

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra genetiky a šlechtění**



**Expresní analýza isoalergenů Mal d 1 ve slupce a dužnině jablek u  
plodů získaných z obchodních řetězců v České republice**

**Diplomová práce**

**Autor práce: Tereza Zunová**

**Vedoucí práce: doc. Dr. Ing. Pavel Vejl**

© 2018 ČZU v Praze

### **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou diplomovou práci " Expresse isoalergenů Mal d 1 ve slupce a dužnině jablek u plodů získaných z obchodních řetězců v České republice" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 11. 4. 2018

---

### **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucímu své diplomové práce doc. Dr. Ing. Pavlu Vejlovi za odborné vedení a pomoc při náročném zpracování dat. Mé poděkování patří také Mgr. Martině Melounové, Ph.D. za odbornou konzultaci a Ing. Daniele Čílové za vedení při laboratorní práci.

# Expresí isoalergenů Mal d 1 ve slupce a dužnině jablek u plodů získaných z obchodních řetězců v České republice

## Souhrn

Alergie na jablka je jednou z nejčastějších potravinových alergií. Hlavní alergen jablečných plodů Mal d 1 je genová rodina 31 lokusů, z nich každý kóduje jinou izoformu. Jednotlivé izoformy mají odlišnou míru exprese ovlivněnou genetickými i environmentálními, biotickými a abiotickými faktory.

V této diplomové práci byla studována exprese izoform jablečných alergenů Mal d 1.01, Mal d 1.02, Mal d 1.06A a Mal d 1.06B. Byly hodnoceny rozdíly v expresi jednotlivých izoform, vzhledem k odrůdě, pomologickému stavu plodů, jejich původu, způsobu balení a jakosti. Dále byly hodnoceny rozdíly mezi expresí alergenů ve slupce a dužnině.

K vyhodnocení byla použita metoda stanovení relativní exprese genů, založená na qRT-PCR. Statistické zpracování výsledků bylo založeno na vyhodnocení hodnot  $\Delta Cq$  a  $\Delta\Delta Cq$ . Jako house keepingový gen byl použit gen pro aktin a jako referenční vzorek odrůda Golden Delicious z VŠÚO Holovousy s.r.o.

Z výsledků diplomové práce vyplývá, že exprese izoform jablečných alergenů Mal d 1.01 a Mal d 1.02 je majoritní ve srovnání s ostatními izoformami bez ohledu na odrůdu, zemi původu, podmínky pěstování, skladování a prodej plodů. Jako odrůdy s vysokou expresí alergenů byly vyhodnoceny Golden Delicious a Jonagold a naopak s nízkou expresí odrůda Modi. Bylo prokázáno, že slupka měla větší expresi alergenů než dužnina a také, že na jednotlivé vzorky měly významný vliv faktory, jakými je doba a způsob skladování, manipulace s plody, způsob balení, jakost nebo napadení patogeny, související s obrannými reakcemi plodů za nepříznivých podmínek. Tyto výsledky potvrzují platnost všech stanovených vědeckých hypotéz. Většina autorů ve svých výzkumech porovnává odrůdy vysoce alergenní s odrůdami málo alergenními nebo se zabývají rozdíly v expresi alergenů mezi slupkou a dužninou, případně podmínkami skladování. Vzhledem k tomu je tato práce inovativní v komplexním přístupu zhodnocení všech možných faktorů, jež vstupují do procesu prodeje konzumních plodů.

Diplomová práce vznikla za podpory grantového projektu NAZV MZe ČR QJ1510354.

**Klíčová slova:** jablko, *Malus × domestica*, isoalergeny, Mal d 1, exprese, qRT-PCR, obchodní řetězec

# Expression of Mal d 1 allergens in apple skin and flesh from fruits obtained from retail chains in the Czech Republic

## Summary

Apple allergy is one of the most common food allergies. The main allergen Mal d 1 is a complex gene family of 31 loci, each of which codes for a different isoallergen. Individual isoforms have different level of expression influenced by genetic and environmental, biotic and abiotic factors.

In this diploma thesis the expression of isoallergens Mal d 1.01, Mal d 1.02, Mal d 1.06A and Mal d 1.06B were studied. Differences in the expression of individual isoforms were evaluated, based on the variety, the pomology, the origin, packaging and quality. Furthermore, the differences between the expression of allergens in the skin and the pulp were evaluated.

The method of evaluation the relative gene expression based on qRT-PCR. The statistical processing of the results was based on the evaluation of  $\Delta Cq$  and  $\Delta\Delta Cq$  values. The gene for actin was used as the housekeeping gene, and as a reference sample the Golden Delicious from VŠÚO Holovousy s.r.o. was used.

The results of the diploma thesis show that the expression of isoallergens Mal d 1.01 and Mal d 1.02 is major compared to the other isoforms irrespective of variety, country of origin, conditions of cultivation, storage and sale of fruits. Highly expressed varieties of allergens have been evaluated by Golden Delicious and Jonagold and cultivar with low expression of the allergens was Modi. It has been shown that the skin has a higher allergenicity than the pulp, and that factors such as time and method of storage, fruit handling, packing, quality or pathogenesis associated with defensive reactions of the fruit under unfavourable conditions cause higher expression of allergens. This result confirm all hypotheses. Most authors compare cultivars with high and low allergenicity, compare skin and flesh in expression of allergens, or compare allergenicity in different storage conditions. Because of this, this diploma thesis is innovative in a comprehensive approach to the assessment of all the possible factors that enter into the process of selling fruit drinks.

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

**Keywords:** apple tree, *Malus × domestica*, isoallergen, Mal d 1, expression, qRT-PCR, retail chains

# Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Cíl práce</b>	<b>2</b>
<b>2.1</b>	<b>Vědecké hypotézy</b>	<b>2</b>
<b>2.2</b>	<b>Cíle práce</b>	<b>2</b>
<b>3</b>	<b>Literární přehled</b>	<b>3</b>
<b>3.1</b>	<b>Potravinové alergie</b>	<b>3</b>
3.1.1	Dělení potravinových alergií	3
3.1.2	Vznik potravinové alergie	5
3.1.2.1	Senzibilizace	5
3.1.2.2	Gastrointestinální trakt	6
3.1.2.3	Střevní mikroflóra	6
3.1.3	Faktory ovlivňující potravinové alergie	7
3.1.3.1	Genetické faktory	7
3.1.3.2	Negenetické faktory	8
3.1.4	Kritické období pro vznik potravinové alergie	9
3.1.5	Diagnostika a léčba potravinových alergií	10
3.1.6	Potravinové alergeny	10
<b>3.2</b>	<b>Jablka</b>	<b>11</b>
3.2.1	Význam jablek v lidské výživě	11
3.2.2	Alergeny u jablek	12
3.2.2.1	Hlavní alergeny jablek	12
3.2.2.2	Alergen Mal d 1	14
3.2.2.3	Zkřížená reakce alergenů Mal d 1 a Bet v 1	15
3.2.2.4	Symptomy doprovázející alergie na jablka a pyl břízy	18
3.2.2.5	Léčba alergie na jablka a pyl břízy	19
<b>3.3</b>	<b>Studium exprese genů</b>	<b>20</b>
3.3.1	Kvantitativní PCR v reálném čase (qRT-PCR)	20
3.3.1.1	Izolace RNA	22
3.3.1.2	Reverzní transkripce	23
3.3.1.3	qRT-PCR	23
3.3.1.4	Vyhodnocení exprese genů	24
<b>4</b>	<b>Materiál a metodika</b>	<b>26</b>
<b>4.1</b>	<b>Biologický materiál</b>	<b>26</b>
<b>4.2</b>	<b>Izolace celkové RNA ze slupky a dužniny plodů</b>	<b>29</b>
4.2.1	Příprava materiálu	29

4.2.2	Izolace celkové RNA .....	29
4.2.3	Vyhodnocení výtěžnosti RNA .....	30
4.2.4	Syntéza cDNA .....	31
4.2.5	Amplifikace vybraných majoritních izoform Mal d 1 .....	31
4.2.6	Relativní kvantifikace exprese – stanovení parametru Ratio $\Delta Cq$ .....	34
4.2.7	Relativní kvantifikace exprese – stanovení parametru Ratio $\Delta\Delta Cq$ .....	34
4.2.8	Ověření specifity amplifikace pomocí sekvenace a analýzou teploty tání .....	35
4.2.9	Statistické zpracování výsledků.....	35
<b>5</b>	<b>Výsledky.....</b>	<b>37</b>
<b>5.1</b>	<b>Stanovení relativní exprese na základě hodnot Ratio <math>\Delta Cq</math> .....</b>	<b>37</b>
5.1.1	Grafický přehled stanovených hodnot Ratio $\Delta Cq$ .....	37
5.1.2	Statistické vyhodnocení rozdílů hodnot Ratio $\Delta Cq$ způsobených třídícími faktory analýzy .....	41
5.1.3	Regresní a korelační analýza použitá pro hodnocení závislosti exprese Mal d 1 izoform ve slupce a v dužnině.....	53
5.1.4	Grafický přehled stanovených hodnot Ratio $\Delta\Delta Cq$ .....	56
5.1.5	Ověření specifity amplifikace pomocí sekvenování .....	64
5.1.6	Vyhodnocení specifity amplifikace pomocí křivek tání .....	67
<b>6</b>	<b>Diskuze.....</b>	<b>69</b>
<b>6.1</b>	<b>Metody izolace RNA, tvorby cDNA a amplifikace.....</b>	<b>69</b>
<b>6.2</b>	<b>Hodnocení Ratio <math>\Delta Cq</math> a Norm. <math>\Delta\Delta Cq</math> u jednotlivých vzorků .....</b>	<b>71</b>
<b>6.3</b>	<b>Efekty jednotlivých třídících faktorů na hodnotu Ratio <math>\Delta Cq</math>.....</b>	<b>71</b>
<b>7</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>76</b>
<b>8</b>	<b>Literární zdroje.....</b>	<b>77</b>
<b>9</b>	<b>Seznam použitých zkratk .....</b>	<b>90</b>
<b>10</b>	<b>Přílohy.....</b>	<b>91</b>

## Seznam tabulek

<b>Tabulka 1:</b> Hlavní třídy alergenů jablek.....	13
<b>Tabulka 2:</b> Zkřížená reaktivita mezi rostlinnými druhy .....	16
<b>Tabulka 3:</b> Vznik a původ odrůd analyzovaných v diplomové práci.....	26
<b>Tabulka 4:</b> Vzorky plodů jablek analyzovaných v diplomové práci s uvedenou odrůdou, zemí původu, obchodním řetězcem, v němž byl plod zakoupen, tuhostí dužiny, otlačení plodů, způsobu balení a jakosti plodů.....	27
<b>Tabulka 5:</b> Primerové páry dle Pagliarani et al. (2013) .....	33
<b>Tabulka 6:</b> Porovnání hodnot $T_m$ s Pagliarani et al. (2013) a Botton et al. (2008) .....	70

## Seznam obrázků

<b>Obrázek 1:</b> Dělení reakcí na potraviny .....	4
<b>Obrázek 2:</b> Části sekvencí kódujících 31 lokusů Mal d 1 genů .....	14
<b>Obrázek 3:</b> Struktura alergenu Mal d 1.0101 .....	15
<b>Obrázek 4:</b> Model molekulárního povrchu Bet v 1 a dvou izoforem Mal d 1 .....	17
<b>Obrázek 5:</b> Schéma principu TaqMan sondy .....	21
<b>Obrázek 6:</b> Schéma principu Molecular beacons .....	21
<b>Obrázek 7:</b> Schéma principu SYBRGreen 1 .....	22
<b>Obrázek 8:</b> Primery pro amplifikaci genů Mal d 1.01, Mal d 1.02, Mal d 1.06A a Mal d 1.06B.....	23
<b>Obrázek 9:</b> Křivka tání u heterozygotů s nescifickým amplikonem .....	24
<b>Obrázek 10:</b> Fáze PCR.....	25
<b>Obrázek 11:</b> Graf průběhu amplifikace při qPCR a rozdíly hodnot $C_q$ .....	25
<b>Obrázek 12:</b> Porovnání sekvence Mal d 1.01 se záznamy mezinárodní nukleotidové databáze NCBI.....	64
<b>Obrázek 13:</b> Porovnání sekvence Mal d 1.02 se záznamy mezinárodní nukleotidové databáze NCBI.....	65
<b>Obrázek 14:</b> Porovnání sekvence Mal d 1.06A se záznamy mezinárodní nukleotidové databáze NCBI.....	66
<b>Obrázek 15:</b> Porovnání sekvence Mal d 1.06B se záznamy mezinárodní nukleotidové databáze NCBI.....	66
<b>Obrázek 16:</b> Křivky tání a hodnota $T_m$ u amplikonu Mal d 1.01 .....	67



<b>Obrázek 17:</b> Křivky tání a hodnota $T_m$ u amplikonu Mal d 1.02 .....	67
<b>Obrázek 18:</b> Křivky tání a hodnota $T_m$ u amplikonu Mal d 1.06A .....	68
<b>Obrázek 19:</b> Křivky tání a hodnota $T_m$ u amplikonu Mal d 1.06B .....	68

### Seznam grafů

<b>Graf 1:</b> Hodnoty Ratio $\Delta Cq$ stanovené u jednotlivých izoform Mal d 1 ve slupce plodu .....	38
<b>Graf 2:</b> Hodnoty Ratio $\Delta Cq$ stanovené u jednotlivých izoform Mal d 1 v dužnině plodu.....	39
<b>Graf 3:</b> Součet hodnot Ratio $\Delta Cq$ stanovených u jednotlivých izoform Mal d 1 ve slupce a dužnině plodu.....	40
<b>Graf 4:</b> Hodnocení normality rozdělení na základě histogramu .....	41
<b>Graf 5:</b> Hodnocení normality rozdělení na základě P-grafu .....	42
<b>Graf 6:</b> Porovnání rozdílů hodnot mediánů $\Delta Cq$ mezi hodnocenými vzorky – výstup Kruskal-Wallisovy ANOVY.....	44
<b>Graf 7:</b> Porovnání rozdílů hodnot mediánů $\Delta Cq$ mezi hodnocenými odrůdami – výstup Kruskal-Wallisovy ANOVY.....	45
<b>Graf 8:</b> Porovnání rozdílů hodnot mediánů $\Delta Cq$ mezi hodnocenými izoformami Mal d 1 – výstup Kruskal-Wallisovy ANOVY .....	46
<b>Graf 9:</b> Porovnání rozdílů hodnot mediánů $\Delta Cq$ mezi slupkou a dužninou – výstup Kruskal-Wallisovy ANOVY.....	47
<b>Graf 10:</b> Porovnání rozdílů hodnot mediánů $\Delta Cq$ mezi zeměmi původu – výstup Kruskal-Wallisovy ANOVY.....	48
<b>Graf 11:</b> Porovnání rozdílů hodnot mediánů $\Delta Cq$ mezi obchodními řetězci – výstup Kruskal-Wallisovy ANOVY.....	49
<b>Graf 12:</b> Porovnání rozdílů hodnot mediánů $\Delta Cq$ mezi různými pevnostmi dužiny – výstup Kruskal-Wallisovy ANOVY .....	50
<b>Graf 13:</b> Porovnání rozdílů hodnot mediánů $\Delta Cq$ mezi různými stupni otláčení plodů – výstup Kruskal-Wallisovy ANOVY .....	51
<b>Graf 14:</b> Porovnání rozdílů hodnot mediánů $\Delta Cq$ mezi použitým obalovým materiálem – výstup Kruskal-Wallisovy ANOVY .....	52
<b>Graf 15:</b> Porovnání rozdílů hodnot mediánů $\Delta Cq$ mezi hodnocenými jakostmi uvedenými prodejci – výstup Kruskal-Wallisovy ANOVY .....	53
<b>Graf 16:</b> Závislost exprese izoformy Mal d 1.01 ve slupce a dužnině plodů .....	54
<b>Graf 17:</b> Závislost exprese izoformy Mal d 1.02 ve slupce a dužnině plodů .....	54

<b>Graf 18:</b> Závislost exprese izoformy Mal d 1.06A ve slupce a dužnině plodů .....	55
<b>Graf 19:</b> Závislost exprese izoformy Mal d 1.06B ve slupce a dužnině plodů.....	55
<b>Graf 20:</b> Závislost exprese Mal d 1 izoform ve slupce a dužnině plodů.....	56
<b>Graf 21:</b> Přehled normalizovaných hodnot Ratio $\Delta\Delta Cq$ u jednotlivých analyzovaných vzorků .....	57

# 1 Úvod

Alergie na jablka je jednou z nejčastějších potravinových alergií a její prevalence stále roste (Pagliarani et al., 2013). Alergie na jablečné plody vzniká na základě zkřížené reakce s hlavním alergenem břízy Bet v 1 (Popescu, 2015) a nejčastěji způsobuje orální alergický syndrom (Kondo and Urisuy, 2009), ale může vést i k život ohrožujícímu anafylaktickému šoku (Ebner et al., 1994; Vanek-Krebitz et al., 1995). Alergie na jablka způsobují 4 hlavní proteiny Mal d 1, Mal d 2, Mal d 3 a Mal d 4 (Gomez et al., 2014). Tyto proteiny můžeme zařadit do tzv. PR-proteinů (pathogenesis-related proteins), které slouží rostlinám primárně k obraně proti biotickým a abiotickým stresorům (Koistinen et al., 2002; Breiteneder, 2004). Hlavním alergenem u jablek je protein Mal d 1, což je ve skutečnosti genová rodina skládající se z 31 různých lokusů a každý z nich kóduje jiný izoalergen. Nejrozšířenější izoformy tohoto alergenu jsou Mal d 1.01 a Mal d 1.02 (Gao et al., 2008; Ahammer et al., 2017).

Pro stanovení alergenicity plodů jablek se využívá metoda založená na studiu relativní exprese genů (Heid et al., 1996) kvantitativní PCR v reálném čase - qRT-PCR (Pagliarani et al., 2013), jež se na rozdíl od klasické PCR vyznačuje kontinuálním zaznamenáváním množství DNA, jež se vytvořilo v průběhu cyklů (Pfaffl, 2001). K této detekci se využívá fluorescenční barvivo, např. SYBRGreen I, které se nespecificky váže do malého žlábků dsDNA (Pfaffl, 2001). Důležitým krokem před samotnou qRT-PCR je také reverzní transkripce, což je přepis izolované RNA do komplementární DNA (Bermingham and Luetlich, 2003). Vzhledem k tomu, že exprese je relativní, vyhodnocení probíhá na základě porovnání hodnot  $C_q$ , která odpovídá počtu PCR cyklů potřebných k vytvoření dostatečného fluorescenčního signálu k dosažení prahové hodnoty fluorescence (Obrázek 11; Ginzinger, 2002). Díky této hodnotě můžeme porovnávat 2 vzorky za využití referenčního genu, za zisku hodnot  $\Delta C_q$  a  $\Delta\Delta C_q$  (Perkins et al., 2012).

V této diplomové práci byla hodnocena exprese izoalergenů plodů jablek Mal d 1.01, Mal d 1.02, Mal d 1.06A a Mal d 1.06B a byly komplexně shrnuty faktory, jež vstupují do prodeje konzumních plodů v obchodních řetězcích, mající významný vliv na expresi alergenů v plodech.

## **2 Cíl práce**

### **2.1 Vědecké hypotézy**

Vědecké hypotézy diplomové práce je možné shrnout do následujících bodů:

1. Expresí izoform jablečných alergenů Mal d 1.01 a Mal d 1.02 bude ve srovnání s ostatními izoformami výrazně vyšší bez ohledu na odrůdu, zemi původu plodů, podmínky pěstování, skladování a prodeje plodů.

2. Přestože jsou konzumní jablka prodávaná v obchodních řetězcích vystavena obtížně definovatelným negenetickým faktorům ovlivňujících expresi jablečných alergenů Mal d 1, bude možné experimentálně určit skupiny odrůd s vysokou a nízkou expresí studovaných izoalergenů.

3. U plodů, které vykazují vyšší stupeň zralosti, lze očekávat vyšší míru expresí studovaných izoalergenů.

### **2.2 Cíle práce**

Konkrétní metodické cíle jsou následující:

A) Získat kolekci alespoň 50 různých vzorků plodů jabloní z evropských obchodních řetězců zastoupených v České republice. B) Provést pomologickou charakteristiku plodů s cílem posoudit stupeň zralosti. C) Určit majoritně se exprimující izoformy jablečných alergenů ve slupce dužnině plodů. D) Pomocí kvantitativní PCR stanovit relativní expresí vybraných izoform ve slupce i dužnině plodů. E) Provést statistické vyhodnocení výsledků zohledňující odrůdu, původ, pomologické vlastnosti a stupeň vyzrání plodů.

## 3 Literární přehled

### 3.1 Potravinové alergie

Nepříznivá reakce na potraviny patří mezi nejčastější zdravotní komplikace naší doby (Rochr et al., 2004). Výskyt potravinové alergie v posledních letech výrazně stoupá a to nejen v Evropě, ale i jinde ve světě (Cochrane et al., 2009). Rozšiřuje se spektrum alergenů, na které pacienti reagují a stupňují se též její projevy (Bělohlávková a kol., 2015). Potravinová alergie vyžaduje přesnou diagnózu, individuální stravovací návyky a má silný vliv na společenský život pacientů (Valenta et al., 2015), jelikož vyloučení alergenů z jídelníčku a zamezení kontaktu s nimi je mimořádně obtížné (Hong et al., 2012). Problémem je také vzrůstající počet tzv. multiproteinových alergií na více bílkovin živočišného i rostlinného původu (Bělohlávková a kol., 2015).

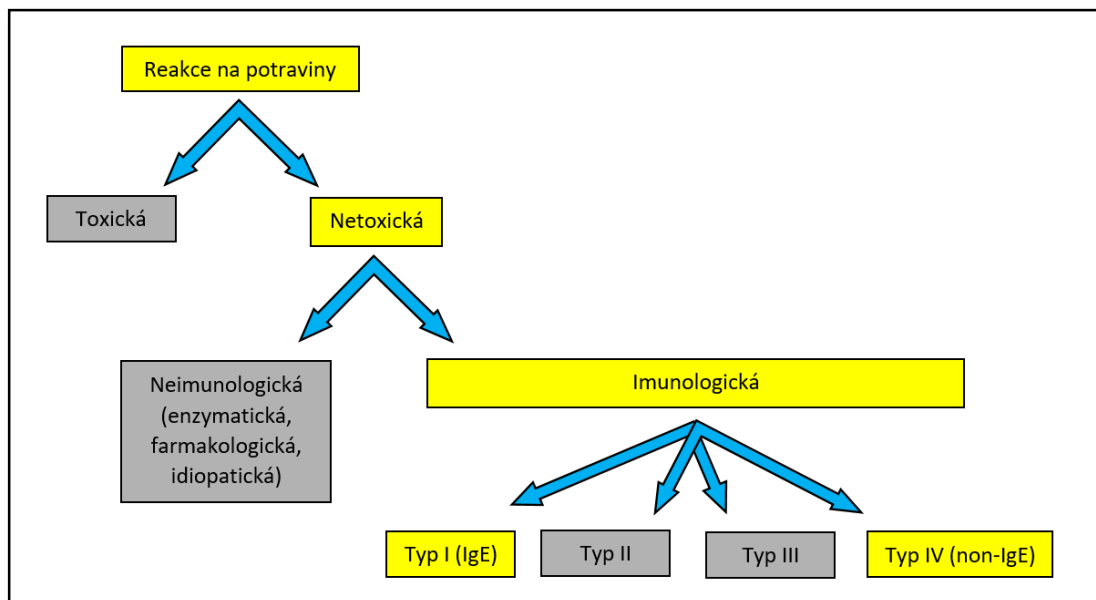
#### 3.1.1 Dělení potravinových alergií

Pojem alergie poprvé použil vídeňský pediatr Clemens von Pirquet v roce 1906. Původně termín zahrnoval nejen přecitlivělost, ale také imunitu. Dnes je alergie chápána jako imunopatologický stav, tedy projev imunologické přecitlivělosti (Vernerová, 2012). Potravinovou alergii tedy můžeme definovat jako imunoglobulinem (Ig) E mediovanou hypersenzitivní reakci na potraviny (Hong et al., 2009; Liu et al., 2011). Je to systémová reakce vznikající po požití konkrétního alergenu (Rochr et al., 2004).

Negativní odezvu na potraviny může vyvolat několik mechanismů (Obrázek 1), které jsou děleny na toxické a netoxické. Netoxické reakce mohou i nemusí být řízeny imunologicky (Valenta et al., 2015). Jako potravinové alergie často pacienti mylně označují intolerance, které nejsou řízeny imunitním systémem a mohou být enzymatické, farmakologické či idiopatické. Nejvíce dochází k intoleranci sacharidů, především laktózy, která postihuje 20 - 30 % evropské populace (Kopelentová a Vernerová, 2016). Méně častá, ale přesto velmi závažná, je reakce imunologická. Postihuje miliony lidí a může vyvolat život ohrožující odezvy organismu, vedoucí až ke smrti. Dělíme ji do čtyř kategorií označených římskými čísly I, II, III a IV.

Nejběžnější forma je reakce typu I (Valenta et al., 2015), která odpovídá časně přecitlivělosti (Kopelentová a Vernerová, 2016) a zahrnuje uvolňování histaminu a dalších mediátorů z mastocytů a bazofilů zprostředkované imunoglobulinem E (Buelow, 2015). Je typická pro sennou rýmu či alergické astma a předpokládá se, že příznaky ji doprovázející, slouží k vypuzení patogena ze sliznic respiračního a trávicího traktu (Rajan, 2003). Další důležitou skupinou je reakce oddáleného typu, označená římským číslem IV, často také nazývaná non-IgE a je to reakce zprostředkovaná buněčnými mechanismy (Kopelentová a Vernerová, 2016). Nepodílejí se na ní protilátky, ale přímo T lymfocyty (Buelow, 2015) a hraje významnou roli v poruchách jako například celiakie (Valenta et al., 2015). Oba tyto mechanismy se mohou navzájem kombinovat (Kopelentová a Vernerová, 2016).

Dalšími již méně častými reakcemi je typ II a III. Reakce typu II (tj. cytotoxická hypersenzitivní reakce) zahrnuje protilátky imunoglobulin G nebo imunoglobulin M vázané na povrchové buněčné antigeny s následnou fixací komplementu. Reakce typu III zahrnují cirkulační imunitní komplexy antigen-protilátka, které se ukládají v cévách s následnou fixací komplementu. Oba typy těchto reakcí mohou být vyvolány podáním léčiv či bílkovin, jež způsobí v organismu onemocnění, jakými jsou například hemolytická anémie nebo sérová nemoc (Buelow, 2015).



**Obrázek 1:** Dělení reakcí na potraviny

**Zdroj:** Valenta et al., 2015 (upraveno autorem diplomové práce)

### 3.1.2 Vznik potravinové alergie

Při běžném vystavení potravinovým alergenům má v organismu dojít k toleranci, tedy k potlačení jakékoliv nepříznivé reakce (Fuchs, 2008). Rozhodující vliv hraje imunitní systém (Akdis and Akdis, 2009), který slouží k obraně proti napadení hostitele patogeny. Tento obranný proces musí být přísně regulován, aby se zabránilo abnormálním reakcím na neškodné environmentální antigeny, komensální organismy (Kelsall, 2008) nebo tkáně vlastního organismu (Akdis and Akdis, 2009). V případě, že tento systém mylně považuje alergen za látku škodlivou, vyvolá hypersenzitivní reakci a dojde k projevu alergie (Fuchs, 2008).

Klíčovou roli hrají B-lymfocyty, které jsou součástí adaptivního mechanismu imunitního systému a zprostředkovávají humorální imunitu produkcí protilátek. Důležitý je vznik paměťových buněk, díky nimž dokáže imunitní systém při opakovaném setkání s antigenem rychle a silně reagovat a tím stupňovat projevy alergie. Každý B-lymfocyt exprimuje unikátní protilátky a receptory, které jsou velmi variabilní a dokáží rozpoznat velké množství různých antigenů a vyvolat obranou reakci proti infekci. Jsou také důležité pro prezentaci antigenů T-lymfocytům, s nimiž musí být schopny vzájemně kooperovat (Ghraichy et al., 2017).

Alergie může být nastartována vrozenými mechanismy, které jsou geneticky podmíněny a jsou označovány jako atopie. Převažuje zde vznik subpopulace Th2 lymfocytů, produkujících protizánětlivé chemokiny a cytokiny, jako jsou například interleukiny IL-4, IL-5, IL-13 aj. Kromě genetiky hraje významnou roli také imunologická a enzymatická nezralost trávicího traktu a dysbalance střevní mikroflóry (Fuchs, 2008).

#### 3.1.2.1 Senzibilizace

První indukce alergické imunitní odpovědi při setkání s alergenem se označuje jako alergická senzibilizace (Valenta et al., 2015). Může být vyvolána potravinovým alergenem nebo pylem, který dráždí dýchací cesty (Fernandez-Rivas et al., 2006).

Nejčastějšími potravinovými alergeny bývají bílkoviny o molekulové hmotnosti 5 - 100 kDa. Potencionální potravinový alergen je obvykle ve vodě rozpustný a málo imunogenní antigen, na který reagují imunokompetentní buňky střevní sliznice (Fuchs, 2008).

### 3.1.2.2 Gastrointestinální trakt

Gastrointestinální trakt je nepřetržitě vystavován extrémně složité směsi antigenů (Kelsall, 2008), a musí umět reagovat na potenciálními patogeny v potravě. Jako ochranná bariéra slouží střevní epitel, což je vrstva jednotlivých buněk, podporující transport živin a vody a zároveň sloužící jako ochrana proti toxinům, nežádoucím bakteriím a antigenům. Střevní epitel musí být schopný rychlé regenerace při poškození tkáně a jakékoliv narušení této bariéry může vést k mnoha imunologicky řízeným onemocněním, zahrnujícím záněty, potravinové alergie či celiakie. Střevní sliznice je složena z mnoha typů epiteliálních buněk se specifickými funkcemi. Tyto buňky musí být schopné utvářet slizniční imunitu a tím udržovat homeostázi ve střevě (Jeon et al., 2013). Většina buněk imunitního systému se nachází právě pod povrchem sliznic. Slizniční imunitní systém (MALT) zahrnuje 80 % všech imunokompetentních buněk v těle. Jsou rozptýlené pod a mezi epiteliálními buňkami a slouží k ochraně proti vniku nežádoucích patogenů. Tkáň je bohatá na dendrické buňky, makrofágy a B lymfocyty (Vernerová, 2008).

### 3.1.2.3 Střevní mikroflóra

Epiteliální buňky mají také za úkol kontrolovat bakterie asociované na povrchu sliznice. Pro zdraví hostitele je důležité, aby střevní mikroflóra nebyla narušena (Jeon et al., 2013) a buňky sliznice byly schopny koexistovat s prospěšnou mikroflórou bez vyvolání zánětlivé reakce (Bischoff et al., 2014). Fyziologická střevní mikroflóra je reprezentována bifidobakteriemi a laktobacily a vytváří příznivé podmínky pro trávicí procesy, optimální pH, výživu epitelu, vytěsňování patogenů i jejich toxinů, usnadnění proteolýzy a řadu dalších funkcí. Tuto mohutnou, ale zároveň velmi křehkou bariéru snadno oslabíme dietními chybami, stravou bohatou na tuky, bílkoviny i nekvalitní cukry či nadměrným užíváním antibiotik. Dodávkou probiotické vlákniny, což jsou pro člověka nestravitelné oligosacharidy, nezbytnou probiotickou flóru naopak posílíme (Fuchs, 2008).

Střevní mikroflóra vytváří ochrannou bariéru obsazením potencionálních vazebných míst střevní výstelky. Mezi bakteriálními druhy zde dochází ke kompetici o receptory, a pokud jsou vazebná místa již obsazena komenzálními bakteriemi, nemohou patogenní bakterie proniknout k slizničnímu povrchu. Dochází zároveň ke kompetici o živiny, vitamíny a růstové faktory a vlastní bakteriální mikroflóra likviduje nežádoucí mikroorganismy produkcí látek, jež



mají baktericidní účinky (Vernerová, 2008) podobně jako žaludeční šťávy či pankreatické enzymy (Viggiano et al., 2015). Při optimálním složení dochází k indukci imunitní reakce, která vede k tvorbě cytokinů, které navozují toleranci. MALT musí neustále hlídat rovnovážný poměr mezi všemi druhy lymfocytů, aby nedošlo k poškození vlastních tkání (Vernerová, 2008). Na mikroflóře střev, slizniční imunitě, změnách hlenové vrstvy či poškození epitelu je závislá střevní propustnost, na kterou má vliv i řada dalších faktorů souvisejících se životním stylem, jako je strava, alkohol a psychická zátěž (Bischoff et al., 2014).

### **3.1.3 Faktory ovlivňující potravinové alergie**

Potravinové alergie postihují přibližně 5 - 8 % dětí (Hong et al., 2009) a až 2 % dospělých (Hoffmann-Sommergruber and Mills, 2009). Obecně se předpokládá, že stejně jako ostatní alergická onemocnění, jako je astma a atopická dermatitida, je ovlivněna jak environmentálními, tak genetickými faktory (Hong et al., 2009).

#### **3.1.3.1 Genetické faktory**

Genetické faktory ovlivňující alergie jsou prokázány řadou studií. Dědičnost je polygenní a nedědí se přímo určité alergické onemocnění, ale predispozice k jeho rozvoji. Podle epidemiologických dat je riziko alergie u dítěte bez genetické zátěže 20 %, v rodinách s jedním alergickým rodičem 40 % a u dětí s oběma alergickými rodiči až 80 % (Vernerová, 2012). Alergie se také často objevuje mezi sourozenci. U jednovaječných dvojčat je 64% pravděpodobnost, že alergii budou mít obě děti (Lack, 2012).

Alergie jsou geneticky heterogenní skupina. V genetické výbavě člověka jsou geny jak rizikové tak protektivní (Vernerová, 2012) a navíc se zde vyskytuje genetický polymorfismus (Cochrane et al., 2009). Imunologická reaktivita je regulována prostřednictvím mnoha cytokininů, jejich receptorů a transkripčních faktorů (Vernerová, 2012).

Genetické faktory však působí v interakci s environmentálními podmínkami (Tan et al., 2011). Jsou ovlivňovány velkým množstvím zevních činitelů, jako jsou viry, mikroby a další škodliviny ve vzduchu, vodě a v zemi (Špičák, 2014).

### 3.1.3.2 Negenetické faktory

Prevalence potravinové alergie se v Evropě a USA zvyšuje a je často označována jako alergická epidemie (Kopelentová a Vernerová, 2016). Přesto, že jsou genetické faktory pro její rozvoj důležité, časová perioda, ve které k tomuto výraznému vzrůstu došlo, není dostatečně dlouhá pro modifikaci genetické informace člověka, která by vedla k takto dramatickým změnám (Abelius et al., 2014). Ačkoliv potravinových alergií přibývá celosvětově, v rozvojových zemích je výskyt výrazně nižší. Riziko bude tedy alespoň částečně ovlivněno životním prostředím a stylem života ve vyspělých zemích (Tan et al., 2011).

Dříve se vycházelo z tzv. hygienické hypotézy, která se týkala vlivu dnešního života ve sterilnějším prostředí. Dnes se již uvádí hypotéza biologické diverzity vycházející z finského výzkumu. Můžeme si pod ní představit různorodost celého ekosystému včetně rostlin, zvířat, lidí, mikroorganismů a jejich genetickou variabilitu. Zjistilo se, že lidé žijící v rozmanitém prostředí, například mezi zvířaty, měli k alergenům vyšší toleranci. Populační exploze, modernizace života, urbanizace, zcela zásadní změny životního stylu a stravování ve srovnání s obdobím před 100 lety vedou k určité uniformitě a ztrátě biodiverzity organismů i jejich životního prostředí a to může vést k poruchám imunity, jinému vnímání nebezpečí a průběhu zánětlivých reakcí (Petrů, 2014).

Významné je i narušení střevní bariéry v důsledku stravy, alkoholu, stresu (Bischoff et al., 2014), působení toxinů či antibiotik. Například příliš nízké nebo příliš vysoké množství bílkovin přijímaných v potravě může vést k nesprávné fyziologické funkci slizničního imunitního systému (Fuchs, 2008). To vše ve svém důsledku vede ke klinickým projevům civilizačních onemocnění, jakým je právě alergie (Petrů, 2014).

Rozdíly v prevalenci potravinové alergie můžeme také pozorovat na odlišných rasách, etnicitách nebo v různém věku (Hong et al., 2012), dle některých studií jsou rozdíly i mezi muži a ženami (Lack, 2012). U malých dětí jsou nejčastějšími spouštěči kravské mléko, slepičí vejce, pšeničná mouka, arašídý, stromové ořechy, sója a mořské plody. U dospělých lidí je to ovoce, zelenina, arašídý, stromové ořechy, ryby a mořské plody (Bělohávková, 2015). Významná je též zeměpisná poloha, s níž souvisí odlišné stravovací zvyklosti v různých částech světa (Bělohávková a kol., 2015). Jako příklad můžeme uvést specifickou alergii na polévky z ptačích hnízd v Singapuru (Lack, 2012), častý výskyt alergie na celer ve Švýcarsku,

slunečnicové semeno v Řecku či české specifikum alergie na mák (Bělohlávková, 2015). Důležitá je také intenzita a časování první expozice jednotlivých alergenů nebo typ pylové senzibilizace (Bělohlávková a kol., 2015). Pacienti z Ameriky vykazují zvýšenou frekvenci protilátek na Ara h 1, 2 a 3, naproti tomu pacienti ve Španělsku jsou senzibilizováni proteiny Ara h 9 a ve Švédsku Ara h 8 (Lack, 2012). U alergie na kiwi, je většina alergiků střední Evropy senzibilizována převážně Bet v 1 homologní bílkovinou Act d 8, naopak na jihu Evropy dominuje bílkovina z rodiny profilinů Act d 9 a lipid transfer proteinů Act d 10 (Bělohlávková a kol., 2015).

Významnou roli v potravinových alergiích hraje také epigenetika zahrnující studium dědičných změn genové exprese nezávisle na změnách sekvencí DNA (Tan et al., 2011). Navzdory rostoucímu počtu studií zaměřených na příčinu vzniku alergických onemocnění není přesná příčina stále zcela jasná (Allen and Koplin, 2012), ale je zřejmé, že environmentální změny působí v interakci s genetickými predispozicemi. Pozornost by se proto měla věnovat nejen dědičnosti, ale také postnatální expozici s alergeny a životnímu stylu (Abelius et al., 2014).

### **3.1.4 Kritické období pro vznik potravinové alergie**

Již prenatální období je považováno za kritické pro rozvoj alergie. Mezi matkou, prostředím a jejím životním stylem během těhotenství a potravinovými alergiemi u jejích potomků je úzký vztah. Vliv může mít matčina výživa, kouření či působení mikrobů. Většina potravinových alergií se ale vyvíjí v prvních letech života, a proto je toto období považováno za kritické pro rozvoj imunitních odchylek a atopie (Hong et al., 2012). Dítě se narodí s nezralým imunitním systémem, který se postupně vyvíjí pod vlivem vnějšího prostředí a ataky na sliznici dýchacího a trávicího traktu. Zprvu je pasivně chráněno protilátkami matky, které mu předá kojením (Bystroň, 2016), proto se v rámci primární prevence vzniku alergie doporučuje plné kojení novorozenců a kojenců do 4. měsíce věku, ale mezi 4. až 6. měsícem již postupné zavádění nemléčné stravy (Petrů, 2014). Dnes již byly teorie o prodloužení doby kojení a pozdějšího odstavení na pevnou stravu zpochybněny a klinické testy naopak dokazují, že dřívější orální kontakt s potravinovými alergeny indukuje toleranci a vyhýbaní se alergenům v těhotenství, kojení a dětství nemá význam (Lack, 2012). U dětí se také doporučuje bezdůvodně netlumit kontakt s životním prostředím včetně domácích zvířat, posilovat imunitu

děti pobýtem v přírodě, cvičením a zdravou stravou, užíváním probiotik a antibiotika brát jen v případě, že je to opravdu nutné (Petru, 2014).

### **3.1.5 Diagnostika a léčba potravinových alergií**

U diagnostiky potravinové alergie je důležité znát anamnézu pacienta. Zjišťuje se, jaká potravinová reakce vyvolala, za jak dlouhou dobu po expozici se rozvinuly příznaky a jakého byly charakteru (Kopelentová a Vernerová, 2016). Symptomy provázející alergické reakce mohou být kožní, (ekzém, kopřivka, zarudnutí), oční, gastrointestinální (bolesti břicha, zvracení, průjem, zácpa, křeče, krev či hlen ve stolici), dýchací (kašel dušnost, stažení hrtanu, pískoty) a nejčastěji jejich kombinace. V krajním případě může dojít až k anafylaxi (Bělohávková, 2015), což je život ohrožující systémová reakce charakterizována respiračními a kardiovaskulárními příznaky (Kopelentová a Vernerová, 2016). Je to stav nepředvídatelný, náhlý, příznaky se rozvíjí velice rychle a potraviny patří mezi nejčastější spouštěče (Bělohávková, 2014). Důležité také je, zda reakce nastala po požití, kontaktu nebo inhalaci výparů, zda se reakce opakovala, jaké množství alergenu ji vyvolalo a zda byla potravinová tepelně upravena či nikoliv. U pacienta se zjišťují další onemocnění a rodinná anamnéza. Úkolem alergologa je identifikovat spouštěcí potraviny a odlišit alergii od senzibilizace či intolerance. Pro diagnostiku se používají kožní testy, laboratorní vyšetření a eliminačně expoziční testy (Kopelentová a Vernerová, 2016).

Samotná léčba v současnosti probíhá experimentálně, takže jediným dostupným opatřením je vyvarování se alergenům a případné podání léků pacientovi s rizikem závažné reakce (Dubois et al., 2015). Používají se antihistaminika, kromoglykáty nebo u anafylaxe adrenalin, kortikosteroidy a dalších (Kopelentová a Vernerová, 2016). Informace o lidském genomu, urychlené sekvenování a příchod nových nástrojů a technologií, může významně přispět k předpovědi, prevenci a léčbě potravinových alergií (Hong et al., 2009).

### **3.1.6 Potravinové alergeny**

Za většinu potravinových alergií je zodpovědných 8 potravin. Je to kravské mléko, vejce, pšenice, sója, arašídy, ořechy, ryby, korýši a měkkýši (Kopelentová a Vernerová, 2016). Dnes je již povinné značení těchto základních alergenů na potravinářských výrobcích (Bělohávková,

2014). Alergie na mléko, vejce či pšenici se rozvíjí v dětství a později se vyvíjí tolerance, naopak alergie na ořechy, arašídů či ryby během života zůstává (Valenta et al, 2015). Existuje i mnoho dalších alergií, například na sezam, hořčici, ovoce, zeleninu či alergie na savčí a drůbeží maso. V evropské populaci nejčastěji způsobuje alergii ovoce (1 - 4 %), z toho nejvíce broskve, jablko a kiwi. Významná je také zelenina (1,4 %), hlavně mrkev a celer a také ořechy (4 %), zejména lískové (Kopelentová a Vernerová, 2016). Z českého registru potravinových alergií DAFALL (Database of Food Allergy) z roku 2015 vyplývá, že z testovaných 275 pacientů vykazuje největší počet (37,7 %) alergii na kravské mléko a výrobky z něj včetně kojeneckých mlék, na druhém místě se umístily stromové ořechy a za nimi následovalo ovoce (26,1 %), 58 pacientů mělo alergii na jablka, 15 na broskve a 13 na kiwi. Na dvě a více potravin reagovalo 44,7 % pacientů a s věkem se také zvyšoval i průměrný počet alergizujících potravin na pacienta, což je dáno zejména vzrůstajícím počtem osob reagujících na potraviny v rámci zkřížené alergie a pylově-potravinového syndromu (Bělohlávková a kol., 2015).

## **3.2 Jablka**

### **3.2.1 Význam jablek v lidské výživě**

Konzumace ovoce a zeleniny je základem zdravé denní diety a prevence mnoha závažných onemocnění. Přispívá k redukci kardiovaskulárních chorob, astmatu, diabetu i rakoviny. Tyto vlastnosti mají díky obsahu vitamínů, minerálů, vlákniny a sekundárních metabolitů fenolů, flavonoidů a karotenoidů, které hrají významnou antioxidační roli (Paris et al., 2017). Jablka jsou jedno z nejčastěji konzumovaného ovoce v Evropě (Fernandez-Rivas et al., 2006) a jsou považovány za hlavní funkční zdroj potravin. Jsou ekonomicky velice důležitou plodinou (Igarashi et al., 2016), celoročně dostupnou (Kiewning and Schmitz-Eiberger, 2013) a šlechtitelé z celého světa nepřetržitě množí nové kultivary s lepšími vlastnostmi (Igarashi et al., 2016). Bohužel stále větší počet konzumentů je kvůli alergii musí vyřadit z jídelníčku (Pagliarani et al., 2013), což má často za následek nedostatek nutričně hodnotných složek (Gilissen et al., 2005). Byla zaznamenána u 0,4 % - 6,6 % dospělých a 2,2 - 11,5 % dětí ve věku do 6 let a z toho bylo 8,5 % dětí bylo alergických přímo na jablko. (Kiewning and Schmitz- Eiberger, 2013).

### 3.2.2 Alergeny u jablek

Alergie způsobená jablek je jednou z nejčastějších potravinových alergií. V rozsáhlém celoevropském průzkumu se umístila na čtvrtém místě a z plodů čeledi *Rosaceae* na místě prvním (Pagliarani et al., 2013). Často se vyskytuje u obyvatel střední a severní Evropy, v menší míře pak v Evropě jižní (Kiewning and Schmitz- Eiberger, 2013). Kultivary se mezi sebou liší alergenními vlastnosti (Gilissen et al., 2005; Nybom et al. 2013; Pagliarani et al., 2013) od málo alergenních odrůd až po odrůdy způsobující reakce u většiny pacientů (Paris et al., 2017). Jako nejvíce alergenní se jeví kultivar 'Golden Delicious', méně pak například odrůda 'Gloster' a naopak odrůda 'Santana' vyšlechtěna v Holandsku, kde je alergie na jablka velice častá, se jeví jako hypoalergenní pro 75 % pacientů. Většina z nich ji proto může běžně zařadit do jídelníčku (Gao et al., 2008).

Obsah alergenů je kromě rozdílného genotypu dle kultivaru také závislý na biotických a abiotických faktorech (Ahammer et al., 2017). Významnou roli hrají podmínky růstu (Paris et al., 2017), stupeň zralosti, délka (Pühringer et al, 2000) a podmínky skladování (Kiewning and Schmitz- Eiberger, 2013). V čerstvě sklizených jablkách je obsah alergenů menší (Pühringer et al, 2000), například koncentrace hlavního alergenu Mal d 1 je v čerstvého plodu po sběru 1 - 30 µg na g, ale během skladování obsah může vzrůst až na 100 µg na g (Ahammer et al., 2017), což je způsobeno silným vystavením plodů biotickému i abiotickému stresu v období po sklizni (Buron-Moles et al., 2015). Výrazně vyšší je také obsah alergenů ve slupce oproti dužině (Ahammer et al., 2016).

#### 3.2.2.1 Hlavní alergeny jablek

Alergická reakce na jablka je způsobena 4 hlavními proteiny Mal d 1, Mal d 2, Mal d 3 a Mal d 4 (Tabulka 1), jež se z genů exprimují v různé míře (Gomez et al., 2014). Označení Mal d vychází z rodového (*Malus*) a druhového (*domestika*) názvu organismus, ze kterého byl alergen izolován a číslem je pak označena konkrétní formu alergenu (Marsh et al., 1988). Tyto proteiny se v rostlinách exprimují primárně jako obrana proti nepříznivým vlivům. Můžeme je zařadit do skupiny PR-proteinů (pathogenesis-related proteins), které se tvoří jako odpověď na napadení houbovými organismy, bakteriemi, viry nebo za nepříznivých podmínek, jakými je osmotický stres (Breiteneder, 2004), zvýšená koncentrace ozónu nebo těžkých kovů v okolním

prostředí (Koistinen et al., 2002). Dělíme je do 14 rodin, z nichž nejvýznamnější pro studium alergií jsou skupiny PR-10, PR-5 a PR-14 (Breiteneder, 2004).

Hlavní alergen u jablek Mal d 1 je protein s molekulovou hmotností 18 kDa a můžeme ho zařadit do skupiny PR-10, což jsou proteiny podobné ribonukleázám, kódované geny Ypr10 (Pühringer et al., 2000). Mal d 2 je protein s molekulovou hmotností 23 kDa a je řazen do skupiny PR-5, které jsou homologní k thamatinu, což je bílkovinné sladidlo izolované ze západoafrického keře *Thaumatococcus daniellii*, a proto byla tato skupina označena jako thaumatin-like proteins (TLP), u nich byly prokázány fungicidní účinky (Breiteneder, 2004). Mal d 3 je alergen s molekulovou hmotností 13 kDa (Sánchez-Monge et al., 1998) a je řazen do skupiny lipid transfer proteinů (LTP), které se v jablkách nachází ve formě nespecifických LTP (Thoma et al., 1993), které patří do skupiny PR-14 (Kondo and Urisu, 2009). Hlavními funkcemi je obrana rostlin proti houbovým a bakteriálním patogenům (Hoffmann-Sommergruber and Mills, 2009) a kromě vrozené imunity rostlin mají na starosti také vazbu a transport lipidů (Finkina et al., 2016).

Dalším významným alergenem je Mal d 4, což je protein homologní ke genové rodině profilinů (Gomez et al., 2014). Profiliny mají 12 – 15 kDa, jsou přítomny ve všech eukaryotických buňkách (Asero et al., 2008) v cytosolu (Hoffmann-Sommergruber and Mills, 2009), váží se na aktin a tím kontrolují jeho dynamiku a hybnost buněk (Di Nardo et al., 2000) a hrají klíčovou roli v intracelulárním transportu, morfogenezi buněk a dělení (Hoffmann-Sommergruber and Mills, 2009).

**Tabulka 1:** Hlavní třídy alergenů jablek

<b>Alergen</b>	<b>Zařazení</b>	<b>Funkce</b>
<b>Mal d 1</b>	Ribonuclease-like protein - PR-10	Stresové situace, napadení patogeny
<b>Mal d 2</b>	Thaumatatin-like proteiny (TLP) - PR-5	Stresové situace, napadení patogeny
<b>Mal d 3</b>	Lipid transfer proteiny (LTP) - PR-14	Transport lipidů, imunita
<b>Mal d 4</b>	Profiliny	Vazba na aktin, hybnost buňky, transport, morfogeneze, dělení

### 3.2.2.2 Alergen Mal d 1

Z genů odpovídajících za alergii se v oblastech střední a severní Evropy zdá jako hlavní alergen Mal d 1 (Pagliarani et al., 2013), který byl poprvé izolován, charakterizován a klonován v roce 1995 (Vanek-Krebitz et al., 1995). Tento protein má molekulovou hmotnost 18 kD a způsobuje alergii typu I (Pühringer et al., 2000). Mal d 1 je ve skutečnosti genová rodina skládající se z 31 různých lokusů (Obrázek 2) a každý z nich kóduje jiný isoalergen. Navíc pro každý gen isoalergenu existuje řada mírně odlišných alel, které mohou kódovat jeho odlišné varianty, jež zvyšují variabilitu Mal d 1 proteinů (Pagliarani et al., 2013). Bylo identifikováno mnoho izoform dělených do skupin dle podobnosti sekvencí DNA. Významné izoformy jsou Mal d 1.01, Mal d 1.02, Mal d 1.03, Mal d 1.04, Mal d 1.05, Mal d 1.06. Izoformy se shodují ve více než 97 % sekvencí a vzhledem k tomu, že nejsou kultivarově specifické, je jejich alergenicita způsobená rozdílnou mírou exprese. Nejrozšířenější formy v jablkách jsou Mal d 1.01 a Mal d 1.02 (Gao et al., 2008; Ahammer et al., 2017).

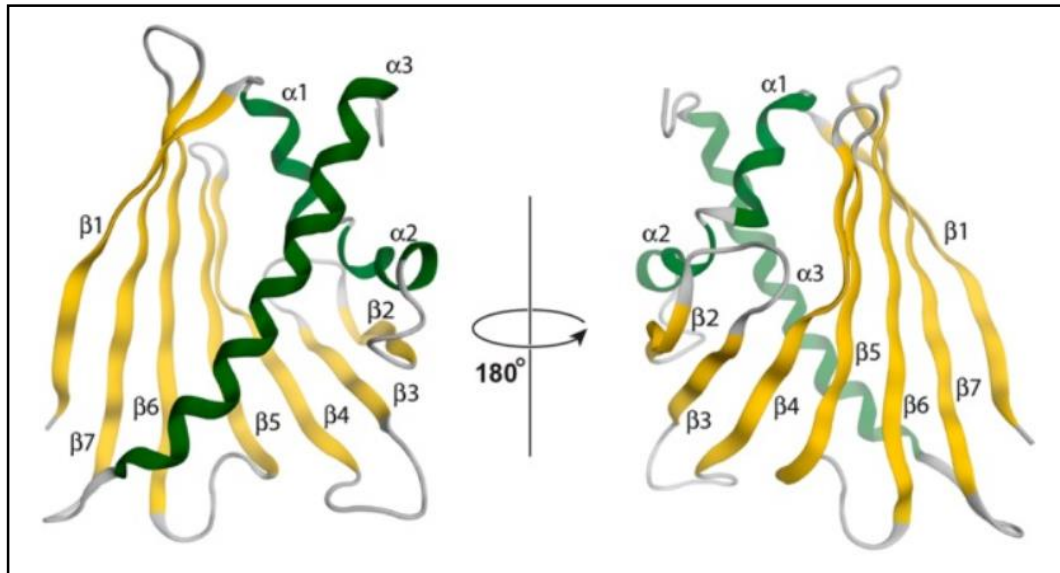


**Obrázek 2:** Části sekvencí kódujících 31 lokusů *Mal d 1* genů (červeně vyznačené jsou nukleotidy (SNP) specifické pouze pro izoformy *Mal s 1.01* a *Mal d 1.02*)

**Zdroj:** Pagliarani et al., 2013



Mal d 1 má trojrozměrnou strukturu, skládá se ze sedmi antiparalelních  $\beta$ -skládaných listů a třech  $\alpha$ -helix (Obrázek 3, Ahammer et al., 2017). Má 158 - 159 aminokyselin kódovaných 480 - 483 nukleotidy (Gao et al., 2005).



**Obrázek 3:** Struktura alergenu Mal d 1.0101

**Zdroj:** Ahammer et al., 2017

Dosud není k dispozici žádná spolehlivá metoda pro kvantifikaci celkového obsahu proteinů Mal d 1 nebo jednotlivých izoforem, ale je možné studovat relativní expresi genů, jež tyto proteiny kódují (Paris et al., 2017).

### 3.2.2.3 Zkřížená reakce alergenů Mal d 1 a Bet v 1

Zkřížená reakce mezi alergeny (Tabulka 2) vzniká na základě jejich homologie, kdy IgE protilátky rozpoznají a následně vyvolají imunitní odpověď na podobné struktury proteinů. Tyto proteiny se nachází v blízké příbuzných druzích nebo se řadí do stejné proteinové rodiny, protože plní v různých organismech napříč druhy stejnou funkci (Popescu, 2015).

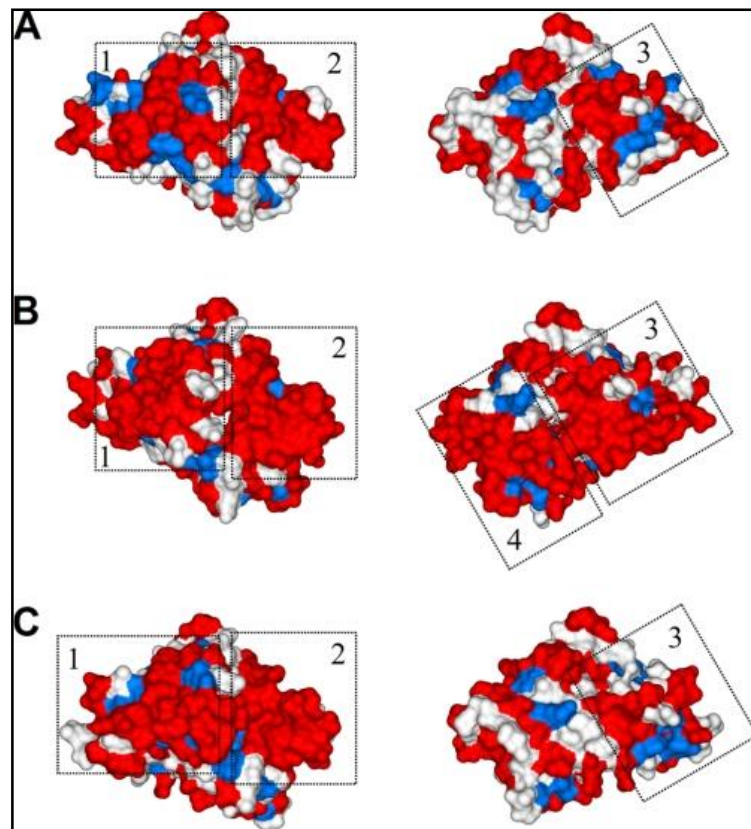
**Tabulka 2: Zkřížená reaktivita mezi rostlinnými druhy**

**Zdroj: Popescu, 2015**

Syndromy zkřížené reaktivity	Alergeny
Bříza – jablko	Bet v 1 homologní Mal d 1
Cypřiš - broskev	Pru p 3 a nsLTP
Celer – pelyněk – koření	Art v 4 profilin, Art v 60 kDa homologní Api g 5
Pelyněk – broskev	Art v 4 profilin, Art v 3 LTP
Pelyněk – heřmánek	Art v 1
Pelyněk – hořčice	Art v 3 LTP, Art v 4 profilin, Art v 60 kDa
Ambrózie – meloun – banán	Amb a 6 LTP, Amb a 8 profilin
Merlík - meloun	Che a 2 profilin

U alergií na jablka je významná senzibilizace pylem břízy (*Betula L.*) na základě zkřížené reaktivity pyl-potravina (Popescu, 2015). Bříza (*Betula L.*) roste v mírném pásmu v oblastech severní polokoule (Hao et al., 2016) a na jaře během dubna a května uvolňuje až 500 zrn pylu na m<sup>3</sup> (Holm et al., 2011). Vystavení pylovým alergenům břízy je hlavní důvod alergických rým v Evropě a jedním z nejčastějších spouštěčů respiračních onemocnění (Hao et al., 2016). Campana et al. (2010) uvádí, že alergií na pyl břízy trpí nejméně 100 milionu pacientů. Hlavním alergenem břízy je protein Bet v 1 (Hao et al., 2016), na který má protilátky přibližně 90 % pacientů. Stejně jako Mal d 1 patří do skupiny takzvaných pathogenesis-related proteinů, konkrétně do skupiny PR-10 (Gilissen et al., 2005) a na základě toho může u pacientů dojít ke zkřížené alergii s jablečným alergenem Mal d 1 (Fernandez-Rivas et al., 2006). V těchto oblastech je kvůli jejich homologii s Mal d 1 hlavním alergenem (Paris et al., 2017) a zároveň ze všech potravin, které obsahují homologní proteiny k Bet v 1 je jablko nejčastějším spouštěčem alergie (Ahammer et al., 2017). Gomez et al. (2014) uvádí, že až 60 % pacientů alergických na březový pyl, má slabé reakce při požití jablek. Základem pro tuto křížovou reaktivitu jsou společné epitopy, jež sdílejí na základě podobnosti aminokyselinových sekvencí (Kiewning and Schmitz- Eiberger, 2013; Gepp et al., 2014). Uvádí se, že sdílejí 55 - 65 % společných aminokyselinových sekvencí (Holm et al., 2011).

V zemích jižní Evropy se naopak častěji vyskytují zkřížené reakce pylu břízy s ostatními druhy ovoce, zejména s broskvemi. V oblastech Středomoří je původ alergií na jablka přisuzován hlavně senzibilizaci vyvolanou lipid transfer proteiny (Gomez et al., 2014).



**Obrázek 4:** Model molekulárního povrchu Bet v 1 a dvou izoform Mal d 1

**Zdroj:** Holm et al., 2011

Homologii mezi Bet v 1 a Mal d 1 můžeme vidět na obrázku 4, kde je znázorněn model molekulárního povrchu Bet v 1 a dvou izoform Mal d 1, z předního a zadního pohledu, otočený o 180° okolo vertikální osy. Na modelu A jsou červenou barvou označeny sekvence z více jak 90 % shodné s Mal d 1 a modrou barvou sekvence z více než 90 % konzervativně substituované. Na modelech B a C jsou 2 izoformy Mal d 1. Model B znázorňuje aminokyselinové sekvence shodné s Bet v 1 z 65 % a model C z 55 %. Červenou barvou jsou opět značeny identické sekvence Bet v 1 a Mal d 1 a modrou barvou konzervativně substituované části. Zarámované části jsou oblasti, jež Bet v 1 a Mal d 1 sdílí společně (Holm et al., 2011).

Klinická pozorování pacientů s alergií na pyl břízy často ukazují kromě jablek na intoleranci i k dalším druhům ovoce a zeleniny (Ebner et al., 1994), jež obsahuje PR proteiny. Můžeme je nalézt v různých rostlinných čeledích, jako *Betulaceae*, *Rosaceae*, *Apiaceae* či *Fabaceae* (Pühringer et al, 2000). Po požití kiwi, mandlí, manga, chilli papriček, lískových ořechů (Kondo and Urisuy, 2009), jablek, hrušek, ořechů, mrkve, brambor, celeru, melounu,

broskve, meruňk, švestek, třešní a okurek aj. vykazuje alergické symptomy více jak 70 % pacientů. To se děje právě na základě homologie proteinů k Bet v 1 (Vanek-Krebitz et al., 1995), jež jsou rozpoznávány specifickými IgE protilátkami, které se tvoří v těle proti alergenům břízy (Gilissen et al., 2005).

#### 3.2.2.4 Symptomy doprovázející alergie na jablka a pyl břízy

Zkřížená reakce mezi hlavními alergeny břízy a jablka zapříčiňuje symptomy, které bývají často slabé a přechodné, ale výjimkou nejsou ani závažné život ohrožující reakce (Dubois et al, 2015).

Alergeny můžeme rozdělit na 2 skupiny. První skupina, kam patří vejce, mléko, pšenice, ořechy nebo ryby, jsou proteiny stabilní vůči zažívacím enzymům a jejich hlavním místem účinku jsou střeva. Naopak alergeny druhé skupiny, kam řadíme ovoce a zeleninu, se rychle rozpouští v ústní dutině a jsou snadno rozkládány trávicími enzymy. To je důvod, proč často způsobují pouze lokální symptomy omezené pouze na ústní dutinu, jež nazýváme orální alergický syndrom, zkráceně OAS (Kondo and Urisuy, 2009). Příznaky jsou obvykle slabé a přechodné (Dubois et al, 2015), objevují se lokálně v místě kontaktu, během několika minut po konzumaci (Ahammer et al., 2017). Zahrnují svědění v ústní dutině nebo otok rtů, jazyka, patra a hltanu, doprovázené bodavou bolestí s občasným svědění uší, pocitem svírání hrdla a obvykle samy postupně odstoupí (Kondo and Urisu, 2009). Může také dojít k senné rýmě, dušnosti (Ahammer et al., 2017), zánětu, ale výjimkou nejsou ani systémové reakce jako je kopřivka, astma, průjem či anafylaktický šok (Ebner et al., 1994; Vanek-Krebitz et al., 1995). To může například u jablečných alergenů způsobovat skupina TLP nebo nsLTP, které mají kompaktní struktury stabilizovanou 4 a 8 disulfidovými můstky, a proto jsou k vysoké teplotě a zažívání stabilní (Fernandez-Rivas et al., 2006). Potravinová alergie je nejčastější příčinou návštěv pohotovostí pacientů s anafylaxí (Hong et al., 2012). Může dojít i k pozdním příznakům, jako je zhoršení atopického ekzému i bez projevu OAS (Kinaciyan et al., 2016). Mal d 1 je citlivý nejen na štěpení pepsinem, ale také oxidaci a teplo (Kiewning and Schmitz-Eiberger, 2013), proto IgE reaktivita proteinů mizí po tepelném ošetření plodů (Pagliarani et al., 2013).

### 3.2.2.5 Léčba alergie na jablka a pyl břízy

V roce 1911 poprvé Leonardo Noon publikoval alergen-specifickou imunoterapii (AIT), jež má sloužit ke zmírnění alergických reakcí. Fungovala na principu protipylové imunizace (Aissa et al., 2016) a podávala se podkožními injekcemi v dávkách odvozených z hmotnostního pylového podílu. Dnes se alergenová vakcína podává nejen v injekční formě, ale také v kapkách či tabletách (Špičák, 2014).

Imunoterapie mění reakci na expozici alergenu vyvoláním imunologické tolerance. Alergeny přicházejí do kontaktu s povrchem sliznice dýchacích cest a vlivem jejich vlhkosti, dojde k jejich interakci s imunitním systémem. Alergen je navázán na specifické IgE protilátky, což vede k aktivaci mastocytů a bazofilů a rychlému uvolňování histaminu a dalších mediátorů přímo odpovědných za alergické příznaky. Navíc se aktivují alergen-specifické T-buňky, což vede k zánětlivé reakci. Krevní cévy se rozšiřují a vylučují plazmu a buňky do slizniční tkáně. Zánětlivá reakce aktivuje žírné buňky, bazofily, eozinofily, neutrofile a makrofágy a přitahuje je do sliznice dýchacích cest, což vede k zúžení průdušek a sekreci hlenu. Dochází k zčervenání očí, zaplavení slzami, vylučování vody z nosu, doprovázené svěděním patra, hrdla, očí a nosu. Když je alergen získán přirozenou expozicí, množství prezentované imunitnímu systému je poměrně nízké. Naproti tomu, pokud je podáván jako imunoterapie, je množství alergenu vysoké. Jedna dávka podávaná v imunoterapii odpovídá přibližně stonásobku odhadovaného maximálního ročního příjmu přirozenou expozicí. Rozdíl v množství podané dávky a rozdílného vstupu do těla má na imunitní systém jiný účinek a vyvolá toleranci alergenu (Larsen et al., 2016).

Stále je však diskutováno, zda úspěšná indukce klinické tolerance k Bet v 1 pomocí AIT s pylem břízy současně vyvolává toleranci vůči alergenům jablkem (Kopac et al., 2012; Kinaciyan et al., 2016), případně jaké dávky budou pro pacienty účinné (Berings et al., 2017). Některé studie uvádí redukci symptomů po léčbě AIT (Asero, 1998; Modrzyński et al., 2002; Asero, 2003; Bolhaar et al., 2004; Bucher et al., 2004), jiné klinický efekt nezaznamenaly (Herrmann et al., 1995; Hansen et al., 2004; Kinaciyan et al., 2007).

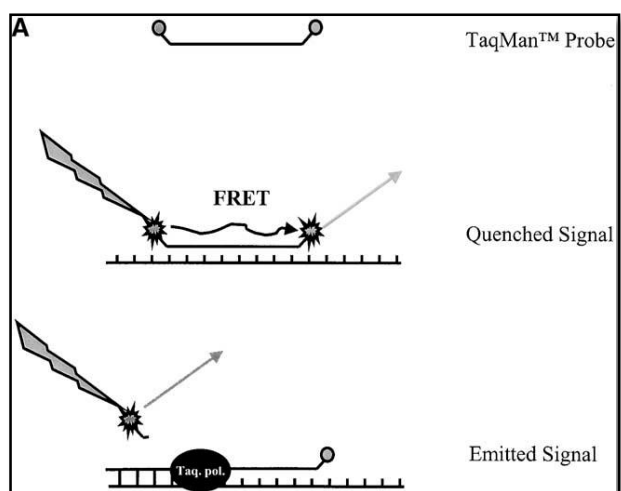
### 3.3 Studium exprese genů

Pro stanovení alergenicity plodů jabloní se využívá metoda založená na studiu relativní exprese genů. Tato metoda hraje důležitou roli v mnoha oblastech biologického výzkumu, je využívána pro monitorování biologických odpovědí na různé podněty (Heid et al., 1996) a má široké využití související s projevy mnoha onemocnění. Expresi genů lze stanovit metodou mikročipů, jimiž lze analyzovat stovky genů (Vandesompele et al., 2002; Pfaffl et al., 2004), nebo metodou kvantitativní PCR v reálném čase - qRT-PCR (Pagliarani et al., 2013).

#### 3.3.1 Kvantitativní PCR v reálném čase (qRT-PCR)

Kvantitativní PCR v reálném čase je metoda *in vitro* enzymatické syntézy a amplifikace specifických DNA sekvencí (Bermingham and Luetlich, 2003), jež se na rozdíl od klasické PCR vyznačuje kontinuálním zaznamenáváním množství DNA, jež se vytvořilo v průběhu cyklů (Pfaffl, 2001). Tuto metodu vyvinul v roce 1993 Higuchi et al. Původně byla videokamerou detekována změna množství dvouřetězcové DNA (dsDNA) v každém PCR cyklu na základě vzrůstajícího fluorescenčního záření ethidium bromidu, jež se navázal na duplex DNA (Higuchi et al., 1993). V současnosti se využívají speciální cykly (Pfaffl, 2001) s detektorem, který zaznamenává fluorescenci (VanGuilder et al., 2008). Intenzita fluorescenčního signálu, jež je emitována během amplifikace, vypovídá o množství dsDNA v každém cyklu (Kaltenboeck and Wang, 2005).

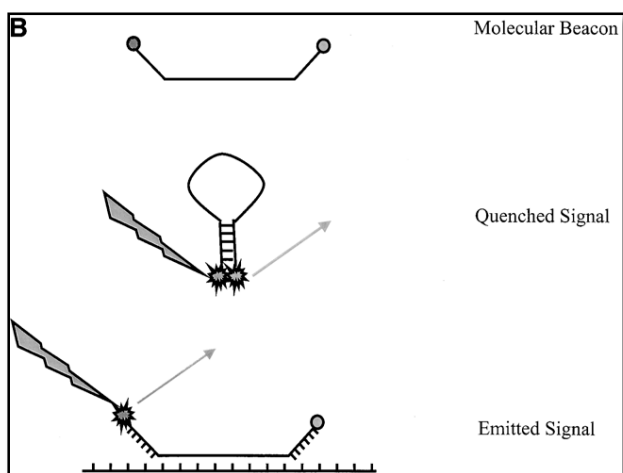
Jako fluorescenční substrát je využíváno několik zdrojů. Jedním z nich jsou hydrolyzační sondy TaqMan (Obrázek 5), které hybridizují s templátovým vláknem DNA. TaqMan sondy využívají 5'-3' exonukleázové aktivity Taq DNA polymerázy. Na 5' konci nesou reportérový fluorofor a na 3' konci zhášeč. Zhášeč blokuje emisi fluorescence z fluoroforu. Při syntéze nového vlákna je TaqMan sonda degradována DNA polymerázou a tím dojde k separaci fluoroforu a zhášeče a následně k emisi fluorescence (VanGuilder et al., 2008).



**Obrázek 5:** Schéma principu TaqMan sondy

**Zdroj:** Ginzinger, 2002

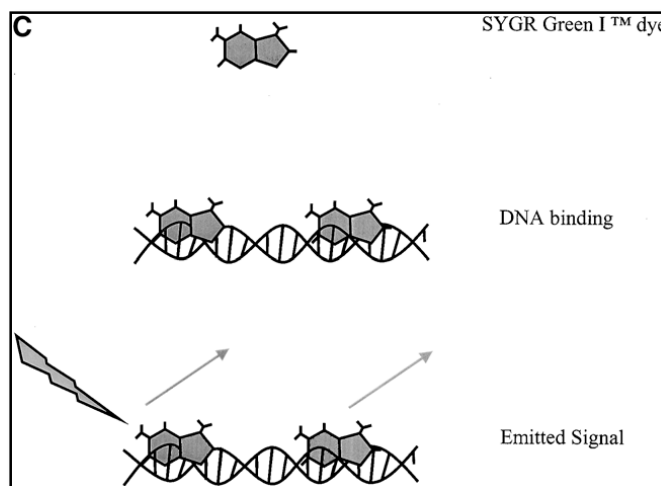
Dalším zdrojem fluorescenčního signálu mohou být fluorescenční vlásenky, například molecular beacons (Obrázek 6). Molecular beacons jsou jednořetězcové oligonukleotidy, jejichž konce jsou vzájemně komplementární, a proto vytvářejí vlásenku. Na jednom konci oligonukleotidu je fluorofor, na druhém je zhášec, který blokuje emisi fluorescence. Pokud je molekula vlásenky denaturovaná a hybridizuje s cílovou sekvencí, fluorofor je tím separován od zhášecce a dochází k emisi fluorescence (VanGuilder et al., 2008).



**Obrázek 6:** Schéma principu Molecular beacons

**Zdroj:** Ginzinger, 2002

Další metodou je SYBRGreen I (Obrázek 7), což je fluorescenčního barvivo, které se nespecificky váže do malého žlábků dsDNA (Pfaffl, 2001) a tím emituje záření (VanGuilder et al., 2008).



**Obrázek 7:** Schéma principu SYBRGreen 1

**Zdroj:** Ginzinger, 2002

Výhodou metody qPCR je její rychlost, vysoká citlivost, reprodukovatelnost (Pagliarani et al., 2013) a minimum postamplifikačních procesů, jež by mohly vést ke kontaminaci vzorku a nepřesných výsledků (Kaltenboeck and Wang, 2005).

### 3.3.1.1 Izolace RNA

Prvním krokem je izolace RNA, která je na rozdíl od DNA nestabilní, a proto je pro její zachování v neporušeném stavu nutné vzorky po odběru zmrazit kapalným dusíkem a skladovat v  $-80^{\circ}\text{C}$ . Pro samotnou izolaci je žádoucí využít spolehlivou metodu, jež zaručí získání kvalitní neporušené RNA a zároveň je důležité zajistit odstranění kontaminací genomickou DNA pomocí enzymu DNasa I. Pro vyhodnocení výtěžnosti lze využít spektrofotometr, jež měří množství RNA při vlnové délce 260 nm a vyhodnocuje též přítomnost nečistot z poměrů absorbancí  $A_{260/280}$ , která by měla být menší než 1,8 a  $A_{260/230}$  by měla být menší než 2 (Udvardi et al., 2008).



### 3.3.1.2 Reverzní transkripce

Dalším krokem je reverzní transkripce, tedy přepis RNA do komplementární DNA (cDNA) s využitím enzymu reverzní transkriptáza (Bermingham and Luettich, 2003). Pro maximální výtěžnost a získání adekvátní délky přepsané cDNA je nutné využít reverzní transkriptázu bez RnasaH aktivity, stejně jako kvalitní čisté oligo(dT) nukleotidy (Udvardi et al., 2008).

### 3.3.1.3 qRT-PCR

Stejně jako pro každou PCR reakci je důležité správné vytvoření primerů (Udvardi et al., 2008), které vychází ze znalosti sekvencí sledovaného úseku nukleové kyseliny, jež můžeme získat z databází a následně si k těmto sekvencím vytvořit *in silico* příslušné primery (Obrázek 8; Pagliarani et al., 2013). Primery jsou 15 - 40 nukleotidů dlouhé úseky, které se komplementárně vážou na opačné konce templátových vláken a slouží jako místa pro nasednutí DNA polymerázy. Důležité je, aby nebyly navzájem komplementární nebo netvářely sekundární struktury (Bermingham and Luettich, 2003).

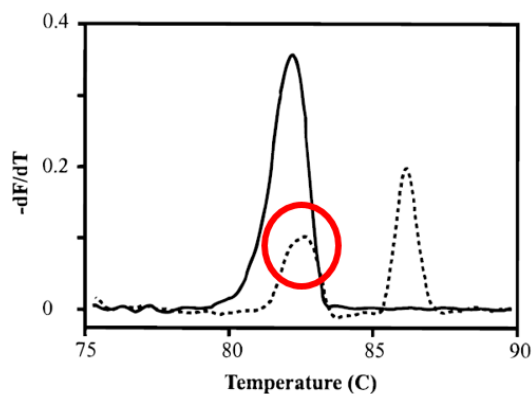
Gene	Primer name	Sequence 5'-3'	SNP cons <sup>a</sup>	SNP gene <sup>b</sup>	SNP allele <sup>c</sup>	Start position	Length (bp)	Primer conc.	T <sub>a</sub>	T <sub>m</sub>	Slope
<i>Mal d 1.01</i>	qMd1.01/02F	GATTGAAGGAGATGCTTTGACA	5	-	-	258	103	100	63	80.5	-0.079
	qMd1.01R	GTAAATGACTGATGCTCTTGATGG	-	1	1						
<i>Mal d 1.02</i>	qMd1.01/02F	GATTGAAGGAGATGCTTTGACA	4	-	-	258	111	100	62	81.0	-0.206
	qMd1.02R	TTGGTGTGGTAGTGGCTGATA	1	1	-						
<i>Mal d 1.06A</i>	qMd1.06AF	CTATAGCTATAGCTTGATTGAAGGG	5	1	-	243	167	100	61	80.5	-0.203
	qMd1.06AR	TTCCAACCTTAACATGTTCTTCT	3	-	1						
<i>Mal d 1.06B</i>	qMd1.06BF	AAACCGAATACGCATCCAT	3	3	1	20	106	100	61	81.5	-0.012
	qMd1.06BR	ACAGITTTGACTGCTTGTGGAG	6	-	-						

**Obrázek 8:** Primery pro amplifikaci genů *Mal d 1.01*, *Mal d 1.02*, *Mal d 1.06A* a *Mal d 1.06B* vytvořené *in silico* na základě sekvencí z databáze genomu rostlin z čeledi Rosaceae

**Zdroj:** Pagliarani et al., 2013

Pro kontrolu nespecifické amplifikace se využívá analýza teploty tání. Teplota, při které dochází k porušení vodíkových můstků mezi primery a žádoucí sekvencí, se nazývá teplota tání (T<sub>m</sub>) a je závislá na několika faktorech, např. počet GC bází, délka primerů, sekvence či heterozygotnost (Reed et al., 2007). LightCycler zaznamenává fluorescenční signály při různých teplotách cyklu a znázorňuje ho křivkou (Obrázek 9). V případě tvorby nespecifických produktů (např. primery-dimery), se v grafu zobrazí vyšší fluorescenční signál většinou při

nižších teplotách, protože tyto nescifické produkty mají často nižší teplotu tání než produkty specifické. Zobrazení pouze jednoho vrcholu křivky značí, že amplifikace probíhala specificky bez vzniku nežádoucích struktur (Kaltenboeck and Wang, 2005).



**Obrázek 9:** Křivka tání u heterozygotů s nescifickým amplikonem

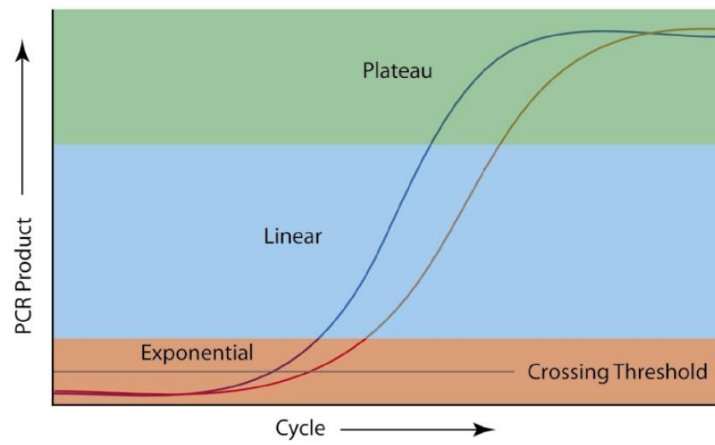
**Zdroj:** Wittwer et al., 2001

#### 3.3.1.4 Vyhodnocení exprese genů

Expres genů je relativní, a proto je nutné porovnávat studovaný gen s genem referenčním (Pfaffl, 2001). Referenční geny mají odlišnou sekvenci od sledovaného genu a musí vykazovat minimální variabilitu exprese v různých tkáních a fyziologických stavech organismu (Kozera and Rapacz, 2013). Nejčastěji se využívají „house keepingové“ geny (Teste et al., 2009), které jsou důležité pro udržení bazálních funkcí buňky, jsou tedy nezbytné pro její existenci bez ohledu na tkáň či organismus a musí se proto exprimovat neustále. Často využívaným genem je aktin (Eisenberg and Levanon, 2013).

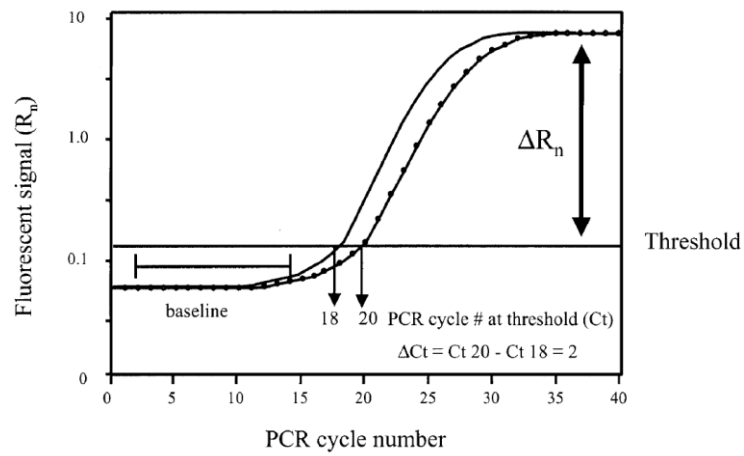
K vyhodnocení exprese se používá hodnota  $C_q$ , která odpovídá počtu PCR cyklů potřebných k vytvoření dostatečného fluorescenčního signálu k dosažení prahové hodnoty fluorescence (Obrázek 11; Ginzinger, 2002), kterému odpovídá nástup exponenciální fáze PCR cyklu. Na Obrázku 10 je hodnota  $C_q$  značena v místě, kde křivka protíná prahovou hodnotu fluorescence (VanGuilder et al., 2008). Tyto hodnoty  $C_q$  jsou přímo úměrné množství výchozího templátu a jsou základem pro výpočet hladin exprese genů (Ginzinger, 2002). Čím vyšší je hodnota  $C_q$ , tím bylo v reakci nižší počáteční množství DNA (Karlen et al., 2007). Díky této hodnotě můžeme porovnávat 2 vzorky za využití referenčního genu. Po odečtení

hodnoty  $C_q$  referenčního genu od  $C_q$  studovaného genu získáme hodnotu  $\Delta C_q$  a porovnáním mezi vzorky potom hodnotu  $\Delta\Delta C_q$  (Perkins et al., 2012).



**Obrázek 10:** Fáze PCR

**Zdroj:** VanGuilder et al., 2008



**Obrázek 11:** Graf průběhu amplifikace při qPCR a rozdíly hodnot  $C_q$

**Zdroj:** Ginzinger, 2002

## 4 Materiál a metodika

### 4.1 Biologický materiál

Byla získána kolekce 66 různých vzorků plodů jabloní (Tabulka 3, 4) z evropských obchodních řetězců zastoupených v České republice a byla u nich provedena pomologická charakteristika plodů s cílem posouzení stupně zralosti.

*Tabulka 3: Vznik a původ odrůd analyzovaných v diplomové práci*

Odrůda	Vznik	Původ
<b>Braeburn</b>	Lady Hamilton × Granny Smith	Nový Zéland, 1950
<b>Elisa</b>	Septer × Koxsa Pomarańczowa	Holandsko – Wageningen, 1974
<b>Evelina</b>	Červená mutace Pinova	
<b>Fuji</b>	Red Delicious × Virginia Ralls Genet	Japonsko – Fujisaki
<b>Gala</b>	Kidd 's Orange × Golden Delicious	Nový Zéland
<b>Golden Delicious</b>	Náhodný kříženec	USA
<b>Granny Smith</b>	Náhodný semenáč objevený Marií Ann Smith	Austrálii
<b>Idared</b>	Jonathan × Wagenerovo	USA – Idaho, Moscow
<b>Jonagold</b>	Golden Delicious × Jonathan	USA, 1953
<b>Jonagored</b>	Barevný klon Jonagold	Belgie
<b>Jonaprince</b>	Umělá mutace Jonagold	Nizozemí a Belgie, 1994
<b>Kanzi</b>	Gala x Braeburn	Belgie
<b>Milwa</b>	(Idared x Maigold) x Elstar	
<b>Modi</b>	Gala x Liberty	Itálie
<b>Pink Lady</b>	Golden Delicious × Lady Williams = Cripps Pink. Pink Lady = výběr nejlepších jablek této odrůdy	Austrálie, 1973
<b>Red Chief</b>	Mutace Red Delicious	
<b>Red Delicious</b>	Mutace Golden Delicious	USA – Iowa, 1921
<b>Red Prince</b>	Golden Delicious × Red Jonathan	
<b>Tenroy Royal Gala</b>	Kidd's Orange x Golden Delicious	Nový Zéland

**Tabulka 4:** Vzorky plodů jablek analyzovaných v diplomové práci s uvedenou odrůdou, zemí původu, obchodním řetězcem, v němž byl plod zakoupen, tuhostí dužiny, otláčení plodů, způsobu balení a jakosti plodů – 1. část

	Odrůda	1.	2.	3.	4.	5.	6.
1	Jonagold	DE	O3	ME2	OT2	V	J1
2	Golden Delicious	IT	O3	ME2	OT1	V	J1
3	Golden Delicious	CZ	O3	ME2	OT1	S	J2
4	Golden Delicious	IT	O1	ME1	OT1	T	J1
5	Idared	PL	O1	ME1	OT1	V	J1
6	Evelina	SK	O1	ME1	OT1	V	J1
7	Golden Delicious	IT	O1	ME2	OT1	V	J1
8	Granny Smith	IT	O1	ME1	OT1	V	J1
9	Red Delicious	IT	O1	ME2	OT1	V	J1
10	Jonagold	CZ	O1	ME1	OT1	V	J1
11	Golden Delicious	CZ	O1	ME2	OT1	V	J1
12	Fuji	IT	O1	ME2	OT2	T	J1
13	Golden Delicious	CZ	O1	ME1	OT1	S	J1
14	Red Prince	CZ	O1	ME2	OT1	V	J1
15	Kanzi	NL	O1	ME1	OT1	V	J1
16	Milwa	NL	O2	ME1	OT1	T	J1
17	Golden Delicious	IT	O2	ME2	OT1	V	J1
18	Tenroy Royal Gala	CL	O2	ME3	OT3	V	J1
19	Idared	PL	O2	ME1	OT1	S	J2
20	Granny Smith	IT	O2	ME2	OT1	V	J1
21	Golden Delicious	IT	O2	ME3	OT3	S	J1
22	Modi	IT	O5	ME1	OT1	V	J1
23	Golden Delicious	CZ	O5	ME3	OT1	S	J1
24	Pink Lady	CL	O5	ME1	OT1	T	J1
25	Jonagold	CZ	O5	ME3	OT3	S	J1
26	Granny Smith	ZA	O5	ME2	OT2	S	J1
27	Red Chief	IT	O6	ME1	OT1	V	J1
28	Golden Delicious	IT	O6	ME1	OT1	V	J1
29	Elisa	PL	O6	ME2	OT1	V	J1
30	Kanzi	NL	O3	ME3	OT3	V	J1
31	Red Chief	IT	O3	ME2	OT1	V	J1
32	Red Prince	CZ	O3	ME2	OT1	V	J1
33	Idared	PL	O3	ME1	OT1	S	J2
34	Red Delicious	AR	O3	ME1	OT1	T	J2
35	Golden Delicious	IT	O4	ME3	OT2	S	J2
36	Idared	PL	O4	ME1	OT1	S	J2
37	Red Delicious	CZ	O4	ME2	OT1	S	J2
38	Jonagold	BE	O4	ME3	OT3	V	J2
39	Pink Lady	CL	O4	ME2	OT1	V	J1
40	Golden Delicious	IT	O4	ME2	OT1	V	J1

**Tabulka 4:** Vzorky plodů jablek analyzovaných v diplomové práci s uvedenou odrůdou, zemí původu, obchodním řetězcem, v němž byl plod zakoupen, tuhostí dužiny, otláčení plodů, způsobu balení a jakosti plodů – 2. část

	Odrůda	1.	2.	3.	4.	5.	6.
41	Idared	PL	O4	ME1	OT1	S	J2
42	Jonagored	PL	O4	ME2	OT1	S	J2
43	Red Prince	DE	O4	ME3	OT3	V	J1
44	Idared	PL	O4	ME1	OT1	V	J1
45	Red Chief	IT	O4	ME2	OT1	V	J1
46	Idared	PL	O4	ME2	OT1	V	J1
47	Fuji	CZ	O4	ME3	OT3	V	J1
48	Kanzi	NL	O4	ME1	OT1	V	J1
49	Golden Delicious	IT	O4	ME2	OT1	V	J1
50	Jonagold	PL	O7	ME2	OT3	V	J1
51	Red Delicious	IT	O7	ME2	OT1	V	J1
52	Fuji	IT	O7	ME2	OT1	V	J1
53	Red Chief	IT	O7	ME3	OT1	V	J1
54	Braeburn	IT	O7	ME2	OT1	V	J1
55	Granny Smith	IT	O7	ME1	OT1	V	J1
56	Jonaprince	DE	O7	ME2	OT1	V	J1
57	Gala	CL	O7	ME1	OT1	V	J1
58	Evelina	SK	O7	ME2	OT1	V	J1
59	Jonagold	CZ	O7	ME2	OT2	V	J1
60	Golden Delicious	IT	O7	ME1	OT1	V	J1
61	Golden Delicious	IT	O7	ME1	OT1	V	J1
62	Red Delicious	IT	O7	ME3	OT1	V	J1
63	Golden Delicious	CZ	O7	ME1	OT1	S	J1
64	Red Delicious	IT	O7	ME2	OT1	T	J1
65	Braeburn	IT	O7	ME3	OT2	S	J1
66	Golden Delicious	CZ	O7	ME1	OT1	S	J2
H1	Golden Delicious	CZ	O8	ME2	OT2	V	J2

**1. Země původu:** AR – Argentina, BE – Belgie, CL – Chile, CZ – Česká republika, DE – Německo, IT – Itálie, NL – Holandsko, PL – Polsko, SK – Slovensko, ZA – Jihoafrická republika; **2. Obchodní řetězec:** O1 – Albert (Kladno), O2 – Billa (Kladno), O3 – Kaufland (Praha), O4 – Kaufland (Kladno), O5 – Lidl (Kladno), O6 – Norma (Kladno), O7 – Tesco (Kladno), O8 – VŠÚO Holovousy s.r.o.; **3. Tuhost dužiny:** ME1 – velice tuhá dužnina, mnohdy s nazelenalou barvou, plod při sklizni nebyl v optimální zralosti, ME2 – dužnina odpovídá konzumní zralosti, je aromatická a šťavnatá, ME3 – dužnina je silně moučnatá a svědčí o tom, že plod je přezrálý; **4. Otláčení plodů:** OT1 – zcela bez otláčení, OT2 – na plodech jsou nepatrné známky otláčení (maximálně 5 % povrchu), OT3 – na plodech jsou patrné výrazné známky otláčení (mnohdy až 20 % plochy plodu), dužnina pod otláčením je vodnatá až hnědé barvy; **5. Způsob balení plodů:** V – plody prodávané volně, S – plody prodávané v zatavených plastových sáčcích, T – plody prodávané na papírových táčcích fixované potravinářskou fólií; **6. Jakost udávaná prodejcem zboží:** J1 – první jakost, J2 – druhá jakost

## **4.2 Izolace celkové RNA ze slupky a dužniny plodů**

### **4.2.1 Příprava materiálu**

Pro extrakci RNA byl používán plast RNase free. Pipety, špičky s filtry, třecí misky, tloučky, skalpely a pinzety byly sterilizovány pomocí autoklávu. Rukavice a pracovní plochy v laboratoři, kde probíhal odběr vzorků a extrakce RNA byly ošetřeny přípravkem RNaseZAP<sup>TM</sup> od firmy Sigma.

Plody získané z obchodních řetězců byly ošetřeny přípravkem RNaseZAP<sup>TM</sup> (Sigma) a po oschnutí byly odebrány směsné vzorky 3 plodů, zvláště dužnina a zvláště slupka, do polypropylenových zkumavek a kvůli zachování nepoškozené RNA byly okamžitě zamrazeny pomocí kapalného dusíku a skladovány při teplotě -80°C.

### **4.2.2 Izolace celkové RNA**

Obsah zkumavky byl přenesen do sterilní třecí misky předem vychlazené kapalným dusíkem a ošetřené RNaseZAP<sup>TM</sup> (Sigma). Vzorky byly pomocí tloučku homogenizovány do práškové struktury za stálého chlazení kapalným dusíkem a následně z nich bylo odváženo 100 mg, jež byly asepticky přeneseny do sterilních 2ml zkumavek. Vzorky byly okamžitě ponořeny do kapalného dusíku a vyjmuty až těsně před vlastní analýzou.

Celková RNA byla izolována pomocí Spectrum Plant Total RNA Kit od firmy Sigma. Do zkumavky s homogenizátem bylo přidáno 500  $\mu$ l lyzačního pufru s obsahem 2-merkaptoetanolu a ponecháno homogenizovat 30 s na vibrační třepačce a následně inkubováno 3 minuty při teplotě 56°C.

Pro odstranění zbytků buněk byly zkumavky centrifugovány při 12 000 RCF po dobu 10 minut při teplotě 10°C. Pipetou byl supernatant bez rostlinných zbytků přenesen na filtrační kolonky, jež byly připraveny ve 2 ml zkumavkách. Následně byla provedena centrifugace při 12 000 RCF 1 minutu při teplotě 20°C.

Zkumavky byly umístěny na led a k získanému filtrátu bylo přidáno 750  $\mu$ l vázacího roztoku. Směs byla krátce promíchána na vibrační třepače a 600  $\mu$ l bylo přeneseno na kolonku určenou k navázání RNA a následně centrifugováno při 12 000 RCF 1 minutu při teplotě 20°C. Stejný proces byl zopakován i se zbývajícím částí filtrátu tak, aby byl veškerý filtrát aplikován na vázací kolonku. Filtrát byl po každé centrifugaci odlit a zkumavka byla vysušena sterilní buničinou.

Na kolonku bylo přidáno 300  $\mu$ l promývacího roztoku 1 a zkumavky byly centrifugovány 12 000 RCF 1 minutu při teplotě 20°C. Po odlití filtrátu a vysušení zkumavky byly kolonky vráceny zpět do zkumavek a byla na kolonku přidána směs 10  $\mu$ l DNázy I a 70  $\mu$ l digesčního pufru pro degradaci zbytků genomické DNA z kitu On-Column DNase I Digestion Set od firmy Sigma. Vzorky byly inkubovány při laboratorní teplotě po dobu 15 minut.

Po uplynutí této doby bylo na kolonky přidáno 500  $\mu$ l promývacího roztoku 1. Zkumavky byly centrifugovány 12 000 RCF 1 minutu při teplotě 20°C, filtrát byl odlit, zkumavky vysušeny a vázací kolonky vráceny zpět do zkumavky.

Následně byly provedeny 2 opakování promývání kolonky pomocí 500  $\mu$ l promývacího roztoku 2 a centrifugování za stejných podmínek jako v předchozím kroku. Vázací kolonky byly následně zbaveny zbytků promývacího roztoku centrifugací po dobu 30 s 12 000 RCF při teplotě 20°C.

Vysušené kolonky byly přendány do nových 2 ml zkumavek a na povrch filtru bylo přidáno 50  $\mu$ l elučního pufru. Kolonky byly ponechány 5 minut inkubovat při laboratorní teplotě a následně byly centrifugovány 12 000 RCF 1 minutu při teplotě 20°C.

#### **4.2.3 Vyhodnocení výtěžnosti RNA**

Výtěžnost izolované RNA byla vyhodnocena pomocí UV spektrofotometru (NanoPhotometer, Implen). Filtrát byl pomocí pipety jemně promíchán a byly z něj odebrány 3  $\mu$ l vzorku, které byly umístěny na kyvetu. Výtěžnost RNA byla vyhodnocena při vlnové délce 260 nm. Vzorky byly po kvantifikaci RNA okamžitě použity pro přepis do cDNA.



#### 4.2.4 Syntéza cDNA

Syntéza cDNA byla provedena pomocí Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit od firmy Roche za použití univerzálního polyA primeru.

Byla připravena směs templátové RNA a oligo(dT)<sub>18</sub> primeru, tak aby celkové množství templátové RNA v reakci nepřesáhlo 1 µg. Koncentrace oligo(dT)<sub>18</sub> primeru byla 2,5 µM. Směs byla doplněna PCR H<sub>2</sub>O (Roche) do celkového objemu 13 µl. Tato směs byla denaturována v termocykleru zahřátím na 60°C a následně rychle zchlazena, pro eliminaci přítomnosti možných sekundárních struktur molekul RNA.

K denaturované a ochlazené směsi byly přidány 4 µl reakčního pufru Transcriptor Reverse Transcriptase Reaction Buffer (Roche), 0,5 µl Protector RNase Inhibitor (Roche), 2 µl deoxynukleotidů a 0,5 µl Transcriptor Reverse Transcriptase (Roche). Reakční směs byla opatrně promíchána pipetou a inkubována v termocykleru při 50°C po dobu 60 minut.

Získaná cDNA byla uchována při teplotě -80°C. Pro vlastní kvantitativní PCR byly vzorky naředěny tak, aby v 1 µl roztoku bylo takové množství cDNA, které odpovídá produktu reverzní transkripce vzniklého z 0,25 ng celkové RNA.

#### 4.2.5 Amplifikace vybraných majoritních izoforem Mal d 1

Amplifikace vybraných majoritních izoforem Mal d 1 byla provedena pomocí termocykleru LightCycler Nano Instrument od firmy Roche a kitu FastStart Essential DNA Green Master (Roche). Nejprve byl připraven premix na adekvátní počet reakcí tak, aby jedna reakce obsahovala 5 µl 2x mastermixu, 0,5 µl F primeru (koncentrace 10 µM) a 0,5 µl R primeru (koncentrace 10 µM). Následně byly připraveny stripy pro amplifikace house keepingového genu (actin) a hodnoceného genu Mald 1.

Do jednotlivých jamek stripů bylo rozpipetováno 6 µl premixu a 4 µl naředěné cDNA. Jako kalibrátor byla použita cDNA odrůdy Golden Delicious a jako negativní kontrola byla použita PCR H<sub>2</sub>O o shodném objemu jako cDNA.

Schéma jednoho experimentu probíhajícího v termocykleru:

	Jamka 1	Jamka 2	Jamka 3	Jamka 4	Jamka 5	Jamka 6	Jamka 7	Jamka 8
<b>Strip A</b>	Aktin 7 Kalibrátor	Aktin 7 Kalibrátor	Aktin 7 Kalibrátor	Aktin 7 Odrůda 1	Aktin 7 Odrůda 1	Aktin 7 Odrůda 1	Aktin 7 Odrůda 2	Aktin 7 Odrůda 2
<b>Strip B</b>	Aktin 7 Odrůda 2	Aktin 7 Odrůda 3	Aktin 7 Odrůda 3	Aktin 7 Odrůda 3	Aktin 7 Negativní kontrola	Aktin 7 Negativní kontrola	Aktin 7 Negativní kontrola	Aktin 7 Negativní kontrola
<b>Strip C</b>	Mald Kalibrátor	Mald Kalibrátor	Mald Kalibrátor	Mald Odrůda 1	Mald Odrůda 1	Mald Odrůda 1	Mald Odrůda 2	Mald Odrůda 2
<b>Strip D</b>	Mald Odrůda 2	Mald Odrůda 3	Mald Odrůda 3	Mald Odrůda 3	Mald Negativní kontrola	Mald Negativní kontrola	Mald Negativní kontrola	Mald Negativní kontrola

Amplifikace probíhala v následujících krocích: aktivace polymerázy při teplotě 95°C (rychlost změny teploty 4°C/s) 10 minut, tříkolová amplifikace se 45 cykly při 95°C (rychlost změny teploty 5°C/s) 20 s, 61°C pro všechny primerové páry (rychlost změny teploty 4°C/s) 20 s a 72°C (rychlost změny teploty 4°C/s) 20 s.

Během řešení diplomové práce bylo provedeno testování všech izoforem Mald, které popsali Pagliarani et al. (2013). Byly použity následující primerové páry, které jsou uvedeny v Tabulce 5.

*Tabulka 5: Primerové páry dle Pagliarani et al. (2013)*

Izoforma	Označení primeru podle Pagliarani et al. (2013)	Sekvence primeru 5'-3'
<b>Mal d 1.01</b>	qMd1.01/02F	GATTGAAGGAGATGCTTTGACA
	qMd1.01R	GTAATGACTGATGCTCTTGATGG
<b>Mal d 1.02</b>	qMd1.01/02F	GATTGAAGGAGATGCTTTGACA
	qMd1.02R	TTGGTGTGGTAGTGGCTGATA
<b>Mal d 1.03A</b>	qMd1.03AF	ATCTGAGTTCACCTCCGTCATT
	qMd1.03AR	ACTGCTTGTGGTGGAAATCTTT
<b>Mal d 1.03C</b>	qMd1.03CF	CTCCGAAACAATTGAGAAAATCTG
	qMd1.03CR	GCTGGTGTCTCTTGATGATGC
<b>Mal d 1.03D</b>	qMd1.03D/EF	ATACGAATCCGAGTTCACCTCT
	qMd1.03DR	ATCTTCTTAATGGTTCCAACCTCT
<b>Mal d 1.03E</b>	qMd1.03D/EF	ATACGAATCCGAGTTCACCTCT
	qMd1.03ER	TTCACCGAAGTTGATCTTCTTAATA
<b>Mal d 1.03F</b>	qMd1.03FF	CACAGAATTGACGGGGTG
	qMd1.03FR	CCGGAAGCGACCAACTTA
<b>Mal d 1.03G</b>	qMd1.03GF	ATTATCAAGAGCACCAGTCACTACT
	qMd1.03GR	TCCAAGAGGTAGTTCTCAATCAA
<b>Mal d 1.03K</b>	qMd1.03KF	CATCAGCCACTACCACACAAA
	qMd1.03KR	TGTATGCATCCTGGTGTCTCT
<b>Mal d 1.06A</b>	qMd1.06AF	CTATAGCTATAGCTTGATTGAAGGG
	qMd1.06AR	TTCCAACCTTAACATGTTCTTCT
<b>Mal d 1.06B</b>	qMd1.06BF	AAACCGAATACGCATCCATT
	qMd1.06BR	ACAGTTTTGACTGCTTGTGGAG
<b>Mal d 1.06C</b>	qMd1.06CF	GCTCCACAAGCAGTCAAACCT
	qMd1.06CR	TCAACCTTGTGCTTCACATAACTA
<b>Mal d 1.07</b>	qMd1.07F	CAACTTTGTGTACCAGTACAGTGTC
	qMd1.07R	TAGTGGCTGATGCTCTTGATAAC
<b>Mal d 1.08</b>	qMd1.08F	TCTTCGGTGAAGGTAGCACAA
	qMd1.08R	ACCCTTAGTGTGGTAGTGGCAT
<b>Mal d 1.11A</b>	qMd1.11AF	GGAGGATGCATCTGTCATTTG
	qMd1.11AR	CCATGAGATAGGCTTCCAAAACCT
<b>Mal d 1.11B</b>	qMd1.11BF	CAGCACATACAAAGCCAAAGAC
	qMd1.11BR	TTTATGCGCGAGGGGTGTG
<b>Mal d 1.13A</b>	qMd1.13AF	GTGTTGGAACCATCAAGAAGATTAG
	qMd1.13AR	ACATCTCCTTCAATCAAACCTGTAAT
<b>Mal d 1.13B</b>	qMd1.13BF	CGAAGATAACTTTGTCTACAACCAT
	qMd1.13BR	GCTCTTCCTTGATCTCAACATCTT
<b>Mal d 1.13D</b>	qMd1.13DF	TGTTGGAACCATCAAGAAGATAAGT
	qMd1.13DR	GACATCTCCTTCAATCAAACCTGTAG
<b>Aktin 7</b>	actin F	CTATGTTCCCTGGTATTGCAGACC
	actin R	GCCACAACCTTGTTTTTTCATGC

Na základě studia literárních zdrojů jsem předpokládala, že ne všechny izoformy uvedené v Tabulce 5 budou vykazovat stejnou expresi. Pro řešení diplomové práce včetně statistických analýz jsem vybrala 4 izoformy (Mal d 1.01, Mal d 1.02, Mal d 1.06A, Mal d 1.06B), které vykazovaly nejvyšší expresi v referenčním vzorku – slupka a dužnina odrůdy Golden Delicious pocházející z experimentálních výsadeb VŠÚO Holovousy s.r.o. ze sklizně v roce 2016.

#### **4.2.6 Relativní kvantifikace exprese – stanovení parametru Ratio $\Delta Cq$**

Pro analýzu relativní kvantifikace byl použit ovládací program termocyklieru LightCycler Nano (Roche). Současně byla zpracována v programu Microsoft Excel tabulka, kde v jednotlivých buňkách probíhal simultánní výpočet parametrů  $\Delta Cq$ ,  $\Delta\Delta Cq$ , Ratio  $\Delta Cq$  a Ratio  $\Delta\Delta Cq$ . Cílem tohoto metodického kroku bylo získání vstupních dat pro následné statistické vyhodnocení, které ovládací program termocyklieru LightCycler Nano (Roche) nezobrazuje. Pro konstrukci této výpočetní tabulky byly použity postupy, které popisují například Perkins et al. (2012). Hodnoty Ratio  $\Delta Cq$  vyjadřují intenzitu exprese studované izoformy Mal d 1 normalizovanou k expresi house keepingového genu (aktin 7). Tento postup hodnocení vyplývá z metodiky Pagliarani et al. (2013).

#### **4.2.7 Relativní kvantifikace exprese – stanovení parametru Ratio $\Delta\Delta Cq$**

Pro použití metody  $\Delta\Delta Cq$  bylo nutné ověřit, zdali eficeience PCR amplifikace (E) vykazuje u všech testovaných genů minimální rozdíly. Pro tento ověřovací experiment byla použita cDNA získaná ze slupky a dužniny odrůdy Golden Delicious pocházející z experimentálních výsadeb VŠÚO Holovousy s.r.o. ze sklizně v roce 2016. Z této cDNA byla provedena ředící řada tak, aby se do jedné PCR reakce o objemu 10  $\mu$ l přidávalo 5000 pg DNA, 1000 pg DNA, 200 pg DNA, 40 pg DNA a 8 pg DNA. Na základě této ředící řady byla pomocí programu termocyklieru LightCycler Nano (Roche) stanovena absolutní kvantifikace. Závislost mezi hodnotami  $Cq$  a množstvím amplifikované templátové DNA byla charakterizována matematickou funkcí, ze které byla vyjádřena hodnota eficeience amplifikace (E) a hodnota směrnice – parametr „slope“. U každé z hodnocených izoform (Mal d 1.01, Mal d 1.02, Mal d 1.06A, Mal d 1.06B) byla podle Larionov et al. (2005) a Pagliarani et al. (2013) stanovena diference mezi její hodnotou parametru „slope“ a hodnotou parametru „slope“ u house keepingového genu pro aktin 7. Vzhledem k tomu, že stanovené diference se pohybovaly

v intervalu od (-0,1) do 0,1, je možné pro hodnocení relativní exprese použít metodu  $\Delta\Delta C_q$ . Při tomto postupu byly všechny získané výsledky standartizovány k expresi izoformy Mal d 1.01 ve slupce odrůdy Golden Delicious pocházející z experimentálních výsadeb VŠÚO Holovousy s.r.o. ze sklizně v roce 2016. Parametr Ratio  $\Delta\Delta C_q$  vyjadřuje procenticky míru exprese studované izoformy k výše uvedenému referenčnímu vzorku. Parametr Ratio  $\Delta\Delta C_q$  byl stanoven simultánně na základě výpočtu v tabulce programu Microsoft Excel na základě algoritmu, který popsal Perkins et al. (2012).

#### **4.2.8 Ověření specifčnosti amplifikace pomocí sekvenace a analýzou teploty tání**

Specifčnost amplifikace byla ověřena u referenčního vzorku - slupka odrůdy Golden Delicious pocházející z experimentálních výsadeb VŠÚO Holovousy s.r.o. ze sklizně v roce 2016 u 4 hodnocených izoforem (Mal d 1.01, Mal d 1.02, Mal d 1.06A, Mal d 1.06B). Získané amplikony byly separovány v 2% agarózovém gelu v TBE pufru. DNA amplikonů byla extrahována z gelu pomocí GeneJET Gel Extraction Kit (Termo SCIENTIFIC). Každý amplikon byl sekvenován ve 3 replikátech od obou primerů s využitím BigDye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit (Termo SCIENTIFIC) a kapilární elektroforézy (ABI PRISM 310, Termo SCIENTIFIC). Získané sekvence byly porovnány s mezinárodní nukleotidovou databází NCBI. Pro porovnání sekvencí byl použit program BioEdit version 7.2.5 (Hall, 1999).

Analýza teploty tání byla provedena u všech získaných amplikonů pomocí řídicího softwaru termocykleru LightCycler Nano (Roche). Jedná se o postamplifikační analýzu, při které byly amplikony zahřáty na teplotu 60°C po dobu 60 s při rychlosti změny teploty 4°C/s. Následně byly vzorky pomalu zahřívány na teplotu 95°C při rychlosti změny teploty 0,1°C/s a ve finální fázi analýzy byly vzorky zahřívány po dobu 20 s na teplotu 95°C. Specifčnost amplifikace byla hodnocena vizuálně na základě průběhu křivek teplot tání.

#### **4.2.9 Statistické zpracování výsledků**

Jako vstupní data pro statistickou analýzu byly použity hodnoty Ratio  $\Delta C_q$ , které normalizují relativní expresi studovaných izoforem vzhledem k expresi house keepingového genu pro aktin 7. Získaná data (2412 hodnot Ratio  $\Delta C_q$ ) byla setříděna na základě parametrů uvedených v Tabulce 4. Před vlastní statistickou analýzou bylo provedeno ověření homogenity rozptylů dat setříděných podle výše uvedených parametrů pomocí Cochranova, Hartletova a

Bartleyova a Leveneova testu na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ . Současně byl proveden test normality rozdělení získaných dat pomocí histogramu a P-grafu. Výše uvedené analýzy na hladině významnosti  $\alpha$  nepotvrdily homogenitu rozptylů a současně nebylo prokázáno normální rozdělení dat. Z těchto důvodů nebylo možné pro prokázání vlivu třídících faktorů na hodnoty parametru Ratio  $\Delta Cq$  použít vícefaktorovou analýzu rozptylu. Proto bylo vlastní statistické zpracování provedeno pomocí neparametrické Kruskal-Wallisovy analýzy, založené na vícenásobném porovnání průměrného pořadí pro všechny hodnocené skupiny. Rozdíly mezi kategoriemi třídících faktorů byly graficky vyhodnoceny pomocí krabicových grafů. Metoda lineární regrese byla použita pro hodnocení závislosti hodnot Ratio  $\Delta Cq$  u analyzované slupky a dužniny. Všechny statistické analýzy byly provedeny s využitím programu Dell Statistica version 13 (Dell Inc. 2015).

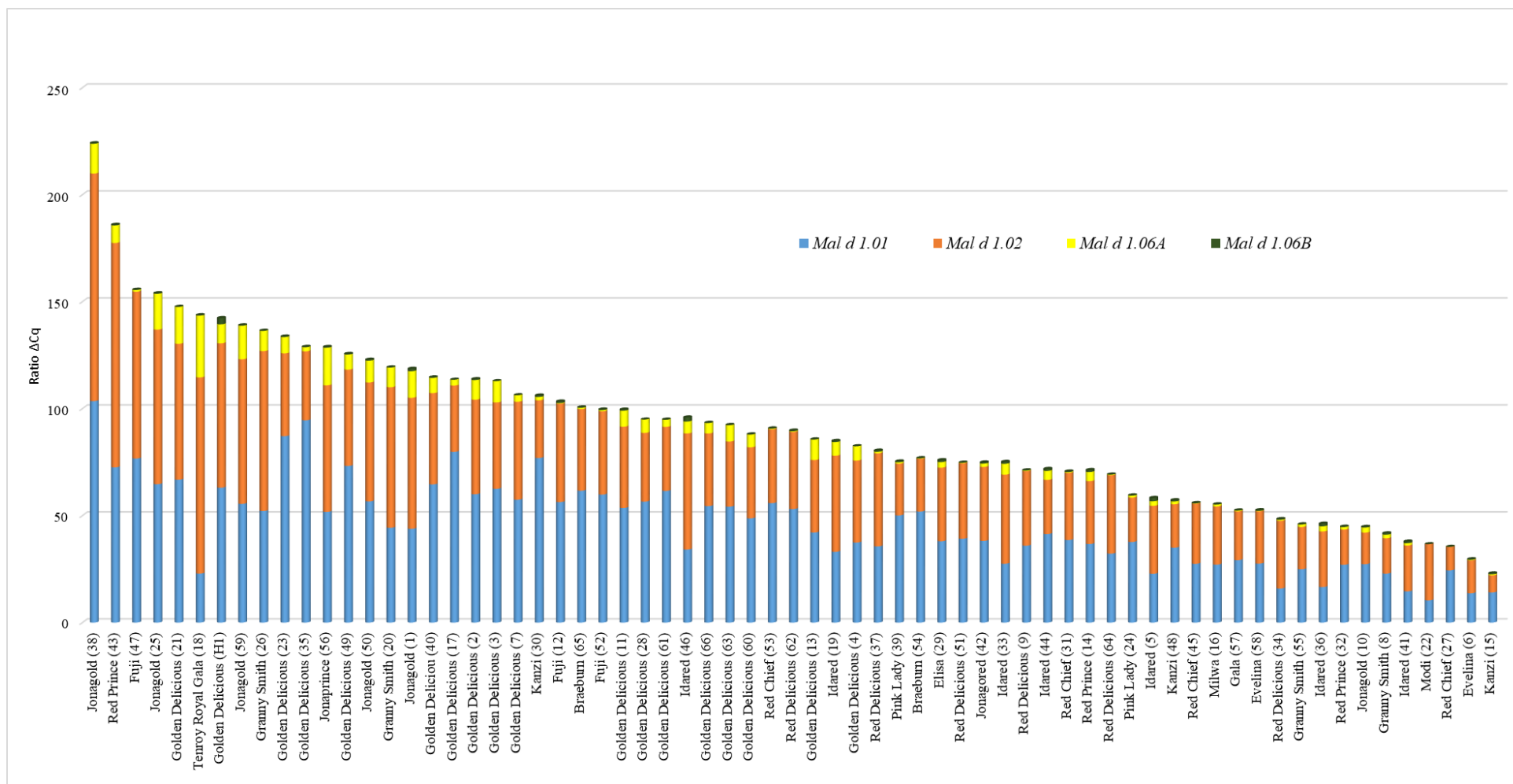
## 5 Výsledky

### 5.1 Stanovení relativní exprese na základě hodnot Ratio $\Delta Cq$

#### 5.1.1 Grafický přehled stanovených hodnot Ratio $\Delta Cq$

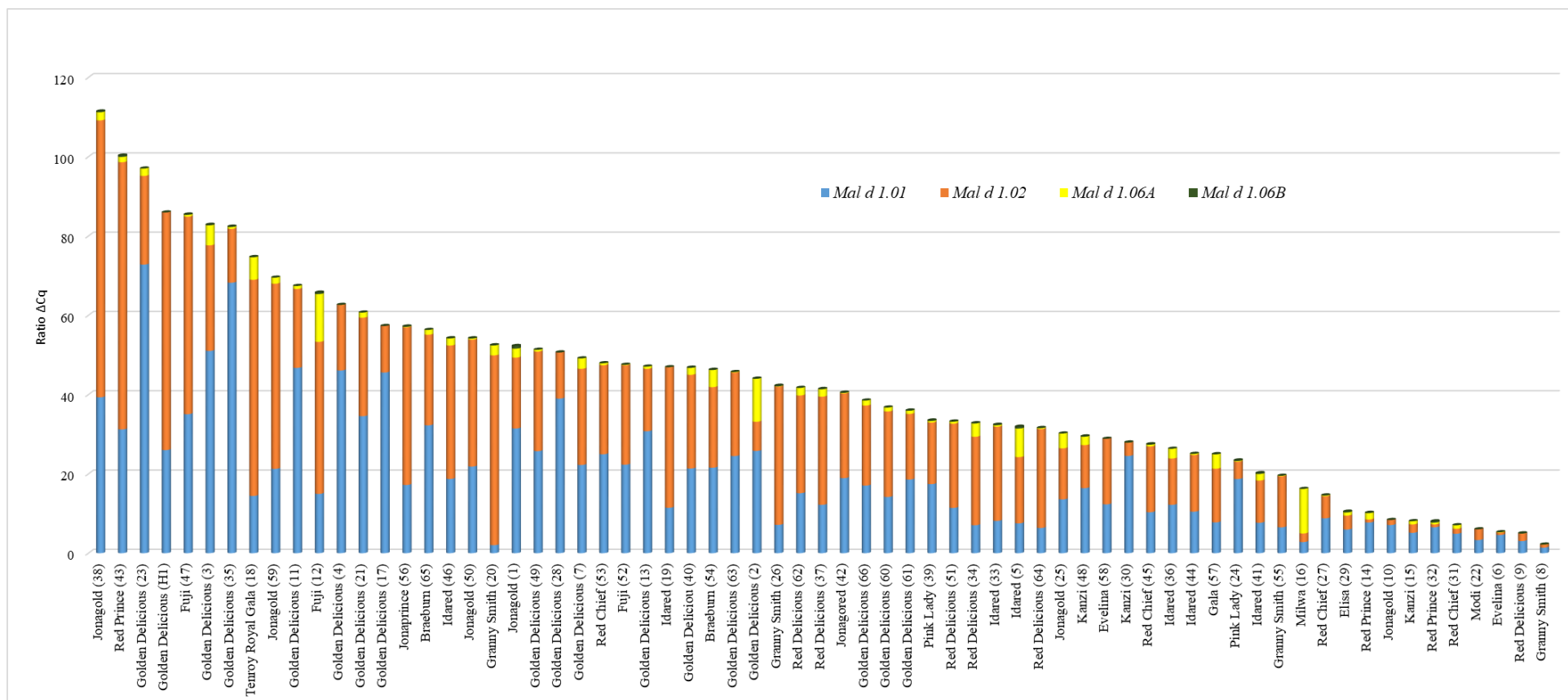
Všechny vzorky (66 vzorků z obchodních řetězců a 1 referenční vzorek – odrůda Golden Delicious z VŠÚO Holovousy s.r.o.) byly hodnoceny na základě hodnot Ratio  $\Delta Cq$ . Přehled stanovených hodnot Ratio  $\Delta Cq$  včetně variačních koeficientů (%) vyjadřujících míru variability mezi replikáty je uveden v Příloze I v tabulkové formě. Pro větší přehlednost však byly získané výsledky dále zpracovány formou sloupcových grafů. Graf 1 charakterizuje expresi studovaných izoform ve slupce plodů, Graf 2 v dužnině plodů a v Grafu 3 jsou vyneseny kumulované hodnoty v dužnině a slupce. Jednotlivé vzorky jsou v sloupcových grafech seřazeny sestupně na základě součtu Ratio  $\Delta Cq$  jednotlivých izoform. Ze všech grafů vyplývá, že izoformy Mal d 1.01 a Mal d 1.02 vykazují majoritní podíl na expresi, naopak izoformy Mal d 1.06A a Mal d 1.06B jsou ve srovnání s předchozími izoformami exprimovány výrazně méně.

**Graf 1: Hodnoty Ratio  $\Delta Cq$  stanovené u jednotlivých izoform Mal d 1 ve slupce plodu**

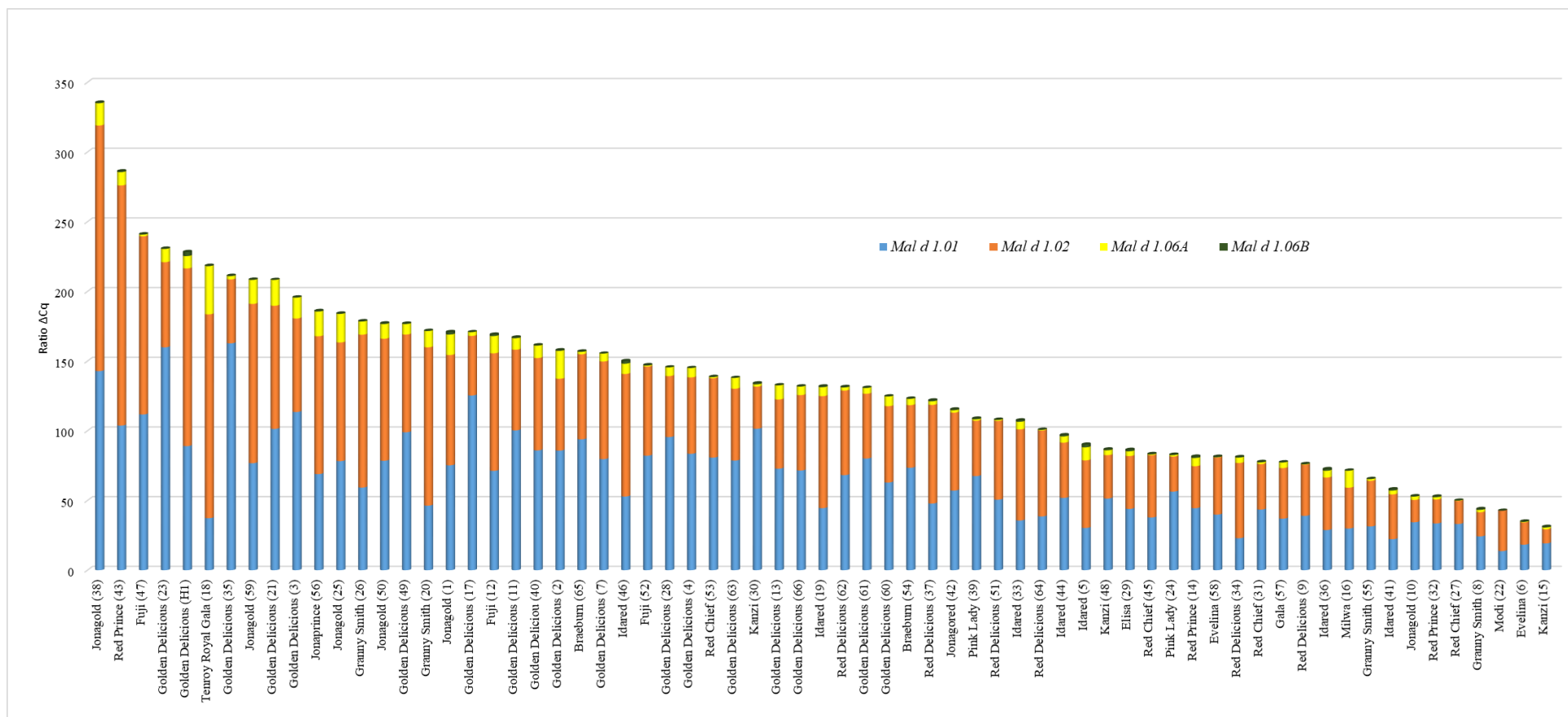




**Graf 2:** Hodnoty Ratio  $\Delta Cq$  stanovené u jednotlivých izoform Mal d 1 v dužnině plodu



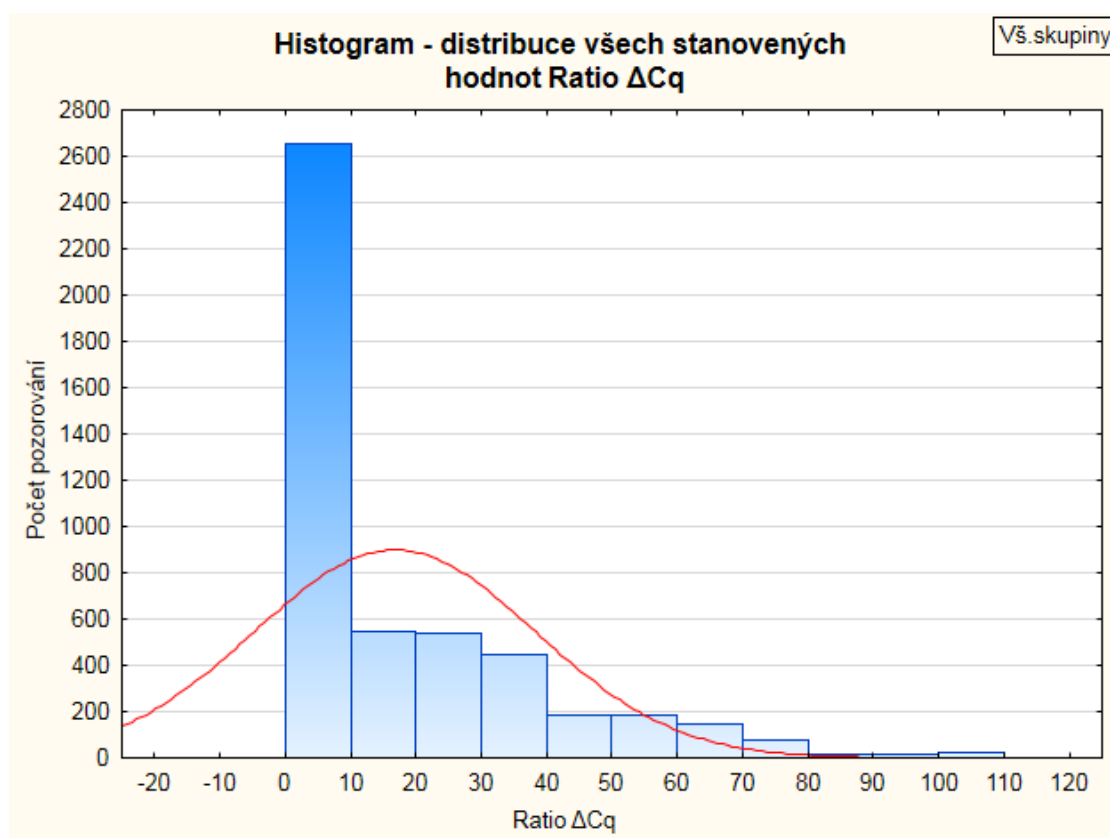
**Graf 3:** Součet hodnot Ratio  $\Delta Cq$  stanovených u jednotlivých izoform Mal d 1 ve slupce a dužnině plodu



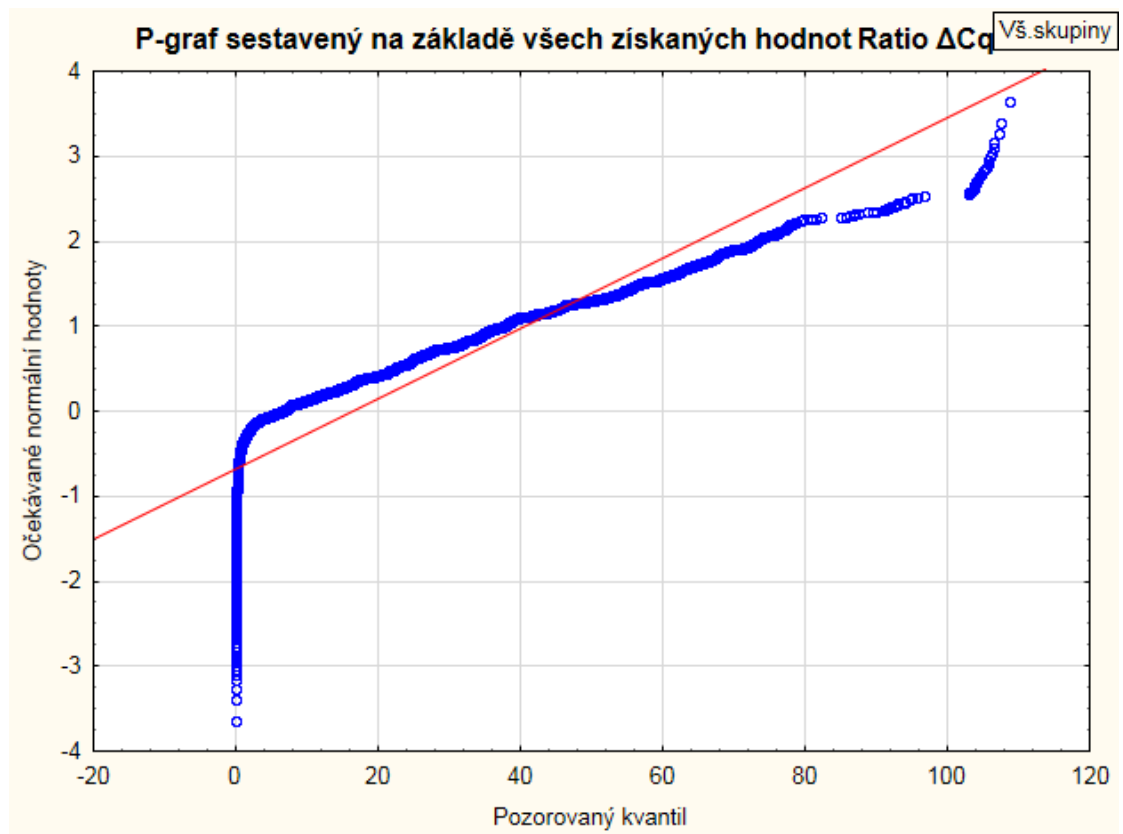
### 5.1.2 Statistické vyhodnocení rozdílů hodnot Ratio $\Delta C_q$ způsobených třídícími faktory analýzy

V metodické části diplomové práce bylo uvedeno, že stanovené hodnoty Ratio  $\Delta C_q$  byly setříděny na základě 7 třídících faktorů uvedených v Tabulce 4. Před vlastní statistickou analýzou bylo provedeno hodnocení homogenity rozptylů, které na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$  nepotvrdilo nulovou hypotézu, že rozptyly hodnot Ratio  $\Delta C_q$  v rámci třídících faktorů jsou homogenní. Tento fakt byl již zmíněn v metodické části práce, protože od něj se odvíjel další postup statistické analýzy. Současně bylo potvrzeno, že analyzovaná data neodpovídají normálnímu rozdělení. Na Grafu 4 je tento výsledek dokumentován histogramem. P-graf znázorněný na Grafu 5 je rovněž důkazem toho, že hodnocené Ratio  $\Delta C_q$  nevykazují normální rozdělení.

**Graf 4:** Hodnocení normality rozdělení na základě histogramu



**Graf 5: Hodnocení normality rozdělení na základě P-grafu**



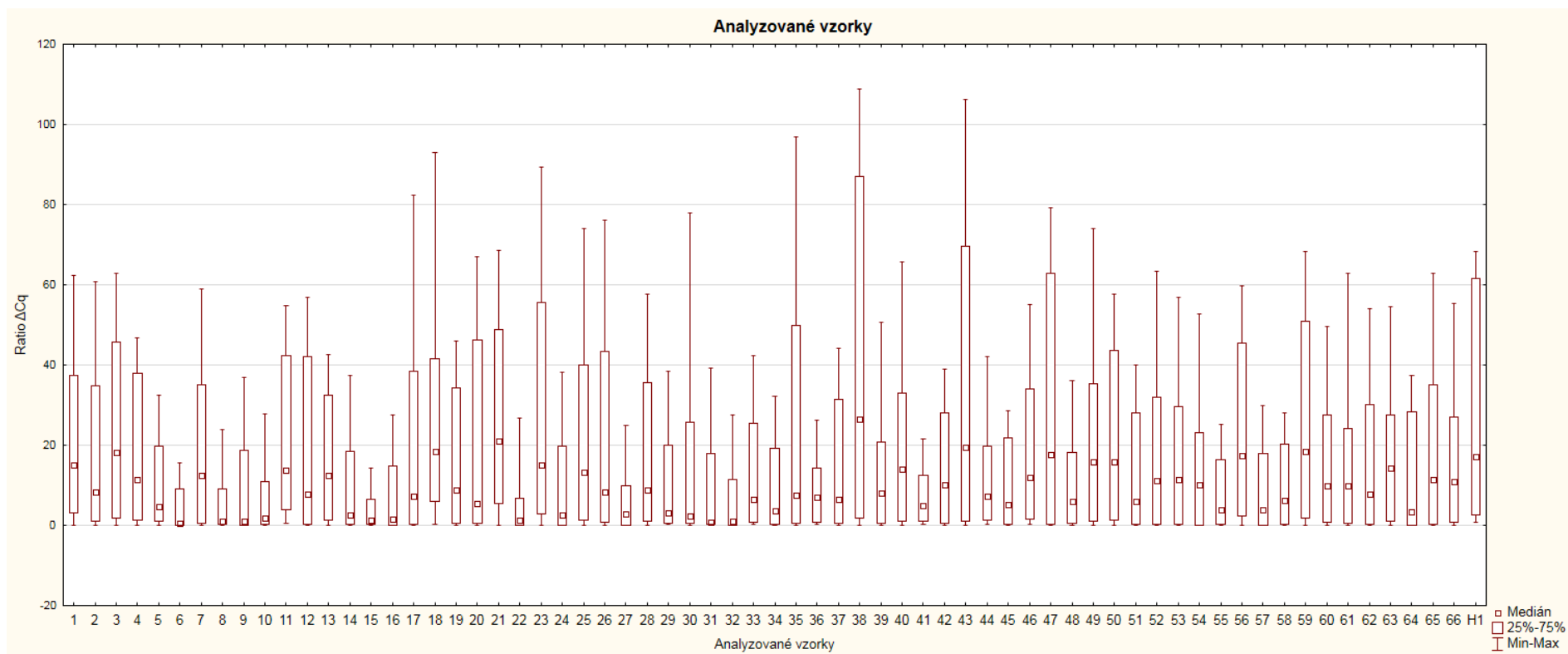
Z výše uvedených grafů vyplývá, že získané datové souboru není správné hodnotit pomocí analýzy rozptylu vícenásobného třídění. Proto byly efekty třídících faktorů hodnoceny na základě neparametrické Kruskal-Wallisovy analýzy. V Grafech 6 - 15 jsou uvedeny výstupy této analýzy pro jednotlivé třídící faktory. Hodnoty pravděpodobností, od kterých se porovnávají mediány odlišují, jsou detailně zpracovány v Příloze II.

V následující části výsledků diplomové práce bylo provedeno stručné shrnutí výsledků vyplývajících z níže uvedených krabicových grafů a detailních hodnot statistických diferencí uvedených v Příloze II.

### Analyzovaný vzorek

Každý analyzovaný vzorek představoval sumu dat (Ratio  $\Delta Cq$ ), které byly u daného vzorku zjištěny. To znamená, že medián každého vzorku byl stanoven na základě hodnot Ratio  $\Delta Cq$  ze všech 4 hodnocených genů, ze slupky i dužniny plodů. Rozsah variability, který je v krabicovém Grafu 6 vyjádřen rozpětím hodnot, vyplývá zejména ze skutečnosti, že existují velké rozdíly mezi mírou exprese izoalergenů Mal d 1.01 a Mal d 1.02 a izoalergenů Mal d 1.06A a Mal d 1.06B. V Příloze II jsou červenou barvou zvýrazněny takové dvojice porovnávaných vzorků, u kterých je možné hodnoty mediánů Ratio  $\Delta Cq$  považovat za statisticky významně odlišné na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ . Z Tabulky 1 v Příloze II je patrné, že medián získaných hodnot vykazoval největší odlišnost od jiných vzorků u vzorků číslo 6 a 22. Tyto vzorky představovaly odrůdy Evelina a Modi, dovezené ze Slovenska resp. Itálie. V obou dvou případech se jednalo o kvalitní neotlačené plody s nízkou úrovní exprese všech studovaných izoform alergenu.

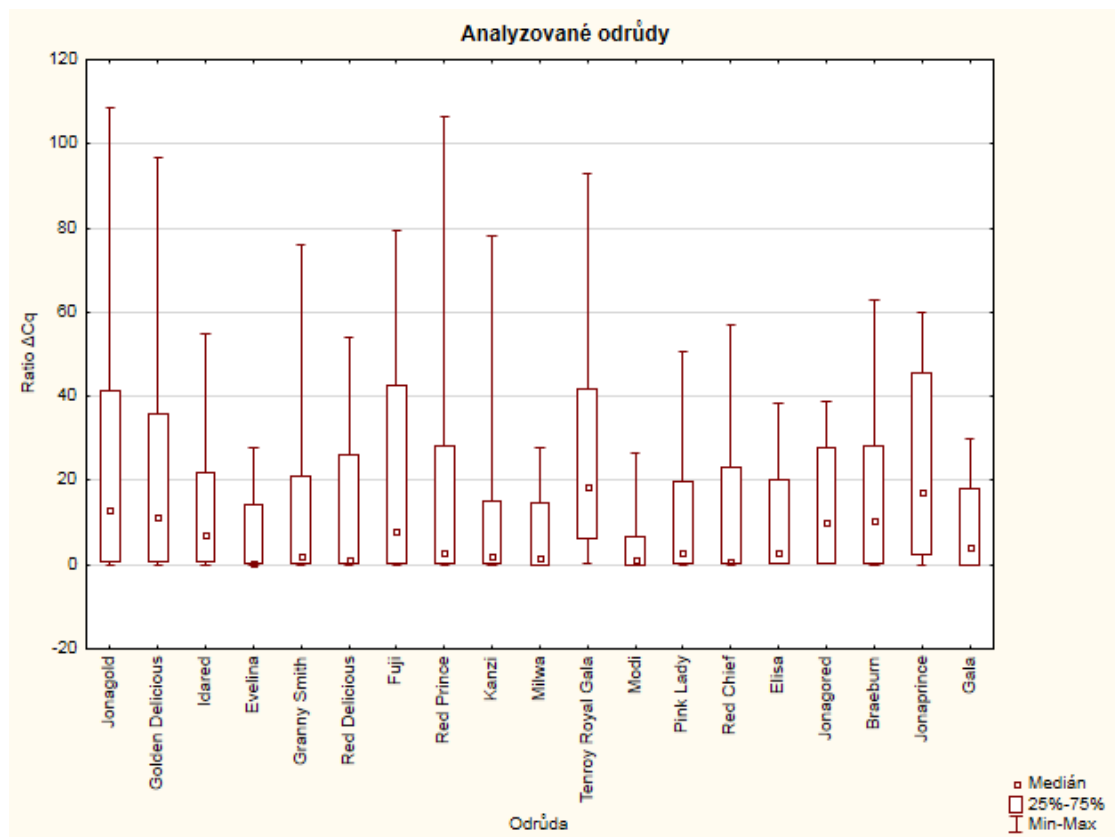
**Graf 6:** Porovnání rozdílů hodnot mediánů  $\Delta Cq$  mezi hodnocenými vzorky – výstup Kruskal-Wallisovy ANOVY



## Odrůda

V Tabulce 2 v Příloze II jsou červenou barvou zvýrazněny takové dvojice porovnávaných odrůd, u kterých je možné hodnoty mediánů Ratio  $\Delta Cq$  považovat za statisticky významně odlišné na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ . Z této tabulky je patrné, že nejvyšší míru odlišnosti vykazovaly odrůdy Golden Delicious, Jonagold a Modi.

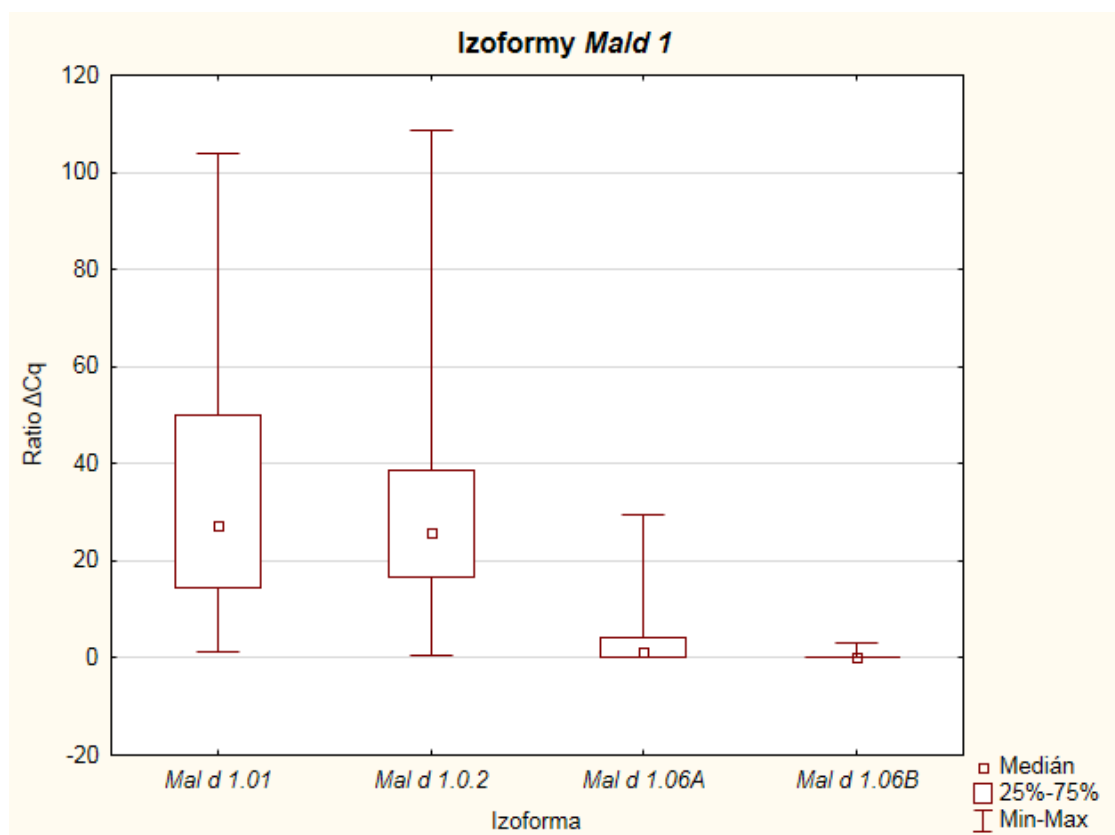
**Graf 7:** Porovnání rozdílů hodnot mediánů  $\Delta Cq$  mezi hodnocenými odrůdami – výstup Kruskal-Wallisovy ANOVY



## Izoformy

V Tabulce 3 v Příloze II jsou červenou barvou zvýrazněny takové dvojice porovnávaných izoform Mal d 1, u kterých je možné hodnoty mediánů Ratio  $\Delta C_q$  považovat za statisticky významně odlišné na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ . Z této tabulky je patrné, že statisticky významný rozdíl není pouze mezi izoformami Mal d 1.01 a Mal d 1.02. Na Grafu 8 je také dobře vidět majoritní exprese těchto izoform.

**Graf 8:** Porovnání rozdílů hodnot mediánů  $\Delta C_q$  mezi hodnocenými izoformami Mal d 1 – výstup Kruskal-Wallisovy ANOVY

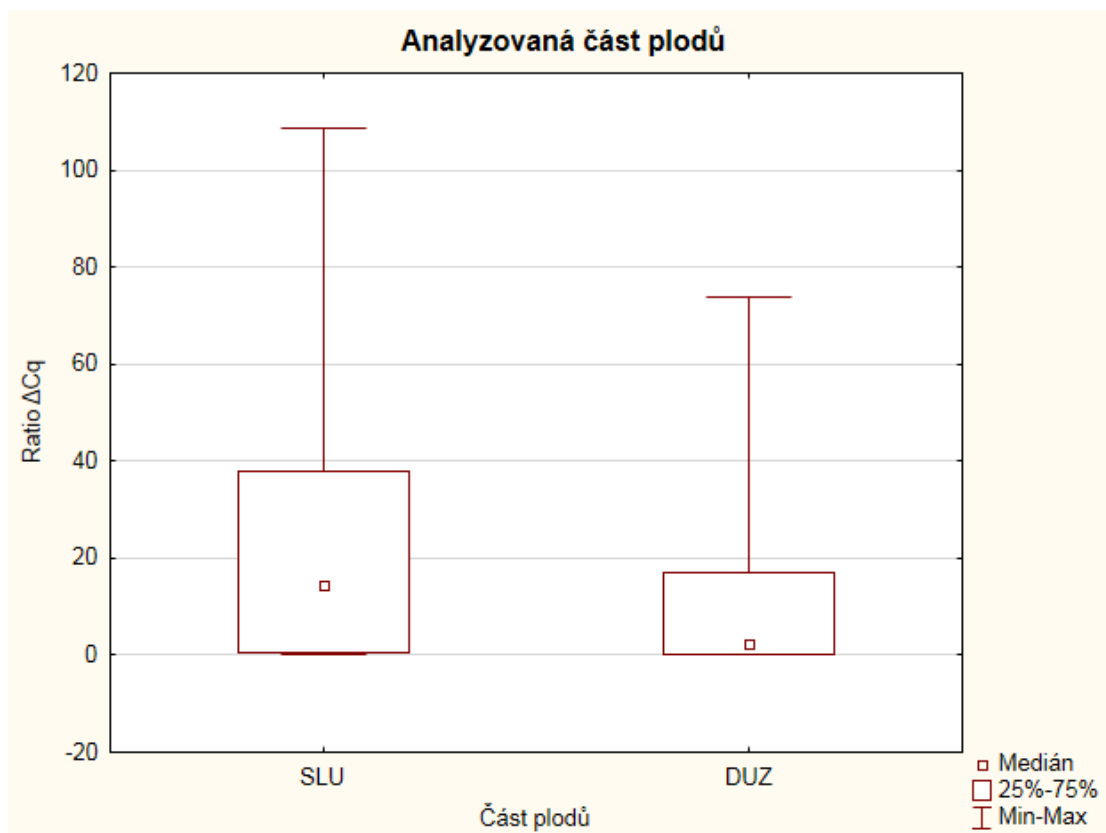




### Slupka a dužnina

V Tabulce 4 v Příloze II jsou červenou barvou zvýrazněny rozdíl mezi expresí alergenů ve slupce a dužině, jejichž hodnoty mediánů Ratio  $\Delta Cq$  lze považovat za statisticky významně odlišné na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ . Z této tabulky je patrný rozdíl v expresi alergenů mezi slupkou a dužinou plodů, znázorněný taktéž na Grafu 9.

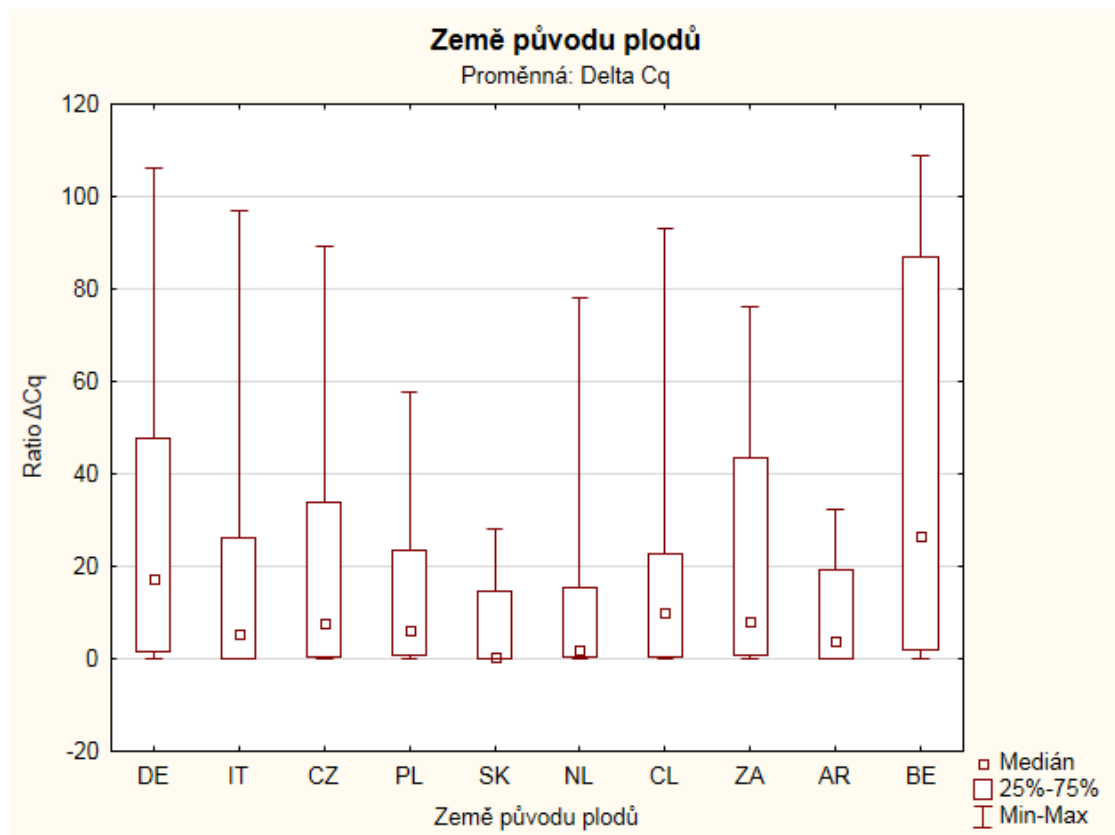
**Graf 9:** Porovnání rozdílů hodnot mediánů  $\Delta Cq$  mezi slupkou a dužninou – výstup Kruskal-Wallisovy ANOVY



## Země původu

V Tabulce 5 v Příloze II jsou červenou barvou zvýrazněny takové dvojice porovnávaných zemí původu plodů, u kterých je možné hodnoty mediánů Ratio  $\Delta Cq$  považovat za statisticky významně odlišné na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ . Z této tabulky je patrné, že nejvyšší míru odlišnosti od ostatních zemí původu vykazovaly vzorky pocházející z Německa, Slovenska a Belgie.

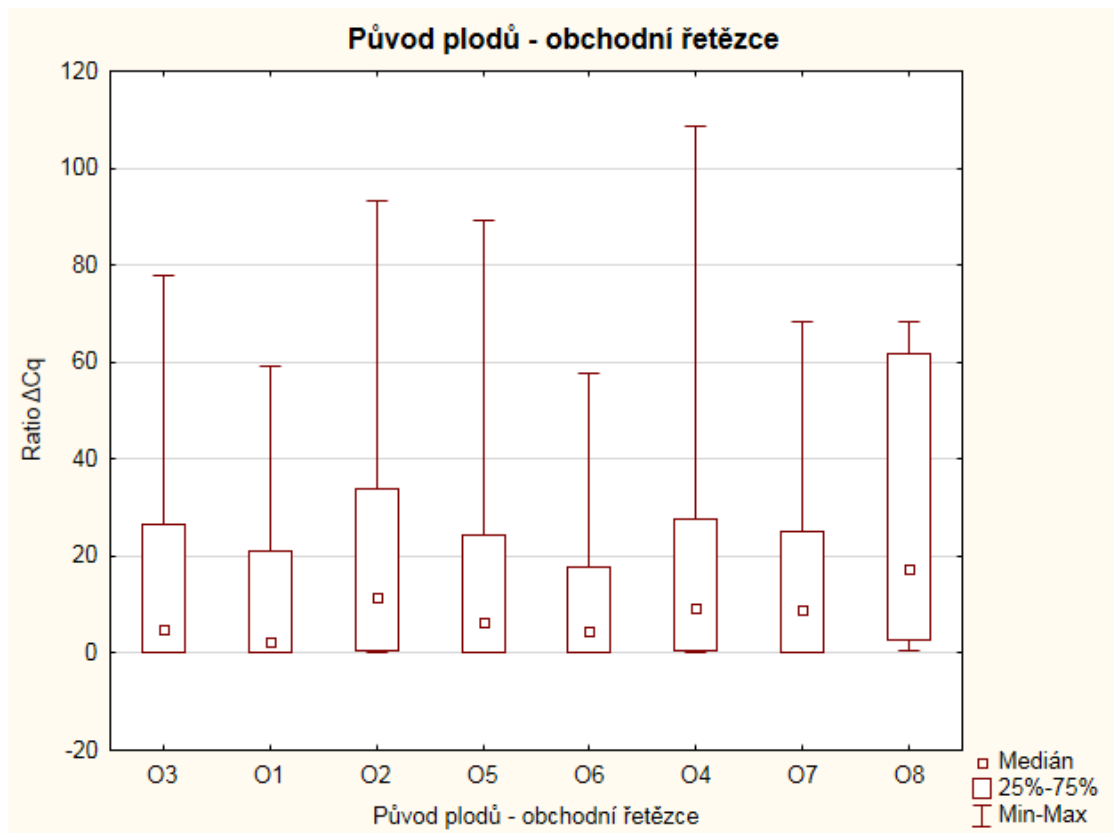
**Graf 10:** Porovnání rozdílů hodnot mediánů  $\Delta Cq$  mezi zeměmi původu – výstup Kruskal-Wallisovy ANOVY



## Obchodní řetězec

V Tabulce 6 v Příloze II jsou červenou barvou zvýrazněny takové dvojice porovnávaných obchodních řetězců, u kterých je možné hodnoty mediánů Ratio  $\Delta Cq$  považovat za statisticky významně odlišné na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ . Z této tabulky je patrné, že největší míru odlišnosti vykazovaly vzorky získané z VŠÚO Holovousy s.r.o.

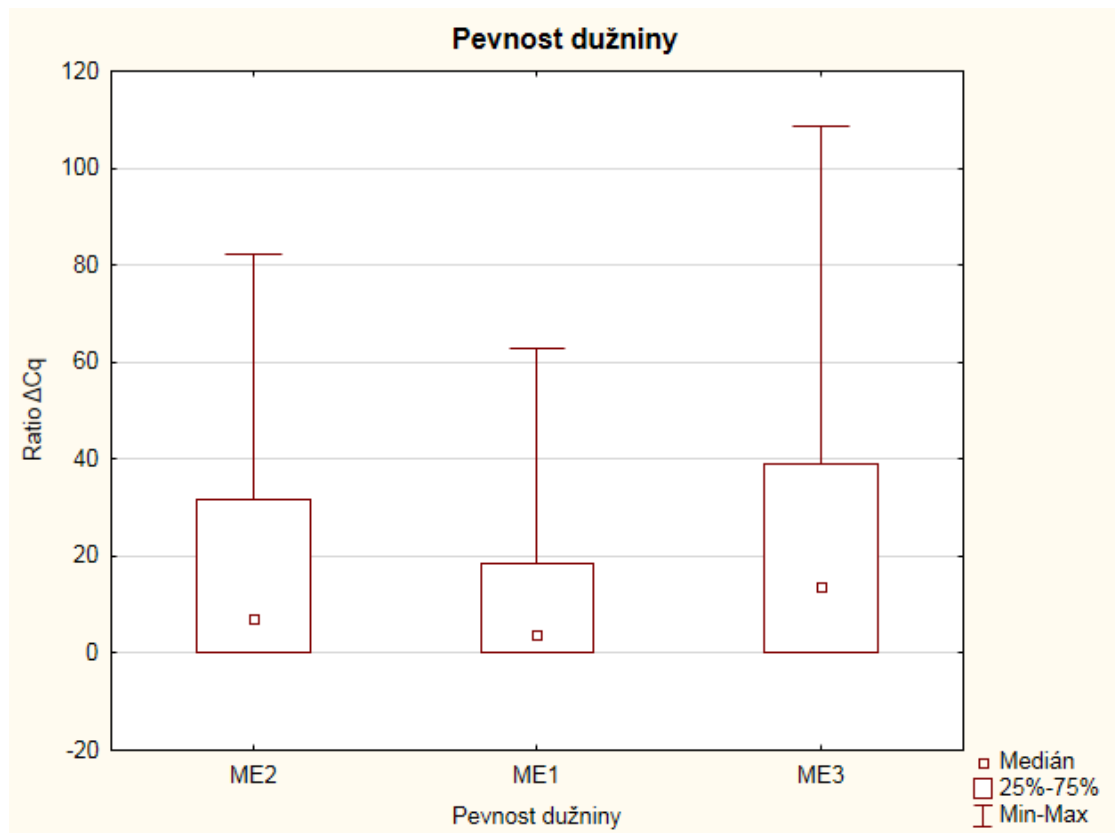
**Graf 11:** Porovnání rozdílů hodnot mediánů  $\Delta Cq$  mezi obchodními řetězci – výstup Kruskal-Wallisovy ANOVY



### Pevnost dužniny

V Tabulce 7 v Příloze II jsou červenou barvou zvýrazněny takové dvojice porovnávaných pevností dužniny, u které je možné hodnoty mediánů Ratio  $\Delta Cq$  považovat za statisticky významně odlišné na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ . Z této tabulky je patrné, že statistické rozdíly jsou mezi všemi porovnávanými stupni pevnosti dužniny.

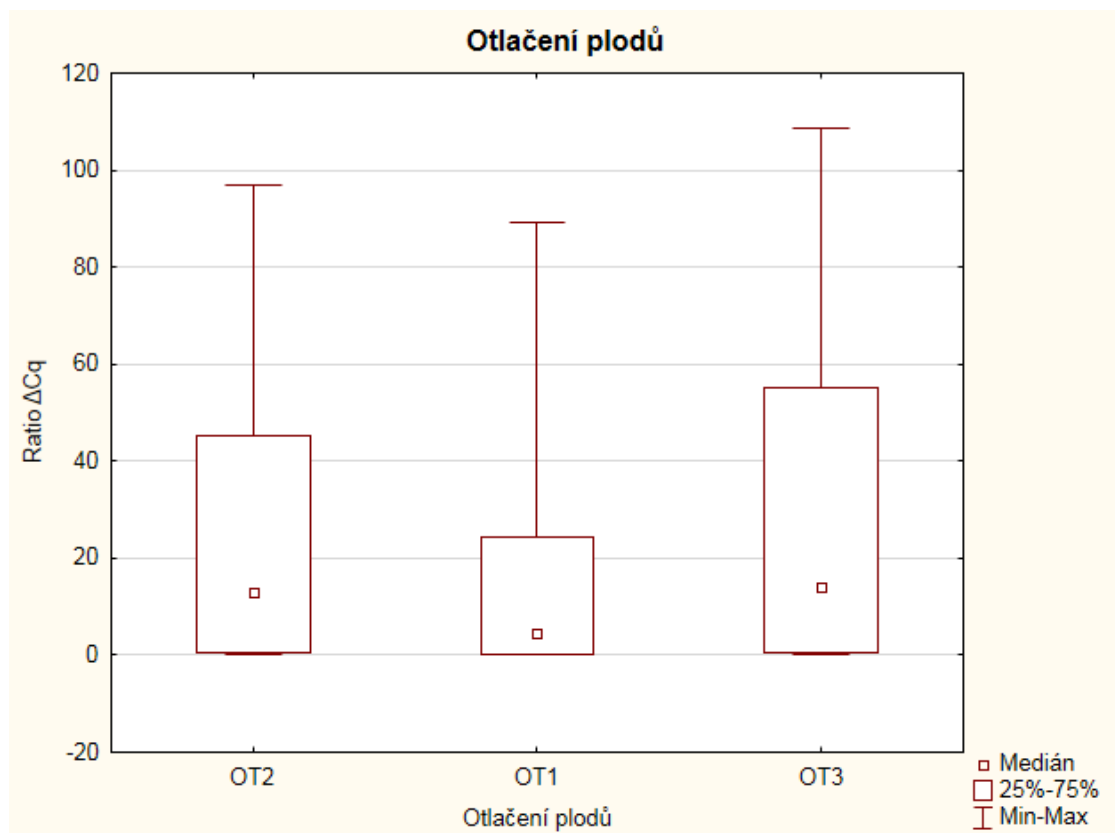
**Graf 12:** Porovnání rozdílů hodnot mediánů  $\Delta Cq$  mezi různými pevnostmi dužniny – výstup Kruskal-Wallisovy ANOVY



## Otlačení plodu

V Tabulce 8 v Příloze II jsou červenou barvou zvýrazněny takové dvojice porovnávaných otlaků plodu, u kterých je možné hodnoty mediánů Ratio  $\Delta Cq$  považovat za statisticky významně odlišné na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ . Z této tabulky je patrné, že statistické rozdíly nejsou mezi druhým a třetím stupněm otlačení plodů.

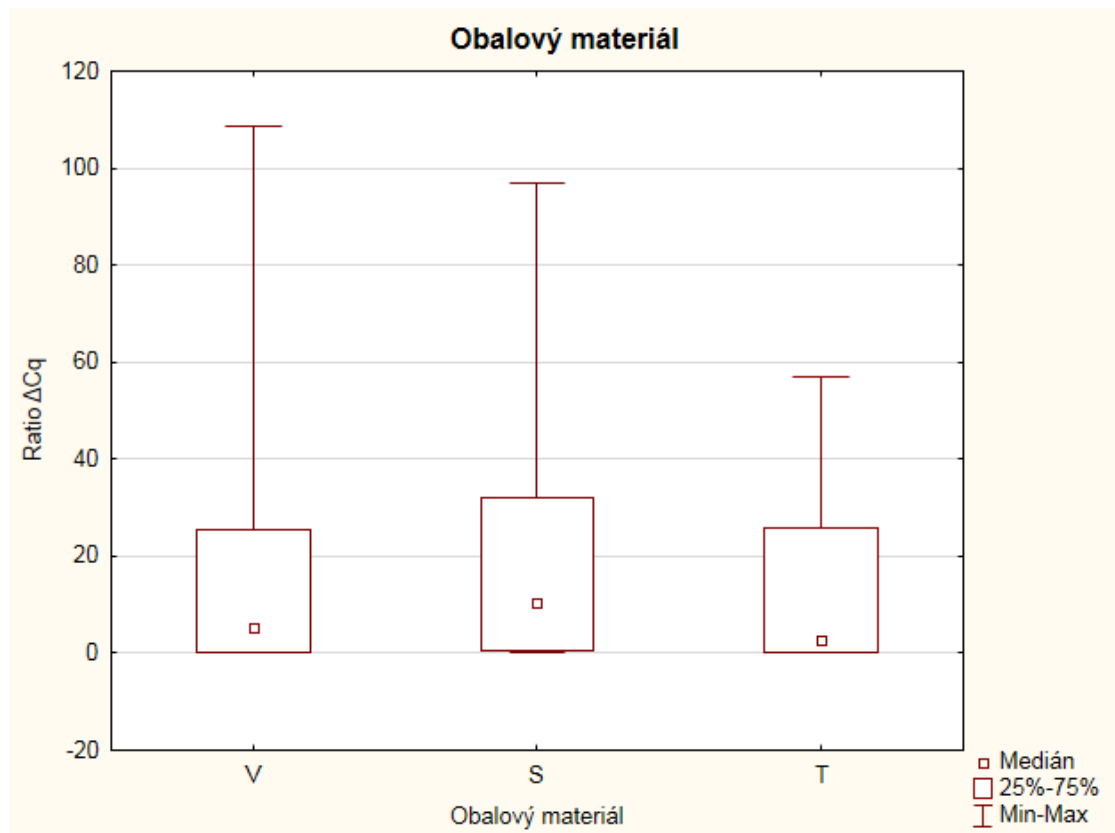
**Graf 13:** Porovnání rozdílů hodnot mediánů  $\Delta Cq$  mezi různými stupni otlačení plodů – výstup Kruskal-Wallisovy ANOVY



### Způsob balení plodů

V Tabulce 9 v Příloze II jsou červenou barvou zvýrazněny takové dvojice porovnávaných obalových materiálů, u kterých je možné hodnoty mediánů Ratio  $\Delta Cq$  považovat za statisticky významně odlišné na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ . Z této tabulky je patrné, že statistické rozdíly jsou mezi všemi způsoby balení plodů.

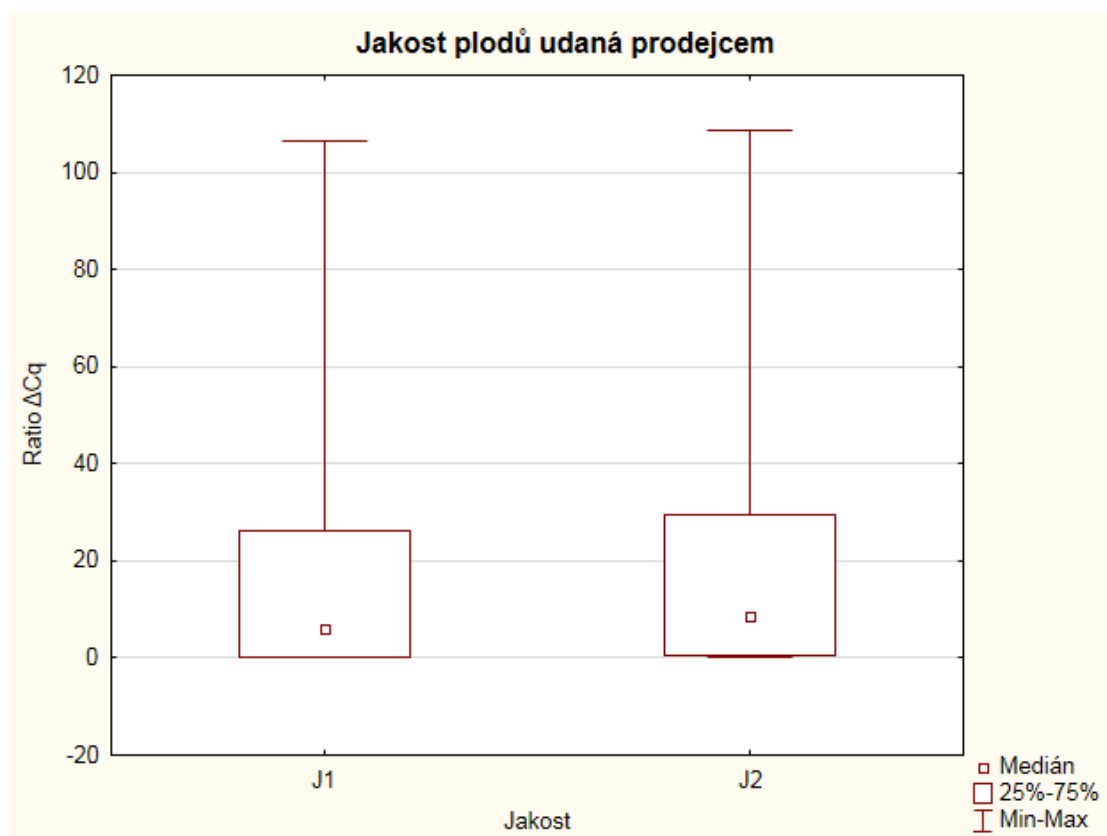
**Graf 14:** Porovnání rozdílů hodnot mediánů  $\Delta Cq$  mezi použitým obalovým materiálem – výstup Kruskal-Wallisovy ANOVY



### Jakost udávaná prodejcem zboží

V Tabulce 10 v Příloze II jsou červenou barvou zvýrazněny jakosti plodů, u kterých je možné hodnoty mediánů Ratio  $\Delta Cq$  považovat za statisticky významně odlišné na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ . Z této tabulky je patrné, že mezi první i druhou jakostí jsou statisticky průkazné rozdíly.

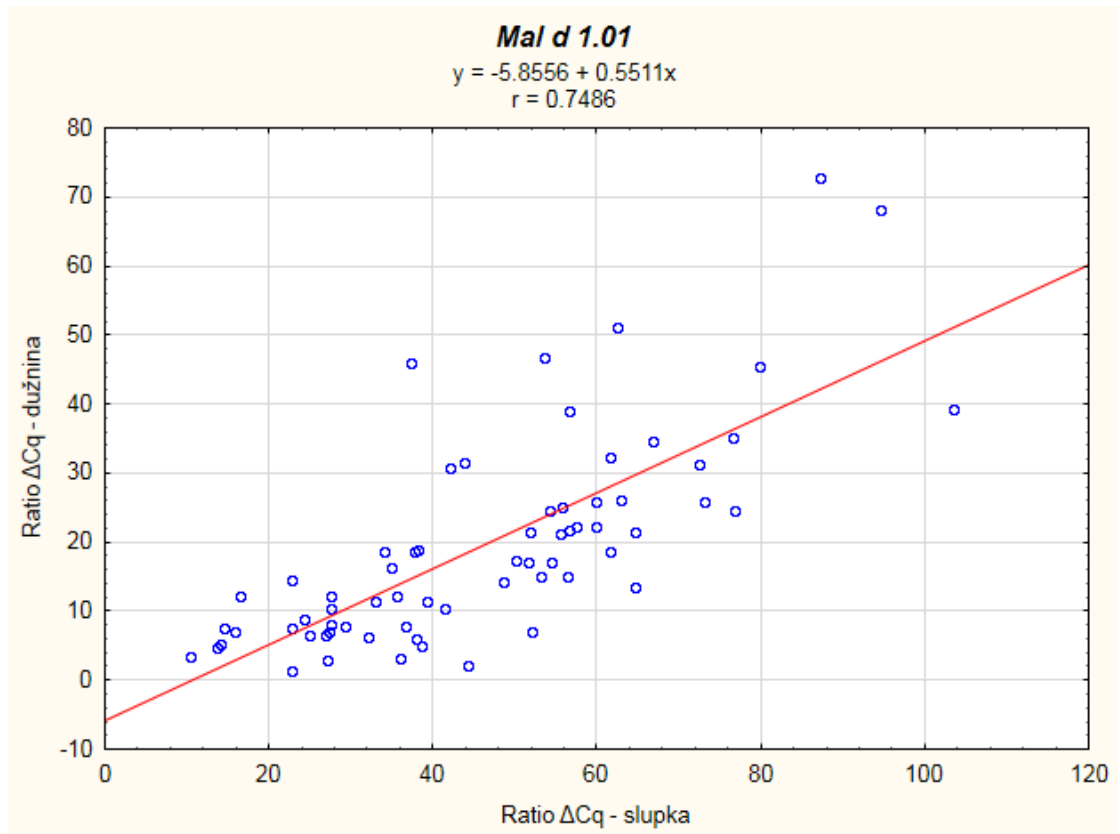
**Graf 15:** Porovnání rozdílů hodnot mediánů  $\Delta Cq$  mezi hodnocenými jakostmi uvedenými prodejci – výstup Kruskal-Wallisovy ANOVY



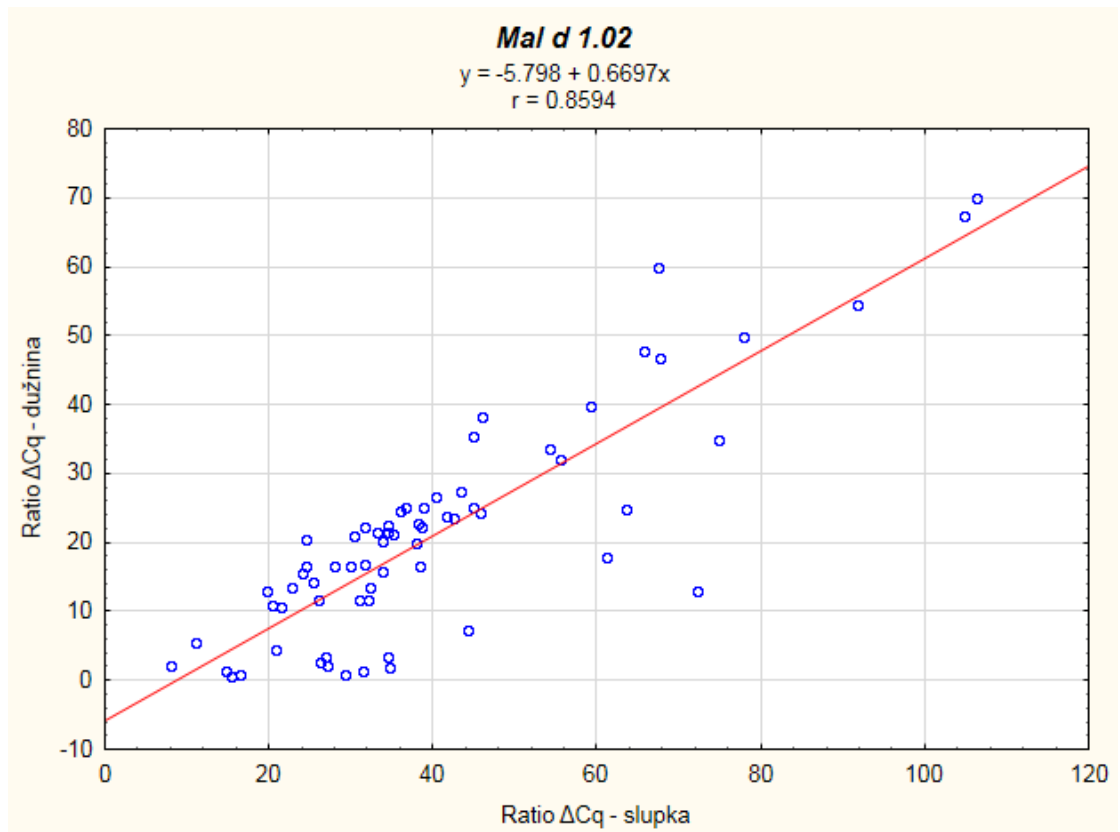
### **5.1.3 Regresní a korelační analýza použitá pro hodnocení závislosti exprese Mal d 1 izoforem ve slupce a v dužnině**

Vstupními daty pro regresní analýzu byly hodnoty Ratio  $\Delta Cq$ . Na následujících grafech (Graf 16 – 20) je znázorněn průběh závislosti včetně rovnice přímky a hodnot korelačního koeficientu. Statistická závislost na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$  byla prokázána při hodnocení Mal d 1.01 a Mal d 1.02 a součtu všech čtyřech genů. Tyto geny měly silnou závislost mezi expresí ve slupce a dužnině (75 - 85 %). Naopak geny Mal d 1.06A a Mal d 1.06B tuto závislost neprokázaly (12 – 27 %)

**Graf 16:** Závislost exprese izoformy Mal d 1.01 ve slupce a dužnině plodů

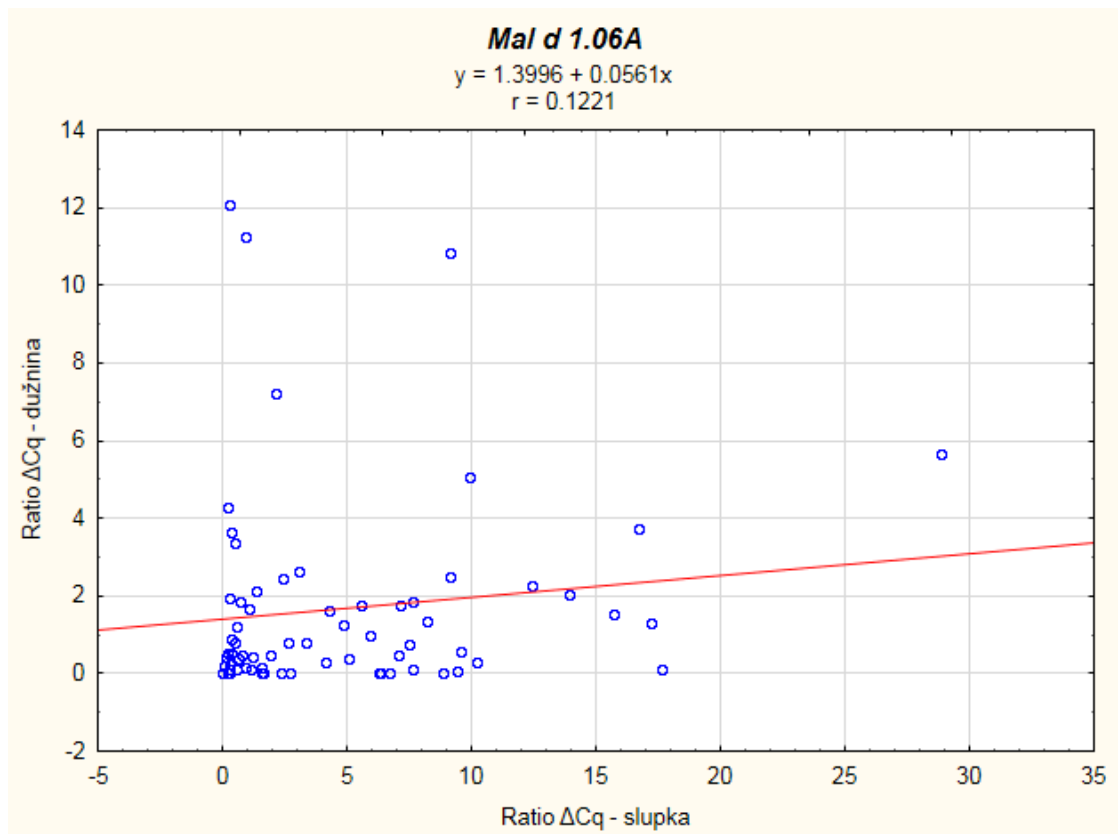


**Graf 17:** Závislost exprese izoformy Mal d 1.02 ve slupce a dužnině plodů

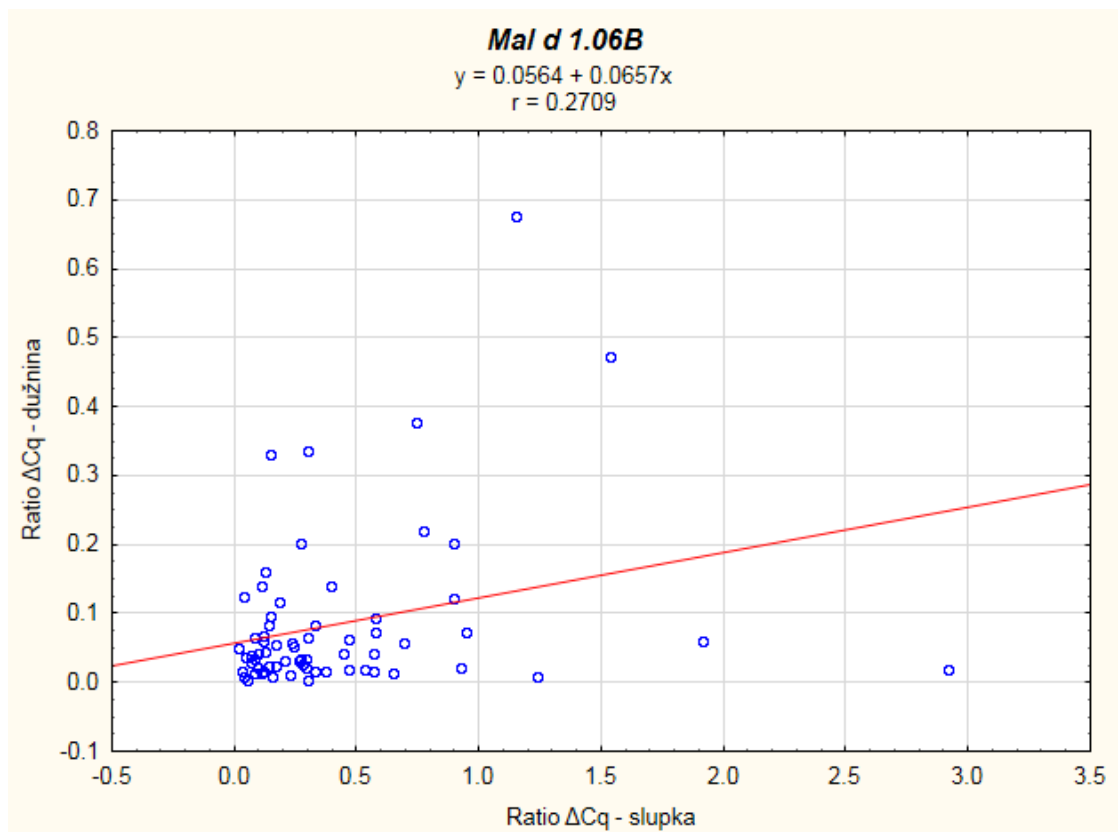




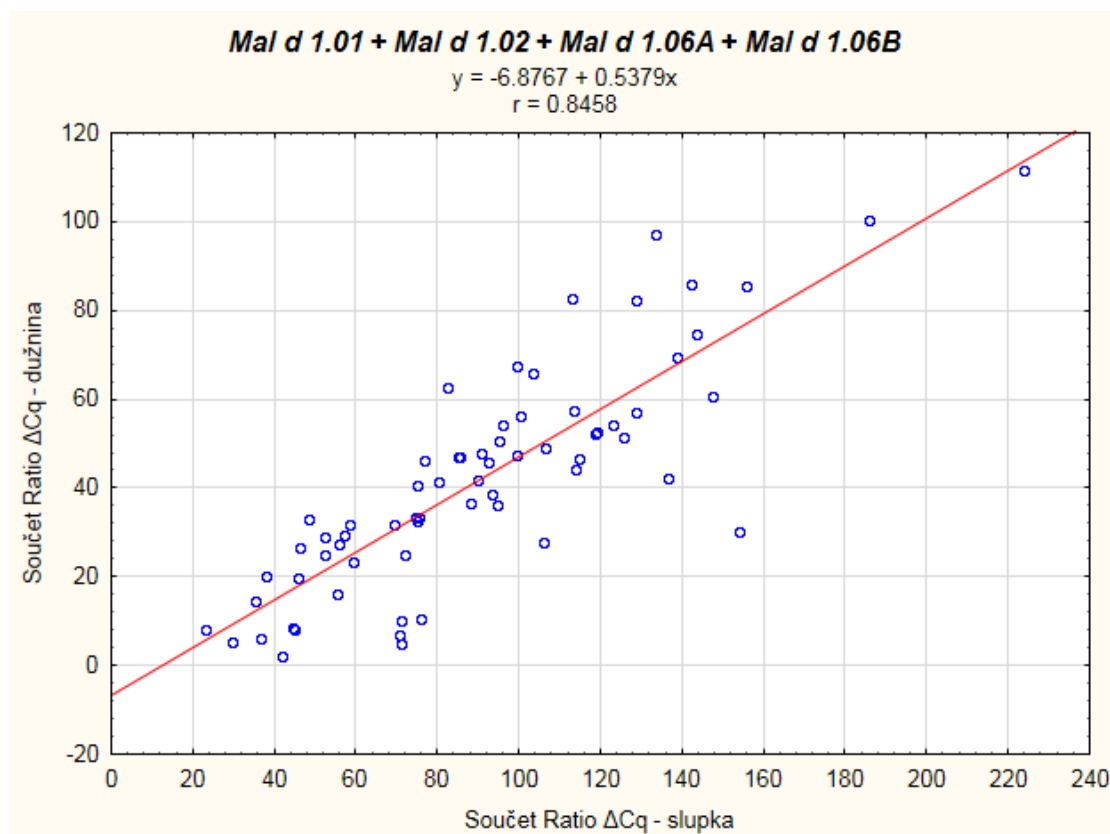
**Graf 18:** Závislost exprese izoformy Mal d 1.06A ve slupce a dužnině plodů



**Graf 19:** Závislost exprese izoformy Mal d 1.06B ve slupce a dužnině plodů



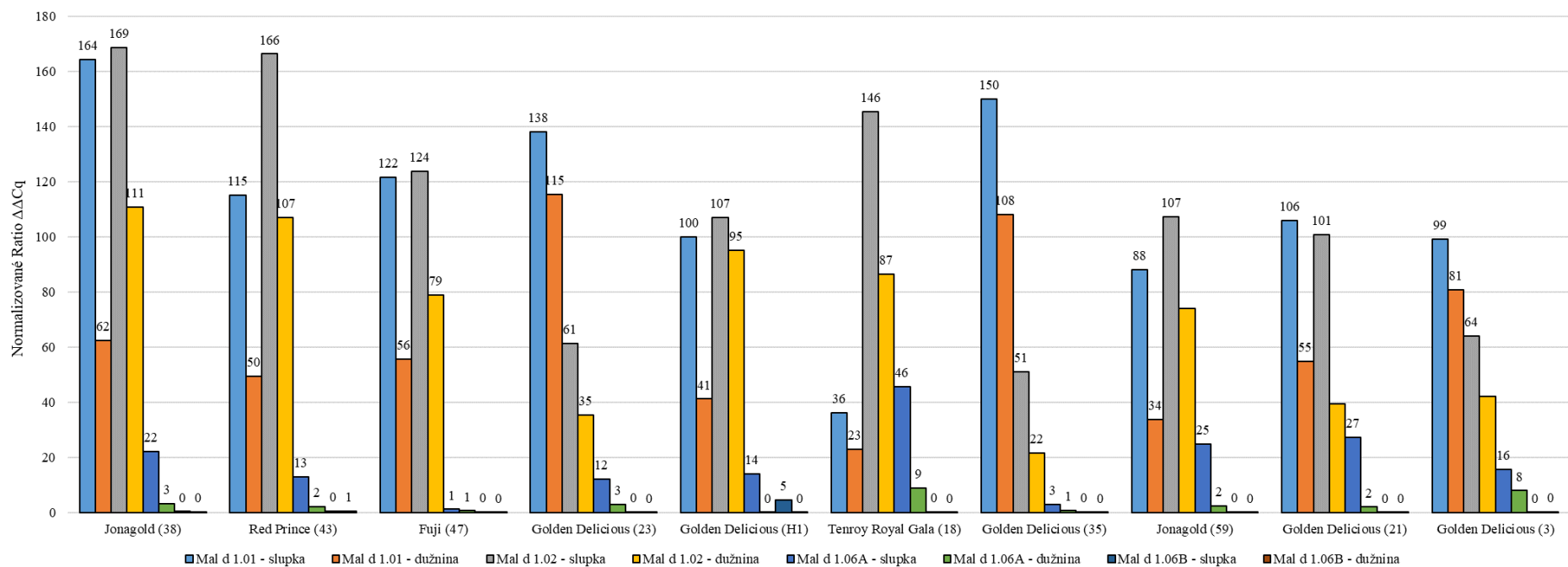
**Graf 20:** Závislost exprese Mal d 1 izoforem ve slupce a dužnině plodů



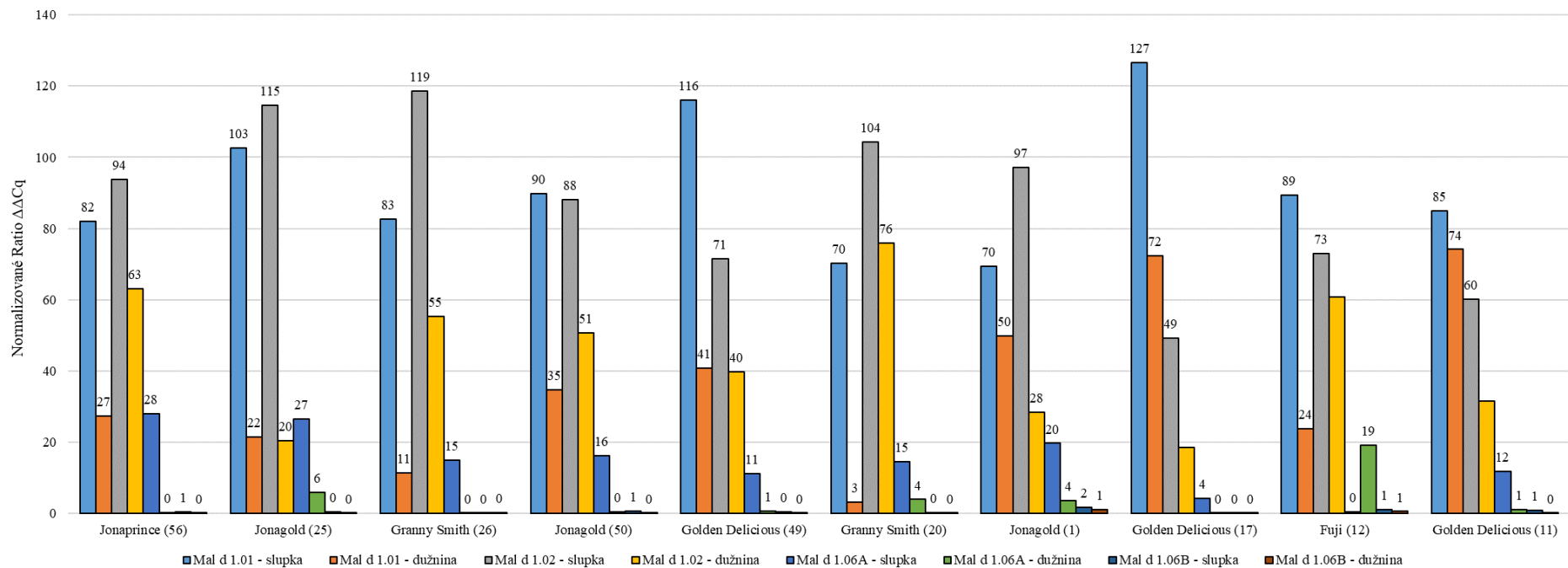
#### 5.1.4 Grafický přehled stanovených hodnot Ratio $\Delta\Delta Cq$

Vzhledem k tomu, že při řešení práce bylo potvrzeno, že eficiency amplifikací studovaných izoforem Mal d 1 i house keepingového genu pro aktin 7 jsou velice podobné, bylo možné provést normalizaci získaných dat k jednomu referenčnímu genotypu a genu. Tímto referenčním vzorkem byla slupka Golden Delicious z VŠÚO Holovousy s.r.o. ze sklizně v roce 2016 a izoforma Mal d 1.01. V následujícím grafu (Graf 21) je uveden přehled získaných normalizovaných expresí. Číselná hodnota u každého sloupce představuje procenticky vyjádřenou míru exprese vztaženou k výše popsanému referenčnímu vzorku.

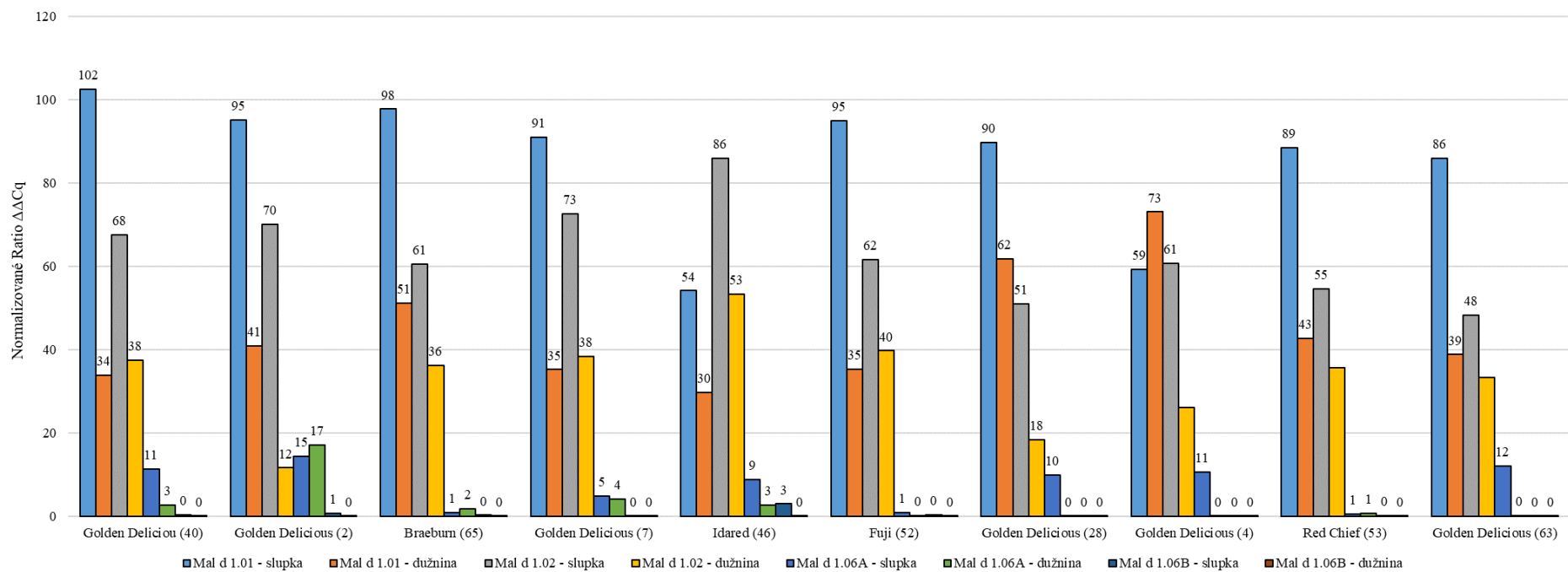
**Graf 21:** Přehled normalizovaných hodnot Ratio  $\Delta\Delta Cq$  u jednotlivých analyzovaných vzorků – 1. část



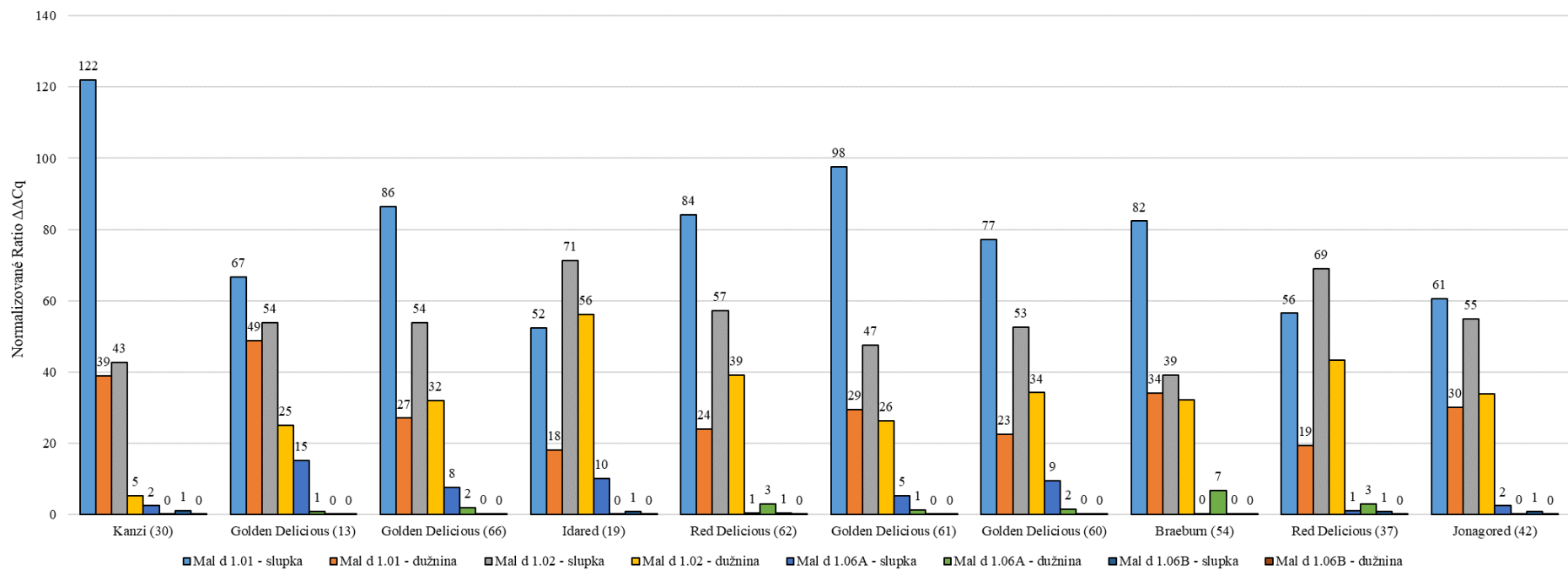
**Graf 21:** Přehled normalizovaných hodnot Ratio  $\Delta\Delta Cq$  u jednotlivých analyzovaných vzorků – 2. část



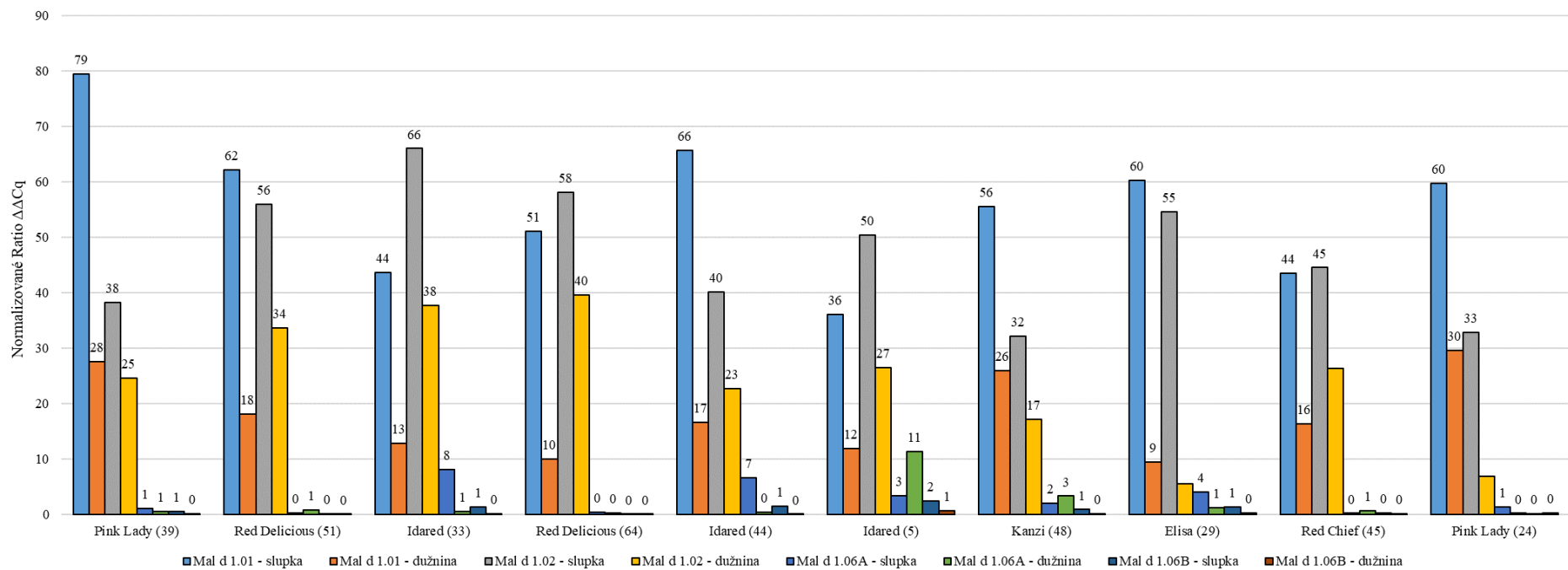
**Graf 21:** Přehled normalizovaných hodnot Ratio  $\Delta\Delta Cq$  u jednotlivých analyzovaných vzorků – 3. část



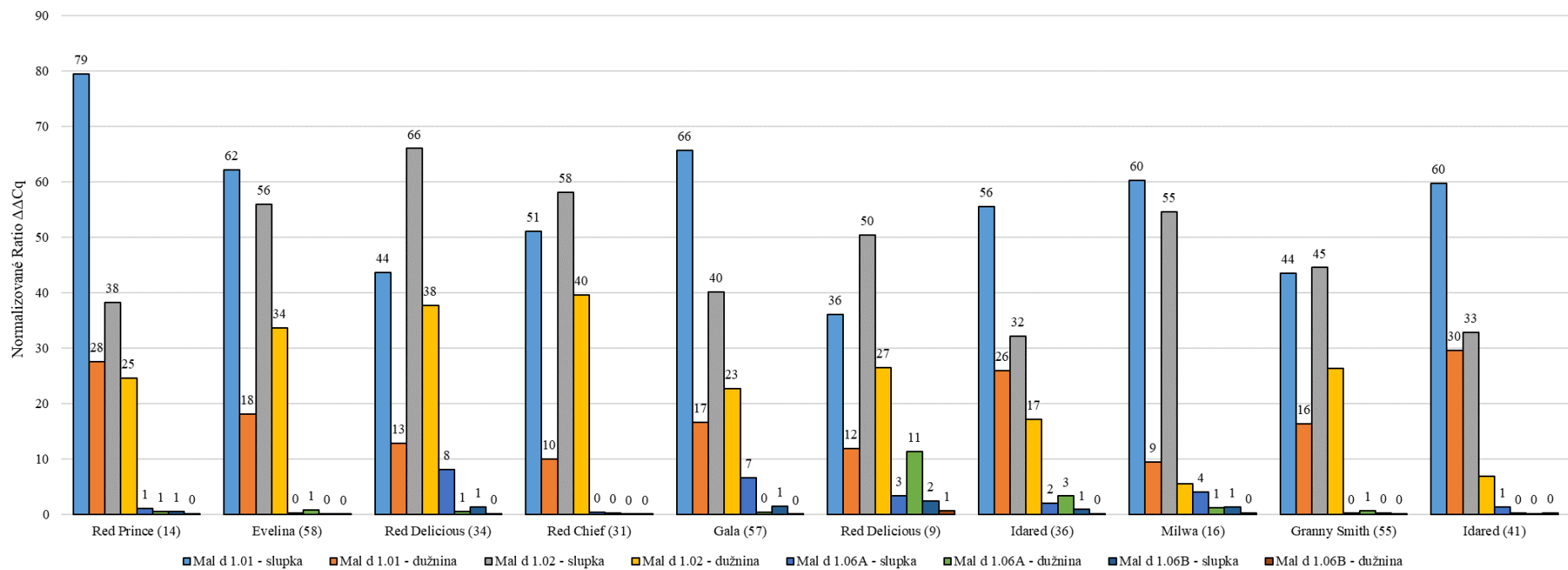
**Graf 21:** Přehled normalizovaných hodnot Ratio  $\Delta\Delta Cq$  u jednotlivých analyzovaných vzorků – 4. část



**Graf 21:** Přehled normalizovaných hodnot Ratio  $\Delta\Delta Cq$  u jednotlivých analyzovaných vzorků – 5. část

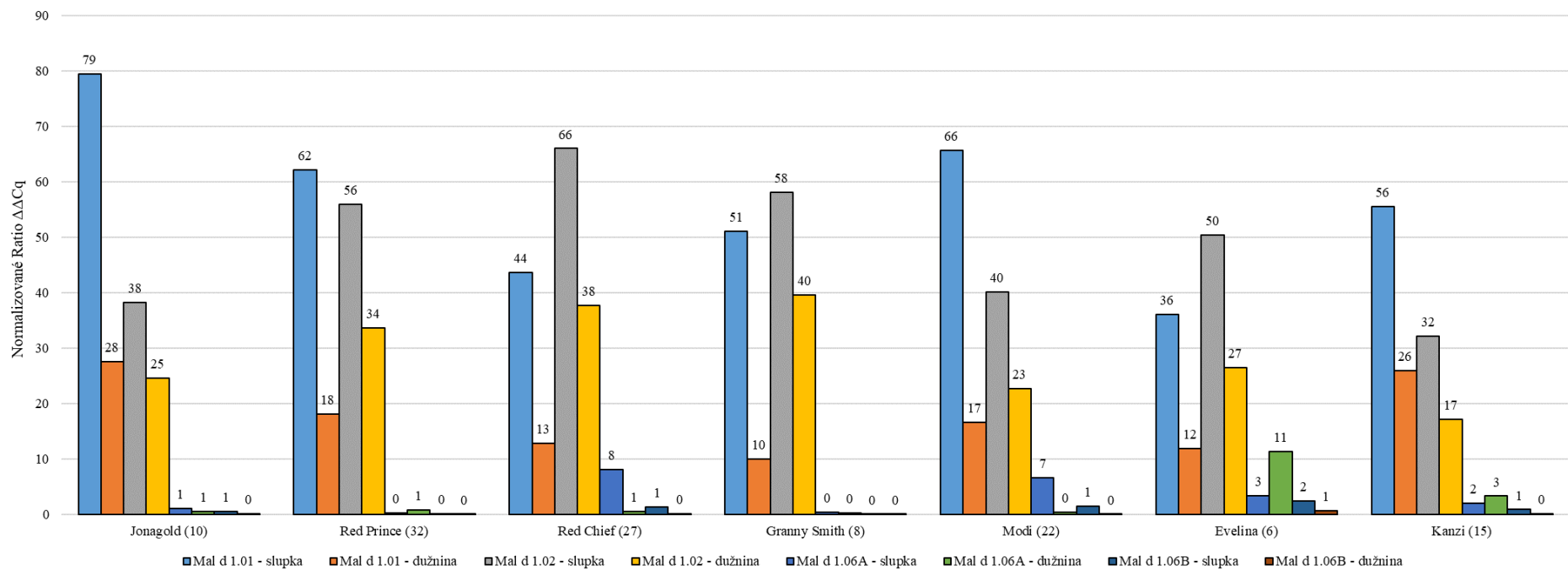


**Graf 21:** Přehled normalizovaných hodnot Ratio  $\Delta\Delta Cq$  u jednotlivých analyzovaných vzorků – 6. část



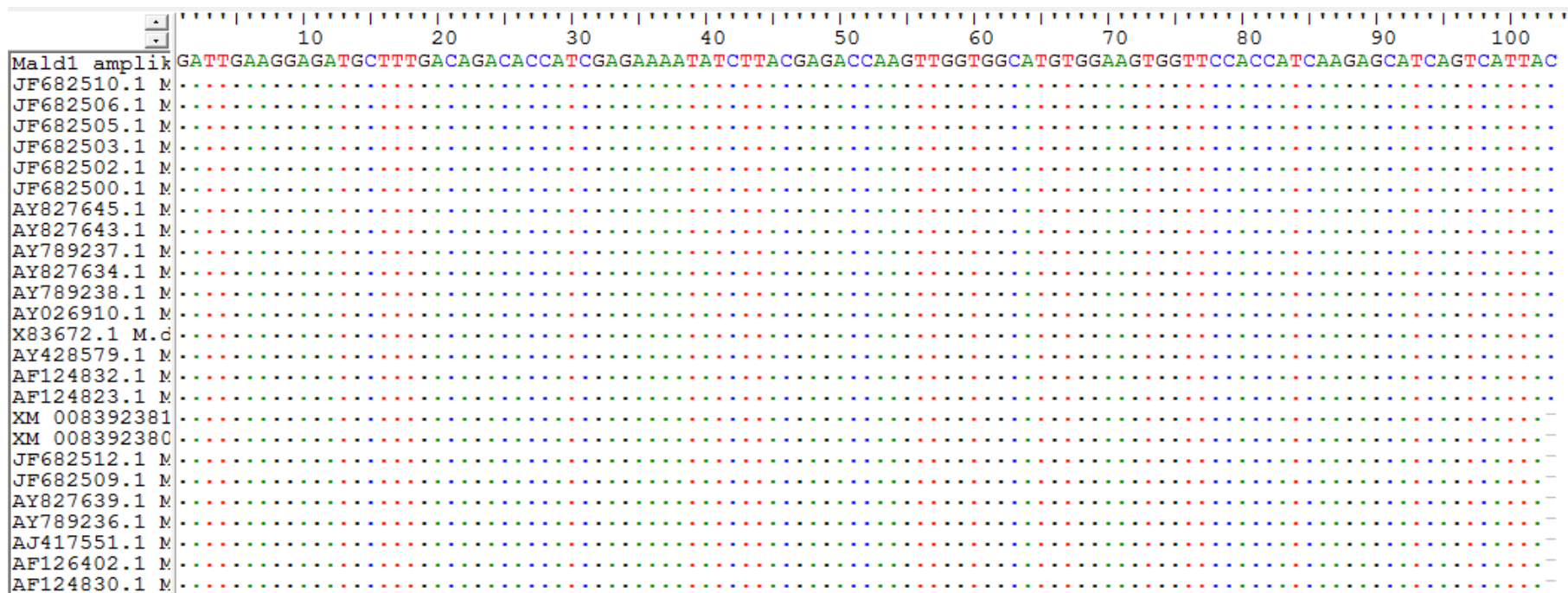


**Graf 21:** Přehled normalizovaných hodnot Ratio  $\Delta\Delta Cq$  u jednotlivých analyzovaných vzorků – 7. část

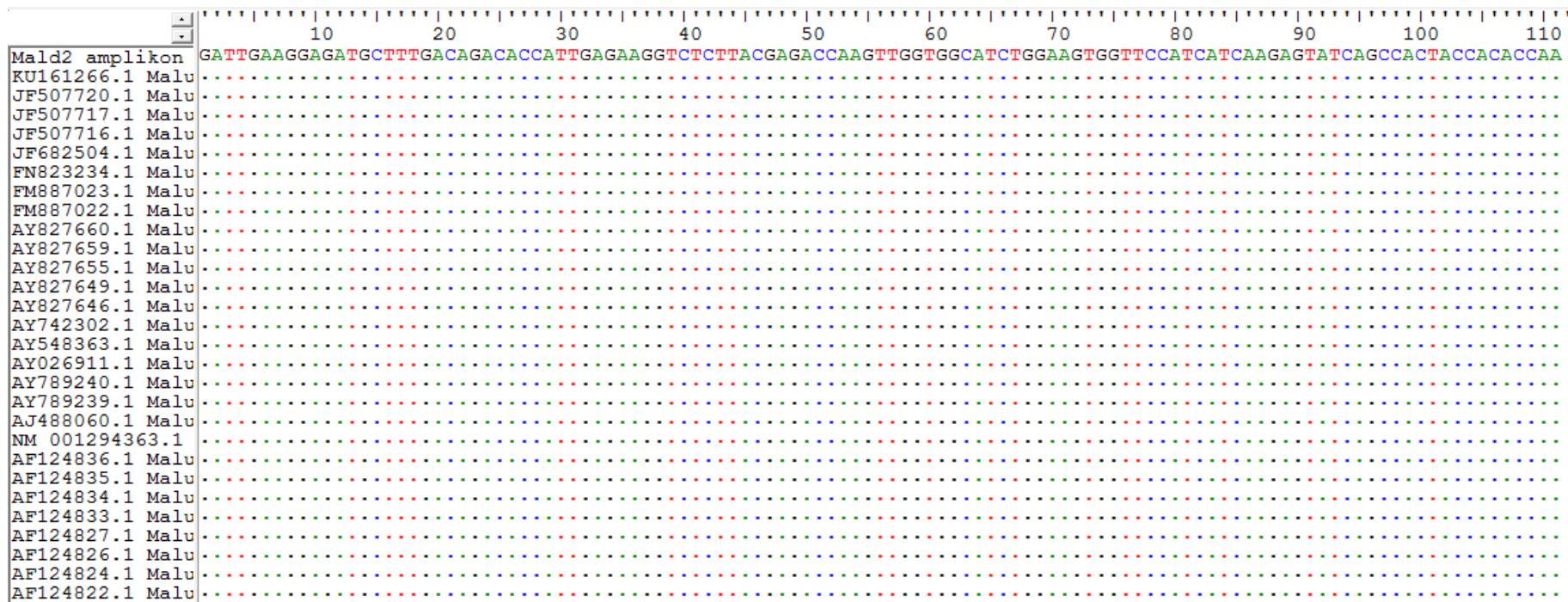


### 5.1.5 Ověření specifičnosti amplifikace pomocí sekvenování

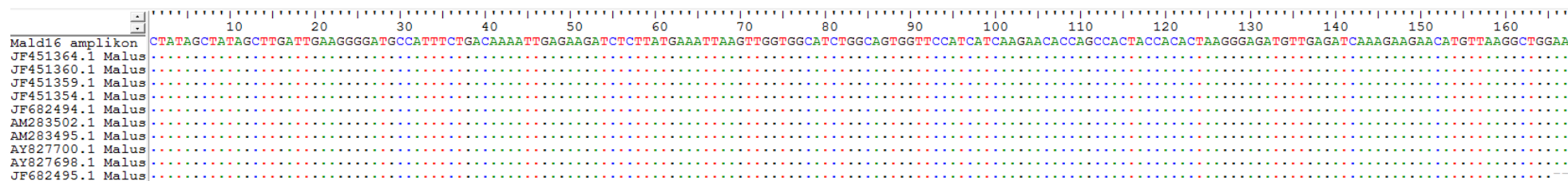
Pro sekvenční analýzu byly použity amplikony všech 4 studovaných izoform Mal d 1, které byly získány ze slupky odrůdu Golden Delicious z VŠÚO Holovousy s.r.o. ze sklizně v roce 2016. Získané sekvence byly porovnány s mezinárodní nukleotidovou databází NCBI a následně vyhodnoceny programem BioEdit version 7.2.5 (Hall, 1999). Tato analýza potvrdila, že byla získána stoprocentní identita s výsledky publikovanými jinými autory. Přehled porovnaných sekvencí – výstup programu BioEdit version 7.2.5 (Hall, 1999) je pro jednotlivé izoformy uveden na následujících obrázcích (Obrázek 12 – 15). Je zde uvedeno číslo NCBI a tečky podávají informaci o tom, že mnou získané sekvence vykazují identitu se sekvencemi databáze NCBI.



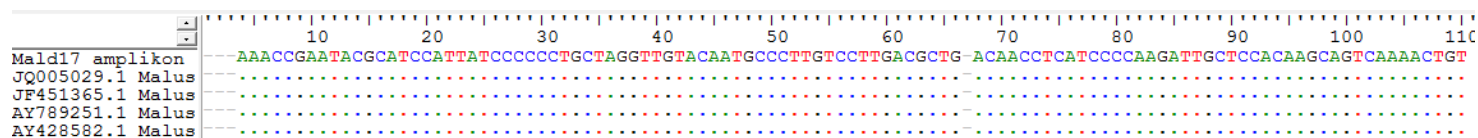
**Obrázek 12:** Porovnání sekvence Mal d 1.01 se záznamy mezinárodní nukleotidové databáze NCBI



**Obrázek 13:** Porovnání sekvence *Mal d 1.02* se záznamy mezinárodní nukleotidové databáze NCBI



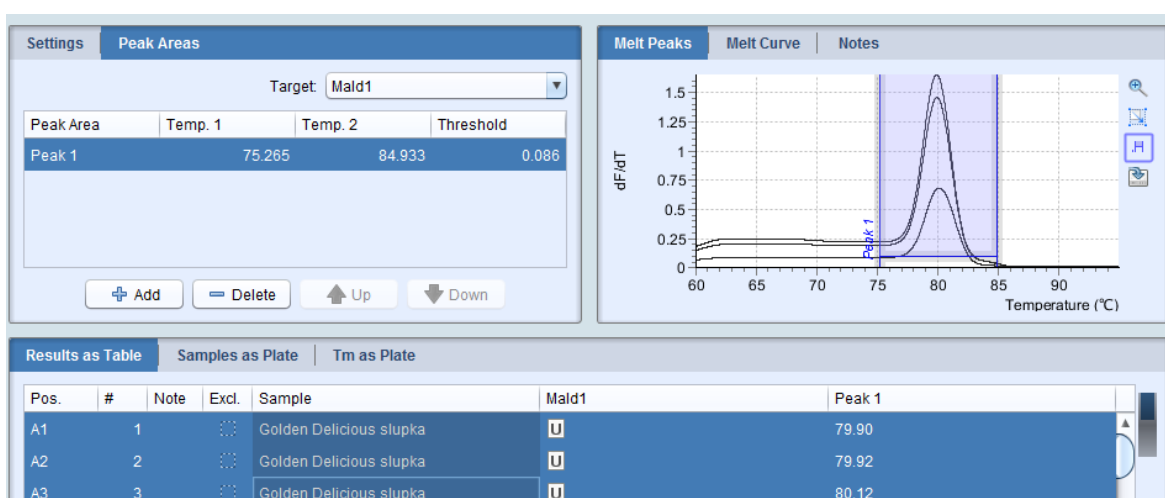
**Obrázek 14:** Porovnání sekvence Mal d 1.06A se záznamy mezinárodní nukleotidové databáze NCBI



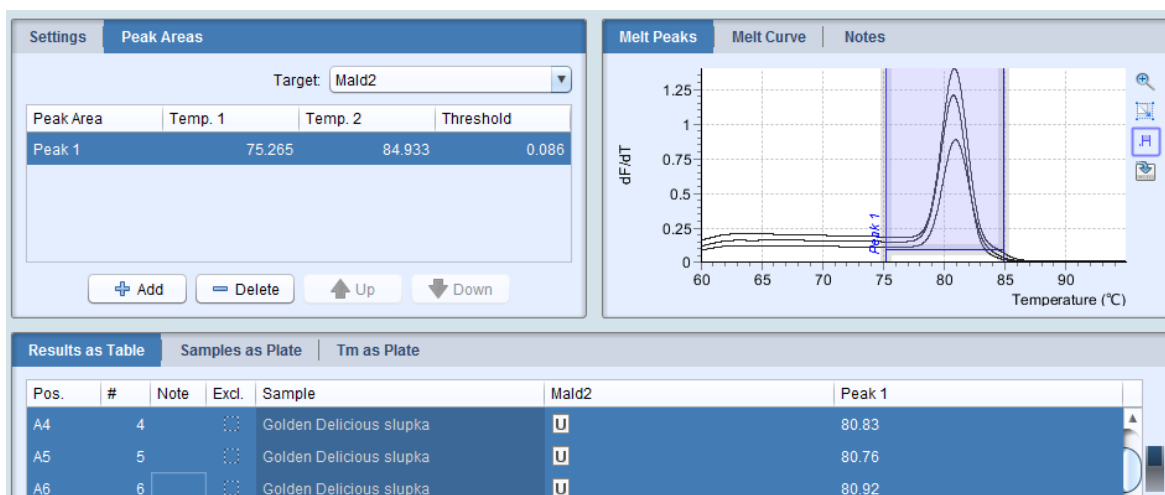
**Obrázek 15:** Porovnání sekvence Mal d 1.06B se záznamy mezinárodní nukleotidové databáze NCBI

### 5.1.6 Vyhodnocení specifity amplifikace pomocí křivek tání

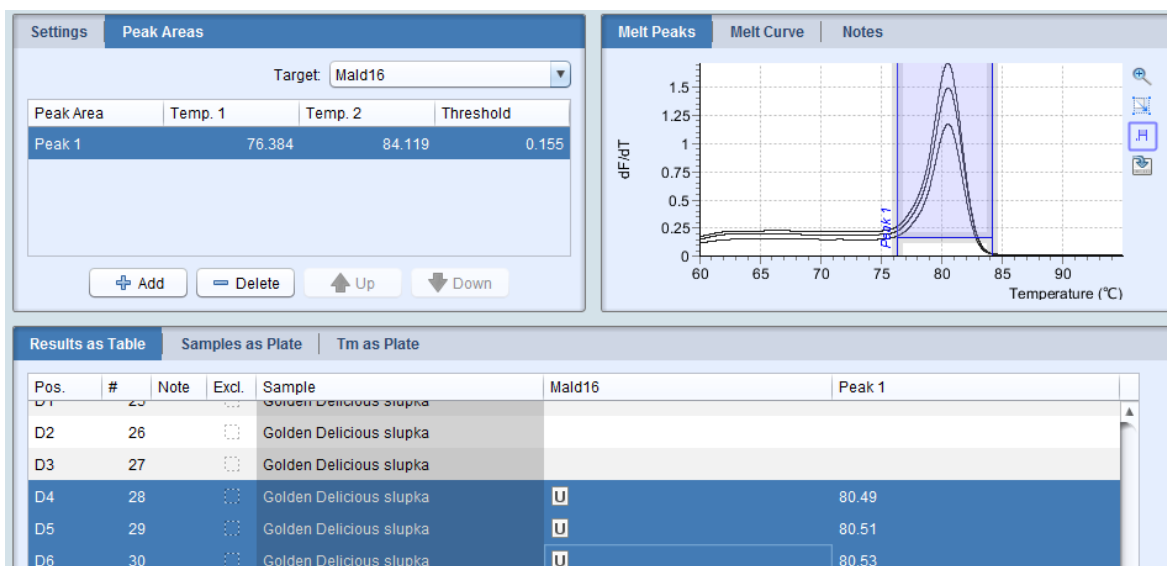
Metody qRT-PCR umožňují provázat postamplifikační analýzu založenou na vyhodnocování křivek tání PCR produktu a stanovení hodnoty  $T_m$ . Tato analýza bylo provedena u všech hodnocených amplikonů. Na následujících obrázcích (Obrázek 16 – 19) jsou znázorněny výstupy této analýzy v ovládacím programu termocykleru LightCycler Nano (Roche) u amplikonů získaných z cDNA pocházejících ze slupky odrůdy Golden Delicious. U všech hodnocených izoforem je patrné, že křivky mají typický průběh a představují jeden ostrý pík.



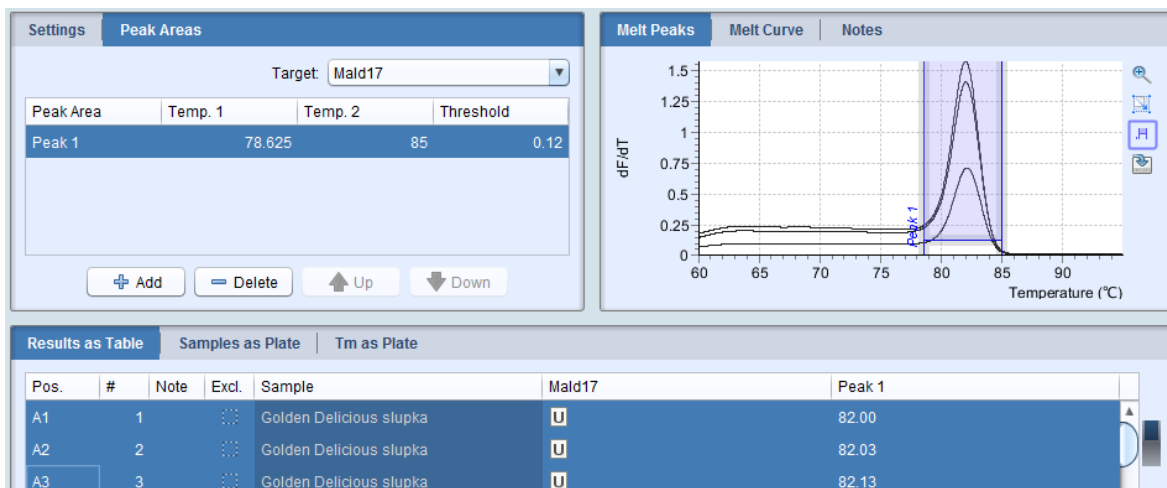
Obrázek 16: Křivky tání a hodnota  $T_m$  u amplikonu Mal d 1.01



Obrázek 17: Křivky tání a hodnota  $T_m$  u amplikonu Mal d 1.02



Obrázek 18: Křivky tání a hodnota  $T_m$  u amplikonu Mal d 1.06A



Obrázek 19: Křivky tání a hodnota  $T_m$  u amplikonu Mal d 1.06B

## 6 Diskuze

### 6.1 Metody izolace RNA, tvorby cDNA a amplifikace

Kromě klasické fenolové nebo guanidin hydrochloridové izolace RNA (MacDonald et al., 1987; Chang et al., 1993; Beuning et al., 2004; Kürkcüoglu et al., 2007) se dnes často využívají izolační kity, např. Extract-A-Plant isolation kit od Clontech (Oh et al., 2000) nebo NucleoSpin RNA Plant kit od Macherey-Nagel (Iorio et al., 2012). V této diplomové práci byl pro izolaci celkové RNA využit Spectrum Plant Total RNA Kit (Sigma), pomocí něhož probíhala izolace bez problémů, nedocházelo k degradaci RNA, na což mělo také vliv okamžité zmrazení vzorků pomocí kapalného dusíku, uchování při teplotě  $-80^{\circ}\text{C}$  a používání RNaseZAP<sup>TM</sup> (Sigma) pro degradaci ribonukleáz, jež by mohly ovlivnit následnou výtěžnost. U všech vzorků bylo kvantifikováno dostatečné množství RNA, které bylo dále použito pro přepis do cDNA.

Na syntézu cDNA lze využít mnoho různých kitů např. SuperScript II reverse transcription systém - Gibco-BRL (Oh et al., 2000), GeneAmp RNA PCR Kit (Schöning et al., 1996) nebo cDNA SMART cDNAsynthesis kit - Clontech (Kürkcüoglu et al., 2007). V této diplomové práci byla syntéza cDNA provedena pomocí Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche) za použití oligo(dT)<sub>18</sub> primeru.

Vytvořená cDNA byla využita pro kvantitativní PCR, která byla realizována v termocykleru LightCycler Nano (Roche) a kitu FastStart Essential DNA Green Master (Roche). Lze využít i jiné termocyklery a kity, např. Gene Amp PCR System 9700 termocycler od Applied Biosystems (Botton et al., 2008) nebo kit QuantiTect SYBRGreen PCR Kit (Kürkcüoglu et al., 2007).

Pro qPCR byly v této práci použity primerové páry podle Pagliarani et al. (2013). Pro Mal d 1.01 (F 5'-GATTGAAGGAGATGCTTTGACA-3', R 5'-GTAATGACTGATGCTTTGATGG-3') a pro Mal d 1.02 (F 5'-ATTGAAGGAGATGCTTTGACA-3', R 5'-TTGGTGTGGTAGTGGCTGATA-3'). V jiných zdrojích lze nalézt pro amplifikaci těchto izoalergenů odlišné primerové páry. Botton et al. (2008) využívali pro amplifikaci Mal d 1.01 primery (F 5'-AAGCTGAAATCCTTGAAGGAA-3' a R 5'-GTGCTCTTCCTTGATTTC

AATG-3') a Mal d 1.02 (F 5'-ACACCTCTGAGATTCCACCAC-3' a R 5'-CAACTTGGTYTCGTA AGAGAC-3').

Pro vyhodnocení exprese genů byly použity hodnoty Ratio  $\Delta Cq$ , které normalizují relativní expresi studovaných izoform vzhledem k expresi house keepingového genu pro aktin 7. Aktin je často využíván jako house keepingový gen (Vinogradov, 2004; Kürkcüoglu et al., 2007) a vyhodnocení hodnotou  $\Delta Cq$  je standardní pro určení relativní exprese genů (Ginzinger, 2002; Karlen et al., 2007; Kürkcüoglu et al., 2007; VanGuilder et al., 2008).

Specifičnost amplifikace byla ověřena sekvenací, jež potvrdila stoprocentní identitu s výsledky publikovanými jinými autory (Beuning et al., 2004; Bolhaar et al., 2005; Gao et al., 2005)

Pro stanovení míry exprese se využívá parametr Ratio  $\Delta\Delta Cq$ , který vyjadřuje procenticky míru exprese studované izoformy k referenčnímu vzorku odrůdy Golden Delicious z VŠÚO Holovousy s.r.o. Pro použití metody  $\Delta\Delta Cq$  bylo nutné ověřit, zdali eficeience PCR amplifikace (E) vykazuje u všech testovaných genů minimální rozdíly. Na rozdíl od Pagliarani et al. (2013) se v této diplomové práci uvedené hodnoty eficeience pohybovaly v intervalu od (-0,1) do 0,1 a proto lze konstatovat, že amplifikace probíhala spolehlivě bez vzniku nespecifických struktur. Kit od firmy Roche tedy fungoval spolehlivě a byl optimalizovaný tak, aby amplifikace probíhala specificky.

Postamplifikační analýza, založená na vyhodnocování křivek tání PCR produktu, vykazovala specifitu amplifikace a stanovené hodnoty  $T_m$  se shodovaly s výsledky jiných autorů (Tabulka 6).

**Tabulka 6:** Porovnání hodnot  $T_m$  s Pagliarani et al. (2013) a Botton et al. (2008)

Izoforma Mal d 1	$T_m$ (°C) zjištěné analýzou teploty tání	$T_m$ (°C) dle Pagliarani et al. (2013)	$T_m$ (°C) dle Botton et al. (2008)
Mal d 1.01	80	80,5	79
Mal d 1.02	81	81	79
Mal d 1.06A	80,5	80,5	-
Mal d 1.06B	82	81,5	-



## 6.2 Hodnocení Ratio $\Delta Cq$ a Norm. $\Delta\Delta Cq$ u jednotlivých vzorků

Z hodnocení Ratio  $\Delta Cq$  a Norm.  $\Delta\Delta Cq$  u jednotlivých vzorků vyplývá výrazný rozdíl v expresi alergenů u jednotlivých odrůd. I když byly vzorky vystaveny různým podmínkám, bylo možné určit odrůdy s vyšší a nižší expresí alergenů. Mezi odrůdy s vyšší expresí Mal d 1 byly zařazeny Golden Delicious a Jonagold, dále Jonaprince, Tenroy Royal Gala a Fuji. Odrůda Golden Delicious je většinou autorů vyhodnocena jako vysoce alergenní (Vieths et al., 1994; Vieths et al., 1995; Bolhaar et al., 2005; Gao et al., 2008; Kiewning and Schmitz-Eiberger; 2013) a vzhledem k tomu, že odrůdy Jonagold, Jonaprince, Tenroy Royal Gala i Fuji vznikly křížením nebo mutací této odrůdy, lze předpokládat jejich vyšší alergenicitu, což potvrzují i ostatní autoři (Bolhaar et al., 2005; Kiewning and Schmitz-Eiberger; 2013). Odrůda Gala, která byla reprezentována pouze jedním vzorkem, který měl tuhou nedozrálou dužninu a neotlačenou slupku, byla vyhodnocena jako málo alergenní. Na rozdíl od této práce, Bolhaar et al. (2005) hodnotí tuto odrůdu jako vysoce alergenní. Tento rozdíl ve výsledcích můžeme pozorovat i u odrůdy Granny Smith (Vieths et al., 1994). O odrůdách, které byly v této diplomové práci vyhodnoceny jako málo alergenní (Modi, Evelina, Red Chief a Kanzi) nebyly nalezeny informace k porovnání shody výsledku s jinými zdroji, například Gao et al. (2008) vyzdvihuje jako málo alergenní odrůdy Santana a Priscila (Gao et al., 2008).

## 6.3 Efekty jednotlivých třídících faktorů na hodnotu Ratio $\Delta Cq$

V následující části diplomové práce je provedeno shrnutí výsledků dle jednotlivých třídících faktorů a jejich porovnání s autory.

### Vzorky

Vysokou míru exprese alergenů Mal d 1 vykazovaly vzorky, které se v pomologické stupnici hodnotily ME3 a OT3, což byly plody vysoce přezrálé se silně moučnatou dužninou a výrazným otláčením slupky, pod níž byla dužnina vodnatá až zahnědlá. S menším množstvím otlaků a s nižší zralostí dužniny, klesala i míra exprese studovaných alergenů. Plody, které byly bez otlaků, sklizené dříve než ve vhodné sklizňové zralosti (vzorky 6 a 22) měly malou míru exprese genů, statisticky významně odlišnou od většiny ostatních vzorků. To potvrzuje význam PR-proteinů a jejich expresi při obranných reakcích v nepříznivých biotických i abiotických podmínkách. Sklizené plody jsou vystaveny velkému množství stresových faktorů, dochází k rozkladným procesům a je vysoké riziko kontaminace mikroorganismy, na něž buňky reagují

aktivací exprese těchto proteinů (Van Loon and Van Strien, 1999; Koistinen et al., 2002; Breiteneder, 2004; Hoffmann-Sommergruber and Mills, 2009; Iorio et al., 2012; Buron-Moles et al., 2015; Luo et al., 2018). Matthes and Schmitz-Eiberger (2009) potvrzují vyšší variabilitu v expresi Mal d 1 mezi stejnými kultivary v různých podmínkách pěstování a napadení patogeny.

### Odrůda

Grafické vyhodnocení uvedené v Grafech 1 - 3 potvrzují i statistické analýzy, v nichž byly odrůdy Golden Delicious a Jonagold vyhodnoceny jako odrůdy s vysokou expresí izoformem Mal d 1, naopak odrůda Modi s minimální expresí Mal d 1. Rozdíly v expresi alergenů mezi odrůdami potvrzují výzkumy mnoha autorů (Vieths et al., 1994; Puehringer et al., 2003; Beuning et al., 2004; Bolhaar et al., 2005; Gilissen et al., 2005; Gao et al., 2008; Matthes and Schmitz-Eiberger, 2009; Pagliarani et al., 2011; Nybom et al. 2013; Pagliarani et al., 2013; Paris et al., 2017). Bližší vyhodnocení bylo provedeno v kapitole 6.2.

### Izoformy

Ze statistických analýz i z Grafu 21 je patrná majoritní exprese izoformem Mal d 1.01 a Mal d 1.02, což je ve shodě s autory Gao et al. (2008) a Ahammer et al. (2017). Statisticky mezi těmito izoformami není významný rozdíl, což je patrné i z Grafu 21, kde je vidět u většiny vzorků stejný podíl exprese Mal d 1.01 a Mal d 1.02. Výjimku tvoří vzorky, u nichž se izoforma Mal d 1.02 exprimovala ve větší míře, např. Granny Smith (26), Red Chief (27), Idared (33), Red Prince (43), Golden Delicious (66) a největší rozdíl je patrný u vzorku Tenroy Royal Gala (18), naopak u vzorků Golden Delicious (17, 61, 63), Modi (22), Kanzi (30) a Pink Lady (39) vykazuje vyšší expresi izoforma Mal d 1.01. Botton et al. (2008) vyhodnotily jako majoritní izoformu Mal d 1.02 a Mal d 1.01 jako minoritní. Mezi expresí ostatních izoformem byl v této diplomové práci nalezen statisticky významný rozdíl. Přestože izoformy Mal d 1.06A a Mal d 1.06B vykazovaly minoritní expresi, u některých vzorků byla jejich exprese o něco vyšší. Výraznější podíl Mal d 1.06A byl u vzorků Tenroy Royal Gala (16) a Milwa (16) a Mal d 1.06B u Idared (5) a Golden Delicious (H1).

### Slupka a dužnina

Rozdíly v expresi alergenů mezi slupkou a dužninou zmiňuje mnoho autorů (Puehringer et al., 2003; Beuning et al., 2004; Pagliarani et al., 2011). Statistická analýza potvrzuje předpoklad, že slupka je alergennější než dužnina (Fernández-Rivas and Cuevas, 1999; Pagliarani et al. 2013; Ahammer et al., 2016). Tento rozdíl je pravděpodobně způsoben prvním kontaktem slupky plodu s chorobami a škůdci, s tím souvisí i manipulace s plody a jejich vzájemný kontakt. Nicméně některé studie ukazují na silnější alergickou reakci u pacientů na dužninu než na slupku plodu (Ricci et al., 2010). Mezi slupkou a dužninou můžeme pozorovat i rozdíly v expresi jednotlivých izoform, např. ve slupce Golden Delicious (17) má majoritní podíl izoforma Mal d 1.01 naopak ve vzorku Tenroy Royal Gala (18) izoforma Mal d 1.02. V dužnině plodů má Mal d 1.01 majoritní podíl u Golden Delicious (23) a Mal d 1.02 u Granny Smith (20).

### Země původu

Vzorky, která vykazovaly vyšší expresi alergenů Mal d 1, byly reprezentovány pouze odrůdou Evelina, pocházející ze Slovenska, u níž se vzhledem k nízké expresi alergenů dají předpokládat statisticky významné rozdíly od ostatních plodů. Vzorky odrůd z Německa a Belgie byly výběrové plody, které byly s velkou pravděpodobností, vzhledem k jejich ceně, v obchodech umístěny delší dobu, a proto byly vysoce moučnaté a přezrálé. Tento fakt opět vypovídá o souvislosti vyšší exprese PR-proteinů při pokročilými rozkladnými procesech v plodech jablek (Van Loon and Van Strien, 1999; Pühringer et al, 2000; Koistinen et al., 2002; Breiteneder, 2004; Hoffmann-Sommergruber and Mills, 2009; Iorio et al., 2012; Buron-Moles et al., 2015) a jejich vyšší obsah při dlouhodobém skladování na rozdíl od množství těchto proteinů v čerstvě sklizených plodech (Matthes and Schmitz-Eiberger, 2009).

### Obchodní řetězec

Největší statisticky významný rozdíl od obchodních řetězců vykazoval vzorek z VŠÚO Holovousy s.r.o. Vzhledem k tomu, že plody měly strupovitou slupku, je jeden z možných důvodů vyšší exprese alergenů v tomto vzorku, jejich vystavení biotickému stresu, pravděpodobně aplikací menšího množství ochranných pesticidů. Podmínky skladování plodů mohly být, na rozdíl od klimatizovaných obchodů horší (Kiewning and Schmitz-Eiberger, 2013). Kombinace těchto biotických (Buron-Moles et al., 2015) i abiotických stresorů vyvolala silnou expresi PR-proteinů (Van Loon and Van Strien, 1999; Pühringer et al, 2000; Koistinen

et al., 2002; Breiteneder, 2004; Hoffmann-Sommergruber and Mills, 2009; Iorio et al., 2012; Buron-Moles et al., 2015).

### Tuhost dužniny a otláčení plodů

Mezi tuhostí dužniny byly prokázány statistické rozdíly, stejně jako mezi otláčenými a neotláčenými plody. U plodů s většími a menšími otlaky rozdíl prokázán nebyl. Bez ohledu na míru otláčení je exprese alergenů u plodů s otláčením vyšší než u plodů bez otláčení. Z toho vyplývá, že na pomologickém stavu plodu je závislá exprese alergenů. Toto je zdůrazněno i v předchozích částech diskuze v souvislosti s jinými třídícími faktory. Jiný výzkum pomologických charakteristik v souvislosti s expresí alergenů nebyl nalezen.

### Balení

Mezi všemi způsoby balení plodů byly prokázány statisticky významné rozdíly. Nejmenší míru exprese měly plody balené po 4 kusech na papírových táčcích fixované potravinářskou fólií. Jednalo se o výběrové plody, jejichž fixace na táčku omezila vzájemný kontakt a plody byly proto v nejlepším pomologickém stavu. Plody balené volně, vzhledem k možné kontaminaci patogeny, měly expresi alergenů o něco vyšší, ale protože byly umístěny na platech v individuálních vaničkách, jejich exprese alergenů nebyla tak vysoká jako u plodů balených v sáčcích. Sáčky měly průduchy, ale i přesto pevný igelitový obal udržuje značnou míru vlhkosti, čímž podporuje kontaminaci a šíření patogena a navíc udržuje v okolí jablek etylén, který plodů produkují (Beuning et al., 2004) a to má za následek urychlené dozrávání. Tento výsledek potvrzuje i Kiewning and Schmitz-Eiberger (2013) důkazem sníženého obsahu Mal d 1 u plodů po aplikaci 1-MCP. Plody jsou navíc balené v sáčcích po několika kilogramech a není tudíž eliminován jejich vzájemný kontakt a zacházení s plody může být výrazně horší. Všechny tyto faktory přispívají k expresi PR-proteinů (Van Loon and Van Strien, 1999; Pühringer et al., 2000; Koistinen et al., 2002; Puehringer et al., 2003; Breiteneder, 2004; Hoffmann-Sommergruber and Mills, 2009; Iorio et al., 2012; Buron-Moles et al., 2015).

### Jakost

Plody s druhou jakostí vykazovaly vyšší míru exprese alergenů, která byla potvrzena i statistickou analýzou. Tyto plody jsou řazeny do kategorie druhé jakosti, vzhledem k jejich odchylkám od standardních plodů první jakosti. Tato jablka mohou mít i poškozenou slupku, což vede k již výše zmíněné expresi obranných PR-proteinů.

Z hypotézy diplomové práce vychází, že míra exprese alergenů je závislá na odrůdě, je tedy podmíněna geneticky a lze předpokládat, že poměr mezi expresí alergenů ve slupce a dužnině bude stabilní. Tento předpoklad potvrzuje i regresní a korelační analýza, znázorňující silnou míru závislosti exprese izoalergenů Mal d 1.01 a Mal d 1.02 mezi slupkou a dužninou. Tyto izoformy se v plodu exprimují majoritně (Pagliarani et al., 2013), a proto je menší pravděpodobnost zatížení chybou při amplifikaci. Naopak u izoform Mal d 1.06A a Mal d 1.06B je vzhledem k jejich nízké expresi ( $\Delta Cq$ ) míra závislosti nízká. Při PCR reakci se pracuje se vzorky, které mají v roztoku nízkou koncentraci cílené cDNA, a proto je větší pravděpodobnost chybovosti, jež může souviset k nízkou korelací.

Většina autorů ve svých výzkumech porovnává odrůdy vysoce alergenní s odrůdami málo alergenními, zabývají se rozdíly v expresi alergenů mezi slupkou a dužninou, případně podmínkami skladování. Tato práce je inovativní v komplexním přístupu zhodnocením všech možných faktorů, jež vstupují do procesu prodeje konzumních plodů, kterými je i pomologický stav, jakost plodů nebo způsob balení, které mají nezanedbatelný vliv na expresi studovaných alergenů.

## 7 Závěr

Tato diplomová práce komplexně shrnuje řadu faktorů, jež vstupují do prodeje konzumních plodů jablek v obchodních řetězcích, které mají významný vliv na expresi alergenů v těchto plodech. Z výsledků vyplývá, že exprese izoform Mal d 1.01 a Mal d 1.02 byla ve srovnání s ostatními izoformami výrazně vyšší bez ohledu na odrůdu, zemi původu, podmínky pěstování, skladování a prodeje. Byly určeny odrůdy s vysokou a nízkou expresí alergenů, i přes obtížně definovatelné podmínky, jimž byly plody konzumních jablek v obchodních řetězcích vystaveny. Jako odrůdy s vysokou expresí alergenů byly vyhodnoceny Golden Delicious a Jonagold a naopak s nízkou expresí odrůda Modi. Větší expresi alergenů také vykazovala slupka oproti dužnině. Jablka s vyšší zralostí, byly vyhodnoceny jako plody s vysokou mírou exprese studovaných alergenů. Tyto výsledky potvrzují platnost všech stanovených vědeckých hypotéz. Pokud by šlechtitelé chtěli vytvářet odrůdy méně alergení, bylo by nutné vyvarovat se vysoce alergenním odrůdám a jejich křížencům. Důležité pro snížení exprese alergenů v plodech je také čas sklizně a posklizňové zacházení s plody, související s manipulací, balením a podmínkami skladování.

## 8 Literární zdroje

Abelius, M. S., Enke, U., Varosi, F., Hoyer, H., Schleussner, E., Jenmalm, M. C., Markert, U. R. 2014. Placental immune response to apple allergen in allergic mothers. *Journal of Reproductive Immunology*. 106. 100-109.

Aissa, S., Jazia, R. B., Ayachi, J., Salem, C. B., Hayouni, A., Abdelghani, A., Saad, H. B., Boussarsar, M. 2016. Critical appraisal of the clinical utility of sublingual immunotherapy in allergy. *Contemporary Clinical Trials Communications*. 4. 1-8.

Ahammer, L., Grutsch, S., Kamenik, A. S., Liedl, K. R., Tollinger, M. 2017. Structure of the Major Apple Allergen Mal d 1. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 65 (8). 1606-1612.

Ahammer, L., Grutsch, S., Tollinger, M. 2016. NMR resonance assignments of the major apple allergen Mal d 1. *Biomolecular NMR Assignments*. 10 (2). 287-290.

Akdis, C. A., Akdis, M. 2009. Mechanisms and treatment of allergic disease in the big picture of regulatory T cells. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 123 (4). 735-746.

Allen, K. J., Koplin, J. J. 2012. The epidemiology of IgE-mediated food allergy and anaphylaxis. *Immunology and Allergy Clinics*. 32 (1). 35-50.

Asero, R. 1998. Effects of birch pollen-specific immunotherapy on apple allergy in birch pollen-hypersensitive patients. *Clinical and Experimental Allergy*. 28 (11). 1368-1373.

Asero, R. 2003. How long does the effect of birch pollen injection SIT on apple allergy last? *Allergy*. 58 (5). 435-438.

Asero, R., Monsalve, R., Barber, D. 2008. Profilin sensitization detected in the office by skin prick test: a study of prevalence and clinical relevance of profilin as a plant food allergen. *Clinical & Experimental Allergy*. 38 (6). 1033-1037.

Bermingham, N., Luettich, K. 2003. Polymerase chain reaction and its applications. *Current Diagnostic Pathology*. 9. 159-164.

Beuning, L., Bowen, J., Persson, H., Barraclough, D., Bulley, S., Macrae, E. 2004. Characterisation of Mal d 1-related genes in *Malus*. *Plant Molecular Biology*. 55 (3). 369-388.

Bělohlávková, S., Kopelentová, E., Šetinová, I., Víšek, P., Novobílská, J., Gvozdiaková, T., Mrázová, L., Minářová, M., Jeřábková, M., Chládková, J., Tichá, M., Orálková, E., Solařová, V., Liška, M., Poloniová, J., Janíčková, H., Mikulová, Š., Švarcová, I., Kuhn M. 2015. Registr potravinových alergií DAFALL – první výsledky. *Alergie*. 2 (1). 5-13.

Bělohlávková, S. 2014. Světový týden alergie 2014. *Alergie, astma, bronchitida*. 1. 9-13.

Bělohlávková, S. 2015. Co potřebujeme vědět o potravinové alergii? Co je registr potravinových alergií DAFALL? *Alergie, astma, bronchitida*. 2. 14-18.

Bischoff, S. C., Giovanni, B., Buurman, W., Ockhuizen, T., Schulzke, J. D., Serino, M., Tilg, H., Watson, A., Wells, J. M. 2014. Intestinal permeability – a new target for disease prevention and therapy. *BMC Gastroenterology*. 189 (14). 1-25.

Bolhaar, S. T. H. P., Tiemessen, M. M., Zuidmeer, L., Van Leeuwen, A., Hoffmann-Sommergruber, K., Bruijnzeel-Koomen, C. A. F. M., Taams, L. S., Knol, E. F., Van Hoffen, E., Van Ree, R., Knulst A. C. 2004. Efficacy of birch-pollen immunotherapy on cross-reactive food allergy confirmed by skin tests and double-blind food challenges. *Clinical & Experimental Allergy*. 34 (5). 761-769.

Bolhaar, S. T., Zuidmeer, L., Ma, Y., Ferreira, F., Bruijnzeel-Koomen, C. A., Hoffmann-Sommergruber, K., van Ree, R. Knulst, A. C. 2005. 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 (12). 1638-1644.

Bolhaar, S. T. H. P., van de Weg, W. E., van Ree, R., Gonzalez-Mancebo, E., Zuidmeer, L., Bruijnzeel-Koomen, C. A. F. M., Fernandez-Rivas, M., Jansen, J., Hoffmann-Sommergruber, K., Knulst, A. C., Gilissen, L. J. W. J. 2005. In vivo assessment with prick-to-



prick testing and double-blind, placebo-controlled food challenge of allergenicity of apple cultivars. *Allergy and Clinical Immunology*. 116 (5). 1080–1086.

Botton, A., Lezzer, P., Dorigoni, A., Barcaccia, G., Ruperti, B., Ramina, A. 2008. Genetic and Environmental Factors Affecting Allergen-Related Gene Expression in Apple Fruit (*Malus domestica* L. Borkh). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56 (15). 6707-6716.

Breiteneder, H. 2004. Thaumatin-like proteins – a new family of pollen and fruit allergens. *Allergy*. 59 (5). 479-481.

Bucher, X., Pichler, W. J., Dahinden, C. A., Helbling, A. 2004. Effect of tree pollen specific, subcutaneous immunotherapy on the oral allergy syndrome to apple and hazelnut. *Allergy*. 59 (12). 1272-1276.

Buelow, B. Medscape [online]. Immediate Hypersensitivity Reactions. New York. WebMD LLC. 9. února 2015 [citováno 2018-02-21]. Dostupné z <https://emedicine.medscape.com/article/136217-overview#showall>

Buron-Molesa, G., Wisniewski, M., Viñas, I., Teixidó, N., Usall, J., Droby, S., Torres, R. 2015. Characterizing the proteome and oxi-proteome of apple in response to a host (*Penicillium expansum*) and a non-host (*Penicillium digitatum*) pathogen. *Journal of Proteomics*. 114 (30). 136-151.

Bystroň, J. 2016. Imunita v dospělosti. *Alergie, astma, bronchitida*. 4. 5-8.

Campana, R., Vrtala, S., Maderegger, B., Jertschin, P., Stegellner, G, Swoboda, I., Focke-Tejkl, M., Blatt, K., Gieras, A., Zafred, D., Neubauer, A., Valent, P., Keller, W., Spitzauer, S., Valenta, R. 2010. Hypoallergenic derivatives of the major birch pollen allergen Bet v 1 obtained by rational sequence reassembly. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 126 (5). 1024-1031.

Chang, S., Puryear, J., Cairney, J. 1993. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Molecular Biology Reporter*. 11 (2). 113-116.

Cochrane, S., Beyer, K., Clausen, M., Wjst, M., Hiller, R., Nicoletti, C., Szepefalusi, Z., Savelkoul, H., Breiteneder, H., Manios, Y., Crittenden, R., Burney, P. 2009. Factors influencing the incidence and prevalence of food allergy. *Allergy*. 64 (9). 1246-1255.

Di Nardo, A., Gareus, R., Kwiatkowski, D., Witke, W. 2000. Alternative splicing of the mouse profilin II gene generates functionally different profilin isoforms. *Journal of Cell Science*. 113. 3795-3803.

Dubois, A. E. J., Pagliarini, G., Brouwer, R. M., Kollen, B. J., Dragsted, L. O., Eriksen, F. D., Callesen, O., Gilissen, L. J. W. J., Krens, F. A., Visser, R. G. F., Smulders, M. J. M., Vlieg-Boerstra, B. J., Flokstrade Blok, B. J., van de Weg, W. E. 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. *Experimental Allergy and Immunology*. 70 (11). 1406-1412.

Ebner, C., Hirschwehr, R., Bauer, L., Breiteneder, H., Valenta, R., Ebner, H., Kraft, D., Scheiner, O. 1994. Identification of allergens in fruits and vegetables: IgE cross-reactivities with the important birch pollen allergens Bet v 1 and Bet v 2 (birch profilin). *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 95 (5). 962-969.

Eisenberg, E., Levanon, E. Y. 2013. Human housekeeping genes, revisited. *Trends in Genetics*. 29 (10). 569-574.

Fernández-Rivas, M., Cuevas, M. 1999. Peels of Rosaceae fruits have a higher allergenicity than pulps. *Clinical and Experimental Allergy*. 29 (9). 1239-1247.

Fernández-Rivas, M., Bolhaar, S., González-Mancebo, E., Asero, R., van Leeuwen, A., Bohle, B., Ma, Y., Ebner, C., Rigby, N., Sancho, A. I., 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. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 118 (2). 481-488.

Finkina, E. I., Melnikova, D. N., Bogdanov, I. V., Ovchinnikova, T. V. 2016. Lipid Transfer Proteins As Components of the Plant Innate Immune System: Structure, Functions, and Applications. *Acta Naturae*. 8 (2). 47-61.

Fuchs, M. 2008. Potravinová alergie. *Practicus*. 6. 30-34.

Gao, Z. S., van de Weg, W. E., Schaart, J. G., Schouten, H. J., Tran, D. H., Kodde, L. P., van der Meer, I. M., van der Geest, A. H. M., Kodde, J., Breiteneder, H., Hoffmann-Sommergruber, K., Bosch, D., Gilissen, L. J. W. J. 2005. Genomic cloning and linkage mapping of the Mal d 1 (PR-10) gene family in apple (*Malus domestica*). *Theoretical and Applied Genetics*. 111 (1). 171-183.

Gao, Z., van de Weg, E. W., Matos, C. I., Arens, P., Bolhaar, S. T., Knulst, A. C., Li, Y., Hoffmann-Sommergruber, K., Gilissen, L. J. 2008. Assessment of allelic diversity in intron-containing Mal d 1 genes and their association to apple allergenicity. *BMC Plant Biology*. 8 (116). 1-12.

Gepp, B., Lengger, N., Bublin, M., Hemmer, W., Breiteneder, H, Radauer, C. 2014. Chimeras of Bet v 1 and Api g 1 reveal heterogeneous IgE responses in patients with birch pollen allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 134 (1). 188-194.

Ghraichy, M., Galson, J. D., Kelly, D. F., Trück, J. 2017. B-cell receptor repertoire sequencing in patients with primary immunodeficiency: a review. *Immunology*. 153 (2). 145-160.

Gilissen, L. J. W. J., Bolhaar, S. T. H. P., Matos, C. I., Rouwendal, G. J. A., Boone, M. J., Krens, F. A., Zuidmeer, L., van Leeuwen, A., Akkerdaas, J., Hoffmann-Sommergruber, K., Knulst, A. C., Bosch, D., van de Weg, W. E., van Ree, R. 2005. Silencing the major apple allergen Mal d 1 by using the RNA interference approach. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 115 (2). 364-369.

Ginzinger, D. G. 2002. Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. *Experimental Hematology*. 30 (6). 503-512.

- Gomez, F., Aranda, A., Campo, P., Diaz-Perales, A., Blanca-Lopez, N., Perkins, J., Garrido, M., Blanca, M., Mayorga, C., Torres, M. J. 2014. High Prevalence of Lipid Transfer Protein Sensitization in Apple Allergic Patients with Systemic Symptoms. *PLOS ONE*. 9 (9). 1-7.
- Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98.
- Hansen, K. J., Khinchi, M. S., Skoc, P. S., Bindslev-Jensen, C., Poulsen, L. K., Malling, H. J. 2004. Food allergy to apple and specific immunotherapy with birch pollen. *Molecular Nutrition and Food Research*. 48 (6). 441-448.
- Hao, G., Zheng, Y., Wang, Z., Kong, X., Song, Z., Lai, X., Spangfort, M. D. 2016. High correlation of specific IgE sensitization between birch pollen, soy and apple allergens indicates pollen-food allergy syndrome among birch pollen allergic patients in northern China. *Journal of Zhejiang University Science B*. 17 (5). 399-404.
- Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J., Williams, P. M. 1996. Real Time Quantitative PCR. *Genome Research*. 6. 986-994.
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., Watson, R. 1993. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology*. 11 (9). 1026-1030.
- Hoffmann-Sommergruber, K., Mills, E. N. C. 2009. Food allergen protein families and their structural characteristics and application in component-resolved diagnosis: new data from the EuroPrevall project. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 395 (1). 25-35.
- Holm, J., Ferreras, M., Ipsen, H., Würtzen, P. A., Gajhede, M., Larsen, J. N., Lund, K., Spangfort, M. D. 2011. Epitope Grafting, Re-creating a Conformational Bet v 1 Antibody Epitope on the Surface of the Homologous Apple Allergen Mal d 1. *The Journal of Biological Chemistry*. 286 (20). 17569-17578.
- Hong, X., Tsai, H., Wang, X. 2009. Genetics of Food allergy. *Curr Opin Pediatr*. 21 (6). 770-776.

- Hong, X., Wang, X. 2012. Early Life Precursors, Epigenetics, and the Development of Food Allergy. *Seminars in Immunopathology*. 34 (5). 655-669.
- Igarashi, M., Hatsuyama, Y., Harada, T., Fukasawa-Akada, T. 2016. Biotechnology and apple breeding in Japan. *Breeding Science*. 66 (1). 18-33.
- Iorio, R. A., Di Sandro, A., Paris, R., Pagliarani, G., Tartarini, S., Ricci, G., Serafini-Fracassini, D., Verderio, E., Del Duca, S. 2012. Simulated environmental criticalities affect transglutaminase of *Malus* and *Corylus pollens* having different allergenic potential. *Amino Acids*. 42 (2-3). 1007-1024.
- Jeon, M. K., Klaus, C., Kaemmerer, E., Gassler, N. 2013. Intestinal barrier: Molecular pathways and modifiers. *World Journal of Gastrointestinal Pathophysiology*. 4 (4). 94-99.
- Kaltenboeck, B., Wang, C. 2005. Advances in real-time PCR: application to clinical laboratory diagnostics. *Advances in Clinical Chemistry*. 40. 219-259.
- Karlen, Y., McNair, A., Perseguers, S., Mazza, C., Mermod, N. 2007. Statistical significance of quantitative PCR. *BMC Bioinformatics*. 2007. 131 (8). 1-16.
- Kelsall, B. 2008. Recent progress in understanding the phenotype and function of intestinal dendritic cells and macrophages. *Mucosal Immunology*. 1 (6). 460-469.
- Kiewning, D., Schmitz-Eiberger, M. 2013. Effects of long-term storage on Mal d 1 content of four apple cultivars with initial low Mal d 1 content. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 94 (4). 798-802.
- Kinaciyan, T., Nagl, B., Faustmann, S., Kopp, S., Wolkersdorfer, M., Bohle B. 2016. Recombinant Mal d 1 facilitates sublingual challenge tests of birch pollen-allergic patients with apple allergy. *European Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 71 (2). 272-274.

- Kinaciyan, T., Jahn-Schmid, B., Radakovics, A., Zwölfer, B., Schreiber, C., Francis, J. N., Ebner, C., Bohle, B. 2007. Successful sublingual immunotherapy with birch pollen has limited effects on concomitant food allergy to apple and the immune response to the Bet v 1 homolog Mal d 1. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 119 (4). 937-943.
- Koistinen, K. M., Hassinen, V. H., Gynther, P. A. M., Lehesranta, S. J., Keinänen, S. I., Kokko, H. I., Oksanen, E. J., Tervahauta, A. I., Auriola, S., Kärenlampi, S. O. 2002. Birch PR-10c is induced by factors causing oxidative stress but appears not to confer tolerance to these agents. *New Phytologist*. 155 (3). 381-391.
- Kondo, Y., Urisu, A. 2009. Oral Allergy Syndrome. *Allergology International*. 58 (4). 485-491.
- Kopac, P., Rudin, M., Gentinetta, T., Gerber, R., Pichler, Ch., Hausmann, O., Schnyder, B., Pichler, W. J. 2012. Continuous apple consumption induces oral tolerance in birch-pollen-associated apple allergy. *Allergy*. 67 (2). 280-285.
- Kopelentová, E., Vernerová, E. 2016. Potravinové alergie z pohledu alergologa. *Medicína pro praxi*. 13 (5). 242-247.
- Kozera, B., Rapacz, M. 2013. Reference genes in real-time PCR. *Journal of Applied Genetics*. 54 (4). 391-406.
- Kürkcüoğlu, S., Degenhardt, J., Lensing, J., Al-Masri, A. N., Gau, A. E. 2007. Identification of differentially expressed genes in *Malus domestica* after application of the non-pathogenic bacterium *Pseudomonas fluorescens* Bk3 to the phyllosphere. *Journal of Experimental Botany*. 58 (3). 733-741.
- Lack, G. 2012. Update on risk factors for food allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 129 (5). 1187-1197.
- Larionov, A., Krause, A., Miller, W. 2005. A standard curve method for relative real time PCR data processing. *BMC Bioinformatics*. 6 (62). 1-16.

- Larsen, J. N., Broge, L., Jacobi, H. 2016. Allergy immunotherapy: the future of allergy treatment. *Drug Discovery Today*. 21 (1). 26-37.
- Liu, X., Wang, G., Hong, X., Wang, D., Tsai, H. J., Zhang, S., Arguelles, L., Kumar, R., Wang, H., Liu, R., Zhou, Y., Pearson, C., Ortiz, K., Schleimer, R., Holt, P. G., Pongratic, J., Price, H. E., Langman, C., Wang, X. 2011. Gene-vitamin D interactions on food sensitization: a prospective birth cohort study. *Allergy*. 66 (11). 1442-1448.
- Luo, H., Song, J., Toivonen, P., Gong, Y., Forney, C., Palmer, L. C., Fillmore, S., Pang, X., Zhang, Z. 2018. Proteomic changes in 'Ambrosia' apple fruit during cold storage and in response to delayed cooling treatment. *Postharvest Biology and Technology*. 137. 66–76.
- MacDonald, R. J., Swift, G. H., Przybyla, A. E., Chirgwin, J. M. 1987. Isolation of RNA using guanidinium salts. *Methods in Enzymology*. 152 (8). 219-226.
- Marsh, D. G., Goodfriend, L., King, T. P., Lowenstein, H., Platts-Mills, T. A. 1988. Allergen nomenclature. *Allergy*. 43. 161-168
- 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 (22). 10548-10553.
- Modrzyński, M., Zawisza, E., Rapiejko, P., Przybylski, G. 2002. Specific-pollen immunotherapy in the treatment of oral allergy syndrome in patients with tree pollen hypersensitivity. *Przegląd Lekarski*. 59 (12). 1007-1010.
- Nybom, H., Cervin-Hoberg, C., Andersson, M. 2013. Oral challenges with four apple cultivars result in significant differences in oral allergy symptoms. *International Archives of Allergy and Immunology*. 161 (3). 258-264.
- Oh, D. H., Song, K. J., Shin, Y. I., Chung, W. 2000. Isolation of a cDNA Encoding a 31-kDa, Pathogenesis-related 5/thaumatin-like (PR5/TL) Protein Abundantly Expressed in Apple Fruit (*Malus domestica* cv. Fuji). *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 64 (2). 355-362.

- Pagliarani, G., Paris, R., Iorio, A. R., Tartarini, S., Del Duca, S., Arens, P., Peters, S, van de Weg, E. 2011. Genomic organisation of the Mal d 1 gene cluster on linkage group 16 in apple. *Molecular Breeding*. 29 (3). 759-778.
- Pagliarani, G., Paris, R., Arens, P., Tartarini, S., Ricci, G., Smulders, M. M. J., van de Weg W. E. 2013. A qRT-PCR assay for the expression of all Mal d 1 isoallergen genes. *BMC Plant Biology*. 51 (13). 1-13.
- Paris, R., Pagliarani, G., Savazzini, F., Aloisi, I., Iorio, R. A., Tartarini, S., Ricci, G., Del Duca, S. 2017. Comparative analysis of allergen genes and pro-inflammatory factors in pollen and fruit of apple varieties. *Plant Science*. 264. 57-68.
- Perkins, J. R., Dawes, J. M., McMahon, S. B., Bennett, D. L. H., Orengo, C., Kohl, M. 2012. ReadqPCR and NormqPCR: R packages for the reading, quality checking and normalisation of RT-qPCR quantification cycle (Cq) data. *BMC Genomics*. 296 (13). 1-8.
- Petrů, V., 2014. Alergie na vzešupu. *Alergie, astma, bronchitida*. 2. 10-12.
- Pfaffl, M. W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*. 29 (9). 2002-2007.
- Pfaffl, M. W., Tichopad, A., Prgomet, C., Neuvians, T. P. 2004. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper – Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnology Letters*. 26 (6). 509–515.
- Popescu, F. D. 2015. Cross-reactivity between aeroallergens and food allergens. *World Journal of Methodology*. 5 (2). 31-50.
- Puehringer, H. M., Zinoecker, I., Marzban, G., Katinger, H., Laimer, M. 2003. MdAP, a novel protein in apple, is associated with the major allergen Mal d 1. *Gene*. 321. 173-183.
- Pühringer, H., Moll, D., Hoffmann-Sommergruber, K., Watillon, B., Katinger, H., Machado, M. L. C. 2000. The promoter of an apple Ypr10 gene, encoding the major allergen Mal d 1, is stress- and pathogen-inducible. *Plant Science*. 152 (1). 35-50.



- Rajan, T. V. 2003. The Gell–Coombs classification of hypersensitivity reactions: a re-interpretation. *TRENDS in Immunology*. 24 (7). 376-379.
- Reed, G. H., Kent, J. O., Wittwer, C. T. 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 skin prick 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 & Technology*. 45 (7). 1517–1523.
- Rochr, C. C., Edenharter, G., Reimann, S., Ehlers, I., Worm, M., Zuberbier, T., Niggemann, B. 2004. Food allergy and non-allergic food hypersensitivity in children and adolescents. *Clinical & Experimental Allergy*. 34 (10). 1534-1541.
- Sánchez-Monge, R., Lombardero, M., García-Sellés, F. J., Barber, D., Salcedo, G. 1999. Lipid-transfer proteins are relevant allergens in fruit allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 103 (3). 514-519.
- Schöning, B., Ziegler, W. H., Vieths, S., Baltes, W. 1996. Apple Allergy: The cDNA Sequence of the Major Allergen of Apple, Determined by Performing - PCR with a Primer Based on the N-Terminal Amino Acid Sequence, is Highly Homologous to the Sequence of the Major Birch Pollen Allergen. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 71 (4). 475-482.
- Špičák, V. 2014. Bílá kniha o alergii. *Alergie, astma, bronchitida*. 1. 7-8.
- Špičák, V. 2014. Vakcíny na alergii. *Alergie, astma, bronchitida*. 2. 30-32.
- Tan, H. T. T., Ellis, J. A., Saffery, R., Allen, K. J. 2011. The role of genetics and environment in the rise of childhood food allergy. *Clinical & Experimental Allergy*. 42 (1). 20-29.

- Teste, M. A., Duquenne, M., François, J. M., Parrou, J. L. 2009. Validation of reference genes for quantitative expression analysis by real-time RT-PCR in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology*. 99 (10). 1-15.
- Thoma, S., Kaneko, Y., Somerville, C. 1993. A non-specific lipid transfer protein from *Arabidopsis* is a cell wall protein. *The Plant Journal*. 3 (3). 427-436.
- Udvardi, M. K., Czechowski, T., Scheible, W. R. 2008. Eleven Golden Rules of Quantitative RT-PCR. *The Plant Cell*. 20 (7). 1736-1737.
- Valenta, R., Hochwallner, H., Linhart, B., Pahr, S. 2015. Food Allergies: The Basics. *Gastroenterology*. 148 (6). 1120-1131.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., Speleman, F. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*. 3 (7). 1-12.
- 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 (2). 538-551.
- VanGuilder, H. D., Vrana, K. E., Freeman, W. M. 2008. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *Biotechniques*. 44 (5). 619-626.
- Van Loon, L. C., Van Strien, E. A. 1999. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. 55. 85-97.
- Vernerová, E. 2008. Slizniční imunita u dětí, možnosti imunomodulace a alergie. *Pediatric pro praxi*. 9 (3). 164-168.
- Vernerová, E. 2012. Alergie a astma, současný stav poznání a léčby. *Interní medicína pro praxi*. 14 (2). 55-58.

Vieths, S., Jankiewicz, A., Schöning, B., Aulepp, H. 1994. Apple allergy: the IgE-binding potency of apple strains is related to the occurrence of the 18-kDa allergen. *European Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 49 (4). 262-271.

Vieths, S., Janek, K., Aulepp, H., Petersen A. 1995. Isolation and characterization of the 18-kDa major apple allergen and comparison with the major birch pollen allergen (Bet v I). *European Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 50 (5). 421-430.

Viggiano, D., Ianiro, G., Vanella, G., Bibbò, S., Bruno, G., Simeone, G., Mele, G. 2015. Gut barrier in health and disease: focus on childhood. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. 19 (6). 1077-1085.

Vinogradov, A. 2004. Compactness of human housekeeping genes: selection for economy or genomic design? *TRENDS in Genetics*. 20 (5). 248-253.

Wittwer, C. T., Herrmann, M. G., Gundry, C. N., Elenitoba-Johnson, K. S. 2001. Real-time multiplex PCR assays. *Methods*. 25 (4). 430-442.

## 9 Seznam použitých zkratek

1-MCP	1-Methylcyclopropene
AIT	alergen-specifická imunoterapie
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DNasa	deoxyribonukleáza
dsDNA	dvouřetězcová deoxyribonukleová kyselina
GC	guanin a cytosin
IgE	imunoglobulin E
IL	interleukin
LTP	lipid transfer protein
MALT	slizniční imunitní systém
nsLTP	nespecifický lipid transfer protein
OAS	orální alergický syndrom
PCR	polymerázová řetězová reakce
PR	pathogenesis-related proteiny
qRT-PCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce
RNA	ribonukleová kyselina
RNasa	ribonukleáza
Th2	subpopulace pomocných helper TH lymfocytů
TLP	thaumatin-like protein
T <sub>m</sub>	teplota tání
UV	ultrafialové

## 10 Přílohy

### Seznam příloh

<b>Příloha I - Tabulka 1:</b> Hodnoty Ratio $\Delta C_q$ a Ratio $\Delta \Delta C_q$ u hodnocených vzorků slupky plodů a charakterizace jejich variability pomocí variačního koeficientu .....	92
<b>Příloha I - Tabulka 2:</b> Hodnoty Ratio $\Delta C_q$ a Ratio $\Delta \Delta C_q$ u hodnocených vzorků dužniny plodů a charakterizace jejich variability pomocí variačního koeficientu .....	96
<b>Příloha II - Tabulka 1:</b> Pravděpodobnosti shody Ratio $\Delta C_q$ mezi analyzovanými vzorky – výsledek Kruskal-Wallisovy analýzy.....	100
<b>Příloha II - Tabulka 2:</b> Pravděpodobnosti shody Ratio $\Delta C_q$ mezi analyzovanými odrůdami – výsledek Kruskal-Wallisovy analýzy .....	105
<b>Příloha II - Tabulka 3:</b> Pravděpodobnosti shody Ratio $\Delta C_q$ mezi jednotlivými izoformami – výsledek Kruskal-Wallisovy analýzy.....	106
<b>Příloha II - Tabulka 4:</b> Pravděpodobnosti shody Ratio $\Delta C_q$ mezi slupkou a dužninou – výsledek Kruskal-Wallisovy analýzy .....	106
<b>Příloha II - Tabulka 5:</b> Pravděpodobnosti shody Ratio $\Delta C_q$ mezi zeměmi původu – výsledek Kruskal-Wallisovy analýzy .....	106
<b>Příloha II - Tabulka 6:</b> Pravděpodobnosti shody Ratio $\Delta C_q$ mezi obchodními řetězci – výsledek Kruskal-Wallisovy analýzy .....	106
<b>Příloha II - Tabulka 7:</b> Pravděpodobnosti shody Ratio $\Delta C_q$ mezi pevností dužiny – výsledek Kruskal-Wallisovy analýzy .....	107
<b>Příloha II - Tabulka 8:</b> Pravděpodobnosti shody Ratio $\Delta C_q$ mezi otlaky plodů – výsledek Kruskal-Wallisovy analýzy .....	107
<b>Příloha II - Tabulka 9:</b> Pravděpodobnosti shody Ratio $\Delta C_q$ mezi balením plodů – výsledek Kruskal-Wallisovy analýzy .....	107
<b>Příloha II - Tabulka 10:</b> Pravděpodobnosti shody Ratio $\Delta C_q$ mezi první a druhou jakostí plodů – výsledek Kruskal-Wallisovy analýzy .....	107

*Příloha I - Tabulka 1: Hodnoty Ratio  $\Delta Cq$  a Ratio  $\Delta \Delta Cq$  u hodnocených vzorků slupky plodů a charakterizace jejich variability pomocí variačního koeficientu – 1. část*

Č	Odrůda	Izoformy Mal d 1															
		Mal d 1.01				Mal d 1.02				Mal d 1.06A				Mal d 1.06B			
		Ratio $\Delta Cq$	V <sub>k</sub> [%]	Ratio $\Delta \Delta Cq$	V <sub>k</sub> [%]	Ratio $\Delta Cq$	V <sub>k</sub> [%]	Ratio $\Delta \Delta Cq$	V <sub>k</sub> [%]	Ratio $\Delta Cq$	V <sub>k</sub> [%]	Ratio $\Delta \Delta Cq$	V <sub>k</sub> [%]	Ratio $\Delta Cq$	V <sub>k</sub> [%]	Ratio $\Delta \Delta Cq$	V <sub>k</sub> [%]
1	Jonagold	43,809	1,615	69,505	1,864	61,242	1,318	97,163	1,643	12,427	1,350	19,717	1,666	1,148	0,604	1,822	1,216
2	Golden Delicious	59,993	0,913	95,181	1,377	44,193	1,154	70,114	1,529	9,169	1,190	14,547	1,553	0,445	1,191	0,707	1,554
3	Golden Delicious	62,495	0,321	99,151	1,116	40,422	0,998	64,131	1,428	9,957	1,244	15,798	1,591	0,038	1,272	0,060	1,610
4	Golden Delicious	37,428	0,950	59,382	1,399	38,312	1,065	60,784	1,471	6,695	0,733	10,622	1,277	0,035	0,567	0,055	1,200
5	Idared	22,796	0,947	36,167	1,397	31,781	1,214	50,422	1,570	2,157	1,064	3,422	1,470	1,536	1,051	2,437	1,462
6	Evelina	13,725	1,101	21,775	1,494	15,371	1,333	24,386	1,653	0,261	1,051	0,413	1,462	0,270	1,610	0,428	1,860
7	Golden Delicious	57,424	1,996	91,106	2,167	45,802	0,277	72,667	1,106	3,057	1,066	4,850	1,471	0,032	1,292	0,051	1,624
8	Granny Smith	22,871	3,500	36,286	3,471	16,580	0,660	26,305	1,241	1,639	1,005	2,600	1,433	0,648	1,008	1,028	1,435
9	Red Delicious	35,956	1,674	57,046	1,910	34,819	1,361	55,241	1,674	0,253	1,805	0,401	2,012	0,173	1,476	0,274	1,758
10	Jonagold	27,305	1,153	43,320	1,528	14,745	1,397	23,393	1,700	2,388	1,226	3,789	1,578	0,300	1,225	0,475	1,578
11	Golden Delicious	53,573	1,213	84,995	1,569	37,988	1,439	60,269	1,731	7,472	1,169	11,854	1,539	0,533	0,819	0,846	1,323
12	Fuji	56,326	0,913	89,363	1,377	45,974	1,108	72,940	1,498	0,296	0,959	0,469	1,404	0,745	0,925	1,182	1,384
13	Golden Delicious	42,089	0,604	66,775	1,216	33,896	0,836	53,777	1,332	9,569	0,882	15,182	1,359	0,082	1,326	0,129	1,649
14	Red Prince	36,728	1,472	58,270	1,755	29,373	1,126	46,601	1,511	4,295	0,977	6,815	1,415	0,944	0,557	1,498	1,196
15	Kanzi	14,088	0,814	22,351	1,320	8,010	1,354	12,708	1,669	0,467	1,348	0,742	1,664	0,465	1,172	0,738	1,541
16	Milwa	27,090	0,796	42,980	1,311	27,154	1,165	43,081	1,536	0,932	1,520	1,479	1,792	0,109	1,103	0,174	1,496
17	Golden Delicious	79,781	2,156	126,575	2,299	31,012	1,230	49,202	1,581	2,726	0,848	4,326	1,339	0,052	1,081	0,082	1,481
18	Tenroy Royal Gala	22,881	1,265	36,302	1,605	91,714	1,033	145,508	1,450	28,882	1,205	45,822	1,564	0,245	1,314	0,389	1,640
19	Idared	33,062	1,148	52,454	1,525	44,925	1,288	71,275	1,621	6,384	1,195	10,128	1,557	0,572	1,412	0,907	1,711
20	Granny Smith	44,306	1,279	70,294	1,615	65,712	1,224	104,256	1,576	9,179	1,061	14,564	1,468	0,116	1,207	0,184	1,565

*Příloha I – Tabulka 1: Hodnoty Ratio  $\Delta Cq$  a Ratio  $\Delta \Delta Cq$  u hodnocených vzorků slupky plodů a charakterizace jejich variability pomocí variačního koeficientu – 2. část*

Č	Odrůda	Izoformy Mal d 1															
		Mal d 1.01				Mal d 1.02				Mal d 1.06A				Mal d 1.06B			
		Ratio $\Delta Cq$	$V_k$ [%]	Ratio $\Delta \Delta Cq$	$V_k$ [%]	Ratio $\Delta Cq$	$V_k$ [%]	Ratio $\Delta \Delta Cq$	$V_k$ [%]	Ratio $\Delta Cq$	$V_k$ [%]	Ratio $\Delta \Delta Cq$	$V_k$ [%]	Ratio $\Delta Cq$	$V_k$ [%]	Ratio $\Delta \Delta Cq$	$V_k$ [%]
21	Golden Delicious	66,817	1,454	106,007	1,742	63,517	1,097	100,773	1,491	17,249	1,109	27,366	1,499	0,066	0,763	0,105	1,293
22	Modi	10,400	1,587	16,500	1,842	26,253	1,159	41,652	1,533	0,015	1,460	0,024	1,746	0,057	1,591	0,090	1,846
23	Golden Delicious	87,134	1,608	138,242	1,859	38,712	0,699	61,418	1,260	7,613	1,380	12,078	1,688	0,231	1,219	0,366	1,573
24	Pink Lady	37,680	0,971	59,781	1,411	20,751	1,315	32,922	1,641	0,915	1,466	1,451	1,751	0,124	0,865	0,197	1,349
25	Jonagold	64,689	1,334	102,632	1,654	72,275	1,258	114,668	1,600	16,715	1,146	26,519	1,523	0,296	1,097	0,470	1,491
26	Granny Smith	52,143	1,011	82,727	1,437	74,790	1,285	118,657	1,619	9,401	1,190	14,914	1,554	0,109	1,467	0,172	1,752
27	Red Chief	24,377	1,427	38,675	1,722	11,000	0,930	17,451	1,387	0,041	1,731	0,065	1,954	0,015	1,327	0,024	1,649
28	Golden Delicious	56,537	1,432	89,699	1,726	32,128	1,111	50,972	1,501	6,259	0,796	9,931	1,311	0,047	1,419	0,075	1,716
29	Elisa	38,003	0,930	60,294	1,387	34,409	0,944	54,592	1,395	2,615	0,718	4,148	1,270	0,894	1,329	1,418	1,651
30	Kanzi	76,926	1,020	122,046	1,442	26,947	0,858	42,752	1,345	1,569	1,529	2,490	1,798	0,692	1,204	1,098	1,563
31	Red Chief	38,596	0,940	61,235	1,393	31,365	1,036	49,761	1,452	0,384	0,636	0,610	1,230	0,261	1,205	0,415	1,564
32	Red Prince	27,017	1,479	42,864	1,761	16,447	1,356	26,094	1,670	1,209	1,003	1,918	1,431	0,151	0,819	0,239	1,323
33	Idared	27,501	1,242	43,632	1,589	41,627	1,289	66,043	1,622	5,099	1,252	8,089	1,596	0,900	1,343	1,428	1,661
34	Red Delicious	15,902	1,598	25,230	1,851	31,671	1,038	50,247	1,453	0,514	1,468	0,815	1,752	0,304	1,065	0,482	1,471
35	Golden Delicious	94,557	1,353	150,019	1,668	32,240	1,394	51,150	1,698	1,930	1,146	3,062	1,524	0,137	1,432	0,217	1,725
36	Idared	16,607	0,800	26,347	1,313	25,999	1,071	41,249	1,474	2,397	0,707	3,802	1,264	1,235	1,111	1,959	1,500
37	Red Delicious	35,606	0,933	56,491	1,389	43,494	1,047	69,005	1,459	0,735	1,312	1,166	1,639	0,577	1,473	0,916	1,756
38	Jonagold	103,513	0,330	164,228	1,119	106,382	1,290	168,779	1,623	13,920	1,252	22,085	1,597	0,269	1,176	0,426	1,544
39	Pink Lady	50,099	0,736	79,484	1,279	24,152	0,903	38,318	1,371	0,677	1,071	1,073	1,474	0,398	1,140	0,631	1,520
40	Golden Delicious	64,598	1,088	102,487	1,486	42,638	0,962	67,647	1,406	7,147	0,628	11,339	1,227	0,235	1,512	0,373	1,785

**Příloha I – Tabulka 1: Hodnoty Ratio  $\Delta Cq$  a Ratio  $\Delta\Delta Cq$  u hodnocených vzorků slupky plodů a charakterizace jejich variability pomocí variačního koeficientu – 3. část**

Č	Odrůda	Izoformy Mal d 1															
		Mal d 1.01				Mal d 1.02				Mal d 1.06A				Mal d 1.06B			
		Ratio $\Delta Cq$	V <sub>k</sub> [%]	Ratio $\Delta\Delta Cq$	V <sub>k</sub> [%]	Ratio $\Delta Cq$	V <sub>k</sub> [%]	Ratio $\Delta\Delta Cq$	V <sub>k</sub> [%]	Ratio $\Delta Cq$	V <sub>k</sub> [%]	Ratio $\Delta\Delta Cq$	V <sub>k</sub> [%]	Ratio $\Delta Cq$	V <sub>k</sub> [%]	Ratio $\Delta\Delta Cq$	V <sub>k</sub> [%]
41	Idared	14,572	1,112	23,118	1,501	21,477	0,729	34,074	1,275	1,069	0,958	1,696	1,403	0,772	1,448	1,224	1,738
42	Jonagored	38,172	1,347	60,562	1,664	34,577	1,092	54,858	1,488	1,563	1,563	2,479	1,824	0,569	1,014	0,902	1,438
43	Red Prince	72,549	1,798	115,101	2,007	104,866	1,014	166,374	1,438	8,231	1,216	13,059	1,571	0,297	1,283	0,471	1,618
44	Idared	41,395	1,033	65,676	1,450	25,335	1,112	40,196	1,501	4,176	1,301	6,625	1,631	0,929	1,769	1,474	1,984
45	Red Chief	27,476	1,106	43,591	1,497	28,086	1,307	44,559	1,635	0,152	1,690	0,241	1,922	0,184	1,146	0,291	1,524
46	Idared	34,155	0,785	54,189	1,305	54,244	1,031	86,061	1,449	5,590	1,089	8,868	1,486	1,913	0,736	3,035	1,279
47	Fuji	76,680	1,287	121,655	1,621	77,983	1,223	123,724	1,576	0,795	1,409	1,261	1,708	0,148	1,899	0,234	2,088
48	Kanzi	35,005	1,632	55,537	1,877	20,310	1,512	32,223	1,785	1,337	1,564	2,121	1,824	0,577	1,469	0,916	1,753
49	Golden Delicious	73,214	0,793	116,156	1,309	45,028	1,160	71,439	1,533	7,059	1,364	11,199	1,676	0,281	1,605	0,445	1,856
50	Jonagold	56,653	1,112	89,882	1,501	55,551	1,026	88,133	1,446	10,232	1,117	16,234	1,505	0,466	1,257	0,740	1,600
51	Red Delicious	39,182	1,293	62,163	1,625	35,263	1,132	55,946	1,515	0,217	0,889	0,345	1,363	0,129	1,087	0,204	1,485
52	Fuji	59,841	4,643	94,940	4,508	38,865	1,151	61,662	1,527	0,603	1,163	0,956	1,535	0,291	1,772	0,461	1,987
53	Red Chief	55,822	1,277	88,564	1,613	34,473	0,922	54,693	1,382	0,342	1,579	0,543	1,836	0,137	1,138	0,217	1,518
54	Braeburn	51,902	0,960	82,345	1,405	24,631	0,915	39,078	1,378	0,210	1,280	0,333	1,616	0,117	1,050	0,186	1,461
55	Granny Smith	24,899	0,770	39,504	1,297	19,800	1,197	31,413	1,558	1,150	1,774	1,825	1,988	0,097	1,147	0,153	1,524
56	Jonaprince	51,749	1,337	82,101	1,656	59,140	1,076	93,829	1,477	17,611	0,812	27,940	1,319	0,329	0,979	0,522	1,416
57	Gala	29,212	1,459	46,345	1,746	22,776	1,290	36,135	1,623	0,376	1,613	0,597	1,862	0,094	1,189	0,150	1,553
58	Evelina	27,564	0,976	43,732	1,415	24,444	1,020	38,781	1,442	0,183	1,469	0,290	1,753	0,376	1,325	0,596	1,648
59	Jonagold	55,475	1,161	88,013	1,534	67,603	0,626	107,256	1,226	15,697	1,017	24,904	1,440	0,167	3,375	0,266	3,359
60	Golden Delicious	48,719	1,190	77,295	1,554	33,214	0,958	52,696	1,404	5,944	1,120	9,430	1,506	0,115	0,575	0,182	1,203



**Příloha I – Tabulka 1: Hodnoty Ratio  $\Delta Cq$  a Ratio  $\Delta\Delta Cq$  u hodnocených vzorků slupky plodů a charakterizace jejich variability pomocí variačního koeficientu – 4. část**

Č	Odrůda	Izoformy Mal d 1															
		Mal d 1.01				Mal d 1.02				Mal d 1.06A				Mal d 1.06B			
		Ratio $\Delta Cq$	$V_k$ [%]	Ratio $\Delta\Delta Cq$	$V_k$ [%]	Ratio $\Delta Cq$	$V_k$ [%]	Ratio $\Delta\Delta Cq$	$V_k$ [%]	Ratio $\Delta Cq$	$V_k$ [%]	Ratio $\Delta\Delta Cq$	$V_k$ [%]	Ratio $\Delta Cq$	$V_k$ [%]	Ratio $\Delta\Delta Cq$	$V_k$ [%]
61	Golden Delicious	61,542	1,569	97,638	1,828	29,935	1,178	47,493	1,545	3,330	0,754	5,283	1,288	0,084	0,803	0,133	1,314
62	Red Delicious	53,080	1,226	84,214	1,578	36,038	1,285	57,175	1,619	0,317	0,735	0,503	1,279	0,333	0,832	0,528	1,330
63	Golden Delicious	54,180	0,436	85,958	1,150	30,443	0,891	48,299	1,364	7,650	1,286	12,137	1,620	0,082	1,513	0,131	1,786
64	Red Delicious	32,203	1,309	51,091	1,637	36,667	1,042	58,173	1,456	0,271	1,140	0,430	1,520	0,068	1,895	0,108	2,085
65	Braeburn	61,638	1,056	97,790	1,465	38,153	0,935	60,531	1,390	0,592	0,959	0,940	1,404	0,208	1,287	0,330	1,621
66	Golden Delicious	54,457	0,908	86,399	1,374	33,935	0,926	53,840	1,385	4,850	0,629	7,695	1,227	0,154	1,167	0,244	1,538
H1	Golden Delicious	63,033	0,657	100,004	1,240	67,526	0,834	107,133	1,331	8,854	0,519	14,047	1,180	2,915	0,896	4,625	1,367

*Příloha I - Tabulka 2: Hodnoty Ratio  $\Delta Cq$  a Ratio  $\Delta\Delta Cq$  u hodnocených vzorků dužniny plodů a charakterizace jejich variability pomocí variačního koeficientu – 1. část*

Č	Odrůda	Izoformy Mal d 1															
		Mal d 1.01				Mal d 1.02				Mal d 1.06A				Mal d 1.06B			
		Ratio $\Delta Cq$	$V_k$ [%]	Ratio $\Delta\Delta Cq$	$V_k$ [%]	Ratio $\Delta Cq$	$V_k$ [%]	Ratio $\Delta\Delta Cq$	$V_k$ [%]	Ratio $\Delta Cq$	$V_k$ [%]	Ratio $\Delta\Delta Cq$	$V_k$ [%]	Ratio $\Delta Cq$	$V_k$ [%]	Ratio $\Delta\Delta Cq$	$V_k$ [%]
1	Jonagold	31.453	1.276	49.901	1.613	17.890	1.000	28.383	1.430	2.257	1.633	3.580	1.878	0.676	1.233	1.072	1.583
2	Golden Delicious	25.790	0.971	40.917	1.411	7.362	1.286	11.680	1.620	10.841	1.148	17.200	1.525	0.041	1.564	0.066	1.825
3	Golden Delicious	51.011	1.075	80.931	1.477	26.643	0.817	42.271	1.322	5.046	1.260	8.005	1.602	0.124	1.571	0.197	1.830
4	Golden Delicious	46.079	0.738	73.106	1.280	16.523	0.971	26.214	1.411	0.027	1.037	0.042	1.453	0.009	37.347	0.014	35.234
5	Idared	7.524	1.064	11.936	1.470	16.711	1.168	26.513	1.539	7.200	0.884	11.424	1.360	0.472	1.399	0.749	1.701
6	Evelina	4.590	1.538	7.282	1.805	0.601	1.303	0.954	1.632	0.108	0.796	0.171	1.310	0.035	1.029	0.055	1.448
7	Golden Delicious	22.240	1.149	35.285	1.526	24.264	1.020	38.495	1.442	2.634	1.159	4.179	1.532	0.017	1.603	0.026	1.854
8	Granny Smith	1.406	1.349	2.230	1.665	0.751	1.174	1.192	1.542	0.025	1.693	0.040	1.924	0.013	0.807	0.021	1.317
9	Red Delicious	3.051	1.297	4.840	1.628	1.880	0.642	2.983	1.233	0.019	1.509	0.030	1.783	0.054	1.429	0.085	1.723
10	Jonagold	7.110	1.128	11.280	1.512	1.267	1.036	2.010	1.452	0.004	0.982	0.006	1.418	0.003	1.493	0.004	1.771
11	Golden Delicious	46.735	1.215	74.147	1.571	19.918	0.431	31.601	1.149	0.753	1.281	1.195	1.616	0.019	1.231	0.030	1.582
12	Fuji	14.953	0.875	23.724	1.354	38.347	0.788	60.839	1.306	12.057	1.425	19.129	1.721	0.376	1.070	0.597	1.474
13	Golden Delicious	30.755	1.054	48.794	1.464	15.748	1.015	24.984	1.417	0.571	1.339	0.905	1.658	0.035	1.215	0.056	1.570
14	Red Prince	7.735	1.178	12.272	1.545	0.773	0.962	1.227	1.406	1.602	1.216	2.541	1.572	0.072	1.181	0.115	1.548
15	Kanzi	5.145	1.004	8.162	1.432	2.122	0.497	3.367	1.172	0.813	0.979	1.289	1.416	0.019	1.390	0.031	1.695
16	Milwa	2.805	0.929	4.450	1.386	2.165	0.627	3.436	1.226	11.236	1.266	17.827	1.606	0.013	1.714	0.021	1.941
17	Golden Delicious	45.571	0.796	72.300	1.311	11.735	0.817	18.618	1.322	0.000	0.867	0.000	1.350	0.003	1.819	0.005	2.024
18	Tenroy Royal Gala	14.437	0.997	22.905	1.427	54.533	0.906	86.518	1.373	5.666	1.953	8.989	2.132	0.052	1.092	0.083	1.488
19	Idared	11.451	0.895	18.167	1.366	35.442	0.970	56.230	1.411	0.019	0.700	0.030	1.261	0.016	0.960	0.026	1.405
20	Granny Smith	2.026	0.935	3.214	1.390	47.871	1.202	75.950	1.562	2.497	1.024	3.962	1.444	0.060	1.252	0.095	1.596

*Příloha I – Tabulka 2: Hodnoty Ratio  $\Delta Cq$  a Ratio  $\Delta \Delta Cq$  u hodnocených vzorků dužniny plodů a charakterizace jejich variability pomocí variačního koeficientu – 2.část*

Č	Odrůda	Izoformy Mal d I															
		Mal d 1.01				Mal d 1.02				Mal d 1.06A				Mal d 1.06B			
		Ratio $\Delta Cq$	$V_k$ [%]	Ratio $\Delta \Delta Cq$	$V_k$ [%]	Ratio $\Delta Cq$	$V_k$ [%]	Ratio $\Delta \Delta Cq$	$V_k$ [%]	Ratio $\Delta Cq$	$V_k$ [%]	Ratio $\Delta \Delta Cq$	$V_k$ [%]	Ratio $\Delta Cq$	$V_k$ [%]	Ratio $\Delta \Delta Cq$	$V_k$ [%]
21	Golden Delicious	34.553	1.035	54.820	1.451	24.853	0.809	39.431	1.318	1.292	0.993	2.050	1.425	0.030	1.089	0.048	1.486
22	Modi	3.313	1.317	5.256	1.642	2.715	0.719	4.307	1.270	0.000	1.006	0.001	1.433	0.003	1.213	0.005	1.569
23	Golden Delicious	72.792	0.727	115.487	1.274	22.368	0.744	35.488	1.283	1.875	1.204	2.975	1.563	0.011	0.887	0.017	1.361
24	Pink Lady	18.710	0.786	29.684	1.305	4.384	0.555	6.956	1.195	0.151	0.900	0.240	1.369	0.161	1.235	0.256	1.585
25	Jonagold	13.565	1.396	21.521	1.699	12.880	1.068	20.435	1.472	3.744	1.020	5.939	1.442	0.034	1.094	0.053	1.489
26	Granny Smith	7.142	0.754	11.331	1.288	34.881	0.739	55.340	1.281	0.072	0.990	0.114	1.423	0.141	1.174	0.223	1.543
27	Red Chief	8.793	1.211	13.951	1.568	5.559	1.205	8.819	1.564	0.183	1.227	0.291	1.579	0.050	0.755	0.080	1.289
28	Golden Delicious	38.992	1.271	61.862	1.609	11.619	0.984	18.434	1.419	0.004	0.969	0.007	1.410	0.038	0.904	0.060	1.371
29	Elisa	5.966	1.126	9.465	1.510	3.512	1.112	5.572	1.501	0.797	1.239	1.264	1.587	0.202	1.150	0.321	1.527
30	Kanzi	24.535	1.209	38.926	1.566	3.314	1.123	5.258	1.508	0.034	1.652	0.053	1.893	0.058	3.729	0.092	3.677
31	Red Chief	4.909	0.807	7.788	1.317	1.248	1.148	1.980	1.525	0.893	1.242	1.417	1.589	0.031	1.129	0.049	1.513
32	Red Prince	6.533	1.233	10.365	1.583	0.740	1.219	1.174	1.573	0.439	1.046	0.697	1.458	0.330	1.229	0.523	1.580
33	Idared	8.148	0.934	12.927	1.389	23.758	0.510	37.693	1.177	0.365	0.790	0.579	1.307	0.121	1.259	0.192	1.601
34	Red Delicious	7.052	0.803	11.188	1.314	22.312	1.026	35.399	1.445	3.361	1.198	5.332	1.559	0.064	1.727	0.102	1.951
35	Golden Delicious	68.219	1.264	108.232	1.604	13.591	3.137	21.563	3.147	0.464	1.509	0.736	1.783	0.082	1.191	0.130	1.554
36	Idared	12.191	0.837	19.341	1.333	11.694	1.116	18.554	1.504	2.452	1.041	3.890	1.455	0.009	1.365	0.015	1.676
37	Red Delicious	12.199	0.828	19.354	1.328	27.286	1.306	43.291	1.634	1.863	1.336	2.955	1.655	0.074	1.547	0.117	1.812
38	Jonagold	39.324	0.422	62.389	2.931	69.845	1.180	110.812	1.547	2.051	1.144	3.253	1.522	0.203	1.250	0.322	1.595
39	Pink Lady	17.420	0.572	27.638	1.202	15.531	1.033	24.640	1.450	0.394	0.719	0.625	1.270	0.139	1.422	0.220	1.718
40	Golden Delicious	21.353	0.674	33.877	1.248	23.639	1.265	37.504	1.605	1.749	1.282	2.775	1.617	0.057	1.824	0.090	2.028

**Příloha I – Tabulka 2: Hodnoty Ratio  $\Delta Cq$  a Ratio  $\Delta \Delta Cq$  u hodnocených vzorků dužniny plodů a charakterizace jejich variability pomocí variačního koeficientu – 3. část**

Č	Odrůda	Izoformy Mal d 1															
		Mal d 1.01				Mal d 1.02				Mal d 1.06A				Mal d 1.06B			
		Ratio $\Delta Cq$	$V_k$ [%]	Ratio $\Delta \Delta Cq$	$V_k$ [%]	Ratio $\Delta Cq$	$V_k$ [%]	Ratio $\Delta \Delta Cq$	$V_k$ [%]	Ratio $\Delta Cq$	$V_k$ [%]	Ratio $\Delta \Delta Cq$	$V_k$ [%]	Ratio $\Delta Cq$	$V_k$ [%]	Ratio $\Delta \Delta Cq$	$V_k$ [%]
41	Idared	7.658	0.917	12.150	1.379	10.672	1.104	16.931	1.496	1.649	0.924	2.616	1.383	0.220	0.923	0.349	1.382
42	Jonagored	18.931	0.474	30.035	1.164	21.374	1.322	33.911	1.645	0.141	0.860	0.223	1.346	0.041	1.807	0.066	2.015
43	Red Prince	31.212	0.818	49.520	1.322	67.404	1.205	106.939	1.563	1.327	1.002	2.105	1.430	0.336	1.831	0.533	2.034
44	Idared	10.474	0.966	16.617	1.408	14.302	1.426	22.690	1.721	0.283	1.216	0.450	1.571	0.021	1.671	0.033	1.907
45	Red Chief	10.334	0.803	16.396	1.314	16.592	1.314	26.324	1.640	0.431	1.159	0.683	1.533	0.116	1.173	0.184	1.542
46	Idared	18.727	0.979	29.711	1.416	33.654	0.863	53.394	1.348	1.781	1.029	2.825	1.447	0.060	2.151	0.095	2.295
47	Fuji	35.060	1.129	55.624	1.512	49.823	1.124	79.047	1.509	0.454	0.668	0.721	1.245	0.096	0.925	0.153	1.384
48	Kanzi	16.397	0.897	26.015	1.368	10.863	1.026	17.235	1.446	2.109	1.291	3.347	1.624	0.095	1.435	0.150	1.728
49	Golden Delicious	25.737	1.276	40.833	1.613	25.108	1.247	39.836	1.592	0.475	0.926	0.754	1.384	0.026	1.320	0.041	1.644
50	Jonagold	21.848	1.402	34.663	1.704	32.009	1.030	50.783	1.448	0.291	1.214	0.462	1.570	0.063	0.814	0.101	1.320
51	Red Delicious	11.414	0.993	18.109	1.425	21.245	0.899	33.706	1.369	0.506	0.884	0.803	1.360	0.046	1.207	0.072	1.565
52	Fuji	22.323	1.278	35.416	1.614	25.073	1.073	39.780	1.476	0.126	1.227	0.199	1.579	0.022	1.559	0.035	1.820
53	Red Chief	24.952	0.962	42.763	1.373	22.461	0.866	35.636	1.349	0.503	1.218	0.799	1.573	0.024	2.299	0.038	2.420
54	Braeburn	21.562	0.949	34.208	1.398	20.328	1.140	32.252	1.520	4.301	1.379	6.824	1.687	0.068	1.566	0.108	1.826
55	Granny Smith	6.516	1.109	10.339	1.499	12.892	1.098	20.454	1.492	0.115	1.554	0.183	1.817	0.021	0.921	0.034	1.382
56	Jonaprince	17.205	1.266	27.297	1.606	39.773	0.856	63.101	1.344	0.115	1.525	0.183	1.795	0.083	1.424	0.131	1.720
57	Gala	7.767	1.220	12.323	1.574	13.536	0.917	21.475	1.379	3.634	0.875	5.766	1.355	0.043	1.294	0.068	1.625
58	Evelina	12.313	1.101	19.535	1.494	16.538	0.865	26.238	1.349	0.002	1.164	0.003	1.536	0.015	1.063	0.024	1.469
59	Jonagold	21.275	0.998	33.753	1.428	46.701	0.903	74.093	1.371	1.524	1.011	2.418	1.436	0.023	0.948	0.036	1.398
60	Golden Delicious	14.183	1.227	22.502	1.579	21.563	1.474	34.210	1.757	1.001	1.252	1.588	1.596	0.016	1.397	0.025	1.700

**Příloha I – Tabulka 2:** Hodnoty Ratio  $\Delta Cq$  a Ratio  $\Delta \Delta Cq$  u hodnocených vzorků dužniny plodů a charakterizace jejich variability pomocí variačního koeficientu – 4. část

Č	Odrůda	Izoformy Mal d 1															
		Mal d 1.01				Mal d 1.02				Mal d 1.06A				Mal d 1.06B			
		Ratio $\Delta Cq$	$V_k$ [%]	Ratio $\Delta \Delta Cq$	$V_k$ [%]	Ratio $\Delta Cq$	$V_k$ [%]	Ratio $\Delta \Delta Cq$	$V_k$ [%]	Ratio $\Delta Cq$	$V_k$ [%]	Ratio $\Delta \Delta Cq$	$V_k$ [%]	Ratio $\Delta Cq$	$V_k$ [%]	Ratio $\Delta \Delta Cq$	$V_k$ [%]
61	Golden Delicious	18.576	1.030	29.472	1.448	16.550	1.190	26.257	1.553	0.805	1.492	1.277	1.770	0.064	1.055	0.102	1.464
62	Red Delicious	15.128	1.415	24.001	1.713	24.649	1.450	39.107	1.739	1.921	1.332	3.048	1.653	0.016	1.655	0.025	1.894
63	Golden Delicious	24.501	1.161	38.871	1.534	21.079	1.180	33.443	1.546	0.115	1.711	0.183	1.939	0.015	1.418	0.023	1.715
64	Red Delicious	6.354	0.824	10.081	1.326	24.951	0.892	39.586	1.364	0.235	0.768	0.372	1.295	0.038	1.384	0.061	1.690
65	Braeburn	32.253	0.864	51.171	1.338	22.855	1.351	36.261	1.667	1.207	1.579	1.915	1.836	0.032	1.684	0.051	1.917
66	Golden Delicious	17.062	1.017	27.070	1.440	20.178	1.041	32.014	1.455	1.271	1.296	2.017	1.627	0.007	0.810	0.012	1.318
H1	Golden Delicious	25.999	1.043	41.249	1.456	59.939	1.239	95.096	1.587	0.014	1.804	0.022	2.012	0.019	1.271	0.030	1.609

*Příloha II - Tabulka 1: Pravděpodobnosti shody Ratio  $\Delta Cq$  mezi analyzovanými vzorky – výsledek Kruskal-Wallisovy analýzy – 1. část, popisy vzorků jsou uvedeny v Tabulce 4 ve vlastní diplomové práci*

2	1,00																				
3	1,00	1,00																			
4	1,00	1,00	1,00																		
5	1,00	1,00	1,00	1,00																	
6	0,00	0,00	0,00	0,01	0,67																
7	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,04															
8	0,00	0,09	0,00	0,63	1,00	1,00	1,00														
9	0,00	0,28	0,02	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00													
10	0,00	0,57	0,05	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00												
11	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,001											
12	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,07	1,00	1,00	1,00	1,000	1,000										
13	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,01	1,00	0,70	1,00	1,000	1,000	1,000									
14	0,31	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,000	0,120	1,000	1,000								
15	0,00	0,03	0,00	0,28	1,00	1,00	0,78	1,00	1,00	1,000	0,000	1,000	0,319	1,000							
16	0,00	0,18	0,01	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,000	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000						
17	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,03	1,00	1,00	1,00	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,720	1,000					
18	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,000	1,000	1,000	1,000	0,035	0,000	0,000					
19	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00	1,00	0,47	1,00	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,210	0,898					
20	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,01	1,00	0,55	1,00	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,248	1,000					
21	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,008	1,000	1,000	1,000	0,507	0,000	0,002					
22	0,00	0,00	0,00	0,00	0,13	1,00	0,00	1,00	1,00	1,000	0,000	0,013	0,002	1,000	1,000	1,000					
23	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,005	1,000	1,000	1,000	0,348	0,000	0,001					
24	0,07	1,00	0,66	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,000	0,025	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000					
25	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00	1,00	0,02	0,08	0,181	1,000	1,000	1,000	1,000	0,010	0,054					
26	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00	1,00	0,17	0,52	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,075	0,349					
27	0,00	0,00	0,00	0,00	0,35	1,00	0,02	1,00	1,00	1,000	0,000	0,037	0,007	1,000	1,000	1,000					
28	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,03	1,00	1,00	1,00	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,603	1,000					
29	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000					
30	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,39	1,00	1,00	1,00	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000					
31	0,12	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,000	0,044	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000					
32	0,00	0,12	0,01	0,86	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,000	0,000	1,000	0,963	1,000	1,000	1,000					
33	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,01	1,00	0,57	1,00	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,256	1,000					
34	0,20	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,000	0,076	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000					
35	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00	1,00	0,19	0,55	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,080	0,372					
36	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,84	1,00	1,00	1,00	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000					
37	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,05	1,00	1,00	1,00	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000					
38	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,000	1,000	1,000	1,000	0,004	0,000	0,000					
39	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,59	1,00	1,00	1,00	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000					
40	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00	1,00	0,04	0,15	0,316	1,000	1,000	1,000	1,000	0,019	0,098					
41	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000					
42	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,03	1,00	1,00	1,00	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,708	1,000					
43	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,001	1,000	1,000	1,000	0,056	0,000	0,000					
44	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,02	1,00	1,00	1,00	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,462	1,000					
45	0,30	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,000	0,114	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000					
46	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,020	1,000	1,000	1,000	1,000	0,001	0,005					
47	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00	1,00	0,03	0,10	0,218	1,000	1,000	1,000	1,000	0,012	0,066					
48	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000					
49	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00	1,00	0,01	0,04	0,097	1,000	1,000	1,000	1,000	0,005	0,028					
50	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,018	1,000	1,000	1,000	1,000	0,001	0,005					
51	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000					
52	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,04	1,00	1,00	1,00	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,800	1,000					
53	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,20	1,00	1,00	1,00	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000					
54	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,000	0,949	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000					
55	0,20	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,000	0,077	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000					
56	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,004	1,000	1,000	1,000	0,325	0,000	0,001					
57	0,04	1,00	0,48	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,000	0,017	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000					
58	0,65	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,000	0,261	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000					
59	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,006	1,000	1,000	1,000	0,397	0,000	0,001					
60	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,09	1,00	1,00	1,00	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000					
61	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,22	1,00	1,00	1,00	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000					
62	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,11	1,00	1,00	1,00	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000					
63	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,02	1,00	1,00	1,00	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,482	1,000					
64	0,37	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,000	0,146	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000					
65	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,05	1,00	1,00	1,00	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,944	1,000					
66	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,04	1,00	1,00	1,00	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,791	1,000					
H1	1,00	1,00	1,00	1,00	0,39	0,00	1,00	0,00	0,00	0,000	1,000	1,000	1,000	0,001	0,000	0,000					
	1	2	3	4,00	5,00	6,00	7,00	8,00	9,00	10,00	11,00	12,00	13,00	14,00	15,00	16,00					







*Příloha II – Tabulka 1: Pravděpodobnosti shody Ratio ΔCq mezi analyzovanými vzorky – výsledek Kruskal-Wallisovy analýzy – 4. část, popisy vzorků jsou uvedeny v Tabulce 4 ve vlastní diplomové práci*

2																			
3																			
4																			
5																			
6																			
7																			
8																			
9																			
10																			
11																			
12																			
13																			
14																			
15																			
16																			
17																			
18																			
19																			
20																			
21																			
22																			
23																			
24																			
25																			
26																			
27																			
28																			
29																			
30																			
31																			
32																			
33																			
34																			
35																			
36																			
37																			
38																			
39																			
40																			
41																			
42																			
43																			
44																			
45																			
46																			
47																			
48																			
49																			
50	1,000																		
51	1,000	1,000																	
52	1,000	1,000	1,000																
53	1,000	1,000	1,000	1,000															
54	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000														
55	1,000	0,675	1,000	1,000	1,000	1,000													
56	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,213												
57	0,800	0,175	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,050											
58	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,678	1,000										
59	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,262	1,000	0,063	0,821								
60	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000							
61	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000						
62	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000					
63	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000				
64	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,390	1,000	1,000	0,476	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000			
65	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000		
66	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	
H1	1,000	1,000	0,038	1,000	1,000	0,013	0,001	1,000	0,000	0,003	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,001
	<b>49,00</b>	<b>50,00</b>	<b>51,00</b>	<b>52,00</b>	<b>53,00</b>	<b>54,00</b>	<b>55,00</b>	<b>56,00</b>	<b>57,00</b>	<b>58,00</b>	<b>59,00</b>	<b>60,00</b>	<b>61,00</b>	<b>62,00</b>	<b>63,00</b>	<b>64,00</b>			

*Příloha II – Tabulka 1: Pravděpodobnosti shody Ratio  $\Delta Cq$  mezi analyzovanými vzorky – výsledek Kruskal-Wallisovy analýzy – 5. část, popisy vzorků jsou uvedeny v Tabulce 4 ve vlastní diplomové práci*

2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
H1
65
66

1,000

1,000 1,00

**Příloha II - Tabulka 2:** Pravděpodobnosti shody Ratio  $\Delta Cq$  mezi analyzovanými odrůdami – výsledek Kruskal-Wallisovy analýzy, popisy vzorků jsou uvedeny v Tabulce 4 ve vlastní diplomové práci

Golden Delicious	1,000																			
Idared	1,000	1,000																		
Evelina	0,000	0,000	0,000																	
Granny Smith	0,000	0,000	1,000	0,361																
Red Delicious	0,000	0,000	0,068	1,000	1,000															
Fuji	1,000	1,000	1,000	0,000	1,000	0,106														
Red Prince	0,010	0,012	1,000	0,294	1,000	1,000	1,000													
Kanzi	0,000	0,000	0,158	1,000	1,000	1,000	0,138	1,000												
Milwa	0,000	0,000	0,005	1,000	1,000	1,000	0,003	1,000	1,000											
Tenroy Royal Gala	1,000	1,000	0,264	0,000	0,002	0,000	1,000	0,007	0,000	0,000										
Modi	0,000	0,000	0,000	1,000	0,001	0,004	0,000	0,001	0,039	1,000	0,000									
Pink Lady	0,003	0,004	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,002	0,039							
Red Chief	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000	0,001	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,368	1,000						
Elisa	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,179	0,031	1,000	1,000						
Jonagored	1,000	1,000	1,000	0,073	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,210	1,000	0,000	1,000	0,702	1,000					
Braeburn	0,391	0,773	1,000	0,220	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,781	0,058	0,001	1,000	1,000	1,000	1,000				
Jonaprince	1,000	1,000	1,000	0,000	0,029	0,003	1,000	0,089	0,003	0,000	1,000	0,000	0,023	0,000	0,998	1,000	0,492			
Gala	0,001	0,002	0,303	1,000	1,000	1,000	0,176	1,000	1,000	1,000	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,004	
	Jonagold	Golden Delicious	Idared	Evelina	Granny Smith	Red Delicious	Fuji	Red Prince	Kanzi	Milwa	Tenroy Royal Gala	Modi	Pink Lady	Red Chief	Elisa	Jonagored	Braeburn	Jonaprince		

**Příloha II - Tabulka 3: Pravděpodobnosti shody Ratio  $\Delta Cq$  mezi jednotlivými izoformami – výsledek Kruskal-Wallisovy analýzy**

Mal d 1.02	0,885		
Mal d 1.06A	0,000	0,000	
Mal d 1.06B	0,000	0,000	0,000
	Mal d 1.01	Mal d 1.02	Mal d 1.06A

**Příloha II - Tabulka 4: Pravděpodobnosti shody Ratio  $\Delta Cq$  mezi slupkou a dužninou – výsledek Kruskal-Wallisovy analýzy**

DUZ	0,00
	SLU

**Příloha II - Tabulka 5: Pravděpodobnosti shody Ratio  $\Delta Cq$  mezi zeměmi původu – výsledek Kruskal-Wallisovy analýzy**

IT	0,000								
CZ	0,009	0,000							
PL	0,001	0,051	1,000						
SK	0,000	0,001	0,000	0,000					
NL	0,000	0,054	0,000	0,000	1,000				
CL	0,000	1,000	0,410	1,000	0,009	0,434			
ZA	1,000	1,000	1,000	1,000	0,001	0,042	1,000		
AR	0,000	1,000	0,055	0,202	1,000	1,000	1,000	0,368	
BE	1,000	0,000	0,026	0,008	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000
	DE	IT	CZ	PL	SK	NL	CL	ZA	AR

**Příloha II - Tabulka 6: Pravděpodobnosti shody Ratio  $\Delta Cq$  mezi obchodními řetězci – výsledek Kruskal-Wallisovy analýzy**

O1	0,080						
O2	1,000	0,000					
O5	1,000	1,000	0,662				
O6	0,219	1,000	0,002	1,000			
O4	0,235	0,000	1,000	0,121	0,000		
O7	1,000	0,002	1,000	1,000	0,056	0,111	
O8	0,000	0,000	0,006	0,000	0,000	0,004	0,000
	O3	O1	O2	O5	O6	O4	O7

**Příloha II - Tabulka 7:** Pravděpodobnosti shody Ratio  $\Delta Cq$  mezi pevností dužiny – výsledek Kruskal-Wallisovy analýzy

ME1	0,000	
ME3	0,000	0,00
	ME2	ME1

**Příloha II - Tabulka 8:** Pravděpodobnosti shody Ratio  $\Delta Cq$  mezi otlaky plodů – výsledek Kruskal-Wallisovy analýzy

OT1	0,000	
OT3	0,613	0,00
	OT2	OT1

**Příloha II - Tabulka 9:** Pravděpodobnosti shody Ratio  $\Delta Cq$  mezi balením plodů – výsledek Kruskal-Wallisovy analýzy

S	0,000	
T	0,002	0,000
	V	S

**Příloha II - Tabulka 10:** Pravděpodobnosti shody Ratio  $\Delta Cq$  mezi první a druhou jakostí plodů – výsledek Kruskal-Wallisovy analýzy

J2	0,000
	J1