

UŽITNÝ VZOR

(11) Číslo dokumentu:

34 114

(13) Druh dokumentu: **U1**

(51) Int. Cl.:

C12Q 1/6895 (2018.01)

C12Q 1/6858 (2018.01)

C12N 15/11 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2020-37606**

(22) Přihlášeno: **02.06.2020**

(47) Zapsáno: **23.06.2020**

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

(72) Původce:
RNDr. Jana Čmejlová, Ph.D., Vitiněves, CZ
RNDr. Radek Čmejla, Ph.D., Vitiněves, CZ

(54) Název užitého vzoru:
**Sada pro detekci lokusu sloupcového růstu
u jabloně domácí (Malus × domestica
Borkh.)**

Sada pro detekci lokusu sloupcového růstu u jabloně domácí (*Malus × domestica* Borkh.)

Oblast techniky

5

Řešení se týká sady primerů a sond pro detekci lokusu sloupcového růstu u jabloně domácí (*Malus × domestica* Borkh.), která umožňuje současně detekovat alelu divokého typu a mutovanou alelu způsobující sloupcový růst jabloní, kde mutovaná alela pochází z odrůdy 'McIntosh Wijcik'. Uvedená sada je vhodná pro molekulárními markery asistovanou selekci jabloně s potenciálním sloupcovým růstem metodou PCR v reálném čase.

10

Dosavadní stav techniky

Přirozená architektura jabloně (*Malus × domestica* Borkh.) je velmi důležitou charakteristikou pro pěstitele, jelikož má vysoký dopad na produkci plodů, náklady a množství práce potřebné pro udržování sadů. Pro vysokou produkci plodů na hektar potřebují stromy s obvyklým habitem velmi intenzivní péči, zejména řez, a obvykle také vyžadují opěrné systémy, které představují vysoké ekonomické náklady. Existuje však přirozeně vzniklá mutace, která velmi ovlivňuje architekturu jabloní a navozuje růst téměř ideálního sloupcového tvaru stromu. Tato mutace byla identifikována v šedesátých letech minulého století v Kanadě jako spontánní mutantní výhon na odrůdě s normálním růstem 'McIntosh' a byla nazvána 'McIntosh Wijcik' po jejím objeviteli (Fisher, 1970). Sloupcový habitus je geneticky daný znak, který se projevuje kompaktním růstem s krátkými internodiemi, omezeným počtem bočních výhonů a bohatým obrostem krátkých plodonošů (Fisher, 1970; Petersen, 2013). Tento habitus umožňuje v sadech velmi hustou dvouřadou výsadbu stromů ve sponu 0,50 m x 0,50 m x 3,00 m s přibližně 10 000 stromy na hektar, v důsledku čehož se velmi výrazně zvyšují výnosy z osázené plochy. Sad osázený jabloněmi se sloupcovým růstem vyžaduje minimální řez a není nutné budovat opěrný systém (Petersen, 2013). Sloupcové jabloně také vykazují časnější kvetení, což umožňuje návratnost nákladů v kratší době (cca po 4 letech) než u jabloní s normálním růstem (Zhang, 2011; Petersen, 2013). Sloupcové jabloně zároveň produkují vyšší výtěžky z jednoho stromu než standardní jabloně (Lazar, 2015) a jsou odolnější i vůči suchu. Vzhledem k tomu, že jsou plody nahloučené v krátké vzdálenosti od kmene, může být v sadech použita mechanizace pro strojovou sklizeň, což dále snižuje náklady a pracnost. Výše uvedené vlastnosti proto činí sloupcové odrůdy jabloní velmi atraktivní pro pěstitele jablek.

35

Bohužel tyto jabloně také velmi často vykazují střídavou plodnost (Blazek, 2011) a první vyšlechtěné sloupcové odrůdy nebyly vhodné pro pěstování k tržnímu účelu pro špatné chuťové vlastnosti, krátkou skladovatelnost a vysokou citlivost k chorobám (Petersen, 2013). V současnosti registrované sloupcové odrůdy z druhé generace křížení, jako jsou například Cumulus, Rondo, Redcats nebo Pompink, mají mnohem lepší vlastnosti, avšak přesto stále nacházejí uplatnění pouze v malých zahradách, úzkých prostorech a nádobách a jejich rozšíření do sadů není běžné. Velkopěstitelé jsou požadovány vynikající růstové/plodové vlastnosti, kterých současné sloupcové odrůdy zatím nedosahují. Z těchto důvodů jsou každoročně po celém světě prováděna nová a nová křížení, aby byly vyprodukovány excelentní odrůdy sloupcových jabloní.

40

45

Identifikace sloupcového růstu u semenáčů na základě jejich fenotypu však může být spolehlivě provedena nejdříve po 2 až 3 letech pěstování (Blazek, 1992; Baldi, 2012), přesto i po této době zůstává řada fenotypů s nejednoznačným růstem (Baldi, 2012; Petersen, 2013), což přináší nemalé náklady a zbytečnou práci vynaloženou na udržování nechtěných hybridů. Proto je velmi potřebný vývoj jednoduché, spolehlivé a rychlé metody pro molekulárními markery asistovanou selekci jabloní se sloupcovým růstem, která by umožňovala selekci již ve stádiu několikátých denních semenáčů.

50

55

Dlouhou dobu byla hledána příčinná mutace sloupcového růstu. Na základě křížení a segregace fenotypů bylo určeno, že se jedná o monogenní dominantní alelu nazvanou (Co) (z anglického „Columnar“), jelikož mutantní fenotyp segregoval přibližně v poměru 1:1 s normálním růstem (Lapins, 1969). Conner a kol. (1997) zamapovali odpovídající lokus na chromozóm 10. Bylo vyvinuto několik více či méně spolehlivých molekulárních markerů pro detekci sloupcového růstu (pro přehled viz Petersen, 2013). Příčinnou mutaci se podařilo nakonec identifikovat na základě resekvenování dříve identifikované oblasti genomu spojené s tímto znakem u odrůd ‘McIntosh’ a ‘McIntosh Wijcik’ a porovnání získaných sekvencí. Wolters et al. (2013) identifikovali 8,2kb (upravená velikost podle corrigendum Wolters, 2015) inzerci nového typu mobilního DNA elementu pravděpodobně specifického pro tribus *Pyraea*. Jelikož nebyl narušen žádný gen kódující protein, byla provedena analýza exprese vybraných genů v okolí této inzerce. V této studii bylo zjištěno, že nejvýraznější změnou v pupenech odrůdy ‘McIntosh Wijcik’ je 14násobné zvýšení exprese MdCo31 genu kódujícího domnělou 2OG-Fe(II) oxygenázu v porovnání s odrůdou ‘McIntosh’. Gen MdCo31 pocházející z odrůdy ‘McIntosh Wijcik’ a rostliny s kontrolovanou architekturou stromu transformované tímto genem se staly předmětem Evropského patentu EP2754711A1. Nezávislou skupinou bylo potvrzeno, že nadměrná exprese tohoto genu v transgenním tabáku a jabloních navodila fenotypy s krátkými internodiemi, podobně jako u sloupcových jabloní (Okada, 2016). Sekvence, k jejíž inzerci v tomto lokusu došlo, byla později identifikována jako retrotranspozon Gypsy-44, který byl v opačné orientaci vložen do dalšího retrotranspozonu s názvem Gypsy-33 (Otto, 2014).

V dosavadním stavu techniky jsou uvedeny pouze poměrně pracné a časově náročné metody spočívající v amplifikaci cílového úseku metodou PCR a následné detekci vzniklých fragmentů elektroforézou na agarózovém gelu.

Například ve Wolters et al. (2013) jsou použity primery pro detekci levé a pravé hranice inzerce retrotranspozonu Gypsy-44, specifická amplifikace alely divokého typu (WT) není v této publikaci nijak řešena. Tento detekční systém byl použit i v Evropském patentu EP 2754711 A1. Hlavní nevýhodou tohoto přístupu je nemožnost odlišení heterozygotních jabloní v tomto lokusu (WT/Co) od homozygotních (Co/Co). Tato znalost je však pro šlechtitele zásadní, neboť oba tyto druhy genotypů mohou mít odlišný fenotypový projev, a navíc při použití v dalším křížení je výhodné pracovat s genotypy Co/Co, neboť všichni jejich potomci budou vykazovat sloupcový růst a molekulárně genetická analýza nebude potřebná.

Otto a kol. (2014) detekovali mutaci pocházející z odrůdy ‘McIntosh Wijcik’ amplifikací oblastí z levé i pravé hranice inzerce retrotranspozonu Gypsy-44. Amplifikace alely divokého typu (WT) probíhala v další PCR reakci. Na obrázku příslušných agarózových gelů v uvedené publikaci je sice možné rozlišit genotypy obsahující sloupcovou alelu a alelu divokého typu, použité primery však vedly ke vzniku nespecifických fragmentů. Dle znalostí původců přihlášky autoři nezveřejnili sekvence použitých primerů.

Další systém pro detekci lokusu sloupcového růstu jabloní navrhl Okada et al. (2016), kdy k amplifikaci obou alel dochází v jediné PCR reakci. Nevýhody tohoto systému však jsou poměrně slabá amplifikace mutované sloupcové alely (Co) a opět analýza PCR produktů pomocí agarózové elektroforézy, která je pracná a nevhodná pro rychlou rutinní analýzu tisíců vzorků, které se běžně zpracovávají v rozsáhlejších šlechtitelských programech.

Podstata technického řešení

Výše uvedené nedostatky – u jednotlivých metodik dle současného stavu techniky se jedná o nemožnost odlišit homozygoty Co/Co, nezbytnost dvou PCR reakcí pro 1 vzorek, vznik nespecifických fragmentů, popřípadě slabou amplifikaci sloupcové alely a ve všech používaných metodách použití pracné a časově náročné analýzy pomocí agarózového gelu – odstraňuje sada primerů a sond pro současnou PCR detekci nemutované alely divokého typu (WT) a mutované

sloupcové alely (Co) lokusu sloupcového růstu jabloně domácí (*Malus × domestica* Borkh.) podle technického řešení, jehož podstata spočívá v tom, že obsahuje primery a značené hybridizační sondy, jejichž sekvence jsou

5 Forward primer 1: ATTCTAAACGCTATTGTCCTTGG (SEQ ID NO. 1)

Forward primer 2: GGAACAACTAAGAAAAGACGAGTGA (SEQ ID NO. 2)

Reverse primer 1: TGAGAAGGGGTGAGAAGGC (SEQ ID NO. 3)

10

Sonda 1: TGCGTCAAGTCTTATGTTAGCTCTGTTTAT (SEQ ID NO. 4)

Sonda 2: ATATGATCCGATCAAGGACTTAAATGTAAT (SEQ ID NO. 5),

15 kde hybridizační sondy jsou vhodně označeny pro jejich současnou detekci v průběhu PCR reakce,

příčemž pro PCR detekci nemutované alely divokého typu (WT) lokusu sloupcového růstu obsahuje sada primery a značenou hybridizační sondu, jejichž sekvence jsou

20

Forward primer 1: ATTCTAAACGCTATTGTCCTTGG (SEQ ID NO. 1)

Reverse primer 1: TGAGAAGGGGTGAGAAGGC (SEQ ID NO. 3)

25 Sonda 1: TGCGTCAAGTCTTATGTTAGCTCTGTTTAT (SEQ ID NO. 4)

a pro PCR detekci mutované sloupcové alely (Co) lokusu sloupcového růstu obsahuje sada primery a značenou hybridizační sondu, jejichž sekvence jsou:

30 Forward primer 2: GGAACAACTAAGAAAAGACGAGTGA (SEQ ID NO. 2)

Reverse primer 1: TGAGAAGGGGTGAGAAGGC (SEQ ID NO. 3)

Sonda 2: ATATGATCCGATCAAGGACTTAAATGTAAT (SEQ ID NO. 5).

35

Výše uvedený primer SEQ ID NO. 1 se částečně překrývá s primerem z Okada, 2016. Příslušný překryv obou primerů je však koincidence, neboť tato genomická oblast je výhodná pro návrh primerů pro amplifikaci daného lokusu. Primer SEQ ID NO. 1 byl navržen tak, aby došlo k optimální amplifikaci nemutované alely divokého typu (WT) v kontextu celého detekčního systému metodou alelické diskriminace pomocí real-time PCR, o které se Okada et al. nezmiňují. Navíc je primer SEQ ID NO. 1 použit v kombinaci s jiným reverzním primerem. Ostatní primery vykazují nižší než 85% homologii k primerům známým z dosavadního stavu techniky, popřípadě jsou zcela nové. V dosavadním stavu techniky se sondy nepoužívaly a jejich sekvence jsou nové.

40

45 Výše uvedené kombinace primerů pro amplifikaci jednotlivých alel lokusu sloupcového růstu jsou vhodné pro současnou nebo individuální analýzu výše uvedených alel u jabloně domácí (*Malus x domestica* Borkh.). Při analýze menšího počtu vzorků je možné obě alely detekovat po klasické (tzv. end-point) PCR elektroforézou na agarózovém gelu. Ve výhodném provedení technického řešení jsou PCR amplikony obou příslušných alel detekovány v přítomnosti značených sond alelickou diskriminací metodou PCR v reálném čase. Ve výhodném provedení
50 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.

Návrh sady primerů podle technického řešení pro stanovení alel lokusu sloupcového růstu jabloně domácí (*Malus x domestica* Borkh.) byl proveden v několika krocích: 1) porovnání sekvencí alely divokého typu (WT) z odrůdy 'McIntosh' (GenBank č: KF530875, HF968766) a mutované alely (Co) z odrůdy 'McIntosh Wijcik' (GenBank č: KF530876, HF968765) pro definici přesné pozice inserce retrotranspozonu Gypsy-44; 2) analýza sekvencí z hlediska identifikace jednotlivých strukturních elementů obou retrotranspozonů (Gypsy-44 a Gypsy-33) a unikátních sekvencí a výběr vhodných oblastí pro navržení primerů a sond; 3) návrh primerů a sond pro současnou detekci a rozlišení obou alel v jedné reakci s ohledem na zajištění specifity celého systému v kontextu jablečného genomu. Organizace celého lokusu sloupcového růstu včetně přibližné polohy navrženého systému primerů a sond je schematicky zachycena na Obrázku 1.

Pro navržení Forward primeru 1 pro detekci alely divokého typu (WT) byla vybrána oblast unikátní v jablečném genomu ležící před 5' LTR retrotranspozonu Gypsy-33, což zajišťuje specifitu tohoto primeru v rámci jablečného genomu. Bezprostředně za ní byla navržena Sonda 1 tak, aby její většina ležela také v unikátní sekvenci. Pro Reverse primer 1 byla vybrána oblast 5' LTR retrotranspozonu Gypsy-33, která se u mutované sloupcové alely (Co) nachází až za místem inserce retrotranspozonu Gypsy-44, aby mohl být Reverse primer 1 použit pro amplifikaci obou alel. Vzhledem k vysokému výskytu těchto retrotranspozonů v jablečném genomu bude tento primer nespecifický a bude rozpoznávat mnoho míst genomu. Specifitu amplifikace a detekce tak budou zajišťovat v jablečném genomu unikátní Forward primer 1, popřípadě Sonda 1.

Oblast pro navržení Forward primeru 2 pro detekci mutované alely bylo nezbytné vymezit v 3' LTR Gypsy-44, z tohoto důvodu bude tento primer opět nespecifický v kontextu jablečného genomu. Na amplifikaci mutované alely se bude podílet taktéž nespecifický Reverse primer 1. Spojení obou retrotranspozonů v této orientaci je však v jablečném genomu unikátní, jak bylo ověřeno analýzou Blast (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch&PROG_DEF=blastn&BLAST_PROG_DEF=megaBlast&BLAST_SPEC=OGP_3750_12882), proto je použití těchto dvou nespecifických primerů pro amplifikaci mutované sloupcové alely (Co) v kontextu jablečného genomu možné, i když bude účinnost amplifikace do určité míry snížena nasedáním primerů i na ostatní retrotranspozony téhož typu. Pro zvýšení specifity při detekci byla navržena sonda pro detekci mutované sloupcové alely (Co) na rozhraní obou zúčastněných retrotranspozonů.

Přehled přesných pozic navržených primerů a sond včetně analyzovaných strukturních elementů jednotlivých alel lokusu sloupcového růstu je uveden v Tabulce 1, nasedání primerů a sond na jednotlivé alely lokusu sloupcového růstu je uvedeno na Obrázku 2A, respektive 2B.

Tabulka 1: Pozice navržených primerů a sond včetně strukturních elementů jednotlivých retrotranspozonů (jak byly uvedeny autory příslušných sekvencí) u alely divokého typu (WT) (GenBank č.: HF968766), respektive mutované sloupcové alely (Co) (GenBank č.: HF968765) lokusu sloupcového růstu jabloně. Komponenty navržené sady primerů a sond jsou uvedeny tučně.

Malus domestica, alela divokého typu (WT) (GenBank č.: HF968766)				
<i>Rys</i>	<i>5' pozice</i>	<i>3' pozice</i>	<i>Délka</i>	<i>Poznámka</i>
Forward primer 1	21 483	21 505	23 nt	unikátní v jablečném genomu
Sonda 1	21 509	21 538	30 nt	hranice unikátní sekvence a 5' LTR Gypsy-33
5' LTR Gypsy-33	21 532	21 881	350 nt	
Reverse primer 1*	21 697	21 715	19 nt	v 5' LTR Gypsy-33
Retrotranspozon Gypsy-33, vnitřní část	21 882	25 128	3 247 nt	
3' LTR Gypsy-33	25 129	25 478	350 nt	

Malus domestica, mutovaná sloupcová alela (Co) (GenBank č.: HF968765)				
<i>Rys</i>	<i>5' pozice</i>	<i>3' pozice</i>	<i>Délka</i>	<i>Poznámka</i>
Forward primer 1	69 302	69 324	23 nt	unikátní v jablečném genomu
Sonda 1	69 328	69 357	30 nt	hranice unikátní sekvence a 5' LTR Gypsy-33
1. část 5' LTR Gypsy-33	69 351	69 402	52 nt	
3' LTR Gypsy-44*	69 403	71 358	1 951 nt	100% homologie s 5' LTR Gypsy-44
Forward primer 2	71 296	71 321	26 nt	v 3' LTR Gypsy-44
Retrotranspozon Gypsy-44, vnitřní část*	71 359	75 651	4 293 nt	
5' LTR Gypsy-44*	75 652	77 602	1 951 nt	100% homologie s 3' LTR Gypsy-44
Forward primer 2	77 540	77 565	26 nt	v 5' LTR Gypsy-44
Sonda 2	77 589	77 618	30 nt	hranice 5' LTR Gypsy-44 a 5' LTR Gypsy-33
Reverse primer 1*	77 716	77 734	19 nt	v 5' LTR Gypsy-33
2. část 5' LTR Gypsy-33	77 603	77 900	298 nt	obsahuje 5nukleotidovou duplikaci v místě inserce
Retrotranspozon Gypsy-33, vnitřní část	77 901	81 159	3 259 nt	obsahuje více TC repetice než alela divokého typu
3' LTR Gypsy-33	81 160	81 509	350 nt	

* na komplementárním řetězci

Z Tabulky 1 a Obrázku 2B vyplývá, že Forward primer 1 a Sonda 1 jsou schopné rozpoznat i mutovanou sloupcovou alelu (Co). Nicméně Reverse primer 1 pro případnou amplifikaci se nachází ve vzdálenosti téměř 8,5 kb od místa nasedání Forward primeru 1, amplifikace s těmito dvěma primery při použití dostatečně krátkého času polymerace tedy nebude účinně probíhat. Forward primer 2 bude u mutované sloupcové alely (Co) nasedat na dvou místech (v 5' LTR Gypsy-44 a 3' LTR Gypsy-44, neboť tyto sekvence vykazují 100% homologii), primer nasedající v 3' LTR (pozice 71296 v HF968765) však opět nebude schopen tvořit při PCR dostatečné množství produktu, jelikož je vzdálen od Reverse primeru 1 téměř 6,5 kb.

Prvním krokem pro stanovení alel lokusu sloupcového růstu jabloně domácí (*Malus x domestica* Borkh.) je izolace genomové DNA, následuje PCR s využitím sady primerů a sond pro specifickou amplifikaci výše uvedených alel a stanovení délky ampliconů elektroforézou v agarózovém gelu, ve výhodnějším provedení s použitím sond analýzou fluorescenčního signálu

po provedení PCR v reálném čase. Finálním krokem je vyhodnocení přítomnosti jednotlivých alel.

5 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 specificity PCR detekce jednotlivých alel lokusu sloupcového růstu.

10

Objasnění výkresů

Obrázek 1: Schematický náčrt uspořádání retrotranspozonů a systému primerů a sond v lokusu sloupcového růstu jabloně u alely divokého typu (WT) a mutované sloupcové alely (Co).
15 V případě mutované sloupcové alely (Co) se pro amplifikaci účinně použije pouze Forward primer 2 nasedající v oblasti 5' LTR Gypsy-44, amplifikace z ostatních forwardových primerů nebude probíhat z důvodu velké vzdálenosti od reverzního primeru a krátkého času polymerace při PCR.

20 Obrázek 2: Místa nasedání navržených primerů a sond. Reverse primer 1 je uveden v opačné (forwardové) orientaci. A) Alela divokého typu (WT) lokusu sloupcového růstu (GenBank č: HF968766); B-1) až B-3) Mutovaná sloupcová alela (Co) téhož lokusu (GenBank č: HF968765). V případě mutované sloupcové alely (Co) se pro amplifikaci účinně použije pouze Forward primer 2 nasedající v pozici 77540, amplifikace z ostatních forwardových primerů
25 nebude probíhat z důvodu velké vzdálenosti od reverzního primeru a krátkého času polymerace při PCR.

Obrázek 3: Reprezentativní separace PCR produktů alely divokého typu (WT) a mutované sloupcové alely (Co) na agarózové gelové elektroforéze. WT/WT = 'McIntosh';
30 WT/Co = 'McIntosh Wjicik'; Co/Co = hybrid z křížení dvou sloupcových rodičů nesoucí pouze mutované alely (Co). Paralelně byla amplifikována negativní kontrola bez přítomnosti DNA.

Obrázek 4: Příklad analýzy metodou PCR v reálném čase. Křivky s kroužky – HEX fluorescence (Sonda 1); křivky bez kroužků – FAM fluorescence (Sonda 2). A) 35 vzorků homozygotních pro
35 alelu divokého typu (WT) lokusu sloupcového růstu jabloně; B) 35 vzorků heterozygotních v tomto lokusu (Co/WT) a C) 6 vzorků homozygotních pro mutovanou sloupcovou alelu (Co).

Příklady uskutečnění technického řešení

40

Příklad 1: Návrh sekvencí primerů a sond

Nejprve byly porovnány sekvence alely divokého typu (WT) z odrůdy 'McIntosh' (GenBank č: KF530875, HF968766) a mutované alely (Co) z odrůdy 'McIntosh Wjicik' (GenBank
45 č: KF530876, HF968765) pro definici přesné pozice inserce retrotranspozonu Gypsy-44, a to pomocí nástroje pro porovnávání sekvencí Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Analýzou sekvencí z hlediska identifikace jednotlivých strukturních elementů obou retrotranspozonů (Gypsy-44 a Gypsy-33) a unikátních sekvencí pro zajištění co nejvyšší specifity byly vybrány vhodné oblasti pro navržení primerů
50 a sond, aby mohl celý systém s krátkými reakčními časy fungovat jak při klasické PCR s analýzou na agarózovém gelu, tak při amplifikaci PCR v reálném čase, tj. aby byly fragmenty přijatelně dlouhé pro obě metody (kolem 200 bp).

Při navrhování primerů pro multiplexovou PCR analýzu byly zohledněny následující požadavky:
55 1) co nejvyšší specificita primerů eliminující necílené amplifikace z důvodu vysokého výskytu

zúčastněných retrotranspozonů v genomu jabloně; 2) obdobná teplota tání všech primerů a k tomu přiměřená teplota tání sond; 3) eliminace tvorby dimerů mezi jednotlivými komponentami systému.

- 5 Konkrétně byly pomocí softwaru Vector NTI Advance vybrány následující sekvence jednotlivých primerů a sond:

Forward primer 1: ATTCTAAACGCTATTGTCCTTGG (SEQ ID NO. 1)

- 10 Forward primer 2: GGAACATACTAAGAAAAGACGAGTGA (SEQ ID NO. 2)

Reverse primer 1: TGAGAAGGGGTGAGAAGGC (SEQ ID NO. 3)

Sonda 1: TCGGTCAAGTCTTATGTTAGCTCTGTTTAT (SEQ ID NO. 4) a

15

Sonda 2: ATATGATCCGATCAAGGACTTAAATGTAAT (SEQ ID NO. 5).

- Navržené primery budou při PCR s časem polymerace 30 sekund, což je výrobcem polymerázy čas doporučený pro amplifikaci úseků o délce 200 bp, schopné účinně dávat vznik fragmentům uvedeným v Tabulce 2, které budou detekovány v ní uvedenými sondami:

20 Tabulka 2: Předpokládané produkty vznikající při PCR a jejich detekce u alely divokého typu (WT) (GenBank č.: HF968766), respektive mutované sloupcové alely (Co) (GenBank č.: HF968765) lokusu sloupcového růstu jabloně.

25

Malus domestica, alela divokého typu (WT) (GenBank č.: HF968766)			
<i>F primer</i>	<i>R primer</i>	<i>Předpokládaná délka PCR produktu</i>	<i>Sonda</i>
Forward primer 1	Reverse primer 1	233 bp	Sonda 1
Forward primer 2	Reverse primer 1	0	0
Malus domestica, mutovaná sloupcová alela (Co) (GenBank č.: HF968765)			
<i>F primer</i>	<i>R primer</i>	<i>Předpokládaná délka PCR produktu</i>	<i>Sonda</i>
Forward primer 1	Reverse primer 1	8 433 bp*	0
Forward primer 2 (v pozici 71296 HF968765)	Reverse primer 1	6 439 bp*	0
Forward primer 2 (v pozici 77540 HF968765)	Reverse primer 1	195 bp	Sonda 2

* nepravděpodobný vznik díky krátkému času polymerace při PCR

- 30 Příklad 2: Detekce alely divokého typu (WT) a mutované sloupcové alely (Co) lokusu sloupcového růstu jabloně metodou PCR v klasickém uspořádání

- Pro detekci přítomnosti alely divokého typu (WT) a mutované sloupcové alely (Co) lokusu sloupcového růstu jabloně byla izolována celková DNA pomocí soupravy Exgene Plant SV mini (GeneAll Biotechnology). Připravená DNA (2 µl) byla použita jako templát pro PCR reakci v objemu 20 µl s následujícími reakčními komponentami (uvedeny výsledné koncentrace): 1x TopBio Blue buffer complete (Top-Bio); 200µM dNTP každý (Genaxxon); 1U Combi Taq DNA polymeráza (Top-Bio); 250nM primery Forward primer 1, Forward primer 2, Reverse primer 1
- 35 každý, reakce byla doplněna do 20 µl vodou. PCR amplifikace probíhala v PCR cyklu C1000 (Biorad) s následujícím teplotním profilem: úvodní denaturace 98 °C/1 minuta; amplifikace ve 40 cyklech: 40x (98 °C/10 s, 58 °C/10 s, 72 °C/15 s); finální extenze 72 °C/30 s.

Pro PCR detekci nemutované alely divokého typu (WT) lokusu sloupcového růstu jabloně se v reakci použily tyto primery:

5 Forward primer 1: ATTCTAAACGCTATTGTCCTTGG (SEQ ID NO. 1) a

Reverse primer 1: TGAGAAGGGGTGAGAAGGC (SEQ ID NO. 3)

s očekávaným fragmentem o délce 233 bp.

10

Pro PCR detekci mutované sloupcové alely (Co) lokusu sloupcového růstu jabloně se v reakci použily tyto primery:

Forward primer 2: GGAACATACTAAGAAAAGACGAGTGA (SEQ ID NO. 2) a

15

Reverse primer 1: TGAGAAGGGGTGAGAAGGC (SEQ ID NO. 3).

S očekávaným fragmentem o délce 195 bp.

20 Po ukončení reakce byly vzniklé PCR amplikony analyzovány elektroforeticky na 3% agarózovém gelu, výsledky této analýzy jsou zachyceny na Obrázku 3, kde vzniklé fragmenty délkově odpovídají očekávání.

25 PCR fragmenty získané z kontrolních odrůd ('McIntosh'; 'McIntosh Wijcik') byly vyříznuty z gelu, vyizolovány soupravou ExpinTM Combo GP podle doporučení výrobce (GeneAll Biotechnology). Izolované fragmenty byly osekvenovány soupravou BigDyeTM Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (ThermoFisher Scientific) za použití amplifikačních primerů a následně analyzovány na genetickém analyzátoru Applied Biosystems 3500 genetic analyzer (ThermoFisher Scientific). Sekvence byly analyzovány metodou Blast

30 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) a získané výsledky odpovídaly amplifikaci předpokládaných úseků alely divokého typu (WT) (GenBank č.: HF968766), respektive mutované sloupcové alely (Co) (GenBank č.: HF968765).

35 Příklad 3: Detekce alely divokého typu (WT) a mutované sloupcové alely (Co) lokusu sloupcového růstu jabloně metodou PCR v reálném čase

Pro detekci přítomnosti alely divokého typu (WT) a mutované sloupcové alely (Co) lokusu sloupcového růstu jabloně byla izolována celková DNA pomocí soupravy Exgene Plant SV mini (GeneAll Biotechnology). Připravená DNA (2 µl) byla použita jako templát pro PCR reakci

40 v objemu 20 µl s následujícími reakčními komponentami (uvedeny výsledné koncentrace): 1x µl qPCR Blue Master Mix (Top-Bio); 250nM Forward primer 1, 500nM Forward primer 2, 500nM Reverse primer 1, 200nM Sonda 1, 250nm Sonda 2, reakce byla doplněna do 20 µl vodou. PCR amplifikace probíhala v Rotor-Gene Q (Qiagen) real-time PCR cyklieru s následujícím teplotním

45 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 nemutované alely divokého typu (WT) lokusu sloupcového růstu jabloně se v reakci použily následující primery a sonda, jejichž sekvence jsou:

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

Reverse primer 1: TGAGAAGGGGTGAGAAGGC (SEQ ID NO. 3) a

Sonda 1: TGCGTCAAGTCTTATGTTAGCTCTGTTTAT (SEQ ID NO. 4),

55

kde byla Sonda 1 fluorescenčně značena HEX fluoroforem,

a pro PCR detekci mutované sloupcové alely (Co) lokusu sloupcového růstu jabloně se v reakci použily následující primery a sonda, jejichž sekvence jsou:

5

Forward primer 2: GGAACAACTAAGAAAAGACGAGTGA (SEQ ID NO. 2)

Reverse primer 1: TGAGAAGGGGTGAGAAGGC (SEQ ID NO. 3) a

10

Sonda 2: ATATGATCCGATCAAGGACTTAAATGTAAT (SEQ ID NO. 5),

kde byla Sonda 2 fluorescenčně značena FAM fluoroforem.

Výsledky byly analyzovány dodaným softwarem k tomuto zařízení Rotor-Gene Q Series Software, typický výstup je zachycen na Obrázku 4.

15

Průmyslová využitelnost

20 Navržená sada primerů a sond pro PCR detekci sloupcového růstu u jabloní je využitelná pro molekulárními markery asistovanou selekci jabloní křížených pro sloupcový růst, a to již ve stádiu několikátýdenních semenáčů. Takto raná selekce přináší nemalé finanční úspory díky tomu, že šetří práci, materiál i prostor nezbytné pro pěstování semenáčů vzniklých z těchto křížení. Konkrétně jsou detekovány 1) alela divokého typu (WT) lokusu sloupcového růstu
25 jabloně domácí (*Malus × domestica* Borkh.) a 2) mutovaná sloupcová alela (Co), kde tato mutovaná alela pochází z odrůdy 'McIntosh Wijcik'. Ve výhodném provedení probíhá detekce v jediné reakci metodou PCR v reálném čase umožňující velmi rychlou analýzu velkého počtu vzorků. Zároveň tato sada umožňuje rozlišení heterozygotů WT/Co od homozygotů nesoucích pouze mutovanou sloupcovou alelu (Co) v jediné reakci, což je velkým přínosem pro šlechtitele, protože homozygoté Co/Co budou v dalším křížení poskytovat jedince nesoucí vždy alespoň
30 jednu mutovanou sloupcovou alelu (Co). V tomto případě tedy nebude nutné semenáče vůbec testovat a všechny budou mít sloupcový tvar růstu, což přinese další úspory při šlechtění sloupcových jabloní.

35 Seznam použité literatury

Patentová literatura:

40 Wolters PJ, Baldi P, Schouten HJ, Velasco R, Si-Ammour A (2013) Co gene MdCo31 of the 'Wijcik' mutant of *Malus × domestica* Borkh and plants with controlled tree architecture genetically transformed by introduction of this gene - EP2754711A1

Nepatentová literatura:

45 Baldi P, Wolters PJ, Komjanc M, Viola R, Velasco R, Salvi S (2013) Genetic and physical characterisation of the locus controlling columnar habit in apple (*Malus × domestica* Borkh.). *Molecular Breeding* 31:429–440. <https://doi.org/10.1007/s11032-012-9800-1>

50 Blazek J (1992) Segregation and General Evaluation of Spur Type or Compact Growth Habits in Apples. *Acta Hort* 317:71–79. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1992.317.6>

Blazek J, Krelinova J (2011) Tree growth and some other characteristics of new columnar apple cultivars bred in Holovousy, Czech Republic. *Hort. Sci. (Prague)* 38:11–20. <https://doi.org/10.17221/23/2010-HORTSCI>

55

- Conner PJ, Brown SK, Weeden NF (1997) Randomly amplified polymorphic DNA-based genetic linkage map of three apple cultivars. *Journal of American Society for Horticultural Science* 122:350–359. <https://doi.org/10.21273/JASHS.122.3.350>
- 5 Fisher DV (1970) Spur strains of McIntosh discovered in British Columbia. *Journal of the American Pomological Society*, 24:27–32.
- Lapins K (1969) Segregation of compact growth types in certain apple seedling progenies. *Can. J. Plant Sci* 49:765–768. <https://doi.org/10.4141/cjps69-130>
- 10 Lazăr AM, Baciú AA (2015) Growth and fructification characteristic at apple hybrids with columnar port, resulted from various combinations and mutations, as compared to standard descendants. *JOURNAL of Horticulture, Forestry and Biotechnology* 19:71-76.
- 15 Okada K, Wada M, Moriya S et al. (2016) Expression of a putative dioxygenase gene adjacent to an insertion mutation is involved in the short internodes of columnar apples (*Malus × domestica*), *Journal of Plant Research* 129:1109-1126. <https://doi.org/10.1007/s10265-016-0863-7>
- 20 Otto D, Petersen R, Brauksiepe B, Braun P, Schmidt ER (2014) The columnar mutation (“Co gene”) of apple (*Malus x domestica*) is associated with an integration of a Gypsy-like retrotranspozón. *Molecular breeding* 33:863-880. <https://doi.org/10.1007/s11032-013-0001-3>
- Petersen R, Krost C. (2013) Tracing a key player in the regulation of plant architecture: the columnar growth habit of apple trees (*Malus × domestica*). *Planta* 238:1–22. <https://doi.org/10.1007/s00425-013-1898-9>
- 25 <https://doi.org/10.1007/s00425-013-1898-9>
- Sun HY, Dai HY, Zhao GL, Ma Y, Ou CQ, Li H, Li LG, Zhang ZH (2008) Genome-wide characterization of long terminal repeat-retrotranspozons in apple reveals the differences in heterogeneity and copy number between Ty1-copia and Ty3-gypsy retrotranspozons. *J Integr Plant Biol.* 50:1130-9. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2008.00717.x>
- 30 <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2008.00717.x>
- Wolters PJ, Schouten HJ, Velasco R, Si-Ammour A, Baldi P (2013) Evidence for regulation of columnar habit in apple by a putative 2OG-Fe(II) oxygenase. *New phytologist* 200: 993-9. <https://doi.org/10.1111/nph.12580>
- 35 <https://doi.org/10.1111/nph.12580>
- Corrigendum for Wolters (2013): *New Phytologist* 2015, 207:928. <https://doi.org/10.1111/nph.13412>.
- 40 Zhang YG, Dai HY (2011). Comparison of photosynthetic and morphological characteristics, and microstructure of roots and shoots, between columnar apple and standard apple trees of hybrid seedlings. *Phyton.* 80. 119-125.

NÁROKY NA OCHRANU

45

1. Sada primerů a sond pro současnou PCR detekci nemutované alely divokého typu (WT) a mutované sloupcové alely (Co) lokusu sloupcového růstu jabloně domácí (*Malus × domestica* Borkh.), **vyznačující se tím**, že obsahuje primery a značené hybridizační sondy, jejichž sekvence jsou
- 50

Forward primer 1: ATTCTAAACGCTATTGTCCTTGG (SEQ ID NO. 1)

Forward primer 2: GGAACATACTAAGAAAAGACGAGTGA (SEQ ID NO. 2)

55

Reverse primer 1: TGAGAAGGGGTGAGAAGGC (SEQ ID NO. 3)

Sonda 1: TGCGTCAAGTCTTATGTTAGCTCTGTTTAT (SEQ ID NO. 4)

5 Sonda 2: ATATGATCCGATCAAGGACTTAAATGTAAT (SEQ ID NO. 5),

kde hybridizační sondy jsou vhodně označeny pro jejich současnou detekci v průběhu PCR reakce,

10 přičemž pro PCR detekci nemutované alely divokého typu (WT) lokusu sloupcového růstu obsahuje sada primery a značenou hybridizační sondu, jejichž sekvence jsou:

Forward primer 1: ATTCTAAACGCTATTGTCCTTGG (SEQ ID NO. 1)

15 Reverse primer 1: TGAGAAGGGGTGAGAAGGC (SEQ ID NO. 3)

Sonda 1: TGCGTCAAGTCTTATGTTAGCTCTGTTTAT (SEQ ID NO. 4)

20 a pro PCR detekci mutované sloupcové alely (Co) lokusu sloupcového růstu obsahuje sada primery a značenou hybridizační sondu, jejichž sekvence jsou:

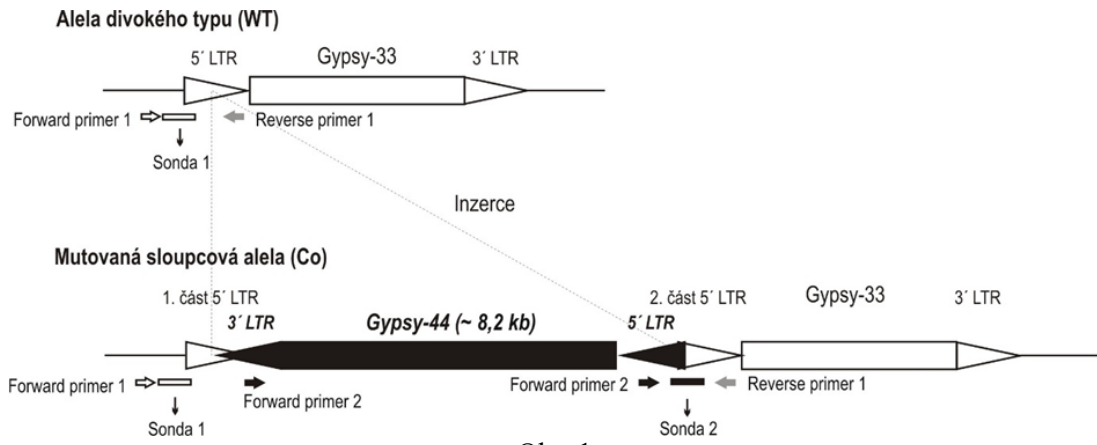
Forward primer 2: GGAACAACTAAGAAAAGACGAGTGA (SEQ ID NO. 2)

Reverse primer 1: TGAGAAGGGGTGAGAAGGC (SEQ ID NO. 3)

25

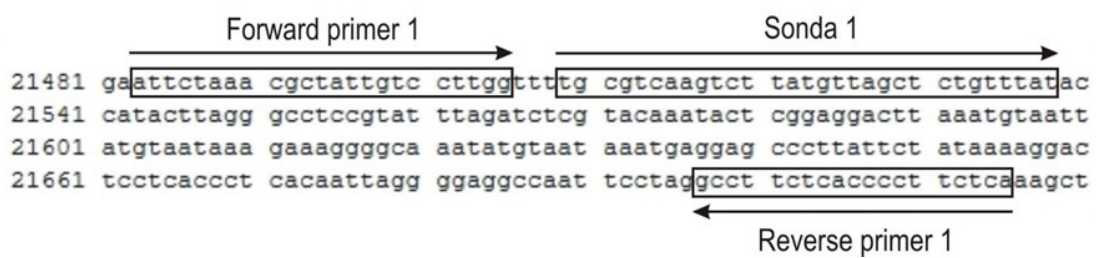
Sonda 2: ATATGATCCGATCAAGGACTTAAATGTAAT (SEQ ID NO. 5).

7 výkresů



Obr. 1

Alela divokého typu (WT) - HF968766



Obr. 2A

Mutovaná sloupcová alela (Co) - HF968765

Forward primer 1 → Sonda 1 →

```

69301 a[at]tctaaac gctattgtcc ttgg[tt]tgc gtcaagtctt atgtagctc t[gt]ttat[acc]
69361 atacttaggg cctccgtatt tagatctcgt acaaatactc ggaggactga tgcgagaatt
69421 aactagcaca caaattaaac cctctttttg tcaattgtag tataagtata agtagggat
69481 cgttctaggc cggggattag gagggcttgc taaaacctct taaaacata aaaacaaagt
69541 taaaaatatt aaacaagact caaggacaca aaactaggct aaaaactcta ataattcgaa
69601 acacacttaa aatgactcaa aataataaaa acaatcaaaa tagacactag gaattgaaat
69661 ggacggaaat taaattaaaa gactaacaat aaagaaaact aactaataa tataatttaa
69721 taatgggtgg gtgtttggtt ttgatgaaaa gtaaattaaa ctaattaaa ttacagaatt
69781 gacaaaaaca taaattaag gtgaaaggat aaatgacgga ctagctagag ggttcttctc
69841 cacacatgac acatattgca cctaaattga ttttcagtgt ttcttcaat aaattgtgaa
69901 tctcaatact ccagattaac cgtgaacagc acttttttaa tcttcaagtt ttccttaagt
69961 tattgaattg gacggaaaaa cgcatacaac aattcaaac attcttcaa agtcccctac
70021 gtgaaaagca caatagcgt acaatcaaag atcattaac tttgtgaaa ctataagcat
70081 tgacgagaca ttcgtaacta tgaaaagcat gatactcttg ccaagaattt acttaacgtg
70141 attgtgacta gcaaccttta ctactt[gt]ga aaataagttc ataacgatta ggtgaaattc
70201 acttatattc tagcatcaaa ttcatgcatg taaattaagc gtgactctc aaccaacata
70261 cacaaatcag tttttatacy aacggataag taaattgaaa tcacaactta t[ga]aatcaca
70321 accgaaggta atcaattcat attacaaata tattcatggc tttgaattaa cctctagcca
70381 aaataaattt aattacacat tattaacaca aaaataaaat agaagtttgg aaggatttaa
70441 ccgagagaga aggcagcttg ctgcttctgt ctttcaaggc tgcaagggca gcctttcttc
70501 tctttctccc cgccagctgt ctctcaagc gccaaaggca gcttccatcc gtccctcact
70561 cctgtctctc cgtttctgac ctctgttctc gtctcctctg cgaactgcc aaagggcagt
70621 cccttctccc gtgcgcaccg ccttattccc ccttttctt cctatattc tctttttt
70681 tctttt[gt]g ctgtcacatt tctcttccc t[gt]c[ca]agct gccaaatggc agccttccc
70741 cggactctcc tacaaagccc ccctatcagc tctctcctc agcttttctt ttacatcct
70801 ctggatccaa gaaaagaatc atagggctcg tgc[ca]agtg cgagagctgg acccagcggc
70861 tgacctctta gctgtcaaag gcagctccca atcctcttc ctcttccat ctgacagtcc
70921 tttttcttta ttttattatt cttttattt gccatccca ctctcttgg ctgtcccggt
70981 tgctttctct gttttccagt cctcccgc tctactctc tttgccttg gattctttc
71041 tttctttgtc caactcttc tttccaccgt tttcttctt ttttttttc tacaaaacaa
71101 aaccatcatg atgatgttc aaacatc[ct]c acgactt[ct]c attattaat ataatttta
71161 atttaattta aaagctgatc tacacagaca gtttgacga atttattaca taaaattca
71221 ctgttctat ttttatttc tttgcataac aaatcctata aacacaaaa taacgtaaat

```

Forward primer 2 →

```

71281 agctcaaaaa tataa[gg]aac taactaagaa aagacgagtg a[tt]tcgaagt aaaaatatat
71341 ataaat[ct]ga tccgatcaaa tacc[cc]caca cttaactttt gctagtctc gagcaaaaca
71401 aagaaaacta gaataagaag taacaagaaa aacattagct tcccctatg tgaccctcat
71461 agaatttcat tcgagaaaac aaatcatcaa gaacctagc tagcatcaag gaactaaacc
71521 acattcatct tcttattca aatattagca gtaatctttg aatcatcctt caagtgtagt
71581 gtgtgagata gccatgctaa tgcaatttca agtttttatt ttaaaatca tcatatgcaa
71641 actagtaacc ttctcaggg atatacactc aatcacatat gtgttagtt ttaatgtgtt
71701 tcgctcaaag aatcaa[ct]gt gaaatttcta ccataagctt gcataaagat cacttctcca
71761 cagtcataat tgcaaaactt aaatcaagag gacttttatt ggatgtaat aggcttaggg
71821 agagggttat tgaaacgaaa gaatag[ga]aaa acacaagttc caagctacat tgcaagcaat
71881 tcttttctt agattataa aaactcaagc tctccaacga ttcttctgaa acctccaacc
71941 acacccttaa actgaaact ta[aa]aaactt ttatttctt t[gt]atataat ccttctttt
72001 cttttttt tttttttt tttttttt tttttttt tttaaataca aatatgaaat
72061 acccccacac ttattcttt gccaaacacc ttcacagtac ttcaccaacg tttctcataa
72121 gacaattt[ct]g cattgctcgc ttggaaaggg taaggaaaaa t[gt]ttcaggt ataagggtag
72181 acatatctgg tgataagaaa taaaaggttc aacatacaca gctcaaattg gcaactaat
72241 gat[ct]cattt ttctttggga aacatgggta tttgggcat agtggtaaac ctaatgctc
72301 tatcatttcc aagttcatgc aatcaatgac aaacaattcg aaagatcgt acgcaagttc
72361 tagagatgta tatcacataa gttcatcaca cataaaaaa taggagtgta tgaaaaatgc

```

Obr. 2B-1

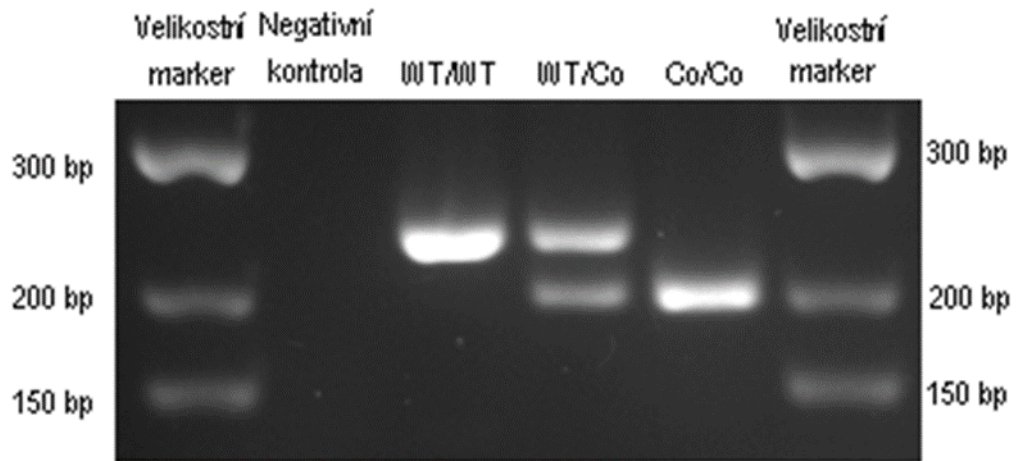
72421 acacactttc aataggctca aaaactcaca taggatgtat atggctacta aattcacata
72481 tgaagcttta agtcatactt tagtttcacg ttaacaaggc tatgtgcatt tgggttttca
72541 aagatgggtca aacatgtaca aaactaacia gagaataagg aatttcacia aacacatggt
72601 aactaagttc ttgatgatca tggttcaaat tttatccaat tatatcattg ggtcgggaaa
72661 ctaacaaaaa atctaattca aaacaataag ggaacaaga caatattttt ggatttttta
72721 aatttttatt tctttttttt tttttttttt ttttttttta aaagaaaaa aaactaatta
72781 agaacacaaa aaaaaacaac aacacagaga caaatgaaat tctggagatt tctaccccca
72841 cacttaaaact tgacattgtc cccaatgtca gaaaacacta taatgcaaat aaaaaataaa
72901 taaataaata aataagaaac aaaataaaaac aattggactg aaaacttccc taatttgcag
72961 taaaatcaag cgatgacccc caagctaaaa ttctgcaatc aacttcaagg gtggaataaa
73021 ctaaaagttc ctgcaaagaa aagaaataat tcagttaagt acgcaagaaa attaattaaa
73081 aaaaaatgca aacgaaaaat tgaaaattac gataaaagat aatgaataaa actaataagt
73141 aatcattggt cgtgcttgtt gactttccac agctttcctc ttgaacaggg tgacacttag
73201 ctttttacta tttgatgata ttgtacggcg gagctttgct ctttgggaat gttgcagttc
73261 cttattcggt ctccaagcag atgtggcagc ttctctagtt cttcagttcg gactccttgt
73321 gctgggttga ttgtacgagc tgcattcttc tctgcttgtt tcttctgtac gttgtctcca
73381 catgctgctg gtatcatttt cgcttgcctt atctgttctt caggtagatg tggcagcttc
73441 tttggaagta catcagcagt ggaagacgag tactcgagag caatttctcc atgtcctgca
73501 ggttagaaca aagacaagga aaaggacatg gagaatgcat gatatgagat actccttgctt
73561 tcaaccttta tgatatgaaa tacttttgcct ttgaatgggt tgctcgcagg agtatcccaa
73621 ggaatgagga acacagagtg actcgagagg attccttggg aatgcatttt cggagatgaa
73681 gaggtgttga gaggggtgtc tgagagagtg tgcttttgcct gtggaaggcg aaggtagaaa
73741 cttataggac ttgtcttcac aaccggaact gttctctcac ttagtgctcg cagccgggtg
73801 atgggtgaag aatacaaat acgcgcttcc tgacaaaagct gcccgtaatt tccgcaaagc
73861 tgattcctca ttgatattctg taatcggcgc ttcgagctct gagcatcgtc gattgtagag
73921 gtagcatgtg acacgtgagg ataaatctgg aaaagaagat tttcccgtgg gttgaagccc
73981 agcttttgag aaagctagcg tgtctttgac tgttgaattt cctccttoga tttctgaatt
74041 ggtgcttoga caaattgccc gagatttccg caaagcaatt tgcgtgtgac aagtgacgac
74101 acgtctggac aaattgatct tttgaaatcc ggggttccgc tgcgtggttc tgagcaagcc
74161 cagcctttaa gaaatgaaac gcctcttttg agaaaagaat ccggcttttg agaaaggaaa
74221 ctctcttttt gagaaaagaa tcagacgttt gagaacggag ccccgactct tcgatttgcg
74281 agaggacgct tctctgagga ggcctctttt gatttcttcc tttttataga gacgtaagc
74341 ttgttccaca acacacttga gctcctctct gtaaactc ccttcttga cttgtttaat
74401 cttgatcatt ccgactctct tctttcttca ccactctga aaaatgtctg gcccttccga
74461 tcgtcgtttt gacttgaacc gtggtgaaga ggcagctccg ccttcaccag acaacatag
74521 ggggccatcc ttcatatccc ctaccggtcc ccttaccgtg ggggattoga tgatgaaaaa
74581 tgacatgacc gctgcggtgg tggccgaaa ccttgtcact cccagagata acagactgct
74641 cgcaaggcgg tctgatgaat tggcggtaaa ggagtctctg gctctcagtg tgcagtgtgc
74701 gggttccgta tccaacatgg cccaacgcct atatgccga acccgctcag ttgaaatcctt
74761 ggtggctgaa atacagagtc tcaagcaaga gattaagggt ctcaagcatg agaataagga
74821 attgcacaag ctgcacaca gctatgccac cagcatgaag aggaagattg accagatgca
74881 ggacaccgat ggtcaaattt tacttgatca tcggagggtt gtgggtttgt tccaaccgca
74941 tctgccttgc tcttctggag cggcaccgcg tagtgaagct ccaactgatc aacctctgcc
75001 gcctcctcct tctgtggccc cggcactgct tgaagacca cccgaccaat gaatactatt
75061 agtttacatt attgtaaaaa tatttgcatt tttttttttt tttttttttt tttttttttt
75121 ttaattttta aatttttttt tttttttttt ttttttttta tgtaattttt ttttttcatt
75181 aaatttaaaa tttttcccct tttttttttt tttttttaaa ttaaattttt tttttttttt
75241 tttttttttt ttgtaaatta atgtaaagag actttgggta accttcccc acacttaaac
75301 taagtaatac aaactcacag aaatcaacca aataacacaa ctaactaaac aaaaacaaat

Obr. 2B-2

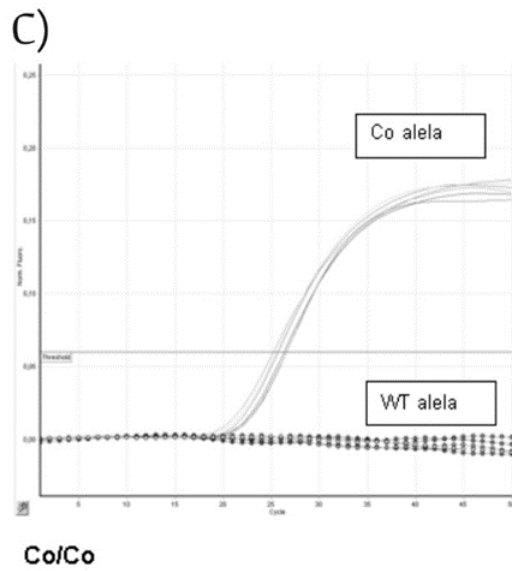
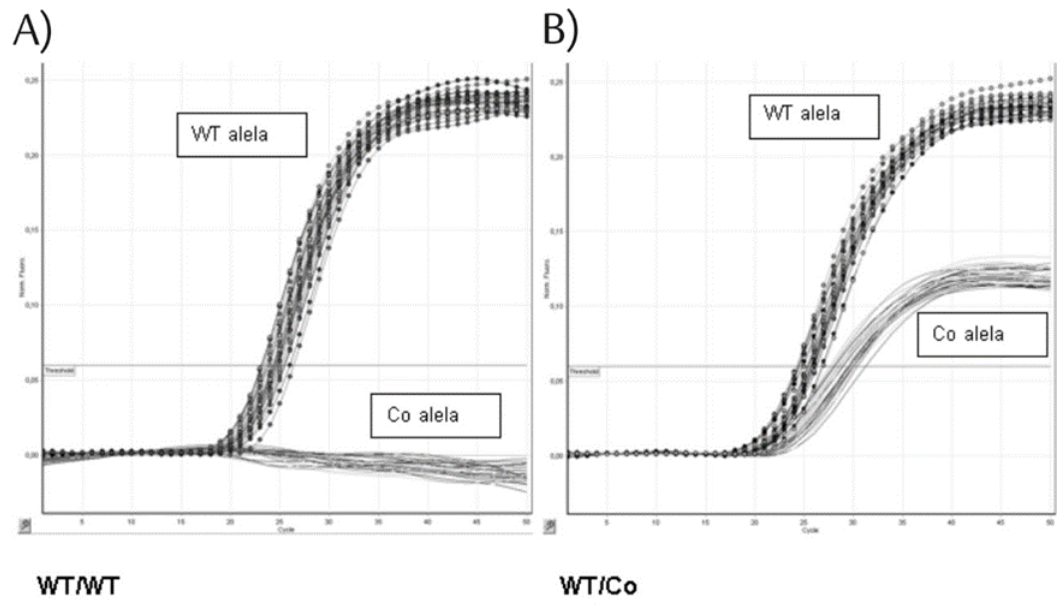
75361 gaaagcagca aagataaggg tgtaaaaatg caaatctgat tgggttagcg attccaaagt
 75421 ctcccttcgt tgaatgcttg ggttgccctcc caagaagcgc ttgatttaac gtcttttagcc
 75481 ggacgcatct ttcctttaa tttccctcag ctccatttga acctaaaatc aaagaaagaa
 75541 aaataaatca aatatcaaaa gtaaaataca caaacaccaa tataaacata aacaaaaaca
 75601 aaaataaaaag gattagcaaa gttactaatc cccggcaacg gcgccaaaat ttgatgagag
 75661 aattaactag cacacaaatt aaaccctctt tttgtcaatt gtagtataag tataagtagg
 75721 gtatcgttct aggccgggga ttaggagggc ttgctaaaac ctcttaaaaa cataaaaaaca
 75781 aagttaaaaa tattaacaa gactcaagga cacaaaacta ggctaaaaac tctaataatt
 75841 cgaaacacac ttaaatgac tcaaaataat aaaaacaatc aaaatagaca ctaggaattg
 75901 aatgggacgg aaattaaatt aaaagactaa caataaagaa aactaactaa ataataaat
 75961 ttaataatgg gtgggtggtt ggttttgatg aaaagtaaat taaactaat taaattacag
 76021 aattgacaaa aacataaaat taagggtgaaa ggataaatga cggactagct agagggttct
 76081 tctccacaca tgacacatat gcaacctaaa ttgattttca gttgttcttt caataaattg
 76141 tgaatctcaa tactccagat taaccgtgaa cagcactttt ttaatcttca agttttcctt
 76201 aagttattga attggacgga aaaacgcata caacaattca aaacattctt caaaagtccc
 76261 ctacgtgaaa agcacaatag cgatacaatc aaagatcatt aaactttgtg aaaactataa
 76321 gcattgacga gacattcgta actatgaaaa gcatgatact cttgccaaaga atttacttaa
 76381 cgtgattgtg actagcaacc tttactactt gtgaaaataa gttcataacg attaggtgaa
 76441 attcacttat attctagcat caaattcatg catgtaaatt aagcgtgcac tctcaaccaa
 76501 catacacaaa tcagttttta tacgaacgga taagtaaatt gaaatcacia cttatgaaat
 76561 cacaaccgaa ggtaatcaat tcatattaca aatatattca tggctttgaa ttaacctcta
 76621 gccaaaataa atttaattac acattattaa cacaaaaata aaatagaagt ttggaaggat
 76681 ttaaccgaga gagaaggcag cttgctgctt ctgtctttca aggctgcaag ggcagccttt
 76741 cttctctttc tccccgccag ctgtctctca agctgccaaa ggcagcttcc atccgtccct
 76801 cactcctgtc tctccgtttc tgacctctgt ttctgtctcc tctgcgaact gcccaaaggg
 76861 cagtcccttc tcccggtgag accgccttat tccccctttt ctttcctata tttcttcttt
 76921 ttttttcttt tgtgctgtca catttctctt cccctgctca agctgccaaa tggcagcctt
 76981 tccccggact ctctacaaa gccccctat cagctctctc ctccagcttt tctttttaca
 77041 tcctctggat ccaagaaaag aatcataggg ctgctgcaa gtggcgagag ctggaccag
 77101 cggctgacct cttagctgtc aaaggcagct cccaatctc tccctcctt ccatctgaca
 77161 gtcctttttc tttattttat tattctttta ttttgccatc cccacttctc ttggctgtcc
 77221 cgtttgcttt ctctgttttc cagtctccc cgcatctact cctcttttgc cttggattct
 77281 ttcctttctt tgtccaactc tttctttcca ccgttttctt tctttttttt tttctacaaa
 77341 acaaaacat catgatgatg tttcaaacat catcagact tatcattatt aaatataatt
 77401 ttttaatttaa tttaaaagct gatctacaca gacagtttg acgaatttat tacataaaat
 77461 ttcacttggt ctatttttat tttctttgca taacaaatcc tataaacaca aaaataacgt

77521 aaatagctca aaaatataag gaactaacta agaaaagacg agtgaattcg aagtaaaaaat
Sonda 2
 77581 atatataaat atgatccgat caaggactta aatgtaatta tgtaataaag aaaggggcaa
 77641 atatgtaata aatgaggagc ccttattcta taaaaggact cctcaccctc acaattaggg
 77701 gaggccaatt cctaggcctt ctcaccctt ctcaaagctc tcattctcag agctctctct
Reverse primer 1

Obr. 2B-3



Obr. 3



Obr. 4