny též obsahují ZIP doménu. Zakončení proteinu podskupiny B je charakteristické zbytkem COOH nebo ORANGE doménou (Carretero-Paulet et al. 2010).

TF s doménou bHLH, které se uplatňují v imunitních reakcích tvoří minoritní skupinu této rodiny TF. Do současnosti bylo nalezeno například TF MYC2, MYC3, MYC4, které představují klíčové regulační prvky pro obranné reakce s JA a SA (Carretero-Paulet et al. 2010).

Transkripční faktory s TGA-bZIP doménou

TF s bZIP (basic leucine zipper) doménou představují rozsáhlejší rodinu proteinů, které se podílejí na vývoji rostlinného organismu, tvorbě semen, odpovědi na abiotický stres a regulaci imunitních reakcí proti patogenům. TF s touto doménou se dělí do několika tříd podle pozice a množství bZIP domén v protein (Alves et al. 2013). Z pohledu imunitních reakcí jsou klíčové dvě skupiny bZIP TF, které rozpoznávají cílovou sekvenci ACGT. Nejlépe prozkoumaná skupina TGA, označovaná podle rozpoznávací sekvence TGACGTCA v DNA. TF této skupiny hrají významnou roli v obranných reakcích proti biotrofním parazitům (Alves et al. 2013). TF z této skupiny se dále podle funkce dělí do třech podskupin. První skupina obsahující TF TGA1 a TGA4 a druhá podskupina s TF ATG3 a TGA5 interagují s NPR1 (non-expresser of pathogen related genes1) klíčového regulátoru SA. Interakce je zprostředkována pomocí AR (ankyrin repeat) motivu. Třetí podskupina s TF TGA2, ATG5 a TGA6 hrají klíčovou roli v aktivaci dlouhodobé rezistence SAR (systemic acquired resistance), dále se také podílejí na odstranění

toxických látek produkovanými patogeny. V neposlední řadě se TF třetí podskupiny podílejí na aktivaci imunitní reakce realizované ET (Tsuda & Somssich 2015).

Transkripční faktory s MYB doménou

TF s MYB (myeloblastosis) doménou představují širokou skupinu rostlinných TF, které jsou často spojeny s ABA a interakcí s dalšími TF v rostlinném genomu. Klíčové oblasti těchto proteinů obsahují pro rostliny typickou doménu R2R3-like MYB interagující se specifickou sekvencí v DNA. Podle této sekvence se R2R3 MYB TF rozdělují do dvou podskupin. První se váže na sekvenci (T/C)AAC(T/G)G, druhá podskupina vyhledává sekvenci G(G/T)T(A/T)G(G/T)T (Tsuda & Somssich 2015). Druhá polovina aminokyselinového řetězce na C konci představuje modulátor, který je zodpovědný za regulační schopnosti těchto enzymů. MYB doména se typická řetězcem 52 aminokyselin tvořící trojrozměrnou strukturu tří α šroubovic. Druhá a třetí α šroubovice navíc tvoří hydrofobní formace HTH (helix-turn-helix). Pro rostliny typická R2R3-like MYB doména je označena podle počtu opakujících se MYB domén (Ambawat et al. 2013).

Z pohledu imunitních reakcí je hlavní těžiště R2R3-MYB-like TF propojení imunitních odpovědí spojených s JA. MYB15, MYB34, MYB51 a MYB75 se podílí s JA s obranných reakcí proti mechanickému poškození a SAR proti hmyzím herbivorům, naopak MYB4 je důležitým článkem v signální dráze spouštějící obecně obranné reakce JA (Ambawat et al. 2013). Další důležité MYB TF podílejí se na obranných reakcích jsou například MYB102 a MYB44 (Liu et al. 2010), MYB30 představuje aktivátor hypersensitivní reakce proti biotrofním patogenům (Li et al. 2009), MYB72 spouští SAR v interakci s půdními bakteriemi a houbami. Dále například MYB96 se podílí na regulaci syntézy SA při imunitní reakci a působí jako koordinační článek SA a ABA (Seo & Park 2010).

Transkripční faktory s NAC doménou

TF s NAC (NAM, ATAF1,2 a CUC2) doménou představují jednu z nejpočetnějších skupin TF u rostlin skládající se ze třech skupin: NAM (non apical meristem), ATF (*Arabidopsis* transcription activation factor) a CUC (cup-shaped cotyledon) všechny s vysoce konzervativními doménami vázající se na specifickou sekvenci DNA. Navzdory vysoké specifitě domén se TF NAC podílejí na mnoha různých biologických procesech, od vývoje a řízení stárnutí organismu až po obranné reakce na biotický stres, abiotický

stres a vytváření mechanických bariér v podobně sekundárních buněčných stěn (Puranik et al. 2012).

Struktura NAC TF se skládá ze dvou částí, první část se 150 aminokyselin na N konci proteinu zahrnuje NAC doménu schopnou se vázat na specifickou sekvenci v DNA. Druhá část na C konci proteinu představuje transkripční regulační oblast (Puranik et al. 2012). Podle schopnosti vázat se na DNA a vzájemné interakce je NAC doména dělena na pět poddomén A – E. Klíčovou vazbu na rozpoznávací sekvenci DNA zajišťují poddomény C a D. Poddoména A zajišťuje tvorbu dimerů NAC TF. Zbylé poddomény B a E představují oblasti, které jsou zodpovědné za specifické funkce NAC TF (Ooka et al. 2003). Trojrozměrná struktura u testovaných NAC proteinů například SNAC1 (stress-responsive NAC1) je složena z antiparalelních β listů s poddomény C a D vázající se na DNA, které jsou obklopeny dvojicí α šroubovic (Chen et al. 2011). Z pohledu biotického stresu hraje nejvýznamnější roli poddoména D, která kromě vazebné specifity na DNA, má také v některých případech i silně hydrofobní vlastnosti. V tomto případě se specifická poddoména označuje jako NARD (NAC repression domain). Silná hydrofobilita NARD poddomény dává příslušným NAC proteinům schopnost negativně regulovat další TF podílející se na imunitní reakci. Příklady takovýchto TF jsou již dříve zmíněné AP2/DRE, Dof (DNA-binding with one finger) nebo TF WRKY popsané v další kapitole (Puranik et al. 2012).

Poslední studie zabývající celou skupinu NAC proteinů ukazují, že největší část je tvořena proteiny, které jsou zapojeny do reakce na abiotické stresy suchem, chladem a zasolením se silnou vazbou na ABA a její signální dráhy (Puranik et al. 2012). Druhá největší část NAC proteinů je zapojena do ETI imunitní reakce proti houbovým, bakteriálním nebo virovým patogenům, případně imunitních odpovědí na mechanické poškození okusem způsobeným hmyzem. V mnoha případech bylo ukázáno, že imunitní reakce SA (Delessert et al. 2005), JA (Yokotani et al. 2009) a ET (Jensen et al. 2010) vedou k aktivaci NAC genů. Tyto NAC TF (například ATAF1, ATAF2, NAC6) se následně podílejí například přímo na aktivaci PR genů vedoucí hypersensitivní reakci jako odpověď na napadení biotrofními patogeny (Kaneda et al. 2009) nebo se jak již bylo dříve zmíněno podílí na negativní regulaci dalších TF zahrnutých v imunitních reakcích (Wang et al. 2009; Puranik et al. 2012). Další elementární NAC proteiny začleněné do imunitních reakcí jsou například NAC019, NAC055 a NAC072 (Tsuda & Somssich 2015).

Transkripční faktory s WRKY doménou

WRKY proteiny představují velkou skupinu rostlinných TF, které se podílejí na regulaci řady biologických procesů. I přes několik nedávných studií odhalující začlenění WRKY TF do regulace klíčení, stárnutí organismu a reakcí na abiotický stres, WRKY TF jsou pravděpodobně z drtivě většiny zapojeny do imunitních reakcí jako receptory, aktivátory a regulátory obranných reakcí. Doposud největší skupina WRKY proteinů představují pozitivní nebo negativní regulátory PTI a ETI imunitní reakce (Rushton et al. 2010). Označení WRKY vychází z konzervativní aminokyselinové sekvence WRKYGQK klíčového úseku rozpoznávající specifický úsek DNA. V několika málo případech byla objevena částečná změna této sekvence na WRRY, WSKY, WKRY, WVKY nebo WKKY (Xie et al 2005). WRKY doména, která představuje přibližně úsek dlouhý 60 aminokyselin, je složena ze dvou částí. V první části na N konci se nachází charakteristická WRKY rozpoznávací oblast, která je schopna se vázat na specifickou DNA sekvenci TTGAC(C/T) označovanou jako W-box. Druhá část WRKY domény na C konci obsahuje atypický zinkový prst. Podle počtu WRKY domén v proteinu jsou tyto TF děleny do několika tříd I, IIa + IIb, IIc, IID + IIE a III (Rushton et al. 2010). Trojrozměrná struktura WRKY domény je tvořena čtyřmi β skládanými listy. Klíčová rozpoznávací aminokyselinová sekvence WRKYGQK je umístěna na N konci prvního β listu. Tato část vystupuje vně proteinu a umožňuje jeho vazbu na W-box na DNA molekule. Struktura alternativního zinkového prstu je umístěna mezi druhým a třetím β listem a na C konci domény (Rushton et al. 2010).

Z pohledu imunitních reakcí jsou WRKY TF klíčovými aktivátory exprese R genů jak pro PTI, DTI a ETI, tak i pro bazální a systemickou rezistenci SAR. WRKY proteiny jsou také často cílovými proteiny pro MAP kinázy, 14-3-3 proteiny, kalmodulin a ostatní TF podílející se na imunitních reakcích, které vedou k jejich aktivaci například WRKY1 a WRKY2. K vytvoření aktivní formy WRKY proteinů může dojít také přímou interakcí s imunitními receptory například WRKY45 interaguje s CC-NB-LRR imunitní receptorem. Některé WRKY TF například WRKY52, WRKY19 a WRKY16 obsahují přímo imunitní receptorové domény TIR–NBS–LRR a sami představují receptory pro efekторы patogenů. Vzájemná provázanost s ostatními částmi imunitních drah zahrnující SA a JA byla objevena u WRKY50 a WRKY51 (Ishihama & Yoshioka 2012).

2.4.2.5 *RR proteiny a RR metabolity*

Na konci obranných drah dochází k expresi takových R genů, jejichž produkty v podobě různorodých proteinů a metabolitů přímo působí negativně na patogen nebo vytvářejí mechanické bariéry zabraňující jeho průniku a negativnímu působení na rostlinné buňky. Takovéto produkty R genů jsou obecně nazývány jako RR proteiny a RR metabolity. Obecně lze tyto látky rozdělit do dvou kategorií, kdy první skupina zahrnuje RR proteiny a metabolity, které jsou trvale přítomné v buňce, označované jako RRC (resistance related constitutive) a druhá skupina látek, které jsou produkovány jen při detekci patogenu, nazývané RRI (resistance related induced) (Kushalappa et al. 2016). RR proteiny představují různorodou skupinu látek potlačující patogeny. Jedná se například o proteiny rozkládající elicitory, neutralizující toxické látky produkované patogenem, posilující pevnost primární buněčné stěny nebo se podílí na zpevnění sekundární stěny (Lazniewska et al. 2012). RR metabolity představují hlavně látky z antipatogéním účinkem jako jsou například fytoanticipiny a fytoalexiny a metabolity ukládané do buněčných stěn zvyšující jejich pevnost (Yogendra et al. 2014; Kushalappa et al. 2016).

RR proteiny

Rostlinné buňky produkují řadu RRC a RRI proteinů, které aktivně či pasivně zabraňují nežádoucí aktivitě patogenu. Skupina těchto látek podle působení rozdělena na několik podskupin. Degradaci buněčných stěn bakterií, hub a protist zprostředkovávají β -1-3-glukanázy, β -1-3-endoglukanázy a chitinázy. Antibakteriální a antifungální účinky charakterizují skupinu denfensinů, inhibitorů proteáz, thioninů, rezistentních peptidů a specifických endoproteináz (Kushalappa et al. 2016). Eliminaci toxických látek patogenu zajišťují například DON-3-glukosyl transferázy, degradující toxin nekrotrofních patogenů deoxynivalenol nebo RR ABC transportéry uzavírající toxiny do vakuol s pomocí transportních proteinů PDR (pleiotropic drug resistance) (Lazniewska et al. 2012). Posílení buněčných stěn je zprostředkována skupinou extensinů (Kushalappa et al. 2016).

RR metabolity

RR metabolity představují několik skupin látek, které lze rozdělit do dvou hlavních proudů: RR metabolity s antimikrobiálním účinkem a metabolity zesilující buněčné stěny. RR metabolity s antimikrobiálními účinky představují fytoanticipiny, které jsou

produkovány bez ohledu na přítomnost patogenu a fytoalexiny, jejichž syntéza je iniciována detekcí patogenu. Typické fytoanticipiny představují fenoly, flavonoidy, terpeny a alkaloidy, které rostliny ukládají do vakuol nebo specializovaných struktur (trichomy, mléčnice, sekreční žlázy). Fytoalexiny zahrnují fenyylpropanoidy, terpeny a indoly. RR metabolity posilující mechanické vlastnosti buněčných stěn představují lignin, HCAA (hydroxycinnamic acid amid), kalóza, kaempferol, quercetin a v neposlední řadě i kutin, rostlinné vosky a suberin (Kushalappa et al. 2016).

2.5 Šlechtění proti nádorovitosti

Boj s nádorovitostí vyžaduje striktní agrotechnická opatření, používání chemických nebo biologických přípravků. Všechny tyto činnosti s sebou nesou dodatečné finanční výdaje. Vynechání brukvovitých plodin z osevního postupu je pro tradiční zelinářské oblasti nereálné a vzhledem ke 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 tomuto onemocnění (Diederichsen et al. 2009).

2.5.1 Problémy při šlechtění proti nádorovitosti

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, 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*, zelených kultivarů *B. rapa* a celé řady různorodých zelenin druhu *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 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). Praktický příklad ukazuje i první rezistentní odrůda ozimé řepky ‘Mendel’, jejíž monogenní rezistence byla prolomena záhy po tom, kdy byla uvolněna na trh (Diederichsen et al. 2014).

2.5.2 Klasifikace patotypů při šlechtění proti nádorovitosti

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 Buczacki et al. (1975) pod označením ECD (European clubroot differential) (Buczacki et al. 1975). Kolekce je složena z 15 různých genotypů, pět od každého druhu *B. rapa*, *B. oleracea* a *B. napus*. Odhaduje se, že tento zatím nejpropracovanější systém dokáže reálně odlišit 23 různých patotypů, teoreticky až 48 různých patotypů (Diederichsen et al. 2009).

Kvůli nekvalitní rozlišovací schopnosti některých evropských patotypů byl navíc pro *B. napus* navržen doplňkový soubor třech testovacích linií (Some et al. 1996). Kolekce se skládá ze třech genotypů *B. napus* a je schopná rozlišit 8 různých patotypů *P. brassicae*. Přehledný seznam testovacích linií pro jednotlivé systémy určení patotypů zobrazuje tab. 2.

Tab. 2: Odrůdy v jednotlivých určovacích systémech

testovací odrůda	druh	systém
Dc 130 Wilhelmsburger	<i>B. napus</i> ssp. <i>rapifera</i>	Williams (1966)
Badger Shipper	<i>B. oleracea</i> ssp. <i>capitata</i>	Williams (1966)
Jersey Queen	<i>B. oleracea</i> ssp. <i>capitata</i>	Williams (1966)
Laurentian	<i>B. napus</i> ssp. <i>napobrassica</i>	Williams (1966)
line aaBBCC	<i>B. rapa</i> ssp. <i>rapifera</i>	Buczacki et al. (1975)
line AAbbCC	<i>B. rapa</i> ssp. <i>rapifera</i>	Buczacki et al. (1975)
line AABBcc	<i>B. rapa</i> ssp. <i>rapifera</i>	Buczacki et al. (1975)
line AABBCC	<i>B. rapa</i> ssp. <i>rapifera</i>	Buczacki et al. (1975)
Granaat	<i>B. rapa</i> ssp. <i>pekinensis</i>	Buczacki et al. (1975)
Dc 101 Nevin	<i>B. napus</i> ssp. <i>napus</i>	Buczacki et al. (1975)
Dc 119 Giant Rape	<i>B. napus</i> ssp. <i>napus</i>	Buczacki et al. (1975)
Dc 128 selection from Dc 119	<i>B. napus</i> ssp. <i>napus</i>	Buczacki et al. (1975)
New Zealand resistant rape	<i>B. napus</i> ssp. <i>napus</i>	Buczacki et al. (1975)
Dc 130 Wilhelmsburger	<i>B. napus</i> ssp. <i>rapifera</i>	Buczacki et al. (1975)
Badger Shipper	<i>B. oleracea</i> ssp. <i>capitata</i>	Buczacki et al. (1975)
Bindsachsener	<i>B. oleracea</i> ssp. <i>capitata</i>	Buczacki et al. (1975)
Jersey Queen	<i>B. oleracea</i> ssp. <i>capitata</i>	Buczacki et al. (1975)
Septa	<i>B. oleracea</i> ssp. <i>capitata</i>	Buczacki et al. (1975)
Verheul	<i>B. oleracea</i> ssp. <i>capitata</i>	Buczacki et al. (1975)
Dc 101 Nevin	<i>B. napus</i> ssp. <i>napus</i>	Some et al. (1996)
Dc 130 Wilhelmsburger	<i>B. napus</i> ssp. <i>rapifera</i>	Some et al. (1996)
Brutor	<i>B. napus</i> ssp. <i>napus</i>	Some et al. (1996)

2.5.3 Genetické zdroje rezistence

V současné době je hlavní pozornost šlechtění proti nádorovitosti zaměřena na tři ekonomicky nejdůležitější brukvovité plodiny *B. rapa*, *B. oleracea* a *B. napus*. U všech těchto druhů byly nalezeny některé genotypy disponující alespoň částečnou rezistencí. Nejčastějším objeveným typem odolnosti je kvalitativní patotypově specifická rezistence. Vzhledem k tomu, že *B. napus* představuje alopolyplodní druh vzniklý relativně nedávno mezidruhovým křížením *B. rapa* a *B. oleracea*, nabízí se zde i možnost přenosu rezistence mezi zmíněnými druhy (Hwang et al. 2011).

Zdroje rezistence u *B. rapa* byly nalezeny pouze u genotypů *B. rapa* var. *rapifera* představující méně významnou zeleninu. Úspěšným křížením byl zdroj rezistence přenesen i do ekonomicky významnějších *B. rapa* var. *chinensis* a *B. rapa* var. *pekinensis*. Vyšlechtěné odrůdy *B. rapa* disponující patotypově specifickou rezistencí jsou například Debra, Gelria R, Milan White a Siloga (Hwang et al. 2011).

Nalezené rezistentní genotypy *B. oleracea* disponují často pouze částečnou odolností polygenního charakteru (Diederichsen et al. 2009). Z tohoto důvodu se v případě tohoto druhu používá přenos genů z odolných genotypů *B. napus* a *B. rapa*. Uvolněné

rezistentní odrůdy *B. oleracea* jsou například Badger Shipper, 8-41 nebo Böhmerwaldkohl.

V případě *B. napus*, mezidruhového křížence *B. rapa* a *B. oleracea* nejsou k dispozici plané formy tohoto druhu. V historii byla hlavní pozornost šlechtění proti nádorovitosti věnována kořenovým a listovým genotypům *B. napus*, které i dnes představují hlavní zdroj rezistentních genotypů (Diederichsen et al. 2009). Druhým využitým způsobem je mezidruhové křížení s rezistentními genotypy *B. rapa* a *B. oleracea*. V současné době je hlavní pozornost věnována šlechtění olejnatých forem *B. napus* ssp. *napus* ozimých a jarních typů. První odolné odrůdy uvedené na trh byly ozimé odrůdy Mendel a Tosca. Obě odrůdy disponují patotypově specifickou rezistencí založenou na jednom R genu, která byla již na mnoha místech výskytu nádorovitostí prolomena (Diederichsen et al. 2014). V následujících letech bylo vyšlechtěno několik dalších rezistentních odrůd odvozených od odrůdy Mendel (ozimé formy například: SY Alister, Mentor, Archimedes, jarní formy například: 73-67RR, VR9562GC, 45H29, 6076CR) (Hirani et al. 2016).

2.5.3.1 Nalezené rezistentní lokusy a geny u *B. rapa*

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*: *Crr3* (Hirai et al. 2004), *CRb* (Piao et al. 2004), *CRb^{kato}* (Kato et al. 2013), *CRd* (Pang et al. 2018), *Rcr1* (Chu et al. 2014), *Rcr2* (Huang et al. 2017) a *Rcr4* (Yu et al. 2017). Kromě již zde zmíněných rezistentních oblastí bylo nalezeno ještě nejméně deset lokusů s přibližnou polohou v genomu tohoto druhu: *Crr2* (Suwabe et al. 2003), *Crr4* (Suwabe 2006), *CrrA5* (Nguyen et al. 2018), *CRc* (Sakamoto et al. 2008), *CRk* (Sakamoto et al. 2008), *PbBa 3.1* (Chen et al. 2013), *PbBa 3.3* (Chen et al. 2013), *Rcr8* (Yu et al. 2017) a *Rcr9* (Yu et al. 2017).

Pozice jednotlivých rezistentních lokusů jsou rozmístěny na šesti z deseti chromozómů *B. rapa* A01, A02, A03, A05, A06 a A08. Jejich pozice není náhodná, ale často se vyskytují v určitých částech genomu. Největší kumulace R lokusů se nachází ve dvou oblastech chromozómu A3, kde jsou lokalizovány tyto lokusy: *Crr3*, *CRA*, *CRb*, *CRb^{kato}*, *CRd*, *CRk*, *PbBa 3.1*, *PbBa 3.3*, *Rcr1*, *Rcr2* a *Rcr4*. Druhým chromozómem s větší

kumulací R lokusů je A02 s lokusy *CRc* a *Rcr8*. Dvojice rezistentních oblastí se také nachází na chromozómu A08 s lokusy *Crr1* a *Rcr9*. Další objevené R lokusy lze lokalizovat na chromozómu A05 v případě lokusu *CrrA5* a na chromozómu A06 obsahující lokus *Crr4*. Jednotlivé publikované R lokusy s jejich pozicí a nejbližším markerem shrnuje následující tab. 3.

Tab. 3: Rezistentní oblasti nalezené v genomu *B. rapa*

<i>R lokus</i>	<i>chr.</i>	<i>marker</i>	<i>studie</i>
<i>Crr1</i>	A08	BRMS-088	Suwabe et al (2003)
<i>Crr2</i>	A01	BRMS-096	Suwabe et al (2003)
<i>Crr3</i>	A03	OPC11-2S	Hirai et al (2003)
<i>Crr4</i>	A06	BRMS-125	Suwabe et al (2006)
<i>CrrA5</i>	A05	tau_cBrCR404	Nguyen et al (2018)
<i>CRa</i>	A03	HC352b	Matsumoto et al (1998)
<i>CRb</i>	A03	TCR05	Piao et al (2004)
<i>CRb^{kato}</i>	A03	KB59N07	Kato et al (2013)
<i>CRc</i>	A02	m6R	Sakamoto et al (2008)
<i>CRd</i>	A03	yau389	Pang et al (2018)
<i>CRk</i>	A03	OPC11-2S	Sakamoto et al (2008)
<i>PbBa 3.1</i>	A03	sau_um438a	Chen et al (2013)
<i>PbBa 3.3</i>	A03	sau_um398a	Chen et al (2013)
<i>Rcr1</i>	A03	sN8591	Chu et al (2014)
<i>Rcr2</i>	A03	SNP_A03_08	Huang et al (2017)
<i>Rcr4</i>	A03	SNP_A03_23710236	Yu et al (2017)
<i>Rcr8</i>	A02	SNP_A02_18552018	Yu et al (2017)
<i>Rcr9</i>	A08	SNP_A08_10272562	Yu et al (2017)

2.5.3.2 Nalezené rezistentní lokusy a geny u *B. oleracea*

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 rezistentním účinkem, který je ale naopak nezávislý na patotypu nádorovitosti (Zhang et al. 2016). Dominantní účinek je předpokládán u šesti rezistentních lokusů *CR2a* (Landry et al. 1992), *CR2b* (Landry et al. 1992), *pb-3* (Voorrips et al. 1997), *pb-4* (Voorrips et al. 1997), *Pb-Bo1* (Rocherieux et al. 2004) a *Rcr7* (Dakouri et al. 2018). Zbývající R oblasti jsou typické menším účinkem *Pb-Bo2*, *Pb-Bo3*, *Pb-Bo4*, *Pb-Bo5a*, *Pb-Bo5b*, *Pb-Bo8*, *Pb-Bo9a* a *Pb-Bo9b* (Rocherieux et al. 2004), *PbBo(Anju)1*, *PbBo(Anju)2*, *PbBo(Anju)3*, *PbBo(Anju)4* a *PbBo(GC)1* (Nagaoka et al. 2010), *CRQTL-GN_1*, *CRQTL-GN_2* a *CRQTL-YC* (Lee et al. 2015), *DIC.I-1* a *DIC.II-1* (Peng et al. 2018). Rezistentní lokusy v genomu *B. oleracea* se vyskytují na všech devíti chromozomech *CR2b*, *pb-4* a *Pb-Bo1* na C01; *Pb-Bo2*, *PbBo(Anju)1*,

PbBo(Anju)2 a *CRQTL-GN_1* na C02; *pb-3*, *Pb-Bo3*, *PbBo(Anju)3*, *CRQTL-GN_2* a *CRQTL-YC* na C03; *Pb-Bo4* na C04; *Pb-Bo5a*, *Pb-Bo5b* a *PbBo(GC)1* na C05; *CR2a* na C06; *PbBo(Anju)4* a *Rcr7* na C07; *Pb-Bo8*, *DIC.I-1* a *DIC.II-1* na C08; *Pb-Bo9a* a *Pb-Bo9b* na C09. 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. Výše zmíněné R lokusy lze nalézt v následující tabulce včetně jejich pozice a nejbližšího publikovaného markeru viz tab. 4.

Tab. 4: Rezistentní oblasti nalezené v genomu *B. oleracea*

<i>R lokus</i>	<i>chr.</i>	<i>marker</i>	<i>studie</i>
<i>CR2a</i>	LG6	2NF11-2ND3	Landry et al. (1992)
<i>CR2b</i>	LG1	3NE4a-3ND3	Landry et al. (1992)
<i>pb-3</i>	LG3	4NE11a	Voorrips et al. (1997)
<i>pb-4</i>	LG1	2NA8c	Voorrips et al. (1997)
<i>Pb-Bo1</i>	LG1	T2	Rocherieux et al. (2004)
<i>Pb-Bo2</i>	LG2	s07.1900	Rocherieux et al. (2004)
<i>Pb-Bo3</i>	LG3	aa7.1400	Rocherieux et al. (2004)
<i>Pb-Bo4</i>	LG4	aa9.983	Rocherieux et al. (2004)
<i>Pb-Bo5a</i>	LG5	PBB7b	Rocherieux et al. (2004)
<i>Pb-Bo5b</i>	LG5	ab1.1350	Rocherieux et al. (2004)
<i>Pb-Bo8</i>	LG8	c01.980	Rocherieux et al. (2004)
<i>Pb-Bo9a</i>	LG9	aj16.570	Rocherieux et al. (2004)
<i>Pb-Bo9b</i>	LG9	a04.1900	Rocherieux et al. (2004)
<i>PbBo(Anju)1</i>	LG2	KBrH059L13R	Nagaoka et al. (2010)
<i>PbBo(Anju)2</i>	LG2	CAM2	Nagaoka et al. (2010)
<i>PbBo(Anju)3</i>	LG3	KBrH008J04R	Nagaoka et al. (2010)
<i>PbBo(Anju)4</i>	LG7	KBrB084F01N1	Nagaoka et al. (2010)
<i>PbBo(GC)1</i>	LG5	CB10027	Nagaoka et al. (2010)
<i>CRQTL-GN_1</i>	C02	C2h-1	Lee et al. (2016)
<i>CRQTL-GN_2</i>	C03	C3b-3	Lee et al. (2016)
<i>CRQTL-YC</i>	C03	C3a-65	Lee et al. (2016)
<i>DIC.I-1</i>	C08	swucp-1098	Peng et al. (2018)
<i>DIC.II-1</i>	C08	swucp-1101	Peng et al. (2018)
<i>Rcr7</i>	C07	SNP_C7_44	Dakouri et al. (2018)

2.5.3.3 Nalezené rezistentní lokusy a geny u *B. napus*

B. napus jako mezidruhový kříženec druhů *B. rapa* a *B. oleracea* doposud nebyl významnějším cílem pro hledání rezistentních lokusů a genů právě kvůli alotetraploidnímu uspořádání genomu. Doposud se touto problematikou zabývaly komplexně pouze tři studie. Manzanares-Dauleux et al. (2000) našel tři R lokusy, z nichž *Pb-Bnl* nacházející se na chromozomu A03 a představoval dominantní oblast. Ostatní dva lokusy jsou lokalizované pravděpodobně na chromozomech C02 a C09 a mají na odolnost jen menší vliv. Druhá práce Werner et al. (2008) odhalila 19 rezistentních QTL na chromozomech A02 (*PbBn-k-1*), A03 (*PbBn-k-2*, *PbBn-1-1*,

PbBn-01:60-1, *PbBn-01.07-1*), A08 (*PbBn-1-2*, *PbBn-01.07-2*, *PbBn-a-1*), A09 (*PbBn-Korp-1*, *PbBn-Korp-2*, *PbBn-Korp-3*), C03 (*PbBn-01.07-3*, *PbBn-01:60-2*), C05 (*PbBn-k-3*), C06 (*PbBn-Korp-4*, *PbBn-Korp-5*) a C09 (*PbBn-01:60-3*, *PbBn-01:60-4*, *PbBn-e4x04-1*). Poslední studie Li et al. (2016) využívající SNP markery odhalila přítomnost 10 rezistentní lokusů často s velmi přesným určením pozice v genomu *B. napus*. Nalezené lokusy se nacházejí na chromozómech A04 (*MCR-A4*), A10 (*SCR-A10a*, *SCR-A10b*), C03 (*SCR-C3*, *MCR-C3*), C04 (*SCR-C4a*, *SCR-C4b*), C06 (*SCR-C6*) a C09 (*MCR-C9*). Všechny zmíněné lokusy lze vyhledat v následující tabulce s jejich pozicí na chromozomu a nejbližším markerem. V případě studie Li et al (2016) jsou uvedena přímo poloha v genomu *B. napus* (tab. 5).

Tab. 5: Rezistentní oblasti nalezené v genomu *B. napus*

<i>R lokus</i>	<i>chr.</i>	<i>marker</i>	<i>studie</i>
<i>Pb-Bnl</i>	A03	OPV09.2100	Manzanares-Dauleux et al. (2000)
<i>minorQTL</i>	C02	OPC18.1250	Manzanares-Dauleux et al. (2000)
<i>minorQTL</i>	C09	OPQ01.930	Manzanares-Dauleux et al. (2000)
<i>PbBn-k-1</i>	A02	152_373	Werner et al. (2008)
<i>PbBn-k-2</i>	A03	128_330	Werner et al. (2008)
<i>PbBn-1-1</i>	A03	128_330	Werner et al. (2008)
<i>PbBn-01:60-1</i>	A03	107_106	Werner et al. (2008)
<i>PbBn-01.07-1</i>	A03	128_330	Werner et al. (2008)
<i>PbBn-1-2</i>	A08	84_258	Werner et al. (2008)
<i>PbBn-01.07-2</i>	A08	84_258	Werner et al. (2008)
<i>PbBn-a-1</i>	A08	79_168	Werner et al. (2008)
<i>PbBn-Korp-1</i>	A09	6_450	Werner et al. (2008)
<i>PbBn-Korp-2</i>	A09	107_366	Werner et al. (2008)
<i>PbBn-Korp-3</i>	A09	158_154	Werner et al. (2008)
<i>PbBn-01.07-3</i>	C03	160_186	Werner et al. (2008)
<i>PbBn-01:60-2</i>	C03	19_329	Werner et al. (2008)
<i>PbBn-k-3</i>	C05	79_75	Werner et al. (2008)
<i>PbBn-Korp-4</i>	C06	19_155	Werner et al. (2008)
<i>PbBn-Korp-5</i>	C06	148_105	Werner et al. (2008)
<i>PbBn-01:60-3</i>	C09	84_174	Werner et al. (2008)
<i>PbBn-01:60-4</i>	C09	107_370	Werner et al. (2008)
<i>PbBn-e4x04-1</i>	C09	163_448	Werner et al. (2008)
<i>MCR-A4</i>	A04	16,356,482–16,733,484	Li et al. (2016)
<i>SCR-A10a</i>	A10	15476654	Li et al. (2016)
<i>SCR-A10b</i>	A10	885083	Li et al. (2016)
<i>SCR-C3</i>	C03	58,088,063–58,097,249	Li et al. (2016)
<i>MCR-C3</i>	C03	21,372,298–21,810,339	Li et al. (2016)
<i>SCR-C4a</i>	C04	2,498,886–2,511,207	Li et al. (2016)
<i>SCR-C4b</i>	C04	8,065,329–8,102,210	Li et al. (2016)
<i>SCR-C6</i>	C06	25596721	Li et al. (2016)
<i>MCR-C9</i>	C09	41,753,926–41,967,651	Li et al. (2016)

3. Hypotézy a cíle disertační práce

3.1 Hypotézy

- 1) Je možné nalézt významnou variabilitu v reakci na infikování nádorovitostí u kolekce 250 vybraných genotypů *B. napus*?
- 2) Je možné pomocí asociativní transkriptomiky identifikovat oblasti a geny, které jsou významné při reakci na napadení nádorovitostí?

3.2 Cíle práce

Cílem této práce je identifikace míry rezistence vyjádřená jako disease index (DI) pro silně variabilní kolekci genotypů *B. napus*. Tato fenotypová data poté porovnat s transkriptomickými daty známými pro tuto kolekci dvěma různými přístupy, které zahrnují moderní přístup asociativní transkriptomiky.

V prvním případě využít SNP markerů detekovaných v RNAseq datech pro jednotlivé genotypy a jejich DI k provedení asociativní analýzy. Výstupem z této analýzy by měly být hodnoty asociace jednotlivých SNP markerů k porovnávanému znaku, v tomto případě DI pro nádorovitost. Vyšší počet asociovaných SNP markerů pak bude určovat polohu v genomu s klíčovými geny ovlivňující DI.

Druhý přístup bude zahrnovat využití míry exprese jednotlivých genů získaných také z RNAseq dat. Expresní profily jednotlivých genů napříč genotypy budou 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 bude vyjadřovat důležitost tohoto genu v reakci na nádorovitost.

V posledním kroku budou případné geny v oblasti asociovaných SNP markerů a vysoce asociované geny na základě expresních profilů podrobeny anotační analýze GO, InterPro a přiřazeny anotace na základě podobnosti s geny *Arabidopsis thaliana* provedené pomocí blastn. Na základě těchto anotačních analýz budou vytipovány klíčové geny v obranných reakcích proti nádorovitosti.

4. Materiál a metody

4.1 Hostitelské rostliny a sekvenování jejich transkriptomu

4.1.1 Kolekce rostlin

Pro testování odolnosti k nádorovitosti a následné bioinformatické analýzy byla použita kolekce 250 různých genotypů *B. napus*. Jedná se velmi různorodou kolekci, která byla složena z odrůd a dihaploidních linií pocházející z Evropy, Asie, Severní Ameriky, Austrálie i Afriky. Testovací panel je nejen variabilní z pohledu geografického ale i časového, jelikož zahrnuje komerční odrůdy od 50. let až do současnosti, včetně polodivokých a resyntetizovaných forem *B. napus*. V rámci kolekce lze nalézt různorodé typy *B. napus* například olejnaté: ozimá řepka (101), poloozimá řepka (5), jarní řepka (92); pícnin (4); kořenové a listové zeleniny (43). Podrobnější informace o kolekci lze najít v práci Havlickova et al. (2018) a v tab. 29 obsahující kompletní seznam testovaných genotypů.

4.1.2 Pěstování rostlin pro RNA sekvenování

Pěstování rostlin pro odběr RNA byla prováděna ve sklenících s umělým osvětlením methylhalogenových žárovek zaručující šestnáctihodinovou fotoperiodu. Teplota ve skleníku se pohybovala kolem 15 °C. Semena jednotlivých odrůd byla nejdříve předpěstována v substrátu pro výsev (Levington F1 kompost). Po 11 dnech byly čtyři semenáčky od každé odrůdy přesazeny náhodným výběrem do sadbovačů se substrátem Levington M2 kompost. Po 15 dnech byl do tekutého dusíku odebrán od každé rostliny první pravý list pro izolaci RNA. Pěstování rostlin bylo prováděno ve sklenících univerzity v Yorku. Podrobný popis postupu lze najít v práci Bancroft et al. (2011) a Harper et al. (2012).

4.1.3 Příprava RNA a sekvenování transkriptomu

Vzorky listů byly homogenizovány v tekutém dusíku. Samotné izolace RNA byla provedena kitem E.Z.N.A. Plant RNA Kit podle výrobce. Po extrakci byla koncentrace RNA změřena pomocí spektrofotometru NanoDrop ND-1000 a požadovaná kvalita RNA

pro sekvenování ověřena pomocí čipu Agilent RNA 6000 Nano LabChip a přístrojem Agilent Technology 2100 Bioanalyzer. Podrobnější postup metody extrakce popisuje studie Trick et al. (2009) a Bancroft et al. (2011).

Samotné sekvenování transkriptomu předcházela příprava knihoven pomocí kitu Illumina mRNA-Seq kit podle manuálu od výrobce. Následně byly všechny knihovny sekvenovány na přístroji Illumina HiSeq2500. Výsledná data byla upravena v programu GERALD, jehož výstupem byly 100 bázové čtecí rámce ve formátu Illumina FASTQ. Pro další zpracování byla data převedena na vhodnější Sanger FASTQ formát. Pro podrobnější popis přípravy RNA, vytvoření knihoven a samotného sekvenování je možné využít práci Lu et al. (2014).

4.1.4 Detekce SNP markerů a kvantifikace transkriptů

SNP markery byly rozpoznány na základě analýzy podobnosti osekvenovaných úseků transkriptomu a referenční sekvence pro A a C chromozomy *B. napus* publikované ve studii (He et al. 2015). Detailnější postup generování SNP včetně využitých programů a scriptů lze nalézt v práci Bancroft et al. (2011).

Sada SNP markerů byla vygenerována pro všechny osekvenované vzorky. Kvalita SNP byla následně zvýšena požadavky na hloubku čtení minimálně 10, kvalita sekvenovaných bází ve SNP minimálně Q20, frekvence jednotlivých bází ve SNP 0,2 a více, parametr ztráty dat 0,25 a identifikace maximálně dvou alel v místě SNP markeru. Výše zmíněné striktní parametry vedly k vygenerování 355 536 SNP markerů, z nichž 256 397 SNP představovalo druhou nejvyšší frekvenci alely v populaci označovanou jako minor allele frequency (MAF) > 0,01. Podrobný postup filtrace vygenerovaných SNP marker je popsán v práci Havlickova et al. (2018).

Kvantifikace exprese jednotlivých genových modelů CDS (coding DNA sequence) *B. napus* byla provedena na základě analýzy podobnosti sekvenačních dat pro jednotlivé genotypy s referenční sekvencí publikovanou He et al. (2015). Data byla následně normalizovaná na hodnoty RPKM (reads per kb per million aligned reads) představující výši exprese jednotlivých CDS. Tímto způsobem byly vygenerovány hodnoty RPKM pro všechny genové modely ve všech osekvenovaných genotypch. Po stanovení minimální hodnoty RPKM > 0,4 byl celkový počet 53 899 CDS použit pro další analýzy. Detailnější postup zde popisové kvantifikace genové exprese lze nalézt v práci Harper et al. (2012).

4.2 Zdroj patogenu, aplikace a hodnocení napadení

4.2.1 Patogenní materiál

Patogenní materiál použitý pro testování citlivosti 250 genotypů *B. napus* k nádorovitosti byl získán kombinací nejagresivnějších patotypů *P. brassicae* v České republice. Po namnožení patogenu na citlivých odrůdách bylo pomocí biotestu zařazen tento materiál jako patotyp 17/31/31 dle ECD (European Clubroot Diferencial set) metodiky Buczacki et al. (1975).

4.2.2 Příprava inokula

Po namnožení patogenního materiálu byly napadené kořeny s nádory uloženy do mrazicího boxu nastaveného na teplotu $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$. 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 třech minutách mixování byla výsledná suspenze přefiltrována přes jemnou tkaninu a poté centrifugována 20 minut. 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 10^6 spor na 1 ml inokulačního media (Chytilová & Dušek 2007).

4.2.3 Pěstování rostlin a způsob aplikace inokula

Od každého testovaného genotypu bylo vyseto pět rostlin, které byly infikovány nádorovitostí a po sedmi týdnech vyhodnocena míra napadení. Substrát pro výsev byl vytvořen smícháním standardního zahradního substrátu B (Florestina) a perlitu v poměru 1:1. Výsledné pH substrátu se pohybovalo v rozmezí šest až sedm. Připravený mix byl rozsypan do sadbovačů o velikosti 4×4 cm. Do každé buňky sadbovače bylo na povrch substrátu umístěno jedno semínko, na které bylo pomocí pipety aplikováno 0,5 ml připraveného roztoku spor o koncentraci 10^6 spor na 1 ml inokula. V posledním kroku byl substrát překryt 1 cm perlitu.

Testované rostliny byly pěstovány za laboratorních podmínek v kultivačních místnostech při teplotě $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ přes den a $18\text{ }^{\circ}\text{C}$ v noci. Intenzita osvětlení byla nastavena na hodnoty

80 – 100 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ s šestnáctihodinovým cyklem. V týdenním intervalu byly semenáčky přihnojovány roztokem Kristalon Start o koncentraci 0,5 g na 10 litrů vody. Jako kontrola správné inokulace byla použita velmi citlivá odrůda čínského zelí *B. rapa* var. *pekinensis* ‘Granaat’, u které byla provedena kontrola čtvrtý týden od výsevu, zda dochází k tvorbě nádorů. Ostatní testované odrůdy a genotypy *B. napus* byly hodnoceny na přítomnost nádorů na kořenech po sedmi týdnech od výsevu.

4.2.4 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 sedmi 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:

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

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 odlišení odolných a citlivých genotypů byly dle metodiky stanoveny hranice pro citlivé genotypy $\text{DI} > 80$ a odolné genotypy $\text{DI} < 20$ (Chytilová & Dušek 2007; Li et al. 2016).

4.3 Bioinformatické analýzy

4.3.1 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 dostupného na <https://cran.r-project.org> 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 byla nahrána Q matice reflektující strukturu populace vygenerovaná metodou PSIKO (Popescu et al. 2014) a sada SNP markerů vygenerovaných podle popisu v kapitole 4.1.4. 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).

4.3.2 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. Expresce jsou vypočítané z RNAseq dat jednotlivých genotypů. Celkem byla použito 53 889 genů ($RPKM > 0,4$) dle popisu v kapitole 4.1.4. K provedení asociační analýzy a zpracování grafického výstupu byl použit program R dostupného na <https://cran.r-project.org>. Detailnější popis GEM asociační analýzy lze najít ve studii Havlickova et al. (2018).

4.3.3 Anotace a predikce kandidátních genů

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 bází od SNP s hodnotou $-\log_{10}P > 4$ a samotné kandidátní geny byly vybírány z užší oblasti do 100 000 bází v rámci polohy na chromozomech. Dvě

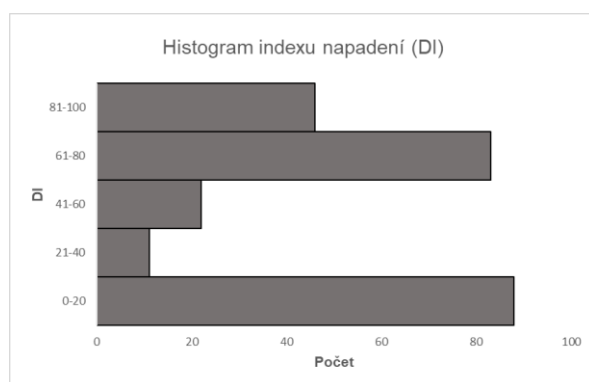
prahové hodnoty byly navrženy na základě předběžné opatrnosti ve stanovení rozsahu asociovaných oblastí. Skupiny genů, ze kterých byly vybrány kandidátní geny pro GEM analýzu, zahrnovaly všechny geny s hodnotami významnosti $-\log_{10}P > 3,5$.

Anotace genů, přiřazení GO termínů a InterPro analýza byla provedena na základě podobnosti (blastn, e-value $\leq 1e^{-3}$) mezi všemi identifikovanými geny v *B. napus* (He et al. 2017) a geny *Arabidopsis thaliana* z aktuální verze genomu araport11 z databáze TAIR dostupná na <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 dostupná na <https://www.ebi.ac.uk/interpro>. Na základě takto anotovaných genů byly vybrány finální kandidátní geny pro jednotlivé analýzy.

5. Výsledky

5.1 Fenotypová variabilita u testovaných genotypů

Při hodnocení fenotypové variability pro nádorovitost byl použit asociační panel s 250 genotypy *B. napus* s obecně vysokou genetickou variabilitou (tab. 29). Konkrétně byla hodnocena míra napadení vyjádřená pomocí DI (disease index) u sedm týdnů starých rostlin inokulovaných trvalými sporami tohoto patogenu. Naměřená data a vygenerované DI vykazovaly vysokou úroveň fenotypové variability napříč celou testovanou kolekcí. Výsledné hodnoty DI pro každý genotyp jsou uvedeny v příloze (tab. 29). Hodnoty DI se pohybovaly od nuly až do maximální hodnoty 100. Průměrná hodnota tohoto indexu byla 45,7 se standardní odchylkou (SE) 2,29. Celkové rozložení jednotlivých testovaných zástupců kolekce lze vidět na obr. 7.



Obr. 7: Histogram hodnot DI rozdělených do pěti kategorií

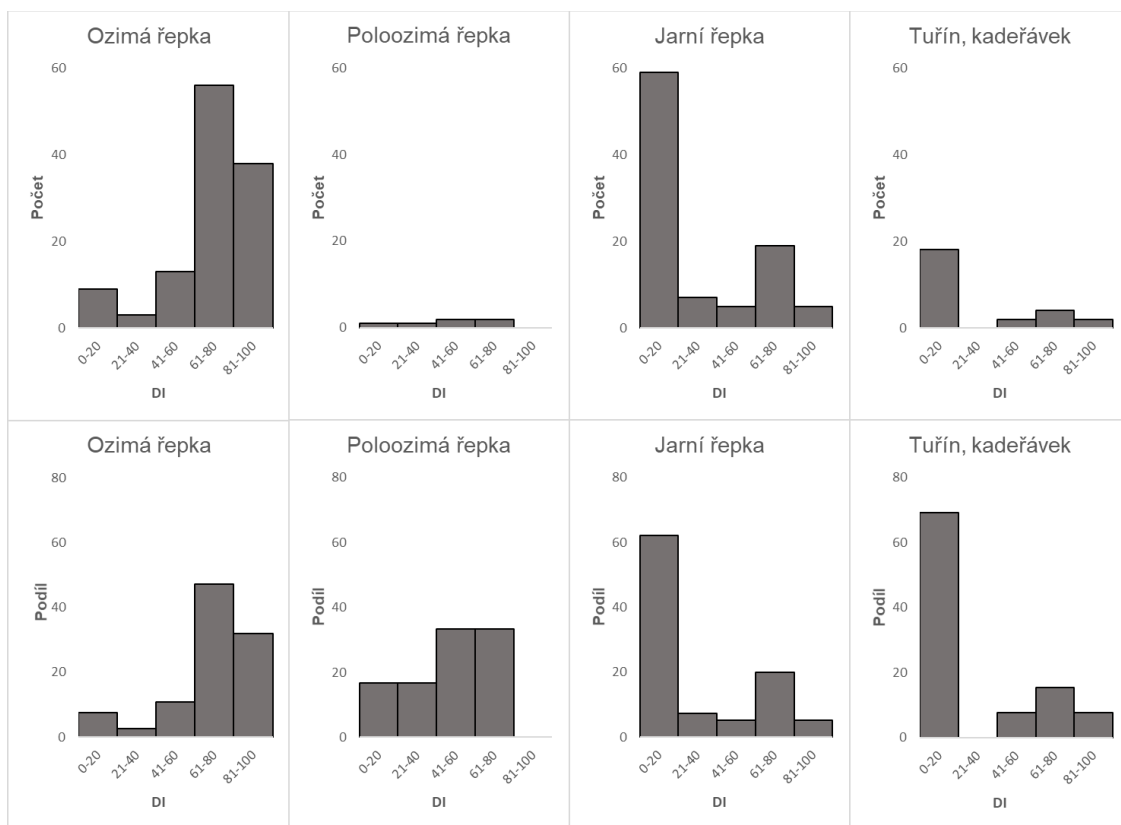
Z obr. 7 je patrné, že je zde určitá míra rozdělení na odolné linie, obecně klasifikované podle DI s hodnotou menší než 20 a citlivé linie považované za zástupce s DI větším než 80. Počet odolných při tomto rozložení představuje 46 zástupců a za citlivé je možné počítat 88 genotypů.

Použitý panel se vyznačoval vysokou genotypovou a fenotypovou variabilitou a rovněž také obsahoval různé typy kultivarů z okruhu *B. napus*. Kolekce obsahovala běžné kultivary typu ozimé a jarní řepky, ale také i nevšední typy jako ozimá a jarní krmná řepka využívaná jako pícní plodina, poloozimá řepka, tuříny a mrazuvzdorné listové zeleniny vyšlechtěné z *B. napus* zde nazývané jako kadeřávky. Při hodnocení těchto typů kultivarů bylo 246 genotypů rozděleno do čtyř skupin. Nejpočetnější skupinu představovaly ozimé řepky s 119 položkami, dále poloozimé odrůdy s šesti položkami a

jarní řepka s 95 zástupci. Poslední skupina byla sloužena z genotypů využívaných jako zelenina zahrnující dohromady 26 zástupců. Následně byla pro vyhodnocení tohoto rozdělení vypočítána průměrná hodnota DI pro každou skupinu. Získané hodnoty shrnuje tab. 6. Na obr. 8 jsou pak zobrazeny jednotlivé histogramy hodnot DI podle jednotlivých skupin.

Tab. 6: Vyhodnocení hodnot DI podle typů kultivarů

	vše	ozimá řepka	poloozimá řepka	jarní řepka	tuřín, kadeřávek	nespecifikované
Průměr	45.705	68.10067227	47.685	23.44473684	22.13730769	58.335
Standardní chyba	2.289551009	2.262650536	8.913159466	3.243291593	6.902506558	20.9719831
Median	66.67	66.67	54.165	0	0	66.67
Modus	0	66.67	66.67	0	0	66.67
Standardní odchylka	36.20098003	24.68260331	21.83269269	31.61169615	35.19601563	41.94396619
Rozptyl	1310.510955	609.2309063	476.66647	999.2993337	1238.759516	1759.2963
Koeficient špičatosti	-1.544941469	1.84122058	0.23416403	-0.940521068	-0.222313534	2.227398757
Koeficient šikmosti	-0.194776593	-1.340495038	-1.066062116	0.863535123	1.162634493	-1.12952831
Variační rozpětí	100	100	55.56	100	100	100
Minimum	0	0	11.11	0	0	0
Maximum	100	100	66.67	100	100	100
Součet	11426.25	8103.98	286.11	2227.25	575.57	233.34
Počet	250	119	6	95	26	4



Obr. 8: Histogramy hodnot DI podle typů kultivarů

Výsledky ukazují, že největší zastoupení odolných odrůd představuje skupina zelenin (v tabulce uvedena jako ‘Tuřín, kadeřávek’). Průměrná hodnota DI pro tuto skupinu

představuje 22,1 (SE = 3,24). Podobné výsledky DI byly získány u skupiny jarních řepok, kde se hodnota DI rovnala 23,4 (SE = 8,91), což ukazuje, že v obou zmíněných kategoriích jsou zastoupeny převážně odolné genotypy. Opačného výsledku bylo dosaženo u nejpočetnější skupiny ozimých řepok se 119 zástupci, kde průměrná hodnota DI byla pouze 68,10 (SE = 2,26). U poslední skupiny poloozimých řepok byl průměr DI roven 47,7 (SE = 8,91).

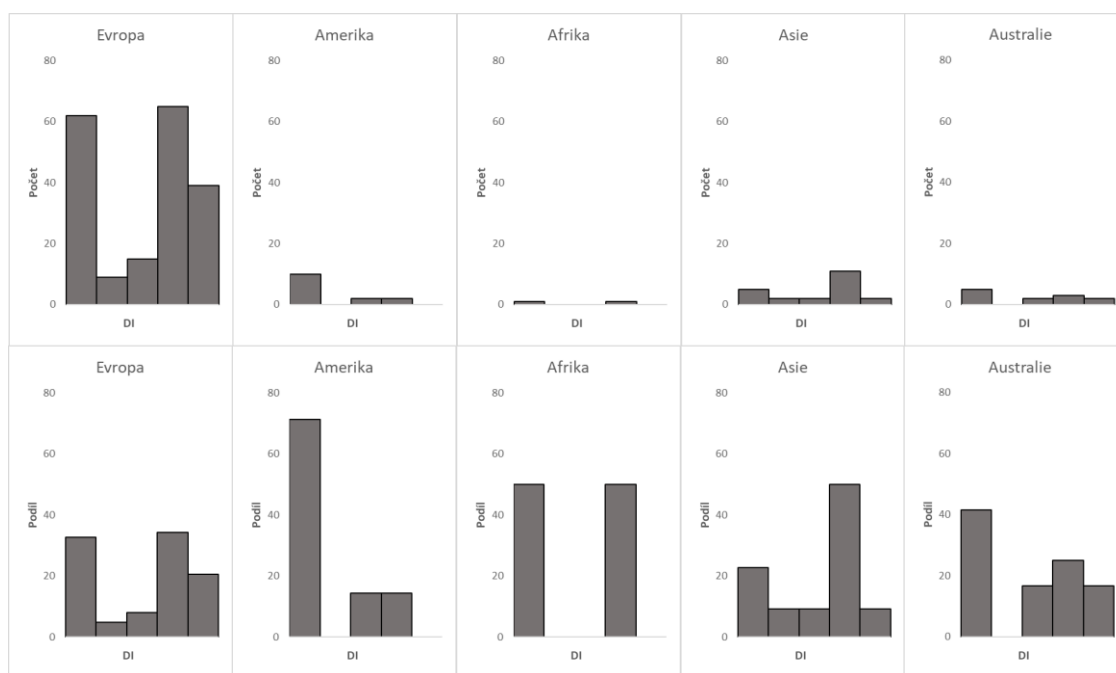
Zastoupení nejvyššího počtu odolných genotypů bylo zaznamenáno u jarních řepok, zde bylo celkem nalezeno 59 genotypů odolných (DI < 20). Celkově tento počet tvořil 62 procent zástupců z této kategorie. Druhý největší počet silně odolných genotypů o počtu 18 představovala skupina zelenin. Celkem bylo v této skupině více než 62 procent genotypů silně odolných. Naopak pouze osm odolných zástupců bylo určeno ve skupině ozimých řepok. Počet tvořil pouze devět procent zástupců této skupiny, naopak 32 procent z této skupiny bylo ohodnoceno jako citlivé k nádorovitosti (DI > 80). V rámci použitých genotypů v kolekci byly dále vyhledány další tři charakteristiky jednotlivých položek. První z těchto znaků byl původ daného genového zdroje. Celkově se podařilo tuto informaci získat pro 240 položek z testované kolekce. Tyto genotypy byly pak rozděleny do pěti skupin podle světadílů. Největší zastoupení představovala Evropa se 190 zástupci, dále Asie se 22 položkami, Amerika se 14 genotypy, Austrálie s počtem 22 položek a poslední dva zástupci byly přiřazeni k Africe.

Tab. 7: Vyhodnocení hodnot DI podle původu

	vše	Evropa	Amerika	Afrika	Asie	Austrálie
Průměr	45.705	48.22863158	17.06428571	33.335	49.67272727	38.42583333
Standardní chyba	2.289551009	2.658856493	7.559301651	33.335	6.028662964	10.2907807
Median	66.67	66.67	0	33.335	66.67	47.22
Modus	0	0	0	0	66.67	0
Standardní odchylka	36.20098003	36.64980753	28.28431686	47.1428091	28.27693578	35.64831003
Rozptyl	1310.510955	1343.208392	800.0025802	2222.44445	799.585097	1270.802008
Koeficient špičatosti	-1.544941469	-1.500349346	-0.718184473		-0.751395666	-1.988094968
Koeficient šikmosti	-0.194776593	-0.277832541	1.139141268		-0.885830909	-0.080038135
Variační rozpětí	100	100	66.67	66.67	83.33	83.33
Minimum	0	0	0	0	0	0
Maximum	100	100	66.67	66.67	83.33	83.33
Součet	11426.25	9163.44	238.9	66.67	1092.8	461.11
Počet	250	190	14	2	22	12

Z počtů vyplývá, že u této kategorie nebyla zaznamenána velká variabilita. Vzhledem k nerovnoměrnému zastoupení položek v jednotlivých kategoriích nelze významně usuzovat o charakteru daného kontinentu, nicméně nejvyšší míru citlivosti představovali zástupci z Asie a Evropy DI 49,7 (SE = 6,03) resp. 48,2 (SE = 2,66). Naopak velice nízkého DI bylo dosaženo v odrůd z Ameriky DI 17,1 (SE = 7,56). Přehledné výsledky

jednotlivých skupin lze nalézt v následující tab. 7. Na obr. 9 jsou ukázány histogramy hodnot DI podle jednotlivých světadílů.

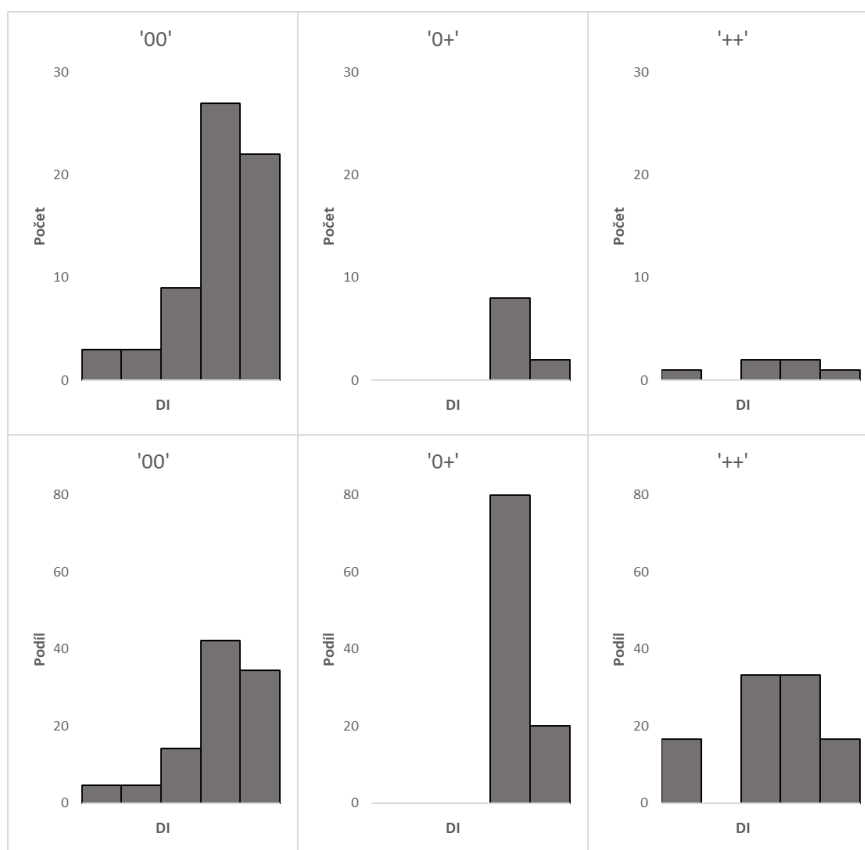


Obr. 9: Histogramy hodnot DI rozdělených podle místa původu

Další charakteristiky, podle kterých byl testovací panel rozříděn, zahrnovaly kvalitu oleje z pohledu obsahu glukosinolátů a kyseliny erukové a období vyšlechtění odrůdy. Pro kvalitu oleje byly stanoveny kategorie: 00 (minimální hladina glukosinolátů a kyseliny erukové), + (minimální hladina glukosinolátů) ++ (s normální hladinou glukosinolátů a kyseliny erukové). Zařazení do těchto kategorií se podařilo u 80 položek. Průměrné hodnoty DI se pro všechny tři kategorie pohybovaly na stejné úrovni. Podrobné výsledky shrnuje tab. 8. Na obr. 10 jsou vyneseny histogramy jednotlivých skupin.

Tab. 8: Vyhodnocení hodnot DI podle obsahu glukosinolátů a kyseliny erukové

	vše	00	0+	++
<i>Průměr</i>	45.705	69.0109375	74.446	57.96333333
<i>Standardní chyba</i>	2.289551009	2.967236717	2.644685741	10.51743938
<i>Median</i>	66.67	66.67	75	64.165
<i>Modus</i>	0	66.67	66.67	
<i>Standardní odchylka</i>	36.20098003	23.73789374	8.363230636	25.76235988
<i>Rozptyl</i>	1310.510955	563.4875991	69.94362667	663.6991867
<i>Koeficient špičatosti</i>	-1.544941469	1.615874524	0.523068658	-0.480008757
<i>Koeficient šikmosti</i>	-0.194776593	-1.119519105	0.942091355	-0.803340715
<i>Variační rozpětí</i>	100	100	25	66.66
<i>Minimum</i>	0	0	66.67	16.67
<i>Maximum</i>	100	100	91.67	83.33
<i>Součet</i>	11426.25	4416.7	744.46	347.78
<i>Počet</i>	250	64	10	6

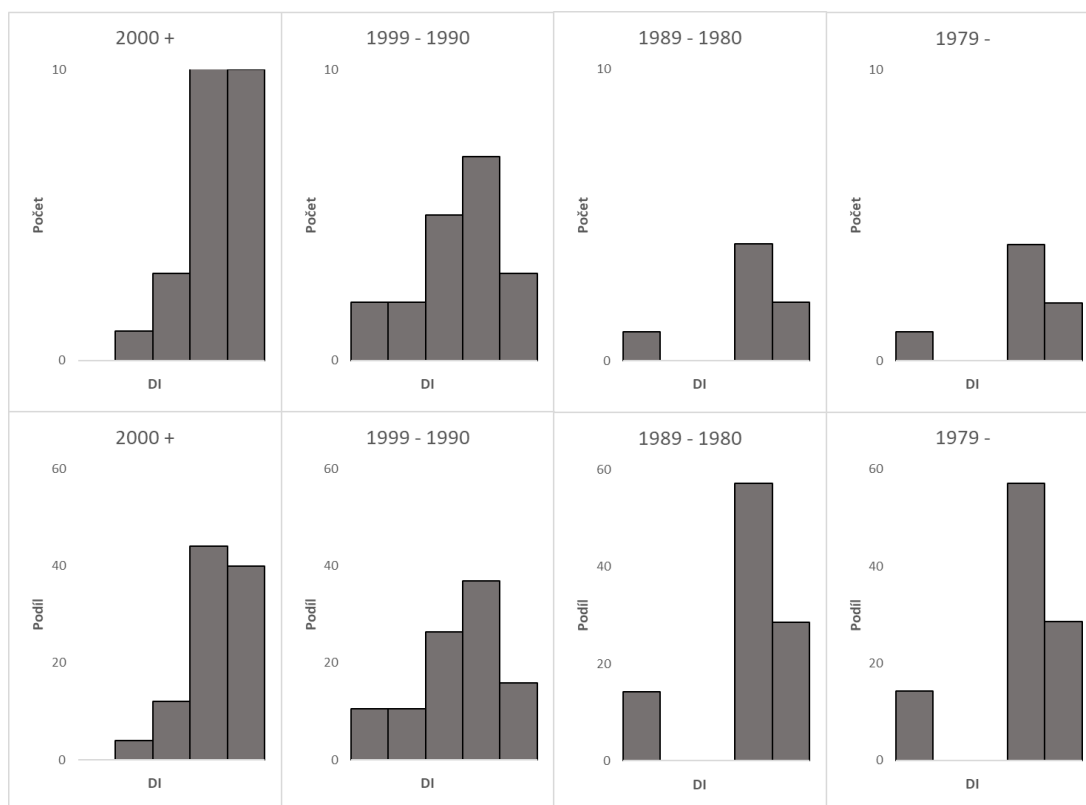


Obr. 10: Histogramy hodnot DI rozdělených podle obsahu glukosinolátů a kyseliny erukové

Podle poslední charakteristiky dělicí genotypy podle roku uvedení odrůdy, byly stanoveny celkem čtyři skupiny. První skupina zahrnovala odrůdy vyšlechtěné po roce 2000, druhá položky z 90. let, třetí skupina zástupce z 80. let a poslední starší než 1979. Informace ohledně časového období bohužel nepatřily mezi běžné, a proto se podařilo tento popis přiřadit jen k 53 položkám. Hodnoty DI se pro všechny čtyři kategorie pohybují na podobné úrovni viz tab. 9 a obr. 11.

Tab. 9: Vyhodnocení hodnot DI podle roku vyšlechtění

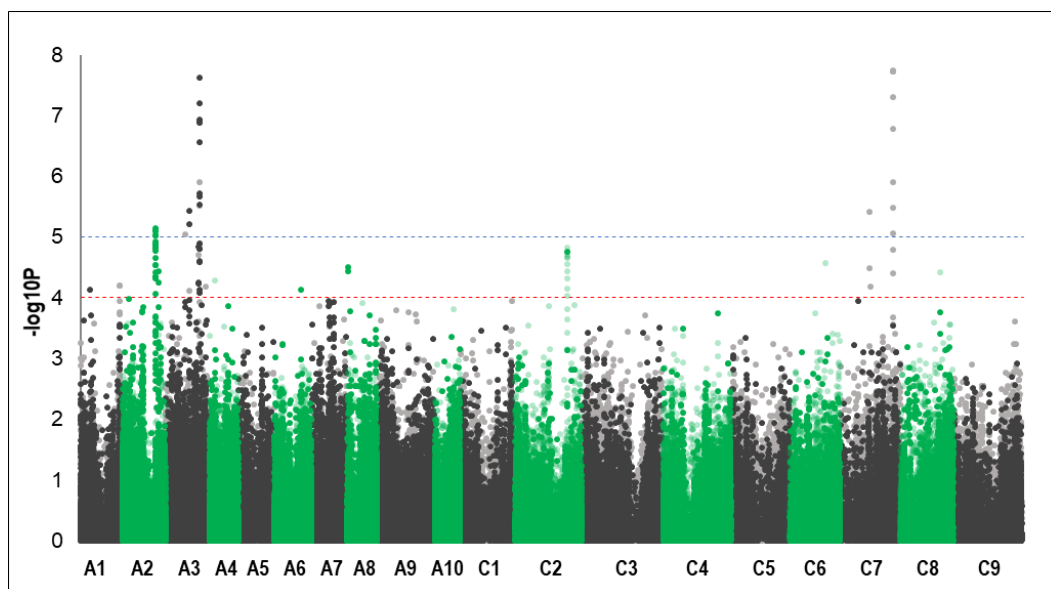
	vše	2000 +	1999 - 1990	1989 - 1980	1979 -
<i>Průměr</i>	45.705	74.556	56.2	81.42857143	66.27142857
<i>Standardní chyba</i>	2.289551009	3.433726499	5.945756755	7.341126626	11.53998915
<i>Median</i>	66.67	73.33	66.67	83.33	77.78
<i>Modus</i>	0	66.67	66.67	100	77.78
<i>Standardní odchylka</i>	36.20098003	17.16863249	25.91695284	19.42279539	30.53194143
<i>Rozptyl</i>	1310.510955	294.7619417	671.6884444	377.244981	932.1994476
<i>Koeficient špičatosti</i>	-1.544941469	0.273881724	-0.187564177	-1.874528115	5.246230078
<i>Koeficient šikmosti</i>	-0.194776593	-0.379446233	-0.428272724	-0.299067077	-2.18611263
<i>Variační rozpětí</i>	100	66.67	100	46.67	91.67
<i>Minimum</i>	0	33.33	0	53.33	0
<i>Maximum</i>	100	100	100	100	91.67
<i>Součet</i>	11426.25	1863.9	1067.8	570	463.9
<i>Počet</i>	250	25	19	7	7



Obr. 11: Histogramy hodnot DI podle roku vyšetření

5.2 SNP asociační analýza

Asociační analýza se SNP markery byla provedena dle popsané metodiky. Z testovaných genotypů byla SNP analýza provedena s kolekcí 245 genotypů, které disponovaly kvalitním výstupem ze sekvenování transkriptomu. Výsledkem této analýzy bylo nalezení 86 SNP markerů, které byly asociované s DI pro nádorovitost. Jejich hodnota signifikance $-\log_{10}P$ byla menší než 10^{-4} . 26 SNP markerů překročilo dokonce hodnotu signifikance $-\log_{10}P$ menší než 10^{-5} . Přehled signifikantních markerů zobrazuje tab. 30 v příloze. Grafický výstup SNP asociační analýzy je vyjádřen ve formě tzn. Manhattan plotu na obr. 12. Tento graf představuje na horizontální ose polohu všech testovaných SNP markerů na chromozómech a vertikální osa zobrazuje záporné hodnoty $\log_{10}P$, představující míru asociace s měřeným znakem, v tomto případě DI nádorovitosti. Světlejší body označují homoelogní SNP markery, u kterých nebylo možné rozlišit jejich umístění mezi homoelogními geny na chromozomech A a C.



Obr. 12: Manhattan plot SNP asociační analýzy

Pět signifikantních SNP markerů se nacházely samostatně bez zřejmé asociace k okolním SNP, a proto byly považovány za náhodnou chybnou asociaci a nebyly dále brány v potaz. Ostatní markery se vždy nacházely shlukovitě v určitých místech na genomu. Tyto oblasti jsou dále označovány jako asociované nebo rezistentní lokusy. Ke stanovení těchto asociovaných lokusů mezi SNP markery a DI byl brán ohled na počet SNP v oblasti (eliminace náhodných chyb) a překročení prahových hodnot signifikance. První hodnota 10^{-5} definovala signifikantně asociovaný SNP marker (sSNP) takto:

$$-\log_{10}P < 10^{-5}$$

Pokud určitá oblast obsahovala alespoň jeden sSNP byla obdobně označena jako signifikantní lokus nebo též rezistentní lokus. Takto bylo odhaleno pět signifikantních lokusů *BnA02_0265*, *BnA03_0186*, *BnA03_0263*, *BnC07_0238* a *BnC07_0421*. Jejich pojmenování bylo odvozeno z polohy na použité pseudomolekule genomu *B. napus*. Druhá prahová hodnota 10^{-4} vymezovala oblast pro potenciálně signifikantní SNP marker (pSNP) takto:

$$10^{-5} < -\log_{10}P < 10^{-4}$$

Následně pokud určitý lokus zahrnoval pouze pSNP bez sSNP byl označen jako potenciálně signifikantní lokus, též jako potenciálně rezistentní lokus. Následujícím způsobem byly nalezeny další 4 lokusy *BnA01_0308*, *BnA02_0286*, *BnA08_0009* a *BnC02_0414*. Celkově bylo tedy identifikováno 9 rezistentních lokusů, které jsou zobrazeny v tab. 10 a tab. 11 podle dvou prahových hodnot.

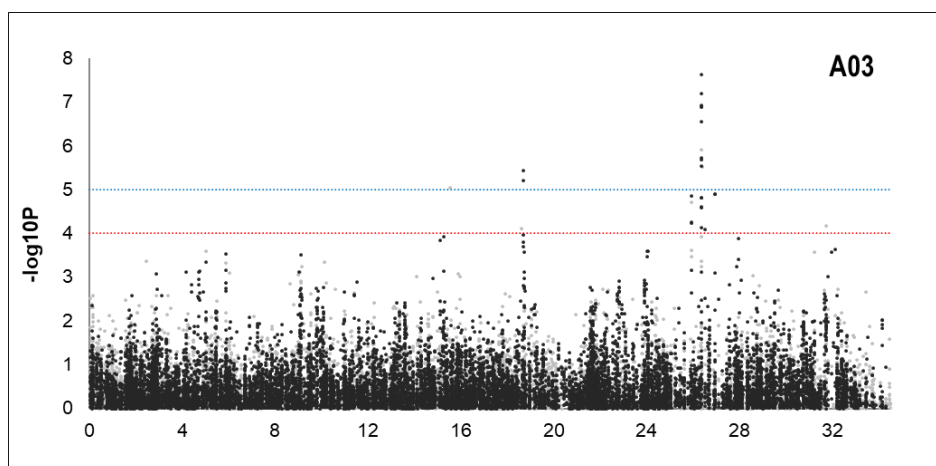
Tab. 10: Identifikované R lokusy vymezené hraniční hodnotou 100k bází

lokus	signifikance	chr.	začátek	konec	rozsah
BnA01_0308	$-\log_{10}P < 4$	A01	30.8E+6	31.0E+6	216.6E+3
BnA02_0265	$-\log_{10}P < 5$	A02	26.4E+6	26.8E+6	330.2E+3
BnA02_0286	$-\log_{10}P < 4$	A02	28.7E+6	28.9E+6	201.9E+3
BnA03_0186	$-\log_{10}P < 5$	A03	18.5E+6	18.8E+6	274.6E+3
BnA03_0263	$-\log_{10}P < 5$	A03	26.3E+6	26.6E+6	355.5E+3
BnA08_0009	$-\log_{10}P < 4$	A08	877.5E+3	1.1E+6	205.3E+3
BnC02_0414	$-\log_{10}P < 4$	C02	41.3E+6	41.6E+6	263.7E+3
BnC07_0238	$-\log_{10}P < 5$	C07	23.7E+6	23.9E+6	203.0E+3
BnC07_0421	$-\log_{10}P < 5$	C07	42.0E+6	42.2E+6	216.7E+3

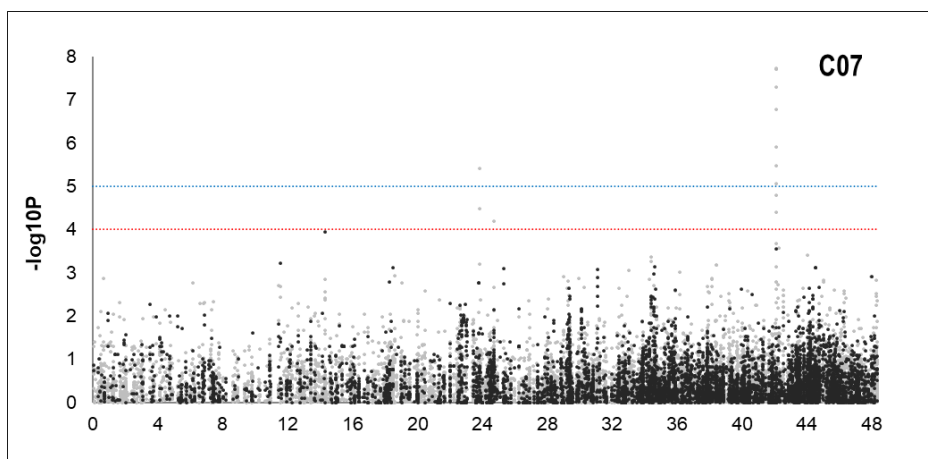
Tab. 11: Identifikované R lokusy vymezené hraniční hodnotou 200k bází

lokus	signifikance	chr.	začátek	konec	rozsah
BnA01_0308	$-\log_{10}P < 4$	A01	30.7E+6	31.1E+6	416.6E+3
BnA02_0265	$-\log_{10}P < 5$	A02	26.3E+6	26.9E+6	530.2E+3
BnA02_0286	$-\log_{10}P < 4$	A02	28.6E+6	29.0E+6	401.9E+3
BnA03_0186	$-\log_{10}P < 5$	A03	18.4E+6	18.9E+6	474.6E+3
BnA03_0263	$-\log_{10}P < 5$	A03	26.2E+6	26.7E+6	555.5E+3
BnA08_0009	$-\log_{10}P < 4$	A08	777.5E+3	1.2E+6	405.3E+3
BnC02_0414	$-\log_{10}P < 4$	C02	41.2E+6	41.7E+6	463.7E+3
BnC07_0238	$-\log_{10}P < 5$	C07	23.6E+6	24.0E+6	403.0E+3
BnC07_0421	$-\log_{10}P < 5$	C07	41.9E+6	42.3E+6	416.7E+3

Z pohledu genomu byly rezistentní lokusy lokalizovány na mnoha různých chromozomech. Po dvou oblastech bylo objeveno na chromozomech A02, A03 a C07. Dále jeden rezistentní lokus obsahovaly také chromozomy A01, A08 a C02. Při pohledu na obr. 12 je patrné, že z pohledu míry asociace se výrazně neodlišuje chromozom A03 a C07. Oba zahrnují SNP markery, s hranicí signifikance $-\log_{10}P < 10^{-7}$ Grafický výstup v podobě dvou Manhattan plotů pro chromozomy A03 a C07 zobrazují obr. 13 a obr. 14.

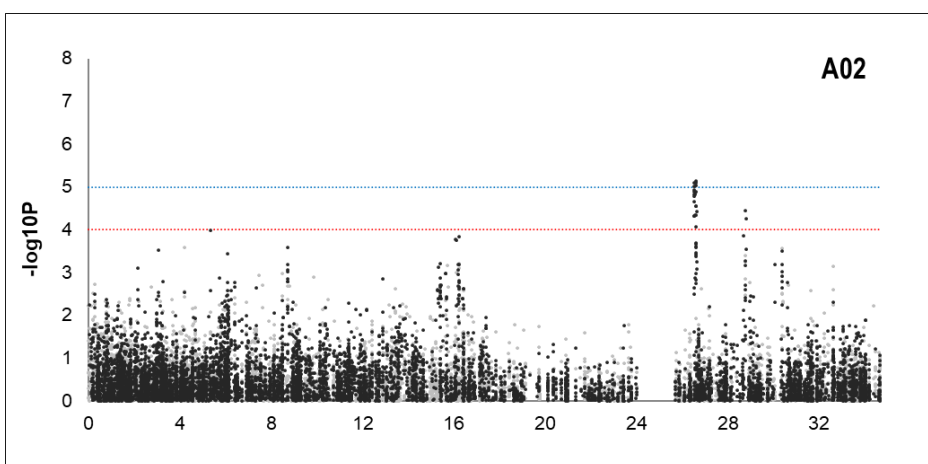


Obr. 13: Manhattan plot SNP asoiační analýzy pro chromozom A03



Obr. 14: Manhattan plot SNP asociační analýzy pro chromozom C07

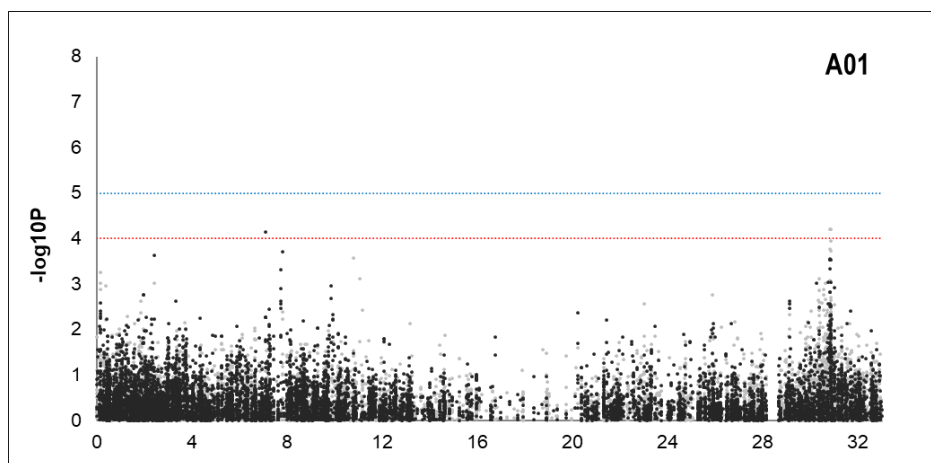
Z grafu je patrné, že chromozom obsahuje jeden menší vrchol kolem 18M bází, lokus označen jako *BnA03_0186* a větší v poloze 26M bází, nazván *BnA03_0263*. Oba tyto dva lokusy jsou signifikantně rezistentní. Při pohledu na Manhattan plot chromozomu C07 je vidět, že obsahuje také jeden menší vrchol v oblasti 24M bází a druhý silně asociovaný vrchol v oblasti 42M bází. Tyto rezistentní lokusy byly označeny jako *BnC07_0238* resp. *BnC07_0421*. Oba tyto lokusy jsou též zahrnuty mezi signifikantně rezistentní. Na rozdíl od chromozomu A03 jsou však tyto oblasti určeny pouze nespécifickými SNP naznačující, že se patrně jedná o homoelogní oblasti mezi chromozomy typu A pocházející z *B. rapa* a chromozomy typu C zděděné od předka *B. oleracea*. Poslední zmíněný chromozom obsahující dva rezistentní oblasti je A02 zobrazen na obr. 15.



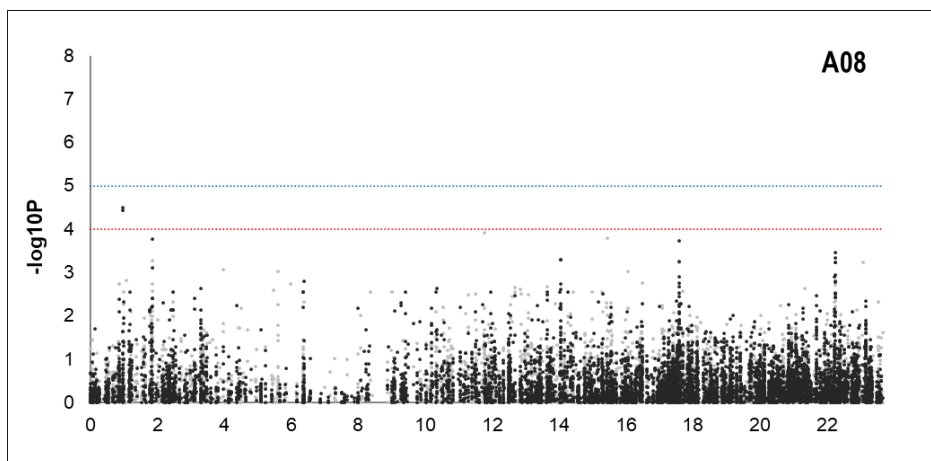
Obr. 15: Manhattan plot SNP asociační analýzy pro chromozom A02

Z grafu je patrné, že spodní prahovou hodnotu překračují dva vrcholy. Menší z nich se nachází v oblasti 29M bází a je označen *BnA02_0286*. V tomto případě se jedná pouze

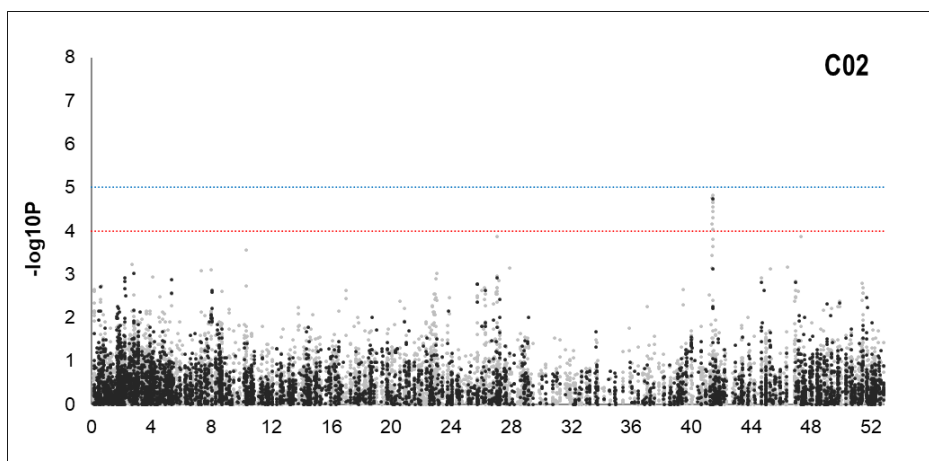
o potenciálně rezistentní lokus. Druhý signifikantně rezistentní lokus *BnA02_0265* se nachází v oblasti 26M bází. Zbývající tři potenciálně rezistentní lokusy se nacházejí na chromozomech A01 v oblasti 31M bází, lokus *BnA01_0308*. Dále na chromozomu A08 v části 90k bází se nachází lokus *BnA08_0009*. Poslední potenciálně rezistentní oblast *BnC02_041* se nachází na chromozomu C02 v části 29M bází. V tomto případě se podobně jako u dalších lokusů na C chromozomech jedná patrně o homoelogní oblast, jelikož signifikantní SNP markery nejsou specifické. Grafický výstup v podobě Manhattan plotu pro chromozomy A01, A08 a C02 se nachází na obr. 16, obr. 17 a obr. 18.



Obr. 16: Manhattan plot SNP asociační analýzy pro chromozom A01



Obr. 17: Manhattan plot SNP asociační analýzy pro chromozom A08



Obr. 18: Manhattan plot SNP asociační analýzy pro chromozom C02

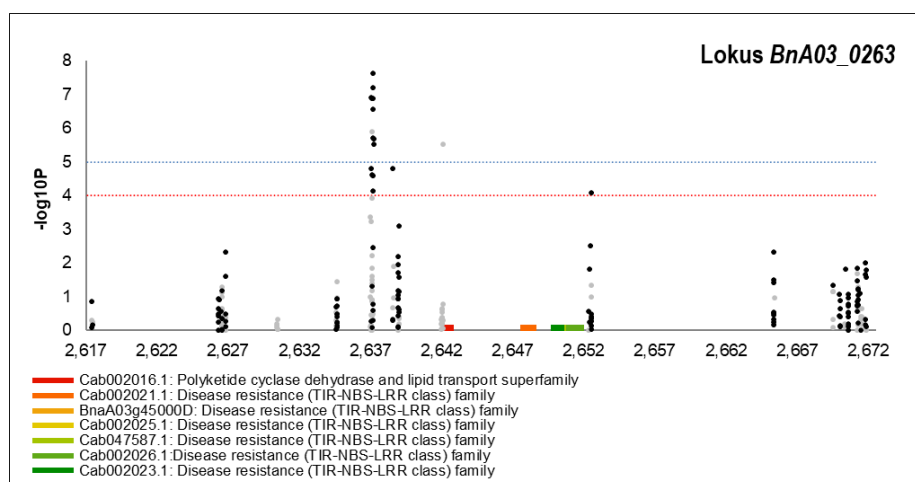
Vzhledem se specifikaci rozsahu rezistentních lokusů, které vycházelo z dvou hraničních oblastí 100k bází a 200k bází od okrajových sSNP a pSNP, celková oblast pod devíti rezistentními lokusy zahrnovala celkem 698 genů. Užší oblast daná hranicí 100k bází o hraničních SNP zahrnovala celkem ve všech lokusech 392 genů. Po rozšíření o hranici 200k bází se počet potenciálních kandidátních genů rozšířil o dalších 306 genů. V rámci této množiny genů bylo na základě několika analýz vybrány kandidátní geny, u kterých je předpoklad, že se přímo či nepřímo zapojují do obranných reakcí proti nádorovitosti. V prvním kroku byla pro potenciální geny provedena anotace na základě podobnosti s geny *Arabidopsis thaliana*. Následně byla provedena GO analýza, ze které byly vybrány geny s popisem “defense response”, “ethylene”, “jasmonic acid”, “salicylic acid”, “abscisic acid”, “auxin” a “gibberellin” jako kandidátní geny. V druhém kroku byla provedena InterPro analýza, která hodnotila potenciální geny z pohledu přítomnosti specifických domén, typických pro transkripční faktory s obranou funkcí. V tomto případě byly hledány domény ERF, bZIP, WRKY, MYB, cis-regulačními motivy ET/JA, G-box, GCC-box, W-box a „pathogen-related“ proteiny. Celkově bylo na základě SNP asociační analýzy vybráno 63 kandidátních genů, u kterých je předpokládáno zapojení do obranné reakce proti nádorovitosti.

Dva nejvíce asociované lokusy *BnA03_0263* a *BnC07_0421* se nacházejí na chromozomech A03 resp. C07. *BnA03_0263* začíná přibližně v pozici 26 170k bází a zahrnuje oblast 556k bází. Užší oblast, stanovená hranicí 100k bází od krajních signifikantních markerů, je v podobě částí pseudomolekuly genomu *B. napus* zobrazena v tab. 12.

Tab. 12: Oblast vymezení lokus *BnaA03_0263*

bn_gen	snp	at_gen	at_popis	e-value	sim
BnaA03g44740D	2.33	AT4G21620.1	glycine-rich protein	1.6E-163	78.0
Cab001998.1		AT3G18680.1	Amino acid kinase family	4.5E-28	89.0
Cab001999.1		AT4G21650.1	Subtilase family	< 1E-200	75.3
BnaA03g44760D		AT4G21650.1	Subtilase family	1.0E-25	81.5
Cab002000.1		AT4G21380.1	receptor kinase 1	5.2E-50	69.9
Cab002001.1		AT4G21650.1	Subtilase family	< 1E-200	76.1
BnaA03g44790D		AT4G21660.2	proline-rich spliceosome-associated (PSP) family	3.7E-20	87.8
Cab002002.1		AT4G21660.2	proline-rich spliceosome-associated (PSP) family	2.4E-34	82.5
Cab002003.2	0.32	AT4G21670.1	carboxyl-terminal domain (ctd) phosphatase-like 2	< 1E-200	79.0
Cab002004.1		AT4G21705.1	Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily	< 1E-200	81.0
Cab002005.2	1.44	AT4G21710.1	nuclear RNA polymerase C2	< 1E-200	76.3
Cab002006.1		AT4G21740.1	transmembrane protein	1.8E-125	80.0
Cab002007.1		AT4G21745.1	ROP-interactive CRIB motif-containing 10	2.1E-53	82.7
Cab002008.1	7.62	AT4G21750.1	Homeobox-leucine zipper family lipid-binding START domain	< 1E-200	79.8
Cab002009.1		AT4G21760.1	beta-glucosidase 45	7.5E-124	76.2
BnaA03g44910D		AT4G21760.1	beta-glucosidase 47	2.5E-96	83.3
Cab002010.1		AT4G21770.1	beta-glucosidase 45	1.1E-97	78.0
Cab002011.1	4.81	AT4G21790.1	tobamovirus multiplication (DUF1084)	7.3E-34	81.5
Cab002012.1	3.11	AT4G21860.4	methionine sulfoxide reductase B 2	3.4E-49	82.0
Cab002013.1		AT4G21895.2	DNA binding	7.3E-80	69.0
Cab002014.1		AT4G21910.3	MATE efflux family	< 1E-200	79.8
Cab002015.1	5.52	AT4G21903.2	MATE efflux family	< 1E-200	78.7
Cab002016.1		AT1G30990.1	Polyketide cyclase dehydrase and lipid transport superfamily	5.9E-02	87.0
Cab002017.1		AT4G21910.3	MATE efflux family	< 1E-200	79.0
Cab002019.1		AT4G21920.1	hypothetical protein	1.1E-64	77.0
Cab002020.1		AT4G21940.2	calcium-dependent kinase 23	3.6E-40	84.6
Cab002021.1		AT5G11250.1	Disease resistance (TIR-NBS-LRR class) family	3.9E-84	72.6
Cab002022.1		AT1G45063.2	Aminotransferase-like, plant mobile domain family	1.2E-01	77.1
Cab002023.1		AT5G11250.1	Disease resistance (TIR-NBS-LRR class) family	6.2E-144	80.3
Cab002024.1		AT4G21940.2	calcium-dependent kinase 15	5.3E-18	84.8
BnaA03g44990D		AT4G21940.3	calcium-dependent kinase	2.1E-27	72.5
BnaA03g45000D		AT5G11250.1	Disease resistance (TIR-NBS-LRR class) family	4.8E-176	71.3
Cab002025.1		AT5G11250.1	Disease resistance (TIR-NBS-LRR class) family	< 1E-200	72.0
Cab047587.1		AT5G11250.1	Disease resistance (TIR-NBS-LRR class) family	< 1E-200	72.0
BnaA03g45030D		AT1G55530.3	RING U-box superfamily	4.9E-02	89.6
Cab002026.1		AT5G11250.1	Disease resistance (TIR-NBS-LRR class) family	< 1E-200	72.5
Cab002027.1		AT4G21970.1	OBF-binding 3	< 1E-200	82.8
Cab002028.3	4.09	AT4G21990.1	APS reductase 3	< 1E-200	80.2
Cab002029.1		AT1G69090.1	F-box (DUF295)	2.5E-163	68.6
Cab002030.1		AT1G55050.2	Cytochrome P450 superfamily	3.7E-02	97.0
Cab002031.1		AT3G47680.1	glutathione S-transferase THETA 3	7.9E-08	70.8
Cab002032.1		AT3G47680.1	DNA binding	2.9E-17	66.0
Cab002033.2		AT3G44100.1	SNF1-related kinase	1.5E-32	78.7
Cab002034.1		AT1G69090.1	F-box (DUF295)	4.7E-55	70.4
Cab002035.1		AT1G27090.1	SCR-like 16	7.0E-03	79.3
Cab002036.1		AT3G57070.1	Glutaredoxin family	1.0E-28	77.0
Cab002037.1		AT1G17360.1	LOW : phosphatase 1 regulatory subunit	1.9E-27	82.3
Cab002038.1		AT1G62290.4	Saposin-like aspartyl protease family	3.8E-08	76.2
Cab002039.1		AT4G22000.1	tyrosine sulfotransferase	7.3E-35	78.0
Cab002040.1		AT1G69090.1	F-box (DUF295)	3.3E-149	70.3
BnaA03g45120D		AT5G66830.1	F-box (DUF295)	1.6E-79	69.0

Tato část zahrnuje 51 genů, z nichž nejvíce signifikantní SNP marker ($-\log_{10}P = 7,62$) obsahuje gen *Cab002008.1* (*Homeobox-leucine zipper family*). Dále je také v oblasti význačný SNP marker ($-\log_{10}P = 5,52$) v genu *Cab002015.1* (*MATE efflux family*) a SNP ($-\log_{10}P = 4,80$) v genu *Cab002011.1* (*tobamovirus multiplication*). Nicméně jako kandidátní geny pro tento pokus byly určeny rezistentní geny, které se nacházejí mezi zmíněnými geny, ale neobsahují v testované rezistentní SNP markery. Konkrétně se jedná o geny *Cab002016.1* (*Polyketide cyclase dehydrase and lipid transport superfamily*), *Cab002021.1* (*Disease resistance TIR-NBS-LRR class family*), *Cab002023.1* (*Disease resistance TIR-NBS-LRR class family*), *BnaA03g45000D* (*Disease resistance TIR-NBS-LRR class family*), *Cab002025.1* (*Disease resistance TIR-NBS-LRR class family*), *Cab047587.1* (*Disease resistance TIR-NBS-LRR class family*) a *Cab002026.1* (*Disease resistance TIR-NBS-LRR class family*). Grafické vyjádření v podobě Manhattan plotu lokusu *BnA03_0263* s kandidátními geny se nachází na obr. 19.



Obr. 19: Manhattan plot SNP asociační analýzy pro lokus *BnA03_0263*

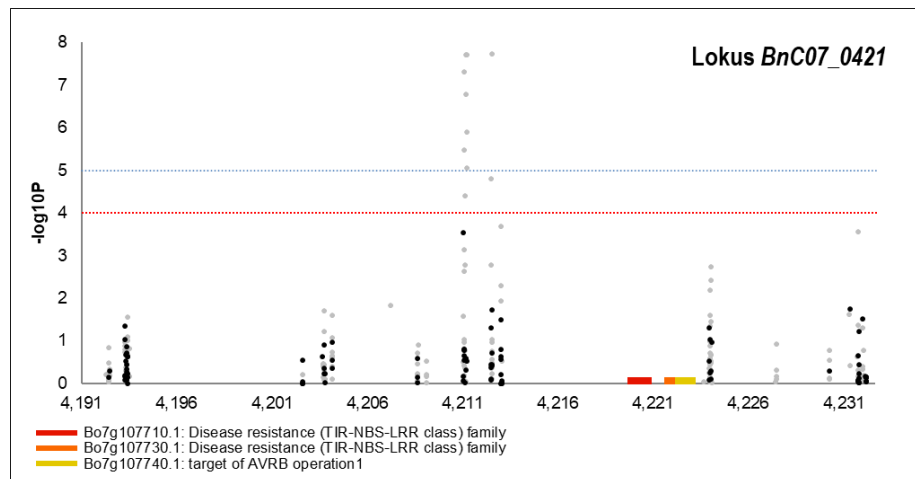
Druhý zmíněný vysoce asociovaný lokus *BnC07_0421* lokalizovaný 41 910k – 42 327k bází na chromozomu C07 má celkovou velikost 417k bází. Mírou asociace i rozložením a podobou podobností genů se podobá předchozímu lokusu *BnA03_0263*. Vymezení menší oblasti hranicí 100k bází od sSNP nebo pSNP zahrnuje 40 genů zobrazených v tab. 13.

Tab. 13: Oblast vymežující lokus *BnC07_0421*

bn_gen	snp	at_gen	at_popis	e-value	sim
Bo7g107430.1	0.55	AT4G21445.1	Leucine-rich repeat kinase family	5.9E-94	79.0
Bo7g107440.1		AT5G45990.1	crooked neck , cell cycle	3.8E-87	83.1
BnaC07g36740D		AT4G21550.3	VP1 ABI3-like 3	9.1E-18	85.5
Bo7g107450.1	1.70	AT4G21540.2	sphingosine kinase 1	4.7E-88	87.8
Bo7g107460.1	1.59	AT4G21620.1	glycine-rich protein	4.8E-129	83.7
Bo7g107470.1		AT4G21650.1	Subtilase family	< 1E-200	75.4
Bo7g107480.1		AT4G21650.1	Subtilase family	< 1E-200	76.3
BnaC07g36790D		AT4G21660.2	proline-rich spliceosome-associated (PSP) family	6.1E-34	81.3
Bo7g107490.1	1.83	AT4G21670.1	carboxyl-terminal domain (ctd) phosphatase-like 2	< 1E-200	78.0
Bo7g107500.1		AT4G21680.1	NITRATE TRANSPORTER	< 1E-200	78.1
BnaC07g36820D		AT1G53110.1	proton pump-interactor	1.5E-01	87.0
Bo7g107510.1	0.89	AT4G21705.1	Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily	< 1E-200	81.0
Bo7g107520.1		AT4G21710.1	DNA-directed RNA polymerase family	4.7E-63	95.0
BnaC07g36840D	0.72	AT4G21710.1	DNA-directed RNA polymerase family	1.6E-63	96.0
BnaC07g36850D	0.52	AT4G21720.1	defensin-like protein	1.3E-33	80.0
Bo7g107530.1		AT4G21740.1	transmembrane protein	2.2E-108	79.0
Bo7g107540.1		AT4G21745.1	PAK-box P21-Rho-binding family	6.0E-51	78.2
Bo7g107550.1	7.72	AT4G21750.1	Homeobox-leucine zipper family lipid-binding START domain	< 1E-200	80.0
Bo7g107560.1		AT4G21760.1	beta-glucosidase 45	4.8E-101	79.2
Bo7g107570.1		AT4G21760.1	beta-glucosidase 45	1.3E-95	77.5
Bo7g107580.1	7.74	AT4G21790.1	tobamovirus multiplication (DUF1084)	2.8E-39	79.8
Bo7g107590.1		AT1G10522.1	Serine Threonine-kinase	1.5E-62	86.8
Bo7g107600.1		AT4G21800.1	P-loop nucleoside triphosphate hydrolases superfamily	6.2E-25	78.0
BnaC07g36920D		AT1G10522.1	Serine Threonine-kinase	9.7E-60	88.6
Bo7g107610.1	3.69	AT4G21860.4	methionine sulfoxide reductase B 2	1.0E-48	81.7
Bo7g107620.1		AT4G21895.2	DNA binding	6.0E-81	69.5
Bo7g107630.1		AT4G21910.3	MATE efflux family	< 1E-200	79.9
BnaC07g36960D		AT4G33470.1	RING U-box superfamily	1.7E-01	92.4
Bo7g107640.1					
Bo7g107650.1		AT4G21910.3	MATE efflux family	< 1E-200	79.0
Bo7g107660.1		AT4G21910.3	MATE efflux family	< 1E-200	78.6
Bo7g107670.1		AT4G21910.2	MATE efflux family	5.3E-77	78.6
Bo7g107680.1		AT4G21920.1	hypothetical protein	3.1E-61	76.0
Bo7g107690.1		AT4G21920.1	hypothetical protein	3.1E-61	76.0
Bo7g107700.1		AT4G21940.3	calcium-dependent kinase 23	8.5E-61	80.0
Bo7g107710.1		AT5G11250.1	Disease resistance (TIR-NBS-LRR class) family	< 1E-200	72.0
BnaC07g42430D		AT1G01300.1	kinase superfamily	4.6E-03	87.0
Bo7g107720.1		AT4G21940.2	calcium-dependent kinase	2.9E-22	86.0
Bo7g107730.1		AT5G11250.1	Disease resistance (TIR-NBS-LRR class) family	< 1E-200	71.7
Bo7g107740.1		AT2G14080.2	target of AVR _B operation1	< 1E-200	72.4

Podobně jako u předchozího lokusu, nejvíce asociovaný SNP markery ($-\log_{10}P = 7,71$ a $-\log_{10}P = 7,73$) se nacházejí ve dvou genech *Bo7g107550.1* (*Homeobox-leucine zipper family lipid-binding START domain*) resp. *Bo7g107580.1* (*tobamovirus multiplication*). Tři kandidátní geny pro tento rezistentní lokus se na základě analýz nacházejí v těsné blízkosti genů s těmito SNP markery. Konkrétně se jedná o tyto geny: *Bo7g107710.1* (*Disease resistance TIR-NBS-LRR class family*), *Bo7g107730.1* (*Disease resistance TIR-NBS-LRR class family*) a *Bo7g107740.1* (*target of AVR_B operation1*). Samotné

kandidátní geny SNP neobsahují. Grafické znázornění tohoto lokusu s vyznačenými geny se nachází na obr. 20.

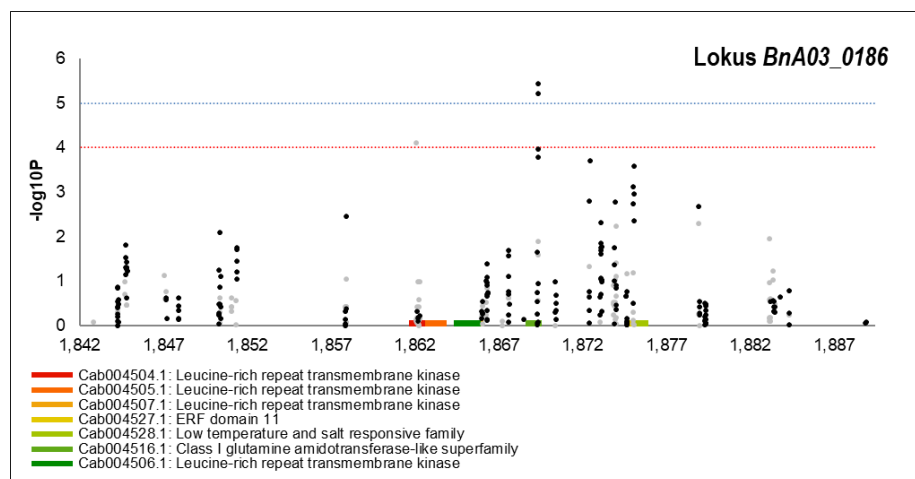


Obr. 20: Manhattan plot SNP asociační analýzy pro lokus *BnC07_0421*

Dalším silně asociovaným lokusem na chromozomu A03 je *BnA03_0186* zahrnující oblast 18 415k až 18 890k bází. Celkem tato oblast zahrnuje přibližně 475k bází (tab. 14). Centrálnější oblast dána vymezením 100k od sSNP zahrnuje celkem oblast se 49 geny, z nichž dva obsahují významně asociované SNP markery ($-\log_{10}P = 5,44$ a $\log_{10}P = 4,11$). V prvním případě se jedná o gen *Cab004517.1* (*plastid developmental DAG*). Ve druhém případě jde o gen *Cab004504.1* (*Leucine-rich repeat transmembrane kinase*). Jako kandidátní geny na základě analýz bylo vybráno z tohoto lokusu 7 genů: *Cab004504.1* (*Leucine-rich repeat transmembrane kinase*), *Cab004505.1* (*Leucine-rich repeat transmembrane kinase*), *Cab004506.1* (*Leucine-rich repeat transmembrane kinase*), *Cab004507.1* (*Leucine-rich repeat transmembrane kinase*), *Cab004516.1* (*Class I glutamine amidotransferase-like superfamily*), *Cab004527.1* (*ERF domain 11*) a *Cab004528.1* (*Low temperature and salt responsive family*). Manhattan plot lokusu *BnA03_0186* s kandidátními geny se nachází obr. 21.

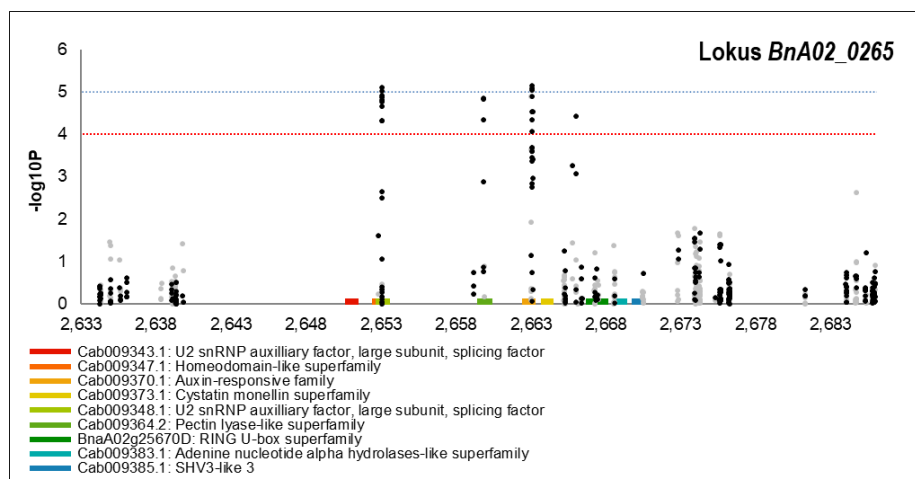
Tab. 14: Úsek chromozomu A03 s lokusem *BnA03_0186*

bn_gen	snp	at_gen	at_popis	e-value	sim
Cab004490.1		AT4G17730.1	syntaxin of plants 23	8.7E-01	87.0
Cab004491.1		AT3G14440.1	nine-cis-epoxycarotenoid dioxygenase 3	< 1E-200	72.8
Cab004492.1		AT1G80530.1	Major facilitator superfamily	4.1E-01	83.0
Cab004493.1		AT3G14450.1	CTC-interacting domain 10	5.5E-61	84.8
Cab004494.1		AT3G32030.1	Terpenoid cyclases prenyltransferases superfamily	1.8E-102	76.1
Cab004495.1		AT3G29430.1	Terpenoid synthases superfamily	< 1E-200	80.6
Cab004496.1		AT3G14490.1	Terpenoid cyclases prenyltransferases superfamily	1.4E-137	76.7
Cab004497.1		AT3G14595.1	Ribosomal L18ae family	4.4E-28	80.5
Cab004498.1	2.47	AT3G14600.1	Ribosomal L18ae LX family	6.8E-133	84.0
Cab004500.1		AT3G14630.1	cytochrome P450, family 72, subfamily A, polypeptide 13	3.3E-153	81.3
Cab004501.1		AT3G14660.2	cytochrome P450, family 72, subfamily A, polypeptide 13	4.5E-67	82.5
Cab004502.3		AT3G14660.3	cytochrome P450, family 72, subfamily A, polypeptide 13	< 1E-200	83.6
Cab004503.1		AT3G14810.1	Mechanosensitive ion channel family	< 1E-200	71.6
Cab004504.1	4.11	AT3G14840.2	Leucine-rich repeat transmembrane kinase	3.0E-159	74.1
Cab004505.1		AT3G14840.2	Leucine-rich repeat transmembrane kinase	2.0E-154	72.5
Cab004506.1		AT3G14840.2	Leucine-rich repeat transmembrane kinase	2.5E-155	72.9
Cab004507.1		AT3G14840.2	Leucine-rich repeat transmembrane kinase	3.1E-62	79.0
Cab004508.1	0.55	AT3G14850.1	RAB geranylgeranyl transferase beta subunit 2	3.2E-95	83.9
Cab004509.2	1.39	AT3G14860.1	NHL domain-containing	< 1E-200	81.4
Cab004510.3	0.10	AT3G14890.2	phosphoesterase	8.5E-67	79.0
Cab004511.1	1.70	AT3G14920.1	Peptide-N4-(N-acetyl-beta-glucosaminyl)asparagine amidase A	< 1E-200	71.5
Cab004512.1		AT3G14930.3	Uroporphyrinogen decarboxylase	2.7E-56	87.0
Cab004513.2		AT3G14940.2	phosphoenolpyruvate carboxylase 1	1.1E-152	84.9
Cab004514.1	0.14	AT3G14940.2	phosphoenolpyruvate carboxylase 1	< 1E-200	80.8
Cab004515.1		AT3G14960.1	Galactosyltransferase family	2.6E-84	75.8
Cab004516.1		AT3G14990.2	Class I glutamine amidotransferase-like superfamily	3.6E-64	83.6
Cab004517.1	5.44	AT3G15000.1	plastid developmental DAG	< 1E-200	74.3
Cab004518.2	0.98	AT3G15030.1	TCP family transcription factor 4	< 1E-200	75.6
Cab004519.1		AT3G15040.1	senescence regulator (Protein of unknown function, DUF584)	< 1E-200	84.0
Cab004520.3		AT3G15070.2	RING U-box superfamily	2.5E-45	84.2
BnaA03g33720D		AT3G15080.1	Polynucleotidyl transferase, ribonuclease H-like superfamily	8.0E-19	86.0
Cab004521.1	3.70	AT3G15090.1	like zinc-binding alcohol dehydrogenase family	1.5E-67	91.0
Cab004522.1	2.32	AT3G15120.1	P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily	< 1E-200	80.4
Cab004523.1		AT3G15130.1	Pentatricopeptide repeat (PPR) superfamily	< 1E-200	75.0
Cab004524.1	2.79	AT3G15160.2	AP-5 complex subunit zeta-1	5.1E-76	91.0
Cab004525.1		AT3G15170.1	NAC domain transcriptional regulator superfamily	2.7E-115	76.5
Cab004526.1	1.17	AT3G15190.1	Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily	3.2E-112	79.0
Cab004527.1	3.58	AT3G15210.1	ERF domain 11	< 1E-200	75.5
Cab004528.1		AT3G05890.1	Low temperature and salt responsive family	3.9E-01	88.0
Cab004529.1		AT3G15260.2	phosphatase 2C family	1.6E-98	75.9
Cab004530.1		AT3G15340.1	proton pump interactor 2	1.4E-138	75.3
Cab004531.1		AT3G15355.1	Ubiquitin-conjugating enzyme family	5.3E-100	76.7
BnaA03g33830D		AT3G27060.1	EXS (ERD1 XPR1 SYG1) family	5.7E-96	81.8
Cab004532.1		AT3G15360.1	Thioredoxin superfamily	3.7E-117	73.0
Cab004533.1		AT4G17070.1	histone deacetylase complex subunit	5.6E-02	89.4
BnaA03g33860D		AT5G28810.1	Ulp1 protease family	2.2E-07	64.8
Cab004534.1		AT3G15370.2	expansin 12	4.0E-167	73.0
Cab004535.1	2.68	AT3G15380.1	interacting from malus	< 1E-200	88.3
Cab004536.1	0.50	AT3G15460.1	Ribosomal RNA processing Brix domain	3.4E-94	80.0



Obr. 21: Manhattan plot SNP asociační analýzy pro lokus *BnA03_0186*

Další odhalený lokus *BnA02_0265* se nachází na chromozomu A02 v pozici mezi 26 329k a 26 859k. Jeho celková velikost je přibližně 530k bází. Oblast rezistentního lokusu vymezená hranicí 100k od sSNP nebo pSNP zahrnuje celkem 70 genů (tab. 15). Nejvýznamnější asociace SNP markeru byla odhalena u třech genů: *Cab009348.1* ($-\log_{10}P = 5,11$ – *Tryptophan RNA-binding attenuator*), *Cab009371.1* ($-\log_{10}P = 5.14$ – *Mo25 family*), *Cab009364.2* ($-\log_{10}P = 4.85$ – *Pectin lyase-like superfamily*) a *Cab009377.1* ($-\log_{10}P = 4.42$ – *nuclear factor Y, subunit B10*). Po provedení příslušných analýz bylo z toho lokusu vybráno devět kandidátních genů, dva již zmíněné s významnou asociací *Cab009348.1* a *Cab009364.2* a dále *Cab009343.1* (*U2 snRNP auxiliary factor, large subunit, splicing factor*), *Cab009347.1* (*Homeodomain-like superfamily*), *Cab009370.1* (*Auxin-responsive family*), *Cab009373.1* (*Cystatin monellin superfamily*), *BnaA02g25670D* (*RING U-box superfamily*), *Cab009383.1* (*Adenine nucleotide alpha hydrolases-like superfamily*) a *Cab009385.1* (*SHV3-like 3*) (obr. 22).

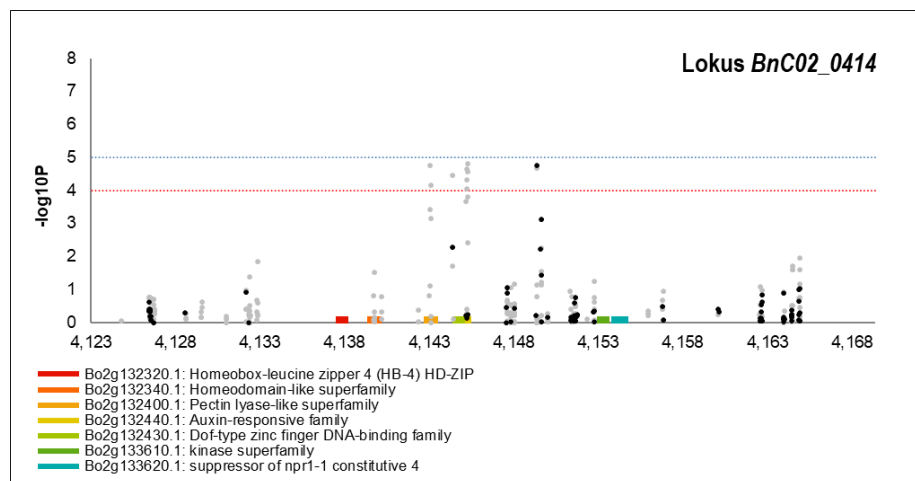


Obr. 22: Manhattan plot SNP asociační analýzy pro lokus *BnA02_0265*

Tab. 15: Úsek chromozomu A02 s lokusem *BnA02_0265*

bn_gen	snp	at_gen	at_popis	e-value	sim
Cab009331.1		AT4G11610.2	C2 calcium lipid-binding plant phosphoribosyltransferase family	5.6E-102	78.5
Cab009332.1		AT1G02130.1	RAS 5	2.2E-22	82.0
Cab009333.1		AT5G47340.1	alpha beta-Hydrolases superfamily	5.4E-30	82.0
Cab009334.1		AT1G16560.4	Per1-like family	3.0E-03	86.0
BnaA02g25260D		AT5G64920.1	GDSL-like Lipase Acylhydrolase superfamily	8.0E-02	89.7
Cab009335.1		AT2G11623.2	small and basic intrinsic 1A	2.3E-05	81.5
Cab009336.1		AT1G62800.3	aspartate aminotransferase 4	6.4E-01	89.0
Cab009337.1		AT5G59050.4	G patch domain	8.8E-04	86.6
Cab009338.1		AT2G01560.1	Plant protein 1589 of unknown function	9.2E-05	72.0
Cab009339.1		AT2G01560.1	Plant protein 1589 of unknown function	6.1E-07	74.0
Cab009340.1		AT1G57730.1	RING U-box superfamily	8.9E-14	72.3
Cab009341.1		AT1G52130.1	Mannose-binding lectin superfamily	6.6E-01	81.0
Cab009342.1		AT2G41430.3	dehydration-induced (ERD15)	8.7E-39	81.5
Cab009343.1		AT4G36690.4	U2 snRNP auxiliary factor, large subunit, splicing factor	1.3E-45	88.2
Cab009345.1		AT4G33160.1	U2 snRNP auxiliary factor, large subunit, splicing factor	3.8E-113	78.4
Cab009346.1		AT5G59020.1	hepatocyte growth factor activator, (DUF3527)	2.4E-168	75.0
Cab009347.1	1.62	AT5G47390.1	Homeodomain-like superfamily	< 1E-200	74.9
Cab009348.1	5.11	AT5G47420.1	Tryptophan RNA-binding attenuator	2.9E-58	84.0
Cab009349.1		AT4G34880.1	Amidase family	6.8E-127	85.3
Cab009350.1		AT2G22920.1	serine carboxypeptidase-like 12	7.4E-02	88.5
Cab009351.1		AT1G35530.4	DEAD DEAH box RNA helicase family	6.3E-03	88.2
Cab009352.1		AT4G34880.2	Amidase family	1.0E-148	81.7
Cab009354.1		AT5G36200.1	F-box and associated interaction domains-containing	1.2E-72	66.4
BnaA02g25420D		AT1G77390.1	cation exchanger 4	1.8E-02	90.7
BnaA02g25430D		AT3G05220.2	Heavy metal transport detoxification superfamily	9.6E-02	89.7
Cab009355.1		AT1G77390.1	cation exchanger 4	1.3E-02	90.7
Cab009356.1		AT1G77390.1	CYCLIN A1 B2	1.9E-02	92.0
Cab009357.1		AT5G47450.1	Aquaporin-like superfamily	4.4E-136	73.2
Cab009358.1		AT5G47450.1	plasma membrane intrinsic 3	1.4E-76	78.7
Cab009360.1		AT5G47450.1	plasma membrane intrinsic 3	1.4E-76	78.7
Cab009361.1	0.74	AT5G47455.9	hypothetical protein	4.4E-47	85.6
Cab009362.1		AT5G47460.1	Pentatricopeptide repeat (PPR) superfamily	< 1E-200	76.3
BnaA02g25470D		AT5G47470.2	DNA primase	5.5E-26	83.2
Cab009363.1		AT5G47470.1	Nodulin 21 -like transporter family	8.2E-70	81.1
Cab009364.2	4.86	AT5G47500.1	Pectin lyase-like superfamily	4.5E-88	73.4
Cab009365.1		AT2G01490.2	phytanoyl - dioxygenase family	2.6E-01	88.1
Cab009366.1		AT5G47520.1	Rab GTPase-like A5A	9.2E-154	73.3
Cab009367.1		AT4G36040.1	phosphatidylinositol-specific phospholipase C8	5.8E-01	84.8
Cab009368.1		AT5G58960.3	glucose-6-phosphate isomerase, (DUF641)	1.5E-02	85.9
Cab009369.1		AT5G44280.2	RING 1A	4.9E-05	67.0
Cab009370.1		AT5G47530.1	Auxin-responsive family	< 1E-200	75.8
Cab009371.1	5.15	AT5G47540.1	Mo25 family	9.9E-73	77.3
Cab009372.1		AT3G22750.1	kinase superfamily	2.7E-35	81.3
Cab009373.1		AT5G47550.1	Cystatin monellin superfamily	4.1E-66	74.0
Cab009374.1		AT5G47560.1	carotenoid isomerase	< 1E-200	82.3
Cab009375.3	1.25	AT5G47620.3	RNA-binding (RRM RBD RNP motifs) family	< 1E-200	79.3
Cab009376.1	3.26	AT5G47630.2	mitochondrial acyl carrier 3	1.1E-59	78.6
Cab009377.1	4.42	AT5G47640.1	nuclear factor Y, subunit B10	< 1E-200	78.8
Cab009378.1	0.01	AT5G47650.3	nudix hydrolase homolog 2	4.8E-67	82.0
Cab009379.1	0.87	AT3G05340.1	nuclear factor Y, subunit B6	< 1E-200	76.8
Cab009380.1	1.20	AT5G47690.1	Calcium-dependent lipid-binding (domain) family	2.3E-131	86.4
BnaA02g25650D		AT5G27850.2	SUGAR-INSENSITIVE 3	4.0E-03	79.4
BnaA02g25660D		AT4G28890.1	kinase with adenine nucleotide alpha hydrolases-like domain	3.2E-03	87.2
BnaA02g25670D		AT4G23440.2	RING U-box superfamily	2.7E-127	84.2
Cab009381.1		AT5G47720.5	Thiolase family	4.0E-39	83.3
Cab009382.1	1.37	AT5G47730.4	Sec14p-like phosphatidylinositol transfer family	1.1E-94	84.3
Cab009383.1		AT5G47750.1	Adenine nucleotide alpha hydrolases-like superfamily	1.3E-150	76.1
Cab009385.1		AT3G20520.1	SHV3-like 3	4.7E-54	74.0
Cab009386.1	0.72	AT5G47770.1	farnesyl diphosphate synthase 2	6.1E-79	88.0
Cab009387.1		AT5G52410.2	oxidoreductase transition metal ion-binding	6.2E-01	93.8
Cab009388.1	1.69	AT5G25410.1	transmembrane (DUF239)	7.1E-50	72.1
Cab009389.1		AT5G59810.1	Subtilase family	1.3E-77	72.1
Cab009390.1	1.78	AT5G47780.1	galacturonosyltransferase 3	< 1E-200	70.0
Cab009391.1	1.67	AT2G01060.2	Homeodomain-like superfamily	4.8E-167	81.5
Cab009392.1		AT2G01070.2	Lung seven transmembrane receptor family	2.9E-60	81.3
Cab009393.1		AT2G01080.1	Late embryogenesis abundant (LEA) family	2.3E-143	82.7
Cab009394.1		AT2G01090.4	Ubiquinol-cytochrome C reductase hinge	1.8E-39	86.3
Cab009395.1	0.16	AT2G01100.3	FAM133-like protein	< 1E-200	80.0
Cab009396.1	1.65	AT2G01110.1	Sec-independent periplasmic translocase	6.1E-115	91.0
Cab009397.1		AT2G01120.2	origin recognition complex subunit 4	1.9E-53	91.0

Pravděpodobný stínový lokus pro právě popsaný *A02_0265* je rezistentní lokus *C2_0414*, který obsahuje velice podobnou homoelogní oblast v chromozomu C02 pocházející z *B. oleracea*. Tato oblast hraničními parametry lokalizována na C02 od 41 230k do 41 694k s celkovou velikostí 463k bází. Jeho středová oblast dána hraniční vzdáleností 100k od sSNP/pSNP obsahuje celkem 42 genů (tab. 16). Tento rezistentní lokus zahrnuje nějak silně asociovaných SNP markerů v těchto genech: *Bo2g132400.1* ($-\log_{10}P = 4.76$ – *Pectin lyase-like superfamily*), *Bo2g132420.1* ($-\log_{10}P = 4.44$ – *Rab GTPase-like A5A*), *Bo2g132450.1* ($-\log_{10}P = 4.81$ – *Mo25 family*) a *Bo2g133520.1* ($-\log_{10}P = 4.75$ – *mitochondrial acyl carrier3*). Kromě již zmíněného genu *Bo2g132400.1* bylo navrženo dalších šest kandidátních genů pro tuto oblast. Tyto geny jsou následující: *Bo2g132320.1* (*Homeobox-leucine zipper 4 (HB-4) HD-ZIP*), *Bo2g132340.1* (*Homeodomain-like superfamily*), *Bo2g132430.1* (*Dof-type zinc finger DNA-binding family*), *Bo2g132440.1* (*Auxin-responsive family*), *Bo2g133610.1* (*kinase superfamily*) a *Bo2g133620.1* (*suppressor of npr1-1 constitutive 4*) (obr. 23).

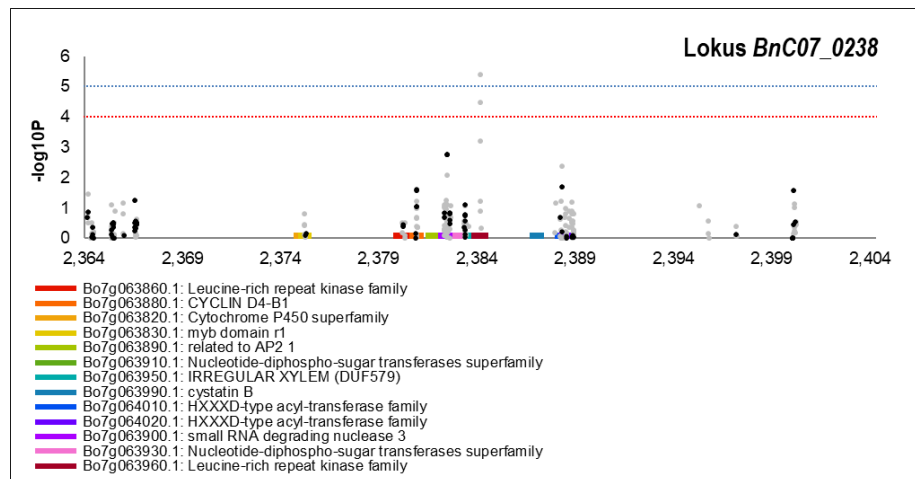


Obr. 23: Manhattan plot SNP asociační analýzy pro lokus *C02_0414*

Tab. 16: Úsek chromozomu C02 s lokusem *BnC02_0414*

bn_gen	snp	at_gen	at_popis	e-value	sim
Bo2g132280.1		AT5G47380.2	electron transporter, putative (Protein of unknown function, DUF547)	5.1E-07	77.0
Bo2g132290.1		AT2G01560.1	Plant protein 1589 of unknown function	1.1E-04	72.0
Bo2g132300.1		AT1G57730.1	RING U-box superfamily	1.4E-17	67.0
Bo2g132310.1		AT2G01560.1	kinase superfamily	3.3E-02	88.0
Bo2g132320.1		AT5G47370.1	Homeobox-leucine zipper 4 (HB-4) HD-ZIP	6.3E-67	80.0
Bo2g132330.1		AT1G48970.2	YDG SRA domain-containing	2.5E-04	84.4
Bo2g132340.1	1.52	AT5G47390.1	Homeodomain-like superfamily	2.7E-158	74.1
Bo2g132350.1	0.77	AT4G34880.2	Amidase family	8.4E-147	79.3
Bo2g132360.1		AT5G47450.1	Aquaporin-like superfamily	3.2E-131	73.9
Bo2g132370.1	0.38	AT5G47455.9	hypothetical protein	4.7E-47	85.6
Bo2g132380.1		AT5G47460.1	Pentatricopeptide repeat (PPR-like) superfamily	< 1E-200	77.5
Bo2g132390.1		AT5G47470.2	Nodulin 21 -like transporter family	5.6E-79	74.7
Bo2g132400.1	4.76	AT5G47500.1	Pectin lyase-like superfamily	1.3E-86	73.7
Bo2g132410.1		AT5G47510.4	Sec14p-like phosphatidylinositol transfer family	2.3E-25	91.2
Bo2g132420.1	4.44	AT5G47520.1	Rab GTPase-like A5A	2.8E-135	74.3
Bo2g132430.1		AT2G33830.1	Dof-type zinc finger DNA-binding family	2.3E-03	93.2
Bo2g132440.1		AT5G47530.1	Auxin-responsive family	< 1E-200	76.7
Bo2g132450.1	4.82	AT5G47540.1	Mo25 family	7.6E-53	77.8
Bo2g132460.1		AT2G13770.1	nuclease	7.5E-12	71.0
Bo2g132470.1		AT5G47550.1	Cystatin monellin superfamily	2.3E-59	73.0
Bo2g132480.1		AT5G47560.1	tonoplast dicarboxylate transporter	< 1E-200	86.0
Bo2g133480.1		AT5G47560.1	tonoplast dicarboxylate transporter	4.3E-150	86.0
Bo2g133490.1	1.05	AT5G47570.1	NADH dehydrogenase ubiquinone 1 beta subcomplex subunit	9.0E-50	92.0
Bo2g133500.1	1.06	AT5G47610.1	RING U-box superfamily	3.1E-139	73.7
Bo2g133510.1	1.16	AT5G47620.3	RNA-binding (RRM RBD RNP motifs) family	< 1E-200	77.7
Bo2g133520.1	4.75	AT5G47630.2	mitochondrial acyl carrier 3	2.6E-57	80.8
Bo2g133530.1	3.13	AT5G47640.1	nuclear factor Y, subunit B10	< 1E-200	78.0
Bo2g133540.1		AT5G47650.3	nudix hydrolase homolog 2	6.4E-65	81.0
Bo2g133550.1	0.26	AT5G47660.1	nuclear factor Y, subunit B6	< 1E-200	76.6
Bo2g133560.1		AT5G03870.1	Tudor PWWP MBT domain-containing	4.3E-02	84.6
Bo2g133570.1	0.94	AT5G47690.1	transcriptional regulator	2.6E-129	78.4
Bo2g133580.1	0.10	AT5G47710.4	Calcium-dependent lipid-binding (domain) family	7.5E-111	87.5
Bo2g133590.1	1.25	AT5G47730.4	Sec14p-like phosphatidylinositol transfer family	7.9E-97	83.7
Bo2g133600.1		AT5G47740.2	Adenine nucleotide alpha hydrolases-like superfamily	5.0E-83	86.0
Bo2g133610.1		AT5G47750.1	kinase superfamily	< 1E-200	70.7
Bo2g133620.1		AT3G20520.1	suppressor of npr1-1 constitutive 4	2.9E-149	70.4
Bo2g133630.1		AT2G01110.1	Sec-independent periplasmic translocase	2.7E-98	90.0
Bo2g133640.1	0.34	AT2G01100.3	FAM133-like protein	8.3E-153	82.0
Bo2g133650.1	0.93	AT5G47770.1	farnesyl diphosphate synthase 2	6.3E-79	88.0
Bo2g133660.1		AT5G41220.3	glutathione S-transferase THETA 3	4.1E-07	73.0
Bo2g133670.1		AT3G47680.1	glutathione S-transferase THETA 3	1.6E-16	80.0
Bo2g133680.1		AT5G35490.1	mto 1 responding up 1	3.2E-10	74.0

Poslední rezistentní lokus obsahující sSNP marker se nachází na chromozomu C07. Tato rezistentní oblast *BnC7_0238* je vymezena od 23 636k do 24 039k bází. Celkem její velikost dosahuje 403k bází a v oblasti vymezené 100k obsahuje 26 genů (tab. 17). V tomto lokusu se nachází silně asociovaný SNP ($-\log_{10}P = 5,41$) v genu *Bo7g063960.1* (*Leucine-rich repeat kinase family*). Tento samotný gen je vyhodnocen jako kandidátní. V jeho okolí se ale vyskytuje mnoho dalších genů, které byly označeny také jako kandidátní pro vliv na toleranci/citlivost k nádorovitosti. Celkem bylo v tomto lokusu nalezeno následujících 15 kandidátních genů: *Bo7g063820.1* (*Cytochrome P450 superfamily*), *Bo7g063830.1* (*myb domain r1*), *Bo7g063860.1* (*Leucine-rich repeat kinase family*), *Bo7g063880.1* (*CYCLIN D4 B1*), *Bo7g063890.1* (*prohibitin 3*), *Bo7g063900.1* (*small RNA degrading nuclease 3*), *Bo7g063910.1* (*Nucleotide-diphospho-sugar transferases superfamily*), *Bo7g063930.1* (*Nucleotide-diphospho-sugar transferases superfamily*), *Bo7g063950.1* (*IRREGULAR XYLEM*), *Bo7g063980.1* (*related to AP2*), *Bo7g063990.1* (*cystatin B*), *Bo7g064000.1* (*target of early activation tagged 3*) a *Bo7g064010.1* (*HXXXD-type acyl-transferase family*). Lokalizace zmíněných genů v tomto lokusu je zobrazena na obr. 24.



Obr. 24: Manhattan plot SNP asociační analýzy pro lokus *BnC07_0238*

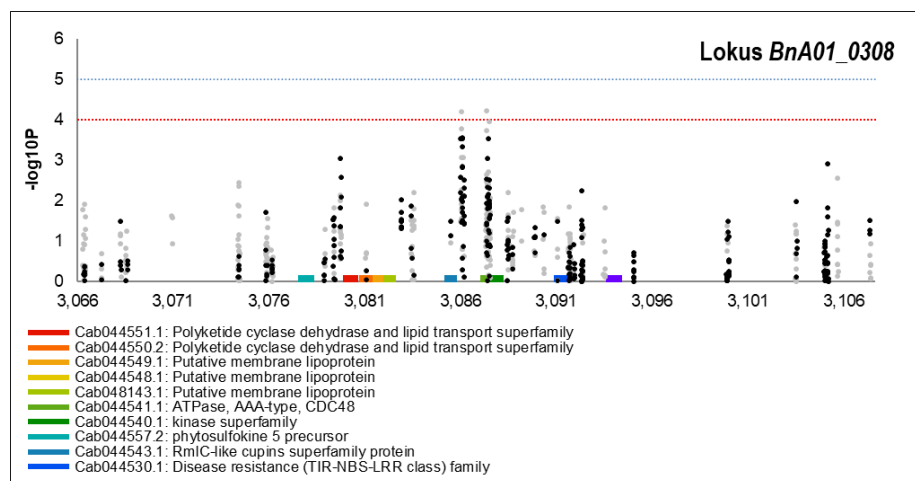
Tab. 17: Úsek chromozomu C07 s lokusem *BnC07_0238*

bn_gen	snp	at_gen	at_popis	e-value	sim
Bo7g063820.1		AT5G67310.1	Cytochrome P450 superfamily	3.6E-177	69.0
Bo7g063830.1	0.82	AT5G67300.1	myb domain r1	< 1E-200	76.5
BnaC07g16040D		AT1G06210.2	alanine-2-oxoglutarate aminotransferase 2	1.6E-02	88.3
Bo7g063840.1					
Bo7g063850.1		AT1G06210.2	alanine-2-oxoglutarate aminotransferase 2	6.0E-03	86.4
BnaC07g16050D		AT5G25850.1	BRCT domain-containing DNA repair	5.4E-01	86.4
Bo7g063860.1	0.52	AT5G67280.1	Leucine-rich repeat kinase family	< 1E-200	78.8
Bo7g063870.1		AT5G67265.1	CYCLIN D3 B2	2.5E-55	81.5
Bo7g063880.1	1.61	AT5G67260.2	CYCLIN D4 B1	5.8E-115	79.3
Bo7g063890.1		AT5G40770.1	prohibitin 3	8.5E-02	88.3
Bo7g063900.1	2.78	AT5G67250.1	small RNA degrading nuclease 3	< 1E-200	76.5
Bo7g063910.1		AT5G67230.1	Nucleotide-diphospho-sugar transferases superfamily	3.6E-67	76.5
Bo7g063920.1		AT5G67240.4	small RNA degrading nuclease 3	6.8E-39	74.3
Bo7g063930.1		AT5G67230.1	Nucleotide-diphospho-sugar transferases superfamily	< 1E-200	75.0
Bo7g063940.1	1.10	AT5G67220.1	FMN-linked oxidoreductases superfamily	< 1E-200	89.0
Bo7g063950.1	0.39	AT5G67210.1	IRREGULAR XYLEM (DUF579)	< 1E-200	79.7
Bo7g063960.1	5.41	AT5G67200.1	Leucine-rich repeat kinase family	< 1E-200	74.4
Bo7g063970.1		AT1G76500.1	T-complex 11	1.2E-62	80.7
Bo7g063980.1		AT5G67190.1	related to AP2 1	< 1E-200	76.8
Bo7g063990.1		AT3G12490.1	cystatin B	1.3E-41	81.2
Bo7g064000.1	1.15	AT5G67180.4	target of early activation tagged (EAT) 3	2.2E-78	78.2
Bo7g064010.1	2.37	AT5G67160.1	HXXXD-type acyl-transferase family	< 1E-200	65.5
Bo7g064020.1	1.00	AT5G67150.1	HXXXD-type acyl-transferase family	< 1E-200	69.0
Bo7g064030.1	0.91	AT5G67140.1	F-box RNI-like superfamily	1.7E-83	91.0
Bo7g064040.1	1.20	AT5G67130.1	PLC-like phosphodiesterases superfamily	8.9E-115	75.6
Bo7g064050.1		AT1G48470.1	glutamine synthetase	9.9E-02	89.0

Jediný potencióálně rezistentní lokus *BnA01_0308* na chromozomu A01 se nachází mezi 30 658k a 31 075k s celkovou délkou 417k bází. Jeho vnitřní oblast vymezená 100k hranicemi zahrnuje 50 genů (tab. 17), z nichž dva obsahují pSNP markery: *Cab044542.1* ($-\log_{10}P = 4.20$ – *aspartate glutamate uridylylate kinase family*), *Cab044541.1* ($-\log_{10}P = 4.21$ – *ATPase, AAA-type, CDC48*). Druhý ze zmíněných genů je jeden z 11 kandidátních genů pro tento lokus. Zbývající kandidáti jsou následující: *Cab044557.2* (*phytosulfokine 5 precursor*), *Cab044551.1* (*Polyketide cyclase dehydrase and lipid transport superfamily*), *Cab044550.2* (*Polyketide cyclase dehydrase and lipid transport superfamily*), *Cab044549.1* (*membrane lipo*), *Cab044548.1* (*membrane lipo*), *Cab048143.1* (*membrane lipo*), *Cab044543.1* (*like cupins superfamily*), *Cab044540.1* (*kinase superfamily*), *Cab044530.1* (*Disease resistance TIR-NBS-LRR class family*) a *Cab044523.1* (*exocyst subunit exo70 family H7*). Vizualizace asociace SNP markerů a znázornění polohy kandidátních genů lze vidět obr. 25.

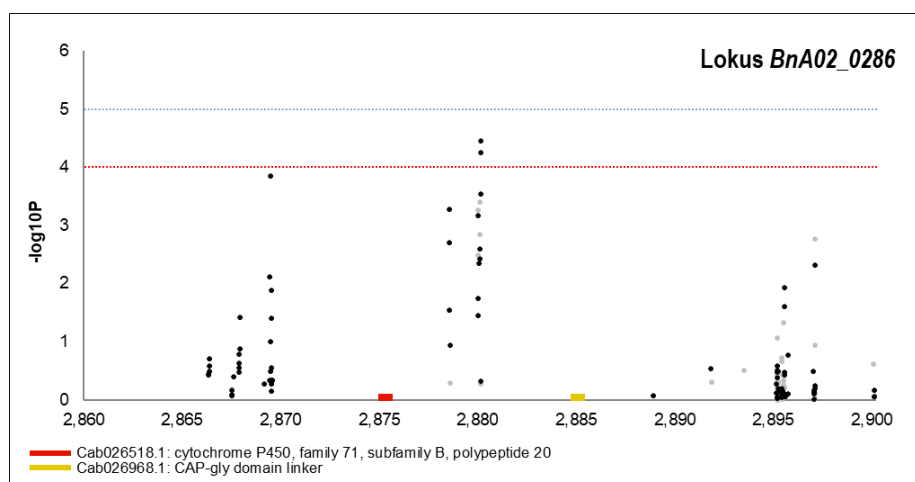
Tab. 18: Úsek chromozomu A01 s lokusem *BnaA01_0308*

bn_gen	snp	at_gen	at_popis	e-value	sim
BnaA01g31820D	1.71	AT3G10370.1	TATA box-binding associated factor RNA polymerase I subunit B	2.4E-157	80.2
Cab044559.2	0.77	AT5G47590.2	Heat shock HSP20 alpha crystallin family	5.4E-77	80.5
Cab044558.1		AT4G17530.1	RAB GTPase homolog 1C	3.7E-43	80.7
Cab044557.2		AT5G65870.1	phytosulfokine 5 precursor	3.2E-01	82.5
Cab044556.1		AT5G02490.1	Heat shock 70 (Hsp 70) family	7.7E-121	78.1
Cab044555.1	1.29	AT3G10300.4	Calcium-binding EF-hand family	1.0E-95	71.1
BnaA01g31870D		AT3G10700.3	Heat shock 70 (Hsp 70) family	2.8E-91	80.8
Cab044554.1		AT3G10290.1	Nucleotide-sugar transporter family	5.4E-161	75.0
Cab044553.2	1.82	AT3G10260.3	Reticulon family	9.0E-55	78.4
Cab044552.1	3.03	AT3G10250.3	histidine-tRNA ligase	8.1E-147	80.5
Cab044551.1		AT4G23680.1	Polyketide cyclase dehydrase and lipid transport superfamily	5.0E-73	78.5
Cab044550.2	1.90	AT4G23680.1	Polyketide cyclase dehydrase and lipid transport superfamily	3.4E-81	80.3
BnaA01g31920D		AT3G10220.1	tubulin folding cofactor B	3.8E-36	88.0
Cab044549.1		AT3G10195.1	membrane lipo	5.3E-07	69.0
Cab044548.1		AT3G10195.1	membrane lipo	4.3E-08	86.0
Cab048143.1		AT3G10195.1	membrane lipo	4.9E-09	84.0
Cab044547.1	2.01	AT3G10185.1	Gibberellin-regulated family	4.1E-84	79.7
Cab044546.2	2.20	AT3G10160.1	DHFS-FPGS homolog D	1.8E-96	83.2
Cab044545.1		AT3G10120.1	SOUL heme-binding family	2.9E-171	79.0
Cab044544.1		AT2G21070.1	methyltransferase	5.5E-03	93.0
Cab044543.1	1.48	AT3G10080.2	like cupins superfamily	< 1E-200	82.0
BnaA01g31990D		AT3G10070.1	TBP-associated factor 12	3.3E-128	79.0
Cab044542.1	4.20	AT3G10050.1	aspartate glutamate uridylate kinase family	3.6E-92	84.3
BnaA01g32020D		AT1G77525.1	SCR-like 27	9.0E-19	81.7
Cab044541.1	4.21	AT3G09840.1	ATPase, AAA-type, CDC48	< 1E-200	76.9
Cab044540.1		AT3G09830.2	kinase superfamily	2.1E-155	74.0
Cab044539.1	2.19	AT3G09820.2	adenosine kinase 2	7.4E-66	88.6
Cab044538.1	1.70	AT3G09800.3	SNARE-like superfamily	1.1E-105	86.3
Cab044537.3	1.77	AT3G09770.2	RING U-box superfamily	6.3E-175	77.6
Cab044536.1					
Cab044535.1	1.32	AT3G09735.1	S1FA-like DNA-binding	8.5E-72	81.0
Cab044534.1		AT3G09730.3	POLAR LOCALIZATION DURING ASYMMETRIC DIVISION AND	6.9E-103	80.3
Cab044533.1	1.84	AT3G09720.2	P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily	2.2E-75	86.8
Cab044532.1		AT3G09710.2	IQ-domain 2	3.6E-107	79.1
Cab044531.1	1.55	AT3G09700.1	AT3G09700.1	2.4E-60	86.3
Cab044530.1		AT5G46450.3	Disease resistance (TIR-NBS-LRR class) family	< 1E-200	74.6
Cab044529.1	1.85	AT3G09690.2	alpha beta-Hydrolases superfamily	5.6E-93	78.4
Cab044528.1	0.92	AT3G09680.1	Ribosomal S12 S23 family	2.3E-56	90.5
Cab044527.1		AT3G09640.2	ascorbate peroxidase 1	4.2E-55	81.4
Cab044526.1	2.23	AT3G09630.2	Ribosomal L4 L1 family	< 1E-200	82.5
BnaA01g32190D		AT3G09600.9	Homeodomain-like superfamily	1.4E-16	70.5
Cab044525.1		AT3G09600.9	Homeodomain-like superfamily	1.0E-50	76.3
Cab044524.1	1.81	AT3G09560.3	Lipin family	< 1E-200	80.3
Cab044523.1		AT3G09520.1	exocyst subunit exo70 family H7	< 1E-200	70.5
Cab044522.1					
Cab048016.1					
Cab044521.1	0.71	AT3G09500.1	Ribosomal L29 family	1.4E-50	79.2
Cab044520.1		AT3G09410.3	Pectinacetyltransferase family	3.9E-77	81.7
Cab044519.1		AT3G09390.2	metallothionein 2A	4.1E-62	80.2
Cab044518.2		AT3G09370.2	myb domain 3r-3	4.3E-126	77.1



Obr. 25: Manhattan plot SNP asociační analýzy pro lokus *BnA01_0308*

Druhým potenciálně rezistentním lokusem na chromozomu A02 je *BnA02_0286*. Rozkládá se mezi 28 601k a 29 003k bázemi s celkovou velikostí 402k. Předpoklad asociace této oblasti s reakcí na nádorovitost vychází z přítomnosti silně asociovaného SNP markerů v genu *Cab026524.1* ($-\log_{10}P = 4.45$ – *cytochrome P450, family 71, subfamily B, polypeptide 4*). Celkový počet genů v užší oblasti 100k je 42, z nichž dva byly vybrány jako kandidátní (tab. 19). Jedná se o tyto dva geny: *Cab026518.1* (*cytochrome P450, family 71, subfamily B, polypeptide 20*) a *Cab026968.1* (*CAP-gly domain linker*). Lokalizace zmíněných genů v tomto lokusu je zobrazena na obr. 26.



Obr. 26: Manhattan plot SNP asociační analýzy pro lokus *BnA02_0286*

Tab. 19: Úsek chromozomu A02 s lokusem *BnA02_0286*

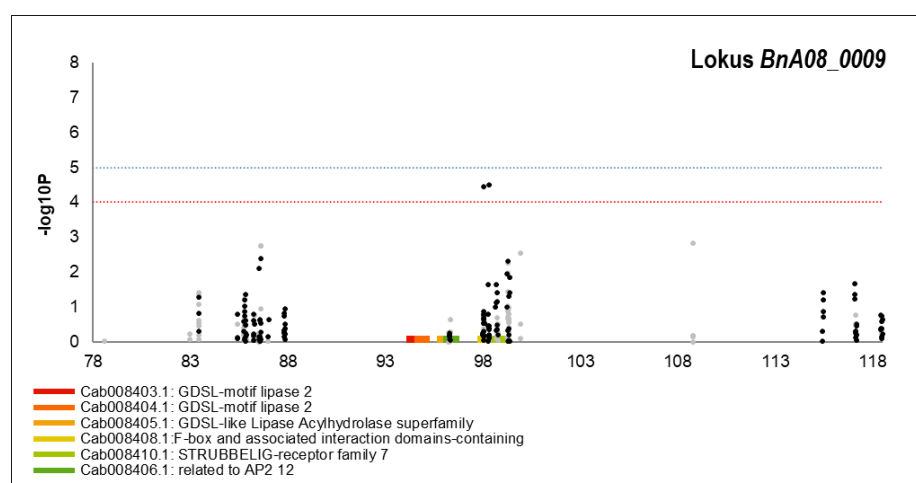
bn_gen	snp	at_gen	at_popis	e-value	sim
Cab026511.1		AT1G18340.1	basal transcription factor complex subunit	7.4E-65	81.0
Cab026512.1		AT3G26100.3	Regulator of chromosome condensation (RCC1) family	3.7E-179	84.0
Cab026513.1		AT3G26110.1	Anther-specific agp1	7.7E-50	72.0
BnaA02g27810D		AT3G26140.1	Cellulase (glycosyl hydrolase family 5)	3.5E-43	81.3
BnaA02g27820D		AT3G26140.1	Cellulase (glycosyl hydrolase family 5)	8.9E-168	78.7
Cab026514.1		AT3G26120.1	MEI2 5	1.8E-169	86.7
Cab026515.1		AT5G52540.1	keratin-associated , (DUF819)	1.2E-31	79.1
Cab026516.1		AT2G40410.1	Ca(2+)-dependent nuclease family	3.2E-11	84.0
Cab026517.1		AT3G47680.1	DNA binding	4.2E-27	67.0
Cab026518.1		AT3G26170.1	cytochrome P450, family 71, subfamily B, polypeptide 20	< 1E-200	78.2
BnaA02g27840D		AT3G18230.1	Octicosapeptide Phox Bem1p family	< 1E-200	77.0
Cab026519.1		AT1G64460.1	phosphatidylinositol 4-kinase gamma	1.0E-136	74.8
Cab026521.1	3.27	AT3G26200.1	cytochrome P450, family 71, subfamily B, polypeptide 22	< 1E-200	77.5
BnaA02g27870D		AT3G26210.1	cytochrome P450, family 71, subfamily B, polypeptide 28	< 1E-200	76.7
Cab026522.2		AT3G26210.1	cytochrome P450, family 71, subfamily B, polypeptide 28	< 1E-200	76.8
Cab026523.1		AT3G26220.1	cytochrome P450, family 71, subfamily B, polypeptide 4	< 1E-200	75.6
Cab026524.1	4.44	AT3G26280.1	cytochrome P450, family 71, subfamily B, polypeptide 4	< 1E-200	75.0
Cab026525.1					
Cab047928.1					
Cab047998.1					
Cab047507.1					
Cab026368.1					
Cab005677.1					
Cab026370.1					
Cab026369.1					
Cab026526.1		AT1G58120.1	SHI-related sequence 7	3.9E-92	76.8
Cab026527.1		AT3G26310.1	cytochrome P450, family 71, subfamily B, polypeptide 26	< 1E-200	79.1
Cab026528.1		AT1G78070.3	Transducin WD40 repeat-like superfamily	8.3E-15	88.0
Cab026529.1		AT5G57110.2	autoinhibited Ca2+ -ATPase, isoform 8	3.3E-42	78.1
Cab026530.1		AT3G26330.1	cytochrome P450, family 71, subfamily B, polypeptide 26	< 1E-200	77.9
BnaA02g28000D		AT5G62750.1	golgin family A	2.1E-01	87.8
Cab026968.1		AT1G58260.1	CAP-gly domain linker	< 1E-200	73.7
Cab016904.1		AT5G56510.6	pumilio 12	8.4E-01	90.8
Cab026967.1		AT5G56510.6	pumilio 12	2.0E-02	99.3
Cab026966.1		AT2G02580.1	cytochrome P450, family 71, subfamily B, polypeptide 26	< 1E-200	79.8
Cab026965.1		AT3G26350.2	proline-rich receptor-like kinase	< 1E-200	75.2
BnaA02g28050D		AT3G26410.1	tRNA modification 11	< 1E-200	90.0
Cab047802.1		AT3G26380.1	Melibiose family	3.0E-91	86.5
Cab026964.1		AT3G26380.1	Melibiose family	4.0E-91	86.8
Cab026963.2	0.08	AT3G26410.1	tRNA modification 11	< 1E-200	89.0
BnaA02g28070D		AT2G17980.1	Sec1 munc18-like (SM) s superfamily	9.7E-101	73.0
Cab026962.3		AT3G26500.1	plant intracellular ras group-related LRR 2	< 1E-200	74.3

Poslední potenciální oblast zahrnující kandidátní geny k nádorovitosti je lokus *BnA08_0009*. Nachází se na začátku chromozomu A08 od 777k do 1182k bází s přibližnou velikostí 405k bází (tab. 20). Tato oblast byla vybrána na základě dvou genů, které obsahují silně asociované SNP markery: *Cab008408.1* ($-\log_{10}P = 4.44$ – *F-box and associated interaction domains-containing*) a *Cab008409.1* ($-\log_{10}P = 4.50$ – *26S*

proteasome regulatory complex ATPase). První z těchto dvou zmíněných genů je spolu s pěti dalšími analyzován jako potenciálně kandidátní gen pro tento lokus. Další kandidátní geny jsou *Cab008403.1* (*GDSL-motif lipase 2*), *Cab008404.1* (*GDSL-motif lipase 2*), *Cab008405.1* (*GDSL-like Lipase Acylhydrolase superfamily*), *Cab008406.1* (*related to AP2 12*) a *Cab008410.1* (*STRUBBELIG-receptor family 7*). Vizualizace asociace SNP markerů a znázornění polohy kandidátních genů lze vidět obr. 27.

Tab. 20: Úsek chromozomu A08 s lokusem *BnA08_0009*

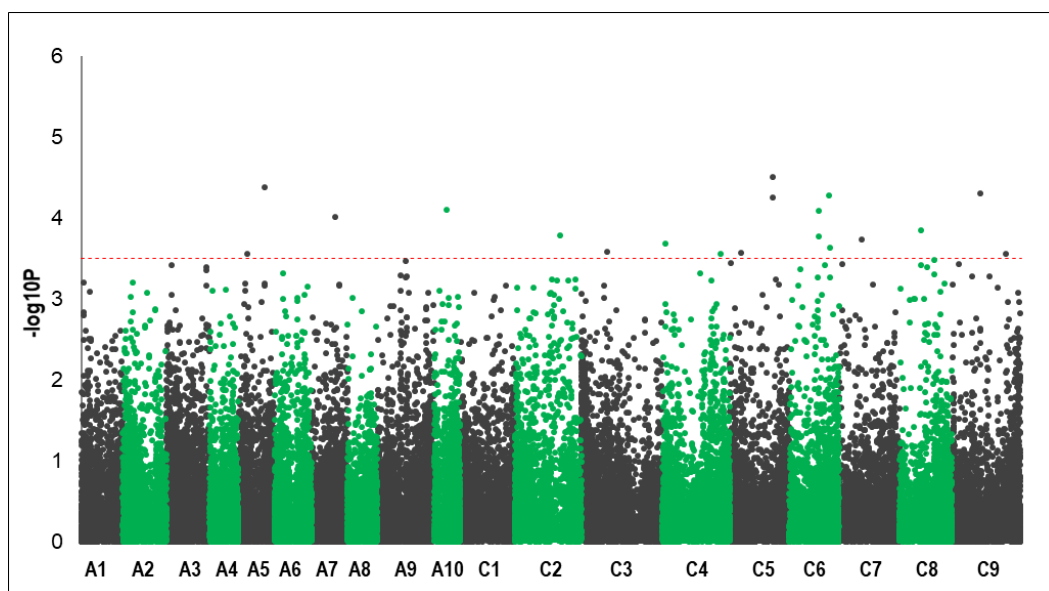
bn_gen	snp	at_gen	at_popis	e-value	sim
Cab008398.1		AT5G07930.2	phosphatase 2A subunit A3	9.9E-02	85.5
Cab008399.1		AT1G54010.1	GDSL-like Lipase Acylhydrolase superfamily	6.0E-139	75.9
Cab008400.1		AT1G54020.4	GDSL-like Lipase Acylhydrolase superfamily	5.4E-77	77.3
Cab008401.1					
Cab008402.1		AT1G54010.1	GDSL-like Lipase Acylhydrolase superfamily	1.6E-160	78.5
Cab008403.1		AT1G53940.1	GDSL-motif lipase 2	9.2E-99	76.2
Cab008404.1		AT1G53940.1	GDSL-motif lipase 2	1.9E-110	74.5
Cab008405.1		AT1G53920.1	GDSL-like Lipase Acylhydrolase superfamily	7.5E-91	76.0
Cab008406.1	0.64	AT1G53910.1	related to AP2 12		80.8
Cab008407.1		AT1G53903.1	linoleate 9S-lipoxygenase-4 , (DUF581)	7.4E-80	81.3
Cab008408.1	4.44	AT1G53850.1	F-box and associated interaction domains-containing	8.6E-40	85.4
Cab008409.1	4.50	AT1G53750.1	26S proteasome regulatory complex ATPase	5.7E-157	85.7
Cab008410.1	1.64	AT1G53730.1	STRUBBELIG-receptor family 7	3.0E-149	79.4
Cab008411.1	2.32	AT1G53710.2	Calcineurin-like metallo-phosphoesterase superfamily	5.9E-164	84.0
Cab008412.1	2.55	AT5G41010.1	DNA directed RNA polymerase, 7 kDa subunit	5.3E-38	91.0
Cab008413.1		AT3G58670.3	2-aminoethanethiol dioxygenase, (DUF1637)	5.6E-67	80.2
BnA08g01050D		AT1G53625.1	glycoside hydrolase family 28 polygalacturonase (pectinase) family	3.2E-44	78.7
BnA08g01060D		AT1G17680.1	tetratricopeptide repeat (TPR)-containing	3.8E-02	87.5
Cab008414.1		AT1G53625.1	hypothetical protein	3.8E-25	82.0
Cab008415.1		AT1G53620.1	proline-rich family	2.5E-21	78.2
Cab008416.1		AT5G06839.1	casein kinase I-like 3	4.5E-23	90.6
Cab008417.1		AT2G22440.1	non-LTR retroelement reverse transcriptase	4.7E-04	89.0



Obr. 27: Manhattan plot SNP asociční analýzy pro lokus *BnA08_0009*

5.3 GEM analýza

K provedení GEM (gene expression model) asociační analýzy modelů genové exprese byla použita data sekvencí genů a jejich předpokládaná míra exprese vygenerovaná z RNAseq dat pro každý genotyp. Genová exprese byla vyjádřena v hodnotách RPKM (reads per kb per million). Celkový počet vstupních genových sekvencích dosahoval 189 116, z nichž nenulová exprese byla zaznamenána u 102 872 předpokládaných genů. Po následném odfiltrování genů, které nesplňovali předpoklad o nenulové exprese napříč testovanými genotypy, byl konečný počet genů vstupující do asociační analýzy 53 889. 25 834 se nacházelo na chromozomech A, a 28 055 genů na chromozomech C. Následně byla provedena samotná regresní analýza mezi mírou exprese a DI pro jednotlivé genotypy. Signifikantní limit asociace ($p < 0,01$) překročilo 992 genů. Grafický výstup analýzy je zobrazen ve formě Manhattan plotu na obr. 28. Tento graf představuje na horizontální ose polohu všech testovaných genů na chromozómech a vertikální osa zobrazuje záporné hodnoty $\log_{10}P$, představující míru asociace expresního profilu daného genu s DI.



Obr. 28: Manhattan plot GEM asociační analýzy

Kvůli vysokému počtu signifikantních genů byl dle metodiky stanoven limit signifikance $-\log_{10}P$ na hodnotu 3,5. Tuto hranici překročilo celkem 19 genů (tab. 21).

Tab. 21: Seznam signifikantních genů s hodnotou $-\log_{10}P > 3,5$

gen	$-\log_{10}P$	gen	$-\log_{10}P$
<i>Bo5g110070.1</i>	4,50	<i>BnaC06g18100D</i>	3,77
<i>Cab031551.1</i>	4,38	<i>Bo7g050230.1</i>	3,73
<i>BnaC09g21650D</i>	4,30	<i>Bo4g019700.1</i>	3,68
<i>Bo6rg099860.1</i>	4,28	<i>Bo6rg104050.1</i>	3,63
<i>Bo5g110030.1</i>	4,25	<i>BnaC03g30400D</i>	3,59
<i>BnaA10g08980D</i>	4,10	<i>Bo5g025700.1</i>	3,57
<i>Bo6rg078020.1</i>	4,08	<i>Bo9g142300.1</i>	3,56
<i>Cab012755.1</i>	4,01	<i>Bo4g173160.1</i>	3,56
<i>Bo8g051310.1</i>	3,84	<i>BnaA05g10610D</i>	3,55
<i>Bo2g116540.1</i>	3,78		

Jak je patrné z tab. 21 signifikantní geny se nacházejí na chromozomech A05, A07, C02, C03, C04, C05, C06, C07, C08 a C09. Významně větší počet genů se nachází na chromozomech C s nejvyšším zastoupením na C05 a C06. Stejným způsobem jako v případě R lokusů SNP asociační analýzy bylo i zde provedeno vytipování kandidátních genů na základě podobnosti s geny *Arabidopsis thaliana*, GO a InterPro analýzy. Na základě těchto analýz byly jako kandidátní geny pro reakci s nádorovitostí vybrány tyto 12 genů:

- Bo5g110070.1* (cytochrome P450, family 705, subfamily A, polypeptide 1)
- Cab031551.1* (cytochrome P450, family 705, subfamily A, polypeptide 1)
- BnaC09g21650D* (DNAJ heat shock N-terminal domain-containing protein)
- Bo6rg099860.1* (T-complex protein 1 alpha subunit)
- Bo5g110030.1* (pentacyclic triterpene synthase 1)
- BnaA10g08980D* (urease accessory protein G)
- Bo7g050230.1* (urease accessory protein G)
- Bo6rg078020.1* (helicase with zinc finger protein)
- Cab012755.1* (cytokinin response factor 6)
- Bo8g051310.1* (S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferase family)
- Bo5g025700.1* (Galactosyl transferase GMA12/MNN10 family protein)
- Bo9g142300.1* (Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein)

6. Diskuze

Nádorovitost košťálovin představuje závažné onemocnění u většiny brukvovitých plodin. V posledních deseti letech dochází k značnému šíření této nemoci v důsledku rozšiřování ploch s brukvovitými plodinami, hlavně řepkou olejkou. K tomuto trendu nedochází jen u nás, ale i celosvětově ve většině oblastí s těmito plodinami (Řičařová et al. 2017). Vážnost tohoto problému ukazuje i náročnost odstranění tohoto patogenu z půdy, ve které je schopen přežít i více než 18 let (Wallenhammar 1996). Z pohledu polního managementu a ekonomického hlediska je reálná možnost boje s touto nemocí v polních podmínkách omezena na tolerantní a rezistentní odrůdy. V současnosti je v případě řepky olejky hlavním zdrojem rezistence uvolněná odrůda ‘Mendel’ a z ní vyšlechtěné další odrůdy ozimé i jarní řepky. Problém těchto odrůd je ale slabá rezistence založená na jednom rezistentním genu, který je v silněji zasažených oblastech patogenem překonán v rámci několika let (Diederichsen et al. 2014). Tato práce je zaměřena především na hledání nových rezistentních genů, které by mohly být využity při MAS šlechtěním k tvorbě nových rezistentních odrůd. K tomuto záměru jsou použity různé druhy analýz.

6.1 Fenotypová variabilita

Hodnocení fenotypové variability bylo posuzováno podle DI vypočítaných pro 250 testovaných genotypů. Hodnoty DI se pohybovaly v rámci celé možné škály hodnot od 0 do 100 (obr. 7). Při podrobnějším průzkumu rozložení hodnot DI lze odhadnout ostřejší separaci odolných genotypů, které tvořily přibližně 35 procent kategorie DI 0 – 20. Horní část diagramu s kategoriemi DI 81 – 100, 61 – 80, 41 – 60 a 21 – 40 si lze vzdáleně představit jako histogram normálního rozložení. Tato nerovnoměrnost v zastoupení by se dala vysvětlit naznačovanou podstatou odolnosti brukvovitých rostlin vůči tomuto onemocnění vysvětlenou v úvodu. Silná rezistence je založena na jednom R genu, který stojí za strukturou rozpoznávající obecně elicitor nádorovitosti nebo elicitor konkrétního patotypu tohoto onemocnění. Pozitivní rozpoznání přítomnosti zoospory nádorovitosti nebo jiné její životní formy vede ke kaskádové dráze ukončené hypersenzitivní reakcí vedoucí k sebedestrukci napadené buňky, čímž je zamezeno dalšímu rozvoji onemocnění (Fredua-Agyeman & Rahman 2016). Tento typ obranné reakce je obecně označován jako ETI imunitní reakce viz kapitola 2.4.1. Rozložení DI

v kategoriích, které zahrnují DI 21 – 100, vzdáleně připomínají Gaussovu křivku normálního rozložení. U těchto genotypů můžeme předpokládat, že R genem nedisponují. Z tohoto důvodu jsou tyto genotypy odkázány na tzv. kvantitativní rezistenci, viz kapitola 2.4.1, jejíž podstatou je větší množství R genů menšího účinku, které reagují jinak, než je vyvolání hypersenzitivní reakce vedoucí k buněčné smrti. V případě nádorovitosti můžeme předpokládat, že tyto R geny kvantitativní rezistence se budou podílet například na posílení mechanických bariér proti průniku zoospor do buněk nebo na regulaci a řízení cytokininů, auxinů nebo jiných hormonů, jejichž nerovnováhou vyvolává patogen tvorbu nádorů na kořenech (Jahn et al. 2013). Celkově lze tedy říci, že nerovnováha rozložení DI v testovacím panelu naznačuje, že genom *B. napus* disponuje kombinací kvalitativní rezistence, založené na jednom nebo několika málo R genech, dříve nalezených hlavně v genomu *B. rapa*, a kvantitativní rezistencí s větším množstvím R genů slabšího účinku, charakteristické pro genom *B. oleracea* (Li et al. 2016).

Při hodnocení vlivu typu kultivaru u 246 genotypů z kolekce na odolnost k nádorovitosti vykazovala největší odolnost skupina brukvovité zeleniny. Opačný výsledek byl pozorován u skupiny ozimých řepok. Tyto výsledky lze vysvětlit velkým podílem moderních ozimých odrůd. Velká část těchto linií byla vyšlechtěna z menšího množství předků, které splňovaly přísné podmínky pro vysokou kvalitu oleje a nízkou hladinou glukosinolátů a kyseliny erukové (< 30 μmol glukosinolátů, < 2 % kyseliny erukové) (Snowdon & Luy 2012) (obr. 8).

Dále byl hodnocen původ genového zdroje u 240 položek z kolekce. Nicméně pro tuto charakteristiku neměla kolekce vhodnou variabilitu. 190 položek tvořily genotypy z Evropy a následně ani výsledky neukazují na žádný viditelný trend mezi kontinenty (obr. 9).

U 80 položek z kolekce byla získána i data charakterizující kvalitu oleje (obsah glukosinolátů a kyseliny erukové). Z těchto dat vyplývá, že tato charakteristika není nijak rozhodující pro určení, zda genotyp bude odolný proti napadení nádorovitostí či nikoli. Nicméně vzhledem k velmi nízkému počtu genotypů v kategoriích '0+' a '++' lze jen s těžší vyvozovat smysluplné závěry ohledně odolnosti proti nádorovitosti na základě obsahu glukosinolátů a kyseliny erukové (obr. 10).

Poslední hodnocená charakteristika, ve které bylo 53 genotypů rozděleno od čtyř skupin podle období vyšlechtění, nepřinesla viditelné rozdíly. Z přiložených výsledků vyplývá, že rok uvolnění odrůdy pro komerční použití se nijak neshodoval s odolností k napadení nádorovitostí. Obdobně jako v předchozím případě je nutné brát v potaz, že jednotlivé

kategorie neobsahovaly dostatečné počty odrůd, ze kterých by se daly vyvozovat významnější závěry (obr. 11).

6.2 SNP asociační analýza a kandidátní geny

Hlavním použitým přístupem při hledání rezistentní genů k nádorovitosti jsou moderní metody asociativní transkriptomiky. V prvním případě byla provedena SNP asociační analýza, která lokalizovala rezistentní lokusy s geny v genomu *B. napus*. Výsledkem této studie bylo nalezení 86 vysoce asociovaných SNP markerů, z nichž 29 překročilo zápornou hodnotu $\log_{10} P < 10^{-5}$ (tab. 30). Zbývajících SNP markerů se pohybovalo v rozmezí $-\log_{10} P$ až 10^{-5} . Tyto markery byly téměř ve všech případech shlukovitě rozmístěny v genomu. Celkem takto vzniklo devět asociovaných lokusů (*BnA01_0308*, *BnA02_0265*, *BnA02_0286*, *BnA03_0186*, *BnA03_0263*, *BnA08_0009*, *BnC02_0414*, *BnC07_0221* a *BnC07_0421*). Tento fakt naznačuje, že rezistence k nádorovitosti je pravděpodobně řízena více geny (tab. 10 a tab. 11).

V minulosti se hledáním rezistentních lokusů zabývalo několik studií, z nichž drtivá většina byla zaměřena na druhy *B. oleracea* a *B. rapa* a jsou zmíněny v literárním přehledu v kapitole 2.5.3.2 resp. 2.5.3.1. Ve dvou případech se podařilo i naklonovat dva rezistentní geny *CRA* (Ueno et al. 2012) a *Crr1* (Hatakeyama et al. 2013). U všech publikovaných lokusů, u kterých byla alespoň přibližně známa poloha, byla hodnocena podobnost s lokusy nalezenými v rámci této práce. Případná podobnost v poloze je rozebrána u jednotlivých rezistentních lokusů.

V případě druhu *B. napus* byly publikovány jen tři práce zaměřené na lokalizování rezistentních lokusů a genů k nádorovitosti (Manzanares-Dauleux et al. 2000; Werner et al. 2008; Li et al. 2016). Posledním zmíněná studie jako jediná využívá SNP asociační analýzu při hledání rezistentních lokusů pro čínský patotyp nádorovitosti za použití expresních mikročipů. V této práci autoři odhalili devět nových rezistentních lokusů, nicméně při porovnání jejich polohy nebyla nalezena ani zdánlivá shoda s výsledky se zde popisované SNP analýzy. Tento fakt lze odůvodnit například použitím jiného patotypu nádorovitosti (čínský patotyp 4× směs evropských patotypů), odlišnými testovacími podmínkami, a především v případě této práce použitím hustější sítě SNP markerů vygenerovaných z RNAseq na rozdíl od výsledků z expresních čipů.

6.2.1 Lokus *BnA03_0263*

Jak již bylo popsáno, výsledkem SNP asociační analýzy bylo devět lokusů rozmístěných na chromozomu A01, A02, A03, A08, C02 a C07. Nejvyšší asociace ukázaly SNP v lokusech *BnA03_0263* a *BnC07_0421* na chromozomu A03 resp. C07. První zmíněný lokus *BnA03_0263* se zdá být patrně nejslibnější oblastí nejen kvůli vysoké asociaci SNP markerů, ale také tandemovým výskytem genů *Disease Resistance (TIR-NBS-LRR class) family* (tab. 12, obr. 19). Nejvíce asociovaný SNP ($-\log_{10}P = 7,62$) obsahuje gen *Cab002008.1 Homeobox-leucine zipper family lipid-binding START domain-containing*, jehož funkce je diferenciaci epidermálních buněk embrya (Takada et al. 2013). Velice podobný gen ze stejné rodiny *GL2* řídí diferenciaci povrchových buněk kořene jako jsou třeba kořenové vlásky, ve kterých probíhá první fáze životního cyklu nádorovitosti (Beyrne et al. 2019). Nicméně jako kandidátní geny pro tento lokus jsou označeny již dříve zmíněné R geny v tandemu. Tyto geny bohužel neobsahují žádné SNP, které by byly hodnoceny v asociační analýze. Vysoká variabilita těchto genů, hlavně v případě rozpoznávacích domén, možná vedla k vyfiltrování SNP pro tyto geny. Na druhou stranu samotné vysoce asociované SNP markery jsou obsaženy v genech, které tuto oblast ohraničují. Prvním kandidátním genem je *Cab002016.1 (AT1G30990.1 Polyketide cyclase/dehydrase and lipid transport superfamily protein, 87 %, e-value 0,33)*, který se podílí na regulaci a diferenciaci buněk rhizodermis (Bruex et al. 2012). Následující šestice kandidátních genů jsou si velice podobné a patří do skupiny R genu s doménami TIR-NBS-LRR: *Cab002021.1 (AT5G11250.3 Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class), 76 %, $8e^{-60}$)*, *Cab002023.1 (AT5G11250.2 Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class), 82 %, $4e^{-122}$)*, *BnA03g45000D (AT5G11250.3, 74 %, $1e^{-111}$)*, *Cab002025.1 AT5G11250.3, 75 %, $4e^{-129}$)*, *Cab047587.1 (AT5G11250.3, 75 %, $4e^{-129}$)* a *Cab002026.1 (AT5G11250.3, 75 %, $1e^{-128}$)*. *AT5G11250*, též nazývaný *BNT1*, funguje jako aktivační prvek stresových hormonů. Obecně je mu přiřazována funkce regulace buněčné odpovědi na stres a přenos signálu. U mutantů tohoto genu byla pozorována nadprodukce JA, SA, ABA a ET vedoucí nekontrolovaným obranným reakcím, pomalým růstem a zakrtněním (Sarazin et al. 2015). Chen et al. (2016) pozoroval 96 hodin na infekci nádorovitostí 1,5× pokles exprese tohoto genu. V rozsáhlejší homologní oblasti genomu *B. rapa* bylo v podobných místech jako se nachází lokus *BnA03_0263* identifikováno několik rezistentních lokusů: *CRA*, *CRB^{kato}*, *Rcr1*, *Rcr2* a *Rcr4* (Hayashida et al. 2008; Ueno et al. 2012; Kato et al. 2013; Chu et al. 2014; Huang

et al. 2017; Yu et al. 2017). Sekvence genu *CRA*, který byl naklonován se nejvíce podobala kandidátnímu genu *BnaA03g45000D*, nicméně při podrobné studii ortologního genu *CRA* v genomu *B. napus* bylo zjištěno, že princip rezistence pro tuto oblast se liší mezi *B. rapa* a *B. napus*, kde je patrně nutná interakce ještě dalších R genů (Zhang et al. 2016).

6.2.2 Lokus *BnC07_0421*

Druhý podobně vysoce asociovaný lokus označený *BnC07_0421* představuje homologní oblast k předchozímu lokusu. U toho lokusu se nejvíce asociované SNP ($-\log_{10}P = 7,72$ a $7,74$) vyskytují ve dvou genech *Bo7g107550.1* (*AT4G21750.4 Homeobox-leucine zipper family protein / lipid-binding START domain-containing protein*, 88 %, $< 1e-200$) a *Bo7g107580.1* (*AT4G21790.1 tobamovirus multiplication 1*, 95 %, $6,84e^{-34}$). Obdobně jako u předchozího lokusu, tyto geny s vysoce asociovanými SNP nejsou zahrnuty mezi kandidátní geny, ale ohraničují menší oblast s R geny *Disease Resistance (TIR-NBS-LRR class) family*. U tohoto lokusu je oblast R genů výrazně menší, nicméně podle současné podoby rozložení genů na chromozomu C07 se zde vyskytují minimálně 3 geny *Disease Resistance (TIR-NBS-LRR class) family*, které se nacházejí v těsné blízkosti genů s asociovanými SNP (tab. 13, obr. 20). Na základě analýz byly pro tento lokus vybrány tři kandidátní geny: *Bo7g107710.1* (*AT5G11250.3 Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class)* 75 %, $5e^{-129}$), *Bo7g107730.1* (*AT5G11250.3*, 75 %, $1e^{-118}$) a *Bo7g107740.1* (*AT5G11250.3*, 75 %, $3e^{-125}$). Ve všech případech je gen anotován jako *AT5G11250.3*, nazývaný též jako *BNT1* popsáný u předchozího lokusu jako rozpoznávací prvek v obranných reakcích (Sarazin et al. 2015). Nutno říci, že v případě tohoto lokusu drtivá většina silně asociovaných SNP představují SNP, u kterých nelze kvůli alopolyploidnímu charakteru genomu s jistotou říci, ke kterému homoelognímu genu patří. U tohoto lokusu je proto reálně možné, že se jedná pouze o stínový lokus *BnA03_0263*. Na druhou stranu, poslední studie zabývající se R lokusy nádorovitosti u *B. oleracea* ve stejné oblasti odhalila R lokus *Rcr7* (Dakouri et al. 2018).

6.2.3 Lokus *BnA03_0186*

Druhým signifikantně asociovaným lokusem na chromozomu A03 je *BnA03_0186* s nejvyšší asociací ($-\log_{10}P = 5,44$) na SNP v genu *Cab004517.1* (*AT3G15000.1 cobalt*

ion binding protein, 81 %, $7e^{-133}$). Pro tento lokus bylo vybráno sedm kandidátních genů, z nichž čtyři představují velmi podobné geny *Leucine-rich repeat transmembrane kinase* (tab. 14, obr. 21). *Cab004504.1* (*AT3G14840.2 Leucine-rich repeat transmembrane protein kinase*, 88 %, $2e^{-148}$), *Cab004505.1* (*AT3G14840.2*, 88 %, $2e^{-143}$), *Cab004506.1* (*AT3G14840.2*, 87 %, $3e^{-143}$) a *Cab004507.1* (*AT3G14840.2*, 84 %, $6e^{-53}$). První z těchto genů dokonce přímo obsahuje silně signifikantní SNP s $-\log_{10}P = 4,1$. Gen *AT3G14840* označován také jako *LIK1* představuje transmembránovou kinázu s rozpoznávací doménou, u které byla prokázána spojitost s bazální imunitní reakcí proti některým mikroorganismům. Dále bylo také objeveno, že ve spojitosti s genem *CERK1* dochází k jeho fosforylaci a schopnosti rozpoznat chitin, což by naznačovalo schopnost rozpoznat zoospory nádorovitosti a vyvolat obrannou reakci (Le et al. 2014). Další kandidátní gen v tomto lokusu představuje *Cab004516.1* (*AT3G14990.3 Class I glutamine amidotransferase-like superfamily protein*, 87 %, $8e^{-59}$), u kterého byla ukázána spojení s genem *PDLPI*. Tento gen se významný článek bazálních reakcí proti houbovým patogenům, jelikož řídí ukládání kalózy kolem penetračních struktur patogenů a potenciálně by mohl mechanicky bránit průniku zoospor nádorovitosti do buněk (Caillaud et al. 2014). Poslední významný kandidátní gen pro tento lokus je *Cab004527.1* (*AT3G15210.1 ethylene responsive element binding factor 4*, 83 %, $1e^{-154}$). Tento gen přímo obsahuje SNP s $-\log_{10}P = 3,58$ a dle předchozích zjištění se jedná o negativní regulátor JA způsobující odolnost vůči houbovému patogenu *Fusarium oxysporum* (Lyons et al. 2013). Dále byla u tohoto genu potvrzena interakce s *CDK8*, důležitým genem v obranných reakcích proti houbovým patogenům *Botrytis cinerea* a *Alternaria brassicicola* (Zhu et al. 2014).

6.2.4 Lokus *BnA02_0265*

Další chromozom obsahující dva R lokusy je A02 s lokusy *BnA02_0265* a *BnA02_0286*. První zmíněný se nachází zhruba 26,5M bází od začátku chromozomu a v žádné předchozí studii se o podobném místě neobjevuje žádná zmínka. Celkově bylo v tomto lokusu identifikováno devět kandidátních genů, z nichž dva obsahují přímo silně asociované SNP markery ($-\log_{10}P$ 5,11 a 4,86) (tab. 15, obr. 22). První z nich *Cab009348.1* (*AT5G47420.1 Tryptophan RNA-binding attenuator protein-like protein*, 88 %, $7e^{-54}$) je v přímé interakci s genem *PEN3*, který je klíčovým genem pro nespecifickou rezistenci (Campe et al. 2016). Druhým kandidátním genem s SNP

($-\log_{10}P$ 4,86) je *Cab009364.2* (*AT5G47500.1 Pectin lyase-like superfamily protein*, 92 %, $1e^{-77}$) na modifikaci buněčné stěny, potenciálně vedoucí k mechanické obraně proti proniknutí zoospor nádorovitosti (Etchells et al. 2012). Dalším kandidátním genem je *Cab009343.1* (*AT4G36690.4 U2 snRNP auxilliary factor, large subunit, splicing factor*, 90 %, $4e^{-43}$), u kterého bylo zjištěno, že napadení patogenem *Pseudomonas syringae* jeho množství výrazně stoupá (Jones et al. 2006). Tři kandidátní geny tohoto lokusu se vyskytují ve spojitosti s hormonem auxinem, jehož změnou množství v pletivech kořenů, patogen vytváří nádory, jedná se o tyto geny: *Cab009347.1* (*AT5G47390.1 myb-like transcription factor family protein*, 81 %, $1e^{-12}$) (Kwon et al. 2013), *Cab009370.1* (*AT5G47530.1 Auxin-responsive family protein* 84 %, $2e^{-168}$) a *Cab009383.1* (*AT5G47750.1 D6 protein kinase like 2*, 89 %, $7e^{-123}$) (Zourelidou et al. 2009). Mezi kandidátní geny byl dále zařazen R gen *BnaA02g25670D* (*AT4G23440.2 Disease resistance protein (TIR-NBS class)*, 82 %, $7e^{-108}$) začleněný do bazální imunitní odpovědi a apoptózy (Meyers et al. 2002), *Cab009385.1* (*AT3G20520.1 SHV3-like 3*, 75 %, $2e^{-33}$) podílející se na organizaci buněčných stěn (Hayashi et al. 2008) a *Cab009373.1* (*AT5G47550.1 Cystatin/monellin superfamily protein*, 81 %, $1e^{-43}$) jeden ze stresových genů interagující s ABA (Labudda et al. 2016).

6.2.5 Lokus *BnaA02_0286*

Druhým méně signifikantním lokusem na chromozomu A02 je *BnaA02_0286*, který zahrnuje dvojici genů obsahující sSNP a pSNP *Cab026521.1* (*AT3G26200.1 cytochrome P450, family 71, subfamily B, polypeptide 22*, 90 % resp. *Cab026524.1* (*AT3G26280.2 cytochrome P450, family 71, subfamily B, polypeptide 4*, 81 %, $< 1e^{-200}$) (tab. 19, obr. 26). Mezi kandidátní geny byly zařazeny také geny *cytochrome P450*, které se v této oblasti vyskytují ve velkém množství. Prvním kandidátním genem je *Cab026518.1* (*AT3G26170.1 cytochrome P450, family 71, subfamily B, polypeptide 19*, 85 %, $< 1e^{-200}$), který je cílovým genem pro transkripční faktory WRKY, podílí se na obranných reakcích, syntéze kamalexinu (Desveaux et al. 2005), a zároveň jeho exprese byla silně potlačena po 72 a 96 hodinách po inokulaci nádorovitostí. Poklesy byly šesti, resp. pětinasobné oproti kontrole (Chen et al. 2016). Druhý kandidátní gen pro tento lokus představuje gen *Cab026968.1* (*AT1G58260.1 cytochrome p450 79c2*, 82 %, $< 1e^{-200}$) kvůli jeho začlenění do obranných reakcí a regulace stresových hormonů (Proietti et al. 2018). Polohou se tento lokus nachází přibližně 26,5M od začátku chromozomu A02.

Z předchozích studií vyplývá, že tato oblast se překrývá s velmi rozlehlým R lokusem *Rcr8* ze studie Yu et al. (2017).

6.2.6 Lokus *BnA01_0308*

Na začátku chromozomu A01 byl v rámci SNP analýzy identifikován R lokus *BnA01_0308* (tab. 18, obr. 25), ve kterém se nejvíce asociované SNP markery nacházely ve dvou genech *Cab044542.1* (*AT3G10050.1 L-O-methylthreonine resistant 1*, 90 %, $6e^{-87}$) a *Cab044541.1* (*AT3G09840.1 ATPase, AAA-type, CDC48, ATCDC48, ATCDC48A, CDC48A, CELL DIVISION CYCLE 48*, 91 %, $< 1e^{-200}$). Druhý zmíněný představuje i kandidátní gen, protože se podílí na negativní regulaci obranných dějů založených na NLR (nucleotide binding–leucine-rich repeat). Zvýšená exprese vede k zakrnělému růstu a zvýšené rezistenci proti houbovým chorobám například *Hyaloperonospora arabidopsidis* (Copel & Charles et al. 2016). Navzdory nepříliš velké asociaci se v tomto lokusu nachází velké množství dalších kandidátních genů. Tandem dvou velmi podobných genů *Cab044551.1* a *Cab044550.1* (*AT4G23680.1 Polyketide cyclase dehydrase lipid transport superfamily*, 91 %, $< 1e^{-200}$ resp. 84 %, $7e^{-129}$) se podílí na obranných reakcích vyvolané některými NAC transkripčními faktory (Tran et al. 2004). Ve studii Chen et al. (2016) zkoumající odlišně exprimované geny během napadení nádorovitostí, byl tento gen u citlivé odrůdy po 72 hodinách potlačen téměř 2,5× oproti kontrole. Dále byla mezi kandidáty zahrnuta tandemová trojice genů *Putative membrane lipoprotein*, konkrétně *Cab044549.1*, *Cab044548.1* a *Cab048143.1*, které se tomuto *AT3G10195.1* lipoproteinu podobaly jen částečně (tab. 18). Nicméně *AT3G10195.1* kóduje defensin-like protein, které se podílejí na houbových reakcích proti patogenům. Částečná podobnost je také s WRKY TF patřící mezi *Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) family* (Birkenbihl et al. 2017). Druhý zástupce z kandidátních genů, který patří mezi *Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) family*, je *Cab044530.1* (*AT5G46450.3 Disease resistance protein TIR-NBS-LRR family*, 77 %, $2e^{-171}$) podílející se na obranných reakcích, bazální imunitě a vedení signálu. Konkrétně byl identifikován v souvislosti s řízením SA, ABA a akumulaci ligninu při napadení houbovým patogenem *Pseudomonas syringae* (Mohr & Cahill 2007). Dále bylo prokázáno, že v souvislosti s nádorovitostí dochází ke zvýšení jeho exprese více jak trojnásobně oproti kontrole (Irani et al. 2019). Další kandidátní gen tohoto lokusu představuje *Cab044557.2* (*AT5G65870.1 phytosulfokine 5 precursor*, 83 %, $1e^{-1}$) označen též *PSK5*. K indukci

tohoto genu dochází při napadení půdními houbovými patogeny jako například *Fusarium oxysporum* (Shen & Diener 2013). Podobně reaguje i další gen z tohoto lokusu *Cab044543.1* (*AT3G10080.2 RmlC-like cupins superfamily protein*, 85 %, $< 1e^{-200}$), který významně reagoval na přítomnost dalšího houbového patogenu *Sclerotinia sclerotiorum* (Zhao et al. 2007). I v případě napadení nádorovitostí byla pozorována výrazně zvýšená exprese tohoto genu po 26 dnech od inokulace (Siemens et al. 2006). Potenciálně velice slibný kandidát v tomto lokusu *Cab044540.1* (*AT3G09820.2 kinase superfamily*, 90 %, $9e^{-63}$) kóduje *PATTERN-TRIGGERED IMMUNITY (PTI) COMPROMISED RECEPTOR-LIKE CYTOPLASMIC KINASE 1* neboli *PCRK1*. U toho genu byla prokázána významná role PTI imunitní odpovědi k dalšímu houbovému patogenu *Pseudomonas syringae* (Sreekanta et al. 2015). Poslední kandidátní gen v tomto lokusu je *Cab044523.1* (*AT3G09520.1 exocyst subunit exo70 family protein H4*, 81 %, $< 1e^{-200}$) způsobující zesílení stěn povrchových buněk ukládáním kalózy, tím by potenciálně mohla být pro zoospory nádorovitosti méně prostupná (Kulich et al. 2015). Chromozom A01 není typickým místem, kde by předchozí studie objevily R lokus k nádorovitosti kromě jedné výjimky v případě *Crr2*. Nicméně po lokalizaci daného R lokusu bylo zjištěno, že se nachází v jiné oblasti chromozomu a se zde popsaným lokusem *BnA01_0308* se ani vzdáleně nepřekrývá (Suwabe et al. 2003).

6.2.7 Lokus *BnA08_0009*

Největší počet R lokusů k nádorovitosti u *B. rapa* bylo nalezeno na chromozomu A03, nemalé množství bylo identifikováno také na chromozomu A08 (Suwabe et al. 2003; Yu et al. 2017). Výsledky z SNP asociační analýzy ukázaly přítomnost R lokusu označeného *BnA08_0009* také na chromozomu A08 (tab. 20, obr. 27). Nicméně při porovnání lokalizace dvou známých R lokusů *Crr1* a *Rcr9* se zde popisovaným *BnA08_0009* nebyla nalezena ani částečná shoda v poloze. Poloha tohoto lokusu je určena na základě dvou genů se silně asociovanými SNP markery: *Cab008408.1* (*AT1G53850.2 20S proteasome alpha subunit E1*, 92 %, $7e^{-39}$, $-\log_{10}P = 4,44$) a *Cab008409.1* (*AT1G53750.1 regulatory particle triple-A 1A*, 94 %, $2e^{-155}$, $-\log_{10}P = 4,50$). První z těchto dvou genů je zahrnut i mezi kandidátní geny, protože se zapojuje do obranných reakcí proti patogenům, konkrétně disponuje RNAzovou aktivitou s proteiny viru salátové mozaiky (Dielen et al. 2011). Kromě tohoto genu bylo v tomto lokusu objeveno dalších pět potenciálních genů důležitých pro reakci proti nádorovitosti: *Cab008410.1* (*AT1G53730.2 STRUBBELIG-*

receptor family 6, 89 %, $6e^{-141}$), *Cab008403.1* (*AT1G53990.1 GDSL-motif lipase 3*, 84 %, $5e^{-57}$), *Cab008404.1* (*AT1G53990.1 GDSL-motif lipase 3*, 82 %, $1e^{-55}$), *Cab008405.1* (*AT1G53920.1 GDSL-motif lipase 5*, 90 %, $2e^{-84}$) a *Cab008406.1* (*AT1G53910.3 related to AP2 12*, 81 %, $2e^{-94}$). Kromě genu *STRUBBELIG-receptor family 7* s serin/threonin kinázovou aktivitou a rozpoznávací doménou Leucine-rich repeat potencionálně rozpoznávající elicitory patogenů se mezi kandidátními geny nachází trojice GDSL lipáz. *Cab008403.1*, *Cab008404.1* a *Cab008405.1* tvoří tandemovou trojici *GDSL-motif lipase* též *GLIP3* a *GLIP5*. Tyto geny disponují schopností reakce na stresové hormony ET, SA, JA, auxin a zapojují se do obranných reakcí proti patogenům, a také jsou brány mezi důležitou součástí obranného aparátu rostlin (Han et al. 2019). Ke zvýšení exprese *GLIP3* dochází při napadení houbovými patogeny, zároveň jsou v přímé interakci se známými *MAP* kinázovými drahami zapojenými do obranných reakcí (Han et al. 2019). V případě zvýšené exprese *GLIP3* docházelo k rezistenci například vůči houbovému patogenu *Botrytis cinerea*, naopak u genu *GLIP5* byl prokázán vliv na rezistenci u houbového patogenu *Alternaria brassicicola* (Oh et al. 2005). Vysokou podobnost trojice *Cab008403.1*, *Cab008404.1* a *Cab008405.1* lze vidět i ke genu *AT1G53940.1 GDSL-motif lipase 2*, též *GLIP2*, který působí jako negativní regulátor auxinu. Jeho role v obranných reakcích byla rozpoznána například u patogenu *Erwinia carotovora* (Lee et al. 2009). Posledním kandidátním genem v tomto lokusu je *Cab008406.1* (*AT1G53910.3 related to AP2 12*, 81 %, $2e^{-94}$), označen také jako *ERF74*, *ETHYLENE RESPONSE FACTOR 74*, *RAP2.12*, *RELATED TO AP2 12*. Poslední studie ukazují, že tento gen je součástí mnoha mechanismů reagující na stres u rostlin (Yao Yuan et al. 2017).

6.2.8 Lokus *BnC02_0414*

Rezistentní lokus *BnC02_0414* se rozkládá přibližně 41M bází do začátku chromozomu C02 (tab. 16, obr. 23). Jeho vymezení je založené na čtyř genech s velmi signifikantní asociací SNP markerů *Bo2g132400.1* ($-\log_{10}P = 4,76$), *Bo2g132420.1* ($-\log_{10}P = 4,44$), *Bo2g132450.1* ($-\log_{10}P = 4,82$) a *Bo2g133520.1* ($-\log_{10}P = 4,75$). Výše zmíněny gen *Bo2g132400.1* (*AT5G47500.1 Pectin lyase-like superfamily protein*, 93 %, $7e^{-83}$) představuje jeden z kandidátních genů, jehož výběr byl již diskutován v kapitole 6.2.4. Celkem bylo v tomto lokusu označeno sedm kandidátních genů. První z nich *Bo2g132320.1* (*AT5G47370.1 Homeobox-leucine zipper protein 4 (HB-4)/HD-ZIP*

protein, 86 %, $1e^{-56}$) označován také jako *HAT2* je indukován auxinem a podílí se na regulaci tohoto hormonu. Nefunkčnost tohoto genu vede k narušení imunitní odpovědi u rostlin, což bylo ukázáno u viru okurkové mozaiky (Zou et al. 2016). Zbývající kandidátní geny jsou *Bo2g132340.1* (*AT5G47390.1 myb-like transcription factor family protein*, 81 %, $2e^{-117}$), *Bo2g132400.1* (*AT5G47500.1 Pectin lyase-like superfamily protein*, 94 %, $7e^{-83}$), *Bo2g132430.1* (*AT4G00940.3 Dof-type zinc finger DNA-binding family protein*, 96 %, 0.15), *Bo2g132440.1* (*AT5G47530.1 Auxin-responsive family protein*, 85 %, $7e^{-177}$), *Bo2g133610.1* (*AT5G47750.1 (D6 protein kinase like 2*, 89 %, $< 1e^{-200}$) a *Bo2g133620.1* (*AT3G20520.1 SHV3-like 3*, 83 %, $1e^{-117}$). Šestice zmíněných kandidátních genů už byla diskutována v rámci kapitoly 6.2.4. V případě tohoto lokusu lze pozorovat částečnou podobnost s lokusem *BnA02_0265*, jedná se pravděpodobně o homoelogní oblast mezi chromozomy A02 a C02. K tomuto faktu přispívá i zastoupení specifických a nespecifických SNP markerů, kde je možno pozorovat větší zastoupení nespecifických SNP. Výjimku tvoří gen *Bo2g133520.1* (*AT5G47630.3 mitochondrial acyl carrier protein 3*, 86 %, $9e^{-52}$), který obsahuje specifické SNP markery. V tomto případě je možné předpokládat, že oba lokusy zde zmíněné lokusy na A02 a C02 představují reálně funkční rezistentní oblasti proti nádorovitosti zděděné z předků *B. rapa* a *B. oleracea*. Při porovnání předchozích studií zabývajících se rezistentními lokusy k nádorovitosti u *B. napus* i *B. oleracea*, nebyl nalezena žádná předchozí informace o existenci R lokusu v této oblasti.

6.2.9 Lokus *BnC07_0238*

Lokus *BnC07_0238* je druhým nalezeným R lokusem na chromozomu C07 (tab. 17, obr. 24). Jeho vymezení je dáno několika silně asociovanými SNP v genu *Bo7g063960.1* s nejvyšší hodnotou $-\log_{10}P = 5,41$. V této oblasti bylo určeno mnoho kandidátních genů, nicméně hlavní kandidát představuje již zmíněný gen *Bo7g063960.1* (*AT5G67200.1 Leucine-rich repeat protein kinase family protein*, 84 %, $< 1e^{-200}$) a to nejen kvůli množství silně asociovaných SNP markerů. Tento gen je tvořen typickými leucin doménami s rozpoznávací funkcí. Prostřední oblast napovídá a pravděpodobněm transmembránovém charakteru výsledného proteinu. Poslední část je tvořena kinázovou doménou. Mutanti tohoto genu jsou tolerantní k některým typům stresu (ten Hove et al. 2011). Druhým kandidátním genem patřící mezi *Leucine-rich repeat kinase family* je *Bo7g063860.1* (*AT5G67280.1 Leucine-rich repeat kinase family*, 87 %, $< 1e^{-200}$). Studie,

které se tímto genem zabývají ukazují, že je důležitým prvkem obranných reakcí (Schwessinger et al. 2011; Gouhier-Darimont et al. 2013; Cole & Diener 2013). Dalším kandidátním genem je *Bo7g063830.1 (AT5G67300.1 myb domain protein r1*, 83 %, $< 1e^{-200}$), který přímo reguluje TF WRKY při napadení houbovým patogenem (Sung Shim & Do Choi 2013). Mezi kandidátní geny byla také zařazena dvojice homologních genů důležitých pro organizaci buněčných stěn a syntézu sekundární struktury buněčných stěn: *Bo7g063910.1 (AT5G67230.1 Nucleotide-diphospho-sugar transferases superfamily protein*, 79 %, $6e^{-43}$) a *Bo7g063930.1 (AT5G67230.1 Nucleotide-diphospho-sugar transferases superfamily protein*, 81 %, $< 1e^{-200}$). Strukturních změn v buněčných stěnách, a tím potenciálně vytváření mechanických bariér proti proniknutí zoospory nádorovitosti by se mohl také účastnit gen *Bo7g063950.1 (AT5G67210.1 IRREGULAR XYLEM protein (DUF579)*, 88 %, $< 1e^{-200}$) zodpovědný za ukládání xylanu v buněčných stěnách (Brown et al. 2011). Významným kandidátem tohoto lokusu je také *Bo7g064010.1 (AT5G67160.1 HXXXD-type acyl-transferase family protein*, 79 %, $< 1e^{-200}$), také *ENHANCED PSEUDOMONAS SUSCEPTIBILITY 1 (EPS1)*, který funguje jako regulace biosyntézy SA při napadení patogeny (Zheng et al. 2009). Na významu pro reakci tohoto genu přidává i studie Chen et al. (2016), kde bylo zjištěno, že po 72 a 96 hodinách od inokulace spory dochází 11 resp. 12 násobné expresi tohoto genu. Ke zvýšení exprese genu při napadení jiného houbového parazita *Sclerotinia sclerotiorum* 3,65× je zodpovědný kandidátní gen *Bo7g064000.1 (AT5G67180.4 target of early activation tagged (EAT) 3*, 79 %, $5e^{-55}$) (Zhao et al. 2007). Za interakce dalšího kandidátního genu tohoto lokusu *Bo7g063900.1 (AT5G67250.1 SKP1/ASK1-interacting protein 2*, 83 %, $< 1e^{-200}$) dochází hypersenzitivní reakci a následné apoptóze napadené buňky (van den Burg et al. 2008). Dalšími kandidátními geny jsou *Bo7g063880.1 (AT5G67260.2 CYCLIN*, 84 %, $4e^{-89}$), *Bo7g063820.1 (AT5G67310.1 cytochrome P450, family 81, subfamily G, polypeptide 1*, 77 %, $2e^{-128}$), *Bo7g063890.1 (AT5G40770.1 prohibitin 3*, 92 %, 0,14), *Bo7g063980.1 (AT5G67190.1 DREB and EAR motif protein 2*, 87 %, $1e^{-165}$) a *Bo7g063990.1 (AT3G12490.2 cystatin B*, 79 %, $8e^{-32}$) zejména kvůli jejich interakci s auxinem, strukturními změnami stěn a reakcemi na stresové podmínky. V případě porovnání oblasti tohoto lokusu s několika málo studiemi, které se zaměřovaly na rezistentní lokusy pro nádorovitosti u *B. napus* a *B. oleracea* nebyla nalezena žádná shoda.

6.3 GEM asociační analýza

Provedením GEM asociační analýzy bylo odhaleno 992 signifikantně asociovaných genů, z nichž 19 překročilo stanovenou hranici $-\log_{10}P$ 3,5. Umístění těchto 19 genů bylo na více než polovině chromozómů (A05, A07, C02, C03, C04, C05, C06, C07, C08 a C09) s převahou výskytu na chromozomech C pocházející z *B. oleracea* (tab. 21, obr. 28). Následnými doplňkovými analýzami GO, InterPro a blastn s geny *A. thaliana* klesl počet kandidátních genů na 12. Nejvyšší hodnota $-\log_{10}P$ 4,50 a 4,38 byla přiřazena dvojici ortologních genů *Bo5g110070.1* (*AT4G15330.2 cytochrome P450, family 705, subfamily A, polypeptide 1, 77 %, $8e^{-92}$*) a *Cab031551.1* (*AT4G15330.2 cytochrome P450, family 705, subfamily A, polypeptide 1, 78 %, $2,5e^{-87}$*) známých také jako *CYP705A1*. Tato cytochrom monooxidáza je indukována přítomností půdního houbového patogenu *Pythium irregulare* za regulace JA. Spolu s arabidiol syntázou ABDS katalyzují biosyntézu terpenů DMNT v kořenech, což v konečném důsledku vede k rezistenci ke zmíněnému půdnímu patogenu (Sohrabi et al. 2015). Vzhledem k vrcholovému postavení těchto dvou ortologních genů *cytochrom P450 monooxidázy*, lze předpokládat velký význam těchto genů a možnost podobného obranného mechanismu proti půdnímu patogenu *P. brassicae*. Další kandidátní gen ($-\log_{10}P = 4,30$) představuje *BnaC09g21650D* (*AT5G23590.2 DNAJ heat shock N-terminal domain-containing protein, 88 %, $8e^{-106}$*), u kterého byla ukázána vazba na stresem indukované NAC transkripční faktory (Tran et al. 2004). Následující kandidátním genem je *Bo6rg099860.1* (*AT3G20050.1 T-complex protein 1 alpha subunit, 97 %, $2e^{-40}$*). Tento *TCP-1* gen označen též jako *heat shock protein 60* nebyl u rostlin významně zkoumán, nicméně u živočichů jsou podobné geny dobře charakterizovány jako geny podílející se na imunitní odpovědi a buněčné smrti (Tsan & Gao 2009). Poslední studie týkající se tohoto genu ukázala, že jeho exprese se signifikantně zvyšuje při napadení *Xanthomonas campestris* způsobující významné onemocnění u brukvovité zeleniny podobně jako nádorovitost. Mechanismus a začlenění do obranných reakcí však není přesně znám (Hwang et al. 2012a). Velice významným kandidátním genem je také *Bo5g110030.1* (*AT4G15340.1 pentacyclic triterpene synthase 1, 81 %, $4e^{-85}$*), nazývaný zkráceně *PEN1*. Tento R gen je členem specifické rodiny syntax proteinů, která jsou klíčovými částmi sekrečního obranného mechanismu proti houbovým patogenům ze skupiny Erysiphales (Bracuto et al. 2017). Přítomnost velmi vysoké asociace toho genu v reakci na nádorovitost napovídá, že by podobný mechanismus sekrece antipatogenních látek mohl

existovat i v reakci na nádorovitost. Další zástupce kandidátních genů tvoří homoelogní dvojice genů *BnaA10g08980D* (*AT2G34470.2 urease accessory protein G*, 88 %, $3e^{-51}$) a *Bo7g050230.1* (*AT2G34470.2 urease accessory protein G*, 90 %, $9e^{-58}$). Tyto geny jsou klíčovým aktivátorem ureázy u rostlin (Myrach et al. 2017). Samotná ureáza, kromě jiných funkcí, je také významným článkem v obraně proti hmyzím a houbovým patogenům (Carlini & Ligabue-Braun 2016). Vzhledem k přítomnosti těchto genů v asociaci na odolnost k nádorovitosti můžeme předpokládat, že i v tomto případě bude aktivace ureázy hrát roli v boji proti tomuto patogenu. Kromě aktivátoru ureázy se mezi kandidátními geny nachází také galaktosyl transferáza *Bo5g025700.1* (*AT1G18690.4 Galactosyl transferase GMA12/MNN10 family protein*, 88 %, $< 1e^{-200}$), který se podílí na přenosu xyloglukanů. Těmto metabolitům je v některých případech také připisována bazální obrana proti patogenům (Claverie et al. 2018). Na regulaci stresového hormonu ET se podílí další kandidátní gen *Bo6rg078020.1* (*AT3G61700.4 helicase with zinc finger protein*, 85 %, $4e^{-30}$) (Paepe et al. 2004). Kromě ET hormonu reaguje na jiný stresový hormon cytokinin následující kandidátní gen *Cab012755.1* (*AT3G61630.1 cytokinin response factor 6*, 74 %, $2,5e^{-51}$). Konkrétně tento gen v závislosti na cytokininu reguluje auxinové transportéry. Nerovnováha těchto dvou hormonů je klíčovým prvkem, který *P. brassicae* naruší a dochází ke vzniku nádorů (Šimášková et al. 2015). Dalším kandidátním genem spojeným s auxinem je *Bo9g142300.1* (*AT1G17760.1 Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein*, 90 %, $9e^{-51}$). Tento gen jinak označovaný jako *CLEAVAGE STIMULATION FACTOR 77*, *CSTF77* je součástí polyadenylační úpravy mRNA signálních genů auxinu. Narušení jeho funkce vede k redukci citlivosti na auxin (Zeng et al. 2019). Vzhledem k tomu, že příčinou vzniku nádorů je nadbytek auxinu, mohly by například genotypy se změnou v tomto genu reagovat odlišně a nádory nevytvářet. Posledním kandidátním genem je *Bo8g051310.1* (*AT4G26420.1 S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases superfamily protein*, 78 %, $6e^{-55}$), označený také jako *GAMT1*, *GIBBERELLIN METHYLTRANSFERASE 1*. Tento gen je schopen reagovat na stresové faktory. Vysoká exprese tohoto genu vedla například ke zvýšené toleranci proti suchu (Nir et al. 2014).

7. Závěr

V rámci této práce je hodnocena odolnost k nádorovitosti u kolekce genotypů *B. napus* s osekvenovaným transkriptomem. Fenotypová data v podobě indexu napadení jsou poté použita ke dvěma asociativním analýzám, jejichž výsledek představují nalezené rezistentní lokusy a geny asociované s DI. Na základě anotace jsou poté navrženy kandidátní geny, které se podílejí na obranné reakci proti nádorovitosti u *B. napus*.

Při celkovém hodnocení míry poškození kořenového systému u testovaných zástupců kolekce je patrná existence menší skupiny odolných genotypů a převažující podíl náchylných až velmi citlivých genotypů. Tyto genotypy jsou dle histogramu rozmístěny do kategorií od částečně rezistentní až po velmi citlivé v podobně připomínající normální rozložení. Z těchto výsledků můžeme předpokládat, že podstata rezistence k nádorovitosti je založena jak kvalitativně přítomností/nepřítomností R genu, tak kvantitativně mnoha genech menšího účinku.

Výsledek asociační SNP analýzy ukazuje na podobný závěr, kdy je zde zřejmý jeden velmi silně asociovaný lokus *BnA03_0263* na chromozomu A03 a jeho stínový lokus *BnC02_0414* na chromozomu C07. Tento lokus patrně obsahuje dominantní R gen. Zbylé identifikované lokusy jsou charakteristické menší mírou asociace a je proto možné, že obsahují geny s menším obranným účinkem podílející se na kvantitativní rezistenci. Zmíněný lokus *BnA03_0263* obsahuje tandemovou sekvenci šesti rezistentních genů typu TIR-NBS-LRR, z nichž jeden z nich je pravděpodobný kauzální R gen pro plnou odolnost. Navzdory velké podobnosti těchto genů, nejvyšší podobnost s dříve naklonovaným genem R genem nádorovitosti u *B. rapa* představuje *BnaA03g45000D* (Ueno et al. 2012). Při porovnání výsledků GEM asociativní analýzy pro jednotlivé R geny v tandemu, výrazně vyšší asociace se nachází právě na genu *BnaA03g45000D*. Obecně k důležitosti celého tohoto lokusu přispívá také fakt, že ortologní oblast v genomu *B. rapa* označená již dříve za R lokus se s tímto lokusem překrývají (Yu et al. 2017).

V závěru SNP analýzy je také nutné zmínit další dva velmi slibné R lokusy. V prvním případě se jedná o asociovaný lokus *BnA02_0286*, který nebyl publikován ani u příbuzných druhů. Hlavním kandidátem se jeví *Cab009348.1*, který přímo obsahuje silně asociovaný SNP marker. Zároveň jeho AT ortolog je v přímé interakci s důležitým R genem *PEN3* (Campe et al. 2016). V druhém případě se jedná o lokus *BnA03_0186* s jeho tandemovou sekvencí čtyř *Leucine-rich repeat* transmembránových kináz,

u kterých je prokázána spojitost s genem *CERK1* se schopností rozpoznávat chitin hub (Le et al. 2014). První z těchto genů *Cab004504.1* obsahuje ve své sekvenci silně asociovaný SNP marker, a tudíž i pravděpodobným kauzální genem tohoto lokusu. Celkový výsledek SNP asociativní analýzy představuje 89 asociovaných SNP markerů sdružených do devíti R oblastí. Tyto lokusy zahrnují 392 genů, z nichž následnou anotací, GO a InterPro analýzou bylo vybráno 66 kandidátních genů.

Výsledkem GEM asociační analýzy by v ideálním případě měly být příčinné geny lokalizované v lokusech SNP asociační analýzy. Při striktně nastavené prahové hodnotě pro geny s nejvyšší asociací k tomu výsledku nedošlo. Nicméně i tak se nejvíce asociované geny na určité formě obranné reakce podílejí. Dvojice nejvíce asociovaných genů představují dva *cytochrome P450* ortologní geny *Bo5g110070.1* a *Cab031551.1*. U této cytochrom monooxidázy byla objevena indukce za přítomnosti houbových patogenů. Spolu s tímto genem dochází také k indukci arabidol syntázy katalyzující biosyntézu některých terpenů v kořenech, což v konečném důsledku vede i rezistenci proti patogenu (Sohrabi et al. 2015). Princip obrany proti nádorovitosti může nastínit i další dvojice silně asociovaných genů *urease accessory protein G BnaA10g08980D* a *Bo7g050230.1*. Tyto geny slouží k aktivaci ureázy v pletivech rostlin. Kromě jiných funkcí bylo u ureáz rozpoznána obranná funkce proti houbovým patogenům (Carlini & Ligabue-Braun 2016). V neposlední řadě je nutné zmínit i velice zajímavý gen *Bo5g110030.1* nazývaný jako *PEN1*. Tento gen hraje klíčovou roli v obranném mechanismu proti houbovým patogenům skupiny Erisiphales (Bracuto et al. 2017). Celkový výsledek z GEM asociativní analýzy ukazuje na 19 asociovaných genů, z nichž následnými analýzami bylo vybráno 12 kandidátních genů. V případě výsledků z této analýzy se nabízí několik otázek jako například odlišnost asociovaných genů od výsledků ze SNP analýzy, která by se dala vysvětlit původem dat, ze kterých jsou exprese genů získány. Vzorky pro RNAseq byly odebírány z listů, nicméně exprese genů v kořenech, kde k interakci mezi patogenem a rostlinou dochází, mohou mít odlišné exprese genů. Nicméně tako analýza také přinesla dvě zajímavé otázky, například zda některé terpeny nebo ureázy mohou sloužit v pletivech jako obranné látky proti tomuto houbovému patogenu.

Celkově takto práce přináší mnoho nového v boji proti nádorovitosti košťálovin. V případě hodnocení kolekce genotypů ukazuje na samotné zdroje rezistence. Následné asociativní analýzy také přímo na SNP markery pro MAS, i přímo na potenciální geny a návrh mechanismu rezistence proti tomuto patogenu.

8. Použitá literatura

- AGRIOS, G. N. 2005 Plant Pathology, 5th eds. Elsevier Academic Press, Singapore.
- AHMED, H. U., S. F. HWANG, S. E. STRELKOV, B. D. GOSSEN, G. PENG, R. J. HOWARD a G. D. TURNBULL, 2011. Assessment of bait crops to reduce inoculum of clubroot (*Plasmodiophora brassicae*) of canola. *Canadian Journal of Plant Science* [online]. **91**(3), 545–551. ISSN 0008-4220. Dostupné z: doi:10.4141/CJPS10200
- ALVES, Murilo S., Silvana P. DADALTO, Amanda B. GONÇALVES, Gilza B. DE SOUZA, Vanessa A. BARROS a Luciano G. FIETTO, 2013. Plant bZIP Transcription Factors Responsive to Pathogens: A Review. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. **14**(4), 7815–7828. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms14047815
- AMBAWAT, Supriya, Poonam SHARMA, Neelam R. YADAV a Ram C. YADAV, 2013. MYB transcription factor genes as regulators for plant responses: an overview. *Physiology and Molecular Biology of Plants* [online]. **19**(3), 307–321. ISSN 0974-0430. Dostupné z: doi:10.1007/s12298-013-0179-1
- ARGUESO, Cristiana T., Maureen HANSEN a Joseph J. KIEBER, 2007. Regulation of ethylene biosynthesis. *Journal of Plant Growth Regulation* [online]. **26**(2), 92–105. ISSN 0721-7595. Dostupné z: doi:10.1007/s00344-007-0013-5
- ARCHIBALD, J. M. a P. J. KEELING, 2004. Actin and ubiquitin protein sequences support a cercozoan/foraminiferan ancestry for the plasmodiophorid plant pathogens. *Journal of Eukaryotic Microbiology* [online]. **51**(1), 113–118. ISSN 1066-5234. Dostupné z: doi:10.1111/j.1550-7408.2004.tb00172.x
- ARIE, T., Y. KOBAYASHI, G. OKADA, Y. KONO a I. YAMAGUCHI, 1998. Control of soilborne clubroot disease of cruciferous plants by epoxydon from *Phoma glomerata*. *Plant Pathology*. **47**(6), 743–748. ISSN 0032-0862.
- AUER, LUDWIG-Müller S. a LUDWIG-Müller, J 2015. Biological control of clubroot (*Plasmodiophora brassicae*) by the endophytic fungus *Acremonium alternatum*. *Journal of Endocytobiosis and Cell Research*. 26. 43-49.
- BACETE, Laura, Hugo MÉLIDA, Eva MIEDES a Antonio MOLINA, 2018. Plant cell wall-mediated immunity: cell wall changes trigger disease resistance responses. *The Plant Journal* [online]. **93**(4), 614–636. ISSN 1365-313X. Dostupné z: doi:10.1111/tpj.13807
- BANCROFT, Ian, Colin MORGAN, Fiona FRASER, Janet HIGGINS, Rachel WELLS, Leah CLISSOLD, David BAKER, Yan LONG, Jinling MENG, Xiaowu WANG, Shengyi LIU a Martin TRICK, 2011. Dissecting the genome of the polyploid crop oilseed rape by transcriptome sequencing. *Nature Biotechnology* [online]. **29**(8), 762–766. ISSN 1087-0156, 1546-1696. Dostupné z: doi:10.1038/nbt.1926
- BERNOUX, Maud, Jeffrey G ELLIS a Peter N DODDS, 2011. New insights in plant immunity signaling activation. *Current Opinion in Plant Biology* [online]. **14**(5), 512–518. ISSN 13695266. Dostupné z: doi:10.1016/j.pbi.2011.05.005

- BEYRNE, Cecilia C., Norberto D. IUSEM a Rodrigo M. GONZÁLEZ, 2019. Effect of Salt Stress on Cytosine Methylation within GL2, An Arabidopsis thaliana Gene Involved in Root Epidermal Cell Differentiation. Absence of Inheritance in the Unstressed Progeny. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. **20**(18), 4446. Dostupné z: doi:10.3390/ijms20184446
- BHATTACHARYA, Indrabrata, Subrata DUTTA, Subhasis MONDAL a Bholanath MONDAL, 2014. Clubroot disease on Brassica crops in India. *Canadian Journal of Plant Pathology* [online]. **36**(sup1), 154–160. ISSN 0706-0661. Dostupné z: doi:10.1080/07060661.2013.875064
- BIGEARD, Jean, Jean COLCOMBET a Heribert HIRT, 2015. Signaling Mechanisms in Pattern-Triggered Immunity (PTI). *Molecular Plant* [online]. **8**(4), Cell Signaling, 521–539. ISSN 1674-2052. Dostupné z: doi:10.1016/j.molp.2014.12.022
- BIRKENBIHL, Rainer P., Barbara KRACHER, Mario ROCCARO a Imre E. SOMSSICH, 2017. Induced Genome-Wide Binding of Three Arabidopsis WRKY Transcription Factors during Early MAMP-Triggered Immunity. *The Plant Cell* [online]. **29**(1), 20–38. ISSN 1040-4651, 1532-298X. Dostupné z: doi:10.1105/tpc.16.00681
- BOLLER, Thomas a Georg FELIX, 2009. A Renaissance of Elicitors: Perception of Microbe-Associated Molecular Patterns and Danger Signals by Pattern-Recognition Receptors. *Annual Review of Plant Biology* [online]. **60**, 379–406. ISSN 1543-5008. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.arplant.57.032905.105346
- BRACUTO, Valentina, Michela APPIANO, Zheng ZHENG, Anne-Marie A. WOLTERS, Zhe YAN, Luigi RICCIARDI, Richard G. F. VISSER, Stefano PAVAN a Yuling BAI, 2017. Functional Characterization of a Syntaxin Involved in Tomato (*Solanum lycopersicum*) Resistance against Powdery Mildew. *Frontiers in Plant Science* [online]. **8** [vid. 2019-10-01]. ISSN 1664-462X. Dostupné z: doi:10.3389/fpls.2017.01573
- BROWN, David, Raymond WIGHTMAN, Zhinong ZHANG, Leonardo D. GOMEZ, Ivan ATANASSOV, John-Paul BUKOWSKI, Theodora TRYFONA, Simon J. MCQUEEN-MASON, Paul DUPREE a Simon TURNER, 2011. Arabidopsis genes IRREGULAR XYLEM (IRX15) and IRX15L encode DUF579-containing proteins that are essential for normal xylan deposition in the secondary cell wall. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* [online]. **66**(3), 401–413. ISSN 1365-313X. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-313X.2011.04501.x
- BROWN, P. D. a M. J. MORRA, 1997. Control of soil-borne plant pests using glucosinolate-containing plants. In: D. L. SPARKS, ed. *Advances in Agronomy, Vol 61*. San Diego: Elsevier Academic Press Inc, s. 167–231. ISBN 978-0-12-000761-5.
- BRUEX, Angela, Raghunandan M. KAINKARYAM, Yana WIECKOWSKI, Yeon Hee KANG, Christine BERNHARDT, Yang XIA, Xiaohua ZHENG, Jean Y. WANG, Myeong Min LEE, Philip BENFEY, Peter J. WOOLF a John SCHIEFELBEIN, 2012. A Gene Regulatory Network for Root Epidermis Cell Differentiation in Arabidopsis. *PLOS Genetics* [online]. **8**(1), e1002446. ISSN 1553-7404. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pgen.1002446

- 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* [online]. **65**(2), 295–303. ISSN 0007-1536. Dostupné z: doi:10.1016/S0007-1536(75)80013-1
- BUCZACKI, St a Jg WHITE, 1977. Preliminary Glasshouse and Field-Tests of Soil Partial Sterilants for Clubroot Control. *Annals of Applied Biology* [online]. **85**(2), 265–275. ISSN 0003-4746. Dostupné z: doi:10.1111/j.1744-7348.1977.tb01800.x
- BUCZACKI, S. 1998. Pests, Diseases and Disorders of Garden Plants, Collins, (1998), pp 449-50. ISBN 0-00-220063-5
- CAILLAUD, Marie-Cécile, Lennart WIRTHMUELLER, Jan SKLENAR, Kim FINDLAY, Sophie J. M. PIQUEREZ, Alexandra M. E. JONES, Silke ROBATZEK, Jonathan D. G. JONES a Christine FAULKNER, 2014. The plasmodesmal protein PDL1 localises to haustoria-associated membranes during downy mildew infection and regulates callose deposition. *PLoS pathogens* [online]. **10**(10), e1004496. ISSN 1553-7374. Dostupné z: doi:10.1371/journal.ppat.1004496
- CAMPE, Ruth, Caspar LANGENBACH, Franz LEISSING, George V. POPESCU, Sorina C. POPESCU, Katharina GOELLNER, Gerold J. M. BECKERS a Uwe CONRATH, 2016. ABC transporter PEN3/PDR8/ABCG36 interacts with calmodulin that, like PEN3, is required for Arabidopsis nonhost resistance. *The New Phytologist* [online]. **209**(1), 294–306. ISSN 1469-8137. Dostupné z: doi:10.1111/nph.13582
- CAO, Tiesen, Victor P. MANOLII, Sheau-Fang HWANG, Ronald J. HOWARD a Stephen E. STRELKOV, 2009. Virulence and spread of Plasmodiophora brassicae [clubroot] in Alberta, Canada. *Canadian Journal of Plant Pathology* [online]. **31**(3), 321–329. ISSN 0706-0661. Dostupné z: doi:10.1080/07060660909507606
- CAO, Tiesen, Jalpa TEWARI a Stephen E. STRELKOV, 2007. Molecular detection of Plasmodiophora brassicae, causal agent of clubroot of crucifers, in plant and soil. *Plant Disease* [online]. **91**(1), 80–87. ISSN 0191-2917. Dostupné z: doi:10.1094/PD-91-0080
- CARLINI, Celia R. a Rodrigo LIGABUE-BRAUN, 2016. Ureasas as multifunctional toxic proteins: A review. *Toxicon* [online]. **110**, 90–109. ISSN 00410101. Dostupné z: doi:10.1016/j.toxicon.2015.11.020
- CARRETERO-PAULET, Lorenzo, Anahit GALSTYAN, Irma ROIG-VILLANOVA, Jaime F. MARTÍNEZ-GARCÍA, Jose R. BILBAO-CASTRO a David L. ROBERTSON, 2010. Genome-Wide Classification and Evolutionary Analysis of the bHLH Family of Transcription Factors in Arabidopsis, Poplar, Rice, Moss, and Algae. *Plant Physiology* [online]. **153**(3), 1398–1412. ISSN 0032-0889, 1532-2548. Dostupné z: doi:10.1104/pp.110.153593
- CAVALIER-SMITH, T. a E. E. Y. CHAO, 2003. Phylogeny and classification of phylum Cercozoa (Protozoa). *Protist* [online]. **154**(3–4), 341–358. ISSN 1434-4610. Dostupné z: doi:10.1078/143446103322454112

CLAVERIE, Justine, Suzanne BALACEY, Christelle LEMAÎTRE-GUILLIER, Daphnée BRULÉ, Annick CHILTZ, Lucie GRANET, Elodie NOIROT, Xavier DAIRE, Benoît DARBLADE, Marie-Claire HÉLOIR a Benoit POINSSOT, 2018. The Cell Wall-Derived Xyloglucan Is a New DAMP Triggering Plant Immunity in *Vitis vinifera* and *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in Plant Science* [online]. **9** [vid. 2019-09-30]. ISSN 1664-462X. Dostupné z: doi:10.3389/fpls.2018.01725

COLE, Stephanie J. a Andrew C. DIENER, 2013. Diversity in receptor-like kinase genes is a major determinant of quantitative resistance to *Fusarium oxysporum* f.sp. *matthioli*. *The New Phytologist* [online]. **200**(1), 172–184. ISSN 1469-8137. Dostupné z: doi:10.1111/nph.12368

COLHOUN, John, 1957. A Technique for Examining Soil for the Presence of *Plasmodiophora Brassicae* Woron. *Annals of Applied Biology* [online]. **45**(3), 559–565. ISSN 0003-4746. Dostupné z: doi:10.1111/j.1744-7348.1957.tb05895.x

COPELAND CHARLES, WOLOSHEN VIRGINIA, HUANG YAN a LI XIN, 2016. AtCDC48A is involved in the turnover of an NLR immune receptor. *The Plant Journal* [online]. **88**(2), 294–305. ISSN 0960-7412. Dostupné z: doi:10.1111/tpj.13251

COUTO, Daniel a Cyril ZIPFEL, 2016. Regulation of pattern recognition receptor signalling in plants. *Nature Reviews Immunology* [online]. **16**(9), 537–552. ISSN 1474-1733, 1474-1741. Dostupné z: doi:10.1038/nri.2016.77

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* [online]. **8**(1), 17657. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-018-36187-5

DELESSERT, C., K. KAZAN, I. W. WILSON, D. VAN DER STRAETEN, J. MANNERS, E. S. DENNIS a R. DOLFERUS, 2005. The transcription factor ATAF2 represses the expression of pathogenesis-related genes in *Arabidopsis*. *Plant Journal* [online]. **43**(5), 745–757. ISSN 0960-7412. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-313X.2005.02488.x

DEORA, A., B. D. GOSSSEN, F. WALLEY a M. R. MCDONALD, 2011. Boron reduces development of clubroot in canola. *Canadian Journal of Plant Pathology* [online]. **33**(4), 475–484. ISSN 0706-0661. Dostupné z: doi:10.1080/07060661.2011.620630

DESVEAUX, Darrell, Alexandre MARÉCHAL a Normand BRISSON, 2005. Whirly transcription factors: defense gene regulation and beyond. *Trends in Plant Science* [online]. **10**(2), 95–102. ISSN 1360-1385. Dostupné z: doi:10.1016/j.tplants.2004.12.008

DEVOS, Sylvie, Kris VISSENBERG, Jean-Pierre VERBELEN a Els PRINSEN, 2005. Infection of Chinese cabbage by *Plasmodiophora brassicae* leads to a stimulation of plant growth: impacts on cell wall metabolism and hormone balance. *New Phytologist* [online]. **166**(1), 241–250. ISSN 1469-8137. Dostupné z: doi:10.1111/j.1469-8137.2004.01304.x@10.1002/(ISSN)1469-8137(CAT)SpecialIssues(VI)Plantecologicaldevelopment

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* [online]. **28**(3), 265–281. ISSN 0721-7595, 1435-8107. Dostupné z: doi:10.1007/s00344-009-9100-0

DIEDERICHSEN, Elke, Martin FRAUEN a Jutta LUDWIG-MUELLER, 2014. Special Issue: Clubroot disease management challenges from a German perspective. *Canadian Journal of Plant Pathology* [online]. **36**, 85–98. ISSN 0706-0661. Dostupné z: doi:10.1080/07060661.2013.861871

DIELEN, Anne-Sophie, Flavio Tetsuo SASSAKI, Jocelyne WALTER, Thierry MICHON, Guillaume MÉNARD, Gaëlle PAGNY, Renate KRAUSE-SAKATE, Ivan De Godoy MAIA, Saloua BADAoui, Olivier LE GALL, Thierry CANDRESSE a Sylvie GERMAN-RETANA, 2011. The 20S proteasome $\alpha 5$ subunit of Arabidopsis thaliana carries an RNase activity and interacts in planta with the lettuce mosaic potyvirus HcPro protein. *Molecular Plant Pathology* [online]. **12**(2), 137–150. ISSN 1364-3703. Dostupné z: doi:10.1111/j.1364-3703.2010.00654.x

DIXON, G. R., 2006. The biology of Plasmodiophora brassicae Wor. - A review of recent advances. In: Y. P. LIM, ed. *Proceedings of the Joint Meeting of the Fourteenth Crucifer Genetics Workshop and Fourth ISHS Symposium on Brassicas*. Leuven 1: International Society Horticultural Science, s. 271–282. ISBN 978-90-6605-445-5.

DIXON, Geoffrey R., 2009. Plasmodiophora brassicae in its Environment. *Journal of Plant Growth Regulation* [online]. **28**(3), 212–228. ISSN 0721-7595, 1435-8107. Dostupné z: doi:10.1007/s00344-009-9098-3

DIXON, Geoffrey Richard, 2015. Water, irrigation and plant diseases. *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources*. **10**, 1–18. ISSN 1749-8848.

DONALD, Caroline a Ian PORTER, 2009. Integrated Control of Clubroot. *Journal of Plant Growth Regulation* [online]. **28**(3), 289–303. ISSN 0721-7595. Dostupné z: doi:10.1007/s00344-009-9094-7

DONALD, E. C., J. M. LAWRENCE a I. J. PORTER, 2004. Influence of particle size and application method on the efficacy of calcium cyanamide for control of clubroot of vegetable brassicas. *Crop Protection* [online]. **23**(4), 297–303. ISSN 0261-2194. Dostupné z: doi:10.1016/j.cropro.2003.08.016

DONALD, E. Caroline a Ian J. PORTER, 2014. Clubroot in Australia: the history and impact of Plasmodiophora brassicae in Brassica crops and research efforts directed towards its control. *Canadian Journal of Plant Pathology* [online]. **36**(sup1), 66–84. ISSN 0706-0661. Dostupné z: doi:10.1080/07060661.2013.873482

ENGELSDORF, Timo a Thorsten HAMANN, 2014. An update on receptor-like kinase involvement in the maintenance of plant cell wall integrity. *Annals of Botany* [online]. **114**(6), 1339–1347. ISSN 0305-7364. Dostupné z: doi:10.1093/aob/mcu043

FAGGIAN, R., S. R. BULMAN, A. C. LAWRIE a I. J. PORTER, 1999. Specific polymerase chain reaction primers for the detection of *Plasmodiophora brassicae* in soil and water. *Phytopathology* [online]. **89**(5), 392–397. ISSN 0031-949X. Dostupné z: doi:10.1094/PHYTO.1999.89.5.392

FAGGIAN, Robert a Stephen E. STRELKOV, 2009. Detection and Measurement of *Plasmodiophora brassicae*. *Journal of Plant Growth Regulation* [online]. **28**(3), 282–288. ISSN 1435-8107. Dostupné z: doi:10.1007/s00344-009-9092-9

FENG, J., S.-F. HWANG a S. E. STRELKOV, 2013. Studies into primary and secondary infection processes by *Plasmodiophora brassicae* on canola. *Plant Pathology* [online]. **62**(1), 177–183. ISSN 1365-3059. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-3059.2012.02612.x

FENG, Jie, Tiesen CAO, Derek C. RENNIE, Stephen E. STRELKOV a Sheau-Fang HWANG, 2014. Special Issue: Host-parasite interactions in clubroot of crucifers. *Canadian Journal of Plant Pathology* [online]. **36**, 113–121. ISSN 0706-0661. Dostupné z: doi:10.1080/07060661.2013.860192

FREDUA-AGYEMAN, Rudolph a Habibur RAHMAN, 2016. Mapping of the clubroot disease resistance in spring *Brassica napus* canola introgressed from European winter canola cv. ‘Mendel’. *Euphytica* [online]. **211**(2), 201–213. ISSN 0014-2336, 1573-5060. Dostupné z: doi:10.1007/s10681-016-1730-2

FRIBERG, H., J. LAGERLOF a B. RAMERT, 2005. Germination of *Plasmodiophora brassicae* resting spores stimulated by a non-host plant. *European Journal of Plant Pathology* [online]. **113**(3), 275–281. ISSN 0929-1873. Dostupné z: doi:10.1007/s10658-005-2797-0

GAO, Minghui, Jinman LIU, Dongling BI, Zhibin ZHANG, Fang CHENG, Sanfeng CHEN a Yuelin ZHANG, 2008. MEKK1, MKK1/MKK2 and MPK4 function together in a mitogen-activated protein kinase cascade to regulate innate immunity in plants. *Cell Research* [online]. **18**(12), 1190–1198. ISSN 1001-0602. Dostupné z: doi:10.1038/cr.2008.300

GARRETT, Sd, 1945. The Root-Infecting Fungi. *Endeavour*. **4**(15), 104–107. ISSN 0160-9327.

GIBBS J. G. 1932 Weed host plants of club-root in New Zealand NZ J Agric

GOSSEN, Bruce D., Abhinandan DEORA, Gary PENG, Sheau-Fang HWANG a Mary Ruth MCDONALD, 2014. Special Issue: Effect of environmental parameters on clubroot development and the risk of pathogen spread. *Canadian Journal of Plant Pathology* [online]. **36**, 37–48. ISSN 0706-0661. Dostupné z: doi:10.1080/07060661.2013.859635

GOUHIER-DARIMONT, Caroline, André SCHMIESING, Christelle BONNET, Steve LASSUEUR a Philippe REYMOND, 2013. Signalling of *Arabidopsis thaliana* response to *Pieris brassicae* eggs shares similarities with PAMP-triggered immunity. *Journal of Experimental Botany* [online]. **64**(2), 665–674. ISSN 1460-2431. Dostupné z: doi:10.1093/jxb/ers362

HAN, Ling, Guo-Jing LI, Kwang-Yeol YANG, Guohong MAO, Ruigang WANG, Yidong LIU a Shuqun ZHANG, 2010. Mitogen-activated protein kinase 3 and 6 regulate

Botrytis cinerea-induced ethylene production in Arabidopsis. *Plant Journal* [online]. **64**(1), 114–127. ISSN 0960-7412. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-313X.2010.04318.x

HAN, Xiaofei, Sen LI, Miao ZHANG, Liuyi YANG, Yidong LIU, Juan XU a Shuqun ZHANG, 2019. Regulation of GDSL Lipase Gene Expression by the MPK3/MPK6 Cascade and Its Downstream WRKY Transcription Factors in Arabidopsis Immunity. *Molecular plant-microbe interactions: MPMI* [online]. **32**(6), 673–684. ISSN 0894-0282. Dostupné z: doi:10.1094/MPMI-06-18-0171-R

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* [online]. **30**(8), 798–802. ISSN 1087-0156, 1546-1696. Dostupné z: doi:10.1038/nbt.2302

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* [online]. **8**(1), e54745. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0054745

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* [online]. **93**(1), 181–192. ISSN 1365-313X. Dostupné z: doi:10.1111/tpj.13767

HAYASHI, Shimpei, Tadashi ISHII, Toshiro MATSUNAGA, Rumi TOMINAGA, Takashi KUROMORI, Takuji WADA, Kazuo SHINOZAKI a Takashi HIRAYAMA, 2008. The glycerophosphoryl diester phosphodiesterase-like proteins SHV3 and its homologs play important roles in cell wall organization. *Plant & Cell Physiology* [online]. **49**(10), 1522–1535. ISSN 1471-9053. Dostupné z: doi:10.1093/pcp/pcn120

HAYASHIDA, Nobuaki, Yuri TAKABATAKE, Norihiro NAKAZAWA, Daisuke ARUGA, Hiromitsu NAKANISHI, Goro TAGUCHI, Koji SAKAMOTO a Etsuo MATSUMOTO, 2008. Construction of a Practical SCAR Marker Linked to Clubroot Resistance in Chinese Cabbage, with Intensive Analysis of HC352b Genes. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* [online]. **77**(2), 150–154. Dostupné z: doi:10.2503/jjshs1.77.150

HE, Zhesi, Feng CHENG, Yi LI, Xiaowu WANG, Isobel A. P. PARKIN, Boulos CHALHOUB, Shengyi LIU a Ian BANCROFT, 2015. Construction of Brassica A and C genome-based ordered pan-transcriptomes for use in rapeseed genomic research. *Data in Brief* [online]. **4**, 357–362. ISSN 2352-3409. Dostupné z: doi:10.1016/j.dib.2015.06.016

HE, Zhesi, Lihong WANG, Andrea L. HARPER, Lenka HAVLICKOVA, Akshay K. PRADHAN, Isobel A. P. PARKIN a Ian BANCROFT, 2017. Extensive homoeologous genome exchanges in allopolyploid crops revealed by mRNAseq-based visualization.

Plant Biotechnology Journal [online]. **15**(5), 594–604. ISSN 1467-7644. Dostupné z: doi:10.1111/pbi.12657

HILDEBRAND, P. D. a K. D. MCRAE, 1998. Control of clubroot caused by *Plasmodiophora brassicae* with nonionic surfactants. *Canadian Journal of Plant Pathology* [online]. **20**(1), 1–11. ISSN 0706-0661. Dostupné z: doi:10.1080/07060669809500435

HIRAI, M., T. HARADA, N. KUBO, M. TSUKADA, K. SUWABE a S. MATSUMOTO, 2004. A novel locus for clubroot resistance in *Brassica rapa* and its linkage markers. *TAG Theoretical and Applied Genetics* [online]. **108**(4), 639–643. ISSN 0040-5752, 1432-2242. Dostupné z: doi:10.1007/s00122-003-1475-x

HIRANI, Arvind H., Feng GAO, Jun LIU, Guohua FU, Chunren WU, Yuxiang YUAN, Wei LI, Jinna HOU, Robert DUNCAN a Genyi LI, 2016. Transferring clubroot resistance from Chinese cabbage (*Brassica rapa*) to canola (*B. napus*). *Canadian Journal of Plant Pathology* [online]. **38**(1), 82–90. ISSN 0706-0661. Dostupné z: doi:10.1080/07060661.2016.1141799

HOWARD, R. J., D. A. BURKE, S. E. STRELKOV, D. C. RENNIE, C. A. PUGH, S. L. I. LISOWSKI, M. W. HARDING a G. C. DANIELS, 2014. Evaluation of methods for cleaning and disinfecting equipment contaminated with clubroot. *Canadian Journal of Plant Pathology*. **36**(2), 266–266. ISSN 0706-0661.

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* [online]. **32**(1), 43–57. ISSN 0706-0661, 1715-2992. Dostupné z: doi:10.1080/07060661003621761

HUANG, Zhen, Gary PENG, Xunjia LIU, Abhinandan DEORA, Kevin C. FALK, Bruce D. GOSSEN, Mary R. MCDONALD a Fengqun YU, 2017. Fine Mapping of a Clubroot Resistance Gene in Chinese Cabbage Using SNP Markers Identified from Bulk Segregant RNA Sequencing. *Frontiers in Plant Science* [online]. **8** [vid. 2019-04-02]. ISSN 1664-462X. Dostupné z: doi:10.3389/fpls.2017.01448

HWANG, In Sun, Nak Hyun KIM, Du Seok CHOI a Byung Kook HWANG, 2012a. Overexpression of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* effector AvrBsT in *Arabidopsis* triggers plant cell death, disease and defense responses. *Planta* [online]. **236**(4), 1191–1204. ISSN 1432-2048. Dostupné z: doi:10.1007/s00425-012-1672-4

HWANG, S. F., H. U. AHMED, Q. ZHOU, S. E. STRELKOV, B. D. GOSSEN, G. PENG a G. D. TURNBULL, 2011. Influence of cultivar resistance and inoculum density on root hair infection of canola (*Brassica napus*) by *Plasmodiophora brassicae*. *Plant Pathology* [online]. **60**(5), 820–829. ISSN 0032-0862. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-3059.2011.02457.x

HWANG, S. F., H. U. AHMED, Q. ZHOU, S. E. STRELKOV, B. D. GOSSEN, G. PENG a G. D. TURNBULL, 2014. Efficacy of Vapam fumigant against clubroot (*Plasmodiophora brassicae*) of canola. *Plant Pathology* [online]. **63**(6), 1374–1383. ISSN 0032-0862. Dostupné z: doi:10.1111/ppa.12207

HWANG, Sheau-Fang, Stephen E. STRELKOV, Jie FENG, Bruce D. GOSSEN a Ron J. HOWARD, 2012b. Plasmodiophora brassicae: a review of an emerging pathogen of the Canadian canola (Brassica napus) crop: Progress on canola clubroot research. *Molecular Plant Pathology* [online]. **13**(2), 105–113. ISSN 14646722. Dostupné z: doi:10.1111/j.1364-3703.2011.00729.x

CHAI, A. L., X. W. XIE, Y. X. SHI a B. J. LI, 2014. Research status of clubroot (Plasmodiophora brassicae) on cruciferous crops in China. *Canadian Journal of Plant Pathology* [online]. **36**(sup1), 142–153. ISSN 0706-0661. Dostupné z: doi:10.1080/07060661.2013.868829

CHEN, Jingjing, Jing JING, Zhongxiang ZHAN, Teng ZHANG, Chunyu ZHANG a Zhongyun PIAO, 2013. Identification of Novel QTLs for Isolate-Specific Partial Resistance to Plasmodiophora brassicae in Brassica rapa. *PLoS ONE* [online]. **8**(12), e85307. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0085307

CHEN, Jingjing, Wenxing PANG, Bing CHEN, Chunyu ZHANG a Zhongyun PIAO, 2016. Transcriptome Analysis of Brassica rapa Near-Isogenic Lines Carrying Clubroot-Resistant and –Susceptible Alleles in Response to Plasmodiophora brassicae during Early Infection. *Frontiers in Plant Science* [online]. **6** [vid. 2018-03-29]. ISSN 1664-462X. Dostupné z: doi:10.3389/fpls.2015.01183

CHEN, Qingfeng, Quan WANG, Lizhong XIONG a Zhiyong LOU, 2011. A structural view of the conserved domain of rice stress-responsive NAC1. *Protein & Cell* [online]. **2**(1), 55–63. ISSN 1674-800X, 1674-8018. Dostupné z: doi:10.1007/s13238-011-1010-9

CHU, Mingguang, Tao SONG, Kevin C FALK, Xingguo ZHANG, Xunjia LIU, Adrian CHANG, Rachid LAHLALI, Linda MCGREGOR, Bruce D GOSSEN, Fengqun YU a Gary PENG, 2014. Fine mapping of Rcr1 and analyses of its effect on transcriptome patterns during infection by Plasmodiophora brassicae. *BMC Genomics* [online]. **15**(1), 1166. ISSN 1471-2164. Dostupné z: doi:10.1186/1471-2164-15-1166

CHYTILOVÁ, Věra a Karel DUŠEK, 2007. *Metodika testování odolnosti brukvovitých plodin k nádorovitosti*. Praha: Výzkumný ústav rostlinné výroby. ISBN 978-80-87011-23-2.

IRANI, Solmaz, Christopher D. TODD, Yangdou WEI a Peta C. BONHAM-SMITH, 2019. Changes in phenylpropanoid pathway gene expression in roots and leaves of susceptible and resistant Brassica napus lines in response to Plasmodiophora brassicae inoculation. *Physiological and Molecular Plant Pathology* [online]. **106**, 196–203. ISSN 0885-5765. Dostupné z: doi:10.1016/j.pmpp.2019.02.007

ISHIHAMA, Nobuaki a Hirofumi YOSHIOKA, 2012. Post-translational regulation of WRKY transcription factors in plant immunity. *Current Opinion in Plant Biology* [online]. **15**(4), Biotic interactions, 431–437. ISSN 1369-5266. Dostupné z: doi:10.1016/j.pbi.2012.02.003

ITO, S., T. MAEHARA, E. MARUNO, S. TANAKA, M. KAMEYA-IWAKI a F. KISHI, 1999. Development of a PCR-based assay for the detection of Plasmodiophora

brassicae in soil. *Journal of Phytopathology-Phytopathologische Zeitschrift* [online]. **147**(2), 83–88. ISSN 0931-1785. Dostupné z: doi:10.1111/j.1439-0434.1999.tb03812.x

JAHN, Linda, Stefanie MUCHA, Sabine BERGMANN, Cornelia HORN, Paul STASWICK, Bianka STEFFENS, Johannes SIEMENS a Jutta LUDWIG-MÜLLER, 2013. The Clubroot Pathogen (*Plasmodiophora brassicae*) Influences Auxin Signaling to Regulate Auxin Homeostasis in *Arabidopsis*. *Plants* [online]. **2**(4), 726–749. ISSN 2223-7747. Dostupné z: doi:10.3390/plants2040726

JENSEN, Michael K., Trine KJAERGAARD, Michael M. NIELSEN, Pernille GALBERG, Klaus PETERSEN, Charlotte O'SHEA a Karen SKRIVER, 2010. The *Arabidopsis thaliana* NAC transcription factor family: structure-function relationships and determinants of ANAC019 stress signalling. *Biochemical Journal* [online]. **426**, 183–196. ISSN 0264-6021. Dostupné z: doi:10.1042/BJ20091234

JONES, Alexandra M. E., Vincent THOMAS, Mark H. BENNETT, John MANSFIELD a Murray GRANT, 2006. Modifications to the *Arabidopsis* Defense Proteome Occur Prior to Significant Transcriptional Change in Response to Inoculation with *Pseudomonas syringae*. *Plant Physiology* [online]. **142**(4), 1603–1620. ISSN 0032-0889, 1532-2548. Dostupné z: doi:10.1104/pp.106.086231

KAGEYAMA, Koji, Tsutomu KOMATSU a Haruhisa SUGA, 2003. Refined PCR protocol for detection of plant pathogens in soil. *Journal of General Plant Pathology* [online]. **69**(3), 153–160. ISSN 1345-2630. Dostupné z: doi:10.1007/s10327-002-0037-4

KANEDA, Takashi, Yuri TAGA, Ryota TAKAI, Megumi IWANO, Hiroyoshi MATSUI, Seiji TAKAYAMA, Akira ISOGAI a Fang-Sik CHE, 2009. The transcription factor OsNAC4 is a key positive regulator of plant hypersensitive cell death. *Embo Journal* [online]. **28**(7), 926–936. ISSN 0261-4189. Dostupné z: doi:10.1038/emboj.2009.39

KARLING, Js, 1968. Zoosporic Fungi of Oceania .3. Monocentric Chytrids. *Archiv Fur Mikrobiologie* [online]. **61**(2), 112–+. ISSN 0003-9276. Dostupné z: doi:10.1007/BF00412148

KATO, Takeyuki, Katsunori HATAKEYAMA, Nobuko FUKINO a Satoru MATSUMOTO, 2013. Fine mapping of the clubroot resistance gene CRb and development of a useful selectable marker in *Brassica rapa*. *Breeding Science* [online]. **63**(1), 116–124. ISSN 1344-7610, 1347-3735. Dostupné z: doi:10.1270/jsbbs.63.116

KAZAN, Kemal a John M. MANNERS, 2009. Linking development to defense: auxin in plant–pathogen interactions. *Trends in Plant Science* [online]. **14**(7), 373–382. ISSN 13601385. Dostupné z: doi:10.1016/j.tplants.2009.04.005

KOPECKY, P. a K. DUSEK, 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. ISBN 978-90-6605-585-8.

KORBAS M., JAJOR, E., KACZMAREK, J., PEREK, A., a JEDRYCZKA, M. 2014. Infestation of Polish agricultural soils by *Plasmodiophora brassicae* on the Polish-Belarussian border in Podlasie province. *Integrated Control in Oilseed Crops Bulletin*, 104, 167–171.

KREADER, C. A., 1996. Relief of amplification inhibition in PCR with bovine serum albumin or. *Applied and Environmental Microbiology*. **62**(3), 1102–1106. ISSN 0099-2240.

KULICH, Ivan, Zdeňka VOJTÍKOVÁ, Matouš GLANC, Jitka ORTMANNOVÁ, Sergio RASMANN a Viktor ŽÁRSKÝ, 2015. Cell wall maturation of *Arabidopsis* trichomes is dependent on exocyst subunit EXO70H4 and involves callose deposition. *Plant Physiology* [online]. **168**(1), 120–131. ISSN 1532-2548. Dostupné z: doi:10.1104/pp.15.00112

KUSHALAPPA, Ajjamada C., Kalenahalli N. YOGENDRA a Shailesh KARRE, 2016. Plant Innate Immune Response: Qualitative and Quantitative Resistance. *Critical Reviews in Plant Sciences* [online]. **35**(1), 38–55. ISSN 0735-2689. Dostupné z: doi:10.1080/07352689.2016.1148980

KWON, Yerim, Jun Hyeok KIM, Hoai Nguyen NGUYEN, Yusuke JIKUMARU, Yuji KAMIYA, Suk-Whan HONG a Hojoung LEE, 2013. A novel *Arabidopsis* MYB-like transcription factor, MYBH, regulates hypocotyl elongation by enhancing auxin accumulation. *Journal of Experimental Botany* [online]. **64**(12), 3911–3922. ISSN 1460-2431. Dostupné z: doi:10.1093/jxb/ert223

LABUDDA, Mateusz, Elżbieta RÓŻAŃSKA, Joanna SZEWIŃSKA, Mirosław SOBCZAK a Jolanta Maria DZIK, 2016. Protease activity and phytocystatin expression in *Arabidopsis thaliana* upon *Heterodera schachtii* infection. *Plant physiology and biochemistry: PPB* [online]. **109**, 416–429. ISSN 1873-2690. Dostupné z: doi:10.1016/j.plaphy.2016.10.021

LANDRY, Benoit S., Nathalie HUBERT, René CRETE, Morgan S. CHANG, Steven E. LINCOLN a Takeomi ETOH, 1992. A genetic map for *Brassica oleracea* based on RFLP markers detected with expressed DNA sequences and mapping of resistance genes to race 2 of *Plasmodiophora brassicae* (Woronin). *Genome* [online]. **35**(3), 409–420. ISSN 0831-2796, 1480-3321. Dostupné z: doi:10.1139/g92-061

LAZNIEWSKA, Joanna, Violetta Katarzyna MACIOSZEK a Andrzej Kiejstut KONONOWICZ, 2012. Plant-fungus interface: The role of surface structures in plant resistance and susceptibility to pathogenic fungi. *Physiological and Molecular Plant Pathology* [online]. **78**, 24–30. ISSN 0885-5765. Dostupné z: doi:10.1016/j.pmpp.2012.01.004

LE, Mi Ha, Yangrong CAO, Xue-Cheng ZHANG a Gary STACEY, 2014. LIK1, A CERK1-Interacting Kinase, Regulates Plant Immune Responses in *Arabidopsis*. *PLOS ONE* [online]. **9**(7), e102245. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0102245

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* [online]. **96**(6), 833–838. ISSN 0191-2917. Dostupné z: doi:10.1094/PDIS-09-11-0807

LEE, Dong Sook, Bo Kyung KIM, Sun Jae KWON, Hak Chul JIN a Ohkmae K. PARK, 2009. Arabidopsis GDSL lipase 2 plays a role in pathogen defense via negative regulation of auxin signaling. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. **379**(4), 1038–1042. ISSN 0006-291X. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbrc.2009.01.006

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* [online]. dsv034. ISSN 1340-2838, 1756-1663. Dostupné z: doi:10.1093/dnares/dsv034

LI, Lei, Xiaofei YU, Addie THOMPSON, Michelle GUO, Shigeo YOSHIDA, Tadao ASAMI, Joanne CHORY a Yanhai YIN, 2009. Arabidopsis MYB30 is a direct target of BES1 and cooperates with BES1 to regulate brassinosteroid-induced gene expression. *Plant Journal* [online]. **58**(2), 275–286. ISSN 0960-7412. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-313X.2008.03778.x

LI, Lixia, Yujie LUO, Biyun CHEN, Kun XU, Fugui ZHANG, Hao LI, Qian HUANG, Xin XIAO, Tianyao ZHANG, Jihong HU, Feng LI a Xiaoming WU, 2016. A Genome-Wide Association Study Reveals New Loci for Resistance to Clubroot Disease in Brassica napus. *Frontiers in Plant Science* [online]. **7** [vid. 2018-03-29]. ISSN 1664-462X. Dostupné z: doi:10.3389/fpls.2016.01483

LICAUSI, Francesco, Masaru OHME-TAKAGI a Pierdomenico PERATA, 2013. APETALA2/Ethylene Responsive Factor (AP2/ERF) transcription factors: mediators of stress responses and developmental programs. *New Phytologist* [online]. **199**(3), 639–649. ISSN 1469-8137. Dostupné z: doi:10.1111/nph.12291

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* [online]. **28**(18), 2397–2399. ISSN 1367-4803. Dostupné z: doi:10.1093/bioinformatics/bts444

LIU, Lijing, Fathi-Mohamed SONBOL, Bethany HUOT, Yangnan GU, John WITHERS, Musoki MWIMBA, Jian YAO, Sheng Yang HE a Xinnian DONG, 2016. Salicylic acid receptors activate jasmonic acid signalling through a non-canonical pathway to promote effector-triggered immunity. *Nature Communications* [online]. **7**, 13099. ISSN 2041-1723. Dostupné z: doi:10.1038/ncomms13099

LIU, Ruoxue, Beibei LU, Xiaomeng WANG, Chunling ZHANG, Shuping ZHANG, Jun QIAN, Lei CHEN, Haojie SHI a Hansong DONG, 2010. Thirty-seven transcription factor genes differentially respond to a harpin protein and affect resistance to the green peach aphid in Arabidopsis. *Journal of Biosciences* [online]. **35**(3), 435–450. ISSN 0250-5991. Dostupné z: doi:10.1007/s12038-010-0049-8

- LU, G., A. L. HARPER, M. TRICK, C. MORGAN, F. FRASER, C. O'NEILL a I. BANCROFT, 2014. Associative Transcriptomics Study Dissects the Genetic Architecture of Seed Glucosinolate Content in *Brassica napus*. *DNA Research* [online]. **21**(6), 613–625. ISSN 1340-2838, 1756-1663. Dostupné z: doi:10.1093/dnares/dsu024
- LUDWIG-MULLER, J., R. N. BENNETT, G. KIDDLE, S. IHMIG, M. RUPPEL a W. HILGENBERG, 1999. The host range of *Plasmodiophora brassicae* and its relationship to endogenous glucosinolate content. *New Phytologist* [online]. **141**(3), 443–458. ISSN 0028-646X. Dostupné z: doi:10.1046/j.1469-8137.1999.00368.x
- LUDWIG-MÜLLER, Jutta, Els PRINSEN, Stephen A. ROLFE a Julie D. SCHOLE, 2009. Metabolism and Plant Hormone Action During Clubroot Disease. *Journal of Plant Growth Regulation* [online]. **28**(3), 229–244. ISSN 0721-7595, 1435-8107. Dostupné z: doi:10.1007/s00344-009-9089-4
- LYONS, Rebecca, Akira IWASE, Thomas GÄNSEWIG, Alexander SHERSTNEV, Céline DUC, Geoffrey J. BARTON, Kousuke HANADA, Mieko HIGUCHI-TAKEUCHI, Minami MATSUI, Keiko SUGIMOTO, Kemal KAZAN, Gordon G. SIMPSON a Ken SHIRASU, 2013. The RNA-binding protein FPA regulates flg22-triggered defense responses and transcription factor activity by alternative polyadenylation. *Scientific Reports* [online]. **3**, 2866. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/srep02866
- MACHO, Alberto P. a Cyril ZIPFEL, 2015. Targeting of plant pattern recognition receptor-triggered immunity by bacterial type-III secretion system effectors. *Current Opinion in Microbiology* [online]. **23**, 14–22. ISSN 1369-5274. Dostupné z: doi:10.1016/j.mib.2014.10.009
- MANZANARES-DAULEUX, M. J., R. DELOURME, F. BARON a G. THOMAS, 2000. Mapping of one major gene and of QTLs involved in resistance to clubroot in *Brassica napus*. *TAG Theoretical and Applied Genetics* [online]. **101**(5–6), 885–891. ISSN 0040-5752, 1432-2242. Dostupné z: doi:10.1007/s001220051557
- MCGRANN, Graham R. D., Peter GLADDERS, Julie A. SMITH a Fiona BURNETT, 2016. Control of clubroot (*Plasmodiophora brassicae*) in oilseed rape using varietal resistance and soil amendments. *Field Crops Research* [online]. **186**, 146–156. ISSN 0378-4290. Dostupné z: doi:10.1016/j.fcr.2015.11.013
- MERCHANTE, Catharina, Jose M ALONSO a Anna N STEPANOVA, 2013. Ethylene signaling: simple ligand, complex regulation. *Current Opinion in Plant Biology* [online]. **16**(5), Cell Signalling and Gene Regulation, 554–560. ISSN 1369-5266. Dostupné z: doi:10.1016/j.pbi.2013.08.001
- MEYERS, Blake C., Michele MORGANTE a Richard W. MICHELMORE, 2002. TIR-X and TIR-NBS proteins: two new families related to disease resistance TIR-NBS-LRR proteins encoded in *Arabidopsis* and other plant genomes. *The Plant Journal* [online]. **32**(1), 77–92. ISSN 1365-313X. Dostupné z: doi:10.1046/j.1365-313X.2002.01404.x
- MCHALE, Leah, Xiaoping TAN, Patrice KOEHL a Richard W MICHELMORE, 2006. Plant NBS-LRR proteins: adaptable guards. *Genome Biology* [online]. **7**(4), 212. ISSN 1465-6906. Dostupné z: doi:10.1186/gb-2006-7-4-212

- MISHINA, Tatiana E. a Juergen ZEIER, 2007. Pathogen-associated molecular pattern recognition rather than development of tissue necrosis contributes to bacterial induction of systemic acquired resistance in Arabidopsis. *Plant Journal* [online]. **50**(3), 500–513. ISSN 0960-7412. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-313X.2007.03067.x
- MITANI, S., K. SUGIMOTO, H. HAYASHI, Y. TAKII, T. OHSHIMA a N. MATSUO, 2003. Effects of cyazofamid against Plasmodiophora brassicae Woronin on Chinese cabbage. *Pest Management Science* [online]. **59**(3), 287–293. ISSN 1526-498X. Dostupné z: doi:10.1002/ps.627
- MOHR, Peter G. a David M. CAHILL, 2007. Suppression by ABA of salicylic acid and lignin accumulation and the expression of multiple genes, in Arabidopsis infected with Pseudomonas syringae pv. tomato. *Functional & Integrative Genomics* [online]. **7**(3), 181–191. ISSN 1438-7948. Dostupné z: doi:10.1007/s10142-006-0041-4
- MORAN, Ma, VI TORSVIK, T. TORSVIK a Re HODSON, 1993. Direct Extraction and Purification of Ribosomal-Rna for Ecological-Studies. *Applied and Environmental Microbiology*. **59**(3), 915–918. ISSN 0099-2240.
- MURAKAMI, Hiroharu, Seiya TSUSHIMA, Takayuki AKIMOTO a Yoshihiro SHISHIDO, 2001. Reduction of Spore Density of Plasmodiophora brassicae in Soil by Decoy Plants. *Journal of General Plant Pathology* [online]. **67**(1), 85–88. ISSN 1345-2630. Dostupné z: doi:10.1007/PL00012994
- MYRACH, Till, Anting ZHU a Claus-Peter WITTE, 2017. The assembly of the plant urease activation complex and the essential role of the urease accessory protein G (UreG) in delivery of nickel to urease. *The Journal of Biological Chemistry* [online]. **292**(35), 14556–14565. ISSN 1083-351X. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M117.780403
- NAGAOKA, T., M. A. U. DOULLAH, S. MATSUMOTO, S. KAWASAKI, T. ISHIKAWA, H. HORI a K. OKAZAKI, 2010. Identification of QTLs that control clubroot resistance in Brassica oleracea and comparative analysis of clubroot resistance genes between B. rapa and B. oleracea. *Theoretical and Applied Genetics* [online]. **120**(7), 1335–1346. ISSN 0040-5752, 1432-2242. Dostupné z: doi:10.1007/s00122-010-1259-z
- NAKASHITA, H., M. YASUDA, T. NITTA, T. ASAMI, S. FUJIOKA, Y. ARAI, K. SEKIMATA, S. TAKATSUTO, I. YAMAGUCHI a S. YOSHIDA, 2003. Brassinosteroid functions in a broad range of disease resistance in tobacco and rice. *Plant Journal* [online]. **33**(5), 887–898. ISSN 0960-7412. Dostupné z: doi:10.1046/j.1365-313X.2003.01675.x
- NARISAWA, K., M. SHIMURA, F. USUKI, S. FUKUHARA a T. HASHIBA, 2005. Effects of pathogen density, soil moisture, and soil pH on biological control of clubroot in Chinese cabbage by heteroconium chaetospora. *Plant Disease* [online]. **89**(3), 285–290. ISSN 0191-2917. Dostupné z: doi:10.1094/PD-89-0285
- NAVARRO, Lionel, Rajendra BARI, Patrick ACHARD, Purificacion LISON, Adnane NEMRI, Nicholas P. HARBERD a Jonathan D. G. JONES, 2008. DELLAs control plant immune responses by modulating the balance and salicylic acid signaling. *Current*

Biology [online]. **18**(9), 650–655. ISSN 0960-9822. Dostupné z: doi:10.1016/j.cub.2008.03.060

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* [online]. **58**(5), 469–470. ISSN 1066-5234. Dostupné z: doi:10.1111/j.1550-7408.2011.00571.x

NEUHAUSER, Sigrid, Martin KIRCHMAIR, Simon BULMAN a David BASS, 2014. Cross-kingdom host shifts of phytomyxid parasites. *Bmc Evolutionary Biology* [online]. **14**, 33. ISSN 1471-2148. Dostupné z: doi:10.1186/1471-2148-14-33

NGUYEN, M. L., G. F. MONAKHOS, R. A. KOMAKHIN a S. G. MONAKHOS, 2018. The New Clubroot Resistance Locus Is Located on Chromosome A05 in Chinese Cabbage (*Brassica rapa* L.). *Russian Journal of Genetics* [online]. **54**(3), 296–304. ISSN 1608-3369. Dostupné z: doi:10.1134/S1022795418030080

NIR, Ido, Menachem MOSHELION a David WEISS, 2014. The Arabidopsis gibberellin methyl transferase 1 suppresses gibberellin activity, reduces whole-plant transpiration and promotes drought tolerance in transgenic tomato. *Plant, Cell & Environment* [online]. **37**(1), 113–123. ISSN 1365-3040. Dostupné z: doi:10.1111/pce.12135

OH, Il Seok, Ae Ran PARK, Min Seok BAE, Sun Jae KWON, Young Soon KIM, Ji Eun LEE, Na Young KANG, Sumin LEE, Hyeonsook CHEONG a Ohkmae K. PARK, 2005. Secretome analysis reveals an Arabidopsis lipase involved in defense against *Alternaria brassicicola*. *The Plant Cell* [online]. **17**(10), 2832–2847. ISSN 1040-4651. Dostupné z: doi:10.1105/tpc.105.034819

OHI, M., T. KITAMURA a S. HATA, 2003. Stimulation by caffeic acid, coumalic acid, and corilagin of the germination of resting spores of the clubroot pathogen plasmodiophora brassicae. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* [online]. **67**(1), 170–173. ISSN 0916-8451. Dostupné z: doi:10.1271/bbb.67.170

OOKA, H., K. SATOH, K. DOI, T. NAGATA, Y. OTOMO, K. MURAKAMI, K. MATSUBARA, N. OSATO, J. KAWAI, P. CARNINCI, Y. HAYASHIZAKI, K. SUZUKI, K. KOJIMA, Y. TAKAHARA, K. YAMAMOTO a S. KIKUCHI, 2003. Comprehensive analysis of NAC family genes in *Oryza sativa* and *Arabidopsis thaliana*. *Dna Research* [online]. **10**(6), 239–247. ISSN 1340-2838. Dostupné z: doi:10.1093/dnares/10.6.239

PAEPE, Annelies De, Marnik VUYLSTEKE, Paul Van HUMMELEN, Marc ZABEAU a Dominique Van Der STRAETEN, 2004. Transcriptional profiling by cDNA-AFLP and microarray analysis reveals novel insights into the early response to ethylene in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* [online]. **39**(4), 537–559. ISSN 1365-313X. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-313X.2004.02156.x

PANG, Wenxing, Pengyu FU, Xiaonan LI, Zongxiang ZHAN, Sha YU a Zhongyun PIAO, 2018. Identification and Mapping of the Clubroot Resistance Gene CRd in Chinese Cabbage (*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*). *Frontiers in Plant Science* [online]. **9** [vid. 2019-04-01]. ISSN 1664-462X. Dostupné z: doi:10.3389/fpls.2018.00653

PENG, Gary, Rachid LAHLALI, Sheau-Fang HWANG, Denis PAGEAU, Russell K. HYNES, Mary Ruth MCDONALD, Bruce D. GOSSSEN a Stephen E. STRELKOV, 2014. Special Issue: Crop rotation, cultivar resistance, and fungicides/biofungicides for managing clubroot (*Plasmodiophora brassicae*) on canola. *Canadian Journal of Plant Pathology* [online]. **36**, 99–112. ISSN 0706-0661. Dostupné z: doi:10.1080/07060661.2013.860398

PENG, Gary, Denis PAGEAU, Stephen E. STRELKOV, Bruce D. GOSSSEN, Sheau-Fang HWANG a Rachid LAHLALI, 2015. A > 2-year crop rotation reduces resting spores of *Plasmodiophora brassicae* in soil and the impact of clubroot on canola. *European Journal of Agronomy* [online]. **70**, 78–84. ISSN 1161-0301. Dostupné z: doi:10.1016/j.eja.2015.07.007

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* [online]. **9** [vid. 2019-05-10]. ISSN 1664-462X. Dostupné z: doi:10.3389/fpls.2018.00822

PIAO, Z. Y., Y. Q. DENG, S. R. CHOI, Y. J. PARK a Y. P. LIM, 2004. SCAR and CAPS mapping of CRb, a gene conferring resistance to *Plasmodiophora brassicae* in Chinese cabbage (*Brassica rapa* ssp *pekinensis*). *Theoretical and Applied Genetics* [online]. **108**(8), 1458–1465. ISSN 0040-5752. Dostupné z: doi:10.1007/s00122-003-1577-5

PIETERSE, Corné M.J., Dieuwertje VAN DER DOES, Christos ZAMIOUDIS, Antonio LEON-REYES a Saskia C.M. VAN WEES, 2012. Hormonal Modulation of Plant Immunity. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* [online]. **28**(1), 489–521. ISSN 1081-0706, 1530-8995. Dostupné z: doi:10.1146/annurev-cellbio-092910-154055

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* [online]. **198**(4), 1421–+. ISSN 0016-6731. Dostupné z: doi:10.1534/genetics.114.171314/-/DC1

PORTEOUS, La, JI ARMSTRONG, Rj SEIDLER a Ls WATRUD, 1994. An Effective Method to Extract Dna from Environmental-Samples for Polymerase Chain-Reaction Amplification and Dna Fingerprint Analysis. *Current Microbiology* [online]. **29**(5), 301–307. ISSN 0343-8651. Dostupné z: doi:10.1007/BF01577445

PROIETTI, Silvia, Lotte CAARLS, Silvia COOLEN, Johan A. Van PELT, Saskia C. M. Van WEES a Corné M. J. PIETERSE, 2018. Genome-wide association study reveals novel players in defense hormone crosstalk in *Arabidopsis*. *Plant, Cell & Environment* [online]. **41**(10), 2342–2356. ISSN 1365-3040. Dostupné z: doi:10.1111/pce.13357

PURANIK, Swati, Pranav Pankaj SAHU, Prem S. SRIVASTAVA a Manoj PRASAD, 2012. NAC proteins: regulation and role in stress tolerance. *Trends in Plant Science* [online]. **17**(6), 369–381. ISSN 1360-1385. Dostupné z: doi:10.1016/j.tplants.2012.02.004

RANF, Stefanie, Nicolas GISCH, Milena SCHAEFFER, Tina ILLIG, Lore WESTPHAL, Yuriy A. KNIREL, Patricia M. SANCHEZ-CARBALLO, Ulrich ZAEHRINGER, Ralph HUECKELHOVEN, Justin LEE a Dierk SCHEEL, 2015. A lectin S-domain receptor kinase mediates lipopolysaccharide sensing in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Immunology* [online]. **16**(4), 426–433. ISSN 1529-2908. Dostupné z: doi:10.1038/ni.3124

REDDY P. P. 2017 Crop Rotation. In: *Agro-ecological Approaches to Pest Management for Sustainable Agriculture*. Springer, Singapore

RENNIE, D. C., V. P. MANOLII, T. CAO, S. F. HWANG, R. J. HOWARD a S. E. STRELKOV, 2011. Direct evidence of surface infestation of seeds and tubers by *Plasmodiophora brassicae* and quantification of spore loads. *Plant Pathology* [online]. **60**(5), 811–819. ISSN 0032-0862. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-3059.2011.02449.x

RENNIE, Derek C., Michael D. HOLTZ, T. Kelly TURKINGTON, Jared M. LEBOLDUS, Sheau-Fang HWANG, Ron J. HOWARD a Stephen E. STRELKOV, 2015. Movement of *Plasmodiophora brassicae* resting spores in windblown dust. *Canadian Journal of Plant Pathology* [online]. **37**(2), 188–196. ISSN 0706-0661. Dostupné z: doi:10.1080/07060661.2015.1036362

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* [online]. **135**(4), 771–781. ISSN 0929-1873. Dostupné z: doi:10.1007/s10658-012-0119-x

ROD J. 1996. Reports – Agent of clubroot of crucifer. Brno: ÚKZUZ, 37 (Special Issue): 1–45.

ROD J. 1986. Dosavadní zjišťování výskytu nádorovitosti /*Plasmodiophora brassicae* Wor./ v Československu. X.Czechoslovak Plant Protec. Conf. Brno Sep. 2 – 5, s. 103 – 104.

ROCHERIEUX, J., P. GLORY, A. GIBOULOT, S. BOURY, G. BARBEYRON, G. THOMAS a M. J. MANZANARES-DAULEUX, 2004. Isolate-specific and broad-spectrum QTLs are involved in the control of clubroot in *Brassica oleracea*. *Theoretical and Applied Genetics* [online]. **108**(8), 1555–1563. ISSN 0040-5752, 1432-2242. Dostupné z: doi:10.1007/s00122-003-1580-x

ROUXEL, F., Y. HERVE a P. ROUSSELLE, 1983. Study of Physiologic Specialization in *Plasmodiophora-Brassicaceae* - Detection of Several Pathotypes in France - Reaction of Some Crucifers. *Agronomie*. **3**(1), 93–93. ISSN 0249-5627.

RUSHTON, Paul J., Imre E. SOMSSICH, Patricia RINGLER a Qingxi J. SHEN, 2010. WRKY transcription factors. *Trends in Plant Science* [online]. **15**(5), 247–258. ISSN 1360-1385. Dostupné z: doi:10.1016/j.tplants.2010.02.006

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* [online]. **52**(No. 2), 71–86. ISSN 12122580, 18059341. Dostupné z: doi:10.17221/87/2015-PPS

ŘIČAŘOVÁ, Veronika, Jan KAZDA, Petr BARANYK a Pavel RYŠÁNEK, 2017. Greenhouse and field experiments with winter oilseed rape cultivars resistant to *Plasmodiophora brassicae* Wor. *Crop Protection* [online]. **92**, 60–69. ISSN 02612194. Dostupné z: doi:10.1016/j.cropro.2016.10.009

SAKAMOTO, Koji, Atsuo SAITO, Nobuaki HAYASHIDA, Goro TAGUCHI a Etsuo MATSUMOTO, 2008. Mapping of isolate-specific QTLs for clubroot resistance in Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*). *Theoretical and Applied Genetics* [online]. **117**(5), 759–767. ISSN 0040-5752, 1432-2242. Dostupné z: doi:10.1007/s00122-008-0817-0

SARAZIN, Vivien, Jérôme DUCLERCQ, Benjamin MENDOU, Laurent AUBANELLE, Veyres NICOLAS, Mitsuko AONO, Serge PILARD, François GUERINEAU, Brigitte SANGWAN-NORREEL a Rajbir S. SANGWAN, 2015. Arabidopsis BNT1, an atypical TIR–NBS–LRR gene, acting as a regulator of the hormonal response to stress. *Plant Science* [online]. **239**, 216–229. ISSN 0168-9452. Dostupné z: doi:10.1016/j.plantsci.2015.07.017

SEGUIN-SWARTZ, G., C. EYNCK, R. K. GUGEL, S. E. STRELKOV, C. Y. OLIVIER, J. L. LI, H. KLEIN-GEGBINCK, H. BORHAN, C. D. CALDWELL a K. C. FALK, 2009. Diseases of *Camelina sativa* (false flax). *Canadian Journal of Plant Pathology-Revue Canadienne De Phytopathologie* [online]. **31**(4), 375–386. ISSN 0706-0661. Dostupné z: doi:10.1080/07060660909507612

SEO, Pil Joon a Chung-Mo PARK, 2010. MYB96-mediated abscisic acid signals induce pathogen resistance response by promoting salicylic acid biosynthesis in *Arabidopsis*. *New Phytologist* [online]. **186**(2), 471–483. ISSN 0028-646X. Dostupné z: doi:10.1111/j.1469-8137.2010.03183.x

SHEN, Yunping a Andrew C. DIENER, 2013. *Arabidopsis thaliana* resistance to *fusarium oxysporum* 2 implicates tyrosine-sulfated peptide signaling in susceptibility and resistance to root infection. *PLoS genetics* [online]. **9**(5), e1003525. ISSN 1553-7404. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pgen.1003525

SHIGENAGA, Alexandra M. a Cristiana T. ARGUESO, 2016. No hormone to rule them all: Interactions of plant hormones during the responses of plants to pathogens. *Seminars in Cell & Developmental Biology* [online]. **56**, X chromosome inactivation, 174–189. ISSN 1084-9521. Dostupné z: doi:10.1016/j.semcd.2016.06.005

SCHWESSINGER, Benjamin, Milena ROUX, Yasuhiro KADOTA, Vardis NTOUKAKIS, Jan SKLENAR, Alexandra JONES a Cyril ZIPFEL, 2011. Phosphorylation-dependent differential regulation of plant growth, cell death, and innate immunity by the regulatory receptor-like kinase BAK1. *PLoS genetics* [online]. **7**(4), e1002046. ISSN 1553-7404. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pgen.1002046

SIEMENS, Johannes, Simon BULMAN, Frank REHN a Thomas SUNDELIN, 2009. Molecular Biology of *Plasmodiophora brassicae*. *Journal of Plant Growth Regulation* [online]. **28**(3), 245–251. ISSN 0721-7595. Dostupné z: doi:10.1007/s00344-009-9091-x

SIEMENS, Johannes, Ingo KELLER, Johannes SARX, Sabine KUNZ, Astrid SCHULLER, Wolfgang NAGEL, Thomas SCHMÜLLING, Martin PARNISKE a Jutta LUDWIG-MÜLLER, 2006. Transcriptome analysis of Arabidopsis clubroots indicate a key role for cytokinins in disease development. *Molecular plant-microbe interactions: MPMI* [online]. **19**(5), 480–494. ISSN 0894-0282. Dostupné z: doi:10.1094/MPMI-19-0480

SNOWDON, Rod J. a Federico L. Iniguez LUY, 2012. Potential to improve oilseed rape and canola breeding in the genomics era. *Plant Breeding* [online]. **131**(3), 351–360. ISSN 0179-9541. Dostupné z: doi:10.1111/j.1439-0523.2012.01976.x

SOHRABI, Reza, Jung-Hyun HUH, Somayesadat BADIEYAN, Liva Harinantenaina RAKOTONDRAIBE, Daniel J. KLIEBENSTEIN, Pablo SOBRADO a Dorothea THOLL, 2015. In planta variation of volatile biosynthesis: an alternative biosynthetic route to the formation of the pathogen-induced volatile homoterpene DMNT via triterpene degradation in Arabidopsis roots. *The Plant Cell* [online]. **27**(3), 874–890. ISSN 1532-298X. Dostupné z: doi:10.1105/tpc.114.132209

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* [online]. **45**(3), 432–439. ISSN 1365-3059. Dostupné z: doi:10.1046/j.1365-3059.1996.d01-155.x

SREEKANTA, Suma, Gerit BETHKE, Noriyuki HATSUGAI, Kenichi TSUDA, Amanda THAO, Lin WANG, Fumiaki KATAGIRI a Jane GLAZEBROOK, 2015. The receptor-like cytoplasmic kinase PCRK1 contributes to pattern-triggered immunity against Pseudomonas syringae in Arabidopsis thaliana. *The New Phytologist* [online]. **207**(1), 78–90. ISSN 1469-8137. Dostupné z: doi:10.1111/nph.13345

STRELKOV, Stephen E., S. F. HWANG, Ronald J. HOWARD, Murray HARTMAN a T. Kelly TURKINGTON, 2011. Progress towards the Sustainable Management of Clubroot (Plasmodiophora brassicae) of Canola on the Canadian Prairies. In: [online]. Dostupné z: doi:10.7939/R3ZC7S752

STRELKOV, Stephen E. a Sheau-Fang HWANG, 2014. Clubroot in the Canadian canola crop: 10 years into the outbreak. *Canadian Journal of Plant Pathology* [online]. **36**, 27–36. ISSN 0706-0661. Dostupné z: doi:10.1080/07060661.2013.863807

SUNG SHIM, Jae a Yang DO CHOI, 2013. Direct regulation of WRKY70 by AtMYB44 in plant defense responses. *Plant Signaling & Behavior* [online]. **8**(6) [vid. 2018-04-15]. ISSN 1559-2316. Dostupné z: doi:10.4161/psb.24509

SUWABE, K., 2006. Simple Sequence Repeat-Based Comparative Genomics Between Brassica rapa and Arabidopsis thaliana: The Genetic Origin of Clubroot Resistance. *Genetics* [online]. **173**(1), 309–319. ISSN 0016-6731. Dostupné z: doi:10.1534/genetics.104.038968

SUWABE, K., H. TSUKAZAKI, H. IKETANI, K. HATAKEYAMA, M. FUJIMURA, T. NUNOME, H. FUKUOKA, S. MATSUMOTO a M. HIRAI, 2003. Identification of two loci for resistance to clubroot (Plasmodiophora brassicae Woronin) in Brassica rapa

L. TAG *Theoretical and Applied Genetics* [online]. **107**(6), 997–1002. ISSN 0040-5752, 1432-2242. Dostupné z: doi:10.1007/s00122-003-1309-x

ŠIMÁŠKOVÁ, Mária, José Antonio O'BRIEN, Mamoona KHAN, Giel VAN NOORDEN, Krisztina ÖTVÖS, Anne VIETEN, Inge DE CLERCQ, Johanna Maria Adriana VAN HAPEREN, Candela CUESTA, Klára HOYEROVÁ, Steffen VANNESTE, Peter MARHAVÝ, Krzysztof WABNIK, Frank VAN BREUSEGEM, Moritz NOWACK, Angus MURPHY, Jiří FRIML, Dolf WEIJERS, Tom BEECKMAN a Eva BENKOVÁ, 2015. Cytokinin response factors regulate PIN-FORMED auxin transporters. *Nature Communications* [online]. **6**, 8717. ISSN 2041-1723. Dostupné z: doi:10.1038/ncomms9717

TAKADA, Shinobu, Nozomi TAKADA a Ayaka YOSHIDA, 2013. ATML1 promotes epidermal cell differentiation in Arabidopsis shoots. *Development* [online]. **140**(9), 1919–1923. ISSN 0950-1991, 1477-9129. Dostupné z: doi:10.1242/dev.094417

TAKAHASHI K., YAMAGUCHI T. 1988. A Method for Assessing the Pathogenic Activity of Resting Spores of Plasmodiophora brassicae by Fluorescence Microscopy, *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 54: 466-475

TANAKA, S., S. KOCHI, H. KUNITA, S. ITO a M. KAMEYA-IWAKI, 1999. Biological mode of action of the fungicide, flusulfamide, against Plasmodiophora brassicae (clubroot). *European Journal of Plant Pathology* [online]. **105**(6), 577–584. ISSN 0929-1873. Dostupné z: doi:10.1023/A:1008722005570

TEN HOVE, Colette A., Zoltán BOCHDANOVITS, Vera M. A. JANSWEIJER, Fenne G. KONING, Lidija BERKE, Gabino F. SANCHEZ-PEREZ, Ben SCHERES a Renze HEIDSTRA, 2011. Probing the roles of LRR RLK genes in Arabidopsis thaliana roots using a custom T-DNA insertion set. *Plant Molecular Biology* [online]. **76**(1–2), 69–83. ISSN 0167-4412. Dostupné z: doi:10.1007/s11103-011-9769-x

TEWARI, J. P., S. E. STRELKOV, D. ORCHARD, M. HARTMAN, R. M. LANGE a T. K. TURKINGTON, 2005. Identification of clubroot of crucifers on canola (*Brassica napus*) in Alberta. *Canadian Journal of Plant Pathology*. **27**(1), 143–144. ISSN 0706-0661.

THULASI DEVENDRAKUMAR, Karen, Xin LI a Yuelin ZHANG, 2018. MAP kinase signalling: interplays between plant PAMP- and effector-triggered immunity. *Cellular and Molecular Life Sciences* [online]. **75**(16), 2981–2989. ISSN 1420-9071. Dostupné z: doi:10.1007/s00018-018-2839-3

TOLMAC, D., S. PRULOVIC, M. LAMBIC, Lj RADOVANOVIC a J. TOLMAC, 2014. Global Trends on Production and Utilization of Biodiesel. *Energy Sources Part B-Economics Planning and Policy* [online]. **9**(2), 130–139. ISSN 1556-7249. Dostupné z: doi:10.1080/15567241003773226

TON, Jurriaan, Victor FLORS a Brigitte MAUCH-MANI, 2009. The multifaceted role of ABA in disease resistance. *Trends in Plant Science* [online]. **14**(6), 310–317. ISSN 1360-1385. Dostupné z: doi:10.1016/j.tplants.2009.03.006

TRAN, Lam-Son Phan, Kazuo NAKASHIMA, Yoh SAKUMA, Sean D. SIMPSON, Yasunari FUJITA, Kyonoshin MARUYAMA, Miki FUJITA, Motoaki SEKI, Kazuo SHINOZAKI a Kazuko YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2004. Isolation and Functional Analysis of Arabidopsis Stress-Inducible NAC Transcription Factors That Bind to a Drought-Responsive cis-Element in the early responsive to dehydration stress 1 Promoter. *The Plant Cell* [online]. **16**(9), 2481–2498. ISSN 1040-4651, 1532-298X. Dostupné z: doi:10.1105/tpc.104.022699

TREMBLAY, N., C. BELEC, J. COULOMBE a C. GODIN, 2005. Evaluation of calcium cyanamide and liming for control of clubroot disease in cauliflower. *Crop Protection* [online]. **24**(9), 798–803. ISSN 0261-2194. Dostupné z: doi:10.1016/j.cropro.2004.12.013

TRICK, Martin, Yan LONG, Jinling MENG a Ian BANCROFT, 2009. Single nucleotide polymorphism (SNP) discovery in the polyploid *Brassica napus* using Solexa transcriptome sequencing. *Plant Biotechnology Journal* [online]. **7**(4), 334–346. ISSN 14677644, 14677652. Dostupné z: doi:10.1111/j.1467-7652.2008.00396.x

TSAN, Min-Fu a Baochong GAO, 2009. Heat shock proteins and immune system. *Journal of Leukocyte Biology* [online]. **85**(6), 905–910. ISSN 1938-3673. Dostupné z: doi:10.1189/jlb.0109005

TSUDA, Kenichi a Imre E. SOMSSICH, 2015. Transcriptional networks in plant immunity. *New Phytologist* [online]. **206**(3), 932–947. ISSN 1469-8137. Dostupné z: doi:10.1111/nph.13286

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* [online]. **80**(6), 621–629. ISSN 0167-4412, 1573-5028. Dostupné z: doi:10.1007/s11103-012-9971-5

VAN DEN BURG, Harrold A., Dimitrios I. TSITSIGIANNIS, Owen ROWLAND, Jane LO, Ghanasyam RALLAPALLI, Daniel MACLEAN, Frank L. W. TAKKEN a Jonathan D. G. JONES, 2008. The F-box protein ACRE189/ACIF1 regulates cell death and defense responses activated during pathogen recognition in tobacco and tomato. *The Plant Cell* [online]. **20**(3), 697–719. ISSN 1040-4651. Dostupné z: doi:10.1105/tpc.107.056978

VAN LOON, Leendert C., Bart P. J. GERAATS a Huub J. M. LINTHORST, 2006. Ethylene as a modulator of disease resistance in plants. *Trends in Plant Science* [online]. **11**(4), 184–191. ISSN 1360-1385. Dostupné z: doi:10.1016/j.tplants.2006.02.005

VLOT, A. Corina, D'Maris Amick DEMPSEY a Daniel F. KLESSIG, 2009. Salicylic Acid, a Multifaceted Hormone to Combat Disease. *Annual Review of Phytopathology* [online]. **47**, 177–206. ISSN 0066-4286. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.phyto.050908.135202

VOORRIPS, R. E., M. C. JONGERIUS a H. J. KANNE, 1997. Mapping of two genes for resistance to clubroot (*Plasmodiophora brassicae*) in a population of doubled haploid lines of *Brassica oleracea* by means of RFLP and AFLP markers. *Theoretical and*

Applied Genetics [online]. **94**(1), 75–82. ISSN 0040-5752, 1432-2242. Dostupné z: doi:10.1007/s001220050384

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* [online]. **45**(4), 710–719. ISSN 0032-0862, 1365-3059. Dostupné z: doi:10.1046/j.1365-3059.1996.d01-173.x

WALLENHAMMAR, A.-C., 2010. Monitoring and Control of *Plasmodiophora brassicae* in Spring Oilseed Brassica Crops. In: M. HANSEN, ed. *V International Symposium on Brassicas and XVI International Crucifer Genetics Workshop, Brassica 2008*. Leuven 1: Int Soc Horticultural Science, s. 181–190. ISBN 978-90-6605-430-1.

WALLENHAMMAR, A.-C., C. ALMQUIST, M. SODERSTROM a A. JONSSON, 2012. In-field distribution of *Plasmodiophora brassicae* measured using quantitative real-time PCR. *Plant Pathology* [online]. **61**(1), 16–28. ISSN 0032-0862. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-3059.2011.02477.x

WALLENHAMMAR, Ann-Charlotte, Charlotta ALMQUIST, Arne SCHWELM, Jonas ROOS, Katarzyna MARZEC-SCHMIDT, Anders JONSSON a Christina DIXELIUS, 2014. Special Issue: Clubroot, a persistent threat to Swedish oilseed rape production. *Canadian Journal of Plant Pathology* [online]. **36**, 135–141. ISSN 0706-0661. Dostupné z: doi:10.1080/07060661.2013.870606

WALTERS, Dale a Martin HEIL, 2007. Costs and trade-offs associated with induced resistance. *Physiological and Molecular Plant Pathology* [online]. **71**(1–3), 3–17. ISSN 0885-5765. Dostupné z: doi:10.1016/j.pmpp.2007.09.008

WALTERS, Dale R. a Neil MCROBERTS, 2006. Plants and biotrophs: a pivotal role for cytokinins? *Trends in Plant Science* [online]. **11**(12), 581–586. ISSN 1360-1385. Dostupné z: doi:10.1016/j.tplants.2006.10.003

WANG, Xiao, Sameer P. GOREGAOKER a James N. CULVER, 2009. Interaction of the Tobacco Mosaic Virus Replicase Protein with a NAC Domain Transcription Factor Is Associated with the Suppression of Systemic Host Defenses. *Journal of Virology* [online]. **83**(19), 9720–9730. ISSN 0022-538X. Dostupné z: doi:10.1128/JVI.00941-09

WASTERNAK, C. a B. HAUSE, 2013. Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in *Annals of Botany*. *Annals of Botany* [online]. **111**(6), 1021–1058. ISSN 0305-7364. Dostupné z: doi:10.1093/aob/mct067

WATSON, Ag a Kf BAKER, 1969. Possible Gene Centers for Resistance in Genus *Brassica* to *Plasmodiophora Brassicae*. *Economic Botany* [online]. **23**(3), 245–. ISSN 0013-0001. Dostupné z: doi:10.1007/BF02860456

WERNER, S., E. DIEDERICHSEN, M. FRAUEN, J. SCHONDELMAIER a C. JUNG, 2008. Genetic mapping of clubroot resistance genes in oilseed rape. *Theoretical and Applied Genetics* [online]. **116**(3), 363–372. ISSN 0040-5752, 1432-2242. Dostupné z: doi:10.1007/s00122-007-0674-2

WILLIAMS, P. H., 1966. A system for the determination of races of *Plasmodiophora brassicae* that infect Cabbage and Rutabaga. *Phytopathology*. **56**(6), 624–626. ISSN 0031-949X.

YAO YUAN, HE RUN JUN, XIE QIAO LI, ZHAO XIAN HAI, DENG XIAO MEI, HE JUN BO, SONG LILI, HE JUN, MARCHANT ALAN, CHEN XIAO-YANG a WU AI-MIN, 2017. ETHYLENE RESPONSE FACTOR 74 (ERF74) plays an essential role in controlling a respiratory burst oxidase homolog D (RbohD)-dependent mechanism in response to different stresses in *Arabidopsis*. *New Phytologist* [online]. **213**(4), 1667–1681. ISSN 0028-646X. Dostupné z: doi:10.1111/nph.14278

YOGENDRA, Kalenahalli N., Doddaraju PUSHPA, Kareem A. MOSA, Ajjamada C. KUSHALAPPA, Agnes MURPHY a Teresa MOSQUERA, 2014. Quantitative resistance in potato leaves to late blight associated with induced hydroxycinnamic acid amides. *Functional & Integrative Genomics* [online]. **14**(2), 285–298. ISSN 1438-7948. Dostupné z: doi:10.1007/s10142-013-0358-8

YOKOTANI, Naoki, Takanari ICHIKAWA, Youichi KONDOU, Minami MATSUI, Hirohiko HIROCHIKA, Masaki IWABUCHI a Kenji ODA, 2009. Tolerance to various environmental stresses conferred by the salt-responsive rice gene ONAC063 in transgenic *Arabidopsis*. *Planta* [online]. **229**(5), 1065–1075. ISSN 0032-0935. Dostupné z: doi:10.1007/s00425-009-0895-5

YU, Fengqun, Xingguo ZHANG, Gary PENG, Kevin C. FALK, Stephen E. STRELKOV a Bruce D. GOSSSEN, 2017. Genotyping-by-sequencing reveals three QTL for clubroot resistance to six pathotypes of *Plasmodiophora brassicae* in *Brassica rapa*. *Scientific Reports* [online]. **7**(1), 4516. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-017-04903-2

ZENG, Wei, Xinhua DAI, Jing SUN, Yifeng HOU, Xuan MA, Xiaofeng CAO, Yunde ZHAO a Youfa CHENG, 2019. Modulation of Auxin Signaling and Development by Polyadenylation Machinery. *Plant Physiology* [online]. **179**(2), 686–699. ISSN 0032-0889, 1532-2548. Dostupné z: doi:10.1104/pp.18.00782

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* [online]. **65**(3), 435–440. ISSN 00320862. Dostupné z: doi:10.1111/ppa.12422

ZHAO, Jianwei, Jianlin WANG, Lingling AN, R. W. DOERGE, Z. Jeffrey CHEN, Craig R. GRAU, Jinling MENG a Thomas C. OSBORN, 2007. Analysis of gene expression profiles in response to *Sclerotinia sclerotiorum* in *Brassica napus*. *Planta* [online]. **227**(1), 13–24. ISSN 0032-0935. Dostupné z: doi:10.1007/s00425-007-0586-z

ZHENG, Zuyu, Anthony QUALLEY, Baofang FAN, Natalia DUDAREVA a Zhixiang CHEN, 2009. An important role of a BAHD acyl transferase-like protein in plant innate immunity. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* [online]. **57**(6), 1040–1053. ISSN 1365-313X. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-313X.2008.03747.x

ZHU, Yingfang, Craig M. SCHLUTTENHOFFER, Pengcheng WANG, Fuyou FU, Jyothi THIMMAPURAM, Jian-Kang ZHU, Sang Yeol LEE, Dae-Jin YUN a Tesfaye

MENGISTE, 2014. CYCLIN-DEPENDENT KINASE8 differentially regulates plant immunity to fungal pathogens through kinase-dependent and -independent functions in Arabidopsis. *The Plant Cell* [online]. **26**(10), 4149–4170. ISSN 1532-298X. Dostupné z: doi:10.1105/tpc.114.128611

ZIPFEL, Cyril, 2014. Plant pattern-recognition receptors. *Trends in Immunology* [online]. **35**(7), 345–351. ISSN 1471-4906. Dostupné z: doi:10.1016/j.it.2014.05.004

ZORZATTO, Cristiane, Joao Paulo B. MACHADO, Kenia V. G. LOPES, Kelly J. T. NASCIMENTO, Welison A. PEREIRA, Otavio J. B. BRUSTOLINI, Pedro A. B. REIS, Iara P. CALIL, Michihito DEGUCHI, Gilberto SACHETTO-MARTINS, Bianca C. GOUVEIA, Virgilio A. P. LORIATO, Marcos A. C. SILVA, Fabyano F. SILVA, Anesia A. SANTOS, Joanne CHORY a Elizabeth P. B. FONTES, 2015. NIK1-mediated translation suppression functions as a plant antiviral immunity mechanism. *Nature* [online]. **520**(7549), 679-U227. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/nature14171

ZOU, Li-Juan, Xing-Guang DENG, Xue-Ying HAN, Wen-Rong TAN, Li-Jun ZHU, De-Hui XI, Da-Wei ZHANG a Hong-Hui LIN, 2016. Role of Transcription Factor HAT1 in Modulating Arabidopsis thaliana Response to Cucumber mosaic virus. *Plant and Cell Physiology* [online]. **57**(9), 1879–1889. ISSN 0032-0781. Dostupné z: doi:10.1093/pcp/pcw109

ZOURELIDOU, Melina, Isabel MÜLLER, Björn C. WILLIGE, Carola NILL, Yusuke JIKUMARU, Hanbing LI a Claus SCHWECHHEIMER, 2009. The polarly localized D6 PROTEIN KINASE is required for efficient auxin transport in Arabidopsis thaliana. *Development (Cambridge, England)* [online]. **136**(4), 627–636. ISSN 0950-1991. Dostupné z: doi:10.1242/dev.028365

9. Příloha

Tab. 29: Seznam testovaných genotypů *B. napus* a vypočítaných DI, popis jednotlivých položek převzat z práce Havlickova et al. (2018)

<i>genotyp</i>	<i>popis</i>	<i>DI</i>
<i>Alaska</i>	Modern winter OSR	83,33
<i>Pirola</i>	Modern winter OSR	77,78
<i>Agalon</i>	Modern winter OSR	77,78
<i>Picasso</i>	Modern winter OSR	88,89
<i>Lord</i>	Modern winter OSR	50,00
<i>Rodeo</i>	Modern winter OSR	88,89
<i>Rapid</i>	Modern winter OSR	100,0
<i>Pacific</i>	Modern winter OSR	66,67
<i>Savannah</i>	Modern winter OSR	73,33
<i>Missouri</i>	Modern winter OSR	83,33
<i>Manitoba</i>	Modern winter OSR	66,67
<i>Ladoga</i>	Modern winter OSR	66,67
<i>Atlantic</i>	Modern winter OSR	66,67
<i>Cooper</i>	Modern winter OSR	83,33
<i>Idol</i>	Modern winter OSR	33,33
<i>Lirajet</i>	Modern winter OSR	100,0
<i>Lisabeth</i>	Modern winter OSR	25,00
<i>Lipid</i>	Modern winter OSR	83,33
<i>Lipton</i>	Modern winter OSR	77,78
<i>Lisek</i>	Modern winter OSR	66,67
<i>Lion</i>	Modern winter OSR	100,0
<i>OASE</i>	Modern winter OSR	83,33
<i>Apex</i>	Modern winter OSR	46,67
<i>Laser</i>	Modern winter OSR	46,67
<i>Fortis</i>	Modern winter OSR	60,00
<i>Roxet</i>	Modern winter OSR	66,67
<i>NK Bravour</i>	Modern winter OSR	66,67
<i>NK Fair</i>	Modern winter OSR	75,00
<i>Sansibar</i>	Modern winter OSR	100,0
<i>SWGospel</i>	Modern winter OSR	33,33
<i>Verona</i>	Modern winter OSR	41,67
<i>Musette</i>	Modern winter OSR	100,0
<i>Kvintett</i>	Modern winter OSR	83,33
<i>Falstaff</i>	Modern winter OSR	50,00
<i>SW Sinatra</i>	Modern winter OSR	58,33
<i>Viking</i>	Modern winter OSR	83,33
<i>Aragon</i>	Modern winter OSR	66,67
<i>Gefion</i>	Modern winter OSR	44,44
<i>Nugget</i>	Modern winter OSR	66,67
<i>SLM 0413</i>	Modern winter OSR	77,78
<i>SLM 0512</i>	Modern winter OSR	66,67
<i>LSF 0519</i>	Modern winter OSR	66,67
<i>Beluga</i>	Modern winter OSR	66,67
<i>Ascona</i>	Modern winter OSR	0,00
<i>Campari</i>	Modern winter OSR	83,33
<i>Caramba</i>	Modern winter OSR	100,0
<i>Duell</i>	Modern winter OSR	66,67
<i>Express 617</i>	Modern winter OSR	66,67
<i>Orlando</i>	Modern winter OSR	100,0
<i>Pollen</i>	Modern winter OSR	88,89
<i>Prince</i>	Modern winter OSR	100,0
<i>Wotan</i>	Modern winter OSR	66,67

Tab. 29 (pokračování): Seznam testovaných genotypů *B. napus*

<i>genotyp</i>	<i>popis</i>	<i>DI</i>
NK Nemax	Modern winter OSR	100,0
AMBER X COMMANCHE	Winter OSR	55,56
APEX-93_5 X GINYOU_3	Winter OSR	77,78
CANBERRA x COURAGE	Winter OSR	66,67
HANSEN X GASPARD	Winter OSR	77,78
MADRIGAL x RECITAL	Winter OSR	66,67
RAFAL DH1	Winter OSR	83,33
TAPIDOR DH	Winter OSR	0,00
EUROL	Winter OSR	93,33
NORIN	Winter OSR	66,67
OLIMPIADE	Winter OSR	100,0
Mansholt	Winter OSR	75,00
Sollux	Winter OSR	91,67
Akela	Winter OSR	0,00
Erox	Winter OSR	16,67
Maplus	Winter OSR	41,67
Askari	Winter OSR	66,67
JetNeuf	Winter OSR	77,78
Cobra	Winter OSR	66,67
Falcon	Winter OSR	66,67
Mohican	Winter OSR	66,67
Flip	Winter OSR	83,33
Zenith	Winter OSR	80,00
Phil	Winter OSR	66,67
Leopard	Winter OSR	44,44
RESYN-H048	Winter OSR	50,00
Resyn-Gš S4	Winter OSR	83,33
Anja	Winter OSR	66,67
Baltia	Winter OSR	77,78
Brink	Winter OSR	66,67
Coriander	Winter OSR	77,78
Dippes	Winter OSR	0,00
Doral	Winter OSR	83,33
GÝzower ...lquell	Winter OSR	75,00
Hokkai 3-Go	Winter OSR	66,67
Jantar	Winter OSR	0,00
Krapphauser	Winter OSR	83,33
Libritta	Winter OSR	100,0
Lirakotta	Winter OSR	53,33
Madora	Winter OSR	0,00
Mestnij	Winter OSR	66,67
Moldavia	Winter OSR	77,78
Norde	Winter OSR	83,33
Panter	Winter OSR	66,67
Skziverskij	Winter OSR	100,0
Sobotkowski	Winter OSR	66,67
Sonnengold	Winter OSR	75,00
Wolynski	Winter OSR	66,67
V8	Winter OSR	93,33
K26-96	Winter OSR	66,67
WINFRED	Winter fodder	0,00
EMERALD	Winter fodder	0,00
FORA	Winter fodder	66,67
Binera	Winter fodder	91,67
Dwarf Essex	Winter fodder	93,33
Michinaku natane	Winter fodder	66,67
Nunsdale	Winter fodder	66,67
Samo	Winter fodder	66,67
Silona	Winter fodder	100,0
Chuosenshu	Exotics Winter vegetable	66,67

Tab. 29 (pokračování): Seznam testovaných genotypů *B. napus*

<i>genotyp</i>	<i>popis</i>	<i>DI</i>
<i>Taisetsu</i>	Exotics Winter vegetable	83,33
<i>Q100</i>	Exotics synthetic	100,0
<i>BRAUNER SCHNITTKOHL</i>	Exotics Siberian kale	66,67
<i>CHEMBERE DZAGUMHANA</i>	Exotics unspecified	66,67
<i>COUVE NABICA</i>	Exotics cauve nabica	66,67
<i>RAGGED JACK</i>	Exotics rape kale	0,00
<i>RED RUSSIAN</i>	Exotics Siberian kale	0,00
<i>SLAPSKA, SLAPY</i>	Exotics unspecified	83,33
<i>ABUKUMA NATANE</i>	Exotics Winter OSR	83,33
<i>WILD ACCESSION</i>	Exotics wild accession	0,00
<i>SWU Chinese 1</i>	Exotics Semiwinter OSR	50,00
<i>SWU Chinese 2</i>	Exotics Semiwinter OSR	66,67
<i>SWU Chinese 3</i>	Exotics Semiwinter OSR	33,33
<i>SWU Chinese 5</i>	Exotics Semiwinter OSR	66,67
<i>SWU Chinese 8</i>	Exotics Semiwinter OSR	11,11
<i>SWU Chinese 9</i>	Exotics Semiwinter OSR	58,33
<i>Drakkar</i>	Spring OSR	0,00
<i>WESTAR DH</i>	Spring OSR	0,00
<i>YUDAL</i>	Spring OSR	66,67
<i>CRESOR</i>	Spring OSR	83,33
<i>MARINKA</i>	Spring OSR	0,00
<i>NIKLAS</i>	Spring OSR	66,67
<i>TARGET</i>	Spring OSR	0,00
<i>MONTY-028DH</i>	Spring OSR	0,00
<i>N01D-1330</i>	Spring OSR	44,44
<i>SURPASS400-024DH</i>	Spring OSR	0,00
<i>CUBS ROOT</i>	Spring OSR	66,67
<i>DUX</i>	Spring OSR	0,00
<i>ERGLU</i>	Spring OSR	66,67
<i>LINETTA</i>	Spring OSR	25,00
<i>MAZOWIECKI</i>	Spring OSR	50,00
<i>WEIHENSTEPHANER</i>	Spring OSR	0,00
<i>Alku</i>	Spring OSR	0,00
<i>Bronowski</i>	Spring OSR	75,00
<i>Duplo</i>	Spring OSR	22,22
<i>Janetzkis Sommerraps</i>	Spring OSR	0,00
<i>Nugget</i>	Spring OSR	50,00
<i>Spaeths Zollerngold</i>	Spring OSR	0,00
<i>SvalsfÖs Gulle</i>	Spring OSR	0,00
<i>Topas</i>	Spring OSR	66,67
<i>Tribute</i>	Spring OSR	0,00
<i>Wesway</i>	Spring OSR	66,67
<i>Tower</i>	Spring OSR	0,00
<i>Ability</i>	Spring OSR	0,00
<i>Clipper</i>	Spring OSR	33,33
<i>Larissa</i>	Spring OSR	0,00
<i>Magma</i>	Spring OSR	0,00
<i>Monty</i>	Spring OSR	83,33
<i>Mozart</i>	Spring OSR	0,00
<i>Pauline</i>	Spring OSR	13,33
<i>Sophia</i>	Spring OSR	6,67
<i>Tribune</i>	Spring OSR	66,67
<i>Trigold</i>	Spring OSR	0,00
<i>Rivette</i>	Spring OSR	83,33
<i>Adamo</i>	Spring OSR	0,00
<i>Altex</i>	Spring OSR	0,00
<i>Andor</i>	Spring OSR	0,00
<i>Bingo</i>	Spring OSR	0,00
<i>Callypso</i>	Spring OSR	0,00
<i>Concord</i>	Spring OSR	0,00

Tab. 29 (pokračování): Seznam testovaných genotypů *B. napus*

<i>genotyp</i>	<i>popis</i>	<i>DI</i>
Conny	Spring OSR	0,00
Cyzowska	Spring OSR	22,22
Daichousen (fuku)	Spring OSR	66,67
Daichousen (mizuyasu)	Spring OSR	0,00
Daichousen (nakano)	Spring OSR	0,00
Erake	Spring OSR	0,00
Furax	Spring OSR	0,00
Giant Xr707	Spring OSR	0,00
Gisora	Spring OSR	0,00
Hankkija's Lauri	Spring OSR	75,00
Kajsa	Spring OSR	0,00
Korall	Spring OSR	6,67
Korinth	Spring OSR	0,00
Kosa	Spring OSR	0,00
Kruglik	Spring OSR	50,00
Lirafox	Spring OSR	0,00
Lirasol	Spring OSR	0,00
Liraspa	Spring OSR	80,00
Lirawell	Spring OSR	0,00
Lisandra	Spring OSR	100,0
Loras	Spring OSR	0,00
Mali	Spring OSR	0,00
Maris Haplona	Spring OSR	0,00
Miyauchi Na	Spring OSR	66,67
Mlochowski	Spring OSR	66,67
Nakate Chousen	Spring OSR	33,33
Nosovskij 9	Spring OSR	0,00
Odin	Spring OSR	66,67
Olivia	Spring OSR	33,33
Omega	Spring OSR	83,33
Optima	Spring OSR	0,00
Pivot	Spring OSR	66,67
Puma	Spring OSR	0,00
Pura	Spring OSR	77,78
Reston	Spring OSR	0,00
Sv 705152	Spring OSR	16,67
Sv 706118	Spring OSR	0,00
Sv 716	Spring OSR	0,00
Sv 75716	Spring OSR	22,22
Tanka	Spring OSR	0,00
Toro	Spring OSR	0,00
Triton	Spring OSR	0,00
Wesbell	Spring OSR	66,67
Wesreo	Spring OSR	0,00
Wesroona	Spring OSR	50,00
Willi	Spring OSR	0,00
Ww 1286	Spring OSR	0,00
Ww1289	Spring OSR	66,67
Zachodni	Spring OSR	66,67
Zairai Chousenshu	Spring OSR	6,67
VIGE DH1	Swede	0,00
FORTIN FAMILY	swede	66,67
KOHALIK SININE	swede	100,0
LORD DERBY	swede	53,33
TURNIP/RUTABAGA HYBRID	synthetic swede	0,00
VOGESA	swede	0,00
BRONZE TOP	swede	100,0
HUGUENOT	swede	55,56
PIKE	swede	0,00
Wilhelmsburger	swede	0,00

Tab. 29 (pokračování): Seznam testovaných genotypů *B. napus*

genotyp	popis	DI
Aberdeenshire Prize	swede	66,67
Altasweet	swede	0,00
Bangholm PT	swede	0,00
Conqueror Bronze Green Top	swede	0,00
Drummonds Purple Top	swede	66,67
Essex Model	swede	0,00
Parkside	swede	0,00
Purple Top	swede	0,00
Scotia	swede	0,00
Tankard Bronze Top	swede	0,00
Tina	swede	0,00
Brandhaug	swede	0,00
Troendersk Kvithamar	swede	0,00

Tab. 30: Seznam signifikantních SNP markerů s hodnotou $-\log_{10}P > 4$

snp	$-\log_{10}P$	snp	$-\log_{10}P$
Bo7g107580.1:660:T	7,74	Cab009348.1:486:A	4,77
Bo7g107550.1:1824:G	7,72	Bo2g132400.1:555:C	4,76
Bo7g107550.1:2157:G	7,72	Bo2g133520.1:179:G	4,75
Cab002008.1:1614:C	7,62	Bo2g133520.1:342:A	4,71
Bo7g107550.1:766:G	7,31	Cab001952.1:906:T	4,70
Cab002008.1:1512:G	7,20	Bo2g133520.1:220:T	4,67
Cab002008.1:474:T	6,93	Cab009348.1:330:C	4,66
Cab002008.1:1746:T	6,90	Bo2g132450.1:660:A	4,65
Cab002008.1:1287:G	6,88	Cab002008.1:1251:T	4,61
Bo7g107550.1:1689:C	6,79	Cab002008.1:2049:G	4,59
Cab002008.1:1992:C	6,56	Bo6rg092820.1:59:C	4,58
Cab002008.1:1350:C	5,91	Bo2g132450.1:969:C	4,56
Bo7g107550.1:2061:C	5,91	Cab009371.1:1047:G	4,54
Cab002008.1:1755:T	5,72	Cab009371.1:1132:C	4,54
Cab002008.1:2226:C	5,68	Cab008409.1:258:T	4,50
Cab002008.1:2124:C	5,54	Bo7g063960.1:1695:C	4,49
Cab002015.1:1445:A	5,52	Cab026524.1:1271:A	4,44
Bo7g107550.1:801:T	5,48	Bo2g132420.1:84:A	4,44
Cab004517.1:720:A	5,44	Cab008408.1:429:T	4,44
Bo7g063960.1:1696:G	5,41	Bo8g092900.1:1530:A	4,43
Cab004517.1:904:G	5,22	Cab009377.1:171:C	4,42
Cab009371.1:951:C	5,15	Bo7g107550.1:1038:C	4,40
Cab009348.1:783:G	5,11	Cab009364.2:405:T	4,35
Cab009371.1:774:T	5,09	Cab009371.1:978:C	4,33
Bo7g107550.1:2049:G	5,07	Cab009348.1:534:G	4,33
Cab003906.2:855:A	5,04	Cab009348.1:458:G	4,31
Cab009371.1:833:T	5,04	Bo2g132450.1:342:C	4,31
Cab009348.1:414:C	5,02	Cab019119.1:2004:G	4,29
Cab009348.1:415:G	5,02	Cab026524.1:1416:T	4,25
Cab009348.1:801:C	4,92	Cab001952.1:855:G	4,25
Cab002089.1:147:G	4,90	Cab001952.1:774:C	4,24
Cab002089.1:145:A	4,90	Cab044541.1:624:T	4,21
Cab009371.1:189:A	4,90	Cab044542.1:576:C	4,20
Cab009371.1:555:C	4,89	Bo7g065080.1:1176:T	4,19
Cab009348.1:624:C	4,88	Cab010956.1:645:A	4,18
Cab009364.2:678:C	4,86	Bo2g132400.1:993:A	4,15
Cab001952.1:768:A	4,85	Cab024123.2:2097:C	4,14
Cab009364.2:477:C	4,82	Cab002008.1:1944:T	4,13
Bo2g132450.1:837:G	4,82	Cab006587.2:847:C	4,13
Cab002008.1:498:C	4,82	Cab004504.1:606:T	4,11
Cab009348.1:615:C	4,82	Cab002028.3:1497:C	4,09
Cab002011.1:410:C	4,81	Cab009371.1:1014:T	4,06
Bo7g107580.1:354:A	4,80	Bo2g132450.1:636:T	4,04

