

Univerzita Hradec Králové
Přírodovědecká fakulta
Katedra biologie

Inovace detekce genů rezistence ke strupovitosti
jabloně a jejich pyramidizace pomocí
molekulárních markerů

Diplomová práce

Autor: Bc. Josef Podlipný
Studijní program: N0588A030001 Biologie a ekologie
Studijní obor: Biologie a ekologie - spec. experimentální biologie

Vedoucí práce: Mgr. Radka Symonová, Ph.D.
Odborný konzultant: RNDr. Radek Čmejla, Ph.D.
Výzkumný a šlechtitelský ústav ovocnářský Holovousy
s.r.o.

Zadání diplomové práce

Autor: Josef Podlipný

Studium: S19BI016NP

Studijní program: N0588A030001 Biologie a ekologie

Studijní obor: Biologie a ekologie - spec. experimentální biologie

Název diplomové práce: **Inovace detekce genů rezistence ke strupovitosti jableň a jejich pyramidizace pomocí molekulárních markerů**

Název diplomové práce AJ: Innovation of detection of apple scab resistance genes and their pyramidization by molecular markers

Cíl, metody, literatura, předpoklady:

Diplomová práce se bude zabývat vývojem metod pro detekci molekulárních markerů typu SNP ve vazbě s geny zodpovědnými za rezistenci jableň k patogenu *Venturia inaequalis*, a to konkrétně geny *Rvi2*, *Rvi4* a *Rvi6*, pro potřeby šlechtění. Detekce genů bude prováděna pomocí sekvenování, alelické diskriminace a SNaPshot.

1. Sběr rostlinného materiálu (listů) z jableň
2. Izolace celkové DNA pomocí kitu
3. Příprava sekvenční reakce, sekvenování na osmikapilárovém Sangerově sekvenátoru
4. Alelická diskriminace
5. SNaPshot
6. Analýza a vyhodnocení dat

Baumgartner I. O., Kellerhals M., Costa F., Dondini L., Pagliarani G., Gregori R., Tartarini S., Leumann L., Laurens F., Patocchi A. (2016): Development of SNP-based assays for disease resistance and fruit quality traits in apple (*Malus × domestica* Borkh.) and validation in breeding pilot studies. *Tree Genet. Genomes* (12).

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*. *Annual Review of Phytopathology* (49): 391 - 413.

Caffier V., Patocchi A., Expert P., Bellanger M. N., Durel C. E., Hilber-Bodmer M., Brogginì G. A. L., Groenwold R., Bus V. G. M. (2015): Virulence characterization of *Venturia inaequalis* reference isolates on the differential set of *Malus* hosts. *Plant Disease* (99): 370 - 375.

Chagné D., Vanderzande S., Kirk C., Profitt N., Weskett R., Gardiner E. S., Peace P. C., Volz K. R., Bassil V. N. (2019): Validation of SNP markers for fruit quality and disease resistance loci in apple (*Malus × domestica* Borkh.) using the OpenArray platform. *Horticulture Research* (6).

De S. et Babu M. M. (2010): A time-invariant principle of genome evolution. *PNAS* (107): 13004 - 13009.

Jänsch M., Brogginì G. A. L., Weger J., Bus V. G. M., Gardiner S. E., Bassett H., Patocchi A. (2015): Identification of SNPs linked to eight apple disease resistance loci. *Molecular Breeding* (35).

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., Tsiouridis C. (2004): Variability of the pathogenicity of *Venturia inaequalis* in Europe. *Acta Horticulturae*: 107 - 113.

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 Pathology*. (151): 533 - 539.

Soriano J., Madduri M., Schaart J., van der Burgh A., van Kaauwen M. W., Tomic L., Groenwold R., Velasco R., van de Weg E., Schouten H. (2014): Fine mapping of the gene *Rvi18* (*V25*) for broad-spectrum resistance to apple scab, and development of a linked SSR marker suitable for marker-assisted breeding. *Molecular Breeding* (34): 2021 - 2032.

Garantující pracoviště: Katedra biologie,
Přírodovědecká fakulta

Vedoucí práce: Mgr. Radka Symonová, Ph.D.

Datum zadání závěrečné práce: 23.1.2020

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně a že jsem v seznamu použité literatury uvedl všechny prameny, z kterých jsem vycházel.

V Hradci Králové dne

Jméno a příjmení

Děkuji Mgr. Radce Symonové, Ph.D. za vedení diplomové práce a RNDr. Radku Čmejlovi, Ph.D. za jeho ochotu, odborné rady a čas, který mi při vypracování diplomové práce věnoval. Rád bych také poděkoval kolektivu Výzkumnému a šlechtitelskému ústavu ovocnářskému Holovousy s.r.o. za možnost účastnit se jejich projektu a pracovat v Laboratoři molekulární biologie. Také bych rád poděkoval celému týmu výše zmíněného oddělení VŠÚO, zejména RNDr. Janě Čmejlové, Ph.D., Ing. Ivoně Žďárské, Mgr. Lucii Valentové, Ing. Martině Rejlové a Ing. Radku Vávrovi, Ph.D. za jejich odborné rady, praktické připomínky a pomoc s praktickou částí diplomové práce.

Anotace

PODLIPNÝ, J. *Inovace detekce genů rezistence ke strupovitosti jabloně a jejich pyramidizace pomocí molekulárních markerů*. Hradec Králové, 2021. Diplomová práce na Přírodovědecké fakultě Univerzity Hradec Králové. Vedoucí diplomové práce Radka Symonová. 59 s.

Diplomová práce se zabývá vývojem nových finančně dostupných metod genotypizace s využitím jednonukleotidových polymorfismů (Single-nucleotide polymorphisms; SNPs), které jsou v asociaci s vybranými geny rezistence jabloní vůči houbovému patogenu *Venturia inaequalis* (*Rvi2*, *Rvi4* a *Rvi6*) se zaměřením na gen *Rvi4*. První část práce obsahuje přehledné shrnutí dosavadních poznatků o problematice se zaměřením na patogen způsobující onemocnění strupovitost jabloně, *Rvi* geny rezistence a principy používaných metod. Hlavním bodem praktické části diplomové práce byla optimalizace tří různých metod genotypizace SNP K146, který je ve vazbě s genem *Rvi4* (sekvenace, real-time PCR alelická diskriminace a SNaPshot). Byly navrženy funkční primery, které lze využít pro všechny tři vybrané metody genotypizace. Pro alelickou diskriminaci byla navržena sada funkčních hybridizačních sond, pomocí kterých bylo úspěšně genotypizováno celkem 113 kříženců připravených ve Výzkumném a šlechtitelském ústavu ovocnářském Holovousy s.r.o. (VŠÚO). Dále byl navržen funkční detekční primer pro metodu SNaPshot. Zároveň bylo v průběhu praktické části diplomové práce porovnáno celkem šest různých komerčně dostupných izolačních kitů a vypracována finanční analýza vybraných tří metod genotypizace, jejíž výsledky jsou shrnuty v přehledném diagramu. Pro diplomovou práci byla použita infrastruktura Laboratoře molekulární biologie VŠÚO. Výsledky diplomové práce vznikly v rámci projektu č. TJ04000389 financovaného Technologickou agenturou v ČR, jehož jsem spoluřešitelem.

Klíčová slova

jednonukleotidový polymorfismus, markery asistovaná selekce, *Rvi* gen, šlechtění jablek, *Venturia inaequalis*, strupovitost jabloně

Annotation

PODLIPNÝ, J. *Innovation of detection of apple scab resistance genes and their pyramidization by molecular markers*. Hradec Králové, 2021. Diploma Thesis at the Faculty of Science of the University of Hradec Králové. Thesis Supervisor Radka Symonová. 59 p.

This diploma thesis deals with the development of new affordable methods for genotyping in apples using single-nucleotide polymorphisms (SNPs) associated with selected genes of resistance to the pathogen *Venturia inaequalis* (*Rvi2*, *Rvi4* and *Rvi6*) with a focus on the *Rvi4* gene. The first part contains a summary with a focus on the pathogen causing a disease called apple scab, *Rvi* genes, and principles of methods used in this work. The main point of the practical part of the diploma thesis was the optimization of three methods for genotyping the K146 SNP linked to the *Rvi4* gene (sequencing, real-time PCR allelic discrimination, and SNaPshot). Functional primers have been designed that can be used for all three selected methods. A set of functional hybridization probes was designed for a qPCR allelic discrimination that was successfully used for genotyping of 113 hybrids prepared at the Research and Breeding Institute of Pomology Holovousy Ltd. (VŠÚO). Furthermore, a functional detection primer for the SNaPshot method was designed. During the practical part of the work, a total of six different commercially available isolation kits were compared, and a financial analysis of selected three genotyping methods was performed (results are summarized in a diagram). The infrastructure of the Laboratory for Molecular Biology of the VŠÚO was used for the diploma thesis. The results of the diploma thesis were obtained within the project No. TJ04000389 (Technology Agency of the Czech Republic) in which I take a part as a co-researcher.

Keywords

single-nucleotide polymorphism, marker-assisted selection, *Rvi* gene, apple breeding, *Venturia inaequalis*, apple scab

Obsah

Úvod	9
1 Přehled dosavadních poznatků o problematice	10
1.1 <i>Venturia inaequalis</i> (Cooke) G. Winter	10
1.1.1 Taxonomické zařazení	11
1.1.2 Geografické rozšíření	11
1.1.3 Hostitelské rostliny	11
1.1.4 Vývojový cyklus a způsob šíření	11
1.1.5 Virulence <i>Venturia inaequalis</i> u jabloní	13
1.2 Strupovitost jabloně	14
1.2.1 Symptomy onemocnění	14
1.2.2 Ochranná opatření	14
1.3 Jednonukleotidové polymorfismy (SNPs)	16
1.3.1 Vznik SNPs	17
1.3.2 Identifikace SNPs	17
1.3.3 Genotypizace známých SNPs	18
1.4 Genom jabloně	19
1.5 <i>Rvi</i> geny rezistence	20
1.5.1 <i>Rvi2</i>	20
1.5.2 <i>Rvi4</i>	20
1.5.3 <i>Rvi6</i>	21
1.5.4 Pyramidizace	21
1.5.5 Marker-assisted selection (MAS)	22
2 Materiály a metody	23
2.1 Materiál	23
2.1.1 Odběr vzorků	23
2.2 Přístrojové vybavení	23
2.3 Izolace DNA	24
2.3.1 Postup izolace DNA pomocí kitu Exgene Plant SV mini (GeneAll)	25
2.3.2 Postup izolace DNA pomocí kitu GenElute™ Plant Genomic DNA Miniprep (Sigma-Aldrich)	26
2.3.3 Postup izolace DNA pomocí kitu GeneJET Plant Genomic DNA Purification Mini (Thermo Fisher Scientific)	27
2.3.4 Postup izolace DNA pomocí kitu WizPrep™ Plant DNA Mini (Wizbiosolutions)	28

2.3.5	Postup izolace DNA pomocí kitu NucleoSpin Plant II (Macherey-Nagel)	28
2.3.6	Postup izolace DNA pomocí kitu QuickExtract Plant DNA Extraction Solution (Biosearch Technologies)	29
2.4	Sekvenace.....	29
2.4.1	PCR amplifikace	30
2.4.2	Gelová elektroforéza	31
2.4.3	Purifikace DNA z gelu.....	32
2.4.4	Sekvenační reakce	33
2.4.5	Purifikace sekvenační reakce a puštění běhu v genetickém analyzátoru	34
2.5	Alelická diskriminace	34
2.6	SNaPshot	36
2.6.1	PCR amplifikace	36
2.6.2	Purifikace.....	36
2.6.3	SNaPshot reakce	37
2.6.4	Purifikace SNaPshot reakce	38
2.6.5	Analýza na genetickém analyzátoru	39
3	Výsledky a diskuse.....	40
3.1	Srovnání izolačních kitů	40
3.2	Sekvenace.....	41
3.3	Alelická diskriminace	44
3.4	SNaPshot	46
3.5	Finanční analýza metod detekce SNPs	47
3.6	Srovnání s dalšími metodami genotypizace <i>Rvi4</i>	51
3.7	<i>Rvi2</i> a <i>Rvi6</i>	51
	Závěr	52
	Seznam použité literatury	53

Úvod

Předložená diplomová práce se zabývá vývojem metod pro detekci molekulárních markerů typu SNP (Single-nucleotide polymorphism) ve vazbě s geny zodpovědnými za rezistenci jabloní k houbovému patogenu *Venturia inaequalis* (Cooke) G. Winter, a to konkrétně geny *Rvi2*, *Rvi4* a *Rvi6*, pro potřeby šlechtění. *Venturia inaequalis* je fakultativním parazitem, jehož anamorfní (nepohlavní) vývojové stádium parazituje na živých pletivech jabloní (rod *Malus*). Vyskytuje se na všech kontinentech a u svého hostitele způsobuje onemocnění strupovitost jabloně, které je hospodářsky nejvýznamnějším onemocněním jabloní. U hostitelských stromů se onemocnění projevuje redukcí listové plochy, případně až opadem listů, v důsledku čehož dochází ke snížení schopnosti asimilace. To se dále odráží na kvalitě plodů redukcí jejich velikosti, horší chutí a špatnou skladovatelností. Jelikož toto onemocnění vede ke značným ekonomickým ztrátám, musí se každoročně k potlačení infekce v produkčních výsadbách aplikovat velké množství fungicidů, které mohou mít negativní vliv na životní prostředí a zdraví člověka.

Celosvětově probíhá šlechtění odrůd jabloní rezistentních k tomuto patogenu. Toto šlechtění může být značně zdlouhavé, finančně velmi nákladné a s nejasným výsledkem. Selektce nových rezistentních kříženců je standardně prováděna umělou infekcí jabloňových semenáčků patogenem *V. inaequalis* v raných vývojových fázích rostliny. Tento méně spolehlivý, nákladný a dlouhotrvající způsob je dnes nahrazován markery asistovanou selekcí, která využívá molekulárních markerů a laboratorních metod k identifikaci rezistentních kříženců s velmi vysokou mírou jistoty blížící se mnohdy 100 %. V genomech různých odrůd jabloní byla již identifikována řada genů rezistence vůči *V. inaequalis* (*Rvi*) a u několika z nich byly identifikovány i markery typu SNP v asociaci s těmito geny. Jednonukleotidové polymorfismy (SNPs) jsou velmi stabilním nejčastějším typem DNA polymorfismů a ideálním molekulárním markerem pro účely markery asistované selekce (MAS).

Cílem praktické části diplomové práce je detekce tří vybraných genů, zodpovědných za rezistenci jabloní k patogenu *Venturia inaequalis* – *Rvi2*, *Rvi4* a *Rvi6* – pomocí SNPs, které jsou s vybranými geny v asociaci. Má hlavní laboratorní činnost se týkala porovnání různých způsobů izolace DNA a ověřování detekčního systému pro genotypování SNP v asociaci s genem *Rvi4*. Pro tento účel byly použity tři metody (sekvenace, alelická diskriminace a SNaPshot), které by měly umožnit následné využití SNPs v markery asistované selekci. Teoretická část obsahuje dostupné významné dosavadní poznatky související s danou problematikou a zhodnocení ekonomických aspektů jednotlivých metod pro genotypizaci. Tato práce vznikla v rámci projektu č. TJ04000389 [podpořen Technologickou agenturou České republiky (TA ČR) v rámci programu ZÉTA], jehož jsem spoluřešitelem.

1 Přehled dosavadních poznatků o problematice

Jabloně (rod *Malus*) jsou hostiteli celé řady škůdců a patogenů způsobujících řadu onemocnění či přenášejících jiné patogenní organismy. Strupovitost jabloně, způsobená houbou *Venturia inaequalis* (Cooke) G. Winter z oddělení Ascomycota, je jedním z nejvážnějších onemocnění jabloní (Peil et al., 2017). Ve všech zemích pěstujících jabloně, zejména v oblastech se zvýšenou vlhkostí (Soriano et al., 2014), způsobuje značné ekonomické škody mnohdy vedoucí ke ztrátě až 70 % očekávané úrody (Ogawa et English, 1991). Z tohoto důvodu jsou jabloně v produkčních sadech často ošetřovány fungicidy, někdy až 30× ročně (Soriano et al., 2014). Nicméně ani takto častá aplikace fungicidů nemusí být 100% účinná, jelikož v posledních letech klesla biologická účinnost některých fungicidů v důsledku získané rezistence vůči určitým účinným látkám fungicidů u některých populací *V. inaequalis*. Příčinou této rezistence je nesprávná, častá nebo nadměrná aplikace fungicidů (Juroch, 2010).

1.1 *Venturia inaequalis* (Cooke) G. Winter

Venturia inaequalis (Cooke) G. Winter je fakultativní parazit, jehož anamorfní a teleomorfní vývojové stádium má značně odlišné životní strategie. Anamorfní (nepohlavní) vývojové stádium *V. inaequalis* parazituje na živých pletivech hostitelské rostliny a teleomorfní (pohlavní) vývojové stádium přečkává období vegetačního klidu hostitele saprofyticky na jeho opadaných listech (Juroch, 2010). *V. inaequalis* patří mezi tak zvané bipolárně heterothalické houby, což znamená, že mycelium obsahuje buď samčí, nebo samičí jádra. K pohlavnímu rozmnožování jsou tedy potřeba dvě fyziologicky odlišné stélky. Plodnice jsou kulovitého tvaru, negativně geotropní (rostou nad zem), tmavě hnědé až černé a bez ústí. Velikost jedné plodnice se pohybuje okolo 90 – 150 μm a obsahuje asi 50 – 100 vřecek. Vřecka *V. inaequalis* o velikosti 55 – 75 \times 6 – 12 μm jsou cylindrického tvaru, svazečkovitá a jejich stěna je tenká a bitunikátní (vícevrstevná, funkčně dvouvrstevná). Vznikají z askogenních hyf, které jsou výsledkem plazmogamie (splynutí cytoplazem) dvou pohlavních buněk. Askogenní hyfy jsou tvořeny dikaryotickými (dvoujadernými) buňkami. Ke karyogamii (splynutí jader) dochází až v samotném mladém vřecku (Vávra et al., 2015a). Dále ve vřecku dochází nejprve k meiotickému a poté mitotickému dělení, jejichž výsledkem je osm dvoubuněčných askospor (Baudyš et al., 1962). Askospory jsou nejprve bezbarvé, poté se zabarvují do olivově zelené až kouřově nahnědlé barvy a velikostně se pohybují okolo 11 – 16 \times 5 – 7 μm (Ackermann, 1992). Jsou dvoubuněčné, přičemž horní buňka askospory je kratší a širší než buňka spodní, od čehož se odvíjí druhový název patogenu „*inaequalis*“, tedy „nerovný“. Nepohlavně se *V. inaequalis* rozmnožuje pomocí konidií, které postupně vznikají v konidioforech během období sporulace. Konidie jsou jednobuněčné nebo dvoubuněčné, 20 – 30 μm dlouhé, olivově zelené, kyjovitého (hruškovitého) tvaru a zašpičatělé na konci. Krátké a nečlánkované konidiofory na povrch listů vyrůstají skrze trhliny v kutikule z hnědého mycelia, které tvoří charakteristické hnědé skvrny na listech napadených rostlin (Juroch, 2010).

1.1.1 Taxonomické zařazení

Venturia inaequalis patří do říše Fungi, oddělení Ascomycota, třídy Dothideomycetes, řádu Pleosporales, čeledi Venturiaceae, rod *Venturia*. Teleomorf je *Venturia inaequalis* (Cooke) G. Winter a anamorf *Spilocaea pomi* Fries; syn. *Fusicladium dendriticum* (Wallr.) Fuckel či *Sphaerella inaequalis* Cooke (Shafi et al., 2019).

1.1.2 Geografické rozšíření

Koalescenční analýza migračních modelů (matematická metoda, která slouží k odhadu rychlosti migrace mezi populacemi s využitím různých migračních modelů) naznačuje, že *V. inaequalis* pochází ze střední Asie, centra původu rodu *Malus*. Je tedy pravděpodobné, že patogen se šířil společně s domestikovanou jabloní, která byla přivážena do Malé Asie, Evropy a na další kontinenty (Amerika, Afrika, Austrálie) vlivem lidské migrace na nová území (Harris et al., 2002). V souladu s tímto zjištěním je také pozorování, že mezi populacemi *V. inaequalis* nalezenými u *Malus sieversii* (předchůdce domestikovaného jablka) (Gladieux et al., 2010) ve střední Asii je větší genetická variabilita než v evropských populacích *Malus × domestica* a *M. sylvestris* (Bowen et al., 2011).

1.1.3 Hostitelské rostliny

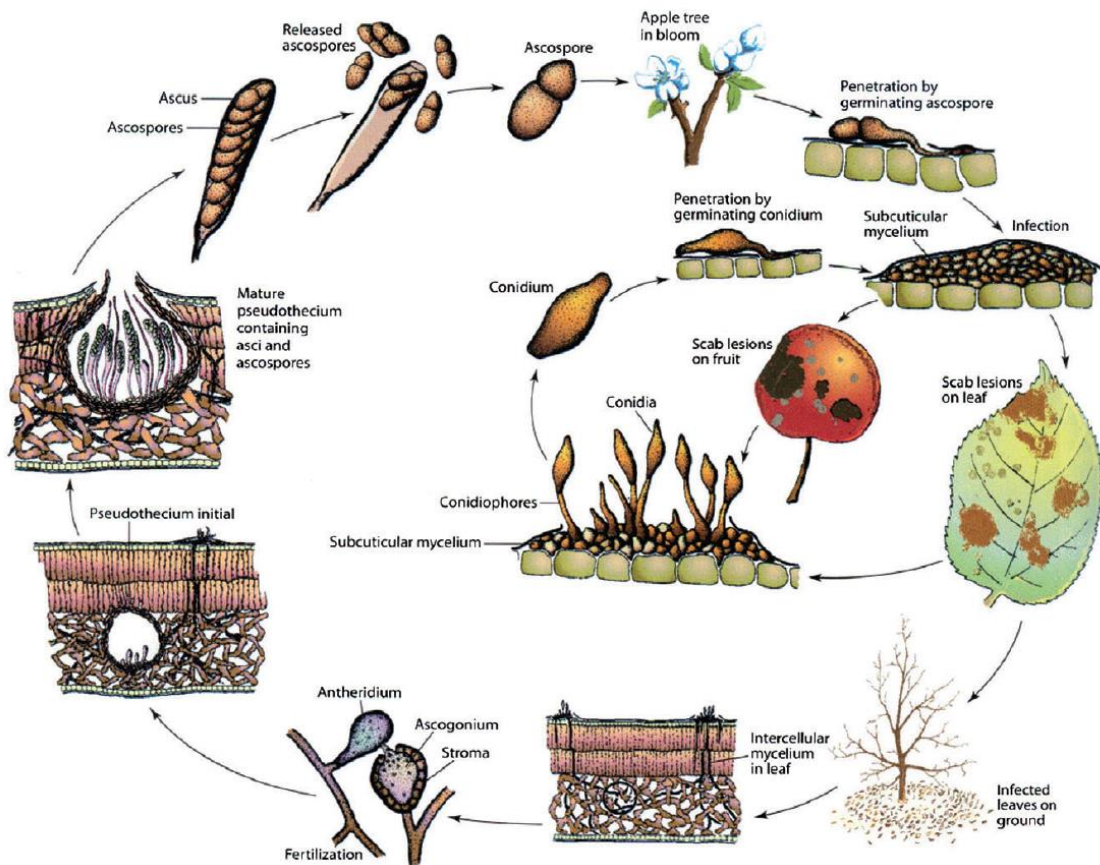
Houby rodu *Venturia* infikují různé rody ovocných dřevin. *V. inaequalis* napadá široké spektrum hostitelských rostlin z čeledi Malaceae, především rod jabloň (*Malus*), *V. pirina* infikuje evropské hrušně (*Pyrus* spp.), *V. nashicola* infikuje asijské hrušně (*Pyrus* spp.), *V. carpophila* broskvoně (*Prunus* spp.) a *V. cerasi* třešně (*Prunus* spp.) (Bowen et al., 2011). Hlavním hostitelem *V. inaequalis* je sice *Malus × domestica*, patogen však napadá i zástupce rodů jeřáb (*Sorbus*), hlohyně (*Pyracantha*), kalina (*Viburnum*) a druhy, jako například lokvát japonský (*Eriobotrya japonica*), hloh obecný (*Crateagus laevigata (oxyacantha)*) a skalník celokrajný (*Cotoneaster integerrimus*) (Juroch, 2010). Jednotlivé druhy rodu *Venturia* lze rozlišit a rozdělit do vlastních kladů na základě polymorfismů vyskytujících se v ribozomálních interních transkribovaných mezernících (angl. spacer; ITS). Topologie fylogramu druhů *Venturia* úzce souvisí s topologií hostitelských rodů, což demonstruje úzký koevoluční vztah mezi patogenními druhy *Venturia* a jejich příslušnými hostiteli (ovocné dřeviny) (Beck et al., 2005).

1.1.4 Vývojový cyklus a způsob šíření

V. inaequalis během svého vývojového cyklu střídá fázi parazitického způsobu života jakožto anamorf s fází saprofytickou jakožto teleomorf (viz Obr. 1). V průběhu saprofytické fáze houba přetrvává v pletivech opadaných listů (Juroch, 2010), konkrétně vytváří své mycelium v mezofylu napadeného listu. Z mycelia v mezofylu vzniká kulovité stroma, ve kterém se vyvíjí trichogyn s askogonem (Vávra et al., 2015a). Jelikož jde v případě *V. inaequalis* o mycelium heterothalické, antheridium vytváří hyfa odlišného páru, pronikající do stromatu (Bowen et al., 2011). Dochází ke spojení antheridia s askogonem skrz trichogyn a poté k plazmogamii, růstu

askogenních hyf, vzniku věceck a přesunu jader (Vávra et al., 2015a). Následně vzniká vrůstáním věceck do dutin stromatu pseudoperithecium (Hluchý et al., 1997), k čemuž je potřeba vlhkost. Askogonia se vyvíjí při teplotách okolo 8 – 12 °C, pro dozrávání askospor, které jsou příčinou primární infekce, jsou však příznivější teploty okolo 16 – 18 °C (Vávra et al., 2015a). Vřecka v dostatečně vlhkém prostředí (dešťové kapky, silná rosa) bobtnají (Kocourek et al., 2015), praskají přes ostiolum (hrdlovitě zúžená část pseudoperithecia) (Vávra et al., 2015a) a vymrštují tak askospory, které jsou dále unášeny vzdušnými proudy (Kocourek et al., 2015). První askospory dozrávají v období rašení jabloně a uvolňovány jsou většinou od druhé poloviny dubna do poloviny června. Nejvíce askospor dozrává od jabloňové fenofáze růžové poupě (Juroch, 2010). Z jednoho napadeného listu se může uvolnit až 2 milióny askospor (Baudyš et al., 1962).

Za vhodných podmínek dochází na povrchu rostlinného pletiva k vyklíčení askospor a vytvoření apresoria (plochý útvar na hyfách, přitisklý ke stěně hostitele). Hyfy pronikají pomocí kutinálních enzymů skrz kutikulu, mezi kutikulou a epidermis vytváří mycelium a pomocí haustorií získávají živiny z epidermálních buněk. Zhruba po 9 – 17 dnech od infekce (v závislosti na klimatických podmínkách) se na pletivu hostitele vytváří léze, tvořené konidiofory s konidii, které jsou zdrojem sekundární infekce (Vávra et al., 2015a). Léze s konidii mají strupovitou (korkovitou) strukturu, podle které bylo onemocnění, které patogen způsobuje, pojmenováno strupovitost jabloně (Bowen et al., 2011). K šíření konidii na nové listy a plody dochází pomocí deště a větru. Šíření patogenu prostřednictvím konidii pokračuje až do konce vegetačního období hostitelské rostliny (Aylor, 1998). Zpravidla se konidie šíří z výše položených částí rostliny níže (Juroch, 2010). Voda je při šíření patogenu nezbytná jak z důvodu šíření, tak pro vyklíčení askospor a konidii. Rychlost klíčení je závislá na vzájemném poměru teploty a vlhkosti. Například při nižších teplotách je pro vyklíčení nezbytné, aby ovlhčení trvalo déle (Kocourek et al., 2015). Na rozdíl od askospor, které pro klíčení potřebují světlo, může k sekundární infekci docházet v průběhu celého dne (Juroch, 2010). V období vegetačního klidu hostitele přechází patogen do saprofytické fáze vývoje a celý cyklus se opakuje (Aylor, 1998).



Obr. 1: Vývojový cyklus *Venturia inaequalis* (Bowen et al., 2011).

1.1.5 Virulence *Venturia inaequalis* u jabloní

Virulence *V. inaequalis* byla doposud popsána u 23 různých izolátů patogenu, jejichž GfG („gene-for-gene“) vztah byl popsán u čtrnácti různých hostitelů (Bus et al., 2011), kteří byli nositeli vždy odlišného genu rezistence *Rvi* (*Rvi1* – *Rvi10* a *Rvi12* – *Rvi15*) (Caffier et al., 2015). U hostitelů nesoucích gen rezistence *Rvi12*, *Rvi14* nebo *Rvi15* nebyl zaznamenán žádný virulentní izolát *V. inaequalis*. Většina (87 %) izolátů byla virulentní u nositelů rezistence *Rvi1 = Vg* (Golden Delicious) (Bénaouf et Parisi, 2000). Často byl překonáván i gen rezistence *Rvi6 = Vf*, konkrétně osmi z 23 izolátů *V. inaequalis* (Caffier et al., 2015). U nositelů genu *Rvi6* dochází často k prolomení rezistence pravděpodobně i z toho důvodu, že je tento gen nejčastěji využíván při šlechtění rezistentních odrůd jabloní (Parisi et al., 2004). Větší množství izolátů se projevilo virulentně i v případě hostitelských rostlin nesoucích gen rezistence *Rvi8*. Gen *Rvi8* pochází z *M. sieversii*, u níž se nejspíš zároveň evolučně poprvé objevila *V. inaequalis*. Z tohoto důvodu je pravděpodobně gen *Rvi8* některými izoláty překonáván. U nositelů *Rvi4* se z 23 izolátů projevily pouze tři, a to jen zvýšenou vnímavostí, která se manifestovala mírnou sporulací. U *Rvi2* se virulentně projevily pouze dva z 23 izolátů *V. inaequalis* (Caffier et al., 2015).

1.2 Strupovitost jabloně

Strupovitost jabloně je nejvýznamnější a hospodářsky nejškodlivější chorobou jabloní v celosvětovém měřítku (Kocourek et al., 2015). K onemocnění jsou náchylná zvláště mladá rostoucí pletiva stromů, zejména mladé listy a plody, ale i květy. U napadených stromů dochází ke snížení schopnosti asimilace (redukcí listové plochy) až opadu listů (Kocourek et al., 2015). Tento negativní vliv na asimilaci se následně odráží na kvalitě plodů, které jsou menší, mají horší chuť nebo jsou hůře skladovatelné (Juroch, 2010). Pokud jsou plody napadeny krátce před sklizní, objevují se na nich v době skladování černé, kruhové, malé léze (Shafi et al., 2019). Plody nelze prodat jako konzumní ovoce, dají se využít pouze průmyslově, což vede k výrazným ekonomickým ztrátám. Pokud u stromů dochází opakovaně k silným infekcím, může dojít k oslabení daného stromu, v extrémním případě až k uhynutí vlivem snížené mrazuvzdornosti (Kocourek et al., 2015).

1.2.1 Symptomy onemocnění

Patogen napadá jak listy, tak i květy a plody hostitelských rostlin (Sherbakoff, 1932). Symptomy onemocnění jsou však nejpatrnější na listech a plodech stromů (Kocourek et al., 2015). Na svrchní i spodní straně listů (Juroch, 2010) se nejprve tvoří nepravidelné světlé skvrny. Po určité době se skvrny zbarvují do hnědozelena, jejich tvar je okrouhlý, mají sametovou strukturu a různou velikost (Sherbakoff, 1932). Dále se skvrny zbarvují až do černa a tvoří lehce vystouplý útvar (Shafi et al., 2019). Listové pletivo pod skvrnami může vlivem nákazy i nekrotizovat, což může ovlivnit růst napadených listů, které mohou být následně zdeformované (Kocourek et al., 2015). Silně napadené listy usychají a nakonec opadávají (Shafi et al., 2019). Stejnými symptomy se onemocnění projevuje i u napadených plodů. Na plodech se opět objevují černé skvrny různé velikosti a sametové struktury. Plody mohou být vlivem onemocnění zdeformovány, v extrémních případech dochází až k jejich praskání (Sherbakoff, 1932), což může vést k následným sekundárním infekcím a hnilobám (Juroch, 2010). Pokud dojde k napadení plodů krátce před sklizní, tzv. pozdní strupovitost, onemocnění se projevuje drobnými černými tečkami na povrchu plodů (Kocourek et al., 2015). U květů se patogen projevuje opět skvrnami a jejich časným opadem (Sherbakoff, 1932).

1.2.2 Ochranná opatření

Ochranná opatření proti výskytu strupovitosti jabloně mohou být přímá a nepřímá. Mezi přímá opatření patří odstraňování zdrojů nákazy, genetická ochrana, ochrana biologická a chemická, mezi nepřímá lze řadit zejména agrotechnická opatření a údržbu výsadeb (Juroch, 2010).

Agrotechnická opatření lze rozdělit na opatření aplikovatelná při zakládání nové ovocné výsadby a opatření, která pozitivně ovlivňují zdravotní stav výsadby. Při zakládání nových výsadeb je třeba vybrat vhodné stanoviště, orientaci, vhodný spon a pěstební tvar výsadeb (Juroch, 2010). Lokalita výsadeb by měla být každý den vystavena slunečnímu záření alespoň 6 hodin (Shafi et al., 2019) a měla by být

dostatečně vzdušná (Kocourek et al., 2015). Pro dobrý zdravotní stav je nezbytné vyrovnané hnojení, doplňková závlaha a správná péče o korunu stromu. Důležitá je také podpora půdních organismů, jako jsou bakterie, houby a žížaly, které rozkládají organické zbytky, mezi které patří i opadané listy jabloní. V případě aplikace pesticidů je tedy nutné vybrat takové přípravky, které jsou ekotoxikologicky nezávadné, nebo alespoň omezit používání pesticidů působících i na necílové organismy (Juroch, 2010). Opadané listí je také možné odstraňovat pomocí speciálních vysavačů, kompostováním či shrabováním a následným odvozem nebo rozdrčením a zapracováním do zeminy, a to ideálně už na podzim, či nejpozději v předjaří (Holb et al., 2006). I když odstraněním listů nezískáme stoprocentní kontrolu nad šířením *V. inaequalis* ve výsadbě, docílíme tak většího účinku dalších biologických a chemických opatření (Sherbakoff, 1932).

Nejvýznamnějším způsobem přímé ochrany, zejména v případě výsadeb v ekologickém režimu, je pěstování rezistentních odrůd jabloní. Jabloně mohou nést několik různých genů rezistence, v některých případech ideálně kombinaci několika těchto genů (polygenní rezistence) (Shafi et al., 2019). Mezi rezistentní odrůdy tuzemského původu patří například Ametyst, Goldstar, Julia, Kordona, Lipno, Luna, Melodie, Opal, Otava, Orion, Rajka, Red Topaz, Rezista, Rondo, Rozela, Rubinola, Selena, Sirius, Topaz, Vysočina. Všechny zmíněné odrůdy jsou nositeli genu rezistence *Rvi6* (*Vf*), který je již v dnešní době poměrně často kmeny *V. inaequalis* překonáván (Kocourek et al., 2015). Proto jsou šlechtěny nové odrůdy, u kterých se využívá tzv. pyramidizace jednotlivých genů rezistence, tedy přikřížení dalších genů pro rezistenci. Polygenně založenou rezistenci proti strupovitosti jabloně můžeme pozorovat například u odrůdy Regia, která je nositelem jak genu rezistence *Rvi2*, tak genu *Rvi4*.

Mezi přímá biologická ochranná opatření patří například použití biopreparátů, které mohou využívat antagonistické (hyperparazitické) mikroorganismy (MacHardy et al., 2001) (antagonistické druhy hub *Athelia bombacina*, *Chaetomium* sp., atd.) (Juroch, 2010). Testovány a využívány jsou také biopreparáty urychlující rozklad infikovaných listů po opadu. Patří sem biopreparáty na bázi enzymů nebo například různě koncentrované kvasnicové extrakty. Kvasnicové extrakty výrazně zvyšují mikrobiální aktivitu už po třech týdnech od aplikace, zvyšují aktivitu žížal a urychlují rozklad opadaných infikovaných listů (Porsche et al., 2013).

Chemickou ochranu, která by se měla uplatňovat až po vyčerpání všech již uvedených ochranných opatření, tvoří chemické postřiky urychlující rozklad listů, a pak zejména fungicidy. Velmi často se jedná o látky s negativním účinkem na životní prostředí a lidské zdraví. Z přípravků urychlujících rozklad listů je to například 5% roztok močoviny, který se aplikuje na podzim a snižuje produkci askospor až o 97 % (Burchill et al., 1965). Rychleji rozkládající se listy v důsledku aplikace roztoku močoviny dále vedou ke zvýšení aktivity žížal (Porsche et al., 2013). V případě fungicidů je velmi důležité zvládnutí zejména primární infekce, ke

kteře dochází od dubna do června, a zabřánit tak infekci sekundární (červenec až sklizeň), aby bylo minimalizováno množství aplikovaných fungicidních postřiků (Bowen et al., 2011). V případě primární infekce se s aplikací fungicidů začíná od fenofáze pukání pupenů (myší ouško). Fungicidní ochranu proti strupovitosti lze ukončit, pokud se na listech a plodech jabloní do konce června neobjeví žádné napadení. Aplikaci fungicidních postřiků lze provádět preventivně nebo kurativně (po vypuknutí infekce). V případě preventivního ošetřeni jsou fungicidy aplikovány v šesti- až osmidenních intervalech, a to v období silného infekčního tlaku při vhodných podmínkách pro infekci. Pokud se však jedná o období intenzivního růstu listů jabloní, je nezbytné interval aplikace fungicidů ještě zkrátit. Nejčastěji jsou v rámci prevence aplikovány fungicidy kontaktní (ftalimidy, chinony, na bázi síry nebo mědi, atd.) a strobilurinové (Kocourek et al., 2015). Kurativní ošetřeni je prováděno, až když jsou vhodné podmínky pro vznik infekce. Aplikovány jsou fungicidy s kurativním účinkem (inhibují růst mycelia v listu), tedy pouze fungicidy systémové, které musí být aplikovány jen pár desítek hodin od vzniku infekce (podle použitého fungicidu) (Juroch, 2010). Mezi fungicidy s kurativním účinkem patří například Chorus 50 WG (aplikace do 60 hodin od vzniku infekce), Clarinet 20 SC (do 48 – 60 hodin od vzniku infekce), Score 250 EC (až do 96 hodin od vzniku infekce) a další (Kocourek et al., 2015). Nejčastěji používané a nejefektivnější jsou však preventivní aplikace fungicidů, a to fungicidů kontaktních a systémových zároveň (Shafi et al., 2019).

V. inaequalis si v průběhu let aplikace fungicidů, často nesprávným způsobem, vyvinula k některým z těchto přípravků rezistenci. V rámci ČR byl v minulosti zaznamenán pokles účinnosti v souvislosti s vyvinutou rezistencí u fungicidů na bázi triazolových látek, mezi které patří například myclobutanil, fenarimol a flusilazole (Kocourek et al., 2015), a strobilurinů (Jaklova et al., 2020). Ve světě byla zaznamenána rezistence některých kmenů *V. inaequalis* například k benzimidazolovým fungicidům a dodinu (Köller, 1994). Vzniku rezistence lze zabřánit nebo ji alespoň oddálit dodržováním zásad antirezistentní strategie. Mezi tyto zásady patří používání strobilurinových (triazolových) fungicidů pouze v plné dávce a kombinaci s kontaktními fungicidy (Brent et Holloman, 2007), nepoužívat blokově fungicidy stejné účinné látky (látek), v případě sníženého účinku fungicidu je nezbytné ho na několik let vyřadit z aplikovaných látek, popřípadě aplikovat pouze mimo období nejsilnějšího infekčního tlaku (Kocourek et al., 2015). Dále je důležité vyvarovat se nadměrné aplikaci fungicidů (Brent et Holloman, 2007). Mechanismem vzniku rezistence u kmenů *V. inaequalis* může být mutace, například v případě rezistence vůči benzimidazolu (Koenraad et al., 1992), u strobilurinových přípravků (Bartlett et al., 2002), nebo v případě DMI fungicidů eflux ven z buňky (Palani et Lalithakumari, 1999).

1.3 Jednonukleotidové polymorfismy (SNPs)

Jednonukleotidové polymorfismy (Single-nucleotide polymorphisms) jsou formou variace DNA mezi jednotlivci, která vzniká substitucí (záměna jednoho nukleotidu

za jiný). SNPs jsou stabilním a nejčastějším typem DNA polymorfismů (Shastry, 2009). Většina těchto změn se v genomu DNA vyskytuje v nekódujících oblastech. SNPs v kódujících oblastech mohou vést k nesynonymním (missense) mutacím, popřípadě k mutacím tichým (silent), které na kódované aminokyseliny vliv nemají (Halushka et al., 1999). SNPs mohou mít vliv na genovou expresi, stabilitu mRNA a efektivitu translace, což se následně může projevit například v metabolismu léčivých látek a náchylností k onemocněním (Lohrer et Tangen, 2000). SNPs mají pravděpodobně vliv i na fenotypové projevy, a to i SNPs vyskytující se v nekódujících oblastech (Shastry, 2009). Jednonukleotidové polymorfismy lze použít jako molekulární markery. Jelikož se tento typ polymorfismu může vyskytovat v asociaci s různými alelami konkrétního genu, jsou SNPs běžně využívány pro detekci přítomnosti těchto alel, které ovlivňují sledovaný fenotypový projev (Rafalski, 2002).

1.3.1 Vznik SNPs

V rámci vícero studií bylo potvrzeno, že SNPs vznikají v blízkosti strukturálních změn DNA (chromozomové a genové mutace), a to v somatických i zárodečných buňkách (De et Babu, 2010; Guo et al., 2016; Wang et al., 2018). Vznik těchto polymorfismů je pravděpodobně způsoben činností tzv. „error-prone“ opravných polymeráz, které jsou aktivovány v případě vzniku strukturálních změn (jednovláknové nebo dvouvláknové zlomy). Tyto změny zahrnují různé opravné mechanismy, které jsou často závislé na homologní rekombinaci založené na templátu, „crossing-over“ zlomené DNA, vytváření DNA struktur, jako jsou D-loops, resekci jednoho řetězce DNA nukleázami (proces, při kterém je odstraněno několik nukleotidů z 5' – konce, čímž vznikne část jednovláknové sekvence na 3' – konci), což vyžaduje syntézu sekvence chybějící oblasti způsobem závislým na templátu. Právě při této syntéze se uplatňují „error-prone“ opravné polymerázy, které mají při zařazování nukleotidů různou míru chybovosti. Na míru chybovosti má vliv obsah nukleotidů G a C a míra rekombinace v regionu (De et Babu, 2010). Vyšší frekvence SNPs byla zaznamenána na 5' – konci oblasti syntetizované „error-prone“ polymerázou (Wang et al., 2018).

1.3.2 Identifikace SNPs

Identifikace SNPs je prováděna například sekvenací několika jedinců a následnou analýzou získaných sekvencí. Volba metody sekvenace závisí na mnoha faktorech, mezi které patří náklady, potřebné vybavení a obtížnost metody (Rafalski, 2002).

Jednou z možných metod je sekvenování nové generace (NGS), které již bylo úspěšně aplikováno pro sekvenaci celých genomů a identifikaci SNPs (Islam et al., 2014). Tato technologie umožňuje rychle identifikovat velké množství SNPs s nízkými cenovými náklady. V rámci NGS jsou současně v jednom běhu zpracovány až miliardy sekvencí, což vede k produkci velkého množství dat. Existuje několik různých platforem sekvenování nové generace, mezi které patří například Illumina, Ion Torrent a další (Escalona et al., 2016).

Další sekvenační metodou, která umožňuje získání velkého množství dat pro následnou identifikaci SNPs, je metoda společnosti Oxford Nanopore Technologies (ONT). V rámci sekvenace ONT prochází jednovláknový řetězec DNA proteinovým nanopórem, který je stabilizován v elektricky odolné polymerové membráně. V průběhu sekvenace tedy nedochází k syntéze DNA, jako je tomu u jiných metod (Feng et al., 2015), ale jednotlivé nukleotidy řetězce DNA pouze prochází skrze tento pór a mění elektrický proud, který je zaznamenán senzorem. Dle těchto změn jsou rozpoznány jednotlivé nukleotidy. Mezi výhody této metody patří „base calling“ (rozpoznávání bází) v reálném čase, možnost sekvenace dlouhých úseků DNA (až 2,5 Mbp) a možnost provedení i na přenosném zařízení. Hlavní nevýhodou je poměrně vysoká chybovost (5 až 20 %) (Kono et Arakawa, 2019). Tuto chybovost lze alespoň částečně odfiltrovat pomocí různých počítačových skriptů (Cornelis et al., 2019).

Z výše zmíněných metod sekvenace vzniká velké množství dat, které je i v dnešní době problematické účinně zpracovat a uchovat. Jsou potřeba vysoce výkonné infrastruktury, jako jsou například cloudy, klastry CPU nebo grafické jednotky (GPU) (Schmidt et Hildebrandt, 2017). Aplikují a vyvíjejí se stále nové bioinformatické nástroje, které se tento problém snaží řešit (Glaubitz et al., 2014).

1.3.3 Genotypizace známých SNPs

Genotypizace známých SNPs je možná s využitím Sangerovy metody sekvenace, která spočívá v syntéze směsi různě dlouhých fragmentů jednořetězcové DNA zakončených fluorescenčně značenými dideoxynukleotidy (ddNTP). K sekvenační reakci jsou tedy potřeba jeden primer, DNA polymeráza, směs deoxynukleotidů (dNTP) a fluorescenčně značených ddNTP. Nasednutím ddNTP (na 3' uhlíku deoxyribózy není -OH skupina) na řetězec se ukončí proces elongace (Sanger et Coulson, 1975). Získaná směs jednořetězcových DNA fragmentů je následně analyzována kapilární elektroforézou. Pomocí Sangerovy metody je v dnešní době možné osekvenovat řetězce DNA o délce >1 000 bp (Stranneheim et Lundeborg, 2012). Největším omezením Sangerovy metody je nekvalitní čtení prvních 15 až 40 bp sekvence z důvodu nasedání primeru a nižší schopnost rozlišit jednotlivé nukleotidy sekvence po překonání délky 900 bp (Crossley et al., 2020).

Další metodou využívanou pro genotypizaci SNPs je alelická diskriminace. Alelická diskriminace je metoda, při které mohou být využívány dvě specifické sondy, přičemž každá ze sond je specifická pro konkrétní alelickou variantu. Sondy jsou na 5' – konci značeny odlišným reportérovým fluoroforem (Livak, 1999) a na 3' – konci mají navázaný tzv. zhášeč, který eliminuje fluorescenční signál reportéru a blokuje 3' – konec sond. Reakce je nejčastěji prováděna pomocí real-time PCR. Činností DNA polymerázy ve směru od 5'- konce je v průběhu real-time PCR sonda vždy rozštěpena, reportér se vzdálí od zhášeče a dojde ke zvýšení fluorescence po excitaci světlem o vhodné vlnové délce. Tato fluorescence je následně v daném spektru po každém cyklu reakce zaznamenána detektorem uvnitř real-time PCR cyklu.

(McGuigan et Ralston, 2002). Alternativně lze pro real-time PCR využít primery specifické pro konkrétní alelu na 3' – konci v rámci tzv. PCR-ASPE (polymerase chain reaction-allele specific primer extension), při které jsou vznikající dvouřetězcové úseky DNA obarveny fluorescenčním barvivem SYBR Green a fluorescence je detekována v průběhu PCR (Papp et al., 2003).

SNaPshot® (Thermo Fisher Scientific) je metoda přímo vyvinutá pro genotypizaci SNPs. Nejprve je nezbytné provést pomocí standardní PCR amplifikaci úseku, který obsahuje genotypizovaný SNP. Amplifikované vzorky jsou následně zpracovány prostřednictvím SNaPshot reakce, která využívá specifických primerů nasedajících na sekvenci přesně před analyzovaný SNP. V reakci jsou použity pouze fluorescenčně značené ddNTP, po inkorporování prvního ddNTP je tedy elongace ukončena. Vzorky jsou následně analyzovány kapilární elektroforézou. Tato technika umožňuje multiplexní detekci více SNPs v jedné reakci (Paneto et Careta, 2015).

Existují i další metody a jejich různé modifikace pro genotypizaci SNPs, které byly a jsou používány. Mezi tyto metody patří například Microarray Genotyping, Molecular Beacon Genotyping, Arrayed Primer Extension, Primer Extension With Detection by Mass Spectrometry a mnoho dalších (Kwok et Chen, 2003).

1.4 Genom jabloně

Genom jabloně byl publikován poprvé v roce 2010 (Velasco et al., 2010) a následně byla zveřejněna resekvenovaná přesnější verze dvojitého haploidu *Golden Delicious* (GDDH13). Velikost haploidního genomu GDDH13 činí přibližně 651 Mbp (Daccord et al., 2017). Zhruba před 50 miliony let došlo k částečné duplikaci genomu jabloně a v důsledku toho k navýšení z původních devíti na dnešních sedmáct chromozomů (Velasco et al., 2010). Setkat se nejčastěji můžeme s diploidními odrůdami, ale i triploidními odrůdami a vzácně tetraploidními. Celkem bylo pomocí analýzy transkriptomu v genomu GDDH13 identifikováno 42 140 genů kódujících proteiny a 1 965 genů nekódujících proteiny. 59,5 % genomu tvoří transponovatelné elementy (TE), z nichž většinu zaujímají retrotranspozony (74,8 % TE). Z retrotranspozonů jsou to zejména LTR retrotranspozony, ale v menším množství i non-LTR retrotranspozony (LINE a SINE). Dále se v genomu vyskytovaly DNA transpozony a helitrony tvořící 23 % TE (Daccord et al., 2017). Ve srovnání například s huseníčkem rolním, topolem, hroznovým vínem, rýží nebo kukuřicí však genom jabloně obsahuje nejnižší množství DNA transpozonů (Velasco et al., 2010). Metylace genomu v listech se v kontextech CG, CHG a CHH (H = adenin, thymin nebo cytosin) pohybuje okolo 49 %, 39 % a 12 %, není však v rámci jednotlivých chromozomů rovnoměrná. Jabloně jsou stejně, jako většina dalších ovocných stromů rozmnožovány roubováním na podnože, což může vést k získání a šíření epimutací prostřednictvím různé metylace DNA. Rozdíly v metylomu mohou následně vést k odlišnému fenotypovému projevu (Daccord et al., 2017), například může mít vliv na barvu plodu (El-Sharkawy et al., 2015).

1.5 Rvi geny rezistence

Geny rezistence vůči kmenům *V. inaequalis* představují ve šlechtění jabloní velkou naději v systému přímé ochrany vůči tomuto patogenu. Dosud bylo identifikováno mnoho těchto genů a s nimi souvisejících molekulárních markerů (Khajuria, 2018). Různé kmeny *V. inaequalis* nesou různé geny avirulence (*Avr* geny), které jsou následně rozpoznávány produkty hostitelských genů rezistence (*R* geny), což následně vede k aktivaci řetězce obranných mechanismů rostliny, které zastaví růst patogenu. Tato „gene-for-gene“ interakce (Flor, 1971) znamená, že pro gen rezistence většinou existuje i gen avirulence nesený patogenem (Broggini et al., 2011). Jednotlivé geny rezistence jsou označovány *Rvik*, kde „R“ odpovídá genu rezistence, „vi“ *Venturia inaequalis* a „k“ počtu specifických „gene-for-gene“ interakcí. Stejně tak jsou pojmenovány i odpovídající geny avirulence (*avrRvik*) (Bus et al., 2011). U různých kultivarů jabloní bylo již identifikováno okolo dvaceti různých lokusů (*Rvi1* až *Rvi20*) těchto genů rezistence. *R* geny se projevují odlišnou fenotypovou reakcí a rychlostí reakce na případné napadení patogenem, proto byly jednotlivé geny rozděleny do čtyř tříd. První třída je označena jako velmi rezistentní, druhá třída rezistentní, třetí třída je rozdělena na dvě podtřídy (3a slabě rezistentní a 3b slabě citlivý) a čtvrtá třída zahrnuje geny rezistence s citlivou fenotypovou odpovědí. Většina *Rvi* genů je monogenní, řídí se Mendelovými zákony dědičnosti (Khajuria, 2018). Dále jsou podrobněji popsány pouze geny, které byly v rámci této práce zpracovávány, přičemž byl kladen hlavní důraz na gen *Rvi4*.

1.5.1 Rvi2

Gen rezistence *Rvi2* byl původně identifikován v semenáči *Malus pumila* R12740-7A. *Rvi2* u svého nositele podmiňuje vznik hvězdicovité nekrózy, dosahující často několika milimetrů v průměru (Bus et al., 2005). Gen se nachází ve vazbové skupině (Linkage Group) LG2 mezi SSR markerem CH05e03 a SCAR markerem OPL19SCAR (Jänsch et al., 2015). Pro analýzu genu *Rvi2* byl validován SNP W242 (Chagné et al., 2019), který se nachází v oblasti nazvané FBSnRvi2-7 ve vzdálenosti 1,2 cM od *Rvi2* (Jänsch et al., 2015). V případě SNP W242 odpovídají genotypy A/T a A/A rezistentnímu jedinci (nositel *Rvi2*) a genotyp T/T jedinci citlivému (není nositelem *Rvi2*) (Chagné et al., 2019). Tento gen rezistence už však byl některými kmeny *V. inaequalis* překonán (Khajuria, 2018).

1.5.2 Rvi4

Stejně, jako gen *Rvi2* i gen *Rvi4* byl poprvé identifikován v genomu semenáče *Malus pumila* R12740-7A. Rostliny disponující genem rezistence *Rvi4* vykazují hypersenzitivní reakci (rychlá nekróza v místě napadení patogenem), u některých rostlin se však může objevit i reakce chlorotická (Bus et al., 2005). Gen se opět nachází ve vazbové skupině LG2, mezi SSR markery Hi22d06 a CH02a02a (Jänsch et al., 2015). Detekci genu rezistence lze provést pomocí validovaného SNP K146 (Chagné et al., 2019), nacházejícího se v oblasti označené FBSnRvi4-1 v kosegregaci s *Rvi4* (Jänsch et al., 2015). Genotypy T/G a T/T SNP K146 odpovídají rezistentnímu jedinci (nositel *Rvi4*) a genotyp G/G citlivému jedinci (není nositelem *Rvi4*) (Chagné

et al., 2019). Tento gen rezistence byl překonán izolátem *V. inaequalis* 1797-9 (Khajuria, 2018).

1.5.3 *Rvi6*

Rvi6 je prvním identifikovaným, nejprostudovanějším a nejpoužívanějším genem rezistence poprvé detekovaným v jabloni *Malus floribunda* 821 (Soriano et al., 2014). Gen u svého hostitele způsobuje zastavení množení patogenu, což dále vede k chlorotické reakci, ale jsou známy i odlišné fenotypové reakce charakteristické pro geny rezistence první až třetí, respektive 3b třídy. Tato variabilita ve vyvolané fenotypové reakci je připisována odlišnému genetickému prostředí genu rezistence v rámci různých kultivarů jabloní (Gessler et al., 2006) a efektu QTL (Quantitative Trait Locus) (Khajuria, 2018). *Rvi6* leží ve vazbové skupině LG1 mezi molekulárním markerem Al07 a molekulárním markerem M18 (Patocchi et al., 1999). V této oblasti také leží tři paralogy tohoto genu, geny *Rvi6.1* až *Rvi6.3* (Bus et al., 2011). Pro analýzu genu *Rvi6* lze využít tři validované SNPs (Chagné et al., 2019). Tyto SNPs leží v oblastech nazvaných M8S a M18 ve vzdálenosti maximálně 0,9 cM od genu rezistence (Jansch et al., 2015). V oblasti M8S se nachází SNP R156, ve kterém genotypy A/G a A/A odpovídají rezistentnímu jedinci (nositel *Rvi6*) a genotyp G/G citlivému jedinci (není nositelem *Rvi6*). Dále oblast M8S obsahuje SNP R193, ve kterém naopak genotypy A/G a G/G odpovídají rezistentnímu jedinci a genotyp A/A jedinci citlivému. V rámci druhé oblasti M18 se nachází SNP Y32, v jehož případě genotypy C/T a T/T odpovídají rezistentnímu jedinci a genotyp C/C citlivému jedinci (Chagné et al., 2019). Jelikož je gen *Rvi6* ve šlechtitelství nejčastěji a nejdéle používaným zdrojem rezistence vůči *V. inaequalis*, je tento gen v dnešní době často překonáván (Khajuria, 2018). Vzhledem k tomuto problému je v případě využití *Rvi6* nezbytné tento gen kombinovat (pyramidizovat) s dalšími geny rezistence, aby vznikl rezistentní kultivar jabloně (Soriano et al., 2014).

1.5.4 Pyramidizace

Pyramidizace je metoda kombinování vícero genů v jednom organismu, což vede k současné expresi těchto genů a v případě genů *Rvi* k rezistenci vůči širšímu spektru kmenů *V. inaequalis*. Pyramidizace genů tak má v rámci šlechtitelství velký význam. Úspěch pyramidizace je ovlivněn několika faktory včetně počtu pyramidizovaných genů, vzájemnými vzdálenostmi mezi těmito geny a molekulárními markery, které je obklopují, počty vybraných genotypů z jednotlivých generací křížení a mnoha dalšími (Joshi et Nayak, 2010).

Cílem pyramidizace genů je vyšlechtit ideální genotyp, který je homozygotní pro příznivé alely ve všech sledovaných lokusech (Joshi et Nayak, 2010). Tohoto stavu lze dosáhnout většinou až po opakovaném křížení několika získaných generací (Dekkers et Hospital, 2002). Genovou pyramidizaci lze rozdělit do dvou částí. V první části je cílem kumulace všech žádaných genů do jednoho genotypu (kořenový genotyp). Ve druhé části je cílem fixace těchto cílových genů do

homozygotního stavu, aby bylo možné odvodit ideální genotyp z jediného genotypu (Joshi et Nayak, 2010).

1.5.5 Marker-assisted selection (MAS)

„Marker-assisted selection“ (MAS) je metoda selekce, která umožňuje detekci sledovaných alel již v rané fázi vývoje rostliny (Liebhard et al., 2003). Jedná se o velmi důležitý nástroj v rámci současných šlechtitelských programů po celém světě, kde je snaha vyšlechtit vylepšené plodiny (Frey et al., 2004). Metoda je zejména přínosná v případě šlechtění vytrvalých rostlin, u kterých se důležité sledované znaky často projeví až po mnoha letech nákladné péče o rostliny (Liebhard et al., 2003). Je tedy hojně využívána v případě šlechtění rezistentních odrůd jablek vůči *V. inaequalis*. MAS funguje spolehlivě zejména pro monogenní a oligogenní vlastnosti, pro vlastnosti polygenní je vhodnější využít genomovou selekci (Chagné et al., 2019).

Než byla pro účely selekce rezistentních hybridních semenáčků po předešlém řízeném křížení aplikována metoda MAS, bylo využíváno umělé infekce patogenem *V. inaequalis* v raných vývojových fázích. V rámci řízeného křížení bylo opylováno pyllem vhodné otcovské rostliny více květů mateřské rostliny a následně byla ze získaných plodů vyluštna semena, která se nechala stratifikovat. Semena byla dále od února do března vysévána a ve fázi 2 až 4 pravých listů byly semenáčky inokulovány patogenem prostřednictvím vodné suspenze konidií *V. inaequalis* v rozprašovači (Vávra et al., 2015b). Zhruba po 21 dnech bylo provedeno hodnocení fenotypového projevu dle klasifikační bonitační stupnice (Chevalier et al., 1991).

Všechny výše zmíněné kroky následující po výsevu semen lze s využitím MAS přeskočit a odebráním 1 až 3 listů semenáčků s následnou analýzou okamžitě a přesně určit výsledky provedeného křížení. V rámci MAS lze využít různé laboratorní metody pro analýzu molekulárních markerů (SSR, SNP, SCAR, atd.) v asociaci s požadovaným znakem, mezi které patří různé modifikace PCR, fragmentační analýza a sekvenování (Jansch et al., 2015). Kvantitativní PCR (qPCR) je však zlatým standardem mezi metodami využívanými v MAS, zejména kvůli reprodukovatelnosti a finančně stále výhodnějšímu genotypování (Chagné et al., 2019).

2 Materiály a metody

2.1 Materiál

Nejprve bylo sekvenováním testováno celkem 111 vzorků, z kterých již byla dříve izolována DNA. Dále byly v rámci celého projektu odebrány vzorky z 330 kříženců, z nichž 111 bylo potenciálními nositeli genu *Rvi4* v heterozygotním stavu. Zpracováno bylo také 26 slepých vzorků odebraných mimo výsadby VŠÚO.

V průběhu experimentální části diplomové práce bylo pro porovnání vyzkoušeno celkem šest komerčně dostupných kitů pro izolaci genomové DNA. Izolace DNA ze vzorků byla provedena kity Exgene Plant SV mini firmy GeneAll; GenElute™ Plant Genomic DNA Miniprep firmy Sigma-Aldrich; GeneJET Plant Genomic DNA Purification Mini firmy Thermo Fisher Scientific; WizPrep™ Plant DNA Mini firmy Wizbiosolutions; NucleoSpin Plant II firmy Macherey-Nagel a QuickExtract Plant DNA Extraction Solution firmy Biosearch Technologies. Pro purifikaci PCR fragmentů z agarózového gelu byl využit kit WizPrep Gel/PCR Purification Mini firmy Wizbiosolutions. V rámci sekvenační reakce byl primárně používán BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit firmy Thermo Fisher Scientific, část vzorků byla zpracována pomocí Gerbera Sequencing Kit v3.1 firmy SEQme. Následná purifikace sekvenační reakce byla provedena kitem BigDye XTerminator Purification firmy Thermo Fisher Scientific a pro SNaPshot reakci byl využit SNaPshot Multiplex Kit firmy Thermo Fisher Scientific.

2.1.1 Odběr vzorků

Vzorky byly odebírány z jednoletých rostlin kříženců připravených ve Výzkumném a šlechtitelském ústavu ovocnářském Holovousy s.r.o. v roce 2020 (viz Tab. 1). Odebírány byly vždy 2 – 3 listy z každé rostliny. Listy byly následně ihned zpracovány, popřípadě zamrazeny v 2ml mikrozkušavkách v -80 °C.

Tab. 1: Tabulka s počtem jednotlivých odebraných variant křížení. (sloup. = sloupcový vzrůst)

Křížení	Počet semenáčků
Herald (sloup. + <i>Rvi6</i>) × Regia (<i>Rvi2</i> , <i>Rvi4</i>)	83
Rubinstep × Regia (<i>Rvi2</i> , <i>Rvi4</i>)	30
HL191 * (sloup.) × Herald (sloup. + <i>Rvi6</i>)	174
Cumulus (sloup. + <i>Rvi6</i>) × 9AR2T196 (<i>Rvi5</i>)	43
Celkem	330

2.2 Přístrojové vybavení

Celá experimentální část diplomové práce byla prováděna v Laboratoři molekulární biologie Výzkumného a šlechtitelského ústavu ovocnářského Holovousy s.r.o.

V rámci všech níže popsaných postupů bylo využíváno uvedené přístrojové vybavení.

Váha – RADWAG PS 210.R2

Vortex – Genius 3; PV-1 Vortex Mixer

Oscilační mlýnek – Retsch MM 400

Termoblok – myBlock I – digital dry bath with 1 Quick-Flip; Omni Bio tepelný blok

Centrifuga – BOECO M-24 A Microlitre

Mikroobjemový spektrofotometr – Thermo Scientific™ NanoDrop Lite

Minicentrifuga – MyFuge Mini

PCR box – Passive Aura PCR Cabinet

PCR cykler – Bio-Rad C1000 Touch Thermal Cycler

Real-time PCR cykler – Rotor-Gene Q 5plex HRM Platform

Elektroforéza (zdroj) – Pharmacia EPS 500/400

Elektroforéza (nádoba) – Owl B

UV transluminátor – Biometra TI 1; Bio-Imaging Systém MiniLumi

Osmikapilárový Sangerův sekvenátor – AB3500 Genetic Analyzer

Pipety

Lednička

Mrazák (-20 °C a -80 °C)

Mikrovltná trouba

2.3 Izolace DNA

Celková DNA jabloně byla z odebraných listů v rámci srovnání izolována pomocí šesti různých komerčně dostupných kitů. Výběr vhodného kitu pro izolaci rostlinné DNA vybraného rostlinného druhu z různých pletiv (biochemické složení napříč rostlinami se liší) je naprosto klíčový. Problematické jsou zejména polysacharidy, proteiny a polyfenoly, které mohou inhibovat enzymatické reakce či snižovat výtěžek a čistotu izolované rostlinné DNA.

V rámci izolace DNA pomocí kolonkových kitů (Exgene Plant SV mini; GenElute™ Plant Genomic DNA Miniprep; GeneJET Plant Genomic DNA Purification Mini;

WizPrep™ Plant DNA Mini; NucleoSpin Plant II) byly použity uvedené nástroje a reagenty:

- Sterilní kovové špachtličky
- Sterilní třecí misky a tloučky
- Sterilní 2ml a 1,5ml mikrozkušavky, stojánky na mikrozkušavky
- Tekutý dusík
- Suchý led
- Etanol (96 – 100%)
- Špičky s filtrem
- Buničitá vata
- Dekontaminační sprej Desprej nebo ROTI Nucleic Acid-free sprej

V rámci izolace DNA pomocí QuickExtract Plant DNA Extraction Solution byly použity uvedené nástroje a reagenty:

- Sterilní 1,5ml a 0,5ml mikrozkušavky, stojánky na mikrozkušavky (polystyrenový stojánek na 0,5ml zkumavky)
- Sterilní kovové špachtličky
- Špičky s filtrem
- Buničitá vata
- Dvě polystyrenové nádoby
- Teploměr
- Izolepa a nůžky
- Kovová pinzeta
- Dekontaminační sprej Desprej nebo ROTI Nucleic Acid-free sprej

2.3.1 Postup izolace DNA pomocí kitu Exgene Plant SV mini (GeneAll)

Všechny centrifugační kroky v rámci následujícího postupu izolace, byly prováděny při otáčkách 13 500 RPM. Části pletiva všech listů jedné rostliny byly nejprve pomocí tekutého dusíku a sterilní třecí misky s tloučkem rozetřeny na jemný prášek. Alternativně byly listy zamražené na -80 °C (v suchém ledu) homogenizovány pomocí kovové kuličky a oscilačního mlýnku. Po vyprchání tekutého dusíku bylo co nejrychleji pomocí sterilní kovové špachtličky naváženo 100 mg prášku do sterilní a popsané 2ml mikrozkušavky. K naváženému prášku se přidalo 400 µl pufru PL a 3 µl RNasy A. Obsah zkumavky se následně promíchal intenzivním vortexováním a vzorek se nechal inkubovat 15 minut při 65 °C v termobloku (každých 5 minut bylo vortexování opakováno). Následně se přidalo 140 µl pufru PD, vzorek se opět vortexoval a nechal inkubovat, tentokrát 5 minut na ledu. Získaný homogenát se přenesl sterilní kovovou špachtličkou na EzSep kolonku a nechal se centrifugovat po dobu 2 minut. Lyzát, který skrz filtr kolonky protekl, se opatrně pomocí pipety přenesl do sterilní 1,5ml mikrozkušavky (zhruba 420 µl), aniž by byla narušena peleta na dně sběrné zkumavky. K lyzátu byl přidán 1,5násobek pufru BD a obsah mikrozkušavky byl okamžitě důkladně promíchán otáčením zkumavky. 700 µl

vzniklé směsi bylo přeneseno na zelenou SV kolonku se sběrnou zkumavkou a nechalo se 1 minutu centrifugovat. Proteklá tekutina se ze sběrné zkumavky vylila a hrany zkumavky se otřely buničitou vatou. Krok byl zopakován i se zbytkem směsi. Následně se na SV kolonku přidalo 700 μ l pufru CW a opět se nechala centrifugovat 1 minutu, proteklá tekutina se vylila a hrany sběrné zkumavky byly otřeny buničitou vatou. Především krok byl zopakován tentokrát s 300 μ l pufru CW a po otření hran sběrné zkumavky se nechala kolonka ve sběrné zkumavce centrifugovat po dobu 1 minuty prázdná. Po tomto finálním odstranění pufru CW byla kolonka vsunuta do sterilní 1,5ml mikrozukavky a do středu kolonky bylo pipetováno 100 μ l pufru AE. Po pětiminutové inkubaci při pokojové teplotě se zkumavka s kolonkou nechala centrifugovat 1 minutu. Kvalita (koncentrace a čistota) izolované DNA byla ověřena na přístroji Thermo Scientific™ NanoDrop Lite. Poměr A260/A280 musel být v rozmezí 1,65 – 2,1. Takto připravená DNA byla ihned zpracována, nebo skladována při ≤ -20 °C.

2.3.2 Postup izolace DNA pomocí kitu GenElute™ Plant Genomic DNA Miniprep (Sigma-Aldrich)

Všechny centrifugační kroky v rámci následujícího postupu izolace, byly prováděny při otáčkách 13 500 RPM. Rostlinný materiál byl rozmělněn identicky, jako je popsáno u izolačního kitu Exgene Plant SV mini. Do 2ml mikrozukavky se 100 mg natřeného vzorku bylo přidáno 350 μ l pufru Lysis buffer, 50 μ l pufru Lysis Solution Part B a celý obsah zkumavky byl důkladně promíchán pomocí vortexu. Vzorek byl následně umístěn na 15 minut do termobloku vyhřátého na 65 °C a každých 5 minut byl krátce vortexován. Po 15 minutách bylo k homogenátu přidáno 130 μ l pufru Precipitation solution, obsah mikrozukavky byl promíchán otáčením zkumavky a směs byla umístěna na 5 minut na led. Homogenát byl pomocí kovové špachtličky přenesen na filtrační kolonku modré barvy a nechal se 1 minutu centrifugovat. Maximum proteklého lyzátu bylo pipetou přeneseno do čisté 2ml mikrozukavky, připipetovalo se 700 μ l pufru Binding solution a obsah mikrozukavky byl opět řádně promíchán otáčením zkumavky. Do nové sterilní 2ml mikrozukavky byla umístěna vazebná kolonka Nucleic Acid Binding Column, která byla aktivována přidáním 500 μ l aktivačního roztoku. Mikrozukavka s kolonkou se nechala 1 minutu centrifugovat, proteklá tekutina byla vylita a hrany zkumavky byly otřeny buničitou vatou. Na aktivovanou vazebnou kolonku bylo nanášeno 700 μ l připravené směsi vzorku s pufrům Binding solution, kolonka se nechala 1 minutu centrifugovat, proteklá tekutina byla vylita a hrany zkumavky otřeny buničitou vatou. Především krok byl zopakován i se zbytkem směsi vzorku s pufrům Binding solution a kolonka byla po centrifugaci vložena do nové sterilní 2ml mikrozukavky. Na vazebnou kolonku bylo pipetováno 500 μ l pufru Wash solution, kolonka se nechala 1 minutu centrifugovat, proteklá tekutina byla vylita a hrany zkumavky otřeny buničitou vatou. Na vazebnou kolonku bylo opět nanášeno 500 μ l pufru Wash solution, tentokrát se však kolonka nechala centrifugovat 3 minuty a po vylití proteklé tekutiny byla prázdná kolonka opět centrifugována po dobu 1 minuty,

aby byl pufr Wash solution z vazebné kolonky zcela odstraněn. Vazebná kolonka byla vložena do nové sterilní 2ml mikrozkušavky a bylo na ni nanášeno 100 μ l pufru TE Buffer vyhřátého na 65 °C. Kolonka se s pufrém nechala inkubovat 1 minutu při pokojové teplotě, a poté byla 1 minutu centrifugována. Kvalita (koncentrace a čistota) izolované DNA byla ověřena na přístroji Thermo Scientific™ NanoDrop Lite. Poměr A260/A280 musel být v rozmezí 1,65 – 2,1. Takto připravená DNA byla ihned zpracována, nebo skladována při ≤ -20 °C.

2.3.3 Postup izolace DNA pomocí kitu GeneJET Plant Genomic DNA Purification Mini (Thermo Fisher Scientific)

Rostlinný materiál byl rozmělněn identicky, jako je popsáno u izolačního kitu Exgene Plant SV mini. Do 2ml mikrozkušavky se 100 mg natřeného vzorku bylo co nejrychleji přidáno 350 μ l pufru Lysis Buffer A a směs byla intenzivně vortexována. K homogenátu bylo přidáno 50 μ l pufru Lysis Buffer B, 20 μ l RNasy A a celá směs byla opět promíchána vortexováním. Následně se vzorek nechal 15 minut inkubovat v termobloku vyhřátém na 65 °C. Každých 5 minut byl vzorek promíchán pomocí vortexu. Po dokončení inkubace bylo do mikrozkušavky pipetováno 130 μ l pufru Precipitation Solution, obsah byl ihned promíchán otáčením zkumavky a 5 minut se nechal inkubovat na ledu. Směs se poté nechala 5 minut centrifugovat při 14 000 RPM a maximum lyzátu bylo bez narušení pelety přeneseno do sterilní 1,5ml mikrozkušavky. K lyzátu bylo přidáno 400 μ l pufru Plant gDNA Binding Solution, 400 μ l 96% etanolu a obsah mikrozkušavky byl okamžitě otáčením zkumavky důkladně promíchán. 700 μ l směsi bylo přeneseno na kolonku se sběrnou zkumavkou a nechala se centrifugovat 1 minutu při 8 000 RPM. Proteklá tekutina byla ze sběrné zkumavky vylita a hrany byly otřeny buničitou vatou. Krok byl zopakován i se zbytkem směsi. Následně bylo na kolonku pipetováno 500 μ l pufru Wash Buffer I a směs se nechala 1 minutu centrifugovat při 10 000 RPM. Proteklá tekutina byla vylita, hrany sběrné zkumavky otřeny buničitou vatou a kolonka se opět vsunula do sběrné zkumavky. Na kolonku bylo pipetováno 500 μ l tentokrát pufru Wash Buffer II a směs se nechala 3 minuty centrifugovat při 14 000 RPM. Proteklá tekutina byla vylita, hrany sběrné zkumavky otřeny buničitou vatou a kolonka se opět vsunula do sběrné zkumavky. Centrifugace (1 minuta při 14 000 RPM) byla opakována s prázdnou kolonkou, aby byl z kolonky zcela odstraněn pufr Wash Buffer II. Po stočení byla kolonka vsunuta do nové sterilní 1,5ml mikrozkušavky a do středu kolonky bylo nanášeno 100 μ l pufru Elution Buffer. Kolonka s pufrém se nechala 5 minut inkubovat při pokojové teplotě, poté byla 1 minutu centrifugována při 10 000 RPM a kvalita (koncentrace a čistota) izolované DNA byla ověřena na přístroji Thermo Scientific™ NanoDrop Lite. Poměr A260/A280 musel být v rozmezí 1,65 – 2,1. Takto připravená DNA byla ihned zpracována, nebo skladována při ≤ -20 °C.

2.3.4 Postup izolace DNA pomocí kitu WizPrep™ Plant DNA Mini (Wizbiosolutions)

Všechny centrifugační kroky v rámci následujícího postupu izolace, byly prováděny při otáčkách 13 500 RPM. Rostlinný materiál byl rozmělněn identicky, jako je popsáno u izolačního kitu Exgene Plant SV mini. Do 2ml mikrozkušavky se 100 mg natřeného vzorku bylo pipetováno 400 μ l pufru GP1, 5 μ l RNasy A a směs byla důkladně promíchána vortexováním. Dále se homogenát nechal 15 minut inkubovat v termobloku vyhřátém na 65 °C a každých 5 minut byl krátce vortexován. K homogenátu bylo přidáno 100 μ l pufru GP2, směs byla promíchána pomocí vortexu a nechala se 5 minut inkubovat na ledu. Homogenát byl po inkubaci přenesen pomocí kovové špachtličky na fialovou kolonku ve sběrné zkumavce a nechal se 2 minuty centrifugovat. Maximálně 400 μ l proteklého lyzátu bylo bez narušení pelety přeneseno do nové sterilní 2ml mikrozkušavky. K lyzátu byl pipetován 1,5násobek pufru GP3 a obsah mikrozkušavky byl důkladně promíchán otáčením zkumavky. Takto připravená směs byla přenesena na žlutou kolonku ve sběrné zkumavce a nechala se 1 minutu centrifugovat. Proteklá tekutina byla vylita a hrany sběrné zkumavky otřeny buničitou vatou. Na kolonku bylo nanášeno 400 μ l pufru PW1 a nechala se 1 minutu centrifugovat. Proteklá tekutina byla vylita a hrany sběrné zkumavky otřeny buničitou vatou. Dále bylo na kolonku nanášeno 600 μ l pufru PW2 a nechala se 1 minutu centrifugovat. Proteklá tekutina byla opět vylita, hrany sběrné zkumavky otřeny buničitou vatou a prázdná kolonka se nechala centrifugovat 3 minuty. Po centrifugaci byla sběrná zkumavka vyhozena a kolonka byla vsunuta do sterilní 1,5ml mikrozkušavky. Na střed kolonky bylo pipetováno 100 μ l pufru Elution Buffer, který se na kolonce nechal inkubovat 1 minutu při pokojové teplotě. Po dokončení inkubace se vzorek 1 minutu centrifugoval. Kvalita (koncentrace a čistota) izolované DNA byla ověřena na přístroji Thermo Scientific™ NanoDrop Lite. Poměr A260/A280 musel být v rozmezí 1,65 – 2,1. Takto připravená DNA byla ihned zpracována, nebo skladována při ≤ -20 °C.

2.3.5 Postup izolace DNA pomocí kitu NucleoSpin Plant II (Macherey-Nagel)

Všechny centrifugační kroky v rámci následujícího postupu izolace, byly prováděny při otáčkách 11 000 RPM. Rostlinný materiál byl rozmělněn identicky, jako je popsáno u izolačního kitu Exgene Plant SV mini. Do 2ml mikrozkušavky se 100 mg natřeného vzorku bylo přidáno 300 μ l pufru PL2, 10 μ l roztoku RNasy A a směs byla důkladně promíchána pomocí vortexu. Získaný homogenát se nechal 15 minut inkubovat v termobloku vyhřátém na 65 °C a každých 5 minut byl promíchán krátkým vortexováním. Po dokončení inkubace bylo k homogenátu přidáno 75 μ l pufru PL3, obsah se důkladně promíchal vortexováním a nechal se 5 minut inkubovat na ledu. Následně byl obsah mikrozkušavky přenesen pomocí kovové špachtličky na NucleoSpin filtr kolonku (fialová barva) a nechal se 2 minuty centrifugovat. Proteklý lyzáat byl bez narušení pelety přenesen do nové sterilní 1,5ml mikrozkušavky. K lyzátu bylo pipetováno 450 μ l pufru PC a obsah byl okamžitě promíchán pomocí vortexu. 700 μ l získané směsi bylo přeneseno na NucleoSpin

Plant II kolonku (zelená barva) ve sběrné zkumavce a nechalo se 1 minutu centrifugovat. Proteklá tekutina byla vylita a hrany sběrné zkumavky otřeny buničitou vatou. Krok byl zopakován i se zbytkem směsi v 1,5ml mikrozskumavce. Následně bylo na kolonku pipetováno 400 μ l pufru PW1 a kolonka se nechala 1 minutu centrifugovat. Proteklá tekutina byla vylita a hrany sběrné zkumavky otřeny buničitou vatou. Na kolonku bylo nanášeno 700 μ l pufru PW2 a nechala se 1 minutu centrifugovat. Proteklá tekutina byla vylita a hrany sběrné zkumavky otřeny buničitou vatou. Poté bylo na kolonku nanášeno 200 μ l pufru PW2 a nechala se centrifugovat 2 minuty. Po dokončení centrifugace byla kolonka opatrně vložena do popsané sterilní 1,5ml mikrozskumavky. Na střed kolonky bylo pipetováno 100 μ l pufru PE předehřátého na 65 °C a nechal se 5 minut inkubovat při pokojové teplotě. Po dokončení inkubace se vzorek 1 minutu centrifugoval. Kvalita (koncentrace a čistota) izolované DNA byla ověřena na přístroji Thermo Scientific™ NanoDrop Lite. Poměr A260/A280 musel být v rozmezí 1,65 – 2,1. Takto připravená DNA byla ihned zpracována, nebo skladována při ≤ -20 °C.

2.3.6 Postup izolace DNA pomocí kitu QuickExtract Plant DNA Extraction Solution (Biosearch Technologies)

Z listu byl víčkem 0,5ml mikrozskumavky vyříznut jeden listový terčík, který byl dále ručně nebo pomocí sterilní kovové špachličky přenesen dovnitř stejné 0,5ml mikrozskumavky. K terčíku bylo přidáno 125 μ l QuickExtract DNA Extraction Solution, aby byl celý listový terčík ponořen. 0,5ml mikrozskumavka byla poté vložena do polystyrenového stojánku a přilepena izolepou. Ve vhodné nádobě byla připravena voda o teplotě 65 °C. Vzorek v polystyrenovém stojánku byl kovovou pinzetou vložen do nádoby a nechal se inkubovat 6 minut. Mezitím se připravila druhá nádoba s vodou o teplotě 98 °C. Po 6 minutách byl polystyrenový stojánek se vzorky z první nádoby přenesen pomocí kovové pinzety do nádoby s vodou 98 °C, ve které se nechal inkubovat 2 minuty. Po vytažení byla 0,5ml mikrozskumavka krátce stočena a maximum roztoku bez nečistot bylo přeneseno do sterilní 1,5ml mikrozskumavky.

Takto izolovanou DNA se doporučuje okamžitě použít v plánovaných analýzách. V případě zamražení v ≤ -20 °C již není garantována 100% funkčnost analyzované DNA.

2.4 Sekvenace

Genotypizace SNPs pomocí sekvenace se skládá z několika dílčích kroků, mezi které patří PCR amplifikace, gelová elektroforéza, purifikace PCR ampliconů z gelu, sekvenční reakce, purifikace sekvenční reakce, puštění běhu v genetickém analyzátoru a analýza získaných dat. Metoda byla vždy prováděna včetně gelové elektroforézy, aby byla potvrzena úspěšná amplifikace sekvence DNA. Sekvenovány byly primárně vzorky odebrané z odrůd využívaných při křížení v rodičovské linii a vzorky slepé.

2.4.1 PCR amplifikace

Během PCR byl amplifikován úsek genomové DNA, v kterém se nacházel příslušný SNP.

V rámci PCR amplifikace byly použity uvedené nástroje a reagenty:

- Sterilní 1,5ml a 0,2ml mikrozkušavky, stojánky na mikrozkušavky
- Špičky s filtrem
- PCR komponenty (qPCR 2× Blue Master Mix, PmxII)
- PCR voda
- Dekontaminační sprej ROTI Nucleic Acid-free

Nejprve byl uvnitř PCR boxu připraven premix Rvi4 PmxII (viz Tab. 2). Všechny komponenty byly před začátkem práce promíchány pomocí vortexu a stočeny.

Tab. 2: Rozpis pro namíchání premixu Rvi4 PmxII.

Komponenty:	Objem:
Rvi4-FB-F (100 μ M)	5 μ l
Rvi4-FB-R (100 μ M)	5 μ l
Voda	90 μ l
Celkem	100 μl

Následně byly v PCR boxu připraveny a popsány sterilní 0,2ml mikrozkušavky a jedna sterilní 1,5ml mikrozkušavka, do které byl připraven mastermix (viz Tab. 3) pro zpracovávané množství vzorků. Všechny komponenty byly před přípravou mastermixu promíchány pomocí vortexu a stočeny. Dále byl promíchán a stočen i samotný mastermix, který byl rozpipetován po 18 μ l do již připravených 0,2ml mikrozkušavek.

Tab. 3: Rozpis pro namíchání mastermixu (PCR).

Komponenty:	1 rce:
PCR voda	7 μ l
2× Blue Master Mix	10 μ l
Rvi4 PmxII	1 μ l
+ DNA	2 μl
Celkem	20 μl

Mimo PCR box byly do každé 0,2ml mikrozkušavky napipetovány 2 μ l DNA a obsah zkušavky byl promíchán propipetováním. Mikrozkušavky se následně krátce stočily, byly umístěny do PCR cykleru a spustil se přednastavený program (viz Tab. 4). Takto připravené vzorky byly okamžitě zpracovány v rámci gelové elektroforézy nebo krátkodobě skladovány při ≤ -20 °C.

Tab. 4: Teplotní podmínky PCR.

Fáze:	Teplota:	Doba:	Počet cyklů:
Víčko	105 °C		
Denaturace	95 °C	5 min	1
Denaturace	95 °C	30 s	40
Nasedání primerů	58 °C	30 s	
Extense	72 °C	30 s	
Finální extense	72 °C	5 min	1
Držet	8 °C	∞	

2.4.2 Gelová elektroforéza

Gelová elektroforéza slouží jako kontrolní metoda, pro ověření úspěšné amplifikace úseku, který obsahuje genotypizovaný SNP. Elektroforéza zahrnuje negativní (netemplátovanou) kontrolu, která slouží k ověření, že během přípravy PCR nedošlo ke kontaminaci. Tento krok tedy v případě již zavedené metodiky lze vynechat a pokračovat purifikací PCR produktu.

V rámci gelové elektroforézy byly použity uvedené nástroje a reagenty:

- Erlenmeyerova baňka
- Odměrný válec
- Agaróza (Agarose SERVA for DNA electrophoresis)
- 5× TBE pufr
- Špičky bez filtru
- UV vizualizační činidlo SafeView
- GeneRuler Low Range DNA Ladder
- TriTrack DNA Loading Dye
- Dekontaminační sprej Desprej nebo ROTI Nucleic Acid-free sprej

V rámci příprav gelové elektroforézy bylo nejprve nezbytné připravit pracovní koncentraci 0,5× TBE desetinasobným ředěním zásobního 5× TBE roztoku. Smícháním 100 ml 5× TBE s 900 ml destilované vody byl tedy připraven 1 l pracovního roztoku.

Jelikož byl PCR reakcí amplifikován úsek o délce 184 bp, pro detekci byl připravován 3% agarózový gel. Gel byl připravován ve vaničce o objemu cca 100 ml (případně v menší o objemu cca 50 ml). V Erlenmeyerově baňce byly pomocí mikrovlnné trouby rozvařeny 3 g agarózy v 100 ml 0,5× TBE. Po dokonalém rozvaření (čirá tekutina bez viditelných partikulí) bylo přidáno vizualizační činidlo pro DNA (SafeView) v koncentraci 1 µl na 20 ml gelu (v případě 100 ml, 5 µl SafeView). Obsah kádinky byl ochlazen pod tekoucí vodou a následně byl gel nalit do připravené elektroforetické vaničky s hřebínky pro požadovaný počet jamek. Gel se takto nechal tuhnout alespoň 1 hodinu při pokojové teplotě (lze urychlit umístěním do ledničky).

Tuhý gel se po odstranění čel vaničky a hřebínků vložil do elektroforetické nádoby, která byla naplněna 0,5× TBE tak, aby byl gel zcela ponořen. K analyzovaným vzorkům (včetně negativní kontroly) byly přidány 4 µl TriTrack DNA Loading Dye a před nanášením jednotlivých vzorků na gel byl vždy celý objem dokonale promíchán propipetováním. Na agarózový gel byl nanášen celkový objem 20 µl vzorku. Do první a poslední jamky gelu byl napipetován velikostní standard GeneRuler Low Range DNA Ladder, elektroforetická nádoba byla uzavřena a zapnul se zdroj nastavený na napětí 120 V po dobu cca 50 minut.

Po rozdělení vzorků byl zdroj odpojen, gel s vaničkou vyjmut a výsledek zkontrolován na UV transluminátoru Biometra TI. Gel byl vyfocen pomocí Bio-Imaging Systém MiniLumi. Získaný snímek byl popsán a vyhodnocen.

2.4.3 Purifikace DNA z gelu

Při purifikaci DNA z gelu s využitím kitu WizPrep Gel/PCR Purification Mini se DNA uvnitř kolonek váže na matici ze skelných vláken, ze které je po dokončení promývání eluována pomocí pufru Elution Buffer do čisté mikrozkušavky. Centrifugace byla ve všech krocích provedena při otáčkách 13 000 RPM.

V rámci purifikace DNA z gelu byly použity uvedené nástroje a reagenty:

- Skalpelová rukojeť s jednorázovou čepelkou
- Sterilní 1,5ml mikrozkušavky, stojánky na mikrozkušavky
- Špičky bez filtru
- Buničitá vata
- Dekontaminační sprej Desprej nebo ROTI Nucleic Acid-free sprej

Jednotlivé amplikony byly z gelu na UV transluminátoru rychle vyříznuty skalpelem ošetřeným dezinfekčním prostředkem Desprej s co nejmenším množstvím okolního gelu. Gelové bločky byly vloženy do sterilních a popsáných 1,5ml mikrozkušavek a co nejrychleji zakápnuty 500 µl pufru GP. Takto připravené bločky se nechaly roztát při pokojové teplotě (cca 60 minut) nebo byl proces urychlen vložením mikrozkušavek do termobloku vyhřátého na 50 °C (cca 10 minut). Vzorky byly v průběhu tání kontrolovány a občas vortexovány. Jelikož byl amplifikován úsek o délce 184 bp, ke každému vzorku bylo přidáno 100 µl isopropylalkoholu pro zvýšení výtěžku DNA. Směs (700 µl) byla přepipetována na kolonku ve sběrné zkumavce a nechala se 1 minutu centrifugovat. Proteklá tekutina byla vylita a hrany sběrné zkumavky utřeny buničitou vatou. Na kolonku bylo přidáno 700 µl pufru Wash Buffer a opět byla spuštěna centrifugace na 1 minutu. Tekutina byla ze sběrné zkumavky vylita a její hrany utřeny buničitou vatou. Byla spuštěna závěrečná centrifugace (1 minuta), aby byl z filtru kolonky zcela odstraněn pufr Wash Buffer. Kolonka byla vsunuta do sterilní a popsáné 1,5ml mikrozkušavky. Na filtr kolonky bylo nanášeno 50 µl pufru Elute Buffer a nechal se inkubovat 1 minutu při pokojové teplotě, poté se vzorek centrifugoval 1 minutu. Takto přečištěná DNA byla ihned analyzována nebo uskladněna při ≤ -20 °C.

2.4.4 Sekvenační reakce

Pomocí sekvenační reakce, při které je použit pouze jeden primer, směs dNTP a ddNTP, byl získán roztok obsahující různě dlouhé jednořetězcové úseky DNA ukončené fluorescenčně značeným ddNTP.

V rámci sekvenační reakce a následné purifikace byly použity uvedené nástroje a reagentie:

- Sterilní 1,5ml a 0,2ml mikrokumavky, stojánky na mikrokumavky
- Špičky s filtrem a špičky bez filtru
- PCR komponenty (5 μ M Rvi4-FB-R)
- Dekontaminační sprej Desprej nebo ROTI Nucleic Acid-free sprej

Před sekvenační reakcí bylo nutné připravit 5 μ M Rvi4-FB-R primer ze zásobního 100 μ M roztoku. Dále byly uvnitř PCR boxu připraveny a popsány sterilní 0,2ml mikrokumavky a jedna 1,5ml mikrokumavka. Všechny komponenty byly před začátkem práce promíchány pomocí vortexu a stočeny. Do 1,5ml mikrokumavky byl pro zpracovávání množství vzorků a podle zvoleného kitu připraven mastermix (viz Tab. 5), poté promíchán a krátce stočen.

Tab. 5: Rozpis pro namíchání mastermixu (sekvenační reakce).

Komponenty:	1 rce:
Terminator RR v3.1 (Gerbera Mix v3.1)	2 μ l
Seq buffer 5 \times (5 \times Dilution Buffer)	1 μ l
Rvi4-FB-R (5 μ M)	1 μ l
+ DNA	6 μl
Celkem	10 μl

Mastermix byl rozpipetován po 4 μ l do připravených 0,2ml mikrokumavek, které byly uzavřeny a přeneseny do Post-PCR místnosti, kde bylo do každé mikrokumavky pipetováno 6 μ l purifikované DNA. Vzorky byly promíchány propipetováním a krátce stočeny. Následně byly vzorky opět přeneseny do PCR místnosti a umístěny do PCR cykleru, na kterém byl spuštěn přednastavený program (viz Tab. 6). Po dokončení reakce byla ihned provedena purifikace sekvenační reakce.

Tab. 6: Teplotní podmínky sekvenační reakce.

Fáze:	Teplota:	Doba:	Počet cyklů:
Víčko	105 °C		
Denaturace	95 °C	5 min	1
Denaturace	95 °C	30 s	35
Nasedání primerů	55 °C	20 s	
Extense	60 °C	4 min	
Držet	8 °C	∞	

2.4.5 Purifikace sekvenační reakce a puštění běhu v genetickém analyzátoru

Purifikací jsou z produktu odstraněny neinkorporované komponenty sekvenační reakce, jako jsou ionty solí, nukleotidy a další.

V rámci purifikace sekvenační reakce a puštění genetického analyzátoru byly použity uvedené nástroje a reagenty:

- Stojánky na mikrozkušavky
- Špičky bez filtru
- Sterilní špičky s odstřiženou špičkou
- Sekvenační destička
- Dekontaminační sprej Desprej nebo ROTI Nucleic Acid-free sprej

Po dokončení sekvenační reakce je nezbytná purifikace získaného produktu, která byla provedena v Post-PCR místnosti. Ke každému vzorku bylo přidáno 45 µl SAM solution a špičkami s ustřiženou špičkou 10 µl BigDye XTerminator Solution. Takto připravená směs se nechala 30 minut vortexovat při přibližně 1 200 RPM (směs musela být homogenní). Mikrozkušavky s homogenní směsí byly stáčeny 2 minuty na minicentrifuze. Poté bylo vždy 25 µl vzorku bez XTerminator částic a bez bublin pipetováno do sekvenační destičky. Takto připravené vzorky byly následně analyzovány na genetickém analyzátoru AB3500. Získané sekvence byly dále zpracovány pomocí softwaru SeqAnalysis, Chromas a Geneious Prime.

2.5 Alelická diskriminace

Alelická diskriminace je dvoukroková metoda genotypizace SNPs, která se skládá z přípravy samotné reakce a následné analýzy získaných dat. Pro detekci genu *Rvi4* pomocí alelické diskriminace byly použity sondy *Rvi4-Res-Pr04* (značená fluoroforem HEX a detekována v kanále „Yellow“) pro rezistentní variantu a *Rvi4-Sens-Pr04* (značená fluoroforem 6-FAM a detekována v kanále „Green“) pro senzitivní variantu. Jako pozitivní kontroly byly v rámci každé reakce použity ultramery (syntetické jednořetězcové sekvence DNA) o koncentraci 1 pg/µl, které byly navrženy tak, aby simulovaly rezistentního a senzitivního homozygota.

V rámci alelické diskriminace byly použity uvedené nástroje a reagenty:

- Sterilní 1,5ml mikrozkušavky, stojánky na mikrozkušavky
- PCR stripy do Rotor-Gene Q, stojánek na PCR stripy
- Špičky s filtrem
- PCR voda
- PCR komponenty (qPCR 2× Blue Master Mix, PmxII)
- Ultramery (Rvi4_Res_Ctrl; Rvi4_Sens_Ctrl)
- Dekontaminační sprej Desprej nebo ROTI Nucleic Acid-free sprej

Před začátkem míchání alelické diskriminace byl v PCR boxu připraven premix Rvi4-AD PmxII (viz Tab. 7). Premix obsahoval forward (Rvi4-FB-F) a reverse primer (Rvi4-FB-R), sondu pro detekci rezistentní alely (Rvi4-Res-Pr04) detekovanou na žlutém kanálu a sondu pro detekci senzitivních alely (Rvi4-Sens-Pr04) detekovanou na zeleném kanálu. Všechny komponenty byly před začátkem práce promíchány pomocí vortexu a stočeny.

Tab. 7: Rozpis pro namíchání premixu Rvi4-AD PmxII.

Komponenty:	Objem:
Rvi4-FB-F (100 μ M)	5 μ l
Rvi4-FB-R (100 μ M)	5 μ l
Rvi4-Res-Pr04 (100 μ M)	5 μ l
Rvi4-Sens-Pr04 (100 μ M)	5 μ l
Voda	80 μ l
Celkem	100 μl

Dle rozpisu (viz Tab. 8) byl následně do sterilní 1,5ml mikrozkušavky uvnitř PCR boxu připraven mastermix pro aktuálně zpracovávané množství vzorků včetně netemplátované kontroly a ultramerů (Rvi4_Res_Ctrl; Rvi4_Sens_Ctrl). Všechny komponenty byly před začátkem práce promíchány na vortexu a stočeny.

Tab. 8: Rozpis pro namíchání mastermixu (alelická diskriminace).

Komponenty:	1 rce:
PCR voda	7 μ l
2× Blue Master Mix	10 μ l
Rvi4-AD PmxII	1 μ l
+ DNA	2 μl
Celkem	20 μl

Do kovové destičky byl připraven potřebný počet sterilních 0,1ml PCR stripů včetně mikrozkušavek pro netemplátovanou kontrolu a ultramery. Do stripů byl mastermix rozpipetován po 18 μ l a mimo PCR box byly pipetovány 2 μ l DNA každého vzorku. Po uzavření všech zkumavek, včetně netemplátované kontroly,

byly v Post-PCR místnosti do příslušných zkumavek pipetovány 2 μ l ultramerů. Stripy byly následně vloženy do real-time PCR cykleru Rotor-Gene Q, ve kterém byl zvolen přednastavený teplotní profil (viz Tab. 9).

Tab. 9: Teplotní podmínky real-time PCR.

Fáze:	Teplota:	Doba:	Počet cyklů:
Denaturace	94 °C	5 min	1
Denaturace	94 °C	20 s	50
Nasedání primerů	58 °C	20 s	
Extense	72 °C	20 s	
Držet	50 °C	5 s	1

Získané produkty real-time PCR byly po analýze vyhozeny, případně krátkodobě skladovány při ≤ -20 °C. Analýza alelické diskriminace byla provedena pomocí softwaru Rotor-Gene Q Series Software, ve kterém byly použity následující parametry:

Dynamic Tube: ANO

Slope Correct: ANO

Threshold: 0,08

Outlier Removal: 10 %

2.6 SNaPshot

Genotypizace SNPs pomocí SNaPshot se skládá z několika dílčích kroků, mezi které patří PCR amplifikace, purifikace PCR, vlastní SNaPshot reakce, purifikace SNaPshot reakce a analýza na genetickém analyzátoru. Genotypizace byla prováděna vždy včetně pozitivní a negativní (netemplátované) kontroly, pro které byly využívány reagentie dodávané, jako součást kitu (Multiplex Control Primer Mix a Multiplex Control Template). Pomocí této metody je získána směs primerů ukončených různými fluorescenčně značenými ddNTP, která je následně analyzována pomocí genetického analyzátoru.

2.6.1 PCR amplifikace

Prvním krokem metody SNaPshot je amplifikace úseku DNA, který obsahuje detekovaný SNP. Použité nástroje a reagentie jsou společně s postupem identické s již popsanou PCR reakcí (viz bod 2.4.1).

2.6.2 Purifikace

Purifikace PCR produktu je prováděna, aby bylo zabráněno účasti komponentů PCR (primery, dNTP, enzymy a jednotlivé složky pufru) v následné extenzi specifických primerů navržených pro SNaPshot. Purifikaci lze provést pomocí komerčně

dostupného purifikačního kitu nebo pomocí SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase) a Exo I (Exonuclease I). SAP je rekombinantní a termolabilní alkalická fosfatáza, kterou lze využít pro defosforylaci biomolekul a odstranění neinkorporovaných dNTP. Exo I je enzym, který štěpí jednovláknové řetězce DNA od 3' – konce.

V rámci purifikace byly použity uvedené nástroje a reagenty:

- Sterilní 0,2ml mikrozkušavky, stojánky na mikrozkušavky
- Špičky bez filtru
- PCR voda
- ExoSAP-IT™ Express PCR Product Cleanup Reagent
- Dekontaminační sprej Desprej nebo ROTI Nucleic Acid-free sprej

V Post-PCR místnosti byl připraven a popsán potřebný počet sterilních 0,2ml mikrozkušavek. Do popsané mikrozkušavky bylo přeneseno 5 μ l PCR produktu a 2 μ l ExoSAP-IT™ Express PCR Product Cleanup Reagent. Směs byla promíchána propipetováním a krátce stočena pomocí minicentrifugy. Takto připravená směs se v termocykleru nechala 4 minuty inkubovat při 37 °C, a poté 1 minutu při 80 °C (inaktivace enzymů). Přečištěné PCR produkty byly před zpracováním uchovány v ledničce při 4 °C, popřípadě dlouhodobě skladovány při \leq -20 °C.

2.6.3 SNaPshot reakce

Produktem SNaPshot reakce byla směs SNaPshot primerů prodloužených o jeden fluorescenčně značený ddNTP a neinkorporovaných fluorescenčně značených ddNTP.

V rámci SNaPshot reakce byly použity uvedené nástroje a reagenty:

- Sterilní 1,5ml a 0,2ml mikrozkušavky, stojánky na mikrozkušavky
- Špičky bez filtru
- PCR voda
- Primery specifické pro detekci vybraného SNP (Rvi4-SNP-36nt-R01)
- Dekontaminační sprej Desprej nebo ROTI Nucleic Acid-free sprej

Po celou dobu přípravy SNaPshot reakce byly reagenty uchovávány na ledu. Před SNaPshot reakcí bylo nutné připravit roztok, ve kterém byly všechny používané primery 2 μ M. Dále byly připraveny a popsány sterilní 0,2ml mikrozkušavky a jedna 1,5ml mikrozkušavka. Všechny komponenty byly před začátkem práce promíchány pomocí vortexu a stočeny. Dle rozpisu (viz Tab. 10) byl následně do sterilní 1,5ml mikrozkušavky připraven mastermix pro aktuálně zpracovávané množství vzorků.

Tab. 10: Rozpis pro namíchání mastermixu (SNaPshot).

Komponenty:	1 rce:
SNaPshot Multiplex Ready Reaction Mix	5 μ l
SNaPshot detekční primery (2 μ M)	1 μ l
PCR voda	1 μ l
+ Templát (přečištěný PCR produkt)	3 μl
Celkem	10 μl

V případě potřeby byla připravena i pozitivní a negativní kontrola dle rozpisu (viz Tab. 11). Obsah zkumavek byl promíchán a stočen.

Tab. 11: Rozpis pro namíchání pozitivní a negativní kontroly pro SNaPshot.

Komponenty:	Pozitivní:	Negativní:
SNaPshot Multiplex Ready Reaction Mix	5 μ l	5 μ l
SNaPshot Multiplex Control Template	2 μ l	0 μ l
SNaPshot Multiplex Control Primer Mix	1 μ l	1 μ l
PCR voda	2 μ l	4 μ l
Celkem	10 μl	10 μl

Připravený mastermix byl důkladně promíchán pomocí vortexu, stočen a po 7 μ l rozpipetován do připravených 0,2ml mikrozkušavek. Do každé z těchto zkumavek byly pipetovány 3 μ l připraveného templátu (v jedné SNaPshot reakci má být 0,01 až 0,40 pmol templátu), obsah byl důkladně promíchán propipetováním a stočen. Následně byly vzorky přeneseny do PCR místnosti a umístěny do PCR cykleru, na kterém byl spuštěn přednastavený templát (viz Tab. 12). Po dokončení reakce byla ihned provedena purifikace SNaPshot reakce.

Tab. 12: Teplotní podmínky SNaPshot reakce.

Fáze:	Teplota:	Doba:	Počet cyklů:
Víčko	105 °C		
Denaturace	96 °C	10 s	25
Nasedání primerů	50 °C	5 s	
Extense	60 °C	30 s	
Držet	4 °C	∞	

2.6.4 Purifikace SNaPshot reakce

Purifikace SNaPshot reakce je nezbytná z důvodu odstranění neinkorporovaných fluorescenčně značených ddNTP, které by interferovaly při analýze dat.

V rámci purifikace SNaPshot reakce byly použity uvedené nástroje a reagenty:

- Stojánky na mikrozkušavky
- Špičky bez filtru
- SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase)
- Dekontaminační sprej Desprej nebo ROTI Nucleic Acid-free sprej

K získaným produktům SNaPshot reakce byla v Post-PCR místnosti pipetována 1 jednotka (1 μ l) SAP. Vzniklá směs byla promíchána pomocí vortexu, stočena a nechala se 1 hodinu inkubovat v termobloku vyhřátém na 37 °C. Poté následovala 15minutová inkubace při 75 °C, která deaktivovala SAP. Získané vzorky byly ihned zpracovány nebo skladovány při ≤ -20 °C, popřípadě krátkodobě (24 hodin) skladovány v ledničce.

2.6.5 Analýza na genetickém analyzátoru

Připravená směs řetězců DNA ukončených různými fluorescenčně značenými ddNTP byla pomocí kapilární elektroforézy podle délky rozdělena společně s velikostním standardem pro determinaci jednotlivých fragmentů.

V rámci analýzy na genetickém analyzátoru byly použity uvedené nástroje a reagenty:

- Sterilní 1,5ml a 0,2ml mikrozkušavky, stojánky na mikrozkušavky
- Špičky bez filtru
- Hi-Di formamide
- GeneScan 120 LIZ dye Size Standard
- Dekontaminační sprej Desprej nebo ROTI Nucleic Acid-free sprej

Jednotlivé komponenty (Hi-Di formamide, GeneScan 120 LIZ dye Size Standard, SNaPshot produkty) byly nejprve promíchány pomocí vortexu a stočeny. Následně byla připravena 1,5ml mikrozkušavka, do které bylo pipetováno 9 μ l Hi-Di formamide společně s 0,25 μ l velikostního standardu GeneScan 120 LIZ dye Size Standard na každý zpracovávaný vzorek. Získaná směs byla promíchána pomocí vortexu a krátce stočena. Dále byla rozpipetována do sekvenační destičky po 9,25 μ l. Do příslušných jamek byl poté přidán 1 μ l SNaPshot produktu. Destička se vzorky se nechala 5 minut inkubovat v termocykleru vyhřátém na 95 °C. Takto připravené vzorky byly ihned analyzovány pomocí přístroje AB3500 Genetic Analyzer. Data byla vyhodnocena pomocí softwaru GeneMapper.

3 Výsledky a diskuse

3.1 Srovnání izolačních kitů

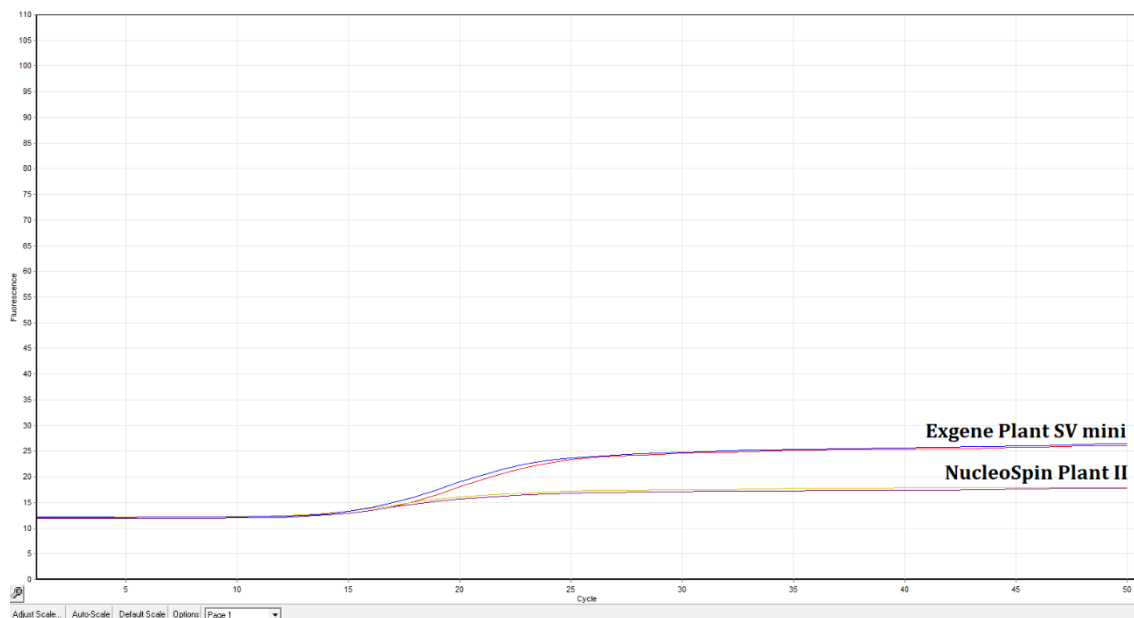
V rámci praktické části diplomové práce bylo vyzkoušeno vícero komerčně dostupných izolačních kitů. Hlavními důvody testování izolačních kitů bylo najít spolehlivý kit pro izolaci DNA z listů jabloně a potřeba najít rychlejší a finančně výhodnější způsob izolace DNA pro potřeby MAS, kterou by bylo možné aplikovat v kombinaci s vyvíjenými metodami genotypizace SNPs v asociaci s geny *Rvi*. Testováno bylo celkem šest různých kitů, jelikož výsledky izolace rostlinné DNA mohou být silně ovlivněny i jen drobnými odlišnostmi v postupu izolace. Výsledky jednotlivých izolačních kitů se mohou výrazně lišit i napříč různými rostlinnými druhy. Při izolaci rostlinné DNA jsou problematické zejména polysacharidy, proteiny a polyfenoly, které mohou inhibovat enzymatické reakce či snižovat výtěžek a čistotu DNA. V Laboratoři molekulární biologie Výzkumného a šlechtitelského ústavu ovocnářského Holovousy s.r.o., kde byla celá praktická část prováděna, je běžně používán již zavedený izolační kit Exgene Plant SV mini, který byl použit jako referenční.

Po finanční stránce vychází z testovaných kitů jednoznačně nejvýhodněji izolace pomocí QuickExtract Plant DNA Extraction Solution (viz Tab. 13). Jedná se o velmi hrubou extrakci DNA, která se nijak nepřechišťuje a musí být zpracována ideálně v den provedení izolace, jelikož dochází k její velmi rychlé degradaci a následující den už nemusíme získat očekávané výsledky. Z tohoto důvodu představuje tento přístup vhodnou variantu v případě izolace DNA za účelem využití v MAS, kdy je nezbytné, co nejrychleji a levně izolovat a vyhodnotit velké množství vzorků. Pro účely akreditované laboratoře je však kvalita takto připravené DNA nedostačující a QuickExtract Plant DNA Extraction Solution tedy není pro tyto účely vhodný. Po finanční stránce je vhodnější náhradou kitu Exgene Plant SV mini pro diagnostické účely mimo MAS izolační kit GeneJET Plant Genomic DNA Purification Mini (viz Tab. 13).

Tab. 13: Cena izolace jednoho vzorku pro každý testovaný izolační kit. Ceny jsou uvedeny bez DPH a zahrnují i potřebný etanol.

Izolační kit	Jeden vzorek
Kity na bázi kolonek	
GenElute™ Plant Genomic DNA Miniprep	90,20 Kč
WizPrep™ Plant DNA Mini	82,20 Kč
NucleoSpin Plant II	74,70 Kč
GeneJET Plant Genomic DNA Purification Mini	63,50 Kč
Exgene Plant SV mini	50,30 Kč
Kit pro hrubou extrakci DNA	
QuickExtract Plant DNA Extraction Solution	21,80 Kč

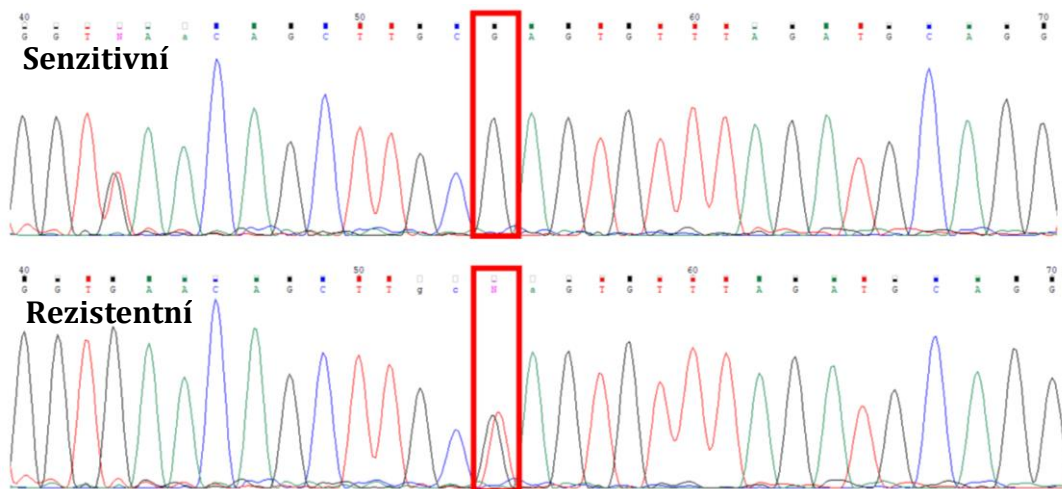
Žádný z nově testovaných izolačních kitů neposkytl výsledky srovnatelné s původním kitem Exgene Plant SV mini. Ve všech případech došlo k snížení hodnot RFU (relative fluorescence units) popřípadě k naměření nižší koncentrace či čistoty izolované DNA, což by svědčilo o nižší účinnosti purifikace a/nebo zbytkové přítomnosti PCR inhibitorů. Příklad srovnání kitu Exgene Plant SV mini a NucleoSpin Plant II prostřednictvím real-time PCR ukazuje následující obrázek (viz Obr. 2).



Obr. 2: Výsledek real-time PCR srovnání dvou paralelně izolovaných vzorků kity Exgene Plant SV mini a NucleoSpin Plant II zobrazen pomocí softwaru Rotor-Gene Q Series (PCR cíl: chloroplastová DNA).

3.2 Sekvenace

Metoda genotypizace pomocí sekvenace je vhodná zejména pro analýzu malého množství vzorků (jednotek až desítek) za účelem ověření přítomnosti nebo upřesnění pozice vybraného SNP. Tento krok byl tedy nezbytný pro vývoj dalších vybraných metod genotypizace. Oblast *Rvi4* byla osekvenována celkem u 111 vzorků jabloní používaných při křížení v rodičovské linii (viz Tab. 14). Byla tak ověřena přítomnost vybraného SNP K146 (nukleotid T odpovídá rezistentní alele) na pozici 54 sekvenované oblasti (viz Obr. 3), a také bylo zmapováno okolí SNP, ve kterém byly detekovány další čtyři SNPs na pozicích 35, 37, 43 a 70. Žádný z těchto dalších čtyř detekovaných SNPs však nebyl v asociaci s rezistentním genem *Rvi4*.



Obr. 3: Chromatogram senzitivního (homozygot G/G) a rezistentního (heterozygot T/G) jedince s vyznačenou pozicí SNP K146.

Tab. 14: Vybrané odrůdy jabloní VŠÚO s určeným genotypem pro *Rvi4* SNP K146.

Odrůda	SNP K146		Odrůda	SNP K146	
Akane	G	G	Krasokvět žlutý	G	G
Aneta	G	G	Liberty	G	G
Antonovka	G	G	Limburské	G	G
Ariane	G	G	Lipno	G	G
Ariwa	G	G	Lobo	G	G
Aurora	G	G	Lord Lambourne	G	G
Banánové zimní	G	G	Lotos	G	G
Baujade	G	G	Luna	G	G
Baya Marisa	G	G	Megumi	G	G
Benet	G	G	Melodie	G	G
Best Ever	G	G	Melrose	G	G
Biogolden	G	G	Meteor	G	G
Bláhovo Pozděkvěté	G	G	Ontario	G	G
Blaník	G	G	Otawa 341	G	G
Britemac	G	G	Petra	G	G
Burgundy	G	G	Pinova	G	G
Cactus	G	G	Prima	G	G
Cameo Caudle	G	G	Primadela	G	G
Camuzat	G	G	Priscilla	G	G
Cardinal	G	G	Produkta	G	G
Carola	G	G	Rajka	G	G
Clear Heart	G	G	Realka	T	G
Clivia	G	G	Reanda	G	G
Cox Orange Pippin	G	G	Red Cap	G	G
Crimson Gold	G	G	Red Topaz	G	G

Český Granát	G	G	Red van Buren	G	G
Čistecké Lahůdkové	G	G	Regia	T	G
Dakota	G	G	Reglindis	G	G
Dark Topaz	G	G	Resista	G	G
Delor	G	G	Retina	G	G
Democrat	G	G	Rewena	G	G
Diadém	G	G	Rome Beauty	G	G
Diamant	G	G	Rosana	G	G
Discovery	G	G	Rozela	G	G
Dukát	G	G	Rubín	G	G
Elstar	G	G	Shalimar	G	G
Empire	G	G	Sirius	G	G
Fantasia	G	G	Slendera	G	G
Nikoleta	G	G	Sonet	G	G
Fiesta	G	G	Spalord	G	G
Flordika	G	G	Starkresa	G	G
Florina	G	G	Starkrimson	G	G
Gala Schniga	G	G	Sungold	G	G
Gloster	G	G	Šampion	G	G
Gold Bohemia	G	G	Tábor	G	G
Golida	G	G	Vltava	G	G
Granny Smith	G	G	Wealthy	G	G
Heliodar	G	G	Wolfriver	G	G
Idared	G	G	Wondernot	G	G
James Grieve	G	G	Yarlington	G	G
Jerseymac	G	G	Zabergau	G	G
Jolana	G	G	Zarja Altai	G	G
Juno	G	G	Zita	G	G
Karmína	G	G	Zuzana	G	G
Katka	G	G	Zvonkové	G	G
Krasokvět Kitajka	G	G			

Z Tab. 14 je patrné, že gen rezistence *Rvi4* nesou pouze dvě odrůdy pěstované ve VŠÚO (Regia a Realka). Proto bylo analyzováno ještě 26 slepých vzorků (viz Tab. 15), které byly dodány šlechtiteli mimo VŠÚO. U 10 z 26 vzorků byl potvrzen genotyp T/G (rezistentní heterozygot). Výsledky sekvenování byly následně potvrzeny šlechtiteli, čímž byla ověřena funkčnost metody. V souboru analyzovaných vzorků nebyl nalezen ani jeden rezistentní homozygot (T/T).

Tab. 15: Slepé vzorky s určeným genotypem pro SNP K146.

Slepé vzorky	SNP K146		Slepé vzorky	SNP K146	
Vzorek 1	G	G	Vzorek 14	T	G
Vzorek 2	G	G	Vzorek 15	G	G
Vzorek 3	G	G	Vzorek 16	G	G
Vzorek 4	G	G	Vzorek 17	T	G
Vzorek 5	G	G	Vzorek 18	T	G
Vzorek 6	G	G	Vzorek 19	T	G
Vzorek 7	G	G	Vzorek 20	T	G
Vzorek 8	G	G	Vzorek 21	T	G
Vzorek 9	G	G	Vzorek 22	G	G
Vzorek 10	G	G	Vzorek 23	T	G
Vzorek 11	G	G	Vzorek 24	G	G
Vzorek 12	T	G	Vzorek 25	T	G
Vzorek 13	T	G	Vzorek 26	G	G

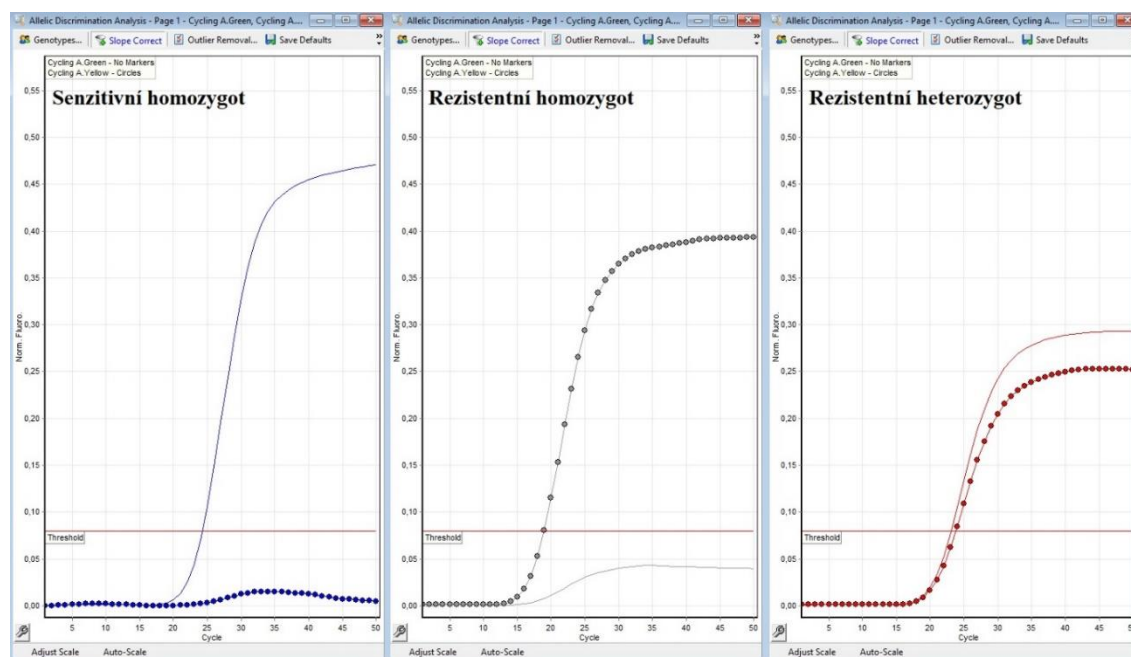
V dalším kroku bylo ze získaných sekvencí pomocí softwaru Geniuse Prime sestaveno porovnání sekvencí (tzv. „alignment“), který byl využit při navrhování sond pro alelickou diskriminaci a primerů pro SNaPshot.

Výhodou sekvenace je možnost vizuální kontroly amplifikovaného úseku a následná práce se sekvencemi. Mezi nevýhody této metody, vzhledem k několika dílčím krokům a drahým komponentům, patří finanční a časová náročnost.

3.3 Alelická diskriminace

Metoda alelické diskriminace je vhodná, jako velmi rychlá metoda genotypizace SNPs umožňující detekci až dvou SNPs v jedné multiplexní reakci, a to zejména v kombinaci s rychlou extrakcí DNA pomocí QuickExtract Plant DNA Extraction Solution. Pro sestavení funkční alelické diskriminace pomocí sond je nezbytné navrhnout funkční primery a samotné sondy. Jelikož bylo možné využít primery používané pro PCR amplifikaci v rámci metody sekvenace, bylo nutné navrhnout pouze funkční sondy. Alelická diskriminace byla tedy dalším krokem po získání dat pomocí sekvenace. Nejprve byly navrženy dvě sady sond pro senzitivní a rezistentní variantu (Rvi4-Res-Pr01; Rvi4-Sens-Pr01; Rvi4-Res-Pr02; Rvi4-Sens-Pr02), které se od sebe lišily pouze v délce. Sondy Pr02 byly o jeden nukleotid na 5' – konci delší než sondy Pr01. První sady sond nevykazovaly dostatečnou fluorescenci pro odlišení jednotlivých variant SNP, a proto byly navrženy nové dvě sady sond (Rvi4-Res-Pr03; Rvi4-Sens-Pr03; Rvi4-Res-Pr04; Rvi4-Sens-Pr04). Sondy Pr03 a Pr04 byly nejprve testovány v simplexní reakci při 53 °C pomocí ultramerů připravených ve třech různých koncentracích (1 pg/ul, 1 fg/ul a 100 ag/ul), které simulovaly rezistentní a senzitivní homozygoty. Po potvrzení funkčnosti sond byla teplota nasedání zvýšena na 58 °C, aby byla zajištěna větší specifita sond. Dle hodnot RFU

(relative fluorescence units) byly jako nejvhodnější sondy vybrány Rvi4-Res-Pr04 a Rvi4-Sens-Pr04. Sondy Pr04 byly dále testovány v multiplexní reakci s ultramery o třech různých koncentracích (1 pg/ul, 1 fg/ul a 100 ag/ul) a již známými heterozygotními a dostupnými homozygotními vzorky (viz Obr. 4).



Obr. 4: Srovnání výsledných variant v Rotor-Gene Q Series Software. Křivka bez teček odpovídá senzitivní alele a křivka s tečkami odpovídá rezistentní alele.

Následně byly pomocí tohoto systému testovány již sekvenované slepé vzorky a několik sekvenovaných jedinců z rodičovské linie. Získané výsledky se 100% shodovaly s výsledky sekvenování. Přistoupilo se tedy k testování 113 kříženců, z nichž část by měla být heterozygotním nositelem genu *Rvi4*. V rámci tohoto souboru bylo detekováno celkem 26 rezistentních heterozygotů (viz Tab. 16).

Tab. 16: Výsledky testování 113 pravděpodobných heterozygotních nositelů genu *Rvi4*.

Křížení	Senzitivní (genotyp G/G)	Rezistentní (genotyp T/G)
Herald (<i>Rvi6</i>) × Regia (<i>Rvi2</i> , <i>Rvi4</i>)	62 (75 %)	21 (25 %)
Rubinstep × Regia (<i>Rvi2</i> , <i>Rvi4</i>)	25 (83 %)	5 (17 %)

Alelická diskriminace pomocí fluorescenčně značených sond umožňuje v případě využití real-time PCR cyklu Rotor-Gene Q 5plex HRM Platform genotypizaci maximálně dvou různých SNPs v jedné multiplexní reakci. Schopnost multiplexování je závislá na množství barev, které je využíváný real-time PCR cyklus schopen detekovat.

Výhodou alelické diskriminace je nenáročný provedení metody genotypizace, jak po časové, tak finanční stránce, kdy lze pro tuto metodu využít běžný real-time PCR

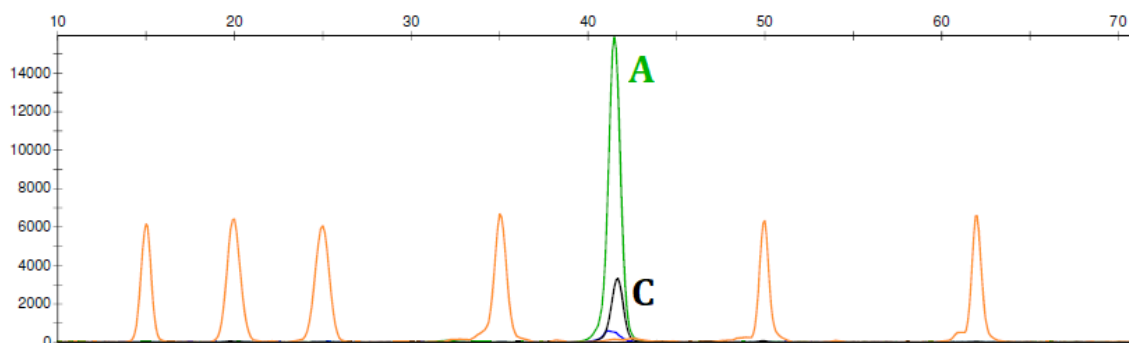
cykler. Pomocí této metody tedy lze zpracovat i stovky vzorků denně. Mezi nevýhody patří omezená schopnost multiplexní detekce SNPs, která je určena vlastnostmi používaného real-time PCR cyklu.

Dle aktuálně dostupných publikací dosud nebyla sestavena metodika genotypizace SNPs v asociaci s genem rezistence vůči patogenu *Venturia inaequalis* Rvi4 pomocí alelické diskriminace s využitím fluorescenčně značených sond.

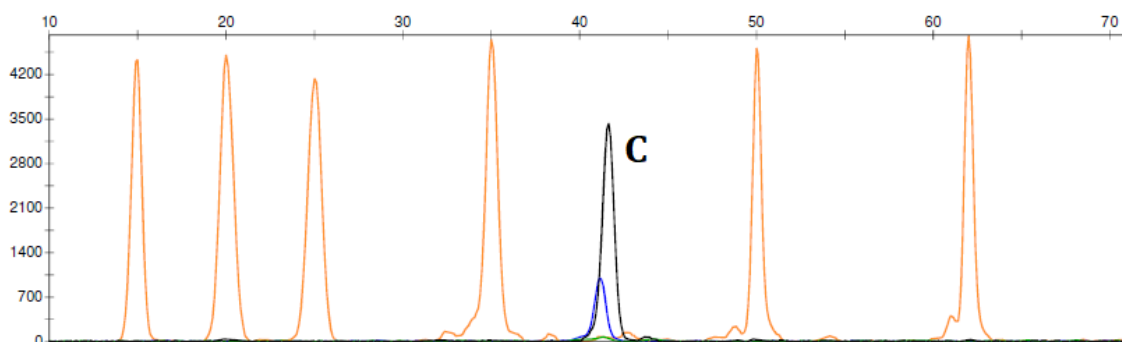
3.4 SNaPshot

SNaPshot je metoda vhodná pro genotypizaci vícero SNPs v jedné multiplexní reakci s možností genotypizace až deseti různých SNPs zároveň. Metoda byla nejprve vyzkoušena pomocí dodané pozitivní kontroly. Po ověření byl navržen specifický primer (Rvi4-SNP-36nt-R01) na základě připraveného sekvenčního srovnání v programu Geneious Prime. Jelikož se v blízkosti SNP K146 nachází další jednonukleotidové polymorfismy, byl detekční primer navržen jako reverzní, aby tyto polymorfismy neobsahoval. Primer byl navržen na výslednou délku 36 nukleotidů, z nichž 24 bylo komplementárních k templátu a zbylých 12 tvořila extenze z cytosinových nukleotidů. Z časových důvodů byl detekční primer Rvi4-SNP-36nt-R01 vyzkoušen pouze na čtyřech již známých vzorcích reprezentujících rezistentní heterozygoty a jednoho senzitivního homozygota. Výsledky všech rezistentních heterozygotů vyšly identicky, vrcholek odpovídající rezistentní alele je však výrazně vyšší než u alely odpovídající senzitivnímu genotypu, což pro analytický software (GeneMapper v. 5) není problém (viz Obr. 5). U vzorků byl též pozorován artefakt odpovídající nukleotidu G, ale i ten byl při analýze softwarově odfiltrován. V obou případech došlo k posunu přibližně o 4,5 nukleotidu oproti předpokládané pozici SNP K146 (37. nukleotid). Tento posun mohl být způsoben použitou fluorescenční značkou, která má vliv na mobilitu získaného produktu nebo sekvencí analyzovaného oligonukleotidu. K posunu nejčastěji dochází u kratších oligonukleotidů o délce okolo 36 nukleotidů. Vliv na výslednou pozici genotypizovaného SNP mohl také mít polymer použitý při práci na genetickém analyzátoru AB3500 Genetic Analyzer. Na možné posuny v případě použití výrobcem doporučeného polymeru POP-7 upozornili Goodwin et Alimat (2017), kteří uvedli, že přesnějších výsledků bylo dosaženo s použitím polymeru POP-6. Metoda je tedy funkční, není však prozatím optimalizována pro současnou detekci všech diagnostických SNPs.

Rezistentní heterozygot



Senzitivní homozygot



Obr. 5: Výsledky genotypizace rezistentního heterozygota (A/C) a senzitivního homozygota (C/C) pomocí kitu SNaPshot Multiplex Kit. Oranžové vrcholky představují velikostní standard; modré vrcholky jsou technické artefakty, které jsou při analýze softwarově odfiltrovány (osa x = relativní velikost fragmentu; osa y = výška signálu)

Výhodou metody SNaPshot je možnost genotypizace až deseti různých SNPs v jedné multiplexní reakci. Genotypizace maximálního množství SNPs povede k menší přístrojové vytíženosti a možnosti zpracovat až stovky vzorků denně. Mezi nevýhody patří v případě genotypizace menšího množství SNPs vyšší cena metody a obtížnější optimalizace multiplexní PCR, která by umožnila amplifikaci všech úseků obsahujících genotypizované SNPs v jedné multiplexní reakci.

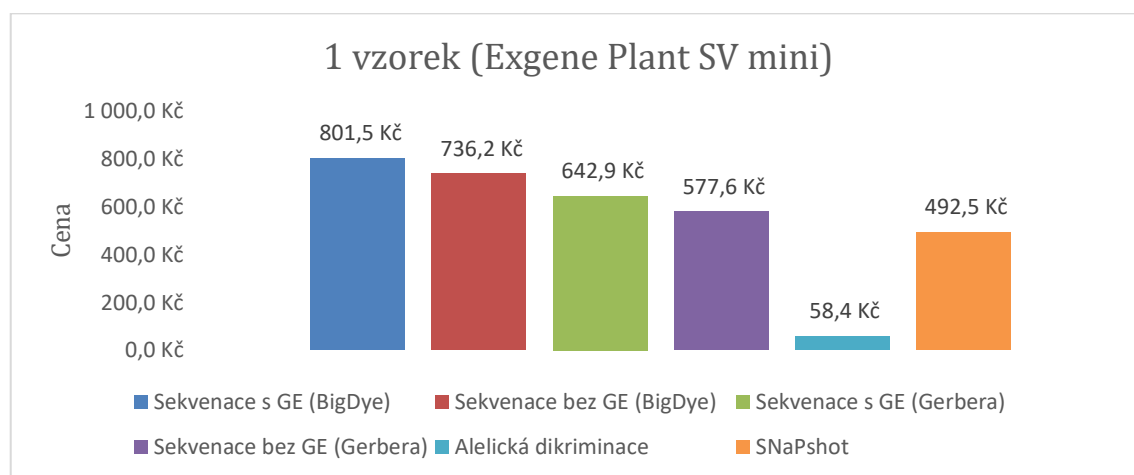
Dle aktuálně dostupných publikací dosud nebyla sestavena metodika genotypizace SNPs v asociaci s genem rezistence vůči patogenu *Venturia inaequalis Rvi4* pomocí metody SNaPshot.

3.5 Finanční analýza metod detekce SNPs

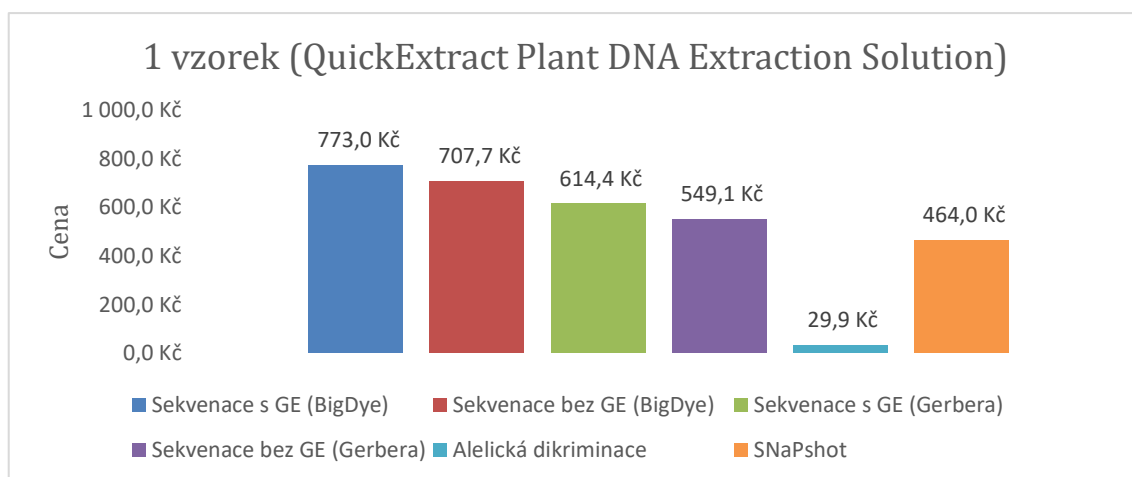
V rámci diplomové práce byla zpracována finanční analýza připravovaných metod genotypizace vybraných SNPs. Byla stanovena cena genotypizace jednoho SNP na jeden analyzovaný vzorek, a to pro izolaci DNA pomocí kitu Exgene Plant SV mini a QuickExtract Plant DNA Extraction Solution. Metoda sekvenace byla analyzována

ve dvou variantách (s gelovou elektroforézou a bez gelové elektroforézy) a s využitím dvou různých kitů pro sekvenační reakci (BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit a Gerbera Sequencing Kit v3.1). Sekvenaci bez gelové elektroforézy lze provést pouze v případě, že na daném pracovišti jde o již zavedenou metodu. Ceny zahrnují pouze náklady nezbytné pro pořízení všech reagentů bez DPH, nezahrnují používané plasty, rukavice a samotnou práci zaměstnance laboratoře.

Ze získaných výsledků vyplývá, že finančně výrazně nejvýhodnější metodou pro genotypizaci jednoho SNP na jeden analyzovaný vzorek je alelická diskriminace (viz Obr. 6 a Obr. 7). Tato metoda je o 434,1 Kč levnější než druhá nejlevnější metoda genotypizace SNaPshot. Ve finální ceně alelické diskriminace se také nejvýrazněji projeví případné použití QuickExtract Plant DNA Extraction Solution pro hrubou extrakci DNA, které cenu genotypizace jednoho SNP na jeden analyzovaný vzorek sníží o 28,5 Kč, což je 48,8 % původní ceny v případě použití kitu Exgene Plant SV mini (viz Obr. 7). V případě použití levnějšího kitu pro sekvenační reakci Gerbera Sequencing Kit v3.1 v kombinaci s izolací DNA pomocí QuickExtract Plant DNA Extraction Solution a vynecháním gelové elektroforézy lze cenu genotypizace jednoho SNP na jeden analyzovaný vzorek pomocí sekvenace snížit až na 549,1 Kč z původních 801,5 Kč. Cena sekvenace je tedy v tomto případě pouze o 85,1 Kč (18,3 %) dražší než SNaPshot v kombinaci s QuickExtract Plant DNA Extraction Solution (viz Obr. 7).



Obr. 6: Ceny genotypizace jednoho SNP na jeden analyzovaný vzorek při izolaci DNA kitem Exgene Plant SV mini. (GE = gelová elektroforéza)



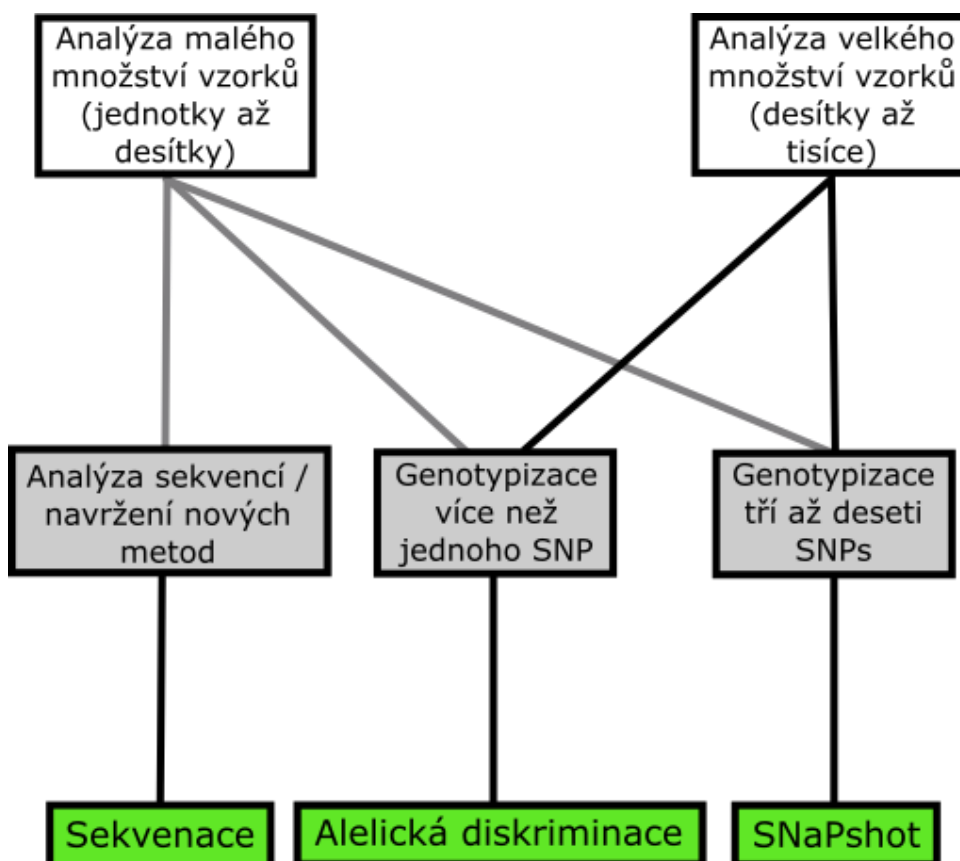
Obr. 7: Ceny genotypizace jednoho SNP na jeden analyzovaný vzorek při izolaci DNA pomocí QuickExtract Plant DNA Extraction Solution. (GE = gelová elektroforéza)

Alelická diskriminace se z finančního hlediska jeví jako nejvhodnější metoda i v případě genotypizace vícero SNPů v rámci jednoho vzorku (viz Tab. 17). V případě využití real-time PCR cyklieru Rotor-Gene Q 5plex HRM Platform lze však v jedné multiplexní reakci genotypizovat maximálně dva SNPů současně, pro tři a více SNPů by tedy byly zapotřebí dva či více různých běhů na tomto cyklieru. Z pohledu přístrojového vytížení a vynaložené práce se tedy, jako vhodnější varianta jeví metoda SNaPshot, jejíž cena by v případě navyšování genotypizovaných SNPů v multiplexní reakci stoupala minimálně, zvláště v případě amplifikace několika různých sekvencí DNA potřebných pro tuto metodu v jedné multiplexní PCR (cena by stoupala pouze o cenu primerů) (Tab. 17 uvádí ceny metody SNaPshot pro variantu amplifikace každé požadované sekvence zvlášť). Dle pokynů výrobce lze pomocí kitu SNaPshot Multiplex Kit genotypizovat současně až deset různých SNPů, proto byla vypracována kalkulace i pro toto maximální množství. I v tomto případě vychází po finanční stránce nejvýhodněji alelická diskriminace, muselo by však být provedeno pět různých běhů, aby takové množství SNPů mohlo být analyzováno. Je tedy velmi pravděpodobné, že v případě započtení ceny vynaložené práce, spotřebního plastu a rukavic by cena genotypizace pomocí alelické diskriminace překonala cenu metody SNaPshot. Jelikož metoda sekvenace nemá možnost multiplexní reakce, je tato metoda pro detekci více než jednoho SNP pro účely MAS finančně naprosto nevhodná (viz Tab. 17). Vhodné použití zpracovávaných metod genotypizace bylo shrnuto v přehledném diagramu (viz Obr. 8).

Tab. 17: Ceny genotypizace vyššího počtu SNPs v jednom vzorku izolovaném pomocí kitu Exgene Plant SV mini. (GE = gelová elektroforéza)

Počet SNPs	Sekvenace s GE (BigDye)	Sekvenace bez GE (BigDye)	Sekvenace s GE (Gerbera)	Sekvenace bez GE (Gerbera)	Alelická diskriminace	SNaPshot
1	801,5 Kč	736,2 Kč	642,9 Kč	577,6 Kč	58,4 Kč	492,5 Kč
2	1 552,7 Kč	1 422,1 Kč	1 235,5 Kč	1 104,9 Kč	66,1 Kč	524,6 Kč
3	2 303,9 Kč	2 108,0 Kč	1 828,1 Kč	1 632,2 Kč	74,2 Kč	556,7 Kč
10	7 512 Kč	6 859 Kč	5 926 Kč	5 273 Kč	129,3 Kč	781,4 Kč

Tato finanční analýza nezahrnuje používané plasty, rukavice a samotnou práci zaměstnance laboratoře. Lze však po vyzkoušení všech tří metod shrnout, že v případě sekvenace je spotřebováno největší množství spotřebního plastu a rukavic, zároveň se jedná o metodu časově nejnáročnější. Příprava metody SNaPshot je časově mnohem přívětivější než sekvenace a spotřeba rukavic se spotřebním plastem je také výrazně nižší. I z tohoto kritéria (časového a spotřeby rukavic se spotřebním plastem) je však alelická diskriminace z těchto tří metod nejvýhodnější možností genotypizace maximálně dvou různých SNPs pro účely MAS.



Obr. 8: Diagram výběru vhodné metody genotypizace SNPs dle počtu zpracovávaných vzorků a SNPs.

3.6 Srovnání s dalšími metodami genotypizace *Rvi4*

SNPs v asociaci s *Rvi4* byly dosud genotypizovány pomocí metody SNP-based KASP™ (competitive allele specific PCR) (Baumgartner et al., 2016), která spočívá v použití dvou různých forward primerů specifických pro konkrétní alelu, které nesou unikátní barevně značenou sekvenci na svém 5' – konci a jednoho univerzálního reverse primeru. Po nasednutí správného forward primeru následuje elongace, při které je dosyntetizován i komplementární řetězec k unikátnímu barevně značenému konci neseném forward primerem. Díky tomu se FRET (fluorescence resonant energy transfer) sonda připojí k nově syntetizovaným řetězcům DNA a dochází k emitaci fluorescenčního záření, které je detekováno. Dále byly SNPs detekovány metodou OpenArray® screens firmy Thermo Fisher Scientific (Chagné et al., 2019), která využívá TaqMan sond a QuantStudio 12K Flex OpenArray destičky s 3072 mikroskopickými otvory v real-time PCR. V případě obou výše uvedených studií byly vzorky vždy zaslány k analýze do externích laboratoří. Metoda KASP je navíc chráněna obchodní značkou firmy LGC Genomics Ltd. Dále byl gen *Rvi4* detekován s využitím SSR a SCAR markerů prostřednictvím PCR a následné gelové elektroforézy (Karapetsi et al., 2020), popřípadě s využitím fluorescenčně značených SSR primerů v multiplexní PCR a následné fragmentační analýzy (Kellerhals et al., 2011). Z dosavadních publikací tedy zatím žádná nepopisuje levnou a rychlou metodu genotypizace vybraných SNPs u několika set či tisíců vzorků. Proto byly v rámci projektu vyvíjeny metody detekce SNPs použitelné pro rutinní analýzy při asistovaném šlechtění, které je možné aplikovat téměř v každé laboratoři molekulární biologie vybavené nyní již běžnými laboratorními přístroji, jako je real-time PCR cykler.

3.7 *Rvi2* a *Rvi6*

Metody pro genotypizaci SNPs v asociaci s geny *Rvi2* a *Rvi6* byly zpracovávány ostatními členy řešitelského týmu. Práce na obou genech je nyní ve stádiu optimalizace metody alelické diskriminace a navrhování detekčních primerů pro metodu SNaPshot.

Závěr

V rámci diplomové práce jsem vyvíjel nové metody detekce genu *Rvi4* pomocí SNP K146, které by byly finančně výhodné pro šlechtitele a přístupné většině laboratoří. Metody byly vyvíjeny ve spolupráci s ostatními řešiteli v rámci projektu č. TJ04000389, kteří se soustředili na další dva vybrané geny *Rvi2* a *Rvi6*. Zároveň jsem se zabýval studiem SNPs, ostatních *Rvi* genů a samotného patogenu *Venturia inaequalis* včetně onemocnění, které způsobuje. Výsledkem tohoto studia je rešeršní část diplomové práce. Praktická část diplomové práce byla soustředěna zejména na sestavení funkčních metod genotypizace SNP K146. V další části diplomové práce bylo testováno vícero izolačních kitů a byla vypracována finanční analýza zpracovávaných metod genotypizace SNPs. Nejprve byla zpracována metoda sekvenace, pomocí které byla ověřena přítomnost SNP K146 a zároveň bylo vytvořeno srovnání sekvencí (alignment), které posloužilo k navržení dalších dvou metod genotypizace. Dále byly navrženy funkční sondy a byla testována metoda real-time PCR alelická diskriminace pomocí hybridizačních sond. Jako poslední byla zpracována metoda SNaPshot, pomocí které bylo testováno pouze několik málo vzorků, jelikož je pro zamýšlené použití (současná detekce SNPs pro všechny *Rvi* geny) nutné zkoordinovat výstupy celého řešitelského týmu.

Jelikož byl v důsledku nově objevených mutací a SNPs průběh práce na genech *Rvi2* a *Rvi6* obtížnější, nebyly dosud SNPs genotypizovány v multiplexních reakcích v rámci metod, které to umožňují (alelická diskriminace a SNaPshot). Po dokončení diplomové práce však budu na projektu dále pracovat, a i této fáze projektu se budu účastnit.

Seznam použité literatury

- Ackermann P. (1992): Jak zajistit úspěšnou ochranu proti strupovitosti jabloně? *Rostlinolékař*, (1): 16 – 19 p. ISSN: 1211-3565.
- Aylor D. E. (1998): The Aerobiology of Apple Scab. *Plant Disease*, 82(8): 838 – 849 p.
- Bartlett D. W., Clough J. M., Godwin J. R., Hall A. A., Hamer M., Parr-Dobrzanski B. (2002): The strobilurin fungicides. *Pest Management Science*, 58(7): 649 – 662 p.
- Baudyš E., Benada J., Špaček J. (1962): Zemědělská fytopatologie. Díl IV. – choroby ovocných stromů. ČAZV, Praha. 203 – 211 p.
- Baumgartner I. O., Kellerhals M., Costa F., Dondini L., Pagliarani G., Gregori R., Tartarini S., Leumann L., Laurens F., Patocchi A. (2016): Development of SNP-based assays for disease resistance and fruit quality traits in apple (*Malus × domestica* Borkh.) and validation in breeding pilot studies. *Tree Genetics & Genomes*, 12(35): 1 – 21 p.
- Beck A., Ritschel A., Schubert K., Braun U., Triebel D. (2005): Phylogenetic relationships of the anamorphic genus *Fusicladium* s. lat. as inferred by ITS nrDNA data. *Mycological Progress*, 4(2): 111 – 116 p.
- Bénaouf G. et Parisi L. (2000): Genetics of Host-Pathogen Relationships Between *Venturia inaequalis* Races 6 and 7 and *Malus* Species. *Phytopathology*, 90(3): 236 – 242 p.
- Bowen J. K., Mesarich C. H., Bus V. G. M., Beresford R. M., Plummer K. M., Templeton M. D. (2011): *Venturia inaequalis*: the causal agent of apple scab. *Molecular Plant Pathology*, 12(2): 105 – 122 p.
- Brent K. J. et Hollomon D. W. (2007): Fungicide resistance in crop pathogens: how can it be managed?. FRAC Monograph No. 1, 2ndEd., Brussels. 57 p. ISBN: 90-72398-07-6.
- Broggini B. L. A., Bus V. G. M., Parravicini G., Kumar S., Groenwold R., Gessler C. (2011): Genetic mapping of 14 avirulence genes in an EU-B04 x 1639 progeny of *Venturia inaequalis*. *Fungal Genetics and Biology*, 48(2): 166 – 176 p.
- Burchill R. T., Hutton K. E., Crosse J. E., Garrett C. M. E. (1965): Inhibition of the Perfect Stage of *Venturia inaequalis* (Cooke) Wint., by Urea. *Nature*, 205(4970): 520 – 521 p.
- 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*. *Annual Review of Phytopathology*, 49(1): 391 – 413 p.

- Bus V. G. M., Rikkerink E. H. A., van de Weg W. E., Rusholme R. L., Gardiner S. E., Bassett H. C. M., Kodde L. P., Parisi L., Laurens F. N. D., Meulenbroek E. J., Plummer K. M. (2005): The *Vh2* and *Vh4* scab resistance genes in two differential hosts derived from Russian apple R12740-7A map to the same linkage group of apple. *Molecular Breeding*, 15(1): 103 – 116 p.
- Caffier V., Patocchi A., Expert P., Bellanger N. M., Durel C. E., Hilber-Bodmer M., Broggin G. A. L., Groenwold R., Bus V. G. M. (2015): Virulence characterization of *Venturia inaequalis* reference isolates on the differential set of *Malus* hosts. *Plant Disease*, 99(3): 370 – 375 p.
- Cornelis S., Gansemans Y., Plaetsen A.-S. V., Weymaere J., Willems S., Deforce D., van Nieuwerburgh F. (2019): Forensic tri-allelic SNP genotyping using nanopore sequencing. *Forensic Science International: Genetics*, 38: 204 – 210 p.
- Crossley B. M., Bai J., Glaser A., Maes R., Porter E., Killian M. L., Clement T., Toohey-Kurth K. (2020): Guidelines for Sanger sequencing and molecular assay monitoring. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 32(6): 1 – 9 p.
- Daccord N., Celton J. M., Linsmith G., Becker C., Choisne N., Schijlen E., van de Geest H., Bianco L., Micheletti D., Velasco R., Di Pierro E. A., Gouzy J., Rees D. J. G., Guérif P., Muranty H., Durel C. E., Laurens F., Lespinasse Y., Gaillard S., Aubourg S., Quesneville H., Weigel D., van de Weg E., Troglio M., Bucher E. (2017): High-quality *de novo* assembly of the apple genome and methylome dynamics of early fruit development. *Nature Genetics*, 49(7): 1099 – 1106 p.
- De S. et Babu M. M. (2010): A time-invariant principle of genome evolution. *PNAS*, 107(29): 13004 – 13009 p.
- Dekkers J. C. M. et Hospital F. (2002): The use of molecular genetics in the improvement of agricultural populations. *Nature Reviews Genetics*, 3(1): 22 – 32 p.
- El-Sharkawy I., Liang D., Xu K. (2015): Transcriptome analysis of an apple (*Malus × domestica*) yellow fruit somatic mutation identifies a gene network module highly associated with anthocyanin and epigenetic regulation. *Journal of Experimental Botany*, 66(22): 7359 – 7376 p.
- Escalona M., Rocha S., Posada D. (2016): A comparison of tools for the simulation of genomic next-generation sequencing data. *Nature Reviews Genetics*, 17(8): 459 – 469 p.
- Feng Y., Zhang Y., Ying C., Wang D., Du C. (2015): Nanopore-based Fourth-generation DNA Sequencing Technology. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 13(1): 4 – 16 p.
- Flor H. H. (1971): Current status of the gene-for-gene concept. *Annual review of phytopathology*, 9(1): 275 – 296 p.

- Frey J. E., Frey B., Sauer C., Kellerhals M. (2004): Efficient low-cost DNA extraction and multiplex fluorescent PCR method for marker-assisted selection in breeding. *Plant Breeding*, 123(6): 554 – 557 p.
- Gessler C., Patocchi A., Sansavini S., Tartarini S., Gianfranceschi L. (2006): *Venturia inaequalis* Resistance in Apple. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 25(6): 473 – 503 p. ISSN: 1549-7836.
- Gladieux P., Zhang X. G., Róldan-Ruiz I., Caffier V., Leroy T., Devaux M., van Glabeke S., Coart E., le Cam B. (2010): Evolution of the population structure of *Venturia inaequalis*, the apple scab fungus, associated with the domestication of its host. *Molecular Ecology*, 19(4): 658 – 674 p.
- Glaubitz J. C., Casstevens T. M., Lu F., Harriman J., Elshire R. J., Sun Q., Buckler E. S. (2014): TASSEL-GBS: A High Capacity Genotyping by Sequencing Analysis Pipeline. *PLoS ONE*, 9(2): 1 – 11 p.
- Goodwin W. H. et Alimat S. (2017): Analysis of four PCR/SNaPshot multiplex assays analyzing 52 SNPforID markers. *ELECTROPHORESIS*, 38(7): 1007 – 1015 p. ISSN: 0173-0835.
- Guo C., Du J., Wang L., Yang S., Mauricio R., Tian D., Gu T. (2016): Insertions/Deletions-Associated Nucleotide Polymorphism in *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in Plant Science*, 7: 1 – 12 p.
- Halushka M. K., Fan J. B., Bentley K., Hsie L., Shen N., Weder A., Cooper R., Lipshutz R., Chakravarti A. (1999): Patterns of single-nucleotide polymorphisms in candidate genes for blood-pressure homeostasis. *Nature Genetics*, 22(3): 239 – 247 p.
- Harris S. A., Robinson J. P., Juniper B. E. (2002): Genetic clues to the origin of the apple. *TRENDS in Genetics*, 18(8): 426 – 430 p.
- Hluchý M., Ackermann P., Zacharda M., Bagar M., Jetmarová E., Vanek G. (1997): *Obrazový atlas chorob a škůdců ovocných dřevin a révy vinné*. Biocont Laboratory s.r.o., Brno. 32 – 35 p. ISBN: 80-901874-2-1.
- Holb I. J., Heijne B., Jeger M. J. (2006): Effects of integrated control measures on earthworms, leaf litter and *Venturia inaequalis* infection in two European apple orchards. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 114(2 – 4): 287 – 295 p.
- Chagné D., Vanderzande S., Kirk C., Profitt N., Weskett R., Gardiner S. E., Peace C. P., Volz R. K., Bassil N. V. (2019): Validation of SNP markers for fruit quality and disease resistance loci in apple (*Malus × domestica* Borkh.) using the OpenArray® platform. *Horticulture Research*, 6(1): 1 – 16 p.

Chevalier M., Lespinasse Y., Renaudin S. (1991): A microscopic study of the different classes of symptoms coded by the *Vf* gene in apple for resistance to scab (*Venturia inaequalis*). *Plant Pathology*, 40(2): 249 – 256 p.

Islam M. S., Thyssen G. N., Jenkins J. N., Fang D. D. (2014): Detection, Validation, and Application of Genotyping-by-Sequencing Based Single Nucleotide Polymorphisms in Upland Cotton. *The Plant Genome*, 8(1): 1 – 10 p.

Jaklova P., Kloutvorova J., Cmejla R. (2020): A real-time PCR quantitative analysis of the *Venturia inaequalis cytb* gene G143A mutation and its prevalence in the Czech Republic. *European Journal of Horticultural Science*, 85(3): 169 – 175 p.

Jänsch M., Broggin G. A. L., Weger J., Bus V. G. M., Gardiner S. E., Bassett H., Patocchi A. (2015): Identification of SNPs linked to eight apple disease resistance loci. *Molecular Breeding*, 35(1): 1 – 21 p.

Joshi R. K. et Nayak S. (2010): Gene pyramiding-A broad spectrum technique for developing durable stress resistance in crops. *Biotechnology and Molecular Biology Review*, 5(3): 51 – 60 p.

Juroch J. (2010): Strupovitost jabloně – nejvýznamnější houbová choroba jabloní [online]. Ministerstvo zemědělství ČR ve spolupráci se Státní rostlinolékařskou správou [cit. 12. 2. 2021]. Dostupné z WWW: http://eagri.cz/public/web/file/94998/strupovitost_jablone_nejvyznamnejsi_houbova_choroba_jabloni.pdf

Karapetsi L., Nianiou-Obeidat I., Zambounis A., Osathanunkul M., Madesis P. (2020): Molecular screening of domestic apple cultivars for scab resistance genes in Greece. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, 56(4): 165 – 169 p.

Kellerhals M., Franck L., Baumgartner I. O., Patocchi A., Frey J. E. (2011): Breeding for Fire Blight Resistance in Apple. *Acta Horticulturae*, 896: 385 – 389 p.

Khajuria Y. P., Kaul S., Wani A. A., Dhar M. K. (2018): Genetics of resistance in apple against *Venturia inaequalis* (Wint.) Cke. *Tree Genetics & Genomes*, 14(2): 1 – 20 p.

Kocourek F., Bagar M., Falta V., Harašta P., Holý K., Chroboková E., Kloutvorová J., Kůdela V., Lánský M., Náměstek J., Navrátil M., Ouředníčková J., Pluhař P., Psota V., Pultar O., Stará J., Suchá J., Sus J., Šafářová D., Špak J., Valentová L. (2015): Integrovaná ochrana ovocných plodin. Profi Press s.r.o., Praha. 127 – 131 p. ISBN: 978-80-86726-72-4.

Koenraadt H., Somerville S. C., Jones A. L. (1992): Characterization of Mutations in the Beta-Tubulin Gene of Benomyl-Resistant Field Strains of *Venturia inaequalis* and Other Plant Pathogenic Fungi. *Phytopathology*, 82(11): 1348 – 1354 p.

- Köller, W. (1994): Chemical control of apple scab-status quo and future. *Norwegian Journal of Agricultural Sciences*, Norway. 149 – 170 p. ISSN: 0802-1600.
- Kono N. et Arakawa K. (2019): Nanopore sequencing: Review of potential applications in functional genomics. *Development, Growth & Differentiation*, 61(5): 316 – 326 p.
- Kwok P. Y. et Chen X. (2003): Detection of Single Nucleotide Polymorphisms. *Current issues in molecular biology*, 5: 43 – 60 p.
- Liebhard R., Koller B., Gianfranceschi L., Gessler C. (2003): Creating a saturated reference map for the apple (*Malus x domestica* Borkh.) genome. *Theoretical and Applied Genetics*, 106(8): 1497 – 1508 p.
- Livak K. J. (1999): Allelic discrimination using fluorogenic probes and the 5' nuclease assay. *Genetic Analysis: Biomolecular Engineering*, 14(5 – 6): 143 – 149 p.
- Lohrer H. D. et Tangen U. (2000): Investigations into the Molecular Effects of Single Nucleotide Polymorphism. *Pathobiology*, 68(6): 283 – 290 p.
- MacHardy W. E., Gadoury D. M., Gessler C. (2001): Parasitic and Biological Fitness of *Venturia inaequalis*: Relationship to Disease Management Strategies. *Plant Disease*, 85(10): 1036 – 1051 p.
- McGuigan F. E. A. et Ralston S. H. (2002): Single nucleotide polymorphism detection: allelic discrimination using TaqMan. *Psychiatric Genetics*, 12(3): 133 – 136 p.
- Ogawa J. M. et English H. (1991): Diseases of temperate zone tree fruit and nut crops. UCANR Publications, Oakland, 3345. 461 p. ISBN: 0-931876-97-4.
- Palani P. V. et Lalithakumari D. (1999): Resistance of *Venturia inaequalis* to the sterol biosynthesisinhibiting fungicide, penconazole [1-(2-(2,4-dichlorophenyl)pentyl)-1H-1,2,4-triazole]. *Mycological Research*, 103(9): 1157 – 1164 p.
- Paneto G. G. et de Paula Careta F. (2015): Designing Primers for SNaPshot Technique. In: PCR Primer Design. Humana Press, New York. 165 – 172 p. ISBN: 978-1-4939-2365-6.
- Papp A. C., Pinsonneault J. K., Cook G., Sadeé W. (2003): Single Nucleotide Polymorphism Genotyping Using Allele-Specific PCR and Fluorescence Melting Curves. *BioTechniques*, 34(5): 1068 – 1072 p.
- 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., Tsipouridis C. (2004): Variability of the Pathogenicity of *Venturia inaequalis* in Europe. *Acta Horticulturae*, 663(1): 107 – 113 p.

- Patocchi A., Gianfranceschi L., Gessler C. (1999): Towards the map-based cloning of *Vf*: fine and physical mapping of the *Vf* Region. *Theoretical and Applied Genetics*, 99(6): 1012 – 1017 p.
- Peil A., Patocchi A., Hanke V. M., Bus V. G. M. (2017): Apple cultivar Regia possessing both *Rvi2* and *Rvi4* resistance genes is the source of a new race of *Venturia inaequalis*. *European Journal of Plant Pathology*, 151(2): 533 – 539 p.
- Porsche F. M., Hahn C. A., Pfeiffer B., Kollar A. (2013): Yeast extract applications to reduce the primary ascospore inoculum of *Venturia inaequalis*. *Yeast*, 53 – 59 p.
- Rafalski A. (2002): Applications of single nucleotide polymorphisms in crop genetics. *Current Opinion in Plant Biology*, 5(2): 94 – 100 p.
- Sanger F. et Coulson A. R. (1975): A Rapid Method for Determining Sequences in DNA by Primed Synthesis with DNA Polymerase. *Journal of Molecular Biology*, 94(3): 441 – 448 p.
- Shafi S. M., Sheikh M. A., Nabi S. U., A Mir M., Ahmad N., Mir J. I., Raja W. H., Rasool R., Masoodi K. (2019): An Overview of Apple Scab, its Cause and Management Strategies. *EC Microbiology*, 15(4): 283 – 287 p.
- Shastri B. S. (2009): SNPs: Impact on Gene Function and Phenotype. In: Komar A. (eds.): *Single Nucleotide Polymorphisms*. Humana Press, Totowa, NJ. 3 – 22 p. ISBN: 978-1-60327-411-1.
- Sherbakoff C. D. (1932): The More Important Diseases of Apples in Tennessee. Bulletin 145. University of Tennessee Agricultural Experiment Station, Knoxville. 23 – 26 p.
- Schmidt B. et Hildebrandt A. (2017): Next-generation sequencing: big data meets high performance computing. *Drug Discovery Today*, 22(4): 712 – 717 p.
- Soriano J. M., Madduri M., Schaart J. G., van der Burgh A., van Kaauwen M. P. W., Tomic L., Groenwold R., Velasco R., van de Weg E., Schouten H. J. (2014): Fine mapping of the gene *Rvi18* (*V25*) for broad-spectrum resistance to apple scab, and development of a linked SSR marker suitable for marker-assisted breeding. *Molecular Breeding*, 34(4): 2021 – 2032 p.
- Stranneheim H. et Lundeberg J. (2012): Stepping stones in DNA sequencing. *Biotechnology Journal*, 7(9): 1063 – 1073 p.
- Vávra R., Kloutvorová J., Blažek J., Sedlák P., Vejl P., Melounová M., Boček S. (2015): Detekce ras a populací rezistentních k fungicidům patogena *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint. na území České republiky. Výzkumný a šlechtitelský ústav ovocnářský Holovousy s.r.o., Holovousy. 40 p. ISBN: 978-80-87030-44-8.

Vávra R., Žďárská I., Kadlecová V., Blažek J., Vejl P., Sedlák P., Melounová M. (2015): Selekce jabloní v rané vývojové fázi s využitím molekulárních markerů. Výzkumný a šlechtitelský ústav ovocnářský Holovousy s.r.o., Holovousy. 56 p. ISBN 978-80-87030-43-1.

Velasco R., Zharkikh A., Affourtit J., Dhingra A., Cestaro A., Kalyanaraman A., Fontana P., Bhatnagar S. K., Troggio M., Pruss D. et al. (2010): The genome of the domesticated apple (*Malus x domestica* Borkh.). *Nature Genetics*, 42(10): 833 – 839 p.

Wang M., Ji Y., Feng S., Liu C., Xiao Z., Wang X., Wang Y., Xia G. (2018): The non-random patterns of genetic variation induced by asymmetric somatic hybridization in wheat. *BMC Plant Biology*, 18(1): 1 – 15 p.