

UŽITNÝ VZOR

(11) Číslo dokumentu:

35 780

(13) Druh dokumentu: **U1**

(51) Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2018.01)
C12Q 1/686 (2018.01)
C12Q 1/6876 (2018.01)
C12N 15/11 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2021-39431**
(22) Přihlášeno: **03.12.2021**
(47) Zapsáno: **08.02.2022**

(73) Majitel:
VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV
OVOCNÁŘSKÝ HOLOVOUSY s.r.o., Holovousy,
CZ

(72) Původce:
Ing. Ivona Žďárská, Mžany, CZ
RNDr. Radek Čmejla, Ph.D., Vitiněves, CZ
Mgr. Josef Podlipný, Býšť, CZ
RNDr. Jana Čmejlová, Ph.D., Vitiněves, CZ

(54) Název užitého vzoru:
**Sada prumerů a sond pro stanovení alel SNP
markeru asociovaného s genem rezistence
Rvi4 u jabloně domácí (Malus × domestica
Borkh.)**

Sada primerů a sond pro stanovení alel SNP markeru asociovaného s genem rezistence *Rvi4* u jabloně domácí (*Malus × domestica* Borkh.)

5 Oblast techniky

Řešení se týká sady primerů a sond navržených pro detekci rezistence u jabloně domácí (*Malus × domestica* Borkh.) k patogenu *Venturia inaequalis* (Cooke) G. Winter, konkrétně pro detekci alel markeru genu rezistence *Rvi4*, kdy tato sada umožňuje současně detekovat senzitivní
10 alelu i rezistentní alelu tohoto genu. Alely jsou detekovány pomocí markeru typu jednonukleotidového polymorfismu (SNP) K146, který je v asociaci s genem rezistence *Rvi4*. Uvedená sada je vhodná pro molekulárními markery asistovanou selekci genotypů jabloní s potenciální rezistencí ke strupovitosti metodou alelické diskriminace pomocí PCR v reálném čase.

15

Dosavadní stav techniky

Venturia inaequalis (Cooke) G. Winter je houbový patogen způsobující hospodářsky
20 nejvýznamnější onemocnění jabloní, kterým je strupovitost. Mezi symptomy onemocnění, objevující se zejména na listech a plodech, patří tmavé vystouplé skvrny. V místě vzniku skvrn často dochází k nekrotickým, což může následně vést až k opadu napadených listů a praskání plodů, čímž vzniká vstup pro druhotné infekce (Kocourek et al., 2015). Napadené ovoce je neprodejné, výnosnost může u neošetřených sadů klesnout o 40 až 80 %. Napadení tímto patogenem lze
25 eliminovat včasnými opakovanými postřiky fungicidy. Jejich použití se však negativně projevuje na životním prostředí, navíc mohou tyto chemické látky, s obvykle negativním důsledkem na lidské zdraví, zůstat ve formě reziduí v plodech určených pro konzumaci či zpracování. Šlechtění odrůd rezistentních vůči tomuto patogenu je proto v popředí šlechtitelských programů mnoha zemí světa, jelikož kombinace použití rezistentních či odolných odrůd jabloní s technologickými opatřeními
30 v sadech umožňuje velmi významné snížení spotřeby fungicidů k regulaci tohoto patogenu.

V posledních dvou desetiletích bylo identifikováno více než 20 různých genů rezistence vůči
V. inaequalis (geny *Rvi*, Bus et al. 2011; Soriano et al. 2014; Patocchi et al., 2020). Geny rezistence jsou pro šlechtění k dispozici u planých jabloní, ze kterých tyto geny často pocházejí, nebo ve
35 formě již komerčně úspěšných rezistentních odrůd vzniklých několikanásobným křížením potomků rezistentní plané jabloně s komerčně úspěšnými odrůdami. Na různých místech světa však byly identifikovány virulentní izoláty patogenu *V. inaequalis* schopné s různou četností překonat jednotlivé geny rezistence. Geny rezistence, které byly překonávány s vyšší frekvencí, je již nyní možné použít k dosažení trvalé rezistence pouze v kombinaci, ideálně s geny
40 překonávanými pouze velmi zřídka nebo dosud nepřekonanými. Gen *Rvi4* byl původně identifikován v genomu semenáče *Malus pumila* R12740-7A. Tento gen byl dosud překonán pouze jedním izolátem *V. inaequalis* 1797-9 (Khajuria, 2018).

Strategie šlechtění jabloní pro rezistenci vůči strupovitosti je tudíž zaměřena na kumulaci genů
45 rezistence, kdy je rezistence podmíněna dvěma nebo více různými geny. V dřívějších dobách probíhalo hodnocení rezistence vůči strupovitosti na úrovni fenotypu, a to inokulací patogenu na rostlinu a sledováním příznaků infekce. Tento test však není zcela spolehlivý a neumožňuje stanovit ani typ genu rezistence, ani homozygotní či heterozygotní výskyt příslušné rezistentní alely, což je velmi důležitý parametr z hlediska dalšího šlechtění. Není vhodný ani pro testování
50 kumulace genů *Rvi*, v tomto případě by bylo nutné použití více izolátů tohoto patogenu schopných překonat pouze jednotlivé použité *Rvi* geny, i tyto izoláty však mohou být geneticky nestabilní a prolomit rezistenci.

Pro průkaz přenosu genů rezistence vůči *V. inaequalis* jsou proto vyvíjeny mnohem průkaznější
55 a informativnější molekulární genetické markery, které by umožnily jednoduchou a spolehlivou

selekcí rezistentních jabloní (marker assisted selection, MAS). MAS umožňuje detekci sledovaných alel již v rané fázi vývoje rostlin (Liebhard et al., 2003) a neperspektivní hybridní potomstvo je možné odstranit bez náročného pěstování a testování již v prvním roce po vysetí, což přináší nemalé finanční úspory. První publikace týkající se molekulárních markerů lokusů *Rvi* byly zveřejněny již na konci minulého tisíciletí, většinou se jednalo o různé spolehlivé markery typu SCAR a SSR (např. Tartarini et al. 1999, Vinatzer et al. 2004 a další). V následujících letech byly publikovány spolehlivější markery typu jednonukleotidových polymorfismů (SNP), které jsou výhodnější pro MAS z důvodu snazší analyzovatelnosti více markerů v jediné reakci. Dosud však byly identifikovány a nezávisle validovány markery pouze pro některé *Rvi* geny, např. *Rvi2*, *Rvi4* a *Rvi6* (Chagné et al., 2019).

Prvotní SSR a SCAR markery byly využívány pro detekci genu *Rvi4* prostřednictvím PCR a následné gelové elektroforózy (Karapetsi et al., 2020), popřípadě byl tento gen také detekován v multiplexní PCR následované fragmentační analýzou pomocí fluorescenčně značeného primeru pro amplifikaci příslušného SSR (Kellerhals et al., 2011). V současnosti se přechází k analýze SNP markerů, pro *Rvi4* byl jako jediný identifikován a nezávisle validován marker K146 (Jänsch et al. 2015; Chagné et al. 2019). Po identifikaci tohoto SNP sekvenováním (Jänsch et al. 2015) byla pro jeho genotypizaci nejprve využita metoda KASPTM (kompetitive allele specific PCR) (Baumgartner et al., 2016). Ta spočívá v použití jednoho univerzálního reverse primeru a dvou různých forward primerů specifických pro konkrétní alelu, které nesou na svém 5' – konci unikátní sekvenci odpovídající jedné ze dvou univerzálních FRET (fluorescence resonant energy transfer) kazet. Dále byla genotypizace tohoto SNP prováděna pomocí metody OpenArray® screens firmy Thermo Fisher Scientific (Chagné et al., 2019).

Dosavadní metody používané pro analýzu markerů asociovaných s *Rvi4* však mají řadu nevýhod. U metod využívajících SSR a SCAR markery je obtížné zpracování velkého množství řádově několika set až tisíců vzorků, problémem je i vyšší cena metod. Totéž platí pro metody využívající sekvenování. 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 jako alelická diskriminace, u které mohou být primery a sondy upravovány, popřípadě objednávány jednotlivě a u různých firem. Zároveň je možné pro alelickou diskriminaci použít více barev pro případné multiplexování několika analýz do jedné reakce, KASPTM analýza byla vyvinuta pouze pro analýzu jednoho SNP/reakci. Zároveň může mít alelická diskriminace vyšší specifitu, jelikož spočívá ve využití tří konkrétních sekvencí (oblast nasedání forward primeru, oblast nasedání reverse primeru a oblast nasedání sond).

Oproti tomu KASPTM využívá pouze dvě specifické sekvence (oblast nasedání forward primerů a oblast nasedání reverse primeru), což se může v případě jabloní s jejich z velké části duplikovaným genomem ukázat jako problematické. Metoda OpenArray® screens firmy Thermo Fisher Scientific je vhodná především pro analýzu velkého počtu SNP a pro vědecké účely, nikoliv pro rutinní testování semenáčků při MAS. Navíc je nezbytné pořízení finančně náročného přístrojového vybavení a zároveň zpracování výsledků vyžaduje vysoce kvalifikovaný personál.

Proto byla pro detekci validovaného markeru asociovaného s *Rvi4* vyvinuta níže uvedená metoda, kterou lze použít v každé laboratoři vybavené v dnešní době běžnými laboratorními přístroji. Tato metoda je velmi levná, rychlá a proveditelná na velkém počtu vzorků.

Podstata technického řešení

Výše popsané nedostatky dosavadního stavu techniky odstraňuje sada primerů a sond pro PCR detekci SNP markeru K146 rozlišujícího senzitivní a rezistentní alelu genu rezistence *Rvi4* u jabloně domácí (*Malus × domestica* Borkh.) podle technického řešení, jehož podstata spočívá v tom, že obsahuje primery a značené hybridizační sondy, jejichž sekvence jsou:

Forward primer: ACAAAGAAGGGGAATGTTGACT (SEQ ID NO. 1)
 Reverse primer: AAGATAAGACCAGTCGCAATAGG (SEQ ID NO. 2)
 Sonda 1: TTGCGAGTGTTTAGATGCAG (SEQ ID NO. 3)
 Sonda 2: TTGCTAGTGTTTAGATGCAG (SEQ ID NO. 4),

5

kde jsou hybridizační sondy vhodně označeny pro současnou detekci jednotlivých alel v průběhu PCR reakce, přičemž pro PCR detekci senzitivní alely SNP markeru K146 genu rezistence *Rvi4* obsahuje sada primery a značenou hybridizační sondu, jejichž sekvence jsou:

10 Forward primer: ACAAAGAAGGGGAATGTTGACT (SEQ ID NO. 1)
 Reverse primer: AAGATAAGACCAGTCGCAATAGG (SEQ ID NO. 2)
 Sonda 1: TTGCGAGTGTTTAGATGCAG (SEQ ID NO. 3),

15 a pro PCR detekci rezistentní alely SNP markeru K146 genu rezistence *Rvi4* obsahuje sada primery a značenou hybridizační sondu, jejichž sekvence jsou:

Forward primer: ACAAAGAAGGGGAATGTTGACT (SEQ ID NO. 1)
 Reverse primer: AAGATAAGACCAGTCGCAATAGG (SEQ ID NO. 2)
 Sonda 2: TTGCTAGTGTTTAGATGCAG (SEQ ID NO. 4).

20

Navržené primery a sondy se nacházejí v oblasti FBSn*Rvi4*-1 (Jänsch et al. 2015). Pomocí nárokovaných primerů a hybridizačních sond je možné v uvedené oblasti detekovat validovaný diagnostický SNP marker nazvaný K146 (G/T) (Jänsch et al. 2015 – identifikace; Chagné et al. 2019 – validace), který je v asociaci s genem rezistence *Rvi4*, a na základě této jednobodové mutace odlišit senzitivní a rezistentní alelu, přičemž nukleotid G je určující pro senzitivní alelu a nukleotid T je určující pro rezistentní alelu. Vzhledem k těsné vazbě mezi *Rvi4* a K146, kde udávaná vzdálenost je 0 cM (Jänsch et al. 2015), mohou být v této přihlášce termíny „senzitivní a rezistentní alela (SNP) markeru genu rezistence *Rvi4*“ a „senzitivní a rezistentní alela genu rezistence *Rvi4*“ používány jako synonyma, SNP markerem genu rezistence *Rvi4* je v celé přihlášce míněn zde specifikovaný SNP K146, pokud není konkrétně uvedeno jinak.

30

Výše uvedený primer SEQ ID NO. 1 se částečně překrývá s primerem z Baumgartner et al., 2016 (12 z 22 nukleotidů je shodných). Příslušný překryv obou primerů je však koincidencí, protože tato genomická oblast je velmi výhodná pro návrh primerů pro amplifikaci daného úseku obsahujícího diagnostický SNP K146, neboť neobsahovala u mnoha námi analyzovaných odrůd další polymorfismy. Primer SEQ ID NO. 1 byl navržen tak, aby došlo k optimální amplifikaci daného úseku v kontextu celého *Rvi4* detekčního systému metodou alelické diskriminace pomocí real-time PCR, o které se Baumgartner et al. nezmiňují. Navíc je primer SEQ ID NO. 1 použit v kombinaci s jiným reverzním primerem (SEQ ID NO. 2), který je zcela nově navržen. V dosavadním stavu techniky se sondy pro PCR v reálném čase nepoužívaly.

40

Nárokovaná kombinace primerů pro amplifikaci jednotlivých alel markeru genu rezistence *Rvi4* je vhodná pro současnou nebo individuální detekci výše uvedených alel u jabloně domácí (*Malus × domestica* Borkh.). Ve výhodném provedení technického řešení jsou PCR amplikony obou příslušných alel detekovány v přítomnosti značených sond metodou alelické diskriminace pomocí PCR v reálném čase. Ve výhodném provedení technického řešení jsou hybridizační sondy pro detekci jednotlivých alel značeny fluorescenčně, a ještě výhodněji pomocí odlišných fluoroforů pro jednotlivé alely, což umožňuje jejich současnou detekci v jedné PCR reakci.

45

50 Prvním krokem pro stanovení alel markeru genu rezistence *Rvi4* jabloně domácí (*Malus × domestica* Borkh.) je izolace genomové DNA, následuje PCR v reálném čase s využitím sady primerů a sond pro specifickou amplifikaci výše uvedených alel. Finálním krokem je vyhodnocení přítomnosti jednotlivých alel na základě analýzy fluorescenčního signálu.

Příklady provedení technického řešení jsou zde uvedeny pouze pro ilustraci a žádným způsobem neomezuji rozsah této přihlášky, která je vymezena připojeným nárokem a podrobně popsána v popisu technického řešení. Odborník v oboru bude schopen učinit různé modifikace použitého způsobu PCR, uvedených primerů a sond, včetně jejich fluorescenčního značení, aby nedošlo ke snížení specifity PCR detekce jednotlivých alel markeru genu rezistence *Rvi4*.

Objasnění výkresů

Obr. 1: Sekvence (odvozeno od sekvence KM105043, GeneBank) amplifikovaného úseku SNP markeru genu rezistence *Rvi4* a místa nasedání primerů a sond na ni. Vyznačené sekvence reprezentují místa nasedání primerů, respektive sond s uvedením jejich SEQ ID NO. (SEQ ID NO. 2 je v reverzní orientaci). A) uvádí sekvenci senzitivní alely SNP markeru *Rvi4*, B) zachycuje sekvenci rezistentní alely SNP markeru tohoto genu. Příslušný SNP polymorfismus je označen jako SNP K146.

Obr. 2: Příklad analýzy genu rezistence *Rvi4* metodou alelické diskriminace pomocí PCR v reálném čase. Křivky bez kroužků – 6-FAM fluorescence (Sonda 1; SEQ ID NO. 3) – detekce senzitivní alely; křivky s kroužky – HEX fluorescence (Sonda 2; SEQ ID NO. 4) – detekce rezistentní alely. A) detekce heterozygota nesoucího rezistentní i senzitivní alelu u vybraného genotypu jabloně; B) detekce homozygota nesoucího dvě senzitivní alely u vybraného genotypu jabloně a C) detekce homozygota nesoucího dvě rezistentní alely u vybraného genotypu jabloně.

Příklady uskutečnění technického řešení

Příklad 1: Návrh sekvencí primerů a sond pro detekci SNP markeru K146 pro gen Rvi4

Na základě známé sekvence oblasti SNP markeru K146 pro gen *Rvi4* (FBsn*Rvi4*-1; GeneBank, KM105043) byla nejprve provedena analýza této oblasti u 100 různých rezistentních a senzitivních odrůd jabloně z důvodu identifikace dalších možných polymorfismů v této oblasti. Následně byly vybrány vhodné úseky pro navržení primerů a sond, aby nemusela být provedena jejich degenerace potenciálně snižující účinnost celého systému. Návrh sekvencí primerů a sond byl proveden pomocí softwarů Vector NTI Advance (ThermoFisher Scientific) a Geneious Prime (Biomatters Ltd.).

Při navrhování primerů a sond pro analýzu pomocí PCR v reálném čase byly zohledněny následující požadavky: 1) co nejvyšší specifita primerů eliminující necílené amplifikace z důvodu parciální duplikace genomu jabloně; 2) obdobná teplota tání obou primerů a k tomu přiměřená teplota tání sond; 3) eliminace tvorby dimerů mezi jednotlivými komponentami systému; 4) zcela diskriminující sondy pro jednoznačné odlišení senzitivní a rezistentní alely.

Byly vybrány následující primery a hybridizační sondy:

Forward primer: ACAAGAAGGGGAATGTTGACT (SEQ ID NO. 1)
Reverse primer: AAGATAAGACCAGTCGCAATAGG (SEQ ID NO. 2)
Sonda 1: TTGCGAGTGTTTAGATGCAG (SEQ ID NO. 3) - pro senzitivní alelu *Rvi4*
Sonda 2: TTGCTAGTGTTTAGATGCAG (SEQ ID NO. 4) - pro rezistentní alelu *Rvi4*.

Nasedání primerů a sond je uvedeno na Obrázku 1.

Příklad 2: Detekce senzitivní alely a rezistentní alely SNP markeru K146 genu rezistence Rvi4 u jabloně domácí metodou alelické diskriminace pomocí PCR v reálném čase

Pro detekci přítomnosti senzitivní alely a rezistentní alely markeru K146 genu rezistence *Rvi4* u různých odrůd jabloně domácí byla z listů izolována celková DNA pomocí soupravy Exgene Plant SV mini (GeneAll Biotechnology) dle návodu výrobce. Připravená DNA (2 µl) byla použita jako templát pro PCR reakci v objemu 20 µl s následujícími reakčními komponentami (uvedeny výsledné koncentrace): 1x qPCR Blue Master Mix (Top-Bio); 250 nmol/l Forward primer, 250 nmol/l Reverse primer, 250 nmol/l Sonda 1, 250 nmol/l Sonda 2, reakce byla doplněna do 20 µl vodou. PCR amplifikace probíhala v Rotor-Gene Q (Qiagen) real-time PCR cyklu s následujícím teplotním profilem: úvodní denaturace 94 °C/5 minut; amplifikace v 50 cyklech: 50x (94 °C/20 s, 58 °C/20 s, 72 °C/30 s). Pro PCR detekci senzitivní alely markeru genu rezistence *Rvi4* u jabloně se v reakci použily následující primery a sonda, jejichž sekvence jsou:

Forward primer: ACAAAGAAGGGGAATGTTGACT (SEQ ID NO. 1)
 Reverse primer: AAGATAAGACCAGTCGCAATAGG (SEQ ID NO. 2)
 Sonda 1: TTGCGAGTGTTTAGATGCAG (SEQ ID NO. 3),

kde byla Sonda 1 fluorescenčně značena 6-FAM fluoroforem, a pro PCR detekci rezistentní alely markeru genu rezistence *Rvi4* u jabloně se v reakci použily následující primery a sonda, jejichž sekvence jsou:

Forward primer: ACAAAGAAGGGGAATGTTGACT (SEQ ID NO. 1)
 Reverse primer: AAGATAAGACCAGTCGCAATAGG (SEQ ID NO. 2)
 Sonda 2: TTGCTAGTGTTTAGATGCAG (SEQ ID NO. 4),

kde byla Sonda 2 fluorescenčně značena HEX fluoroforem. Výsledky byly analyzovány pomocí Rotor-Gene Q Series 1.5 Software, typický výstup je ukázán na Obrázku 2.

Průmyslová využitelnost

Navržená sada primerů a sond pro PCR detekci rezistence jabloně domácí (*Malus × domestica* Borkh.) k patogenu *Venturia inaequalis* (Cooke) G. Winter, původci strupovitosti, konkrétně pro detekci přítomnosti jednotlivých alel markeru K146 genu rezistence *Rvi4*, je využitelná pro molekulárními markery asistovanou selekci jabloní křížených za účelem cílené introdukce tohoto genu do potomstva. Sada je využitelná pro detekci rezistence ke strupovitosti již ve stádiu několikátýdenních semenáčů. Takto raná selekce přináší nemalé finanční úspory, protože šetří práci, materiál i prostory nezbytné pro pěstování semenáčů vzniklých z těchto křížení. Konkrétně jsou detekovány senzitivní a rezistentní alela markeru genu rezistence *Rvi4*. Ve výhodném provedení probíhá detekce obou alel v jediné reakci metodou alelické diskriminace pomocí PCR v reálném čase umožňující velmi rychlou analýzu velkého počtu vzorků. Zároveň tato sada umožňuje rozlišení heterozygotů od homozygotů nesoucích pouze rezistentní alely *Rvi4*, což je velkým přínosem pro šlechtitele, protože rezistentní homozygoté budou v dalším křížení poskytovat jedince nesoucí vždy alespoň jednu rezistentní alelu tohoto genu, což přinese další úspory při šlechtění následné generace rezistentních jabloní (všechny budou rezistentní). Dále je nárokována sada primerů a sond pro detekci *Rvi4* využitelná v kombinaci s obdobnými sadami pro detekci dalších genů rezistence vůči *V. inaequalis* pro testování kumulace příslušných genů rezistence, kterou v podstatě nelze detekovat jinak než analýzou molekulárních markerů. Šlechtění jabloní rezistentních vůči strupovitosti je moderním trendem tvorby nových odrůd této oblíbené ovocné plodiny, jelikož umožňuje snížení ekologické zátěže, ke které dochází při pěstování nerezistentních odrůd.

50

Reference

- 5 Baumgartner I. O., Kellerhals M., Costa F., Dondini L., Pagliarani G., Gregori R., Tartarini S.,
Leumann L., Laurens F., Patocchi A. (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 & Genomes*, 12(35): 1 – 21.
- 10 Bus V. G. M., Rikkerink E. H. A., van de Weg W. E., Rusholme R. L., Gardiner S. E., Bassett H.
C. M., Kodde L. P., Parisi L., Laurens F. N. D., Meulenbroek E. J., Plummer K. M. (2005): The
Vh2 and Vh4 scab resistance genes in two differential hosts derived from Russian apple R12740-
7A map to the same linkage group of apple. *Molecular Breeding*, 15(1): 103 – 116.
- 15 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(1): 1
– 16.
- 20 Jänsch 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.
- Karapetsi L., Naniou-Obeidat I., Zambounis A., Osathanunkul M., Madesis P. (2020): Molecular
screening of domestic apple cultivars for scab resistance genes in Greece. *Czech Journal of
Genetics and Plant Breeding*, 56(4): 165 – 169.
- 25 Kellerhals M., Franck L., Baumgartner I. O., Patocchi A., Frey J. E. (2011): Breeding for Fire
Blight Resistance in Apple. *Acta Horticulturae*, 896: 385 – 389.
- 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.
- 30 Kocourek F., Bagar M., Falta V., Harašta P., Holý K., Chroboková E., Kloutvorová J., Kůdela V.,
Lánský M., Náměstek J., Navrátil M., Ouředníčková J., Pluhař P., Psota V., Pultar O., Stará J.,
Suchá J., Sus J., Šafářová D., Špak J., Valentová L. (2015): *Integrovaná ochrana ovocných plodin*.
Profi Press s.r.o., Praha. 127 – 131. ISBN 978-80-86726-72-4.
- 35 Liebhard 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.
- 40 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.
- 45 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.
- 50 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.
- 55 Vávra R., Žďárská I., Kadlecová V., Blažek J., Vejl P., Sedlák P., Melounová M. (2015): *Selekce
jabloní v rané vývojové fázi s využitím molekulárních markerů. Výzkumný a šlechtitelský ústav
ovocnářský Holovousy s.r.o., Holovousy. 56 p. ISBN 978-80-87030-43-1.*

- 5 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.

NÁROK NA OCHRANU

1. Sada primerů a sond pro detekci senzitivní alely a rezistentní alely SNP markeru K146 genu rezistence *Rvi4* u jabloně domácí *Malus × domestica* Borkh. metodou alelické diskriminace pomocí PCR v reálném čase, **vyznačující se tím**, že obsahuje primery a značené hybridizační sondy, jejichž sekvence jsou:

Forward primer: ACAAAGAAGGGGAATGTTGACT (SEQ ID NO. 1)
 10 Reverse primer: AAGATAAGACCAGTCGCAATAGG (SEQ ID NO. 2)
 Sonda 1: TTGCGAGTGTTTAGATGCAG (SEQ ID NO. 3)
 Sonda 2: TTGCTAGTGTTTAGATGCAG (SEQ ID NO. 4),

15 kde hybridizační sondy jsou označeny pro jejich současnou detekci v průběhu PCR reakce, přičemž pro PCR detekci senzitivní alely SNP markeru K146 genu rezistence *Rvi4* obsahuje sada primery a značenou hybridizační sondu, jejichž sekvence jsou:

Forward primer: ACAAAGAAGGGGAATGTTGACT (SEQ ID NO. 1)
 Reverse primer: AAGATAAGACCAGTCGCAATAGG (SEQ ID NO. 2)
 20 Sonda 1: TTGCGAGTGTTTAGATGCAG (SEQ ID NO. 3),

a pro PCR detekci rezistentní alely SNP markeru K146 genu rezistence *Rvi4* obsahuje sada primery a značenou hybridizační sondu, jejichž sekvence jsou:

25 Forward primer: ACAAAGAAGGGGAATGTTGACT (SEQ ID NO. 1)
 Reverse primer: AAGATAAGACCAGTCGCAATAGG (SEQ ID NO. 2)
 Sonda 2: TTGCTAGTGTTTAGATGCAG (SEQ ID NO. 4).

30 2 výkresy

A)

Forward primer (SEQ ID NO. 1)

ACAAAGAAGGGGAATGTTGACTGGATTAAGTTTATGGATTACATATTTTGGATTCTATATTG

Sonda 1 (SEQ ID NO. 3)

GTKAACAGCTTGCGAGTGTTTAGATGCAGGTGTAACATTGATGAAATATAAGTGTATCTAA

SNP K146

Reverse primer (SEQ ID NO. 2)

AATTCATTTTGATTTTCAGACTCTCAAACCTTCTGCACCTATTGCGACTGGTCTTATCTT

B)

Forward primer (SEQ ID NO. 1)

ACAAAGAAGGGGAATGTTGACTGGATTAAGTTTATGGATTACATATTTTGGATTCTATATTG

Sonda 2 (SEQ ID NO. 4)

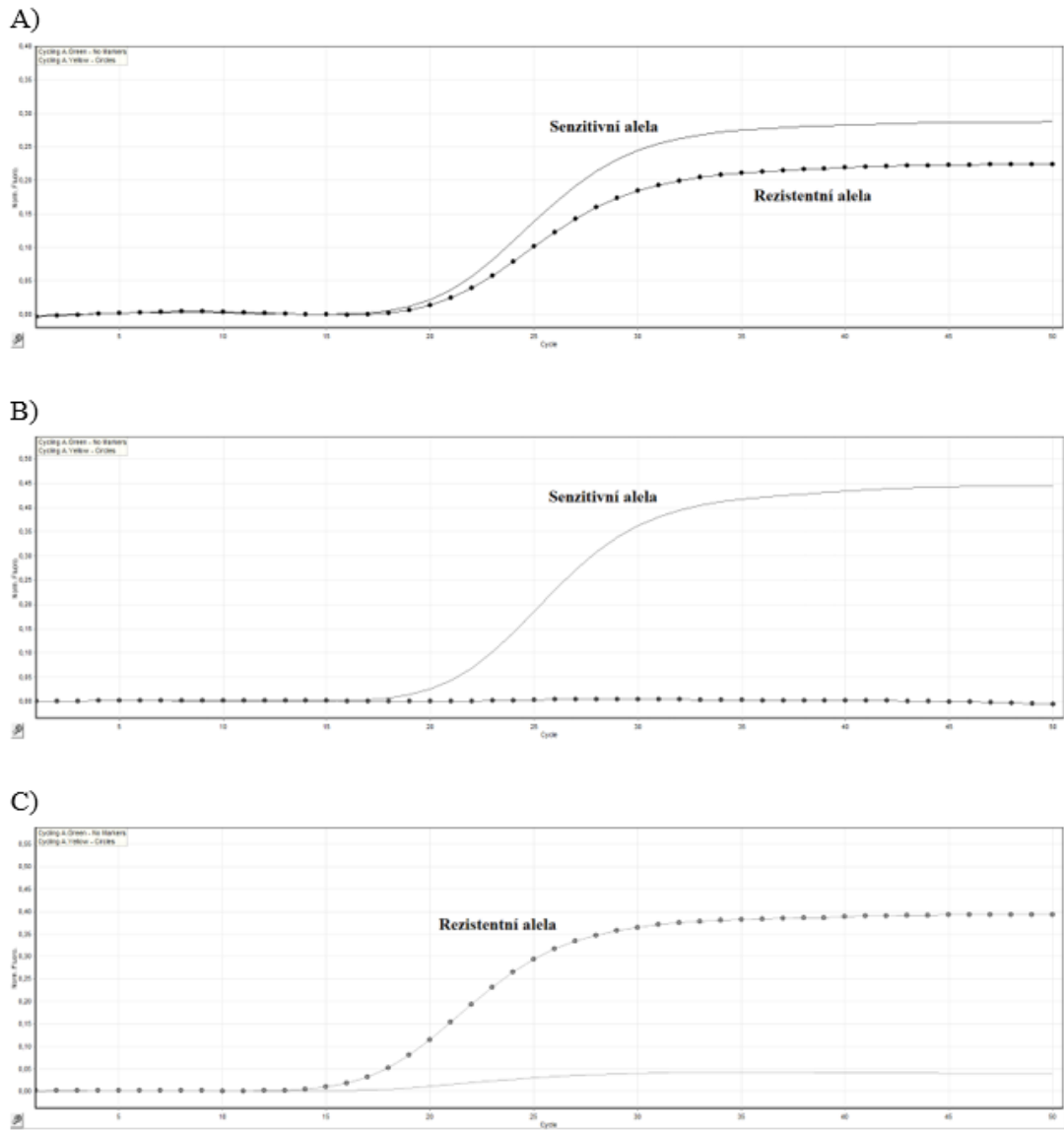
GTKAACAGCTTGCTAGTGTTTAGATGCAGGTGTAACATTGATGAAATATAAGTGTATCTAA

SNP K146

Reverse primer (SEQ ID NO. 2)

AATTCATTTTGATTTTCAGACTCTCAAACCTTCTGCACCTATTGCGACTGGTCTTATCTT

Obr. 1



Obr. 2