

**Metodika detekce genů rezistence
Rvi2, Rvi4 a Rvi6 k *Venturia inaequalis*
a jejich pyramidizace pro zavedení selekce
jabloní asistované molekulárními markery**

Ivona Žďárská a kol.



VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOCNÁŘSKÝ HOLOVOUSY, s.r.o.

**Metodika detekce genů rezistence
Rvi2, Rvi4 a Rvi6 k *Venturia inaequalis*
a jejich pyramidizace pro zavedení selekce
jabloní asistované molekulárními markery**

Ivona Žďárská a kol.



CERTIFIKOVANÁ METODIKA

2022

Autoři: Ing. Ivona Žďárská, Ing. Martina Rejllová, Mgr. Josef Podlipný, Ing. Kamila Pluhařová, RNDr. Jana Čmejlová, Ph.D., Ing. Radek Vávra, Ph.D.

VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOCNÁŘSKÝ HOLOVOUSY s.r.o.

Název: Metodika detekce genů rezistence *Rvi2*, *Rvi4* a *Rvi6* k *Venturia inaequalis* a jejich pyramidizace pro zavedení selekce jabloní asistované molekulárními markery

Vydal: VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOCNÁŘSKÝ HOLOVOUSY s.r.o.
Holovousy 129, 50801 Holovousy

Vyšlo v roce: 2022

Oponenti: Doc. Dr. Ing. Jaroslav Salava,
Výzkumný ústav rostlinné výroby, v. v. i., Praha - Ruzyně
Ing. Josef Vačkář,
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Oddělení trvalých kultur

Vydáno bez jazykové úpravy

Publikace je realizačním výstupem projektu TAČR TJ04000389 – Inovace detekce genů rezistence ke strupovitosti jabloně a jejich pyramidizace pomocí molekulárních markerů.

Publikace byla certifikována UKZUZ 093233/2022

© VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOCNÁŘSKÝ HOLOVOUSY s.r.o., 2022

www.vsu.cz

ISBN 978-80-87030-85-1

OBSAH

ANOTACE	5
ANNOTATION	5
1 ÚVOD	7
2 CÍL METODIKY	10
3 VLASTNÍ POPIS METODIKY	10
3.1 Izolace DNA	11
3.2 Detekce markeru rezistence <i>Rvi2</i> , <i>Rvi4</i> a <i>Rvi6</i> pomocí sekvenování.	11
3.3 Detekce markerů rezistence <i>Rvi2</i> , <i>Rvi4</i> a <i>Rvi6</i> metodou alelické diskriminace pomocí real-time PCR	19
3.4 Detekce markerů rezistence <i>Rvi2</i> , <i>Rvi4</i> a <i>Rvi6</i> metodou SNaPshot	27
4 SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ	32
5 POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY	32
6 EKONOMICKÉ ASPEKTY	33
7 SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY	35
8 SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE	37
9 PŘÍLOHY	38

ANOTACE

Jabloň domácí (*Malus × domestica* Borkh.) je důležitou zemědělskou komoditou, může však trpět různými chorobami, které snižují produkci komerčně uplatnitelných plodů. Mezi nejzávažnější patří strupovitost jabloně, jejímž původcem je houbový patogen *Venturia inaequalis*. Šlechtění odrůd rezistentních vůči tomuto patogenu je proto v popředí šlechtitelských programů mnoha zemí světa, jelikož kombinace použití odolných odrůd jabloní s technologickými opatřeními v sadech umožňuje snížit spotřebu fungicidů k regulaci tohoto patogenu. Vzhledem k tomu, že v současné době je tato rezistence kódovaná tzv. *Rvi* geny překonávána různými rasami patogenu, dosažení trvalé rezistence je možné jen kombinací různých genů *Rvi*, tzv. pyramidizací genů. Avšak zda k této kumulaci genů *Rvi* došlo, není na úrovni fenotypu téměř možné rozpoznat. Pro průkaz přenosu genů rezistence vůči *V. inaequalis* jsou proto vyvíjeny genetické markery, které umožňují jednoduchou selekci rezistentních jabloní. Použitím markerů asistované selekce je možné odstranit neperspektivní hybridní potomstvo bez náročného pěstování a testování již v prvním roce života. V poslední době byly validovány SNP markery pro lokusy *Rvi2*, *Rvi4* a *Rvi6*, jejichž detekce je popsána v této metodice. Detekce těchto markerů rezistence byla provedena třemi metodami, a to sekvenováním, metodou alelické diskriminace pomocí real-time PCR a metodou SNaPshot.

ANNOTATION

Domestic apple (*Malus × domestica* Borkh.) is an important agricultural commodity, but it suffers from various diseases that can reduce the production of commercially applicable fruits. One of the most serious diseases is a scab, which is caused by the fungal pathogen *Venturia inaequalis*. Breeding of cultivars resistant to this pathogen is therefore at the forefront of breeding programs in many countries worldwide. The combination of resistant apple cultivars usage with technological procedures in orchards makes it possible to reduce the fungicide consumption to control this pathogen. Due to the fact that this resistance encoded by so called *Rvi* genes is currently overcome by different races of the pathogen, the achievement of durable resistance is possible only by a combination of different resistance genes, so-called pyramidization of genes. However, whether this accumulation of *Rvi* genes has occurred is almost impossible to discern at the phenotype level. Therefore, genetic markers are being developed to demonstrate the transmission of *V. inaequalis* resistance genes to the progeny, which allow easy selection of resistant apple trees. By using marker-assisted selection, it is possible to remove unpromising hybrid

offspring without demanding cultivation and testing in the first year of life. Recently, SNP markers for the *Rvi2*, *Rvi4* and *Rvi6* resistance genes have been validated and their detection is described in this methodology. Detection of these resistance markers was performed by three methods, namely sequencing, allelic discrimination using real-time PCR, and SNaPshot.

1 ÚVOD

Houbový patogen *Venturia inaequalis* (Cooke) G. Winter je původcem onemocnění řady dřevitých hostitelů nazývaného strupovitost jabloně. Jedním z hostitelů je jablň domáci (*Malus × domestica* Borkh.), která se řadí mezi celosvětově nejpěstovanější ovocné druhy. Strupovitost jabloně se vyskytuje na listech po primárních (askosporových) infekcích a na větších plodech po sekundárních (konidiových) infekcích ve všech regionech produkujících jablka. Na listech způsobuje sazovité, později nekrotizující skvrny, silně napadené listy následně opadávají. Opadávají i více postižené květy a mladé plody. Na větších plodech se vyskytují typické černé strupy, které často plody deformují a způsobují i jejich praskání (příloha 2). Praskliny jsou pak vstupní branou pro další patogeny, zejména ty, které způsobují hnilobu plodů (např. moniliovou hnilobu). Strupovitost se může vyskytnout i na skladovaných jablkách, a to v podobě drobných teček. *V. inaequalis* tak způsobuje výrazné ekonomické ztráty komerčně uplatnitelných plodů ve všech stádiích produkce, které v regionech s chladným a vlhkým jarem a začátkem léta dosahují až 70% (Bowen et al., 2011; Bus et al., 2011). Ochrana jabloní může během jednoho vegetačního období vyžadovat až 30 preventivních fungicidních postřiků (Manktelow et al., 1996), což je ekonomicky náročné, navíc mohou zbytky pesticidů také zůstat ve formě reziduí v půdě či na konzumovaných plodech, z čehož vyplývají potencionální zdravotní rizika. Bohužel, dlouhodobé využívání fungicidních postřiků přispívá také ke vzniku rezistentních forem *V. inaequalis* (Lichtner et al., 2020; Polat a Bayraktar, 2021). V dnešní době se proto čím dál více přistupuje k šlechtění odrůd rezistentních vůči tomuto patogenu.

Genetická rezistence vůči *V. inaequalis* je dána interakcí genu rezistence (*R*) hostitelské rostliny a genu avirulence (*Avr*) pocházejícího z patogenu (tzv. rezistence gen-pro-gen), (Flor et al., 1971). Při šlechtění nových odrůd se proto využívá začleňování genů rezistence vůči *V. inaequalis*, tzv. *Rvi* genů, do genomů jabloní. V dnešní době je známo více jak 20 různých *Rvi* genů vyskytujících se převážně v planých nebo divoce rostoucích druzích rodu *Malus* (Bus et al., 2011; Soriano et al., 2014; Patocchi et al., 2020). Z tohoto důvodu je vyšlechtění nové, komerčně uplatnitelné odrůdy jabloně s geny rezistence vůči patogenu *V. inaequalis* značně časově náročné. Nezbytné je několikanásobné zpětné křížení k dosažení požadované kvality plodů. Nejrozšířenějším a široce využívaným v šlechtitelských programech je gen *Rvi6* (Khajuria et al., 2018), pocházející z genotypu *Malus floribunda* 821, ale využívají se i geny *Rvi2*, *Rvi4*, *Rvi5*, *Rvi7*, *Rvi9*, *Rvi10*, *Rvi11*, *Rvi12*, *Rvi13*, *Rvi14* a *Rvi15* (Patocchi et al., 2020). Gen *Rvi6*, ale i řada dalších byly ovšem v různých částech světa už mnohými rasami *V. inaequalis* překonány

(Parisi et al., 2004; Bus et al., 2011; Caffier et al., 2015; Masny, 2017; Peil et al., 2018) a i z tohoto důvodu se v dnešní době čím dál více přistupuje k tzv. pyramidizaci těchto genů. Při pyramidizaci neboli kumulaci genů je rezistence podmíněna dvěma nebo více různými geny rezistence. K primární selekci hybridů s rezistencí k patogenu *V. inaequalis* jsou používány i v dnešní době umělé inokulace semenáčků v rané fázi vývoje (Vávra et al., 2015). Tato metoda však nedokáže odhalit kumulované geny rezistence zajišťující rezistenci proti rasám patogenu *V. inaequalis*. V případě šlechtění jabloní s kumulovanými geny rezistence je selekce s využitím molekulárních markerů nezbytná.

Molekulární neboli genetický marker je určitá sekvence DNA, kterou lze jednoduše identifikovat a má konkrétní význam. Můžeme jej popsat jako určitý druh variace, který je dán změnou oproti původní sekvenci, a koreluje s různými fenotypy rostliny, např. náchylností nebo rezistencí k nemoci. Marker se může nacházet přímo v genu, nebo je pouze v těsné vazbě s určitým genem, přičemž není nutná přímá znalost příčinného genu sledovaného znaku. Tato situace nastává i u rezistence k *V. inaequalis*, kdy nejsou známy přímo geny zodpovědné za rezistenci, pouze oblast neboli lokus, kde by se tyto geny měly nacházet, a přesto jsou známy markery, které tuto rezistenci detekují. V případě rezistence k tomuto patogenu jsou však v literatuře jednotlivé lokusy pro jednoduchost označovány jako geny rezistence, toto označení proto používá i tato metodika. Genetickým markerem může být například polymorfismus jednoho páru bází (SNP marker, z angl. single nucleotide polymorphism), případně repetitivní úsek (SSR marker, z angl. simple sequence repeats), či mohou být detekovány kratší či delší inserce/delece v DNA.

Molekulární markery využívané k detekci genů rezistence poskytují informace nejen o přítomnosti a typu daného genu, ale také o tom, jestli se vyskytuje v homozygotním či heterozygotním stavu, což je důležitá informace z hlediska dalšího křížení. Přinášejí tak mnohem relevantnější informace než dříve používaná metoda inokulace rostlin patogeny. Molekulárně genetické markery pak umožňují jednoduchou a spolehlivou identifikaci jabloní obsahujících dané geny rezistence (tzv. marker assisted selection, MAS), navíc se využívají k odstranění neperspektivního hybridního potomstva již v prvním roce po vysetí a brání tak zdlouhavému, ale i finančně náročnému pěstování neperspektivních jabloní (Liebhard et al., 2003). Začlenění MAS do šlechtění má tedy potenciál snížit náklady vynaložené na šlechtitelský program, případně zlepšit ekonomickou efektivitu programu, nicméně je nutné brát v potaz porovnání nákladů spojených s MAS (například reagentie, vybavení a práce) s provozními náklady vynaloženými při konvenčních šlechtitelských metodách (Wannemuehler et al., 2019). V této práci bylo zjištěno, že MAS je pro program šlechtění jabloní nákladově efektivní,

pokud její implementace vede k míře odstranění neperspektivních genotypů vyšší než 11,93%. Pokud míra odstraňování semenáčků klesne pod tuto prahovou hodnotu, MAS již není nákladově efektivní.

Jako molekulární markery pro geny *Rvi* jsou využívány markery typu SCAR (sequence characterized amplified region), SSR nebo SNP (Tartarini et al., 1999; Vinatzer et al., 2004; Jansch et al., 2015; Baumgartner et al., 2016; Chagné et al., 2019). Pro tuto metodiku detekce genů rezistence byly vybrány právě SNP markery, a to konkrétně pro geny rezistence *Rvi2*, *Rvi4* a *Rvi6*, které byly nezávisle validovány a byla potvrzena jejich funkčnost ve studii Chagné et al. 2019. SNP markery lze analyzovat různými molekulárními metodami, využívá se např. metoda KASPTM (kompetitive allele specific PCR) (Baumgartner et al., 2016) či metoda OpenArray[®] screens firmy Thermo Fisher Scientific (Chagné et al., 2019), tyto metody mají však některé nevýhody. Nevýhodou metody KASPTM je její ochrana obchodní značkou firmy LGC Genomics, kdy je celý detekční systém syntetizován jako celek na zakázku a nenabízí tak jednoduchou optimalizaci, kdy mohou být primery pro detekci příslušného SNP podle potřeby upravovány, popřípadě objednávány jednotlivě a u různých firem. Další nevýhoda spočívá v tom, že KASPTM analýza je momentálně nabízena pouze se značením 6-FAM a HEX, tj. pro identifikaci dvou variant jednoho SNP/reakci. Nelze ji tedy multiplexovat s dalšími analýzami. KASPTM nemusí být proto úplně výhodná pro MAS, a to zejména tehdy, když je rutinně analyzován velký počet vzorků s různými sledovanými znaky. Metoda OpenArray[®] screens firmy Thermo Fisher Scientific je zase vhodná především pro analýzu velkého počtu SNP a pro vědecké účely, nikoliv pro rutinní testování semenáčků při MAS. Je nezbytné pořízení finančně náročného přístrojového vybavení a zároveň zpracování výsledků vyžaduje vysoce kvalifikovaný personál. Tato práce byla proto zaměřena na vyvinutí detekce SNP markerů pomocí metod, které jsou poměrně běžné a lze je provést v každé laboratoři vybavené v dnešní době dostupnými laboratorními přístroji. Zároveň jsou tyto metody proveditelné na velkém počtu vzorků. Mezi tyto analýzy patří především alelická diskriminace pomocí PCR v reálném čase či metoda SNaPshot (Thermo Fisher Scientific), je popsán i postup sekvenování jednotlivých markerů.

2 CÍL METODIKY

Cílem této metodiky je zavést molekulárními markery asistovanou selekci do klasického šlechtitelského procesu. Za tímto účelem byly optimalizovány tři různé metody detekce markerů typu SNP, které jsou ve vazbě s geny *Rvi2*, *Rvi4* a *Rvi6* zodpovědnými za rezistenci jabloní k určitým rasám patogenu *V. inaequalis*, a to sekvenování, alelická diskriminace pomocí real-time PCR a SNaPshot. Pro potřeby šlechtění je možné pomocí zmiňovaných markerů provádět genotypování vhodných rodičů jako dárců genů rezistence a následně provádět genotypizace potomstev vzniklých křížením těchto rodičů s cílem získat jedince s jedním nebo ideálně s více různými geny rezistence (pyramidizace). Díky zavedení této metodiky do rutinní praxe může dojít k značnému zefektivnění šlechtitelského procesu.

3 VLASTNÍ POPIS METODIKY

Pro stanovení rezistence k *V. inaequalis* u jabloní byly vybrány tři lokusy, které jsou ve šlechtění nejvíce využívány, a to lokus *Rvi2*, *Rvi4* a *Rvi6*. Z popsanych a validovaných SNP markerů pro tyto tři geny rezistence (Jänsch et al., 2015; Chagné et al., 2019) byly vybrány následující.

Pro analýzu lokusu *Rvi2* byl validován SNP W242 (Jänsch et al., 2015; Chagné et al., 2019). Tento SNP se nachází v oblasti nazvané FBsn*Rvi2*-7 a je umístěn v maximální vzdálenosti 1,2 cM od *Rvi2* (Jänsch et al., 2015). Detekce lokusu *Rvi4* byla provedena pomocí validovaného SNP K146, který se nachází v oblasti označené jako FBsn*Rvi4*-1, která kosegreguje s *Rvi4* (Jänsch et al., 2015; Chagné et al., 2019). Pro analýzu lokusu *Rvi6* byly validovány tři SNP (Jänsch et al., 2015; Chagné et al., 2019), přičemž dva se nachází před inkriminovaným lokusem a třetí za ním. Tyto SNP se nacházejí v oblasti nazvané M8S, respektive M18 a všechny SNP jsou umístěny v maximální vzdálenosti 0,9 cM od *Rvi6* (Jänsch et al., 2015). V oblasti M8S se nachází dva diagnostické SNP – SNP R156, respektive SNP R193 a v oblasti M18 se nachází jeden diagnostický SNP, a to SNP Y32 (Jänsch et al., 2015; Chagné et al., 2019).

Detekce těchto markerů rezistence byla provedena třemi metodami, a to sekvenováním (metoda byla vyvinuta zejména pro ověřování příslušného SNP a jeho okolí, kdy byly sekvence využity pro návrh primerů, popřípadě sond pro zbylé dvě metody, ale je možné tuto metodu využít i pro selekci menšího počtu vzorků), metodou alelické

diskriminace pomocí real-time PCR pro jednotlivé lokusy a metodou SNaPshot, která umožňuje analýzu všech tří lokusů *Rvi* najednou a potenciálně je rozšiřitelná o další markery. Pro vývoj metod byly použity výhradně diploidní genotypy, odrůdy s vyšší ploidii byly z analýz vyloučeny. Metodika je použitelná i pro ně, je však třeba věnovat pozornost vyhodnocování výstupů a jejich interpretaci. Prvním krokem pro všechny tři metody je izolace DNA.

3.1 Izolace DNA

Pro izolaci DNA za účelem MAS byly jako rostlinný materiál použity mladé listy stromů, popřípadě semenáčků, odebrané co nejdříve to bylo možné (stádium cca 3–4 prvních listů). Do izolace se navažovalo 100 mg rostlinného materiálu a homogenizace byla prováděna v tekutém dusíku. Izolace probíhala pomocí DNA izolačního kitu Exgene™ Plant SV mini (GeneAll), a to podle návodu výrobce. Celkovou genomickou DNA je však možné izolovat jakýmkoli způsobem umožňujícím dosáhnout takovou výtěžnost DNA, aby bylo možné detekovat diagnostické SNP způsoby popsanými v následujících kapitolách. Koncentrace [ng/μl] a čistota (poměr absorbancí při vlnových délkách 260/280 nm) získané DNA byly stanoveny pomocí spektrofotometru NanoDrop Lite (Thermo Fisher Scientific). Koncentrace získané DNA se typicky pohybovala v rozmezí 10 až 60 ng/μl a čistota by se měla pohybovat v rozmezí 1,8 až 2,2. DNA získaná tímto způsobem byla využita pro následné analýzy, případně uchovávána při teplotě -20 °C.

3.2 Detekce markeru rezistence *Rvi2*, *Rvi4* a *Rvi6* pomocí sekvenování

DNA vyzolovaná postupem popsaným v předchozí kapitole byla použita jako templát pro PCR reakci, kdy byl amplifikován fragment genomové DNA obsahující příslušný SNP. Primery byly navrženy pomocí softwaru Vector NTI (Thermo Fisher Scientific) případně Geneious prime (<https://www.geneious.com>) tak, aby byly jejich sekvence unikátní v částečně duplikovaném jablečném genomu (Velasco et al., 2010). Byla zvolena strategie amplifikovat poměrně krátké sekvence, a to z toho důvodu, že je v literatuře popisována velká sekvenční heterogenita analyzovaných lokusů (Jänsch et al., 2015; Baumgartner et al., 2016) a v případě posunových mutací by byla analýza sekvencí velmi ztížena. Pro lokus *Rvi2* však musel být amplifikován fragment s mnohem větší délkou než pro zbylé dva lokusy, a to z důvodu výskytu nulové alely při sekvenaci krátkého PCR produktu, která byla eliminována až použitím níže popsaných primerů. Pro lokus *Rvi2* byl amplifikován úsek o celkové délce 1357 bp, ve kterém se nachází diagnostický SNP W242, a pro lokus *Rvi4* byl amplifikován úsek o celkové délce

184 bp, ve kterém se nachází diagnostický SNP K145. Pro lokus *Rvi6* byl v oblasti M8S amplifikován úsek o celkové délce 209 bp, ve kterém se nacházejí diagnostické SNP R156 a R193. V oblasti *Rvi6* M18, ve které se nachází diagnostický SNP Y32, by měl úsek odpovídat délce 243 bp, ale vzhledem k tomu, že se v této oblasti nachází posunová mutace, mohou se jednotlivé alely od sebe lišit až o 16 nukleotidů.

Tabulka 1. Primery navržené pro amplifikaci fragmentu určeného pro sekvenaci oblasti obsahující požadované SNP markery lokusů rezistence.

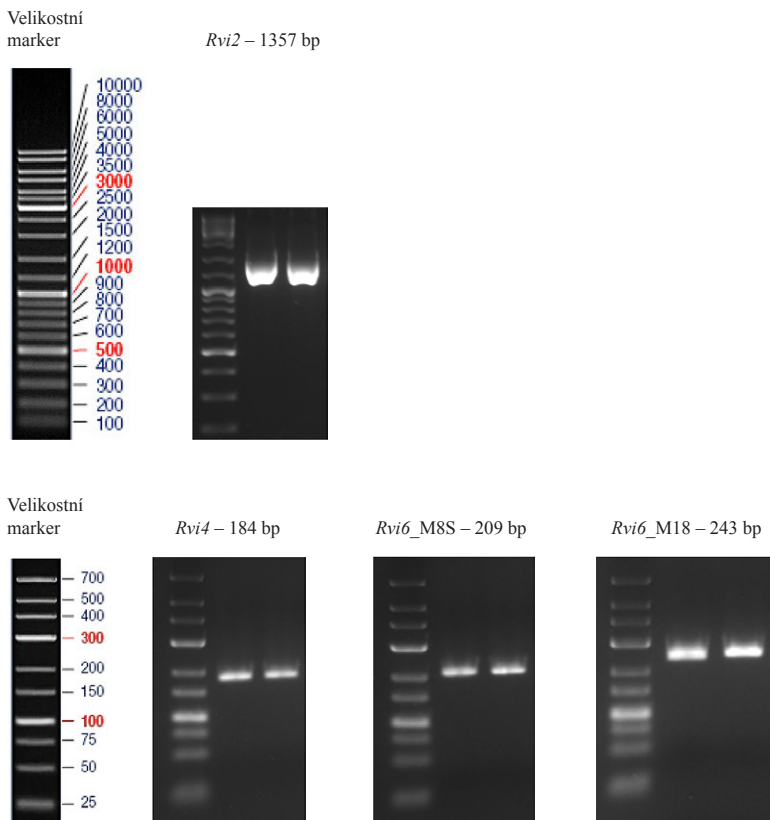
Amplifikovaný fragment	F-primer a R-primer
FBsn <i>Rvi2-7</i> SNP W242	AGAGTAAGCGAGAGTTTAAGAGG TCCTCGTCTTAATATAATCGAAGC
FBsn <i>Rvi4-1</i> SNP K145	ACAAAGAAGGGGAATGTTGACT AAGATAAGACCAGTCGCAATAGG
<i>Rvi6</i> _M8S SNP R156 a R193	TGGTTTAATCTCATGTTCTCAC TTCCCATCAAGTTTGGAGC
<i>Rvi6</i> _M18 SNP Y32	CAAAACAAATATGCTATCGCTGA CCAATAATAAAAAATAACTTCAAAAAA

Pro sekvenování FBsn*Rvi2-7* SNP W242 byl použit specificky navržený vnitřní primer (CCAGCTCCAACCAATATGTCA), který se nachází 70 bp před SNP W242 (délka primeru není započtena). Fragment oblasti FBsn*Rvi4-1* obsahující SNP K145 je doporučeno sekvenovat z R-primeru, a to z toho důvodu, že mezi F-primerem a SNP K145 dochází v případě některých vzorků u jedné z alel k inzerci/deleci jednoho nukleotidu T, a tím k posunu této sekvence o jeden nukleotid. Při sekvenování z F-primeru je sekvence v oblasti diagnostického SNP tedy hůře čitelná. Fragment oblasti *Rvi6*_M8S obsahující SNP R156 a SNP R193 je doporučeno sekvenovat z F-primeru, a to z toho důvodu, že R-primer je vzdálen jen 30 bp od diagnostického SNP R193, který by nemusel být v případě použití tohoto primeru osekvenován. Fragment oblasti *Rvi6*_M18 obsahující SNP Y32 je doporučeno sekvenovat z F-primeru, a to proto, že mezi diagnostickým SNP a R-primerem

se nachází rozsáhlejší posunová mutace a sekvence by byla v tomto případě velmi špatně čitelná. U rezistentní alely se mezi F-primerem a SNP Y32 nachází inserce/delece jednoho nukleotidu T, a tím dochází rovněž k posunu této sekvence, avšak pouze o jeden nukleotid, což je snáze analyzovatelné než v případě sekvenování z R-primeru.

Amplifikační reakce probíhala u jednotlivých SNP za mírně odlišných podmínek. Pro amplifikaci úseku obsahujícího detekční SNP W242 (*Rvi2*) byly reakční podmínky stanoveny následovně: 2 μ l DNA, 10 μ l 2 \times Phusion Flash High-Fidelity PCR master mix (Thermo Fisher Scientific), 1 μ l každého primeru o koncentraci 5 μ M, a 6 μ l PCR vody do celkového objemu 20 μ l. Amplifikace fragmentů probíhala v cykleru C1000 (Biorad) s nastaveným teplotním profilem: úvodní denaturace 98 $^{\circ}$ C/1 minuta; amplifikace ve 40 cyklech: 98 $^{\circ}$ C/15 s, 52 $^{\circ}$ C/15 s, 72 $^{\circ}$ C/120 s; závěrečná extenze 72 $^{\circ}$ C/30 s. Pro amplifikaci úseku obsahujícího detekční SNP K146 (*Rvi4*), respektive SNP R156 + SNP R193 (*Rvi6* lokus M8S) byly reakční podmínky stanoveny následovně: 2 μ l DNA, 10 μ l 2 \times Blue Master Mix (Top-Bio), 1 μ l směs obou primerů, každý o koncentraci 5 μ M, a 7 μ l PCR vody do celkového objemu 20 μ l. Amplifikace fragmentů probíhala v cykleru C1000 (Biorad) s nastaveným teplotním profilem: úvodní denaturace 94 $^{\circ}$ C/5 minut; amplifikace ve 40 cyklech: 94 $^{\circ}$ C/30 s, 58 $^{\circ}$ C/30 s, 72 $^{\circ}$ C/30 s; závěrečná extenze 72 $^{\circ}$ C/5 minut. Pro amplifikaci úseku obsahujícího detekční SNP Y32 (*Rvi6* lokus M18) byly reakční podmínky stanoveny následovně: 2 μ l DNA, 10 μ l 2 \times Blue Master Mix, 1 μ l směs obou primerů, každý o koncentraci 5 μ M, a 7 μ l PCR vody do celkového objemu 20 μ l. Amplifikace fragmentů probíhala v cykleru C1000 (Biorad) s nastaveným teplotním profilem: úvodní denaturace 94 $^{\circ}$ C/5 minut; amplifikace ve 40 cyklech: 94 $^{\circ}$ C/30 s, 52 $^{\circ}$ C/30 s, 72 $^{\circ}$ C/30 s; závěrečná extenze 72 $^{\circ}$ C/5 minut.

Amplifikované produkty byly analyzovány pomocí gelové elektroforézy. Pro amplifikované fragmenty obsahující marker genu rezistence *Rvi2* byl použit 1,5% agarózový gel v 0,5% TBE pufru, barven SafeView™ Classic (abm) a jako velikostní standard pro určení správné velikosti amplifikovaného produktu byl použit GeneRuler™ DNA Ladder Mix, ready-to-use (Thermo Fisher Scientific). Pro amplifikované fragmenty obsahující markery genů rezistence *Rvi4* a *Rvi6* byl použit 3% agarózový gel v 0,5% TBE pufru, barven SafeView™ Classic (abm) a jako velikostní standard pro určení správné velikosti amplifikovaného produktu byl použit GeneRuler Low Range DNA Ladder, ready-to-use (Thermo Fisher Scientific). K produktům bylo před nanášením na gel přidáno 4 μ l 6 \times TriTrack DNA Loading Dye (Thermo Fisher Scientific). Produkty byly vizualizovány pomocí UV transiluminátoru. Příslušné fragmenty byly identifikovány u všech vzorků.



Obrázek 1. Ukázka elektroforeogramů amplifikovaných fragmentů obsahujících požadované markery pro lokusy *Rvi2*, *Rvi4* a *Rvi6*.

Amplifikované produkty byly z gelu purifikovány pomocí izolačního kitu WizPrep™ Gel/PCR Purification Mini Kit (Wizbiosolutions). Eluovaná DNA byla sekvenována kitem BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific), případně kitem Gerbera Sequencing Kit v3.1 (SEQme). Sekvenační reakce byla provedena za následujících podmínek v termocykleru C1000 (Biorad): úvodní denaturace 95 °C/5 min; následně 95 °C/30 s, 55 °C/20 s, 60 °C/4 min v 40 cyklech; finální chlazení 8 °C. Následná purifikace sekvenační reakce byla provedena přidáním 45 µl SAM Solution a 10 µl BigDye XTerminator Solution (Thermo Fisher Scientific)

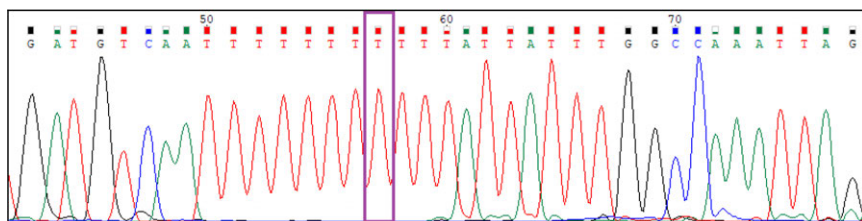
a vortexováním 30 minut při cca 1200 RPM. Po krátké centrifugaci bylo do sekvenační destičky napipetováno 25 μ l každého vzorku bez kuliček a destička byla analyzována na genetickém analyzátoru ABI PRISM 3500 (Thermo Fisher Scientific). Výsledky byly analyzovány softwarem Sequence Analysis Software 6 od téže firmy a následně vyhodnocovány a editovány pomocí softwaru Chromas (Technelysium Pty Ltd). Alignment získaných sekvencí pro určení detekčního SNP byl sestaven pomocí softwaru Geneious Prime (Biomatters Ltd). Doporučuje se rovněž kontrola získaných sekvencí pomocí nástroje BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Primery použité pro PCR za mírných podmínek se 40 cykly amplifikace jsou obvykle schopné amplifikovat příslušný úsek DNA i v případě výskytu několika záměnných mutací v místě nasedání primeru. Nelze však vyloučit, že byl primer navržen v oblasti s delekcemi/inzercemi či rozsáhlejšími přestavbami, které znemožňují nasednutí primeru, v tomto případě by daný úsek nebyl amplifikován. Výskyt této tak zvané nulové alely lze odhalit buď díky výskytu odrůd s nulovou amplifikací daného lokusu při současné analýze kontrolního genu (tj. příslušná odrůda obsahuje 2 nulové alely), nebo analyzováním hybridů z křížení senzitivní odrůdy (s 1 nulovou alelou, případně 2 nulovými alelami, pokud nebyla tato rodičovská odrůda s těmito primery analyzována) s odrůdou nesoucí rezistentní alelu, kdy dojde k identifikaci rezistentního homozygota. V tomto případě je vhodné vzorky amplifikovat opakovaně pomocí dalších párů primerů, dokud není nulová alela osekvenována. Tímto způsobem bylo postupováno rovněž při analýze lokusu *Rvi2*, kde byly díky analýze potomstva křížení senzitivní odrůdy (s 1 nulovou alelou) s odrůdou nesoucí rezistentní alelu identifikovány rozsáhlejší přestavby uvedeného lokusu, původní nulová alela byla nakonec úspěšně amplifikována. Vzhledem k velké diverzitě jabloní v inkriminovaných lokusech však není možné vyloučit výskyt dalších vzácných nulových alel i přes pečlivě provedenou analýzu a v případě podezření na výskyt nulové alely je doporučeno postupovat podle výše uvedeného návodu.

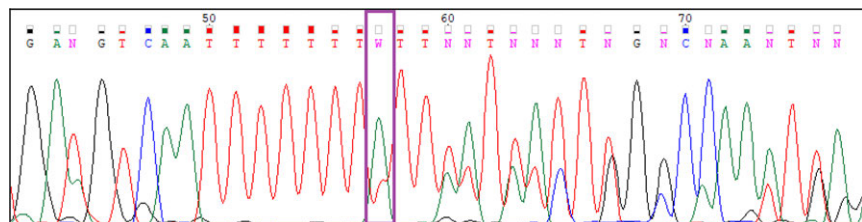
Výsledky sekvenování pro lokus *Rvi2*

Pro SNP W242, který je markerem genu rezistence *Rvi2*, genotyp T/T odpovídá senzitivním jedincům či jedincům nesoucím jiný typ rezistence a genotypy A/T a A/A odpovídají rezistentním jedincům. Rezistentní genotyp A/A však nebyl v souboru testovaných odrůd zaznamenán ani v naší práci (viz Příloha 1), ani v publikaci Chagné et al., 2019.

a)



b)

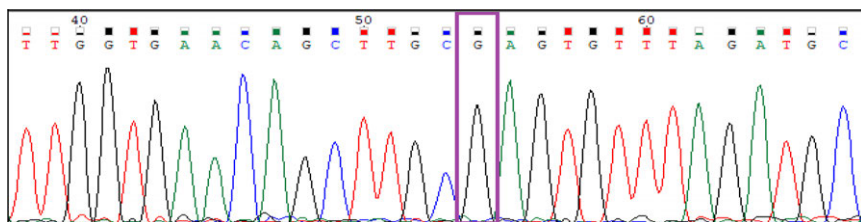


Obrázek 2. Sekvence oblasti FBsn*Rvi2-7* senzitivní odrůdy (a.) a sekvence rezistentní odrůdy s heterozygotním genotypem (b.) s vyznačenou pozicí validovaného SNP W242.

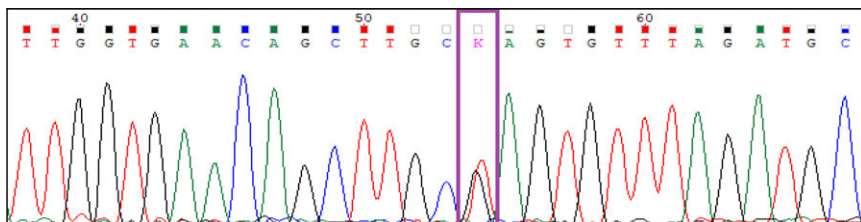
Výsledky sekvenování pro lokus *Rvi4*

Pro SNP K146, který je markerem genu rezistence *Rvi4*, odpovídá genotyp G/G senzitivním jedincům či jedincům nesoucím jiný typ rezistence a genotypy T/G a T/T rezistentům. Rezistentní genotyp T/T nebyl v souboru testovaných odrůd zaznamenán ani v naší práci (viz Příloha 1), ani v publikaci Chagné et al., 2019.

a)



b)

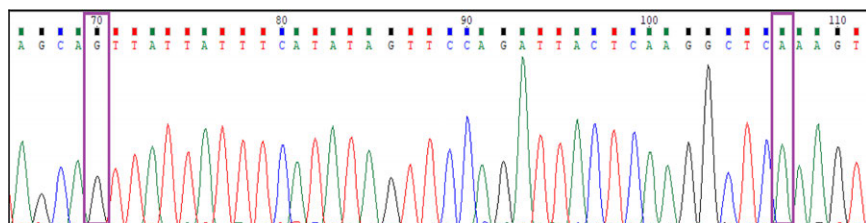


Obrázek 3. Chromatogram senzitivního (a.) a rezistentního (b.) jedince s vyznačenou pozicí validovaného SNP K146.

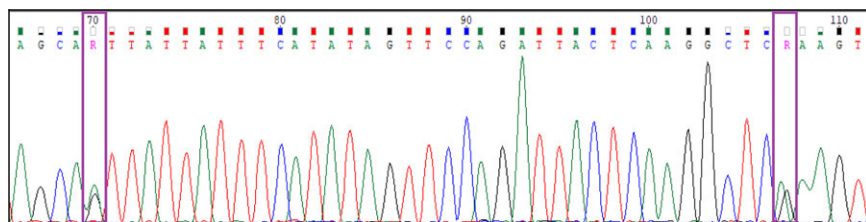
Výsledky sekvenování pro lokus *Rvi6*

Pro SNP R156 (nukleotid 70 v sekvenci na obrázku 4), nacházející se v oblasti *Rvi6*_M8S, genotyp G/G odpovídá senzitivním jedincům či jedincům nesoucím jiný typ rezistence a genotypy A/G a A/A odpovídají rezistentům. Rezistentní genotyp A/A nebyl v souboru testovaných odrůd zaznamenán (viz Příloha 1). Pro SNP R193 (nukleotid 107 v sekvenci na obrázku 4), nacházející se v oblasti *Rvi6*_M8S, genotyp A/A odpovídá senzitivním jedincům či jedincům nesoucím jiný typ rezistence a genotypy A/G a G/G odpovídají rezistentům. Rezistentní genotyp G/G však nebyl v souboru testovaných odrůd zaznamenán.

a)



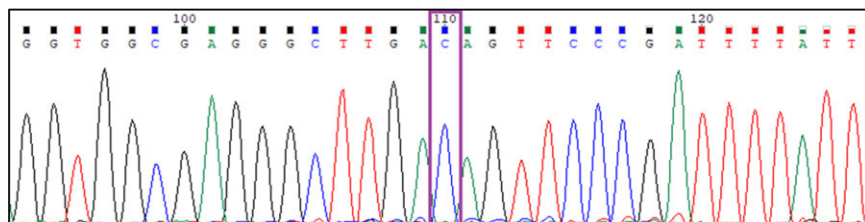
b)



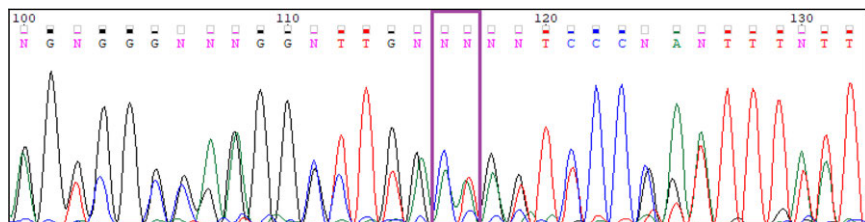
Obrázek 4. Sekvence oblasti M8S senzitivní odrůdy (a.), sekvence rezistentní odrůdy s heterozygotním genotypem (b.). Diagnostické SNP R156 a R193 jsou vyznačeny rámečkem.

Pro SNP Y32, nacházející se v oblasti *Rvi6_M18*, genotyp C/C odpovídá senzitivním jedincům či jedincům nesoucím jiný typ rezistence a genotypy C/T a T/T odpovídají rezistentům. Rezistentní genotyp T/T však nebyl v souboru testovaných odrůd zaznamenán.

a)



b)



Obrázek 5. Sekvence oblasti *Rvi6*_M18 v místě diagnostického SNP u senzitivní odrůdy (a.) a sekvence rezistentní odrůdy, kdy dochází k vzájemnému posunu sekvencí o 1 nukleotid. (b.). Diagnostický SNP Y32 je vyznačen rámečkem.

3.3 Detekce markerů rezistence *Rvi2*, *Rvi4* a *Rvi6* metodou alelické diskriminace pomocí real-time PCR

Alelická diskriminace je v podstatě multiplexní reakce, která detekuje různé varianty cílové sekvence DNA. Přítomnost dvou fluorescenčně značených sond v každé reakci umožňuje genotypizaci dvou možných variant v místě jednonukleového polymorfismu (SNP) v cílové templátové sekvenci. Každá sonda je značená jinou fluorescenční barvou a je komplementární k dané variantě SNP a okolní sekvenci. Pomocí alelické diskriminace je tedy možné určit konkrétní alelickou skladbu zkoumaného jedince a rozlišovat homozygoty a heterozygoty.

Na základě porovnání sekvencí námi vybraných vzorků odrůd byly pro SNP W242 markerující gen *Rvi2*, SNP K145 markerující gen *Rvi4* a SNP R156 markerující gen *Rvi6* navrženy sondy pro detekci senzitivních (Sens) a rezistentních (Res) alel a byly vybrány nejvhodnější kombinace primerů (tabulka 2). Celá metoda byla navržena tak, aby ji bylo

možné rutinně použít pro MAS v laboratořích, které jsou vybaveny standardním real-time PCR cyklem. Jako templát pro real-time PCR reakci byla využita DNA izolovaná způsobem popsaným v kapitole 3.1.

Tabulka 2. Primery a sondy navržené pro detekci SNP markeru genů rezistence *Rvi2*, *Rvi4* a *Rvi6* metodou alelické diskriminace pomocí real-time PCR. Y v sekvencích zastupuje C nebo T; K představuje G nebo T. 6-FAM a HEX znamená fluoroforové značení jednotlivých sond. + před nukleotidem označuje LNA (locked nucleic acid) nukleotid.

Amplifikovaný fragment	F-primer a R-primer	Sondy
FBsn <i>Rvi2</i> -7 SNP W242	F: GTTAAATTTGACATATGAGAATGTG	6-FAM- TT+TTT+T+T+TTTA+T+TA TYTGGC (Sens)
	R: ATACCATATGAYCACAKAGATCATT	HEX TT+TTT+T+A+TTTA+T+TA TTTGGC (Res)
FBsn <i>Rvi4</i> -1 SNP K145	F: ACAAAGAAGGGGAATGTTGACT	6-FAM- TTGCGAGTGTTTAGATGC AG (Sens)
	R: AAGATAAGACCAGTCGCAATAGG	HEX- TTGCTAGTGTTTAGATGC AG (Res)
<i>Rvi6</i> _M8S R156	F: TGGTTTAATCTCATGTTCCCTCAC	6-FAM- ATAACTGCTAAGGTGATT GTG (Sens)
	R: AAGTTTGGAGCACACATAAGG	HEX- ATAATTGCTAAGGTGATT GTG (Res)

Analýza jednotlivých markerů genů rezistence *Rvi2*, *Rvi4* a *Rvi6* probíhá v samostatných reakcích. Amplifikační reakce o výsledném objemu 20 µl byla připravena smícháním 1 µl premixu požadovaných primerů a sond (podle tabulky 3), 10 µl qPCR 2× Blue Master Mix a 7 µl PCR vody.

Tabulka 3. Rozpis pro premix primerů a sond pro jednotlivé markery genů rezistence na 100 reakcí

Komponenty:	Pro <i>Rvi2</i>:	Pro <i>Rvi4</i>:	Pro <i>Rvi6</i>:
F-primer (100μM)	10 μl	5 μl	5 μl
R-primer (100μM)	10 μl	5 μl	5 μl
Res-sonda (100μM)	5 μl	5 μl	4,5 μl
Sens-sonda (100μM)	5 μl	5 μl	5 μl
Voda	70 μl	80 μl	80,5 μl
Celkem	100 μl	100 μl	100 μl

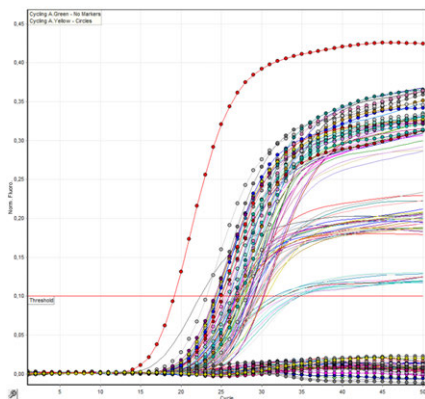
Do každé reakce byly jako vstupní materiál pro provedení PCR amplifikace přidány 2 μl izolované genomové DNA. Pro spolehlivé vyhodnocení analýzy je vhodné vždy přidat jako vzorek i pozitivní kontroly, a to rovněž o objemu 2 μl/reakce. Jako pozitivní kontrola slouží syntetické ultramery připravené jak pro rezistentní, tak pro senzitivní alelu jednotlivých genů rezistence (tabulka 4). Zároveň je analyzována negativní kontrola bez přidaného DNA templátu.

Tabulka 4. Sekvence ultramerů používaných jako pozitivní kontrola pro metodu alelické diskriminace pomocí real-time PCR. Sens – senzitivní alela, Res – rezistentní alela. Příslušný SNP je vyznačen barevně.

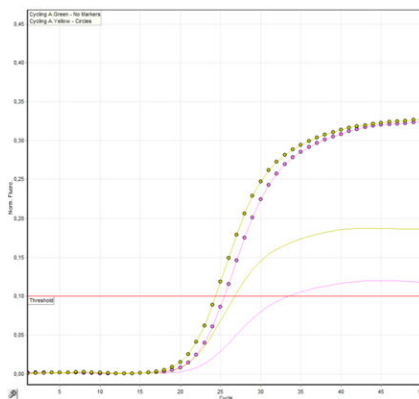
Ultramer	Sekvence
Rvi2_Sens	GTAAATTTGACATATGAGAATGTGATGTCAATTTTTTT T TTTATTATTG GCCAAATTAGATAAATGATCTATGTGGTCATATGGTAT
Rvi2_Res	GTAAATTTGACATATGAGAATGTGATGTCAATTTTTTT A TTTATTATTG GCCAAATTAGATAAATGATCTATGTGGTCATATGGTAT
Rvi4_Sens	ACAAAGAAGGGGAATGTTGACTGGATTAAGTTTATGGATTACATATTTG GATTCTATATTGGTGAACAGCTTGC G AGTGTTTATAGTCAGGTGTAACAT TGATGAAATATAAGTGTTATCTAAAATTCATTTTGATTTTCAGACTCTCAA ACTTTCTGCACCTATTGCGACTGGTCTTATCTT
Rvi4_Res	ACAAAGAAGGGGAATGTTGACTGGATTAAGTTTATGGATTACATATTTG GATTCTATATTGGTGAACAGCTTGC T AGTGTTTATAGTCAGGTGTAACAT TGATGAAATATAAGTGTTATCTAAAATTCATTTTGATTTTCAGACTCTCAA ACTTTCTGCACCTATTGCGACTGGTCTTATCTT
Rvi6_Sens	TGGTTAATCTCATGTTTCCTACCAATATTGGGTTGAAGCCTTCACGACTG CACTATATCTCATTAATAGATTGCCAATCTCTGGGATTTACAATCACCTT AGCA G TTATTATTTTCATATAGTTCCAGATTACTCAAGGCTC A AAGTCTTTG GTTGTTTGTACTTTCCATGGTTAAAACCTTATGTGTGCTCCAAACTT
Rvi6_Res	TGGTTAATCTCATGTTTCCTACCAATATTGGGTTGAAGCCTTCACGACTG CACTATATCTCATTAATAGATTGCCAATCTCTGGGATTTACAATCACCTT AGCA A TTATTATTTTCATATAGTTCCAGATTACTCAAGGCTC G AAGTCTTTG GTTGTTTGTACTTTCCATGGTTAAAACCTTATGTGTGCTCCAAACTT

PCR amplifikace byla provedena běžným postupem v real-time PCR cyklu (použit Rotor-Gene Q (Qiagen)) s následujícím teplotním profilem stejným pro všechny tři amplifikační reakce: 94 °C/5 min; cyklování: 50x (94 °C/20 s, 58 °C/20 s, 72 °C/20 s); závěr 50 °C/5 s. Snímání fluorescence musí být aktivní pro kanály 6-FAM a HEX, Gain pro fluorescenční kanál „green“ byl nastaven na hodnotu 5,67 a Gain pro fluorescenční kanál „yellow“ byl nastaven na hodnotu 6. Výsledek PCR amplifikace byl vyhodnocen metodou alelické diskriminace. Grafické výstupy a příklady výsledků alelické diskriminace u semenáčů z křížení různých odrůd (rezistentní x rezistentní nebo senzitivní) jsou uvedeny na obrázcích 6 až 8.

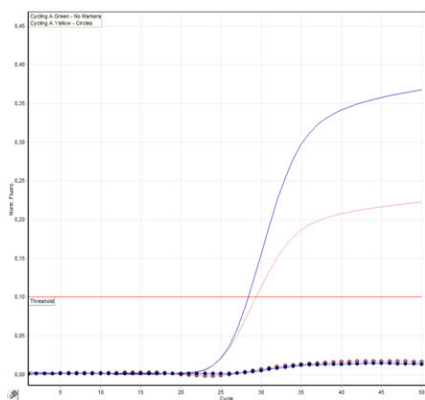
a)



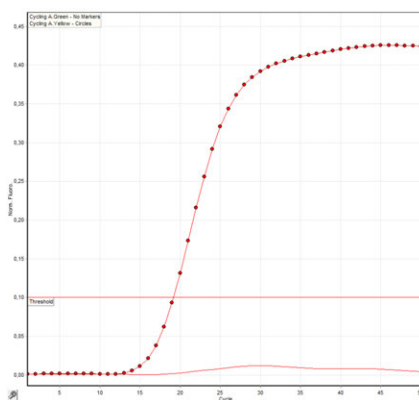
b)



c)



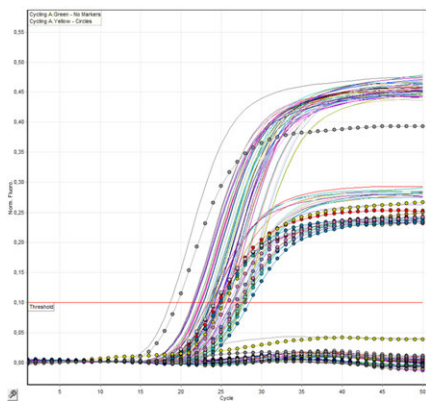
d)



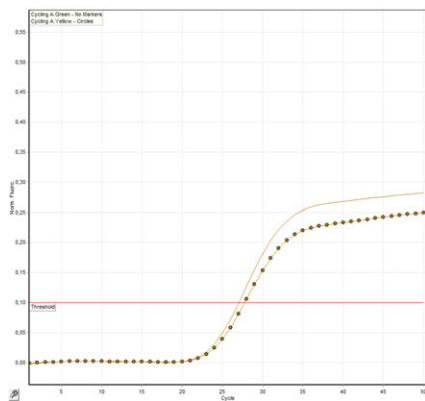
Obrázek 6. Příklady analýzy genu rezistence *Rvi2* metodou alelické diskriminace pomocí PCR v reálném čase. Křivky bez teček – 6-FAM fluorescence (sonda pro senzitivní alelu); křivky s tečkami – HEX fluorescence (sonda pro rezistentní alelu). a) Výsledek alelické diskriminace pro soubor testovaných vzorků; b) detekce dvou heterozygotních genotypů jabloně nesoucích rezistentní i senzitivní alelu pro lokus rezistence *Rvi2* – na výsledném grafu je možné vidět dvě různé výšky fluorescenčních křivek pro senzitivní alelu. To je způsobeno tím, že v sekvenci sondy se nachází degenerovaný nukleotid (viz. tabulka 2 – nukleotid Y odpovídá T nebo C) a varianty sondy mají mírně odlišnou teplotu tání (T_m). Křivka, která je vyšší, patří vzorku, který obsahuje alelu s nukleotidem C; křivka, která je nižší, patří vzorku, který obsahuje alelu s nukleotidem T (ověřeno sekvenováním, vliv degenerace primerů byl experimentálně vyloučen); c) detekce dvou homozygotních genotypů jabloně nesoucích pouze senzitivní alely pro lokus

rezistence *Rvi2* – na výsledném grafu je možné vidět dvě různé výšky fluorescenčních křivek pro senzitivní alelu, to je způsobeno tím, že v sekvenci sondy se nachází i nediagnostický SNP, který je řešen degenerovaným nukleotidem (viz. tabulka 2 – nukleotid Y odpovídá T nebo C) a varianty sondy mají mírně odlišnou teplotu tání (T_m). Křivka, která je výš, patří vzorku, který obsahuje jednu alelu s nukleotidem T a jednu alelu s nukleotidem C a křivka, která je níž, patří vzorku, který obsahuje dvě alely s nukleotidem T, vzorek, který by nesl obě alely s nukleotidem C, nebyl zaznamenán, ale dá se předpokládat, že by tento genotyp vytvořil ještě třetí, nejvyšše položenou křivku; d) detekce homozygotního genotypu jabloně nesoucího pouze rezistentní alely pro lokus rezistence *Rvi2*.

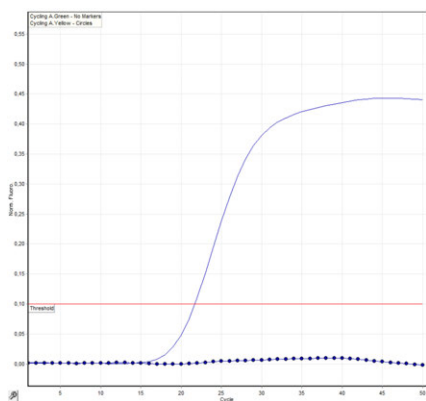
a)



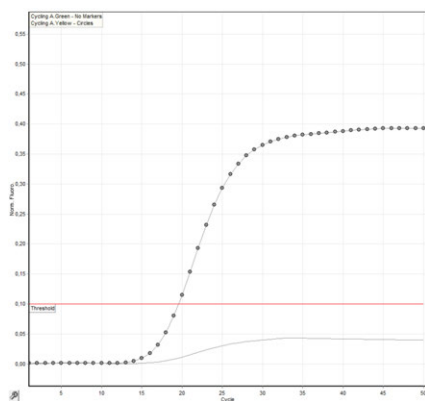
b)



c)

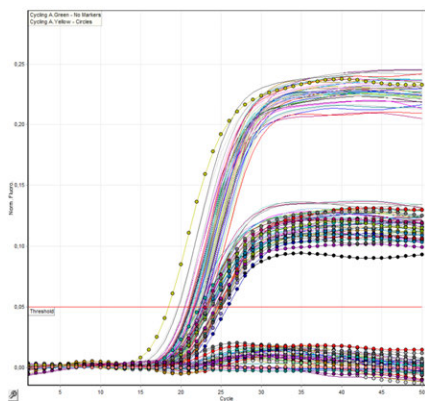


d)

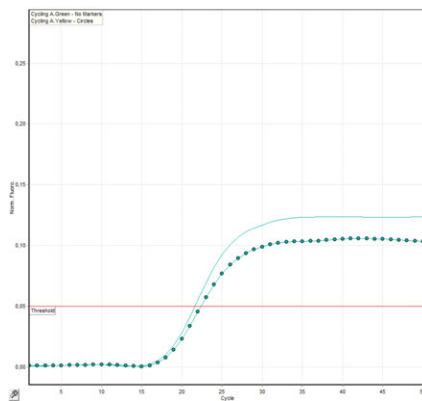


Obrázek 7. Příklad analýzy genu rezistence *Rvi4* metodou alelické diskriminace pomocí PCR v reálném čase. Křivky bez kroužků – 6-FAM fluorescence (sonda pro senzitivní alelu); křivky s kroužky – HEX fluorescence (sonda pro rezistentní alelu). a) Výsledek alelické diskriminace pro soubor testovaných vzorků; b) detekce heterozygota nesoucího rezistentní i senzitivní alelu pro lokus rezistence *Rvi4* u vybraného genotypu jabloně; c) detekce homozygota nesoucího dvě senzitivní alely pro lokus rezistence *Rvi4* u vybraného genotypu jabloně a d) detekce homozygota nesoucího dvě rezistentní alely pro lokus rezistence *Rvi4* u vybraného genotypu jabloně.

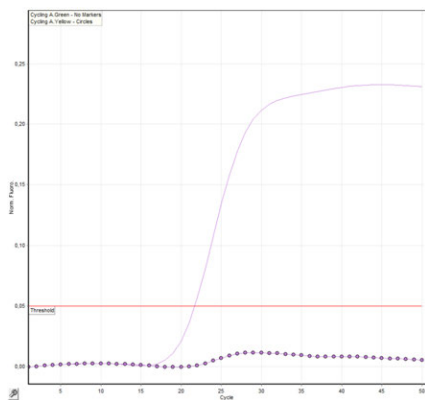
a)



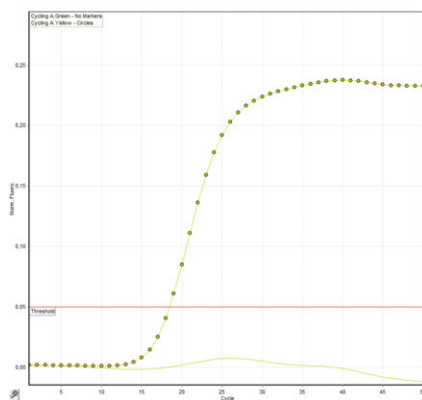
b)



c)



d)



Obrázek 8. Příklady očekávaných výstupů alelické diskriminace diagnostického SNP R156 pro lokus *Rvi6*. Křivky bez teček – 6-FAM fluorescence (sonda pro senzitivní alelu); křivky s tečkami – HEX fluorescence (sonda pro rezistentní alelu). a) Výsledek alelické diskriminace pro soubor testovaných vzorků; b) detekce heterozygotního genotypu jabloně nesoucího rezistentní i senzitivní alelu pro lokus rezistence *Rvi6*; c) detekce homozygotního genotypu jabloně nesoucího pouze senzitivní alely pro lokus rezistence *Rvi6*; d) detekce homozygotního genotypu jabloně nesoucího pouze rezistentní alely pro lokus rezistence *Rvi6*.

3.4 Detekce markerů rezistence *Rvi2*, *Rvi4* a *Rvi6* metodou SNaPshot

Metoda SNaPshot využívaná v SNP genotypování probíhá jako multiplexní reakce, ve které je možné sledovat více SNP markerů najednou. Pro každý sledovaný SNP je navržen specifický detekční primer. Tyto primery mají na 3' konci sekvenci bezprostředně předcházející diagnostickému SNP markeru, takže je ve SNaPshot reakci tento primer prodloužen právě o nukleotid diagnostického SNP. Na 5' konci primeru může být připojena nekomplementární extenze. Díky této extenzi je možné primer prodloužit na požadovanou délku tak, aby bylo možné fragmenty pro různé SNP rozlišit na základě jejich délky jako při fragmentační analýze. V reakční směsi jsou přítomny jen dideoxyribonukleotidy (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP), přičemž každý je označen jinou fluorescenční barvou. Začleněním takto značeného ddNTP za primer je polymerizace ukončena. Získaná směs fragmentů prodloužených přesně o jeden fluorescenčně značený ddNTP, který odpovídá příslušnému SNP, je následně separována pomocí kapilární elektroforézy v genetickém analyzátoru, kde je detegována fluorescence a délka jednotlivých fragmentů.

SNaPshot analýza se skládá z několika dílčích kroků, a to PCR amplifikace, purifikace PCR produktů, vlastní SNaPshot reakce, purifikace produktů SNaPshot reakce a výsledné analýzy na genetickém analyzátoru. Pro PCR amplifikaci příslušné oblasti obsahující detekční SNP pro jednotlivé geny rezistence byly použity stejné primery jako v případě metody alelické diskriminace pomocí real-time PCR (viz. tabulka 2 – F a R-primery). Dále byly na základě provedeného porovnání sekvencí v programu Geneious Prime navrženy specifické primery pro metodu SNaPshot (tabulka 4).

Pro SNP W242 markerující lokus *Rvi2* byly navrženy dva primery, a to z toho důvodu, že v této oblasti je více jednonukleotidových polymorfismů a bylo potřeba obsáhnout všechny alely. Tyto primery byly navrženy na výslednou délku 30 nukleotidů. Primer pro SNP K145 markerující lokus *Rvi4* byl navržen na výslednou délku 36 nukleotidů a primer pro SNP R156 markerující lokus *Rvi6* (konkrétně lokus M8S) byl navržen na výslednou délku 42 nukleotidů.

Tabulka 4. Specifické detekční primery navržené pro detekci SNP markeru genů rezistence *Rvi2*, *Rvi4* a *Rvi6* metodu SNaPshot. Y v sekvencích znamená nukleotid C nebo T.

Amplifikovaný fragment	Primer	Extenze na 5'- konci
FBsn <i>Rvi2</i> -7 SNP W242	5'-ATCATTATYTAATTTGGCCAAATAATAAA-3'	Bez extenze
	5'-ATCATTATCTAATTTGGCCAGATAATAAA-3'	Bez extenze
FBsn <i>Rvi4</i> -1 SNP K145	5'-ATGTTACAYCTGCATCTAAACACT-3'	CCCCCCCCCCCC
<i>Rvi6</i> _M8S SNP R156	5'-TGAGTAATYTGGAACTATATGAAATAATAA-3'	CCCCCCCCCCCC

Vzorky DNA (byly využity stejné vzorky jako v případě sekvenování nebo alelické diskriminace) byly před amplifikací genomového úseku s požadovaným SNP naředěny na koncentraci 10 ng/μl. Amplifikační reakce o výsledném objemu 20 μl byla připravena smícháním 1 μl premixu primerů připraveného podle tabulky 5, 10 μl qPCR 2× Blue Master Mix a 8 μl PCR vody a do každé reakce byl jako vstupní materiál pro provedení PCR amplifikace přidán 1 μl ředěné DNA. Amplifikace fragmentů probíhala v cyklu C1000 (Biorad) s nastaveným teplotním profilem: úvodní denaturace 94 °C/5 minut; amplifikace ve 40 cyklech: 94 °C/30 s, 58 °C/30 s, 72 °C/30 s; závěrečná extenze 72 °C/5 minut.

Tabulka 5. Rozpis pro premix primerů na 100 PCR reakci.

Premix primerů	Objem (μl)
<i>Rvi6</i> _MS8 primer-F (100μM)	7
<i>Rvi6</i> _MS8 primer-R (100μM)	7
<i>Rvi4</i> _FB primer-F (100μM)	3
<i>Rvi4</i> _FB primer-R (100μM)	3
<i>Rvi2</i> -FB7 primer-F (100μM)	10
<i>Rvi2</i> -FB7 primer-R (100μM)	10
Voda	60
Celkem	100

Amplifikované fragmenty byly purifikovány, aby byly odstraněny komponenty PCR (především nevyužité primery a dNTP) v následné extenzi specifických detekčních primerů navržených pro SNaPshot. Purifikace byla prováděna pomocí ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup Reagent (Thermo Fisher Scientific) tak, že k 5 µl PCR produktu byly přidány 2 µl ExoSAP-IT™. Takto připravená směs se v termocykleru nechala 4 minuty inkubovat při 37 °C a poté 1 minutu při 80 °C (inaktivace enzymů). Purifikované amplifikované fragmenty byly následně použity jako templát pro SNaPshot reakci, která byla připravena podle tabulky 6.

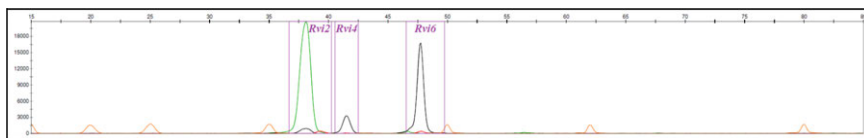
Tabulka 6. Rozpis přidávaných reagensů pro SNaPshot reakci o celkovém objemu 10 µl.

SNaPshot reakce	Objem (µl)
SNaPshot Multiplex Ready Reaction Mix (Thermo Fisher Scientific)	5
SNaPshot detekční primer <i>Rvi2</i> R01 (2µM)	0,5
SNaPshot detekční primer <i>Rvi2</i> R02 (2µM)	0,5
SNaPshot detekční primer <i>Rvi4</i> (1µM)	0,5
SNaPshot detekční primer <i>Rvi6</i> (5µM)	0,5
Voda	2
Templát po přečištění pomocí ExoSAP-IT™	1
Celkem	10

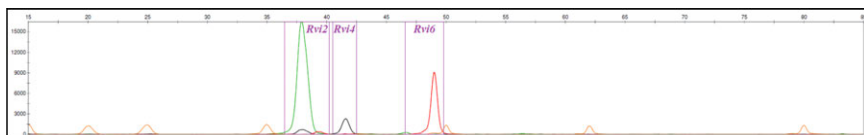
Reakce probíhala v termocykleru C1000 (Biorad) s nastaveným teplotním profilem: amplifikace v 10 cyklech: 96 °C/10 s, 50 °C/5 s, 60 °C/30 s. Po dokončení reakce bylo potřeba opět purifikovat amplifikované fragmenty z důvodu odstranění nevyužitých primerů a ddNTP. Do každé zkumavky, ve které bylo 10 µl SNaPshot produktu, byl přidán 1 µl enzymu SAP (Thermo Fisher Scientific). Takto připravená směs byla v termocykleru inkubována 1 hodinu při 37 °C a poté 15 minut při 75 °C. Následně byly vzorky připraveny pro analýzu pomocí genetického analyzátoru tak, že byl nejdříve připraven mix 9 µl Hi-Di formamidu a 0,2 µl velikostního standardu GeneScan 120 LIZ dye (obojí Thermo Fisher Scientific) a k němu byl přidán vždy 1 µl analyzovaného vzorku. Připravené vzorky byly před samotnou analýzou denaturovány 5 minut při 95 °C v termocykleru, SNaPshot analýza byla prováděna na genetickém analyzátoru ABI PRISM 3500 (Thermo Fisher Scientific).

Výsledek SNaPshot analýzy byl vyhodnocen pomocí softwaru GeneMapper v5.0 (Thermo Fisher Scientific). Výsledkem je elektroforeogram obsahující vrcholy v barvě konkrétního nukleotidu v místě SNP a zároveň jsou tyto vrcholy rozděleny na základě délky. Výsledky SNaPshot analýzy jsou znázorněny na obrázku 9. Ve všech případech došlo k posunu v délce několika nukleotidů oproti předpokládané pozici (původní délka pro fragment obsahující SNP W242 byla 31 nukleotidů, pro fragment obsahující SNP K146 byla 37 nukleotidů a pro fragment obsahující SNP R156 byla 43 nukleotidů), nesoulad mezi skutečnou délkou fragmentu a délkou fragmentu pozorovanou při fragmentační analýze je však běžně popisovaný jev. Tento posun může být způsoben použitím jak fluorescenční značky, která má vliv na mobilitu získaného produktu, tak sekvencí analyzovaného oligonukleotidu. Posun z těchto důvodů je na Obrázku 9 patrný i u analýz SNP pro *Rvi2* a *Rvi6*, kde se jednotlivé alely nezobrazují přesně pod sebou (jako v případě *Rvi4*), ale s posunem cca 1 nukleotidu. K celkovému posunu i o několik nukleotidů oproti předpokladu také často dochází u kratších oligonukleotidů. Vliv na výslednou pozici genotypizovaného SNP může také mít polymer použitý při práci na genetickém analyzátoru (Goodwin et Alimat, 2017). V uvedeném příkladu byla analýza prováděna v polymeru POP7 (Thermo Fisher Scientific) a na kapilárách o délce 50 cm. I přes tyto posuny by však měly být jednotlivé SNP v případě multiplexní reakce dobře velikostně rozlišitelné, správné přiřazení jednotlivých vrcholů bylo ověřeno SNaPshot analýzou probíhající pouze s jedním typem primerů pro SNaPshot. U analýzy *Rvi4* je možné pozorovat, že alela G má oproti ostatním vrcholům poměrně nízký signál. Je to pravděpodobně dáno sekvencí daného lokusu a nízkou prioritou inkorporace G za příslušný primer, případné sekvenční odlišnosti v místě nasedání všech tří primerů pro analýzu *Rvi4* byly vyloučeny.

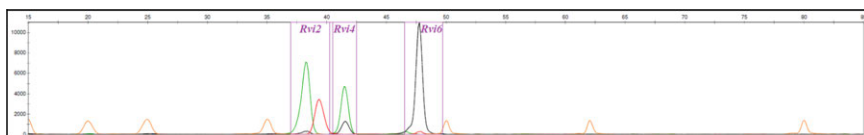
a)



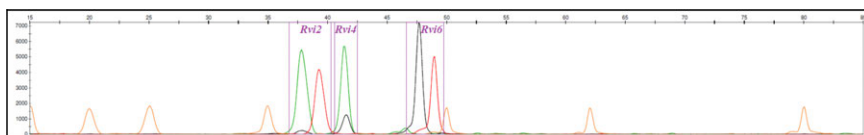
b)



c)



d)



Obrazek 9. Příklady výsledků SNaPshot analýzy. Černá barva označuje nukleotid G, červená barva představuje nukleotid A a zelená barva patří nukleotidu T. Oranžové vrcholky reprezentují velikostní marker. Fialové rámečky vymezují oblast pro jednotlivé SNP *Rvi2*, *Rvi4* a *Rvi6*. a) Senzitivní jedinec ve všech třech lokusech s genotypem T/T pro SNP W242 (*Rvi2*), G/G pro SNP K146 (*Rvi4*) a G/G pro SNP R156 (*Rvi6*); b) jedinec, který je v lokusech *Rvi2* a *Rvi4* senzitivní a v lokusu *Rvi6* rezistentní s genotypem T/T pro SNP W242 (*Rvi2*), G/G pro SNP K146 (*Rvi4*) a A/A pro SNP R156 (*Rvi6*); c) jedinec, který je v lokusech *Rvi2* a *Rvi4* rezistentní a v lokusu *Rvi6* senzitivní s genotypem A/T pro SNP W242 (*Rvi2*), T/G pro SNP K146 (*Rvi4*) a G/G pro SNP R156 (*Rvi6*); d) rezistentní jedinec ve všech třech lokusech s genotypem A/T pro SNP W242 (*Rvi2*), T/G pro SNP K146 (*Rvi4*) a A/G pro SNP R156 (*Rvi6*).

4 SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ

Pro analýzu genů rezistence k *V. inaequalis* se v dnešní době využívá detekce markerů typu SCAR, SSR či SNP. Metody využívané k detekci těchto markerů jsou však v současnosti buď finančně náročné, nebo nejsou vhodné pro analýzu velkého množství vzorků, které je potřeba zanalyzovat při selekci jabloní, a to zejména z důvodu pracnosti a časové náročnosti. V této metodice jsou proto představeny metody detekce validovaných SNP markerů pro geny rezistence *Rvi2*, *Rvi4* a *Rvi6*, a to sekvenování, alelická diskriminace pomocí real-time PCR a SNaPshot. Zatímco sekvenování je využíváno zejména pro ověřování a návrh zbylých metod, alelická diskriminace představuje velmi rychlou detekci SNP markerů pro geny rezistence k *V. inaequalis*. SNaPshot umožňuje analýzu více SNP markerů najednou v jedné reakci a v budoucnu může být tento systém ještě rozšířen o další šlechtitelsky zajímavé SNP markery. Popsané metody zajišťují přesnou charakterizaci genů rezistence *Rvi2*, *Rvi4* a *Rvi6* u jabloní a jsou vhodné k využití při MAS využívané v šlechtitelských procesech.

5 POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY

Metodika je určena především šlechtitelům jabloní, kteří využívají molekulárně-genetické metody v procesu šlechtění, protože ty jsou v současnosti nejučinnější metodou charakterizace jednotlivých genotypů. Jejich velkým přínosem je možnost uplatnění v raných fázích vývoje rostlin, kdy je možné vyselektovat genotypy perspektivně odolné k *V. inaequalis* již po několika týdnech růstu. Nezastupitelnou roli hraje molekulárními MAS zejména při pyrimidizaci genů rezistence. Pomocí genetických analýz je možné analyzovat kumulaci několika genů rezistence k *V. inaequalis* v jednom genotypu, což u fenotypového pozorování projevů po infekci patogenem je jen velmi obtížně proveditelné, proto je tato metodika účinným nástrojem pro zefektivnění šlechtitelského procesu. Další výhodou MAS oproti testování rostlin inokulací je možnost zjištění homozygotního/heterozygotního výskytu jednotlivých alel rezistence. Metodika může být zajímavá i pro výzkumné laboratoře, které nabídnou vyvinuté metody šlechtitelům formou služby, nebo pro výzkumné ústavy či univerzity, které se zabývají kromě šlechtění jabloní i další analýzou genů rezistence v jabloních.

6 EKONOMICKÉ ASPEKTY

Využití molekulárně-genetických markerů rezistence k *V. inaequalis* vede k přesné charakterizaci genových zdrojů rezistence jabloní, což přispívá ke zvýšení efektivity šlechtitelského procesu. Zvláště u MAS, kde jsou genotypy, které nenesou požadovaný znak, vyloučeny již ve stádiu semenáčků, dochází k úsporám prostoru, který je potřeba pro pěstování vzorků, úsporám času a jiných prostředků, které jsou potřeba na obhospodařování daných stromků, a tedy k úsporám také finančním. Uvádí se, že je MAS u jabloní nákladově efektivní, pokud je během selekce ve skleníku eliminováno alespoň 11,93 % semenáčků (parametry analýzy viz Wannemuehler et al., 2019), při dominantním typu dědičnosti genů rezistence uvedených v této metodice tak stačí selektovat při MAS na přítomnost jednoho markeru. Teoreticky při křížení senzitivní odrůdy s rezistentní odrůdou s 1 alelou rezistence bude možné odstranit již ve skleníku 50 % potomstva bez požadovaného znaku. V případě pyramidizace více genů rezistence bude procento eliminovaného materiálu ještě vyšší. Odstraněním neperspektivních hybridů tak dochází k výraznému zefektivnění šlechtitelského procesu. Dalším přínosem je možnost identifikace šlechtitelsky velmi cenných genotypů se dvěma rezistentními alelami téhož genu, které v dalším křížení budou poskytovat 100 % rezistentního potomstva. Při použití těchto rezistentů v křížení pak MAS nebude nutné provádět, což přinese další ekonomické úspory.

Tato metodika uvádí několik různých metod pro detekci genů rezistence ke strupovitosti, které jsou aplikovatelné v molekulárně genetické laboratoři vybavené buď PCR cyklerem pro analýzu v reálném čase, nebo kapilárním genetickým analyzátozem. Alespoň jeden z přístrojů je již v dnešní době poměrně standardním vybavením těchto laboratoří, popřípadě lze provedení těchto analýz zadat komerčním firmám.

Byla stanovena cena genotypizace jednoho SNP na jeden analyzovaný vzorek, a to pro reagentie, které jsou využívány v popsané metodice. Ceny zahrnují pouze náklady nezbytné pro pořízení všech reagentií bez DPH, nezahrnují spotřební materiál, režijní náklady ani samotnou práci zaměstnance laboratoře. Finančně výrazně nejvýhodnější metodou pro genotypizaci jednoho SNP na jeden analyzovaný vzorek je alelická diskriminace, kde se cena analýzy pohybuje na hodnotě cca 60 Kč, následuje metoda SNaPshot s cenou pod 500 Kč a nakonec sekvenování s cenou přibližně 650 Kč (vyčísleno pro reagentie popsané v metodice). Alelická diskriminace se tedy z finančního hlediska jeví jako nejvhodnější metoda pro genotypizaci, avšak metodu SNaPshot je jako jedinou z výše uvedených možné mnohonásobně multiplexovat, výrobcem kitu je uvedeno, že je možné sledovat až 10 SNP najednou. V případě, že v procesu šlechtění je sledováno vícero

znaků, je tato metoda určitě také dobře uplatnitelná, neboť bude rychlejší než postupná analýza několika alelických diskriminací. Analýzou několika markerů v jedné reakci se zároveň sníží nároky na využití PCR cyklieru pro analýzu v reálném čase. Taktéž výsledky analýz všech markerů jsou pro jeden vzorek při použití SNaPshot dostupné najednou, odpadá jejich slučování z několika analýz alelickou diskriminací, kdy může dojít k chybě. Sekvenování je z finančního hlediska využitelné spíše pro vědecké účely a není vhodné pro rutinně prováděnou selekci pomocí molekulárních markerů.

Zavedení metodiky do laboratorní praxe pak může vést k výnosům z detekce genů rezistence prováděné na zakázku, které by se odvíjely podle aktuálního zájmu ze strany zákazníků. Uživatelé by mohli eventuálně využívat předpřipravené sady primerů pro detekci genů rezistence poskytované za úplatu. Předpokládaná cena za ověřenou předmíchanou sadu primerů a sond včetně kontrolních DNA pro jednotlivé markery rezistence *Rvi2*, *Rvi4* a *Rvi6* vystačující pro analýzu 100 vzorků DNA by se mohla pohybovat kolem 7 000 Kč.

Tato metodika má sloužit ke zjednodušení šlechtění odrůd jabloně odolných vůči strupovitosti, dalším ekonomickým přínosem je tak nižší spotřeba pesticidů potřebných k obhospodařování sadu s těmito odrůdami. Díky tomu dochází i ke snížení ekologické zátěže pro životní prostředí a klesá riziko výskytu zdraví škodlivých reziduí pesticidů v potravním řetězci se všemi důsledky pro zdravotnický systém.

7 SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY

- Baumgartner, I. O., Kellerhals, M., Costa, F., et al. (2016). Development of SNP-based assays for disease resistance and fruit quality traits in apple (*Malus × domestica* Borkh.) and validation in breeding pilot studies. *Tree Genetics and Genomes* 12: 1–21.
- Bowen, J., Mesarich, C., Bus, V., Beresford, R., Plummer, K., et al. (2011). *Venturia inaequalis*: the causal agent of apple scab. *Molecular Plant Pathology* 12: 105–122.
- Bus, V. G. M., Rikkerink, E. H. A., Caffier, V., Durel, C.-E., Plummer, K. M. (2011). Revision of the nomenclature of the differential host-pathogen interactions of *Venturia inaequalis* and *Malus*. *Annual Review of Phytopathology* 49: 391–413.
- Caffier, V., Patocchi, A., Expert, P., et al. (2015). Virulence characterization of *Venturia inaequalis* reference isolates on the differential set of *Malus* hosts. *Plant Disease* 99: 370–375.
- Flor, H. H. (1971). Current status of the gene-for-gene concept. *Annual Review of Phytopathology* 9: 275–296.
- Goodwin, W. H., Alimat, S. (2017). Analysis of four PCR/SNaPshot multiplex assays analyzing 52 SNPforID markers. *Electrophoresis* 38(7): 1007–1015.
- Chagné, D., Vanderzande, S., Kirk, C., Profitt, N., Weskett, R., Gardiner, S. E., Peace, C. P., Volz, R. K., Bassil, N. V. (2019). Validation of SNP markers for fruit quality and disease resistance loci in apple (*Malus × domestica* Borkh.) using the OpenArray® platform. *Horticulture Research* 6, 30.
- Jansch M., Brogginini G. A. L., Weger J., Bus V. G. M., Gardiner S. E., Bassett H., Patocchi A. (2015). Identification of SNPs linked to eight apple disease resistance loci. *Molecular Breeding* 35(1): 1–21.
- Khajuria Y. P., Kaul S., Wani A. A., Dhar M. K. (2018). Genetics of resistance in apple against *Venturia inaequalis* (Wint.) Cke. *Tree Genetics & Genomes* 14(2): 1–20.
- Liebhart R., Koller B., Gianfranceschi L., Gessler C. (2003). Creating a saturated reference map for the apple (*Malus x domestica* Borkh.) genome. *Theoretical and Applied Genetics* 106(8): 1497–1508.
- Lichtner, F. J., Jurick, W. M., Ayer, K. M., Gaskins, V. L., Villani, S. M., Cox, K. D. (2020). A Genome Resource for Several North American *Venturia inaequalis* Isolates with Multiple Fungicide Resistance Phenotypes. *Phytopathology* 110: 544–546.
- Manktelow, D. W. L., Beresford, R. M., Batchelor, T. A., Walker, J. T. S. (1996). Use patterns and economics of fungicides for disease control in New Zealand apples. *Acta Horticulturae* 422: 187–192.
- Masny, S. (2017). Occurrence of *Venturia inaequalis* races in Poland able to overcome specific apple scab resistance genes. *European Journal of Plant Pathology* 147: 313–323.

- Parisi, L., Fouillet, V., Schouten, H. J., Groenwold, R., Laurens, F., Didelot, F., Evans, K., Fischer, C., Gennari, F., Kemp, H., Lateur, M., Patocchi, A., Thissen, J., Tsipouridis, C. (2004). Variability of the pathogenicity of *Venturia inaequalis* in Europe. *Acta Horticulturae* 663: 107–113.
- Patocchi, A., Wehrli, A., Dubuis, P. H., et al. (2020). Ten Years of VINQUEST: First Insight for Breeding New Apple Cultivars with Durable Apple Scab Resistance. *Plant Disease* 104(8): 2074–2081.
- Peil, A., Patocchi, A., Hanke, M.-V., Bus, V. G. M. (2018). Apple cultivar Regia possessing both *Rvi2* and *Rvi4* resistance genes is the source of a new race of *Venturia inaequalis*. *European Journal of Plant Pathology* 151: 533–539.
- Polat, Z., Bayraktar, H. (2021). Resistance of *Venturia inaequalis* to multiple fungicides in Turkish apple orchards. *Journal of Phytopathology* 169(6): 360–368.
- Soriano, J., Madduri, M., Schaart, J., van der Burgh, A., van Kaauwen, M. W., Tomic, L., Groenwold, R., Velasco, R., van de Weg, E., Schouten, H. (2014). Fine mapping of the gene *Rvi18* (V25) for broad-spectrum resistance to apple scab, and development of a linked SSR marker suitable for marker-assisted breeding. *Molecular Breeding* 34: 2021–2032.
- Tartarini, S., Gianfranceschi, L., Sansavini, S., Gessler, C. (1999). Development of reliable PCR markers for the selection of the *Vf* gene conferring scab resistance in apple. *Plant Breeding* 118: 183–186.
- Vávra, R., Žďárská, I., Kadlecová, V., Blažek, J., Vejl, P., Sedlák, P., Melounová, M. (2015). Selektce jabloní v rané vývojové fázi s využitím molekulárních markerů. Certifikovaná metodika, VŠÚO Holovousy s. r. o. 56 s.
- Vinatzer, B. A., Patocchi, A., Tartarini, S., Gianfranceschi, L., Sansavini, S., Gessler, C. (2004). Isolation of two microsatellite markers from BAC clones of the *Vf* scab resistance region and molecular characterization of scab-resistant accessions in *Malus* germplasm. *Plant Breeding* 123: 321–326.
- Velasco, R., Zharkikh, A., Affourtit, J., et al. (2010). The genome of the domesticated apple (*Malus × domestica* Borkh.). *Nature Genetics* 42: 833–839.
- Wannemuehler, S. D., Luby, J. J., Yue, C., Bedford, D. S., Gallardo, R. K., McCracken, V. A. (2019). A Cost–Benefit Analysis of DNA Informed Apple Breeding. *HortScience* 54(11): 1998–2004.
- Xu, Y. (2010). *Molecular plant breeding*. CAB International, Wallingford, Oxfordshire. 734 s.

8 SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE

- Čmejlová, J., Rejlová, M., Žďárská, I., Čmejla, R. (2021) Sada primerů a sond pro stanovení alel markeru rezistence *Rvi2* u jabloně domácí (*Malus × domestica* Borkh.). Užité vzor č. 35890.
- Žďárská, I., Rejlová, M., Podlipný, J., Vávra, R., Čmejlová, J. (2021) Uplatnění markery asistované selekce ve šlechtění jabloní. Úroda 12, roč. LXIX, vědecká příloha, s. 223–229.
- Žďárská, I., Čmejlová, J., Čmejla, R. (2021). Sada primerů a sond pro stanovení alel markeru genu rezistence *Rvi6* u jabloně domácí (*Malus x domestica* Borkh.). Užité vzor č. 35603.
- Žďárská, I., Čmejla, R., Podlipný, J., Čmejlová, J. (2022) Sada primerů a sond pro stanovení alel SNP markeru asociovaného s genem rezistence *Rvi4* u jabloně domácí (*Malus × domestica* Borkh.). Užité vzor č. 35780.
- Podlipný, J. (2021) Inovace detekce genů rezistence ke strupovitosti jabloně a jejich pyramidizace pomocí molekulárních markerů. Diplomová práce, Univerzita Hradec Králové, Přírodovědecká fakulta. 59 s.

9 PŘÍLOHY

Příloha 1. Seznam analyzovaných odrůd a potvrzení jejich náchylnosti, případně rezistence podle přítomnosti jednotlivých genů rezistence. Pro každý gen rezistence je v prvním sloupci zaznamenán výskyt nukleotidu pro daný SNP marker v obou alelách zjištěný pomocí sekvenování a ve druhém sloupci je zaznamenán genotyp jednotlivých odrůd zjištěný metodou alelické diskriminace pomocí real-time PCR (Sens – senzitivní alela; Res – rezistentní alela). Výsledky obou metod jsou ve vzájemné shodě a odpovídají dlouhodobě pozorovaným fenotypovým projevům/údajům v literatuře. Pro analýzu byly vybrány pouze diploidní odrůdy jabloně.

Odrůda	<i>Rvi2</i>		<i>Rvi4</i>		<i>Rvi6</i>	
	SNP W242	Genotyp <i>Rvi2</i>	SNP K146	Genotyp <i>Rvi4</i>	SNP R156	Genotyp <i>Rvi6</i>
Akane	T/T	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens
Aneta	T/T	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens	A/G	Res/Sens
Antonovka	T/T	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens
Ariane	T/T	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens	A/G	Res/Sens
Ariwa	T/T	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens	A/G	Res/Sens
Aurora	T/T	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens
Banánové zimní	T/T	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens
Baujade	T/T	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens	A/G	Res/Sens
Baya Marisa	T/T	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens
Benet	T/T	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens
Best Ever	T/T	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens
Biogolden	T/T	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens	A/G	Res/Sens
Bláhovo Pozděkvěté	-	-	G/G	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens
Blaník	T/T	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens	A/G	Res/Sens
Britemac	T/T	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens
Burgundy	T/T	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens

Odrůda	Rvi2		Rvi4		Rvi6	
	SNP W242	Genotyp Rvi2	SNP K146	Genotyp Rvi4	SNP R156	Genotyp Rvi6
Cactus	T/T	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens	A/G	Res/Sens
Cameo Caudle	T/T	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens
Camuzat	T/T	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens	-	-
Cardinal	T/T	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens
Carola	T/T	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens
Clear Heart	T/T	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens
Clivia	T/T	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens
Cox Orange Pippin	T/T	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens
Crimson Gold	T/T	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens
Český Granát	T/T	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens
Čistické Lahůdkové	T/T	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens
Dakota	T/T	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens
Dark Topaz	T/T	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens	A/G	Res/Sens
Delor	T/T	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens
Democrat	T/T	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens
Diadém	T/T	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens
Diamant	T/T	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens
Discovery	T/T	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens
Dukát	T/T	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens
Elstar	T/T	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens
Empire	T/T	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens
Fantasie	T/T	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens
Fiesta	T/T	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens
Flordika	T/T	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens	A/G	Res/Sens
Florina	T/T	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens	A/G	Res/Sens

Odrůda	Rvi2		Rvi4		Rvi6	
	SNP W242	Genotyp Rvi2	SNP K146	Genotyp Rvi4	SNP R156	Genotyp Rvi6
Gala Schniga	T/T	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens
Gloster	T/T	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens
Gold Bohemia	T/T	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens
Golida	T/T	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens	A/G	Res/Sens
Granny Smith	-	-	G/G	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens
Heliodar	T/T	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens	A/G	Res/Sens
Idared	T/T	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens
James Grieve	T/T	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens
Jerseymac	T/T	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens
Jolana	T/T	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens	A/G	Res/Sens
Juno	T/T	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens
Karmína	T/T	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens	A/G	Res/Sens
Katka	T/T	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens	A/G	Res/Sens
Krasokvět Kitajka	T/T	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens
Krasokvět žlutý	T/T	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens
Liberty	T/T	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens	A/G	Res/Sens
Limburské	T/T	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens
Lipno	T/T	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens	A/G	Res/Sens
Lobo	T/T	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens
Lord Lambourne	T/T	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens
Lotos	T/T	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens	A/G	Res/Sens
Luna	T/T	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens	A/G	Res/Sens
Megumi	T/T	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens
Melodie	T/T	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens	A/G	Res/Sens
Melrose	T/T	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens

Odrůda	Rvi2		Rvi4		Rvi6	
	SNP W242	Genotyp Rvi2	SNP K146	Genotyp Rvi4	SNP R156	Genotyp Rvi6
Meteor	T/T	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens
Nikoleta	T/T	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens
Ontario	T/T	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens
Otawa 341	T/T	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens
Petra	T/T	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens	A/G	Res/Sens
Pinova	T/T	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens
Prima	T/T	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens	A/G	Res/Sens
Primadela	T/T	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens	A/G	Res/Sens
Priscilla	T/T	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens	A/G	Res/Sens
Produkta	T/T	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens
Rajka	T/T	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens	A/G	Res/Sens
Realka	A/T	Res/Sens	T/G	Res/Sens	G/G	Sens/Sens
Reanda	T/T	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens	A/G	Res/Sens
Red Cap	T/T	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens
Red Topaz	T/T	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens	A/G	Res/Sens
Red van Buren	T/T	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens
Regia	A/T	Res/Sens	T/G	Res/Sens	G/G	Sens/Sens
Reglindis	T/T	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens	A/G	Res/Sens
Resista	T/T	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens	A/G	Res/Sens
Retina	T/T	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens	A/G	Res/Sens
Rewena	T/T	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens	A/G	Res/Sens
Rome Beauty	T/T	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens
Rosana	T/T	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens	A/G	Res/Sens
Rozela	T/T	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens	A/G	Res/Sens
Rubín	T/T	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens

Odrůda	<i>Rvi2</i>		<i>Rvi4</i>		<i>Rvi6</i>	
	SNP W242	Genotyp <i>Rvi2</i>	SNP K146	Genotyp <i>Rvi4</i>	SNP R156	Genotyp <i>Rvi6</i>
Shalimar	T/T	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens	A/G	Res/Sens
Sirius	T/T	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens	A/G	Res/Sens
Slendera	T/T	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens	A/G	Res/Sens
Sonet	T/T	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens	A/G	Res/Sens
Spalord	T/T	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens
Starkresa	T/T	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens	A/G	Res/Sens
Starkrimson	T/T	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens
Sungold	T/T	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens
Šampion	T/T	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens
Tábor	T/T	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens	A/G	Res/Sens
Vltava	T/T	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens
Wealthy	T/T	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens
Wolfriver	T/T	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens
Wondernot	T/T	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens
Yarlington	T/T	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens
Zabergau	T/T	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens
Zarja Altau	T/T	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens
Zita	T/T	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens
Zuzana	T/T	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens
Zvonkové	T/T	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens	G/G	Sens/Sens

Příloha 2. Projevy infekce patogenem *Venturia inaequalis*.



Plod a listy napadené patogenem *V. inaequalis*.



Silné napadení plodu patogenem *V. inaequalis*.



První symptomy napadení patogenem *V. inaequalis* po primárních infekcích na listech stromů ve výsadbě.



Listy semenáčků napadené patogenem *V. inaequalis* po umělé infekci značí vysokou náchylnost.



v y d á v á

OSVĚDČENÍ

UKZUZ 093233/2022

o uznání metodiky v souladu s podmínkami Metodiky hodnocení výzkumných organizací a programů účelové podpory výzkumu, vývoje a inovací, schválené usnesením vlády dne 8. února 2017, číslo 107 a její samostatné přílohy č. 4 schválené usnesením vlády dne 29. listopadu 2017 č. 837.

Název metodiky: **Metodika detekce genů rezistence *Rvi2*, *Rvi4* a *Rvi6* k *Venturia inaequalis* a jejich pyramidizace pro zavedení selekce jableň asistované molekulární markery**

Autor/autoři: **Ing. Ivona Žďárská; Ing. Martina Rejlová; Mgr. Josef Podlípny;
Ing. Kamila Pluhařová; RNDr. Jana Čmejlová, Ph.D.;
Ing. Radek Vávra, Ph.D.**

Název organizace/cí: **Výzkumný a šlechtitelský ústav ovocnářský Holovousy s.r.o.**

Místo vydání: **Holovousy**
Rok vydání: **2022**

Metodika byla vypracovaná v rámci výzkumného projektu/podpory na rozvoj výzkumné organizace TAČR TJ04000389 – Inovace detekce genů rezistence ke strupovitosti jableň a jejich pyramidizace pomocí molekulárních markerů.

Brno 27. 5. 2022

Ing. Daniel Jurečka
ředitel ústavu

.....
Podpis/elektronický podpis
zástupce odborného útvaru státní správy

Souhlas ředitele Odboru vědy, výzkumu a vzdělávání MZe:

V dne

Mgr. Jan Radoš

Digitální podpis:
07.06.2022 18:13

.....
Podpis/elektronický podpis
ředitele/ředitelky Odboru vědy, výzkumu
a vzdělávání

**Metodika detekce genů rezistence *Rvi2*, *Rvi4* a *Rvi6* k *Venturia inaequalis*
a jejich pyramidizace pro zavedení selekce jabloní asistované molekulárními
markery**

Ivona Žďárská a kol.

Vydal:

VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOCNÁŘSKÝ HOLOVOUSY, s. r. o.

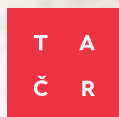
Grafická úprava, sazba a tisk:

ŽAKET – KARTOGRAFICKÉ VYDAVATELSTVÍ A TISKÁRNA

ISBN 978-80-87030-85-1



ISBN 978-80-87030-85-1



VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOCNÁŘSKÝ HOLOVOUSY, s.r.o.

© 2022