

UŽITNÝ VZOR

(11) Číslo dokumentu:

35 603

(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: **2021-39205**
(22) Přihlášeno: **23.09.2021**
(47) Zapsáno: **30.11.2021**

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

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

(54) Název užitného vzoru:
**Sada prumerů a sond pro stanovení alel
markeru genu rezistence Rví6 u jabloně
domácí (Malus x domestica Borkh.)**

CZ 35603 U1

Sada primerů a sond pro stanovení alel markeru genu rezistence *Rvi6* u jabloně domácí (*Malus x domestica* Borkh.)

5 Oblast techniky

Řešení se týká sady primerů a sond navržených pro detekci rezistence jabloně domácí (*Malus x domestica* Borkh.) k patogenu *Venturia inaequalis* (Cooke) G. Winter, konkrétně pro detekci přítomnosti alel markeru genu rezistence *Rvi6*, kdy tato sada umožňuje současně detekovat senzitivní alelu i rezistentní alelu tohoto genu. Alely jsou detekovány pomocí markeru typu 10 jednonukleotidového polymorfizmu (SNP) R156, který je v těsné vazbě s genem rezistence *Rvi6*. Uvedená sada 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 x domestica* Borkh.) je velmi důležitou zemědělskou komoditou, trpí však mnoha chorobami, které snižují produkci komerčně uplatnitelných plodů. Mezi nejzávažnější patří 20 strupovitost jabloně, jejímž původcem je houbový patogen *Venturia inaequalis* (Cooke) G. Winter. Pěstování odrůd citlivých vůči tomuto patogenu může vyžadovat až 20 až 30 postřiků produkčních sadů fungicidními prostředky ročně (Manktelow et al. 1996), které kromě značných finančních nákladů přinášejí i vysokou zátěž životnímu prostředí a mohou ve formě reziduí zůstat v plodech určených pro konzumaci/zpracování. Šlechtění odrůd rezistentních vůči tomuto patogenu je proto 25 v popředí šlechtitelských programů mnoha zemí světa, jelikož kombinace použití rezistentních či odolných odrůd jabloní s technologickými opatřeními 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 30 *V. inaequalis* (geny *Rvi*, Bus et al. 2011; Soriano et al. 2014). Tyto geny rezistence jsou k dispozici ve šlechtění v různých formách (od planých jabloní, ze kterých tyto geny často pocházejí, po již komerčně úspěšné rezistentní odrůdy vzniklé několikanásobným křížením potomků rezistentní plané jabloně s komerčně úspěšnými odrůdami). Většina v současnosti dostupných odrůd jabloní rezistentních ke strupovitosti nese gen rezistence vůči strupovitosti získaný z genotypu *Malus floribunda* 821. Tento gen rezistence označený *Rvi6* (*Vf*) je však v mnoha regionech Evropy 35 překonáván určitými rasami *V. inaequalis* (Parisi et al. 2004). Bohužel však byly na různých místech světa identifikovány virulentní izoláty tohoto patogenu schopné překonat i většinu ostatních genů *Rvi* (Bus et al. 2011; Caffier et al. 2015; Peil et al. 2018). Z víceletého hodnocení genotypů nesoucích jednotlivé geny rezistence prováděného v geograficky odlišných regionech s rozdílným infekčním tlakem (www.vinquest.ch) je evidentní, že populace patogenu *V. inaequalis* 40 se geograficky liší a překonávají jednotlivé geny rezistence s různou četností. Geny rezistence, které jsou překonávány s vyšší frekvencí, je již nyní možné použít k dosažení trvalé rezistence pouze v kombinaci, ideálně s geny překonávanými pouze velmi zřídka nebo dosud nepřekonanými. Strategie šlechtění jabloní k rezistenci vůči strupovitosti je tudíž zaměřena na kumulaci genů 45 rezistence, kdy je rezistence podmíněna dvěma nebo více různými geny. Zda ke kumulaci genů *Rvi* došlo, však není na úrovni fenotypu téměř možné rozpoznat, bylo by nutné použití více izolátů tohoto patogenu schopných překonat pouze jednotlivé použité *Rvi* geny, i ty však mohou být geneticky nestabilní a prolomit rezistenci.

50 V dřívějších dobách byla rezistence vůči strupovitosti výhradně testována 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. Pro průkaz přenosu genů rezistence vůči *V. inaequalis* jsou proto vyvíjeny mnohem průkaznější a informativnější 55 molekulárně genetické markery, které by umožnily jednoduchou a spolehlivou selekci

rezistentních jabloní (marker assisted selection, MAS). Použitím MAS je možné odstranit neperspektivní hybridní potomstvo bez náročného pěstování a testování již v prvním roce po vysetí, což přináší nemalé finanční úspory. První publikace zabývající se molekulárními markery pro geny *Rvi* byly zveřejněny již na konci minulého tisíciletí, kdy se obvykle jednalo o různé spolehlivé markery typu SCAR a SSR (např. Tartarini et al. 1999, Vinatzer et al. 2004 a další). V letech 2015 a 2016 byly publikovány přesnější markery typu jednonukleotidových polymorfizmů (SNP) (pro *Rvi6*: R156 - Jänsch et al. 2015, Y124 - Jänsch et al. 2015; Baumgartner et al. 2016), které jsou vhodnější pro MAS z důvodu snazší analyzovatelnosti více markerů v jediné reakci. SNP markery byly kriticky validovány v nezávislé studii využívající více než 200 různých genotypů a byly vybrány SNP se statisticky nejprůkaznější asociací s rezistencí ($p < 0,00001$) pro *Rvi2*, *Rvi4* a *Rvi6* (Chagné et al. 2019). V této práci byl jako SNP nejtěsněji asociovaný s *Rvi6* validován R156 z lokusu M8S (Jänsch et al. 2015). Zavedení molekulárních metod detekce genů *Rvi* do šlechtění vysoce zefektivňuje a v podstatě jako jediné i umožňuje tvorbu nových prokazatelně rezistentních odrůd jabloní, zejména obsahujících více genů *Rvi*.

Přestože je MAS již zhruba deset let v některých programech pro šlechtění jabloní komerčně využívána (Chagné et al. 2019), nebyly publikovány metody pro analýzu přítomnosti genů *Rvi* umožňující běžně použitelnou jednoduchou analýzu často velmi početného potomstva křížení jabloní. V Jänsch et al. 2015, kde byly tyto SNP popsány, byly amplifikovány a sekvenovány úseky dlouhé 1200 až 1300 bp, sekvenování však nepatří mezi metody vhodné pro analýzu mnoha vzorků, ať již z důvodu pracnosti, či ceny. V dalším článku věnujícím se SNP asociovaným s geny *Rvi* (Baumgartner et al. 2016) byla použita metoda KASPTM, avšak zmíněnou metodou byl testován jiný SNP asociovaný s *Rvi6* (Y124) než R156 používaný v této přihlášce. Tento SNP Y124 ovšem ve validační studii vykazoval menší úspěšnost při identifikaci rezistentního genotypu než SNP R156 a nebyl tak spolehlivý (Chagné et al. 2019). Chagné et al. (2019) použili pro analýzu a validaci 128 různých SNP technologií OpenArray®, tato technologie je ovšem vhodná především pro analýzu velkého počtu SNP a pro vědecké účely, nikoliv pro rutinní testování semenáčků při MAS. Dále jsou pro jabloně komerčně dostupné čipy pro analýzu 20K SNP (https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/product_information_sheets/infinium-arrays-summary-agrigenomics-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 konkrétních SNP u mnoha set či tisíc vzorků, která by byla využitelná v běžné šlechtitelské praxi pro ověřování přítomnosti jednotlivých alel genu *Rvi6*. Proto byla pro jejich detekci vyvinuta níže uvedená metoda, která by byla použitelná v každé laboratoři vybavené v dnešní době běžnými laboratorními přístroji.

Podstata technického řešení

Výše popsaný nedostatek, kterým je nedostupnost jednoduché metody běžně použitelné v každé laboratoři molekulární biologie, díky které by bylo možné spolehlivě otestovat velké množství vzorků, odstraňuje sada primerů a sond pro současnou PCR detekci SNP markeru rozlišujícího senzitivní a rezistentní alelu genu rezistence *Rvi6* 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: TGGTTAATCTCATGTTTCCTCAC (SEQ ID NO. 1)

Reverse primer: AAGTTTGGAGCACACATAAGG (SEQ ID NO. 2)

Sonda 1: ATAAGTCTAAGGTGATTGTG (SEQ ID NO. 3)

Sonda 2: ATAATTGCTAAGGTGATTGTG (SEQ ID NO. 4),

55

kde jsou hybridizační sondy vhodně označeny pro současnou detekci jednotlivých alel v průběhu PCR reakce, přičemž pro PCR detekci senzitivní alely SNP markeru genu rezistence *Rvi6* obsahuje sada primery a značenou hybridizační sondu, jejichž sekvence jsou:

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

Reverse primer: AAGTTTGGAGCACACATAAGG (SEQ ID NO. 2)

Sonda 1: ATAACTGCTAAGGTGATTGTG (SEQ ID NO. 3)

10

a pro PCR detekci rezistentní alely SNP markeru genu rezistence *Rvi6* obsahuje sada primery a značenou hybridizační sondu, jejichž sekvence jsou:

Forward primer: TGGTTTAATCTCATGTTTCCTCAC (SEQ ID NO. 1)

15

Reverse primer: AAGTTTGGAGCACACATAAGG (SEQ ID NO. 2)

Sonda 2: ATAATTGCTAAGGTGATTGTG (SEQ ID NO. 4).

20

Navržené primery a sondy se nacházejí v oblasti M8S (Patocchi et al. 1999). Pomocí primerů a hybridizačních sond je možné v uvedené oblasti detekovat validovaný diagnostický SNP marker nazvaný R156 (A/G) (Jänsch et al. 2015 – identifikace; Chagné et al. 2019 – validace), který je v těsné vazbě s genem rezistence *Rvi6*, a na základě této jednobodové mutace odlišit senzitivní a rezistentní alelu, přičemž nukleotid G je určující pro senzitivní alelu a nukleotid A je určující pro rezistentní alelu. Vzhledem k těsné vazbě mezi *Rvi6* a R156 mohou být v této přihlášce termíny „senzitivní a rezistentní alela (SNP) markeru genu rezistence *Rvi6*“ a „senzitivní a rezistentní alela genu rezistence *Rvi6*“ používány jako synonyma, SNP markerem genu rezistence *Rvi6* je v celé přihlášce míněn zde dále specifikovaný SNP R156, pokud není konkrétně uvedeno jinak.

25

30

Výše uvedený primer SEQ ID NO. 2 se částečně překrývá s primerem z Jänsch et al., 2015 (11 z 21 nukleotidů je shodných). Příslušný překryv obou primerů je však koincidencí, protože tato genomická oblast je výhodná pro návrh primerů pro amplifikaci daného úseku obsahujícího diagnostický SNP R156, neboť neobsahovala u mnoha námi analyzovaných odrůd další polymorfizmy. Primer SEQ ID NO. 2 byl navržen tak, aby došlo k optimální amplifikaci daného úseku v kontextu celého *Rvi6* detekčního systému metodou alelické diskriminace pomocí real-time PCR, o které se Jänsch et al. nezmiňují. Navíc je primer SEQ ID NO. 2 použit v kombinaci s jiným forwardovým primerem, který je zcela nově navržen. V dosavadním stavu techniky se sondy pro PCR v reálném čase nepoužívaly, avšak v systému KASPTM byly pro detekci sousedícího SNP Y124, který však ve validační studii vykazoval menší úspěšnost a spolehlivost při identifikaci rezistentního genotypu, použity alelicky specifické značené primery (Baumgartner et al., 2016). Vzhledem k tomu, že SNP Y124 leží v bezprostřední blízkosti námi využívaného SNP R156, dochází k částečnému překryvu těchto primerů s námi navrženými sondami SEQ ID NO. 3 a SEQ ID NO. 4 (9 resp. 10 z 21 nukleotidů je shodných). Příslušný překryv alelicky specifických primerů z Baumgartner et al., 2016 a sond navržených v této přihlášce je však koincidencí, protože jsou detekovány rozdílné diagnostické SNP markery (SNP Y124 versus SNP R156) a používané metody fungují na odlišném principu.

35

40

45

50

Navržená kombinace primerů pro amplifikaci jednotlivých alel markeru genu rezistence *Rvi6* je vhodná pro současnou nebo individuální analýzu výše uvedených alel u jabloně domácí (*Malus x 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.

55

Prvním krokem pro stanovení alel markeru genu rezistence *Rvi6* jabloně domácí (*Malus x 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.

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 specifity PCR detekce jednotlivých alel markeru genu rezistence *Rvi6*.

10

Objasnění výkresů

Obr. 1: Sekvence (odvozeno od sekvence KM105074, GeneBank) amplifikovaného úseku SNP markeru genu rezistence *Rvi6* 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, SEQ ID NO. 3 a SEQ ID NO. 4 jsou v reverzní orientaci). A) uvádí sekvenci a senzitivní alelu SNP markeru *Rvi6*, B) zachycuje sekvenci a rezistentní alelu SNP markeru tohoto genu. Příslušný SNP polymorfismus je označen jako SNP R156.

20

Obr. 2: Příklad analýzy metodou alelické diskriminace pomocí PCR v reálném čase. Křivky bez kroužků – 6-FAM fluorescence (Sonda 1; SEQ ID NO. 3); křivky s kroužky – HEX fluorescence (Sonda 2; SEQ ID NO. 4). A) detekce heterozygota nesoucího rezistentní i senzitivní alelu genu rezistence *Rvi6* u jabloně s genotypem Res/Sens; B) detekce homozygota nesoucího pouze senzitivní alely s genotypem Sens/Sens a C) detekce homozygota nesoucího pouze rezistentní alely s genotypem Res/Res.

25

Příklady uskutečnění technického řešení

30

Příklad 1: Návrh sekvencí primerů

Na základě známé sekvence oblasti M8S (GeneBank, KM105074) a místa výskytu diagnostického SNP pro detekci genu rezistence *Rvi6* u jabloně byly pomocí softwarů Vector NTI Advance (ThermoFisher Scientific) a Geneious Prime (Biomatters Ltd.) navrženy sekvence jednotlivých primerů a sond. Nejprve byla provedena analýza sekvencí cca 100 různých rezistentních a senzitivních odrůd jabloně z důvodu identifikace dalších možných nesespecifických polymorfizmů v této oblasti. Následně byly vybrány vhodné úseky pro navržení primerů a sond, aby nemusela být provedena jejich degenerace potenciálně snižující účinnost celého systému.

40

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.

45

Byly vybrány následující primery a hybridizační sondy:

Forward primer: TGGTTTAATCTCATGTTTCCTCAC (SEQ ID NO. 1)

50

Reverse primer: AAGTTTGGAGCACACATAAGG (SEQ ID NO. 2)

Sonda 1: ATAAGTCTAAGGTGATTGTG (SEQ ID NO. 3) - pro senzitivní alelu *Rvi6*

55

Sonda 2: ATAATTGCTAAGGTGATTGTG (SEQ ID NO. 4) - pro rezistentní alelu *Rvi6*.

Nasedání primerů a sond je uvedeno na Obrázku 1.

- 5 Příklad 2: Detekce senzitivní alely a rezistentní alely SNP markeru genu rezistence *Rvi6* u jabloně domácí metodou alelické diskriminace pomocí PCR v reálném čase

Pro detekci přítomnosti senzitivní alely a rezistentní alely markeru genu rezistence *Rvi6* u různých odrůd jabloně domácí byla z listů izolována celková DNA pomocí soupravy Exgene Plant SV mini (GeneAll Biotechnology), případně rychlejší metodou pomocí QuickExtract™ (Lucigen) dle 10 návodu výrobců. 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); 250nM Forward primer, 250nM Reverse primer, 250nM Sonda 1, 200nM Sonda 2, reakce byla doplněna do 20 µl vodou. PCR amplifikace probíhala v Rotor-Gene Q 15 (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 *Rvi6* u jabloně se v reakci použily následující primery a sonda, jejichž sekvence jsou:

20 Forward primer: TGGTTTAATCTCATGTTTCCTCAC (SEQ ID NO. 1)

Reverse primer: AAGTTTGGAGCACACATAAGG (SEQ ID NO. 2)

25 Sonda 1: ATAACTGCTAAGGTGATTGTG (SEQ ID NO. 3),

kde byla Sonda 1 fluorescenčně značena 6-FAM fluoroforem, a pro PCR detekci rezistentní alely markeru genu rezistence *Rvi6* u jabloně se v reakci použily následující primery a sonda, jejichž sekvence jsou:

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

Reverse primer: AAGTTTGGAGCACACATAAGG (SEQ ID NO. 2)

35 Sonda 2: ATAATTGCTAAGGTGATTGTG (SEQ ID NO. 4),

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

40

Průmyslová využitelnost

Navržená sada primerů a sond pro PCR detekci rezistence jabloně domácí (*Malus x domestica* Borkh.) k patogenu *Venturia inaequalis* (Cooke) G. Winter, konkrétně pro detekci přítomnosti 45 jednotlivých alel markeru R156 genu rezistence *Rvi6*, je využitelná 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 genu rezistence *Rvi6* a 2) rezistentní alela 50 markeru genu rezistence *Rvi6*. Ve výhodném provedení probíhá detekce 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 *Rvi6*, což je velkým přínosem pro šlechtitele, protože rezistentní homozygoté budou v dalším křížení poskytovat jedince nesoucí vždy alespoň jednu rezistentní alelu tohoto 55 genu. V tomto případě tedy nebude nutné semenáče vůbec testovat a všechny budou nést gen

rezistence *Rvi6*, což přinese další úspory při šlechtění rezistentních jabloní. Dále je nárokována sada primerů a sond pro detekci *Rvi6* využitelná v kombinaci s obdobnými sadami pro detekci dalších genů rezistence vůči *V. inaequalis* pro testování kumulace příslušných genů rezistence, kterou 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.

Seznam použité literatury

- 10 Baumgartner, I. O., Kellerhals, M., Costa, F., Dondini, L., Pagliarani, G., Gregori, R., Tartarini, S., Leumann, L., Laurens, F., and 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 Genet. Genomes* 12:1-21.
- 15 Bus, V. G. M., Rikkerink, E. H. A., Caffier, V., Durel, C.-E., and Plummer, K. M. 2011. Revision of the nomenclature of the differential host-pathogen interactions of *Venturia inaequalis* and *Malus*. *Annu. Rev. Phytopathol.* 49:391-413.
- 20 Caffier, V., Patocchi, A., Expert, P., Bellanger, M. N., Durel, C. E., Hilber-Bodmer, M., Brogini, G. A. L., Groenwold, R., and Bus, V. G. M. 2015. Virulence characterization of *Venturia inaequalis* reference isolates on the differential set of *Malus* hosts. *Plant Dis.* 99:370-375.
- 25 Jänsch, M., Brogini, G. A. L., Weger, J., Bus, V. G. M., Gardiner, S. E., Bassett, H., and Patocchi, A. 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.
- 30 Parisi, L., Fouillet, V., Schouten, H. J., Groenwold, R., Laurens, F., Didelot, F., Evans, K., Fischer, C., Gennari, F., Kemp, H., Lateur, M., Patocchi, A., Thissen, J., and Tsipouridis, C. 2004. Variability of the pathogenicity of *Venturia inaequalis* in Europe. *Acta Hort.* 663:107-529 113.
- 35 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 Journal of Plant Pathol.* 151:533-539.
- 40 Soriano, J., Madduri, M., Schaart, J., van der Burgh, A., van Kaauwen, M. W., Tomic, L., Groenwold, R., Velasco, R., van de Weg, E., and 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. *Mol. Breeding* 34:2021-2032.
- 45 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.
- 50 Vinatzer B. A., Patocchi A., Tartarini S., Gianfranceschi L., Sansavini, S., and 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.

NÁROKY NA OCHRANU

5 1. Sada primerů a sond pro detekci senzitivní alely a rezistentní alely markeru genu rezistence *Rvi6* 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: TGGTTTAATCTCATGTTTCCTCAC (SEQ ID NO. 1)

Reverse primer: AAGTTTGGAGCACACATAAGG (SEQ ID NO. 2)

Sonda 1: ATAACTGCTAAGGTGATTGTG (SEQ ID NO. 3)

15 Sonda 2: ATAATTGCTAAGGTGATTGTG (SEQ ID NO. 4),

kde hybridizační sondy jsou označeny pro jejich současnou detekci v průběhu PCR reakce, přičemž pro PCR detekci senzitivní alely SNP markeru genu rezistence *Rvi6* obsahuje sada primery a značenou hybridizační sondu, jejichž sekvence jsou:

20 Forward primer: TGGTTTAATCTCATGTTTCCTCAC (SEQ ID NO. 1)

Reverse primer: AAGTTTGGAGCACACATAAGG (SEQ ID NO. 2)

25 Sonda 1: ATAACTGCTAAGGTGATTGTG (SEQ ID NO. 3)

a pro PCR detekci rezistentní alely SNP markeru genu rezistence *Rvi6* obsahuje sada primery a značenou hybridizační sondu, jejichž sekvence jsou:

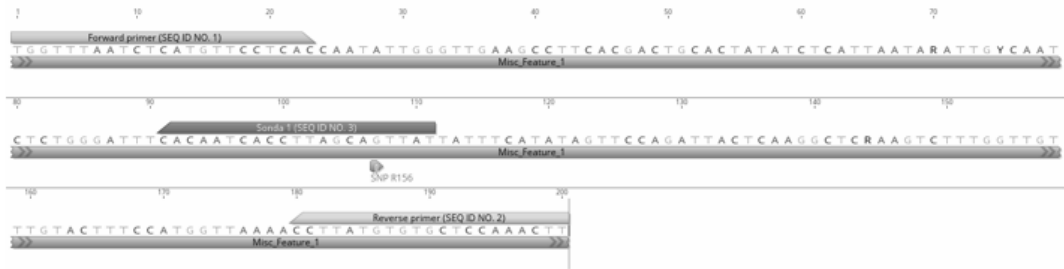
30 Forward primer: TGGTTTAATCTCATGTTTCCTCAC (SEQ ID NO. 1)

Reverse primer: AAGTTTGGAGCACACATAAGG (SEQ ID NO. 2)

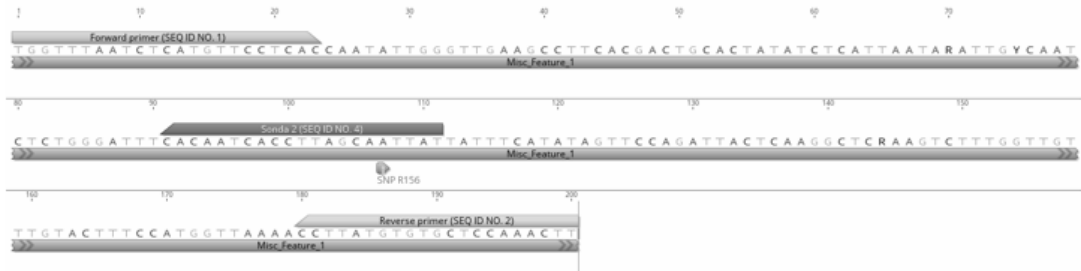
35 Sonda 2: ATAATTGCTAAGGTGATTGTG (SEQ ID NO. 4).

2 výkresy

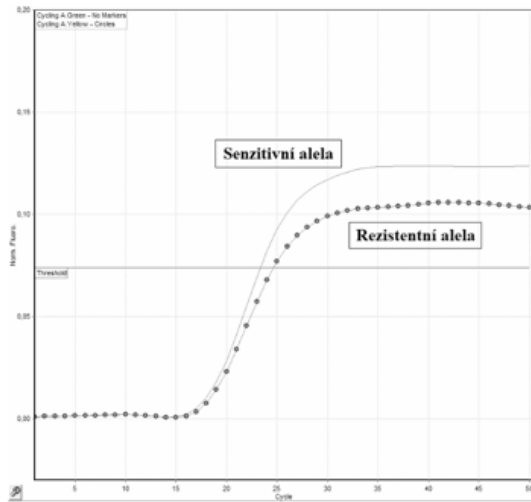
A)



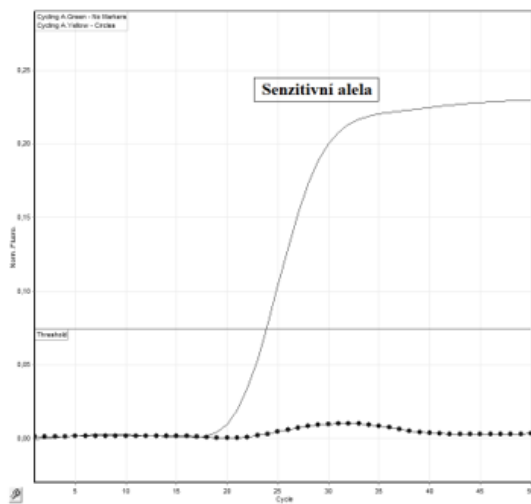
B)



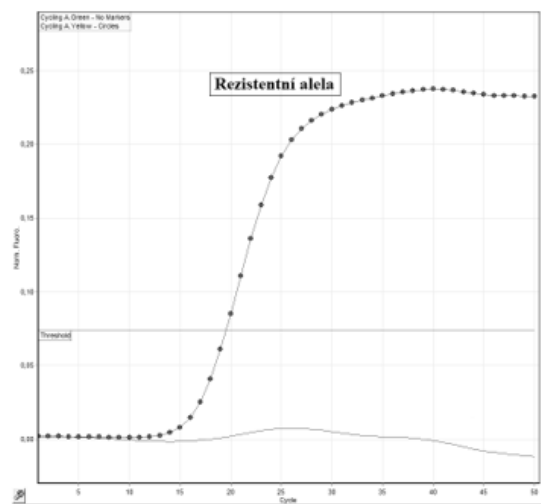
Obr. 1



B)



C)



Obr. 2