

2023

Martin Černý, Marie Greplová, Miroslav Berka, Romana Hampejsová,
Břetislav Brzobohatý, Vladislav Klička, Pengxi Wang, Jan Novák

Metodika časně preselekcce
šlechtitelských materiálů na
odolnost/náchylnost k patogenu
Phytophthora infestans



Certifikovaná metodika

● MENDELU
● Agronomická
● fakulta
●



VÝZKUMNÝ ÚSTAV
BRAMBORÁŘSKÝ
HAVLÍČKŮV BROD



Martin Černý, Marie Greplová, Miroslav Berka, Romana Hampejsová,
Břetislav Brzobohatý, Vladislav Klička, Pengxi Wang, Jan Novák

Metodika časně preselektce šlechtitelských materiálů na odolnost/náchylnost k patogenu *Phytophthora infestans*

Certifikovaná metodika



**VÝZKUMNÝ ÚSTAV
BRAMBORÁŘSKÝ
HAVLÍČKŮV BROD**



Oponenti:

Ing. Jiří Zámečník, CSc.

VÚRV, v. v. i. Praha, Odbor genetiky a šlechtění rostlin, Fyziologie a kryobiologie rostlin;
zamecnik@vurv.cz; tel.: +420 233 022 426, +420 702 087 666

Ing. Václav Čermák

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský; Sekce rostlinné výroby, Národní odrůdový úřad,
Oddělení zkoušek užitné hodnoty; vaclav.cermak@ukzuz.cz; tel.: 569 400 462; 737 267 259

Autorský kolektiv:

doc. Mgr. Martin Černý, Ph.D. (podíl na autorství 20 %),

Ing. Marie Greplová, Ph.D. (podíl na autorství 20 %),

Ing. Miroslav Berka (podíl na autorství 10 %),

Mgr. Romana Hampejšová (podíl na autorství 15 %),

prof. RNDr. Břetislav Brzobohatý, CSc. (podíl na autorství 10 %),

Ing. Vladislav Klička (podíl na autorství 15 %),

Pengxi Wang, M.Sc. (podíl na autorství 5 %),

Mgr. Jan Novák, Ph.D. (podíl na autorství 5 %),

Metodika vznikla za finanční podpory Ministerstva zemědělství a je výstupem výzkumného projektu Národní agentury pro zemědělský výzkum, projekt **QK1910045: Identifikace metabolitů korelujících s kvantitativní rezistencí k *Phytophthora infestans***



© Mendel University in Brno, Zemědělská 3, Brno 613 00, Czech Republic

ISBN 978-80-7509-952-5

<https://doi.org/10.11118/978-80-7509-952-5>



Open Access. Publikace „Metodika časné preselektce šlechtitelských materiálů na odolnost/náchylnost k patogenu *Phytophthora infestans*“ je licencována [Creative Commons Attribution-NonCommercialNoDerivatives 4.0 \(CC BY-NC-ND 4.0\) International License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

Obsah

Metodika časné preselektce šlechtitelských materiálů na odolnost/náchylnost k patogenu

| | |
|--|----|
| <i>Phytophthora infestans</i> | i |
| 1 Úvod | 1 |
| 2 Cíl metodiky | 3 |
| 3 Vlastní popis metodiky | 4 |
| 3.1 Kultivace rostlin pro testování..... | 4 |
| 3.2 Odběr rostlinného materiálu..... | 4 |
| 3.3 Extrakce pro omické analýzy | 5 |
| 3.4 Analýza metabolitů..... | 5 |
| 3.5 Analýza lipidů..... | 6 |
| 3.6 Analýza proteinů | 7 |
| 3.7 Ověření přítomnosti <i>P. infestans</i> | 8 |
| 3.8 Statistické zpracování a preselektce vhodných genotypů na základě necílené analýzy..... | 8 |
| 3.1 Cílená analýza identifikovaných látek spojených s rezistencí k <i>P. infestans</i> | 9 |
| 4 Technické vybavení..... | 10 |
| 5 Příklad využití metody..... | 11 |
| 5.1 Provokační test na oddělených listech – odhad rezistence genetického materiálu pomocí profilování lipidů | 11 |
| 5.2 Identifikace rezistentní odrůdy na základě sběru listů z polního experimentu..... | 12 |
| 5.3 Provokační test na rostlinách pěstovaných <i>in vitro</i> | 13 |
| 6 Srovnání novosti postupů..... | 15 |
| 7 Popis uplatnění metodiky..... | 16 |
| 8 Ekonomické aspekty | 17 |
| 9 Seznam použité související literatury..... | 18 |
| 10 Seznam publikací, které předcházely metodice a byly publikovány | 21 |

1 Úvod

Brambory zůstávají přes klesající osázenou plochu v ČR (28 850 ha v roce 2021, 27 645 ha v roce 2022 [1]) významnou plodinou pro lidskou výživu, průmyslové zpracování a výrobu škrobu. Brambory jsou z pohledu náročnosti na spotřebu vody a výnosu efektivnější plodinou než pšenice, ale jejich světová roční produkce se pohybuje pouze kolem 360 milionů tun (<https://www.fao.org/>). Jedním z důvodů je skutečnost, že součástí jejich domestikace bylo snížení ochranných toxických sloučenin, jako jsou glykoalkaloidy, které ale snížilo i odolnost vůči škůdcům a patogenům. Brambory se tak staly jednou z nejvíce závislých plodin na použití fungicidů, a proto i velmi ekonomicky náročnou. Náklady na vypěstování jednoho hektaru brambor jsou pro pěstitele více než 100.000 Kč [2]. S pěstováním brambor se také pojí velká rizika, protože v případě špatné úrody je celá produkce prakticky nepoužitelná. Náklady na chemickou ochranu brambor tvoří 10,9 % úplných vlastních nákladů na výrobu brambor a jsou po nákladech na sadbu, osobních nákladech a nákladech na provoz vlastní techniky čtvrtou největší nákladovou položkou. Největší podíl patří fungicidním přípravkům na ochranu proti plísni bramboru (46,2 %) [1].

Původcem tohoto onemocnění je patogen z rodu *Phytophthora* (výraz z řečtiny pro ničitel rostlin). Je to celosvětově rozšířený rod houbových oomycet zahrnující více než 200 taxonů distribuovaných ve dvanácti kladech a v několika z nich se vyskytují patogeny s významným negativním dopadem na zemědělskou produkci, jako je právě *P. infestans*, původce plísně bramboru. Tento patogen byl poprvé popsán Heinrichem Antonem de Bary, který studoval chorobu brambor odpovědnou za velký irský hladomor [3]. *P. infestans* je obligátní hemibiotrofní patogen, který napadá živá pletiva (listy, stonky, hlízy) z čeledi *Solanaceae* [4]. Většina infekcí během sezóny je iniciována rychlou asexuální reprodukcí a spory se dostávají do listů a stonků přirozenými otvory (např. průduchy), pupeny, ranami nebo přímým narušením kutikuly. Patogen přijímá živiny z pletiv hostitele až do terminální fáze infekce, kdy dochází k nekróze hostitele a sporulaci patogenu. Agresivní izoláty *P. infestans* jsou schopné této fáze dosáhnout již tři dny po infekci listů [5]. Rychlá produkce sporangií a další šíření větrem na relativně velké vzdálenosti pak může vést k zničení celé vegetace během několika týdnů [6,7]. Patogen může rovněž přezimovat v hlízách, které zůstanou po sklizni na poli a slouží jako primární inokulum. Globální šíření patogenu je převážně antropomorfní v důsledku obchodu se sadbovými brambory, který vede k nechtěnému šíření infikovaných hlíz a zanesení nových kmenů *P. infestans*.

V posledních 11 sledovaných letech náklady na pesticidní ochranu překračují hodnotu 10 tis. Kč na 1 ha brambor. Pro úspěšnou produkci kvalitních hlíz bramboru je nezbytné aplikovat i více než 10 fungicidních postřiků během pěstební sezóny (s ohledem na průběh počasí) proti původci plísně bramboru *Phytophthora infestans*. Experimentálně bylo prokázáno, že bez použití fungicidů by bylo 20-60 % produkce ztraceno [8]. Tato opatření ale mají negativní dopad na životní prostředí, zejména na zdroje pitných vod, v nichž musí být sledována rezidua použitých chemických látek a některé jejich deriváty vzniklé metabolickou přeměnou. Z hlediska udržitelnosti produkce bramboru i v oblastech zdrojů pitných vod je nutné zavádět alternativní opatření. Jednou z cest je pěstovat nové odolnější genotypy, které dovedou lépe čelit nejzávažnějšímu patogenu bramboru, tj. *Phytophthora infestans*.

Tradiční šlechtění vychází z přirozené rezistence. Rostliny si vyvinuly několik vrstev obrany, aby odolávaly útokům patogenů. Kromě pasivní obrany založené na fyzických bariérách a chemickém složení mají i aktivní obranné mechanismy, které reagují na přítomnost patogenu. *Phytophthora* produkuje několik unikátních sloučenin, které jsou rozpoznávány rostlinnými receptory,

včetně proteinů elicitinů a také β -glukanů uvolňovaných z buněčné stěny oomycet působením rostlinných glukanas [9]. Úspěšná reakce vede k produkci reaktivních forem kyslíku a hypersenzitivní reakci, expresi obranných genů, ukládání kalózy a akumulaci ochranných sekundárních metabolitů. Patogen *P. infestans* tuto reakci blokuje produkcí efektorů a pouze rostliny obsahující vhodné proteiny rezistence (R-proteiny) mohou odolat. Rozlišujeme pak kvalitativní (vertikální) a kvantitativní (horizontální) rezistenci. V rámci rezistentního šlechtění již nestačí sledovat pouze kvalitativní odolnost vůči patogenu, která je rasově specifická, řízená jednotlivými *R*-geny a poskytuje rasově úplnou rezistenci díky hypersenzitivní odpovědi. Tento způsob rezistence je často překonán nově vyvinutými virulentními rasami [6]. Kvantitativní rezistence je kombinovaným výsledkem interakcí mezi více geny označovanými jako QTL (quantitative trait loci). Tyto geny/proteiny většinou mají pouze vedlejší roli v obraně, ale výsledný aditivní účinek velkého počtu složek s menšími individuálními vlivy podporuje rezistenci. Rezistence na základě QTL obvykle není úplná, ale je robustnější a většinou není specifická pouze pro určitý patogen. Počet identifikovaných QTL se neustále zvyšuje [10,11], ale molekulární mechanismy, které stojí za pozorovanou odolností, většinou nejsou známy. Dosud používané DNA markery ve šlechtění mohou dobře postihnout pouze kvalitativní rezistenci, čili rezistenci řízenou hlavními geny rezistence. Trvalá kvantitativní rezistence je však řízena složitou sítí genů a dalších regulačních prvků. Některé z těchto prvků se podílejí na regulaci transkripce a umlčování genů, zatímco jiné určují biochemické vlastnosti a řídí produkci metabolitů. I když naše soudobé znalosti biochemických drah zatím neumožňují zcela pochopit tyto procesy, do jisté míry lze sledovat jejich dopad na složení rostlinných pletiv. V případě profilu metabolomu pak můžeme hovořit o mQTL (metabolomické QTL), specifické akumulaci určitých metabolitů [12], kterými jsou například látky ze skupiny fenyylpropanoidů, mastné kyseliny, alkaloidy a terpenoidy.

2 Cíl metodiky

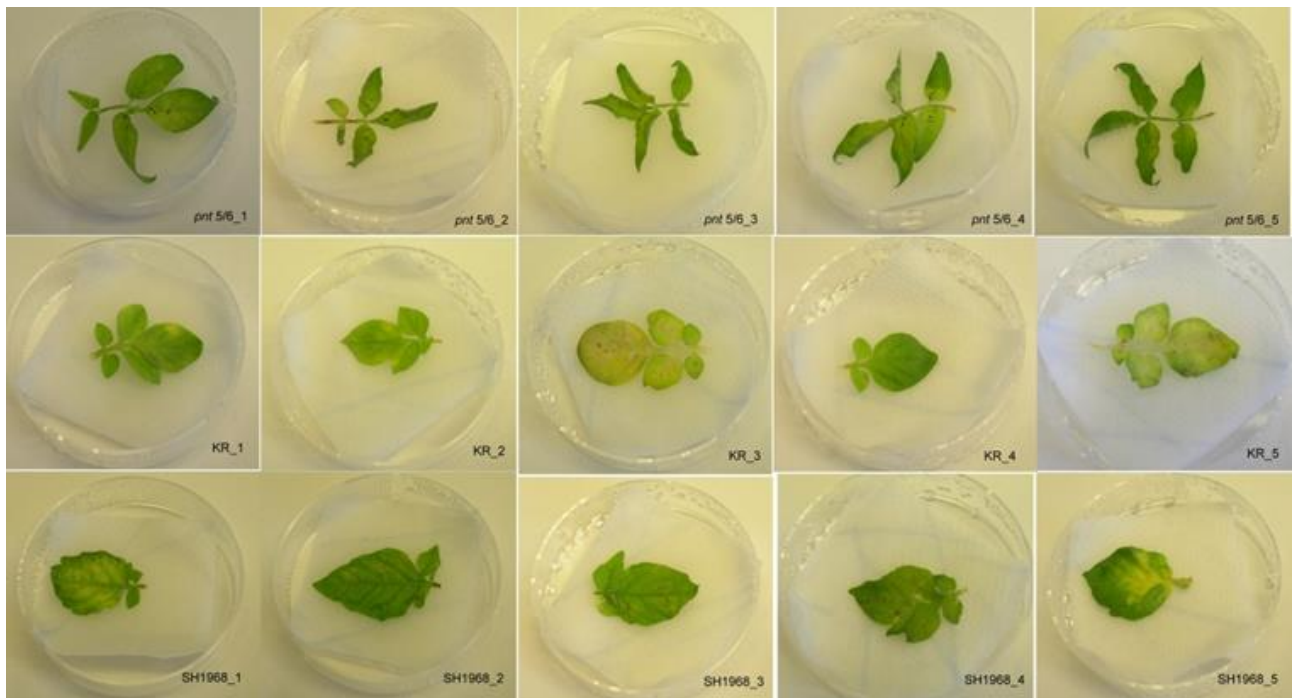
Introgrese trvalé rezistence k *Phytophthora* je časově náročný proces a často končí neúspěchem. Limitujícími faktory jsou dlouhé šlechtitelské cykly, nedostačující komerční kvalita hlíz získaných rezistentních genotypů, ale i rychlá ztráta rezistence v důsledku evoluce patogenu [13,14]. Například velmi slibná introgrese genu *R* ze *S. demissum* trvala několik desetiletí a výsledný kultivar během pouze několika vegetačních období rezistenci ztratil, protože nové virulentní rasy *P. infestans* ji překonaly [15]. Tradiční proces šlechtění brambor trvá od počátečního křížení do získání nového kultivaru v průměru více než deset let, ale proces může trvat podstatně déle díky pracnému procesu selekce, zpětnému křížení a eliminaci nežádoucích vlastností [16]. Introgrese jediného *R* genu z planého druhu *S. bulbocastanum* do odrůd brambor Bionica a Toluca trvala neuvěřitelných 46 let [17]. Cílem vývoje této metodiky bylo urychlit šlechtitelský proces pomocí včasné preselektce vhodných kandidátních kříženců na základě molekulárních markerů a mQTL spojených s rezistencí. Tato selekce aplikovaná na předem vybrané křížence ve čtvrtém roce šlechtitelského cyklu nahrazuje polní testy rezistence a zkracuje délku procesu šlechtění nejméně o tři roky [18]. S využitím cílené analýzy námi identifikovaných látek korelujících s citlivostí/odolností vůči patogenu *P. infestans* je možné posuzovat šlechtitelský materiál v počátečním stádiu šlechtitelského procesu a s předstihem vyloučit vysoce náchylné genotypy nebo naopak vybrat genotypy s potenciálem vyšší/vysoké odolnosti k patogenu *P. infestans*.

3 Vlastní popis metodiky

3.1 Kultivace rostlin pro testování

Kultivace rostlin pro *in vitro* testování je provedena na živném médiu dle Murashige a Skooga s vitamíny (Duchefa Biochemie), s přidavkem 30 g l⁻¹ sacharózy a 3 g l⁻¹ GELRITE™ (Duchefa Biochemie) pro zpevnění. Rostliny jsou kultivovány v kultivační komoře za fotoperiody dlouhého dne (16 h světlo, 60 μmol m⁻² s⁻¹, 8 h tma) a konstantní teploty 22±1 °C. Inokulace je provedena ve stáří rostlin 4–5 týdnů. Pro inokulaci se použije čistá kultura *P. infestans*. Patogen může být izolován z nakaženého pletiva nebo získán ze sbírek mikroorganismů (např. Národní program konzervace a využívání genetických zdrojů mikroorganismů a drobných živočichů hospodářského významu, <https://www.microbes.cz/>). Pro inokulaci se využije suspenze o hustotě 1,3 – 6×10⁴ sporangií ml⁻¹, výhodou je využití směsné kultury více izolátů *P. infestans*. Každá rostlina je očkována 10 μl (dvě kapky po 5 μl).

Pro testování na oddělených listech (Obr. 1) jsou rostliny pěstovány na médiu Schenk & Hildebrandt s vitamíny (Duchefa Biochemie), s 20 g l⁻¹ sacharózy a 3 g l⁻¹ GELRITE™ (Duchefa Biochemie), doplněné o AgNO₃ (3 mg l⁻¹) a Alar 85 (1,5 mg l⁻¹). Listy jsou odebrány z rostlin ve stáří 6 týdnů (5 listů na genotyp ve dvou opakováních), ponořeny do suspenze sporangií *P. infestans* (směs izolátů, 5×10³ ml⁻¹) v kohoutkové vodě a položeny spodní stranou na navlhčenou buničinu v Petriho misce (vše za sterilních podmínek). Misky jsou následně zabezpečeny Parafilmem a kultivovány v kultivační komoře za podmínek dlouhého dne a teplotě 22 °C, jak je uvedeno výše.



Obr. 1. Ukázka inokulačního testu na oddělených listech.

3.2 Odběr rostlinného materiálu

Listy rostlin se odebírají třetí den po umělé infekci v *in vitro* podmínkách, případně ve skleníku nebo v technickém izolátu. V rámci polního experimentu se vzorkuje krátce po první signalizaci výskytu *P. infestans* v okolních lokalitách, dokud jsou testované rostliny bez zjevných projevů napadení. Z jedné rostliny je odebráno šest jednoduchých listů pro zaručení dostatečné reprezentativnosti materiálu a pro

každý genotyp jsou provedena aspoň tři biologická opakování. Listy se ihned po odtržení vloží do připravené obálky z alobalu nebo do kryozkumavek a takto připravený vzorek se ponoří do tekutého dusíku. Vzorky jsou v tekutém dusíku uloženy v tlustostěnné polystyrenové krabici s volně položeným polystyrenovým víkem s možností úniku par (Obr. 2). Vzorky z tekutého dusíku jsou v laboratoři vloženy do mrazicího boxu s teplotou $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, před vlastní analýzou jsou pak lyofilizovány a homogenizovány při pokojové teplotě s využitím tloučku, nebo oscilačního mlýnu (Laboratory Mixer Mill MM 400).



Obr. 2. Ukázka sběru materiálu z polního experimentu.

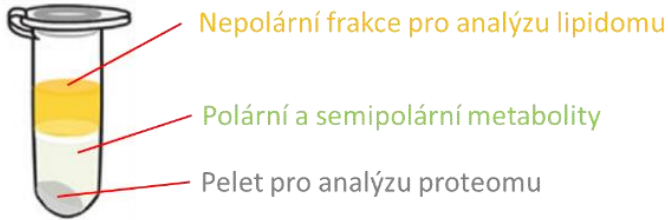
3.3 Extrakce pro omické analýzy

Základní analýza vychází ze zavedeného protokolu kombinované extrakce, který umožňuje paralelní stanovení metabolitů, proteinů, lipidů a vybraných hormonů z jedné extrakce a to již od 10 mg hmotnosti pletiv před lyofilizací (např. [19-23]). Homogenizovaná pletiva jsou vysrážena pomocí směsi methanol/methyl terc-butylether/voda (1:3:1). Pro množství vzorku do 30 mg sušiny postačuje 1 ml tohoto roztoku. Volitelně je možné do extrakčního roztoku přidat standardy pro absolutní kvantifikaci (např. standardy hormonů) nebo značený metabolit pro kontrolu kvality (např. ^{13}C L-valin). Pro větší navážky je vhodné vzorek alikvotovat. Po důkladném protřepání je vzorek ponechán aspoň 12 h v mrazicím boxu ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$). Následně je k vzorku přidáno 0,5 ml směsi methanol:voda (1:3) a vzorek je centrifugován (10 min, $10\ 000\times g$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$). Vzorek se rozdělí na pelet, který obsahuje proteiny a nukleové kyseliny, a supernatant, který obsahuje dvě oddělené fáze (nepolární a polární/semipolární; Obr. 3).

3.4 Analýza metabolitů

Z polární/semipolární frakce je odebráno 50 μl a odpařeno pomocí vakuového koncentrátoru (SpeedVac, Thermo). Vzorek je následně rozpuštěn 20 μl methoximačnického roztoku (40 mg methoxyaminhydrochloridu v 1 ml pyridinu) a inkubován 90 min při $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ za stálého třepání. Následně jsou metabolity derivatizovány přidávkem 80 μl silylačního roztoku (N-methyl-N-trimethylsilyltri fluoracetamid, Merck) a směs je inkubována 30 min při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ za stálého třepání. Profil metabolitů je měřen pomocí plynové chromatografie spojené s hmotnostní spektrometrií (GC-MS) s vysokým rozlišením Q Exactive GC Orbitrap GC-MS/MS (Thermo Fisher). Vzorky jsou nastříknuty v režimu split 5:1 (vstupní teplota $250\text{ }^{\circ}\text{C}$, splitless time 0,8 min, purge flow $5,0\text{ ml min}^{-1}$, split flow $6,0\text{ ml min}^{-1}$) na GC kolonu TG-5SILMS (Thermo Fisher, $30\text{ m}\times 0,25\text{ mm}\times 0,25\text{ }\mu\text{m}$) s heliem jako nosným plynem při konstantním průtoku $1,2\text{ ml min}^{-1}$. Metabolity jsou následně separovány s gradientem teploty 28 minut (konstantní teplota $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 5 min, poté gradient $9\text{ }^{\circ}\text{C}$ za minutu až po $320\text{ }^{\circ}\text{C}$) a ionizovány pomocí elektronové ionizace (energie elektronů 70 eV, emisní proud 50 μA , teplota iontového zdroje $250\text{ }^{\circ}\text{C}$). Hmotnostní spektrometr měří v režimu MS profilu, rozlišení 60 000, rozsah skenování 50–650 m/z, automatický maximální čas plnění orbitální pasti a automatické řízení

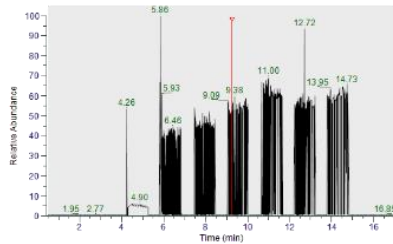
akumulace iontů na 1e6, interní kalibrace lockmass [m/z]: 207,0323. Data jsou analyzována pomocí CompoundDiscoverer 3.0 (Thermo) a identifikace jsou získány na základě porovnání se spektrální knihovnou (NIST2014 a GC-Orbitrap Metabolomics). Jako spolehlivě identifikované metabolity jsou považovány pouze ty, které dosáhnou aspoň skóre ≥ 70 a odchylky od očekávaného retenčního indexu $\Delta RI < 2\%$.



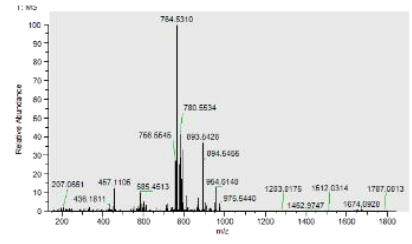
| Ref. | Formula | ID | LipidGroup | Grade | Score |
|--------|-----------------------|------------------|------------|-------|-------|
| 370700 | PE(16:0_18:2)+H | PE(24:2)+H | A | M52 | |
| 370704 | PE(16:0_18:3)+H | PE(24:3)+H | A | M52 | |
| 370709 | DG(14:3_18:3)+H | DG(28:6)+H | A | M52 | |
| 370761 | PE(18:1_18:3)+H | PE(36:4)+H | A | M52 | |
| 370847 | PG(16:0_18:3)+NH4 | PG(34:3)+NH4 | A | M52 | |
| 370988 | TG(14:0_18:3)+H | TG(44:5)+H | A | M52 | |
| 371025 | PA(18:3_18:2)+NH4 | PA(36:5)+NH4 | A | M52 | |
| 371197 | AcHex5(0-5)+NH4 | AcHex5(1)+NH4 | A | M52 | |
| 370586 | PE(18:3_20:2)+H | PE(38:5)+H | B | M52 | |
| 370689 | DG(14:3_18:3)+Na | DG(28:3)+Na | B | M52 | |
| 370987 | BlmMPA(18:3_18:3)+NH4 | BlmMPA(36:6)+NH4 | B | M52 | |
| 370765 | BlmMPA(18:2_20:2)+NH4 | BlmMPA(40:6)+NH4 | B | M52 | |
| 370714 | PC(18:0_18:2)+K | PC(34:7)+K | B | M52 | |



1 TriversaNanomate propojený pro přímý nástřik lipidů na hmotnostní spektrometr



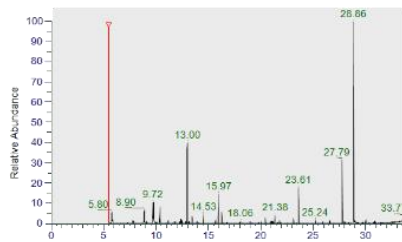
2 MS spektrum slepého vzorku a 6 reálných vzorků (celkový iontový tok)



3 Identifikace lipidů pomocí nástroje LipidSearch a průměrné MS spektrum pro relativní kvantifikaci



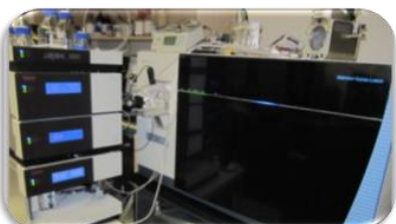
1 Nástřik vzorku na plynovou chromatografii spojenou s hmotnostní spektrometrií



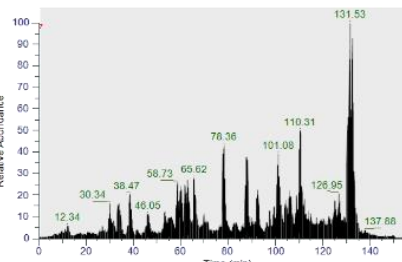
2 MS spektrum profilu separovaných metabolitů

| Check | Tag | Name | Calc. MW | RT (min) | Reference MS | Log TIC | MSF (Lib MS) |
|-------|-----|--------------------------|----------|----------|--------------|---------|--------------|
| 1 | SP | 1-phenylethylamine | 105.12 | 10.18 | 1760202 | 1264600 | C12H15N |
| 2 | SP | 1,2-dimethylpropan-1-ol | 74.12 | 11.18 | 1760202 | 1264600 | C4H10O |
| 3 | SP | 1,3-dimethylpropan-2-ol | 74.12 | 11.18 | 1760202 | 1264600 | C4H10O |
| 4 | SP | 1,4-dimethylpropan-2-ol | 74.12 | 11.18 | 1760202 | 1264600 | C4H10O |
| 5 | SP | 1,5-dimethylpropan-2-ol | 74.12 | 11.18 | 1760202 | 1264600 | C4H10O |
| 6 | SP | 1,6-dimethylpropan-2-ol | 74.12 | 11.18 | 1760202 | 1264600 | C4H10O |
| 7 | SP | 1,7-dimethylpropan-2-ol | 74.12 | 11.18 | 1760202 | 1264600 | C4H10O |
| 8 | SP | 1,8-dimethylpropan-2-ol | 74.12 | 11.18 | 1760202 | 1264600 | C4H10O |
| 9 | SP | 1,9-dimethylpropan-2-ol | 74.12 | 11.18 | 1760202 | 1264600 | C4H10O |
| 10 | SP | 1,10-dimethylpropan-2-ol | 74.12 | 11.18 | 1760202 | 1264600 | C4H10O |
| 11 | SP | 1,11-dimethylpropan-2-ol | 74.12 | 11.18 | 1760202 | 1264600 | C4H10O |
| 12 | SP | 1,12-dimethylpropan-2-ol | 74.12 | 11.18 | 1760202 | 1264600 | C4H10O |
| 13 | SP | 1,13-dimethylpropan-2-ol | 74.12 | 11.18 | 1760202 | 1264600 | C4H10O |
| 14 | SP | 1,14-dimethylpropan-2-ol | 74.12 | 11.18 | 1760202 | 1264600 | C4H10O |
| 15 | SP | 1,15-dimethylpropan-2-ol | 74.12 | 11.18 | 1760202 | 1264600 | C4H10O |
| 16 | SP | 1,16-dimethylpropan-2-ol | 74.12 | 11.18 | 1760202 | 1264600 | C4H10O |
| 17 | SP | 1,17-dimethylpropan-2-ol | 74.12 | 11.18 | 1760202 | 1264600 | C4H10O |
| 18 | SP | 1,18-dimethylpropan-2-ol | 74.12 | 11.18 | 1760202 | 1264600 | C4H10O |
| 19 | SP | 1,19-dimethylpropan-2-ol | 74.12 | 11.18 | 1760202 | 1264600 | C4H10O |
| 20 | SP | 1,20-dimethylpropan-2-ol | 74.12 | 11.18 | 1760202 | 1264600 | C4H10O |
| 21 | SP | 1,21-dimethylpropan-2-ol | 74.12 | 11.18 | 1760202 | 1264600 | C4H10O |
| 22 | SP | 1,22-dimethylpropan-2-ol | 74.12 | 11.18 | 1760202 | 1264600 | C4H10O |
| 23 | SP | 1,23-dimethylpropan-2-ol | 74.12 | 11.18 | 1760202 | 1264600 | C4H10O |
| 24 | SP | 1,24-dimethylpropan-2-ol | 74.12 | 11.18 | 1760202 | 1264600 | C4H10O |
| 25 | SP | 1,25-dimethylpropan-2-ol | 74.12 | 11.18 | 1760202 | 1264600 | C4H10O |
| 26 | SP | 1,26-dimethylpropan-2-ol | 74.12 | 11.18 | 1760202 | 1264600 | C4H10O |
| 27 | SP | 1,27-dimethylpropan-2-ol | 74.12 | 11.18 | 1760202 | 1264600 | C4H10O |
| 28 | SP | 1,28-dimethylpropan-2-ol | 74.12 | 11.18 | 1760202 | 1264600 | C4H10O |
| 29 | SP | 1,29-dimethylpropan-2-ol | 74.12 | 11.18 | 1760202 | 1264600 | C4H10O |
| 30 | SP | 1,30-dimethylpropan-2-ol | 74.12 | 11.18 | 1760202 | 1264600 | C4H10O |

3 Identifikace a kvantifikace pomocí nástroje CompoundDiscoverer



1 Analýza proteomu pomocí kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie



2 MS spektrum profilu separovaných peptidů (celkový iontový tok)

| Specialized Traces | Consensus Features | Peptide Protein Groups | PSMs | Annotation |
|--------------------|--------------------|------------------------|---------|------------|
| Protein | Protein | Protein | Protein | Protein |
| 1 | High | PGIC:0002027 | 100 | 100 |
| 2 | High | PGIC:0002027 | 100 | 100 |
| 3 | High | PGIC:0002027 | 100 | 100 |
| 4 | High | PGIC:0002027 | 100 | 100 |
| 5 | High | PGIC:0002027 | 100 | 100 |
| 6 | High | PGIC:0002027 | 100 | 100 |
| 7 | High | PGIC:0002027 | 100 | 100 |
| 8 | High | PGIC:0002027 | 100 | 100 |
| 9 | High | PGIC:0002027 | 100 | 100 |
| 10 | High | PGIC:0002027 | 100 | 100 |
| 11 | High | PGIC:0002027 | 100 | 100 |
| 12 | High | PGIC:0002027 | 100 | 100 |
| 13 | High | PGIC:0002027 | 100 | 100 |
| 14 | High | PGIC:0002027 | 100 | 100 |
| 15 | High | PGIC:0002027 | 100 | 100 |
| 16 | High | PGIC:0002027 | 100 | 100 |
| 17 | High | PGIC:0002027 | 100 | 100 |
| 18 | High | PGIC:0002027 | 100 | 100 |
| 19 | High | PGIC:0002027 | 100 | 100 |
| 20 | High | PGIC:0002027 | 100 | 100 |
| 21 | High | PGIC:0002027 | 100 | 100 |
| 22 | High | PGIC:0002027 | 100 | 100 |
| 23 | High | PGIC:0002027 | 100 | 100 |
| 24 | High | PGIC:0002027 | 100 | 100 |
| 25 | High | PGIC:0002027 | 100 | 100 |
| 26 | High | PGIC:0002027 | 100 | 100 |
| 27 | High | PGIC:0002027 | 100 | 100 |
| 28 | High | PGIC:0002027 | 100 | 100 |
| 29 | High | PGIC:0002027 | 100 | 100 |
| 30 | High | PGIC:0002027 | 100 | 100 |

3 Identifikace a kvantifikace proteinů nástrojem ProteomeDiscoverer

Obr. 3. Rozdělení vzorku na frakce pro následnou analýzu lipidů, metabolitů a proteinů. Detaily nastavení jednotlivých měření jsou popsány v kapitolách 3.5–3.7.

3.5 Analýza lipidů

Celkové lipidy z oddělené etherové frakce jsou alikvotovány. 100 μ l je použito pro ověření složení pomocí tenkovrstvé chromatografie (TLC, silikagel 60, Merck). Vzorek je nanesen v třech technických opakováních po 30 μ l a separován pomocí směsi hexan/terc-butylmethylether/kyselina octová (84/15/1) po dobu 60 minut. TLC je následně obarvena 0,03% Coomassie Brilliant Blue R-250, obraz

zaznamenán pomocí denzitometru (kalibrovaný denzitometr GS-800, Bio-Rad) a kvantifikován pomocí nástroje ImageJ [24]. Paralelně je 100 μ L etherové frakce vysušena vakuovou centrifugací, rozpuštěna ve 200 μ L směsi isopropanol/methanol/terc-butylmethylether (4/2/1) s přídatkem 20 mM HCOONH₄ a analyzováno přímou infuzí za použití nanoelektrospreje Triversa Nanomate (Advion Biosciences) a hmotnostního spektrometru Orbitrap Fusion Lumos Tribrid. Podmínky jsou následující: aplikované napětí – 1,6 kV, polarita – kladná, tlak dusíku – 0,3 psi, objem vzorku odebraný pro analýzu – 5 μ L, doba sprejování – 2 minuty. Hmotnostní spektrometr Orbitrap Fusion Lumos pracuje v režimu DDA (data-dependentní analýza) s dobou cyklování 2 s, kladnou polaritou, aktivním dynamickým vyloučením měřených prekursorů, sweep gas – 0; teplota vstupu – 250 °C; detektor MS – Orbitrap, rozlišení 500 000, rozsah skenování (m/z) – 150–1800, RF (%) 30, AGC 5e4, maximální doba plnění 50 ms, 1 mikrosken, profilové spektrum; detektor MS/MS – Orbitrap, rozlišení 120 000, hmotnostní rozsah – normální, cíl AGC – standardní, maximální doba plnění 100 ms, 1 mikrosken, izolace prekursoru pomocí kvadrupólu, šířka izolačního okna (m/z) 1,5 a aktivace HCD 25, 30 a 35 %. Získaná profilová spektra jsou analyzována pomocí FreeStyle 1.7 a LipidSearch 4.2 (Thermo Fisher).

3.6 Analýza proteinů

Oddělené pelety (3.2) jsou solubilizovány v 800 μ L solubilizačního roztoku (2% SDS, 30% sacharóza, 5% merkaptoethanol, 5mM EDTA, 100mM Tris, pH 8,0) po dobu 60 min při teplotě 30 °C. Proteiny jsou následně extrahovány přídatkem 400 μ L TRIS satureovaného fenolu. Vzorky jsou důkladně protřepány, centrifugovány (10 min, 10 000 \times g, 20 °C), fenolická frakce je oddělena a precipitována přes noc pomocí roztoku 100mM octanu amonného v methanolu při – 20 °C. Vzorky jsou centrifugovány (10 min, 10 000 \times g, 4 °C), získaný pelet je promyt roztokem 80% acetonu ve vodě a po vysušení rozpuštěn v 300 μ L roztoku močoviny (8M močovina, 10mM DTT, 100mM NH₄HCO₃) po dobu 30 min nebo do úplného rozpuštění peletu. Následně je pomocí metody dle Bradforda stanovena koncentrace proteinu a alikvoty odpovídající 100 μ g proteinu jsou alkylovány pomocí iodacetamidu (30 mM, 30 min). Alkylace je zastavena pomocí 30mM DTT, vzorky jsou doplněny roztokem obsahujícím 50mM NH₄HCO₃ a 2% ACN a vodu, aby finální koncentrace močoviny byla 2M. Následně jsou vzorky štěpeny přes noc pomocí trypsinu (Promega; 0,5 μ g enzymu na vzorek, 29 °C), odsoleny s využitím C18 SPE (Agilent) a změřeny pomocí hmotnostní spektrometrie klasickou metodou „shotgunové“ DDA proteomiky s využitím 15 cm kolony C18 Zorbax (Agilent), nano-UPLC systému Dionex Ultimate 3000 RSLC a hmotnostního spektrometru Orbitrap Fusion Lumos Tribrid s následujícím nastavením: Peptidy jsou eluovány pomocí gradientu acetonitrilu (2–72%, 120 min); Spektra jsou měřena s výchozím nastavením pro identifikaci peptidů, za použití analyzátoru orbitrap s rozlišením 120 000 (MS), rozsahem skenování (m/z) 300–1700, maximální dobou plnění 50 ms, AGC 400 000, jeden mikrosken, aktivace HCD, 30% energie kolize, rozlišení 30 000 (MS2), maximální doba nástřiku 100 ms, AGC 50 000 a dynamické vyloučení měřeného prekursoru na 60 s. Změřená spektra jsou rekalibrována pomocí nelineárního regresního modelu a prohledána proti databázím *S. tuberosum* (SolTub_3.0), *P. infestans* (kmen T30-4) a běžných kontaminantů pomocí Proteome Discoverer 2.5 (Thermo Fisher) se Sequest HT a Algoritmy MS Amanda 2.0 s následujícími parametry: enzym-trypsin, maximálně dvě vynechaná místa štěpení; tolerance MS1-5 ppm; MS2 tolerance - 0,02 Da (MS Amanda), 0,1 Da (Sequest); modifikace – karbamidomethyl (Cys) a až tři dynamické modifikace včetně oxidace Met, deamidace Asn/Gln a N-terminální acetylace. Kopmenzace odchylek v retenčním čase je zpracována pomocí Feature Mapper (maximální posun RT 10 min, hmotnostní tolerance 10 ppm). Kvantitativní rozdíly jsou stanoveny pomocí Minora za použití kvantifikace prekursorových iontů následované normalizací a výpočtem relativního množství.

3.7 Ověření přítomnosti *P. infestans*

Pro ověření přítomnosti a přesnou kvantifikaci *P. infestans* v rostlinném pletivu je možné využít PCR a amplifikaci vysoce repetitivní sekvence *PiO8* z jejího genomu a normalizací na gen *Ef-1αS. tuberosum* (PGSC0003DMG400023270). Rovněž lze využít detekci *P. infestans* na základě specifických peptidů patogenu, jak je popsáno v Berka et al. (2020) [23] a Dufková et al. (2022) [19].

3.8 Statistické zpracování a preselektce vhodných genotypů na základě necílené analýzy

Při základním necíleném porovnání profilů je vždy využito genotypů se známou a kontrastní rezistencí, které slouží jako etalon pro identifikaci rezistentních a senzitivních genotypů. Pro základní evaluaci je využita analýza hlavních komponent (PCA) s následujícím základním nastavením: škálování

| Třída | Jméno | ID | |
|----------------------------------|---|----------------------------|-------------|
| Steroidní saponiny | α-solanin | HMDB0034202 | |
| | α-chaconin | HMDB0039353 | |
| Alkaloidy odvozené od a kridonu | melicopidin | NA | |
| Solanidiny | Solanidin | HMDB0003236 | |
| Tropanové alkaloid | Scopolamin | HMDB0003573 | |
| | | | |
| Kumariny | 4-kumarylalkohol | HMDB0003654 | |
| | Skopolin | HMDB0303366 | |
| | Skopoletin | HMDB0034344 | |
| Katechol | Paucin | HMDB0029876 | |
| Flavonoidy | Rutin | HMDB0003249 | |
| | Kyselina hydroxyskořicová a její deriváty | 1-O-Feruloyl-β-D-glukosa | HMDB0302219 |
| | | 1-O-Sinapoyl-β-D-glucosa | HMDB0302379 |
| | | 3-glucosid kyseliny kávové | HMDB0303040 |
| | | Kyselina ferulová | HMDB0000954 |
| | | N-cis-Feruloyltyramin | HMDB0036381 |
| | | Subafylin | HMDB0033463 |
| Kyselina chinová a její deriváty | 5-O-feruloylchinová kyselina | HMDB0240478 | |
| | kyselina p-kumaroylchinová | HMDB0301709 | |
| | Kyselina chlorogenová | HMDB0003164 | |
| | Kyselina chinová | HMDB0003072 | |
| Seskviterpeny | Phytuberin | HMDB0035754 | |
| | Rishitin | HMDB0035593 | |
| | Lubimin | NA | |
| | Solavetivon | HMDB0035657 | |
| Saponiny | Neoi ndiosid D | NA | |
| | Protoneodioscin | | |
| | Barogenin-solatriosid | | |
| | Barogenin-chakotriosid | | |

| | | |
|-------------------------|---|----------------------|
| Proteiny | Annexin | PGSC0003DMT400004741 |
| | Protein obsahující WPP doménu | PGSC0003DMT400008558 |
| | Inhibitor proteinas typu 2 | PGSC0003DMT400011563 |
| | Protein z rodiny glykosylhydrolas | PGSC0003DMT400015222 |
| | Ferredoxin–nitrit reduktasa | PGSC0003DMT400021310 |
| | Endochitinasa | PGSC0003DMT400022685 |
| | Protein obsahující HD doménu | PGSC0003DMT400029178 |
| | Aktivátor HSP90 | PGSC0003DMT400029793 |
| | Peptidasa rodiny M28 | PGSC0003DMT400039091 |
| | Glutathion S-transferasa DHAR3 | PGSC0003DMT400040588 |
| | Protein neznámé funkce | PGSC0003DMT400053187 |
| | Protein neznámé funkce | PGSC0003DMT400053190 |
| | Phosphoglycerátkinasa | PGSC0003DMT400056871 |
| | Sulfurtransferasa | PGSC0003DMT400057236 |
| | Cyklasa | PGSC0003DMT400059496 |
| | Chloropfyla-b vázající protein | PGSC0003DMT400068129 |
| | Delta-1-pyrrolin-5-carboxylátsynthasa | PGSC0003DMT400068829 |
| UDP-glykosyltransferasa | PGSC0003DMT400075868 | |
| HSP70 | PGSC0003DMT400078163 | |
| Glycerophospholipid | Heptadecenoyl-lysophosphatidylcholin (LPC 17:1) | LMGP01050002 |
| Acetate ester | Z-3-Hexenyl acetát | HMDB0040215 |
| Dialkyldisulfide | Cystamin | HMDB0250701 |
| Alkylthiol | Cysteamin | HMDB0002991 |

Tab. 1. Potenciální markery rezistence k *P. infestans*. Dle Dufková et al., 2022, 2023 [19,25].

rozptylu (unity variance scaling), PCA metoda SVD s imputací. Pro vyhodnocení očekávané rezistence k *P. infestans* je vyhledána vhodná komponenta PC1-PC3, která nejlépe separuje známé kontrastní genotypy a zároveň se blíží aspoň 20% pokrytí variance systému (Obr. 3). Výsledky je možné doplnit o vyhodnocení podobnosti s využitím ANOVA a následných párových testů. Uvedené statistické testy jsou implementovány s využitím nástrojů MS Excel a Real Statistics Resource Pack pro MS Excel, MetaboAnalyst 5.0 (<https://www.metaboanalyst.ca/>) a nástroje Clustvis (<https://biit.cs.ut.ee/clustvis/>).

3.1 Cílená analýza identifikovaných látek spojených s rezistencí k *P. infestans*

Necílená analýza může být doplněna či nahrazena cíleným monitorováním látek uvedených v tabulce (Tabulka 1) identifikovaných na základě předchozích experimentů s rezistentními a citlivými genotypy. Pro identifikaci a kvantifikaci těchto látek je vhodné využít především hmotnostní spektrometrii spojenou s volně dostupným nástrojem pro cílenou kvantifikaci Skyline (<https://skyline.ms/project/home/software/Skyline/begin.view>).

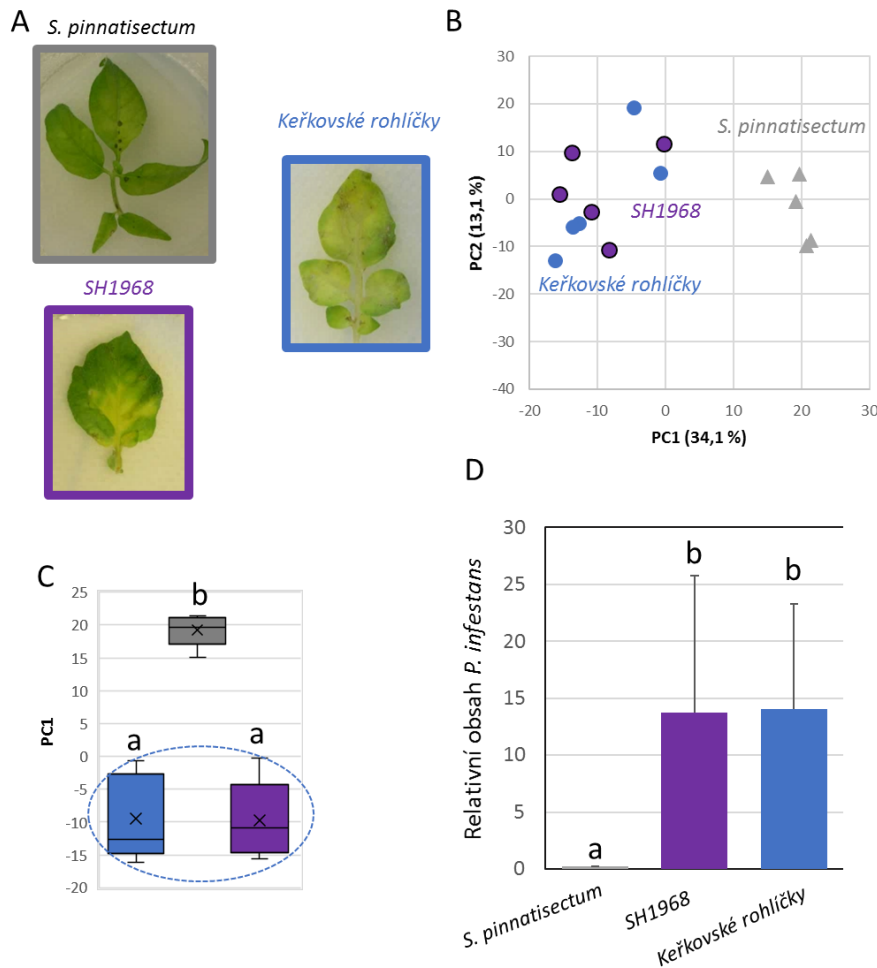
4 Technické vybavení

Klíčové vybavení pro přípravu rostlinného materiálu zahrnuje parní a horkovzdušný sterilizátor, laminární box, kultivační místnost s nastavitelným režimem (světlo, teplota), mikroskop, pH metr, analytické váhy, pipety, pomůcky pro sterilní manipulaci (skalpely, pinzety, filtry pro studenou sterilizaci roztoků, zkumavky, Petriho misky, kultivační dózy ...). Klíčové omické vybavení je postaveno na hmotnostní spektrometrii s vysokým rozlišením a příslušenství pro separaci směsí biomolekul. Vhodným příkladem je hybridní hmotnostní spektrometr založený na orbitální pasti spojené s kvadrupólem (qExactive, Fusion Lumos, Thermo). Pro separaci biomolekul pak plynová chromatografie (např. TRACE 3100, Thermo), kapalinová chromatografie v provedení nano UPLC (např. Ultimate 3000, Thermo) a Triversa Nanomate (Advion Biosciences) pro analýzu lipidů metodou přímé infuze.

5 Příklad využití metody

Následující příklady využití metodiky ukazují tři různé přístupy založené na profilu lipidomu (5.1), složení metabolomu (5.2) a proteomu (5.3). Rovněž demonstrují přístup necílené analýzy (5.1-5.2) a cílené analýzy (5.3). Jak je demonstrováno, každý z těchto přístupů může být úspěšně použit pro odhad míry rezistence k *P. infestans* a preselektci šlechtitelského materiálu. Jelikož jsou metody a přístupy vzájemně komplementární, doporučujeme jejich paralelní využití a kombinace pro zvýšení spolehlivosti výsledné predikce.

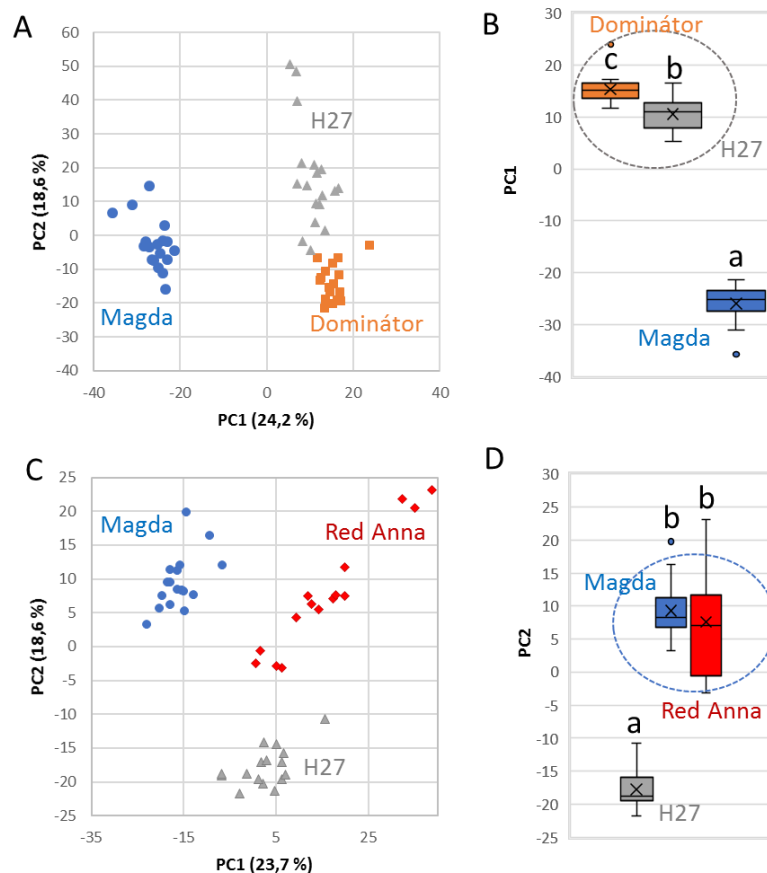
5.1 Provokační test na oddělených listech – odhad rezistence genetického materiálu pomocí profilování lipidomu



Obr. 4. Predikce odolnosti na základě PCA profilu lipidomu s využitím silně odolného druhu *S. pinnatisectum* a náchylné odrůdy Keřkovské rohlíčky. (A) Ukázka reprezentativního inokulovaného listu 96 h po inokulaci. (B-C) Profil lipidomu listu somatického hybridu SH1968 (fialová) se klastruje s profilem senzitivní odrůdy Keřkovské rohlíčky a je tak hodnocen jako nedostatečně odolný. (D) Potvrzení přítomnosti *P. infestans* pomocí metod qPCR. Relativní množství *PiO8* normalizované na hladinu exprese *PGSC0003DMG400023270*. Uvedené výsledky jsou průměrem pěti biologických opakování. Signifikance rozdílů mezi jednotlivými genotypy byla vyhodnocena pomocí neparametrického testu (Kruskal–Wallis a Conoverův test; $p < 0,05$). Prezentované výsledky byly převzaty a upraveny z publikace Dufková et al., 2022 [19].

První příklad ukazuje porovnání šlechtitelského materiálu získaného somatickou hybridizací druhu *Solanum pinnatisectum* s vysokou přirozenou rezistencí k *P. infestans* a odrůdy Keřkovské rohlíčky. Využito bylo provokačního testu na oddělených listech, jak je popsáno v části 3.1. Tato varianta provokačního testu je nejrychlejší, ale zároveň může být její výpovědní hodnota ovlivněna, protože efekt patogenu může být navýšen procesem senescence. Listy v pěti biologických opakováních (Obr. 4A) byly lyofilizovány, homogenizovány a alikvoty odpovídající 30 mg byly použity pro extrakci lipidů. Extrakce byla provedena, jak je popsáno v kapitolách 3.3 a 3.5, následně byl ověřen výtěžek pomocí TLC a vzorky byly změřeny hmotnostní spektrometrií metodou přímé infuze. Měření bylo získáno relativní zastoupení 654 lipidů. Profil lipidů byl porovnán pomocí PCA (Obr. 4B). Rezistentní a citlivý genotypy byly signifikantně odděleny v rámci první komponenty (PC1), která vystihovala přes 34 % variance systému. Profil lipidů hybridní rostliny SH1968 byl nerozlišitelný od citlivé odrůdy Keřkovské rohlíčky (Obr. 4C), což indikuje její nízkou odolnost k *P. infestans*. Identické množství *P. infestans* v inokulovaných listech bylo potvrzeno i pomocí metody qPCR (Obr. 4D).

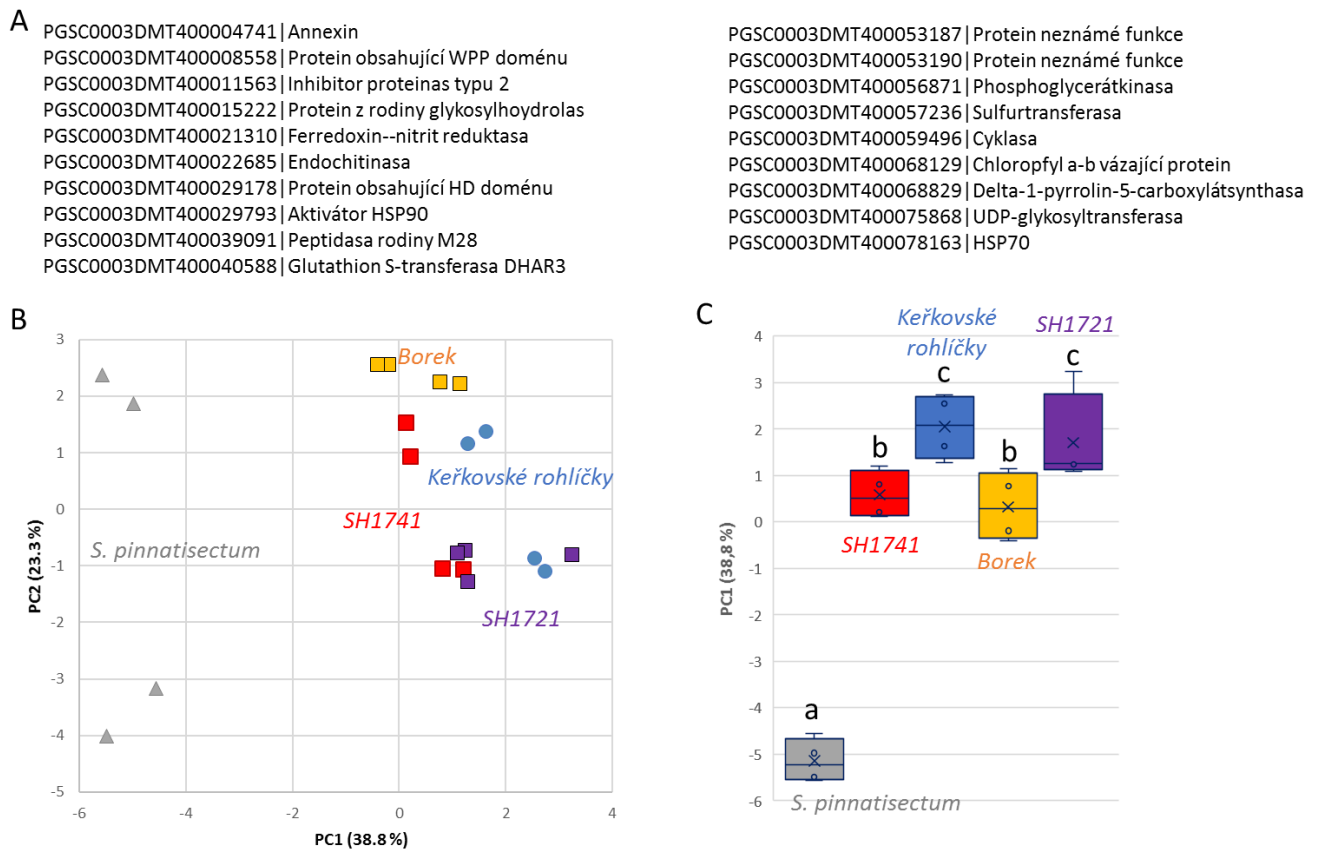
5.2 Identifikace rezistentní odrůdy na základě sběru listů z polního experimentu



Obr. 5. Predikce odolnosti na základě PCA profilu metabolomu s využitím silně odolného genotypu H27 a náchylné odrůdy Magda. (A-B) Profil metabolomu listu odrůdy Dominátor predikuje jeho zařazení mezi odolné genotypy, v odrůdových testech byl hodnocen jako středně odolný. (C-D) Profil metabolomu odrůdy Red Anna vykazuje shodu s náchylnou odrůdou Magda, v testech byla odrůda hodnocena jako méně odolná. Signifikance rozdílů mezi genotypy byla vyhodnocena pomocí neparametrického testu (Kruskal–Wallis a Conoverův test; $p < 0,05$). Uvedené výsledky jsou založeny na 18 biologických opakováních.

Polní experiment byl proveden v roce 2019 ve Velharticích na odrůdách Magda, Red Anna, Dominátor a genotypu H27. Vzorkování bylo provedeno 7. 8. 2019, a odebrány byly listy z porostu nevykazujícího žádné viditelné známky infekce. V rámci testování metodiky bylo odebráno 18 vzorků na každý genotyp a jako referenční genotypy sloužily náchylná odrůda Magda a odolný genotyp H27HH. Odebrané listy byly zamrazeny do tekutého dusíku, lyofilizovány a alikvoty odpovídající 30 mg sušiny byly zpracovány pro GC-MS metabolomické profilování, jak je popsáno výše (3.3-3.4). Pro analýzu byl zvolen necílený přístup a GC-MS profil 1000 nejintenzivnějších píků byl porovnán pomocí PCA (Obr. 5). V rámci prvního testu byl rezistentní a citlivý genotyp oddělen v rámci komponenty PC1, která vystihovala přes 24 % variance systému. Odrůda Dominátor se pak klastrovala k odolnému genotypu H27 (Obr. 6B), což indikuje její možnou odolnost k *P. infestans* a souhlasí s výsledky odrůdových zkoušek, kde se prokázala jako středně odolná [26]. V rámci druhého testu rozdělila rezistenci k *P. infestans* komponenta PC2 s nižším, ale postačujícím pokrytím variance. Test pak prokázal, že profil odrůdy Red Anna a odrůdy Magda není významně odlišný, což opět souhlasí s výsledky odrůdových zkoušek, kde byla Red Anna hodnocena jako méně odolná [26].

5.3 Provokační test na rostlinách pěstovaných *in vitro*



Obr. 6. Predikce odolnosti na základě PCA profilu potenciálních proteinových markerů rezistence. (A) List proteinů identifikovaných na základě provokačního testu v oddělených listech *S. pinnatisectum* a Keřkovské rohlíčky, publikováno v Dufková et al., 2022 [19]. (B-C) Profil markerových proteinů v rezistentních rostlinách *S. pinnatisectum*, citlivého kultivaru Keřkovské rohlíčky (100 % rostlin infikováno) a porovnávaných genotypů SH1741, SH1721 a kultivaru Borek. Všechny hodnocené odrůdy byly vyhodnoceny jako náchylné, což odpovídá i výsledkům provokačního testu. Signifikance rozdílů mezi genotypy byla vyhodnocena pomocí

neparametrického testu (Kruskal–Wallis a Conoverův test; $p < 0,05$). Uvedené výsledky proteomické analýzy jsou založeny na 4 opakováních.

Čtyřtýdenní rostliny pěstované *in vitro* byly rozděleny do dvou skupin. První sada byla použita pro proteomickou analýzu (2 × 8 rostlin), druhá sada byla naočkována *P. infestans* aplikací suspenze sporangii na adaxiální stranu dvou plně vyvinutých listů (jedna kapka 5 μ l suspenze na list s koncentrací sporangii 1,34 × 10⁴ ml⁻¹ sporangii). Hodnocení infekce bylo provedeno dva týdny po inokulaci. Listy neinokulovaných rostlin byly zamraženy, lyofilizovány, homogenizovány a alikvoty 30 mg sušiny byly použity pro proteomickou analýzu popsanou v kapitole 3.6. Pro evaluaci šlechtitelského materiálu bylo jako kontrola využito *S. pinnatisectum* (odolný genotyp) a kultivar Keřkovské rohlíčky (náchylný). Analýza se zaměřila na potenciální proteinové markery rezistence (Obr. 4A). Porovnání profilů hybridů SH1741, SH1721 a odrůdy Borek ukázalo významnou podobnost s profilem citlivé odrůdy Keřkovské rohlíčky, tedy tyto genotypy metoda hodnotí jako náchylné. Obdobný výsledek byl získán po vyhodnocení infekce dva týdny po inokulaci.

6 Srovnání novosti postupů

Pro určení rezistence šlechtitelského materiálu se běžně využívají klasické postupy, jako jsou provokační laboratorní testy rezistence na oddělených listech, provokační testy v nádobových pokusech, sledování šlechtitelských materiálů v podmínkách přirozeného tlaku patogenu s následnou selekcí v průběhu sklizně a/nebo v posklizňových rozbořech spojených s klasifikací rozvoje patogenu a souběžným popisem šlechtitelských materiálů dle morfologických a agronomických znaků. Tyto klasické testy mohou být doplněny o cílené monitorování známých genů rezistence, ale i když je genetická podstata rezistence k *P. infestans* velmi dlouho studována a byla odhalena celá řada genů *S. tuberosum* spojených s kvalitativní rezistencí, naše znalosti o kvantitativní rezistenci jsou stále velmi omezené. Příslušné molekulární a biochemické mechanismy dosud nebyly plně prostudovány, a proto nemohly být ani efektivně využívány při šlechtění brambor. Metodika popsaná v předchozích kapitolách cílí právě na tyto dosud nevyužívané markery rezistence, biomolekuly, které vykazují signifikantně odlišné zastoupení při porovnání odolné a náchylné odrůdy. Aniž by bylo nutné znát signální dráhy vedoucí k akumulaci/úbytku těchto molekul, dokonce i bez nutnosti identifikovat všechny měřené látky, je možné prostým porovnáním profilů predikovat odolnost nového šlechtitelského materiálu. Jak je demonstrováno na uvedených příkladech (5.1-5.3), spolehlivost odhadu může být poměrně vysoká a ve všech uvedených testech predikce odolnosti odpovídala údajům z referenčních zdrojů nebo výsledkům provedených provokačních testů. Metodikou je tedy možné provést včasné a objektivní posouzení šlechtitelských materiálů, a tím tak snížit pracovní náročnost a v budoucnu i ekonomickou náročnost celého procesu rezistentního šlechtění. Mimo necílené analýzy založené na porovnání celého "omického" profilu rostliny metodika rovněž předkládá seznam potenciálních markerů rezistence (Tab. 1), které mohou být využity pro méně náročnou a rychlejší cílenou analýzu. Je nutné podotknout, že metodika byla vyvinuta v rámci výzkumného projektu a ověřena na limitovaném spektru genotypů, proto praktické využití v budoucnu povede k zúžení/rozšíření spektra sledovaných molekul.

7 Popis uplatnění metodiky

Metodika je určena výzkumným a šlechtitelským pracovištím, která se zabývají rezistentním šlechtěním bramboru k *P. infestans*. Metodika může být i vhodným pracovním nástrojem pro studenty VŠ laboratoří ke studiu a praktickému výcviku v používaných technikách a k případné adaptaci metodiky pro příbuzné rostlinné druhy (rajče, paprika, tabák, petunie, lilek,...).

8 Ekonomické aspekty

Ekonomické náklady na provedení jednoho stanovení jsou v rámci experimentálního provozu stanoveny na 1500 Kč/vzorek při sadě 50-100 vzorků. Vývoj ceny bude souviset s vývojem cen energií a ostatních vstupů. Dále bude ovlivněn celkovým rozsahem využívání obdobných analýz adaptovaných pro další plodiny v budoucnu, takže případná konečná cena v aplikační laboratoři by mohla být nižší. Cena je rovněž závislá na celkovém množství analýz, protože nejvyšší položku spotřebního materiálu představují chromatografické kolony, které však mohou při řádném používání být použity pro měření řádově stovek vzorků.

Využití testu časné selekce významně zlepší postavení českých šlechtitelů a zefektivní šlechtění na rezistenci. Lze pak očekávat rychlejší selekci šlechtitelských materiálů vedoucí k vývoji odrůdy, která bude z hlediska rezistence k *P. infestans* konkurenceschopná minimálně v evropském prostředí. Návazně lze předpokládat navýšení množitelských/produkčních ploch sadby/konzumu takové odrůdy, a tím navýšení tržeb.

Zvýšený objem produkce bramboru může být očekáván ve výhledu 5 let po dosažení rezistentní odrůdy s ohledem na navyšující se vstupy do zemědělství [1-2]. Předpokladem úspěchu je i účinná propagace českého bramborářství a adaptace českého spotřebitele na případnou nižší atraktivitu hlíz (např. z pohledu tvaru, struktury slupky, hloubky oček apod.). Zvýšený zájem lze očekávat u malopěstitelů a zahrádkářů, kde požadavek na biokvalitu je na prvním místě.

9 Seznam použité související literatury

- [1] Čížek, M. Ekonomika ochrany brambor proti chorobám a škůdcům u vybraných pěstitelů Vysočiny. 7. 4. 2023, Agromanual.cz; <https://www.agromanual.cz/cz/clanky/management-a-legislativa/management/ekonomika-ochrany-brambor-proti-chorobam-a-skudcum-u-vybranych-pestitelu-vysociny>.
- [2] ČTK. Svaz: Náklady na jeden hektar brambor jsou více než trojnásobné oproti obilí. Česká tisková kancelář. 4. 5. 2023, <https://www.ceskenoviny.cz/zpravy/svaz-naklady-na-jeden-hektar-brambor-jsou-vice-nez-trojnashobne-oproti-obili/2360981>.
- [3] Schoina, C.; Govers, F. The oomycete *Phytophthora infestans*, the irish potato famine pathogen. Princ. Plant-Microbe Interact. Microbes Sustain. Agric. 2015, 371–378, doi:10.1007/978-3-319-08575-3_39.
- [4] Chepsergon, J.; Motaung, T. E.; Bellieny-Rabelo, D.; Moleleki, L. N. Organize, Don't Agonize: Strategic Success of *Phytophthora* Species. Microorg. 2020, Vol. 8, Page 917 2020, 8, 917, doi:10.3390/microorganisms8060917.
- [5] Leesutthiphonchai, W.; Vu, A. L.; Ah-Fong, A. M. V.; Judelson, H. S. How does *Phytophthora infestans* evade control efforts? Modern insight into the late blight disease. Phytopathology 2018, 108, 916–924, doi:10.1094/phyto-04-18-0130-ia.
- [6] Fry, W. E.; Birch, P. R. J.; Judelson, H. S.; Grünwald, N. J.; Danies, G.; Everts, K. L.; Gevens, A. J.; Gugino, B. K.; Johnson, D. A.; Johnson, S. B.; McGrath, M. T.; Myers, K. L.; Ristaino, J. B.; Roberts, P. D.; Secor, G.; Smart, C. D. Five reasons to consider *Phytophthora infestans* a reemerging pathogen. Phytopathology 2015, 105, 966–981, doi:10.1094/phyto-01-15-0005-fi.
- [7] Nowicki, M.; Foolad, M. R.; Nowakowska, M.; Kozik, E. U. E. U. Potato and tomato late blight caused by *Phytophthora infestans*: an overview of pathology and resistance breeding. Plant Dis. 2012, 96, 4–17, doi:10.1094/pdis-05-11-0458.
- [8] Kolbe, W. Importance of potato blight control exemplified by Höfchen long-term trial (1943-1982), and historical development. Pflanzenschutz Nachr. Bayer 1982, 35, 247–290.
- [9] Naveed, Z. A.; Wei, X.; Chen, J.; Mubeen, H.; Ali, G. S. The PTI to ETI continuum in *Phytophthora*-plant interactions. Front. Plant Sci. 2020, 11, 2030, doi:10.3389/fpls.2020.593905.
- [10] Rojas, D. K. J.; Sedano, J. C. S.; Ballvora, A.; León, J.; Vásquez, T. M. Novel organ-specific genetic factors for quantitative resistance to late blight in potato. PLoS One 2019, 14, e0213818, doi:10.1371/journal.pone.0213818.
- [11] Álvarez, M. F.; Angarita, M.; Delgado, M. C.; García, C.; Jiménez-Gomez, J.; Gebhardt, C.; Mosquera, T. Identification of novel associations of candidate genes with resistance to late blight in *Solanum tuberosum* group phureja. Front. Plant Sci. 2017, 8, 1040, doi:10.3389/FPLS.2017.01040.
- [12] Fernie, A. R.; Schauer, N. Metabolomics-assisted breeding: a viable option for crop improvement? Trends Genet. 2009, 25, 39–48, doi:10.1016/j.tig.2008.10.010.

- [13] Bradshaw, J. E. Potato Breeding at the Scottish Plant Breeding Station and the Scottish Crop Research Institute: 1920–2008. *Potato Res.* 2009, 52, 141–172, doi:10.1007/s11540-009-9126-5.
- [14] Jansky, S. H.; De Jong, W. S.; Douches, D. S.; Haynes, K. G.; Holm, D. G. Cultivar Improvement with Exotic Germplasm: An Example from Potato. In *The Wild *Solanums* Genomes. Compendium of Plant Genomes.*; Carpato, D., Aversano, R., Ercolano, M. R., Eds.; Springer: Cham, 2021; pp. 215–230 ISBN 978-3-030-30342-6.
- [15] Akino, S.; Takemoto, D.; Hosaka, K. *Phytophthora infestans*: a review of past and current studies on potato late blight. *J. Gen. Plant Pathol.* 2014, 80, 24–37, doi:10.1007/s10327-013-0495-x.
- [16] Bradshaw, J. E. Review and Analysis of Limitations in Ways to Improve Conventional Potato Breeding. *Potato Res.* 2017, 60, 171–193, doi:10.1007/s11540-017-9346-z.
- [17] Haverkort, A. J.; Boonekamp, P. M.; Hutten, R.; Jacobsen, E.; Lotz, L. A. P.; Kessel, G. J. T.; Vossen, J. H.; Visser, R. G. F. Durable late blight resistance in potato through dynamic varieties obtained by cisgenesis: scientific and societal advances in the DuRPh project. *Potato Res.* 2016, 59, 35–66, doi:10.1007/S11540-015-9312-6.
- [18] Slater, A. T.; Cogan, N. O. I.; Hayes, B. J.; Schultz, L.; Dale, M. F. B.; Bryan, G. J.; Forster, J. W. Improving breeding efficiency in potato using molecular and quantitative genetics. *Theor. Appl. Genet.* 2014 12711 2014, 127, 2279–2292, doi:10.1007/S00122-014-2386-8.
- [19] Dufková, H.; Berka, M.; Greplová, M.; Shejbalová, Š.; Hampejsová, R.; Luklová, M.; Domkářová, J.; Novák, J.; Kopačka, V.; Brzobohatý, B.; Černý, M. The Omics Hunt for Novel Molecular Markers of Resistance to *Phytophthora infestans*. *Plants* 2022, 11, 61, doi:10.3390/plants11010061.
- [20] Berková, V.; Berka, M.; Griga, M.; Kopecká, R.; Prokopová, M.; Luklová, M.; Horáček, J.; Smýkalová, I.; Čičmanec, P.; Novák, J.; Brzobohatý, B.; Černý, M. Molecular Mechanisms Underlying Flax (*Linum usitatissimum* L.) Tolerance to Cadmium: A Case Study of Proteome and Metabolome of Four Different Flax Genotypes. *Plants* 2022, 11, 2931, doi:10.3390/plants11212931.
- [21] Hampejsová, R.; Berka, M.; Berková, V.; Jersáková, J.; Domkářová, J.; von Rundstedt, F.; Frary, A.; Saiz-Fernández, I.; Brzobohatý, B.; Černý, M. Interaction with fungi promotes the accumulation of specific defense molecules in orchid tubers and may increase the value of tubers for biotechnological and medicinal applications: The case study of interaction between *Dactylorhiza* sp. and *Tulasnella calospora*. *Front. Plant Sci.* 2022, 13, 757852, doi:10.3389/fpls.2022.757852.
- [22] Dufková, H.; Berka, M.; Psota, V.; Brzobohatý, B.; Černý, M. Environmental impacts on barley grain composition and longevity. *J. Exp. Bot.* 2023, 74(5), 1609–1628, doi:10.1093/jxb/erac498.
- [23] Berka, M.; Greplová, M.; Saiz-Fernández, I.; Novák, J.; Luklová, M.; Zelená, P.; Tomšovský, M.; Brzobohatý, B.; Černý, M. Peptide-based identification of *Phytophthora* isolates and *Phytophthora* detection in planta. *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 21, 9463, doi:10.3390/ijms21249463.
- [24] Schneider, C.A.; Rasband, W.S.; Eliceiri, K.W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* 2012, 9, 671–675, doi: 10.1038/nmeth.2089.

[25] Dufková, H.; Greplová, M.; Hampejsová, R.; Kuzmenko, M.; Hausvater, E.; Brzobohatý, B.; Čemý, M. Secondary Metabolites, Other Prospective Substances, and Alternative Approaches That Could Promote Resistance against *Phytophthora infestans*. *Agronomy* 2023, 13, 1822, doi:10.3390/agronomy13071822.

[26] ÚKZÚZ. Seznamy doporučených odrůd (SDO). eAGRI.cz; 11. 8. 2023 <https://eagri.cz/public/web/ukzuz/portal/odrudy/seznam-doporucenych-odrud/>.

10 Seznam publikací, které předcházely metodice a byly publikovány

Berka, M.; Greplová, M.; Saiz-Fernández, I.; Novák, J.; Luklová, M.; Zelená, P.; Tomšovský, M.; Brzobohatý, B.; Černý, M. Peptide-based identification of *Phytophthora* isolates and *Phytophthora* detection in planta. *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 21, 9463, doi:10.3390/ijms21249463.

Dufková, H.; Berka, M.; Greplová, M.; Shejbalová, Š.; Hampejsová, R.; Luklová, M.; Domkářová, J.; Novák, J.; Kopačka, V.; Brzobohatý, B.; Černý, M. The Omics Hunt for Novel Molecular Markers of Resistance to *Phytophthora infestans*. *Plants* 2022, 11, 61, doi:10.3390/plants11010061.

Dufková, H.; Greplová, M.; Hampejsová, R.; Kuzmenko, M.; Hausvater, E.; Brzobohatý, B.; Černý, M. Secondary Metabolites, Other Prospective Substances, and Alternative Approaches That Could Promote Resistance against *Phytophthora infestans*. *Agronomy* 2023, 13, 1822, doi:10.3390/agronomy13071822.

Název: Metodika časné preselekcce šlechtitelských materiálů na odolnost/náchylnost k patogenu *Phytophthora infestans*

Autoři: Martin Černý, Marie Greplová, Miroslav Berka, Romana Hampejsová, Břetislav Brzobohatý, Vladislav Klička, Pengxi Wang, Jan Novák

Vydavatel: Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno

Vydání: první, 2023

Počet stran: 26

IISBN 978-80-7509-952-5

<https://doi.org/10.11118/978-80-7509-952-5>

Tato publikace neprošla jazykovou úpravou. Za věcnou a jazykovou správnost díla odpovídají autoři. Metodika je poskytována bezplatně.