

UŽITNÝ VZOR

(11) Číslo dokumentu:

36 766

(13) Druh dokumentu: **U1**

(51) Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2018.01)
C12Q 1/6844 (2018.01)
C12Q 1/686 (2018.01)
C12Q 1/6876 (2018.01)
C12Q 1/6883 (2018.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2022-40428**
(22) Přihlášeno: **03.11.2022**
(47) Zapsáno: **24.01.2023**

(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

(54) Název užitého vzoru:
**Sada primerů pro stanovení alel markerů
genů rezistence Rvi2, Rvi4 a Rvi6 v jedné
reakci metodou SNaPshot u jabloně domácí
(Malus × domestica Borkh.)**

Sada primerů pro stanovení alel markerů genů rezistence *Rvi2*, *Rvi4* a *Rvi6* v jedné reakci metodou SNaPshot u jabloně domácí (*Malus × domestica* Borkh.)

5 Oblast techniky

Řešení se týká sady primerů vyvinutých pro detekci genů rezistence *Rvi2*, *Rvi4* a *Rvi6* jabloně domácí (*Malus × domestica* Borkh.) k patogenu *Venturia inaequalis* (Cooke) G. Winter, kdy tato detekce probíhá v jedné reakci metodou SNaPshot. Tato sada umožňuje současnou detekci 10 senzitivních alel i rezistentních alel markerů typu jednonukleotidového polymorfizmu (SNP), kdy jsou tyto markery v těsné vazbě s uvedenými geny rezistence, a to konkrétně SNP W242, který je v těsné vazbě s genem rezistence *Rvi2*, SNP K146, který je v asociaci s genem rezistence *Rvi4*, a SNP R156, který je v těsné vazbě s genem rezistence *Rvi6*. Navržená sada primerů je vhodná pro molekulárními markery asistovanou selekci jabloně s potenciální rezistencí ke strupovitosti.

15

Dosavadní stav techniky

Jabloně domácí (*Malus × domestica* Borkh.) je jednou z nejpěstovanějších ovocných plodin v našem klimatickém pásmu, může však trpět různými chorobami, které snižují produkci komerčně 20 uplatnitelných plodů. Mezi nejzávažnější a nejčastěji se vyskytující patří strupovitost jabloně, jejímž původcem je houbový patogen *Venturia inaequalis* (Cooke) G. Winter. Jedny z prvních symptomů jsou skvrny objevující se zejména na listech a plodech, které mají zpočátku olivově zelenou barvu a později tmavnou. V těchto místech může docházet k nekrotickým, což vede až 25 k opadu napadených listů a praskání plodů. Praskliny mohou následně vést k hnilobě plodu. Napadené ovoce je neprodejné, výnosnost u neošetřených sadů tak může výrazně poklesnout. 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 30 nákladů přinášejí i vysokou zátěž životnímu prostředí a mohou ve formě reziduí zůstat v plodech určených pro lidskou spotřebu. Šlechtění odrůd rezistentních vůči tomuto patogenu je proto v popředí šlechtitelských programů mnoha zemí světa, jelikož kombinace použití rezistentních či odolných odrůd jabloní s technologickými opatřeními v sadech umožňuje velmi významné snížení spotřeby fungicidů k regulaci tohoto patogenu.

35 Genetická rezistence vůči *V. inaequalis* je dána interakcí genu rezistence (*R*) hostitelské rostliny a genu avirulence (*Avr*) pocházejícího z patogenu (tzv. rezistence gen-pro-gen) (Flor et al. 1971). V posledních dvou desetiletích bylo identifikováno více než 20 různých genů neboli loků rezistence vůči *V. inaequalis*, tzv. geny *Rvi* (Bus et al. 2011; Soriano et al. 2014). Označení gen se 40 běžně používá, i když samotné příčinné geny rezistence nebyly obvykle identifikovány. Tyto geny rezistence obvykle pocházejí z planých jabloní a jejich začlenění do kulturních odrůd jabloně s tržní kvalitou plodů je pracné a časově velmi náročné. Většina v současnosti dostupných odrůd jabloní odolných 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 45 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* se geograficky liší a překonávají jednotlivé geny rezistence s různou četností. Mezi nejvýhodnější 50 geny rezistence, které nebyly překonány nebo byly překonávány pouze vzácně, patří *Rvi5*, *Rvi11*, *Rvi12*, *Rvi14* a *Rvi15*. Geny, které byly překonávány s vyšší frekvencí (*Rvi2*, *Rvi4*, *Rvi6*, *Rvi7*, *Rvi9* a *Rvi13*), je již nyní možné použít k dosažení trvalé rezistence pouze v kombinaci (Patocchi et al. 2020). Populace *V. inaequalis* se však neustále vyvíjí a frekvence překonání určitého genu rezistence se může během velmi krátké doby změnit. Proto je strategie šlechtění jabloní 55 rezistentních vůči strupovitosti zaměřena na tzv. pyramidizaci (kumulaci) genů rezistence, kdy je

rezistence dána dvěma nebo více různými geny. Kromě již zmíněného genu *Rvi6* s nejvíce rozpracovaným kvalitním šlechtitelským materiálem s mnoha registrovanými odrůdami patří v současné době mezi nejvíce využívané geny rezistence vůči *V. inaequalis* *Rvi2* a *Rvi4*, následují *Rvi5*, *Rvi11*, *Rvi12*, *Rvi13* a *Rvi15*, některé z nich se již vyskytují v registrovaných odrůdách (Berra et al. 2017).

Rezistence vůči strupovitosti je klasicky u jabloní testována inokulací původcovského patogenu na rostlinu a sledováním příznaků infekce. Tento test však nemusí být zcela spolehlivý, a především neumožňuje stanovit, který gen rezistence vůči strupovitosti rostlina nese, ani homozygotní či heterozygotní výskyt příslušné rezistentní alely, což je velmi důležitý parametr z hlediska dalšího šlechtění. Není tudíž vhodný ani pro testování kumulace genů *Rvi* v jednom genotypu. Pro testování na základě fenotypových projevů by bylo nutné použít více izolátů tohoto patogenu schopných překonat pouze jednotlivé použité *Rvi* geny, i tyto izoláty však mohou být geneticky nestabilní a prolomit rezistenci. Toto testování je navíc pracné a časově náročné.

Pro průkaz přenosu genů rezistence vůči *V. inaequalis* jsou proto vyvíjeny mnohem průkaznější a informativnější genetické markery, které by umožnily jednoduchou a spolehlivou selekci rezistentních jabloní. Molekulárními markery asistovaná selekce (MAS) umožňuje detekci sledovaných alel již v rané fázi vývoje rostlin (Liebhard et al. 2003) a neperspektivní hybridní potomstvo je možné odstranit bez náročného pěstování a testování již v prvním roce po vysetí. Začlenění MAS do šlechtění má tedy potenciál výrazně zefektivnit šlechtitelský program. První publikace týkající se molekulárních markerů genů *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 markery typu jednonukleotidových polymorfizmů (SNP), které se jeví jako velmi výhodné pro MAS z důvodu relativně snadné analyzovatelnosti i více markerů v jediné reakci. Dosud však byly identifikovány, a především nezávisle validovány, markery pouze pro některé *Rvi* geny, např. *Rvi2*, *Rvi4* a *Rvi6* (Jänsch et al. 2015; Chagné et al. 2019).

Přestože je MAS již zhruba deset let v některých programech pro šlechtění jabloní komerčně využívána (Chagné et al. 2019), nejsou publikovány vhodné metody pro analýzu přítomnosti genů *Rvi* a používané metody detekce bývají firemním tajemstvím. SNP markery lze analyzovat různými molekulárními metodami, využívá se např. metoda KASPTM (kompetitive allele specific PCR) (Baumgartner et al. 2016) či metoda OpenArray[®] screens firmy Thermo Fisher Scientific (Chagné et al. 2019), tyto metody však mají některé nevýhody. Nevýhodou metody KASPTM je její ochrana obchodní značkou firmy LGC Genomics, kdy je celý detekční systém syntetizován jako celek na zakázku a nenabízí tak jednoduchou optimalizaci, kdy mohou být primery pro detekci příslušného SNP podle potřeby upravovány, popřípadě objednávány jednotlivě a u různých firem. Další nevýhoda spočívá v tom, že KASPTM analýza je momentálně nabízena pouze se značením 6-FAM a HEX, tj. pro identifikaci dvou variant jednoho SNP/reakci. V současnosti tedy není možné multiplexování KASPTM analýz více markerů, proto nemusí být KASPTM úplně výhodná pro MAS, a to zejména v situaci, kdy je třeba rutinně analyzovat velký počet vzorků s různými sledovanými znaky. Metoda OpenArray[®] screens firmy Thermo Fisher Scientific je zase vhodná především pro analýzu velkého počtu SNP a pro vědecké účely, nikoliv pro rutinní testování semenáčků při MAS. Je nezbytné pořízení finančně náročného přístrojového vybavení a zároveň zpracování výsledků vyžaduje vysoce kvalifikovaný personál. Další využitelnou metodou je alelická diskriminace pomocí PCR v reálném čase (tato metoda je popsána v užitečných vzorech patřících přihlašovatelé této přihlášky: CZ 35890, CZ 35780 a CZ 35603). Výhodou této metody je její rychlost, jednoduchost a nízká cena. Nevýhodou je skutečnost, že je možné testovat pouze jeden SNP marker na analýzu, teoreticky, v případě náročnější optimalizace a využití čtyř fluorescenčních barviv v reakci, maximálně dva SNP markery na analýzu. V případě více než dvou sledovaných markerů již tato metoda není tak výhodná z důvodu zvyšující se pracnosti a časové náročnosti.

Podstata technického řešení

Popsaný nedostatek, tedy chybějící rychlou a relativně levnou metodu proveditelnou v běžné molekulární laboratoři, díky které je možné analyzovat větší množství SNP markerů vybraných znaků ve velkém počtu vzorků, řeší sada primerů pro současnou detekci SNP markerů rozlišujících 5 senzitivní a rezistentní alely genů rezistence *Rvi2*, *Rvi4* a *Rvi6* jabloně domácí (*Malus × domestica* Borkh.) metodou SNaPshot podle technického řešení, jehož podstata spočívá v tom, že obsahuje primery, jejichž sekvence jsou:

10 primery pro FBsn*Rvi2*-7 SNP W242:

Rvi2 PCR forward primer: GTTAAATTTGACATATGAGAATGTG (SEQ ID NO. 1)

Rvi2 PCR reverse primer: ATACCATATGAYCACAKAGATCATT (SEQ ID NO. 2)

Rvi2 SNaPshot primer 1: ATCATTTATYTAATTTGGCCAAATAATAAA (SEQ ID NO. 3)

Rvi2 SNaPshot primer 2: ATCATTTATCTAATTTGGCCAGATAATAAA (SEQ ID NO. 4)

15

primery pro FBsn*Rvi4*-1 SNP K145:

Rvi4 PCR forward primer: ACAAGAAGGGGAATGTTGACT (SEQ ID NO. 5)

Rvi4 PCR reverse primer: AAGATAAGACCAGTCGCAATAGG (SEQ ID NO. 6)

20 *Rvi4* SNaPshot primer: CCCCCCCCCCATGTTACAYCTGCATCTAAACACT (SEQ ID NO. 7)

primery pro *Rvi6*_M8S SNP R156:

Rvi6 PCR forward primer: TGGTTAATCTCATGTTCTCAC (SEQ ID NO. 8)

Rvi2 PCR reverse primer: AAGTTTGGAGCACACATAAGG (SEQ ID NO. 9)

25 *Rvi6* SNaPshot primer: CCCCCCCCCCTGAGTAATYTGGA ACTATATGAAATAATAA (SEQ ID NO. 10),

kde dle názvosloví IUPAC zastupuje Y v sekvenci primerů nukleotidy C a T a K zastupuje nukleotidy G a T. Všechny SNaPshot primery byly navrženy v reverzní orientaci.

30 Primery navržené pro detekci markeru genu rezistence *Rvi2* se nacházejí v oblasti FBsn*Rvi2*-7 (Jänsch et al. 2015). Pomocí výše uvedených primerů 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 35 jednobodové mutace odlišit senzitivní a rezistentní alelu. Nukleotid T je určující pro senzitivní alelu a nukleotid A je určující pro rezistentní alelu (viz Obr. 1 a Obr. 2). Primery navržené pro detekci markeru genu rezistence *Rvi4* se nacházejí v oblasti FBsn*Rvi4*-1 (Jänsch et al. 2015). Pomocí nárokovaných primerů je možné v uvedené oblasti detekovat validovaný diagnostický SNP 40 marker nazvaný K146 (G/T) (Jänsch et al. 2015 – identifikace; Chagné et al. 2019 – validace), který je v asociaci s genem rezistence *Rvi4*, a na základě této jednobodové mutace odlišit senzitivní a rezistentní alelu, přičemž nukleotid G je určující pro senzitivní alelu a nukleotid T je určující pro rezistentní alelu (viz Obr. 1 a Obr. 2). Primery navržené pro detekci markeru genu rezistence *Rvi6* se nacházejí v oblasti M8S (Patocchi et al. 1999). Pomocí primerů této přihlášky je možné v uvedené oblasti detekovat validovaný diagnostický SNP marker nazvaný R156 (A/G) (Jänsch et 45 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 (viz Obr. 1 a Obr. 2). Vzhledem k těsné vazbě mezi zde zmiňovanými geny rezistence a jejich SNP markery mohou být v této přihlášce termíny „senzitivní a rezistentní alela (SNP) markeru genu rezistence *Rvi2/Rvi4/Rvi6*“ a „senzitivní a rezistentní alela genu rezistence *Rvi2/Rvi4/Rvi6*“ používány jako 50 synonyma, SNP markerem genu rezistence *Rvi2* je v celé přihlášce míněn SNP W242, SNP markerem genu rezistence *Rvi4* je v celé přihlášce zamýšlen zde specifikovaný SNP K146 a SNP markerem genu rezistence *Rvi6* je v celé přihlášce míněn zde dále specifikovaný SNP R156, pokud není konkrétně uvedeno jinak. Alelou je v této přihlášce zamýšlena senzitivní, respektive rezistentní alela konkrétního uvedeného SNP markeru, v principu však může existovat více variant

amplifikovaných sekvencí senzitivní, respektive rezistentní alely na základě přítomnosti dalších nukleotidových změn, které nemusí být ve vztahu s rezistencí vůči *V. inaequalis*.

5 Nárokovaná kombinace primerů je vhodná pro současnou analýzu výše uvedených alel genů rezistence *Rvi2*, *Rvi4* a *Rvi6* u jabloně domácí (*Malus × domestica* Borkh.). Ve výhodném provedení technického řešení jsou PCR amplikony všech příslušných alel detekovány pomocí specifických SNaPshot primerů, které mají pro konkrétní gen rezistence *Rvi2*, *Rvi4* a *Rvi6* rozdílnou délku, aby je bylo možné odlišit pomocí SNaPshot analýzy.

10 Prvním krokem pro stanovení alel markerů genů rezistence *Rvi2*, *Rvi4* a *Rvi6* jabloně domácí (*Malus × domestica* Borkh.) je izolace genomové DNA, následuje nejprve PCR s využitím PCR primerů pro amplifikaci konkrétních fragmentů, které obsahují analyzované SNP markery genů rezistence *Rvi2*, *Rvi4* a *Rvi6*, a poté je provedena detekční SNaPshot reakce s využitím SNaPshot primerů. PCR amplifikace všech tří úseků i detekční SNaPshot reakce probíhají vždy pro všechny
15 tři geny najednou v jedné reakci. Vzhledem k přítomnosti pouze fluorescenčně značených ddNTP v detekční SNaPshot reakci dochází k prodloužení každého detekčního primeru o jediný nukleotid - primery jsou navrženy tak, aby přidaným nukleotidem byl detekovaný SNP. Pomocí této metody je získána směs fragmentů ukončených různými fluorescenčně značenými ddNTP, která je následně analyzována pomocí genetického analyzátoru.

20 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, včetně způsobu zvýšení či snížení jejich teploty tání modifikací
25 chemické struktury a délky, aniž by došlo ke snížení specifity detekce jednotlivých alel markerů genů rezistence *Rvi2*, *Rvi4* a *Rvi6*. Také je možné změnit délku a typ nekomplementární extenze SNaPshot primerů, aniž by došlo k odklonu od této přihlášky. Degenerované primery mohou být nahrazeny kombinací jednotlivých primerů s příslušnými jednotlivými nukleotidy vyplývajícími z typu degenerace, tj. primer obsahující v určité pozici Y může být nahrazen primery obsahujícími
30 ve stejném místě sekvence C, respektive T. Taktéž je možné snížit počet použitých primerů v reakci takovým způsobem, aby byly detekovány pouze jednotlivé geny *Rvi2*, *Rvi4* a *Rvi6*, popřípadě kombinace pouze dvou z těchto tří genů.

35 Objasnění výkresů

Obr. 1: A) Sekvence amplifikované oblasti, která obsahuje SNP marker W242 pro gen rezistence *Rvi2* (SEQ ID NO. 11, odvozena od sekvence KM105014.1, GenBank) a místa nasedání PCR primerů a SNaPshot primerů. Vyznačené sekvence reprezentují místa nasedání jednotlivých
40 primerů s uvedením jejich SEQ ID NO. (SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3 a SEQ ID NO. 4 jsou v reverzní orientaci). Vyznačený SNP marker W242 reprezentuje v sekvenci písmeno W, které podle názvosloví IUPAC zastupuje nukleotidy A (tento nukleotid je charakteristický pro rezistentní alelu) a T (tento nukleotid je charakteristický pro senzitivní alelu). B) Sekvence amplifikované oblasti, která obsahuje SNP marker K146 genu rezistence *Rvi4* (SEQ ID NO. 12, odvozena od sekvence KM105043.1, GenBank) a místa nasedání PCR primerů a SNaPshot primeru. Vyznačené sekvence reprezentují místa nasedání jednotlivých primerů s uvedením jejich SEQ ID NO. (SEQ ID NO. 6 a SEQ ID NO. 7 jsou v reverzní orientaci). Vyznačený SNP marker K146 reprezentuje
45 v sekvenci písmeno K, které podle názvosloví IUPAC zastupuje nukleotidy T (tento nukleotid je charakteristický pro rezistentní alelu) a G (tento nukleotid je charakteristický pro senzitivní alelu). C) Sekvence amplifikované oblasti, která obsahuje SNP marker R156 genu rezistence *Rvi6* (SEQ ID NO. 13, odvozena od sekvence KM105074.1, GenBank) a místa nasedání PCR primerů a SNaPshot primeru. Vyznačené sekvence reprezentují místa nasedání jednotlivých primerů s uvedením jejich SEQ ID NO. (SEQ ID NO. 9 a SEQ ID NO. 10 jsou v reverzní orientaci). Vyznačený SNP marker R156 reprezentuje v sekvenci písmeno R, které podle názvosloví IUPAC
50

zastupuje nukleotidy A (tento nukleotid je charakteristický pro rezistentní alelu) a G (tento nukleotid je charakteristický pro senzitivní alelu).

Obr. 2: Příklady vyhodnocené SNaPshot analýzy. Černá barva označuje nukleotid G, červená barva nukleotid A a zelená barva nukleotid T. Oranžové vrcholky reprezentují velikostní marker. Rámečky vymezují oblasti pro jednotlivé SNP markery genů rezistence *Rvi2*, *Rvi4* a *Rvi6*. A) Senzitivní jedinec ve všech třech locích, a tedy jedinec s genotypem T/T pro SNP W242 (*Rvi2*), G/G pro SNP K146 (*Rvi4*) a G/G pro SNP R156 (*Rvi6*); B) jedinec, který je v locích *Rvi2* a *Rvi4* senzitivní a v loku *Rvi6* homozygotně rezistentní, a tedy jedinec s genotypem T/T pro SNP W242 (*Rvi2*), G/G pro SNP K146 (*Rvi4*) a A/A pro SNP R156 (*Rvi6*); C) jedinec, který je v locích *Rvi2* a *Rvi4* heterozygotně rezistentní a v loku *Rvi6* senzitivní, a tedy jedinec s genotypem A/T pro SNP W242 (*Rvi2*), T/G pro SNP K146 (*Rvi4*) a G/G pro SNP R156 (*Rvi6*); D) heterozygotně rezistentní jedinec ve všech třech locích, a tedy jedinec s genotypem A/T pro SNP W242 (*Rvi2*), T/G pro SNP K146 (*Rvi4*) a A/G pro SNP R156 (*Rvi6*).

Příklady uskutečnění technického řešení

Příklad 1: Návrh sekvencí primerů

Na základě známých sekvencí oblastí s místy výskytu diagnostických SNP pro detekci genů rezistence *Rvi2*, *Rvi4* a *Rvi6* u jabloně (přístupová čísla databáze Genbank: KM105014.1 (SEQ ID NO. 11), KM105043.1 (SEQ ID NO. 12), respektive KM105074.1 (SEQ ID NO. 13)) byly pomocí softwaru Geneious Prime (Biomatters Ltd.) navrženy sekvence jednotlivých primerů. Nejprve byla provedena analýza sekvencí cca 100 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, aby bylo minimalizováno potenciální snížení účinnosti celého systému. Specifické primery pro metodu SNaPshot vždy obsahují na svém 3' konci sekvenci, která končí těsně před diagnostickým SNP markerem, a na druhé straně primeru může být připojena nekomplementární extenze tvořená sledem určitých nukleotidů. Díky této extenzi je možné primer prodloužit na požadovanou délku tak, aby bylo možné jednotlivé fragmenty pro různé SNP rozlišit na základě délky jako při fragmentační analýze. Pro SNP W242 markerující gen rezistence *Rvi2* byly navrženy dva SNaPshot primery, a to z toho důvodu, že v této oblasti je více jednonukleotidových polymorfizmů a bylo potřeba obsáhnout všechny varianty senzitivní a rezistentní alely. Tyto primery byly navrženy na výslednou délku 30 nukleotidů a neobsahují extenzi. Primer pro SNP K145 markerující gen rezistence *Rvi4* byl navržen na výslednou délku 36 nukleotidů, z čehož 12 nukleotidů představuje extenze, a primer pro SNP R156 markerující gen rezistence *Rvi6* byl navržen na výslednou délku 42 nukleotidů, z čehož 12 nukleotidů představuje extenze. Pro nekomplementární extenzi byl v obou případech zvolen sled 12 cytosinů (C₁₂).

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

Rvi2 PCR forward primer: GTTAAATTTGACATATGAGAATGTG (SEQ ID NO. 1),
Rvi2 PCR reverse primer: ATACCATATGAYCACAKAGATCATT (SEQ ID NO. 2),
Rvi2 SNaPshot primer 1: ATCATTTATYTAATTTGGCCAAATAATAAAA (SEQ ID NO. 3) a
Rvi2 SNaPshot primer 2: ATCATTTATCTAATTTGGCCAGATAATAAAA (SEQ ID NO. 4).

Pro identifikaci senzitivní a rezistentní alely diagnostického SNP K146 pro detekci genu rezistence *Rvi4* byly navrženy následující primery:

Rvi4 PCR forward primer: ACAAGAAGGGGAATGTTGACT (SEQ ID NO. 5),
Rvi4 PCR reverse primer: AAGATAAGACCAGTCGCAATAGG (SEQ ID NO. 6) a
Rvi4 SNaPshot primer: CCCCCCCCCCATGTTACAYCTGCATCTAAACACT (SEQ ID NO. 7).

Pro identifikaci senzitivní a rezistentní alely diagnostického SNP R156 pro detekci genu rezistence *Rvi6* byly navrženy následující primery:

Rvi6 PCR forward primer: TGGTTTAATCTCATGTTTCCTCAC (SEQ ID NO. 8),

Rvi6 PCR reverse primer: AAGTTTGGAGCACACATAAGG (SEQ ID NO. 9) a

- 5 *Rvi6* SNaPshot primer: CCCCCCCCCCTGAGTAATYTGGAATAATAA (SEQ ID NO. 10).

Nasedání jednotlivých primerů na příslušné sekvence je uvedeno na Obr. 1.

- 10 **Příklad 2: Detekce alel SNP markerů genů rezistence *Rvi2*, *Rvi4* a *Rvi6* jabloně domácí metodou SNaPshot:**

- Nejdříve byla z listů různých odrůd jabloně domácí izolována celková DNA pomocí soupravy Exgene Plant SV mini (GeneAll Biotechnology) dle návodu výrobce. DNA byla před amplifikací genomového úseku s požadovaným SNP naředěna na koncentraci 10 ng/μl. Takto připravená DNA (1 μl) byla použita jako templát pro PCR reakci s následujícími reakčními složkami (uvedeny výsledné koncentrace primerů): 10 μl qPCR 2× Blue Master Mix (Top-Bio); 500nM *Rvi2* PCR forward primer (SEQ ID NO. 1), 500nM *Rvi2* PCR reverse primer (SEQ ID NO. 2), 350nM *Rvi4* PCR forward primer (SEQ ID NO. 5), 350nM *Rvi4* PCR reverse primer (SEQ ID NO. 6), 150nM *Rvi6* PCR forward primer (SEQ ID NO. 8), 150nM *Rvi6* PCR reverse primer (SEQ ID NO. 9), reakce byla doplněna do 20 μl vodou. Amplifikace fragmentů probíhala v cykleru C1000 (Biorad) s nastaveným teplotním profilem: úvodní denaturace 94 °C/5 minut; amplifikace ve 40 cyklech: 94 °C/30 s, 58 °C/30 s, 72 °C/30 s; závěrečná extenze 72 °C/5 minut.

- 25 Amplifikované fragmenty byly purifikovány pomocí ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup Reagent (Thermo Fisher Scientific) tak, že k 5 μl PCR produktu byly přidány 2 μl ExoSAP-IT™. Takto připravená směs byla 4 minuty inkubována v termocykleru při 37 °C a poté 1 minutu při 80 °C (inaktivace enzymů). Purifikované amplifikované fragmenty (1 μl) byly poté použity jako templát pro SNaPshot reakci s následujícími reakčními složkami (uvedeny výsledné koncentrace primerů): 30 5 μl SNaPshot Multiplex Ready Reaction Mix (ThermoFisher Scientific); 100nM *Rvi2* SNaPshot primer 1 (SEQ ID NO. 3); 100nM *Rvi2* SNaPshot primer 2 (SEQ ID NO. 4); 50nM *Rvi4* SNaPshot primer (SEQ ID NO. 7); 250nM *Rvi6* SNaPshot primer (SEQ ID NO. 10), reakce byla doplněna do 10 μl vodou. Reakce probíhala v termocykleru C1000 (Biorad) s nastaveným teplotním profilem: amplifikace v 10 cyklech: 96 °C/10 s, 50 °C/5 s, 60 °C/30 s. Po dokončení reakce byly 35 opět amplifikované fragmenty purifikovány, kdy byl do každé zkumavky, ve které bylo 10 μl produktu z detekční SNaPshot reakce, přidán 1 μl enzymu SAP (Thermo Fisher Scientific). Takto připravená směs byla v termocykleru inkubována 1 hodinu při 37 °C a poté 15 minut při 75 °C. Následně byly vzorky připraveny pro analýzu pomocí genetického analyzátoru tak, že byl nejdříve 40 připraven mix 9 μl Hi-Di formamidu a 0,2 μl velikostního standardu GeneScan 120 LIZ dye (obojí Thermo Fisher Scientific) a k němu byl přidán vždy 1 μl analyzovaného vzorku. Připravené vzorky byly před samotnou analýzou denaturovány 5 minut při 95 °C v termocykleru. SNaPshot analýza byla prováděna na genetickém analyzátoru ABI PRISM 3500 dle doporučení výrobce (Thermo Fisher Scientific).

- 45 Výsledek SNaPshot analýzy byl vyhodnocen pomocí softwaru GeneMapper v5.0 (Thermo Fisher Scientific). Výsledkem je elektroforeogram obsahující vrcholy v barvě konkrétního nukleotidu v místě SNP a zároveň jsou tyto vrcholy rozděleny na základě délky. Výsledky SNaPshot analýzy jsou znázorněny na Obr. 2.

50

Průmyslová využitelnost

- Navrženou sadu primerů pro detekci rezistence jabloně domácí (*Malus × domestica* Borkh.) k patogenu *Venturia inaequalis* (Cooke) G. Winter pomocí metody SNaPshot, konkrétně 55 pro detekci přítomnosti jednotlivých alel markerů genů rezistence *Rvi2*, *Rvi4* a *Rvi6*, 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 senzitivní a rovněž rezistentní alely markerů genů rezistence *Rvi2*, *Rvi4* a *Rvi6*, kdy detekce těchto markerů probíhá metodou SNaPshot, která umožňuje velmi rychlou analýzu několika SNP markerů důležitých znaků u velkého počtu vzorků. Zároveň tato sada umožňuje identifikaci homozygotů nesoucích pouze rezistentní alely genů *Rvi2*, *Rvi4*, případně *Rvi6*, což je velkým přínosem pro šlechtitele, protože rezistentní homozygoti budou v dalším křížení poskytovat jedince nesoucí vždy alespoň jednu rezistentní alelu tohoto genu. Velkou výhodou navržené sady primerů je možnost v jediné reakci stanovit kumulaci příslušných genů rezistence, kterou v podstatě nelze detekovat jinak než analýzou molekulárních markerů. Současná analýza 3 SNP markerů v jediné reakci přináší další úspory jak finanční, tak časové díky tomu, že není nutné provádět analýzu pro každý znak zvlášť. Všechny tři testované rezistence již byly jednotlivě implementovány do komerčně úspěšných odrůd, jejich vzájemným křížením je tak možné již v první generaci vyšlechtit kvalitní nové hybridy, jejichž rezistence nebude prolamována rasami *V. inaequalis* schopnými obejít jednotlivé typy rezistence. Šlechtění jabloní s kumulací genů rezistence vůči strupovitosti je moderním trendem tvorby nových odrůd této oblíbené ovocné plodiny, jelikož umožňuje snížení ekologické zátěže, ke které dochází při pěstování nerezistentních odrůd, popřípadě odrůd s pouze jediným genem rezistence *Rvi*, který je příčinným patogenem prolamován.

Seznam sekvencí

- sekvence primerů a jednotlivých genů rezistence jsou shodné se sekvencemi současně podaného elektronického souboru dle standardu WIPO ST.26 připojeného k této přihlášce

<SEQ ID NO. 1- *Rvi2* PCR forward primer; DNA; *Malus × domestica* Borkh.; genomic DNA>
GTAAATTTGACATATGAGAATGTG

<SEQ ID NO. 2- *Rvi2* PCR reverse primer; DNA; *Malus × domestica* Borkh.; genomic DNA>
ATACCATATGAYCACAKAGATCATT

<SEQ ID NO. 3- *Rvi2* SNaPshot primer 1; DNA; *Malus × domestica* Borkh.; genomic DNA>
ATCATTTATYTAATTTGGCCAAATAATAAA

<SEQ ID NO. 4- *Rvi2* SNaPshot primer 2; DNA; *Malus × domestica* Borkh.; genomic DNA>
ATCATTTATCTAATTTGGCCAGATAATAAA

<SEQ ID NO. 5- *Rvi4* PCR forward primer; DNA; *Malus × domestica* Borkh.; genomic DNA>
ACAAGAAGGGGAATGTTGACT

<SEQ ID NO. 6- *Rvi4* PCR reverse primer; DNA; *Malus × domestica* Borkh.; genomic DNA>
AAGATAAGACCAGTCGCAATAGG

<SEQ ID NO. 7- *Rvi4* SNaPshot primer; DNA; *Malus × domestica* Borkh.; genomic DNA>
CCCCCCCCCATGTTACAYCTGCATCTAAACACT

<SEQ ID NO. 8- *Rvi6* PCR forward primer; DNA; *Malus × domestica* Borkh.; genomic DNA>
TGGTTAATCTCATGTTCCCTCAC

<SEQ ID NO. 9- *Rvi6* PCR reverse primer; DNA; *Malus × domestica* Borkh.; genomic DNA>
AAGTTTGGAGCACACATAAGG

<SEQ ID NO. 10- *Rvi6* SNaPshot primer; DNA; *Malus × domestica* Borkh.; genomic DNA>
CCCCCCCCCCTGAGTAATYTGGAACCTATATGAAATAATAA

<SEQ ID NO. 11- KM105014.1, GenBank; DNA; *Malus × domestica* Borkh.; genomic DNA>
 CTCTCTCCCTCCCTGTCTCTCTTCTCTCTCTGCTCGCTCGCTCTCTGTCCCACGACGRC
 ATGGTCTCAGRCTCTGTCTGCCTGAAAGACGTAAGACRTCAAATCCAATATCCAATA
 5 TGGAATGTCACGTAATCAAATTTGTGTGTAGGATCCAGCTCCAACCAATATGTCAAT
 TTTACGTGGATTAACATGAGTTTTTCATATGTTAAATTTGACATATGAGAATGTGATGT
 CAATTTTTTTWTTTATTATTTGGCCAAATTARATAAATGATCTATGTGGTCATATGGT
 ATYCGGAATATAGCCTATATGCTAAAAAACTCGAATTTAAACCCTTGTGGTGTACT
 CTGTTAGCAAATTTAGTCCAAAAATGATTTTTTCGTTAACTATMTGTTAATACATGGT
 10 AAAATTGTACTTTGACATTTTTACTAGGATTGGGGTTTTTRCTAGGATTTTGGTTTAAA
 TGCTATCTGAGTTTTCAATTTCTGATCGGTTAGAATTCTATTAGAGTTGGCAAGCAAC
 ATGAATGGATTCTTGTYTGTGTGGCTTTGAAAAACATCCATTTGAGAAGACCAAGTGG
 TTTCTGCAATGGTGGTTCTGGGTTTTTGGGGAGAGGGTTAGAGGGAGTTTCAATAA
 CAGGCTTTGGGCTAATCAATTGAGAAAYTAACAAGAGGAAGGTGATACCTGGAGCTG
 15 TTCTTGCTGTTCTTACCTCAAAGATGCCGAGGCTGTCGTAAGTTAATCCTTT

<SEQ ID NO. 12- KM105043.1, GenBank; DNA; *Malus × domestica* Borkh.; genomic DNA>
 TTACTIONCAATTCAGACTTTAGCCAAAAAATCTCATGTTTACTGCCAGTGTGTTGAAGATC
 TTCTCTTCTATTACAAAGAAGGGGAATGTTGACTGGATTAAGTTTATGGATTACATAT
 20 TTTGGATTCTATATTGGTKAACAGCTTGCKAGTGTGTTAGATGCAGGTGTAACATTGAT
 GAAATATAAGTGTTATCTAAAATTCATTTTGATTTTCAGACTCTCAAACCTTCTGCAC
 CTATTGCGACTGGTCTTATCTTGGT

<SEQ ID NO. 13- KM105074.1, GenBank; DNA; *Malus × domestica* Borkh.; genomic DNA>
 TGTGTGGAAAGGAAACATCGTCATCTAGTTGAGACAGCTAGAACTTTATTGGTTTAA
 25 TCTCATGTTCCACCAATATTGGGTTGAAGCCTTCACGACTGCACTATATCTCATT
 ATARATTGYCAATCTCTGGGATTTACAATCACCTTAGCARTTATTATTTTCATATAGT
 TCCAGATTACTCAAGGCTCRAAGTCTTTGGTTGTTTGTACTTTCCATGGTTAAAACCT
 TATGTGTGCTCCAAACTTGATGGGAAA

30

Seznam použité literatury

- Baumgartner, I. O., Kellerhals, M., Costa, F., Dondini, L., Pagliarani, G., Gregori, R., et al. (2016).
 35 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.
- Berra, L., Tartarini, S., Adami, M. et al. (2017). Pyramiding of multiple resistances to disease and
 marker-assisted selection. *Acta Horticulturae* 1172: 57-60.
- Bus, V. G. M., Rikkerink, E. H. A., Caffier, V., Durel, C.-E., Plummer, K. M. (2011). Revision of
 the nomenclature of the differential host-pathogen interactions of *Venturia inaequalis* and *Malus*.
 40 *Annu. Rev. Phytopathol.* 49:391-413.
- Caffier, V., Patocchi, A., Expert, P., Bellanger, M. N., Durel, C. E., Hilber-Bodmer, et al. (2015).
 Virulence characterization of *Venturia inaequalis* reference isolates on the differential set of *Malus*
 hosts. *Plant Dis.* 99:370-375.
- Flor, H. H. (1971). Current status of the gene-for-gene concept. *Annual Review of Phytopathology*
 45 9:275-296.
- Chagné D., Vanderzande S., Kirk C., Profitt, N., Weskett, R., Gardiner, S. E., 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.* 6:30.
- Jänsch, M., Broggini, G. A. L., Weger, J., Bus, V. G. M., Gardiner, S. E., Bassett, H., Patocchi, A.
 50 (2015). Identification of SNPs linked to eight apple disease resistance loci. *Mol. Breeding* 35:1-21.
- Liebhart R., Koller B., Gianfranceschi L., Gessler C. (2003). Creating a saturated reference map
 for the apple (*Malus × domestica* Borkh.) genome. *Theoretical and Applied Genetics* 106(8): 1497-
 1508.
- Manktelow, D. W. L., Beresford, R. M., Batchelor, T. A., Walker, J. T. S. (1996). Use patterns and
 55 economics of fungicides for disease control in New Zealand apples. *Acta Hortic.* 422:187-192.

- Parisi, L., Fouillet, V., Schouten, H. J., Groenwold, R., Laurens, F., Didelot, F., et al. (2004). Variability of the pathogenicity of *Venturia inaequalis* in Europe. *Acta Hort.* 663:107-113.
- Patocchi, A., Wehrli, A., Dubuis, P. H. et al. (2020). Ten Years of VINQUEST: First Insight for Breeding New Apple Cultivars with Durable Apple Scab Resistance. *Plant Disease* 104(8): 2074-2081.
- 5 Peil, A., Patocchi, A., Hanke, M.-V., Bus, V. G. M. (2018). Apple cultivar Regia possessing both *Rvi2* and *Rvi4* resistance genes is the source of a new race of *Venturia inaequalis*. *European Journal of Plant Pathol.* 151:533-539.
- Soriano, J., Madduri, M., Schaart, J., van der Burgh, A., van Kaauwen, M. W., Tomic, 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.
- 10 Tartarini S., Gianfranceschi L., Sansavini S., Gessler C. (1999). Development of reliable PCR markers for the selection of the *Vf* gene conferring scab resistance in apple. *Plant Breeding*. 118:183-186.
- 15 Vinatzer B. A., Patocchi A., Tartarini S., Gianfranceschi L., Sansavini, S., Gessler C. (2004). Isolation of two microsatellite markers from BAC clones of the *Vf* scab resistance region and molecular characterization of scab-resistant accessions in *Malus* germplasm. *Plant Breeding*. 123:321-326.
- 20 Citované užité vzory:
- Žďárská, I., Čmejlová, J., Čmejla, R. (2021). Sada primerů a sond pro stanovení alel markeru genu rezistence *Rvi6* u jabloně domácí (*Malus x domestica* Borkh.). Užité vzor č. 35603.
- 25 Žďárská, I., Čmejla, R., Podlipný, J., Čmejlová, J. (2022) Sada primerů a sond pro stanovení alel SNP markeru asociovaného s genem rezistence *Rvi4* u jabloně domácí (*Malus x domestica* Borkh.). Užité vzor č. 35780.
- Čmejlová, J., Rejlová, M., Žďárská, I., Čmejla, R. (2022) Sada primerů a sond pro stanovení alel markeru rezistence *Rvi2* u jabloně domácí (*Malus x domestica* Borkh.). Užité vzor č. 35890.

NÁROKY NA OCHRANU

1. Sada primerů pro současnou detekci SNP markerů rozlišujících senzitivní a rezistentní alely genů rezistence *Rvi2*, *Rvi4* a *Rvi6* jabloně domácí *Malus × domestica* Borkh. k patogenu *Venturia inaequalis* (Cooke) G. Winter metodou SNaPshot, **vyznačující se tím**, že obsahuje následující primery:

Rvi2 PCR forward primer: GTTAAATTTGACATATGAGAATGTG (SEQ ID NO. 1),

Rvi2 PCR reverse primer: ATACCATATGAYCACAKAGATCATT (SEQ ID NO. 2),

10 *Rvi2* SNaPshot primer 1: ATCATTTATYTAATTTGGCCAAATAATAAA (SEQ ID NO. 3) a

Rvi2 SNaPshot primer 2: ATCATTTATCTAATTTGGCCAGATAATAAA (SEQ ID NO. 4)

pro identifikaci senzitivní a rezistentní alely diagnostického SNP W242 pro detekci genu rezistence *Rvi2*,

15 *Rvi4* PCR forward primer: ACAAAGAAGGGGAATGTTGACT (SEQ ID NO. 5),

Rvi4 PCR reverse primer: AAGATAAGACCAGTCGCAATAGG (SEQ ID NO. 6) a

Rvi4 SNaPshot primer: CCCCCCCCCCATGTTACAYCTGCATCTAAACACT (SEQ ID NO. 7)

20 pro identifikaci senzitivní a rezistentní alely diagnostického SNP K146 pro detekci genu rezistence *Rvi4*,

Rvi6 PCR forward primer: TGGTTTAATCTCATGTTCCCTCAC (SEQ ID NO. 8),

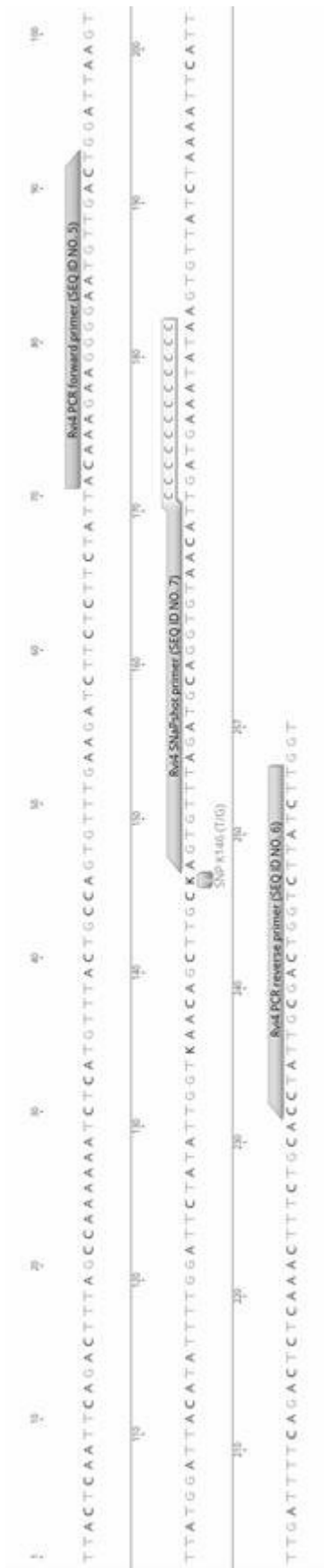
Rvi6 PCR reverse primer: AAGTTTGGAGCACACATAAGG (SEQ ID NO. 9) a

25 *Rvi6* SNaPshot primer: CCCCCCCCCCCTGAGTAATYTGGAECTATATGAAATAATAA (SEQ ID NO. 10)

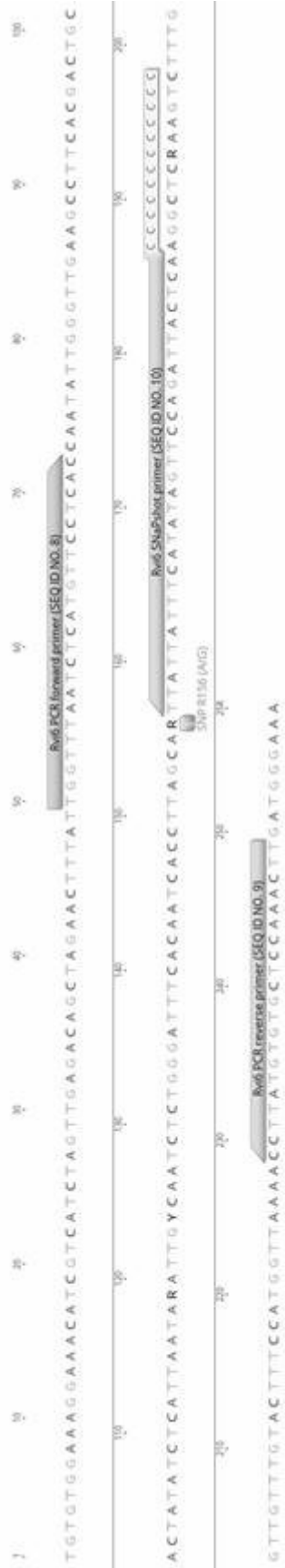
pro identifikaci senzitivní a rezistentní alely diagnostického SNP R156 pro detekci genu rezistence *Rvi6*,

30 kdy podle názvosloví IUPAC zastupuje Y v sekvenci primeru nukleotidy C a T a K zastupuje nukleotidy G a T.

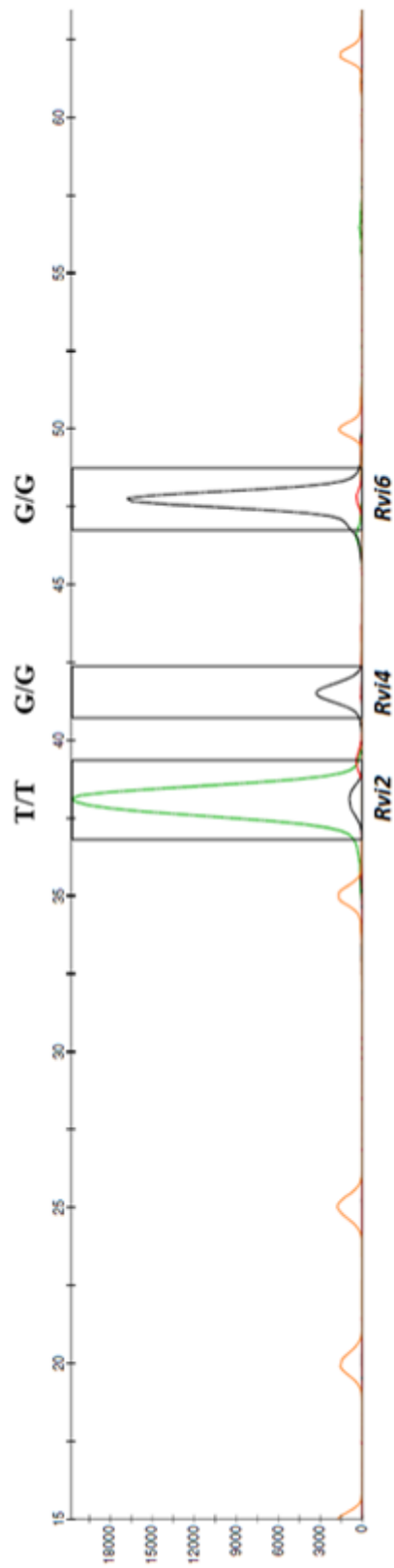
7 výkresů



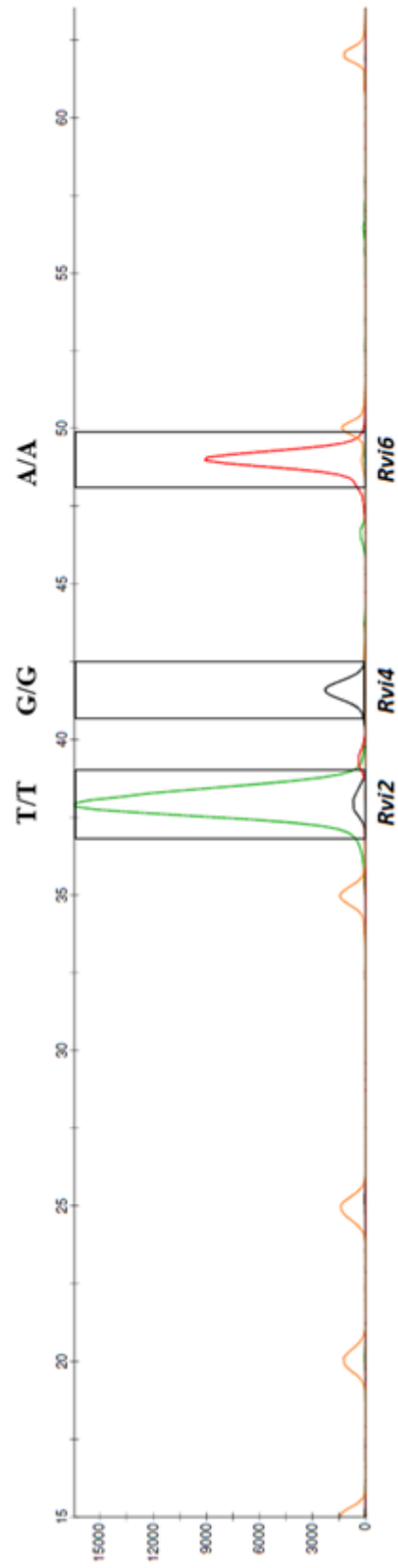
Obr. 1B



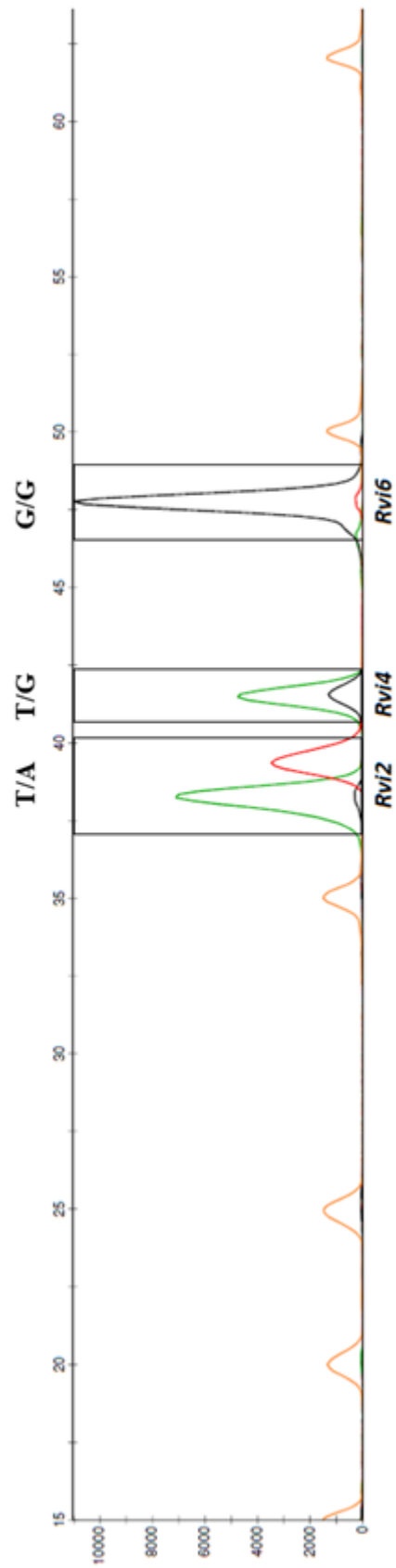
Obr. 1C



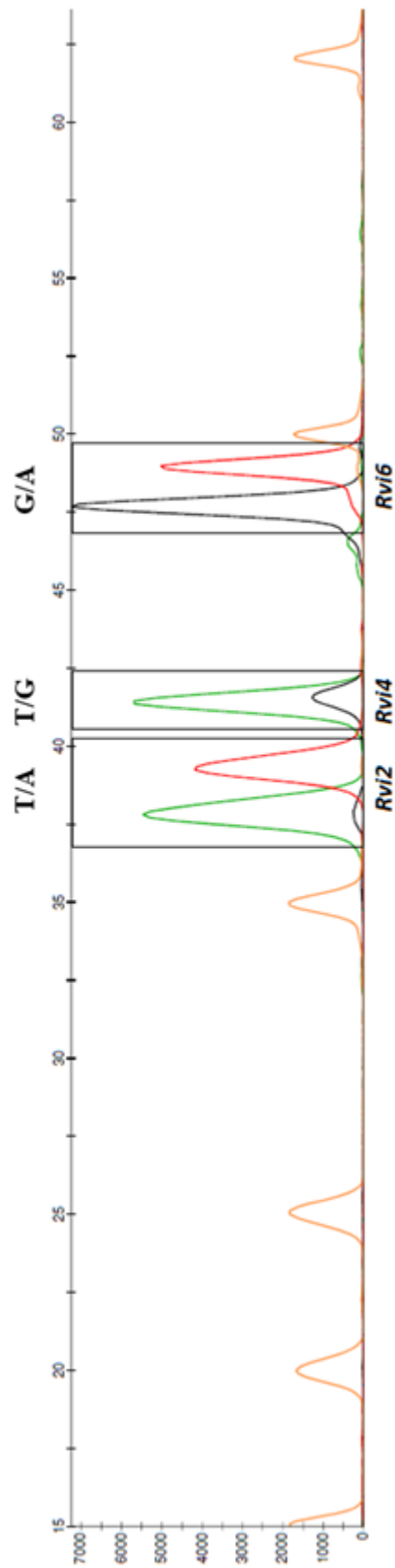
Obr. 2A



Obr. 2B



Obr. 2C



Obr. 2D