



ČESKÁ REPUBLIKA  
ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ



# OSVĚDČENÍ

## O ZÁPISU UŽITNÉHO VZORU

Josef Kratochvíl  
předseda  
Úřadu průmyslového vlastnictví

Úřad průmyslového vlastnictví

zapsal podle § 11 odst. 1 zákona č. 478/1992 Sb., v platném znění, do rejstříku

# UŽITNÝ VZOR

číslo

# 35890

na technické řešení uvedené v příloženém popisu.

V Praze dne: 29.03.2022

Za správnost:

Jiří Voráček  
oddělení rejstříků

Úřad průmyslového vlastnictví v zápisném řízení nezjišťuje, zda předmět užitého vzoru splňuje podmínky způsobilosti k ochraně podle § 1 zák. č. 478/1992 Sb.

Číslo zápisu: **35890**

Datum zápisu: 29.03.2022

Číslo přihlášky: **2021-39278**

Datum přihlášení: 18.10.2021

MPT: C 12 Q 1/68 (2018.01)  
C 12 Q 1/686 (2018.01)  
C 12 Q 1/6876 (2018.01)  
C 12 N 15/11 (2006.01)

Název: Sada primerů a sond pro stanovení alel markeru rezistence Rvi2 u jabloně domácí (Malus × domestica Borkh.)

Majitel: VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOCNÁŘSKÝ  
HOLOVOUSY s.r.o., Holovousy

Původce: RNDr. Jana Čmejlová, Ph.D., Vitiněves  
Ing. Martina Rejlová, Dvůr Králové nad Labem  
Ing. Ivona Žďárská, Mžany  
RNDr. Radek Čmejla, Ph.D., Vitiněves

# UŽITNÝ VZOR

(11) Číslo dokumentu:

## 35 890

(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: **2021-39278**  
(22) Přihlášeno: **18.10.2021**  
(47) Zapsáno: **29.03.2022**

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

(72) Původce:  
RNDr. Jana Čmejlová, Ph.D., Vitiněves, CZ  
Ing. Martina Rejlová, Dvůr Králové nad Labem, CZ  
Ing. Ivona Žďárská, Mžany, CZ  
RNDr. Radek Čmejla, Ph.D., Vitiněves, CZ

(54) Název užitného vzoru:  
**Sada primerů a sond pro stanovení alel  
markeru rezistence Rvi2 u jabloně domácí  
(Malus × domestica Borkh.)**

## Sada primerů a sond pro stanovení alel markeru rezistence *Rvi2* u jabloně domácí (*Malus × domestica* Borkh.)

### 5 Oblast techniky

Řešení se týká sady primerů a sond vyvinutých pro detekci rezistence typu *Rvi2* jabloně domácí (*Malus × domestica* Borkh.) k patogenu *Venturia inaequalis* (Cooke) G. Winter. Konkrétně tato sada umožňuje současnou detekci senzitivní alely i rezistentní alely pomocí markeru typu  
 10 jednonukleotidového polymorfizmu (SNP) W242, který je v těsné vazbě s lokusem rezistence *Rvi2*. Navržená sada primerů a sond je vhodná pro molekulárními markery asistovanou selekci jabloně s potenciální rezistencí ke strupovitosti metodou alelické diskriminace pomocí PCR v reálném čase.

15

### Dosavadní stav techniky

Jabloně domácí (*Malus × domestica* Borkh.) je celosvětově třetím nejvíce produkovaným ovocem po banánech a vodním melounu (Statista; statista.com) s produkcí v roce 2019 přes 87 milionů tun.  
 20 Jabloně však trpí mnoha chorobami, které snižují produkci komerčně uplatnitelných plodů. Mezi nejčastější patří strupovitost, kterou způsobuje houbový patogen *Venturia inaequalis* (Cooke) G. Winter. Pěstování odrůd citlivých vůči tomuto patogenu může vyžadovat i 20-30 postřiků produkčních sadů fungicidními prostředky ročně (Manktelow et al. 1996), což přináší pěstitelům vysoké finanční náklady. Použití fungicidů se negativně projevuje na životním prostředí, navíc  
 25 mohou tyto chemické látky, s obvykle negativním důsledkem na lidské zdraví, zůstat ve formě reziduí v plodech určených pro konzumaci či zpracování. V přírodě existuje řada jabloní rezistentních vůči *V. inaequalis* a jsou intenzivně používány pro šlechtění odrůd rezistentních vůči tomuto patogenu, jelikož kombinace použití rezistentních nebo odolných odrůd jabloní s technologickými opatřeními v sadech umožňuje velmi významné snížení spotřeby fungicidů  
 30 k regulaci tohoto patogenu.

V posledních dvou dekáдах bylo popsáno více než 20 různých lokusů rezistence vůči *V. inaequalis* (tzv. lokusy *Rvi*, pro přehled viz Bus et al. 2011; Soriano et al. 2014; Patocchi et al., 2020), i když samotné příčinné geny rezistence nebyly obvykle identifikovány. Tyto lokusy  
 35 rezistence jsou pro šlechtění k dispozici v různých podobách - od planých jabloní, ze kterých tyto lokusy často pocházejí, až po již komerčně úspěšné rezistentní odrůdy, které vznikly několikanásobným křížením potomků rezistentní plané jabloně s komerčně úspěšnými odrůdami. Tyto lokusy rezistence jsou však s různou frekvencí překonávány určitými rasami *V. inaequalis* (Bus et al. 2011; Caffier et al. 2015; Peil et al. 2018; Patocchi et al., 2020). Z desetiletého  
 40 celosvětového hodnocení genotypů nesoucích jednotlivé lokusy rezistence prováděného v geograficky odlišných oblastech s rozdílným infekčním tlakem (www.vinquest.ch) je zřejmé, že se populace patogenu *V. inaequalis* geograficky významně liší a překonávají jednotlivé lokusy rezistence s různou četností. Mezi nejvýhodnější lokusy rezistence, které nebyly překonány nebo byly překonávány pouze vzácně, patří *Rvi5*, *Rvi11*, *Rvi12*, *Rvi14* a *Rvi15*. Lokusy, které byly  
 45 překonávány s vyšší frekvencí (*Rvi2*, *Rvi4*, *Rvi6*, *Rvi7*, *Rvi9* a *Rvi13*), je již nyní možné použít k dosažení trvalé rezistence pouze v kombinaci, ideálně s lokusy překonávanými pouze velmi zřídka nebo dosud nepřekonanými. Naopak ze šlechtitelského hlediska se jako v podstatě bezcenné jevíly velmi často překonávané lokusy rezistence *Rvi1*, *Rvi3*, *Rvi8*, popřípadě *Rvi10* (Patocchi et al., 2020). Populace *V. inaequalis* se však neustále vyvíjí a frekvence překonání určitého lokusu  
 50 rezistence se může během velmi krátké doby změnit. Proto je strategie šlechtění jabloní rezistentních vůči strupovitosti zaměřena na tzv. pyramidizaci (kumulaci) lokusů rezistence, kdy je rezistence dána dvěma nebo více různými lokusy. Mezi nejčastěji používané lokusy rezistence vůči *V. inaequalis* s nejvíce rozpracovaným kvalitním šlechtitelským materiálem patří *Rvi6* s mnoha registrovanými odrůdami, po něm následují *Rvi2*, *Rvi4*, *Rvi5*, *Rvi11*, *Rvi12*,  
 55 *Rvi13* a *Rvi15*, některé z nich se již vyskytují v registrovaných odrůdách (Berra et al., 2017).

Původně byla rezistence vůči strupovitosti testována inokulací patogenu na rostlinu a sledováním příznaků infekce. Tento test však nebyl zcela spolehlivý a neumožňoval stanovit ani typ lokusu rezistence, ani homozygotní či heterozygotní výskyt příslušné rezistentní alely, což je velmi důležitý parametr z hlediska dalšího šlechtění. V dnešní době a při snaze o pyramidizaci několika lokusů *Rvi* v jednom genotypu je navíc tento test téměř bezcenný, protože na úrovni fenotypu je velmi problematické rozpoznat, zda ke kumulaci skutečně došlo. Pro testování by bylo nutné použít více izolátů tohoto patogenu schopných překonat pouze jednotlivé použité *Rvi* lokusy, i tyto izoláty však mohou být geneticky nestabilní a prolomit rezistenci. Toto testování je navíc pracné a časově náročné.

Pro průkaz přenosu lokusu rezistence vůči *V. inaequalis* jsou proto v současnosti vyvíjeny mnohem průkaznější a informativnější molekulárně genetické markery, které by umožnily jednoduchou a spolehlivou selekci rezistentních jabloní (marker assisted selection, MAS). Díky použití MAS je možné odstranit neperspektivní hybridní potomstvo již během několika týdnů či měsíců po vysetí. První publikace týkající se molekulárních markerů lokusů *Rvi* byly zveřejněny již na konci minulého tisíciletí, většinou se jednalo o různě 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 polymorfizmů (SNP), které jsou výhodnější pro MAS z důvodu snazší analyzovatelnosti více markerů v jediné reakci.

SNP markery byly publikovány i pro lokus rezistence *Rvi2* pocházející původně z ruského semenáče označovaného R12740-7A (Bus *et al.*, 2005). V dnešní době jsou jako donor této rezistence využívány hybrid TSR34T15, popřípadě již uznané odrůdy Realka, Reka či Regia. Přestože ani zde nebyl příčinný gen identifikován, bylo pro detekci lokusu *Rvi2* navrženo hned několik SNP markerů, např. W242 z amplikonu označovaného FBsnRvi2-7 a R243 z amplikonu FBsnRvi2-8 (Jänsch *et al.* 2015), popřípadě FBsnRvi2-1\_M417 a FBsnRvi2-4\_R590 (Baumgartner *et al.* 2016). Pouze marker W242 z amplikonu označovaného FBsnRvi2-7 byl však nezávisle validován jako dostatečně predikující rezistentní alelu lokusu *Rvi2* ( $p < 0,00001$ ) (Chagné *et al.*, 2019, zde označován také jako AHI15IL). Pro tento marker dosud nebyly publikovány jednoduché, rychlé a levné detekční metody pro využití pro MAS, které by umožňovaly analýzu často velmi početného potomstva křížení jabloní s *Rvi2* lokusem. V Jänsch *et al.* 2015, kde byl tento SNP marker identifikován, byl v tomto případě amplifikován a sekvenován úsek o délce cca 750 bp. Sekvenování je však pracné a finančně náročné, z těchto důvodů ho není vhodné používat pro analýzu mnoha vzorků. Při validaci tohoto markeru Chagné *et al.* (2019) použili technologii OpenArray®, jelikož současně analyzovali a validovali 128 různých SNP. Tato technologie je především vhodná pro analýzu většího počtu SNP a pro vědecké účely, nikoliv pro rutinní testování semenáčků při MAS. Dále jsou pro jabloně komerčně dostupné čipy pro analýzu 20 000 různých SNP ([https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/product\\_information\\_sheets/infinium-arrays-summaryagrigenomics-1370-2015-008.pdf](https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/product_information_sheets/infinium-arrays-summaryagrigenomics-1370-2015-008.pdf)), jejichž cena se postupně snižuje, avšak tyto čipy jsou z důvodu ceny a náročnosti na vybavení a vyhodnocování vhodné zejména pro celogenomové genotypování.

Žádná z dosavadních publikací tedy nepopisuje jednoduchý systém, který by byl vhodný pro rychlou analýzu SNP markeru W242 asociovaného s lokusem rezistence *Rvi2* u mnoha set či tisíců vzorků, který by byl využitelný v běžné šlechtitelské praxi pro ověřování přítomnosti jednotlivých alel lokusu *Rvi2*. Proto byla pro jejich detekci vyvinuta níže uvedená metoda, kterou lze použít v každé laboratoři vybavené v dnešní době běžnými laboratorními přístroji.

Zavedení molekulárních metod detekce lokusů *Rvi* do šlechtění vysoce zefektivňuje a v podstatě jako jediné i umožňuje tvorbu nových, prokazatelně rezistentních odrůd jabloní, zejména obsahujících více lokusů *Rvi*. Výběr rezistentních semenáčků jabloně a odstranění neperspektivního potomstva křížení již během prvních měsíců života rostlin přináší při šlechtění nových odrůd

značné finanční, personální, časové a prostorové úspory. Je tedy vhodné ho rutinně provádět při každém křížení jabloní s příslušným lokusem rezistence.

5 Podstata technického řešení

10 Nedostupnost jednoduché metody běžně použitelné v každé laboratoři molekulární biologie, díky které by bylo možné spolehlivě otestovat velké množství vzorků, řeší sada primerů a sond pro současnou PCR detekci SNP markeru W242 rozlišujícího senzitivní a rezistentní alelu lokusu rezistence *Rvi2* jabloně domácí (*Malus × domestica* Borkh.) podle technického řešení, jehož podstata spočívá v tom, že obsahuje primery a značené LNA hybridizační sondy, jejichž sekvence jsou:

15 Forward primer: GTTAAATTTGACATATGAGAATGTG (SEQ ID NO. 1)

Reverse primer: ATACCATATGAYCACAKAGATCATT (SEQ ID NO. 2)

Sonda 1: TT+TTT+T+T+TTTA+T+TATTTGGC (SEQ ID NO. 3)

20 Sonda 2: TT+TTT+T+A+TTTA+T+TATTTGGC (SEQ ID NO. 4),

kde dle názvosloví IUPAC zastupuje Y v sekvenci primeru nukleotidy C a T a K zastupuje nukleotidy G a T; kde + před nukleotidem v sekvenci sond označuje tzv. uzamčenou bázi, tj. bázi obsahující methylenový můstek mezi 2' kyslíkem a 4' uhlíkem pentózového kruhu, a kde jsou hybridizační sondy vhodně označeny pro současnou detekci jednotlivých alel v průběhu PCR reakce. Pro PCR detekci senzitivní alely SNP markeru lokusu rezistence *Rvi2* obsahuje sada primery a značenou hybridizační sondu, jejichž sekvence jsou:

30 Forward primer: GTTAAATTTGACATATGAGAATGTG (SEQ ID NO. 1)

Reverse primer: ATACCATATGAYCACAKAGATCATT (SEQ ID NO. 2)

Sonda 1: TT+TTT+T+T+TTTA+T+TATTTGGC (SEQ ID NO. 3)

35 a pro PCR detekci rezistentní alely SNP markeru lokusu rezistence *Rvi2* obsahuje sada primery a značenou hybridizační sondu, jejichž sekvence jsou:

Forward primer: GTTAAATTTGACATATGAGAATGTG (SEQ ID NO. 1)

40 Reverse primer: ATACCATATGAYCACAKAGATCATT (SEQ ID NO. 2)

Sonda 2: TT+TTT+T+A+TTTA+T+TATTTGGC (SEQ ID NO. 4).

45 Navržené primery a sondy se nacházejí v oblasti FBsn*Rvi2*-7 (Jänsch *et al.* 2015). Pomocí výše uvedených primerů a hybridizačních sond je možné v uvedené oblasti detekovat validovaný diagnostický SNP marker nazvaný W242 (A/T) (Jänsch *et al.* 2015 – identifikace; Chagné *et al.* 2019 – validace), který je v těsné vazbě s genem rezistence *Rvi2*, a na základě této jednobodové mutace odlišit senzitivní a rezistentní alelu. Nukleotid T v pozici 7 sondy 1 je určující pro senzitivní alelu a nukleotid A v téže pozici sondy 2 je určující pro rezistentní alelu (viz Obr. 1). Vzhledem k těsné vazbě mezi *Rvi2* a W242 mohou být v této přihlášce termíny „senzitivní a rezistentní alela (SNP) markeru lokusu rezistence *Rvi2*“ a „senzitivní a rezistentní alela lokusu rezistence *Rvi2*“ používány jako synonyma, SNP markerem lokusu rezistence *Rvi2* je v celé přihlášce míněn SNP W242 z Jänsch *et al.* 2015, pokud není konkrétně uvedeno jinak.

Navržená kombinace primerů pro amplifikaci markeru lokusu rezistence *Rvi2* je vhodná pro současnou analýzu výše uvedených alel u jabloně domácí (*Malus × domestica* Borkh.). Ve výhodném provedení technického řešení jsou PCR amplikony obou příslušných alel detekovány pomocí 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.

Prvním krokem pro stanovení alel markeru lokusu rezistence *Rvi2* 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 neomezují 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 způsobu zvýšení jejich teploty tání modifikací chemické struktury a fluorescenčního značení, aby nedošlo ke snížení specifity PCR detekce jednotlivých alel markeru lokusu rezistence *Rvi2*.

#### Objasnění výkresů

Obr. 1: Sekvence amplifikovaného úseku FBsnRvi2-7, který obsahuje SNP W242 marker pro lokus rezistence *Rvi2*, a místa nasedání primerů a sond na ni. Šedě 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 z *Malus × domestica* genotypu Golden Delicious (přístupové číslo GenBank KM105013.1) a homozygotní senzitivní alelu SNP W242 markeru pro rezistenci *Rvi2*; B) zachycuje sekvenci z *Malus × domestica* genotypu TSR34T15 (přístupové číslo GenBank KM105014.1) a kombinaci senzitivní a rezistentní alely SNP W242 markeru tohoto lokusu. Příslušný SNP W242 polymorfismus je označen tučně a podtržením.

Obr. 2: Příklady analýzy metodou alelické diskriminace pomocí PCR v reálném čase. Křivky bez teček – 6-FAM fluorescence (Sonda 1; SEQ ID NO. 3); křivky s tečkami – HEX fluorescence (Sonda 2; SEQ ID NO. 4). A) detekce heterozygota genotypu jabloně nesoucího rezistentní i senzitivní alelu pro lokus rezistence *Rvi2*; B) detekce homozygota genotypu jabloně nesoucího pouze senzitivní alely pro lokus rezistence *Rvi2*; a C) detekce homozygota genotypu jabloně nesoucího pouze rezistentní alely pro lokus rezistence *Rvi2*.

#### Příklady uskutečnění technického řešení

##### Příklad 1: Návrh sekvencí primerů

Na základě známé sekvence oblasti FBsnRvi2-7 (GeneBank, KM105013.1, respektive KM105014.1) a místa výskytu diagnostického SNP W242 pro detekci lokusu rezistence *Rvi2* u jabloně byly pomocí softwarů Vector NTI Advance (ThermoFisher Scientific) a Geneious Prime (Biomatters Ltd.) navrhnuty sekvence jednotlivých primerů a sond. Nejprve byla provedena analýza sekvencí cca 150 různých rezistentních a senzitivních odrůd jabloně z důvodu identifikace dalších možných polymorfizmů v této oblasti, které by mohly interferovat s vlastní PCR. Následně byly vybrány co nejkonzervovanější úseky pro navržení primerů a sond, aby bylo minimalizováno potenciální snížení účinnosti celého systému. Jelikož se jedná o velmi heterogenní oblast jablečného genomu s pouze krátkými úseky vhodnými pro navržení primerů a sond, bylo nezbytné pro reverzní primer vybrat sekvenci se dvěma degenerovanými nukleotidy. Vzhledem k analyzovanému markeru a okolní sekvenci bylo třeba navrhnout velmi krátké sondy, u kterých



bylo nezbytné zvýšit teplotu tání pomocí modifikace chemické struktury sondy. Byly zvoleny sondy obsahující tzv. uzamčené neboli LNA nukleotidy (z angl. Lock Nucleic Acid), kdy modifikace kruhu pentózového sacharidu methylenovým můstkem zvyšuje teplotu tání sondy, a umožňuje tak použití kratších sond. LNA nukleotidy jsou v sekvenci označeny  
5 znaménkem + před uvedením příslušné báze.

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

Pro identifikaci senzitivní a rezistentní alely diagnostického SNP W242 pro detekci lokusu rezistence *Rvi2* byly navrženy následující primery a hybridizační sondy:

15 Forward primer: GTTAAATTTGACATATGAGAATGTG (SEQ ID NO. 1) pro detekci obou alel,

Reverse primer: ATACCATATGAYCACAKAGATCATT (SEQ ID NO. 2) pro detekci obou alel,

20 Sonda 1: TT+TTT+T+T+TTTA+T+TATTTGGC (SEQ ID NO. 3) pro detekci senzitivní alely,

Sonda 2: TT+TTT+T+A+TTTA+T+TATTTGGC (SEQ ID NO. 4) pro detekci rezistentní alely.

Nasedání primerů a sond je uvedeno na Obrázku 1.

25 Příklad 2: Detekce senzitivní alely a rezistentní alely SNP markeru W242 lokusu rezistence *Rvi2* u jabloně domácí metodou alelické diskriminace pomocí PCR v reálném čase

Pro detekci přítomnosti senzitivní alely a rezistentní alely markeru W242 lokusu rezistence *Rvi2*  
30 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 s následujícími reakčními složkami (uvedeny výsledné koncentrace): 1x qPCR Blue Master Mix (Top-Bio); 250nM Forward primer (SEQ ID NO. 1), 250nM Reverse primer (SEQ ID NO. 2), 250nM Sonda 1 (SEQ ID NO. 3), 200nM Sonda 2 (SEQ ID NO. 4), reakce  
35 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 lokusu rezistence *Rvi2* u jabloně se v reakci použily následující primery a sonda, jejichž sekvence  
40 jsou:

Forward primer: GTTAAATTTGACATATGAGAATGTG (SEQ ID NO. 1)

Reverse primer: ATACCATATGAYCACAKAGATCATT (SEQ ID NO. 2)

45 Sonda 1: TT+TTT+T+T+TTTA+T+TATTTGGC (SEQ ID NO. 3),

kde byla Sonda 1 fluorescenčně značena fluoroforem 6-FAM, a pro PCR detekci rezistentní alely markeru lokusu rezistence *Rvi2* u jabloně se v reakci použily následující primery a sonda, jejichž sekvence jsou:

50 Forward primer: GTTAAATTTGACATATGAGAATGTG (SEQ ID NO. 1)

Reverse primer: ATACCATATGAYCACAKAGATCATT (SEQ ID NO. 2)

55 Sonda 2: TT+TTT+T+A+TTTA+T+TATTTGGC (SEQ ID NO. 4),

kde byla Sonda 2 fluorescenčně značena fluoroforem HEX. Výsledky byly analyzovány dodaným softwarem k tomuto zařízení Rotor-Gene Q Series Software, typický výstup je ukázán na Obrázku 2.

5

### Průmyslová využitelnost

Navrženou sadu primerů a sond pro PCR detekci rezistence jabloně domácí (*Malus × domestica* Borkh.) k patogenu *Venturia inaequalis* (Cooke) G. Winter, konkrétně pro detekci přítomnosti jednotlivých alel markeru W242 pro lokus rezistence *Rvi2*, je možné použít pro molekulárními markery asistovanou selekci jabloní křížených pro rezistenci k strupovitosti, a to již ve stádiu několikátýdenních semenáčů. Takto raná selekce přináší nemalé finanční úspory díky tomu, že šetří práci, materiál i prostory nezbytné pro pěstování semenáčů vzniklých z těchto křížení. Konkrétně jsou detekovány 1) senzitivní alela markeru pro lokus rezistence *Rvi2* a 2) rezistentní alela markeru pro lokus rezistence *Rvi2*. Ve výhodném provedení probíhá detekce v jediné reakci metodou alelické diskriminace pomocí PCR v reálném čase, která umožňuje velmi rychlou analýzu velkého počtu vzorků. Zároveň tato sada umožňuje identifikaci homozygotů nesoucích pouze rezistentní alely *Rvi2*, což je velkým přínosem pro šlechtitele, protože rezistentní homozygoti budou v dalším křížení poskytovat jedince nesoucí vždy alespoň jednu rezistentní alelu tohoto lokusu. V tomto případě tedy nebude nutné semenáče vůbec testovat a všechny budou nést lokus rezistence *Rvi2*, což přinese další úspory při šlechtění rezistentních jabloní. Dále je nárokována sada primerů a sond pro stanovení rezistence *Rvi2* využitelná v kombinaci s obdobnými sadami pro detekci dalších lokusů rezistence vůči *V. inaequalis* při testování kumulace příslušných lokusů 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.

### 30 Seznam použité 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 Genet. Genomes* 12:1-21.

35

Berra, L., Tartarini, S., Adami, M. *et al.* 2017. Pyramiding of multiple resistances to disease and marker-assisted selection. *Acta Hort.* 1172, 57-60.

40 Bus, V., Rikkerink, E., van de Weg, W. *et al.* 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. *Mol Breeding* 15, 103–116.

45 Bus, V. G. M., Rikkerink, E. H. A., Caffier, V. *et al.* 2011. Revision of the nomenclature of the differential host-pathogen interactions of *Venturia inaequalis* and *Malus*. *Annu. Rev. Phytopathol.* 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 Dis.* 99:370-375.

50 Chagné D., Vanderzande S., Kirk C., *et al.* 2019. Validation of SNP markers for fruit quality and disease resistance loci in apple (*Malus × domestica* Borkh.) using the OpenArray® platform. *Hortic Res.* 2019; 6:30.

55 Jansch, M., Brogini, G. A. L., Weger, J. *et al.* 2015. Identification of SNPs linked to eight apple disease resistance loci. *Mol. Breeding* 35:1-21.

- Manktelow, D. W. L., Beresford, R. M., Batchelor, T. A., and Walker, J. T. S. 1996. Use patterns and economics of fungicides for disease control in New Zealand apples. *Acta Hort.* 422:187-192.
- 5 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 Dis.* 104(8):2074-2081.
- Peil, A., Patocchi, A., Hanke, M.-V., and 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*  
10 *Journal of Plant Pathol.* 151:533-539.
- Soriano, J., Madduri, M., Schaart, J. *et al.* 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. *Mol. Breeding* 34:2021-2032.
- 15 Tartarini S., Gianfranceschi L., Sansavini S., and 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.
- 20 Vinatzer B. A., Patocchi A., Tartarini S. *et al.* 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.

## NÁROKY NA OCHRANU

5 1. Sada primerů a sond pro detekci senzitivní alely a rezistentní alely markeru W242 rezistence *Rvi2* 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:

10 Forward primer: GTTAAATTTGACATATGAGAATGTG (SEQ ID NO. 1)

Reverse primer: ATACCATATGAYCACAKAGATCATT (SEQ ID NO. 2)

Sonda 1: TT+TTT+T+T+TTTA+T+TATTTGGC (SEQ ID NO. 3)

15 Sonda 2: TT+TTT+T+A+TTTA+T+TATTTGGC (SEQ ID NO. 4),

kde Y zastupuje v sekvenci primeru nukleotidy C a T a K zastupuje nukleotidy G a T, kde + před nukleotidem v sekvenci sond označuje uzamčenou bázi - bázi obsahující methylenový můstek mezi 2' kyslíkem a 4' uhlíkem pentózového kruhu, a kde jsou hybridizační sondy vhodně označeny pro  
20 současnou detekci jednotlivých alel v průběhu PCR reakce, přičemž pro PCR detekci senzitivní alely markeru rezistence *Rvi2* obsahuje sada primery a značenou hybridizační sondu, jejichž sekvence jsou:

25 Forward primer: GTTAAATTTGACATATGAGAATGTG (SEQ ID NO. 1)

Reverse primer: ATACCATATGAYCACAKAGATCATT (SEQ ID NO. 2)

Sonda 1: TT+TTT+T+T+TTTA+T+TATTTGGC (SEQ ID NO. 3)

30 a pro PCR detekci rezistentní alely markeru rezistence *Rvi2* obsahuje sada primery a značenou hybridizační sondu, jejichž sekvence jsou:

Forward primer: GTTAAATTTGACATATGAGAATGTG (SEQ ID NO. 1)

35 Reverse primer: ATACCATATGAYCACAKAGATCATT (SEQ ID NO. 2)

Sonda 2: TT+TTT+T+A+TTTA+T+TATTTGGC (SEQ ID NO. 4).

40 2 výkresy

A)

CTCTCTCCCTCCCTGTCTCTCTTCTCTCTCTGCTCGCTCGCTCTCTCTGTCCCACGGCATGGTCTCAGA  
CTCTGTCTGCCTGAAAGACGTAAGACGTCAAATCCAATATCCAATATGKAATGTCACGTAATCAAATTTG

Forward

TGTGTARGATCCAGCTCCAACCAATATGTCAATTTTACGTGGATTAACATGAGTTTTTCATATGTTAAATT

primer (SEQ ID NO. 1) Sonda 1 (SEQ ID NO. 3) Reverse primer (SEQ  
TGACATATGAGAATGTGATGTCAAWTTTTTTTATTATTGGCCAAATTAGATAAATGATCTCTGTGG

ID NO. 2)

TCATATGGTATTCGGAATATAGCCTATATGCTAAAAAACTCGAATTTAAACCCTTGTGGTGTACTCTGT  
TAGCAAATTTAGTCCAAAAATRATTTTTTCGTTAACTATCTGTTAATACATGGTAAAATTGTACTTTGAC  
ATTTTTACTAGGATTGGGGTTTTTRCTAGGATTTTGGTTTAAATGCTATCTGAGTTTTCAATTTCTGATCG  
GTTAGAATTCTATTAGAGTTGGCAAGCAACATGAATGGATTCTTGCTGTGTGGCTTTGAAAAACATCCAT  
TTGAGAAGACCAAGTGGTTTCTGCAATGGTGGTTCTGGGTTTTGGGGGAGAGGGTTAGAGGGAGTTTCA  
ATAACAGGCTTTGGGCTAATCAATTGAGAATTAACAAGAGGAAGGTGATACCTGGAGCTGTTCTTGCTGT  
TCTTACCTCAAAGATGCCGAGGCTRTCGTAAGTTAATCCTTT

B)

CTCTCTCCCTCCCTGTCTCTCTTCTCTCTCTGCTCGCTCGCTCTCTCTGTCCCACGRCATGGTCTCAGR  
CTCTGTCTGCCTGAAAGACGTAAGACRTCAAATCCAATATCCAATATGGAATGTCACGTAATCAAATTTG

Forward

TGTGTAGGATCCAGCTCCAACCAATATGTCAATTTTACGTGGATTAACATGAGTTTTTCATATGTTAAATT

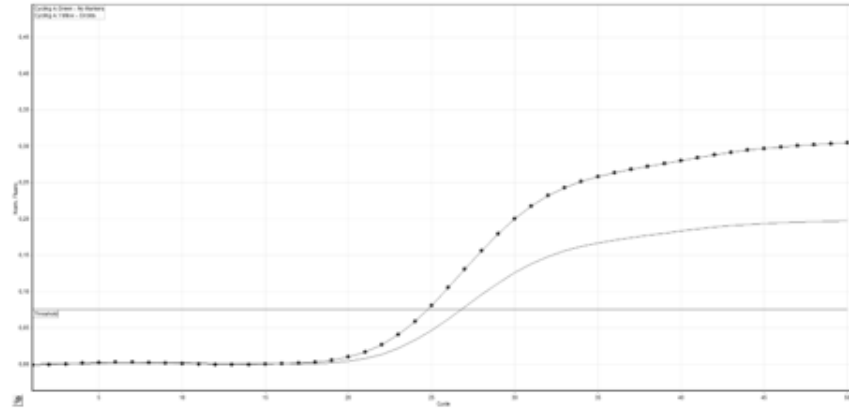
primer (SEQ ID NO. 1) Sonda 1, resp. 2 (SEQ ID NO. 3, resp. 4) Reverse primer (SEQ  
TGACATATGAGAATGTGATGTCAATTTTTTTTATTATTGGCCAAATTARATAAATGATCTATGTGG

ID NO. 2)

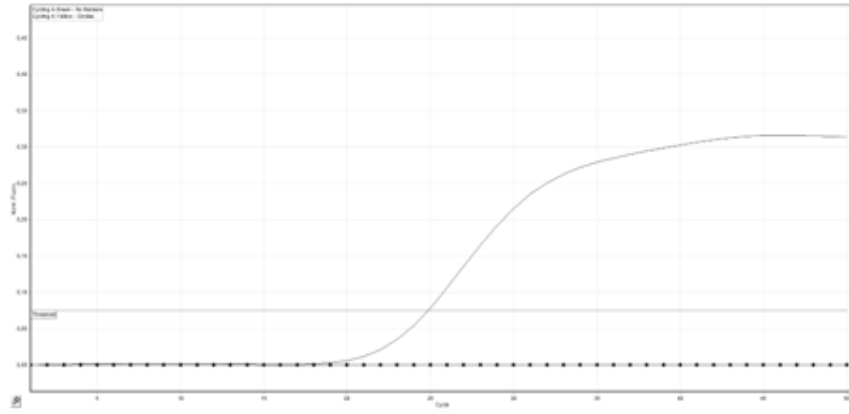
TCATATGGTATYCGGAATATAGCCTATATGCTAAAAAACTCGAATTTAAACCCTTGTGGTGTACTCTGT  
TAGCAAATTTAGTCCAAAAATGATTTTTTCGTTAACTATMTGTTAATACATGGTAAAATTGTACTTTGAC  
ATTTTTACTAGGATTGGGGTTTTTRCTAGGATTTTGGTTTAAATGCTATCTGAGTTTTCAATTTCTGATCG  
GTTAGAATTCTATTAGAGTTGGCAAGCAACATGAATGGATTCTTGYTGTGTGGCTTTGAAAAACATCCAT  
TTGAGAAGACCAAGTGGTTTCTGCAATGGTGGTTCTGGGTTTTGGGGGAGAGGGTTAGAGGGAGTTTCA  
ATAACAGGCTTTGGGCTAATCAATTGAGAAITAACAAGAGGAAGGTGATACCTGGAGCTGTTCTTGCTGT  
TCTTACCTCAAAGATGCCGAGGCTGTCGTAAGTTAATCCTTT

Obr. 1

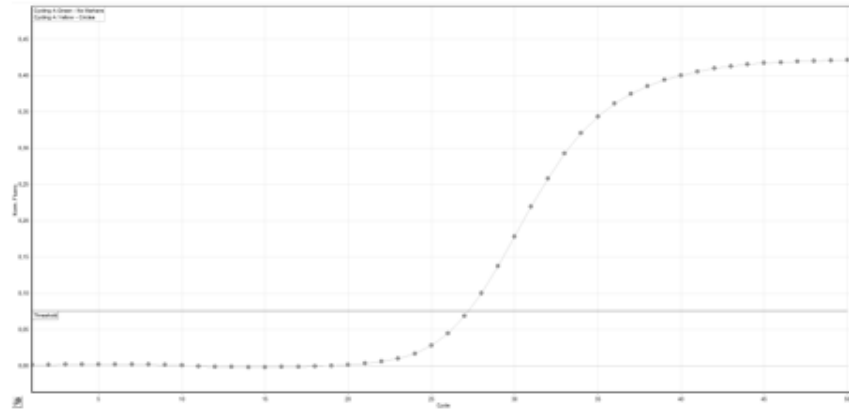
A)



B)



C)



Obr. 2