

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra genetiky a šlechtění



**Vliv odrůdy a skladování plodů na expresi izoalergenů
Mal d 1 ve slupce a dužnině jablek**

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Anna Táborská

Obor studia: Biotechnologie a šlechtění rostlin

Vedoucí práce: doc. Dr. Ing. Pavel Vejl

© 2018 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Vliv odrůdy a skladování plodů na expresi izoalergenů Mal d 1 ve slupce a dužnině jablek" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 16. 4. 2018

Poděkování

Rád) bych touto cestou poděkovala především doc. Dr. Ing. Pavlovi Vejlovi za odborné vedení, cenné rady a pomoc se zpracováním této diplomové práce. Dále bych také chtěla poděkovat Mgr. Martině Melounové, Ph.D. a Ing. Daniele Čílové za vedení při laboratorní práci a odborné konzultace.

Vliv odrůdy a skladování plodů na expresi izoalergenů

Mal d 1 ve slupce a dužnině jablek

Souhrn

Konzumace čerstvých jablečných plodů (*Malus x domestica*) může u citlivých jedinců vyvolat alergickou reakci. Většinou se jedná pouze o lehké lokální symptomy v okolí dutiny ústní, nazývané ústní alergický syndrom. Alergie na jablka je především ve střední a severní Evropě často spojována s alergií na pyl břízy. To je dáno podobnou strukturou hlavního jablečného alergenu Mal d 1 s alergenem březového pylu Bet v 1 a zkříženou reaktivitou IgE protilátek, které způsobují alergické reakce.

Tato diplomová práce vznikla na základě výzkumu vlivu odrůdy a skladování na expresi izoalergenů Mal d 1 ve slupce a dužnině jablek. Aby byla jablka dostupná po celý rok, musí být většina z nich dlouhodobě skladována. Podmínky a délka skladování mohou výrazně ovlivnit alergenicitu plodů. Byla zkoumána exprese 4 izoform alergenu Mal d 1 u 14 odrůd jablek z experimentálních výsadb VŠÚO Holovousy s.r.o. ihned po sklizni a po 12 týdnech skladování při 5 °C. Exprese genu byla zkoumána pomocí kvantitativní Real-time polymerázové řetězové reakce (qRT-PCR). Před samotnou qRT-PCR musela být extrahována RNA z rostlinných tkání, která byla následně reverzní transkripcí převedena do cDNA. K vyhodnocení relativní exprese jednotlivých izoform Mal d 1 byly použity hodnoty ΔCq a $\Delta\Delta Cq$, vztažené k referenčnímu genu pro aktin 7 a referenčnímu vzorku odrůdy Golden Delicious, která sloužila jako kalibrátor.

Z výsledků vyplývá, že skladováním po dobu 12 týdnů při teplotě 5 °C byla zvýšena exprese většiny izoform Mal d 1. Míra zvýšení exprese po skladování závisí na skladovatelnosti odrůdy a může být také ovlivněna působením stresových faktorů. Majoritní podíl na celkové expresi Mal d 1 mají ze 4 zkoumaných izoform Mal d 1.01 a Mal d 1.02. Všechny izoformy jsou celkově více exprimovány ve slupce než v dužnině. Nejvyšší míru celkové exprese zkoumaných izoform vykazovala odrůda Jonagold.

Tato diplomová práce vznikla za podpory grantového projektu NAZV Mze ČR QJ1510354.

Klíčová slova: jablko, *Malus x domestica*, izoalergeny, Mal d 1, exprese, qRT-PCR, skladování plodů

Effect of variety and storage of fruits on expression of Mal d 1 isoallergens in apple peel and pulp

Summary

Consumption of fresh apple fruits (*Malus x domestica*) can cause an allergic reaction in sensitive individuals. Patients generally develop only mild local symptoms around the oral cavity, called oral allergy syndrome. Apple allergy is often associated with birch pollen in Central and Northern Europe. This is due to the similar structure of the Mal d 1, main apple allergen with the birch pollen allergen Bet 1, and the cross reactivity of IgE antibodies that cause allergic reactions.

This diploma thesis was based on the research of effect of variety and storage of fruits on expression of Mal d 1 isoallergens in apple peel and pulp. As apples are available throughout the year, a significant number of consumed fruit had been stored for several weeks or months. Conditions and length of storage can significantly affect the allergenicity of the fruits. The expression of 4 Mal d 1 allergen isoforms in 14 apple varieties from experimental plots of VŠÚO Holovousy s.r.o. immediately after harvest and after 12 weeks of storage at 5 ° C has been investigated. Gene expression was investigated using a quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR). First, RNA from plant tissues had to be extracted, which was subsequently converted to cDNA by reverse transcription. To evaluate the relative expression of each Mal d 1 isoform, the ΔCq and ΔCCq values were used relative to the reference gene for actin 7 and the reference sample of Golden Delicious, which was used as a calibrator.

The results show that the most of isoforms Mal d 1 showed increased expression after storage for 12 weeks at 5 ° C. The rate of increase in expression after storage depends on the variety's shelf life and may also be affected by stress factors. The majority of Mal d 1 total expression has Mal d 1.01 and Mal d 1.02 of the 4 isoforms studied. All isoforms are generally more expressed in peel than in pulp. The highest level of isoallergen expression was by the Jonagold variety.

The diploma thesis was created with the support of the grant project NAZV MZe ČR QJ1510354.

Keywords: apple tree, *Malus x domestica*, isoallergens, Mal d 1, expression, qRT-PCR, storage of fruit

Obsah

1	Úvod	1
2	Vědecké hypotézy a cíle práce	2
2.1	Vědecké hypotézy:	2
2.2	Cíle práce:	2
3	Literární rešerše	3
3.1	Jabloň domácí (<i>Malus x domestica</i> Borkh.).....	3
3.1.1	Růst a zrání jablečných plodů	4
3.1.2	Chemické složení jablečných plodů	5
3.2	Exprese genu	6
3.3	Imunitní reakce člověka a alergie	7
3.3.1	Typy imunopatologických reakcí	8
3.3.1.1	Anafylaktický typ alergie (reakce I. typu).....	8
3.3.1.2	Další typy imunopatologických reakcí.....	9
3.4	Alergeny.....	10
3.4.1	Inhalační alergený	10
3.4.2	Kontaktní alergený	10
3.4.3	Potravinové alergený	11
3.4.4	Názvosloví alergenů	11
3.4.5	Zkřížené alergie	11
3.4.5.1	Pylově potravinový syndrom.....	13
3.4.6	Jablečné alergený	14
3.4.6.1	Typy jablečných alergenů	14
3.4.6.2	Izoformy alergenu Mal d 1	15
3.4.6.3	Projevy alergie na jablka	16
3.4.6.4	Stanovení exprese jablečných alergenů a jejich detekce.....	17
3.4.6.5	Faktory ovlivňující míru exprese jablečných alergenů	17
3.5	Kvantitativní polymerázová řetězová reakce (qRT-PCR)	19
3.5.1	PCR amplifikace.....	20

3.5.2	Real-time monitoring PCR.....	22
3.5.2.1	ΔCq porovnávací kvantifikační metoda	23
3.5.2.2	Měření genové exprese pomocí qRT-PCR.....	24
3.5.2.3	$\Delta\Delta Cq$ metoda relativní kvantifikace.....	25
3.5.3	SYBR Green.....	26
3.5.4	Využití Real-time PCR.....	27
3.6	Skladování jablečných plodů	27
3.6.1	Životní pochody ve sklizených plodech.....	28
3.6.1.1	Výpar	28
3.6.1.2	Dýchání	28
3.6.1.3	Přeměna zásobních látek v plodech.....	28
3.6.1.4	Změny zbarvení plodů.....	29
3.6.2	Faktory ovlivňující skladovatelnost plodů	29
3.6.2.1	Teplota.....	29
3.6.2.2	Vlhkost	30
3.6.2.3	Složení vzduchu	30
3.6.3	Skladování plodů v řízené atmosféře	30
3.6.4	Vliv skladování na expresi jablečných alergenů	30
4	Materiál a metody.....	33
4.1	Rostlinný materiál	33
4.1.1	Použité odrůdy.....	33
4.2	Extrakce RNA	40
4.2.1	Příprava vzorku a potřebných roztoků	41
4.2.1.1	Příprava vzorku rostlinného pletiva	41
4.2.1.2	Příprava lyzačního pufru	41
4.2.1.3	Příprava promývacího roztoku Wash Solution 2	41
4.2.2	Proces extrakce.....	41
4.2.2.1	Rozklad pletiv a odstranění buněčných zbytků	41
4.2.2.2	Vysrážení RNA a její zachycení v kolonce.....	42

4.2.2.3	Promývací fáze (odstranění nečistot)	42
4.2.2.4	Vyluhování vyčištěné RNA z kolonky.....	43
4.2.2.5	Finální produkt extrakce RNA	43
4.3	Přepis RNA do cDNA	43
4.4	Kvantitativní Real-time PCR (qRT-PCR).....	44
4.5	Zpracování dat z qRT-PCR.....	47
4.5.1	Stanovení parametrů relativní kvantifikace exprese Ratio ΔCq a $\Delta\Delta Cq$	47
4.6	Ověření reprezentativnosti přípravy směšného vzorku.....	48
4.7	Sekvenační analýza	48
4.8	Statistické zpracování výsledků	48
5	Výsledky.....	50
5.1	Celkový přehled stanovených hodnot Ratio ΔCq a $\Delta\Delta Cq$	51
5.2	Hodnocení statisticky významných rozdílů hodnot Ratio ΔCq	60
5.2.1	Analýza rozdílů dle typu pletiva	62
5.2.2	Analýza rozdílů dle skladování	63
5.2.3	Analýza rozdílů dle izoformy Mal d 1	64
5.2.4	Analýza rozdílů dle odrůdy	65
5.3	Hodnocení závislosti exprese izoformem Mal d 1 před a po skladování.....	67
5.4	Testování vhodnosti metodického postupu přípravy směšného vzorku	70
5.5	Ověření specifity amplifikace sekvenační analýzou	71
6	Diskuze	72
6.1	Rostlinný materiál	72
6.2	Metodický postup izolace RNA, přepisu do cDNA a qRT-PCR.....	72
6.3	Míra exprese izoalergenů vyjádřena hodnotami Ratio ΔCq a $\Delta\Delta Cq$	73
6.4	Optimalizace metodického postupu přípravy směšného vzorku.....	74
6.5	Sekvenační analýza	74
6.6	Vliv odrůdy na míru exprese izoformem Mal d 1	75

6.7	Vliv skladování na míru exprese izoforem Mal d 1 u jednotlivých odrůd...	75
6.7.1	Teplota a způsob skladování	76
6.7.2	Doba skladování	76
6.7.3	Stres v průběhu skladování.....	76
6.7.4	Expresse jednotlivých izoforem v průběhu skladování	77
6.8	Rozdíly v míře exprese izoforem Mal d 1 mezi slupkou a dužninou.....	77
6.9	Rozdíly v míře exprese mezi zkoumanými izoformami Mal d 1	78
7	Závěr.....	79
8	Bibliografie.....	80

Seznam použitých zkratk

PCR = polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)

RT-PCR = reverzně transkriptázová PCR (Reverse transcription polymerase chain reaction)

Real-time PCR = PCR v reálném čase

RCF = relativní centrifugační zrychlení

Seznam obrázků

Obrázek 1 Fáze RT-PCR zobrazené na reakční křivce (Stephenson, 2016).	20
Obrázek 2 Teplotní cyklus PCR (Kubista et al., 2006)	22
Obrázek 3 Real-time PCR reakční křivky. Prahová úroveň je nastavena dostatečně nad pozadí a počet potřebných cyklů k dosažení této úrovně, CT, je zaznamenáván (Kubista et al., 2006).	23
Obrázek 4 Ukázka výpočtu, kolikrát je více amplifikovaného produktu ve vzorku A (nižší hodnota C_T) než u vzorku B (Stephenson, 2016).....	24
Obrázek 5 Navázání SYBR Greenu na dvouřetězcové molekuly DNA, zdroj: < http://labguide.cz/sybergreen/ >	26
Obrázek 6 Výsledky SPT testu porovnávající změnu alergenicity vlivem skladování v neřízené a řízené atmosféře (Bolhaar et al., 2005).	31
Obrázek 7 odrůda Nikoleta, zdroj: < http://eagri.cz/public/web/file/493584/Ovoce_2016.pdf >	33
Obrázek 8 odrůda Frosta, zdroj: < http://eagri.cz/public/web/file/493584/Ovoce_2016.pdf > ..	34
Obrázek 9 odrůda Jonagold Marnika, zdroj: < http://www.ovoceploskovice.cz/portfolio/detail/jonagold >	34
Obrázek 10 odrůda Topaz, zdroj: < http://www.ovocne-stromky.cz/topaz-p72 >	35
Obrázek 11 odrůda Meteor, zdroj: < http://eagri.cz/public/web/file/493584/Ovoce_2016.pdf >	35
Obrázek 12 odrůda Flordika, zdroj: < http://eagri.cz/public/web/file/493584/Ovoce_2016.pdf >	36
Obrázek 13 odrůda Artiga, zdroj: < http://eagri.cz/public/web/file/493584/Ovoce_2016.pdf >	36
Obrázek 14 odrůda Jonagold Supra, zdroj: < https://www.zahradnictvi-spomysl.cz/jablon-jonagored-supra/ >	37
Obrázek 15 odrůda Rucla, zdroj: < http://eagri.cz/public/web/file/493584/Ovoce_2016.pdf >	37
Obrázek 16 odrůda Idared, zdroj: < http://www.zemcheba.cz/node/33 >	38
Obrázek 17 odrůda Lady Silvia, zdroj: < http://eagri.cz/public/web/file/493584/Ovoce_2016.pdf >	38

Obrázek 18 odrůda Reluga, zdroj: < http://eagri.cz/public/web/file/493584/Ovoce_2016.pdf >	39
Obrázek 19 odrůda Jonagold, zdroj: < http://www.zemcheba.cz/cz/jonagold-jonagored >.....	39
Obrázek 20 odrůda Golden Delicious, zdroj: < https://www.starkbros.com/products/fruit-trees/apple-trees/stark-golden-delicious-apple >	40
Obrázek 21 Příklad obsazení jamek stripů se vzorky, které byly vloženy do Nano Light Cycleru, kde podstoupily qRT-PCR, zdroj: <vlastní obrázek>.....	46
Obrázek 22 Grafický výstup z programu přístroje LightCycler Nano Instrument od firmy Roche	50
Obrázek 23 Výsledek sekvenační analýzy.....	71
Obrázek 24 Primery pro izoformy Mal d 1.01 a Mal d 1.02 dle Botton et al. (2008)	73

Seznam tabulek

Tabulka 1 Komponenty od firmy Roche potřebné pro reverzní transkripci a jejich množství na 1 vzorek.....	44
Tabulka 2 Primerové páry použité pro amplifikaci vybraných genů v qRT-PCR (Pagliarani et al., 2013).	47
Tabulka 3 Mediány výsledných hodnot Ratio ΔCq a Ratio $\Delta\Delta Cq$ a jejich variační koeficienty u analyzovaných vzorků dužniny plodů před a po skladování - 1. část.....	52
Tabulka 4 Mediány výsledných hodnot Ratio ΔCq a Ratio $\Delta\Delta Cq$ a jejich variační koeficienty u analyzovaných vzorků slupky plodů před a po skladování - 1. část.....	56
Tabulka 5 Pravděpodobnost shody hodnot mediánů Ratio ΔCq mezi dužninou a slupkou dle Kruskal-Wallisova testu.....	62
Tabulka 6 Pravděpodobnost shody hodnot Ratio ΔCq před a po skladování dle Kruskal-Wallisova testu.....	63
Tabulka 7 Pravděpodobnost shody hodnot Ratio ΔCq mezi analyzovanými izoformami dle Kruskal-Wallisova testu.....	64
Tabulka 8 Pravděpodobnost shody hodnot Ratio ΔCq mezi jednotlivými odrůdami dle Kruskal-Wallisova testu.....	66

Seznam grafů

Graf 1 Součet hodnot Ratio ΔCq stanovených v dužině před skladováním	54
Graf 2 Součet hodnot Ratio ΔCq stanovených v dužině po skladování	54
Graf 3 Součet hodnot Ratio $\Delta\Delta Cq$ stanovených v dužině před skladováním.....	55
Graf 4 Součet hodnot Ratio $\Delta\Delta Cq$ stanovených v dužině po skladování.....	55
Graf 5 Součet hodnot Ratio ΔCq stanovených ve slupce před skladováním.....	58
Graf 6 Součet hodnot Ratio ΔCq stanovených ve slupce po skladování	58
Graf 7 Součet hodnot Ratio $\Delta\Delta Cq$ stanovených ve slupce před skladování	59
Graf 8 Součet hodnot Ratio $\Delta\Delta Cq$ stanovených v dužině po skladování.....	59
Graf 9 Histogram všech stanovených hodnot Ratio ΔCq v porovnání s Gaussovou křivkou normálního rozdělení	60
Graf 10 P-graf všech stanovených hodnot Ratio ΔCq v porovnání s očekávaným průběhem normálního rozdělení.....	61
Graf 11 Porovnání rozdílů hodnot mediánů Ratio ΔCq mezi dužninou a slupkou dle Kruskal-Wallisova testu.....	62
Graf 12 Porovnání rozdílů mediánů Ratio ΔCq mezi vzorky před a po skladování dle Kruskal-Wallisova testu.....	63
Graf 13 Porovnání rozdílů hodnot mediánů Ratio ΔCq mezi analyzovanými izoformami dle Kruskal-Wallisova testu.....	64
Graf 14 Porovnání rozdílů hodnot mediánů Ratio ΔCq mezi jednotlivými odrůdami dle Kruskal-Wallisova testu.....	65
Graf 15 Závislost exprese zkoumaných izoform Mal d 1 před a po skladování.....	67
Graf 16 Závislost exprese izoformy Mal d 1.01 před a po skladování.	68
Graf 17 Závislost exprese izoformy Mal d 1.02 před a po skladování.	68
Graf 18 Závislost exprese izoformy Mal d 1.06A před a po skladování.	69
Graf 19 Závislost exprese izoformy Mal d 1.06B před a po skladování.	69
Graf 20 Porovnání rozdílů hodnot mediánů Ratio ΔCq vyjadřujících expresi Mal d 1.01 u 10 vzorků ze 3 plodů ve všech možných kombinacích a směsného vzorku (S).....	70

1 Úvod

Jablka jsou nejvíce konzumovaným ovocem a zdrojem mnoha prospěšných látek ve výživě evropské populace (Bolhaar et al., 2005). Díky rozšířenému pěstování jabloní v mírném zeměpisném pásu jsou pro nás snadno dostupná. Oblíbená jsou hlavně pro příjemnou svěžď a lehce sladkou chuť. Za hlavní výhody konzumace jablečných plodů můžeme považovat především snadnou stravitelnost, nízkou kalorickou hodnotu a obsah prospěšných minerálních látek, vitaminů a vlákniny, která podněcuje peristaltiku střev a tím napomáhá správnému zažívání. Dalo by se říci, že jablko je pro Středoevropana ideálním ovocem. Ve společnosti ale bohužel stále přibývá jedinců, kteří si toto ovoce z důvodu alergie dopřát nemohou.

Rostlinná strava je obvyklým původcem potravinových alergií. Velmi často se projevují alergické reakce na ovoce z čeledi *Rosaceae*, nejčastěji právě na jablka. U pacientů se projevují většinou mírnými orofaryngeálními symptomy, které známe jako tzv. orální alergický syndrom (OAS). Často se tyto alergie vyskytují zkříženě s alergií na pyl (Fernández-Rivas et al., 2006).

Podle údajů z roku 1999 se potravinové alergie týkaly více než 8 % dětí mladších 3 let a přibližně 2 % dospělé populace (Sampson, 1999). Poslední dobou však alergiků stále přibývá. Dle Fernández-Rivas et al. (2006) či Nováka a Novákové (2010) trpí některou z alergií téměř každé třetí dítě a každý pátý dospělý (statistiky uvádějí cca 20 %). Alergie na jablka se vyskytuje především ve střední a severní Evropě, a to více než u 2 % místní populace (Bolhaar et al., 2005; Fernández-Rivas et al., 2006 a další). Výzkum alergií přináší neustále mnoho nových výsledků, což vede k vývoji nových farmaceutických preparátů působících proti látkám, které se na alergických reakcích podílejí. Existuje mnoho preparátů, které dokáží alergickou reakci zmírnit nebo potlačit, ale ne ji zcela vymýtit.

Skutečnost, že alergická onemocnění se ve větší míře vyskytují ve vyspělých zemích, by se dala odůvodnit vysokými nároky na hygienu. Duševně pracující lidé žijící ve městech, kteří se většinou pohybují v téměř sterilním prostředí, bývají podle některých tvrzení k alergickým onemocněním náchylnější. Musíme ale brát v potaz, že lidé v méně vyspělých zemích často nemají možnost získat dostatečnou lékařskou péči, takže je možné, že v jejich případě není často alergie ani diagnostikována. Svoju roli zde jistě hraje genetická predispozice. Diskutuje se také o vlivu zhoršujícího se životního prostředí, změně životního stylu, globalizace nebo cestování (Novák et Nováková, 2010).

2 Vědecké hypotézy a cíle práce

2.1 Vědecké hypotézy:

V této diplomové práci se vychází z následujících hypotéz:

1. Rozdíly v expresi jablečných izoalergenů Mal d 1 u plodů z obdobně osluněných částí koruny nejsou mezi jednotlivými plody statisticky významné a lze tak navrhnout spolehlivý metodický postup přípravy směšného vzorku.
2. Sekvenačními analýzami lze prokázat, že neexistují rozdíly u studovaných izoform Mal d 1 mezi zahraničními odrůdami a odrůdami vyšlechtěnými v České republice.
3. Skladování plodů v chladicím boxu s neřízenou atmosférou zvýší intenzitu exprese izoalergenů ve slupce i v dužnině plodů.

2.2 Cíle práce:

Z uvedených hypotéz vyplývají následující cíle práce:

- a. Získat kolekci plodů alespoň 10 odrůd jabloní, které byly vypěstovány v identických agrotechnických podmínkách experimentálních výsadeb VŠÚO Holovousy s.r.o.
- b. Optimalizovat metodický postup přípravy směšného vzorku slupky a dužniny s cílem spolehlivé reprezentace hodnocené odrůdy.
- c. Pomocí kvantitativní PCR stanovit relativní expresi vybraných izoform ve slupce i dužnině plodů okamžitě po sklizni a po skladování v chladicím boxu po dobu 12 týdnů.
- d. Provést statistické vyhodnocení výsledků zohledňující vliv odrůdy, hodnocené části plodu a skladování na expresi Mal d 1 izoalergenů.

3 Literární rešerše

3.1 Jabloň domácí (*Malus x domestica* Borkh.)

Rod *Malus* patří do řádu růžokvětých (*Rosales*), čeledi růžovitých (*Rosaceae*) a podčeledi jabloňovitých (*Maloideae*). Celkově rod *Malus* čítá asi 35 druhů opadavých, často okrasných stromů nebo statných keřů rostoucích v lesích a křovinách v Evropě, Asii a Severní Americe. Jsou to dřeviny světlomilné, ne příliš náročné na půdu (Brickell, 2008; Koblížek 2006).

Malus x domestica Borkh je v Evropě velmi rozšířená dřevina, řadí se sem všechny kulturní odrůdy rodu *Malus*. Jedná se o zahradní hybrid, který vznikl kombinací několika evropských a asijských druhů (Coombes et al., 1996). Pěstuje se již od pradávna pro své jedlé plody a v současné době je *Malus x domestica* hojně rozšířena v mírném pásu Eurasie a Severní Ameriky, kde je často pěstována pro komerční účely. Existuje asi 10 000 kultivarů (odrůd), z toho jen v ČR asi 1500 (Koblížek, 2006). Jiný zdroj uvádí nižší množství známých odrůd, a to něco přes 7 500 (Pareek et al., 2016). Toto číslo ale není příliš zásadní, protože se neustále mění, vlivem registrace nově šlechtěných odrůd a zánikem těch starých, již nevyhovujících. Komerčním pěstováním se celkový vzhled jabloní značně změnil z důvodu snahy dosáhnout co největšího výnosu plodů na co nejmenší ploše sadu. Původní habitus dosahoval výšky kolem 10 m a měl široce rozvětvený tvar (Koblížek, 2006), takové jabloně již v dnešních sadech stěží nalezneme. Pro žádoucí nízký tvar stromů se využívá slabě rostoucích podnoží a celkový habitus stromů je především v konvenčním pěstování značně ovlivněn lidskou činností.

Listy jabloně domácí jsou vejčité až široce eliptické, až 12 cm dlouhé a 7,5 cm široké, zubaté, žlutavě zelené, později na líci tmavozelené, obvykle pýřité, alespoň na rubu. Kůra je šedohnědá až purpurově hnědá a loupe se v malých tenkých plátcích. Oboupohlavné květy jsou až 5 cm široké, bílé s růžovým zbarvením, s pěti korunními lístky, rodí se v chomáčcích na konci jara. Plody jsou rozmanité, kulovité, sladké až kyselé, jedlé, v průměru až 10 cm i více, různě zbarvené, často zelené, žluté, načervenalé i úplně do červena (Coombes et al., 1996).

Jabloním se dobře daří na půdách hlubokých, středně těžkých, hlinitých až jílovitohlinitých. V příliš lehkých půdách vyžadují závlahu. Optimální podmínky pro pěstování jsou u nás v nadmořské výšce 200-350 m, s průměrnou roční teplotou nad 7,5 °C a s ročním úhrnem srážek 500-800 mm. Pěstování je však možné i ve vyšších polohách. Pěstované odrůdy jabloní jsou cizosprašné. Většina odrůd je diploidní a jsou dobými opylovači (mají dobře klíčivý

pyl). Existují ale i triploidní odrůdy, jako je např. Jonagold nebo Booskopské červené (Dlouhá et al., 1991).

V Evropě se množství zkonsumovaných jablek pohybuje mezi 20–25 kg na obyvatele za rok, což je celkem více než 10 milionů metrických tun. Mezi 6 nejčastějších odrůd, které tvoří 79 % podíl na trhu, patří Golden Delicious, Jonagold, Red Delicious, Gala, Elstar a Granny Smith (Cook, 2003).

3.1.1 Růst a zrání jablečných plodů

Růst plodů začíná z botanického hlediska vytvořením zygoty a končí dozráváním semen. Minerální živiny pro správný růst a vývoj jsou do pletiv semen a plodů transportovány prostřednictvím asimilátů na základě koncentračního spádu, který je řízen fytohormony. Plody jabloní rostou po celou dobu vegetace poměrně stejnoměrně. Zvětšování semeníku je spojeno s dělením a prodlužováním buněk a se zvětšováním mezibuněčných prostorů. Nejintenzivnějším obdobím růstu je konec května a červen, kdy se v plodech rychle dělí buňky. Koncem června a začátkem července se již buňky přestávají dělit a silně se zvětšuje jejich objem, převažuje prodlužování buněk nad dělením (Dvořák, 1987; Procházka et al., 1998). Uprostřed léta výrazně klesá transport auxinů do rostoucích orgánů jabloně, a proto v této době dochází k opadu plodů, pokud nejsou dostatečně zásobovány hormony z listů a kořenů. Postřik listů a plodů roztoky alfanaftyloctové a giberelové kyseliny v koncentraci 100 mg l⁻¹ výrazně podporuje udržení plodů. Současně s asimiláty se v dospívajících semenech a plodech hromadí také inhibiční látky, jako je např. kyselina abscisová (ABA), která společně s dalšími látkami zavádí především ve druhé polovině vegetace výrazné inhibice v semenech a plodech. ABA účinně reguluje průběh transpirace, omezuje vadnutí listů, opad květů a plodů. Její koncentrace se při nedostatku vody v rostlině zvyšuje. Dále také navozuje dormanci, brání klíčení semen a růstu embryí. Inhibuje syntézu hydrolytických enzymů, které se podílejí na přeměně zásobních látek v semenech (Procházka, 1998).

Procházka et al. (1998) uvádí, že malvice jabloně zvětší svůj objem během 20 týdnů 600krát. Růst plodů a zejména zrání je značně ovlivňováno prostředím a podnoží. (Dvořák, 1987). Koncem růstu a začátkem senescence dochází k procesu zrání (Pareek et al., 2016).

Zrání je velmi důležitý proces v životním cyklu plodů a také zásadní z pohledu konzumenta. Veškeré dospělé ovoce musí projít zráním, což je koordinovaný proces doprovázený mnohými změnami, jako jsou změny pigmentace chuti, aroma. Také se zvyšuje intenzita dýchání, produkce ethylenu, plody měknou a sládnou (mění se obsah cukru

a organických kyselin) (Pareek et al., 2016). Jedná se o kontrolovaný proces, během kterého je velmi důležitá komunikace mezi buňkami plodu, stejně jako vliv růstových regulátorů a signálů z vnějšího prostředí (Cruz-Hernández et Paredes-López, 2012). Biosyntéza fytohormonu ethylenu má vliv na následné měknutí plodů a jejich skladovatelnost (Sancho et al., 2006). Jablka řadíme mezi tzv. klimakterické plody, které se vyznačují právě zvýšenou produkcí ethylenu a vyšší mírou respirace během zrání (Pareek et al., 2016).

Z genetického hlediska je zrání poměrně složitý proces, který ovlivňuje míra exprese mnoha specifických genů. Během zrání dochází ke změnám ve specifických molekulách mRNA a k *de novo* syntézám proteinů. Změny v expresi genů mohou být pozitivní i negativní a týkají se genů obsažených v jádře i plastidech a exprese některých z nich může být vázána na zrání ovocných pletiv (Pareek et al., 2016). Změny v průběhu dozrávání tedy obecně zahrnují modifikaci struktury buněčných stěn, přeměnu škrobu na cukry, změny biosyntézy a akumulace pigmentu a zvýšení hladiny aromatických a těkavých látek (Seymour et al., 2013).

3.1.2 Chemické složení jablečných plodů

Chemické složení jablek velmi kolísá s rozmanitostí odrůd a podle klimatických, půdních, a také pěstitelských podmínek. Záleží přímo na zralosti plodů, jejich velikosti a také na způsobu uskladnění (Dvořák, 1987).

Nejvíce zastoupenou složkou jablečné dužniny tvoří samozřejmě voda. Její obsah se dle šťavnatosti pohybuje většinou mezi 79–91 % (Dvořák, 1987). Jedná se jak o vodu volnou, kterou lze odstranit sušením či odšťavněním, tak o vodu pevně vázanou na koloidní částičky plodů (Pareek et al., 2016).

Z výživového hlediska jsou nejzastoupenější makroživinou sacharidy, které jsou pro lidský organismus snadno vstřebatelné. V průběhu zrání jejich obsah velmi kolísá. Jedná se hlavně o monosacharidy, fruktózu, sacharózu a glukózu (Dvořák, 1987).

Hodnota pH jablečných plodů se pohybuje v rozmezí 2,5-5. Kyseliny zastupuje nejvíce kyselina jablečná a citrónová, dále v menší míře kyselina salicylová a šťavelová. Jablka jsou bohatá na minerální látky, které kyselost naopak regulují a mají pro lidský organismus velký význam. Jedná se především o K_2O , Na_2O , CaO , MgO , F_2O_3 a P_2O . Z dalších látek můžeme jmenovat např. pektiny, třísloviny nebo celulózu. Chuťové vlastnosti doplňuje také vůně jablek, kterou způsobují především estery kyselin, aldehydy a silice (Dvořák, 1987).

Dále jsou v jablkách obsaženy enzymy, které pozitivně působí na lidské trávení, a také významné vitamíny. Nejvíce je zastoupen vitamín C (kyselina askorbová). Dvořák (1987) uvádí obsah vitamínu C v rozmezí 1,5 – 50 mg ve 100 g čerstvé dužniny. Samozřejmě záleží na konkrétní odrůdě, ale i např. na délce skladování, proto je rozmezí obsahu vitamínu C tak vysoké. Obecně můžeme říci, že kyselejší plody obsahují vitamínu C více. V menší míře jablka obsahují vitaminy A, B₁ a B₂.

Je známo, že ve slupce je daleko větší zastoupení prospěšných minerálů a vitamínů než v dužnině, a proto z výživového hlediska není vhodné jablka loupát. Existují ale také důvody k odstranění jablečné slupky z důvodu většího zastoupení reziduí pesticidů či alergenů. Slupka je také bohatým zdrojem sloučenin, které jsou silnými antioxidanty, jako jsou antokyany, chitosany a flavonoly, jejichž příjem v lidské stravě je často spojován s nižším výskytem rakoviny a srdečního onemocnění (Gallus et al., 2005).

3.2 Exprese genu

Dle Rozsypala a kol. (1983) expresí genu rozumíme vyjádření genetické informace genu v primární struktuře a funkci polypeptidu (v případě strukturního genu), v primární struktuře a funkci RNA určené k translaci (v případě genu pro RNA) nebo vyjádření regulační oblasti v jejich činnosti a funkci.

Expresi genu je třeba chápat jako proces, který u strukturního genu zahrnuje tyto dílčí děje: transkripci, popřípadě posttranskripční úpravy, translaci, popřípadě posttranslační úpravy, účast translačního produktu genu na tvorbě vysokomolekulárních struktur a jeho biologickou funkci (např. enzymovou, hormonální, imunologickou aj.). U genu pro RNA zahrnuje pouze transkripci, případně posttranskripční úpravy, kterými vznikají funkční typy RNA (tRNA, rRNA aj.) a tvorbou vysokomolekulárních struktur, což se týká účasti rRNA na samosestavování ribozómů. Všechny tyto procesy představují různé úrovně exprese genu. Regulační oblast se vyjádří zastavením nebo zahájením určitého molekulárního děje (např. transkripce) tím, že se naváže specifický protein (proteiny) nebo se z ní uvolní (Rozsypal a kol., 1983).

Během transkripce je informace obsažená v genové DNA zkopírována do molekuly RNA. Ta je sestavována postupně podle jednoho z vláken dvouvláknové DNA. Při tomto procesu se klasicky párují báze nukleotidů A (adenin) – T (thymin) a G (guanin) – C (cytosin), s tím rozdílem, že na straně RNA je T nahrazen U (uracil). Výsledný transkript se po přepisu oddělí od templátového vlákna DNA a často ještě podléhá posttranskripčním úpravám.

Finálním výsledkem je mediátorová (messenger) RNA, neboli mRNA, která obsahuje veškerou informaci potřebnou pro syntézu polypeptidu (Snustad et Simmons et Relichová, 2017).

Translací rozumíme druhou fázi genové exprese, kde působí genová mRNA jako templát pro syntézu polypeptidu. Triplet sousedních nukleotidů tvoří kodon, který určuje začlenění konkrétní aminokyseliny do polypeptidového řetězce. Když je polypeptid dokončen, disociuje od mRNA a sbaluje se do přesného trojrozměrného tvaru a pak plní svoji úlohu v buňce (Snustad et Simmons et Relichová, 2017).

3.3 Imunitní reakce člověka a alergie

Imunita znamená zjednodušeně odolnost vůči infekcím. Jako obranné opatření organismu vzniká imunitní reakce, na jejímž vzniku se podílejí 3 typy buněk: T-lymfocyty, B-lymfocyty a makrofágy (Mačák et al., 2012).

Látka, vyvolávající imunitní reakci se nazývá antigen. Obvykle se jedná o chemické látky s velkou molekulou, často cizorodé bílkoviny, polysacharidy, ale i lipidy a lipoproteiny. Rozeznáváme exoantigeny, které se do organismu dostávají z vnějšího prostředí a autoantigeny, které pocházejí z vlastního organismu. Organismus se antigenů zbavuje nespecifickou nebo specifickou imunitní odpovědí. Specifická imunitní odpověď je zprostředkována jednak protilátkami, které tvoří plazmatické buňky a různé typy B-lymfocytů – humorální imunita, jednak buňkami, které protilátky netvoří a patří k T-řadě lymfocytů – celulární imunita (Mačák et al., 2012).

B-lymfocyty vytvářejí 5 hlavních tříd imunoglobulínů: IgG, IgA, IgM, IgD a IgE (seřazeny podle jejich sestupné koncentrace v séru) (Mačák et al., 2012).

Při opakovaném setkání organismu s tímž antigenem probíhají imunitní reakce rychleji než při prvním setkání (anamnestická reakce). Lymfocyty mají tzv. imunologickou paměť, díky které je organismus na antigen připraven. Reakce na antigen může být v některých případech nepřiměřeně silná, čímž vzniká alergie (Mačák et al., 2012). Za určitých okolností může imunitní reakce vyvolat více či méně závažné poškození organismu. V takových případech hovoříme o imunopatologických reakcích, jako je alergie, hypersenzitivita nebo autoimunitní reakce (Hořejší et al., 2013).

Alergie se tedy projevuje imunopatologickou reakcí, která je výsledkem neadekvátní reakce na neškodné vnější antigeny (Hořejší et al., 2013). Je zprostředkována imunoglobulinem E (IgE), jedná se vlastně o alergen specifické protilátky (Liška, 2012). Protilátky se vážou na

konkrétní oblasti antigenu, tzv. epitopy. Alergičtí pacienti mají IgE protilátky, které jsou směřovány proti více různým konformacím (izoformám) potravinových alergenů (Laffer et al., 1996). U potravinových alergií pravděpodobně souvisí vyšší poměr alergen specifických protilátek IgG₄ oproti IgE s vyšší potravinovou tolerancí, protože IgG₄ potenciálně blokuje vazbu IgE na potravinové alergen (Geroldinger-Simic et al., 2011).

3.3.1 Typy imunopatologických reakcí

Hořejší et al. (2013) i Mačák et al. (2012) dělí imunopatologické reakce podle klasifikace zavedené Coombsem a Gelllem do čtyř základních typů, které však dle Hořejšího et al. (2013) nepostihují všechny dnes známé imunopatologické reakce. Jedná se o anafylaktický, cytotoxický, komplexový typ a buněčnou imunitní odpověď. První tři jsou zprostředkovány protilátkami (humorální imunita) a reakce na alergen nastává rychle. Čtvrtý typ je zprostředkován lymfocyty, které protilátky netvoří a reakce je pozdní.

3.3.1.1 Anafylaktický typ alergie (reakce I. typu)

Anafylaktický I. typ alergie se projevuje buď mírnější lokální formou (na kůži nebo na sliznicích dýchacího a zažívacího systému) nebo ve formě celkové bouřlivé reakce organismu, která může být způsobena i velmi malým množstvím alergenů a může končit i smrtí. V tomto případě se jedná o závažnou systémovou reakci, tzv. anafylaktický šok. Mezi symptomy anafylaktického šoku patří zvracení, průjmy, pokles krevního tlaku, někdy dokonce srdeční zástava. Podstatou anafylaktické reakce je nadměrná tvorba IgE v B-lymfocytech (Mačák et al., 2012). Tato reakce se označuje také jako přecitlivělost časného typu, neboť k reakci dochází velmi rychle po kontaktu s alergenem (během několika minut). Jde o jediný typ imunopatologické reakce, který se nevyskytuje u autoimunitních onemocnění. Jedinci, kteří na alergen reagují produkcí IgE jsou nazýváni atopici, a proto je alergie I. typu někdy nazývána také atopie. (Hořejší et al., 2013).

Často vyskytující se alergie na rostlinné potraviny, zkříženě reagující s alergií na březový pyl (alergen Bet v 1), se projevují většinou pouze mírnými lokálními projevy v okolí dutiny ústní nebo na sliznici, které jsou nazývány jako ústní alergický syndrom (OAS) (Bolhaar et al., 2005). OAS je typickým příkladem lokální formy této imunopatologické reakce zprostředkované protilátkami IgE. Při silnější alergii se po konzumaci alergenních rostlinných potravin mohou objevit i závažnější systémové reakce jako je kopřivka, alergické astma nebo již zmíněný anafylaktický šok (Geroldinger-Simic et al., 2011).

Při prvním setkání s antigenem (alergenem) dochází k senzibilizaci pacienta. B-lymfocyty sekretují protilátky IgE. Protilátky IgE vytvořené plazmatickou buňkou se váží na IgE receptory žírných buněk (mastocytů) a bazofylů. Žírné buňky se nachází v celém organismu, především ale ve sliznicích a v kůži. Obsahují v plazmě množství granulí velmi aktivních látek. Po opakovaném setkání s multivalentním alergenem může dojít k přemostění molekul IgE a tím k agregaci receptorů těchto buněk. Při reakci protilátek navázaných na povrchu buněk s antigenem dochází k degranulaci aktivních látek žírných buněk a jejich uvolnění do krevního oběhu. Uvolňují se nejprve mediátory jako je histamin či heparin (1. fáze alergické reakce), následně dochází k tvorbě a sekreci metabolitů kyseliny arachidonové, jako jsou např. leukotrieny (2. fáze alergické reakce). Tyto látky způsobují spasmus hladké svaloviny bronchů, což může vést k dušnosti, protože se do plic dostává málo vzduchu. Dále dochází ke zvýšené propustnosti cév, především kapilár a vzniku edému (Hořejší et al., 2013; Mačák et al., 2012).

Anafylaktický šok tedy nastává v případě, že alergen způsobí hromadnou degranulaci bazofylů a mastocytů, poté, co je ve větším množství roznesen krví do celého organismu. Uvolněné mediátory způsobí zvýšenou permeabilitu cév, vedoucí k poklesu krevního tlaku se všemi důsledky (otok plic, ischemie mozku a v konečné fázi multiorgánové selhání) (Hořejší et al., 2013).

Současná strategie prevence alergií spočívá ve vyhýbání se problematickým alergenním potravinám s využitím záchranných léků, v případě nutnosti. Efekt na kvalitu života pacientů je evidentní, a proto se ti s mírnějšími lokálními projevy někdy rozhodnou, i přes svoji alergii např. na jablka, tyto potraviny konzumovat a riskovat tak zhoršení své alergie. Většina pacientů se alergenům z mnoha druhů ovoce a zeleniny vyhýbá, čímž se ochuzují o důležitý zdroj vitaminů, minerálů a vlákniny (Bolhaar et al., 2005).

3.3.1.2 Další typy imunopatologických reakcí

Druhým typem imunopatologické reakce je **cytotoxická imunitní odpověď**, jejíž podstatou je poškození buněk protilátkami zaměřenými proti antigenům, nacházejícím se na jejich povrchu. K tomu, aby protilátka mohla cílovou buňku zničit, potřebuje spoluúčast komplementu, který je obsažen v krvi a v místě navázání protilátky se aktivuje, aby mohl cílové buňky zničit. Protilátky tedy pouze označí místo, které má být zničeno. To se může stát např. při podání krve inkompatibilní krve pacientovi nebo u autoimunitních anémií. Některé

komplementy mohou také vazbou na protilátku např. usnadňovat fagocytózu makrofágy (Mačák et al., 2012).

U **komplexové imunitní odpovědi** vznikají při spojení protilátky s antigenem imunitní komplexy, které jsou ale obvykle z oběhu rychle vychytány systémem mononukleárních fagocytů. Někdy ale mohou imunokomplexy utkvět ve stěnách cév, kde dojde k aktivaci komplementu, což může mít za následek nahromadění neutrofilních leukocytů v tomto místě. To je typický příklad akutního zánětu (Mačák et al., 2012).

Posledím, čtvrtým typem imunopatologické reakce je tzv. **buněčná imunitní odpověď**. Jedná se o reakci oddáleného typu, která se také někdy označuje jako DTH (delayed type hypersensitivity). Lokální reakce je způsobena zánětlivou reakcí závislou na TH1-lymfocytech, monocytech a makrofázích. Alergenem jsou bakterie, plísňe, viry a jejich produkty (Hořejší et al., 2013).

3.4 Alergeny

Alergen je vlastně antigen vyvolávající alergickou reakci (Mačák et al., 2012).

Do organismu se mohou alergeny dostat vdechnutím, požitím nebo kontaktem a proniknutím do kůže, takže se podle působení na organismus a podle reakce rozlišují na inhalační, kontaktní a potravinové (Novák et Nováková, 2010).

3.4.1 Inhalační alergeny

Mezi inhalační alergeny řadíme především pylové alergeny. V severní a střední Evropě je nejčastějším pylovým alergenem Bet v 1, pocházející z pylu břízy. Mnoho lidí trpí zkříženou alergií na pyl a zároveň na některé potraviny, jedná se o tzv. pylově potravinový syndrom (PFS), který se obvykle projevuje mírnými lokálními symptomy na sliznici dutiny ústní či v jejím okolí jako tzv. ústní alergický syndrom (OAS) (Rashid et al., 2011). Pyl břízy je jednou z nejčastějších příčin vzniku alergické rýmy a astmatu v severní a střední Evropě a Severní Americe (Geroldinger-Simic et al., 2011).

3.4.2 Kontaktní alergeny

Kontaktní alergeny vyvolávají alergickou reakci již při kontaktu s kůží, často se jedná o alergie na latex různých rostlin. I u této kategorie alergenů se může objevit zkřížená reaktivita protilátek, které zároveň reagují na potravinové alergeny. Tzv. latexo-ovocný syndrom (LFS) je další známou chorobou projevující se OAS (Kondo et Urisu, 2009).

3.4.3 Potravinové alergen

Vzhledem ke klinickým projevům a základním imunologickým mechanismům alergie na potraviny je třeba rozlišovat 2 formy potravinové alergie. U potravinových alergií 1. třídy nastává proces senzibilizace v trávicím traktu. Alergeny projevující se alergií 1. třídy bývají rezistentní vůči žaludečním trávicím enzymům. Řadíme sem alergen jako je kravské mléko, slepičí vejce nebo luštěniny. U dospělých se projevuje zřídka, u dětí může vyvolat atopický syndrom (Breiteneder et Ebner, 2000).

Potravinová alergie 2. třídy se častěji vyskytuje u dospělých, a to především jako následek alergické senzibilizace na inhalační alergen. Imunologickým základem pro tyto potravinové alergie je zkřížená reaktivita IgE protilátek, která se může nebo nemusí klinicky projevit (Ebner et al., 1995). Diagnóza je zde většinou složitější než u alergií 1. třídy, protože u alergenů 2. třídy se většina rostlinných proteinů složitěji extrahuje a je vysoce labilní. Tomuto typu potravinové alergie je poslední dobou věnována vysoká pozornost, protože výskyt zkříženě působících inhalačních alergií neustále vzrůstá. Projevuje se převážně symptomy jako je mírný OAS, ale může dojít i k závažnému anafylaktickému šoku. (Breiteneder et Ebner, 2000).

Konkrétní potravinové alergen, především jablečné, budou podrobněji rozebrány v následujících kapitolách.

3.4.4 Názvosloví alergenů

Názvosloví alergenů se tvoří dle latinského názvu jeho původce a na konci je každý alergen označen číslicí, která udává, o kolikátý gen daného druhu se jedná. První část tvoří první 3 písmena z rodového jména, druhou první písmeno jména druhového. Mal d 1 je tedy 1. alergen z *Malus x domestica* Borkh (Novák et Nováková, 2010).

3.4.5 Zkřížené alergie

Zkřížené alergie ve svých studiích podrobněji rozebírají Fernández-Rivas et al. (2006), Ebner et al. (1995) a další.

Jak již bylo uvedeno, hlavní jablečný alergen Mal d 1 je homologní s alergenem březového pylu Bet v 1 a mnoho alergických pacientů reaguje na oba tyto alergen. Častý výskyt zvýšené citlivosti na oba zmíněné alergen je především v oblastech severní a střední Evropy, kde se břízy hojně vyskytují. Odtud také pocházejí první klinicky popsané alergie na

jablka. Můžeme tedy hovořit o tzv. zkřížených alergiích (Fernández-Rivas et al., 2006). Také v Severní Americe je mnoho pacientů alergických na březový pyl, kteří posléze zjistili intoleranci na různé druhy ovoce a zeleniny (Ballmer-Weber, 2015). Laffer et al. (1996) uvádí, že alergen Bet v 1 a homologní proteiny patří mezi hlavní zkříženě reagující alergeny pro více než 95 % jedinců alergických na pyl, ovoce nebo zeleninu. Zkřížená reaktivita mezi těmito alergeny může být vysvětlena téměř shodnou molekulovou strukturou homologních alergenů (Ahammer et al., 2017).

U alergenů Mal d 3, který se rovněž podílí na klinickém projevu alergie na jablka, byla zjištěna spoulnreakce s alergeny pylu břízy, z pylu černobýlu (*Artemisia vulgaris*) a platanu (*Platanus acerifolia*) (Fernández-Rivas et al., 2006).

Podle Fernández-Rivas et al. (2006) se alergické reakce na pyl břízy vyskytují celkově s větší frekvencí než na jablka. Podle Geroldinger-Simic et al. (2011) trpí více než 70 % pacientů alergických na březový pyl zkříženou alergií na jablka, způsobenou zkříženou reakcí IgE protilátek na Bet v 1 a Mal d 1. Tato zkřížená alergie je tedy velmi častá a většinou trvalá. Sancho et al. (2006) uvádí výčet dalších rostlinných potravin problematických pro pacienty s předchozí zvýšenou citlivostí na pyl, především pyl břízy. Z ovoce jsou zde kromě jablek uvedeny také hrušky, meruňky, třešně a švestky, ze zeleniny celer, brambory a mrkev a z ořechů lískový a vlašský. Vzhledem k vhodným podmínkám pro pěstování těchto plodin jsou v Evropě tyto rostlinné potraviny konzumovány velmi často. Tyto potraviny řadíme mezi tzv. birch pollen-related foods, řadí se sem výše jmenované a mnohé další potraviny rostlinného původu, především mnoho druhů ovoce a zeleniny. Obsahují proteiny vysoce homologní s pylovými alergeny, a proto jsou považovány za potenciální hrozbu pro pacienty s pylovou alergií (Ebner et al., 1995). Nejčastější zkříženě alergenní potravinou, kterou řadíme mezi birch pollen-related foods jsou právě jablka (Geroldinger-Simic et al., 2011). Frekvence výskytu alergie na pyl v posledních letech silně vzrůstá (Beuning et al., 2004). Tyto zkříženě reagující potravinové alergeny mimo jiné u pacientů často zhoršují nebo vyvolávají atopickou dermatitidu (Wittmann et al., 1999). Mohou se stát pro pacienty požitelnými po tepelné úpravě, ale jsou i takové, které jsou k varu rezistentní (Kondo et al., 2009).

V oblastech, kde se březový pyl nevyskytuje, např. ve Španělsku, je ovocem nejčastěji vyvolávajícím alergické reakce broskve, hned za ní následuje jablko. U pacientů ze Španělska se alergie na pyl projevuje o 8 až 9 % méně než u pacientů z Nizozemí, Rakouska a Itálie, kde se vyskytuje především pyl břízy, zatímco ve Španělsku převažuje pyl trav. Bylo zjištěno, že Španělé reagují na alergeny Mal d 1 nebo Bet v 1 méně než pacienti ze zbylých 3 zemí. Naopak

nejvíce protilátek IgE vytváří Španěle proti alergenu Mal d 3, který je dáván také do souvislosti se zdejším nejproblematictějším alergenem broskve Pru p 3 (Fernández-Rivas et al., 2006).

Alergie na jablka se může zkříženě projevit např. společně s alergií na broskve (Španělsko) nebo na lískové ořechy (Nizozemí, Rakousko) (Fernández-Rivas et al., 2006). Frekvence výskytu alergií na rostlinné potraviny v různých částech Evropy tedy pravděpodobně souvisí s výskytem alergenních rostlin, a to i těch, které reagují zkříženě, jako tzv. zkřížené alergeny.

3.4.5.1 Pylově potravinový syndrom

Podle Fernández-Rivas et al. (2006), Sancho et al. (2006), Kondo et Urisu (2009) a dalších nemusí být alergie na rostlinné potraviny výsledkem čistě přímé citlivosti na dané potravinové alergeny, ale mohou být také důsledkem primární citlivosti na inhalační či jiné alergeny (nepř. pyl nebo latex).

Pylově potravinový syndrom neboli Pollen-food syndrome (PFS) se vyskytuje u lidí alergických na pyl a zároveň trpících alergií na některé druhy ovoce nebo zeleniny. Jiný termín používaný pro tento syndrom je ústní alergický syndrom (OAS), ale ne všechny symptomy PFS se musí projevit jako OAS a OAS mohou také způsobovat jiné syndromy. Například latexo-ovocný syndrom (LFS) je další známou chorobou projevující se OAS (Kondo et Urisu, 2009).

PFS vzniká při zvýšené citlivosti vůči panalergenům. Panalergeny obsahují strukturně stejné molekuly vyskytující se jak v pylu, tak v některých jedlých rostlinných produktech. Mezi alergenní molekuly zodpovědné za PFS řadíme 3 skupiny proteinů: Bet v 1 / PR-10, profiliny a nsLTP. Typické pro PFS jsou alergické symptomy projevující se na ústní dutině po kontaktu s ovocem z čeledi Rosaceae (Rashid et al., 2011). Jak již bylo uvedeno, mnoho lidí alergických na jablka, má současně alergii na pyl břízy, z důvodu zkřížené reakce IgE protilátek mezi homologními alergeny Mal d 1 a Bet v 1 (Bolhaar et al., 2005). Můžeme tedy tyto zkřížené alergie nazvat jako pylově potravinový syndrom (Kondo et Urisu, 2009). Z diagnostického a terapeutického hlediska je důležité rozeznávat zkříženě reagující skupiny alergenů a případně aplikovat „zkříženou terapii“ (Breiteneder et Ebner, 2000).

Rashid et al. (2011) a Fernández-Rivas et al. (2006) se shodují, že citlivost pacientů s PFS na jednotlivé panalergeny je v rámci Evropy geograficky odlišná. PR-10 (pathogenesis-related) (Bet v 1) proteiny jsou dominantními alergeny v severní Evropě, nsLTP (nonspecific lipid transfer protein) převažují zase na jihu. Klinické projevy PFS se liší v závislosti na

konkrétním alergenem. Někteří alergici mohou dokonce reagovat zvýšenou citlivostí na více těchto alergenů najednou.

U lidí alergických na profiliny je často škála potravin způsobující problémy širší, může se jednat např. o alergie na citrusy, banány, papáju, melouny nebo rajčata (Asero et al., 2008). V Británii byla potvrzena souvislost PFS především se zvýšenou citlivostí na PR-10 proteiny, v druhé řadě na profiliny a u nsLTP byla souvislost nejistá (Rashid et al., 2011).

3.4.6 Jablečné alergeny

3.4.6.1 Typy jablečných alergenů

Nejvýznamnějším jablečným alergenem je Mal d 1, protein o molekulové hmotnosti 17,5 kDa, který zkříženě reaguje s homologním senzibilizujícím alergenem pylu břízy Bet v 1 (Gao et al., 2005; Ahammer et al., 2017). Rozdílná alergenicita jablečných plodů závisí především na rozdílné expresi tohoto hlavního alergenem (Son et al., 1999). Tento alergen je termolabilní, vařením tedy můžeme jeho aktivitu potlačit. Dále je také náchylný k oxidaci a proteolytickému trávení (Sancho et al., 2006). Dle Bolhaar et al. (2005) nepřežije tento labilní alergen většinu procesů zpracování jako je var či výroba šťávy, a proto se alergie projevuje převážně po konzumaci čerstvého, případně skladovaného, nezpracovaného ovoce. Alergen Mal d 1 se vyskytuje jak ve slupce, tak i v dužnině. Vlivem skladování na míru jeho exprese či porovnáním míry exprese ve slupce a dužnině se budeme dále zabývat.

Mal d 1 se vyskytuje ve více možných izoformách, které jsou kódovány geny skupiny Ypr 10. Promotorovou aktivitou tohoto genu a jeho indukovatelností ve svém produktu Mal d 1 se zabýval Pühringer et al. (2000), který se zabýval studiem vlivu stresu na expresi Mal d 1.

Struktura Mal d 1 byla analyzována pomocí 3D NMR spektroskopie. Tento protein je složen ze sedmivláknového antiparalelního β -listu tří α -helixů, které tvoří velkou vnitřní dutinu. Tato struktura je podobná Bet v 1 a dalším zříženě reagujícím potravinovým alergenům (Ahammer et al., 2017).

Mezi další jablečné alergeny patří také Mal d 2 (TLP = Thaumatin like protein), Mal d 3 (nsLTP = Nonspecific lipid transfer protein) a Mal d 4 (profilin). TLP a nsLTP jsou třídy rostlinných alergenů vyznačující se velkou stabilitou. Mají velmi kompaktní strukturu stabilizovanou disulfidickými můstky (Fernández-Rivas et al., 2006). LTP proteiny (Mal d 3) jsou na rozdíl od Mal d 1 odolné proteolytickému trávení (Asero et al., 2000). Profilin je

polypeptid, patřící mezi tzv. panalergeny, který je přítomný v pylu, ale i v různých druzích ovoce a zeleniny (Mačák et al., 2012).

Většina zmíněných jablečných alergenů je homologní s tzv. PR (pathogenesis-related) proteiny, jejichž vznik je indukován patogeny, zraněním nebo dalšími stresy z prostředí. Nepatří sem pouze alergen Mal d 4, který řadíme mezi profiliny. V roce 1994 vznikla nomenklatura sjednocující PR proteiny do skupin na základě sekvence aminokyselin nebo jejich enzymatické či biologické aktivity (Van Loon et al., 1994). Seznam PR proteinů byl později rozšířen a klasifikován do 14 skupin (PR-1 – PR-14) (Breiteneder et Ebner, 2000).

TLP proteiny nacházející se např. v třešních nebo jablkách (Mal d 2) jsou homologní se skupinou PR-5, Mal d 1 (Bet v 1) jsou homologní se skupinou PR-10 a LTP nacházející se v jablkách (Mal d 3), broskvích (Pru p 3) a dalším ovoci nebo v obilovinách jsou homologní se skupinou PR-14 (Breiteneder et Ebner, 2000).

Dle Fernández-Rivas et al. (2006) jsou za klinický projev alergie na jablka zodpovědné protilátky IgE reagující především na alergeny Mal d 1 a Mal d 3. Zvýšená citlivost na Mal d 3 v této studii nesla riziko závažných systémových alergických reakcí. Alergen Mal d 3 se v tržních jablečných plodech vyskytuje v menší míře (Sancho et al., 2006).

3.4.6.2 Izoformy alergenu Mal d 1

Alergen Mal d 1 můžeme podle tvaru dále rozdělit na 4 skupiny (Mal d 1.01/Mal d 1a až Mal d 1.04/Mal d 1d), obsahující 18 izoform tohoto alergenu. Expres jednotlivých izoalergenů může být vlivem mnoha faktorů značně variabilní. Také vazebná kapacita jednotlivých izoform Mal d 1 na molekuly IgE se může lišit (Sancho et al., 2006). Podle Son et al. (1999) imunologické vyšetření přirozeně se vyskytujících izoform Mal d 1 odhalilo pouze malé rozdíly v jejich IgE vazebné kapacitě a odlišnosti projevů jsou převážně způsobeny rozdílnou mírou exprese Mal d 1. Marzban et al. (2005) uvádí, že při vyšetřování alergenicity izoform Mal d 1.01 a Mal d 1.02 ukázala vyšší IgE vazebnou kapacitu pro Mal d 1.01.

Při pozorování exprese tří hlavních izoform Mal d 1 v průběhu skladování pomocí qRT-PCR byla nejvíce exprimována izoforma Mal d 1.02 (Sancho et al., 2006; Marzban et al., 2005). Mal d 1.02 byla následována téměř desetkrát méně exprimovanou izoformou alergenu Mal d 1.01 a exprese Mal d 1.03 byla výrazně nejnižší (Marzban et al., 2005).

Při studii 3D struktury Mal d 1 a vazebných míst (epitopů) IgE, která je podobná struktuře Bet v 1 a dalších PR-10 proteinů, byly pomocí NMR spektroskopie zkoumány

klonované izoformy Mal d 1.0101 z odrůdy Granny Smith a Mal d 1.0102 z Golden Delicious (Ahammer et al., 2017). Jde o první izoformy, u kterých byla určena sekvence DNA, která je identická s Bet v 1 na úrovni aminokyselin (Vanek-Krebitz et al., 1995).

3.4.6.3 Projevy alergie na jablka

Alergické reakce na hlavní jablečný alergen Mal d 1 často vycházejí z počáteční citlivosti na alergen pylu břízy Bet v 1, což je způsobeno již zmíněnou zkříženou imunitní reakcí Bet v 1-specifických IgE protilátek s Mal d 1 po konzumaci jablečných plodů (Ahammer et al., 2017). Někdy se ale u pacientů trpících alergií na pyl a vykazujících IgE reaktivitu na homologní potravinové alergeny (pollen-related allergens) nemusí po konzumaci těchto potravin projevit žádné klinické symptomy, což může být způsobeno již zmiňovaným vyšším obsahem IgG₄ protilátek, které blokují navázání IgE na potravinové alergeny, tzv. Bet v 1-related food allergens (Geroldinger-Simic et al., 2011).

Nejčastěji se objevující lokální symptom, OAS (Oral Allergy Syndrome) se projevuje orofaryngeálními projevy, nejčastěji na rtech, jazyku a na sliznici jícnu (Sancho et al., 2006). OAS se objevuje již během několika minut po konzumaci jablek. Poměrně často se také může objevit alergická rýma (Geroldinger-Simic et al., 2011). Fernández-Rivas et al. (2006) klasifikují symptomy, projevující se u alergických pacientů během konzumace jablečných plodů, do 2 skupin. Lokální symptomy, projevující se pouze na kůži a sliznici, a systémové, kam řadí kopřivku či anfykaxi, jejímž nejtěžším projevem je anafylaktický šok, který byl popsán v předchozí kapitole. Dle Kondo et Urisu (2009) symptomy OAS, způsobené protilátkami IgE, jsou lokalizovány na sliznici dutiny ústní a jsou také závislé na labilitě antigenu. OAS se proto objevuje v souvislosti s labilnějším a zároveň nejčastějším jablečným alergenem Mal d 1. Tento alergen se jeví jako problematický především v severní a střední Evropě. Naopak reakce na rizikovější Mal d 3 se více vyskytují spíše u jižněji žijících pacientů (Bolhaar et al., 2005). Anafylaktický šok byl popsán v předchozí podkapitole. Objevuje se častěji v souvislosti s reakcí na alergen Mal d 3 (LTP) (Asero et al., 2000). Závažný anafylaktický šok byl hlášen např. u pacientů s IgE proti LTP (Pru p 3) ve studii, týkající se výzkumu alergie na broskve u pacientů ze Španělska (Fernández-Rivas et al., 2005). U vzorku pacientů ze Španělska se byla zjištěna závažnější systémová alergická reakce s výrazně vyšší frekvencí než u pacientů Itálie, Rakouska a Nizozemí, i v případě jablečných alergenů (Fernández-Rivas et al., 2006). To vypovídá o skutečnosti, že na konkrétní alergeny mohou obyvatelé z různých částí Evropy reagovat jinak, což potvrzuje také Rashid et al. (2011) a další.

3.4.6.4 Stanovení exprese jablečných alergenů a jejich detekce

Expresi alergenů v jablečné dužnině či slupce lze stanovit z RNA, extrahované ze zmrzlých vzorků rostlinného materiálu, pomocí kvantitativní polymerázové řetězové reakce (qRT-PCR), která bude podrobněji rozebrána v následující kapitole. Touto metodou mohou být např. analyzovány různé míry projevu alergenů Mal d 1 způsobené regulací genové exprese na úrovni transkripce (Sancho et al., 2006).

Antigen je možné detekovat také pomocí imunologické testovací metody ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) s využitím monoklonální protilátky BIP-1. Tento test se ukázal jako účinný při stanovení hladiny Mal d 1 v jablečné dužnině (Sancho et al., 2006). Podle Laffer et al. (1996) byla charakterizována specifická monoklonální protilátka BIP-1 pro studium interakce mezi alergenem Bet v 1 a imunitním systémem člověka. U BIP-1 byla objevena zkřížená reaktivita s homologními alergeny srovnatelná s reaktivitou IgE protilátek alergických pacientů. Bylo tak prokázáno, že BIP-1 zkříženě reaguje také s Mal d 1.

3.4.6.5 Faktory ovlivňující míru exprese jablečných alergenů

Míra exprese alergenů může být ovlivněna více faktory, jako je odrůda, doba skladování či působení stresu. Odlišná míra exprese je evidentní také mezi jablečnou slupkou a dužninou (Fernández-Rivas et al., 2006; Sancho et al., 2006). Podle Sancho et al. (2006), Schmitz-Eiberger et Matthes (2011) a dalších nebyla míra exprese alergenů Mal d 1 ovlivněna stupněm zralosti při sklizni.

3.4.6.5.1 Odrůda

Jednotlivé odrůdy jablečných plodů se výrazně liší svojí alergenicitou. Znalost genetického základu těchto rozdílů by mohla vést k rozvoji šlechtění hypoalergenních odrůd (Gao et al., 2005). Díky znalosti míry alergenicity jednotlivých jablečných odrůd je také možná selekce odrůd méně alergenních (Bolhaar et al., 2005). Variabilní alergenita jednotlivých odrůd může být způsobena odlišnou mírou exprese některé z izoform alergenů Mal d 1. Je evidentní, že genetické faktory hrají významnou roli v alergenicitě jablek (Sancho et al., 2006). Podle několika studií se v jablkách vyskytují směsi izoform Mal d 1 a tyto izoformy nejsou odrůdově specifické (Marzban et al., 2005; Helsper et al., 2002; Son et al., 1999) a rozdíly mezi transkripty Mal d 1 jsou pozorovány v různých odrůdách. Nicméně, vzor exprese hlavních izoform Mal d 1 se zdá být podobný (Marzban et al., 2005).

Odlišnosti v alergenicitě odrůd byly zkoumány také pomocí vyšetřovací imunologické metody, kožního prick testu (SPT). Míra alergenicity u pacientů hodnocena SPT testem je značně individuální v závislosti na citlivosti pacienta. Pomocí SPT testu bylo testováno 21 odrůd skladovaných po dobu 6 měsíců při teplotě 2 °C na 9 pacientech. Vysoká alergenita byla pozorována u 7 odrůd, střední u 10 a malá u 4 odrůd. Jako vysoce alergenní odrůda byla vyhodnocena Golden Delicious, následovaná odrůdou Gala. Naopak Santana byla vyhodnocena jako odrůda vykazující nejnižší alergenitu ze zkoušených vzorků (Bolhaar et al., 2005).

3.4.6.5.2 Rozdíly v expresi alergenů mezi slupkou a dužninou

Směs izoform alergenů Mal d 1 se projevuje v jablečné slupce a dužnině odlišně, ale se stejným vzorcem exprese v různých odrůdách (Sancho et al., 2006). Ve slupce se alergeny exprimují ve větší míře než v dužnině, a proto je vhodné u citlivých jedinců slupku oloupat, přestože z výživového hlediska obsahuje více vitamínů, minerálů a antioxidantů. Na jablečnou slupku byla při kožním prick testu (SPT) zjištěna větší alergická reakce než na dužninu (Fernández-Rivas et al., 2006).

3.4.6.5.3 Skladování

Skldováním v řízené i neřízené atmosféře obecně dochází k vyšší expresi alergenů Mal d 1 (Beuning, et al., 2004; Sancho et al., 2006). Vliv různých podmínek skladování na expresi jablečných alergenů bude podrobněji rozebrán v kapitole věnující se skladování plodů.

3.4.6.5.4 Stres

Vyšší rostliny ve stresu akumulují výše zmíněné PR proteiny, které jsou homologní s většinou jablečných alergenů. PR proteiny jsou kódovány geny hostitelské rostliny a indukovány v případě patogeneze nebo v situacích s patogenezí souvisejících. Stresové podmínky jsou vyvolány klasickými patogeny nebo aplikací chemikálií, které napodobují efekt infekce nebo vyvolávají stres (Van Loon et al., 1994). Během logistického procesu cesty jablka od stromu ke spotřebiteli může být mnoha způsoby ovlivněn obsah PR proteinů v tomto ovoci. Vliv může mít způsob pěstování (organické vs. konvenční) s různou mírou napadení a frekvencí použití chemických ochranných prostředků, ale také způsob sklizně či přepravy a následné skladovací podmínky. To vše může potenciálně zvýšit stupeň alergenicity plodů (Bolhaar et al., 2005).

Abiotický a biotický stres působící na jabloně a jablka může mít efekt na výsledný projev alergenů Mal d 1. Různá rostlinná pletiva mohou na stresové podněty reagovat jinak a

Mal d 1 může být také pod kontrolou různých promotorů (Sancho et al., 2006). Kontrola exprese alergenu Mal d 1 (PR-10) a Mal d 3 (nsLTP/PR-14) se liší (Van Loon et al., 1994).

Bylo zjištěno, že biotický stres navyšuje expresi Mal d 1 také v listech. Virovou infekcí u transgenních rostlin tabáku byla silně indukována exprese transgenu Ypr10a, který kóduje alergen Mal d 1. Po ošetření houbovým elicitorem vzrostla exprese Mal d 1 v mladých listech tabáku i jabloně (Pühringer et al., 2000).

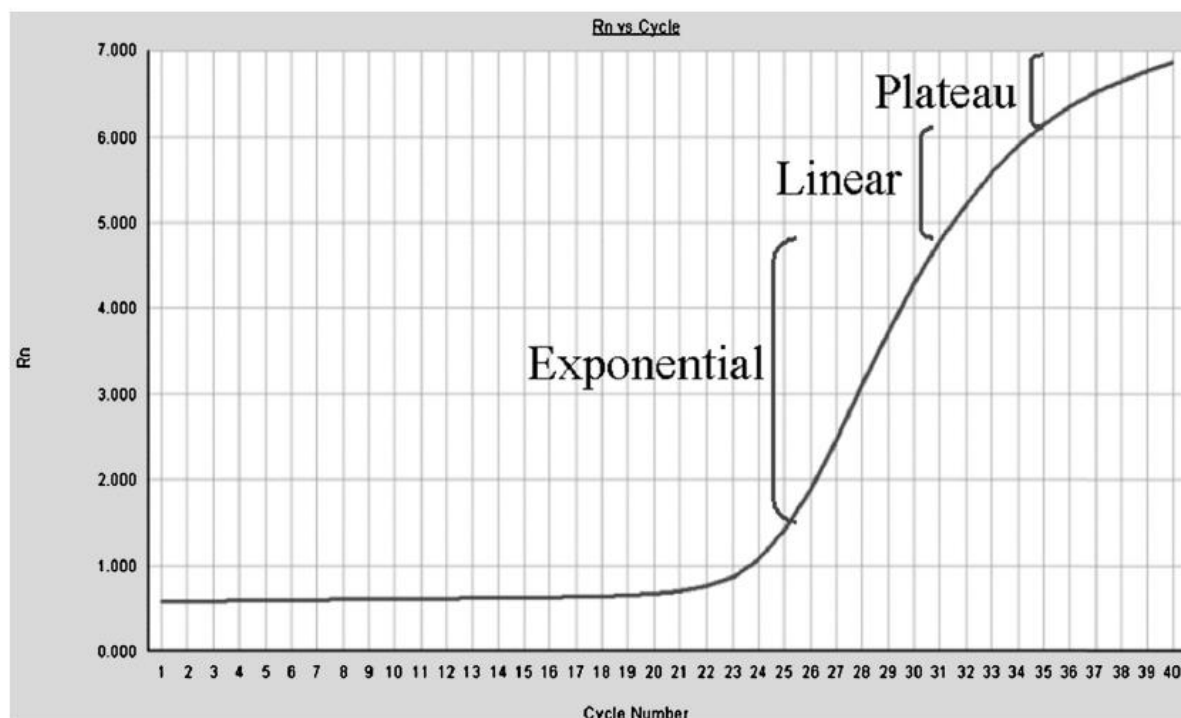
3.5 Kvantitativní polymerázová řetězová reakce (qRT-PCR)

Kvantitativní PCR nebo také Real-Time PCR je výkonný nástroj pro kvantitativní analýzu nukleových kyselin. Technologie qRT-PCR je vlastně zdokonalení původní PCR, vyvinuté Kary B. Mullisem a jeho spolupracovníky v roce 1985 (Saiky et al., 1985). Za tento objev získal Kary Mullis v roce 1993 Nobelovu cenu za chemii (Kubista et al., 2006).

Pomocí PCR lze v podstatě amplifikovat (zmnožit) jakoukoliv sekvenci nukleové kyseliny, přítomnou v komplexním vzorku. Amplifikace probíhá v cyklech, během kterých se generuje velké množství identických kopií dané sekvence, které lze snadno analyzovat. To umožnilo například manipulaci s DNA pro účely klonování, genetického inženýrství a sekvenování. Jako analytická technologie však měla původní PCR vážná omezení. Amplifikace DNA sekvence a její následná kvantitativní analýza byla dříve velmi obtížná, protože výtěžek PCR produktu nebyl závislý na množství původní templátové DNA, která byla přítomna ve vzorku (Kubista et al., 2006). Zjednodušeně řečeno bylo pomocí původní PCR možné daný úsek nukleové kyseliny pouze zmnožit (amplifikovat) do mnohých kopií, nikoliv však přesně analyzovat. Řešení tohoto omezení přinesl R. Higuchi et al. (1992) objevem metody PCR v reálném čase (Real-time PCR). Díky tomuto objevu je možné souběžně s amplifikací také specifické DNA sekvence detekovat. Přidáním fluorescenčního ethidium bromidu (EtBr) mohla být amplifikace jednoduše externě monitorována. Fluorescence EtBr se totiž v přítomnosti dvouvláknové DNA (ds DNA) zvyšuje. Zvýšení fluorescence tedy znamená pozitivní PCR amplifikaci, jejíž průběh může být sledován. (Higuchi et al., 1992).

Sledováním fluorescence barviv nebo sond, zavedených do PCR reakce, je tedy možné monitorovat množství vytvořeného produktu a počet amplifikačních cyklů, potřebných k získání určitého množství molekul DNA. Za předpokladu známé účinnosti amplifikace, která zhruba odpovídá zdvojení počtu molekul za amplifikační cyklus, je možné vypočítat počet molekul amplifikované DNA v původním vzorku (Kubista et al., 2006). Během amplifikace roste množství DNA díky dvěma primerům, navázaným na obě vlákna denaturované DNA,

geometrickou řadou. V ideálním případě (100 % účinnost amplifikace) by množství molekul amplifikované DNA v exponenciální fázi reakce šlo vyjádřit jako 2^n , kde n je pořadí cyklu. Tento exponenciální růst však nemůže trvat věčně. Po určitém počtu cyklů (cca 30), který závisí na mnoha faktorech, se tempo zpomalí a reakce vstoupí do lineární fáze, kde už se templát kompletně nezdvoujnásobí. Na závěr vstupuje reakce do tzv. plateau fáze, ve které je amplifikace zastavena (Stephenson, 2016).



Obrázek 1 Fáze RT-PCR zobrazené na reakční křivce (Stephenson, 2016).

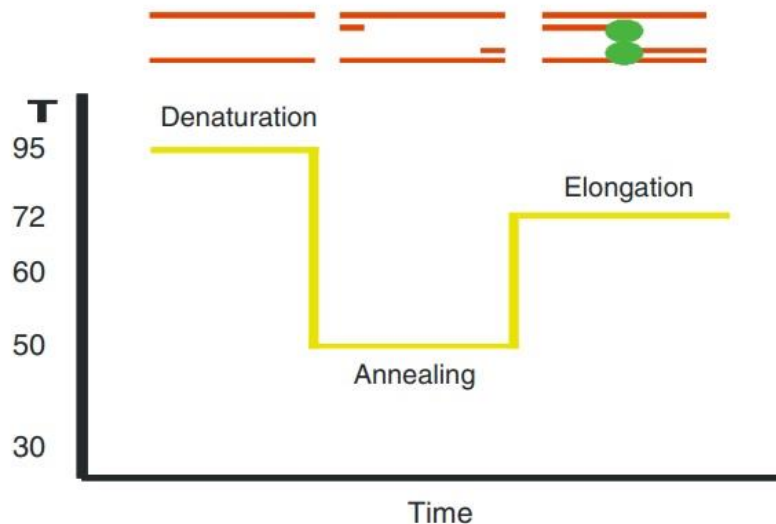
Díky vysoce účinným detekčním metodám a citlivým přístrojům, které jsou dnes běžně dostupné, může být počet molekul DNA konkrétní sekvence v komplexním vzorku určen s nebývalou přesností, dostatečnou k detekci jedné molekuly (Kubista et al., 2006).

3.5.1 PCR amplifikace

Amplifikace je vlastně zmnožení úseku DNA do mnoha kopií. DNA templát pro PCR může být jedno nebo dvouřetězcový. K amplifikaci jsou dále potřeba především dva oligonukleotidové primery, které označí DNA sekvenci, která má být amplifikována, dále volné nukleotidy dNTPs (deoxynukleotid trifosfáty), termostabilní polymeráza a hořčnaté ionty v pufru. Během reakce je velmi důležitý správný teplotní cyklus. Každá ze 3 fází cyklu (denaturace, annealing, elongace) vyžaduje specifickou teplotu. Nejprve je nutné navodit teplotu dostatečně vysokou, aby došlo k denaturaci dvouřetězcové templátové DNA, poté je na

vzorek působeno nižší, tzv. anelační teplotou, vhodnou k nasedání primerů na specifická místa denaturované DNA, a na závěr působí teplota kolem 72 °C, což je optimum pro působení termostabilní polymerázy, která rozšiřuje primery začleňováním volných nukleotidů dNTPs, čímž dochází k elongaci, prodlužování amplikonu. Tvorba nového komplementárního řetězce DNA probíhá ve směru od 5' konce ke 3' konci. Amplifikace probíhá v cyklech, kterých je většinou kolem 30 (Kubista et al., 2006).

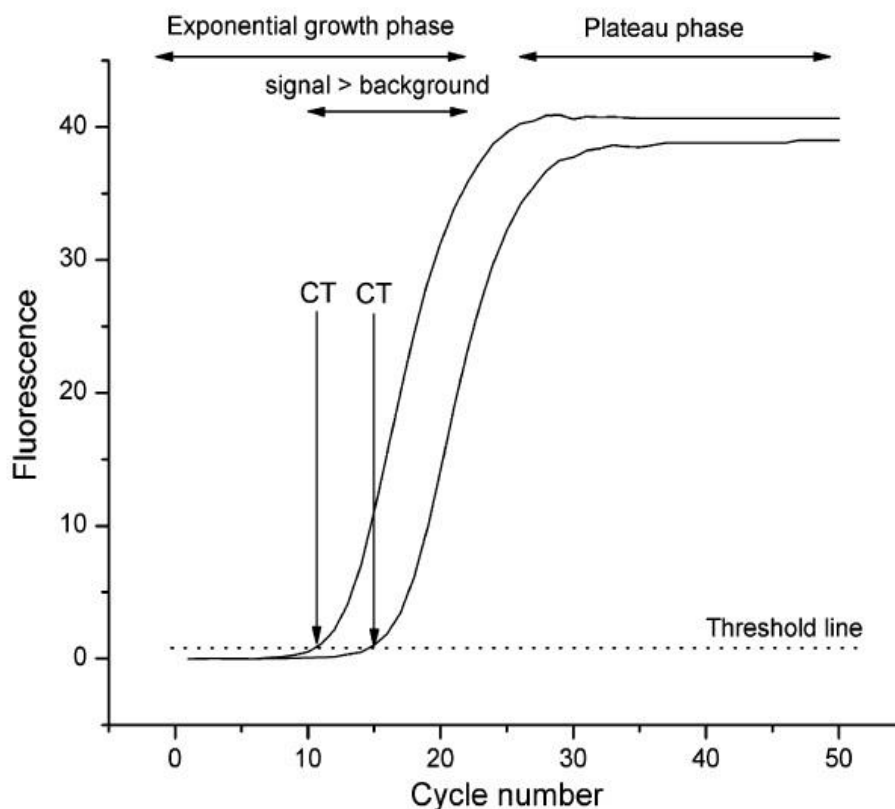
Teplota pro **denaturaci**, tzv. melting temperature se pohybuje cca kolem 95 °C. Tato teplota musí být dostatečná k rozrušení vodíkových můstků dvoušroubovice DNA, čímž se kompletně oddělí vlákna templátu. Při částečné separaci vláken by se po snížení teploty vlákna opět spojila a nedošlo by k nasednutí primerů. Přesná teplota a délka denaturace je závislá na více faktorech, jako je délka templátu, parametry použitého přístroje nebo materiál použitých reakčních zkumavek. Dosažení přesné teploty potřebné k denaturaci je důležité především v několika prvních cyklech, protože původní templát bývá mnohem delší než amplikony, které později převažují. Teplota pro **nasedání primerů**, tzv. anelační teplota závisí na použitých primerech a pohybuje se kolem 50–65 °C. Po nasednutí jejich nasednutí se na primery naváže termostabilní DNA polymeráza, která stabilizuje komplex. Optimální teplota pro **elongaci** závisí na použité termostabilní DNA polymeráze, u často používané Taq polymerázy je to kolem 72 °C. Vzájemně komplementární části templátu mohou způsobit problémy vznikem vlásenek a jiných struktur, které mohou elongaci narušit. Stejně riziko problémů je i u primerů. Komplementarita primerů, zvláště jejich 3' konců způsobuje komplikace vznikem komplexů primer-dimer (PD). Je důležité se vzniku PD vyhnout, především u vzorků obsahujících pouze několik cílových molekul, protože PD v PCR reakci těmito molekulám konkurují (Kubista et al., 2006).



Obrázek 2 Teplotní cyklus PCR (Kubista et al., 2006)

3.5.2 Real-time monitoring PCR

Inovace v přístrojové technice a v chemii fluorescenčních barviv podnítily rychlý vývoj metod detekujících PCR produkty v reálném čase (Stephenson, 2016). V Real-time PCR je nutná přítomnost fluorescenčního substrátu, který se váže na vzniklý produkt, jehož přítomnost oznamuje vyzářením fluorescence. Substrát je tedy fluorescenčně aktivní až po navázání na DNA. Existuje několik dostupných fluorescenčních sond a barviv. Substrátem je generován fluorescenční signál, který odráží množství vytvořeného produktu. Zpočátku je signál slabý a nelze dobře odlišit od pozadí. Až po nahromadění většího množství produktu fluorescenční signál exponenciálně roste. Po nějaké době se signál nasytí a vypne, což je většinou způsobeno vyčerpáním některého z kritických komponentů, jako jsou primery, fluorescenční substrát nebo volné nukleotidy. A tak množství vzniklých molekul může být limitováno způsobem, kterým exponenciální amplifikace přejde k lineární amplifikaci. V klasických PCR experimentech se všechny reakční křivky nasytí na stejné úrovni. Konec PCR měření tedy nevypovídá nic o počátečním množství cílových molekul ve vzorku. Jednotlivé reakční křivky se však liší počáteční fází exponenciálního růstu reakce, což poukazuje na rozdíly v počátečním množství templátových molekul. Rozdíl je kvantifikován porovnáním počtu amplifikačních cyklů potřebných k tomu, aby reakční křivka vzorku dosáhla určité mezní hranice fluorescenčního signálu. Počet cyklů potřebný k dosažení této mezní hodnoty je označován jako **cycle threshold**, zkráceně hodnota **C_T** (Kubista et al., 2006).



Obrázek 3 Real-time PCR reakční křivky. Prahová úroveň je nastavena dostatečně nad pozadí a počet potřebných cyklů k dosažení této úrovně, C_T , je zaznamenáván (Kubista et al., 2006).

Real-time PCR se teda opírá o schopnost přístroje (Light Cycler) detekovat dílčí cyklus amplifikace, ve kterém se nahromadilo dostatečné množství PCR produktu, aby jeho signál mohl být odlišen od fluorescenčního šumu pozadí (signál v limitech přístrojové detekce kolísající v počátečních cyklech amplifikace). Čím větší množství templátu, tím větší množství produktu a také tím dřívější dosažení detekční mezní hranice a tím nižší hodnota C_T (Stephenson, 2016). To znamená, že C_T hodnota je nepřímo úměrná množství ampliconu v reakci, tj. nižší C_T hodnota znamená větší množství ampliconu (Schmittgen et Livak, 2008).

3.5.2.1 ΔC_T porovnávací kvantifikační metoda

Hodnotou C_T ($=C_q$) je tedy udáván počet PCR cyklů potřebných k dosažení mezní hranice fluorescenčního signálu, tzv. Threshold line. Tato mezní hranice může být určena automaticky nebo nastavena ručně. C_T hodnota lze odečíst z grafu v místě průsečíku Threshold line a reakční křivky (viz. obr. 3) a je automaticky vyhodnocena softwarem přístroje, na kterém reakce probíhá. Nachází se ve fázi reakce, kdy amplifikační křivka začíná exponenciálně růst a v reakci je přítomné dostatečné množství všech reakčních složek. Kolikanásobná je změna v hodnotách C_T lze matematicky vyjádřit jako $2^{-\Delta C_T}$ (Stephenson, 2016).

Problem 9.1 Two DNA samples, *A* and *B*, are run in a real-time PCR experiment in which the β -actin gene is assayed. Sample *A* yields a C_T value of 21.8. Sample *B* yields a C_T value of 23.2. What is the fold increase in the amount of target in Sample *A* over Sample *B*?

Solution 9.1

The fold increase is given by

$$\text{Fold increase} = 2^{-\Delta C_T}$$

The ΔC_T , the difference between the two C_T values, is

$$\Delta C_T = 21.8 - 23.2 = -1.4$$

The fold increase is then

$$2^{-\Delta C_T} = 2^{-(-1.4)} = 2^{1.4} = 2.64$$

Therefore, there is a 2.64-fold difference in the amount of amplified product in sample *A* compared to sample *B*.

Obrázek 4 Ukázka výpočtu, kolikrát je více amplifikovaného produktu ve vzorku *A* (nižší hodnota C_T) než u vzorku *B* (Stephenson, 2016).

3.5.2.2 Měření genové exprese pomocí qRT-PCR

Měření rozdílů genové exprese sebou nese potenciál velké variability, která může být způsobena např. chybami v pipetování, změnou účinnosti buď PCR amplifikace nebo reverzní transkripce při přepisu mRNA do cDNA a mnoha dalšími důvody. Z tohoto důvodu je vhodné využití vnitřní kontroly. Používá se k normalizaci rozdílů v množství totální RNA, přidané do Real-time PCR reakce. Nejčastěji se jako vnitřní kontrola používají housekeepingové geny, tyto geny jsou vždy exprimovány ve víceméně konstantní míře ve většině pletiv či tkání organismu a jejich exprese je pro buňku zpravidla esenciální. Jako příklady těchto referenčních genů můžeme uvést β -actin, GAPDH (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) a 18 S RNA (Stephenson, 2016).

Kvantifikace genové exprese může být prováděna dvěma způsoby. Častějším způsobem je relativní kvantifikace, méně častým kvantifikace absolutní. Absolutní kvantifikací je určován počet kopií genu porovnáním PCR fluorescenčního signálu se standartní křivkou. Data jsou obvykle vyjádřena jako množství kopií na buňku. Absolutní kvantifikace je využívána v případech, kdy je požadována přesná kvantita amplikonu, např. při počítání virové zátěže.

Nevýhodou je absolutní kvantifikace je nutnost věnovat velké úsilí vytvoření standartní křivky. Navíc většinou není nutné prezentovat data jako absolutní počet kopií a postačí relativní vyjádření (kolikrát se zvýšila či snížila exprese genu). Relativní exprese genu zájmu je vyhodnocována relativně k referenčnímu genu, který slouží jako vnitřní kontrola (Schmittgen et Livak, 2008).

Měření genové exprese se tedy nejčastěji provádí jako relativní test. To znamená, že není nutné přesně vědět, kolik molekul mRNA vzniká z konkrétního genu, stačí znát množství transkriptu v porovnání s jiným referenčním genem. Relativní měření genové exprese se používá např. při porovnání exprese konkrétního genu v různých typech pletiv. Měřený gen bývá označován jako **target** (gen zájmu) a jeho exprese je porovnávána s referenčním genem, který bývá označován jako **calibrator**, gen s konzistentní úrovní exprese ve všech experimentálních vzorcích. Existuje několik způsobů měření relativní kvantifikace (Stephenson, 2016).

Aby mohl být výstup z RT-PCR prezentován, musí být dále statisticky zpracován. Jednotlivá data, která mají být prezentována jako samostatné údaje by měla být vyjádřena jako $2^{-\Delta C_T}$ nebo 2^{-C_T} , spíše než surovou C_T hodnotou. Při prezentaci dat ze studie profilu genové exprese by měla být data vždy normalizována vnitřní kontrolou, takže v tomto případě je vhodné expresi vyjádřit jako $2^{-\Delta C_T}$, kde $\Delta C_T = (C_T \text{ genu zájmu} - C_T \text{ referenčního genu})$ (Schmittgen et Livak, 2008).

3.5.2.3 $\Delta\Delta C_T$ metoda relativní kvantifikace

Srovnávací C_T metoda neboli $\Delta\Delta C_T (= \Delta\Delta C_q)$ metoda je v současné době nejpoužívanější kvantifikační metodou pro studie změn exprese genů v porovnání s referenčním genem, tj. relativní genové exprese. Stejně jako pro všechny ostatní metody relativní kvantifikace musí být i pro tuto metodu splněny dvě základní podmínky. Za prvé účinnost jednotlivých testů musí být konzistentní od jednoho cyklu k druhému, a tedy celková efektivita PCR blízká 100 %. Za druhé účinek jakýchkoliv změn na hodnotu C_T musí být ekvivalentní pro referenční geny a geny zájmu. Výhodou této metody je její jednoduchost a schopnost vyjádřit data jako násobnou změnu v expresi genu (Schmittgen et Livak, 2008).

$$\text{Fold change} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

Tato rovnice může být použita k porovnání genové exprese ve dvou různých vzorcích. Každý vzorek se vztahuje ke genu vnitřní kontroly (k referenčnímu genu). Nezáleží, který rozdíl

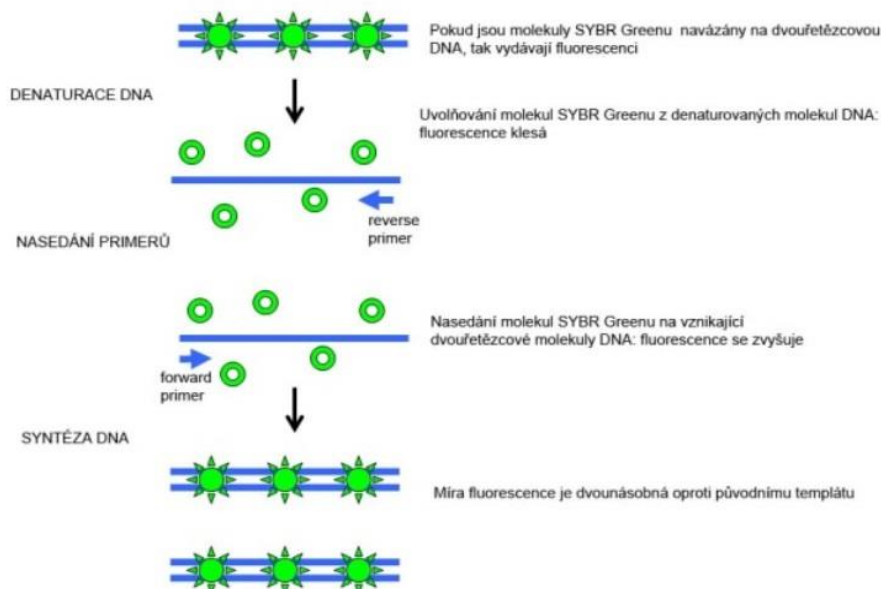
C_T hodnot (ΔC_T) je v rovnici na prvním a který na druhém místě, pořadí pouze ovlivňuje interpretaci výsledků (Schmittgen et Livak, 2008).

$$\Delta\Delta C_T = [(C_T \text{ gene of interest} - C_T \text{ internal control}) \text{sample A} - (C_T \text{ gene of interest} - C_T \text{ internal control}) \text{sample B}]$$

Je nutné zdůraznit, že data vstupující do statistických testů by měla být vždy transformována do podoby $2^{-\Delta\Delta C_T}$, $2^{-\Delta C_T}$ nebo 2^{-C_T} , nikdy by neměla být vstupní data v podobě surové C_T hodnoty (Schmittgen et Livak, 2008).

3.5.3 SYBR Green

SYBR Green je nejvyužívanějším fluorescenčním substrátem v qRT-PCR. Jedná se o fluorescenční barvivo, které se váže pouze na dvouvláknovou DNA, nikoliv na jednovláknovou, a po navázání fluoreskuje. Během cyklické reakce roste míra fluorescenčního signálu s množstvím vytvořeného dvouřetězcového produktu, na který je SYBR Green navázán. Množství fluorescence je tedy v určité chvíli reakce přímo úměrné počtu molekul dvouřetězcové DNA přítomné ve vzorku. Nevýhodou SYBR Greenu je, že se váže nespecificky na všechny dvouřetězcové produkty. Vztah mezi intenzitou fluorescenčního signálu a množstvím templátu v qRT-PCR je spolehlivým prostředkem pro kvantifikaci nukleových kyselin a pro stanovení přítomnosti či nepřítomnosti specifických genových sekvencí (Stephenson, 2016).



Obrázek 5 Navázání SYBR Greenu na dvouřetězcové molekuly DNA, zdroj: <http://labguide.cz/sybergreen/>

3.5.4 Využití Real-time PCR

Mezi typické využití Real-time PCR patří detekce patogenů, analýzy genové exprese, bodových mutací (SNP = single nucleotide polymorphism), chromozomových aberací nebo detekce proteinů pomocí Real-Time Immuno PCR (Kubista et al., 2006).

Real-time PCR je velmi účinný nástroj pro kvantifikaci genové exprese má mnoho výhod (Schmittgen et Livak, 2008). Jedná se o velmi citlivou metodu s takovou schopností detekce, kterou lze identifikovat i jen jednu kopii specifického transkriptu. Má schopnost vytvářet data širokého rozsahu (přesná detekce malého i velkého množství transkriptu), může zpracovávat současně mnoho vzorků a rozezná rozdíl mezi transkripty, které mají velmi podobné sekvence (Stephenson, 2016).

3.6 Skladování jablečných plodů

Různé odrůdy mají různé nároky na podmínky skladování. Optimální podmínky pro skladování se mohou lišit i v rámci jedné odrůdy v závislosti na stanovišti, na kterém byla jablka vypěstována. Skladování více odrůd v jednom prostoru by se mělo řídit nejslabším článkem, měly by být dodrženy optimální skladovací podmínky pro nejnáročnější odrůdu (Jelen, 1976). Bylo zjištěno, že skladování jablečných plodů zvyšuje expresi alergenu Mal d 1 na translační i transkripční úrovni (Sancho et al., 2006). To znamená, že delší dobu skladovaná jablka jsou pro citlivé jedince, trpící často zkříženou alergií na jablka a pyl břízy, rizikovější, a proto je pro alergiky vhodnější konzumace čerstvě utržených jablek. Jablka jsou ale pro komerční účely sklízena ve sklizňové zralosti a dobrých chuťových vlastností dosahují až ve zralosti konzumní, která ale běžně nastává až po určité době skladování.

Aby plody vydržely i delší skladování, čímž může značně stoupnout jejich tržní hodnota, musí se nejprve včas sklídit a následně zamezit rychlému dozrávání a senescenci. Kromě rané sklizně se využívá metod jako je rapidní zchlazení, řízení teploty a atmosféry, případně ošetření inhibitorem ethylenu (Pareek et al., 2016).

Ethylen je považován za nejdůležitější molekulu ve sklizeném ovoci, která vyvolává mnohé efekty, způsobující ztrátu kvality plodů. Je to rostlinný růstový regulátor, který je přirozeně produkován při zrání a stárnutí plodů. Jeho produkce také souvisí s abiotickým či biotickým stresem (Saltveit, 1999). Ethylen je produkován v methioninovém cyklu (Matto et Liberman, 1977). Společné skladování plodů s odlišnou mírou produkce ethylenu může mít za

následek rychlejší stárnutí a degradaci plodů, které produkují ethylenu méně (Pareek et al., 2016).

3.6.1 Životní pochody ve sklizených plodech

3.6.1.1 Výpar

Obsah vody v čerstvých rostlinných výrobcích může být až 95 %. Během skladování dochází k transpiraci, což u ovoce vede ke značnému zhoršení jakosti, projevující se např. svraskáním slupky. Tvrdší ovoce, jako jsou jablka nebo hrušky je výparem ohroženo méně než měkké ovoce (např. jahody, maliny atd.) z důvodu silnější kutikuly, která tvoří ochrannou vrstvu lamelovité struktury, ve které je voda také uložena. Nejvíce transpirační vody je z plodů uvolňováno skrz lenticely (Jelen, 1976). Existuje celá řada faktorů, která ovlivňuje odolnost plodu vůči ztrátě vody, jako např. složení a tloušťka slupky, počet stomat nebo morfologická struktura plodu (objem, tvar) (Tovinen, 2003).

3.6.1.2 Dýchání

Jablka řadíme mezi klimakterické plody, které se vyznačují rapidním zvýšením respirace během zrání na stromě i po sklizni (Pareek et al., 2016). Z okolního vzduchu si plody odebírají kyslík (O₂), následně zpět vydechují oxid uhličitý (CO₂) a zároveň uvolňují teplo. Rovněž dochází k vedlejším procesům, při nichž se do okolního vzduchu uvolňuje např. ethylen a další aromatické látky (Jelen, 1976). Cílem při skladování jablek je dosáhnout redukce míry respirace a enzymatické aktivity, což může značně prodloužit životnost plodů při skladování a tím i udržet dostupnost jablek tak dlouho, jak je ekonomicky žádáno (Sancho et al., 2006).

3.6.1.3 Přeměna zásobních látek v plodech

3.6.1.3.1 Sacharidy

V průběhu růstu vznikají v listech asimilační cukry, které se v plodech spojují do velkých molekul škrobu. Při zrání se tento zásobní materiál rozpadá znovu na cukry a teprve pak je ovoce vhodné ke konzumaci. Část cukrů se postupně spotřebovává prodýcháním (Jelen, 1976).

3.6.1.3.2 Proteiny

Bílkoviny skládající se z různých aminokyselin mají u našich druhů ovoce většinou druhořadou úlohu. Mají ale velký význam, protože jsou důležitou složkou enzymů. Obsah

aminokyselin podléhá během růstu neustálým změnám, které jsou v tomto období do značné míry závislé na příjmu živin (Jelen, 1976).

3.6.1.3.3 Pektiny

Pektiny jsou „tmelící složkou“ buněčných pletiv. Udržují buněčné svazky pohromadě a mají proto významný vliv na charakter ovoce. Ionty vápníku zde mají pojící účinek, ionty draslíku naopak účinek rozpouštějící. Během skladování jsou pektiny odbourávány, skladováním v řízené atmosféře (CA) je možné tento proces zpomalit (Jelen, 1976).

3.6.1.4 Změny zbarvení plodů

Zbarvení jablečné slupky způsobují především antokyaniny, které patří do třídy flavonoidů a způsobují červené zbarvení plodů (Gallus et al., 2005). Stupeň koncentrace antokyaninů je ovlivněn mírou exprese alespoň pěti genů (MdCHS, MdF3H, pDFR, MdANS, and pUFGluT), zodpovědných za biosyntézu těchto barviv (Ubi et al., 2006). Akumulace antokyaninů může být také ovlivněna teplotou a UV zářením. Intenzita zbarvení plodů v době zralosti je také důležitá z ekonomického hlediska, protože může značně ovlivnit jejich prodejní hodnotu (Pareek et al., 2016).

Kromě antokyaninů se ve slupce vyskytuje také zelený chlorofyl, který je během zrání na stromě i po sklizni odbouráván a objevuje se žlutá barva. Skladováním v řízené atmosféře (CA) je možné udržet chlorofyl po poměrně dlouhou dobu (Jelen, 1976).

3.6.2 Faktory ovlivňující skladovatelnost plodů

3.6.2.1 Teplota

Teplota významně ovlivňuje rychlost všech metabolických procesů, včetně dýchání (Pareek et al., 2016). Pro dlouhodobé skladování je vhodné zajistit co nejnižší teplotu. Zároveň ale nesmí být teplota natolik nízká, aby vzniklo riziko poškození plodů. Vhodné také je snižovat teplotu postupně. Každý stupeň teploty zpomaluje dýchání, a tím odbourávání cukrů, kyselin, pektinů a dalších látek. Čím je teplota skladování nižší, tím větší je nebezpečí příliš nízké vlhkosti vzduchu (Jelen, 1976). Ideální teplota pro skladování jablek je ovlivněna mnoha faktory složení vzduchu, uvádí většinou v rozmezí 1-5 °C (Bolhaar et al., 2005).

3.6.2.2 Vlhkost

Vlhkost vzduchu je po teplotě druhým nejdůležitějším faktorem, který může významně regulovat posklizňové fyziologické změny v ovoci. Pokud je vlhkost vzduchu příliš nízká, dochází k rychlé transpiraci a znehodnocování plodů (Pareek et al., 2016).

Aby bylo možné vyskladnit ovoce co nejčerstvějšího vzhledu, instalují se často ve skladech jádrového ovoce zvlhčovače vzduchu, ideálně na principu vhánění vodní páry. Jablka svraskají, jakmile překročí ztráta hmotnosti cca 5 % (Jelen, 1976). Není-li ztráta vody kontrolována, dochází kromě ztráty turgoru a nežádoucímu svraskání také k dalším pro skladování nežádoucím metabolickým změnám, jako je zvýšená produkce ethylenu (Tovinen, 2003).

3.6.2.3 Složení vzduchu

Nejdůležitější roli zde hraje % zastoupení CO₂ a O₂, protože tyto dva plyny ovlivňují rychlost respirace, kterou se při skladování snažíme snížit na minimum, aby se zpomalilo stárnutí plodů. Z tohoto důvodu se v řízených atmosférách snižuje obsah O₂ a zvyšuje obsah CO₂ (Pareek et al., 2016; Tovinen, 2003).

3.6.3 Skladování plodů v řízené atmosféře

Řízená atmosféra (CA) pro skladování plodů spočívá především v regulaci množství CO₂ a O₂ s cílem co nejdelšího uchování čerstvosti ovoce. Skladováním v prostorách se sníženou koncentrací O₂ a naopak se zvýšenou koncentrací CO₂ můžeme snížit míru senescence a oddálit ztrátu kvality ovoce. CA snižuje ztrátu chlorofylu, změkčování a tvorbu těkavých látek, které přispívají k lepší chuti. Důležité je také kontrolovat vlhkost vzduchu, která musí být dostatečně velká, aby nedocházelo k velkým ztrátám transpiraci (Pareek et al., 2016).

Dle Sancho et al. (2006) skladováním jablek v řízené atmosféře po dobu 5 měsíců výrazně vzrostla exprese alergenu Mal d 1.

3.6.4 Vliv skladování na expresi jablečných alergenů

Podle Sancho et al. (2006) byl pozorován vzrůst obsahu alergenu Mal d 1 během skladování po dobu 5 měsíců ve třech různých podmínkách (řízená a neřízená atmosféra a pokojová teplota 20 °C) u všech zkoušených odrůd. I při mnohem kratší době skladování bylo pozorováno navýšení exprese Mal d 1 na transkripční úrovni. Konkrétně u odrůdy Golden

Delicious a dalších a to při skladování po dobu 2 týdnů při pokojové teplotě 20 °C (Beuning et al., 2004).

Při studiu vlivu skladovacích podmínek na alergenicitu 5 jablečných odrůd pomocí vyšetřovací alergologické metody SPT (skin prick test) byla v řízené atmosféře (2,5 % O₂; 1 % CO₂) při 3 °C pozorována o 15 % nižší alergenicita v porovnání se skladováním v neřízené atmosféře při 2 °C. Plody byly skladovány po dobu 6 měsíců. Porovnání výsledků tohoto SPT testu u jednotlivých odrůd v řízených a neřízených skladovacích podmínkách je graficky zobrazeno na obrázku č. 6 (Bolhaar et al., 2005).

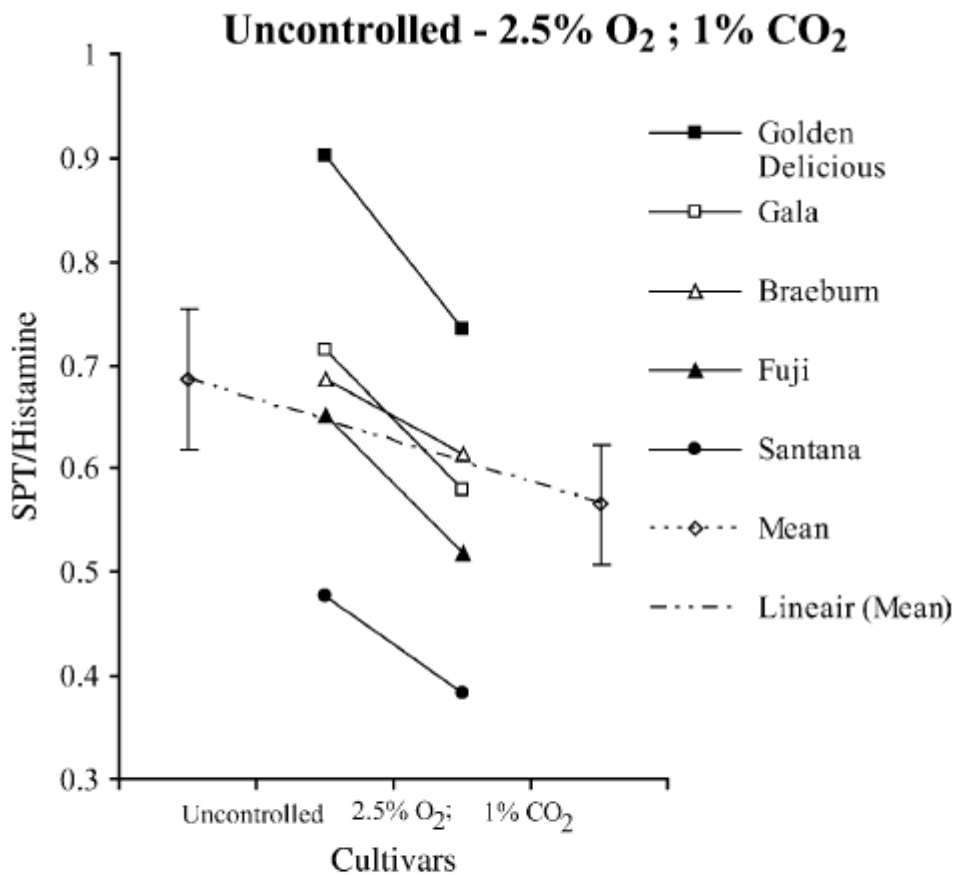


FIG 4. Effect of storage conditions: comparison of cold storage under normal conditions with controlled atmosphere conditions (2.5% oxygen and 1% carbon dioxide). There is 15% ($P < .001$) lower allergenicity under controlled storage conditions.

Obrázek 6 Výsledky SPT testu porovnávající změnu alergenicity vlivem skladování v neřízené a řízené atmosféře (Bolhaar et al., 2005).

Oxidativní reakce během zrání a skladování plodů jsou katalyzovány enzymem polyfenoloxidáza a/nebo peroxidázou, které mohou interagovat s alergenními proteiny

a snižovat jejich alergenicitu. Reakce chinonů s alergenními proteiny totiž mění jejich terciální strukturu, což má za následek ztrátu epitopů, kam se mohou navázat IgE protilátky, zodpovědné za alergickou reakci (Schmitz-Eiberger et Matthes, 2011).

4 Materiál a metody

Byla získána kolekce plodů ze 14 odrůd jablek, které byly vypěstovány v identických agrotechnických podmínkách experimentálních výsadb VŠÚO Holovousy s.r.o. Analyzované plody pocházely ze sklizně v září roku 2016. Od každé odrůdy byly odebrány 3 plody, které byly následně využity k výzkumu vlivu odrůdy a skladování na expresi izoalergenů Mal d 1 ve slupce a dužnině.

Ve vzorcích slupky i dužniny těchto plodů byla zjišťována exprese izoalergenů Mal d 1 pomocí kvantitativní polymerázové řetězové reakce (qRT-PCR). Vzorky byly ke zkoumání alergénové exprese použity okamžitě po sklizni a po skladování v chladícím boxu při 5 °C (neřízená atmosféra) po dobu 12 týdnů. Ze získaných údajů byl statisticky vyhodnocen vliv odrůdy a skladování na míru exprese izoalergenů Mal d 1.

4.1 Rostlinný materiál

Z každé ze 14 odrůd jablek byly použity 3 plody, ze kterých byl odebrán vzorek pletiva slupky a dužniny. Slupka i dužnina byla odebírána z více míst na ploše plodu. Před odběrem vzorků slupky a dužniny byly plody, nástroje, pracovní plocha i rukavice důkladně ošetřeny inhibitorem RNázy, konkrétně přípravkem RNaseZAP TM od firmy Sigma. Slupka byla rovnoměrně seškrábnuta v co nejmenší možné vrstvě z celého obvodu plodu. Kousky dužniny byly vyříznuty na několika místech z různých stran plodu. Vzorky slupky a dužniny ze všech plodů byly vloženy do velkých polypropylenových zkumavek, které byly ihned po naplnění a uzavření šroubovacím víčkem zamrazeny v tekutém dusíku a následně skladovány při teplotě -80 °C. Hluboce zamražené vzorky byly postupně odebírány pro extrakci RNA.

4.1.1 Použité odrůdy

1. Nikoleta

Původ: Jonadel x Rubín (VŠÚO Holovousy s.r.o., reg. 2015)

Popis odrůdy: Vyrůstnost středně bujná až bujná, typ rozvětvený, habitus rozložitý. Nasazení plodů na krátkých a tlustých výhonech jednotlivě i ve shlucích. Plod po probírce velký, tvar kuželovitý, se středně zřetelným žebrováním a středně zřetelnými svalci na



Obrázek 7 odrůda Nikoleta, zdroj: <http://eagri.cz/public/web/file/493584/Ovoce_2016.pdf>

vrcholu. Základní barva plodu žlutá, krycí červená, typ celoplošný s výrazným žiháním. Slupka středně tlustá, hladká se středním ojíněním a střední rzivostí okolo stopečné jamky. Dužnina žlutavé barvy, měkká až středně pevná, středně šťavnatá, v chuti nasládlá. Stopka tlustá a krátká. Sklizňová zralost ke konci září, konzumní zralost od listopadu. Skladovat lze do poloviny února (zimní odrůda). Je středně odolná k houbovým chorobám (Nesrsta et Jan, 2016).

2. Frosta

Původ: Florina x 'Cox Orange pippin' x A 467-74 (VŠÚO Holovousy s.r.o., reg. 2012)

Popis odrůdy: Vyrůstnost bujná, typ rozvětvený, habitus rozložitý, nasazení plodů na krátkých a dlouhých výhonech ve shlucích. Plod po probírce středně velký až velký, tvar elipsovité, se středním žebrováním a středně výraznými masitými svalci na vrcholu. Základní barva plodu žlutá, krycí barva



Obrázek 8 odrůda Frosta, zdroj: http://eagri.cz/public/web/file/493584/Ovoce_2016.pdf

červená, plošná a skvrnitá. Slupka středně tlustá až tlustá, suchá, se středním až vysokým počtem středně velkých lenticel. Dužnina žlutavé barvy, tuhá, středně šťavnatá a sladká. Stopka středně tlustá až tlustá a krátká až středně dlouhá. Sklizňová zralost koncem září, konzumní zralost od poloviny října, skladovatelnost do listopadu (podzimní odrůda). Rezistentní proti napadení strupovitostí (Nesrsta et Jan, 2016).

3. Jonagold Marnika

Původ: řízená mutace odrůdy Jonagold

Popis odrůdy: Vyrůstnost zpočátku bujná, později střední. Plody jsou středně velké až větší, někdy nevyrovnané, odolné proti otlakům. Tvar kulovitý, někdy s mírnými žebry. Slupka středně silná, pevná, hladká, lehce mastná. Základní barva zelenožlutá, překrytá oranžově červenou barvou, která



Obrázek 9 odrůda Jonagold Marnika, zdroj: <http://www.ovoceploskovice.cz/portfolio/detail/jonagold>

je nanesená formou mramorování a někdy i výrazného žihání. Dužnina středně pevná, jemná, šťavnatá. Chuť je příjemně sladce navinulá, velmi aromatická. Sklizňová zralost nastává

v první dekádě října, konzumní zralost v listopadu. Dobře uskladněná vydrží až do března (zimní odrůda). Citlivější vůči mrazu v době květu (Dlouhá et al., 1991).

4. Topaz

Původ: Rubín x Vanda (Ústav experimentální botaniky AVČR, Střížovice)

Popis odrůdy: Plody středně velké, ploše kulovité až kuželovité. Barva bohatě červeně žíhaná. Dužnina pevná a šťavnatá. Chuť příjemně sladce navinulá. Sklizňová zralost v říjnu, konzumní zralost v prosinci. V dobrých skladovacích podmínkách vydrží až do dubna (zimní odrůda).

Rezistentní proti strupovitosti a vysoce odolná proti padlí (Richter, 2013).



Obrázek 10 odrůda Topaz, zdroj: <http://www.ovocne-stromky.cz/topaz-p72>

5. Meteor

Původ: Melrose x Megumi (VŠÚO Holovousy s.r.o.)

Popis odrůdy: Vyrůstnost středně bujná až bujná, habitus stromu rozložitý, plodí jednotlivě na krátkém plodonosném obrostu rostoucím na středně dlouhých výhonech. Plod velký až velmi velký, tvar ploše kulovitý, žebrování a masité svalce na vrcholu slabé.

Základní barva slupky zelenožlutá, krycí barva červená, rozmytá. Slupka tlustá, na povrchu hladká,

slabě masná, rzivost okolo stopečné jamky nízká. Dužnina žlutavá, středně tuhá, jemná, více šťavnatá, navinule sladká. Stopka tlustá a krátká. Sklizňová zralost na přelomu září a října, konzumní zralost od listopadu, skladovatelnost do dubna (zimní odrůda). Odolnost proti napadení strupovitostí je nízká, vůči padlí střední (Nesrsta et Jan, 2016).



Obrázek 11 odrůda Meteor, zdroj: http://eagri.cz/public/web/file/493584/Ovoce_2016.pdf

6. Flordika

Původ: Discovery x Florina (VŠÚO Holovousy s.r.o., reg. 2010)

Popis odrůdy: Vyrůstnost středně bujná, typ rozvětvený, habitus rozložitý, nasazení plodů na krátkém obrostu ve shlucích i jednotlivě. Plod po probírce středně velký až velký, tvar ploše kulovitý, bez žebrování. Základní barva plodu žlutozelená, krycí barva červená celoplošně rozmytá. Slupka tlustá, na povrchu hladká, s velkou rzivostí okolo stopečné jamky, středně mastná. Dužnina krémové barvy, středně pevná, šťavnatá, sladce navinulá. Stopka středně tlustá a středně dlouhá. Sklizňová zralost koncem září, konzumní zralost od listopadu, skladovatelnost do února (zimní odrůda). Rezistentní proti napadení strupovitostí, odolnost vůči padlí střední (Nesrsta et Jan, 2016).



Obrázek 12 odrůda Flordika, zdroj: http://eagri.cz/public/web/file/493584/Ovoce_2016.pdf

7. Artiga

Původ: Angold x HL782 (Rubín x Priscilla) (VŠÚO Holovousy s.r.o., reg. 2015)

Popis odrůdy: Vyrůstnost bujná, typ rozvětvený, habitus rozložitý. Převládající barva květu v balónové fázi světle růžová. Nasazení plodů na krátkých, středně tlustých až tlustých výhonech jednotlivě i ve shlucích. Plod po probírce velký, tvar kuželovitý, bez žeber a svalců na vrcholu. Základní barva plodu žlutozelená, krycí červená ve formě celoplošně mramorované. Slupka středně tlustá, hladká, na povrchu nerovná, bez ojínění a rzivosti, na skládce středně mastná. Dužnina žlutavé barvy, středně pevná, více šťavnatá, navinule sladká. Stopka středně tlustá až tlustá a středně dlouhá až dlouhá. Sklizňová zralost koncem října, konzumní zralost od ledna (zimní odrůda). Skladovat lze do dubna. Odrůda je více odolná proti houbovým chorobám (Nesrsta et Jan, 2016).



Obrázek 13 odrůda Artiga, zdroj: http://eagri.cz/public/web/file/493584/Ovoce_2016.pdf

8. Jonagold Supra

Původ: řízená mutace odrůdy Jonagold (Belgie)

Popis odrůdy: Vyrůstnost bujná, habitus stromu vzpřímený až rozložitý, plodí ve shlucích i jednotlivě na krátkém dřevě. Plod velký, vysoce kulovitého tvaru, bez žeber, se slabými svalci nad mělkou kališní jamkou. Slupka středně tlustá, hladká, suchá. Základní barva zelenožlutá, krycí červená, forma rozmytá.



Obrázek 14 odrůda Jonagold Supra, zdroj: <<https://www.zahradnictvi-spomysl.cz/jablon-jonagored-supra/>>

Dužnina krémové barvy, navinulé sladké chuti, středně šťavnatá. Konzistence dužniny jemná, křehká, středně tuhá. Stopka středně tlustá až tlustá, středně dlouhá. Sklizňová zralost začátkem září, konzumní v listopadu se skladovatelností do února (zimní odrůda) (Vysloužil, 2015).

9. Rucla

Původ: Clivia x Rubín (VŠÚO Holovousy s.r.o.)

Popis odrůdy: Vyrůstnost středně bujná až bujná, habitus stromu rozložitý až převislý, plodí jednotlivě na dlouhém obrostu. Plod středně velký až velký, tvar kulovitý, bez žebrování. Základní barva slupky zelenožlutá, krycí barva purpurová, celoplošná.



Obrázek 15 odrůda Rucla, zdroj: <http://eagri.cz/public/web/file/493584/Ovoce_2016.pdf>

Slupka středně tlustá, na povrchu hladká, suchá, ryzost okolo stopečné jamky nízká až střední.

Dužnina krémová, tuhá, šťavnatá, navinule sladká. Stopka středně tlustá, středně dlouhá až dlouhá. Sklizňová zralost začátkem října, konzumní zralost koncem listopadu, skladovatelnost do března (zimní odrůda). Odrůda je středně odolná proti napadení strupovitostí a padlí (Nesrsta et Jan, 2016).

10. Idared

Původ: Wagenerovo x Jonathan (USA, 1935)

Popis odrůdy: Růst středně bujný, později v plné plodnosti slabý. Habitus vzdušný s ploše kulovitou korunou. Plody středně velké až větší, kulovité až ploše kulovité, tupě žebrované, vyrovnané. Slupka hladká, lesklá a tuhá. Barva nezelenale žlutá, krytá jasně červenou barvou.



Obrázek 16 odrůda Idared, zdroj: <http://www.zemcheba.cz/node/33>

Dužnina nažloutle bílá, křehká, jemná, šťavnatá, nasládlá a málo aromatická. Sklizňová zralost ve druhé polovině října, konzumní zralost v prosinci, skladovatelná až do dubna (zimní odrůda). Odolnost proti mrazu ve dřevě střední, v květu nízká. Často napadána strupovitostí a padlím (Dlouhá et al., 1991).

11. Lady Silvia

Původ: Zvonkové x Šampion (VŠÚO Holovousy s.r.o., reg. 2015)

Popis odrůdy: Vzrůstnost středně bujná, typ rozvětvený, habitus rozložitý, plodnost na krátkých a dlouhých středně tlustých výhonech převážně ve shlucích. Plod po probírce středně velký až velký, tvar elipsovité, bez žebrování a svalců na vrcholu. Základní barva plodu žlutozelená, krycí červená, typ



Obrázek 17 odrůda Lady Silvia, zdroj: http://eagri.cz/public/web/file/493584/Ovoce_2016.pdf

plošný, žíhaný a skvrnitý. Slupka tenká až středně tlustá, bez ojínění a rzivosti, s četnými lenticelami, bývá středně mastná. Dužnina žlutavé barvy, měkká až středně pevná, středně šťavnatá, v chuti sladce navinulá. Stopka středně tlustá až tlustá, krátká až středně dlouhá. Sklizňová zralost ke konci září, konzumní zralost od poloviny listopadu. Skladovat lze do ledna (zimní odrůda). Odolnost k houbovým chorobám je střední (Nesrsta et Jan, 2016).

12. Reluga

Původ: Golida x Topaz (VŠÚO Holovousy s.r.o., reg. 2015)

Popis odrůdy: Vyrůstnost středně bujná, typ rozvětvený, habitus rozložitý plodí na krátkých a středně tlustých až tlustých výhonech převážně ve shlucích.

Plod po probírce velký, tvar kuželovitý se středně znatelným žebrováním bez svalců na vrcholu. Základní

barva plodu žlutozelená, krycí červená ve formě celoplošné s výrazným žiháním. Slupka tlustá, hladká, bez ojínění a rzivosti, na skládce nemastí. Dužnina zelenavé barvy, středně pevná, středně šťavnatá, sladce navinulá. Stopka tlustá a středně dlouhá. Sklizňová zralost začátkem října, konzumní zralost od ledna (zimní odrůda). Skladovat lze do dubna. Odrůda je rezistentní proti napadení strupovitostí (Nesrsta et Jan, 2016).



Obrázek 18 odrůda Reluga, zdroj: <http://eagri.cz/public/web/file/493584/Ovoce_2016.pdf>

13. Jonagold

Původ: Golden Delicious x Jonathan (USA, 1943)

Popis odrůdy: Vyrůstnost bujná, později střední. Habitus kulovitý, později zahuštěný s velkým podílem listové plochy. Plody středně velké až velké, kulovité až vysoce kulovité. Základní barva zpočátku zelenavě žlutá, později žlutá.

Krycí barva oranžově červená, nanesena

mramorováním a nepravidelným žiháním v průměru asi na 50 % povrchu. Dužnina žlutavé barvy, dosti jemná, středně pevná a šťavnatá. Chuť má sladce navinulou, mírně aromatickou. Sklizňová zralost začátkem října, konzumní od prosince (zimní odrůda). Střední citlivost ke strupovitosti, vyšší citlivost k padlí (Vysloužil, 2015).



Obrázek 19 odrůda Jonagold, zdroj: <<http://www.zemcheba.cz/cz/jonagold-jonagored>>

14. Golden Delicious

Původ: náhodný semenáč (USA, 1890)

Popis odrůdy: Vyrůstnost zpočátku bujná, v plné plodnosti růst slábne. Plody středně velké, kulovité až kuželovité, mírně žebernaté. Barva zelenožlutá až zlatožlutá, bez krycího zabarvení, někdy s oranžovým líčkem. Dužnina je žlutavá, navinule sladká křehká a aromatická. Sklizňová zralost v říjnu, konzumní zralost od prosince, skladovatelnost do března (zimní odrůda). Odolnost proti strupovitosti nízká, proti padlí vysoká (Dlouhá et al., 1991; Vysloužil, 2015).



Obrázek 20 odrůda Golden Delicious, zdroj: <<https://www.starkbros.com/products/fruit-trees/apple-trees/stark-golden-delicious-apple>>

4.2 Extrakce RNA

Extrakce RNA byla provedena pomocí Spectrum Plant Total RNA Kitu od firmy Sigma. Tento kit slouží k extrakci totální čisté RNA z rostlinných pletiv, které jsou nejprve v tekutém dusíku rozemlety na jemný prášek. Poté dochází k rozpadu těchto pletiv v lyzačním roztoku (Lysis solution), který z nich uvolní RNA a zároveň inaktivuje ribonukleázy a interferující sekundární metabolity. Po odstranění buněčného odpadu je RNA zachycena v kolonce za použití speciálního roztoku (Binding Solution), který efektivně zabrání polysacharidům a stejně dobře genomické DNA v zanášení kolonky. Většina reziduální genomické DNA a další nečistoty jsou následně odstraněny promývacím roztokem (Wash Solution). Pro citlivé technologie jako qRT-PCR, která byla v našem pokusu použita pro zkoumání míry exprese izoalergenů, je nutné odstranit i stopová množství DNA, a proto byl proces extrakce RNA obohacen o krok, ve kterém byla přidána DNáza. K tomuto účelu byl použit On-Column DNase 1 Digest Set také od firmy Sigma. Na závěr je vyčištěná RNA vyluhována pomocí elučního roztoku (Elution Solution). Takto vyčištěná RNA byla následně převedena do cDNA, která byla použita pro qRT-PCR.

Během extrakce RNA je důležité se vyhnout kontaminaci všudypřítomnými a velmi stabilními enzymy, tzv. RNázami. RNázy také nazývané ribonukleázy katalyzují degradaci RNA na malé komponenty. Je důležité vyhnout se kontaminaci RNázami z vnějšího prostředí během preparace RNA, především během finální promývací fáze. Vnitřní RNázy jsou denaturovány lyzačním roztokem během extrakce. Aby bylo pracovní prostředí čisté a bez RNáz, byl při práci v laboratoři použit speciální přípravek inhibující RNázy RNaseZAP™ od

firmy Sigma, kterým byl ošetřen povrch pracovní plochy, laboratorních nástrojů i rukavic. Byly použity pomocí autoklávu vysterilizované laboratorní nástroje a nové čisté plastové zkumavky a špičky na pipety.

4.2.1 Příprava vzorku a potřebných roztoků

4.2.1.1 Příprava vzorku rostlinného pletiva

Předem zmrzlý vzorek jablečné slupky nebo dužniny byl důkladně rozdrcen pomocí tloučku a třecí misky za soustavného přilévání tekutého dusíku. Třecí miska s tloučkem byla předem vyautoklávována a ošetřena sprejem inhibujícím RNázu, stejně jako pracovní povrch a rukavice. Poté bylo do sterilních 2ml zkumavek naváženo 100 mg jemně rozdrceného vzorku, který byl v uzavřené zkumavce vložen do nádoby s tekutým dusíkem.

4.2.1.2 Příprava lyzačního pufru

Do lyzačního roztoku (Lysis Solution) bylo nutné před použitím přidat 2-merkapt ethanol (2-ME) v poměru 100:1. Množství připravovaného pufru bylo vyhodnoceno dle počtu vzorků. Na každý vzorek pufr obsahoval 500 μ l Lysis Solution a 5 μ l 2-ME.

4.2.1.3 Příprava promývacího roztoku Wash Solution 2

Tento promývací roztok je v kitu dodáván jako koncentrát a je nutné ho naředit patřičným množstvím (určeno dle tabulky podle velikosti používaného kitu) 96 % ethanolu, který napomáhá vysrážení RNA a její navázání na kolonku. Promývací roztok byl po zředění ethanollem lehce promíchán a uchováván v těsně uzavřené nádobě, aby nedocházelo k odpařování ethanolu.

4.2.2 Proces extrakce

4.2.2.1 Rozklad pletiv a odstranění buněčných zbytků

Ke každému vzorku s rozemletým pletivem bylo přidáno 500 μ l připraveného lyzačního pufru (Lysis solution + 2-ME) a poté byly vzorky důkladně promíchány na vibrační třepačce po dobu alespoň 30 sekund. Poté byla provedena inkubace vzorků po dobu 3 minuty při 56 °C v termocykleru a následně jejich centrifugace po dobu 10 minut. Centrifuga byla nastavena na 12 000 RCF a teplotu 10 °C. Mezitím byly připraveny nové sterilní 2ml zkumavky s filtračními kolonkami, do kterých byla následně přelita tekutina nad sedimentem (supernatant). Po uzavření zkumavek s filtračními kolonkami byly vzorky 1 minutu při 20 °C na 12 000 RCF

centrifugovány, aby vzorek prošel filtrem, na kterém se zachytily buněčné zbytky, které byly následně i s filtračními kolonkami zlikvidovány.

4.2.2.2 Vysrážení RNA a její zachycení v kolonce

Do zkumavek s vyčištěným vzorkem, které byly umístěny na led (do chladicího stojanu s ledem), bylo přidáno 750 μ l roztoku na vysrážení nukleové kyseliny (Binding solution). Poté byly zkumavky se směsí alespoň 5krát krátce promíchány na vibrační třepačce a navráceny na led. Do připravených a popsaných sterilních 2 ml zkumavek s kolonkami pro zachycení RNA (Binding Column) bylo přidáno 600 μ l z promíchaného vzorku. Po uzavření byly vzorky 1 minutu na 12 000 RCF při 20 °C centrifugovány, aby se na kolonky navázala RNA a mohla protéct zbylá kapalina, která byla po centrifugaci odlita a zkumavky byly osušeny na čisté buničině. Do stejných zkumavek byly zpět vloženy kolonky a do nich byla přidána zbývající část příslušného původního vzorku. Poté byl zopakován proces centrifugace a odlití filtrátu.

4.2.2.3 Promývací fáze (odstranění nečistot)

Během promývací fáze, ve které byly použity promývací roztoky Wash Solution 1 a 2 byla z RNA zachycené na kolonkách odstraněna většina reziduální DNA a další nečistoty. Pro důkladné odstranění všech zbytků DNA, které je v našem případě nutné, byl proces obohacen o krok, ve kterém byla přidána směs DNázy a pufru. Do zkumavek s kolonkami se zachycenou RNA bylo přidáno nejprve po 300 μ l 1. promývacího roztoku (Wash solution 1). Po uzavření zkumavek byly vzorky 1 minutu na 12 000 RCF při 20 °C centrifugovány, poté byla odlita reziduální tekutina a po osušení zbytků tekutiny na zkumavkách o čistou buničinu byly kolonky navráceny zpět do zkumavek. Pro kompletní odstranění zbytků DNA byl namíchan směsný roztok obsahující 10 μ l DNázy (DNase I) a 70 μ l pufru (DNase digestion buffer) na každý vzorek. Po smíchání patřičného množství těchto 2 složek byla směs jemně promíchána pipetou. Na střed kolonky každého vzorku bylo přidáno 80 μ l připraveného roztoku DNázy, která byla ponechána v uzavřených zkumavkách 15 minut při pokojové teplotě. Po uplynutí 15 minut byl zopakován stejný proces jako při 1. promývání, s rozdílem v množství Wash Solution 1, které bylo tentokrát na každou kolonku přidáno 500 μ l, dále byla opět provedena minutová centrifugace na 12 000 RCF při 20 °C, odlita reziduální kapalina s rozloženou DNA a kolonky navráceny do prázdné osušené zkumavky. Stejný postup promývání byl poté ještě dvakrát zopakován s předem namíchaným 2. promývacím roztokem (Wash Solution 2). Na závěr této fáze byly zkumavky s kolonkami naposledy 1 minutu na 12 000 RCF při 20 °C centrifugovány na sucho s cílem odstranění zbytků promývacího roztoku.

4.2.2.4 Vyluhování vyčištěné RNA z kolonky

Kolonky byly přemístěny do nových sterilních 2 ml zkumavek a následně bylo na střed filtru kolonek přidáno po 50 μ l elučního roztoku (Elution Solution). Zkumavky byly poté uzavřeny a ponechány 5 minut při pokojové teplotě v klidu. Po klidové fázi byly zkumavky s kolonkami a elučním roztokem 1 minutu na 12 000 RCF při 20 °C centrifugovány. Abychom měli jistotu co největšího výtěžku a důkladného promytí kolonky od RNA, byl roztok ze zkumavky znovu přidán na stejnou kolonku a proces centrifugace opakován.

4.2.2.5 Finální produkt extrakce RNA

Finálním produktem celého procesu extrakce pomocí kitu byla čistá totální RNA extrahovaná z rostlinného materiálu. Výtěžek extrakce z jednotlivých vzorků byl změřen na UV spektrofotometru, konkrétně šlo o NanoPhotometer od firmy Implen, a výsledné koncentrace RNA zaznamenány. Roztok s RNA byl nejprve lehce promíchán pipetou a poté z něj byla nanesena 3 μ l kapka na kyvetu spektrofotometru, který byl nastaven na vlnovou délku 260 nm. Po zjištění výtěžku z jednotlivých variant byly všechny 3 varianty od jedné odrůdy zceleny do zkumavky. Extrahovanou RNA je nutné skladovat v mrazáku (krátkodobé skladování v -20 °C), v našem případě však byly vzorky většinou rovnou převedeny do cDNA.

4.3 Přepis RNA do cDNA

Proces přepisu zralé mRNA (po sestřihu, tj. bez intronů a nekódujících sekvencí) do cDNA nazýváme zpětná (reverzní) transkripce a je katalyzován enzymem reverzní transkriptázou. Přepis byl realizován pomocí Transcription First Strand cDNA Synthesis Kitu od firmy Roche a univerzálního polyA primeru. Na polyA konec mRNA se nejprve musí navázat oligo(dT)₁₈ primer, který byl použit v koncentraci 2,5 μ M. Námi vytvořený vzorek o známé koncentraci RNA (průměrná koncentrace zcelených vzorků od 1 odrůdy) je nutné naředit ve správném poměru vodou PCR H₂O od firmy Roche (RNase free), aby do samotné PCR vstupoval vždy 1 μ g čisté templátové RNA. Celkový objem naředěného směsného vzorku je 13 μ l. V tomto procesu je velmi důležitý teplotní cyklus, a proto byl přepis realizován pomocí termocykleru metodou RT-PCR.

Nejprve byl vzorek inkubován po dobu 10 minut při teplotě 60 °C, při které dochází k denaturaci RNA a tím k degradaci sekundárních struktur jako jsou vlásenky, které by mohly bránit správnému průběhu reakce. Poté byl vzorek rychle ochlazen a byly přidány komponenty potřebné pro reverzní transkripci, jako je pufr, deoxynukleotidy, inhibitor RNázy a reverzní

transkriptáza. Množství těchto komponentů na 1 vzorek je uvedeno tabulce 1. Počtem vzorků vstupujících do reverzní transkripce (plus rezerva cca 2 vzorky) pomocí RT-PCR bylo vynásobeno množství jednotlivých komponentů, ze kterých byla připravena směs. Z této směsi bylo pak ke každému vzorku přidáno odpovídající celkové množství, tj. 7 μ l.

Číslo zkumavky s komponentem	Název komponentu od firmy Roche potřebného pro RT-PCR (reverzní transkripce)	Množství na 1 vzorek
2	Transcriptor RT Reaction Buffer	4 μ l
3	Protector RNase Inhibitor	0,5 μ l
4	dNTP Mix	2 μ l
1	Transcriptor Reverse Transcriptase	0,5 μ l
Celkový objem namíchané směsi komponentů na 1 vzorek:		7 μl

Tabulka 1 Komponenty od firmy Roche potřebné pro reverzní transkripci a jejich množství na 1 vzorek

Vzorky byly vloženy do termocykleru a bylo na ně působeno teplotou 50 °C po dobu 60 minut. Během této doby byla RNA přepsána díky působení reverzní transkriptázy a dalších komponentů do cDNA. Po dokončení procesu zpětné transkripce byla po dobu 5 minut teplota zvýšena na 85 °C, aby došlo k inaktivaci reverzní transkriptázy. Výsledkem reverzní transkripce je stabilnější dvouřetězcová nukleová kyselina cDNA, která může být následně dále použita pro Real-time PCR. V případě skladování musela být cDNA skladována při teplotě -80 °C.

4.4 Kvantitativní Real-time PCR (qRT-PCR)

Vzorky pro Real-time PCR amplifikaci byly pro vstup do samotné reakce připraveny pomocí kitu FastStart Essential DNA Green Master od firmy Roche. Do qRT-PCR vstupuje naředěná cDNA, která byla vytvořena reverzní transkripcí při RT-PCR (reverzně transkriptázová PCR) z původní RNA extrahované z rostlinného materiálu. V 1 μ l roztoku cDNA, který vstupuje do reakce, je obsažen produkt reverzní transkripce, vzniklý z 0,25 ng celkové extrahované RNA. Všechny potřebné komponenty pro Real-time PCR kromě primerů jsou obsaženy ve speciálním roztoku, tzv. Mastermixu. Do jedné zkumavky, která je součástí

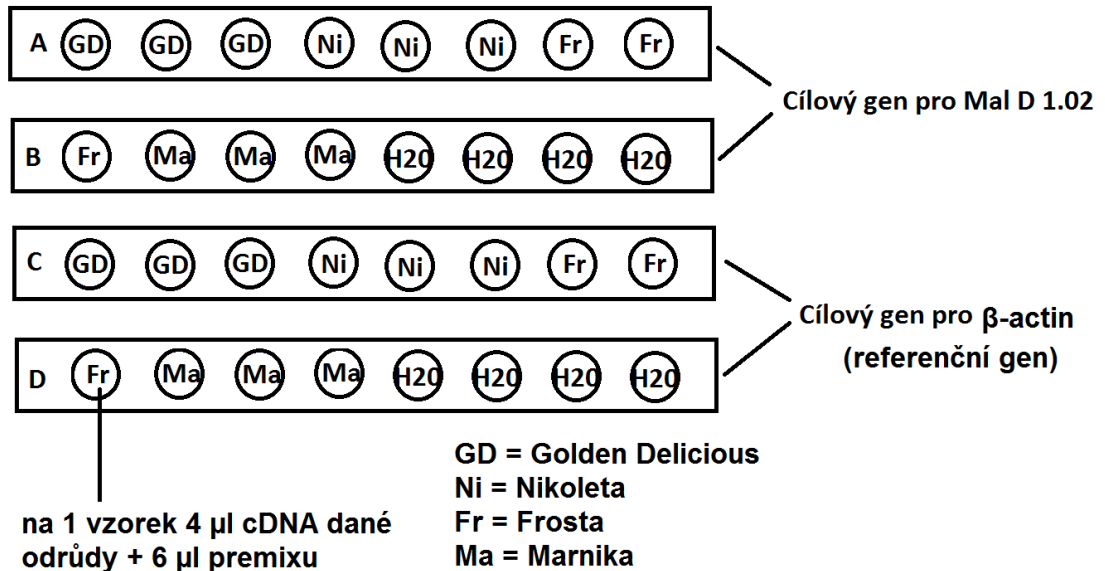
stripu vstupujícího do reakce, byly tedy přidány 4 μ l naředěné cDNA určité odrůdy a 6 μ l premixu, což je předem připravená směs dalších komponentů v daných poměrech přepočítaných na počet vzorků.

Primery byly nejprve naředěny vodou tak, aby vznikly roztoky o koncentraci 10 μ M. V premixu bylo obsaženo 5 μ l Mastermixu, 0,5 μ l roztoku F-primeru (forwardový p.) a 0,5 μ l roztoku R-primeru (reverzový p.) na 1 zkumavku. Po smíchání jednotlivých komponent v množství přepočítaném na počet vzorků byl premix promíchán na vibrační třepače.

Vzhledem k tomu, že pomocí qRT-PCR zjišťujeme relativní expresi genů, je nutné pro vnitřní kontrolu použít tzv. referenční (srovnávací) gen. K tomuto účelu se využívají tzv. housekeepingové geny. V našem případě byl jako referenční gen použit aktin 7, jehož exprese byla posléze relativně porovnávána s expresí některého z izoalergenů Mal d 1. Aby mohly být míry exprese těchto 2 genů porovnány, musí do reakce vstupovat 2 varianty vzorků s odlišnými primery. V jedné variantě byly do premixu přidány primery komplementární na gen pro β -actin, ve druhé primery komplementární na gen kódující konkrétní izoalergen.

Vzorky připravené pro vstup do qRT-PCR byly napipetovány do 4 stripů označených A–D po 8 vzorcích. Do reakce tedy vstupovalo celkem 32 vzorků, na 2 stripech (16 vzorků) byla zkoumána míra exprese aktinu 7 a na dalších 2 stripech míra exprese konkrétního izoalergenu. Vždy byla v reakci použita odrůda Golden Delicious, která sloužila jako kalibrátor (slupka ze sklizně 2016, exprese Mal d 1.01 okamžitě po sklizni) a PCR H₂O (také v množství 4 μ l na vzorek), která sloužila jako negativní kontrola. Naředěná cDNA jednotlivých odrůd vstupovala do reakce ve více (v našem případě 3 – viz. obr. 21) variantách. Stripy byly po naplnění pevně uzavřeny a vloženy do LightCycler Nano Instrument od firmy Roche, ve kterém podstoupily Real-time PCR se všemi teplotními fázemi.

**Stripy se vzorky cDNA odrůd,
u kterých byla pomocí qRT-PCR zkoumána
relativní exprese izoalergenu Mal d 1.02**



Obrázek 21 Příklad obsazení jamek stripů se vzorky, které byly vloženy do Nano Light Cycleru, kde podstoupily qRT-PCR, zdroj: <vlastní obrázek>

LightCycler Nano Instrument je speciální typ termocykleru, který je schopen detekovat míru fluorescence, kterou vydává fluorescenční substrát navázaný na dvouřetězcovou amplifikovanou molekulu DNA a tím monitoruje její přibývající množství. Je propojen s počítačovým programem, ve kterém byla předem nastavena lokace jednotlivých odrůd a variant v rámci stripů. LightCycler musel nejprve vzorky zahřát na teplotu 95 °C pro denaturaci a aktivaci Taq DNA polymerázy (změna teploty: 5 °C/s) po dobu 10 minut. Dále následovala amplifikace ve 3 fázích. Nejprve byly vzorky vystaveny teplotě 95 °C po dobu 20 sekund (změna teploty: 5 °C/s), poté teplotě 61 °C pro všechny primerové páry také po dobu 20 s. (změna teploty 4 °C/s) a na závěr 20 s. při 72 °C (změna teploty: 5 °C/s). Tyto 3 fáze amplifikace byly zopakovány celkem ve 40 cyklech.

Míra exprese zkoumaných genů byla programem vyhodnocena graficky v podobě reakčních křivek a zaznamenáním Cq hodnot. Pro statistické vyhodnocení výsledků je nutné tyto údaje dále zpracovat (viz. metoda relativní kvantifikace ΔCq a $\Delta\Delta Cq$).

Primerové páry použité pro amplifikaci 4 vybraných izoform alergenu Mal d 1 (Mal d 1.01, Mal d 1.02, Mal d 1.06A a Mal d 1.06B) a referenčního genu aktinu jsou uvedeny v tabulce 2.

Izoforma	Označení primeru podle Pagliarani et al. (2013)	Sekvence primeru 5'-3'
Mal d 1.01	qMd1.01/02F	GATTGAAGGAGATGCTTTGACA
	qMd1.01R	GTAATGACTGATGCTCTTGATGG
Mal d 1.02	qMd1.01/02F	GATTGAAGGAGATGCTTTGACA
	qMd1.02R	TTGGTGTGGTAGTGGCTGATA
Mal d 1.06A	qMd1.06AF	CTATAGCTATAGCTTGATTGAAGGG
	qMd1.06AR	TTCCAACCTTAACATGTTCTTCT
Mal d 1.06B	qMd1.06BF	AAACCGAATACGCATCCATT
	qMd1.06BR	ACAGTTTTGACTGCTTGTGGAG
Aktin 7	actin F	CTATGTTCCCTGGTATTGCAGACC
	actin R	GCCACAACCTTGTTTTTCATGC

Tabulka 2 Primerové páry použité pro amplifikaci vybraných genů v qRT-PCR (Pagliarani et al., 2013).

4.5 Zpracování dat z qRT-PCR

4.5.1 Stanovení parametrů relativní kvantifikace exprese Ratio ΔCq a $\Delta\Delta Cq$

Jak již bylo zmíněno, výchozí data (hodnoty Cq) z přístroje LightCycler Nano, na kterém probíhala qRT-PCR sloužila jako vstupní hodnoty pro výpočet vlastních parametrů relativní kvantifikace exprese studovaných izoform. Relativní exprese byla sledována na základě 2 typů normalizací. První normalizace představovala vyjádření relativní exprese vstažené k expresi referenčního genu pro aktin 7. Tento způsob vyjádření relativní exprese je v diplomové práci charakterizován jako parametr Ratio ΔCq . Druhým způsobem vyjádření relativní exprese byla normalizace vstažená k expresi izoformy Mal d 1.01 ve slupce plodů v odrůdě Golden Delicious z VŠÚO Holovousy analyzované bezprostředně po sklizni. Tento parametr v diplomové práci představuje hodnoty Ratio $\Delta\Delta Cq$. Pro použití metody $\Delta\Delta Cq$ je nutné, aby se hodnoty eficienty amplifikací studovaných izoform a aktinu 7 vzájemně minimálně lišily. Toto prokázala studentka FAPPZ ČZU v Praze Tereza Zunová při řešení své diplomové práce (Zunová, 2018). Pro výpočet potřebných parametrů Ratio ΔCq a Ratio $\Delta\Delta Cq$ byl využit program Microsoft Excel, ve kterém byl vytvořen program na základě algoritmů,

kteře uvádí např. Perkins et al. (2012), kam byla průběžně zadávána výchozí data z programu LightCycleru.

4.6 Ověření reprezentativnosti přípravy směšného vzorku

Pro tento experiment bylo náhodně vybráno 5 plodů z různé části koruny 1 stomu odrůdy Golden Delicious z výsadeb VŠÚO Holovousy sklizně v září 2016. Pro experiment byla použita slupka odebíraná okamžitě po sklizni. Byla extrahovaná RNA ze směšného vzorku tvořeného ekvivalentními navážkami všech 5ti plodů. Tento směšný vzorek je v diplomové práci označen písmenem S. Dále byla extrahována RNA ze směšných vzorků odpovídajícím všem 10 možným kombinacím 3 různých plodů. Tyto směšné vzorky jsou označeny čísly 1-10.

4.7 Sekvenační analýza

Byla provedena sekvenační analýza studovaných izoforem Mal d 1 u zahraničních odrůd a odrůd vypěstovaných v České republice. Pro tuto analýzu byly vybrány 3 odrůdy vyšlechtěné ve VŠÚO Holovousy s.r.o., konkrétně Nikoleta, Reluga a Frosta a ty byly porovnávány s americkou odrůdou Golden Delicious. Amplikony studovaných izoforem byly separovány ve 2 % agarózovém gelu v TBE pufru. Následně byl pro extrakci DNA použit GeneJET Gel Extraction Kit od firmy Thermo SCIENTIFIC. Sekvence každého amplikonu byla provedena ve 3 kopiích od obou primerů, na což byl využit 3.1 Cycle Sequencing Kit od firmy Thermo SCIENTIFIC, konkrétně Big Dye Terminator a kapilární elektroforéza ABI PRISM 310 rovněž od firmy Thermo SCIENTIFIC. Výsledné sekvence byly porovnávány pomocí programu BioEdit version 7.2.5 s mezinárodní nukleotidovou databází NCBI (Hall, 1999).

4.8 Statistické zpracování výsledků

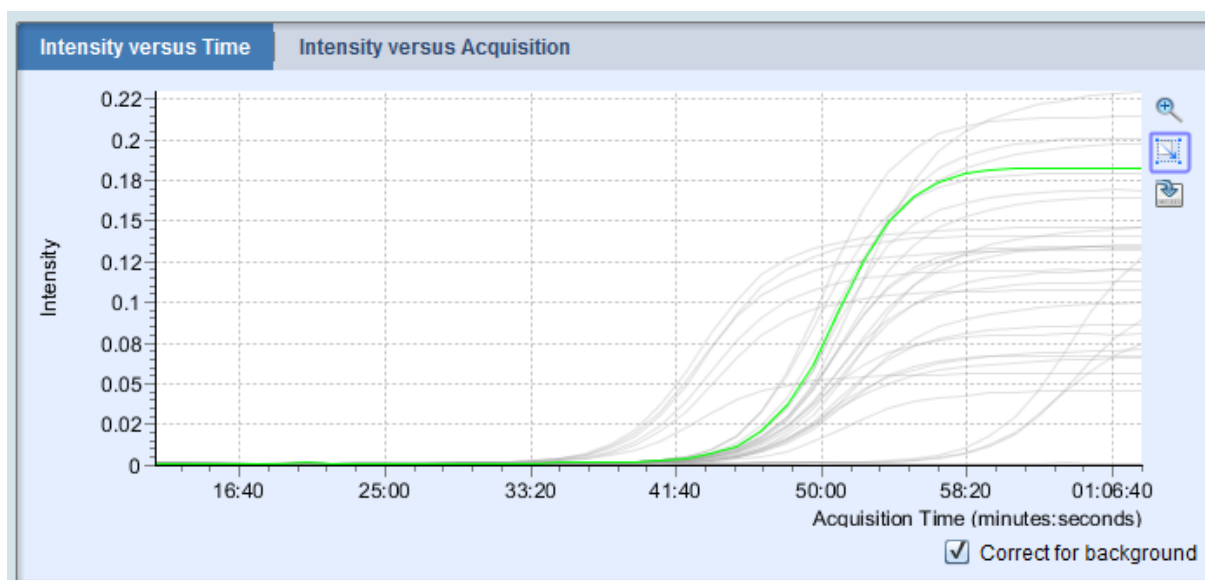
Jak již bylo uvedeno, při prezentaci dat ze studie profilu genové exprese by měla být data vždy normalizována vnitřní kontrolou (Schmittgen et Livak, 2008). Pro statistické zpracování byly tedy použity relativní parametry Ratio ΔCq a Ratio $\Delta\Delta Cq$ vypočítané v tabulkách programu Microsoft Excel. Byla hodnocena relativní exprese jednotlivých izoalergenů vzhledem k referenčnímu genu pro aktin 7, která je vyjádřena hodnotou Ratio ΔCq . Tyto hodnoty byly seříděny dle 4 faktorů, typu pletiva (dužnina nebo slupka), doby analýzy plodů (před nebo po skladování), typu izoformy alergenu Mal d 1 (Mal d 1.01, Mal d 1.02, Mal d 1.06A a Mal d 1.06B) a dle odrůdy (celkem 14 odrůd – viz. tabulka použitých odrůd). Hodnoty Ratio ΔCq a Ratio $\Delta\Delta Cq$ byly graficky vyhodnoceny složenými sloupcovými grafy v programu Microsoft Excel. Kromě programu Microsoft Excel byl pro statistickou analýzu použit také

program Dell Statistica version 13 (Dell Inc. 2015), především pro porovnání statisticky významných rozdílů hodnot ΔC_q v rámci jednotlivých třídících faktorů. V tomto programu bylo provedeno testování homogenity rozptylů všech třídících kritérií pomocí Cochranova, Hartletova, Bartleyova a Leveneova testu na hladině významnosti $\alpha = 0,05$. Na základě testu normality rozdělení hodnot ΔC_q pomocí histogramu a P-grafu, ze kterého vyšlo najevo, že vstupní data normálnímu rozdělení neodpovídají, byl pro statistickou analýzu vybrán Kruskal-Wallisův test, kterým bylo hodnoceno, zda jsou rozdíly těchto hodnot v rámci třídících parametrů statisticky významné či nikoliv. Kruskal-Wallisův test byl rovněž použit pro vyhodnocení experimentu zaměřeného na přípravu směsného reprezentativního vzorku. Tyto analýzy byly rovněž provedeny pomocí programu Dell Statistica version 13 (Dell Inc. 2015). Pomocí tohoto programu byla také vyhodnocena závislost exprese izoforem Mal d 1 na skladování (regresní a korelační analýza).

5 Výsledky

Celkem bylo získáno 2016 hodnot Ratio ΔC_q , které vypovídají o relativní expresi 4 izoform alergenu Mal d 1 vzhledem k referenčnímu genu pro aktin 7, a stejný počet hodnot Ratio $\Delta\Delta C_q$, které byly normalizovány k referenčnímu genotypu odrůdy Golden Delicious (slupka ze sklizně 2016, exprese Mal d 1.01 okamžitě po sklizni), která sloužila jako kalibrátor. Těchto 2016 hodnot zahrnuje 224 různých variant kombinací jednotlivých třídících faktorů (odrůda, typ pletiva, izoforma a skladování) v 9 měřeních. Z těchto 9 měření byl pomocí programu Microsoft Excel vypočítán medián. Pomocí tohoto programu byly také vypočítány samotné hodnoty Ratio ΔC_q a Ratio $\Delta\Delta C_q$ z původních C_q hodnot vycházejících z programu Light Cycleru.

Na obrázku 22 je pro představu zobrazena ukázka, jak vypadaly amplifikační křivky v grafickém výstupu programu LightCycleru. Křivky, které přechází dříve do exponenciální fáze (nižší C_q hodnota), obecně patří více exprimovaným genům. V tomto případě se jedná o izoformy Mal d 1.01 a Mal d 1.02, které se v porovnání s dalšími dvěma testovanými izoformami (Mal d 1.06A a Mal d 1.06B) exprimují mnohem více. Jedná se o výstup testování různých izoform Mal d 1 charakterizující jejich expresi ve slupce odrůdy Golden Delicious.



Obrázek 22 Grafický výstup z programu přístroje LightCycler Nano Instrument od firmy Roche

5.1 Celkový přehled stanovených hodnot Ratio ΔCq a $\Delta\Delta Cq$

Na následujících stránkách se nacházejí tabulky (tabulka 3 a 4) mediánů získaných hodnot Ratio ΔCq , Ratio $\Delta\Delta Cq$ a jejich variability určené variačním koeficientem (%). Dále jsou zde pro srovnání vyobrazeny skládanými sloupcovými grafy (graf 1 až 8), které vyjadřují míru exprese zkoumaných izoform alergenu Mal d 1 před a po skladování. Tyto výsledky jsou pro lepší přehlednost rozděleny do 2 částí podle zkoumaného rostlinného pletiva (dužnina a slupka). Tabulka 3 a následující grafy (graf 1 až 4) jsou věnovány dužnině, tabulka 4 a následující grafy (graf 5 až 8) jsou věnovány slupce. Míra exprese je tedy znázorněna ve 4 grafech pro každý typ pletiva, u každého typu 2 grafy (před a po skladování) relativních hodnot Ratio ΔCq a 2 grafy (před a po skladování) normalizovaných hodnot Ratio $\Delta\Delta Cq$. Jednotlivé odrůdy jsou ve sloupcových grafech seřazeny dle součtu hodnot Ratio ΔCq a Ratio $\Delta\Delta Cq$ sestupně od nejvyšší k nejnižší.

Téměř ze všech grafů je evidentní značně vyšší exprese prvních dvou izoform, Mal d 1.01 a Mal d 1.02, v porovnání s izoformami Mal d 1.06A a Mal d 1.06B, což souvisí s tím, že získané hodnoty neodpovídají normálnímu rozdělení.

		Izoformy Mal d 1															
		Mal d 1.01				Mal d 1.02				Mal d 1.06A				Mal d 1.06B			
Odrůda	Skladování*	Ratio ΔCq	Vk [%]	Ratio ΔΔCq	Vk [%]	Ratio ΔCq	Vk [%]	Ratio ΔΔCq	Vk [%]	Ratio ΔCq	Vk [%]	Ratio ΔΔCq	Vk [%]	Ratio ΔCq	Vk [%]	Ratio ΔΔCq	Vk [%]
Artiga	A	36,721	3,723	58,260	3,671	32,062	1,314	50,867	1,640	0,125	1,239	0,199	1,587	0,317	1,237	0,503	1,586
Artiga	B	25,571	1,382	40,570	1,689	22,296	0,788	35,373	1,306	0,059	0,487	0,094	1,168	0,035	0,863	0,055	1,348
Flordika	A	9,671	0,997	15,344	1,428	22,560	0,859	35,793	1,346	0,111	1,089	0,176	1,486	0,281	1,358	0,445	1,672
Flordika	B	28,921	0,695	45,884	1,258	37,602	1,000	59,657	1,429	1,097	1,220	1,740	1,574	0,348	1,314	0,552	1,640
Frosta	A	12,542	0,481	19,898	1,166	19,604	0,921	31,102	1,381	1,148	1,090	1,821	1,487	0,053	1,907	0,084	2,095
Frosta	B	96,249	0,682	152,703	1,252	89,975	1,360	142,749	1,673	22,287	1,267	35,359	1,607	0,117	0,789	0,186	1,307
Golden Delicious	A	25,999	1,043	41,249	1,456	59,939	1,239	95,096	1,587	2,257	1,633	3,580	1,878	0,676	1,233	1,072	1,583
Golden Delicious	B	29,407	1,004	46,655	1,432	62,699	0,814	99,475	1,320	10,841	1,148	17,200	1,525	0,041	1,564	0,066	1,825
Idared	A	18,534	1,200	29,405	1,560	43,900	1,448	69,648	1,738	2,928	0,913	4,646	1,376	0,080	1,415	0,126	1,713
Idared	B	58,298	0,788	92,492	1,306	80,010	1,325	126,939	1,648	23,941	1,198	37,984	1,559	0,027	1,180	0,043	1,547
Jonagold	A	65,801	0,683	104,395	1,253	80,879	0,620	128,318	1,223	4,805	1,018	7,623	1,441	0,580	1,232	0,920	1,582
Jonagold	B	76,767	1,068	121,793	1,472	94,012	1,253	149,153	1,597	3,657	1,066	5,802	1,471	0,261	1,133	0,415	1,515
Jonagold Marnika	A	24,314	0,992	38,576	1,425	45,007	1,003	71,405	1,432	0,613	1,630	0,972	1,875	0,020	1,157	0,031	1,531
Jonagold Marnika	B	110,492	1,449	175,300	1,738	87,069	1,138	138,138	1,518	11,493	0,352	18,234	1,124	0,083	1,613	0,131	1,862

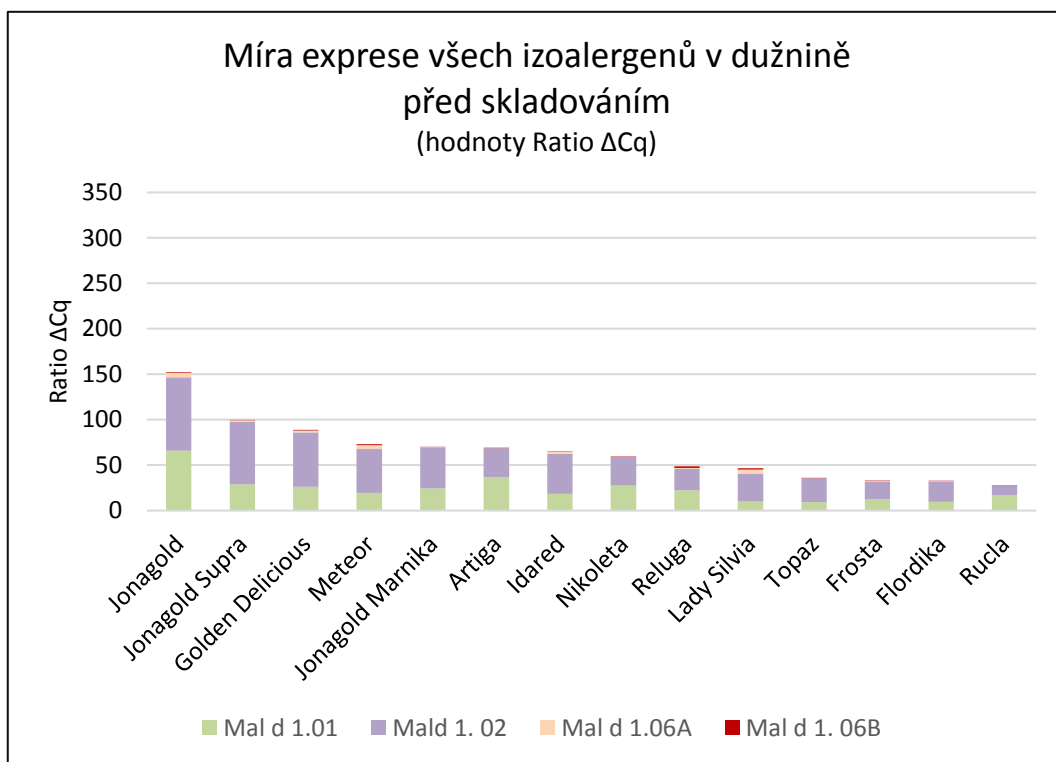
*A = Před skladováním / B = Po skladování

Tabulka 3 Mediány výsledných hodnot Ratio ΔCq a Ratio ΔΔCq a jejich variační koeficienty u analyzovaných vzorků dužniny plodů před a po skladování - 1. část

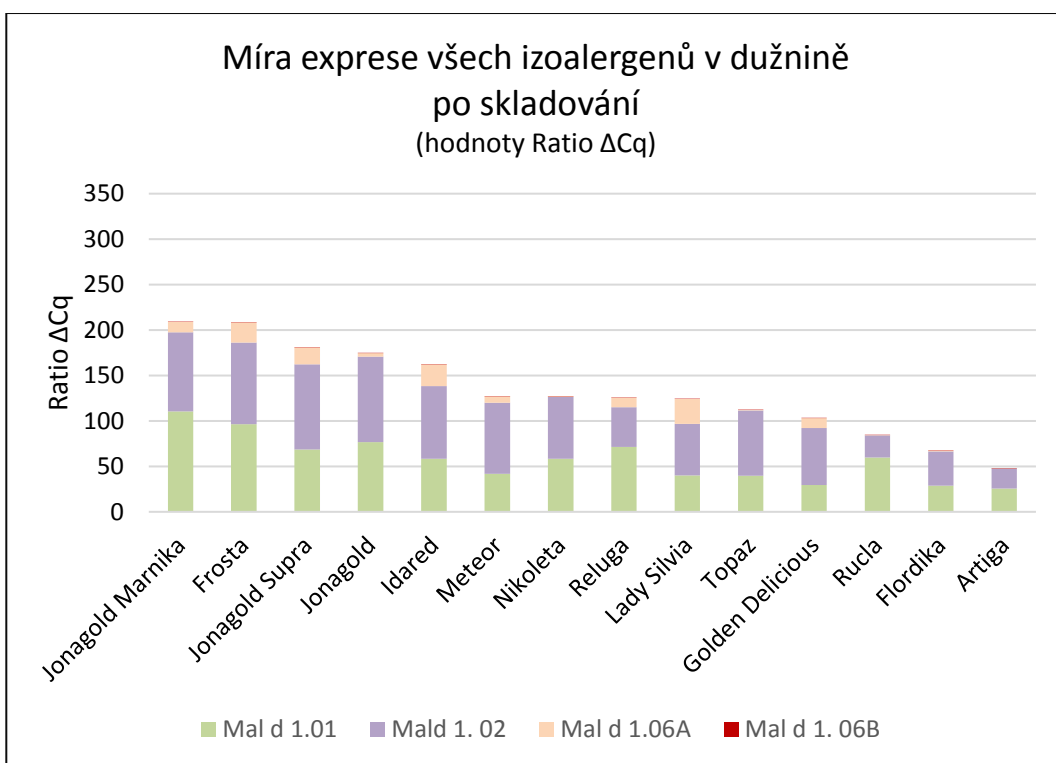
		Izoformy Mal d 1															
		Mal d 1.01				Mal d 1.02				Mal d 1.06A				Mal d 1.06B			
Odrůda	Skladování*	Ratio ΔCq	Vk [%]	Ratio $\Delta\Delta Cq$	Vk [%]	Ratio ΔCq	Vk [%]	Ratio $\Delta\Delta Cq$	Vk [%]	Ratio ΔCq	Vk [%]	Ratio $\Delta\Delta Cq$	Vk [%]	Ratio ΔCq	Vk [%]	Ratio $\Delta\Delta Cq$	Vk [%]
Jonagold Supra	A	28,821	0,984	45,726	1,420	68,995	1,148	109,463	1,525	1,586	1,273	2,516	1,611	0,182	1,455	0,289	1,743
Jonagold Supra	B	68,470	1,042	108,631	1,456	93,791	0,883	148,804	1,359	18,641	2,598	29,575	2,675	0,187	1,904	0,297	2,092
Lady Silvia	A	9,913	0,665	15,728	1,244	30,492	0,760	48,377	1,291	4,610	1,144	7,314	1,523	1,636	1,678	2,596	1,913
Lady Silvia	B	39,922	1,349	63,338	1,665	56,916	1,227	90,300	1,579	27,368	1,250	43,421	1,595	0,499	1,231	0,792	1,582
Meteor	A	19,423	0,784	30,816	1,304	48,215	1,005	76,494	1,433	4,392	1,059	6,967	1,467	0,954	1,038	1,514	1,453
Meteor	B	41,800	1,200	66,317	1,560	78,271	1,122	124,181	1,508	6,981	0,826	11,075	1,327	0,301	1,427	0,477	1,722
Nikoleta	A	27,411	0,430	43,489	1,148	31,803	1,070	50,456	1,474	0,219	1,416	0,348	1,713	0,022	1,194	0,035	1,556
Nikoleta	B	58,541	0,827	92,878	1,327	67,870	0,792	107,679	1,308	0,537	1,044	0,851	1,457	0,232	1,331	0,368	1,652
Reluga	A	22,378	0,332	35,504	1,119	23,438	1,254	37,185	1,598	1,143	1,094	1,813	1,489	1,562	1,468	2,478	1,752
Reluga	B	71,526	0,977	113,479	1,415	43,614	0,894	69,195	1,366	10,375	0,678	16,460	1,250	0,456	0,977	0,724	1,415
Rucla	A	16,823	0,932	26,691	1,388	10,603	1,181	16,822	1,547	0,029	1,484	0,046	1,764	0,044	1,331	0,070	1,652
Rucla	B	59,756	0,504	94,806	1,175	24,505	0,710	38,879	1,266	0,311	0,791	0,494	1,308	0,036	1,491	0,057	1,769
Topaz	A	9,171	1,025	14,550	1,445	26,417	0,935	41,911	1,390	0,004	1,009	0,006	1,435	0,030	1,289	0,048	1,622
Topaz	B	39,627	1,065	62,870	1,470	71,941	1,021	114,137	1,443	0,658	0,867	1,044	1,350	0,057	1,187	0,091	1,552

*A = Před skladováním / B = Po skladování

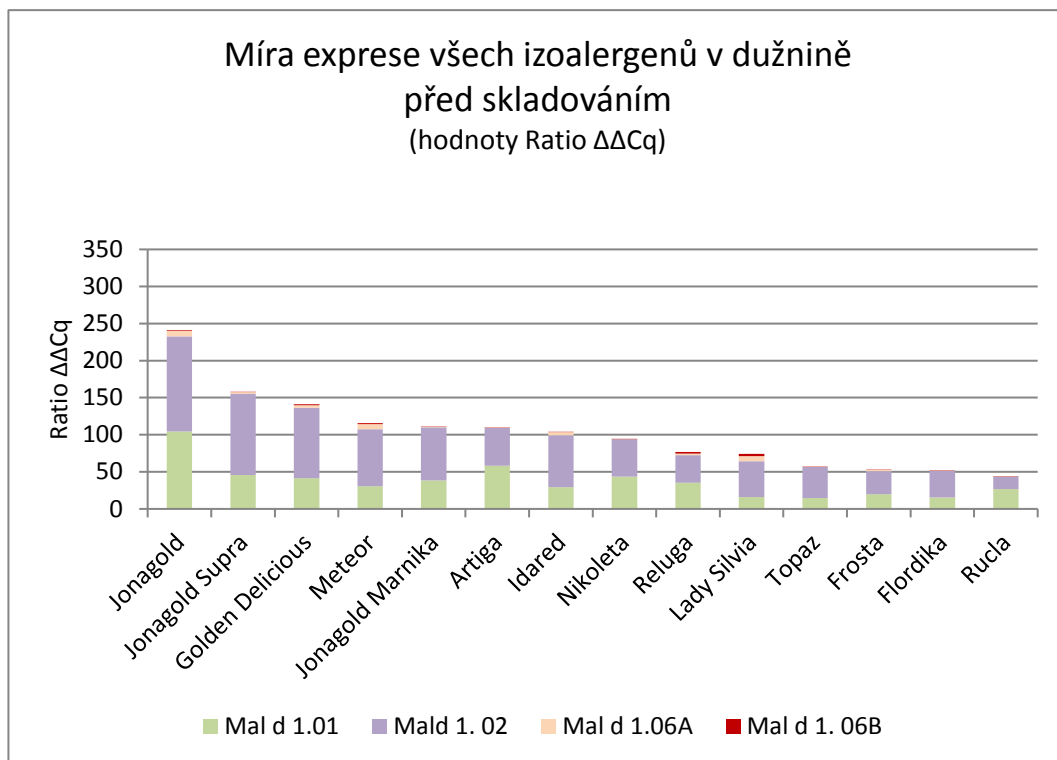
Tabulka 3 Mediány výsledných hodnot Ratio ΔCq a Ratio $\Delta\Delta Cq$ a jejich variační koeficienty u analyzovaných vzorků dužniny plodů před a po skladování - 2. část



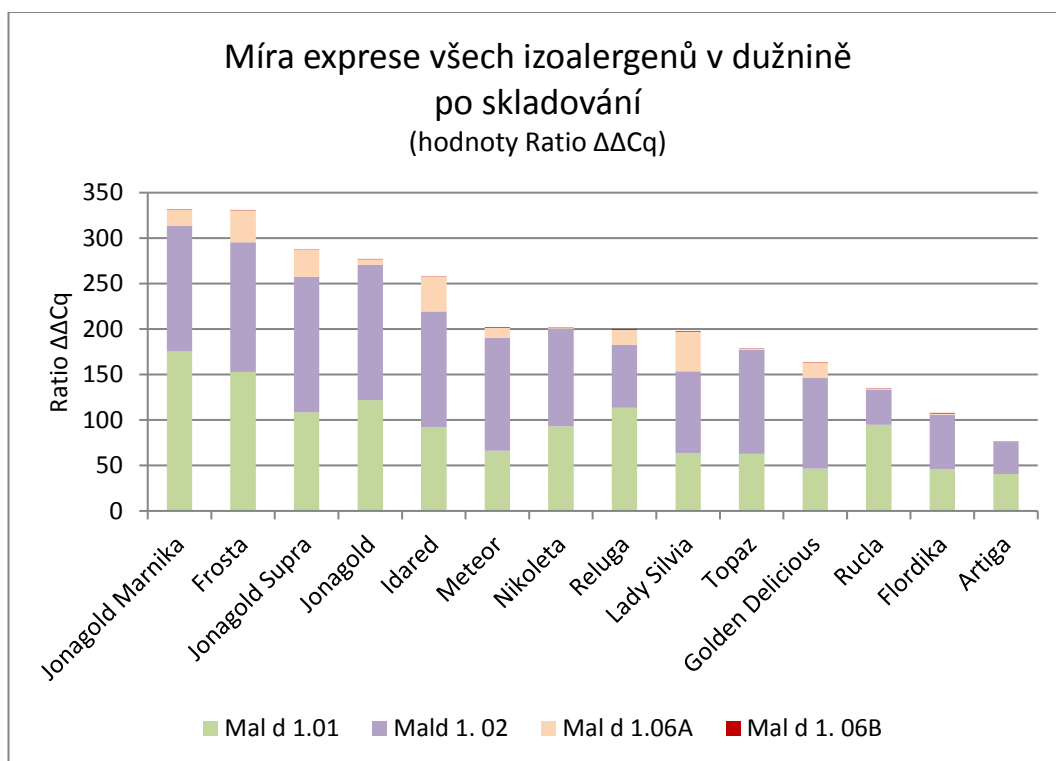
Graf 1 Součet hodnot Ratio ΔCq stanovených v dužnině před skladováním



Graf 2 Součet hodnot Ratio ΔCq stanovených v dužnině po skladování



Graf 3 Součet hodnot Ratio $\Delta\Delta Cq$ stanovených v dužnině před skladováním



Graf 4 Součet hodnot Ratio $\Delta\Delta Cq$ stanovených v dužnině po skladování

		Izoformy Mal d 1															
		Mal d 1.01				Mal d 1.02				Mal d 1.06A				Mal d 1.06B			
Odrůda	Skladování*	Ratio ΔCq	Vk [%]	Ratio $\Delta\Delta Cq$	Vk [%]	Ratio ΔCq	Vk [%]	Ratio $\Delta\Delta Cq$	Vk [%]	Ratio ΔCq	Vk [%]	Ratio $\Delta\Delta Cq$	Vk [%]	Ratio ΔCq	Vk [%]	Ratio $\Delta\Delta Cq$	Vk [%]
Artiga	A	59,884	1,303	95,009	1,632	78,034	0,737	123,804	1,280	2,253	1,203	3,575	1,562	1,204	1,207	1,911	1,565
Artiga	B	101,083	1,032	160,373	1,449	59,415	1,163	94,264	1,535	2,143	0,881	3,400	1,358	0,308	1,415	0,489	1,713
Flordika	A	29,251	0,966	46,407	1,409	46,638	1,322	73,994	1,646	1,346	0,830	2,136	1,329	2,906	1,074	4,611	1,477
Flordika	B	71,513	1,432	113,458	1,726	73,434	0,832	116,506	1,330	8,015	0,610	12,716	1,219	2,001	0,903	3,175	1,371
Frosta	A	44,144	1,477	70,036	1,759	71,993	1,303	114,219	1,632	14,147	1,017	22,444	1,440	2,250	1,337	3,569	1,656
Frosta	B	99,093	0,803	157,215	1,314	73,878	1,132	117,211	1,514	31,227	0,792	49,542	1,308	0,632	0,578	1,003	1,205
Golden Delicious	A	63,033	0,657	100,004	1,240	67,526	0,834	107,133	1,331	8,854	0,519	14,047	1,180	2,915	0,896	4,625	1,367
Golden Delicious	B	63,680	1,296	101,031	1,627	64,927	1,132	103,009	1,515	46,593	0,809	73,922	1,318	0,193	0,736	0,307	1,279
Idared	A	41,052	0,975	65,131	1,414	98,843	1,029	156,818	1,448	6,466	1,513	10,258	1,786	0,624	1,846	0,990	2,045
Idared	B	67,111	1,494	106,474	1,771	60,260	1,417	95,605	1,715	12,121	1,183	19,230	1,548	1,421	1,604	2,254	1,855
Jonagold	A	94,641	0,919	150,151	1,380	130,786	1,023	207,498	1,444	34,488	0,821	54,717	1,324	4,216	1,453	6,689	1,741
Jonagold	B	120,540	0,726	191,241	1,274	90,684	1,305	143,874	1,633	19,947	1,132	31,646	1,515	1,083	1,420	1,718	1,717
Jonagold Marnika	A	92,913	1,504	147,411	1,779	129,821	0,815	205,966	1,321	21,817	0,771	34,613	1,297	2,151	0,691	3,413	1,257
Jonagold Marnika	B	130,454	0,962	206,970	1,406	78,564	1,449	124,645	1,738	16,127	0,790	25,586	1,307	0,189	1,698	0,301	1,928

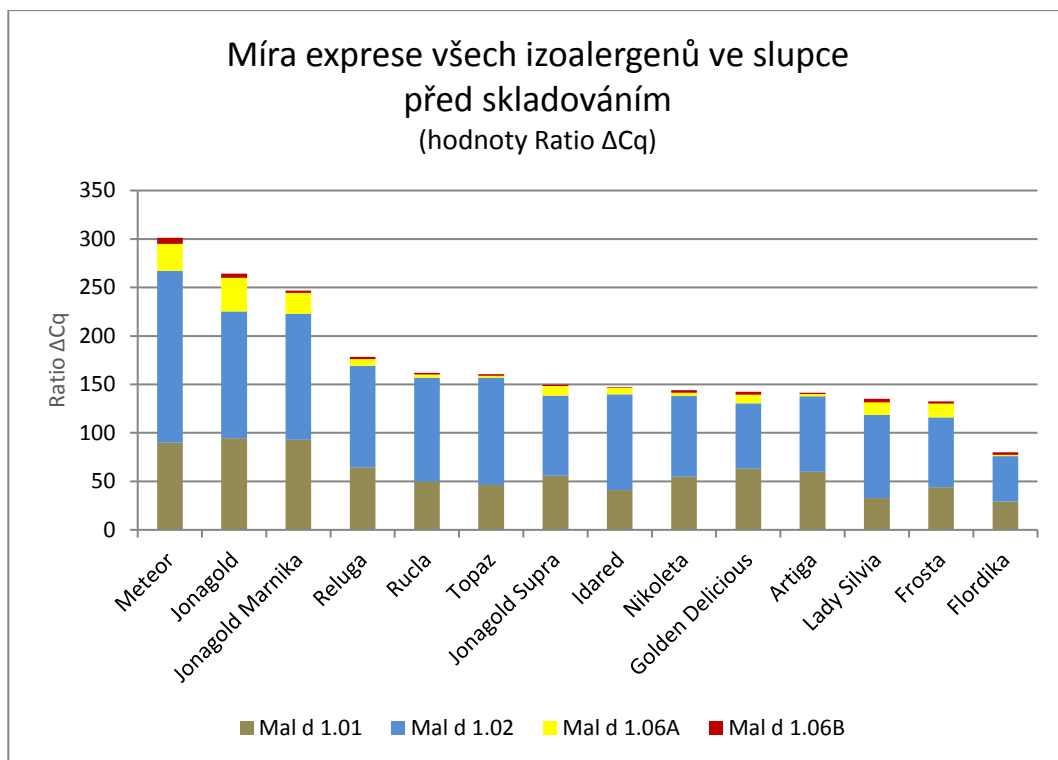
*A = Před skladováním / B = Po skladování

Tabulka 4 Mediány výsledných hodnot Ratio ΔCq a Ratio $\Delta\Delta Cq$ a jejich variační koeficienty u analyzovaných vzorků slupky plodů před a po skladování - 1. část

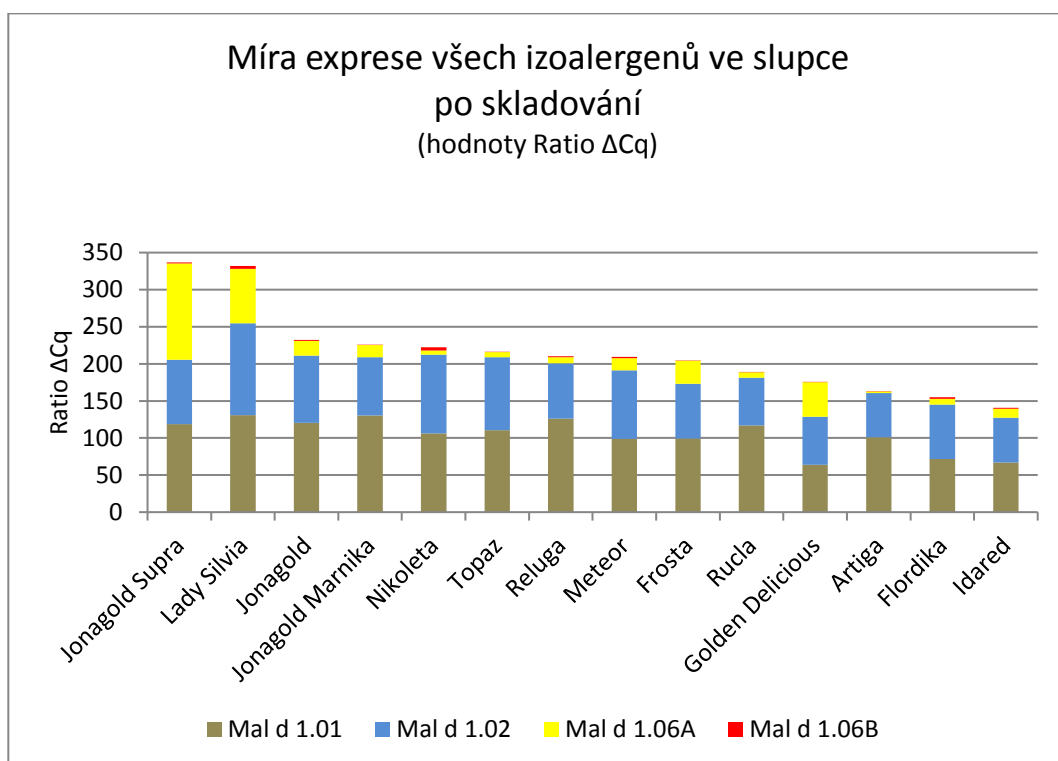
		Izoformy Mal d 1															
		Mal d 1.01				Mal d 1.02				Mal d 1.06A				Mal d 1.06B			
Odrůda	Skladování*	Ratio ΔCq	Vk [%]	Ratio $\Delta\Delta Cq$	Vk [%]	Ratio ΔCq	Vk [%]	Ratio $\Delta\Delta Cq$	Vk [%]	Ratio ΔCq	Vk [%]	Ratio $\Delta\Delta Cq$	Vk [%]	Ratio ΔCq	Vk [%]	Ratio $\Delta\Delta Cq$	Vk [%]
Jonagold Supra	A	55,769	0,971	88,480	1,411	82,721	1,671	131,240	1,907	9,866	1,215	15,652	1,571	1,195	1,534	1,896	1,802
Jonagold Supra	B	118,693	1,172	188,311	1,541	86,627	1,051	137,436	1,462	130,122	0,919	206,444	1,380	1,118	1,312	1,774	1,638
Lady Silvia	A	32,809	0,778	52,053	1,301	85,810	1,103	136,141	1,495	12,818	1,110	20,336	1,500	3,846	1,460	6,102	1,746
Lady Silvia	B	130,704	1,557	207,367	1,819	124,073	0,864	196,847	1,348	73,267	1,142	116,240	1,521	3,750	1,117	5,950	1,504
Meteor	A	89,955	1,467	142,718	1,752	177,311	1,460	281,311	1,746	27,545	0,757	43,701	1,290	6,307	0,675	10,007	1,249
Meteor	B	98,866	1,029	156,855	1,447	92,184	1,323	146,254	1,646	16,481	0,856	26,147	1,344	2,042	0,773	3,239	1,298
Nikoleta	A	54,851	1,345	87,023	1,662	83,139	1,402	131,904	1,703	3,464	1,333	5,496	1,653	2,596	0,544	4,118	1,191
Nikoleta	B	106,259	1,282	168,584	1,617	106,236	1,388	168,547	1,693	5,420	0,978	8,600	1,416	4,625	1,375	7,338	1,684
Reluga	A	64,601	1,488	102,491	1,767	104,457	1,240	165,725	1,588	7,119	0,770	11,295	1,296	2,343	1,156	3,717	1,530
Reluga	B	125,902	1,555	199,748	1,818	74,880	1,619	118,799	1,867	8,241	1,507	13,075	1,781	1,120	0,628	1,777	1,227
Rucla	A	49,849	1,589	79,088	1,844	107,025	1,448	169,799	1,737	3,203	1,207	5,082	1,565	1,714	1,507	2,719	1,782
Rucla	B	117,031	1,098	185,674	1,492	64,242	1,271	101,922	1,609	7,581	0,939	12,028	1,392	0,131	1,123	0,207	1,508
Topaz	A	46,315	1,118	73,481	1,505	110,564	1,066	175,414	1,471	2,094	1,135	3,323	1,516	1,642	1,095	2,604	1,490
Topaz	B	110,720	1,264	175,661	1,605	98,370	1,483	156,067	1,763	6,709	1,026	10,644	1,445	0,419	0,847	0,664	1,339

*A = Před skladováním / B = Po skladování

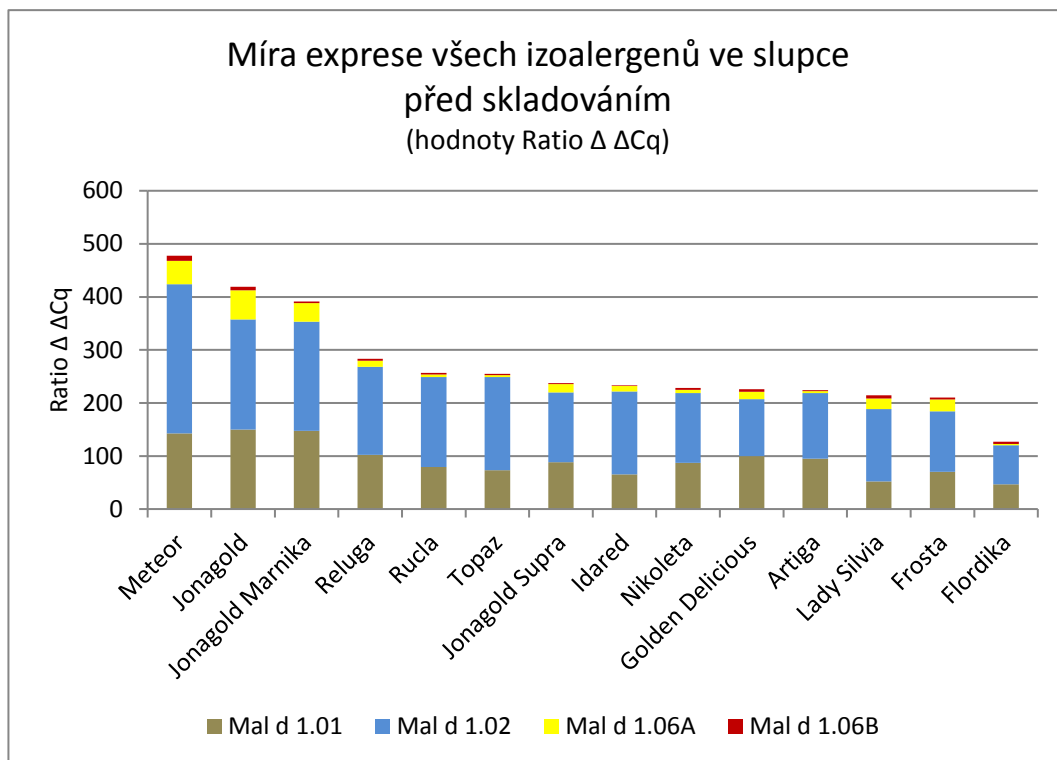
Tabulka 4 Mediány výsledných hodnot Ratio ΔCq a Ratio $\Delta\Delta Cq$ a jejich variační koeficienty u analyzovaných vzorků slupky plodů před a po skladování - 2. část



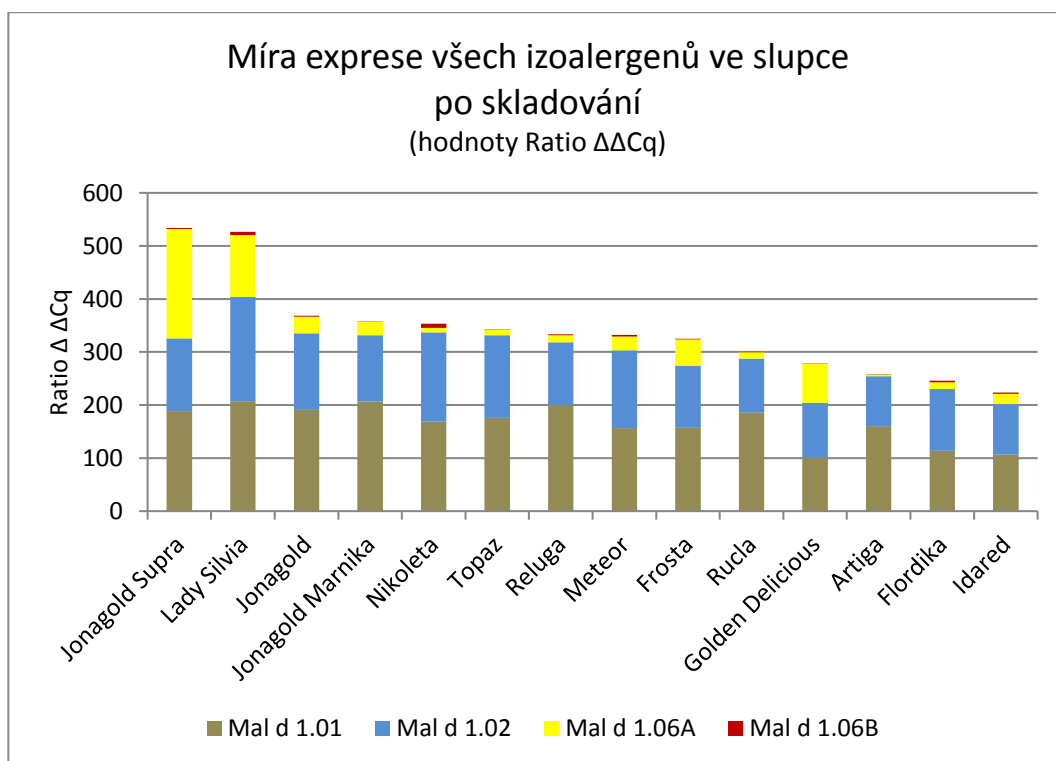
Graf 5 Součet hodnot Ratio ΔCq stanovených ve slupce před skladováním



Graf 6 Součet hodnot Ratio ΔCq stanovených ve slupce po skladování



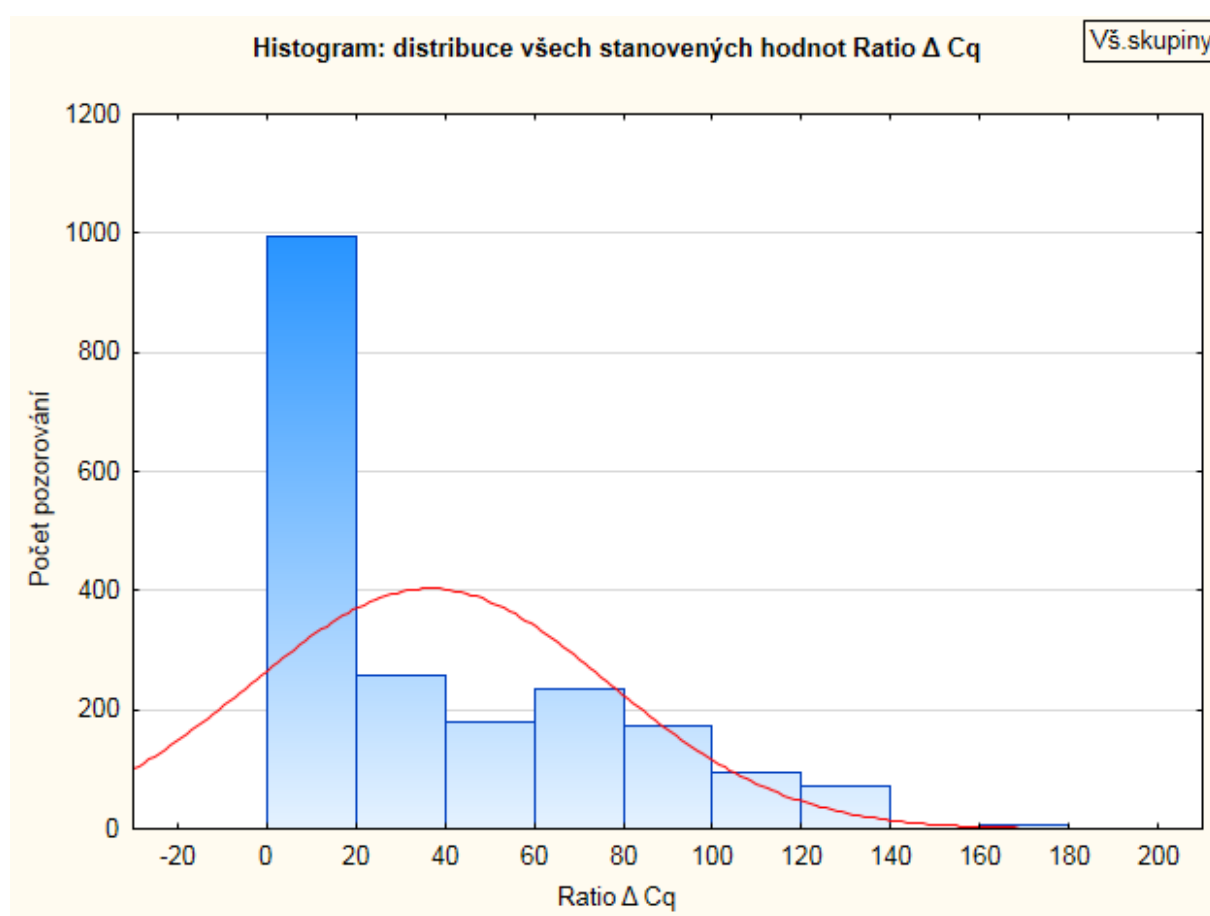
Graf 7 Součet hodnot Ratio $\Delta \Delta Cq$ stanovených ve slupce před skladování



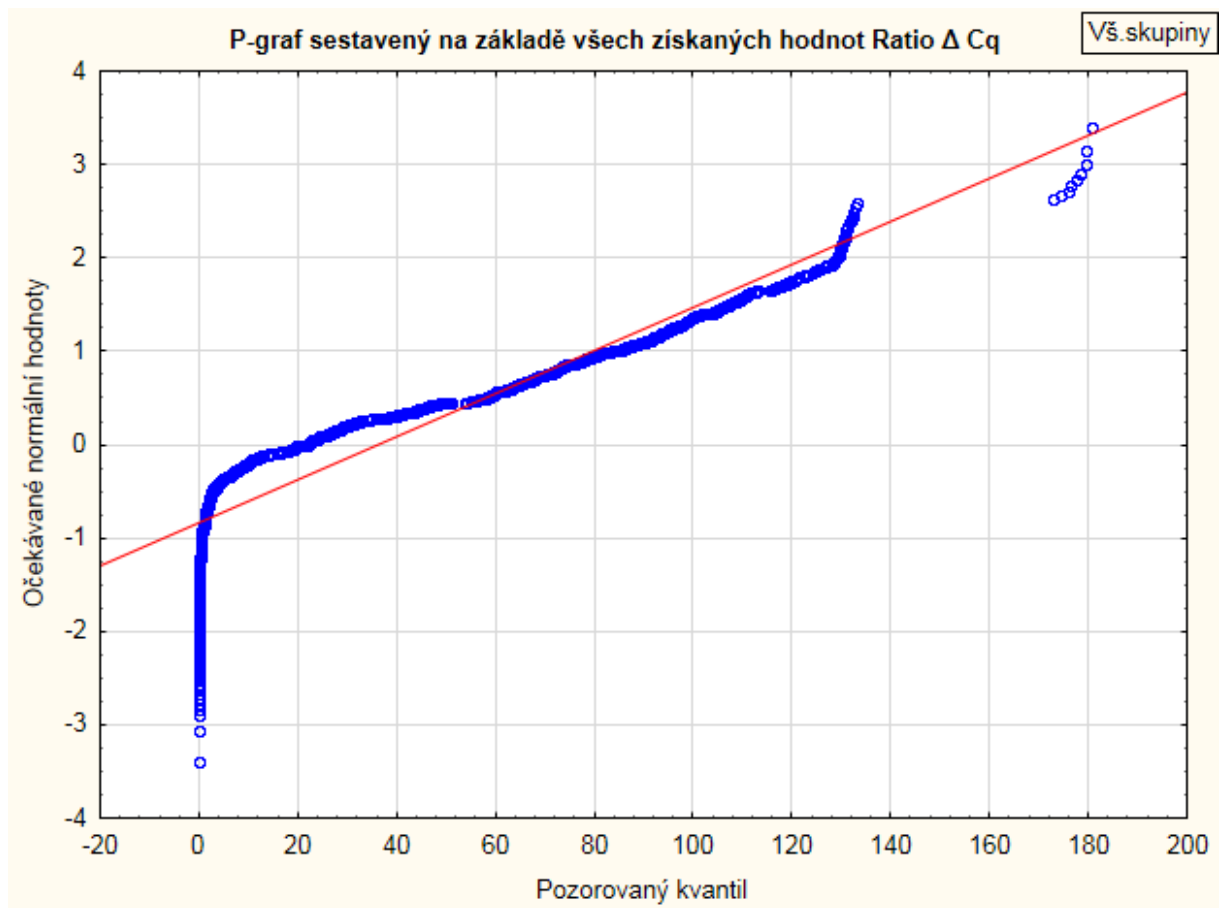
Graf 8 Součet hodnot Ratio $\Delta \Delta Cq$ stanovených v dužině po skladování

5.2 Hodnocení statisticky významných rozdílů hodnot Ratio ΔCq

Aby mohla být zvolena vhodná statistická analýza, musí se nejprve provést hodnocení homogenity rozptylů hodnot Ratio ΔCq . Nulová hypotéza na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ nebyla potvrzena, takže rozptyly těchto vstupních hodnot nejsou homogenní a hodnoty neodpovídají Gaussovu normálnímu rozdělení, což je patrné z grafů 9 a 10. To je pravděpodobně způsobeno vysokou mírou exprese prvních 2 izoform Mal d 1, která je ve většině případů dokonce několikanásobně vyšší než u dalších izoform. Na grafu 2 jsou navíc dobře vidět více odlehle hodnoty Ratio ΔCq , které jsou zdůrazněny osamoceným kroužkem.



Graf 9 Histogram všech stanovených hodnot Ratio ΔCq v porovnání s Gaussovou křivkou normálního rozdělení



Graf 10 P-graf všech stanovených hodnot Ratio ΔCq v porovnání s očekávaným průběhem normálního rozdělení

Z grafů 1 a 2 tedy vyplývá, že pro statistickou analýzu nelze použít klasická ANOVA (analýza rozptylu) vícenásobného třídění a jako vhodný způsob statistické analýzy byl proto vybrán neparametrický Kruskal-Wallisův test, který byl proveden pomocí programu Dell Statistica version 13 (Dell Inc. 2015). V tomto testu byl hodnocen medián všech hodnot Ratio ΔCq získaný z 9 opakovaných měření pro konkrétní faktory. Výsledky Kruskal-Wallisova testu jsou znázorněny v tabulkách a krabicových grafech v následující části diplomové práce. Z celkových 2016 naměřených Ratio ΔCq hodnot bylo tedy získáno 224 hodnot mediánů pro všechny možné třídící faktory (odrůda, izoalergen, pletivo a skladování). Tabulky (tabulka 3 a 4) s těmito hodnotami jsou umístěny v předchozí podkapitole této diplomové práce.

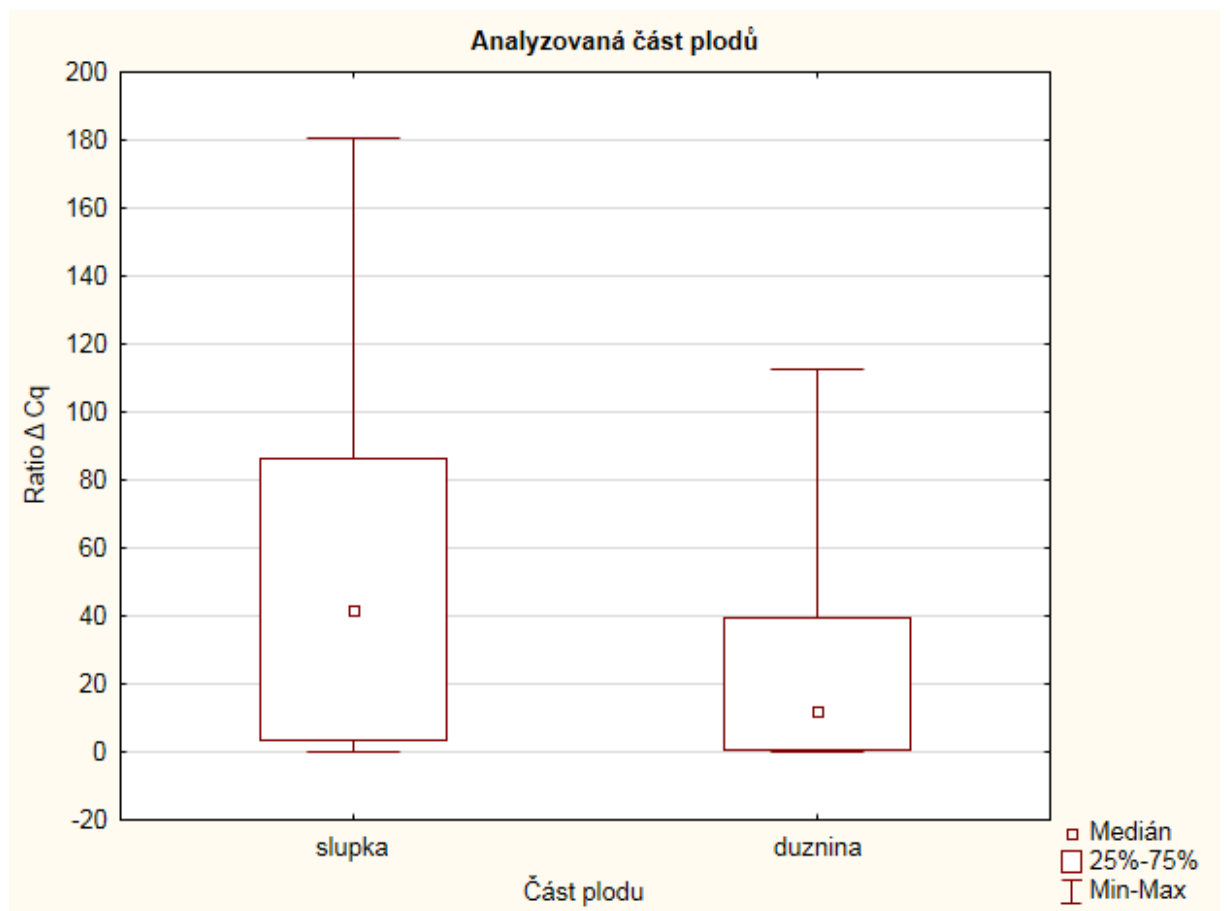
5.2.1 Analýza rozdílů dle typu pletiva

Z tabulky 5 je patrné, že existuje statisticky významný rozdíl na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ v míře exprese izoalergenů Mal d 1 vyjádřené hodnotami mediánů Ratio ΔC_q mezi dužninou a slupkou.

dužnina	0,000
slupka	

Tabulka 5 Pravděpodobnost shody hodnot mediánů Ratio ΔC_q mezi dužninou a slupkou dle Kruskal-Wallisova testu.

Na krabicovém grafu 11 je pro lepší představu vyobrazen rozdíl mediánů, rozptyl a oblast, ve které se nachází 25–75 % hodnot Ratio ΔC_q mezi dužninou a slupkou.



Graf 11 Porovnání rozdílů hodnot mediánů Ratio ΔC_q mezi dužninou a slupkou dle Kruskal-Wallisova testu.

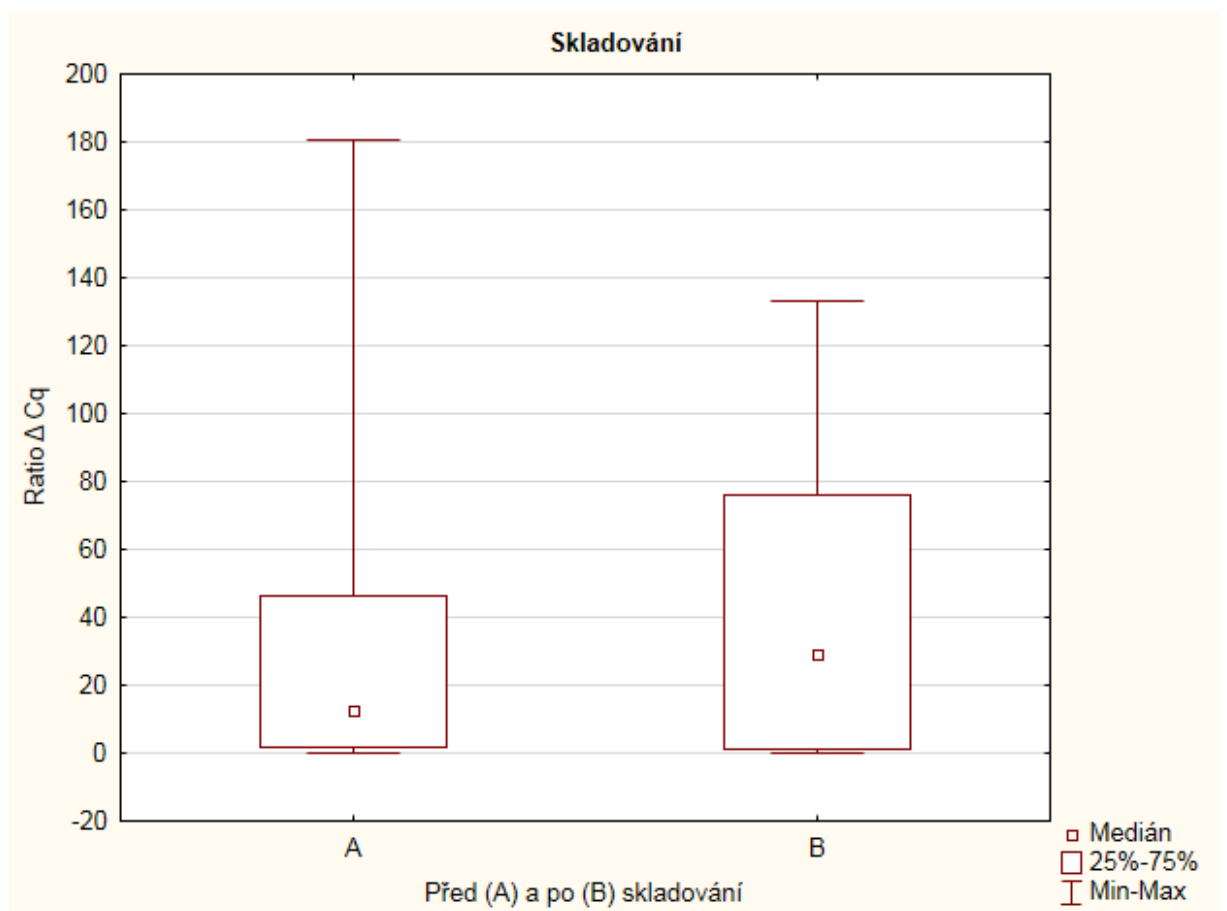
5.2.2 Analýza rozdílů dle skladování

Z tabulky 6 je patrné, že existuje statisticky významný rozdíl na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ v míře exprese izoalergenů Mal d 1 vyjádřené hodnotami mediánů Ratio ΔC_q mezi plody analyzovanými ihned po sklizni a po skladování (12 týdnů při 5 °C, neřízená atmosféra).

Před skladováním	0,000
Po skladování	

Tabulka 6 Pravděpodobnost shody hodnot Ratio ΔC_q před a po skladování dle Kruskal-Wallisova testu.

Na krabicovém grafu 12 je pro lepší představu vyobrazen rozdíl mediánů, rozptyl a oblast, ve které se nachází 25–75 % hodnot Ratio ΔC_q mezi vzorky před a po skladování.



Graf 12 Porovnání rozdílů mediánů Ratio ΔC_q mezi vzorky před a po skladování dle Kruskal-Wallisova testu.

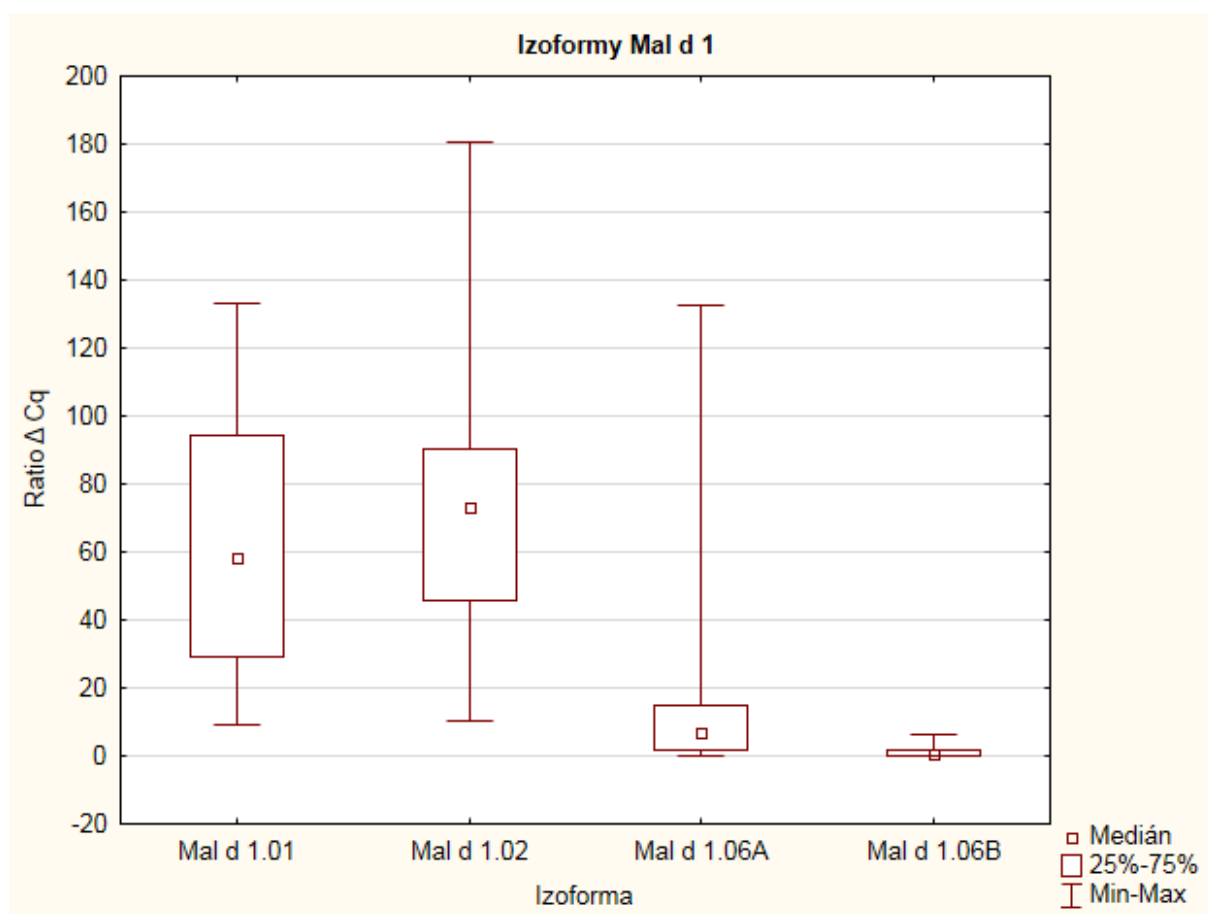
5.2.3 Analýza rozdílů dle izoformy Mal d 1

Z tabulky 7 je patrné, že existuje statisticky významný rozdíl na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ v míře exprese izoalergenů Mal d 1 vyjádřené hodnotami mediánů Ratio ΔC_q mezi všemi analyzovanými izoformami Mal d 1.

Mal d 1.02	0,021		
Mal d 1.06A	0,000	0,000	
Mal d 1.06B	0,000	0,000	0,000
	Mal d 1.01	Mal d 1.02	Mal d 1.06A

Tabulka 7 Pravděpodobnost shody hodnot Ratio ΔC_q mezi analyzovanými izoformami dle Kruskal-Wallisova testu

Na krabicovém grafu 13 je pro lepší představu vyobrazen rozdíl mediánů, rozptyl a oblast, ve které se nachází 25–75 % hodnot Ratio ΔC_q mezi analyzovanými izoformami.



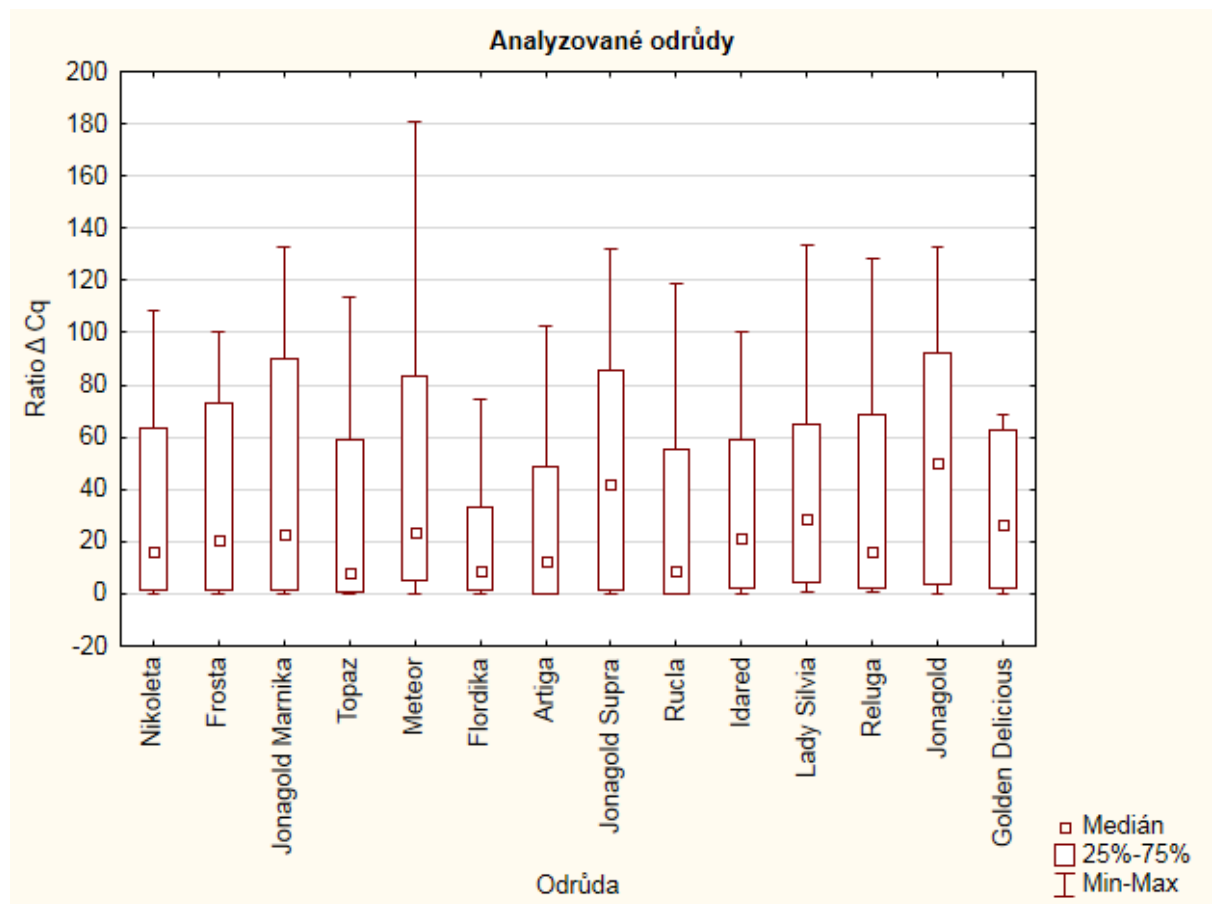
Graf 13 Porovnání rozdílů hodnot mediánů Ratio ΔC_q mezi analyzovanými izoformami dle Kruskal-Wallisova testu.

5.2.4 Analýza rozdílů dle odrůdy

Z výsledků Kruskal-Wallisova testu vychází dvojice zkoumaných odrůd, mezi kterými je statisticky významný rozdíl v hodnotách mediánů Ratio ΔCq . Jako nejvíce odlišné byly vyhodnoceny odrůdy Artiga, Flordika a Rucla, u každé z nich byl prokázán statisticky významný rozdíl s dalšími 5 odrůdami. Naopak u odrůd Nikoleta, Frosta, Golden Delicious, Idared a Reluga nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl s žádnými dalšími odrůdami.

Všechny tyto odrůdy můžeme najít v tabulce 8. Je zde červeně vyznačena pravděpodobnost shody u odrůd, u kterých byl vyhodnocen rozdíl v hodnotách mediánů Ratio ΔCq na hladině $\alpha = 0,05$ za statisticky významný.

Na krabicovém grafu 14 je pro lepší představu vyobrazen rozdíl mediánů, rozptyl a oblast, ve které se nachází 25–75 % hodnot Ratio ΔCq mezi jednotlivými odrůdami.



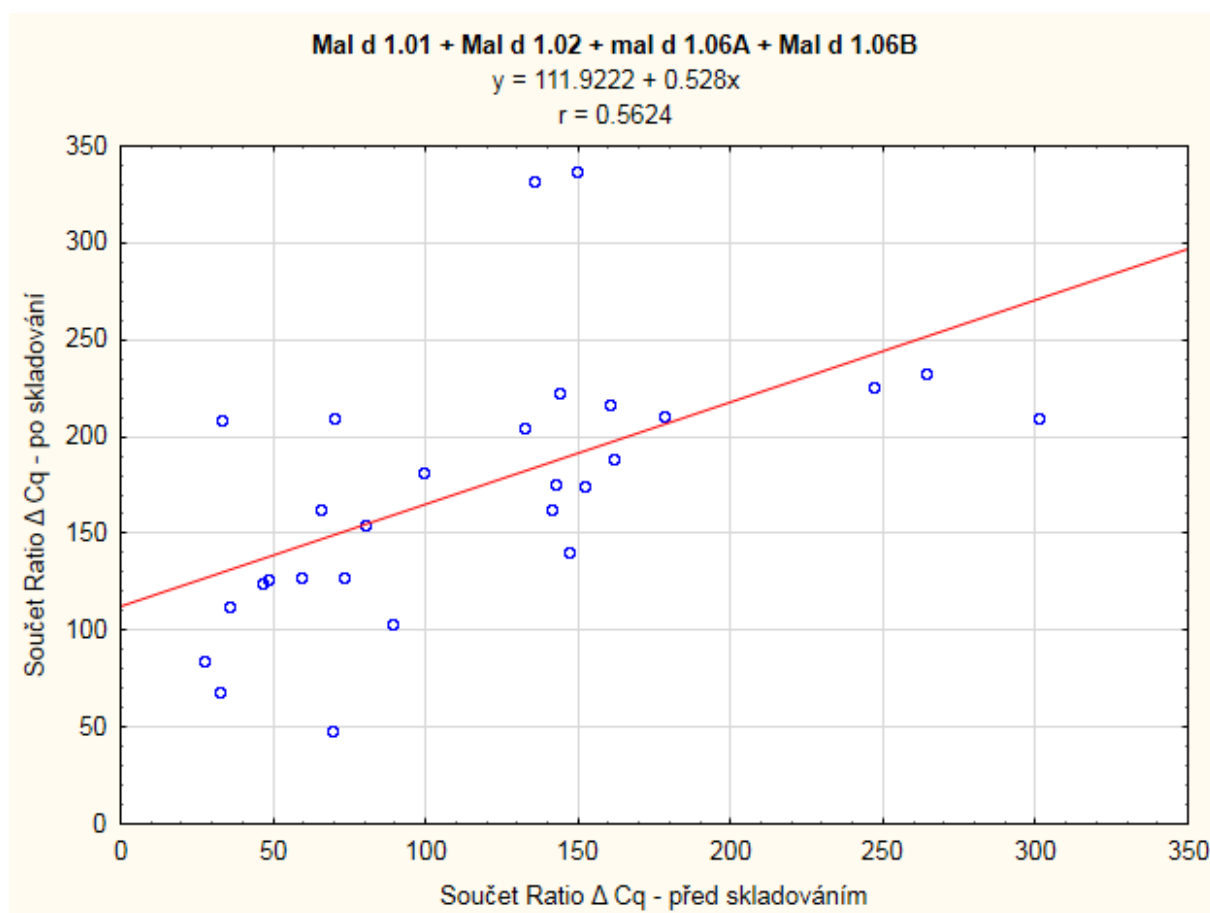
Graf 14 Porovnání rozdílů hodnot mediánů Ratio ΔCq mezi jednotlivými odrůdami dle Kruskal-Wallisova testu.

Frosta	1,000													
Jonagold Marnika	1,000	1,000												
Topaz	1,000	1,000	0,421											
Meteor	1,000	1,000	1,000	0,069										
Flordika	1,000	0,428	0,020	1,000	0,002									
Artiga	1,000	0,362	0,016	1,000	0,002	1,000								
Jonagold Supra	1,000	1,000	1,000	0,036	1,000	0,001	0,001							
Rucla	1,000	0,637	0,033	1,000	0,004	1,000	1,000	0,002						
Idared	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000				
Lady Silvia	1,000	1,000	1,000	0,071	1,000	0,002	0,002	1,000	0,004	1,000				
Reluga	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,374	0,316	1,000	0,560	1,000	1,000			
Jonagold	0,054	0,947	1,000	0,001	1,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,087	1,000	1,000		
Golden Delicious	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,193
	Nikoleta	Frosta	Jonagold Marnika	Topaz	Meteor	Flordika	Artiga	Jonagold Supra	Rucla	Idared	Lady Silvia	Reluga	Jonagold	

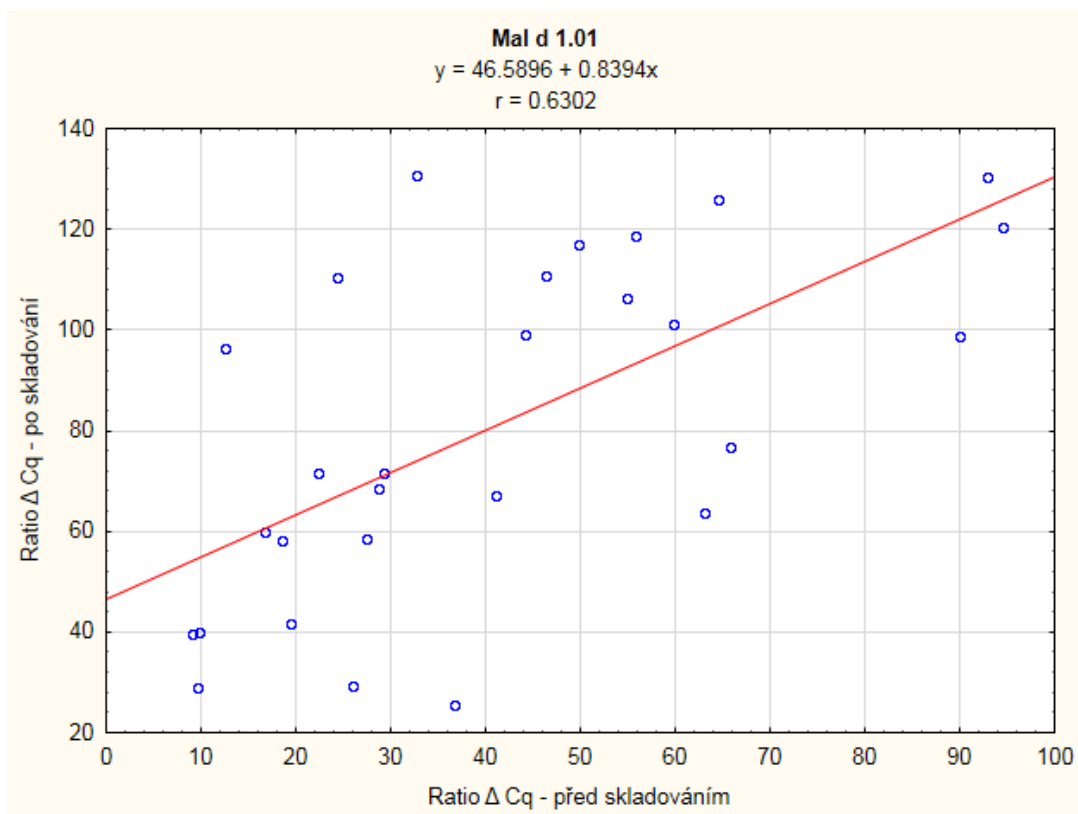
Tabulka 8 Pravděpodobnost shody hodnot Ratio ΔCq mezi jednotlivými odrůdami dle Kruskal-Wallisova testu.

5.3 Hodnocení závislosti exprese izoforem Mal d 1 před a po skladování

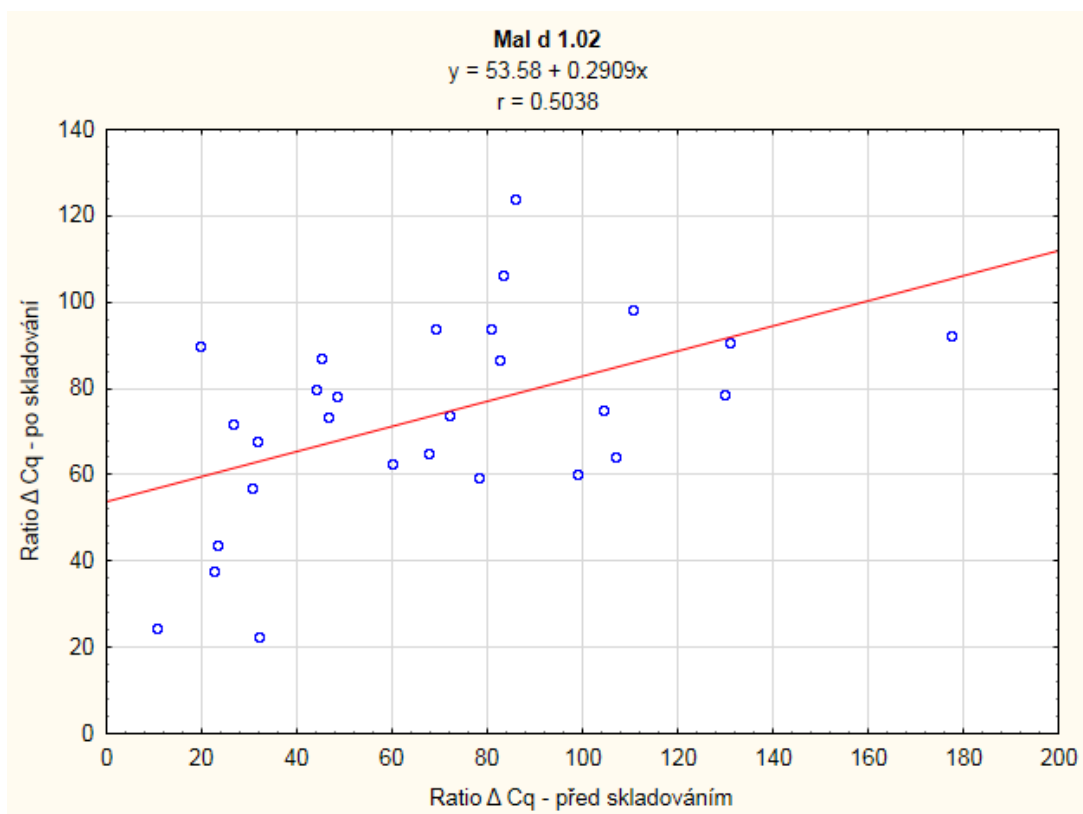
Pro hodnocení závislosti exprese izoforem Mal d 1 před a po skladování byla použita regresní a korelační analýza, která byla vyhodnocena pomocí programu Dell Statistica version 13 (Dell Inc. 2015). Jako vstupní data regresní a korelační analýzy byly použity hodnoty Ratio ΔCq . Výsledkem této analýzy je následujících 5 grafů (graf 15-19), na kterých se na ose x (nezávisle proměnná) nachází hodnoty Ratio ΔCq před skladováním a na ose y (závisle proměnná) hodnoty po skladování. Na grafech je zobrazena míra závislosti hodnot před a po skladování, uvedena rovnice přímky a korelační koeficient (r). Statisticky významná závislost míry exprese izoalergenů před skladováním a po skladování na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ byla prokázána u všech zkoumaných izoforem kromě izoformy Mal d 1.06A, kde není závislost statisticky významná.



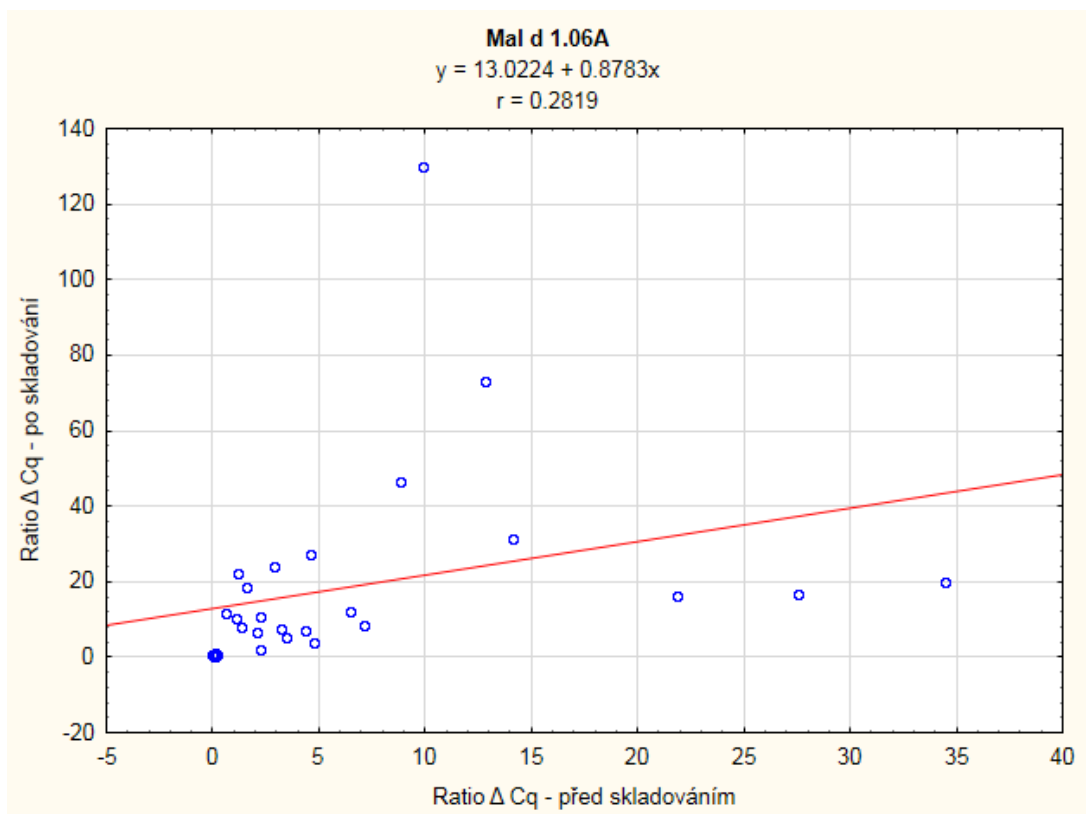
Graf 15 Závislost exprese zkoumaných izoforem Mal d 1 před a po skladování.



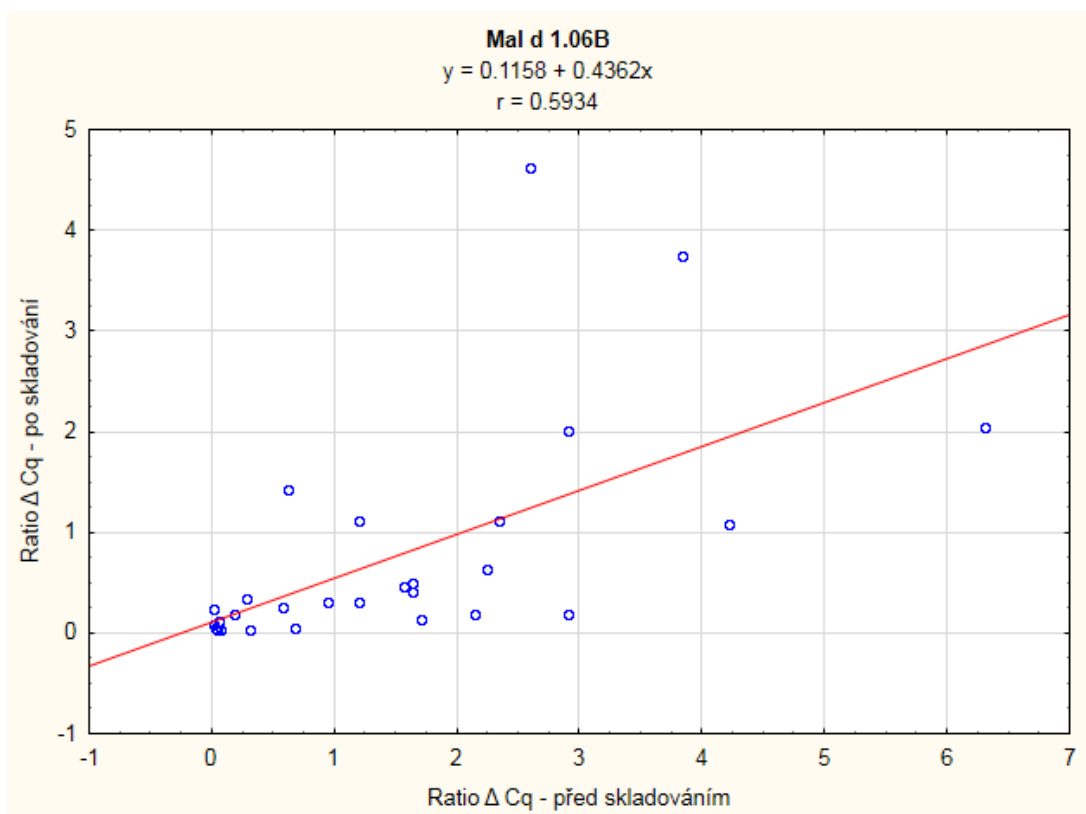
Graf 16 Závislost exprese izoformy Mal d 1.01 před a po skladování.



Graf 17 Závislost exprese izoformy Mal d 1.02 před a po skladování.



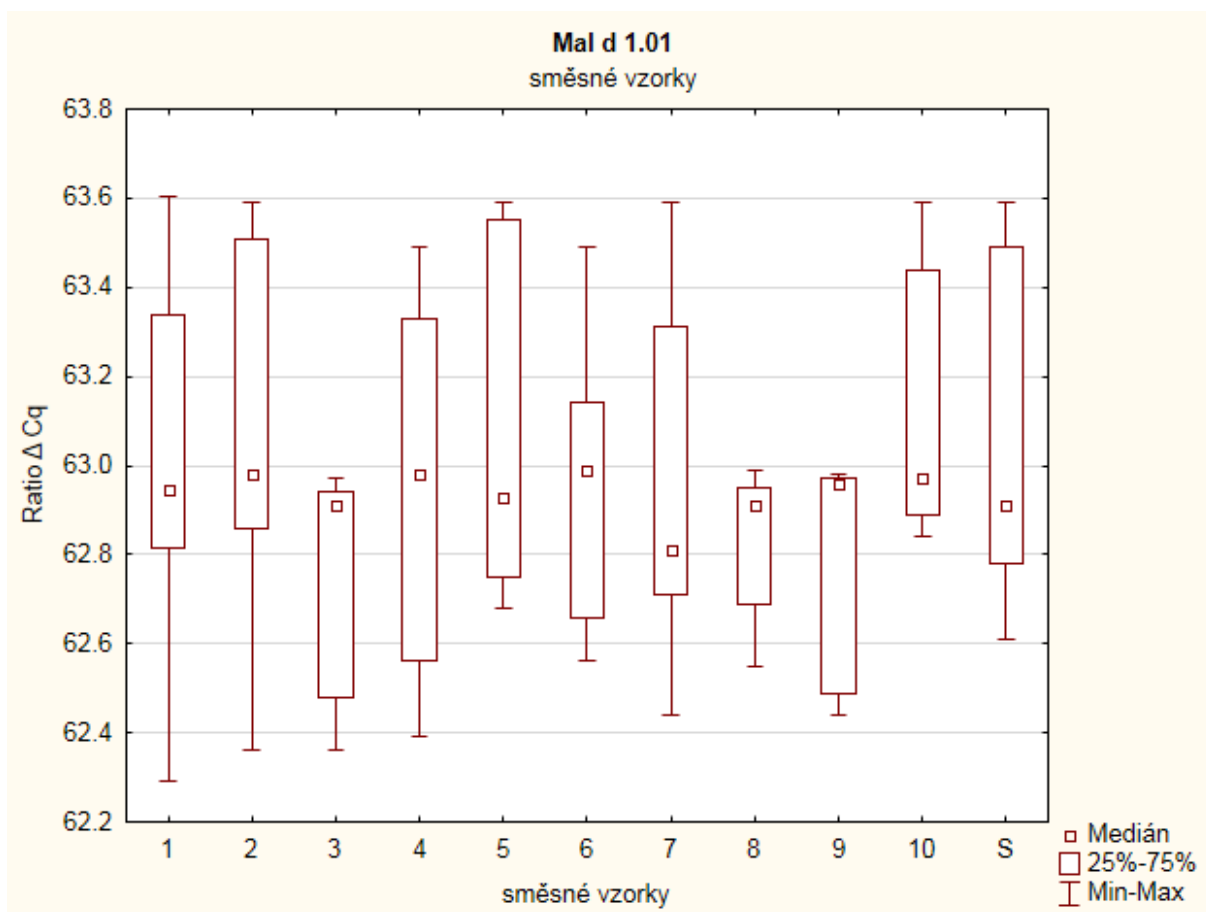
Graf 18 Závislost exprese izoformy Mal d 1.06A před a po skladování.



Graf 19 Závislost exprese izoformy Mal d 1.06B před a po skladování.

5.4 Testování vhodnosti metodického postupu přípravy směšného vzorku

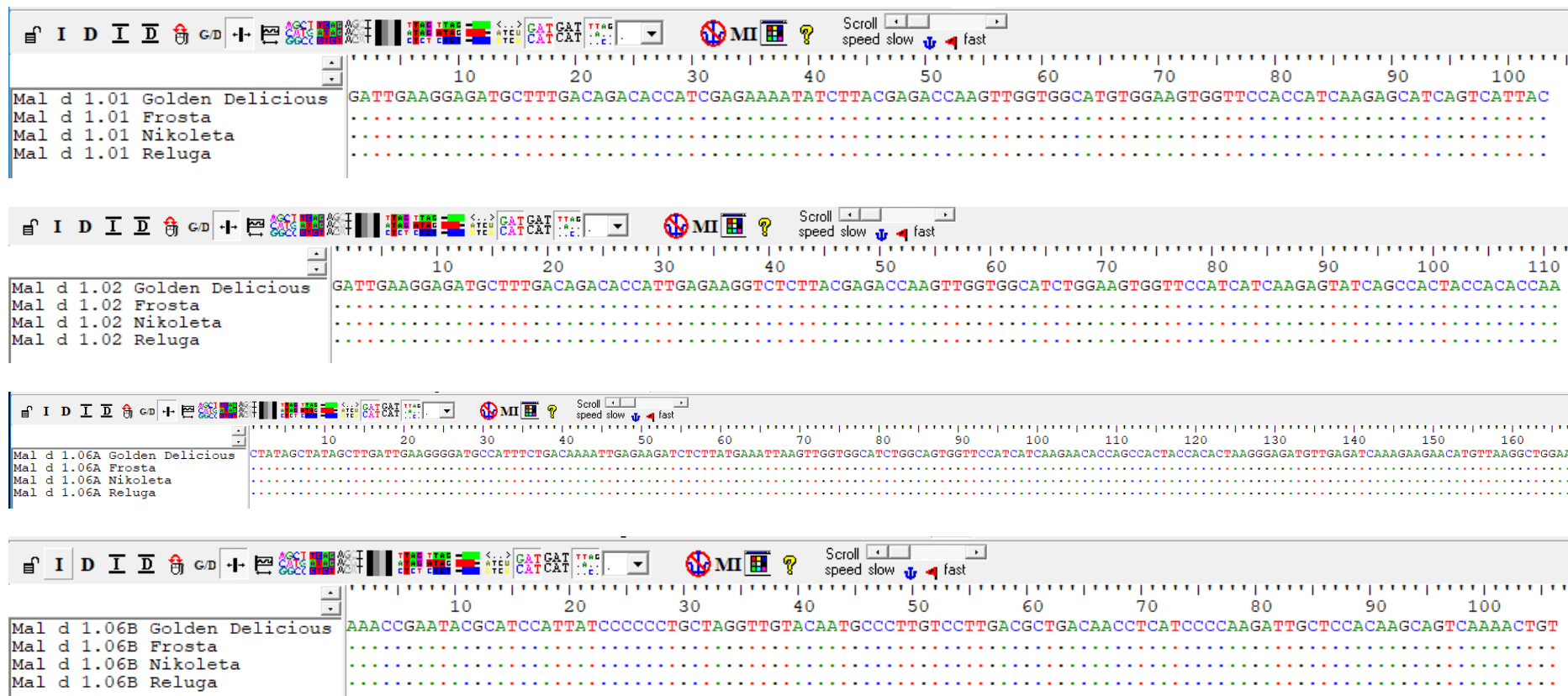
Jak již bylo uvedeno v metodice, jedním z úkolů této diplomové práce bylo optimalizovat vhodný metodický postup přípravy směšného vzorku. Směšný vzorek ze slupky 5 plodů z různých částí koruny jednoho stromu odrůdy Golden Delicious s 10 vzorky kombinací utvořených ze 3 různých plodů, které jsou součástí směšného vzorku, byly testovány rovněž pomocí Kruskal-Wallisova testu, jehož výsledkem je následující grafický výstup programu Dell Statistica version 13 (Dell Inc. 2015). Na krabicovém grafu je vyobrazeno, že mezi mediány hodnot Ratio ΔCq vyjadřujících expresi izofomy Mal d 1.01 u vzorků z 10 možných kombinací 3 plodů a směšného vzorku ze všech 5 plodů není statisticky významný rozdíl na hladině významnosti $\alpha = 0,05$.



Graf 20 Porovnání rozdílů hodnot mediánů Ratio ΔCq vyjadřujících expresi Mal d 1.01 u 10 vzorků ze 3 plodů ve všech možných kombinacích a směšného vzorku (S).

5.5 Ověření specifiky amplifikace sekvenační analýzou

Z obrázku 23 je patrné, že tři testované české odrůdy (Frosta, Nikoleta a Reluga) vykazovaly zcela identické sekvence u všech čtyřech analyzovaných genů, jako referenční odrůda Golden Delicious pocházející z USA.



Obrázek 23 Výsledek sekvenační analýzy

6 Diskuze

6.1 Rostlinný materiál

Prvním cílem této diplomové práce bylo získat alespoň 10 odrůd jabloní, které byly vypěstovány v identických agrotechnických podmínkách experimentálních výsadeb VŠÚO Holovousy s.r.o. Nakonec byly získány plody z celkem 14 odrůd jabloní, z toho bylo 13 odrůd zimních a 1 podzimní. Plody dodané k analýze pocházely ze sklizně v září 2016. Na základě mnoha studií nebyly pozorovány statisticky průkazné rozdíly v míře exprese Mal d 1 v souvislosti se sklizňovou zralostí jablek (termínem sklizně) (Sancho et al., 2006; Schmitz-Eiberger et Matthes, 2011), tudíž faktor přesného termínu sklizně nebyl v našem výzkumu zohledňován. Šlo především o analýzu vlivu skladování plodů, sklizených v obvyklé sklizňové zralosti, na expresi izoalergenu Mal d 1. Vzorky byly analyzovány ihned po sklizni a po 12 týdnech skladování při 5 °C v chladicím boxu.

Nadpoloviční většina zkoušených odrůd byla původem z České republiky. Převážně šlo o odrůdy vyšlechtěné ve VŠÚO Holovousy. Analyzované odrůdy zahraničního původu jsou Golden Delicious, Idared, Jonagold a jeho mutace.

6.2 Metodický postup izolace RNA, přepisu do cDNA a qRT-PCR

Při extrakci RNA z rostlinného materiálu byly použity produkty od firmy Sigma, konkrétně Spectrum Plant Total RNA Kit, On-Column DNase 1 Digest Set pro odstranění kontaminující DNA a přípravek inhibující RNázy RNaseZAP TM. Procesy homogenizace rostlinných pletiv v tekutém dusíku, kde byla pletiva rozemleta na jemný prášek, extrakce v extrakčním pufru s merkaptoethanolem a následné inkubace vzorku byly až na malé rozdíly v teplotách a době inkubace podobné jako u Sancho et al. (2006), který vzorky dále třikrát purifikoval pomocí chloroform-isoamylalkoholu. Podobný postup extrakce za účasti chloroform-isoamylalkoholu popisuje také Gasic et al. (2004) nebo Chang et al. (1993), který navrhl metodu extrakce bez toxických a drahých chemikálií jako je fenol či guanidin hydrochlorid. Modernější podrobný postup extrakce totální RNA bez použití komerčního kitu popisuje např. Bird (2005). V dnešní době je pro rychlost, přesnost a usnadnění práce v laboratoři často využíváno komerčních kitů. Dalšími komerčně vyráběnými kity pro izolaci RNA je např. TRIzol Reagent od firmy Invitrogen (Deng et al., 2012) nebo RNAlater od firmy Ambion (Yockteng et al., 2013). Pro izolaci Poly(A)⁺mRNA z totální RNA extrahované z rostlinné tkáně může být použit např. Oligotex Direct mRNA kit od firmy Qiagen (Gasic et

al., 2004). V této diplomové práci byly při extrakci použity kromě kitu další dva výše zmíněné produkty od firmy Sigma, které hlavní kit vhodně doplňují a spolehlivě fungují, o čemž vypovídá dostatečná výtěžnost RNA, která byla změřena na NanoPhotometru od firmy Implen. Spektrofotometrické měření lze pro ověření doplnit elektroforézou za použití ethidium bromidu (Marzban et al., 2005), tento krok ale v praktické části této diplomové práce nebyl realizován.

Pro přepis do cDNA existuje rovněž celá řada kitů. V našem pokusu byl použit Transcription First Strand cDNA Synthesis Kit od firmy Roche, který obsahoval všechny potřebné komponenty pro reverzní transkripci pomocí RT-PCR v termocykleru LightCycler Nano, rovněž od firmy Roche. Například Botton et al. (2008) využil ve své studii pro přepis extrahované RNA do cDNA stejné komponenty, ale od jiné firmy (MMLV reverse transcriptase, 1X MMLV buffer, RNasin jako inhibitor RNázy a dNTPs) a pro samotnou PCR Gene Amp PCR System 9700 termocykler.

cDNA byla následně použita pro qRT-PCR, kde proběhla za účasti vhodných primerů amplifikace. Samotná qRT-PCR probíhala ve speciálním termocykleru LightCycler Nano od firmy Roche a vzorky vstupující do reakce byly připraveny pomocí kitu FastStart Essentials DNA Green Master, také od firmy Roche. Použité primerové páry podle Pagliarani et al. (2013) pro všechny 4 zkoumané izoformy Mal d 1 jsou uvedeny v tabulce 2 v metodické části této diplomové práce. Pro tyto izoformy mohou být použity i primery o jiných nukleotových sekvencích. Odlišné primerové páry pro izoformy Mal d 1.01 a Mal d 1.02, jejichž sekvenci můžeme vidět na obrázku 23, použil např. Botton et al. (2008).

Table 2. Sequences of Family- and Gene-Specific Primers Used To Quantify Allergen-Related Transcripts in Apple Fruit Tissues^a

gene	forward	reverse	size (bp)	T _m (°C)
<i>Mal d 1.01</i>	5'-AAGCTGAAATCCTTGAAGGAA-3'	5'-GTGCTCTTCCTTGATTCAATG-3'	275	79.0
<i>Mal d 1.02</i>	5'-ACACCTCTGAGATTCCACCAC-3'	5'-CAACTTGGTYTCGTAAGAGAC-3'	287	79.0

Obrázek 24 Primery pro izoformy Mal d 1.01 a Mal d 1.02 dle Botton et al. (2008)

6.3 Míra exprese izoalergenů vyjádřena hodnotami Ratio ΔCq a $\Delta\Delta Cq$

Při prezentaci dat ze studie profilu genové exprese by měla být data vždy normalizována vnitřní kontrolou (Schmittgen et Livak, 2008). Pro vyjádření míry exprese jednotlivých izoform Mal d 1 byly tedy použity hodnoty Ratio ΔCq a $\Delta\Delta Cq$ vypočítané z Cq hodnot (výchozí data programu LightCycleru) v programu Microsoft Excel. Z těchto hodnot byly vytvořeny grafy (graf 1 až 8) umístěné na začátku kapitoly s výsledky. Lze z nich vyčíst rozdíly v expresi izoform Mal d 1 u jednotlivých odrůd.

Hodnoty Ratio ΔCq jsou vlastně hodnoty relativní exprese jednotlivých izoform Mal d 1 normalizované vzhledem k referenčnímu genu pro aktin 7. Aktin patří mezi tzv. housekeepingové geny, které jsou k účelu vyjádření relativní exprese genu často využívány. Dalšími geny housekeepingovými geny, které je možné využít jako referenční vnitřní kontrolu jsou např. β -actin, GAPDH (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) a 18 S RNA (Schmittgen et Livak, 2008; Stephenson, 2016).

Hodnotami $\Delta\Delta Cq$ se stanovuje relativní exprese genu v porovnání s kalibrátorem, kterým je odrůda Golden Delicious (exprese Mal d 1.01 ve slupce po sklizni). Pro použití metody $\Delta\Delta Cq$ je nutné, aby se hodnoty eficienty amplifikací studovaných izoform a aktinu 7 vzájemně minimálně lišily. Toto prokázala studentka FAPPZ ČZU v Praze Tereza Zunová při řešení své diplomové práce (Zunová, 2018).

6.4 Optimalizace metodického postupu přípravy směsného vzorku

Dalším cílem této diplomové práce bylo optimalizovat vhodný metodický postup na přípravu směsného vzorku. Byla zde použita slupka odrůdy Golden Delicious vykazující v porovnání s ostatními analyzovanými odrůdami víceméně průměrné hodnoty exprese izoform Mal d 1, které nejsou v porovnání s ostatními odrůdami statisticky významně odlišné. Způsob, kterým byl tento metodický postup optimalizován, je popsán v metodice této diplomové práce. Podle grafu 20 (viz výsledky) bylo prokázáno, že u směsného vzorku ze všech 5 plodů z různých částí koruny, ani u různých 10 vzorků všech možných kombinací 3 plodů, neexistuje statisticky významný rozdíl v expresi izoformy Mal d 1.01. To je celkově druhá nejvíce exprimovaná izoforma Mal d 1, značně se podílející na celkové alergicitě. To znamená, že u plodů z různých, podobně osluněných částí koruny jsou rozdíly v expresi Mal d 1.01 zanedbatelné.

6.5 Sekvenační analýza

Sekvenačními analýzami lze prokázat, že neexistují rozdíly u studovaných izoform Mal d 1 mezi zahraničními odrůdami a odrůdami vypěstovanými v České republice. Z obrázku 23 v kapitole s výsledky je patrné, že tři testované české odrůdy (Frosta, Nikoleta a Reluga), vyšlechtěné ve VŠÚO Holovousy s.r.o., vykazovaly zcela identické sekvence u všech čtyřech analyzovaných genů, jako referenční odrůda Golden Delicious pocházející z USA.

6.6 Vliv odrůdy na míru exprese izoforem Mal d 1

Plody asi nejrozšířenější oblíbené zimní odrůdy Golden Delicious (původem z USA) se jeví jako poměrně vysoce alergenní (Beuning et al., 2004; Bolhaar et al., 2005; Sancho et al., 2006; Schmitz-Eiberger et Matthes, 2011). Míra exprese izoforem Mal d 1 u této odrůdy byla v této práci v porovnání s dalšími 13 analyzovanými odrůdami průměrná až nižší. Pouze v dužnině plodů ihned po sklizni byla míra exprese u Golden Delicious vyhodnocena jako 3. nejvyšší, hned za odrůdou Jonagold a Jonagold Supra. Tato odrůda v Kruskal-Wallisově testu nevykazovala statisticky významný rozdíl v expresi (vyjádřené hodnotou mediánu Ratio ΔCq) s žádnou další zkoušenou odrůdou. Zároveň byl u odrůdy Golden Delicious prokázán nejužší rozptyl hodnot.

Podobně jako Golden Delicious, také odrůdy Nikoleta, Frosta, Idared a Reluga nevykazují statisticky významný rozdíl s dalšími odrůdami. Naopak odrůdy Artiga, Flordika a Rucla vykazují statisticky významný rozdíl hned s 5 dalšími odrůdami.

Z grafu 14, který je výstupem z Kruskal-Wallisova testu je patrné, že největší rozptyl hodnot mediánů Ratio ΔCq je u odrůdy Meteor. Nejvýše položený medián má odrůda Jonagold, to znamená, že tato odrůda dosáhla nejvyšší relativní míry exprese izoalergenů Mal d 1 v porovnání s referenčním genem pro aktin 7.

Jak již bylo uvedeno v literární rešerši, různá alergenicita odrůd může také souviset s obsahem polyfenolů a aktivitou polyfenoloxidázy (Schmitz-Eiberger et Matthes, 2011). Původem česká zimní odrůda Topaz byla zkoumána také ve studii Schmitz-Eiberger et Matthes (2011), jako odrůda s vysokým obsahem polyfenolů. Topaz zde po 12 týdnech skladování při 2 °C vykazoval mnohem vyšší nárůst obsahu Mal d 1 než odrůda Golden Delicious. Podobné výsledky byly zjištěny i v této diplomové práci, kde byl rovněž prokázán větší vliv skladování na expresi izoforem Mal d 1 u odrůdy Topaz v porovnání s odrůdou Golden Delicious.

6.7 Vliv skladování na míru exprese izoforem Mal d 1 u jednotlivých odrůd

Vzrůst míry exprese izoforem alergenů Mal d 1 během skladování byl pozorován v několika studiích, např. u Sancho et al. (2006), Schmitz-Eiberger et Matthes (2011), kde byly zkoumány různé skladovací podmínky a délky skladování. V této diplomové práci byl dle Kruskal-Wallisova testu prokázán statisticky významný rozdíl mezi mírou exprese izoforem Mal d 1 před a po sklizni. Byla potvrzena vyšší exprese těchto izoforem po sklizni.

6.7.1 Teplota a způsob skladování

V této diplomové práci byl zkoumán vliv skladování v neřízené atmosféře v chladícím boxu při 5 °C, což je často udávaná horní hranice optimální teploty pro skladování jablek. Pro dlouhodobé skladování se doporučuje spíše nižší teplota a řízená atmosféra. V ostatních studiích zkoumajících vliv skladování na expresi izoalergenů Mal d 1 byla pro neřízenou atmosféru zvolena spíše nižší teplota, např. u Schmitz-Eiberger et Matthes (2011) byly plody skladovány rovněž v chladícím boxu po dobu 12 týdnů, ale při teplotě 2 °C.

Porovnání vlivu více způsobů skladování na alergenicitu plodů v řízené a neřízené atmosféře studovali např. Bolhaar et al. (2005) nebo Sancho et al. (2006). Výsledky studií vlivu různých podmínek skladování vypovídají o skutečnosti, že čím jsou skladovací podmínky optimálnější, jako je tomu např. ve správně řízené atmosféře, tím méně se alergenicita plodů za stejnou dobu zvýší. Dle Bolhaar et al. (2005) se projevila o 15 % vyšší alergenicita u plodů skladovaných v neřízené atmosféře při 2 °C než u plodů skladovaných stejnou dobu v řízené atmosféře (2,5 % O₂; 1 % CO₂) při 3 °C. Nejrychleji se zvyšuje míra exprese izoforem Mal d 1 při skladování při pokojové teplotě (Sancho et al., 2006; Schmitz-Eiberger et Matthes, 2011). To je pravděpodobně spojeno také s rychlejší degradací plodů a větším rizikem chorob při nevhodném skladování. Skladovací podmínky aplikované v této diplomové práci jsou srovnatelné se skladováním plodů v běžné domácí chladničce, kde se rovněž teplota pohybuje kolem 5 °C.

6.7.2 Doba skladování

Plody byly skladované po dobu 12 týdnů. Některé odrůdy s kratší skladovatelností jako je např. Frosta či Jonagold a její mutace již jevily po uplynutí 12 týdnů značné známky přezrlosti. Ostatní odrůdy byly většinou v konzumní zralosti a všechny plody byly po skladování ve stavu, který nijak neznemožňoval přípravu vzorků pro extrakci RNA. Doba skladování 12 týdnů tedy můžeme považovat za dobu adekvátní k tomu, aby všechny plody z kolekce 14 použitých odrůd dosáhly alespoň začátku konzumní zralosti a zároveň nebyly degradovány natolik, aby je nebylo možné dále analyzovat.

6.7.3 Stres v průběhu skladování

Mal d 1 je řazen k 10. skupině PR (pathogenesis related) proteinů, které jsou v rostlinách aktivovány různými typy stresu (Fernandes et al., 2013). Jak již bylo uvedeno v literární rešerši, u izoforem Mal d 1 z odrůd Granny Smith a Golden Delicious byla zjištěna pomocí NMR

spektroskopie velmi podobná struktura s těmito proteiny, tudíž míru exprese alergenů mohou ovlivnit i různé patogeny, které se mohou šířit v průběhu skladování (Ahammer et al., 2017). Také v této diplomové práci jevíly některé plody hůře skladovatelných, převážně podzimních odrůd, po 12 týdnech skladování v chladícím boxu při 5 °C známky napadení skládkovými chorobami. Právě u těchto vzorků byl posléze zjištěn razantní nárůst exprese izoforem Mal d 1. Špatný zdravotní stav a známky přezrálости vykazovaly po skladování především odrůdy Frosta, Jonagold, Jonagold Marnika a Jonagold Supra. Nejrazantnější nárůst exprese zkoumaných izoalergenů jevíla podzimní odrůda Frosta, která není vhodná k dlouhému skladování. Uvádí se u ní skladovatelnost do listopadu (Nesrsta et Jan, 2016). Tato odrůda po 12 týdnech skladování v chladícím boxu s neřízenou atmosférou při 5 °C, byla vyhodnocena jako nevhodná ke konzumaci. Odrůda Frosta je v našem výzkumu jedinou vyloženě podzimní odrůdou, všechny ostatní zkoumané odrůdy byla odrůdy zimní.

Jako příklad odrůdy, která po 12 týdnech skladování vykazovala pouze malé zvýšení exprese izoforem Mal d 1 můžeme uvést např. odrůdu Golden Delicioius. Tato odrůda snáší skladování celkem dobře, běžně je skladovatelná do března (Vysloužil, 2015).

6.7.4 Expese jednotlivých izoforem v průběhu skladování

Výsledky regresní a korelační analýzy vyhodnocené pomocí programu Dell Statistica version 13 (Dell Inc. 2015) ukazují statistickou závislost exprese jednotlivých izoforem Mal d 1 před a po skladování. U všech izoforem kromě Mal d 1.06A byla zjištěna statisticky významná závislost hodnot Ratio ΔCq po skladování na hodnotách Ratio ΔCq před skladováním. U hodnoty Mal d 1.06A nebyla tato závislost prokázána z důvodu prudkého zvýšení exprese této izoformy po skladování ve slupce u odrůd Jongold Supra a Lady Silvia. Jonagold Supra tvoří také jedinou výjimku, kde je nejvyšší hodnota exprese této izoformy. U ostatních odrůd, ve všech případech převažují Mal d .01 a Mal d 1.02. Zvýšená exprese této izoformy je pravděpodobně způsobena značně pokročilým stádiem zralosti a vysokou pravděpodobností napadení skládkovými chorobami při skladování.

6.8 Rozdíly v míře exprese izoforem Mal d 1 mezi slupkou a dužninou

Dle Sancho et al. (2006) se směs izoforem alergenu Mal d 1 se projevuje v jablečné slupce a dužnině odlišně, ale se stejným vzorcem exprese v různých odrůdách. Ve slupce se alergeny obecně exprimují ve větší míře než v dužnině, což potvrzuje také Fernández-Rivas et al. (2006), v jehož studii byla na jablečnou slupku při kožním prick testu (SPT) zjištěna větší

alergická reakce než na dužninu. Ke stejnému závěru došly také další autoři (Pagliarani, 2013; Ahammer, 2016). Vyšší exprese alergenů ve slupce v porovnání s dužninou potvrzuje i statistická analýza provedená v této diplomové práci (krabicový graf 11 v kapitole Výsledky).

Již zmíněný razantní nárůst exprese izoformou Mal d 1 po skladování u odrůdy Frosta byl pozorován především na vzorcích dužniny. Ve složených sloupcových grafech (graf 1-4), kde jsou odrůdy seřazeny dle míry exprese všech izoformou Mal d 1 v dužnině před a po skladování, je zřetelný velký nárůst hodnot $\text{Ratio } \Delta C_q$ i $\Delta \Delta C_q$ u této odrůdy, která se z 12. místa (3. nejnižší exprese ze 14 odrůd) dostala po 12 týdnech skladování až na místo 2. odrůdy s nejvyšší expesí zkoumaných izoalergenů, hned za odrůdu Jonagold Marnika.

6.9 Rozdíly v míře exprese mezi zkoumanými izoformami Mal d 1

Nejvíce exprimovanými zkoumanými izoformami byly Mal d1.02 s nejvýše položenou hodnotou mediánu $\text{Ratio } \Delta C_q$ a Mal d 1.01, která byla exprimována v podobné míře. Tyto 2 izoformy se oproti dalším dvěma testovaným izoformám (Mal d 1.06A a Mal d 1.06B) exprimují mnohem více, a proto také výsledné hodnoty neodpovídají normálnímu rozdělení, jak již bylo podrobněji rozebráno ve výsledcích. Jedinou výjimkou je odrůda Jonagold Supra, která vykazuje ve slupce po skladování značně zvýšenou expresi izoformy Mal d 1.06A. Nejvyšší exprese izoformy Mal d 1.02 ve svých studiích vyhodnotili také Sancho et al. (2006) nebo Marzban et al. (2005). Dle Marzban et al. (2005) byla ale Mal d 1.02 následována téměř desetkrát méně exprimovanou izoformou alergenů Mal d 1.01. V našem případě byl ale rozdíl mezi těmito izoformami minimální.

7 Závěr

Jablka jsou u nás velmi oblíbeným a rozšířeným ovocem a zároveň zdrojem prospěšných vitamínů, minerálů či antioxidantů. Vzhledem k tomu, že jedinci trpící alergií na tyto plody v poslední době přibývá, považují výzkum alergenů za velmi důležitý. Alergenicita odrůd je sice geneticky podmíněna, ale může být ovlivněna mnoha faktory během růstu a zrání plodů. Míru exprese alergenů může tedy kromě genotypu ovlivnit také způsob pěstování, manipulace s plody, působení stresu nebo podmínky a doba skladování. Studium míry exprese alergenů za různých podmínek přináší cenné informace nejen pro pěstitele, kteří mohou optimalizovat podmínky pěstování pro snížení alergenního potenciálu plodů, či šlechtitele, kteří se snaží o selekci hypoalergenních odrůd, ale i pro citlivé konzumenty plodů, kteří mohou získat cenné informace o tom, kterým plodům se vyhnout a možnostech snížení rizika alergické reakce při jejich konzumaci.

V této diplomové práci byly shrnuty faktory, které ovlivňují míru exprese izoform Mal d 1, především vliv skladování a odrůdy. Na základě analýzy exprese 4 zkoumaných izoform Mal d 1 pomocí qRT-PCR a následného statistického vyhodnocení výsledků byla zjištěna výrazně vyšší exprese Mal d 1.01 a Mal d 1.02 u téměř všech typů pletiv a odrůd před i po skladování. Jedinou výjimkou, u které se ve slupce po skladování projevila značně zvýšená míra exprese izoformy Mal d 1.06 byla odrůda Jonagold Supra, což bylo pravděpodobně dáno její horší skladovatelností a zhoršeným zdravotním stavem. Jonagold Supra je mutace odrůdy Jonagold s celkově nejvyšší střední hodnotou exprese všech zkoumaných izoform. U téměř všech odrůd byl pozorován nárůst v expresi izoalergenů po skladování. Nejvíce razantní nárůst byl po skladování u jediné podzimní odrůdy Frosta, která má ze všech plodů nejhorší skladovatelnost. Naopak méně patrný nárůst v expresi izoform Mal d 1 byl pozorován u odrůdy Golden Delicious, která je považována za poměrně vysoce alergenní odrůdu. V této diplomové práci však mnoho odrůd, především po skladování, vykazovalo ještě vyšší hodnoty, jako např. Jonagold, Jonagold Supra nebo Lady Silvia.

8 Bibliografie

- Ahammer, L., Grutsch, S., Kamenik, A., Liedl, K., Tollinger, M. 2017. Structure of the Major Apple Allergen Mal d 1. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2017 (65). 1606–1612. DOI: 10.1021/acs.jafc.6b05752. Dostupné také z: <<http://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jafc.6b05752>>
- Asero, R., Mistrello, G., Roncarolo, D., de Vries, S., Gautier, M., Ciurana, C. 2000. Lipid Transfer Protein: A Pan-Allergen in Plant-Derived Foods That Is Highly Resistant to Pepsin Digestion. *International Archives of Allergy and Immunology*. 2000 (122). 20-32. DOI: 10.1159/000024355.
- Asero, R., Monsalve, R., Barber, D. 2008. Profilin sensitization detected in the office by skin prick test: a study of prevalence and clinical relevance of profilin as a plant food allergen. *Clinical and Experimental Allergy*. (38). 1033-1037. DOI: 10.1111/j.1365-2222.2008.02980.x.
- Ballmer-Weber, B. 2015. Food allergy in adolescence and adulthood. *Chemical Immunology and Allergy*. 2015 (101). 51-58. DOI: 10.1159/000371669.
- Beuning, L., Bowen, J., Persson, H., Barraclough, D., Bulley, S., MacRae, E. 2004. Characterisation of Mal d 1-related genes in *Malus*. *Plant Molecular Biology*. 2004 (3). 369-388. DOI: 10.1007/s11103-004-0904-9. Dostupné také z: <<http://link.springer.com/10.1007/s11103-004-0904-9>>
- Bird, I. 2005. Extraction of RNA from cells and tissue. *Methods in Molecular Medicine*. 2005 (108). 139-148.
- Bolhaar, S., van de Weg, W., van Ree, R., Gonzalez-Mancebo, E., Zuidmeer, L., Bruijnzeel-Koomen, C., Fernandez-Rivas, M., Jansen, J., Hoffmann-Sommergruber, K., Knulst, A., Gilissen, L. 2005. In vivo assessment with prick-to-prick testing and double-blind, placebo-controlled food challenge of allergenicity of apple cultivars. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2005 (116). 1080-1086. DOI: 10.1016/j.jaci.2005.07.004.
- Botton, A., Lezzer, P., Dorigoni, A., Barcaccia, G., Ruperti, B., Ramina, A. 2008. Genetic and Environmental Factors Affecting Allergen-Related Gene Expression in Apple Fruit (*Malus domestica* L. Borkh). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56 (15). 6707–6716. DOI: 10.1021/jf800813d. ISBN: 10.1021/jf800813d. Dostupné také z: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf800813d>>

- Breiteneder, H., Ebner, C. 2000. Molecular and biochemical classification of plant-derived food allergens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2000 (106). 27-36. DOI: 10.1067/mai.2000.106929.
- Brickell, C. 2008. A-Z encyklopedie zahradních rostlin. Knižní klub. V Praze. 1128 s. ISBN: 978-80-242-2069-7.
- Chang, S., Puryear, J., Cairney, J. 1993. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. 11 (2). 113-116. DOI: 10.1007/BF02670468. ISBN: 10.1007/BF02670468. Dostupné také z: <<http://link.springer.com/10.1007/BF02670468>>
- Cook, R. 2003. Marketing apples in a global environment: challenges and opportunities. University of California Davis. Dostupné také z: <<http://ucce.ucdavis.edu/files/datastore/234-410.ppt>>
- Coombes, A., Menclová, R., Ward, M. 1996. *Stromy*. Osveta. Martin. ISBN: 80-88824-16-8.
- Cruz-Hernández, A., Paredes-López, O. 2012. Fruit Quality: New Insights for Biotechnology. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2012 (52). 272–289. DOI: 10.1080/10408398.2010.499844. Dostupné také z: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408398.2010.499844>>
- Deng, L. -H., Luo, M. -W., Zhang, C. -F., Zeng, H. -C. 2012. Extraction of High-Quality RNA from Rubber Tree Leaves. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2012 (7). 1394-1396. DOI: 10.1271/bbb.120014. ISBN: 10.1271/bbb.120014. Dostupné také z: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1271/bbb.120014>>
- Dlouhá, J., Peňáz, R., Sus, J., Svoboda, V., Vondráček, J. 1991. *Ovoce slovem i obrazem*. 1. Sempra a.s. Praha. ISBN: 80-901173-0-9.
- Dvořák, A. 1987. *Pěstování jabloní*. 2., přeprac. a dopln. vyd. SZN. Praha. 343 s. Rostlinná výroba. ISBN: 07-098-87.
- Ebner, C., Hirschwehr, R., Bauer, L., Breiteneder, H., Valenta, R., Ebner, H., Kraft, D., Scheiner, O. 1995. Identification of allergens in fruits and vegetables: IgE cross-reactivities with the important birch pollen allergens Bet v 1 and Bet v 2 (birch profilin). *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* [online]. 95 (5). 962-969. [cit. 2018-03-23]. ISSN: 00916749. Dostupné z: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7751517>>

- Fernandes, H., Michalska, K., Sikorski, M., Jaskolski, M. 2013. Structural and functional aspects of PR-10 proteins. *The FEBS Journal*. 2013 (280). 1169-1199. DOI: 10.1111/febs.12114. Dostupné také z: <<http://doi.wiley.com/10.1111/febs.12114>>
- Fernández-Rivas, M., Bolhaar, S., González-Mancebo, E. 2006. Apple allergy across Europe: How allergen sensitization profiles determine the clinical expression of allergies to plant foods. *The Journal of allergy and clinical immunology* [online]. 2006 (118). 481-488. [cit. 2018-03-19]. DOI: 10.1016/j.jaci.2006.05.012. Dostupné z: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16890775>>
- Gallus, S., Talamini, R., Giacosa, A., Montella, M., Ramazzotti, V., Franceschi, S., Negri, E., La Vecchia, C. 2005. Does an apple a day keep the oncologist away?. *Annals of Oncology*. 2005 (16). 1841-1844. DOI: 10.1093/annonc/mdi361. Dostupné také z: <<http://academic.oup.com/annonc/article/16/11/1841/130498/Does-an-apple-a-day-keep-the-oncologist-away>>
- Gao, Z., van de Weg, W., Schaart, J., Schouten, H., Tran, D., Kodde, L., van der Meer, I., van der Geest, A., Kodde, J., Breiteneder, H., Hoffmann-Sommergruber, K., Bosch, D., Gilissen, L. 2005. Genomic cloning and linkage mapping of the Mal d 1 (PR-10) gene family in apple (*Malus domestica*). *Theoretical and applied genetics : TAG : International journal of plant breeding research*. 2005 (1). 171-183. DOI: 10.1007/s00122-005-2018-4. ISSN: 0040-5752. Dostupné také z: <<http://link.springer.com/10.1007/s00122-005-2018-4>>
- Gasic, K., Hernandez, A., Korban, S. S. 2004. RNA extraction from different apple tissues rich in polyphenols and polysaccharides for cDNA library construction. *Plant Molecular Biology Reporter*. 22 (4). 437-438. DOI: 10.1007/BF02772687. ISBN: 10.1007/BF02772687. Dostupné také z: <<http://link.springer.com/10.1007/BF02772687>>
- Geroldinger-Simic, M., Zelniker, T., Aberer, W., Ebner, C., Egger, C., Greiderer, A., Prem, N., Lidholm, J., Ballmer-Weber, B., Vieths, S., Bohle, B. 2011. Birch pollen-related food allergy: Clinical aspects and the role of allergen-specific IgE and IgG4 antibodies. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2011 (127). 616-622. DOI: 10.1016/j.jaci.2010.10.027. Dostupné také z: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0091674910016428>>
- Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*. (41). 95-98.
- Helsper, J. P. F. G., Gilissen, L. J. W. J., van Ree, R., America, A. H. P., Cordewener, J. H. G., Bosch, D. 2002. Quadrupole time-of-flight mass spectrometry: A method to study the actual

- expression of allergen isoforms identified by PCR cloning. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2002 (110). 131-138. DOI: 10.1067/mai.2002.125599. ISBN: 10.1067/mai.2002.125599. Dostupné také z: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0091674902000520>>
- Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, S., Griffith, R. 1992. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology*. 1992 (10). 413-417.
- Hořejší, V., Bartůňková, J., Brdička, T., Špišek, R. 2013. *Základy imunologie: 5. vydání*. 5. Triton. Praha 10. 330 s. ISBN: 978-80-7387-713-2.
- Jelen, V. 1976. *Moderní skladování a jakost ovoce*. 1. vyd. Merkur. Praha. ISBN: 51-178-76.
- Koblížek, J. 2006. *Jehličnaté a listnaté dřeviny našich zahrad a parků*. 2., rozš. vyd. Sursum. Tišnov. 551 s. ISBN: 8073231174.
- Kondo, Y., Urisu, A. 2009. Oral Allergy Syndrome. *Allergology International*. 58 (4). 485-491. 6 s. DOI: 10.2332/allergolint.09-RAI-0136.
- Kubista, M., Andrade, J., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjöback, R., Sjögreen, B., Strömbom, L., Ståhlberg, A., Zoric, N. 2006. The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine*. 2006 (27). 95-125. DOI: 10.1016/j.mam.2005.12.007. Dostupné také z: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0098299705000907>>
- Laffer, S., Vangelista, L., Steinberger, P., Kraft, D., Pastore, A., Valenta, R. 1996. Molecular characterization of Bip 1, a monoclonal antibody that modulates IgE binding to birch pollen allergen, Bet v 1. *Journal of Immunology*. 11 (157). 4953-4962. 8943401.
- Liška, M. 2012. *Vyšetřovací metody v alergologii*. *Zdraví.Euro.cz* [online]. 2012 (022012). [cit. 2018-03-20]. Dostupné z: <<https://zdravi.euro.cz/clanek/postgradualni-medicina/vysetrovaci-metody-v-alergologii-463461>>
- Mačák, J., Mačáková, J., Dvořáčková, J. 2012. *Patologie: 2., doplněné vydání*. 1. GRADA Publishing. Praha. ISBN: 978-80-247-3530-6.
- Marzban, G., Puehringer, H., Dey, R., Brynda, S., Ma, Y., Martinelli, A., Zaccarini, M., van der Weg, E., Housley, Z., Kolarich, D., Altmann, F., Laimer, M. 2005. Localisation and distribution of the major allergens in apple fruits. *Plant Science*. 2005 (169). 387-394. DOI: 10.1016/j.plantsci.2005.03.027. Dostupné také z: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168945205001226>>

- Matto, A., Liberman, M. 1977. Localization of the Ethylene-synthesizing System in Apple Tissue. 1977 (60). 794–799. PMC542716.
- Nesrsta, D., Jan, T. 2016. Ovoce 2016: Přehled odrůd ovoce. 1. Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Brno, Národní odrůdový úřad. Brno. 154 s. ISBN: 978-80-7401-126-9.
- Novák, J., Nováková, H. 2010. Alergenní rostliny. 1. Euromedia Group, k. s. - Knižní klub. Praha. 264 s. ISBN: 978-80-242-2591-3.
- Pagliarani, G., Paris, R., Arens, P., Tartarini, S., Ricci, G., Smulders, M. J. M., van de Weg, W. E. 2013. A qRT-PCR assay for the expression of all Mal d 1 isoallergen genes. BMC Plant Biology. 2013 (5). 13-51. DOI: 10.1186/1471-2229-13-51. ISBN: 10.1186/1471-2229-13-51. Dostupné také z: <<http://bmcpantbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2229-13-51>>
- Pareek, S., Finger, F., Silva, T. 2016. Postharvest Ripening Physiology of Crops. 1. CRC Press. India. ISBN: 9781498703802.
- Procházka, S. 1998. Fyziologie rostlin. 1. Academia. Praha. ISBN: 8020005862.
- Pühringer, H., Moll, D., Hoffmann-Sommergruber, K., Watillon, B., Katinger, H., da Câmara Machado, M. 2000. The promoter of an apple Ypr10 gene, encoding the major allergen Mal d 1, is stress- and pathogen-inducible. Plant Science. 2000 (152). 35-50. DOI: 10.1016/S0168-9452(99)00222-8. Dostupné také z: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168945299002228>>
- Rashid, R., Smith, K., Nambiar, K., Frew, A., Tarzi, M. 2011. Pollen-food syndrome is related to Bet v 1/PR-10 protein sensitisation, but not all patients have spring rhinitis. Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2011 (66). 2. DOI: 10.1111/j.1398-9995.2011.02618.x.
- Richter, M. 2013. Jablka k uskladnění: 15 zimních odrůd jabloní odolných vůči padlí a strupovitosti. IReceptář.cz [online]. 2013 (10). [cit. 2018-04-10]. Dostupné z: <<https://www.ireceptar.cz/zahrada/uzitkova-zahrada/jablka-k-uskladneni-15-zimnich-odrud-jabloni-odolnych-vuci-padli-a-strupovitosti/>>
- Saiky, R., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K., Horn, G., Erlich, H., Arnheim, N. 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science. 1985 (230). 1350-4. 2999980.

- Saltveit, M. 1999. Effect of ethylene on quality of fresh fruits and vegetables. *Postharvest Biology and Technology*. 1999 (15). 279-292. DOI: 10.1016/S0925-5214(98)00091-X. Dostupné také z: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S092552149800091X>>
- Sampson, H. 1999. Food allergy. Part 1: immunopathogenesis and clinical disorders. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 1999 (103). 717-728. 10329801.
- Sancho, A., Foxall, R., Browne, T., Dey, R., Zuidmeer, L., Marzban, G., Waldron, K., Van Ree, R., Hoffmann-Sommergruber, K., Laimer, M., Mills, E. 2006. Effect of Postharvest Storage on the Expression of the Apple Allergen Mal d 1. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2006 (54). 5917-5923. DOI: 10.1021/jf060880m.
- Seymour, G., Østergaard, L., Chapman, N., Knapp, S., Martin, C. 2013. Fruit Development and Ripening. *Annual Review of Plant Biology*. 2013 (64). 219-241. DOI: 10.1146/annurev-arplant-050312-120057. Dostupné také z: <<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-arplant-050312-120057>>
- Schmittgen, T., Livak, K. 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocol*. 2008 (3). 1101-1108. DOI: 10.1038/nprot.2008.73. Dostupné také z: <<http://www.nature.com/articles/nprot.2008.73>>
- Schmitz-Eiberger, M., Matthes, A. 2011. Effect of harvest maturity, duration of storage and shelf life of apples on the allergen Mal d 1, polyphenoloxidase activity and polyphenol content. *Food Chemistry*. 127 (1). 1459-1464. DOI: 10.1016/j.foodchem.2011.01.101. Dostupné také z: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814611002081>>
- Snustad, D., Simmons, M., Relichová, J. (ed.). 2017. *Genetika*. Druhé, aktualizované vydání. přeložil Jiří DOŠKAŘ, přeložil Jiří FAJKUS, přeložil Petr HOŘÍN, přeložil Aleš KNOLL, přeložil Petr KUGLÍK, přeložil Jan ŠMARDA, přeložil Jana ŠMARDOVÁ, přeložil Renata VESELSKÁ, přeložil Boris VYSKOT. Masarykova univerzita. Brno. ISBN: 978-80-210-8613-5.
- Son, D., Scheurer, S., Hoffmann, A., Haustein, D., Vieths, S. 1999. Pollen-related food allergy: cloning and immunological analysis of isoforms and mutants of Mal d 1, the major apple allergen, and Bet v 1, the major birch pollen allergen. *European Journal of Nutrition*. 1999 (38). 201-215. DOI: 10.1007/s003940050063. Dostupné také z: <<http://link.springer.com/10.1007/s003940050063>>

Stephenson, F. 2016. Calculations for Molecular Biology and Biotechnology. 3. Academic Press. London. 481 s. ISBN: 978-0-12-802211-5.

Tovinen, P. 2003. Effects of storage conditions and postharvest procedures on oxidative stress in fruits and vegetables. Food Products Press. New York. . 69-90.

Ubi, B., Honda, C., Bessho, H., Kondo, S., Wada, M., Kobayashi, S., Moriguchi, T. 2006. Expression analysis of anthocyanin biosynthetic genes in apple skin: Effect of UV-B and temperature. Plant Science. 2006 (170). 571–578. DOI: 10.1016/j.plantsci.2005.10.009. Dostupné také z: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168945205003961>>

van Loon, L., Pierpoint, W., Boller, T., Conejero, V. 1994. Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins. Plant Molecular Biology Reporter. 1994 (3). 245-264. DOI: 10.1007/BF02668748. Dostupné také z: <<http://link.springer.com/10.1007/BF02668748>>

Vanek-Krebitz, M., Hoffmann-Sommergruber, K., Machado, M., Susani, M., Ebner, C., Kraft, D., Scheiner, O., Breiteneder, H. 1995. Cloning and Sequencing of Mal d 1, the Major Allergen from Apple (*Malus domestica*), and Its Immunological Relationship to Bet v 1, the Major Birch Pollen Allergen. Biochemical and Biophysical Research Communications. 1995 (214). 131-8. DOI: 10.1006/bbrc.1995.2320. Dostupné také z: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X85723200>>

Vysloužil, J. 2015. Jonagored Supra. Databáze odrůd ovocných dřevin [online]. Mendeleova univerzita v Brně. Brno. [cit. 2018-04-10]. Dostupné z: <http://jirivyslouzil.cz/databaze_ovoce/jonagored-supra-2/>

Wittmann, M., Reekers, R., Busche, M., Kapp, A., Werfel, T. 1999. Birch pollen-related foods trigger atopic dermatitis in patients with specific cutaneous T-cell responses to birch pollen antigens. JOURNAL OF ALLERGY AND CLINICAL IMMUNOLOGY [online]. 104 (2). 466-472. [cit. 2018-03-23]. ISSN: 00916749. Dostupné z: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10452773>>

Yockteng, R., Almeida, A. M. R., Yee, S., Andre, T., Hill, C., Specht, C. D. 2013. A Method for Extracting High-Quality RNA from Diverse Plants for Next-Generation Sequencing and Gene Expression Analyses. Applications in Plant Sciences. 1 (12). 12-20. DOI: 10.3732/apps.1300070. ISBN: 10.3732/apps.1300070. Dostupné také z: <<http://doi.wiley.com/10.3732/apps.1300070>>

Zunová, T. 2018. Exprese isoalergenů Mal d 1 ve slupce a dužnině jablek u plodů získaných z obchodních řetězců v České republice. Diplomová práce. Praha. 107 s. ČZU v Praze. Vedoucí práce Doc. Dr. Ing. Pavel Vejl.