

**ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE**  
**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**  
**Katedra genetiky a šlechtění**



**Studium exprese významných alergenů v plodech jabloní**

Disertační práce

**Autor:** Ing. Ivona Žďárská

**Školitel:** doc. Dr. Ing. Pavel Vejl

**Konzultant:** Mgr. Martina Melounová, PhD., ČZU v Praze

Ing. Radek Vávra, PhD., VŠÚO Holovousy s.r.o.

**Praha 2024**

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem disertační práci na téma **Studium exprese významných alergenů v plodech jabloní** vypracovala samostatně s použitím uvedené literatury a na základě konzultací a doporučení školitele.

Souhlasím se zveřejněním disertační práce dle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, v platném znění, a to bez ohledu na výsledek její obhajoby.

V Praze dne 2.1.2024

Ing. Ivona Žďárská

## **Poděkování**

Chtěla bych poděkovat mému školiteli doc. Dr. Ing. Pavlu Vejlovi za odborné vedení při zpracovávání disertační práce. Děkuji mému kolegovi RNDr. Radku Čmejlovi, Ph.D. za cenné odborné rady a pomoc. Děkuji mému příteli Martinu Suchému za poskytnutý prostor a podporu. Rovněž děkuji mé rodině, bývalému manželovi a dětem Jeronýmovi, Vincentovi a Aurélii za trpělivost a pochopení. A jedno velké díky patří i mně samotné.

## **Dedikace**

Řešení disertační práce bylo financováno z projektu QJ1510354 – Tvorba a selekce odrůd jableň s vysokým obsahem zdraví prospěšných látek a prodlouženou skladovatelností plodů (MZe, 2015-2018) s využitím infrastruktury Ovocnářského výzkumného institutu CZ.105/2.1.00/03.0116 (MŠMT, 2012 – 2015) a následného navazujícího projektu LO1608 - Národní program udržitelnosti (MŠMT, 2016 - 2020).

## Abstrakt

Tato disertační práce se zabývá problematikou genové exprese alergenu Mal d 1 v plodech různých odrůd jablek. Alergen Mal d 1 z důvodu své strukturní podobnosti s alergenem Bet v 1 vykazuje zkříženou alergickou reakci s pylem břízy a je typický pro oblast střední, severní a východní Evropy a citlivým jedincům zabraňuje v konzumaci jablek. Proto jsou poznatky spojené s alergenicitou jednotlivých odrůd velice aktuální a mohou přispět k rozvoji šlechtitelských programů zaměřených na hypoalergenní odrůdy.

V rámci této práce byla hodnocena genová exprese isoform *Mal d 1.01* a *Mal d 1.02* v průběhu tří let u 39 odrůd jablek, dále byl hodnocen vliv skladování, systému produkce a lokality na úroveň exprese genu *Mal d 1*. Relativní genová exprese byla analyzována pomocí kvantitativní real-time PCR a stanovena na základě metody  $\Delta C_t$ , hodnoty relativní genové exprese jednotlivých isoform alergenu byly normalizovány ke genu *aktin*. Byla rovněž vyhodnocena genová exprese všech 31 isoform alergenu Mal d 1, a to pomocí sekvenování nové generace s využitím sekvenátoru Ion PGM.

Byl prokázán vliv všech zkoumaných faktorů (ročníku, skladování, systému produkce i lokality) na úroveň genové exprese alergenu Mal d 1. Nejvíce exprimovanými isoformami jsou *Mal d 1.01* a *Mal d 1.02*, i když v průběhu skladování může docházet k významnému růstu exprese i u dalších isoform, konkrétně *Mal d 1.03G* a *Mal d 1.06D*. Na základě výsledků hodnocení jednotlivých odrůd v průběhu tří let byly určeny odrůdy s ustáleně nižší relativní expresí genu *Mal d 1*, a to 'King Jonagold', 'Jonagold', 'Braeburn Mariri Red', 'Braeburn', 'Cumulus', 'Zuzana', 'Fragrance'. Stabilně vysoké hladiny relativní exprese genu *Mal d 1* ve všech třech letech hodnocení dosahovala odrůda 'Gala'.

**Klíčová slova:** jablko, *Malus × domestica* Borkh., relativní genová exprese, isoformy, Mal d 1, real-time PCR, skladování

## Abstract

This thesis deals with the issue of gene expression of the Mal d 1 allergen in the fruits of different apple cultivars. The allergen Mal d 1 shows a cross-allergic reaction with birch pollen and is typical for the region of Central, Northern and Eastern European region and prevents sensitive individuals from consuming apples. Therefore, knowledge related to the allergenicity of various cultivars is very current and can contribute to the development of breeding programs focused on hypoallergenic apples.

As a part of this work, the gene expression of the *Mal d 1.01* and *Mal d 1.02* isoforms was evaluated over three years in 39 apple cultivars. Also the influence of storage, production system and location on the level of the expression of the Mal d 1 gene was evaluated. Relative gene expression was analyzed using quantitative real-time PCR and determined based on the  $\Delta C_t$  method, relative gene expression values of individual allergen isoforms were normalized to the *actin* gene. The gene expression of all 31 isoforms of the Mal d 1 allergen was also evaluated using next-generation sequencing on the Ion PGM sequencer.

The influence of all investigated factors (year, storage, production system and location) on the gene expression level of the Mal d 1 allergen was demonstrated. The most expressed isoforms are *Mal d 1.01* and *Mal d 1.02*, although during storage there may be a significant increase in the expression of other isoforms, specifically *Mal d 1.03G* and *Mal d 1.06D*. Based on the results of the evaluation of various cultivars over the course of three years, the cultivars with consistently lower relative expression of the *Mal d 1* gene were determined, namely 'King Jonagold', 'Jonagold', 'Braeburn Mariri Red', 'Braeburn', 'Cumulus', 'Zuzana', 'Fragrance'. The 'Gala' variety achieved stably high levels of relative expression of the *Mal d 1* gene in all three years of evaluation.

**Key words:** apple tree, *Malus × domestica* Borkh., relative gene expression, isoforms, Mal d 1, real-time PCR, NGS, storage

# OBSAH

1	ÚVOD.....	9
2	LITERÁRNÍ PŘEHLED .....	11
2.1	Charakteristika druhu .....	11
2.2	Genom jabloně .....	12
2.3	Genová exprese .....	13
2.3.1	Možnosti stanovení genové exprese .....	14
2.4	RT-qPCR.....	15
2.4.1	Výpočet relativní kvantifikace.....	16
2.4.2	Křivka tání .....	18
2.5	Profilování genové exprese pomocí sekvenování nové generace (NGS) .....	18
2.6	Potravinové alergie.....	19
2.7	Alergeny v jablku .....	20
2.7.1	Mal d 1 .....	20
2.7.1.1	Struktura alergenu Mal d 1 a jeho alergenita.....	21
2.7.1.2	Genetická podstata alergenu Mal d 1 .....	21
2.7.1.3	Vliv skladování na alergen Mal d 1 .....	24
2.7.2	Mal d 2 .....	24
2.7.3	Mal d 3 .....	25
2.7.4	Mal d 4 .....	26
2.7.5	Hypoalergenní odrůdy .....	26
3	VĚDECKÉ HYPOTÉZY A CÍLE PRÁCE.....	29
4	MATERIÁL A METODY .....	30
4.1	Rostlinný materiál .....	30
4.2	Odběr vzorku pro analýzy .....	31
4.3	Izolace RNA.....	31
4.4	Přepis do cDNA .....	33
4.5	Optimalizace kvantitativní real-time PCR .....	34
4.6	Gelová elektroforéza a sekvenační reakce .....	36
4.7	Optimalizace metody NGS pro kvantifikaci všech isoformů alergenu Mal d 1 .....	38
4.8	Statistická analýza výsledků .....	40
5	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	41
5.1	Hodnocení genové exprese v plodech vybraných odrůd jabloní .....	41
5.1.1	Vliv ročníku na úroveň genové exprese .....	42

5.1.2	Vliv skladování na úroveň genové exprese .....	58
5.1.3	Vliv systému produkce na úroveň genové exprese.....	68
5.1.4	Vliv lokality na úroveň genové exprese .....	72
5.2	Vyhodnocení genové exprese všech 31 isoform alergenu Mal d 1 .....	77
5.2.1	Vyhodnocení změny genové exprese u vybraných isoform alergenu Mal d 1 v průběhu dlouhodobého skladování .....	82
5.3	Shrnutí výsledků pro praxi .....	95
5.4	Publikované výsledky .....	97
6	ZÁVĚR.....	98
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....	101
8	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....	103



# 1 ÚVOD

V dnešní moderní době roste výskyt civilizačních nemocí, mezi které patří i alergie. Může za to stres, nesprávné stravovací návyky, znečištěné životní prostředí, chemizace potravin a mnohé další faktory. Právě proto by měl každý jedinec dbát o dodržování zásad zdravého životního stylu. Důležitou součástí vyváženého a zdravého jídelníčku je ovoce, které je přirozeným zdrojem mnoha vitamínů, minerálů, vlákniny a různých zdraví prospěšných látek. Jabloně (*Malus × domestica* Borkh.) jsou jednou z nejpěstovanějších ovocných plodin jak v České republice, tak ve světě. Velkou výhodou jablek je jejich dobrá skladovatelnost a tedy celoroční dostupnost a rovněž velký výběr rozmanitých odrůd. Na druhou stranu existuje určité procento lidí, kterým může konzumace jablek způsobit vážné zdravotní problémy v podobě alergické reakce. Uvádí se, že 0,4 – 6,6 % dospělých a 2,2 – 11,5 % dětí do 6 let je alergických na ovoce (Zuidmeer et al. 2008). Některé tyto alergie se objevují jako tzv. zkřížené a bylo zjištěno, že až u 70 % pacientů s alergií na pyl břízy se vyskytují potravinové alergie, nejčastěji právě na jablka (Geroldinger-Simic et al. 2011). V jablku byly zatím identifikovány čtyři hlavní třídy alergenů: Mal d 1, Mal d 2, Mal d 3 a Mal d 4. Alergen, který je zodpovědný za zkříženou alergickou reakci na břízový pyl a je typický pro oblast střední, severní a východní Evropy a rovněž pro oblast severní Ameriky (oblasti, kde rostou břízy), je alergen Mal d 1. Jedná se o protein s molekulovou hmotností 18 kDa, který patří do skupiny proteinů PR-10 (pathogenesis-related protein), stejně jako alergen Bet v 1 nacházející se v pylových zrnech břízy (Breiteneder a Radauer 2004). Projevy alergie způsobené alergenem Mal d 1 jsou většinou mírné, jedná se o tzv. OAS (oral allergic syndrom), kdy dochází k svědění a otoku rtů, krku, jazyka. Tyto příznaky se objevují během několika minut po konzumaci jablek. Teplem mění protein Mal d 1 svoji strukturu a přestává být alergenem, proto se alergie na jablka týkají pouze konzumace samotných plodů a teplem neošetřených jablečných produktů.

Důležitým znakem při určování kvality ovoce se stává jeho alergenicita, a proto je nezbytné odhalit podstatu jejího vzniku. Pomocí genetického mapování byly určeny pozice genů na chromozomech pro všechny čtyři známé třídy jablečných alergenů. Pro alergen Mal d 1, který je předmětem této práce, je v současné době známo 31 isoform genů, které ho kódují (Pagliarani et al. 2013). Fylogenetická analýza isoform genů Mal d 1 oddělila pět odlišných podskupin na základě nepřítomnosti nebo přítomnosti intronu a na základě variací délky intronu (Gao et al. 2005a; Pagliarani et al. 2012). V každém jablku je přítomna směs všech těchto isoform, z nichž některé se liší pouze jednou aminokyselinou (Gao et al. 2005a). Nejvíce

exprimovanou genovou podskupinou v dužnině a slupce jablek je podskupina I, ve které se nachází isoformy *Mal d 1.01* a *Mal d 1.02* (Sancho et al. 2006a).

Obsah alergenu v jablku závisí na různorodých faktorech, jako jsou podmínky a délka skladování, nadmořská výška, lokalita, systém produkce nebo biotický a abiotický stres (Bolhaar et al. 2005a; Sancho et al. 2006a; Botton et al. 2008; Matthes a Schmitz-Eiberger 2009; Kiewning et al. 2013; Savazzini et al. 2015). Avšak jedním z nejdůležitějších faktorů ovlivňujících alergenní potenciál ovoce je samotná odrůda (Wang et al. 2019). Různé odrůdy jsou klasifikovány do skupin s vysokým, středním a nízkým alergenním potenciálem (Bolhaar et al. 2005a; Marzban et al. 2005; Matthes a Schmitz-Eiberger 2009). Genetická determinace rozdílů v obsahu alergenů u odrůd jablek však doposud nebyla plně objasněna (Pagliarani et al. 2013). Nejčastěji využívanými metodami k zjištění obsahu alergenu v odrůdě jsou qRT-PCR, ELISA, SDS-PAGE elektroforéza a Western blot, kožní „prick“ testy nebo dvojitě slepý placebem kontrolovaný potravinový expoziční test (DBPCFC). Znalost obsahu Mal d 1 je důležitá, protože jablka s nízkou hladinou alergenu jsou lidmi s mírnými alergickými projevy tolerována a konzumace čerstvých plodů hypoalergenních odrůd jim většinou nezpůsobuje problémy (Bolhaar et al. 2005a; Kopac et al. 2012). V současnosti je celosvětově k dispozici velké množství odrůd jabloní, objasnění genetické podstaty vzniku alergenicity u jablek a případné získání molekulárních markerů by znamenalo velký posun ve šlechtění hypoalergenních odrůd.

## 2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

### 2.1 Charakteristika druhu

Jabloň domácí (*Malus × domestica* Borkh.) patří do čeledi růžovité (*Rosaceae*) a předpokládá se, že pochází z planého druhu *Malus sieversii* (Velasco et al. 2010). Pravděpodobným centrem původu současných kulturních jabloní je středoasijská oblast (pohoří Tien Shan v oblasti Kazachstánu, Kyrgyzstánu, Zakavkazí), z této oblasti se jabloň rozšířila na jihozápad do Malé Asie a dále do Evropy a Severní Ameriky (Velasco et al. 2010). V současnosti se jabloň domácí díky své vynikající klimatické adaptaci stala nejrozšířenějším ovocným druhem mírného pásma a jednou z nejpěstovanějších ovocných plodin na světě. Jabloň je poměrně nenáročná na stanoviště. Optimální podmínky pro pěstování poskytují polohy okolo 200 až 350 m. n. m. Plodem jabloně je jablko patřící mezi malvice čili jádrové ovoce. Jsou určeny jak k přímé konzumaci, tak k výrobě mnoha dalších produktů. Aktuálně existuje celosvětově velké množství různých odrůd pěstovaných jablek, avšak informace o přesném počtu se liší, odhaduje se 7500 (Elzebroek a Wind 2008), případně více než 10 000 (Peil et al. 2011), dokonce Mansfeldova světová databáze zemědělských a zahradnických plodin uvádí, že existuje více než 30 000 různých odrůd *Malus × domestica* Borkh. (mansfeld.ipk-gatersleben.de). Odrůdy se mezi sebou liší v různých pomologických a fyziologických vlastnostech. Čím dál více se v moderním ovocnářství využívají klony jednotlivých odrůd. Tyto klony vznikají náhodnou nebo cílenou mutací (genetickou změnou) za účelem zlepšení určité vlastnosti, například lepší vybarvení plodů, nerzivý a hladký povrch plodu nebo vyšší produktivita stromu. Nejrozšířenější je dělení odrůd podle doby zrání, na základě které můžeme odrůdy rozdělit na letní, u nichž konzumní zralost nastává současně se sklizňovou zralostí nebo brzo po ní a trvá krátce (sklizeň do 15. srpna); podzimní s konzumní zralostí 2-8 týdnů po sklizňové (sklizeň od 15. 8. do 20. 9.); raně zimní s konzumní zralostí 8-12 týdnů po sklizňové (sklizeň od 20. 9. – do 30. 9.); pozdně zimní s konzumní zralostí 12-24 týdnů po sklizňové (sklizeň od konce září) (Nečas et al. 2004).

Jablko je tvořeno z 10 % sacharidy a ze 4 % různými vitamíny, minerály a dalšími fytochemickými látkami, zbytek jablka (více než 80 %) tvoří voda (Ben-Nun 2016). V jablku obsažené sacharidy fruktóza a sacharóza mu dodávají jeho sladkou chuť, zatímco kyselá chuť pochází z kyseliny jablečné, vinné a citronové. Plody obsahují rovněž třísloviny, které tvoří 0,2 % a jablku dodávají svíravou a svěží chuť (Ben-Nun 2016). Také obsahují celý komplex zdraví prospěšných látek, jejichž dostatečný a pravidelný přísun podporuje odolnost a

obranyschopnost organismu (Boyer a Liu 2004). Vitaminy a minerály (vitamin A, B1, B2 a B6, niacin, kyselina pantothenová, kyselina listová, vitamín C a vitamín E, vápník, měď, železo, hořčík, mangan, fosfor, draslík, selen, sodík a zinek), polyfenolické látky jako důležitá součást antioxidantního komplexu (například rutin, kvercitrin, floridzin, kyselina chlorogenová, katechin), stopové prvky (například bor a kobalt), aminokyseliny, rozpustná a nerozpustná vláknina z celulózy, pektinu a ligninu jsou v jablkách obsaženy v biologicky ideální formě a nelze je proto zcela adekvátně nahradit uměle syntetizovanými produkty (Ben-Nun 2016). Jablka jsou tak významným zdrojem fytonutrientů a díky moderním metodám skladování jsou k přímé konzumaci dostupná celoročně.

## 2.2 Genom jabloně

Genom jabloně byl osekvenován v roce 2010 (Velasco et al. 2010). Pro sekvenování byla použita odrůda 'Golden Delicious'. Celková délka kontigů (603,9 Mb) pokrývala přibližně 81,3 % genomu jabloně. Celkem bylo sestaveno 17 vazebných skupin odpovídajících 17 chromozomům. Nesestavená část genomu cca 138,4 Mb byla z 98 % repetitivní a odhadovaná celková velikost genomu byla 742,3 Mb. Celkový počet genů, předpovězených pro genom jabloně, byl do té doby nejvyšší mezi rostlinami a to 57 386 domnělých genů, včetně některých genů, které mohou být přítomny pouze v jednom ze dvou párových chromozomů. Srovnání 17 jablečných chromozomů ukázalo silnou kolinearitu mezi dlouhými segmenty chromozomů 3 a 11, 5 a 10, 9 a 17, 13 a 16 a mezi kratšími segmenty chromozomů 1 a 7, 2 a 7, 2 a 15, 4 a 12, 12 a 14, 6 a 14, 8 a 15, což naznačuje, že genom domestikované jabloně formovala celogenomová duplikace (Velasco et al. 2010). Základní počet chromozomů u jabloně je tedy  $n = 17$ . Většina odrůd je diploidní ( $2n = 34$ ), ale objevují se i odrůdy triploidní ( $3n = 51$ ) jako např. 'Jonagold', 'Mutsu', 'Boskoopské', nebo tetraploidní ( $4n = 68$ ), například mutace odrůdy 'Ontario'. Existuje několik teorií, které vysvětlují tento jedinečně vysoký počet chromozomů u kmenu *Maleae*, nejpopulárnější je hypotéza takzvané široké hybridizace založená na alopolyploidizaci mezi předky podčeledí *Spiraeoideae* ( $n = 9$ ) a *Amygdaloideae* ( $n = 8$ ), které patří do čeledi *Rosaceae* (Phipps et al. 1991). Novější studie molekulární fylogeneze však poukazují na možnost, že kmen *Maleae* vznikl autopolyploidizací nebo hybridizací mezi dvěma sesterskými taxony s  $n = 9$  (podobnými jako je rod *Gillenia* rovněž patřící do čeledi *Rosaceae*) s následovanou diploidizací a aneuploidizací na  $n = 17$  (Velasco et al. 2010).

V roce 2017 byl genom jabloně přesequenován s využitím nejnovějších technik (Daccord et al. 2017). K sekvenování byl využit DH Golden Delicious, který vznikl pomocí technologie homozygotních linií (tzv. DH line – double-haploid line). Daccord et al. (2017) se ve své práci zaměřovali především na charakterizaci chybějících repetitivních sekvencí, studie transpozibilních elementů, epigenetické studie, vývoj epigenetických markerů a sestavení genomových DNA metylačních map. Celkově se povedlo osekvenovat 643,2 Mb. V jejich práci bylo identifikováno 42 140 genů kódujících proteiny (což představuje 23,3 % sestavy genomu) a 1 965 genů nekódujících proteiny. Důkaz transkripce byl nalezen u 93 % anotovaných genů. Transpozibilní elementy představovaly 372,2 Mb, což je 57,3 % z celkové velikosti osekvenovaného genomu. Genom osekvenovaný v roce 2017 nyní slouží jako referenční genom jabloně (Peace et al. 2019). Tyto znalosti genomu jsou velmi důležité pro pochopení biologického fungování rostliny, fyziologie vlastností a dědičnosti a rovněž pro další genetický výzkum jabloně. Na základě známé sekvence jablečného genomu byly například sestaveny SNP čipy pro genotypování – RosBREED Apple 8K nebo Fruitbreedomics Apple 20K na platformě Illumina (Chagné et al. 2012; Bianco et al. 2014) a Axiom<sup>®</sup> Apple 480K na platformě Affimetrix (Bianco et al. 2016), které představují výrazné usnadnění při aplikaci ve šlechtění. Mnohem rychleji je také možné určit kauzální geny pro určité fenotypové projevy. Genetické mapy s vysokou hustotou jsou konstruovány mnohem efektivněji a díky tomu jsou QTL pro důležité znaky snadněji spojovány s kandidátními geny (Peace et al. 2019).

### 2.3 Genová exprese

Gen je základní jednotka genetické informace, aby se tato informace mohla projevit do konečného funkčního produktu (protein nebo nekódující RNA), musí dojít k tzv. expresi genu. Genová exprese je tedy ucelený proces sestávající z dalších kroků, jako jsou transkripce a translace. Velmi zjednodušeně ji lze popsat na základě konceptu centrálního dogmatu molekulární biologie, formulovaného koncem padesátých let vědcem Francisem Crickem, a sice DNA (kyselina deoxyribonukleová)  $\xrightarrow{\text{transkripce}}$  RNA (kyselina ribonukleová)  $\xrightarrow{\text{translace}}$  protein. V procesu transkripce dochází pomocí enzymu RNA polymerázy II k produkci messengerové RNA (mRNA) a jejím následným úpravám. V procesu translace je tato mRNA jako součást složitého proteosyntetického aparátu použita coby templát k přímé syntéze molekuly proteinu, která je následně posttranslačně zpracována.

Genová exprese je přísně regulovaný proces, který zahrnuje širokou škálu mechanismů. Schopnost regulovat genovou expresi umožňuje buňkám reagovat na měnící se potřeby a podmínky a dodávat funkční protein kdykoli je to nutné pro jejich normální fungování nebo přežití. Regulace genové exprese funguje tedy jako ovladač, který zvyšuje, snižuje nebo úplně zastaví produkci různých proteinů. Tyto mechanismy jsou základem různých fyziologických a patologických procesů, včetně buněčných adaptací na nová prostředí, udržování homeostázy a reakce na napadení nebo poškození (Volgin 2014). Regulace genové exprese se může projevovat na všech úrovních procesu přenosu genetické informace od transkripce, posttranskripčních úprav, translace až po posttranslační úpravy.

### 2.3.1 Možnosti stanovení genové exprese

Aktivita genů je rozhodující pro pochopení jakéhokoli biologického procesu, a to díky tomu, že genová exprese je v kterémkoli daném časovém okamžiku regulována různě a podle potřeby. Stanovit genovou expresi je možné pomocí různých detekčních metod, v závislosti na tom, na jaké úrovni je sledována.

Na úrovni RNA se využívá:

**RT-qPCR (reverse transcription quantitative real-time PCR)** – u této metody je nejdříve mRNA přepsána do cDNA pomocí reverzní transkriptázy. Samotná metoda je založena na principu klasické PCR, umožňuje však sledovat kvantifikaci syntetizovaného produktu v reálném čase.

**RNA-seq (whole transcriptome shotgun sequencing)** – jde o technologii sekvenování RNA pomocí NGS (sekvenování nové generace), díky které je možné určit přítomnosti a množství RNA v biologickém vzorku v daném okamžiku, čímž je možné analyzovat neustále se měnící buněčný transkriptom.

**Northern blot** – mRNA je nejprve rozdělena podle velikosti na agarózovém denaturačním gelu, poté přenesena na nitrocelulózový filtr, denaturována a nakonec hybridizována se značenou hybridizační sondou (tato sonda může být značena například radioaktivně ( $^{32}\text{P}$ ), nebo digoxigeninem, biotinem, aj.). Intenzita výsledného proužku určuje množství sledované mRNA.

**SAGE (Sériová analýza genové exprese)** – používá se pro stanovení absolutních hladin transkripce. Mechanismus této metody je založen na unikátních malých značkách („tags“)

o délce 13–15 bp, které dokážou identifikovat konkrétní fragment transkriptu, a na rychlém sekvenování řetězců těchto značek spojených dohromady.

**Mikročipy** – díky této metodě je umožněno analyzovat hladiny exprese tisíců předem vybraných genů v rámci jedné reakce. Základním principem je hybridizace komplementárních fragmentů cDNA k sondám pevně navázaných na povrch čipu. Navázání komplementárního fragmentu umožní fluorescenci sondy. Tento signál je poté detekován digitálně.

**Hybridizace in situ** – tato metoda umožňuje lokalizaci a identifikaci specifické sekvence nukleotidů v RNA, a to přímo v biologickém materiálu (chromozomy, jádra, nebo celé buňky) neizoluje se nukleová kyselina.

Na úrovni proteinu lze použít:

**Western blot** – postup je podobný Northern blot analýze, jen s tím rozdílem, že jsou pomocí dodecylsírany sodný – polyakrylamidovou gelovou elektroforézou (SDS-PAGE) separovány bílkoviny, které jsou na membráně detekovány specifickými protilátkami.

**ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)** – je imunologická metoda založená na specifické interakci antigenu a protilátky. Enzym, který je navázaný na antigen nebo protilátku, katalyzuje přeměnu přidávaného substrátu na produkt, který je barevný. Barevný produkt lze měřit spektrofotometricky.

**Hmotnostní spektrometrie** – princip metody je založen na ionizaci, tedy tvorbě nabitých molekul nebo fragmentů molekul a měření jejich poměru hmotnosti k náboji, na jeho základě je možné molekuly identifikovat.

## 2.4 RT-qPCR

RT-qPCR (reverse-transcription quantitative real-time PCR) je metoda, která kombinuje reverzní transkripci (RT-PCR) s kvantitativní PCR v reálném čase (qPCR). Díky tomu je možné stanovit přítomnost mRNA pomocí jejího přepisu do tak zvané komplementární DNA (cDNA) s následnou PCR reakcí analyzovanou v reálném čase, což umožňuje rychlou detekci změn v genové expresi (Adams 2020).

RT-PCR umožňuje použití RNA jako templátu, kdy je nejdříve pomocí enzymu reverzní transkriptázy RNA přepsána do jednovláknové kopie komplementární DNA (cDNA). cDNA

pak může být amplifikována DNA polymerázou, a tím použita ve standardním procesu PCR amplifikace.

Metoda kvantitativní polymerázové řetězové reakce představuje velice citlivou a rychlou metodu vhodnou pro studium exprese genů. Je založena na principu klasické PCR, avšak na rozdíl od ní umožňuje kvantifikaci syntetizovaného produktu a každý cyklus je zaznamenáván v reálném čase. Tento záznam je založen na principu stanovení změny intenzity fluorescenčního záření během amplifikace. Při hodnocení platí, že čím vyšší je obsah nukleové kyseliny v testovaném vzorku (např. mRNA jako výraz úrovně exprese daného genu), tím rychlejší je přírůstek fluorescence. Jako zdroj fluorescence se využívají buď nespecifická barviva interkalující se do dvouřetězcové DNA (např. SYBR Green), nebo specifické fluorescenční sondy komplementární k cílové sekvenci (např. hydrolyzační sondy TaqMan nebo hybridizační sondy FRET). Kvantifikace může být buď absolutní, kdy z kalibrační křivky vytvořené za použití referenční DNA o známém množství odečítáme přesné množství mRNA ve vzorku, nebo relativní, kdy porovnáváme množství fluorescence jednoho vzorku nebo skupiny vzorků s jiným vzorkem nebo skupinou vzorků (např. kontrolní), měříme tedy relativní změnu úrovně exprese mRNA.

Kvantitativní PCR reakci můžeme rozdělit do čtyř charakteristických fází: 1. fáze fluorescence vzorku se pohybuje na úrovni pozadím; 2. exponenciální fáze amplifikace, kdy se množství amplifikovaného produktu relativně pomalu zvyšuje na takovou úroveň, že intenzitu fluorescence již lze detekovat a je nad pozadím; 3. lineární fáze amplifikace s prudkým nárůstem fluorescence; 4. fáze plató, definovaná jako útlum rychlosti akumulace produktu (Pfaffl, 2004). Množství amplifikovaného produktu je přímo úměrné vstupnímu množství pouze během exponenciální fáze PCR amplifikace probíhající se 100% účinností (tzn. za zdvojnásobení počtu amplikonů v každém PCR cyklu), klíčovým faktorem kvantitativní schopnosti této metody je tedy to, že měří množství produktu právě v této fázi (Pfaffl 2004). Cyklus, kdy dochází k nárůstu fluorescence nad prahovou hodnotu, je zaznamenán jako  $C_t$  hodnota.  $C_t$  hodnota je pak důležitá pro další výpočty.

#### **2.4.1 Výpočet relativní kvantifikace**

Relativní kvantifikace určuje změny v hladinách mRNA určitého genu napříč různými vzorky a vyjadřuje míru exprese analyzovaného genu vzhledem k hladině vnitřní kontrolní mRNA. Jako kontrolní nebo referenční gen většinou slouží provozní (housekeeping) geny,



u kterých se předpokládá stálá úroveň genové exprese v buňce za všech podmínek. Nejčastěji využívané provozní geny jsou *aktin*, *ubikvitin*, *Glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza (GAPDH)*, *tubulin* aj. Hodnoty relativní genové exprese genu zájmu jsou normalizovány k tomuto referenčnímu genu. Pro výpočet exprese genu zájmu vzhledem k odpovídajícímu referenčnímu genu jsou stanoveny různé matematické modely.

Nejčastěji používanou metodou ke stanovení relativní exprese je komparativní metoda  $\Delta\Delta C_t$  (Livak a Schmittgen 2001). Tato metoda je poměrně jednoduchá a základním předpokladem je, že amplifikace genu zájmu (GOI) i referenčního genu (RG) probíhá se stejnou účinností. K výpočtu se používá vztah:

$$\Delta C_t (\text{testovaný vzorek}) = C_{t_{GOI}} - C_{t_{RG}}$$

$$\Delta C_t (\text{kontrolní vzorek}) = C_{t_{GOI}} - C_{t_{RG}}$$

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_t (\text{testovaný vzorek}) - \Delta C_t (\text{kontrolní vzorek})$$

$$R = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

V některých případech je potřebné pro přesnější výpočet relativní kvantifikace zohlednit účinnost amplifikační reakce, která je daná účinností nasedání primerů, složením PCR reakce, případně přítomností PCR inhibitorů v reakci. V případě, že gen zájmu a referenční gen nejsou amplifikovány se stejnou účinností, je k výpočtu relativní kvantifikace využita metoda dle Pfaffla (Pfaffl 2001). Relativní poměr exprese se vypočítá podle následného vztahu:

$$R = \frac{(E_{GOI})^{\Delta C_{t_{GOI}}(\text{kontrolní vzorek} - \text{testovný vzorek})}}{(E_{RG})^{\Delta C_{t_{RG}}(\text{kontrolní vzorek} - \text{testovný vzorek})}}$$

K výpočtu poměru relativní exprese (R) je tedy potřeba znát účinnost (E) amplifikace pro referenční gen (RG) a rovněž pro gen zájmu (GOI) a hodnoty  $C_t$  testovaného a kontrolního vzorku, a to jak pro referenční gen, tak pro gen zájmu.

### 2.4.2 Křivka tání

Pokud se v qPCR využívá interkalační fluorescenční barvivo, které není specifické a váže se na jakoukoli dvouřetězcovou DNA (dsDNA) v reakci, může dojít k detekci nespecifického fluorescenčního signálu. Pokud nejsou primery optimálně navrženy, dochází k tvorbě nespecifických produktů, případně primery vytváří dimery. Tyto struktury pak mohou být zdrojem nespecifického fluorescenčního signálu a ovlivnit kvantifikaci. Při použití interkalačního barviva je proto vhodné využít analýzy křivek tání pro kontrolu tvorby nespecifických produktů. Analýza křivky tání využívá toho, že různé amplifikované produkty mají různé teploty tání, které závisí na jejich délce, obsahu GC a jejich komplementaritě. Nespecifické produkty mají obvykle teplotu tání nižší než specifické. Křivka tání tedy ukazuje změnu intenzity fluorescence při různých teplotách.

Ještě citlivější metodou je vysokorozlišovací analýza křivek tání (HRM) pomocí které je možné detekovat mutace, polymorfismy a epigenetické rozdíly ve vzorcích dsDNA. Pro tuto analýzu se využívají tzv. saturující barviva, jako jsou např. LCGreen plus (Idaho Technologies), EvaGreen (Biotium) nebo ResoLight (Roche Applied Science), které plně vysycují všechna vazebná místa dsDNA a při postupné denaturaci nedochází k jejich znovunavázání, zároveň tato barviva ani v případě použití vyšší koncentrace neinhibují PCR reakci. V současnosti již HRM analýza nevyžaduje speciální přístroj jako je LightScanner<sup>®</sup> (Idaho Technology), ale je možné ji provádět i na modifikovaných termocyklerech pro real-time PCR, např. LightCycler<sup>®</sup> 480 (Roche) nebo Rotor-Gene<sup>®</sup> Q (Qiagen). Tato analýza se provádí po proběhnutí qPCR a základním principem je postupné zvyšování teploty a sledování změn fluorescence při denaturaci vzniklých amplikonů (Reed et al. 2007).

## 2.5 Profilování genové exprese pomocí sekvenování nové generace (NGS)

V současné době existuje na trhu několik platforem pro NGS. Pravděpodobně nejvyužívanější je Illumina, u které sekvenování probíhá detekcí fluorescenčních záblesků nově inkorporovaného nukleotidu a k amplifikaci dochází na destičce opatřené oligonukleotidy, na níž se každý segment DNA amplifikuje pomocí můstkové PCR. V minulosti byla využívána i metoda Solid, která byla vyvinuta firmou Applied Biosystems. K sekvenování využívá emulzní PCR reakci probíhající na kuličce. Vzniklé namnožené segmenty jsou umístěné do mikroreaktorů na skleněnou destičku a následně jsou na ně vázány fluorescenčně značené sondy obsahující vždy dva nukleotidy. Dochází k opakované ligaci a odmývání různých sond a měří

se intenzita záblesků při navázání sondy na segment. Jednou z novějších platforem je Ion Torrent od firmy Life Technologies, která byla využita i v této práci k studiu genové exprese. Sekvenátor nové generace Ion Personal Genome Machine (PGM) je založený na technologii schopné přímo převádět chemický signál do digitální podoby. Místo optického způsobu zaznamenávání jednotlivých nukleotidů je využívána detekce vodíkových protonů uvolněných v průběhu syntézy nově vznikajícího řetězce katalyzované DNA polymerázou. Proces probíhá na polovodičovém čipu typu CMOS (Complementary Metal-Oxide Semiconductor) hustě pokrytém mikrojamkami o velikosti 3,5  $\mu\text{m}$ , pod nimiž je umístěna na ionty citlivá vrstva a detektor. Inkorporace nukleotidu způsobí uvolnění pyrofosfátu a kationtu  $\text{H}^+$ , čímž dojde ke změně pH roztoku o 0,02 jednotky za každou připojenou bázi. Detektor zachytí tuto změnu a převede ji do digitální podoby. V případě inkorporování dvou nebo více stejných bází lineárně narůstá intenzita signálu. Zařízení tudíž funguje jako velmi citlivý druh pHmetru, kdy vstupní materiál tvoří jen 10 ng DNA. Sekvenátor Ion PGM pracuje s úseky o délce 35 až 400 bp, tudíž je vhodný pro studium exprese genů.

## 2.6 Potravinové alergie

Konzumace čerstvého ovoce a zeleniny má pro člověka řadu zdravotních benefitů, avšak tato strava může rovněž obsahovat alergenní proteiny, které senzitivním jedincům způsobují zdravotní problémy. Alergie na rostlinnou stravu je nejčastější potravinovou alergií u starších dětí a dospělých (Fernández-Rivas et al. 2006). Zkonzumované ovoce a zelenina mohou vyvolat alergickou reakci s příznaky od mírných symptomů, jako je orální alergický syndrom (OAS), až po těžký, život ohrožující anafylaktický šok a smrt. Potravinová alergie je hypersenzitivní reakce na za normálních okolností neškodné látky (nejčastěji proteiny) a zahrnuje imunitní odpověď zprostředkovanou imunoglobulinem E (IgE) syntetizovaným B-lymfocyty (Bohle 2004). Potravinové alergie můžeme rozdělit do dvou tříd. Potravinové alergie třídy I, u kterých se imunitní reakce projevuje gastrointestinálními a systémovými příznaky, a to z toho důvodu, že alergeny zahrnuté v této třídě jsou velmi stabilní a odolné vůči teplu a procesům trávení (Pastorello a Rivolta 2004). Potravinové alergie třídy II způsobují pylové proteiny z několika druhů stromů a trav a proteiny z čerstvého ovoce, vystavení se těmto alergenům okamžitě vyvolává imunitní reakci (Eriksson et al. 1982).

## 2.7 Alergeny v jablku

Jablka obsahovala čtvrtý nejčastější alergen z testovaných 24 různých potravin a rovněž byly nejvíce alergenním druhem ovoce z čeledi *Rosaceae* (Burney et al. 2010). Úroveň alergické reakce je závislá na odrůdě jabloně (Vlieg-Boerstra et al. 2011). Existují odrůdy, jejichž konzumace vyvolává silné alergické reakce, a naopak i odrůdy s minimální alergenicitou. Genetická determinace velkých meziodrůdových rozdílů však doposud nebyla plně objasněna. Exprese alergenů u jabloní probíhá zejména v plodech, přičemž se předpokládá, že u většiny odrůd je exprese vyšší ve slupce oproti dužnině (Fernández-Rivas a Cuevas 1999; Matthes a Schmitz-Eiberger 2009; Pagliarini et al. 2013). Mechanické odstranění slupky plodu před konzumací ve většině případů pouze zmírní projevy alergické reakce, v určité části alergické populace však alergická reakce přetrvává (Fernández-Rivas a Cuevas 1999; Pagliarini et al. 2013). Prvním charakterizovaným jablečným alergenem byl alergen Mal d 1. Později byly identifikovány další alergeny Mal d 2, Mal d 3 a Mal d 4.

### 2.7.1 Mal d 1

Alergen Mal d 1 je 17,5 kDa velký protein, který patří do rodiny PR-10 proteinů. Funkce PR-10 proteinů není stále zcela objasněna, aktivují se v rostlinách kupříkladu v reakci na různé druhy stresu, ale mohou hrát i další důležité role v různých vývojových stádiích rostlin (Fernandes et al. 2013). U střeoevropské populace je považován za nejvýznamnější jablečný alergen (Vanek-Krebitz et al. 1995) a to právě z důvodu jeho homologie s alergenem Bet v 1 obsaženém v pylu břízy (Breiteneder a Radauer 2004). Aminokyselinové sekvence těchto dvou proteinů jsou z 64,5 % identické (Vanek-Krebitz et al. 1995). V oblastech, kde rostou břízy, tedy dochází ke vzniku křížové alergické reakce, kdy se u lidí s alergií na pyl břízy může vyvinout i alergie na jablka. Alergická reakce způsobená alergenem Mal d 1 se obvykle projevuje mírnějšími příznaky a objevuje se po požití tepelně neupraveného jablka. Dochází k alergické reakci na sliznicích dutiny ústní, jazyka a hltanu a projevuje se pálením rtů, jazyka, svěděním i otoky patra a kořene jazyka a škrábáním v krku. Mírnější příznaky alergie jsou dány i snadnou enzymatickou degradovatelností proteinu Mal d 1, který je štěpen pepsinem během trávicího procesu (Bohle et al. 2006). Tento protein je rovněž tepelně nestabilní proto alergické reakce nevyvolávají tepelně upravené potraviny vyrobené z jablek (Bohle et al. 2006).

### 2.7.1.1 *Struktura alergenu Mal d 1 a jeho alergenicita*

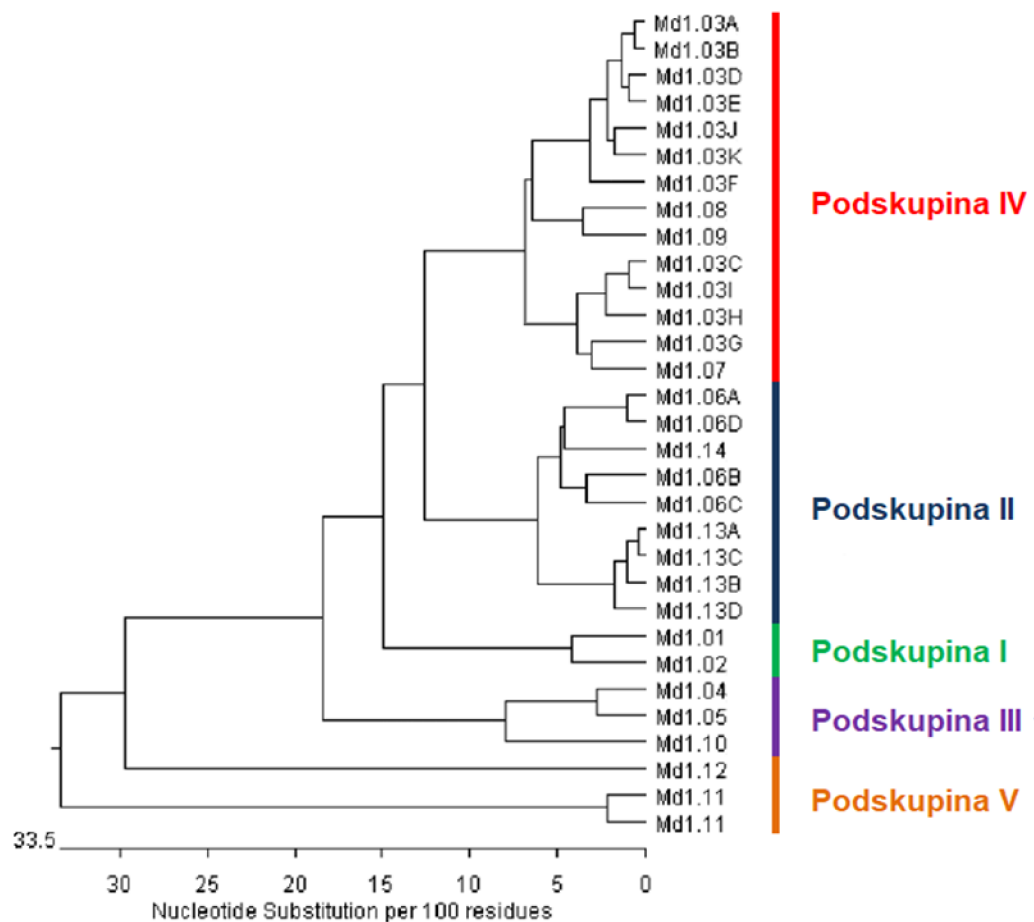
Strukturu alergenu Mal d 1 poprvé detailně popsali pomocí NMR spektroskopie ve své práci Ahammer et al. (2017). Sekundární strukturu alergenu Mal d 1 tvoří sedmivláknový antiparalelní  $\beta$ -skládaný list ( $\beta 1 - \beta 7$ ), na který na C-konci navazuje dlouhý  $\alpha$ -helix ( $\alpha 3$ ) a dva po sobě jdoucí krátké helixy ( $\alpha 1$  a  $\alpha 2$ ). Hrany  $\beta$ -skládaného listu jsou formovány vlákny  $\beta 1$  a  $\beta 2$ , které jsou spojeny helixy  $\alpha 1$  a  $\alpha 2$ . Tyto dva helixy tvoří podpěru ve tvaru písmene V pro C-koncový dlouhý helix  $\alpha 3$ . Podobně jako u dalších proteinů z rodiny PR-10, i tady jsou vlákna  $\beta 1$  a  $\beta 2$  spojena motivem smyčky, která je bohatá na glycin. Tyto strukturální prvky společně vytvářejí velkou hydrofobní vnitřní dutinu, která je opět typická pro bílkoviny z rodiny PR-10 a je pravděpodobně klíčem k jejich funkčnímu významu (Fernandes et al. 2013). Při porovnání alergenů Mal d 1 a Bet v 1, které oba patří do rodiny PR-10 proteinů, jsou jejich trojrozměrné struktury obecně velmi podobné (Ahammer et al. 2017). Tato strukturní podobnost je v souladu s pozorovanou imunologickou zkříženou reaktivitou mezi Mal d 1 a hlavním alergenem pylu břízy, Bet v 1, případně dalšími potravinovými alergeny z proteinové rodiny PR-10. U většiny pacientů je protein Bet v 1 senzibilizačním činidlem, kdy Bet v 1 specifické IgE protilátky následně zkříženě reagují s Mal d 1 a vyvolávají alergickou reakci i na jablka, což se odráží v klinickém pozorování, že alergie na jablka se rozvíjí až po nástupu senné rýmy v důsledku březového pylu (Ebner et al. 1995). Další zajímavostí je, že proteiny Mal d 1 a Bet v 1 se v délce liší o jednu aminokyselinu, a to v oblasti smyčky mezi vlákny  $\beta 6$  a  $\beta 7$  (Ahammer et al. 2017). Vzhledem k tomu, že tato smyčka je v Mal d 1 kratší o jeden zbytek než v Bet v 1, jeví se oblast na povrchu bílkoviny v Mal d 1 se jeví jako méně hydrofobní než odpovídající oblast na povrchu Bet v 1. To může být částečně odpovědné za různé IgE vazebné vlastnosti těchto alergenů (Ahammer et al. 2017). Míru imunologické reakce na jednotlivé isoformy alergenu Mal d 1 může ovlivnit rovněž fakt, že různé isoformy tohoto proteinu obsahují v potenciálních IgE interakčních površích aminokyselinové substituce (Holm et al. 2011). A proto není jisté, do jaké míry se jednotlivé isoformy Mal d 1 podílejí na vzniku alergické reakce u senzitivních jedinců.

### 2.7.1.2 *Genetická podstata alergenu Mal d 1*

Na základě sekvenace a vytvořených genetických a fyzikálních map byla určena pozice genů *Mal d 1* na dvou homologních LG (linkage group – vazebná skupina), konkrétně LG13 a LG16 a gen *Mal d 1.05* byl nalezen na LG6 (Gao et al. 2005a; Velasco et al. 2010; Pagliarani

et al. 2012). Nejdříve bylo identifikováno 18 genů pro alergen *Mal d 1* a ty byly rozděleny do čtyř podskupin I-IV (Gao et al. 2005a), později bylo identifikováno až 31 isoalergenů *Mal d 1* (Pagliarani et al. 2012). Porovnáním 31 kódujících sekvencí získaných díky osekvenování genomu odrůdy ‘Golden Delicious’ byl vygenerován fylogenetický strom, který rozdělil tyto isoalergeny do pěti podskupin I-V (obrázek 1), z nichž čtyři byly již dříve popsány a charakterizovány (Gao et al. 2005a; Pagliarani et al. 2013). Společné pro všechny podskupiny s výjimkou podskupiny IV je přítomnost jednoho intronu různé velikosti (Gao et al. 2005a). V promotorových oblastech byly identifikovány některé konzervativní sekvence, jako jsou sekvence GAGAATC u bezintronových isoform genů podskupiny IV (*Mal d 1.03A*, *Mal d 1.03D*, *Mal d 1.03E* a *Mal d 1.03F*) a sekvence TCATC před iniciačním kodonem ATG u isoform genů obsahujících intron (*Mal d 1.01*, *Mal d 1.02*, *Mal d 1.04* a *Mal d 1.06A*) (Gao et al. 2005a). V regulačních oblastech genu *Mal d 1* jsou obsažena další konzervativní vazebná místa transkripčních faktorů (motiv Box-W, ERE-element, TCA-element nebo motiv ERRE), což naznačuje, že by se mohly podílet například na produkci etylenu nebo kyseliny salicylové (Ziadi et al. 2001). Tyto rozdíly v regulačních oblastech mohou být klíčové pro expresi v různém vývojovém stádiu, v specifických tkáních, jakož i pro expresi v různých podmínkách prostředí nebo biotického stresu (Savazzini et al. 2015). Kupříkladu tkáňová specifita je dobře zdokumentována pro několik isoform genů *Mal d 1* a jejich detekce v plodu je prvním krokem k pochopení alergenního potenciálu každé isoformy (Beuning et al. 2004). Isoformy *Mal d 1.01* a *Mal d 1.02* jsou vysoce zastoupeny v plodech, následované skupinami *Mal d 1.03* (C, E a F), *Mal d 1.06* (isoformy A a B), *Mal d 1.07*, *Mal d 1.10* a *Mal d 1.11* (Savazzini et al. 2015). Některé isoformy genu *Mal d 1* se nacházejí také ve specializovaných orgánech, jako jsou pupen nebo květ (*Mal d 1.01*, *Mal d 1.02* a *Mal d 1.03E*), kořeny (*Mal d 1.03F*, *Mal d 1.06B*, *Mal d 1.08* a *Mal d 1.09*) a listy napadeny patogenem (*Mal d 1.04* a *Mal d 1.06*) (Savazzini et al. 2015).

Pagliarani et al. (2013) zkoumali specifickou genovou expresi každé isoformy alergenu *Mal d 1* pomocí qRT-PCR na odrůdách ‘Gala’ a ‘Florina’ a bylo zjištěno, že z 31 isoform jich 11 nebylo vůbec exprimováno. Neexprimovaly se žádné geny z podskupiny II a některé geny z podskupin III a IV. Z výsledků analýzy dále vyplynulo, že v plodech jabloní probíhala exprese u 20 genů z podskupin I a V (všechny geny) a některých genů z podskupin III a IV. Mezi expresí jednotlivých isoform byly značné rozdíly. Pagliarani et al. (2013) dále experimentálně ověřili, že existují rozdíly v expresi mezi dužninou a slupkou plodů s výjimkou genů z podskupiny V, přičemž transkripty genu *Mal d 1* byly přednostně lokalizovány ve slupce jablka.



**Obrázek 1.** Fylogenetický strom vytvořený pomocí metody nejbližšího souseda (Neighbour-joining) na základě kódujících sekvencí 31 isoformů alergenu Mal d 1 (upraveno dle Pagliarani et al. 2013).

Produkty transkripce genů *Mal d 1* mají tedy značnou genetickou variabilitu, která je dána sekvenčním polymorfismem jednotlivých isoalel. Řada autorů potvrdila, že nejvíce exprimovanými isoformami jsou *Mal d 1.01* a *Mal d 1.02* (Beuning et al. 2004; Botton et al. 2008; Pagliarani et al. 2013). Úroveň exprese těchto dvou isoformů byla 10 až 10 000krát vyšší než u ostatních isoformů genu *Mal d 1* a celkové kombinované množství RNA pro tyto dva isogeny překročilo množství všech ostatních isoformů dohromady (Pagliarani et al. 2013). I přes toto zjištění je důležité testovat expresi minoritních isoformů *Mal d 1*, protože i nepatrné množství alergenního proteinu může u některých jedinců vyvolat alergické reakce. Navíc je pravděpodobné, že alergenicitu jablek určuje spíše přítomnost a množství specifických isoalergenů *Mal d 1*, než celkový obsah *Mal d 1* (Pagliarani et al. 2013).

### **2.7.1.3 Vliv skladování na alergen Mal d 1**

Vzhledem k tomu, že jablka jsou vhodná ke konzumaci i po několikaměsíčním skladování, je důležité poznat, k jak velkým změnám v obsahu alergenu Mal d 1 dochází u různých odrůd za různých podmínek skladování. Jablka jsou obvykle skladována dvěma způsoby, a to v chlazeném skladu bez kontrolované atmosféry při teplotě kolem 2 °C, nebo v kontrolované atmosféře ULO (ultra-low oxygen) se sníženým obsahem kyslíku a oxidu uhličitého, nízké teplotě a vysoké vlhkosti. Při dlouhodobém skladování se využívá další ošetření plodů, například přípravkem obsahujícím 1-methylcyklopropen (1-MCP) známým pod názvem SmartFresh. Posouzením vlivu skladování na alergenicitu jablek se zabývalo již několik autorů (Bolhaar et al. 2005a; Sancho et al. 2006a; Botton et al. 2008; Matthes a Schmitz-Eiberger 2009; Kiewning et al. 2013). Hladina alergenu Mal d 1 byla studována jak na úrovni bílkovin, tak na úrovni RNA. Obsah alergenu Mal d 1 se během skladování významně zvyšuje. Bylo zjištěno, že v čerstvě sklizeném plodu se nachází kolem 1-20 µg proteinu Mal d 1 na gram jablka ale po skladování může tato hodnota vzrůst až na více než 130 µg proteinu Mal d 1 na gram jablka (Matthes a Schmitz-Eiberger 2009). Rovněž genová exprese alergenu Mal d 1 může v průběhu skladování několikanásobně vzrůst bez ohledu na typ skladování (Sancho et al. 2006a; Botton et al. 2008; Kiewning et al. 2013). Efekt způsobu skladování na změnu obsahu alergenu Mal d 1 již tak jednoznačný není. Bolhaar et al. (2005a) zjistili, že obsah alergenu Mal d 1 je nižší v plodech skladovaných v kontrolované atmosféře ULO než v plodech skladovaných v chlazeném skladu. V studii Kiewning et al. (2013) byl ale výsledek opačný, u většiny studovaných odrůd byl obsah alergenu Mal d 1 nižší v plodech skladovaných v chlazeném skladu. V této studii byl rovněž potvrzen pozitivní vliv 1-MCP na nižší hladinu alergenu Mal d 1 v plodech během skladování.

### **2.7.2 Mal d 2**

Alergen Mal d 2 je 23 kDa velký protein, který patří mezi thaumatin-like proteiny (TLP) z rodiny PR-5 proteinů. TLP proteiny lze rozdělit do tří skupin: 1) proteiny produkované jako reakce na infekci patogenem, 2) proteiny produkované jako reakce na osmotický stres, nazývané také osmotiny a 3) antifungální proteiny přítomné v semenech obilovin (Breiteneder 2004). TLP proteiny jsou obecně odolné vůči proteázám a tepelné degradaci, což je pravděpodobně způsobeno přítomností 16 konzervovaných cysteinů v jejich struktuře, které tvoří osm disulfidických můstků (Breiteneder 2004). Alergeny Mal d 2 jsou považovány za



minoritní, i když ve zralých jablkách jsou hojně zastoupeny a mohou vyvolat silnou alergickou reakci (Savazzini et al. 2015). V plodech jabloní patří geny *TLP* mezi nejčastěji exprimované a mezi odrůdami byl nejvyšší obsah nalezen u odrůdy ‘Braeburn’ (Botton et al. 2008). Pomocí mapovacích studií a sekvence genomu jabloně byla určena pozice jednotlivých genů *Mal d 2* na různých chromozomech, například geny pro *Mal d 2.01* a *Mal d 2.03* se nachází na LG2, LG5, LG9 a geny pro *Mal d 2.02* na LG10, LG15 a LG17 (Gao et al. 2005b; Velasco et al. 2010).

### 2.7.3 Mal d 3

Alergen *Mal d 3* je nízkomolekulární protein o velikosti 9 kDa, který patří mezi nespécifické proteiny přenášející lipidy (nsLTP – nonspecific lipid-transfer proteins) z rodiny prolaminů (PR-14). Tyto proteiny jsou pojmenovány podle schopnosti přenášet lipidy mezi membránami. Jako ostatní PR proteiny jsou zapojeny do procesů při adaptaci rostliny na biotický i abiotický stres, rozpoznávání a inhibici patogenů a jsou rovněž zodpovědné za kumulaci obraných extracelulárních polymerních látek. Pro LTP je charakteristické konzervativní složení šesti až osmi cysteinů v jejich struktuře, které tvoří tři až čtyři disulfidické můstky (Muraro a Alonzi 2012). Tato kompaktní struktura zaručuje stabilitu vůči tepelné degradaci a proteázám. LTP proteiny jsou významnými potravinovými alergeny zejména ve středomořských oblastech. Nepřekvapivě způsobuje *Mal d 3* alergii, která nesouvisí s alergií na pyl, ale navozuje tzv. systémovou alergickou reakci, která je provázená závažnými příznaky, jako jsou kopřivka, astma, zvracení, průjem, hypotenze až anafylaktický šok (Marzban et al. 2005). Několik studií prokázalo zkříženou imunologickou reakci alergenů LTP z čeledi *Rosaceae* mezi sebou a rovněž mezi alergeny LTP z čeledi *Rosaceae* a botanicky nesouvisejícími rostlinnými druhy (Sánchez-Monge et al. 1999; Asero et al. 2002). Geny pro *Mal d 3.01* a *Mal d 3.02* jsou lokalizovány na chromozomech LG4 a LG12 (Gao et al. 2005c). Obsah alergenu *Mal d 3* se zvyšuje s dosažením fyziologické zralosti plodů, přičemž gen pro isoformu *Mal d 3.01* je více exprimován než gen pro isoformu *Mal d 3.02* (Pagliarani et al. 2009) a klesá během skladování při 4 °C, přičemž etylen zřejmě představuje signální aktivátor genové exprese (Sancho et al. 2006b). Alergen *Mal d 3* je v jablku lokalizován především v slupce a v dužnině se téměř nevyskytuje (Fernández-Rivas a Cuevas 1999; Marzban et al. 2005). Nejvyšší obsah alergenu *Mal d 3* byl nalezen například u odrůdy ‘Rajka’ a ‘Delorina’, zatímco jiné komerční odrůdy ‘Fuji’, ‘Brina’, ‘Golden Delicious’ a ‘Granny Smith’, měly obsah nižší (Botton et al. 2008).

#### 2.7.4 Mal d 4

Alergen Mal d 4 patřící mezi minoritní jablečné alergeny je 14 kDa velký protein, který patří mezi profiliny. Profiliny jsou cytosolické proteiny, které se nacházejí ve všech eukaryotických buňkách a podílejí se na regulaci polymerace aktinu (Radauer et al. 2006). Pacienti alergičtí na profiliny tvoří asi 20 % všech jedinců alergických na pyly (Valenta et al. 1992). Za tuto mnohonásobnou zkříženou reaktivitu mezi pyly rostlin, ovocem, dalšími potravinami a latexem je zodpovědná vysoce konzervovaná aminokyselinová sekvence ve struktuře bílkoviny profilinů (Valenta et al. 1992). Příkladem je homologie alergenu Mal d 4 s alergenem Bet v 2 obsaženém v pylu břízy (Breiteneder a Ebner 2000). A podobně, jako je tomu u alergenu Mal d 1, i alergen Mal d 4 je snadno tepelně a enzymaticky degradovatelný a u senzitivních jedinců vyvolává pouze mírné alergické projevy (Ma et al. 2006). Genové isoformy *Mal d 4.01*, *Mal d 4.02* a *Mal d 4.03* byly plně sekvenovány a byly lokalizovány na chromozomech LG9, LG2 a LG8 (Gao et al. 2005b). Po osekvenování jablečného genomu byly nalezena i čtvrtá isoforma a další pseudogeny (Velasco et al. 2010). V plodech byla detekována jen isoforma *Mal d 4.03*, exprese dalších isoform nebyla zjištělná (Pagliarani et al. 2009). Nejvyšší obsah alergenu Mal d 4 byl nalezen u odrůdy ‘Golden Delicious’, ‘Granny Smith’ a ‘Rajka’, zatímco odrůdy ‘Fuji’ a ‘Brina’ měly obsah nižší (Botton et al. 2008).

#### 2.7.5 Hypoalergenní odrůdy

Mnohé studie dokazují, že mezi jednotlivými odrůdami jsou výrazné rozdíly v schopnosti vyvolat alergickou reakci (Bolhaar et al. 2005a; Vlieg-Boerstra et al. 2011) z čehož je zřejmé, že některé odrůdy mají nižší obsah alergenů. Na trhu však v současnosti neexistuje odrůda, která by byla zcela bez alergenů. Byly již vyšlechtěny odrůdy, které jsou deklarovány jako hypoalergenní. Tyto odrůdy jsou vhodné pro lidi, kterým konzumace čerstvých plodů běžně dostupných odrůd způsobuje jen mírné alergické projevy, jako jsou svědění nebo škrábání v ústní dutině (Bolhaar et al. 2005a; Vlieg-Boerstra et al. 2011). Pravidelnou pomalou, postupně se zvyšující konzumací hypoalergenních jablek, případně jablek s nízkým obsahem alergenů, je možné dosáhnout tolerance k vysoce alergickým odrůdám jako je například ‘Golden Delicious’ (Kopac et al. 2012; Bergmann et al. 2020). Nothegger et al. (2020) ve své studii předpokládají, že pravidelnou konzumací určitých odrůd jablek je možné dosáhnout nejen tolerance k OAS, ale je to také vhodná imunoterapie pro sennou rýmu způsobenou alergickou reakcí na pyl břízy.

První hypoalergenní odrůdy ‘Santana’ a ‘Elise’ byly vyšlechtěny v Nizozemsku na univerzitě ve Wageningenu. Nejznámější je odrůda ‘Santana’, která vznikla již v roce 1978 křížením odrůd ‘Elstar’ a ‘Priscilla’, oficiálně na trh se však dostala až v roce 2006. Kromě toho, že vykazuje nízkou hladinu alergenů a u jedinců alergických na jablko způsobuje významně méně alergických příznaků (Kootstra et al. 2007), má i řadu dalších důležitých vlastností. Odrůda ‘Santana’ je rezistentní ke strupovitosti způsobované patogenem *Venturia inaequalis* díky přítomnosti genu *Rvi6* a je jen mírně náchylná k nektriové rakovině způsobované patogenem *Nectria galligena*, tudíž může být pěstována i v ekologickém zemědělství. Další výhodou jsou její vynikající chuťové vlastnosti, odrůda je výjimečně voňavá s křuplavou a šťavnatou dužninou, chuť je nasládlá, což s ní dělá ideální jablko pro přímou konzumaci. Odrůda ‘Elise’ je novější a její hlavní výhodou je dlouhá skladovatelnost, kdy na rozdíl od ‘Santany’, která není vhodná pro dlouhodobé skladování, je možné ‘Elise’ uchovávat až do června (<https://medicalxpress.com/news/2011-03-elise-apples-suitable-people-mild.html>).

Existuje mnoho různých strategií, které mají za cíl pomoci alergikům konzumovat jablka bez vyvolání alergické reakce. První z možností je testování a výběr konvenčně pěstovaných odrůd jablek s nízkou alergicitou, anebo nových odrůd šlechtěných právě za tímto účelem a jejich hodnocení kožními „prick“ testy (skin prick test – SPT) a dvojitě slepým placebem kontrolovaným potravinovým expozičním testem (DBPCFC) (Bolhaar et al. 2005a). Tímto způsobem byla objevena právě výše popsaná hypoalergenní odrůda ‘Santana’. Další strategií je alergenově specifická mutagenese. Mutantní gen alergenů *Mal d 1* s pěti zaměněnými aminokyselinami byl získán místně cílenou mutagenesí (Bolhaar et al. 2005b). Tento gen *Mal d 1mut* byl odvozen od isoformy *Mal d 1.0108* a pomocí testů SPT a DBPCFC bylo prokázáno, že vede ke snížené IgE vazebné odpovědi. Další zajímavou strategií je genetická modifikace. Pokrok v rostlinné biotechnologii umožnil téměř úplné umlčení některých specifických genů, včetně genů kódujících alergenů proteiny. U jablečných alergenů byla použita technologie RNA interference (RNAi). Modifikace pomocí RNAi funguje na základě sekvencně specifické degradace RNA. Dochází k posttranskripčnímu umlčení genu, a to díky použití genového konstrukt, který sestává z komplementární sekvence k fragmentu cílové genové sekvence oddělené intronem. Takový konstrukt vede k tvorbě takzvané intronovo-sestříhové vlásenkové RNA (intron-spliced hairpin RNA), která indukuje posttranskripční umlčení genu (Smith et al. 2000). Pomocí této metody Gilissen et al. (2005) úspěšně transformovali *in vitro* pěstované rostliny jabloní odrůdy ‘Elstar’. Vytvořili genový

konstrukt odvozený od sekvence isoformy *Mal d 1.02*. V transformovaných buňkách tento konstrukt inicioval interferenci na úrovni transkripce genu *Mal d 1*, docházelo k rozpadu RNA, což vedlo k inhibici produkce proteinu Mal d 1. Úspěšnost transformace byla prokázána PCR analýzou, SPT testy a SDS-PAGE a následnou analýzou imunoblotem (Gilissen et al. 2005). Pro ověření stálosti a funkčnosti RNAi byly tyto modifikované *in vitro* rostliny přeneseny nejdříve do skleníku a po dopěstování životaschopných stromků byly dále naroubovány na podnož M9 (Krath et al. 2009). Krath et al. (2009) ve své studii pomocí qRT-PCR ověřili, že nízká úroveň alergenu Mal d 1 dosažená pomocí RNAi nebyla ovlivněna roubováním, byla stabilní více než tři roky a během všech vývojových stádií jabloní. Poslední úrovní testování těchto geneticky modifikovaných jabloní bylo ověření jejich hypoalergenicity pomocí qRT-PCR přímo v plodech a pomocí orálních provokačních testů na alergických pacientech. Expresí genové isoformy *Mal d 1.02*, stejně jako exprese ostatních isoform byla v plodech geneticky modifikovaných linií odrůdy 'Elstar' značně snížena oproti genové expresi alergenu Mal d 1 v geneticky nemodifikované odrůdě 'Elstar' (Dubois et al. 2015). Dubois et al. (2015) rovněž prokázali, že umlčování genů pomocí technologie RNAi zaměřené na snížení obsahu hlavního alergenu v jablku je schopné produkovat plody, ke kterým byla většina alergických jedinců, účastníků se této studie, zcela tolerantní. Genetická modifikace by tudíž mohla být cestou, jak alergickým jedincům umožnit konzumaci jablek.

### 3 VĚDECKÉ HYPOTÉZY A CÍLE PRÁCE

Na základě dosavadních poznatků byly navrženy následující hypotézy:

- Lze předpokládat existenci geneticky podmíněné úrovně exprese významných isoalergenů v plodech jabloní. Současně je nutné brát v potaz i existenci negenetických faktorů (ročník, lokalita, skladování plodů), které mohou rovněž ovlivnit úroveň exprese. Vhodně zvoleným experimentem lze dokázat, které z těchto faktorů mají zásadní vliv na expresi isoalergenů.
- Pro 31 isoform genů *Mal d 1* již byly navrženy a publikovány primery pro amplifikaci. Lze předpokládat, že u vybraných odrůd a nadějných novošlechtění jabloní pěstovaných v České republice nebudou výrazné sekvenční odlišnosti isoalergenů *Mal d 1* a exprese isoalergenů *Mal d 1* bude dostatečná pro detekovatelnost pomocí techniky qRT-PCR.

Z předložených hypotéz vycházejí tyto cíle práce:

1. Optimalizovat metodu qRT-PCR využívající doposud publikované primerové páry pro 31 isoalergenů *Mal d 1*.
2. Optimalizovat izolaci a purifikaci celkové genomické RNA ze slupky a dužniny plodu.
3. Pomocí metody qRT-PCR vyhodnotit expresi isoalergenů *Mal d 1* u vybraných nadějných novošlechtění a odrůd jabloní, které jsou v České republice nejvíce pěstovány a nejčastěji využívány pro přímý konzum.
4. Pomocí qRT-PCR techniky vyhodnotit stabilitu exprese a vliv lokality a doby skladování na expresi *Mal d 1*.
5. Publikace výsledků ve vědeckých periodikách.

## 4 MATERIÁL A METODY

### 4.1 Rostlinný materiál

Plody různých odrůd jabloní vybraných k analýzám pocházely především z pokusných výsadeb Výzkumného a šlechtitelského ústavu ovocnářského Holovousy s.r.o. (VŠÚO Holovousy), odrůda ‘Opal’ pocházela z výsadby od pěstitele z Ostroměře. Za dobu tří let trvání pokusu byla vyhodnocena exprese u 39 odrůd jabloní (tabulka 1). Plody byly sklizeny v době optimální sklizňové zralosti. Expresse byla hodnocena jednak u čerstvých plodů bezprostředně po sklizení a rovněž u skladovaných plodů. Plody byly skladovány po dobu čtyř měsíců a to ve dvou různých podmínkách: i) v podmínkách řízené atmosféry ULO ("ultra-low oxygen" – 2 % O<sub>2</sub>, 1 % CO<sub>2</sub>, teplota 1,5–2 °C, vlhkost 99 %); ii) v podmínkách chlazeného skladu (bez kontrované atmosféry, teplota cca 2 °C) V případě hodnocení dlouhodobého skladování byly vzorky pro analýzu odebírány ve čtyřech časových intervalech: před skladováním a po čtyřech, šesti a devíti měsících skladování (pro oba způsoby skladování).

**Tabulka 1.** Přehled odrůd použitých pro stanovení relativní genové exprese.

Odrůdy vyšlechtěné ve VŠÚO Holovousy	‘Andera’, ‘Angold’, ‘Artiga’, ‘Benet’, ‘Cumulus’ (sloupcová odrůda), ‘Flordika’, ‘Fragrance’, ‘Frosta’, ‘Herald’ (sloupcová odrůda), HL 19, HL 2010, ‘James Grieve Super Compact’ (zakrslá odrůda), ‘Judita’ (letní), ‘Julia’ (letní), ‘Lady Silvia’, ‘Meteor’, ‘Miodar’ (letní), ‘Nikoleta’, ‘Reluga’, ‘Resista’, ‘Rosabel’, ‘Rubinstep’, ‘Rucla’, ‘Slendera’ (sloupcová odrůda), ‘Zuzana’
Další české odrůdy	‘Bohemia Gold’, ‘Opal’, ‘Rubín’, ‘Topaz’
Světové odrůdy	‘Braeburn’, ‘Braeburn Mariri Red’, ‘Ecolette’, ‘Elise’, ‘Gala’, ‘Golden Delicious’, ‘Idared’, ‘Jonagold’, ‘King Jonagold’, ‘Santana’

Pro hodnocení vlivu systému pěstování na hladinu genové exprese alergenu Mal d 1 bylo vybráno 9 odrůd, a to ‘Angold’, ‘Golden Delicious’, ‘Idared’, ‘Jonagold’, ‘King Jonagold’, ‘Resista’, ‘Rubín’, ‘Topaz’ a ‘Zuzana’. Tyto odrůdy byly pěstovány jak v integrovaném

systemu produkce (IP)<sup>1</sup>, tak i v ekologickém systému produkce (EP)<sup>2</sup>. Všechny plody pocházely z výsadeb VŠÚO Holovousy.

Pro účely hodnocení vlivu lokality na stabilitu genové exprese alergenu Mal d 1 byly v prvním roce hodnocení získány vzorky z pěti lokalit v rámci České republiky a to Holovousy, Těchlovice, Rovensko pod Troskami, Líšnice a Břasy. Ve druhém roce hodnocení byly získány vzorky z 11 lokalit v rámci České republiky, a to Holovousy, Těchlovice, Líšnice, Pěčín, Ploskovice, Vlkov nad Lesy, Slaný, Libčany, Bříství, Chelčice, Velké Dvorce a Nechvalín. Z těchto lokalit byly odebrány plody odrůdy 'Golden Delicious', které byly sklizeny po dosažení sklizňové zralosti a před odběrem vzorků pro analýzy byly skladovány v chlazeném skladu při teplotě 2 °C. Odebírány byly po pěti měsících skladování.

Meteorologická data k hodnocení vlivu lokality byla získána z archivu Českého hydrometeorologického ústavu (<https://www.chmi.cz/historicka-data/pocasi/zakladni-informace>) a meteorologická data k hodnocení vlivu ročníku byla získána z meteostanice umístěné přímo v sadu VŠÚO Holovousy.

## 4.2 Odběr vzorku pro analýzy

Před odběrem byl povrch plodů očištěn prostředkem ROTI<sup>®</sup> Nucleic Acid-free (Carl Roth), případně také Desprej (Bochemie). Z plodu byla odebírána slupka rovnoměrně ze všech stran. Vzorek byl připraven jako směsný, obvykle ze tří až čtyř plodů konkrétní odrůdy. Slupky se okamžitě po odběru zamrazily v tekutém dusíku a byly použity pro následnou extrakci RNA, případně byly uchovávány v hlubokomrazicím boxu při teplotě -80 °C.

## 4.3 Izolace RNA

Byl optimalizovaný následující metodický postup využívající Ribospin<sup>™</sup> Plant kit (GeneAll<sup>®</sup>) doplněný o DNA-free kit (Ambion by Life Technologies).

---

<sup>1</sup> Integrovaná produkce je charakterizována integrací dostupných technických, biologických, chemických a ekologických poznatků. Je možné použití chemických přípravků se širokým spektrem účinných látek, které mohou být uměle připraveny a v přírodě se běžně nevyskytující. Přípravky se používají cíleně a v co nejnižší míře v rámci zachování účinnosti, avšak s ohledem na životní prostředí.

<sup>2</sup> Ekologická produkce využívá přirozené metody ochrany před škůdci, plevele a nemocemi a má za cíl vyhnout se používání agrochemických vstupů a minimalizovat poškození životního prostředí. V ekologické produkci se k ochraně využívají jen látky a sloučeniny běžně se vyskytující v přírodě, přičemž je kladen důraz na zachování všech prospěšných činitelů (bezobratlí i obratlovců).

400 mg biologického materiálu bylo zmrazeno v kapalném dusíku ve sterilní 2 ml zkumavce. Materiál byl přenesen do sterilní třecí misky, kde byl v tekutém dusíku homogenizován. Pro vlastní extrakci RNA bylo naváženo 50 mg homogenizovaného materiálu a přeneseno do 2 ml zkumavky. K homogenátu bylo přidáno 450  $\mu$ l lyzačního pufru a vše bylo ihned důkladně promícháno pomocí vortexu a inkubováno 3 minuty při pokojové teplotě. Lyzát byl přenesen na EzPure™ kolonku a centrifugován 2 minuty při otáčkách 14 000 RPM. Proteklý lyzát byl opatrně bez narušení pelety přenesen do nové 1,5ml zkumavky a zpravidla k 350  $\mu$ l lyzátu byl přidán stejný objem 70% EtOH. Vše bylo nezbytně okamžitě promíchat. Poté byla směs přenesena na kolonku typu W a centrifugována 1 minutu při otáčkách 14 000 RPM. Na kolonku bylo přidáno 500  $\mu$ l vazebného pufru a opět centrifugováno 1 minutu. Proteklá tekutina byla vylita a na kolonku bylo přidáno 70  $\mu$ l premixu reakční směsi DNase I, která byla inkubována 15 minut při pokojové teplotě. Poté byla prováděna inaktivace enzymu DNase I. přidáním 500  $\mu$ l vazebného pufru a po 2 minutách působení opětovným centrifugováním při otáčkách 14 000 RPM. K pročištění kolonky sloužilo přidání 500  $\mu$ l promývacího pufru a následné centrifugace ve dvou opakováních za sebou. Závěrečným krokem bylo přidání 50  $\mu$ l RNase free water, která se nechala 1 minutu při pokojové teplotě působit na kolonci. Poté byla kolonka vložena do sterilní 1,5 ml zkumavky a centrifugována 2 minuty při otáčkách 14 000 RPM.

Odstranění kontaminující genomové DNA se u kitu Ribospin™ Plant provádí již v průběhu izolace, ale vzhledem k tomu, že pro účely studia exprese genů je požadováno co nejdůkladnější odstranění kontaminující DNA, byla provedena ještě jedna závěrečná inkubace izolované RNA s DNase I. Pro tento účel byl použit DNA-free kit (Ambion by Life technologies). K výslednému eluátu o objemu 50  $\mu$ l byla přidána 0,1 objemu 10X DNase I Buffer a 1  $\mu$ l rDNase I, vše bylo jemně promícháno a inkubováno 25 minut při 37°C. Inaktivace DNasy ve směsi byla provedena přidáním 0,1 objemu DNase Inactivation Reagent, promícháním a inkubací po dobu 2 minut při pokojové teplotě. Poté se směs centrifigovala při otáčkách 14 000 RPM po dobu 2 minut a výsledný supernatant byl opatrně přepipetován do nové zkumavky. Koncentrace a čistota izolované RNA byla stanovena spektrofotometricky (NanoDrop Lite, Thermo Scientific). Současně byl hodnocen poměr absorbance při 260 a 280 nm (A260/A280), podle kterého lze posoudit případné kontaminace izolované RNA. Purifikovaná RNA byla využita k následnému přepisu do cDNA nebo zamrazena na -80 °C pro pozdější použití.



Před přepisem do cDNA byla kontrolována čistota izolované RNA, aby se zcela vyloučila přítomnost kontaminující genomové DNA, a to pomocí specifických sond pro aktin a následné real-time PCR.:

MaActin (DNA): 5'-6-Fam-ATTTTCCTGTGCAAAGCTGCTCTGTAA-BHQ-1-3'  
(detekuje pouze genomovou DNA)

MaActin (RNA): 5'-Hex-CCATCTTAGCTTCCCTCAGTACATTCCA-BHQ-1-3'  
(detekuje cDNA i genomovou DNA)

Pro amplifikační reakci byly použity následující komponenty:

- Combi Taq DNA polymeráza, 1U/μl (Top-Bio)
- dNTP mix, 10 mM každý (Genaxxon, dodavatel: Bohemia Genetics s.r.o.)

Složení reakční směsi:		Složení specifického PmxII:	
Složky premixu	Na 1 vzorek	MaActin PmxII	Finální konc.
10x TopBio Blue pufr complete	2 μl	MaActin-F primer	0,5 μM
dNTPs (10 mM každý)	0,4 μl	MaActin-R primer	0,5 μM
Specifický PmxII	1 μl	MaActin (sonda DNA)	0,2 μM
CombiTaq (1U/μl)	1 μl	MaActin (sonda RNA)	0,2 μM
PCR voda	13,6 μl	PCR voda	
<b>+ RNA</b>	<b>2 μl</b>		

Byl nastaven následující teplotní a časový profil amplifikační reakce: úvodní denaturace 95 °C/5 minut; tříkroková amplifikace s 50 cykly (95 °C/20 s; 58 °C/20 s; 72 °C/ 10 s); na závěr 50 °C/5s.

#### 4.4 Přepis do cDNA

Pro přípravu cDNA byly použity následující komponenty:

- M-MLV Reverse Transcriptase, 200 U/μl (Invitrogen)
- Primer Random p(dN6), pracovní koncentrace 50 ng/μl (Roche)
- dNTP mix, 10 mM každý (Genaxxon, dodavatel Bohemia Genetics s.r.o.)
- RNase free water (Top-Bio)

Příprava cDNA probíhala podle následujícího postupu (postup je optimalizován pro použití celkové RNA do koncentrace 1 μg/reakci):

1. Do jednotlivých zkumavek bylo napipetováno:

- a) 4  $\mu$ l Primer Random p(dN6) o koncentraci 50 ng/ $\mu$ l
- b) 1  $\mu$ l 10 mM dNTP mix
- c) 5  $\mu$ l celkové RNA (je možno pipetovat 1 – 5  $\mu$ l celkové RNA tak, aby celkové množství RNA v reakci nepřekročilo 1  $\mu$ g, vzhledem k tomu, že naše koncentrace RNA byly nízké, kolem 30 ng/ $\mu$ l, bylo použito 5  $\mu$ l)
- d) 3  $\mu$ l RNase free water (do celkového objemu 13  $\mu$ l)

Kroky a) + b) + d) byly připravovány jako premix pro více vzorků najednou.

Směs byla promíchána.

2. Směs byla zahřata v cykleru na 65°C / 5 minut. Po uplynutí inkubační doby byly zkumavky prudce zchlazeny ve vymražené kovové destičce. Poté byly krátce zcentrifugovány.
3. Do jednotlivých zkumavek bylo napipetováno:
  - a) 4  $\mu$ l 5x First-Strand Buffer
  - b) 2  $\mu$ l 0,1 M DTT
  - c) 1  $\mu$ l (200 U) M-MLV reverzní transkriptázy, dobře promíchat.
 Kroky a) + b) + c) byly připravovány jako premix.
4. Vzorky byly dány do cykleru s nastaveným následným teplotním profilem:
  1. Inkubace při 37°C po dobu 2 minut.
  2. Inkubace při 25°C po dobu 10 minut.
  3. Inkubace při 37°C po dobu 50 minut.
  4. Závěrečná denaturace při 70°C po dobu 10 minut.
  5. Finální zchlazení na 4°C.
5. Takto připravenou cDNA lze přímo použít jako templát (zpravidla 2  $\mu$ l) pro další PCR analýzy. cDNA byla uchovávána v mrazničce při teplotě -20 °C.

## 4.5 Optimalizace kvantitativní real-time PCR

Pro analýzu bylo použito zařízení real-time PCR cykler Rotor-Gene Q (Qiagen).

Pro amplifikační reakci byly použity následující komponenty:

- Combi Taq DNA polymeráza, 1U/ $\mu$ l (Top-Bio)
- dNTP mix, 10 mM každý (Genaxxon, dodavatel: Bohemia Genetics s.r.o.)
- EvaGreen 20x (Biotium)

### Pracovní postup:

1. Podle počtu vzorků byl ve stojánku připraven potřebný počet 0,1ml stripů včetně zkumavek pro negativní kontrolu.
2. Do jednotlivých zkumavek bylo pipetováno 18  $\mu$ l PCR premixu. Pro reakci byl 3x namíchán premix, vždy pro daný pár primerů – *aktin*, *Mal d 1.01*, *Mal d 1.02*. K premixu byly postupně pipetovány 2  $\mu$ l vzorku cDNA (kromě negativní kontroly).

### Složení reakční směsi:

Složky premixu	Na 1 vzorek
10x TopBio Blue pufr complete	2 $\mu$ l
dNTPs (10 mM každý)	0,4 $\mu$ l
primer F	1 $\mu$ l
primer R	1 $\mu$ l
EvaGreen 20x	1 $\mu$ l
CombiTaq (1U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
PCR voda	11,6 $\mu$ l
+ cDNA	2 $\mu$ l

Amplifikační reakce každého vzorku byla provedena ve třech technických replikátech. Byly nastaveny následující parametry amplifikace: úvodní denaturace (95 °C/5 minut); tříkroková amplifikace s 50 cykly (95 °C/20 s; 55 °C/20 s; 72 °C/ 10 s); závěrečná analýza tání v kanálu HRM (teplota 76 °C–88 °C stoupala o 0,2 °C/ s). Specifičnost amplifikační reakce byla potvrzena pomocí analýzy křivky tání a sekvenování.

K většině analýz byly použity specifické primery pro dvě nejvíce exprimované isoformy alergenu *Mal d 1.01* a *Mal d 1.02* a specifické primery pro *aktin* (sekvence primerů – viz tabulka 2).

Na základě výsledků hodnocení relativní exprese pomocí NGS (viz kapitola 5.2) bylo pro analýzu dlouhodobě skladovaných vzorků odrůd ‘Opal’ a ‘Gala’ vybráno dalších 7 isoform, konkrétně *Mal d 1.03D*, *Mal d 1.03G*, *Mal d 1.06A*, *Mal d 1.06B*, *Mal d 1.06D*, *Mal d 1.07* a *Mal d 1.13A*. Pro real-time PCR byly využity sekvence primerů (tabulka 2), které byly publikované v práci Pagliarani et al. (2013), kromě isoformy *Mal d 1.06A*, pro kterou byly navrženy nové specifické primery (tabulka 2).

**Tabulka 2.** Sekvence primerů použitých pro real-time PCR

<b>Primery</b>	<b>Sekvence primeru 5'-3'</b>
<b>Mal d 1.01 F</b>	GATTGAAGGAGATGCTTTGACA
<b>Mal d 1.01 R</b>	GTAATGACTGATGCTCTTGATGG
<b>Mal d 1.02 F</b>	GATTGAAGGAGATGCTTTGACA
<b>Mal d 1.02 R</b>	TTGGTGTGGTAGTGGCTGATA
<b>Mal d 1.03D F</b>	ATACGAATCCGAGTTCACCTCT
<b>Mal d 1.03D R</b>	ATCTTCTTAATGGTTCCAACCTCCT
<b>Mal d 1.03G F</b>	ATTATCAAGAGCACCAGTCACTACT
<b>Mal d 1.03G R</b>	TCCAAGAGGTAGTTCTCAATCAA
<b>Mal d 1.06A F</b>	CATCATGGGTGTCCCTCACATACG
<b>Mal d 1.06A R</b>	GAGCAATCTTCGGAATGAGAT
<b>Mal d 1.06B F</b>	AAACCGAATACGCATCCATT
<b>Mal d 1.06B R</b>	ACAGTTTTGACTGCTTGTGGAG
<b>Mal d 1.06D F</b>	CCCTCCTGCTAGGTTGTATT
<b>Mal d 1.06D R</b>	TCCCTCGAGAATTTCAACAG
<b>Mal d 1.07 F</b>	CAACTTTGTGTACCAGTACAGTGTC
<b>Mal d 1.07 R</b>	TAGTGGCTGATGCTCTTGATAAC
<b>Mal d 1.13A F</b>	GTGTTGGAACCATCAAGAAGATTAG
<b>Mal d 1.13A R</b>	ACATCTCCTTCAATCAAACCTGTAAT
<b>Aktin F</b>	TGACAGAATGAGCAAGGAAATTACT
<b>Aktin R</b>	TACTCAGCTTTGGCAATCCACATC

Relativní genová exprese byla stanovena na základě metody  $\Delta C_t$  (Livak a Schmittgen 2001), kde byl jako referenční gen použit *aktin*, ke kterému byly normalizovány hodnoty genové exprese jednotlivých isoformů alergenu Mal d 1. Relativní genová exprese je udávána v jednotkách A.U. (Arbitrary Units), což je relativní měrná jednotka popisující poměr množství látky, intenzity nebo jiných veličin k předem stanovenému referenčnímu měření.

#### 4.6 Gelová elektroforéza a sekvenační reakce

Fragmenty amplifikované pomocí real-time PCR byly analyzovány pomocí gelové elektroforézy a následně osekvenovány.

Pro gelovou elektroforézu byly použity následující komponenty:

- Agaróza (Serva)
- TBE pufr (VWR)
- SafeView (ABM)
- 6× TriTrack DNA Loading Dye (Thermo Fisher Scientific)
- GeneRuler™ DNA Ladder Mix, ready-to-use (Thermo Fisher Scientific)

Byl připraven 3% agarózový gel, a to rozvařením 3 g agarózy v 100 ml 0,5x TBE pufru. Po úplném rozvaření bylo ke gelu přidáno UV vizualizační činidlo pro DNA SafeView v koncentraci 1  $\mu$ l na 20 ml gelu. K vzorkům byly před nanášením na gel přidány 4  $\mu$ l 6 $\times$  TriTrack DNA Loading Dye. a jako velikostní standard pro určení velikosti amplifikovaného fragmentu byl použit GeneRuler™ DNA Ladder Mix, ready-to-use. Fragmenty na gelu byly vizualizovány pomocí UV transiluminátoru.

Příslušné fragmenty určené k sekvenování byly z gelu purifikovány pomocí kitu Expin™ Combo GP (GeneAll) podle následujícího postupu:

Na UV prosvětlovači byly z gelu vyříznuty jednotlivé proužky s co nejmenším množstvím okolního gelu a vloženy do označených 1,5ml mikrozkuvek. Do každé zkuvky bylo přidáno 500  $\mu$ l pufru GB. Vyříznuté gelové bločky byly ponechány v pufru až do úplného rozpuštění agarózy. Vzhledem k tomu, že byly purifikovány fragmenty o velikosti <200 bp, bylo ke všem vzorkům přidáno 100  $\mu$ l isopropanolu. Směs (maximálně 700  $\mu$ l) byla přepipetována na SV kolonu ve sběrné zkuvce a centrifugována 1 min. při otáčkách 14 000 RPM. Proteklá tekutina byla vylita. Na SV kolonu bylo přidáno 500  $\mu$ l pufru GB a centrifugováno 1 min. při otáčkách 14 000 RPM. Proteklá tekutina byla opět vylita. Na SV kolonu bylo přidáno 700  $\mu$ l pufru NW a vzorek se ponechal stát 1-5 min. Poté byla směs centrifugována 1 min. při otáčkách 14 000 RPM, proteklá tekutina byla vylita a zkuvka s SV kolonou byla opět centrifugována 1 minutu při otáčkách 14 000 RPM, aby se zcela odstranil NW pufr z filtru. Po stočení byla SV kolona opatrně vsunuta do čisté 1,5ml mikrozkuvky. Na SV kolonu bylo přidáno 30  $\mu$ l pufru EB. Byla provedena inkubace 1 minutu při pokojové teplotě, poté byly eluované fragmenty centrifugovány 1 minutu při otáčkách 14 000 RPM. Eluovaná DNA byla použita pro následnou sekvenační reakci.

Pro sekvenační reakci byly použity následující komponenty:

- BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems™)
- BigDye XTerminator™ Purification Kit (Applied Biosystems™)

Složení premixu pro sekvenační reakci:

<b>Složky premixu</b>	<b>Na 1 vzorek</b>
BigDye Terminator RR kit v3.1	2 µl
BigDye Seq buffer 5x	1 µl
Primer (5 µM)	1 µl
PCR purifikovaný produkt	6 µ
<b>Celkem</b>	<b>10 µl</b>

Teplotní podmínky PCR: 1 cyklus: 95°C 5 min  
35 cyklů: 95°C 30 s, 55°C 20 s, 60°C 4 min  
Finální chlazení 8°C

Následná purifikace sekvenační reakce byla provedena přidáním 45 µl SAM Solution a 10 µl BigDye XTerminator Solution do každé zkumavky. Směs byla vortexována 30 minut při přibližně 1 200 RPM tak, aby byla neustále homogenní bez usazených XTerminator partikulí. Poté byla směs stočena 2 minuty ve stolní minicentrifuze (MyFuge).

Do sekvenační destičky bylo napipetováno 25 µl vzorku bez XTerminator partikulí a bez bublin. Vzorky byly analyzovány na genetickém analyzátoru ABI 3500 (Thermo Fisher Scientific).

Výsledky byly analyzovány softwarem Sequence Analysis Software 6 (Thermo Fisher Scientific) a následně vyhodnocovány a editovány pomocí softwaru Chromas (Technelysium Pty Ltd). Získané sekvence byly pomocí nástroje BLAST porovnány se záznamy v databázi GenBank (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) pro potvrzení, zda amplifikované fragmenty odpovídají příslušným isoformám. Alignment získaných sekvencí byl sestaven pomocí softwaru Geneious Prime (Biomatters Ltd).

## **4.7 Optimalizace metody NGS pro kvantifikaci všech isoform alergenu Mal d 1**

K analýzám byly vybrány čtyři odrůdy jablek: 'Idared', 'Opal', 'Topaz' a 'Rubín'. Plody odrůd 'Idared', 'Topaz' a 'Rubín' byly čerstvě sklizeny, zatímco odrůda 'Opal' byla skladována po dobu čtyř měsíců, a to jak v podmínkách ULO (2 % O<sub>2</sub>, 1 % CO<sub>2</sub>, teplota 1,5–2

°C, vlhkost 99 %), tak v podmínkách chlazeného skladu (bez regulované atmosféry, teplota přibližně 2 °C).

Pro NGS byl využit sekvenátor Ion PGM (ThermoFisher Scientific). Před samotným sekvenováním byla vytvořena knihovna DNA. K vytvoření amplikonové knihovny byla vybrána metoda fúzní PCR využívající fúzní primery, které do PCR amplikonů inkorporují Ion-adaptéry A a P1. Byl proto navržen systém primerů tak, aby pokryl známé isoformy genu *Mal d 1* a to na základě sekvencí získaných z databáze GenBank. Pro vnesení důležitých sekvencí pro vlastní sekvenační analýzu, byl využit mezikrok, kdy k adaptéru A byla připojena sekvence Tg01, která byla použita pro návrh fúzních primerů. Sekvenační reakce začíná rozpoznáním tzv. klíčové sekvence, která je součástí adaptéru A. Aby se předešlo sekvenačnímu zkreslení (kdy se preferenčně lépe sekvenuje sekvence ve směru jenom jednoho z páru primerů), byly navrženy primery tak, aby bylo možné sekvenovat jak z forwardového, tak z reverzního primeru. Popis a sekvence jednotlivých fúzních primerů jsou v příloze 1.

K vlastním analýzám byla použita RNA vybraných odrůd, která byla vyizolovaná a přepsaná do cDNA podle postupu popsáno v kapitole 4.3 a 4.4. Příprava knihovny amplikonů příslušných isoform Mal d 1 genu byla provedena pomocí PCR reakce s použitím Phusion High-Fidelity DNA polymerase (ThermoFisher Scientific) provedené na cykleru C1000 (Bio-Rad) s následujícím teplotním profilem: 98 °C po dobu 10 s; 40x (98 °C po dobu 1 s; 53 °C po dobu 5 s; 72 °C po dobu 7 s). Amplikony byly detekovány gelovou elektroforézou.

Purifikace amplikonů byla provedena přidáním 1,8 objemu Agencourt AMPure XP Reagent do amplifikované DNA. Směs byla důkladně promíchána pipetováním a 5 minut inkubována při pokojové teplotě. Poté byla zkumavka na 2 minuty umístěna na magnetu, aby došlo k vytvoření pelety pomocí kuliček obsažených v AMPure XP reagent, supernatant byl odstraněn. K peletě byl přidán čerstvě připravený 70% etanol a vzorek byl při pokojové teplotě 30 sekund inkubován. Poté byl supernatant odstraněn a krok byl opakován. Aby došlo k úplnému odstranění etanolu, byla otevřená zkumavka inkubována 5 minut při pokojové teplotě. K vymytí knihovny z kuliček došlo přidáním 20 µl TE pufru, pipetováním a inkubací na magnetu po dobu 1 minuty. Poté opět došlo k vytvoření pelety a supernatant s amplikonovou knihovnou mohl být přenesen do nové zkumavky. Výsledná knihovna byla kvantifikována fluorimetricky a naředěna dle doporučení výrobce. Vlastní příprava templátu pro sekvenování probíhala v automatické pipetovací stanici Ion Chef™ Systém (ThermoFisher Scientific). Sekvenování probíhalo s využitím čipu Ion 316 s teoretickou kapacitou čtení 2-3 miliony (300-

600 Mb). Vyhodnocení dat probíhalo pomocí Ion Reporter softwaru dodávaného výrobcem (ThermoFisher Scientific) (příloha 2).

#### **4.8 Statistická analýza výsledků**

Pro statistické zpracování byly použity hodnoty relativní exprese  $\Delta C_t$ , které byly vypočítané pomocí programu Microsoft Excel. Hodnota relativní exprese jednotlivých isoformů alergenu Mal d 1 byla vyjádřena vzhledem k referenčnímu genu pro aktin.

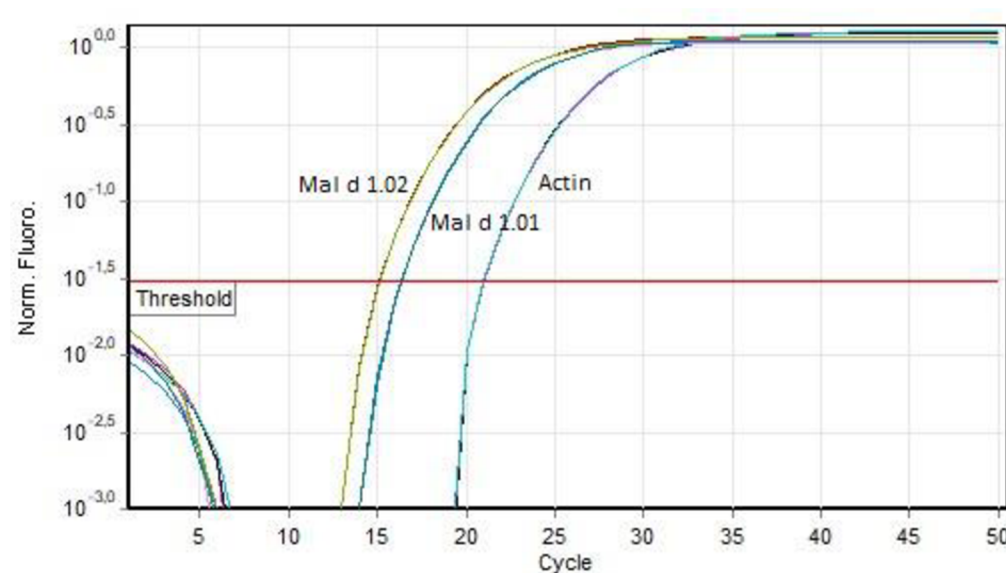
Pro každý datový soubor byl proveden test normality dat. Vzhledem k tomu, že většina datových souborů, se kterými bylo pracováno, neodpovídala Gaussovu normálnímu rozdělení, byly pro statistické hodnocení použity neparametrické testy, a to Kruskal-Wallisův test, s následným vyžitím post-hoc testů pro účely mnohonásobného porovnání, a to Dunnův test a Bonferroniho korekce. Pro dvouvýběrové porovnání byl použit Mann-Whitneyův test. Statistické analýzy byly vypracovány pomocí programu GraphPad Prism 8.



## 5 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 5.1 Hodnocení genové exprese v plodech vybraných odrůd jableň

Plody vybraných odrůd byly využity pro hodnocení faktorů, které by mohly mít vliv na změnu genové exprese alergenu Mal d 1, a to ročník, skladování, systém produkce a lokalita. Výsledky hodnocení vlivu ročníku na změnu genové exprese byly získány za tři roky, výsledky hodnocení skladování byly získány za dva roky a systém produkce a lokalita byly hodnoceny rovněž ve dvou letech. Vzhledem k tomu, že porovnáním genové exprese všech isoform bylo zjištěno, že dvě nejvíce exprimované isoformy *Mal d 1.01* a *Mal d 1.02* tvoří u většiny odrůd, a to jak u čerstvých, tak u skladovaných, kolem 80 % celkové genové exprese alergenu Mal d 1 (Pagliarini et al. 2013; v naší práci kapitola 5.2), byly pro účely dalších analýz hodnoceny právě tyto dvě isoformy. Relativní exprese isoform *Mal d 1.01* a *Mal d 1.02* byla charakterizována na základě výsledků optimalizované real-time PCR pomocí výpočtů odvozených od metody  $\Delta\Delta C_t$  (Livak and Schmittgen 2001). Hodnoty  $C_t$  byly získány kvantitativní analýzou, jejíž grafický výstup je znázorněn na obrázku 2.



**Obrázek 2.** Příklad grafického výstupu relativní kvantifikace pomocí real-time PCR v programu Rotor-Gene Q.

Analýzou křivek tání a porovnáním získaných sekvencí s databází GeneBank byla potvrzena specifita obou isoform (příloha 3 a 4).

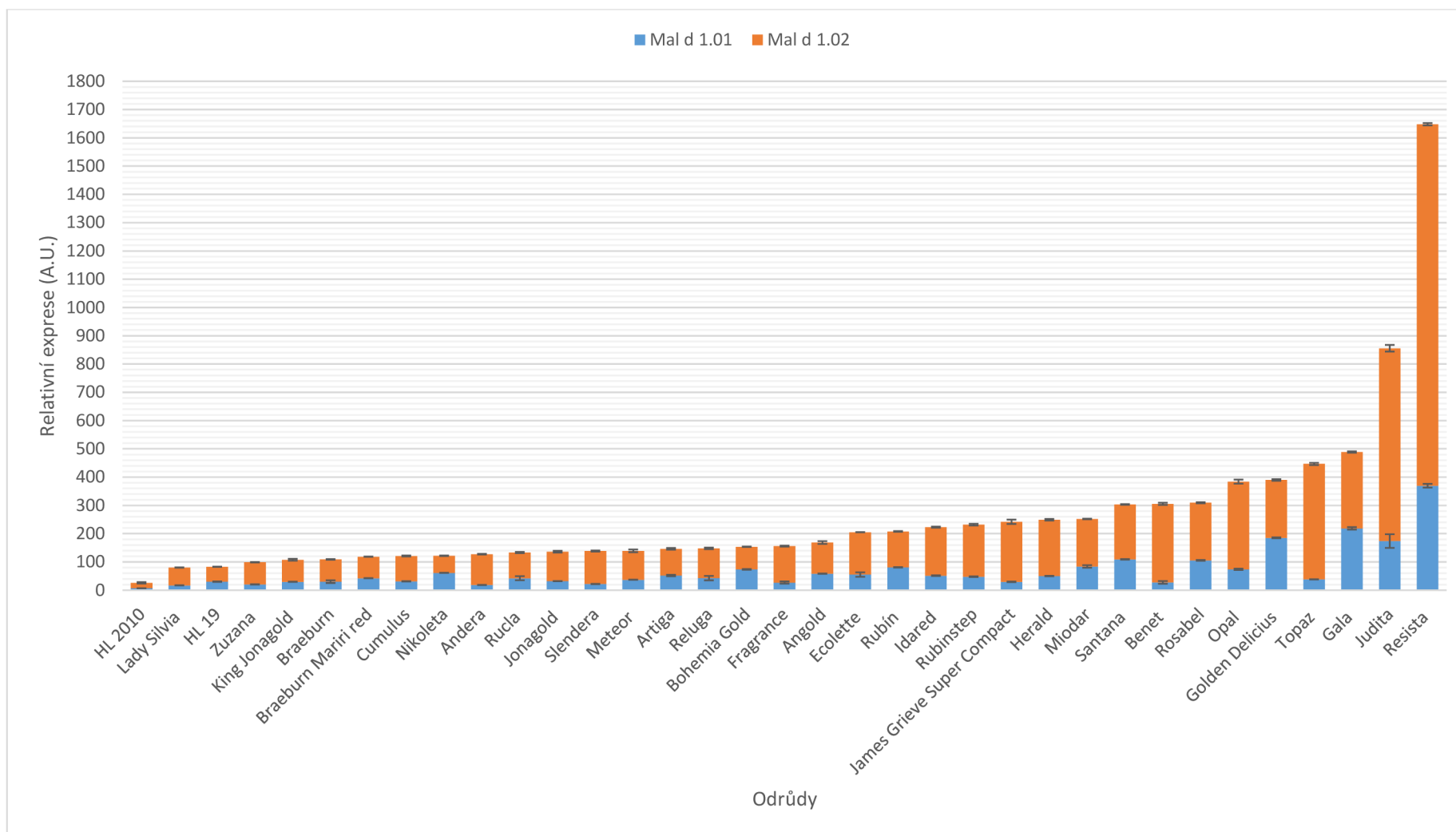
### 5.1.1 Vliv ročníku na úroveň genové exprese

V průběhu třech let (2016 až 2018) byla zhodnocena relativní genová exprese isoformem *Mal d 1.01* a *Mal d 1.02* u 39 odrůd. U některých odrůd nebylo možné získat plody ve všech třech letech hodnocení, případně kvalita izolované RNA nebyla dostačující, nebo mohlo dojít k jiným komplikacím, proto hodnocení v tomto roce chybí. U hodnocení vlivu ročníku na genovou expresi vybraných isoformem ve slupce plodů byly tyto relativní hodnoty vyjádřeny jednak v podobě parametru 'ratio', což je relativní kvantifikace exprese vztažená k referenčnímu genu *aktin* a rovněž v podobě parametru 'norm. ratio', což je relativní kvantifikace exprese vztažená k referenčnímu genu *aktin* a normalizovaná k odrůdě 'Golden Delicious' (tabulky 3, 5 a 7 pro jednotlivé analyzované roky). Zároveň bylo vypočteno, v jakém poměru se liší relativní exprese jedné isoformy od druhé. Výsledky byly pro větší přehlednost zpracovány i do grafů 1-3. Statistická analýza rozdílů v genové expresi mezi jednotlivými odrůdami je v jednotlivých letech uvedena v tabulkách 4, 6 a 8.

V prvním roce hodnocení můžeme mezi odrůdy s nejnižší hladinou celkové exprese genu *Mal d 1* zařadit novošlechtění HL 2010 a HL 19, dále odrůdy 'Lady Silvia', 'Zuzana', 'King Jonagold', 'Braeburn' a ze sloupcových odrůd 'Cumulus'. Nejvyšší hladinu genové exprese dosahoval alergen *Mal d 1* u odrůd 'Judita' a 'Resista' (graf 1). Bylo potvrzeno, že isoforma *Mal d 1.01* má expresi nižší než isoforma *Mal d 1.02*, u většiny odrůd to bylo v poměru 1:2 až 1:4. U odrůd 'Benet' a 'Topaz' dosahoval tento rozdíl exprese poměru až 1:10 (tabulka 3).

**Tabulka 3.** Výsledky relativní genové exprese (měřeno v jednotkách A.U.) isoformem *Mal d 1.01* a *Mal d 1.02* v roce hodnocení 2016.

Odrůda	Mal d 1.01		Mal d 1.02		Poměr Mal d 1.01 : Mal d 1.02
	ratio	norm. ratio	ratio	norm. ratio	
<b>HL 2010</b>	6,93	0,037	19,40	0,094	1:3
<b>Lady Silvia</b>	17,19	0,093	62,98	0,308	1:4
<b>HL 19</b>	30,42	0,164	52,47	0,256	1:2
<b>Zuzana</b>	20,73	0,112	78,25	0,382	1:4
<b>King Jonagold</b>	29,93	0,162	77,78	0,380	1:3
<b>Braeburn</b>	30,32	0,162	78,80	0,385	1:3
<b>Braeburn Mariri Red</b>	42,72	0,231	75,94	0,371	1:2
<b>Cumulus</b>	31,42	0,170	89,69	0,438	1:3
<b>Nikoleta</b>	61,61	0,333	60,28	0,295	1:1
<b>Andera</b>	18,73	0,101	108,89	0,532	1:6
<b>Rucla</b>	42,51	0,226	90,95	0,444	1:2
<b>Jonagold</b>	32,08	0,173	104,26	0,509	1:3
<b>Slendera</b>	22,12	0,119	116,45	0,569	1:5
<b>Meteor</b>	37,10	0,200	102,17	0,499	1:3
<b>Artiga</b>	52,17	0,281	94,40	0,461	1:2
<b>Reluga</b>	42,98	0,228	105,21	0,514	1:2
<b>Bohemia Gold</b>	73,78	0,405	79,90	0,390	1:1
<b>Fragrance</b>	27,19	0,145	128,90	0,630	1:5
<b>Angold</b>	58,62	0,316	110,00	0,537	1:2
<b>Ecolette</b>	55,44	0,296	149,78	0,732	1:3
<b>Rubín</b>	81,01	0,437	126,83	0,620	1:2
<b>Idared</b>	51,52	0,278	171,66	0,839	1:3
<b>Rubinstep</b>	47,96	0,259	184,00	0,899	1:4
<b>James Grieve S. C.</b>	29,74	0,160	212,45	1,038	1:7
<b>Herald</b>	50,22	0,271	199,03	0,973	1:4
<b>Miodar</b>	84,27	0,452	167,73	0,820	1:2
<b>Santana</b>	109,14	0,589	194,02	0,948	1:2
<b>Benet</b>	27,80	0,148	277,59	1,357	1:10
<b>Rosabel</b>	105,67	0,570	203,67	0,995	1:2
<b>Opal</b>	73,89	0,399	310,20	1,516	1:4
<b>Golden Delicious</b>	185,26	1,000	204,62	1,000	1:1
<b>Topaz</b>	38,41	0,207	408,28	1,995	1:11
<b>Gala</b>	218,82	1,181	269,98	1,320	1:1
<b>Judita</b>	173,85	0,929	681,96	3,333	1:4
<b>Resista</b>	369,71	1,995	1278,30	6,248	1:4
<b>Kalibrátor (G.D.)</b>	185,26	1,000	204,62	1,000	1:1



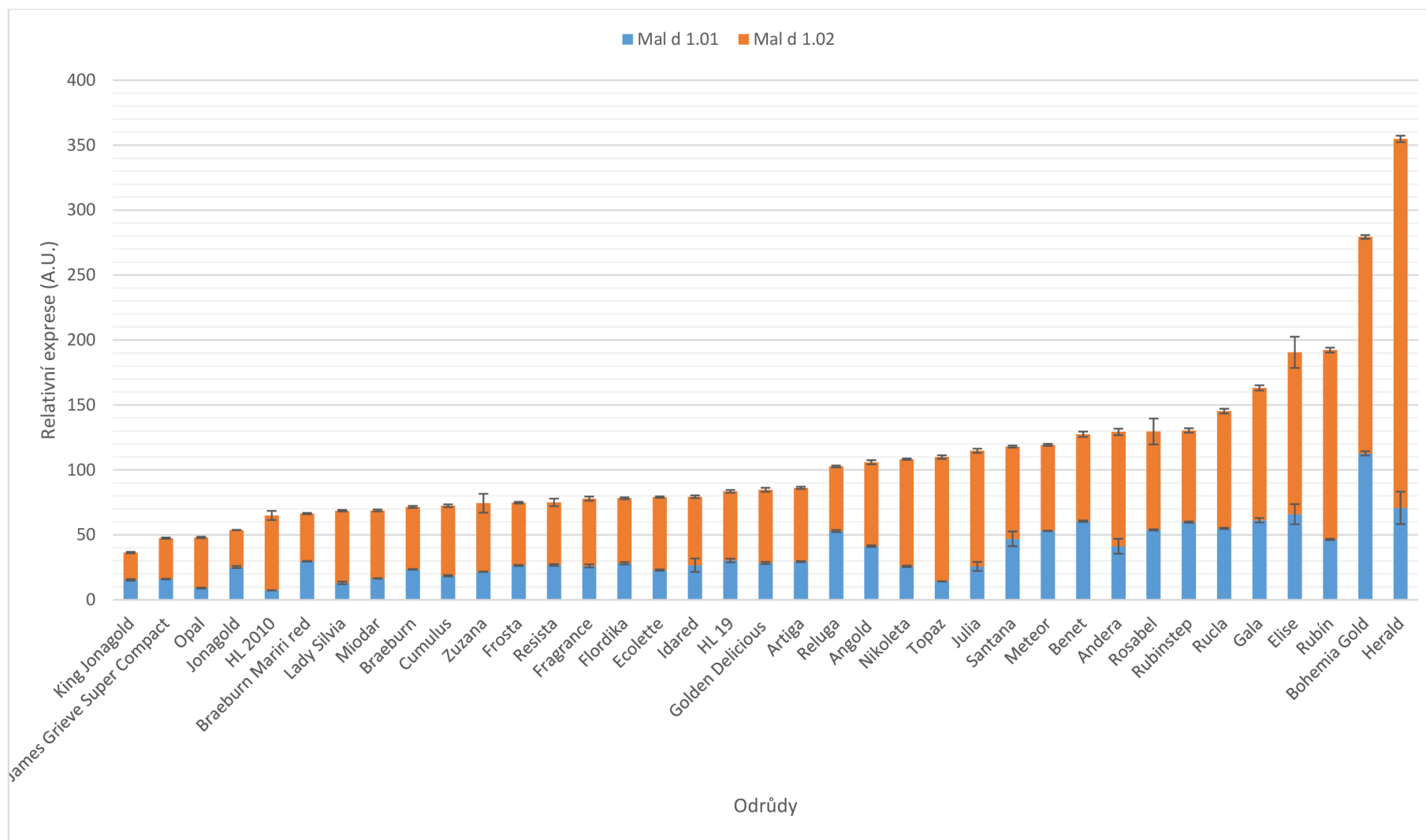
**Graf 1.** Porovnání relativní genové exprese isoform *Mal d 1.01* a *Mal d 1.02* ve slupce čerstvých plodů v roce hodnocení 2016.



Ve druhém roce hodnocení mezi odrůdy s nejnižší hladinou exprese Mal d 1 patřily odrůdy ‘King Jonagold’, ‘Opal’, nebo zakrslá odrůda ‘James Grieve Super Compact’. Nejvyšší hladinu genové exprese dosahoval alergen Mal d 1 u sloupcové odrůdy ‘Herald’ a u odrůdy ‘Bohemia Gold’ (graf 2). Opět bylo potvrzeno, že isoforma *Mal d 1.01* má expresi nižší než isoforma *Mal d 1.02*, u většiny odrůd to bylo v poměru 1:2 až 1:4. U odrůdy ‘Topaz’ dosahoval tento rozdíl exprese poměru 1:7 a u novošlechtění HL 2010 poměr 1:8 (tabulka 5).

**Tabulka 5.** Výsledky relativní genové exprese (měřeno v jednotkách A.U.) isoformem *Mal d 1.01* a *Mal d 1.02* v roce hodnocení 2017.

Odrůda	Mal d 1.01		Mal d 1.02		Poměr Mal d 1.01 : Mal d 1.02
	ratio	norm. ratio	ratio	norm. ratio	
<b>King Jonagold</b>	15,33	0,083	21,02	0,103	1:1
<b>James Grieve S. C.</b>	16,00	0,086	31,49	0,154	1:2
<b>Opal</b>	9,03	0,049	38,95	0,190	1:4
<b>Jonagold</b>	25,24	0,136	28,51	0,139	1:1
<b>HL 2010</b>	7,29	0,039	57,66	0,281	1:8
<b>Braeburn Mariri Red</b>	29,65	0,160	36,76	0,180	1:1
<b>Lady Silvia</b>	13,00	0,070	55,59	0,272	1:4
<b>Miodar</b>	16,45	0,089	52,35	0,256	1:3
<b>Braeburn</b>	23,48	0,127	48,06	0,235	1:2
<b>Cumulus</b>	18,54	0,100	53,95	0,264	1:3
<b>Zuzana</b>	21,61	0,117	52,76	0,255	1:2
<b>Frosta</b>	26,48	0,143	48,28	0,236	1:2
<b>Resista</b>	26,85	0,147	48,15	0,235	1:2
<b>Fragrance</b>	26,13	0,137	51,77	0,253	1:2
<b>Flordika</b>	28,13	0,152	50,10	0,245	1:2
<b>Ecolette</b>	22,90	0,124	56,24	0,275	1:2
<b>Idared</b>	26,62	0,141	52,72	0,258	1:2
<b>HL 19</b>	30,31	0,163	53,21	0,260	1:2
<b>Golden Delicious</b>	28,39	0,153	56,25	0,275	1:2
<b>Artiga</b>	29,45	0,159	56,76	0,277	1:2
<b>Reluga</b>	52,96	0,288	49,76	0,243	1:1
<b>Angold</b>	41,31	0,225	64,61	0,316	1:2
<b>Nikoleta</b>	25,76	0,139	82,52	0,403	1:3
<b>Topaz</b>	14,22	0,077	95,68	0,468	1:7
<b>Julia</b>	25,68	0,137	89,07	0,435	1:3
<b>Santana</b>	46,96	0,252	71,02	0,347	1:2
<b>Meteor</b>	53,08	0,287	66,26	0,324	1:1
<b>Benet</b>	60,55	0,327	66,90	0,327	1:1
<b>Andera</b>	41,22	0,220	88,07	0,430	1:1
<b>Rosabel</b>	53,82	0,291	75,76	0,367	1:1
<b>Rubinstep</b>	59,85	0,325	70,54	0,345	1:1
<b>Rucla</b>	54,95	0,297	90,32	0,441	1:2
<b>Gala</b>	61,27	0,331	101,85	0,498	1:2
<b>Elise</b>	65,97	0,354	124,53	0,606	1:2
<b>Rubín</b>	46,53	0,251	145,69	0,712	1:3
<b>Bohemia Gold</b>	112,74	0,609	166,58	0,814	1:1
<b>Herald</b>	70,74	0,375	284,06	1,388	1:4
<b>Kalibrátor (G.D.)</b>	185,26	1,000	204,62	1,000	1:1



**Graf 2.** Porovnání relativní genové exprese isoformem *Mal d 1.01* a *Mal d 1.02* ve slupce čerstvých plodů v roce hodnocení 2017.

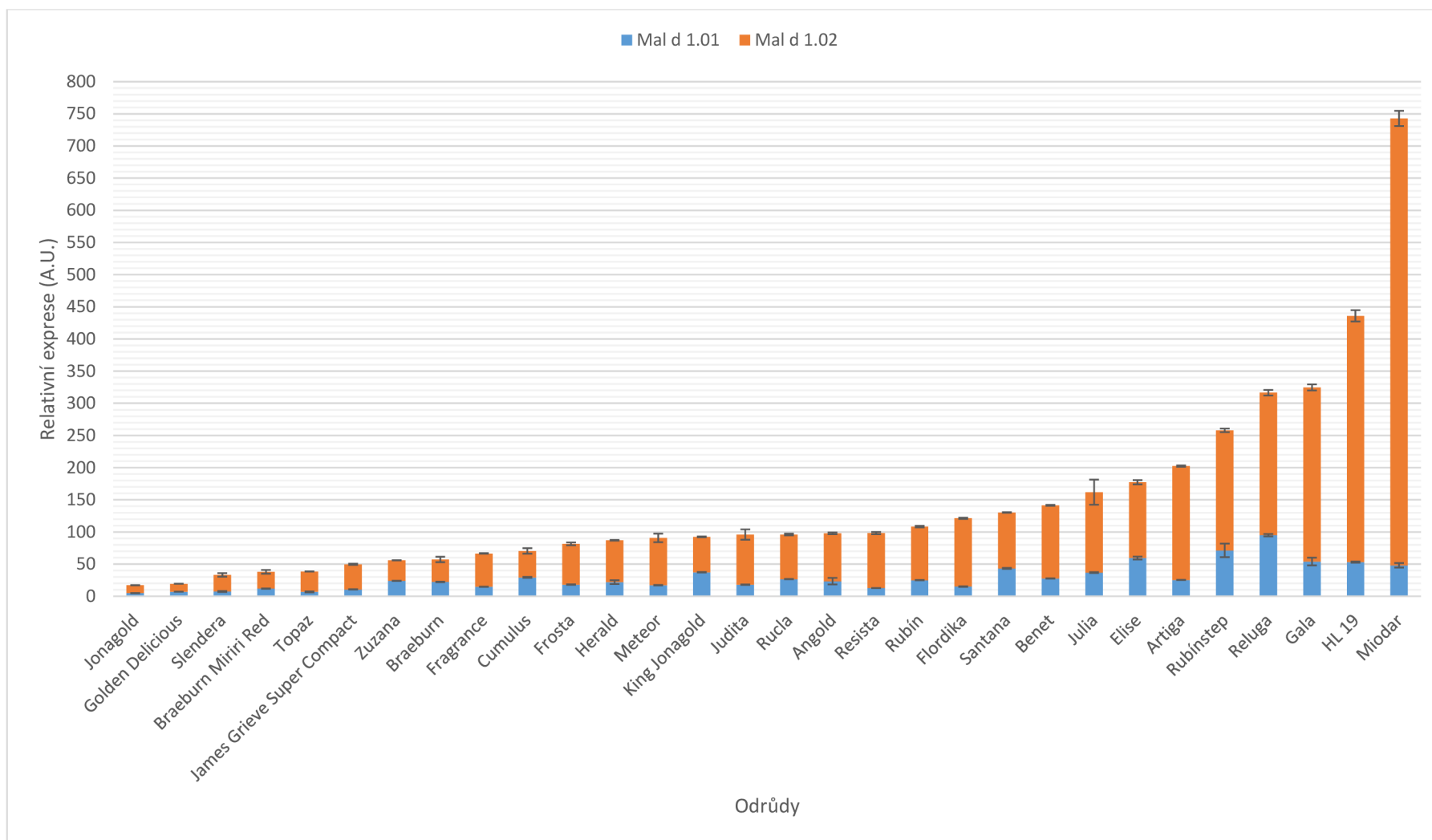




Ve třetím roce hodnocení můžeme mezi odrůdy s nejnižší hladinou exprese genu *Mal d 1* zařadit odrůdy ‘Jonagold’ a ‘Golden Delicious’ a ze sloupcových odrůd Slenderu. Nejvyšší hladinu genové exprese dosahoval alergen *Mal d 1* u odrůdy ‘Miodar’ a novošlechtění HL 19 (graf 3). I v třetím roce hodnocení měla isoforma *Mal d 1.01* genovou expresi nižší než isoforma *Mal d 1.02*, u většiny odrůd byl tento poměr od 1:1 až ke 1:7. U odrůdy ‘Miodar’ dosahoval tento rozdíl exprese poměru až 1:14 (tabulka 7).

**Tabulka 7.** Výsledky relativní genové exprese (měřeno v jednotkách A.U.) isoformem *Mal d 1.01* a *Mal d 1.02* v roce hodnocení 2018.

Odrůda	Mal d 1.01		Mal d 1.02		Poměr Mal d 1.01 : Mal d 1.02
	ratio	norm. ratio	ratio	norm. ratio	
Jonagold	4,88	0,026	12,30	0,060	1:3
Golden Delicious	7,11	0,039	12,35	0,060	1:2
Slendera	7,42	0,040	25,79	0,125	1:3
Braeburn Miriri Red	11,92	0,065	26,09	0,127	1:2
Topaz	6,85	0,037	31,63	0,155	1:5
James Grieve S. C.	10,66	0,058	39,04	0,191	1:4
Zuzana	23,97	0,129	31,93	0,156	1:1
Braeburn	22,32	0,120	34,88	0,169	1:2
Fragrance	14,83	0,080	51,75	0,253	1:3
Cumulus	29,39	0,159	41,10	0,200	1:1
Frosta	18,17	0,098	63,30	0,309	1:3
Herald	21,94	0,117	65,05	0,318	1:3
Meteor	17,23	0,093	73,47	0,358	1:4
King Jonagold	37,36	0,202	55,08	0,269	1:1
Judita	18,02	0,098	77,97	0,379	1:4
Rucla	26,60	0,144	69,40	0,339	1:3
Angold	23,46	0,123	74,38	0,363	1:3
Resista	12,73	0,069	85,45	0,418	1:7
Rubín	25,05	0,135	83,29	0,407	1:3
Flordika	15,11	0,082	106,16	0,519	1:7
Santana	43,41	0,237	86,82	0,424	1:2
Benet	27,67	0,149	113,77	0,556	1:4
Julia	36,85	0,199	125,01	0,603	1:3
Elise	59,48	0,321	117,83	0,576	1:2
Artiga	25,40	0,137	176,89	0,865	1:7
Rubinstep	71,36	0,381	186,56	0,912	1:3
Reluga	95,03	0,513	221,36	1,082	1:2
Gala	54,04	0,290	270,64	1,323	1:5
HL 19	53,21	0,287	382,78	1,870	1:7
Miodar	48,18	0,259	694,68	3,395	1:14
Kalibrátor (G.D.)	185,26	1,000	204,62	1,000	1:1

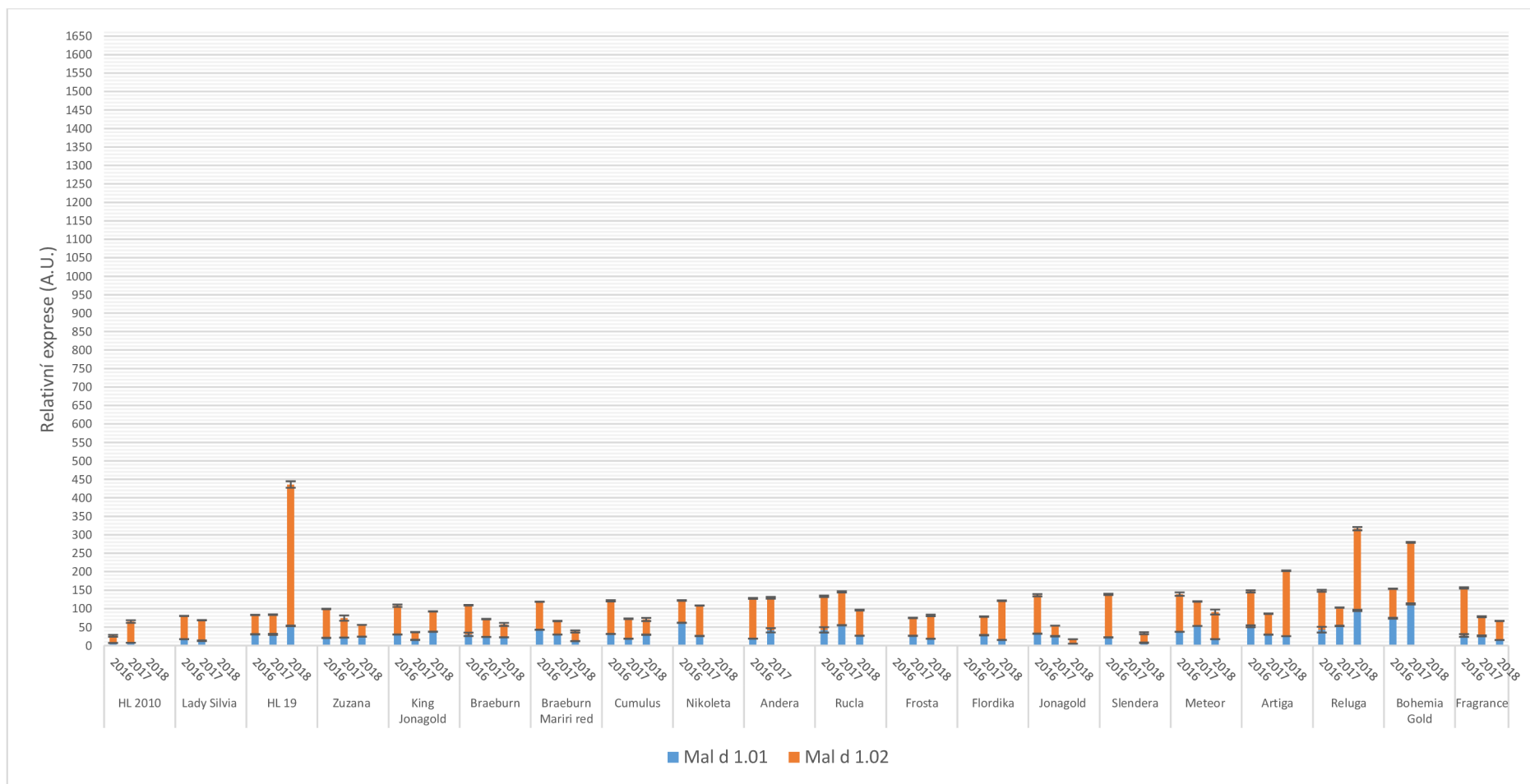


**Graf 3.** Porovnání relativní genové exprese isoformem *Mal d 1.01* a *Mal d 1.02* ve slupce čerstvých plodů v roce hodnocení 2018.

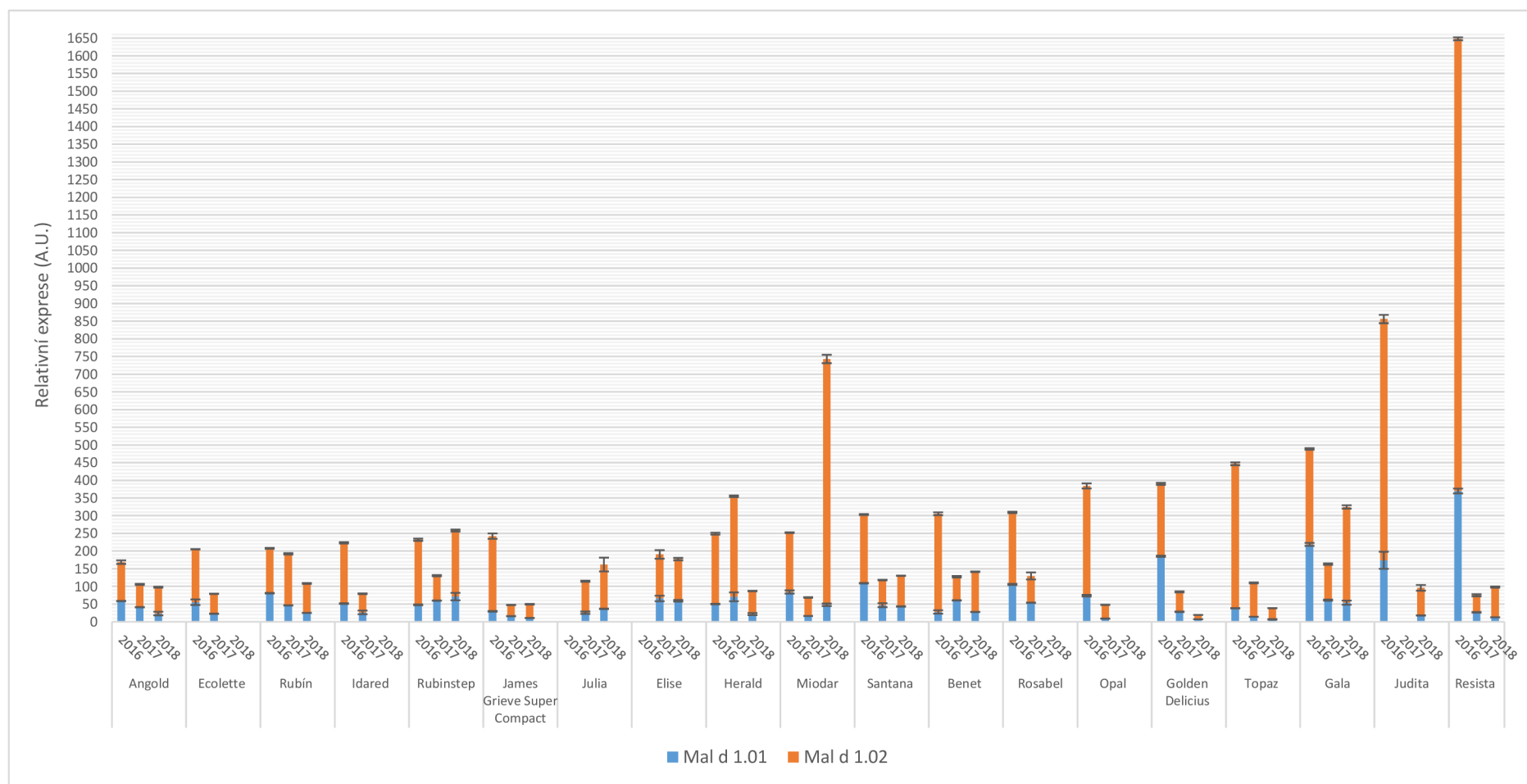


Na základě uvedených výsledků můžeme mezi odrůdy s nízkou relativní expresí genu *Mal d 1* zahrnout následující: 'King Jonagold', 'Jonagold', 'Braeburn Mariri Red', 'Braeburn', 'Cumulus', 'Zuzana', 'Fragrance' (tyto odrůdy byly hodnoceny ve všech třech letech), 'Lady Silvia', 'Frosta', 'Slendera', HL 2010 (tyto odrůdy byly hodnoceny ve dvou letech). Stabilně vysoké hladiny relativní exprese genu *Mal d 1* ve všech třech letech dosahovala odrůda 'Gala'. Odrůda 'Gala' byla zařazena mezi odrůdy s vysokým obsahem alergenu Mal d 1 i v dalších pracích jako například Matthes a Schmitz-Eiberger (2009), Kiewning et al. (2013) anebo Bolhaar et al. (2005a). V práci Ricci et al. (2010) byla 'Gala' vyhodnocena jako odrůda s nejvyšší alergenicitou slupky. Avšak všeobecně se jednotlivé výsledky hodnocení odrůd na základě obsahu alergenu Mal d 1 dosti liší a nelze jednoznačně říct, které odrůdy lze zařadit mezi nízkoalergenní a které mezi vysokoalergenní. Pro názornost jsou všechny odrůdy souhrnně uvedeny v grafu 4.

**Graf 4 (1. část).** Souhrnné porovnání relativní genové exprese isoformem *Mal d 1.01* a *Mal d 1.02* ve slupce čerstvých plodů v letech 2016, 2017 a 2018.



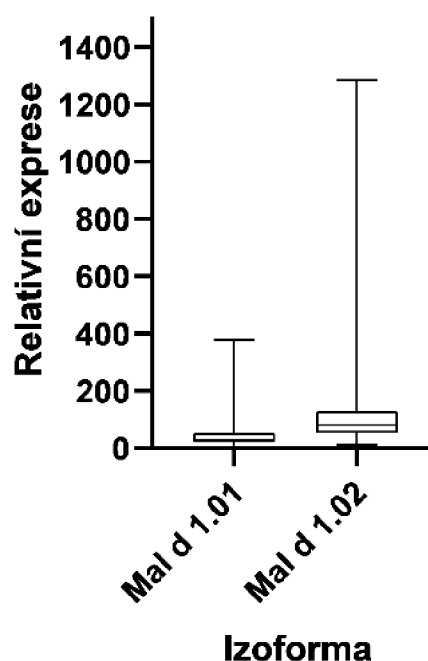
**Graf 4 (2. část).** Souhrnné porovnání relativní genové exprese isoformem Mal d 1.01 a Mal d 1.02 ve slupce čerstvých plodů v letech 2016, 2017 a 2018.



Díky velkému počtu hodnot relativní exprese získaných za tři roky hodnocení u široké škály odrůd, bylo přistoupeno k statistickému vyhodnocení rozdílu mezi dvěma nejvýznamějšími isoformami a rovněž mezi jednotlivými roky hodnocení. V následující tabulce 9 je potvrzen statisticky významný rozdíl mezi relativní genovou expresí isoformy *Mal d 1.01* a isoformy *Mal d 1.02*, a tedy v porovnání hodnot získaných od všech hodnocených odrůd za celé sledované období. V tabulce 10 je zase potvrzen statisticky významný rozdíl mezi celkovou relativní genovou expresí v roce 2016, 2017 a 2018.

**Tabulka 9.** Statistická analýza rozdílů v relativní expresi isoform *Mal d 1.01* a *Mal d 1.02*. V tabulce jsou zaznamenány hodnoty p. Nulová hypotéza byla testována na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ ; červeně jsou označeny statisticky významné rozdíly ( $p < 0,05$ ). V přiloženém grafu je znázorněno porovnání rozdílů hodnot mediánů, minima a maxima, 25 až 75 percentilu relativní genové exprese isoform *Mal d 1.01* a *Mal d 1.02*.

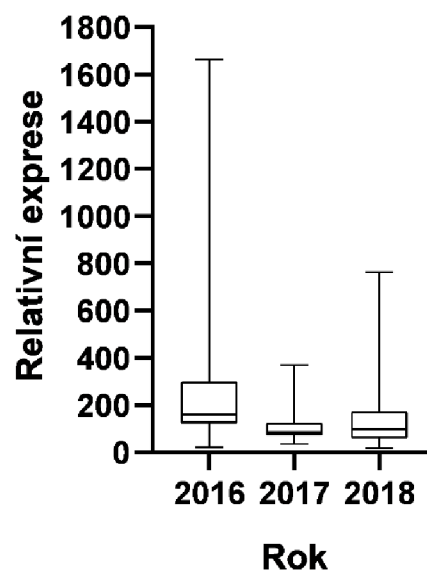
Mal d 1.01	<0,0001
	Mal d 1.02



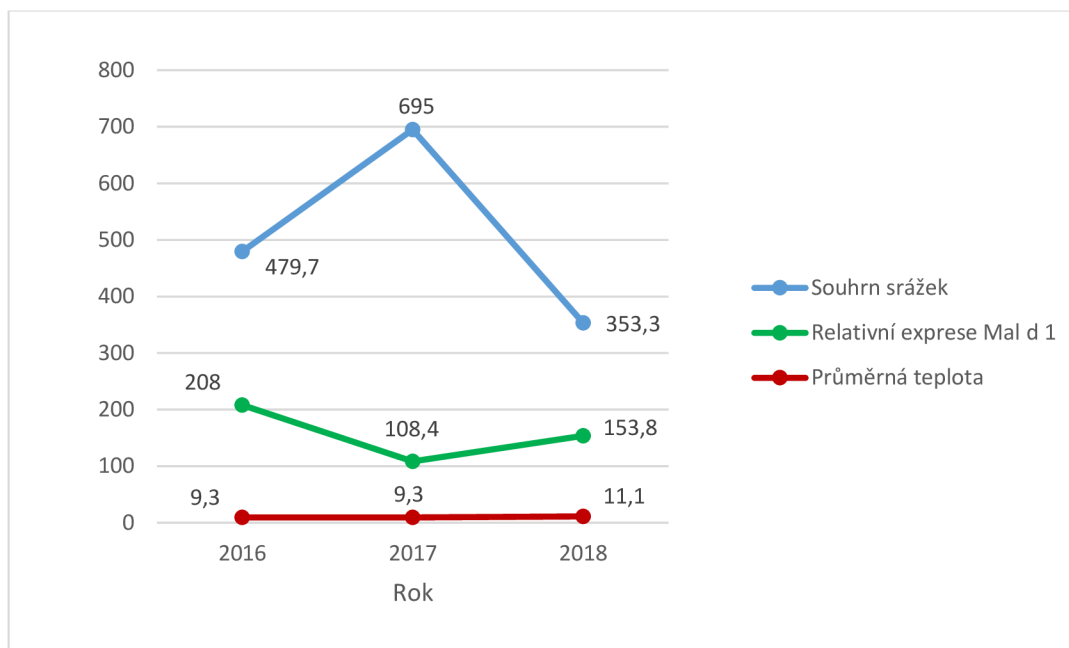


**Tabulka 10.** Statistická analýza rozdílů v průměrné relativní expresi genu *Mal d 1* ve třech letech hodnocení. V tabulce jsou zaznamenány hodnoty p. Nulová hypotéza byla testována na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ ; červeně jsou označeny statisticky významné rozdíly ( $p < 0,05$ ). V přiloženém grafu je znázorněno porovnání rozdílů hodnot mediánů, minima a maxima, 25 až 75 percentilu relativní genové exprese genu *Mal d 1* ve třech letech hodnocení.

2017	<0,0001	
2018	<0,0001	0,0231
	2106	2017



Vzhledem k tomu, že mezi všemi třemi hodnocenými roky byly statisticky významné rozdíly v relativní genové expresi alergenu *Mal d 1* (tabulka 10), byly následně v rámci porovnání vlivu ročníku vyhodnoceny parametry průměrná roční teplota a průměrný roční úhrn srážek. Vliv sucha na expresi alergenů v plodech u jabloní studovali např. Botton et al. (2008), avšak tento vliv se jim nepovedlo prokázat i přesto, že u jiných plodin může sucho stimulovat expresi různých genů patřících do skupiny PR (Akbulak et al, 2020; Gregorová et al. 2015; Yang et al. 2011). Z našich výsledků vyplývá, že v roce, kdy bylo srážek nejvíc, byla průměrná relativní genová exprese alergenu *Mal d 1* nižší a naopak v letech, kdy bylo srážek méně, byla tato exprese vyšší (graf 5). Dalo by se tedy tvrdit, že nedostatek vody působí na jabloně jako abiotický stres, a tím pádem může vyvolávat vyšší expresi stresových proteinů, jako jsou PR proteiny, do kterých patří i alergen *Mal d 1*.



**Graf 5.** Hodnocení rodílů v relativní expresi genu *Mal d 1* v závislosti na změně meteorologických podmínek (souhrn srážek v mm a teplota v °C) v jednotlivých letech.

### 5.1.2 Vliv skladování na úroveň genové exprese

Hodnocení vlivu skladování na relativní genovou expresi alergenu *Mal d 1* probíhalo u vzorků sklizených v prvním a ve druhém roce hodnocení. Do hodnocení nebyly zařazeny letní odrůdy, u kterých není skladování běžné.

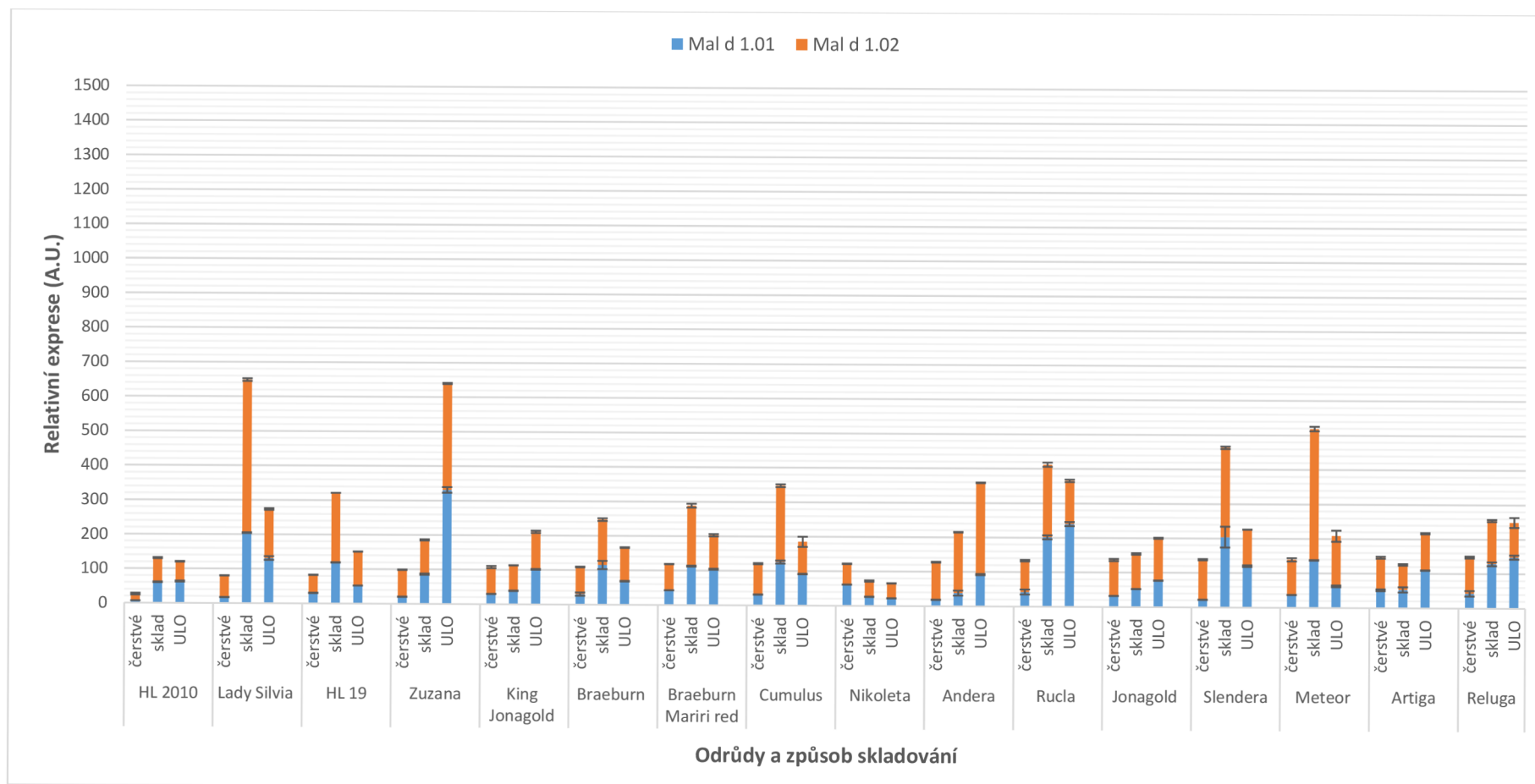
V prvním roce hodnocení došlo vlivem skladování u 19 z 31 odrůd k nárůstu celkové genové exprese alergenu *Mal d 1* u obou typů skladování, u 6 odrůd k nárůstu jen u jednoho typu skladování a u 6 odrůd k poklesu v obou typech skladování. V průběhu skladování v chlazeném skladě nejvíce vzrostla celková exprese genu *Mal d 1* v porovnání s čerstvým vzorkem u odrůd ‘Lady Silvia’, ‘Bohemia Gold’, ‘Herald’ a ‘Santana’. V případě skladování v podmínkách ULO nejvíce vzrostla celková exprese genu *Mal d 1* v porovnání s čerstvým vzorkem u odrůd ‘Zuzana’ a ‘Bohemia Gold’. Při porovnání obou způsobů skladování byla celková genová exprese vyšší u 19 vzorků skladovaných v chlazeném skladu v porovnání se vzorky skladovanými v podmínkách ULO, u 11 vzorků tomu bylo naopak a tedy že celková genová exprese byla vyšší u vzorků skladovaných v podmínkách ULO v porovnání se vzorky skladovanými v chlazeném skladu (graf 6). Statisticky významný rozdíl mezi skladováním v chlazeném skladu a v podmínkách ULO byl potvrzen u 24 z 31 odrůd (tabulka 11). U většiny odrůd v chlazeném skladu měla isoforma *Mal d 1.01* nižší expresi než isoforma *Mal d 1.02*, a

to v poměru 1:1 až 1:6, jen u odrůd ‘Herald’ a ‘Reluga’ měla v chlazeném skladu o něco vyšší expresi isoforma *Mal d 1.01*. V podmínkách ULO byl zřejmý nárůst isoformy *Mal d 1.01*, u odrůd ‘Rucla’, ‘Rubín’, ‘Santana’ byl poměr v prospěch isoformy *Mal d 1.01* 2:1, v případě odrůdy ‘Rosabel’ až 3:1 (tabulka 11).

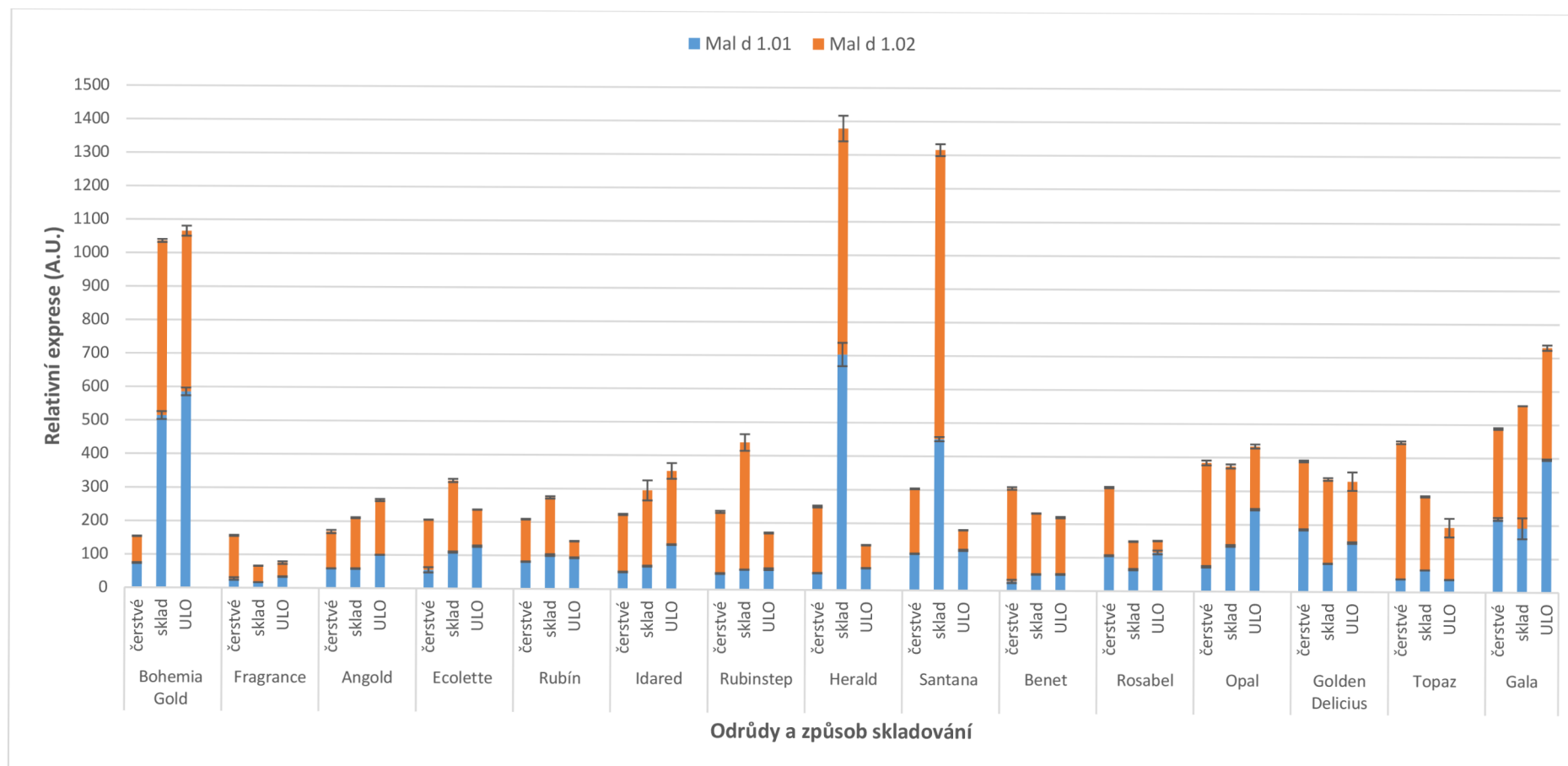
**Tabulka 11.** Výsledky relativní genové exprese isoformem *Mal d 1.01* a *Mal d 1.02* v roce hodnocení 2016 u vzorků skladovaných v chlazeném skladu a v podmínkách ULO. V posledním sloupci tabulky jsou zaznamenány hodnoty p. Nulová hypotéza byla testována na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ ; červeně jsou označeny statisticky významné rozdíly ( $p < 0,05$ ).

Odrůda	sklad		Poměr Mal d 1.01 : Mal d 1.02	ULO		Poměr Mal d 1.01 : Mal d 1.02	Hladina významnosti sklad versus ULO
	Mal d 1.01	Mal d 1.02		Mal d 1.01	Mal d 1.02		
<b>HL 2010</b>	60,70	70,22	1:1	63,00	57,56	1:1	<0,0001
<b>Lady Silvia</b>	204,60	443,68	1:2	131,10	142,37	1:1	<0,0001
<b>HL 19</b>	119,16	201,78	1:2	52,35	98,59	1:2	0,0882
<b>Zuzana</b>	86,44	99,10	1:1	330,94	308,69	1:1	<0,0001
<b>King Jonagold</b>	39,13	73,86	1:2	101,60	108,93	1:1	<0,0001
<b>Braeburn</b>	115,21	131,66	1:1	68,44	97,69	1:1	<0,0001
<b>Braeburn Mariri Red</b>	112,99	175,34	1:2	104,46	98,42	1:1	<0,0001
<b>Cumulus</b>	126,02	221,36	1:2	91,57	93,50	1:1	<0,0001
<b>Nikoleta</b>	26,42	45,72	1:2	22,42	43,31	1:2	>0,9999
<b>Andera</b>	38,22	176,68	1:5	92,43	266,26	1:3	<0,0001
<b>Rucla</b>	201,40	210,44	1:1	240,04	125,42	2:1	<0,0001
<b>Jonagold</b>	52,35	101,85	1:2	77,17	122,80	1:2	<0,0001
<b>Meteor</b>	137,83	381,00	1:3	62,95	145,28	1:2	<0,0001
<b>Artiga</b>	53,47	72,54	1:1	109,64	107,15	1:1	<0,0001
<b>Reluga</b>	129,02	125,40	1:1	148,52	100,47	1:1	>0,9999
<b>Bohemia Gold</b>	514,51	521,57	1:1	585,53	480,16	1:1	0,0004
<b>Fragrance</b>	16,45	49,18	1:3	33,37	41,84	1:1	>0,9999
<b>Angold</b>	58,23	152,23	1:3	99,73	163,55	1:2	<0,0001
<b>Ecolette</b>	108,65	213,84	1:2	126,55	109,39	1:1	<0,0001
<b>Rubín</b>	101,16	172,08	1:2	93,28	49,42	2:1	<0,0001
<b>Idared</b>	69,25	226,01	1:3	133,75	220,10	1:2	<0,0001
<b>Rubinstep</b>	59,65	379,96	1:6	61,59	108,14	1:2	<0,0001
<b>Herald</b>	703,53	675,11	1:1	65,50	68,76	1:1	<0,0001
<b>Santana</b>	451,99	863,25	1:2	120,00	60,00	2:1	<0,0001
<b>Benet</b>	49,00	181,86	1:4	49,31	169,70	1:3	>0,9999
<b>Rosabel</b>	64,48	83,68	1:1	116,15	33,99	3:1	>0,9999
<b>Opal</b>	136,40	237,29	1:2	245,02	188,80	1:1	<0,0001
<b>Golden Delicious</b>	84,26	251,93	1:3	146,38	183,38	1:1	>0,9999
<b>Topaz</b>	65,50	219,80	1:3	37,11	155,23	1:4	<0,0001
<b>Gala</b>	191,23	366,25	1:2	396,18	334,78	1:1	<0,0001
<b>Slendera</b>	204,27	259,00	1:1	120,26	105,91	1:1	<0,0001

**Graf 6.** (1. část) Porovnání rozdílu relativní genové exprese isoformem *Mal d 1.01* a *Mal d 1.02* u čerstvých vzorků a vzorků odrůd skladovaných v chlazeném skladu a v podmínkách ULO v roce hodnocení 2016.



**Graf 6.** (2. část) Porovnání rozdílu relativní genové exprese isoformem *Mal d 1.01* a *Mal d 1.02* u čerstvých vzorků a vzorků odrůd skladovaných v chlazeném skladu a v podmínkách ULO v roce hodnocení 2016.

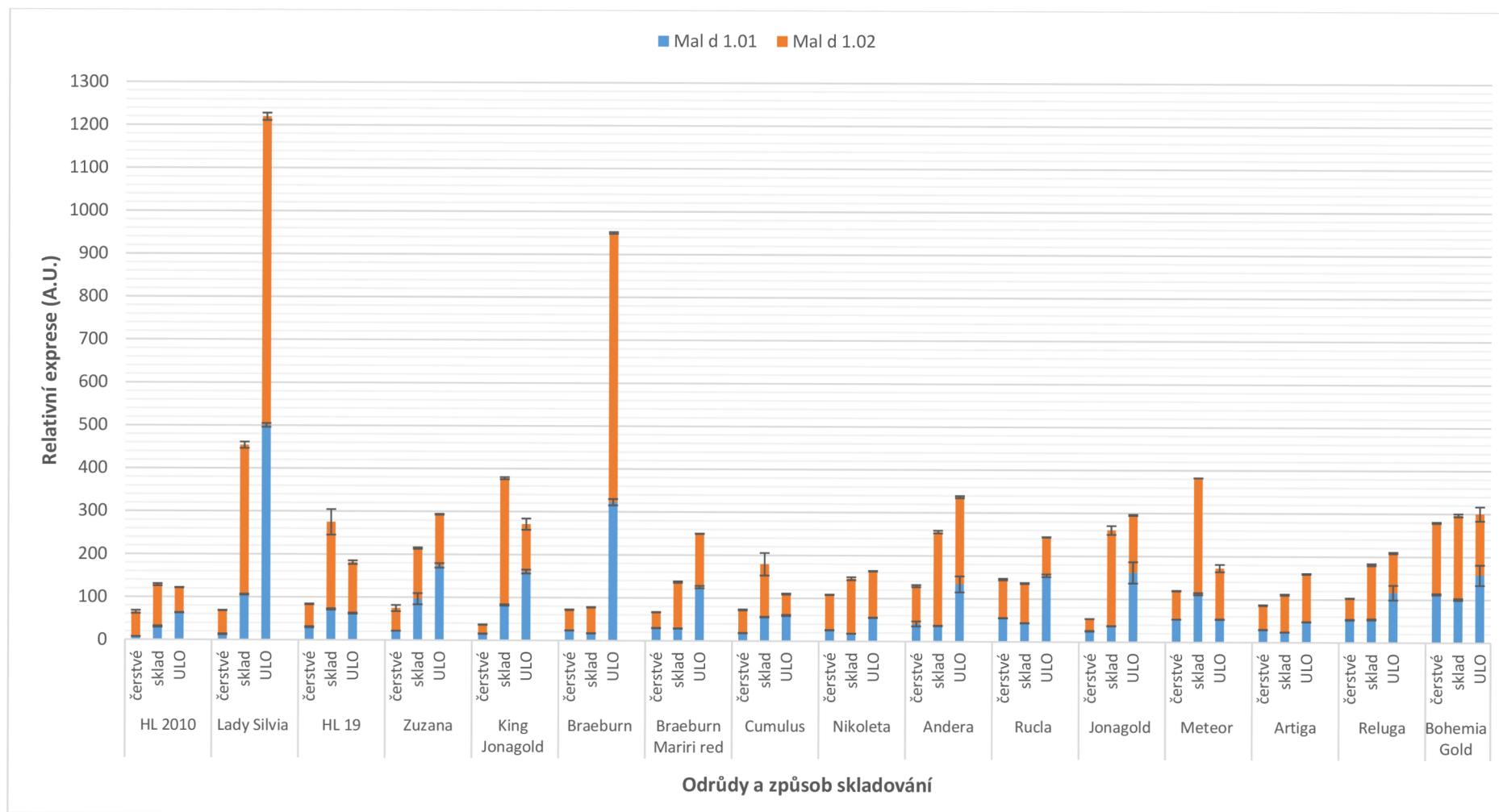


V druhém roce hodnocení došlo vlivem skladování u 27 z 33 odrůd k nárůstu celkové genové exprese alergenu Mal d 1 v obou typech skladování, u 3 odrůd k nárůstu jen u jednoho typu skladování a u 3 odrůd k poklesu v obou typech skladování. U odrůdy ‘Santana’ bylo hodnoceno jenom skladování v podmínkách ULO, a to z důvodu znehodnocení vzorků v chlazeném skladu. V průběhu skladování v chlazeném skladě nejvíce vzrostla celková exprese Mal d 1 v porovnání s čerstvým vzorkem u odrůd ‘Lady Silvia’ a ‘King Jonagold’. V případě skladování v podmínkách ULO nejvíce vzrostla celková exprese genu Mal d 1 v porovnání s čerstvým vzorkem u odrůd ‘Lady Silvia’ a ‘Braeburn’. Při porovnání obou způsobů skladování byla celková genová exprese vyšší u 12 vzorků skladovaných v chlazeném skladu v porovnání se vzorky skladovanými v podmínkách ULO, u 21 vzorků tomu bylo naopak a celková genová exprese byla vyšší u vzorků skladovaných v podmínkách ULO v porovnání se vzorky skladovanými v chlazeném skladu. Statisticky významný rozdíl mezi skladováním v chlazeném skladu a v podmínkách ULO byl potvrzen u 27 z 33 odrůd, u odrůdy ‘Santana’ nelze hodnotit (tabulka 12). U většiny odrůd v chlazeném skladu měla isoforma *Mal d 1.01* nižší expresi než isoforma *Mal d 1.02*, a to v poměru 1:1 až 1:7, jen u odrůdy ‘Flordika’ měla v chlazeném skladu o něco vyšší expresi isoforma *Mal d 1.01*. V podmínkách ULO byl zřejmý nárůst isoformy *Mal d 1.01*, jak v předešlém roce, tak i v tomto roce hodnocení, byl u odrůd ‘Rucla’ a ‘Santana’ poměr v prospěch isoformy *Mal d 1.01* 2:1 (tabulka 12). Všechny výše popsané výsledky jsou znázorněny v grafu 7.

**Tabulka 12.** Výsledky relativní genové exprese isoformem *Mal d 1.01* a *Mal d 1.02* v roce hodnocení 2017 u vzorků skladovaných v chlazeném skladu a v podmínkách ULO. V posledním sloupci tabulky jsou zaznamenány hodnoty p. Nulová hypotéza byla testována na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ ; červeně jsou označeny statisticky významné rozdíly ( $p < 0,05$ ).

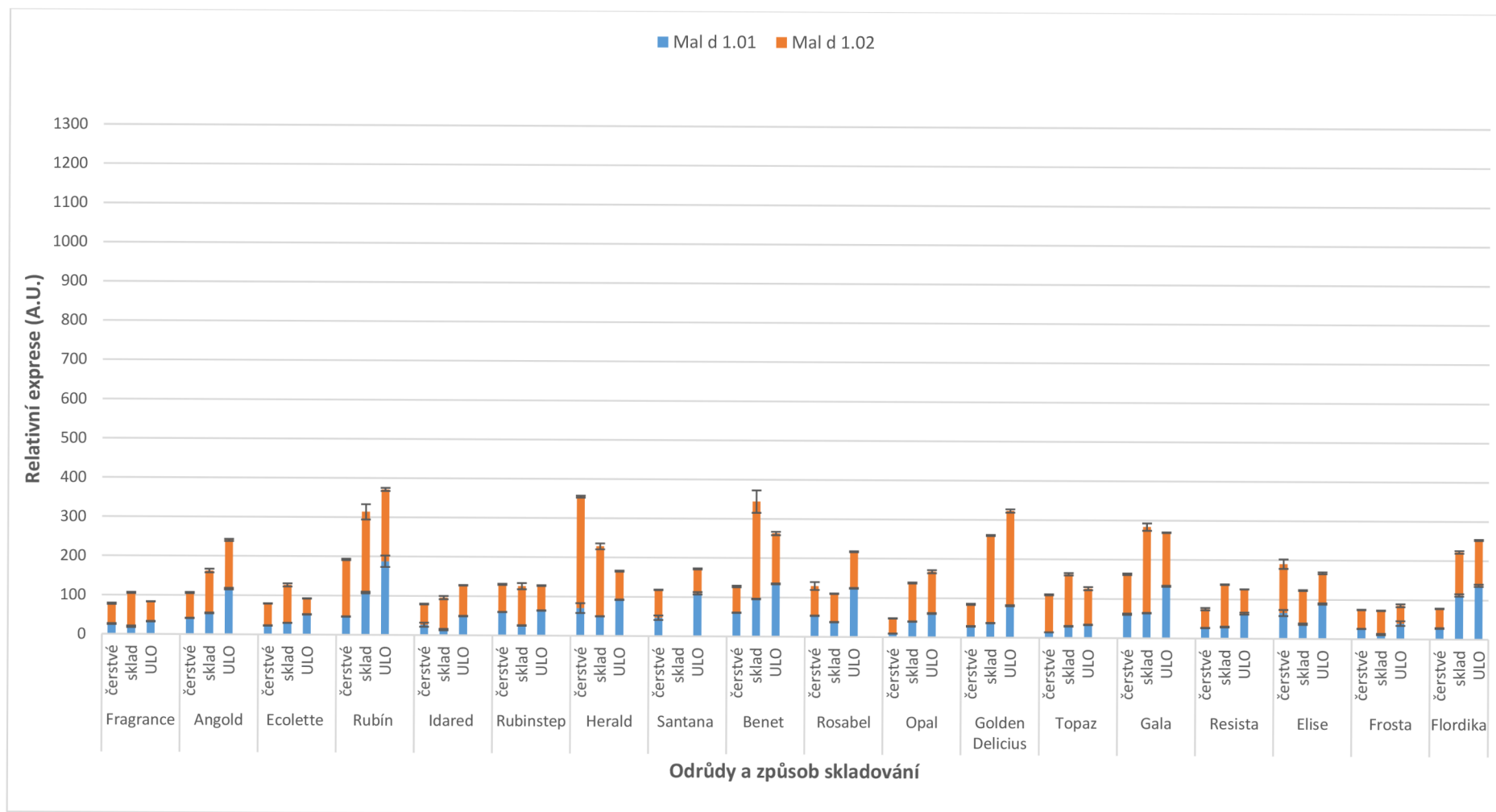
Odrůda	sklad		Poměr Mal d 1.01 : Mal d 1.02	ULO		Poměr Mal d 1.01 : Mal d 1.02	Hladina významnosti sklad versus ULO
	Mal d 1.01	Mal d 1.02		Mal d 1.01	Mal d 1.02		
<b>HL 2010</b>	30,87	97,49	1:3	63,27	58,35	1:1	>0,9999
<b>Lady Silvia</b>	105,79	348,17	1:3	500,33	719,13	1:1	<0,0001
<b>HL 19</b>	71,86	202,91	1:3	62,26	118,68	1:2	<0,0001
<b>Zuzana</b>	96,17	118,07	1:1	174,13	119,16	1:1	<0,0001
<b>King Jonagold</b>	82,35	295,44	1:4	160,22	110,64	1:1	<0,0001
<b>Braeburn</b>	16,76	60,69	1:4	322,62	627,44	1:2	<0,0001
<b>Braeburn Mariri Red</b>	28,78	108,15	1:4	125,40	124,21	1:1	<0,0001
<b>Cumulus</b>	56,11	122,93	1:2	59,87	49,88	1:1	<0,0001
<b>Nikoleta</b>	17,75	128,35	1:7	55,08	108,39	1:2	0,0167
<b>Andera</b>	36,51	218,80	1:6	133,67	203,20	1:2	<0,0001
<b>Rucla</b>	43,61	92,42	1:2	154,21	89,47	2:1	<0,0001
<b>Jonagold</b>	37,27	223,10	1:6	161,58	134,06	1:1	<0,0001
<b>Meteor</b>	112,37	269,97	1:2	53,08	119,20	1:2	<0,0001
<b>Artiga</b>	23,75	87,24	1:4	47,73	111,69	1:2	<0,0001
<b>Reluga</b>	53,71	127,72	1:2	116,27	92,43	1:1	<0,0001
<b>Bohemia Gold</b>	100,68	196,30	1:2	157,35	142,71	1:1	>0,9999
<b>Fragrance</b>	19,59	86,04	1:4	32,60	50,68	1:2	0,0003
<b>Angold</b>	54,20	108,23	1:2	116,46	124,24	1:1	<0,0001
<b>Ecolette</b>	29,86	96,64	1:3	51,63	40,60	1:1	<0,0001
<b>Rubín</b>	108,16	205,57	1:2	187,99	183,17	1:1	<0,0001
<b>Idared</b>	14,34	81,49	1:6	49,07	78,43	1:2	<0,0001
<b>Rubinstep</b>	25,65	100,28	1:4	64,08	63,42	1:1	>0,9999
<b>Herald</b>	50,10	178,28	1:4	92,42	73,02	1:1	<0,0001
<b>Santana</b>	-	-	-	109,67	62,26	2:1	
<b>Benet</b>	95,89	248,28	1:3	134,68	128,37	1:1	<0,0001
<b>Rosabel</b>	37,71	72,34	1:2	124,22	93,28	1:1	<0,0001
<b>Opal</b>	40,04	98,37	1:2	60,84	106,47	1:2	<0,0001
<b>Golden Delicious</b>	37,02	223,38	1:6	81,40	241,67	1:3	<0,0001
<b>Topaz</b>	29,87	132,55	1:4	33,60	92,50	1:3	<0,0001
<b>Gala</b>	64,00	219,49	1:3	132,83	136,56	1:1	0,1531
<b>Resista</b>	29,60	108,14	1:4	63,90	61,96	1:1	0,5641
<b>Elise</b>	37,76	85,84	1:2	89,49	78,28	1:1	<0,0001
<b>Frosta</b>	12,20	60,41	1:5	40,32	45,50	1:1	0,2625
<b>Flordika</b>	112,77	109,69	1:1	137,53	115,63	1:1	<0,0001

**Graf 7.** (1. část) Porovnání rozdílu relativní genové exprese isoformem *Mal d 1.01* a *Mal d 1.02* u čerstvých vzorků a vzorků odrůd skladovaných v chlazeném skladu a v podmínkách ULO v roce hodnocení 2017.





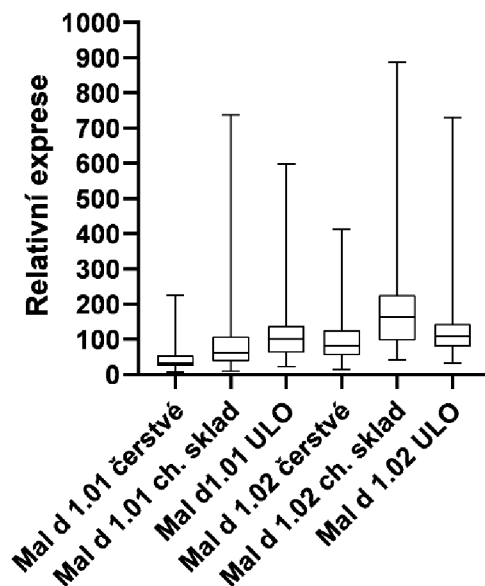
**Graf 7. (2. část)** Porovnání rozdílu relativní genové exprese isoformem *Mal d 1.01* a *Mal d 1.02* u čerstvých vzorků a vzorků odrůd skladovaných v chlazeném skladu a v podmínkách ULO v roce hodnocení 2017.



Co se týče jednotlivých isoform alergenu Mal d 1 byly mezi nimi nalezeny statisticky významné rozdíly i v souhrnném hodnocení míry relativní genové exprese. V případě čerstvých vzorků i vzorků skladovaných v chlazeném skladu byla exprese vyšší u isoformy *Mal d 1.02* než u isoformy *Mal d 1.01*. Avšak v případě skladování v podmínkách ULO docházelo především k růstu exprese isoformy *Mal d 1.01* a u téměř poloviny odrůd byla tato exprese dokonce vyšší než v případě isoformy *Mal d 1.02*. To dokazuje i statistické hodnocení, kdy v podmínkách ULO není mezi isoformou *Mal d 1.01* a *Mal d 1.02* statisticky významný rozdíl (tabulka 13).

**Tabulka 13.** Statistická analýza rozdílů v relativní expresi isoform *Mal d 1.01* a *Mal d 1.02* mezi plody čerstvě sklizenými a plody skladovanými v chlazeném skladu a v podmínkách ULO. V tabulce jsou zaznamenány hodnoty p. Nulová hypotéza byla testována na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ ; červeně jsou označeny statisticky významné rozdíly ( $p < 0,05$ ). V přiloženém grafu je znázorněno porovnání rozdílů hodnot mediánů, minima a maxima, 25 až 75 percentilu relativní genové exprese isoform *Mal d 1.01* a *Mal d 1.02*.

Md1.01 versus Md1.02	
čerstvé	<0,0001
chlazený sklad	<0,0001
ULO	0,0743

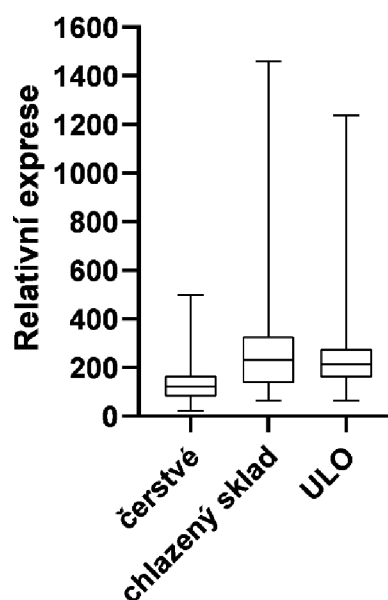


Díky velkému počtu hodnot relativní exprese získaných za dva roky hodnocení u široké škály odrůd, bylo přistoupeno k statistickému vyhodnocení rozdílu mezi dvěma způsoby skladování a čerstvými vzorky. Byl zjištěn statisticky významný rozdíl mezi relativní genovou

expresí alergenu Mal d 1 v čerstvých plodech a v plodech skladovaných u všech hodnocených odrůd za celé sledované období, avšak mezi použitými způsoby skladování nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl (tabulka 14). Tyto výsledky jsou v souladu se zjištěními, které jsou popsány v literárním přehledu v kapitole 2.7.1.2, a sice že skladování má vliv na zvýšení obsahu alergenu Mal d 1 v plodech jabloní a rovněž, že nelze jednoznačně určit, který způsob skladování je vhodnější z hlediska alergenicity. Souvislost skladování s alergenitou jablek je detailněji diskutována v kapitole 5.2.1, kde byly vyhodnoceny změny genové exprese v průběhu dlouhodobého skladování

**Tabulka 14.** Statistická analýza rozdílů v relativní expresi genu Mal d 1 mezi plody čerstvě sklizenými a plody skladovanými v chlazeném skladu a v podmínkách ULO. V tabulce jsou zaznamenány hodnoty p. Nulová hypotéza byla testována na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ ; červeně jsou označeny statisticky významné rozdíly ( $p < 0,05$ ). V přiloženém grafu je znázorněno porovnání rozdílů hodnot mediánů, minima a maxima, 25 až 75 percentilu relativní genové exprese alergenu Mal d 1 v čerstvých a skladovaných plodech.

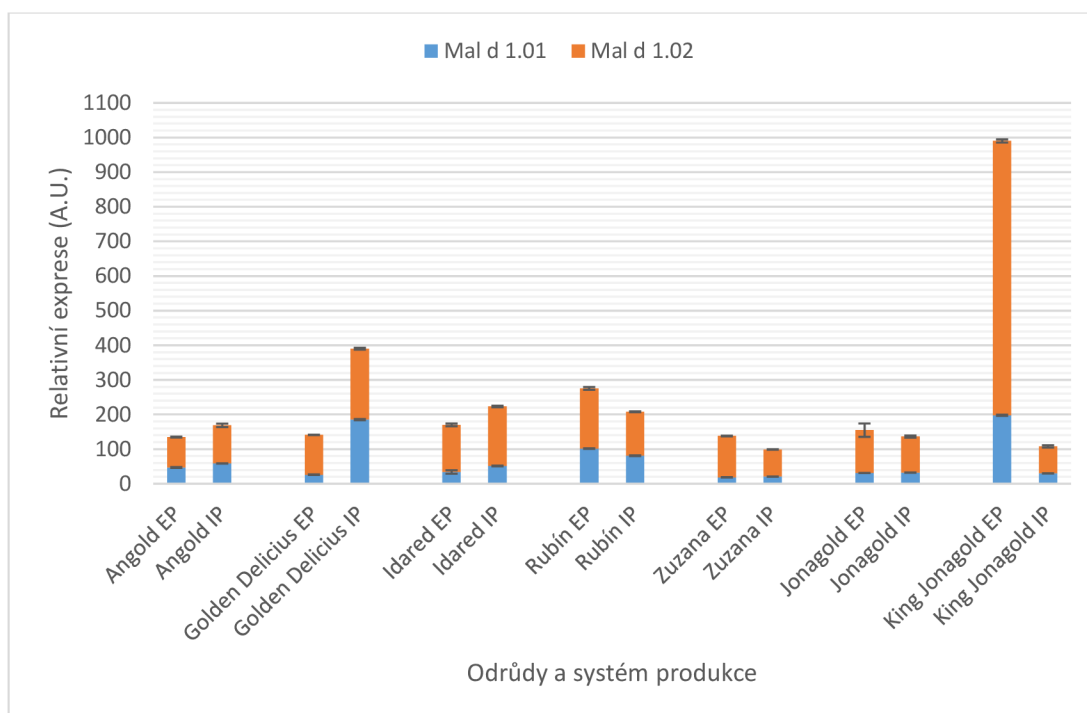
chlazený sklad	<0,0001	
ULO	<0,0001	0,4512
	čerstvé	chlazený sklad



### 5.1.3 Vliv systému produkce na úroveň genové exprese

U čerstvě sklizených plodů byl zhodnocen vliv systému pěstování (EP – ekologická produkce; IP – integrovaná produkce) na hladinu genové exprese. Hodnocení probíhalo tři roky.

V prvním roce byly zhodnoceny odrůdy ‘Angold’, ‘Golden Delicious’, ‘Idared’, ‘Rubín’, ‘Zuzana’, ‘Jonagold’ a ‘King Jonagold’ (graf 8). U odrůd ‘Angold’, ‘Golden Delicious’ a ‘Idared’ byla celková genová exprese alergenu *Mal d 1* vyšší v integrované produkci a u odrůd ‘Rubín’, ‘Zuzana’, ‘Jonagold’ a ‘King Jonagold’ tomu bylo obráceně a vyšší genová exprese byla v ekologické produkci, u odrůdy ‘King Jonagold’ byla tato exprese až 9 krát vyšší. Nicméně, statisticky významné rozdíly byly vyhodnoceny jen u odrůd ‘Golden Delicious’ a ‘King Jonagold’ (tabulka 15).

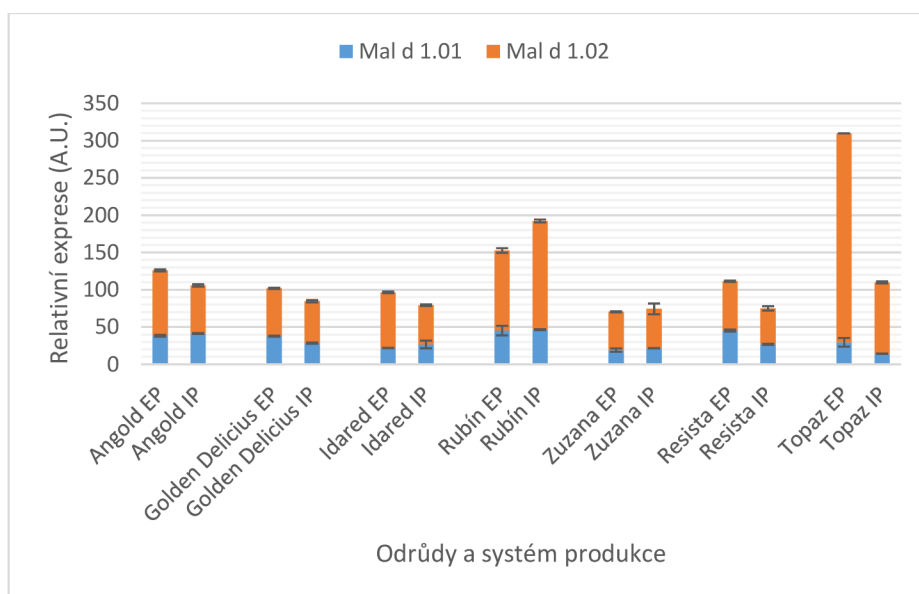


**Graf 8.** Hodnocení vlivu systému produkce na hladinu genové exprese isoformem *Mal d 1.01* a *Mal d 1.02* v prvním roce hodnocení.

**Tabulka 15.** Statistická analýza míry genové exprese mezi dvěma systémy pěstování (EP – ekologická produkce; IP – integrovaná produkce) v prvním roce hodnocení. V tabulce jsou zaznamenány hodnoty p. Nulová hypotéza byla testována na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ ; červeně jsou označeny statisticky významné rozdíly ( $p < 0,05$ ).

	IP versus EP
Angold	0,3113
Golden Delicious	0,0493
Idared	0,4997
Rubín	0,7137
Zuzana	0,0523
Jonagold	0,5245
King Jonagold	0,0002

Ve druhém roce byly zhodnoceny odrůdy ‘Angold’, ‘Golden Delicious’, ‘Idared’, ‘Rubín’, ‘Zuzana’, ‘Resista’ a ‘Topaz’ (graf 9). U odrůd ‘Rubín’ a ‘Zuzana’ byla celková genová exprese alergenu Mal d 1 vyšší v integrované produkci a u odrůd ‘Angold’, ‘Golden Delicious’, ‘Idared’, ‘Resista’ a ‘Topaz’ tomu bylo obráceně a vyšší genová exprese byla v ekologické produkci. Statisticky významné rozdíly byly vyhodnoceny opět jen u dvou odrůd a to ‘Resista’ a ‘Topaz’ (tabulka 16).

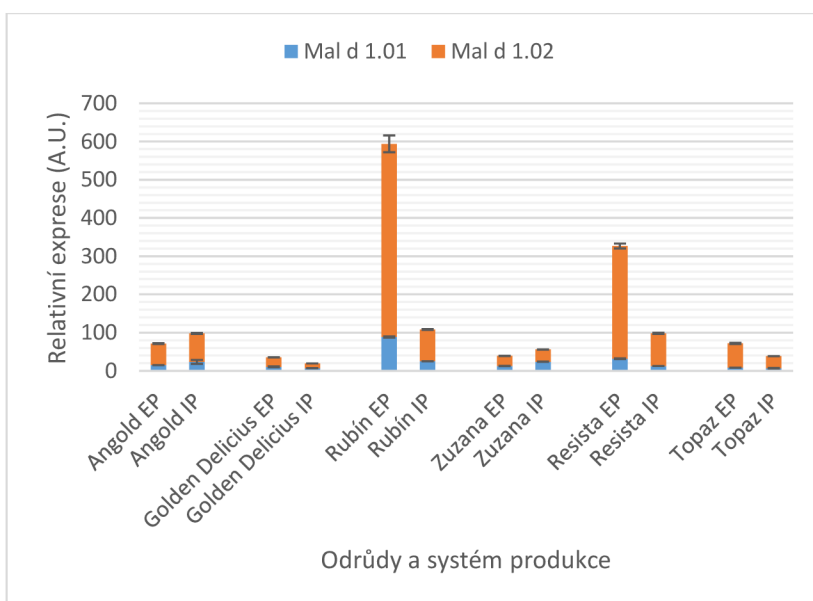


**Graf 9.** Hodnocení vlivu systému produkce na hladinu genové exprese isoformem *Mal d 1.01* a *Mal d 1.02* ve druhém roce hodnocení.

**Tabulka 16.** Statistická analýza rozdílů míry genové exprese mezi dvěma systémy pěstování (EP – ekologická produkce; IP – integrovaná produkce) ve druhém roce hodnocení. V tabulce jsou zaznamenány hodnoty p. Nulová hypotéza byla testována na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ ; červeně jsou označeny statisticky významné rozdíly ( $p < 0,05$ ).

	<b>IP versus EP</b>
Angold	0,4188
Golden Delicious	0,3722
Idared	0,5454
Rubín	0,5514
Zuzana	0,7053
Resista	<b>0,0249</b>
Topaz	<b>0,0050</b>

Ve třetím roce byly zhodnoceny odrůdy ‘Angold’, ‘Golden Delicious’, ‘Rubín’, ‘Zuzana’, ‘Resista’ a ‘Topaz’ (graf 10). U odrůd ‘Angold’ a ‘Zuzana’ byla celková genová exprese alergenu Mal d 1 vyšší v integrované produkci a u odrůd ‘Golden Delicious’, ‘Rubín’, ‘Resista’ a ‘Topaz’ tomu bylo obráceně a vyšší genová exprese byla v ekologické produkci, u odrůdy ‘Rubín’ byla tato exprese až téměř 6 krát vyšší. I v tomto případě byly statisticky významné rozdíly vyhodnoceny u dvou odrůd, a to ‘Rubín’ a ‘Resista’ (tabulka 17).



**Graf 10.** Hodnocení vlivu systému produkce na hladinu genové exprese isoformů Mal d 1.01 a Mal d 1.02 ve třetím roce hodnocení.

**Tabulka 17.** Statistická analýza rozdílů míry genové exprese mezi dvěma systémy pěstování (EP – ekologická produkce; IP – integrovaná produkce) v třetím roce hodnocení. V tabulce jsou zaznamenány hodnoty p. Nulová hypotéza byla testována na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ ; červeně jsou označeny statisticky významné rozdíly ( $p < 0,05$ ).

	<b>IP versus EP</b>
Angold	0,1749
Golden Delicious	0,8544
Rubín	<b>0,0004</b>
Zuzana	0,8243
Resista	<b>&lt;0,0001</b>
Topaz	0,3662

Z uvedených dat je zřejmé, že u tohoto faktoru nelze jasně určit, jaký vliv má systém produkce na expresi, vzhledem k tomu, že výsledky se liší jak v případě hodnocení jednotlivých odrůd, tak v případě hodnocení v jednotlivých letech. Je to patrné u odrůd, které byly hodnoceny ve všech třech letech, kdy odrůda ‘Angold’ má v prvním a třetím roce hodnocení vyšší expresi v integrované produkci a ve druhém roce má vyšší expresi v ekologické produkci. Odrůda ‘Golden Delicious’ má v prvním roce hodnocení vyšší expresi v integrované produkci a ve druhém a třetím roce má vyšší expresi v ekologické produkci. Odrůda ‘Rubín’ má ve druhém roce hodnocení vyšší expresy v integrované produkci a v prvním a třetím roce má vyšší expresy v ekologické produkci. Odrůda ‘Zuzana’ má ve druhém a třetím roce hodnocení vyšší expresy v integrované produkci a v prvním roce má vyšší expresi v ekologické produkci. Nicméně u většiny odrůd nejsou tyto rozdíly statisticky významné. K podobnému závěru došli ve své práci rovněž Marzban et al. (2005), kteří nezjistili žádné významné rozdíly mezi pěstováním v konvenčním a ekologickém zemědělství z hlediska obsahu proteinu Mal d 1. V našem hodnocení v průběhu tří let byly statisticky významné rozdíly nalezeny v šesti případech, z čeho u čtyř odrůd byly naměřené hodnoty relativní genové exprese vyšší v případě ekologické produkce (2x ‘Resista’, ‘Rubín’, ‘Topaz’ a ‘King Jonagold’) a u jedné odrůdy byly naměřené hodnoty relativní genové exprese vyšší v případě integrované produkce (‘Golden Delicious’). Matthes a Schmitz-Eiberger (2009), kteří stanovovali obsah proteinu Mal d 1 v plodech pěstovaných jak v ekologické, tak v integrované produkci, zjistili statisticky významné rozdíly mezi hodnotami naměřenými u plodů sklizených ze sadů v ekologické produkci a plodů sklizených ze sadů v integrované produkci. U odrůdy ‘Jonagold’ zjistili, že u plodů sklizených ze sadů nacházejících se v Klein-Altendorfu jsou naměřené hodnoty vyšší v ekologické

produkci než v integrované a naopak u plodů sklizených ze sadů nacházejících se v Bavendorfu jsou naměřené hodnoty vyšší v integrované produkci než v ekologické. U odrůdy ‘Topaz’ byly naměřeny hodnoty obsahu alergenu Mal d 1 vyšší u plodů sklizených ze sadů v integrované produkci a to v obou lokalitách. Vliv systému produkce na genovou expresi isoformy *Mal d 1.01* měřili ve své práci rovněž Siekierzynska et al. (2021). Byly hodnoceny odrůdy ‘Gala’, ‘Golden Delicious’ a ‘Idared’ a u všech byla hladina genové exprese isoformy Mal d 1 vyšší v případě pěstování v ekologické produkci. Tato hodnocení byla prováděna v jednom roce.

Mal d 1 patří k proteinům, které se v rostlinách aktivují v reakci na různé druhy stresu (Fernandes et al. 2013), je tedy možné, že u obou systémů pěstování mohou na plody působit odlišné spouštěče stresové reakce. Na plody pěstované v ekologické produkci mohou ve větší míře působit patogeny, jako jsou houby, viry, a bakterie, anebo hmyzí škůdci, a to proto, že u tohoto typu produkce nejsou využívány běžné chemické postřiky. V integrované produkci jsou jabloně ošetřované rozličnými fungicidy a pesticidy a s ohledem na počasí, případně sílu infekčního tlaku choroby nebo škůdce může být toto ošetření různě intenzivní. Tato ošetření mohou na rostlinu rovněž působit jako jistá forma stresu a vyvolat produkci PR-10 proteinů, a to včetně alergenu Mal d 1. Z naší studie vyplývá, že podmínky pěstování (ekologická vs. integrovaná produkce) nemusí být tím rozhodujícím faktorem, který má vliv na hladinu exprese genu Mal d 1, ale reakce na jakékoli stresové faktory může být závislá i na odrůdě a na jejím genetickém základu. Avšak mechanismus, který vede k aktivaci syntézy proteinu Mal d 1 v jabloních, není ještě zcela prozkoumán a objasněn, a proto je jen velmi těžké určit, co přesně se na této aktivaci podílí.

#### **5.1.4 Vliv lokality na úroveň genové exprese**

Dalším hodnoceným parametrem byl vliv lokality na expresi isoformou *Mal d 1.01* a *Mal d 1.02*. Plody odrůdy ‘Golden Delicious’ byly odebrány z jednotlivých lokalit, jejichž popis je shrnut v tabulce 18.



**Tabulka 18.** Charakteristika lokalit, ze kterých byly získány plody odrůdy ‘Golden Delicious’ pro hodnocení vlivu lokality na genovou expresi alergenu Mal d 1. a) data za rok 2016; b) data za rok 2017.

a)

Lokalita	Okres	Kraj	Nadmořská výška	Průměrná roční teplota (°C)*	Průměrný roční úhrn srážek (mm)*
Rovensko pod Troskami - Proseč	Semily	Liberecký	390	7,9	768
Lišnice	Šumperk	Olomoucký	320	8,6	684
Těchlovice	Hradec Králové	Královéhradecký	290	8,6	577
Břasy	Rokycany	Plzeňský	440	8,3	671
Holovousy	Jičín	Královéhradecký	290	8,6	577

\* dle dat ČHMÚ za rok 2016 pro jednotlivé kraje

b)

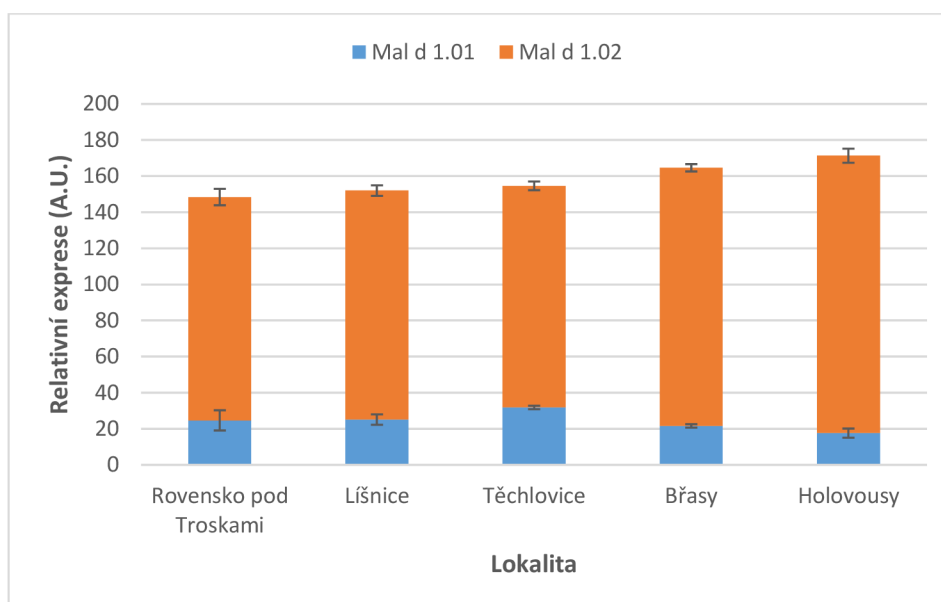
Lokalita	Okres	Kraj	Nadmořská výška	Průměrná roční teplota (°C)*	Průměrný roční úhrn srážek (mm)*
Pěnčín	Liberec	Liberecký	280	7,9	946
Ploskovice	Litoměřice	Ústecký	240	8,9	667
Vlkov nad Lesy	Nymburk	Středočeský	230	9,3	615
Lišnice	Šumperk	Olomoucký	320	8,4	716
Slaný	Kladno	Středočeský	270	9,3	615
Holovousy	Jičín	Královéhradecký	290	8,4	803
Libčany	Hradec Králové	Královéhradecký	240	8,4	803
Těchlovice	Hradec Králové	Královéhradecký	290	8,4	803
Bříství	Nymburk	Středočeský	230	9,3	615
Chelčice	Strakonice	Jihočeský	460	8,3	649
Velké Dvorce	Tachov	Plzeňský	560	8,4	647
Nechvalín	Hodonín	Jihomoravský	290	9,8	473

\* dle dat ČHMÚ za rok 2017 pro jednotlivé kraje

V prvním roce hodnocení byly mezi sledovanými lokalitami pozorovány statisticky významné rozdíly v celkové genové expresi alergenu Mal d 1 (tabulka 19). Nejvyšší celková exprese alergenu Mal d 1 byla pozorována v lokalitě Holovousy, nejnižší v lokalitě Rovensko pod Troskami – Proseč (graf 11).

**Tabulka 19.** Statistická analýza rozdílů míry genové exprese mezi jednotlivými lokalitami pěstování odrůdy ‘Golden Delicious’ v roce 2016. V tabulce jsou zaznamenány hodnoty p. Nulová hypotéza byla testována na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ ; červeně jsou označeny statisticky významné rozdíly ( $p < 0,05$ ).

Líšnice	0,5299			
Těchlovice	0,1670	0,4510		
Břasy	0,0002	0,0019	0,0187	
Holovousy	<0,0001	<0,0001	0,0005	0,2659
	Rovensko pod Troskami	Líšnice	Těchlovice	Břasy

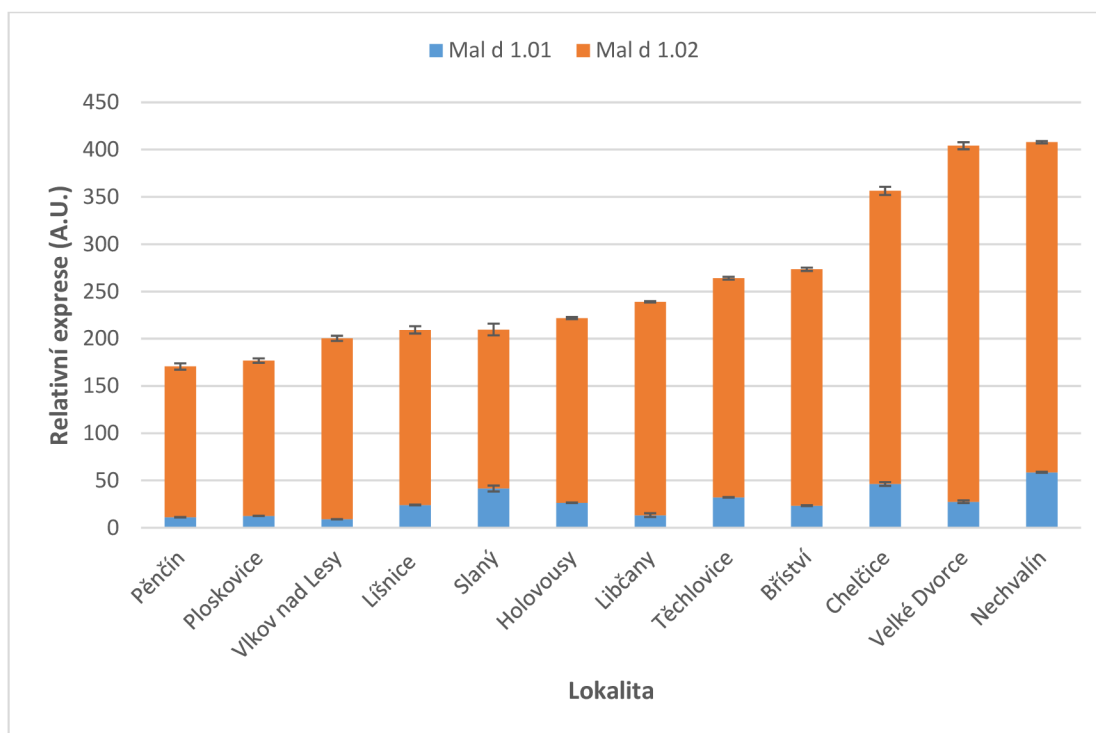


**Graf 11.** Hodnocení relativní genové exprese isoformem *Mal d 1.01* a *Mal d 1.02* v odrůdě ‘Golden Delicious’ pěstované v různých lokalitách v roce 2016.

V druhém roce hodnocení byly rovněž pozorovány statisticky významné rozdíly v celkové genové expresi alergenu Mal d 1 mezi sledovanými lokalitami (tabulka 20). Tyto rozdíly byly ve druhém roce hodnocení mnohem výraznější než v prvním roce, bylo však hodnoceno více lokalit. Nejvyšší celková genová exprese alergenu Mal d 1 byla pozorována v lokalitách Velké Dvorce a Nechvalín a byla více než dvojnásobná než nejnižší celková genová exprese alergenu Mal d 1, která byla pozorována v lokalitách Ploskovice a Pěččín (graf 12).

**Tabulka 20.** Statistická analýza rozdílů míry genové exprese mezi jednotlivými lokalitami pěstování odrůdy ‘Golden Delicious’ v roce 2017. V tabulce jsou zaznamenány hodnoty p. Nulová hypotéza byla testována na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ ; červeně jsou označeny statisticky významné rozdíly ( $p < 0,05$ ).

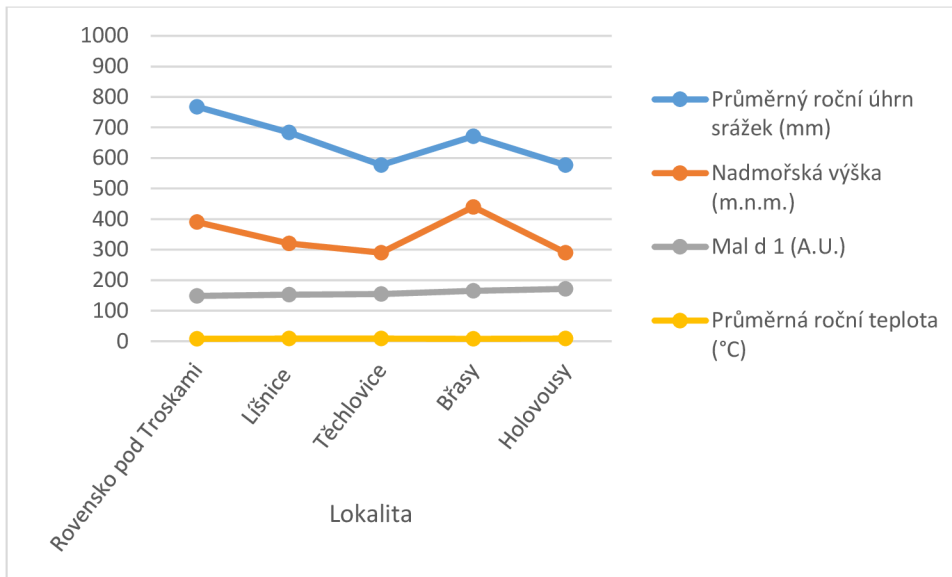
Ploskovice	0,6571											
Vlkov nad Lesy	0,2355	0,4065										
Líšnice	0,0650	0,1146	0,4036									
Slaný	0,0508	0,0916	0,3914	0,9453								
Holovousy	0,0040	0,0064	0,0581	0,3901	0,2995							
Libčany	0,0018	0,0029	0,0251	0,1999	0,1408	0,5859						
Těchlovice	<0,0001	<0,0001	0,0019	0,0513	0,0241	0,2232	0,5859					
Bříství	<0,0001	<0,0001	0,0009	0,0228	0,0104	0,1022	0,3200	0,5859				
Chelčice	<0,0001	<0,0001	0,0002	0,0075	0,0027	0,0385	0,1638	0,3268	0,6908			
Velké Dvorce	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0003	<0,0001	0,0023	0,0290	0,0670	0,2742	0,5107		
Nechvalín	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0004	<0,0001	0,0028	0,0256	0,0574	0,2158	0,4010	0,7931	
	Pěčín	Ploskovice	Vlkov nad Lesy	Líšnice	Slaný	Holovousy	Libčany	Těchlovice	Bříství	Chelčice	Velké Dvorce	



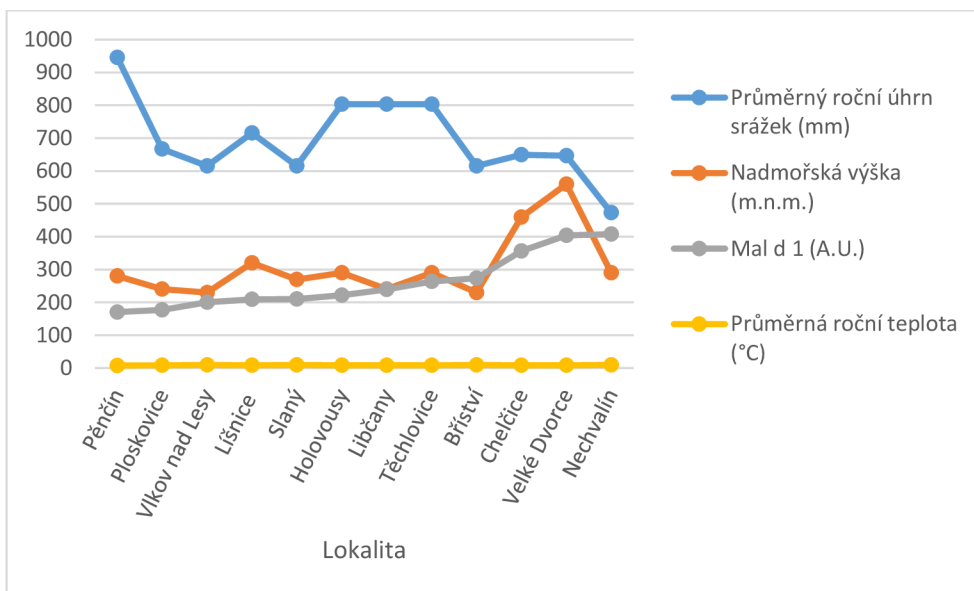
**Graf 12.** Hodnocení relativní genové exprese isoformem *Mal d 1.01* a *Mal d 1.02* v odrůdě ‘Golden Delicious’ pěstované v různých lokalitách v roce 2017.

V rámci analýzy rozdílů mezi jednotlivými lokalitami byly vyhodnoceny parametry, jako jsou nadmořská výška, průměrná roční teplota a průměrný roční úhrn srážek, které by mohly ovlivňovat expresi *Mal d 1* genu. Tyto parametry jsou zachyceny v grafu 13 a) pro první hodnocený rok a grafu 13 b) pro druhý hodnocený rok.

a)



b)



**Graf 13.** Znáročnění změny exprese genu *Mal d 1* u odrůdy ‘Golden Delicious’ v jednotlivých lokalitách v závislosti na nadmořské výšce, ročním úhrnu srážek a průměrné roční teplotě, a) lokality hodnocené v roce 2016; b) lokality hodnocené v roce 2017.

Mezi lokalitami v České republice, které byly hodnoceny v této disertační práci, nejsou výrazné rozdíly v nadmořské výšce. Přesto však můžeme vidět, že plody získané z lokalit s vyšší nadmořskou výškou měly i vyšší celkovou genovou expresi alergenu *Mal d 1* (graf 13). Botton et al (2008) uvádějí, že plody odrůdy ‘Golden Delicious’ pěstované v nízké nadmořské výšce vykazovaly po sklizni celkově nižší genovou expresi ve srovnání s plody ve vyšších nadmořských výškách a to s ohledem na hodnoty všech čtyř tříd alergenů. Plody skladované po dobu 5 měsíců vykazovaly u plodů získaných z nižší nadmořské výšky 50% snížení souhrnné genové exprese, zatímco se souhrnná exprese *Mal* genů v plodech získaných z vyšších nadmořských výšek během skladování významně nezměnila. Avšak v jejich studii představoval rozdíl v nadmořské výšce mezi dvěma lokalitami více než 500 metrů. Z našich výsledků dále vyplývá, že mnohem větší vliv než nadmořská výška by mohla mít teplota a srážky. Ve své práci sice Botton et al. (2008) uvádějí, že nedostatek vody významně neovlivnil expresi jimi pozorovaných alergenů v plodech odrůdy ‘Golden Delicious’, nicméně dále diskutují, že u dalších plodin, jako například u slunečnice, pšenice nebo cizrny, sucho stimuluje expresi dalších genů patřících do skupiny PR. Jak je patrné v grafu 13, v roce 2016, ale především v roce 2017, byla nejnižší hladina exprese genu *Mal d 1* naměřena u plodů získaných z lokality, u které byla nejvyšší hodnota průměrného ročního úhrnu srážek a zároveň nejnižší průměrná roční teplota. Na druhou stranu nejvyšší hladina exprese genu *Mal d 1* byla naměřena u plodů získaných z lokality, u které byla nejnižší hodnota průměrného ročního úhrnu srážek a zároveň nejvyšší průměrná roční teplota. Podobné závěry byly vyvozeny i v kapitole 5.1.1, kde byl hodnocen vliv ročníku na změnu genové exprese *Mal d 1*.

## 5.2 Vyhodnocení genové exprese všech 31 isoform alergenu *Mal d 1*

Analýzy byly provedeny u čtyř odrůd jablek a to ‘Idared’, ‘Rubín’, ‘Topaz’ a ‘Opal’, posledně jmenovaná odrůda byla hodnocena po skladování ve dvou různých podmínkách, u ostatních odrůd byly hodnoceny čerstvé plody. Data byla zpracována a vyhodnocena pomocí softwaru dodávaného výrobcem k sekvenátor Ion PGM (ThermoFisher Scientific).

U odrůdy ‘Idared’ byly nejvíce exprimovanými isoformami *Mal d 1.01* (66,5 % všech transkriptů), *Mal d 1.02* (25,7 % všech transkriptů) a *Mal d 1.06A+D* (3,7 % všech transkriptů). Expres těchto tří genů představovala téměř 96 % všech transkriptů *Mal d 1*. Další isoformy se vyskytovaly v rozmezí 0,01–0,5 % (tabulka 21).

Podobný expresní profil *Mal d 1* měla i odrůda ‘Rubín’, u které byly rovněž nejvíce exprimovanými geny *Mal d 1.01*: 71 % všech transkriptů; *Mal d 1.02*: 20,5 % všech transkriptů a *Mal d 1.06A+D*: 6,6 % všech transkriptů. Expresse těchto tří genů představovala víc než 98 % všech transkriptů *Mal d 1*. Další isoformy se vyskytovali v rozmezí 0,01–0,84 %. U isoform *Mal d 1.03A*, *Mal d 1.03B*, *Mal d 1.03H*, *Mal d 1.03J*, *Mal d 1.04*, *Mal d 1.09*, *Mal d 1.10*, *Mal d 1.12* a *Mal d 1.14* nebyla zaznamenána žádná exprese.

Odrůda ‘Topaz’ měla mírně odlišný expresní profil. U této odrůdy byla exprese genu *Mal d 1.01* nižší než u predešlých dvou odrůd, a to 41,9 % všech transkriptů. Naopak byla zaznamenána nejvyšší exprese genu *Mal d 1.06A+D* ze všech studovaných odrůd, a to 21,9 % všech transkriptů. Expresse genu *Mal d 1.02* tvořila 29,7 % všech transkriptů. Expresse těchto tří genů představovala 93,5 % všech transkriptů *Mal d 1*. Rovněž byla u odrůdy ‘Topaz’ zaznamenána vyšší exprese genů *Mal d 1.06B* a *Mal d 1.05* (tabulka 21). Další isoformy se vyskytovaly v rozmezí 0,02–0,52 %. U isoform *Mal d 1.03A*, *Mal d 1.03H*, *Mal d 1.04*, *Mal d 1.09*, *Mal d 1.10*, *Mal d 1.12* a *Mal d 1.14* nebyla zaznamenána žádná exprese.

Dominantní isoforma u skladované odrůdy ‘Opal’ byla rovněž *Mal d 1.01*. Expresse této isoformy představovala v podmínkách ULO 69,3 % všech transkriptů a v podmínkách chlazeného skladu 64,5 % všech transkriptů. Dalšími exprimovanými isoformami byly: *Mal d 1.02*, a to 9,5 % všech transkriptů v podmínkách ULO a 14,2 % všech transkriptů v podmínkách chlazeného skladu a isoforma *Mal d 1.06A+D*, a to 15,5 % všech transkriptů v podmínkách ULO a 9,2 % všech transkriptů v podmínkách chlazeného skladu. V obou podmínkách skladování byla zaznamenána vyšší exprese u isoform *Mal d 1.13A* a *Mal d 1.13C* (tabulka 21). Účinek typu skladování na změnu genové exprese je demonstrován v tabulce 22. Z tabulky je patrné, že pokles o téměř 5 procentních bodů v zastoupení isoformy *Mal d 1.01* v chlazeném skladu je kompenzován identickým nárůstem v zastoupení isoformy *Mal d 1.02*, takže celková přítomnost těchto dvou hlavních alergenů (cca 78 % exprese všech isoform) je beze změny v obou skladovacích podmínkách. Obdobná kompenzace je pozorovatelná mezi isoformami *Mal d 1.06A+D* (pokles zastoupení o 6,3 procentních bodů) a *Mal d 1.13A+C* (nárůst o 6,1 procentních bodů). V souhrnu představuje exprese těchto nejvíce exprimovaných isoform 95 % všech isoform v obou skladovacích podmínkách.

**Tabulka 21.** Genová exprese všech známých isoformů alergenu Mal d 1 stanovených pomocí systému Ion PGM™ v procentickém zastoupení. Modře jsou označeny isoformy, které dosahovaly hodnoty na 0,5 %.

Isoformy	Idared	Rubín	Topaz	Opal (ULO)	Opal (ch.sklad)
Mal d 1.01	66.38 %	71.06 %	41.91 %	69.28 %	64.50 %
Mal d 1.02	25.63 %	20.45 %	29.73 %	9.50 %	14.22 %
Mal d 1.03A	0.23 %	0.00 %	0.00 %	0.00 %	0.00 %
Mal d 1.03B	0.23 %	0.00 %	0.02 %	0.00 %	0.00 %
Mal d 1.03C	0.24 %	0.01 %	0.05 %	0.13 %	0.14 %
Mal d 1.03D	0.28 %	0.08 %	0.52 %	0.25 %	0.33 %
Mal d 1.03E	0.23 %	0.02 %	0.10 %	0.04 %	0.10 %
Mal d 1.03F	0.25 %	0.05 %	0.17 %	0.09 %	0.09 %
Mal d 1.03G	0.01 %	0.01 %	0.05 %	0.59 %	0.06 %
Mal d 1.03H	0.25 %	0.00 %	0.00 %	0.01 %	0.00 %
Mal d 1.03I	0.28 %	0.01 %	0.02 %	0.22 %	0.47 %
Mal d 1.03J	0.26 %	0.00 %	0.04 %	0.01 %	0.03 %
Mal d 1.03K	0.02 %	0.04 %	0.39 %	0.53 %	0.29 %
Mal d 1.04	0.01 %	0.00 %	0.00 %	0.01 %	0.01 %
Mal d 1.05	0.01 %	0.84 %	1.94 %	0.49 %	0.39 %
Mal d 1.06A+D *	3.72 %	6.61 %	21.87 %	15.50 %	9.19 %
Mal d 1.06B	0.10 %	0.19 %	1.78 %	0.39 %	0.67 %
Mal d 1.06C	0.01 %	0.01 %	0.12 %	0.04 %	0.03 %
Mal d 1.07	0.13 %	0.07 %	0.29 %	0.23 %	0.29 %
Mal d 1.08	0.28 %	0.01 %	0.05 %	0.00 %	0.00 %
Mal d 1.09	0.27 %	0.00 %	0.00 %	0.00 %	0.00 %
Mal d 1.10	0.14 %	0.00 %	0.00 %	0.00 %	0.00 %
Mal d 1.11A	0.29 %	0.04 %	0.09 %	0.03 %	0.03 %
Mal d 1.11B	0.17 %	0.03 %	0.10 %	0.01 %	0.01 %
Mal d 1.12	0.03 %	0.00 %	0.00 %	0.00 %	0.00 %
Mal d 1.13A	0.35 %	0.16 %	0.27 %	1.14 %	2.42 %
Mal d 1.13B	0.04 %	0.10 %	0.18 %	0.39 %	0.77 %
Mal d 1.13C	0.10 %	0.15 %	0.24 %	0.93 %	5.75 %
Mal d 1.13D	0.03 %	0.05 %	0.05 %	0.21 %	0.20 %
Mal d 1.14	0.01 %	0.00 %	0.00 %	0.00 %	0.00 %
<b>Celkem</b>	100 %	100 %	100 %	100%	100 %

\* Mal d 1.06A a Mal d 1.06D byly kvantifikovány společně, z důvodu identické sekvence v oblasti použité pro kvantifikaci NGS.

**Tabulka 22.** Změna v zastoupení jednotlivých isoform *Mal d 1* v odrůdě ‘Opal’ při skladování v chlazeném skladu vzhledem ke skladování v podmínkách ULO.

Mal d 1.01	- 4,8 procentních bodů
Mal d 1.02	+ 4,7 procentních bodů
Mal d 1.06A + D	- 6,3 procentních bodů
Mal d 1.13A + C	+ 6,1 procentních bodů

Z uvedených výsledků vyplývá, že nejvíce exprimované isoformy jsou *Mal d 1.01*, *Mal d 1.02* a *Mal d 1.06A* (v našem případě společně s isoformou *Mal d 1.06D*, protože bylo zjištěno, že primery, používané pro amplifikaci isoformy *Mal d 1.06A* jsou komplementární s isoformou *Mal d 1.06D* a může docházet k amplifikaci rovněž části této isoformy – popsáno níže), které dominují ve všech odrůdách a představují 88–98 % všech transkriptů genu *Mal d 1*. Tyto výsledky jsou v souladu s dalšími publikovanými výsledky, kde byla u těchto tří isoform zjištěna nejvyšší exprese ze všech (Gao et al. 2008; Pagliarani et al. 2013; Siekierzynska et al. 2021). Naproti tomu téměř žádná exprese nebyla pozorována u genů *Mal d 1.04*, *Mal d 1.10*, *Mal d 1.12* a *Mal d 1.14*. Pagliarani et al. (2013) rovněž ve své studii nepozorovali žádnou expresi u genů *Mal d 1.04*, *Mal d 1.10* a *Mal d 1.14*.

S ohledem na výsledky získané pomocí NGS sekvenování byly vybrány ty isoformy, které měly relativní expresi 0,5 % a vyšší: *Mal d 1.01*, *Mal d 1.02*, *Mal d 1.03D*, *Mal d 1.03G*, *Mal d 1.03K*, *Mal d 1.05*, *Mal d 1.06A*, *Mal d 1.06B*, *Mal d 1.06D*, *Mal d 1.13A*, *Mal d 1.13B* a *Mal d 1.13C* (tabulka 21). Na základě diskutovaných výsledků v práci Pagliarani et al. (2013) byla dodatečně k analýzám vybrána i isoforma *Mal d 1.07*. Relativní exprese těchto isoform byla následně měřena pomocí real-time PCR, a to na stejných čtyřech vzorcích, jaké byly použity pro NGS analýzu, a rovněž byly ověřeny na vzorcích čerstvě sklizených odrůd ‘Gala’ a ‘Opal’ (tabulka 23). Tyto dvě odrůdy byly následně využity k analýzám změny genové exprese vybraných isoform v rámci dlouhodobého skladování.



**Tabulka 23.** Výsledné hodnoty relativní exprese (měřeno v jednotkách A.U.) isoformem, vybraných na základě výsledků NGS sekvenování, která byla měřena pomocí real-time PCR.

Isoforma	Topaz	Rubín	Opal (ULO)	Opal (ch. sklad)	Opal	Gala
Mal d 1.01	56,637	115,639	410,148	273,366	24,827	125,662
Mal d 1.02	243,879	172,646	274,192	381,032	106,895	161,272
Mal d 1.03D	0,438	0,159	1,625	3,350	2,720	3,443
Mal d 1.03G	NA	NA	NA	NA	0,489	0,237
Mal d 1.03K	0,042	0,002	0,022	0,018	NA	NA
Mal d 1.05	Neamplifikuje se				NA	NA
Mal d 1.06A	12,911	8,516	73,182	53,360	49,413	51,393
Mal d 1.06B	3,454	0,575	2,179	4,460	16,077	4,779
Mal d 1.06D	0,004	0,004	4,470	11,289	0,311	0,184
Mal d 1.07	NA	NA	NA	NA	7,534	3,395
Mal d 1.13A	0,330	0,258	3,265	5,594	3,935	2,204
Mal d 1.13B	Neamplifikuje se				NA	NA
Mal d 1.13C	0,001	0,003	0,017	0,110	NA	NA

Na základě výsledků relativní kvantifikace z real-time PCR byly z analýz vyřazeny ty isoformy, u kterých nedocházelo k amplifikaci, nebo byl výsledek relativní kvantifikace velmi nízký (tabulka 23). Pro nízkou expresi byly vyřazeny isoformy *Mal d 1.03K* a *Mal d 1.13C*. U isoformem *Mal d 1.05* a *Mal d 1.13B* nebyl fragment amplifikován. Nejvyšších hodnot v relativní kvantifikaci genové exprese dosáhly podle očekávání isoformy *Mal d 1.01*, *Mal d 1.02* a *Mal d 1.06A*, jejichž hodnoty se pohybovaly v řádu desítek až stovek vzhledem k aktinu. Isoformy *Mal d 1.03D*, *Mal d 1.03G*, *Mal d 1.06B*, *Mal d 1.06D*, *Mal d 1.07*, *Mal d 1.13A* se pohybovaly v řádu desetín až jednotek. Specifita jednotlivých isoformem byla potvrzena jednak analýzou křivek tání (příloha 3) a rovněž sekvenováním ampliconů vybraných isoformem genu *Mal d 1*, kdy získané sekvence byly ověřeny srovnávací analýzou se sekvencemi v databázi GeneBank (příloha 4). U ampliconů isoformem *Mal d 1.01*, *Mal d 1.02*, *Mal d 1.03D*, *Mal d 1.03G*, *Mal d 1.06A*, *Mal d 1.06B* a *Mal d 1.07* sekvenční analýza potvrdila, že se jedná o alely publikované pod stejnými názvy podle Pagliarani et al. (2013). U ampliconů *Mal d 1.06D* a *Mal d 1.13A* bylo srovnávací analýzou potvrzeno, že se skutečně jedná o úseky jablečného genu *Mal d 1*, ale v databázi NCBI nejsou tyto sekvence blíže popsány názvy alel podle Pagliariniho. a kol. (2013). Pomocí softwaru Geneious Prime byl sestaven alignment sekvencí vybraných isoformem získaných jednak sekvenováním a jednak z databáze GeneBank. Na základě tohoto alignmentu bylo zjištěno, že primery, používané pro amplifikaci isoformy *Mal d 1.06A* převzaté z Pagliarani et al. (2013) jsou komplementární s isoformou *Mal d 1.06D* a může

docházet k amplifikaci rovněž části této isoformy. Proto byly pro další analýzy navrženy primery nové, specifické pouze pro isoformu *Mal d 1.06A*. pro ostatní isoformy byly ponechány primery původní navrženy podle Pagliarani et al. (2013).

### **5.2.1 Vyhodnocení změny genové exprese u vybraných isoformem alergenu Mal d 1 v průběhu dlouhodobého skladování**

Kvantifikace relativní exprese genu *Mal d 1* byla provedena pro isoformy *Mal d 1.01*, *Mal d 1.02*, *Mal d 1.03D*, *Mal d 1.03G*, *Mal d 1.06A*, *Mal d 1.06B*, *Mal d 1.06D* a *Mal d. 1.13A* a to u dvou vybraných odrůd ‘Gala’ a ‘Opal’.

#### **Odrůda ‘Gala’:**

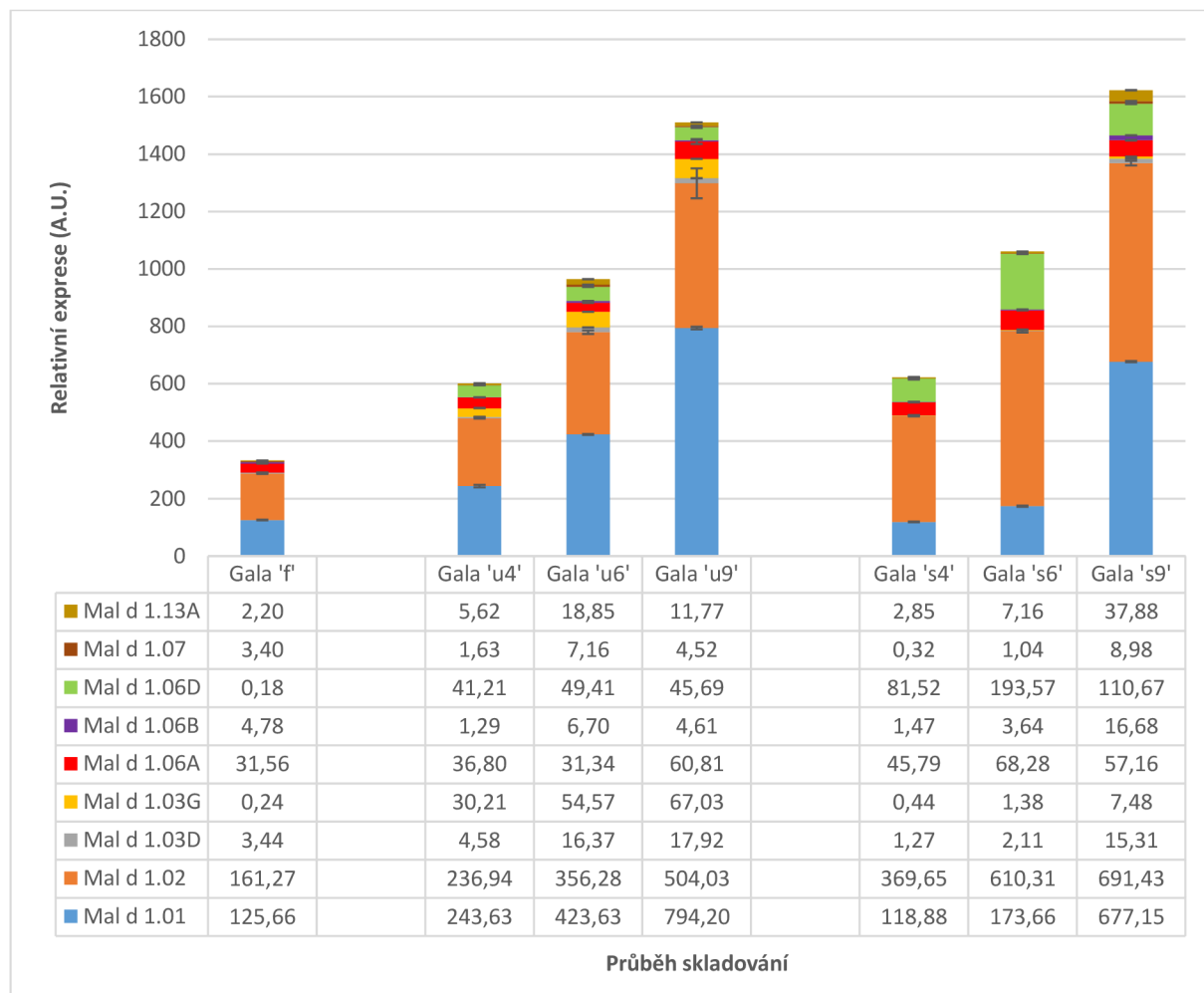
Celková relativní exprese genu *Mal d 1* se během skladování měnila, postupně se zvyšovala a byla vyšší u plodů skladovaných v chlazeném skladu než u plodů skladovaných v podmínkách ULO (graf 14).

V čerstvých plodech byla nejvyšší genová exprese pozorována u isoformem *Mal d 1.02*, *Mal d 1.01* a *Mal d 1.06A*. Tyto tři isoformy představovaly dohromady téměř 96 % celkové exprese genu *Mal d 1* (graf 15). Relativní exprese ostatních isoformem v čerstvých plodech odrůdy ‘Gala’ byla velmi nízká (graf 14 a graf 15).

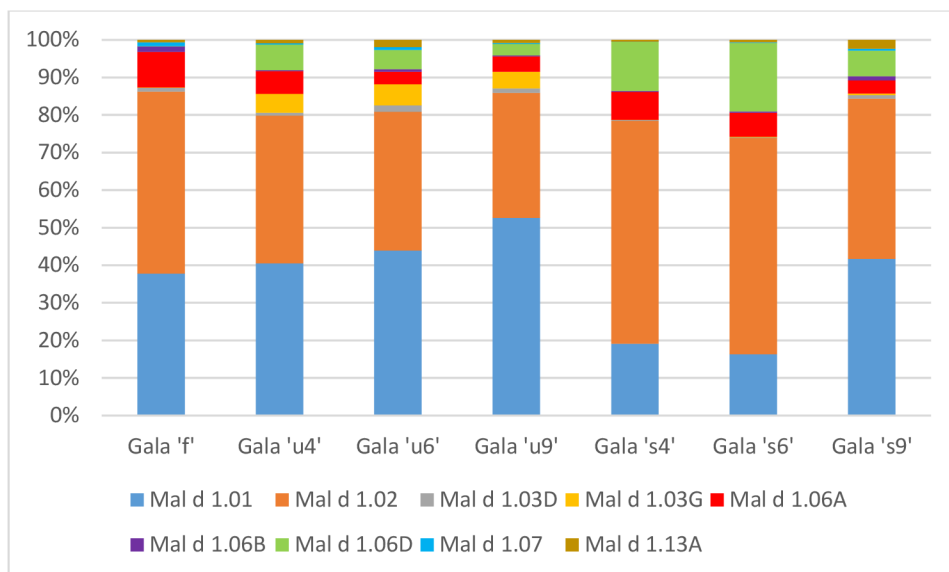
V plodech skladovaných v podmínkách ULO byla nejvíce exprimována isoforma *Mal d 1.01*, následovala isoforma *Mal d 1.02*. Exprese isoformy *Mal d 1.06A* se za podmínek ULO výrazně neměnila, po 9 měsících skladování lze pozorovat mírný nárůst, ale procentuální zastoupení této isoformy na celkové expresi má tendenci klesat. Během skladování v podmínkách ULO došlo k výraznému zvýšení genové exprese isoformem *Mal d 1.03G* a *Mal d 1.06D* (graf 14 a graf 15).

V plodech skladovaných v chlazeném skladu byla nejvíce exprimována isoforma *Mal d 1.02*. Další v pořadí byla isoforma *Mal d 1.01*, i když exprese této isoformy se během prvních šesti měsíců skladování příliš nezměnila (graf 14). Procentuální zastoupení této isoformy na celkové expresi klesá v prvních šesti měsících a následně se výrazněji zvýšilo až po devíti měsících skladování (graf 15). U isoformy *Mal d 1.06A* lze pozorovat mírný nárůst exprese (graf 14), ale podobně jako u skladování v podmínkách ULO tak i v chlazeném skladu mělo

procentuální zastoupení této isoformy na celkové expresi tendenci klesat (graf 15). V plodech skladovaných v chlazeném skladu bylo pozorováno výrazné zvýšení exprese *isoformy Mal d 1.06D*, která po šesti měsících skladování dosáhla vyšších hodnot relativní exprese než isoforma *Mal d 1.01* (graf 14).

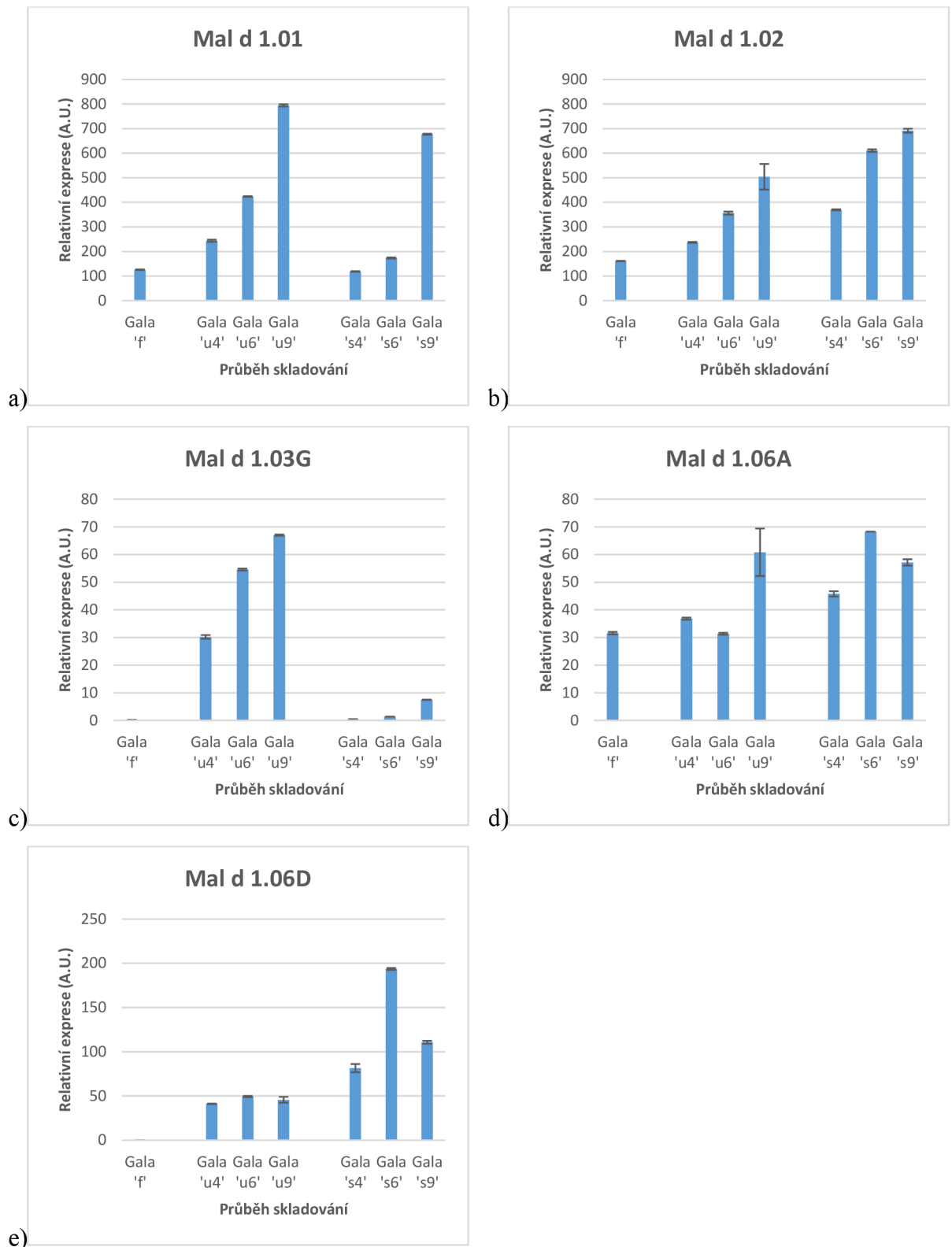


**Graf 14.** Zastoupení jednotlivých isoform na celkové genové expresi alergenu Mal d 1 u odrůdy 'Gala'. Graf ukazuje změnu genové exprese jednotlivých isoform při skladování v kontrolované atmosféře ULO ('u4' - 'u9') a v chlazeném skladu ('s4' - 's9') oproti čerstvým plodům ('f').



**Graf 15.** Výsledky relativní genové exprese pro všechny studované isoformy genu *Mal d 1* pro odrůdu ‘Gala’ vyjádřené v procentech. % označuje zastoupení specifické isoformy při daném měření na celkové expresi genu *Mal d 1*. Vysvětlivky k tabulce: ‘Gala’ ‘f’ – relativní exprese měřená v čerstvých plodech; ‘Gala’ ‘u4’ – relativní exprese měřená v plodech po čtyřech měsících skladování v podmínkách ULO; ‘Gala’ ‘u6’ – relativní exprese měřená v plodech po šesti měsících skladování v podmínkách ULO; ‘Gala’ ‘u9’ – relativní exprese měřená v plodech po devíti měsících skladování v podmínkách ULO; ‘Gala’ ‘s4’ – relativní exprese měřená v plodech po čtyřech měsících skladování v chlazeném skladu; ‘Gala’ ‘s6’ – relativní exprese měřená v plodech po šesti měsících skladování v chlazeném skladu; ‘Gala’ ‘s9’ – relativní exprese měřená v plodech po devíti měsících skladování v chlazeném skladu.

Pro zpřehlednění relativní míry exprese nejvíce exprimovaných isoform genů *Mal d 1* byly vytvořeny grafy ukazující nárůst jednotlivých isoform v průběhu skladování odrůdy ‘Gala’ (grafy 16 a-e).



**Graf 16.** Expresní profily vybraných isoform genů *Mal d 1* u odrůdy ‘Gala’. a) Změna genové exprese isoformy *Mal d 1.01* během skladování v chlazeném skladu ('s4' - 's9') a v řízené atmosféře ULO ('u4' - 'u9') ve srovnání s čerstvými plody ('f'); b) zvýšení genové exprese isoformy *Mal d 1.02* během skladování v chlazeném skladu ('s4' - 's9') a v řízené atmosféře

ULO ('u4' - 'u9') ve srovnání s čerstvými plody ('f '); c) zvýšení genové exprese isoformy *Mal d 1.03G* během skladování v chlazeném skladu ('s4' - 's9') a v řízené atmosféře ULO ('u4' - 'u9') ve srovnání s čerstvými plody ('f '); d) změna genové exprese isoformy *Mal d 1.06A* během skladování v chlazeném skladu ('s4' - 's9') a v řízené atmosféře ULO ('u4' - 'u9') ve srovnání s čerstvými plody ('f '); e) zvýšení genové exprese isoformy *Mal d 1.06D* během skladování v chlazeném skladu ('s4' - 's9') a v řízené atmosféře ULO ('u4' - 'u9') ve srovnání s čerstvými plody ('f ').

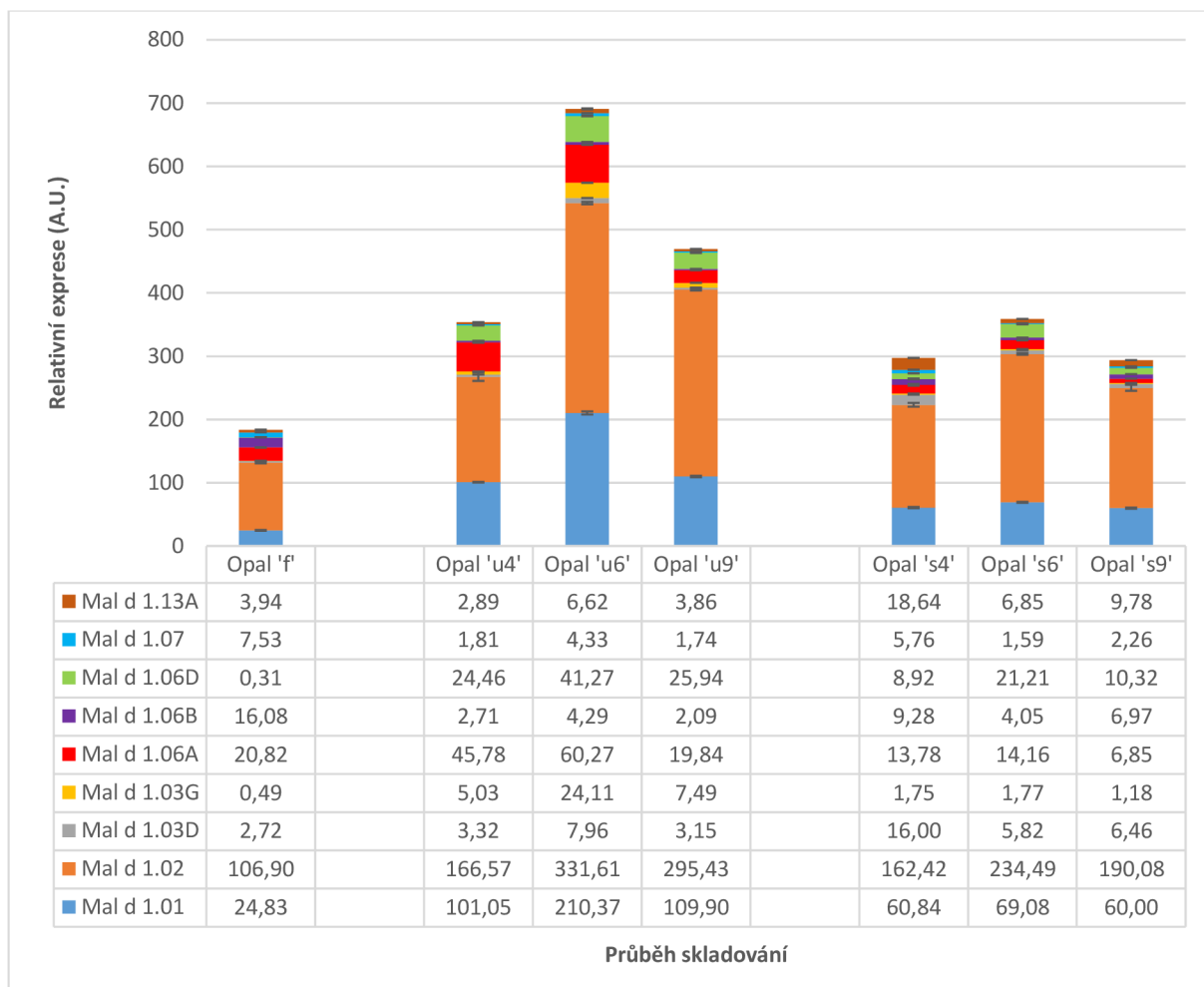
### **Odrůda 'Opal':**

U odrůdy 'Opal' bylo pozorováno zvyšování relativní genové exprese během skladování, avšak tento nárůst nebyl postupný, ale během skladování se měnil a nejvyšších hodnot bylo dosaženo po šesti měsících skladování (graf 17). U odrůdy 'Opal' byla vyšší exprese pozorována při skladování v podmínkách ULO než při skladování v chlazeném skladu.

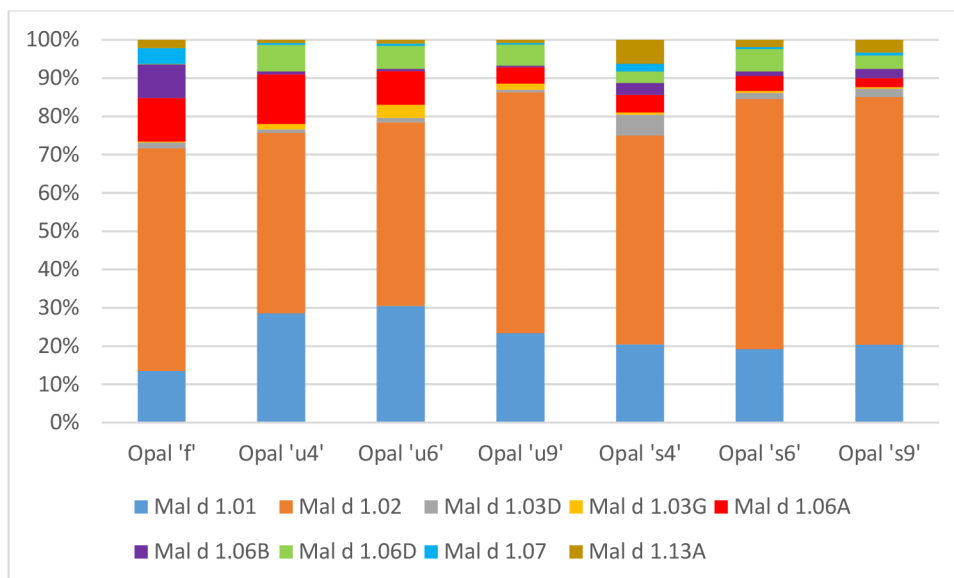
V čerstvých plodech měla nejvyšší expresi isoforma *Mal d 1.02*, následovaly isoformy *Mal d 1.01*, *Mal d 1.06A* a *Mal d 1.06B*. Společně tyto čtyři isoformy představovaly téměř 92 % celkové relativní genové exprese alergenu *Mal d 1* (graf 18). Celkově byla relativní genová exprese u odrůdy 'Opal' nižší než u odrůdy 'Gala'.

V plodech skladovaných v podmínkách ULO byla nejvíce exprimována isoforma *Mal d 1.02*, dále následovaly isoformy *Mal d 1.01* a *Mal d 1.06A*. Genová exprese isoformy *Mal d 1.06B* byla nižší ve srovnání s expresí v čerstvých plodech. Během skladování v podmínkách ULO se výrazně zvýšila genová exprese isoformou *Mal d 1.03G* a *Mal d 1.06D* (graf 17).

V plodech skladovaných v chlazeném skladu byla nejvíce exprimována isoforma *Mal d 1.02* a po ní následovala isoforma *Mal d 1.01*. Během skladování v chlazeném skladu se výrazně zvýšila genová exprese isoformy *Mal d 1.06D*. U ostatních isoformou nedošlo k žádnému zřetelnému zvýšení exprese během celého skladování ve srovnání s expresí v čerstvých plodech. Snížení exprese nastalo u isoformy *Mal d 1.06A*, a to jak z hlediska relativní exprese, tak z hlediska procentuálního zastoupení na celkové expresi genu *Mal d 1* (graf 17 a graf 18).



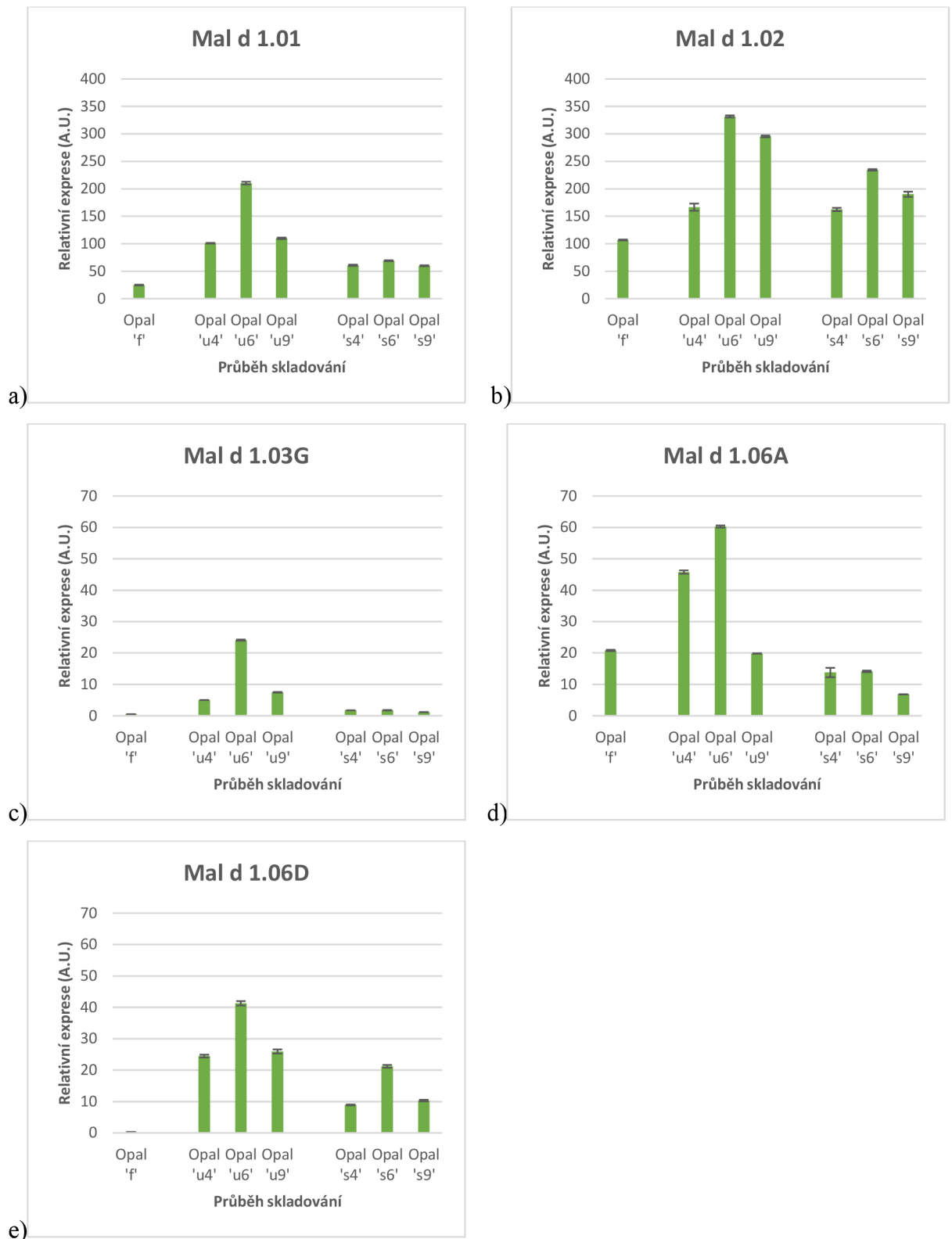
**Graf 17.** Zastoupení jednotlivých isoformů na celkové genové expresi alergenu Mal d 1 u odrůdy 'Opal'. Graf ukazuje změnu genové exprese jednotlivých isoformů při skladování v podmínkách ULO ('u4' - 'u9') a v chlazeném skladu ('s4' - 's9') oproti čerstvým plodům ('f').



**Graf 18.** Výsledky relativní genové exprese pro všechny studované isoformy genu *Mal d 1* pro odrůdu 'Opal' vyjádřené v procentech. % označuje zastoupení specifické isoformy při daném měření na celkové expresi genu *Mal d 1*. Vysvětlivky k tabulce: 'Opal' 'f' – relativní exprese měřená v čerstvých plodech; 'Opal' 'u4' – relativní exprese měřená v plodech po čtyřech měsících skladování v podmínkách ULO; 'Opal' 'u6' – relativní exprese měřená v plodech po šesti měsících skladování v podmínkách ULO; 'Opal' 'u9' – relativní exprese měřená v plodech po devíti měsících skladování v podmínkách ULO; 'Opal' 's4' – relativní exprese měřená v plodech po čtyřech měsících skladování v chlazeném skladu; 'Opal' 's6' – relativní exprese měřená v plodech po šesti měsících skladování v chlazeném skladu; 'Opal' 's9' – relativní exprese měřená v plodech po devíti měsících skladování v chlazeném skladu.

Pro zpřehlednění relativní míry exprese nejvíce exprimovaných isoform genů *Mal d 1* byly vytvořeny grafy ukazující nárůst jednotlivých isoform v průběhu skladování odrůdy 'Opal' (grafy 19 a-e).





**Graf 19.** Expresní profily vybraných isoform genů *Mal d 1* u odrůdy 'Opal'. a) Změna genové exprese isoformy *Mal d 1.01* během skladování v chlazeném skladu ('s4' - 's9') a v řízené atmosféře ULO ('u4' - 'u9') ve srovnání s čerstvými plody ('f'); b) zvýšení genové exprese isoformy *Mal d 1.02* během skladování v chlazeném skladu ('s4' - 's9') a v řízené atmosféře

ULO ('u4' - 'u9') ve srovnání s čerstvými plody ('f '); c) zvýšení genové exprese isoformy *Mal d 1.03G* během skladování v chlazeném skladu ('s4' - 's9') a v řízené atmosféře ULO ('u4' - 'u9') ve srovnání s čerstvými plody ('f '); d) změna genové exprese isoformy *Mal d 1.06A* během skladování v chlazeném skladu ('s4' - 's9') a v řízené atmosféře ULO ('u4' - 'u9') ve srovnání s čerstvými plody ('f '); e) zvýšení genové exprese isoformy *Mal d 1.06D* během skladování v chlazeném skladu ('s4' - 's9') a v řízené atmosféře ULO ('u4' - 'u9') ve srovnání s čerstvými plody ('f ').

Výše popsané výsledky potvrzuje i statistická analýza, kdy statisticky významné rozdíly byly pozorovány ve změně exprese vybraných isoform mezi čerstvými a skladovanými vzorky plodů a to u obou studovaných odrůd (tabulka 24). Statisticky významné rozdíly byly pozorovány rovněž mezi jednotlivými isoformami. Vzhledem k malému souboru dat, byly tyto rozdíly vyhodnoceny pro obě odrůdy samostatně, a také samostatně pro čerstvé plody a pro plody skladované jak v chlazeném skladu, tak v podmínkách ULO (tabulka 25).

**Tabulka 24.** Statistická analýza rozdílů míry genové exprese vybraných isoform genu *Mal d 1* mezi čerstvými plody a plody skladovanými v chlazeném skladu a v podmínkách ULO u odrůd 'Gala' a 'Opal'. V tabulce jsou zaznamenány hodnoty p. Nulová hypotéza byla testována na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ ; červeně jsou označeny statisticky významné rozdíly ( $p < 0,05$ ).

	Gala			Opal		
	čerstvé versus ch. sklad	čerstvé versus ULO	ch. sklad versus ULO	čerstvé versus ch. sklad	čerstvé versus ULO	ch. sklad versus ULO
Mal d 1.01	0,3935	0,0229	0,2348	0,6483	0,0017	0,0031
Mal d 1.02	0,0114	0,3559	0,124	0,0187	<0,0001	0,0089
Mal d 1.03D	>0,9999	>0,9999	>0,9999	0,3016	>0,9999	0,3295
Mal d 1.03G	>0,9999	<0,0001	<0,0001	>0,9999	0,0136	0,0009
Mal d 1.06A	0,1103	>0,9999	0,1207	0,0737	<0,0001	<0,0001
Mal d 1.06B	>0,9999	>0,9999	>0,9999	0,0697	0,0049	0,5837
Mal d 1.06D	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0044	<0,0001	<0,0001
Mal d 1.07	>0,9999	>0,9999	>0,9999	0,8618	0,6845	>0,9999
Mal d 1.13A	0,5205	0,9831	>0,9999	0,1678	>0,9999	0,0362

**Tabulka 25.** Statistická analýza rozdílů v genové expresi mezi jednotlivými isoformami u odrůd ‘Gala’ a ‘Opal’: a) hodnocení čerstvých plodů; b) hodnocení plodů skladovaných v podmínkách ULO; c) hodnocení plodů skladovaných v chlazeném skladu. Nulová hypotéza byla testována na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ ; přičemž ns –  $p > 0,05$ ; \* –  $p \leq 0,05$ ; \*\* –  $p \leq 0,01$ ; \*\*\* –  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\* –  $p \leq 0,0001$ .

a)

Gala čerstvé	Mal d 1.01																					
	Mal d 1.02	ns																				
	Mal d 1.03D	*	*																			
	Mal d 1.03G	***	***	ns																		
	Mal d 1.06A	ns	ns	ns	**																	
	Mal d 1.06B	ns	ns	ns	ns	ns																
	Mal d 1.06D	***	****	ns	ns	**	*															
	Mal d 1.07	*	*	ns	ns	ns	ns	ns														
	Mal d 1.13A	**	**	ns	ns	*	ns	ns	ns													
Opal čerstvé	Mal d 1.01	ns	ns	ns	**	ns	ns	**	ns	*												
	Mal d 1.02	ns	ns	ns	**	ns	ns	***	ns	*	ns											
	Mal d 1.03D	*	**	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*										
	Mal d 1.03G	**	**	ns	ns	*	ns	ns	ns	ns	*	**	ns									
	Mal d 1.06A	ns	ns	ns	**	ns	ns	**	ns	ns	ns	ns	ns	*								
	Mal d 1.06B	ns	ns	ns	*	ns	ns	**	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns							
	Mal d 1.06D	**	***	ns	ns	*	ns	ns	ns	ns	**	**	ns	ns	*	*						
	Mal d 1.07	ns	ns	ns	*	ns	ns	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns			
	Mal d 1.13A	*	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns		
	Mal d 1.01	Mal d 1.02	Mal d 1.03D	Mal d 1.03G	Mal d 1.06A	Mal d 1.06B	Mal d 1.06D	Mal d 1.07	Mal d 1.13A	Mal d 1.01	Mal d 1.02	Mal d 1.03D	Mal d 1.03G	Mal d 1.06A	Mal d 1.06B	Mal d 1.06D	Mal d 1.07	Mal d 1.13A				
	Gala čerstvé									Opal čerstvé												

b)

Gala ULO	Mal d 1.01																			
	Mal d 1.02	ns																		
	Mal d 1.03D	****	****																	
	Mal d 1.03G	ns	ns	*																
	Mal d 1.06A	*	*	ns	ns															
	Mal d 1.06B	****	****	ns	***	**														
	Mal d 1.06D	*	ns	*	ns	ns	***													
	Mal d 1.07	****	****	ns	***	**	ns	***												
	Mal d 1.13A	****	***	ns	*	ns	ns	ns	ns											
Opal ULO	Mal d 1.01	ns	ns	**	ns	ns	****	ns	****	**										
	Mal d 1.02	ns	ns	***	ns	ns	****	ns	****	***	ns									
	Mal d 1.03D	****	****	ns	***	**	ns	*	ns	ns	****	****								
	Mal d 1.03G	****	***	ns	*	ns	ns	ns	ns	ns	**	***	ns							
	Mal d 1.06A	*	*	ns	ns	ns	**	ns	**	ns	ns	ns	**	ns						
	Mal d 1.06B	****	****	ns	****	***	ns	***	ns	ns	****	****	ns	ns	***					
	Mal d 1.06D	**	*	ns	ns	ns	**	ns	**	ns	ns	*	*	ns	ns	**				
	Mal d 1.07	****	****	*	****	***	ns	****	ns	*	****	****	ns	*	***	ns	***			
	Mal d 1.13A	****	****	ns	***	**	ns	*	ns	ns	****	****	ns	ns	**	ns	**	ns		
	Mal d 1.01	Mal d 1.02	Mal d 1.03D	Mal d 1.03G	Mal d 1.06A	Mal d 1.06B	Mal d 1.06D	Mal d 1.07	Mal d 1.13A	Mal d 1.01	Mal d 1.02	Mal d 1.03D	Mal d 1.03G	Mal d 1.06A	Mal d 1.06B	Mal d 1.06D	Mal d 1.07	Mal d 1.13A		
	Gala ULO									Opa ULO										

c)

Gala ch. sklad	Mal d 1.01																				
	Mal d 1.02	ns																			
	Mal d 1.03D	****	****																		
	Mal d 1.03G	****	****	ns																	
	Mal d 1.06A	ns	ns	**	***																
	Mal d 1.06B	****	****	ns	ns	**															
	Mal d 1.06D	ns	ns	****	****	ns	***														
	Mal d 1.07	****	****	ns	ns	***	ns	****													
	Mal d 1.13A	***	***	ns	ns	ns	ns	**	ns												
Opal ch. sklad	Mal d 1.01	ns	ns	***	****	ns	**	ns	****	*											
	Mal d 1.02	ns	ns	****	****	ns	****	ns	****	**	ns										
	Mal d 1.03D	***	****	ns	ns	*	ns	**	ns	ns	*	***									
	Mal d 1.03G	****	****	ns	ns	****	ns	****	ns	*	****	****	*								
	Mal d 1.06A	**	***	ns	*	ns	ns	*	*	ns	ns	**	ns	*							
	Mal d 1.06B	***	****	ns	ns	*	ns	****	ns	ns	**	***	ns	ns	ns						
	Mal d 1.06D	*	**	ns	**	ns	ns	*	**	ns	ns	*	ns	**	ns	ns					
	Mal d 1.07	****	****	ns	ns	***	ns	****	ns	ns	****	****	ns	ns	ns	ns	ns	*			
	Mal d 1.13A	**	***	ns	*	ns	ns	*	*	ns	ns	**	ns	**	ns	ns	ns	ns	*		
	Mal d 1.01	Mal d 1.02	Mal d 1.03D	Mal d 1.03G	Mal d 1.06A	Mal d 1.06B	Mal d 1.06D	Mal d 1.07	Mal d 1.13A	Mal d 1.01	Mal d 1.02	Mal d 1.03D	Mal d 1.03G	Mal d 1.06A	Mal d 1.06B	Mal d 1.06D	Mal d 1.07	Mal d 1.13A			
	Gala ch. sklad									Opal ch. sklad											

V několika pracích bylo potvrzeno, že se obsah alergenu Mal d 1 během skladování zvyšuje (Botton et al. 2008; Shi et al. 2014; Matthes a Schmitz-Eiberger 2009; Sancho et al. 2006a; Siekierzynska et al. 2021), což také odpovídá výsledkům popsáním v této disertační práci. Z hlediska relativní genové exprese byla u odrůdy ‘Opal’ celková exprese genu *Mal d 1* nižší než u odrůdy ‘Gala’ a to jak v čerstvých plodech, tak během skladování. U obou odrůd se celková relativní genová exprese alergenu Mal d 1 během skladování zvýšila, ale u odrůdy ‘Opal’, na rozdíl od odrůdy ‘Gala’ nebyl tento nárůst postupný, ale během skladování se měnil a nejvyšších hodnot dosáhl po 6 měsících skladování. Byly pozorovány rozdíly mezi skladováním v chlazeném skladu a skladováním v podmínkách ULO. Zatímco relativní genová exprese genu *Mal d 1* u odrůdy ‘Gala’ vzrostla více v chlazeném skladu než v podmínkách ULO, opak byl pravdou pro odrůdu ‘Opal’. Bolhaar et al. (2005a) zjistili, že u pěti sledovaných odrůd, včetně odrůdy ‘Gala’ nebo ‘Golden Delicious’, byl obsah alergenu Mal d 1 nižší v plodech skladovaných v řízené atmosféře ULO než v plodech skladovaných v chlazeném skladu. Ve studii Kiewning et al. (2013) byl výsledek opačný, a sice že u šesti sledovaných odrůd, mezi kterými byly i ‘Gala’ a ‘Golden Delicious’, byl u většiny obsah alergenu Mal d 1 nižší v plodech skladovaných v chlazeném skladu. Lze předpokládat, že tyto změny exprese alergenu Mal d 1 během skladování v různých podmínkách jsou zřejmě odrůdově závislé. Jak se však ukázalo v předchozích studiích (Bolhaar et al. 2005a; Sancho et al. 2006a; Kiewning et al. 2013) a také na základě výše uvedených výsledků, nelze jednoznačně určit, jaký typ skladování má větší vliv na expresi alergenu Mal d 1. Je třeba vzít v úvahu také to, že jablečný alergen Mal d 1 patří do skupiny PR proteinů (tedy proteinů souvisejících s patogenezi), které se v rostlinách aktivují v reakci na různé typy stresu (Fernandes et al. 2013). Je tedy možné, že změna exprese alergenu není způsobena pouze samotným skladováním jablek, ale také vystavením jiným druhům stresu jako například chlad, nedostatek kyslíku v případě podmínek ULO a podobně. Veškerý tento stres spolu s procesy probíhajícími během dozrávání plodů při skladování by mohl mít vliv na růst exprese některých isoformů alergenu Mal d 1, a tím i na zvýšení alergenicity skladovaného ovoce. Obě odrůdy ‘Gala’ a ‘Opal’ jsou vhodné pro dlouhodobé skladování. ‘Opal’ je známý tím, že velmi dobře snáší skladování i bez použití speciálních podmínek a dlouhodobě si uchovává dobré kvalitativní vlastnosti. Podle našich výsledků se zdá, že z hlediska zvýšení úrovně genové exprese alergenu Mal d 1 je vhodnější skladovat ‘Opal’ v chlazeném skladu než v podmínkách ULO. Odrůdy jako ‘Gala’, které jsou dodávány do obchodních řetězců a spotřebitelům jsou dostupné prakticky po celý rok, jsou většinou skladovány v podmínkách ULO, aby si zachovaly své dobré plodové vlastnosti. Na

základě našich pozorování se tato varianta skladování pro tuto odrůdu jeví jako vhodná i z hlediska pomalejšího zvyšování hladiny genové exprese alergenu Mal d 1.

Co se týče jednotlivých isoform, nejvyšší genovou expresi v čerstvých plodech u obou odrůd měla isoforma *Mal d 1.02* a následně isoformy *Mal d 1.01* a *Mal d 1.06A*, které dohromady tvořily 83 až 96 % celkové genové exprese Mal d 1 alergenu. Tyto isoformy jsou obecně považovány za nejvíce exprimované (Beuning et al. 2004; Botton et al. 2008; Gao et al. 2008; Pagliarani et al. 2013; Siekierzynska et al. 2021). Isoformy *Mal d 1.01* a *Mal d 1.02* zůstaly nejvíce exprimovány i během skladování, přičemž exprese isoformy *Mal d 1.01* rostla více v podmínkách ULO než v chlazeném skladu a u odrůdy ‘Gala’ dokonce dosáhla vyšší hodnoty relativní genové exprese než isoforma *Mal d 1.02*. Skladování má vliv rovněž na další isoformy. Během skladování se u obou odrůd statisticky významně zvýšila genová exprese isoformy *Mal d 1.06D*. U odrůdy ‘Gala’ po šesti měsících skladování v chlazeném skladu měla tato isoforma vyšší expresi než isoforma *Mal d 1.01*. Při skladování jablek v podmínkách ULO se také u obou odrůd statisticky významně zvýšila exprese isoformy *Mal d 1.03G*. Je tedy možné, že tyto isoformy mají souvislost se zvýšením alergenicity jablek během skladování.

### 5.3 Shrnutí výsledků pro praxi

V moderním světě stoupá výskyt alergií, mezi které patří i alergie na jablka. I když tato alergie nepatří mezi nejrozšířenější, má vliv na lidské zdraví a může mít u senzitivních jedinců za následek ukončení spotřeby tohoto ovoce, a tím i snížení přísunu zdraví prospěšných látek přirozeně se vyskytujících v čerstvých jablkách. V současnosti je na trhu jen minimální nabídka odrůd, které jsou deklarovány jako hypoalergenní. Avšak složitost biochemické podstaty alergenů u jablek a rovněž množství různých isoform jednotlivých alergenů brzdí objasnění alergenicity jablek, což podstatně ztěžuje zahájení šlechtitelského programu zaměřeného na hypoalergenní odrůdy. Šlechtění jabloní s hypoalergenními plody vyžaduje identifikaci genotypů s nízkým obsahem alergenů, jejichž exprese je stabilní v průběhu několikaletého pěstování a není ovlivněna změnami prostředí (Romer et al. 2020). Tento úkol je však velmi náročný už jen z toho hlediska, že alergen Mal d 1 patří do skupiny PR-10 proteinů. Přes četné studie zůstává funkce PR-10 proteinů v jabloních jen velmi málo objasněna. Tyto proteiny jsou exprimovány jako odezva rostliny na biotické a abiotické stresy, proto se předpokládá se, že mají ochrannou roli. Nicméně někteří členové PR-10 jsou exprimováni konstitutivně, což svědčí o jejich obecnější biologické roli v životě rostlin

(Fernandes et al. 2013). PR-10 proteiny jsou kódovány multigenovými rodinami, což je pravděpodobně základem multifunkčního aspektu těchto proteinů (Fernandes et al. 2013). Dopad příslušnosti alergenu Mal d 1 do rodiny PR proteinů byl pozorován i v této disertační práci, kdy nejnižší exprese genu *Mal d 1* měla souvislost s vyššími srážkami a naopak, z čehož vyplývá, že nedostatek vody může působit jako stresový faktor, který má vliv na zvýšení genové exprese. Rovněž systém produkce může ovlivňovat genovou expresi – v ekologické produkci mohou jako biotický stres působit patogeny, jako jsou houby, viry, bakterie či hmyzí škůdci, naopak v integrované produkci mohou jako abiotický stres působit fungicidy a pesticidy.

Znalost genové exprese je jen jeden ze základních poznatků ohledně alergenicity jablek a není možné pouze na základě tohoto poznatku určit hypoalergenní odrůdy. V kaskádě centrálního dogmatu molekulární biologie může po transkripci genu do RNA docházet k dalším posttranskripčním úpravám ovlivňujícím následující krok syntézy bílkovin podle tohoto templátu. Kromě translace exprimovaného genu do bílkoviny může být různě ovlivněna i stabilita výsledného proteinového produktu. To vše má vliv na výsledné množství alergenu v konzumovaném plodu. Z toho důvodu by bylo vhodné na tuto práci navázat i studiem alergenu Mal d 1 na úrovni bílkovin a závěrečným krokem v studiu hypoalergenních jablek by měly být testy přímo na pacientech s alergií. Tato práce je každopádně svým rozsahem analýz vhodným odrazovým můstkem pro tyto navazující studie.

V souhrnu výsledky této disertační práce naznačují, že na expresi alergenů Mal d 1 má vliv nejen genetické pozadí jednotlivých odrůd, které však bude zřejmě hrát podstatnou roli, ale důležité je vyvarovat se i stresových faktorů, které mohou zvyšovat expresi těchto alergenů. A to jak během pěstování (např. zavlažování během období sucha, výběr lokality pro založení sadu), tak během skladování, i když komerčně využívané skladovací podmínky jsou především nastaveny pro uchování co nejlepší kvality plodů po co nejdelší dobu. Z výsledků dlouhodobého skladování rovněž vyplývá, že způsob skladování podřízený hypoalergenicitě jablek je třeba vybrat jednotlivým odrůdám na míru. Z komerčního hlediska je samozřejmě téměř nereálné skladovat každou odrůdu rozdílně. V případě producentů zaměřených na hypoalergenní jablka by byly informace jak skladovat jednotlivé odrůdy tak, aby u nich nedocházelo k přílišnému nárůstu exprese alergenu Mal d 1, stěžejní. Přínosem této práce je i fakt, že poukázala na důležitost závlahy v sadech při nedostatku srážek v případě extrémně suchých let. Pěstitele hypoalergenních odrůd by proto měli dbát na to, aby udělali všechno pro zamezení možnému zvyšování hladiny alergenu v pěstovaných plodech, a tím umožnili jejich bezproblémovou konzumaci lidem s mírnou formou alergie.



## 5.4 Publikované výsledky

Výsledky této práce byly publikovány v odborných člancích, které jsou uvedeny níže, a zpracovány do certifikované metodiky pro stanovení jablečných alergenů v plodech.

### Impaktovaný článek:

Žďárská I, Čmejla R. 2023. Effect of long-term storage on the change in the expression of selected *Mal d 1* gene isoforms in apple cultivar Opal®. Czech Journal of Genetics and Plant Breeding **59**:141–147.

### Recenzované články:

Žďárská I, Nekvindová V, Čmejla R, Vávra R. 2018. Vliv skladování na změny genové exprese alergenu Mal d 1 v jablkách. Úroda 12, roč. LXVI, vědecká příloha, s. 461-464.

Žďárská I, Kadlecová V, Čmejla R, Vávra R, Vejl P, Melounová M. 2017. Hodnocení exprese alergenu Mal d 1 u vybraných odrůd jabloní. Vědecké práce ovocnářské **25**:33–44.

### Články ve sbornících:

Žďárská I, Čmejla R, Nekvindová V, Vávra R. 2021. Gene expression of Mal d 1 allergen isoforms in apple fruits determined using new generation sequencing. Acta Horticulturae **1307**:227–230.

Žďárská I, Nekvindová V, Vávra R, Čmejla R. 2019. Stanovení genové exprese isoformů alergenu Mal d 1 v plodech jabloní. Zborník príspevkov z vedeckej konferencie Mladí vedci – bezpečnosť potravinového reťazca, s. 227–231.

### Certifikovaná metodika:

Žďárská I, Vávra R, Nekvindová V, Čmejla R, Vejl P, Melounová M, Čílová D, Vašek J, Sedlák P, Zunová T. 2018. Metodika hodnocení genové exprese isoformů alergenu Mal d 1 v jablkách. Výzkumný a šlechtitelský ústav ovocnářský Holovousy s.r.o., certifikovaná metodika. 44 s. ISBN 978-80-87030-67-7.

## 6 ZÁVĚR

Tato disertační práce se zabývá studiem relativní genové exprese jablečného alergenu *Mal d 1* na úrovni RNA. Tento alergen je významný pro oblast České republiky z důvodu možného vzniku zkřížené alergické reakce s pylem břízy u senzitivních jedinců. *Mal d 1* vyvolává obvykle mírné, ale přesto nepříjemné projevy alergické reakce. Relativní genová exprese byla sledována jak u dvou nejvíce exprimovaných isoform *Mal d 1.01* a *Mal d 1.02*, tak i u všech 31 isoform alergenu *Mal d 1*, a to v plodech vybraných odrůd jablek a za různých podmínek.

Byly potvrzeny obě dvě stanovené hypotézy. V první řadě byla potvrzena existence geneticky podmíněné úrovně exprese významných isoalergenů v plodech jablek a současně i existence negenetických faktorů, které úroveň exprese ovlivňují. Byla prokázána i druhá hypotéza, že u vybraných odrůd a novošlechtění jablek pěstovaných v České republice lze použít publikované primery pro detekci jednotlivých isoalergenů *Mal d 1*, jelikož nebyly pozorovány výrazné sekvenční odlišnosti isoalergenů *Mal d 1* od již publikovaných primerů pro amplifikaci a exprese jednotlivých isoalergenů bylo možné detekovat jak pomocí techniky kvantitativní real-time PCR, tak pomocí techniky NGS.

Byly rovněž splněny z hypotéz vyplývající vytyčené cíle práce. Byl optimalizován postup izolace a purifikace celkové RNA ze slupky plodů odebraných z vybraných odrůd jablek. Před přepisem do cDNA byla kontrolována čistota izolované RNA, aby se zcela vyloučila přítomnost kontaminující genomové DNA, a to pomocí specifických sond pro aktin a následné real-time PCR. Byla optimalizována kvantitativní real-time PCR pro hodnocení vybraných isoform genu *Mal d 1*, pro které byly použity již navržené a publikované primery pro amplifikaci. Pro analýzu bylo použito zařízení real-time PCR cyklier Rotor-Gene Q (Qiagen). Amplifikační reakce každého vzorku byla provedena ve třech technických replikátech. Specifičnost amplifikační reakce byla potvrzena pomocí analýzy křivky tání a sekvenování. Pro statistické zpracování byly použity hodnoty relativní exprese  $\Delta C_t$ . Hodnota relativní exprese jednotlivých isoform alergenu *Mal d 1* byla vyjádřena vzhledem k referenčnímu genu pro aktin. Navíc byl optimalizována metoda NGS pro současnou kvantifikaci všech isoform alergenu *Mal d 1*. Pro NGS byl využit sekvenátor Ion PGM (ThermoFisher Scientific).

Další práce byla zaměřena na hodnocení genové exprese isoalergenů *Mal d 1.01* a *Mal d 1.02* u vybraných odrůd jablek. Tyto dvě nejvíce exprimované isoformy byly pro

účely ďalších analýz vybrány proto, že tvoří u plodů většiny odrůd, a to jak u čerstvých, tak u skladovaných, kolem 80 % celkové genové exprese alergenu Mal d 1 na úrovni RNA. Plody vybraných odrůd byly následně využity pro hodnocení faktorů, které mohou mít vliv na změnu genové exprese alergenu Mal d 1, a to ročník, skladování, systém produkce a lokalita.

Z hodnocení jednotlivých odrůd vyplynulo, že stabilně nižší relativní genovou expresi si v průběhu tří let zachovaly odrůdy ‘King Jonagold’, ‘Jonagold’, ‘Braeburn Mariri Red’, ‘Braeburn’, ‘Cumulus’, ‘Zuzana’, ‘Fragrance’ a naopak stabilně vyšší expresi genu Mal d 1 měla odrůda ‘Gala’. V rámci porovnání vlivu ročníku byly dále vyhodnoceny parametry průměrná roční teplota a průměrný roční úhrn srážek. Z našich výsledků vyplynulo, že v roce, kdy bylo srážek nejvíc, byla průměrná relativní genová exprese alergenu Mal d 1 nižší a naopak v letech, kdy bylo srážek méně, byla tato exprese vyšší. Je tedy evidentní, že nedostatek vody působí na jabloně stresově, a tím pádem může vyvolávat vyšší expresi stresových proteinů, jako jsou PR-10 proteiny, do kterých patří i alergen Mal d 1.

Dále byl potvrzen vliv skladování na zvýšení genové exprese alergenu Mal d 1, kdy byla jablka skladována jak v chlazeném skladu, tak v podmínkách ULO. Z výsledků vyplývá, že nelze jednoznačně určit, který způsob skladování je vhodnější z hlediska alergenicity. Z výsledků dlouhodobého skladování odrůd ‘Opal’ a ‘Gala’ se jeví, že z hlediska zvýšení úrovně genové exprese alergenu Mal d 1 je vhodnější skladovat ‘Opal’ v chlazeném skladu než v podmínkách ULO. Oproti tomu, u odrůdy ‘Gala’ se varianta skladování v podmínkách ULO jeví jako vhodnější z hlediska zvyšování hladiny genové exprese alergenu Mal d 1. Z uvedených zjištění plyne potřeba testovat podmínky skladování pro každou odrůdu zvlášť.

Výsledky pro vliv systému produkce se značně lišily ve třech letech hodnocení u jednotlivých odrůd, proto nebyl identifikován jednoznačný vliv systému produkce na zvýšení genové exprese alergenu Mal d 1. V obou dvou případech totiž na plody mohou působit různé faktory jako jistá forma stresu a ovlivnit tak expresi genu *Mal d 1*. V kontextu těchto faktorů se zdá, že je důležité především dbát na omezení stresového působení na jabloně v sadu, a to jak v integrované, tak v ekologické produkci.

Z výsledků hodnocení vlivu lokality na úroveň relativní exprese genu Mal d 1 opět vyplývá, že teplota a srážky mají podstatný význam. Podobně jako u hodnocení ročníku, i v tomto případě byla nejnižší hladina exprese genu *Mal d 1* naměřena u plodů získaných z lokality, u které byla nejvyšší hodnota průměrného ročního úhrnu srážek a zároveň nejnižší průměrná roční teplota. Na druhou stranu nejvyšší hladina exprese genu *Mal d 1* byla naměřena

u plodů získaných z lokality, u které byla nejnižší hodnota průměrného ročního úhrnu srážek a zároveň nejvyšší průměrná roční teplota. Z výše zmíněných výsledků lze vyvodit doporučení pro výběr lokality pro založení jabloňového sadu zaměřeného na produkci hypoalergenních plodů v oblastech spíše chladnějších a s dostatkem srážek, popřípadě umělou závlahou.

Pomocí metody NGS byla vyhodnocena genová exprese u všech známých isoform genů *Mal d 1*. V rámci analýz byla detekována RNA pro všechny publikované isoformy *Mal d 1*. Ty isoformy, které měly expresi vyšší než 0,5 % celkového obsahu všech *Mal d 1*, byly vybrány pro hodnocení relativní genové exprese pomocí kvantitativní real time PCR. Toto hodnocení probíhalo u dvou odrůd, a to od čerstvých plodů až po dlouhodobě skladované plody. Bylo zjištěno, že ačkoli isoformy *Mal d 1.01* a *Mal d 1.02* zůstaly nejvíce exprimovány v čerstvých i skladovaných plodech, měl by se při analýzách hypoalergenních jablek brát zřetel též na méně exprimované isoformy jako *Mal d 1.06D* a *Mal d 1.03G*, jejichž relativní genová exprese se během skladování výrazně zvýšila a tyto isoformy by mohly mít vliv na alergenicitu jablek.

Získané výsledky a poznatky byly publikovány ve dvou recenzovaných časopisech, ve dvou sbornících, v certifikované metodice a v impaktovaném článku.

Tato práce svým rozsahem, množstvím provedených analýz a získaných výsledků poskytuje ucelený a přehledný zdroj poznatků ohledně RNA exprese genu *Mal d 1* a jeho isoform v plodech jabloní. Může poskytnout užitečné informace i pro šlechtitele a pěstitele hypoalergenních odrůd. Rovněž dává dobrý základ pro možné navazující studie na úrovni bílkovin a následně pro ověřování výsledků u pacientů trpících alergiemi na jablka.

## 7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

Zkratka	Anglický název	Český název
<b>1-MCP</b>	1-Methylcyclopropene	1-metylcyklopropen
<b>ATGC</b>	adenine, thymine, guanine, cytosine	adenin, thymin, guanin, cytosin
<b>A.U.</b>	Arbitrary Units	arbitrární jednotka
<b>BLAST</b>	Basic Local Alignment Search Tool	Basic Local Alignment Search Tool
<b>bp</b>	pair of bases	pár bází
<b>cDNA</b>	complementary deoxyribonucleic acid	komplementární deoxyribonukleová kyselina
<b>CMOS</b>	Complementary Metal-Oxide Semiconductor	komplementární kov–oxid–polovodič
<b>C<sub>t</sub></b>	cycle of treshold	cyklus prahové hodnoty
<b>DBPCFC</b>	double-blind placebo-controlled food challenge	dvojitě slepý placebem kontrolovaný potravinový expoziční test
<b>DH</b>	double-haploid	zdvojený haploid
<b>DNA</b>	deoxyribonucleic acid	deoxyribonukleová kyselina
<b>dNTPs</b>	deoxyribonucleotide triphosphate	deoxyribonukleotid trifosfát
<b>dsDNA</b>	double-stranded deoxyribonucleic acid	dvouvláknová deoxyribonukleová kyselina
<b>DTT</b>	dithiothreitol	dithiothreitol
<b>ELISA</b>	enzyme linked immunosorbent assay	imunoenzymatická testovací metoda
<b>EtOH</b>	ethanol	etanol
<b>FRET</b>	fluorescence resonance energy transfer	fluorescenční rezonanční přenos energie
<b>GAPDH</b>	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza
<b>GOI</b>	gene of interest	genu zájmu
<b>HRM</b>	high resolution melt analysis	vysokorozlišovací analýza křivek tání
<b>IgE</b>	immunoglobulin E	imunoglobulín E
<b>Ion PGM</b>	Ion Personal Genome Machine	Ion Personal Genome Machine
<b>kDa</b>	kiloDalton	kiloDalton
<b>LG</b>	linkage group	vazebná skupina
<b>M-MLV</b>	Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase	reverzní transkriptáza typu Moloney Murine Leukemia Virus
<b>mRNA</b>	messenger RNA	Mediátorová RNA
<b>NA</b>	not analyzed	neanalyzováno
<b>NGS</b>	Next generation sequencing	sekvenování nové generace
<b>nsLTP</b>	nonspecific lipid-transfer proteins	nespecifické proteiny přenášející lipidy
<b>nt</b>	nucleotide	nukleotid
<b>OAS</b>	oral allergic syndrome	orální alergický syndrom
<b>PCR</b>	polymerase chain reaction	polymerázová řetězová reakce
<b>PR-10</b>	pathogenesis related-10 proteins	proteiny spojené s patogenezi

<b>Zkratka</b>	<b>Anglický název</b>	<b>Český název</b>
<b>QTL</b>	quantitative trait locus	lokus kvantitativního znaku
<b>RG</b>	reference gene	referenční gen
<b>RNA</b>	ribonucleic acid	ribonukleová kyselina
<b>RNAi</b>	RNA interference	RNA interference
<b>RPM</b>	rounds per minute	otáčky za minutu
<b>RT</b>	reverse transcription	reverzní transkripce
<b>RT-qPCR</b>	reverse transcription quantitative real-time PCR	reverzní transkripce s následnou kvantitativní PCR v reálním čase
<b>SDS-PAGE</b>	sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis	dodecylsírany sodný – polyakrylamidová gelová elektroforéza
<b>SPT</b>	skin prick test	bodový kožní test
<b>Taq</b>	DNA polymerase from <i>Thermus aquaticus</i>	DNA polymeráza z <i>Thermus aquaticus</i>
<b>TLP</b>	thaumatin-like proteins	proteiny typu thaumatinu
<b>ULO</b>	ultra-low oxygen	extrémně nízký obsah kyslíku
<b>UV</b>	ultra violet	ultrafialové záření

## 8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Adams G. 2020. A beginner's guide to RT-PCR, qPCR and RT-qPCR. *The Biochemist* **42**(3):48–53.
- Ahammer L, Grutsch S, Kamenik AS, Liedl KR, Tollinger M. 2017. Structure of the major apple allergen Mal d 1. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **65**:1606–1612.
- Akbudak MA, Yildiza S, Filiz E. 2020. Pathogenesis related protein-1 (PR-1) genes in tomato (*Solanum lycopersicum* L.): Bioinformatics analyses and expression profiles in response to drought stress. *Genomics* **112**:4089–4099.
- Asero R, Mistrello G, Roncarolo D, Amato S, Caldironi G, Barocci F, van Ree R. 2002. Immunological cross-reactivity between lipid transfer proteins from botanically unrelated plant-derived foods: a clinical study. *Allergy* **57**:900–906.
- Ben-Nun L. 2016. *Roots/Health Benefits of Apples*. B.N. Publication House. 127 s. [cit. 3/2021]. Dostupné z <[https://www.researchgate.net/publication/288944473\\_ROOTSHEALTH\\_BENEFITS\\_OF\\_APPLES](https://www.researchgate.net/publication/288944473_ROOTSHEALTH_BENEFITS_OF_APPLES)>.
- Bergmann KC, Zuberbier J, Zuberbier T, Zapp J, Hennebrüder W. 2020. Apple Allergy – Development of Tolerance through Regular Consumption of Low-Allergen Apples. An Observational Study. *Erwerbs-Obstbau* **62**:267–273.
- Beuning LL, Bowen JH, Persson HA, Barraclough D, Bulley S, MacRae EA. 2004. Characterisation of Mal d 1-related genes in *Malus*. *Plant molecular biology* **55**:369–388.
- Bianco L, Cestaro A, Linsmith G, Muranty H, Denancé C, Théron A, Poncet C, Micheletti D, Kerschbamer E, Di Pierro EA, Larger S, Pindo M, Van de Weg E, Davassi A, Laurens F, Velasco R, Durel CE, Troggio M. 2016. Development and validation of the Axiom<sup>®</sup> Apple 480K SNP genotyping array. *The Plant Journal* **86**:62–74.
- Bianco L, Cestaro A, Sargent DJ, Banchi E, Derdak S, Di Guardo M, Salvi S, Jansen J, Viola R, Gut I, Laurens F, Chagné D, Velasco R, Van de Weg E, Troggio M. 2014. Development and validation of a 20K single nucleotide polymorphism (SNP) whole genome genotyping array for apple (*Malus × domestica* Borkh). *PLoS ONE* **9**:e110377.
- Bohle B. 2004. T lymphocytes and food allergy. *Molecular Nutrition and Food Research* **48**:424–433.

- Bohle B, Zwölfer B, Heratizadeh A, Jahn-Schmid B, Antonia YD, Alter M, Keller W, Zuidmeer L, van Ree R, Werfel T, Ebner C. 2006. Cooking birch pollen related food: divergent consequences for IgE- and T cell-mediated reactivity in vitro and in vivo. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **118**:1242–1249.
- Bolhaar ST, van de Weg WE, van Ree R, Gonzalez-Mancebo E, Zuidmeer L, Bruijnzeel-Koomen CA, Fernandez-Rivas M, Jansen J, Hoffmann-Sommergruber K, Knulst AC, Gilissen LJ. 2005a. In vivo assessment with prick-to-prick testing and double-blind, placebo-controlled food challenge of allergenicity of apple cultivars. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **116**:1080–1086.
- Bolhaar ST, Zuidmeer L, Ma Y, Ferreira F, Bruijnzeel-Koomen CA, Hoffmann-Sommergruber K, van Ree R, Knulst AC. 2005b. A mutant of the major apple allergen, Mal d 1, demonstrating hypo-allergenicity in the target organ by double-blind placebo-controlled food challenge. *Clinical and Experimental Allergy* **35**:1638–1644.
- 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**:6707–6716.
- Boyer J, Liu RH. 2004. Apple phytochemicals and their health benefits. *Nutrition Journal* **3**:5.
- Breiteneder H. 2004. Thaumatin-like proteins a new family of pollen and fruit allergens. *Allergy* **59**:479–481.
- Breiteneder H, Ebner C. 2000. Molecular and biochemical classification of plant-derived food allergens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **106**:27–36.
- Breiteneder H, Radauer C. 2004. A classification of plant food allergens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **113**:821–830.
- Burney P, Summers C, Chinn S, Hooper R, Van Ree R, Lidholm J. 2010. Prevalence and distribution of sensitization to foods in the European Community Respiratory Health Survey: a EuroPrevall analysis. *Allergy* **65**:1182–1188.
- Chagné D, Crowhurst RN, Troggio M, Davey MW, Gilmore B, Lawley C, Vanderzande S, Hellens RP, Kumar S, Cestaro A, Velasco R, Main D, Rees JD, Iezzoni A, Mockler T, Wilhelm L, Van de Weg E, Gardiner SE, Bassil N, Peace C. 2012. Genome-wide SNP detection, validation, and development of an 8K SNP array for apple. *PLoS ONE* **7**:e31745.



- Daccord N, Celton JM, Linsmith G, Becker C, Choisne N, Schijlen E, van de Geest H, Bianco L, Micheletti D, Velasco R, Di Pierro EA, Gouzy J, Rees DJG, Guérif P, Muranty H, Durel CE, Laurens F, Lespinasse Y, Gaillard S, Aubourg S, Quesneville H, Weigel D, van de Weg E, Troglio M, Bucher E. 2017. High-quality de novo assembly of the apple genome and methylome dynamics of early fruit development. *Nature genetics* **49**(7):1099–1106.
- Dubois AE, Pagliarani G, Brouwer RM, Kollen BJ, Dragsted LO, Eriksen FD, Callesen O, Gilissen LJ, Krens FA, Visser RG, Smulders MJ, Vlieg-Boerstra BJ, Flokstra-de Blok BJ, van de Weg WE. 2015. First successful reduction of clinical allergenicity of food by genetic modification: Mal d 1-silenced apples cause fewer allergy symptoms than the wild-type cultivar. *Allergy* **70**:1406–1412.
- 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). *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **95**:962–969.
- Elzebroek ATG, Wind K. 2008. *Guide to Cultivated Plants*. Wallingford: CAB International. 540 s. ISBN 1-84593-356-7.
- Eriksson NE, Formgren H, Svenonius E. 1982. Food hypersensitivity in patients with pollen allergy. *Allergy* **37**:437–443.
- Fernandes H, Michalska K, Sikorski M, Jaskolski M. 2013. Structural and functional aspects of PR-10 proteins. *FEBS Journal* **280**:1169–1199.
- Fernández-Rivas M, Bolhaar S, González-Mancebo E, Asero R, van Leeuwen A, Bohle B, Ma Y, Ebner C, Rigby N, Sancho AI, Miles S, Zuidmeer L, Knulst A, Breiteneder H, Mills C, Hoffmann-Sommergruber K, van Ree R. 2006. Apple allergy across Europe: how allergen sensitization profiles determine the clinical expression of allergies to plant foods. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **118**:481–488.
- Fernández-Rivas M, Cuevas M. 1999. Peels of rosaceae fruits have a higher allergenicity than pulps. *Clinical and Experimental Allergy* **29**:1239–1247.
- Gao Z, Van de Weg EW, Matos CI, Arens P, Bolhaar ST, Knulst AC, Li Y, Hoffmann-Sommergruber K, Gilissen LJ. 2008. Assessment of allelic diversity in intron-containing Mal d 1 genes and their association to apple allergenicity. *BMC Plant Biology* **8**:116.

- Gao Z, Van de Weg WE, Schaart JG, Schouten HJ, Tran DH, Kodde LP, van der Meer IM, van der Geest AH, Kodde J, Breiteneder H, Hoffmann-Sommergruber K, Bosch D, Gilissen LJ. 2005a. Genomic cloning and linkage mapping of the Mal d 1 (PR-10) gene family in apple (*Malus domestica*). *Theoretical and Applied Genetics* **111**:171–183.
- Gao Z, Van der Weg WE, Schaart JG, Arkel GV, Breiteneder H, Hoffmann-Sommergruber K, Gilissen LJ. 2005b. Genomic characterization and linkage mapping of the apple allergen genes Mal d 2 (thaumatin-like protein) and Mal d 4 (profilin). *Theoretical and Applied Genetics* **111**:1087–1097.
- Gao Z, Van de Weg WE, Schaart JG, van der Meer IM, Kodde L, Laimer M, Breiteneder H, Hoffmann-Sommergruber K, Gilissen LJ. 2005c. Linkage map positions and allelic diversity of two Mal d 3 (nonspecific lipid transfer protein) genes in the cultivated apple (*Malus domestica*). *Theoretical and Applied Genetics* **110**:479–491.
- Geroldinger-Simic M, Zelniker T, Aberer W, Ebner C, Egger C, Greiderer A, Prem N, Lidholm J, Ballmer-Weber BK, 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* **127**:616–622.
- Gilissen LJ, Bolhaar ST, Matos CI, Rouwendal GJ, Boone MJ, Krens FA, Zuidmeer L, Van Leeuwen A, Akkerdaas J, Hoffmann-Sommergruber K, Knulst AC, Bosch D, Van de Weg WE, Van Ree R. 2005. Silencing the major apple allergen Mal d 1 by using the RNA interference approach. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **115**:364–369.
- Gregorová Z, Kováčik J, Klejdus B, Maglovski M, Kuna R, Hauptvogel P, Matušíková I. 2015. Drought-Induced Responses of Physiology, Metabolites, and PR Proteins in *Triticum aestivum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **63**(37):8125 – 8133.
- Holm J, Ferreras M, Ipsen H, Würtzen PA, Gajhede M, Larsen JN, Lund K, Spangfort MD. 2011. Epitope grafting, re-creating a conformational Bet v 1 antibody epitope on the surface of the homologous apple allergen Mal d 1. *Journal of Biological Chemistry* **286**:17569–17578.
- Kiewning D, Baab G, Schmitz-Eiberger M. 2013. Effect of 1-MCP treatment on the apple (*Malus domestica* L. Borkh.) allergen Mal d 1 during long-term storage. *LWT - Food Science and Technology* **53**:198–203.

- Kootstra HS, Vlieg-Boerstra BJ, Dubois AEJ. 2007. Assessment of the reduced properties of the Santana apple. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology* **99**:522–525.
- Kopac P, Rudin M, Gentinetta T, Gerber R, Pichler CH, Hausmann O, Schnyder B, Pichler WJ. 2012. Continuous apple consumption induces oral tolerance in birch-pollen-associated apple allergy. *Allergy* **67**:280–285.
- Krath BN, Eriksen FD, Pedersen BH, Gilissen LJWJ, Van de Weg WE, Dragsted LO. 2009. Development of hypoallergenic apples – silencing of the major allergen Mal d 1 in Elstar. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* **84**:52–57.
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  Method. *Methods* **25**(4):402–408.
- Ma Y, Zuidmeer L, Bohle B, Bolhaar ST, Gadermaier G, Gonzalez-Mancebo E, Fernandez-Rivas M, Knulst AC, Himly M, Asero R, Ebner C, Van Ree R, Ferreira F, Breiteneder H, Hoffmann-Sommergruber K. 2006. Characterization of recombinant Mal d 4 and its application for component resolved diagnosis of apple allergy. *Clinical and Experimental Allergy* **36**:1087–1096.
- Marzban G, Helene 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* **169**:387–394.
- Matthes A, Schmitz-Eiberger M. 2009. Apple (*Malus domestica* L. Borkh.) allergen Mal d 1: effect of cultivar, cultivation system, and storage conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **57**:10548–10553.
- Muraro A, Alonzi C. 2012. Pollen–Food Syndrome. In: James JM, Burks W, Eigenmann P. *Food Allergy*. Saunders. 309 s. ISBN 978-1-4377-1992-5.
- Nečas T, Krška B, Ondrášek I. 2004. Multimediální učební texty Ovocnictví. [cit. 3/2021]. Dostupné z: <[http://tilia.zf.mendelu.cz/ustavy/551/ustav\\_551/eltronic\\_ovoc/\\_private/ovoc\\_1/data/jabl on.ppd](http://tilia.zf.mendelu.cz/ustavy/551/ustav_551/eltronic_ovoc/_private/ovoc_1/data/jabl on.ppd)>

- Nothegger B, Reider N, Covaciu CE, Cova V, Ahammer L, Eidelpes R, Unterhauser J, Platzgummer S, Tollinger M, Letschka T, Eisendle K. 2020. Allergen-specific immunotherapy with apples: selected cultivars could be a promising tool for birch pollen allergy. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* **34**:1286–1292.
- Pagliarani G, Paris R, Arens P, Tartarini S, Ricci G, Smulders MJM, Van de Weg WE. 2013. A qRT-PCR assay for the expression of all Mal d 1 isoallergen genes. *BMC Plant Biology* **13**:51.
- Pagliarani G, Paris R, Iorio AR, Tartarini S, Del Duca S, Arens P, Peters S, Van de Weg E. 2012. Genomic organisation of the Mal d 1 gene cluster on linkage group 16 in apple. *Molecular Breeding* **29**:759–778.
- Pagliarani G, Paris R, Tartarini S, Sansavini S. 2009. Cloning and expression of the major allergen genes in apple fruit. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology, ISAFRUIT (special issue)*:176–181.
- Pastorello EA, Rivolta F. 2004. Clinical role of lipid transfer proteins in food allergy. *Molecular Nutrition and Food Research* **48**:356–362.
- Peace CP, Bianco L, Troglio M, van de Weg E, Howard NP, Cornille A, Durel CE, Myles S, Migicovsky Z, Schaffer RJ, Costes E, Fazio G, Yamane H, van Nocker S, Gottschalk C, Costa F, Chagné D, Zhang X, Patocchi A, Gardiner SE, Hardner C, Kumar S, Laurens F, Bucher E, Main D, Jung S, Vanderzande S. 2019. Apple whole genome sequences: recent advances and new prospects. *Horticulture Research* **6**(1):59.
- Peil A, Kellerhals M, Höfer M, Flachowsky H. 2011. Apple Breeding - From the origin to genetic engineering. *Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology* **5** (Special Issue 1):118–138.
- Pfaffl MW. 2004. Quantification strategies in real-time PCR. In: Bustin SA. *A-Z of quantitative PCR*. International University Line. ISBN: 978-0963681782.
- Pfaffl MW. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* **29**:45.
- Phipps JB, Robertson KR, Rohrer JR, Smith PG. 1991. Origins and evolution of subfam. Maloideae (Rosaceae). *Systematic Botany* **16**:303–332.

- Radauer C, Willerroider M, Fuchs H, Hoffmann-Sommergruber K, Thalhamer J, Ferreira F, Scheiner O, Breiteneder H. 2006. Cross-reactive and species-specific immunoglobulin E epitopes of plant profilins: an experimental and structure-based analysis. *Clinical and Experimental Allergy* **36**:920–929.
- Reed GH, Kent JO, Wittwer CT. 2007. High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics. *Pharmacogenomics* **8**(6):597–608.
- Ricci G, Dondi A, Belotti T, Baldi E, Tartarini S, Paris R, Pagliarani G, Serafini-Fracassini D, Casadio R, Giannetti A, Masi M. 2010. Allergenicity of different apple cultivars assessed by means of skinprick test and sensitisation to recombinant allergens Mal d 1 and Mal d 3 in a group of Italian apple-allergic patients. *International Journal of Food Science and Technology* **45**:1517–1523.
- Romer E, Chebib S, Bergmann K-C, Plate K, Becker S, Ludwig C, Meng C, Fischer T, Dierend W, Schwab W. 2020. Tiered approach for the identification of Mal d 1 reduced, well tolerated apple genotypes. *Scientific Reports* **10**:9144.
- Sánchez-Monge R, Lombardero M, García-Sellés FJ, Barber D, Salcedo G. 1999. Lipid-transfer proteins are relevant allergens in fruit allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **103**:514–519.
- Sancho AI, Foxall R, Browne T, Dey R, Zuidmeer L, Marzban G, Waldron KW, van Ree R, Hoffmann-Sommergruber K, Laimer M, Mills EN. 2006a. Effect of postharvest storage on the expression of the apple allergen Mal d 1. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**:5917–5923.
- Sancho AI, Foxall R, Rigby NM, Browne T, Zuidmeer L, van Ree R, Waldron KW, Mills EN. 2006b. Maturity and storage influence on the apple (*Malus domestica*) allergen Mal d 3, a nonspecific lipid transfer protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**:5098–5104.
- Savazzini F, Ricci G, Tartarini S. 2015. Apple allergens genomics and biotechnology: Unravelling the determinants of apple allergenicity. In: Poltronieri P, Hong Y. *Applied Plant Genomics and Biotechnology*. Woodhead Publish. 356 s. ISBN 978-0-08-100068-7.

- Siekierzynska A, Piasecka-Kwiatkowska D, Litwinczuk W, Burzynska M, Myszka A, Karpinski P, Zygala E, Piorecki N, Springer E, Sozanski T. 2021. Molecular and Immunological Identification of Low Allergenic Fruits among Old and New Apple Varieties. *International Journal of Molecular Sciences* **22**(7):3527.
- Smith NA, Singh SP, Wang M-B, Stoutjesdijk PA, Green AG, Waterhouse PM. 2000. Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs. *Nature* **407**:319–320.
- Valenta R, Duchene M, Ebner C, Valent P, Sillaber C, Deviller P, Ferreira F, Tejkl M, Edlmann H, Kraft D. 1992. Profilins constitute a novel family of functional plant pan-allergens. *Journal of Experimental Medicine* **175**:377–385.
- Vanek-Krebitz M, Hoffmann-Sommergruber K, Laimer da Camara 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* **214**:538–551.
- Velasco R, Zharkikh A, Affourtit J, Dhingra A, Cestaro A, Kalyanaraman A, Fontana P, Bhatnagar SK, Troggio M, Pruss D, Salvi S, Pindo M, Baldi P, Castelletti S, Cavaiuolo M, Coppola G, Costa F, Cova V, Dal Ri A, Goremykin V, Komjanc M, Longhi S, Magnago P, Malacarne G, Malnoy M, Micheletti D, Moretto M, Perazzolli M, Si-Ammour A, Vezzulli S, Zini E, Eldredge G, Fitzgerald LM, Gutin N, Lanchbury J, Macalma T, Mitchell JT, Reid J, Wardell B, Kodira C, Chen Z, Desany B, Niazi F, Palmer M, Koepke T, Jiwan D, Schaeffer S, Krishnan V, Wu C, Chu VT, King ST, Vick J, Tao Q, Mraz A, Stormo A, Stormo K, Bogden R, Ederle D, Stella A, Vecchietti A, Kater MM, Masiero S, Lasserre P, Lespinasse Y, Allan AC, Bus V, Chagné D, Crowhurst RN, Gleave AP, Lavezzo E, Fawcett JA, Proost S, Rouzé P, Sterck L, Toppo S, Lazzari B, Hellens RP, Durel CE, Gutin A, Bumgarner RE, Gardiner SE, Skolnick M, Egholm M, Van de Peer Y, Salamini F, Viola R. 2010. The genome of the domesticated apple (*Malus x domestica* Borkh.). *Nature genetics* **42**(10):833–841.
- Vlieg-Boerstra BJ, Van de Weg WE, Van der Heide S, Kerkhof M, Arens P, Heijerman Poppelman G, Dubois AEJ. 2011. Identification of low allergenic apple cultivars using skin prick tests and oral food challenges. *Allergy* **66**:491–498.

- Volgin DV. 2014. Gene Expression: Analysis and Quantitation. In: Verma AS, Singh A. *Animal Biotechnology: Models in Discovery and Translation*. Academic Press. 668 s. ISBN 978-0-12-416002-6.
- Wang J, Vanga SK, Raghavan V. 2019. Effect of pre-harvest and post-harvest conditions on the fruit allergenicity: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **59**(7):1027–1043.
- Yang L, Su N, Wu M, Wang C, Hu H. 2011. Proteomics to identify pathogenesis-related proteins in rice roots under water deficit. *Biologia* **66**(3):477–483.
- Ziadi S, Poupard P, Brisset MN, Paulin JP, Simoneau P. 2001. Characterization in apple leaves of two subclasses of PR-10 transcripts inducible by acibenzolar-S-methyl, a functional analogue of salicylic acid. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **59**:33–43.
- Zuidmeer L, Goldhahn K, Rona RJ, Gislason D, Madsen C, Summers C, Sodergren E, Dahlstrom J, Lindner T, Sigurdardottir ST, McBride D, Keil T. 2008. The prevalence of plant food allergies: a systematic review. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* **121**:1210–1218.