



Fakulta zemědělská
a technologická
Faculty of Agriculture
and Technology

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

Metodika odlišení patotypů *Plasmodiophora brassicae*

Metodika byla vypracována jako výstup projektu FW10010461 „Moderní technologie ve šlechtění olejnin a luskovin - zavedení tvorby dihaploidů a molekulární identifikace donorů rezistence ve šlechtitelských programech olejnin a luskovin“

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

České Budějovice, 2024

Metodika odlišení patotypů *Plasmodiophora brassicae*

Metodika byla vypracována jako výstup projektu FW10010461 „Moderní technologie ve šlechtění olejnin a luskovin - zavedení tvorby dihaploidů a molekulární identifikace donorů rezistence ve šlechtitelských programech olejnin a luskovin“

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

České Budějovice, 2024

Metodika odlišení patotypů *Plasmodiophora brassicae*

Hejna O. et al. 2024

hejna@fzt.jcu.cz

Katedra genetiky a biotechnologií, FZT JU v Českých Budějovicích, České Budějovice

www.fzt.jcu.cz, <http://biocentrum.zf.jcu.cz>

Vypracováno za podpory projektu FW10010461 „Moderní technologie ve šlechtění olejnin a luskovin - zavedení tvorby dihaploidů a molekulární identifikace donorů rezistence ve šlechtitelských programech olejnin a luskovin“

Recenzenty metodiky byli:

Ing. Petr Zehnálek – ÚKZÚZ Hradec nad Svitavou

doc. Ing. František Hnilička, Ph.D. – ČZU Praha

Text: ©2024 Hejna O. a kol.

Vydáno bez jazykové úpravy

ISBN 978-80-7694-094-9



Obsah

Uvedení problému a cíl metodiky	7
Vlastní popis metodiky	8
Úvod.....	8
Biotesty.....	11
Zdroj patogenu, inokulace rostlin a hodnocení napadení.....	11
Příklady výstupů a interpretace výsledků biotestů.....	13
NGS sekvenování.....	16
Příprava vzorků pro extrakci DNA.....	16
Bioinformatické zpracování dat.....	17
Rekonstrukce genomů jednotlivých patotypů	18
Vizualizace jedné z oblastí s unikátní sekvencí pro patotyp P2	20
Vizualizace jedné z oblastí s unikátní sekvencí pro patotyp P3	22
Vizualizace jedné z oblastí s unikátní sekvencí pro patotyp P4	24
Vizualizace jedné z oblastí s unikátní sekvencí pro patotyp P5	26
Vizualizace jedné z oblastí s unikátní sekvencí pro patotyp P7	28
Srovnání novosti postupů	30
Popis uplatnění metodiky.....	30
Ekonomické aspekty.....	31
Seznam použité literatury.....	32
Seznam publikací předcházející metodice.....	35

Uvedení problému a cíl metodiky

Plasmodiophora brassicae je obligátní biotrofní patogen, který napadá výhradně brukvovité rostliny a je původcem nádorovitosti košťálovin. Patogen vytváří na kořenech a hypokotylu formace „nádory“, které následně způsobí snížení toku živin a vody, což vede ke žloutnutí a deformaci listů, vadnutí, zastavení růstu rostlin a v pozdějším stádiu až smrt hostitelské rostliny (Malinowski et al., 2012; Javed et al., 2023). V současnosti představuje tento patogen závažné problémy pro většinu brukvovitých plodin v celosvětovém měřítku, způsobuje významné ekonomické ztráty v zemědělství, které se globálně odhadují na 10-15 procent z produkce brukvovitých rostlin (Dixon, 2009).

Pro efektivní boj proti nádorovitosti jsou klíčové spolehlivé a citlivé diagnostické metody. Detekci *P. brassicae* však komplikuje skutečnost, že tohoto obligátního patogena nelze kultivovat na umělých médiích. Patogen je možno detekovat pomocí biologických, mikroskopických a molekulárních metod (Hwang et al., 2012).

Identifikace patotypů je standardně prováděna biotesty. Nejstarší a stále často používaná klasifikace pomocí biotestů je Williamsova klasifikace (Williams et al., 1966). V Evropě je také využívána přesnější klasifikace ECD (European Clubroot Differential) podle Buczackiho et al. (1975). Pro *B. napus* byl navíc navržen doplňkový soubor tří testovacích linií, zaměřený speciálně na evropské patotypy (Some et al., 1996).

Vzhledem k tomu, že se jednotlivé izoláty patogena často liší jednonukleotidovými polymorfismy, insercemi a delecemi, byly v posledním desetiletí vyvíjeny snahy o identifikační metody založené na těchto genetických odlišnostech (Gossen et al., 2019; Tso et al., 2021, 2022).

Cílem metodiky je precizní identifikace patotypů *P. brassicae* na základě kombinace biotestů a molekulárních metod založených na celogenomovém sekvenování.

Vlastní popis metodiky

Úvod

Jedním ze současných problémů pěstování brukvovitých zelenin a olejnin je onemocnění známé jako nádorovitost košťálovin. Toto onemocnění způsobuje obligátní biotrofní patogen *Plasmodiophora brassicae*, který má schopnost velice dlouho přežít v půdě (Wallenhammar 1996). V současnosti představuje toto onemocnění v celosvětovém měřítku jedno z nejzávažnějších problémů pěstování brukvovitých plodin.

Plasmodiophora brassicae řadíme do Eukaryotické skupiny Rhizaria, konkrétně do třídy Phytomyxea (Endomyxa). Tato třída sčítá obligátní biotrofní parazity hnědých řas, oomycety (Phagomyxids), pestrou škálu rostlinných hostitelů (Plasmodiophorids) a nově popsané Marinomyxa. Velmi známým zástupcem této třídy je také například původce strupovitosti brambor (Javed et al., 2023). Životní cyklus patogena se dělí na tři životní fáze. V první fázi *P. brassicae* proniká do epidermálních buněk kořenového vlášení, kde vytváří primární plasmodium. Následná sekundární fáze je charakteristická tvorbou sekundárních zoosporií vytvořených z primárního plasmodia. Tyto zoosporie pronikají hluboko do kořene hostitele, kde způsobují proliferaci a expanzi buněk hostitele. V poslední fázi se v těchto pletivech vytváří velmi odolné klidové spory, které po rozpadnutí nádorů na kořenech přežívají v půdě i více jak 20 let (Liu et al., 2020). Patogen se vyskytuje především na vlhkých místech. Odolné spory se mohou snadno šířit, prostřednictvím přenosu půdy na strojích, zvířat, vody i vzduchu (Struck et al., 2022).

Pro efektivní boj proti nádorovitosti jsou velmi důležité spolehlivé a citlivé diagnostické metody. Detekci *P. brassicae* komplikuje skutečnost, že tohoto obligátního patogena nelze kultivovat na umělých médiích. Detekce patogena se provádí pomocí biologických, mikroskopických a molekulárních metod (Hwang et al. 2012). Biologické metody detekce trvalých spor využívají citlivé odrůdy hostitelských rostlin. Tyto odrůdy se pěstují ve vzorcích odebrané půdy po dobu pěti týdnů a následně je vyhodnoceno napadení kořenového systému jednotlivých rostlin na škále 1 - 4. Jako kontrola se nejčastěji využívá vysoce citlivá odrůda čínského zelí var. Granaat (Hwang et al. 2012). Mezi nevýhody této metody patří horší citlivost detekce, časová a prostorová náročnost. Metoda se však i v současnosti stále hojně využívá (Faggian & Strelkov, 2009). Dalšími metodami detekce jsou metody mikroskopování. Nejstarší metoda byla navržena v roce 1945 (Garrett, 1945). Při této metodě jsou pěstovány semenáčky v odebrané testované

půdě po dobu pěti týdnů při určitých pěstebních podmínkách. Pomocí jednoprocenního acetokarmínu jsou poté obarveny infikované části kořenů a následně je počítán počet napadených vlasových kořínků (Colhoun, 1957; Wallenhammar, 1996). Další modernější metoda využívá dvě fluorescenční barviva. První z barviv Calcoflor White M2R je schopné se vázat na chitin, který se vyskytuje na povrchu spor a tím spory zviditelňuje. Druhé z barviv ethidium bromid dokáže proniknout do buněk a navázat se na DNA. Tímto barvivem je tedy možné ověřit životaschopnost spor (Takahashi & Yamaguchi, 1988). V současnosti se používá například Evans blue nebo Ocerin (Rod, 1996; Rennie et al., 2011).

V posledním desetiletí bylo vyvinuto několik molekulárních metod, pro detekci klidových spor v infikované půdě a také několik testů založených na PCR (polymerázová řetězová reakce), pro detekci, kvantifikaci patogenu a rozlišení jednotlivých patotypů (Gossen et al., 2019; Tso et al., 2021, 2022). *P. brassicae* můžeme detekovat jak v půdě, tak v hostiteli. Problémem metod založených na PCR je komplikovanější příprava vzorků. Spory patogenu jsou totiž velmi odolné, mají silnou stěnu a také se poměrně silně váží na půdní částice. V půdě se navíc mohou vyskytovat různé inhibitory PCR (Kageyama et al., 2003). Příprava vzorku zahrnuje degradaci stěny spor, kterou lze nejlépe provést enzymatickou degradací. Následně se DNA přečišťuje gelovou filtrací. Pro eliminaci inhibitorů lze použít přídatné látky jako je například bovine serum albumin (BSA) (Hejna, 2019). Dnes nejpoužívanější metoda PCR byla popsána ve studii (Cao et al., 2007). Tato metoda je založena na jednom páru primerů. Metoda se používá i pro komerční účely, kde je citlivost 1000 spor na jeden gram půdy (Faggian & Strelkov, 2009). Nejnovější techniky využívají kvantitativní PCR (qPCR). Výhodou qPCR je možnost jednak detekce patogenu ale také možnost odhadnutí intenzity výskytu a množství trvalých spor (Rennie et al., 2011; Wallenhammar et al., 2012).

Jednotlivé izoláty *P. brassicae* se ale mohou lišit v jednonukleotidových polymorfismech, insercích a delecích. Jako marker k identifikaci a k odlišení geografických izolátů *P. brassicae* byla hojně využívána jaderná ribozomální DNA. Tyto markery byly též použity pro vývoj kvantitativních PCR testů ke studii patogenu. Vzhledem k objevům nových různorodých patotypů, bylo třeba identifikovat oblasti genomu zodpovědné za virulenci nebo avirulenci patotypu (Javed et al., 2023). Například pomocí využití *P. brassicae* cpn60 universal target (cpn60UT) byla vyvinuta metoda digital droplet PCR (ddPCR) and loop-mediated isothermal DNA amplification (LAMP) (Gossen et al., 2019). Jinou metodou, hojně využívanou k diferenciaci patotypů, je RNase H-dependent PCR (rhPCR), která amplifikuje rDNA nebo fragmenty genomu.

Pro šlechtění odolných odrůd vůči nádorovitosti, je velmi podstatná identifikace jednotlivých patotypů, která se standardně provádí pomocí biotestů. Nejstarší navržený postup, který se ale stále často používá, je Williamsova klasifikace (Williams at al., 1966). Pomocí této klasifikace je možné rozlišit 16 různých patotypů. Pro biotest jsou zde použity čtyři vhodně vybrané genotypy (dva genotypy kapusty *B. oleracea* a dvě linie tuřínů *B. napus*). Další možný testovaný soubor genotypů, který je mezinárodně uznávaný, nese označení ECD (European clubroot differential). Je využíván hlavně v Evropě (Buczacki et al., 1975). Tento soubor se skládá z pěti různých genotypů *B. rapa*, *B. oleracea* a *B. napus*. Hodnotí se projev napadení u 15 odlišných genotypů, podle kterých je možné reálně odlišit až 23 různých patotypů, teoreticky až 48 (Diederichsen et al., 2009). Pro *B. napus* byl dále, pro lepší rozlišovací schopnost evropských patotypů, navržen doplňkový soubor třech testovacích linií. Pomocí těchto třech genotypů je možno rozlišit dalších 8 patotypů *P. brassicae* (Some et al., 1996).

Rozvoj molekulárních/omics technologií umožňuje analýzu celého genomu patogena a identifikaci jednotlivých patotypů na základě celogenomového sekvenování a následného bioinformatického zpracování. Toto zahrnuje několik základních kroků. Nejdříve se provádí základní filtrace a hodnocení kvality sekvenačních dat, následované odstraněním nízkokvalitních sekvencí a adaptérů pomocí nástrojů, například Trimmomatic nebo Cutadapt. Pro odstranění kontaminace hostitelskou DNA je možné použít referenční genom hostitele a mapování nástroji (BWA, STAR).

Následná rekonstrukce genomu jednotlivých patotypů může být prováděna metodou de novo assembly s využitím assemblerů, jako jsou SPAdes a Unicycler. Scaffolding je pak využíván ke spojení contigů, zejména pro překonání obtížných repetitivních oblastí, přičemž nástroje jako Medusa nebo Ragout mohou pomoci s vytvořením delších sekvencí za použití referenční sekvence. K hodnocení kvality sestavených genomů se využívají programy jako QUAST, BUSCO a Qualimap.

Samotné srovnání genomických sekvencí a identifikaci rozdílů mezi patotypy se používají programy pro multisekvenční alignment (ClustalW, Omega, Kalign). Specifické oblasti pro jednotlivé patotypy lze využít k návrhu PCR specifických primerů pro následnou rutinní identifikaci patogenního materiálu.

Biotesty

Zdroj patogenu, inokulace rostlin a hodnocení napadení

Patogenní materiál

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

Příprava inokula

Po namnožení patogenního materiálu byly napadené kořeny s nádory uloženy do mrazícího boxu při teplotě -26 °C. Při přípravě nového inokulačního media byly nejprve nádory rozmrazeny, mechanicky očištěny a opláchnuty v destilované vodě. Následně byly nádory společně s destilovanou vodou rozmixovány v mixeru. Po 5 minutách mixování byla výsledná suspenze přefiltrována přes jemnou tkaninu a poté centrifugována 20 minut na nejvyšší otáčky. V posledním kroku byly pozorované shluky spor přeneseny do zkumavky s destilovanou vodou a za pomoci Bürkerovy komůrky byl roztok dále ředěn až na požadovanou koncentraci 10^8 spor na 1 ml inokulačního media (Chytilová and Dušek 2007).

Pěstování rostlin a způsob aplikace inokula

Od každého testovaného genotypu bylo vyseto 6 rostlin ve čtyřech opakováních, které byly infikovány sporamí a po 7 týdnech vyhodnocena míra napadení. Substrát pro výsev byl vytvořen smícháním standardního zahradního substrátu B (Florestina) a perlitu v poměru 1:1. Připravený mix byl rozsypan do sadbovačů o velikosti 4 x 4 cm. Do každé buňky sadbovače bylo umístěno jedno semeno do cca 0,5cm hluboké jamky, do které bylo pomocí pipety aplikováno 1 ml připraveného roztoku spor o koncentraci 10^6 spor na 1 ml inokula.

Testované rostliny byly pěstovány za laboratorních podmínek v kultivačních místnostech při teplotě 20 °C přes den a 18 °C v noci. Intenzita osvětlení dosahovala $80 - 100 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ po dobu 16 hodin. Po dvou týdnech zalévání vodou byly rostliny přihnojovány plno spektrálním hydroponickým hnojivem Jungle Garden - base a Jungle Garden - listová zelenina dle specifikace výrobce.

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

Vyhodnocení úrovně napadení

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

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

n_1 = počet rostlin daného genotypu se stupněm 1

n_2 = počet rostlin daného genotypu se stupněm 2

n_3 = počet rostlin daného genotypu se stupněm 3

N_T = celkový počet rostlin daného genotypu

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

Použité přístroje a pomůcky:

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

Chemikálie:

- destilovaná voda
- chloramin T
- zahradnický substrát
- perlit

Příklady výstupů a interpretace výsledků biotestů

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

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

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

(+ citlivá odrůda, - rezistentní odrůda)

Přiřazení vzorků k jednotlivým patotypům dle Williamsova systému

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

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

(+ citlivá odrůda, - rezistentní odrůda)

Příklady fotodokumentace výsledků napadení *P. brassicae*

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



NGS sekvenování

Příprava vzorků pro extrakci DNA

Povrchová dezinfekce nádorů

Celogenomové sekvenování vyžaduje kvalitní, nekontaminovanou DNA. K tomuto účelu byly infikované rostliny pěstovány hydroponicky v perlitu, aby se minimalizovalo znečištění substrátem. Po devíti týdnech od inokulace byly nádory na kořenech omyty od perlitu a uloženy v mrazicím boxu při teplotě $-26\text{ }^{\circ}\text{C}$ až do dalšího zpracování. Pro extrakci DNA byl pro každý vzorek vybrán vhodný nádor o hmotnosti přibližně 25 g. Poté byla provedena důkladná povrchová dezinfekce v třicetiprocentním roztoku sava po dobu 10 minut, následně 1 minutu v devadesátiprocentním etanolu a 20 minut ve dvouprocentním roztoku chloraminu T. V posledním kroku byly nádory opláchnuty ve sterilní destilované vodě.

Extrakce dormantních spór

Povrchově dezinfikovaný nádor byl umístěn do sterilní nádoby mixéru s 250 ml sterilní destilované vody. Po 5 minutách mixování byla kapalina přeceděna přes tři vrstvy sterilní netkané textilie. Část vzniklého roztoku se spórami byla nalita do zkumavky o objemu 50 ml a centrifugována 10 minut při 2000 RCF. Poté byl odstraněn supernatant a přidána další část přecezeného roztoku. Proces centrifugace a odstranění supernatantu se opakoval, dokud nebyl zpracován celý přecezený roztok. Po finálním odstranění supernatantu bylo do zkumavky přidáno 5 ml šedesátiprocentní sacharózy. Zkumavka byla důkladně protřepána a opět centrifugována 10 minut při 2000 RCF. Výsledný supernatant byl přelit do nové zkumavky a doplněn destilovanou vodou na přibližně 40 ml. Po ručním protřepání byl roztok opět centrifugován a supernatant odstraněn. Stěny zkumavky lze opatrně opláchnout vodou, aby nedošlo k poškození peletu se spórami. Přechozí kroky s přidáním vody a centrifugací byly zopakovány ještě dvakrát pro odstranění sacharózy. V posledním kroku byl pelet důkladně protřepán v 5 ml vody, čímž bylo získáno 5 ml vysoce koncentrovaného roztoku extrahovaných spór.

Purifikace dormantních spor

Extrahovaný roztok spór je nutné důkladně přecistit. K tomuto účelu byl použit zjednodušený Ludoxový gradient. K 5 ml koncentrovaného roztoku spór bylo přidáno 5 ml Ludoxu HS 40 a roztok byl důkladně promíchán. Poté bylo do zkumavky po stěně opatrně pipetou přidáno 5 ml čtyřicetiprocentního, třicetiprocentního, dvacetiprocentního a desetiprocentního Ludoxu. Posledních 5 ml tvořila destilovaná voda. Zkumavka byla opatrně přenesena do centrifugy, kde se centrifugovala 30 minut při 1000 RCF. Ve vzniklém Ludoxovém gradientu byla vizuálně identifikována vrstva spór, která byla opatrně přenesena pipetou do nové zkumavky. Následně byly provedeny kroky k odstranění Ludoxu z roztoku.

Desetkrát byla do zkumavky přidána voda, spory promíchány, centrifugovány 10 minut při 2000 RCF a supernatant odstraněn. Výsledný pelet přečištěných spór byl pipetou rozmíchán v 5 ml vody a přenesen do tří mikrozkuavek, které byly v posledním kroku opět centrifugovány. Výsledný pelet extra čistých spór byl poté použit k izolaci genomové DNA.

Extrakce DNA ze spór

Purifikované spóry patogenu ve formě peletu byly ponechány v 2ml mikrozkuavkách. V prvním kroku extrakce genomové DNA byly do zkumavek přidány ocelové kuličky, a obsah byl třepán v homogenizátoru třikrát po 1 minutě při 20 otáčkách za sekundu. Následně byla použita standardní extrakční metoda CTAB. V poslední fázi byl vysušený pelet DNA rozpuštěn ve 40 µl TE pufru ve vodní lázni při teplotě 37 °C. RNáza nebyla použita.

Celogenomové sekvenování

Celkem bylo vybráno pět nejběžnějších patotypů vyskytujících se v České republice. Extrahované vzorky DNA byly odeslány ke sekvenování do společnosti SEQme, která provedla přípravu knihoven a samotné sekvenování na přístroji Illumina NovaSeq. Na každý vzorek bylo vygenerováno minimálně 10 milionů párových sekvencí o délce 150 bp. Toto množství by mělo zajistit více než stonásobné pokrytí genomu *P. brassicae*, jehož velikost je odhadována na 25 Mb.

Bioinformatické zpracování dat

Základní filtrace sekvenačních dat

V prvním kroku byla kvalita dat vyhodnocena programem FastQC. Výsledky ukázaly, že sekvenační výstup má dostatečnou kvalitu pro naše účely. Standardně bylo přistoupeno k odstranění malého množství nekvalitních sekvencí nebo k jejich zkrácení. Na základě použitého sekvenátoru byly vyhledány adaptorové sekvence, které byly následně validovány programem BBtools. Filtrace na základě kvality a přítomnosti zbytkových adaptátorových sekvencí byla provedena programem Trimmomatic. Výsledky tohoto kroku byly opět zkontrolovány programem FastQC.

Odstranění sekvencí hostitele

I přes vysokou čistotu použitých spór data ukázala na přítomnost malého množství hostitelské DNA. Z tohoto důvodu bylo přikročeno k jejímu odstranění na základě genomické sekvence hostitelské rostliny. Jako referenční sekvence genomu *B. rapa* byla použita sekvence CAAS_Brap_v3.01 stažená z databáze NCBI. Mapování sekvencí na referenční genom bylo provedeno programem STAR. Všechny namapované hostitelské sekvence byly z dalšího zpracování vyřazeny.

Rekonstrukce genomů jednotlivých patotypů

De novo Assembly

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

Scaffolding

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

Hodnocení sestavených genomů

Celkově bylo pro každý z pěti vzorků sestaveno čtyři různé genomy, které vznikly použitím kombinací dvou de novo assemblerů (SPAdes, Unicycler) a dvou scaffolderů (Medusa, Ragout). Nejlepší kombinace byla vybrána na základě tří různých kritérií: podobnosti, kompletnosti a přesnosti.

K hodnocení podobnosti byl použit program QUAST, jehož výstup posuzoval hlavně celkovou délku, počet sestavených sekvencí v porovnání s počtem chromozómů v referenční sekvenci, statistické hodnoty N50, NG50 a další.

Kompletnost byla hodnocena pomocí programu BUSCO. Jako referenční databáze genů byla zvolena eukaryota_odb10, protože bližší soubor genů nádorovitosti v systému zatím není k dispozici. Klíčovou hodnotou pro porovnání byl počet nalezených BUSCO genů a jejich fragmentů.

Přesnost sestavených genomů byla vyhodnocena na základě výstupu z programu Qualimap, přičemž byla hodnocena primárně chybovost a uniformita pokryvu.

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

Vylepšování hrubého sestavení genomu

Pro každý vzorek byl vybrán genom vytvořený pomocí programů SPAdes a Ragout. Ostatní možnosti byly vyřazeny z dalšího zpracování. V poslední fázi tvorby genomu byl použit program Pilon, jehož úkolem je využít sekvenované páry k dalšímu vylepšení genomu. Tento software se snaží opravovat chyby vzniklé při sestavování, uzavírat mezery mezi scaffoldy, odhalovat strukturní změny a zajistit rovnoměrné pokrytí. Výsledný návrh genomu byl následně analyzován programem Qualimap, který ověřil, zda došlo k vylepšení po aplikaci programu Pilon.

Srovnání genomových sekvencí

Na základě genomové a mitochondriální referenční sekvence byly v sestavených genomech jednotlivých vzorků identifikovány chromozomové a mitochondriální sekvence. Následně byl proveden alignment pomocí programu Kalign. Celkově bylo získáno 21 multisekvenčních srovnání pro 20 chromozómů a jeden mitochondrion. Alignments byly následně vizualizovány programem Mview.

Jako první bylo přistoupeno k porovnání mitochondriálních sekvencí, protože množství mitochondriální DNA bylo přibližně desetinásobné. Celková pokryvnost mitochondrionu pro jednotlivé vzorky převyšovala hodnotu 1000. Na základě analýzy alignmentu mitochondriálních sekvencí byly identifikovány rozdíly mezi jednotlivými sekvencemi. Jednalo se však pouze o jednonukleotidové polymorfizmy, které pro tvorbu selekčních markerů na bázi PCR nejsou příliš vhodné, hlavně kvůli jejich nízké spolehlivosti. Zdá se, že mitochondriální genom je v případě patotypů *P. brassicae* vysoce konzervativní. Z tohoto důvodu byla provedena důkladná analýza chromozomových sekvencí, kde byla identifikována místa s výraznými změnami typickými pouze pro určité patotypy. Na těchto místech byly pomocí programu Primer3 navrženy primerové páry pro PCR detekci specifických patotypů nádorovitosti. Všechny navržené páry byly otestovány na jejich specifickou reakci na daný patotyp. Zároveň byla provedena optimalizace PCR reakce a vizualizace produktů pomocí elektroforézy. Všechny níže uvedené páry jsou schopné fungovat za stejných podmínek PCR reakce a generovat různé délky produktů pro jednotlivé patotypy. V rámci optimalizace nákladů je tedy možné v jedné reakci detekovat více než jeden patotyp.

Vizualizace jedné z oblastí s unikátní sekvencí pro patotyp P2

Navržený primerový pár k detekci patotypu P2:

P2_1_F TAATGGGAAGGCTAGCGACA

P2_1_R TATCGTCGGGTTCTTCTGG

Velikost produktu: 613

Vizualizace jedné z oblastí s unikátní sekvencí pro patotyp P2



Navržený primerový pár pro tuto oblast:

P2_2_F GCACGTTCTGGACCCAT

P2_2_R ACTCTAAGCGTGTCTCGAG

Velikost produktu: 583

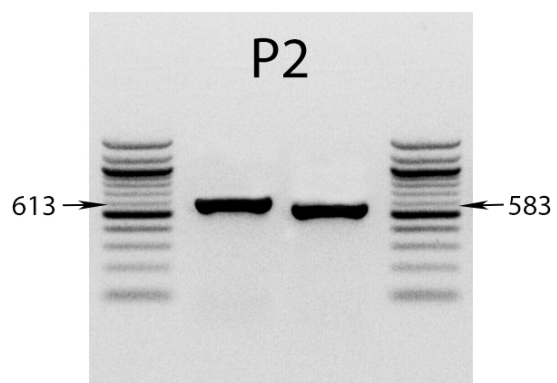
Složení PCR reakce:

- 10 μ l PPP Master Mix
- 1 μ l F primer
- 1 μ l R primer
- 1 μ l templátová DNA
- 7 μ l PCR H₂O

Průběh PCR reakce:

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

Elektroforetická separace PCR produktů



Vizualizace jedné z oblastí s unikátní sekvencí pro patotyp P3



Navržený primerový pár pro tuto oblast:

P3_1_F *GCCAGATAGCTTGTGACCG*
P3_1_R *CGAGCAGGTAGTTTGTGACG*

Velikost produktu: 685

Vizualizace jedné z oblastí s unikátní sekvencí pro patotyp P3



Navržený primerový pár pro tuto oblast:

P3_2_F *CCAGTTGTTCTTGACGCGAT*
P3_2_R *CACTCTTTCCTGACGGTTC*

Velikost produktu: 627

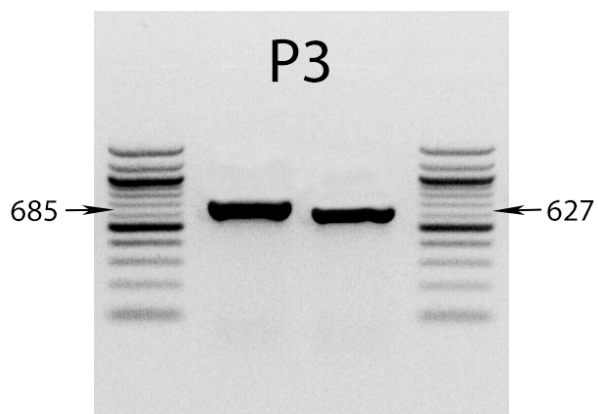
Složení PCR reakce:

- 10 µl *PPP Master Mix*
- 1 µl *F primer*
- 1 µl *R primer*
- 1 µl *templátová DNA*
- 7 µl *PCR H₂O*

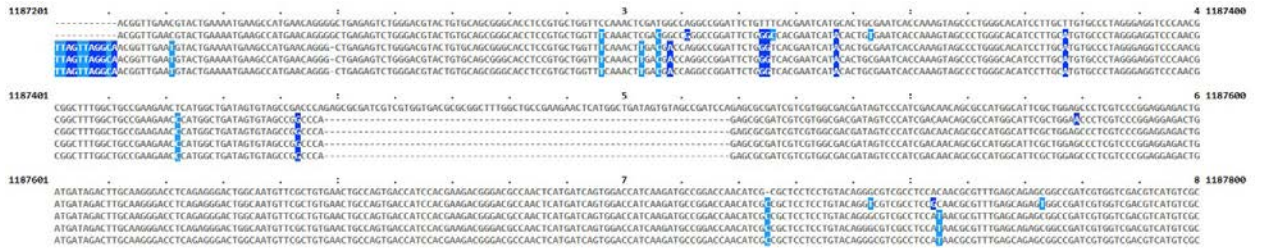
Průběh PCR reakce:

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

Elektroforetická separace PCR produktů



Vizualizace jedné z oblastí s unikátní sekvencí pro patotyp P4

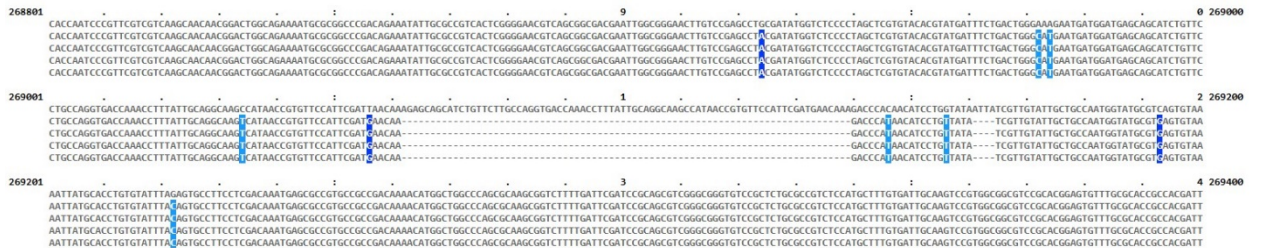


Navržený primerový pár pro tuto oblast:

P4_1_F *TTGGCTGCCGAAGAACTCAT*
P4_1_R *CCGGGCATCAATCGTGTC*

Velikost produktu: 354

Vizualizace jedné z oblastí s unikátní sekvencí pro patotyp P4



Navržený primerový pár pro tuto oblast:

P4_2_F *TCGATTAACAAAGAGCAGCATCT*
P4_2_R *CCACGGACTTGCAATCACAA*

Velikost produktu: 313

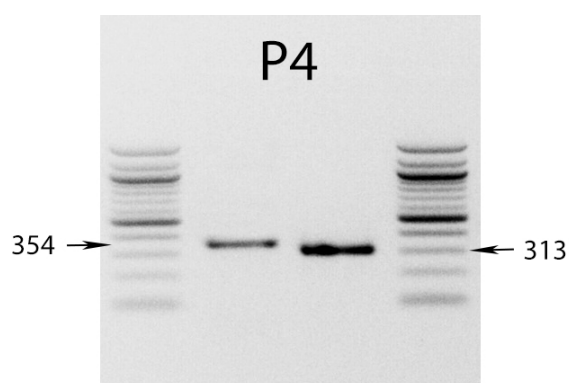
Složení PCR reakce:

- 10 µl *PPP Master Mix*
- 1 µl *F primer*
- 1 µl *R primer*
- 1 µl *templátová DNA*
- 7 µl *PCR H₂O*

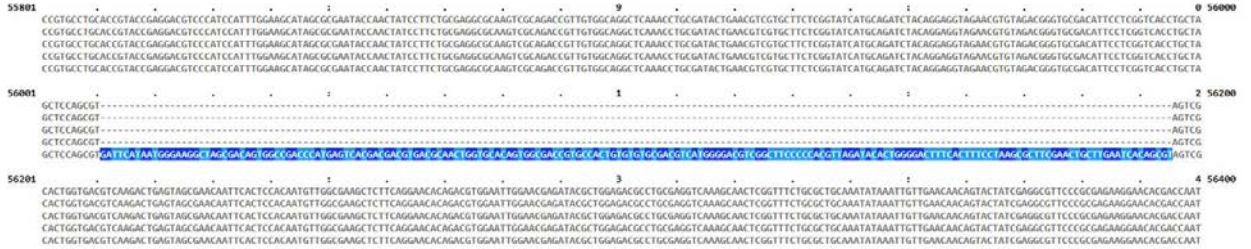
Průběh PCR reakce:

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

Elektroforetická separace PCR produktů



Vizualizace jedné z oblastí s unikátní sekvencí pro patotyp P5

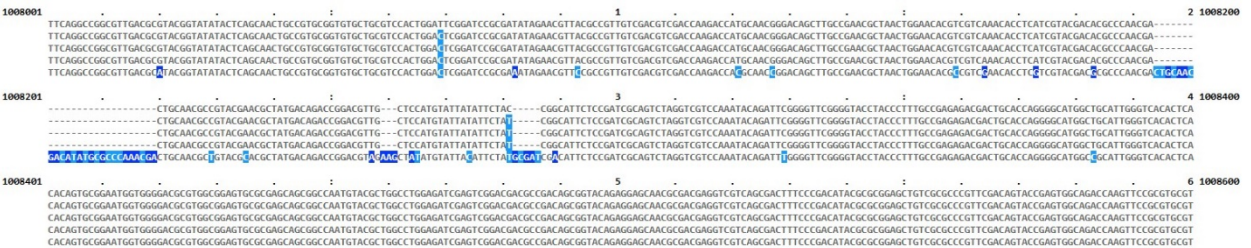


Navržený primerový pár pro tuto oblast:

P5_1_F TAATGGGAAGGCTAGCGACA
P5_1_R CGATCGTGCCCTGAGAAAAC

Velikost produktu: 793

Vizualizace jedné z oblastí s unikátní sekvencí pro patotyp P5



Navržený primerový pár pro tuto oblast:

P5_2_F AACGACATATGCGCCCAAAC
P5_2_R TCCTGGAAACTCTGCGTCAT

Velikost produktu: 725

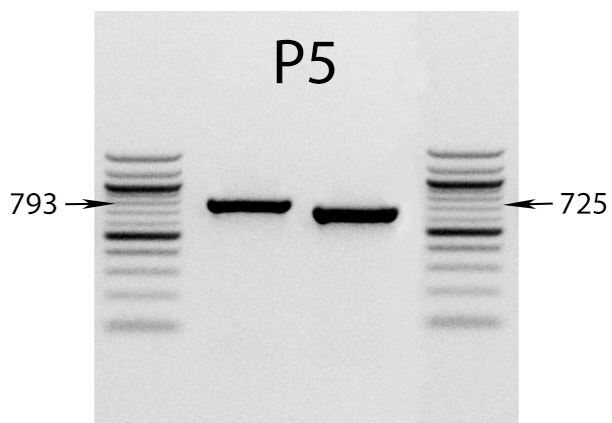
Složení PCR reakce:

- 10 µl PPP Master Mix
- 1 µl F primer
- 1 µl R primer
- 1 µl templátová DNA
- 7 µl PCR H₂O

Průběh PCR reakce:

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

Elektroforetická separace PCR produktů



Vizualizace jedné z oblastí s unikátní sekvencí pro patotyp P7

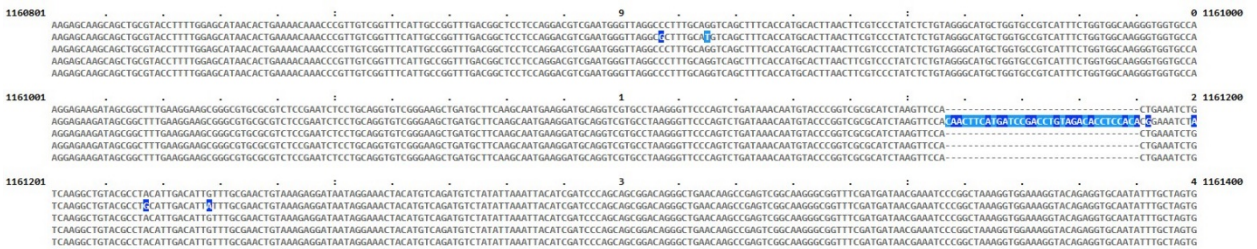


Navržený primerový pár pro tuto oblast:

P7_1_F ACAGACCGCCGCATGTTCC
P7_1_R AGACGAGGACTGCACATGAT

Velikost produktu: 455

Vizualizace jedné z oblastí s unikátní sekvencí pro patotyp P7



Navržený primerový pár pro tuto oblast:

P7_2_F TGATCCGACCTGTAGACACC
P7_2_R ATATCCTGTTTCATCCGCCCC

Velikost produktu: 431

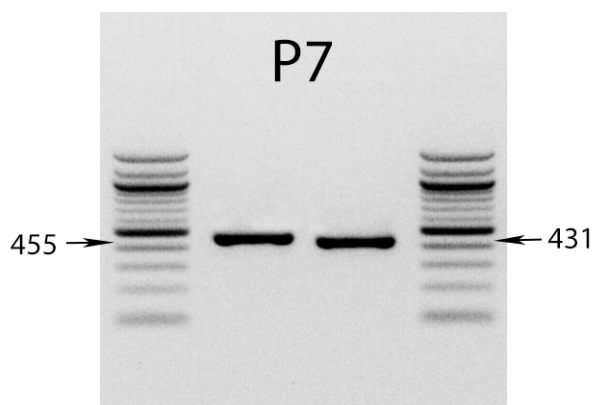
Složení PCR reakce:

- 10 µl PPP Master Mix
- 1 µl F primer
- 1 µl R primer
- 1 µl templátová DNA
- 7 µl PCR H₂O

Průběh PCR reakce:

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

Elektroforetická separace PCR produktů



Bioinformatické analýzy

Použité přístroje a pomůcky:

- výpočetní server
- software pro bioinformatiku

Srovnání novosti postupů

Předkládanou metodiku s názvem “Metodika odlišení patotypů *Plasmodiophora brassicae*“ lze hodnotit jako novou metodiku, neboť v současné době není šlechtitelské praxi k dispozici ucelená metodika popisující identifikaci patotypů na základě biotestů a molekulární analýzy. Dosud dostupné informace jsou jen dílčí a rozptýlené ve vědeckých publikacích a monografiích a většinou se týkají detekce patogena jako takového a nikoliv rozlišení jednotlivých patotypů. Komplexní metodický postup tedy k dispozici není.

Identifikace jednotlivých patotypů *P. brassicae* na základě NGS analýzy a vývoje specifických markerů – postupů pro PCR detekci je postup doposud ve šlechtitelské praxi nepoužívaný. Limity pak představuje požadavek na kvalitní genomická data. Další limitou je dostupnost „know-how“ a potřeba specializované bioinformatické analýzy dat. Předkládaná metodika pak popisuje všechny kroky analýzy – provedení biotestů i provedení molekulárních analýz (příprava inokula, pěstování rostlin a způsob aplikace inokula, vyhodnocení úrovně napadení, aplikace Williamsovy klasifikace, NGS sekvenování, příprava vzorků pro extrakci dna, celogenomové sekvenování, bioinformatické zpracování dat, rekonstrukce genomů jednotlivých patotypů, srovnání genomových sekvencí a postup nalezení oblastí s unikátní sekvencí pro patotypy).

Popis uplatnění metodiky

Využití metodiky pro odlišení patotypů *Plasmodiophora brassicae* je možné ve specializovaných šlechtitelských a aplikačních laboratořích či v laboratořích, které se zabývají molekulárně-biologickými analýzami. Metodika v první části zahrnuje teoretický úvod do problematiky. V praktické části jsou uvedeny metodické postupy pro provedení biotestů a jejich interpretaci a postupy molekulární a bioinformatické analýzy, která vede k identifikaci jednotlivých patotypů *P. brassicae*.

Tato metodika byla vyvinuta a optimalizována pro přesnou a spolehlivou detekci patotypů *Plasmodiophora brassicae* s ohledem na šlechtitelské programy zacílené na selekci rostlin nesoucích geny rezistence/tolerance k patogenu i jeho jednotlivým patotypům. Právě možnost cíleného výběru šlechtitelských materiálů s vyšší tolerancí k biotickému stresu je naprosto klíčová pro úspěšné šlechtění rostlin, které budou poskytovat optimální výnos a kvalitu i podmínkách infekčního tlaku nádorovky. Tato metodika pak může umožnit přenos znalostí a postupů z akademických pracovišť do běžného provozu např. šlechtitelských laboratoří.

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

Ekonomické aspekty

Analýzy popisované v této metodice mají značný ekonomický význam z pohledu šlechtitelských pracovišť. V důsledku závažnosti nádorovitosti, zvyšujícímu se infekčnímu tlaku a nedostupnosti odolných odrůd, se šlechtění na odolnost či toleranci k biotickému stresu stává vysoce aktuální. Pro úspěšné šlechtění je klíčová nejen znalost genů rezistence vůči jednotlivým patotypům, ale také schopnost tyto patotypy identifikovat a rutinně rozlišovat pomocí jednoduché molekulární metody.

Navržený metodický postup umožňuje identifikovat pět nejběžnějších patotypů *P. brassicae* a rutinně je analyzovat pomocí PCR. Práce dále představuje postup pro stanovení indexu napadení (stupeň rezistence) u testovaných genotypů brukvovitých rostlin a navrhuje, na základě bioinformatické a molekulární analýzy, postup pro identifikaci nových nebo vzácnějších patotypů.

Pro provedení analýz je nutné mít k dispozici vybavenou fytopatologickou a molekulárně-biologickou laboratoř. Náklady na klasifikaci jednoho vzorku patogena (izolace DNA, PCR a elektroforetická separace na gelu) činí přibližně 250 Kč. Při identifikaci nového patotypu je však nutné počítat s počátečními náklady na jeho celogenomové sekvenování a dvoudenní práci bioinformatika, což představuje částku kolem 20 000 Kč.

Pro šlechtitelská pracoviště představuje navržený metodický postup významný přínos, protože umožňuje získat nové odrůdy s odolností nebo tolerancí vůči jednotlivým patotypům i možnost následně kombinovat odolnost proti několika patotypům současně.

Seznam použité literatury

- BUCZACKI, S.T., H. TOXOPEUS, P. MATTUSCH, T.D. JOHNSTON, G.R. DIXON a L.A. HOBOLTH, 1975. Study of physiologic specialization in *Plasmodiophora brassicae*: Proposals for attempted rationalization through an international approach. *Transactions of the British Mycological Society* 65(2), 295–303.
- COLHOUN, J., 1957. A Technique for Examining Soil for the Presence of *Plasmodiophora brassicae* Woron. *Annals of Applied Biology* 45(3), 559–565.
- DIEDERICHSEN, Elke, Martin FRAUEN, Enrico G. A. LINDERS, Katsunori HATAKEYAMA a Masashi HIRAI, 2009. Status and Perspectives of Clubroot Resistance Breeding in Crucifer Crops. *Journal of Plant Growth Regulation* 28(3), 265–281.
- DIXON, Geoffrey R., 2009. *Plasmodiophora brassicae* in its Environment. *Journal of Plant Growth Regulation* 28(3), 212–228.
- FAGGIAN, R. a S.E. STRELKOV, 2009. Detection and Measurement of *Plasmodiophora brassicae*. *Journal of Plant Growth Regulation*. 28(3), 282–288.
- GARRETT, Sd, 1945. The Root-Infecting Fungi. *Endeavour*. 4(15), 104–107.
- Gossen, B.D., Al-Daoud, F., Dumonceaux, T., Dalton, J.A., Peng, G., Pageau, D. et al. (2019) Comparison of techniques for estimation of resting spores of *Plasmodiophora brassicae* in soil. *Plant Pathology*, 68, 954–961.
- HEJNA, Ondřej. Identifikace genů rezistence k nádorovitosti pomocí asociativní transkriptomiky. Disertační práce, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích České Budějovice, 2019. Dostupné z: <https://theses.cz/id/inmrox/>.
- Hwang, S.F., Strelkov, S.E., Feng, J., Gossen, B.D., Howard, R.J. 2012. *Plasmodiophora brassicae*: a review of an emerging pathogen of the Canadian canola (*Brassica napus*) crop. *Molecular Plant Pathology* 13: 105–113.
- CHYTILOVÁ, V. a K. DUŠEK, 2007. Metodika testování odolnosti brukvovitých plodin k nádorovitosti. Praha: Výzkumný ústav rostlinné výroby. ISBN 978-80-87011-23-2.
- JAVED, M.A., SCHWELM, A., ZAMANI-NOOR, N., SALIH, R., SILVESTRE VAÑÓ, M., WU, J., GONZÁLEZ GARCÍA, M., HEICK, T.M., LUO, C., PRAKASH, P., PÉREZ-LÓPEZ, E. 2023. The clubroot pathogen *Plasmodiophora brassicae*: A profile update. *Mol Plant Pathol*. 24(2):89-106.
- KAGEYAMA, K., T. KOMATSU a H. SUGA, 2003. Refined PCR protocol for detection of plant pathogens in soil. *Journal of General Plant Pathology* 69(3):153–160.

- LIU, L., QIN, L., CHENG, X., ZHANG, Y., XU, L., LIU, F., TONG, C., HUANG, J., LIU, S., WEI, Y. 2020. Comparing the Infection Biology of *Plasmodiophora brassicae* in Clubroot Susceptible and Resistant Hosts and Non-hosts. *Front Microbiol.* 11:507036.
- MALINOWSKI, R., TRUMAN, W., BLICHARZ, S. 2019. Genius architect or clever thief – how *Plasmodiophora brassicae* reprograms host development to establish a pathogen-oriented physiological sink. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 32:1259–1266.
- 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* 60(5):811–819.
- ROD J. 1996. Reports – Agent of clubroot of crucifer. Brno: ÚKZUZ, 37 (Special Issue): 1–45.
- ŘÍČAŘOVÁ, V., J. KAZDA, K. SINGH a P. RYŠÁNEK, 2016. Clubroot caused by *Plasmodiophora brassicae* Wor.: a review of emerging serious disease of oilseed rape in the Czech Republic. *Plant Protection Science* 52(2):71–86.
- SOME, A., M. J. MANZANARES, F. LAURENS, F. BARON, G. THOMAS a F. ROUXEL, 1996. Variation for virulence on *Brassica napus* L. amongst *Plasmodiophora brassicae* collections from France and derived single-spore isolates. *Plant Pathology* 45(3):432–439.
- STRUCK, C., RÜSCH, S., STREHLOW, B., 2022. Control Strategies of Clubroot Disease Caused by *Plasmodiophora brassicae*. *Microorganisms* 10:620.
- 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.
- TSO, H.H., GALINDO-GONZÁLEZ, L. a STRELKOV, S.E. 2021. Current and future pathotyping platforms for *Plasmodiophora brassicae* in Canada. *Plants*, 10:1446.
- TSO, H.H., GALINDO-GONZÁLEZ, L., LOCKE, T., a STRELKOV, S.E. 2022. Protocol: rhPCR and SNaPshot assays to distinguish *Plasmodiophora brassicae* pathotype clusters. *Plant Methods*, 18:91.
- WALLENHAMMAR, A.-C., 1996. Prevalence of *Plasmodiophora brassicae* in a spring oilseed rape growing area in central Sweden and factors influencing soil infestation levels. *Plant Pathology* 45(4):710–719.
- WALLENHAMMAR, A.-C., C. ALMQUIST, M. SODERSTROM a A. JONSSON, 2012. In-field distribution of *Plasmodiophora brassicae* measured using quantitative realtime PCR. *Plant Pathology* 61(1):16–28.

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

Seznam publikací předcházející metodice

Hejna, O., Kopecký, P., Čurn, V. (2019): Hledání genetických zdrojů rezistence k nádorovitosti košťálovin. Úroda 12, roč. LXVII, 2019, vědecká příloha, s. 121 – 125. ISSN 0139-6013.

Hejna O., Havlickova L., He Z., Bancroft I., Curn V. (2019): Analysing the genetic architecture of clubroot resistance variation in *Brassica napus* by associative transcriptomics. Molecular Breeding, 39, 112.

Název: Hejna O. a kol. (2024): Metodika odlišení patotypů
Plasmodiophora brassicae

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

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

Vydáno bez jazykové úpravy

Metodika byla schválena Ministerstvem zemědělství ČR, dopisem ze dne 8.1.2025 (č.j. MZE-1151/2025-13132), jako uplatněná metodika s doporučením pro její využití v zemědělské praxi č. osvědčení UKZUZ 207204/2024.

Kontakt na autory: hejna@fzt.jcu.cz

ISBN 978-80-7694-094-9



9 788076 940949