

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra Genetiky a Šlechtění



**Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů**

**Vývoj nového molekulárního markerů vhodného pro
detekci enchanceru genu MdMYBA zodpovědného za
červenou barvu slupky jablek**

Diplomová práce

**Autor práce: Bc. Zakamennaia Vera
Biotechnologie a šlechtění rostlin (REPROMP)**

Vedoucí práce: doc. Dr. Ing. Pavel Vejl

© 2023 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Vývoj nového molekulárního markerů vhodného pro detekci enhanceru genu MdMYBA zodpovědného za červenou barvu slupky jablek " jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne datum odevzdání

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala doc. Dr. Ing. Pavlu Vejlovi za vedení diplomové práce, věcné připomínky a vstřícnost při konzultacích. Dále bych ráda poděkovala Prof. Dr. Ing. Borisovi Krškovi a dalším kolegům z oddělení genofondu VŠÚO Holvousy s.r.o. za poskytnutí biologického rostlinného materiálů a informací o odrůdách jabloní. Také bych ráda poděkovala Mgr. Martině Melounové Ph.D. za trpělivost a ochotu, kterou mi v průběhu zpracování diplomové práce věnovala.

1. Úvod	9
2. Cíl práce	10
2.1 Vědecké hypotézy, ze kterých vychází řešení diplomové práce	10
2.2 Konkrétní cíle pro řešení diplomové práce.....	10
3. Literární přehled	11
3.1 Obecná charakteristika jabloní	11
3.2 Systematické zařazení jabloní	11
3.3 Původ a historie pěstování jabloní.....	12
3.3.1 Současná situace pěstování jabloně v České republice.....	12
3.4 Přírodní podmínky pěstování jabloní.....	13
3.5 Pomologie vybraných odrůd jabloní	14
3.6 Šlechtění jabloní	19
3.6.1 Marker Assisted Selection	22
3.6.2 Molekulární a morfologické markery.....	22
3.6.3 Využívané markery pro selekce jabloní	23
3.7 Polymerázová řetězcová reakce.....	24
3.8 Elektroforetická separace amplifikovaných fragmentů	25
3.9 Sekvenování	25
3.10 Chemické složení jablek	26
3.10.1 Antokyany	27
3.10.2 Biosyntéza antokyanu.....	28
3.11 Hodnocení přítomnosti genů řídících barvu slupky a dužniny.....	29
3.11.1 Rodina transkripčních faktorů MYB	31
3.11.2 Gen pro transkripční faktor <i>MdMYB10</i> řídící červené zbarvení dužniny plodu jabloní	31
3.11.3 Gen pro transkripční faktor <i>MdMYBA</i> řídící červené zbarvení slupky plodu jabloní.....	32
3.11.4 Geny rodiny transkripčních faktorů MYB a jejich funkce v jiných rostlinách	33
3.12 Transponovatelné elementy	33
3.12.1 Klasifikace DNA transpozónů a retrotranspozónů	34
3.12.2 Vliv transpozónů na regulace rostlinných genů.....	35

3.13 Mapování a charakterizace LTR retrotranspozonu – redTE Zhang et al. (2019)	35
4. Materiál a metody	38
4.1 Rostlinný materiál	38
4.1.1 Odrůdy jabloní	38
4.1.2 Hybridní kombinace	38
4.2 Extrakce genomické DNA a hodnocení kvality a kvantity DNA	38
4.3 Detekce alelických variant genu <i>MdMYBA</i> podle Ban et al. (2007)	39
4.3.1 Ověření sekvenční specifity amplikonů genu <i>MdMYBA</i> pomocí Sangerovy sekvenace	39
4.4 Detekce retrotranspozonu redTE podle Zhang et al. (2019)	40
4.4.1 Bionformatická analýza enchanceru redTE	40
4.4.2 Identifikace pozice primerů navržených Zhang et al. (2019)	40
4.4.3 Optimalizace amplifikace specifických markerů navržených Zhang et al. (2019)	41
4.4.4 Navržení nového PCR markeru pro detekci redTE	41
4.4.5 Optimalizace protokolu pro amplifikaci nově navrženého markeru MalMYB	42
4.4.6 Vyhodnocení segregace nově navrženého markeru MalMYB	42
5. Výsledky	44
5.1 Hodnocení fenotypů barvy slupky u kolekce modelových odrůd a u hybridních kombinací	44
5.2 Hodnocení kvality a kvantity izolované genomické DNA	44
5.3 Výsledky identifikace alelických variant genu <i>MdMYBA</i> podle Ban et al. (2007)	44
5.3.1 Genotypizace kolekce odrůd pomocí markeru podle Ban et al. (2007)	45
5.3.2 Sekvenování genu <i>MdMYBA</i>	47
5.3.3 Porovnání sekvence markeru <i>MdMYBA</i> podle Ban et al. (2007) s databází NCBI	47
5.4 Výsledky detekce retrotranspozonu redTE podle Zhang et al. (2019)	50
5.4.1 Výsledky ověření specifity nasedání primerů navržených Zhang et al. (2019)	50
5.4.3 Výsledky navržení nového markeru MalMYB	56
5.4.4 Výsledný optimalizovaný protokol pro amplifikaci nově navrženého markeru MalMYB	57

5.4.5 Výsledky sekvenační analýzy nově navrženého markeru	60
5.4.6 Výsledky segregace nově navrženého markeru MalMYB	61
6. Diskuse	63
6.1 Význam molekulárních markerů ve šlechtění jabloní	63
6.2 Hodnocení markeru <i>MdMYBA</i> Ban et al. (2007)	67
6.3 Hodnocení markeru redTE Zhang et al. (2019)	67
7. Závěr	71
8. Literatura	73
9. Seznam použitých zkratk	83

Vývoj nového molekulárního markerů vhodného pro detekci enchanceru genu *MdMYBA* zodpovědného za červenou barvu slupky jablek

Souhrn

Jabloně jsou nejdůležitějším ovocným stromem mírného pásma. Plody jabloně jsou zdrojem vitamínů a antioxidantů a jsou součástí vyváženého jídelníčku. Šlechtitelské cíle zahrnují nejen zlepšování odolnosti jabloní vůči škůdcům, ale i zlepšení barvy slupky plodů.

Schopnost jablek syntetizovat a kumulovat pigmenty je především geneticky řízena. Antokyany – pigmenty způsobující červené zbarvení slupky, jsou významným antioxidantem a jejich biosyntetická dráha je řízena genem pro transkripční faktor *MdMYBA*.

Expese genu *MdMYBA* může být indukována vlivem záření nebo nízké teploty. V regulaci exprese *MdMYBA* se účastní také transponovatelný element redTE. Jeho přítomnost v regulační oblasti genu *MdMYBA* indukuje intenzivnější červené zbarvení slupky.

Marker Assisted Selection (MAS) je nástroj pro urychlení šlechtitelského procesu. *MdMYBA* a redTE jsou molekulární markery podle kterých je možné hodnotit budoucí fenotyp slupky plodů v ranných vývojových stádiích jabloní.

Během řešení diplomové práce byly optimalizovány amplifikační protokoly pro oba markery. Rovněž byly navrženy nové primery pro přesnější identifikaci redTE ve vybraných odrůdách.

Sekvenační analýzou byla potvrzena delece v genu *MdMYBA*, která je spojena se žlutým fenotypem slupky.

Sekvenační analýza redTE potvrdila asociaci fragmentu o velikosti 288 bp s červeným zbarvením slupky.

Klíčova slova: Jablň, *Malus domestica*, barva plodů, transkripční faktor *MdMYBA*, red enchancer, transpozon

Development of a new molecular marker suitable for the detection of the enhancer of the *MdMYBA* gene responsible for the red colour of apple skin

Summary

Apple trees are the most important fruit tree in the temperate zone. The fruits of the apple tree are a source of vitamins and antioxidants and are part of a balanced diet. Breeding targets include not only improving the resistance of apple trees to pests, but also improving the colouration of the skin of the fruit.

The ability of apples to synthesize and accumulate pigments is mainly genetically controlled. Anthocyanins, the pigments that cause the red colouration of the skin, are an important antioxidant and their biosynthetic pathway is controlled by the gene for transcription factor *MdMYBA*.

Expression of the *MdMYBA* gene can be induced by radiation or low temperature. Transposable element redTE is also involved in the regulation of *MdMYBA* expression. Its presence in the regulatory region of the *MdMYBA* gene induces a more intense red colouration of the skin.

Marker Assisted Selection (MAS) is a tool to accelerate breeding process. *MdMYBA* and redTE are the molecular markers which allow assessing the future phenotype of the fruit skin in early developmental stages of apple trees.

During the work on this master thesis, the amplification protocols were optimized for both markers. Also, new primers were designed for more accurate identification of redTE in selected cultivars.

A deletion in the *MdMYBA* gene was confirmed by sequence analysis, which is associated with a yellow skin phenotype.

Sequence analysis of redTE confirmed the association of a 288 bp fragment with red skin colouration.

Keywords: Apple, *Malus domestica*, fruit colour, transcriptional factor *MdMYBA*, red enhancer, transposon

1. Úvod

Jablka jsou celosvětově hojně konzumovaným ovocem, které je důležitou součástí pestré stravy. Barva slupky jablek je klíčovým aspektem spotřebitelských preferencí a nákupních rozhodnutí, který si spotřebitelé spojují s určitými chutěmi a texturami. Barva slupky jablek je dána akumulací pigmentů, které jsou syntetizovány biosyntetickou kaskádou zahrnující různé enzymy a regulační geny a epigenetickou cestou zahrnující vliv vnějšího prostředí (sluneční záření, teplota). Vzhledem k tomu, že červená jablka jsou častěji asociována se sladší chutí a šťavnatější dužninou, jsou červené kultivary u spotřebitelů populárnější.

Jabloně jsou víceleté stromy s dlouhým juvenilním vývojem, ve kterém není možné hodnotit základní hospodářské znaky. Použití genetických molekulárních markerů, které by jednoznačně identifikovaly žádoucí fenotypy v ranných vývojových stádiích jabloní, by mohlo značně urychlit proces selekce žádoucího fenotypu a snížit náklady na šlechtění. Markerem určitého fenotypového projevu může být jeden klíčový gen asociovaný s fenotypem, ale také i elementy genomu, jako například transponovatelné elementy (TE). Identifikace TE a jejich asociace s fenotypovým projevem je dalším užitečným nástrojem pro efektivnější šlechtění.

2. Cíl práce

2.1 Vědecké hypotézy, ze kterých vychází řešení diplomové práce

Tato diplomová práce je založena na třech vědeckých hypotézách, které se týkají mechanismu regulace syntézy pigmentu ve slupce jablek na genové úrovni. Řešení dané diplomové práce vychází z následujících vědeckých hypotéz:

- i. K syntéze červených pigmentů ve slupce plodů jabloní dochází tehdy, pokud v genu pro transkripční faktor *MdMYBA* nedochází k mutaci (Ban et al. 2007).
- ii. Intenzita červeného zbarvení slupky je ovlivněna přítomností retrotranspozonové inserce s enchancerovou aktivitou redTE (Zhang et al. 2019).
- iii. Neschopnost syntetizovat červené pigmenty nemusí být u všech žlutoplodých odrůd způsobena delecí v genu pro transkripční faktor *MdMYBA* nebo absencí redTE. Tato skutečnost se může týkat nových odrůd vzniklých spontánními mutacemi v kultivaru s původní červenou barvou slupky plodů.

2.2 Konkrétní cíle pro řešení diplomové práce

Konkrétní cíle pro řešení diplomové práce je možno shrnout do následujících bodů:

- i. Optimalizovat amplifikační protokoly pro PCR markery pro detekce alelických variant genu *MdMYBA* a enchanceru redTE.
- ii. Provést sekvenační analýzu genu *MdMYBA* u vybraných červenoplodých a žlutoplodých odrůd.
- iii. Provést sekvenační analýzu retrotranspozonového elementu redTE u vybraných červenoplodých a žlutoplodých odrůd.
- iv. Navrhnout nový PCR marker, který by umožňoval detekci neporušeného enchanceru redTE na základě délkového polymorfismu a rozlišení alelických sestav.

3. Literární přehled

3.1 Obecná charakteristika jabloní

Říše: rostliny (*Plantae*)

Podříše: cévnaté rostliny (*Tracheobionta*)

Oddělení: krytosemenné (*Magnoliophyta*)

Třída: vyšší dvouděložné (*Rosopsida*)

Řád: růžokvěté (*Rosales*)

Čeleď: růžovité (*Rosaceae*)

Podčeleď: jabloňovité (*Maloideae*)

Rod: jabloň (*Malus*)

Jabloně jsou stromy nebo keře s opadavými listy. Listy jsou celistvé nebo laločnaté s výrazně pilovitým okrajem a palisty. Květy jabloně jsou bílé až karmínově červené se žlutými prašníky, 5 cm široké s pěti korunními lístky. Plodem je malvice (jablko), se šťavnatou dužninou a drobnými semeny. Tvar plodu a zbarvení dužniny a slupky se liší podle odrůdy. Jabloně jsou cizosprašné stromy (Praciak, 2022).

Plody jabloně jsou zdrojem vlákniny, energie v podobě cukru (sacharóza, fruktóza, glukóza), vitamínů a minerálů (K, Fe, Mg, Ca, P a Na). Jedna porce jablka (200 g) obsahuje do 10% denní normy vitamínu C (kyselin askorbové), který je kvalitním antioxidantem, v lidském organismu má především role ve vstřebávání železa a podpory syntézy kolagenu, v rostlinách se podílí na regulaci fotosyntézy (Boyer, 2004). Další antioxidantní látky jsou antokyany, které nejen přidávají zbarvení slupce a dužně, ale příznivě ovlivňují zažívání a schopnost vázat těžké kovy (Pehlivan, 2017).

3.2 Systematické zařazení jabloní

Přesné botanické zařazení jabloně není jednotné, vzhledem ke značnému polymorfismu a hybridnímu charakteru druhu. Zjednodušený systém uvedený Dvořákem et al. (1976), člení jabloně do dvou sekcí, do kterých je zahrnováno 30 druhů jabloní.

Sekce *Cylcomeles* – jabloně s kalichem neopadavým.

podsekce *Eumalus* – jabloně pravé (*Malus sylvestris* Mill., *Malus pumila* Mill., *Malus sieversii* M. Roem)

podsekce *Prunifoliae* – jabloně slívolisté (*Malus prunifolia* Borkh., *Malus micromalus* Makino)

podsekce *Chloromeles* – jabloně zelenoplodé (*Malus coronaria* Mill., *Malus ionensis* Britt.)

podsekce *Eriomeles* – jabloně se sklerenchymatickými buňkami (*Malus formosana* Kawak et Koidz., *Malus Prattii* Schneid)

Sekce *Gymnomeles* – jabloně s kalichem opadavým.

podsekce *Baccatae* – jabloně drobnoplodé drobnoplodé (*Malus baccata* Borkh., *Malus floribunda* Sieb.)

podsekce *Prunifoliae* – jabloně jeřábovitě (*Malus sargentii* Rehd., *Malus fusca* Schneid)

Aktuálně pěstované odrůdy jabloně se řadí do hybridního druhu *Malus x domestica* Borkh (*jabloň domácí*). Druhy *Malus prunifolia* Borkh a *Malus floribunda* Sieb, jsou využívány při šlechtění mrazuvzdorných a rezistentních odrůd (Hričovský et al. 1990).

3.3 Původ a historie pěstování jabloní

Analýza genetické struktury a mikrosatelitů odhalila, že hlavním předkem *M.domestica* byla jabloň *M.sieversii* původem ze Střední Asie (Velasco, 2010). Později, když se jabloně šířily na západ podél Velké hedvábné stezky, se křížily s místními druhy v různých regionech: na Sibiři s *M.baccata*, na Kavkaze s *M.orientalis* a v Evropě s *M.sylvestris*. Tou samou Hedvábnou stezkou se jablka dostala ke starým Římanům a Řekům. Tam se jablka šířila po celé Evropě roubováním. Archeologické nálezy dokládají o konzumaci jablek v oblasti dnešního Švýcarska od roku 6500 př. n. l. (Korban, 2021; Anderson, 2019).

Během vlády Karla IV. se jabloně rozšířily v českých zemích a pěstovaly se v klášterních zahradách. Na přelomu 18. a 19. století v Poděbradech vznikla první kolekce 260 odrůd získaných pomocí místních ovocnářů a z ciziny.

V roce 1830 byla založena Česka Pomologická společnost, která se zabývala popisem, šlechtěním a údržbou odrůd. Úkolem společnosti bylo taky i rozšíření českých odrůd po Evropě a propagace ovocnářské kultury (Dvořák, 1976).

3.3.1 Současná situace pěstování jabloně v České republice

Jabloně v České republice jsou nejdůležitější ovocnou komoditou. Celková výměra ovocných sadů v ČR v roce 2022 činila 15 419 ha, z toho 11 437 ha produkčních sadů. Český statistický úřad zaznamenává meziroční pokles výměr. Jabloňové produkční sady, kde se pěstují konzumní plody, v ČR činí 6 348 ha (z toho 833 ha patří k produkčním

sadům v ekologickém režimu), v posledních letech je klesající tendence pěstebních plochách. Necelých 51 % ploch jabloňových sadů spadá do přestárých. Zájem o výsadbu jabloní se snižuje, ačkoli dochází k nárůstu produkce jabloňových podnoží. Z odrůd jsou nejvíce zastoupeny zimní Golden Delicious, Idared, Šampión, Jonagold, Rubín, Gala, Topaz, z toho Golden Delicious a Idared jsou na seznamu povolených odrůd k výsadbě v integrovaném zemědělství. Zvyšuje se poptávka o rezistentní odrůdy (Němcová a Buchtová, 2022).

Nepříznivé počasí a nadprůměrné srážky v sezóně 2021/2022 zkomplikovaly sklizeň jaderovin a školkařských výpěstků. Dlouhotrvající jarní mrazy poškodily květy jabloně a přivedly k propadům a deformacím plodů (Němcová a Buchtová, 2022).

Rentabilita jablek je přímo úměrná k rentabilitě celého ovocnářství. Celková úroda jablek v České republice v roce 2021 dosáhla 297,4 tis. t. Podíl jablek na celkové produkci ovoce v roce 2021 činil 82 %, na tržbách ovocnářských podniků 74 %, ačkoli dlouhodobá záporná obchodní bilance se prohlubuje. Ztráta obchodních trhů ve skladovací sezóně 2021/2022 způsobila pokles cen jablek ve střední a východní Evropě. Navíc došlo k poklesu poptávky, vzhledem k rostoucím cenám na všechny potraviny. Trend poklesu cen a snížení poptávky se držel po celé době skladovací sezóny. Ztráta exportního potenciálu je problémem pro pěstitele jablek po celé EU. V marketingovém roce 2021/2022 v ČR se celkem prodalo 109,2 tis. t, z toho tuzemská konzumace jablek činila 51,6 tis. t. Roste také poptávka po klasickém jablečném koncentrátu (Němcová a Buchtová, 2022).

3.4 Přírodní podmínky pěstování jabloní

Jabloň je ovocná plodina mírného pásma. Průměrná letní teplota by se měla v období aktivního růstu pohybovat kolem 21-24 °C. Jabloním se nejlépe daří v oblastech, kde mají stromy v zimě nepřetržitý odpočinek a dostatek slunečního svitu pro dobrý vývoj barvy. Lze je pěstovat v nadmořské výšce 1500-2700 m n. m. Pro optimální růst a plodnost jabloní jsou nejprůzračnější dobře rozložené srážky v rozmezí 1000-1250 mm během celého vegetačního období. Jabloní nejlépe rostou na dobře propustných, hlinitých půdách o hloubce 45 cm a pH v rozmezí 5,5-6,5. Půda by měla být bez tvrdých substrátů bez zamokření. Je třeba se vyhnout půdám s těžkým jílovitým nebo kompaktním podložím (Musacchi & Serra, 2018).

3.5 Pomologie vybraných odrůd jableň

V této kapitole je uveden pomologický popis odrůd jableň z hlediska barvy slupky použitých při řešení této diplomové práce.

‘Angold’ (kříženec odrůd ‘Antonovka’ x ‘Golden Delicious’). Žlutozelená slupka se s jemným červeným páskovaným líčkem. Červené zbarvení je výraznější na straně vystavené slunečnému záření (Hričovský et al. 2000).

‘Bohemia’ (pupenová mutace odrůdy ‘Rubín’). Od původní odrůdy se liší výraznější červenou celoplošnou barvou (Hričovský et al. 2000).

‘Braeburn’ (náhodný semenáč ze Nového Zelandu). Základ slupky je zelený s tmavé oranžovým překrytím (Hričovský et al. 2000).

‘Discovery’ (Semenáč odrůdy ‘Worcesterská parména’). Základ krémové žlutý s rozmytým jasno červeným líčkem (Hričovský et al. 2000).

‘Fuji’ (kříženec odrůd ‘Ralls Janet’ x ‘Golden Delicious’). Základní barva slupky je zelenožlutá. Zralý plod je překrytý bledým červeným líčkem (Hričovský et al. 2000).

‘Gala’ (Kříženec odrůd ‘Kidd’s Orange’ x ‘Golden Delicious’). Slupka má žlutý základ s červeným páskovaným překrytím (Hričovský et al. 2000).

‘Gloser’ (Kříženec odrůd ‘Zvonkove’ x ‘Richard Delicious’). Zelenožlutá slupka, překryta tmavé fialovou barvou skoro po celém povrchu (Hričovský et al. 2000).

‘Golden Delicious’ (Nahodily semenáč). Základ je zelenožlutý, velmi zřídka má růžové líčko (Hričovský et al. 2000).

‘Idared’ (Kříženec odrůd ‘Wagenerovo’ x ‘Jonathan’). Základní barva slupky je žlutozelená, krycí barva – karmínové červená (Hričovský et al. 2000).

‘Jarka’ (Kříženec odrůd ‘Golden Delicious’ x ‘Lord Lambourne’). Základní barva slupky je žluta, překryta červeným páskovaným (Hričovský et al. 2000).

‘Jonagold’ (Kříženec odrůd ‘Golden Delicious’ x ‘Jonathan’). Zelenožlutá základní barva slupky, překryta červenou krycí (Hričovský et al. 2000).

‘Julie’ (Kříženec odrůd ‘Quinte’ x ‘Discovery’). Základní světlá zelená barva slupky překryta intenzivní červenou barvou (Hričovský et al. 2000).

‘Karmína’ (Kříženec odrůd ‘Lord Lambourne’ x ‘Linda’). Zelenožlutá slupka, překryta rozmytou karmínovou barvou ve formě mramorování (Hričovský et al. 2000).

‘Melodie’ (Kříženec odrůd ‘Šampion’ x ‘OR38 T16’ (nese gen *mf* vůči strupovitosti jabloní). Slupka základní je žlutá, překryta intenzivní červenou barvou (Hričovský et al. 2000).

‘Melrose’ (Kříženec odrůd ‘Jonathan’ x ‘Red Delicious’). Základní barva slupky je žlutozelená, krytá hnědočervenou (Hričovský et al. 2000).

‘Ontario’ (Kříženec odrůd ‘Wagenerovo’ x ‘Northen Spy’). Slupka s dozráváním plodu mění barvu ze zelené na slámovou až žlutou. Na straně vystavené slunci vzniká karmínové červené rozmytí líčku (Hričovský et al. 2000).

‘Otava’ (Kříženec odrůd ‘Šampion’ x ‘Jolana’). Základní barva žlutozelená, překryta oranžovou (Hričovský et al. 2000).

‘Rosana’ (Kříženec odrůd ‘Jolana’ x ‘Lord Lambourne’). Základní zelenožlutá barva, s překrytím červeným mramorovým líčkem (Hričovský et al. 2000).

‘Rubinola’ (Kříženec odrůd ‘Prima’ x ‘Rubín’). Základní barva slupky je žlutá, překryta širokými červenými páskami. Výraznější červené zbarvení na plodů vystavených intenzivnímu záření (Hričovský et al. 2000).

‘Rubín’ (Kříženec odrůd ‘Lord Lambourne’ x ‘Coxova raneta’). Základní barva slupky je zelenožlutá, na slunečné straně je červené líčko (ve příznivých rocích celý plod je červený) (Hričovský et al. 2000).

‘Selena’ (Kříženec odrůd ‘Britemac’ x ‘Prima’, s následnou selekcí hybridního osiva). Základní barva slupky je zelenožlutá, krycí – oranžová, na slunečné straně jasné červené líčko (Hričovský et al. 2000).

‘Šampion’ (Kříženec odrůd ‘Golden Delicious’ x ‘Coxova raneta’). Zelenožlutá základní barva, s oranžovým páskovaným líčkem s výraznými lenticelami (Hričovský et al. 2000).

‘Topaz’ (Kříženec odrůd ‘Rubín’ x ‘Vanda’). Základní barva slupky je žlutá, překryta tmavé oranžovým páskovaným až mramorovaným (Hričovský et al. 2000).

‘Vanda’ (Kříženec odrůd ‘Jolana’ x ‘Lord Lambourne’ a následnou selekci). Zelenožlutá základní barva, překryta červeným mramorovaným (Hričovský et al. 2000).

‘Spartan’ (Kříženec odrůd ‘McIntosh’ x ‘Yellow Newton Pippin’). Základní barva zelenožlutá, později žlutá. Krycí barva je tmavé červená (Kutina et al. 1991).

Odrůdy představené na webových stránkách VŠÚO Holovousy s.r.o., Sempra Praha a.s. a Databáze odrůd ovocných dřevin.

‘Braeburn’ (‘Lady Hamilton’ x ‘neznámý’). Některé zdroje uvádí Coxovu renetu, a Granny Smith). Zelený základ slupky, překrytý jasně červenou barvou (Sempra.cz, jirivyslouzil.cz, vsuo.cz).

‘Bohemia Gold’ (pupenová mutace odrůdy ‘Bohemia’). Zelenožlutá slupka bez rzivosti (vyšlechtěna v Pěnčíně Josefem Thořem) (Sempra.cz, jirivyslouzil.cz, vsuo.cz).

‘Clijo’ (Kříženec odrůd ‘Clivia’ x ‘Jonalicious’). Základní barva zelenožlutá, krycí – červená, s celoplošným žíháním (Sempra.cz, jirivyslouzil.cz, vsuo.cz).

‘Jonathan’ (Semenáč odrůdy ‘Esopus Spitzenburg’). Základní barva slupky je zelenavě žlutá, později žlutá. Krycí barva je oranžové červená s nepravidelným žíháním (Sempra.cz, jirivyslouzil.cz, vsuo.cz).

‘Klara’ (Kříženec odrůd ‘Hvězdnatá’ x ‘Hájkova renetá’). Základní barva je slámové žlutá, krycí – jasně červená, rozmytá na větší části plodu (Sempra.cz, jirivyslouzil.cz, vsuo.cz).

‘Kordona’ (Kříženec odrůd ‘McIntosh Wijcik’ x ‘Florina’). Základní barva slupky zelenožlutá, krycí – červené líčko. (Sempra.cz, jirivyslouzil.cz, vsuo.cz).

‘Meteor’ (Kříženec odrůd ‘Megumi’ x ‘Melrose’). Jasné purpurové červená slupka. (Sempra.cz, jirivyslouzil.cz, vsuo.cz).

‘Miodar’ (Kříženec odrůd ‘Mio’ x ‘Quinte’). Bělavé zelena základní barva s rozmytým růžovým líčkem (Sempra.cz, jirivyslouzil.cz, vsuo.cz).

‘Orion’ (‘Golden Delicious’ x ‘Otava’). Zelenožlutá s nevýrazným oranžovým líčkem. (Sempra.cz, jirivyslouzil.cz, vsuo.cz).

‘Primadela’ (Kříženec odrůd ‘Primula’ x selekce z potomstva odrůd ‘Starkrimson Delicious’ x ‘Zvonkové’). Zelenožlutý základ, krycí barva červená se žíháním (Sempra.cz).

‘Produkta’ (Kříženec odrůd ‘Antonovka’ x ‘Goldspur’). Základní zelenožlutá, ve zralosti světlé žlutá slupka (Sempra.cz, jirivyslouzil.cz, vsuo.cz).

‘Rezista’ (Kříženec ‘Prima’ x ‘NJ 56’). Základní barva slupky je žlutá, líčko buď chybí nebo jen slabé světlé oranžové (Sempra.cz, jirivyslouzil.cz)

‘Rubens’ (Kříženec odrůd ‘Elstar’ x ‘Gala’). Žlutý základ, oranžové překrytí (Sempra.cz, jirivyslouzil.cz)

‘Rubimeg’ (Kříženec odrůd ‘Megumi’ x ‘Rubín’). Bělavě zelená základní barva s celoplošným červeným žíháním (Sempra.cz, jirivyslouzil.cz, vsuo.cz).

‘Rucla’ (Kříženec odrůd ‘Clivia’ x ‘Rubín’). Základní barva slupky je zelenožlutá s krycí purpurovou barvou (Sempra.cz, jirivyslouzil.cz, vsuo.cz).

‘Vysočina’ (Kříženec hybridu HL75-26-8 s mutantem ‘McIntosh’). Bělavě zelený základ, purpurové celoplošné krycí žíhání (Sempra.cz, jirivyslouzil.cz)

‘Zuzana’ (Kříženec odrůd ‘Zvonkové’ x ‘James Grieve’). Základní barva zelenavě žlutá až žlutá, s oranžově červenou až karmínovou krycí barvou, ve formě žíhání a mramorování (Sempra.cz, jirivyslouzil.cz, vsuo.cz).



Obrázek 1: Odrůda 'Herald' (Zdroj: <https://www.zahradnictvi-flos.cz>)



Obrázek 2: Odrůda 'Zuzana' (Zdroj: <https://www.zahradnictvi-flos.cz>)



Obrázek 3: Odrůda 'Spartan' (Zdroj: <https://www.zahradnictvi-flos.cz>)



Obrázek 4: Odrůda 'Rezista' (Zdroj: <https://www.zahradnictvi-flos.cz>)



Obrázek 5: Odrůda 'Golden Delicious' (Zdroj: <https://www.zahradnictvi-flos.cz>)



Obrázek 5: Odrůda 'Bohemia Gold' (Zdroj: <https://www.zahradnictvi-flos.cz>)

3.6 Šlechtění jabloní

Šlechtění jabloní je zaměřené především na resistenci vůči chorobám jako je padlí jabloňové (původce *Podosphaera leucotricha*), strupovitost jabloní (původce *Venturia inaequalis*) a spála růžovitých (původce *Erwinia amylovora*), které mají značný vliv na hospodářský výnos (Kellerhals et al. 2008).

Mezi další šlechtitelské patří:

- i. Odolnost vůči biotickým a abiotickým faktorům
- ii. Zlepšení jakosti plodu (struktura dužniny, kyselost a sladkost chutě, šťavnatost)
- iii. Zvýšení plodnosti
- iv. Šlechtění nových atraktivních fenotypů plodu (zbarvení slupky a dužniny, velikost a tvar malvice)
- v. Trvanlivost a delší skladovatelnost plodu

Existuje několik metod využívaných v procesu šlechtění jabloní (Kellerhals et al. 2008):

- i. Selektce jabloní z volného křížení: využívá cizosprašnost jabloně, nevýhodou je nemožná kontrola otcovské komponenty a nemožný odhad charakteru genetické struktury potomstva. Aktuálně se neuplatňuje ve šlechtitelské praxi.
- ii. Selektce ze záměrného křížení, tzv hybridizace – záměrné opylování vybrané mateřské odrůdy známou otcovskou odrůdou. Známý genotyp obou komponent umožňuje relativně rychle vyšlechtit potomstva s konkrétními žádoucími vlastnostmi.
- iii. Šlechtění s využitím mutací – mutace jsou náhodné změny genotypu dědičného charakteru. Mutace může vzniknout přirozeným způsobem nebo cílenou indukci šlechtitelem.
- iv. Šlechtění s využitím transgenóze – selektce na molekulární úrovni, založená na transformaci struktury DNA. Taková metoda se uplatňuje při šlechtění rezistentních odrůd vůči hospodářským chorobám.

Vyšlechtění nových odrůd je časově náročný proces vzhledem k delší vegetační době jabloně. Vývoj genových technologií však nabízí molekulární metody, které umožňují identifikaci hybridních semenáčů již v prvním vegetačním roce, a tím značně snižují dobu šlechtění a finanční náklady (Kellerhals et al. 2008).

3.6.1 Marker Assisted Selection

MAS (Marker Assisted Selection) neboli selekce pomocí markerů, je molekulární šlechtitelská technika, která kombinuje tradiční šlechtitelské metody s analýzou markerů DNA za účelem identifikace a výběru žádoucích znaků u rostlin a zvířat (Kumawat et al. 2021).

MAS zahrnuje identifikaci markerů DNA, které jsou spojeny s určitým cíleným znakem, jako je odolnost vůči chorobám, tolerance vůči suchu nebo určitý fenotyp. Tyto markery se pak používají k prověření populace jedinců s cílem identifikovat jedince s požadovaným znakem. Pomocí MAS mohou šlechtitelé urychlit proces selekce tím, že identifikují jedince s požadovaným znakem rychleji a přesněji než tradiční šlechtitelské metody (Collard & Mackill, 2008).

MAS lze použít různými způsoby, a to včetně:

Mapování kvantitativních znaků (QTL): Mapování QTL zahrnuje identifikaci oblastí genomu, které jsou spojeny s určitým znakem. Tyto informace lze využít k vývoji markerů, které lze použít k selekci daného znaku v budoucích šlechtitelských programech (Ghomi et al. 2013).

Zpětné křížení s pomocí markerů: Zpětné křížení s pomocí markerů zahrnuje křížení elitního rodiče s rodičem, který nese požadovaný znak, ale nemá jiné žádoucí znaky. Výsledné heterozygotní potomstvo se pak zpětně zkříží s elitním rodičem a prověří se na požadovaný znak pomocí markerů (Frisch & Melchindger, 2005).

Celkově lze říci, že selekce pomocí markerů je účinný nástroj, který může šlechtitelům pomoci účinněji a efektivněji vyvíjet lepší hospodářské plodiny.

3.6.2 Molekulární a morfologické markery

Morfologické markery udávají informace o životním cyklu, geografickém a ekologickém rozšíření a evoluce zkoumaného druhu rostliny. Fenotypické markery u rostlin jsou omezené na několik základních markerů jako je barva, tvar a velikost plodů. Na rozdíl od molekulárních markerů, morfologické jsou plně detekovatelné jen v pozdějších vývojových stádiích rostliny. Současné technologie umožňují šlechtitelům hodnotit rostliny na úrovni genotypu, již v juvenilním stadiu. Molekulární markery nejsou ovlivněny vnějším prostředím a jejich použití nezávislé na vegetačně sezóně, a tím jsou spolehlivým a rychlým nástrojem hodnocení genetické variability (Douaihy et al. 2012).

Mezi molekulární markery patří (Qi et al. 2014):

- i. Polymorfismus jednotlivých nukleotidů (SNP)
- ii. Polymorfismus délky restrikčních fragmentů (RFLP)
- iii. Variabilní počet tandemových repetitiv (VNTR)

Polymorfismus NK vzniká v důsledku hromadění bodových mutací, delecí, inverze a další větší přestavby. V podstatě takové mutace mohou být spojené se změnou ve expresi genů (ve kterém došlo k mutaci) a tím i změnou fenotypického projevu. Detekce polymorfismu DNA se dá provést na základě délkového polymorfismu restrikčních fragmentů, pomocí PCR amplifikace a následně elektroforetické separace nebo sekvenace. Bodová mutace, vznikla v cílovém analyzovaném fragmentu, může přivést ke ztrátě nebo získání restrikčního místa. Delece nebo inserce ovlivňuje délku fragmentů (Qi et al. 2014).

3.6.3 Využívané markery pro selekce jabloní

Odolnost jabloně vůči chorobám je podmíněna přítomností určitých rezistentních genů. Ve šlechtění odrůd vůči strupovitosti jabloně jsou využívány lokusy *Rvi6* a *Rvi7* z *Malus floribunda*. Další lokusy jsou *Rvi10* (donorem je Antonovka, nositelem je Angold) a *Rvi14* (donorem je odrůda 'Dülmener Rosen') (Jha et al. 2009).

Majorgen PI1 (původem z *Malus robusta*) je markerem rezistence odrůdy vůči padlí jabloňovému. Částečnou rezistenci mohou mít odrůdy, které disponují jen souborem minor genů (polygenně řízena rezistence), například odrůda Golden Delicious (Markussen et al. 1995).

Molekulární markerování se využívá i pro determinaci fenotypu plodů jabloně, zejména barva slupky a dužniny, za které je zodpovědná rodina transkripčních faktorů MYB regulujících syntézu antokyanu. Dominantní alela genů *MdMYB10* je markerem pro červeně zbarvenou dužninu (donorem je *M. robusta*). Společným předkem odrůd s červenou dužninou je botanický druh *M. pumila* var. *Niedzwetzkyana*. S červeným zbarvením dužniny mohou být spojené i nežádoucí vlastnosti jako je malá velikost plodů a trpká, nahořklá chuť (Chagné et al. 2007).

Další identifikovaný marker je *MdMYBA*, přičemž exprese daného genu je velice intenzivní u odrůd s červenou slupkou. *MdMYBA* může nést dvě alely, wild-alela je spojena s červeným fenotypem slupky a mutovaná alela se žlutým fenotypem. Podstatou mutace této alely je delece (Ban et al. 2007).

3.7 Polymerázová řetězová reakce

Polymerázová řetězová reakce (PCR) je experimentální technika molekulární biologie, která umožňuje výrazné zvýšení malých koncentrací určitých fragmentů nukleových kyselin v biologickém materiálu. PCR se využívá jako metoda amplifikace *in vitro* pro definované DNA fragmenty se známou nebo částečně známou sekvencí. Různé modifikace PCR umožňují detekci mikroorganismů a bodových mutací (Mullis et al. 1986).

PCR reakce probíhá v několika cyklech (obvykle 20-30), během kterých exponenciálně narůstá počet specifických amplikonů o určité délce. Amplifikační reakce zajišťuje termostabilní zařízení tzv. termocykler, kde je možné přednastavit počet opakování cyklů, časové intervaly a teploty pro každý z kroků amplifikace (Mullis et al. 1986).

K provedení amplifikace je potřeba vytvořit PCR mix z dále uvedených reakčních komponent (Sambrook, 2001):

- i. Cílový vzorek určený k analýze, tzv. templát. Templátem je dvouvláknová nukleová kyselina, která po denaturaci umožňuje nasedání primerů a vytvoření specifického amplifikačního produktu.
- ii. Primery – uměle syntetizované oligonukleotidy (o velikosti 10 až 30 nukleotidů), komplementární k cílovému vlákně ve směru 5' – 3'. Správně navržené primery jsou klíčovou složkou k úspěšné amplifikaci, při návrhu primerů je třeba dbát na:
 - a) Specifitu primerů. Primery se musí vázat na přesně definované místo na NK, jinak je možnost vytvoření více nespecifických produktů.
 - b) Primery nesmí být vzájemně komplementární. Komplementární primery při smíchání v premixu mohou vytvářet tzv. dimery.
 - c) Oblast nasedání primerů na templátovém vlákně, nesmí obsahovat mutace nebo indely.
- iii. Polymeráza – enzym zajišťující připojení nukleotidu od 3' – konce primerů, Hlavní požadavky na polymerázu jsou termostabilita a vysoká procesivita.
- iv. Směs dNTP (deoxynukleotidtrifosfátů) – je stavebním materiálem pro prodloužení komplementárního vlákna polymerázou.
- v. Pufrační složka, která zajistí stabilní reakční prostředí a katalyzuje polymerizační reakce (KCl, MgCl₂).

Samotný průběh amplifikace se skládá ze tří kroků, probíhajících za určitých teplotních podmínek (Mullis et al. 1986):

- i. Denaturace – narušení vodíkových můstku mezi komplementárními vlákny cílového vzorku vlivem vysokých teplot (94–96 °C).
- ii. Annealingu (nasedání) – primery nasedají na jednovláknové řetězce (cca 50–60 °C) a vytváří krátký dvouřetězcový úsek s volným 3' – koncem.
- iii. Elongace – prodloužení komplementárního vlákna polymerázou (72 °C).

Výsledné amplifikované fragmenty podléhají další detekci prostřednictvím několika metod: elektroforetické (na agarózovém nebo polyakrylamidovém gelu) nebo hybridizační (enzymová nebo fluorescenční) (Sambrook, 2001).

3.8 Elektroforetická separace amplifikovaných fragmentů

Elektroforéza je jednou z nejrozšířenějších metod separace molekul NK na základě jejich velikosti. Amplifikované fragmenty se vizualizují na agarózovém nebo polyakrylamidovém gelu, ponořeným v elektroforetickém pufru s přidaným barvivem ethidium bromidem. Ztuhlý gel se umístí v separační vaničce naplněné puftrem, která je spojena se zdrojem stejnosměrného napětí. Záporně nabitá NK se pohybuje od záporně nabitě katody kladně nabitě anodě. Kratší fragmenty se pohybují v gelu rychleji. Rychlost pohybu je ovlivněna koncentrací agarózy, intenzitou napětí elektrického pole, teplotou a složením pufru (Alberts et al. 2002).

Agarózový gel se využívá při rozdělování větších fragmentů (100 až 5000 bp), zatímco polyakrylamidový gel se využívá při separaci velmi malých fragmentů (10 až 100 bp). Velikostně rozdělené fragmenty lze porovnávat se hmotnostním standardem a následně určit jejich velikost (Alberts et al. 2002).

3.9 Sekvenování

Sekvenace je proces determinace pořadí nukleotidů v molekule DNA. Sekvenování DNA má širokou škálu využití v oborech jako je medicína, genetika, kriminalistika nebo i zemědělství. Sekvenování DNA lze použít k identifikaci mutací způsobujících nemoci, ke sledování šíření infekčních chorob, identifikaci užitečných genetických znaků (Simpson, 2010).

První metodu sekvenování DNA vyvinul Frederick Sanger v roce 1977. Ke zkoumání DNA používal modifikované nukleotidy ddNTP (dideoxynukleotid trifosfát). Na rozdíl od typických dNTP, ddNTP postrádají OH skupiny na 2. a 3. uhlíku ribózy a tím, po nasednutí na DNA templát, neumožňuje dalším dNTP prodlužovat komplementární řetězec. Vznikne tak řada fragmentů DNA různých délek, z nichž každý je zakončen určitým ddNTP nukleotidem. Po sekvenování se fragmenty separují pomocí elektroforézy v akrylamidovém gelu, a určuje se pořadí koncových ddNTP. Pořadí nukleotidů se dá zkoumat i prostřednictvím kapilární elektroforézy, kde speciální detektor registruje signál od fluorescenčně značených ddNTP (Sanger et al. 1977).

V současné době je Sangerova metoda nahrazována tzv. NGS (Next Generation Sequencing) využívající automatické sekvenátory, které dokážou paralelně sekvenovat větší množství molekul. K NGS metodám patří například pyrosekvenování – metoda, kde se používá kaskáda enzymatických reakcí s následnou registrací emitovaného záření při každém zapojení daného nukleotidu (Pervez et al. 2022).

V roce 2010 byly vyvinuté NGS technologie sekvenování umožňující sekvenování DNA bez fragmentace a amplifikace fragmentu, což dovoluje velmi efektivně sekvenovat celé genomy (Pervez et al. 2022).

NGS sekvenování zahrnuje následující kroky:

- i. Příprava knihovny – DNA určená k analýze se izoluje a amplifikuje s přidáním adaptoru se známou sekvencí.
- ii. Vlastní sekvenování fragmentů knihovny.
- iii. Bioinformatická analýza dat – hrubá sekvenační data se vyhodnocují speciálním bioinformatickým softwarem. Výsledkem je tzv. konsensus sekvence, které obsahují oblasti pro nasednutí R a F primerů.
- iv. Interpretace dat – konsensus-sekvence se analyzuje z hlediska polymorfismů včetně bodových mutací.

3.10 Chemické složení jablek

Jablka obsahují antioxidanty, vitamíny, vlákninu a řadu dalších živin. Díky svému rozmanitému obsahu živin jsou jablka zdravou součástí vyvážené stravy (Rop et al. 2011). Konzumace stravy bohatá na různé druhy ovoce a zeleniny, včetně jablek, může pomoci snížit riziko vzniku řady onemocnění, jako jsou například obezita, srdeční onemocnění, diabetes i rakovina (Hyson, 2011).

Složení jablek se u jednotlivých odrůd značně liší. Na celkové složení plodů mají vliv faktory prostředí, jako je klima, stav půdy, místo pěstování a podmínky skladování po sklizni. Cukry, organické kyseliny a polyfenolové sloučeniny jsou zodpovědné za hlavní sensorické vlastnosti jablek, kterými jsou sladkost, kyselost a trpkost. Proces zrání mění složení jablek, což ovlivňuje jejich konzistenci i chuť (Velasco et al. 2010).

Obsah vody související se šťavnatostí jablek se obecně pohybuje v rozmezí 82,5-86,2 %. Sacharidy tvoří hlavní část (více než 90 %) sušiny jablek. Bílkoviny se pohybují v rozmezí od 1,42 % do 4,35 %, celkový obsah lipidů od 0,28 % do 3,62 % a popeloviny od 1,32 % do 2,08 % sušiny (Velasco et al. 2010).

Obsah sacharidů v jablkách lze rozdělit na rozpustné cukry, vlákninu (neškrobové polysacharidy) a škrob. Nejrozšířenější složkou sacharidů jsou rozpustné cukry, které tvoří až 83 %. Hlavním cukrem mezi nimi je fruktóza. Obecně se koncentrace cukrů během zrání zvyšuje (Zhang et al. 2010).

Jablka jsou zdrojem vlákniny. Množství vlákniny ve slupce jablek je asi o 30 % vyšší než v dužnině. Hlavními neškrobovými polysacharidy, které tvoří většinu vlákniny v jablkách, jsou pektiny. Uvádějí se hodnoty 8 až 24 g pektinů/100 g sušiny. Pektiny jsou hlavní složkou buněčné stěny a jsou spojeny s pevností plodů. Vzhledem k tomu, že pektiny procházejí během zrání výraznými strukturními změnami, mění se textura jablek a obvykle měknou (Rop et al. 2011).

Draslík a fosfor jsou hlavními minerálními látkami obsaženými v jablkách. Draslík se pohybuje mezi 676,91 a 843,96 mg/100 g sušiny. Fosfor se pohybuje od 57,97 do 120,83 mg/100 g sušiny. Hlavními mastnými kyselinami v jablkách jsou kyselina linolová a kyselina palmitová (Hyson, 2011).

Celkový obsah vitamínu C v čerstvých jablkách se pohybuje mezi 31,9 a 69,44 mg/100 g sušiny. Vitamin C je citlivý na zpracování a snadno se rozkládá. Proto je příjem vitamínu C prostřednictvím jablek nejvyšší u nezpracovaného ovoce. Jablka neobsahují významné množství vitaminů rozpustných v tucích, jako jsou vitaminy A, D a E (Hyson, 2011).

3.10.1 Antokyany

Hromadění pigmentu v plodech je důležitý faktor kvality plodu. Pigmenty ve slupce zajišťují pro spotřebitele základní rozlišení odrůd. Barva slupky jablek je jedním z rozhodujících faktorů preference spotřebitelů. Obecně jsou spíše preferované červené odrůdy (Boyer, 2004).

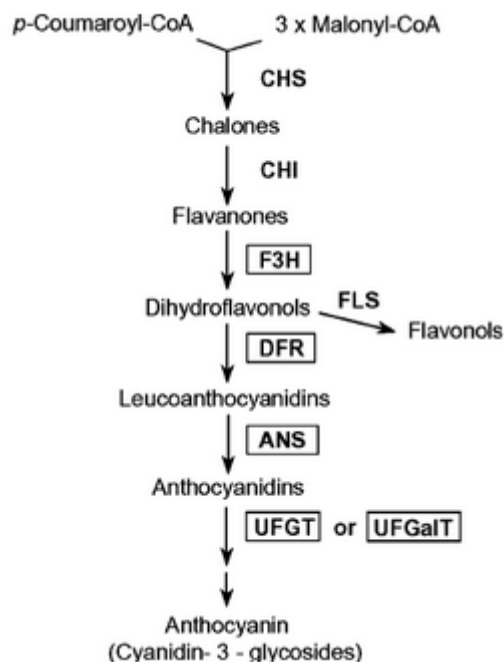
Antokyany (také antokyanidiny) jsou ve vodě rozpustné pigmenty patřící do skupiny flavonoidních polyfenolů. Antokyany v rostlinách mohou mít funkci pigmentů, antioxidantů i antimikrobiálních látek. Antokyany slouží k přilákání hmyzu, ochraně před

poškozením od UV záření a jsou součástí obranného mechanismu před biotickými a abiotickými stresy (Zhao et al. 2014). Kromě fyziologických funkcí v rostlinách se ukázalo, že antokyany mají řadu zdravotních přínosů pro člověka. Antokyany mají antioxidační a protizánětlivé vlastnosti a mohou přispívat k ochraně před kardiovaskulárními chorobami, rakovinou a dalšími chronickými onemocněními (Blesso, 2019).

Koncentrace antokyanů se může lišit v závislosti na druhu, kultivaru a podmínkách pěstování rostliny a také na fázi vývoje a zralosti ovoce nebo zeleniny. Důležitou roli v syntéze a akumulaci antokyanu hrají i genetické faktory (Blesso, 2019).

3.10.2 Biosyntéza antokyanu

Antokyany jsou syntetizovány obecnou flavonoidní cestou. Molekuly malonyl-CoA a 4-kumaroyl-CoA, odvozené od fenylalaninu nebo tyrozinu, jsou kondenzované chalkonsyntázou (CHS) za vzniku chalkon naringenin. Enzym flavonoid 3' – hydroxyláza (F3'H) hydroxyluje naringenin za vzniku různých dihydroflavonolů. Dehydroflavonol-4-reduktáza (DFR) redukuje dihydroflavonoly na leukoantokyanidin, který je antokyanidinsyntázou (ANS) oxidovaný na antokyanidiny (nestabilní kationty flavonoidů). Antokyanidiny se vážou na monosacharidový zbytek prostřednictvím glykosylace katalyzované glukosyltransferázou (FGT). Monosacharidovou složkou může být glukóza, galaktóza nebo xylóza. Syntetizované antokyany jsou přenášeny a skladovány ve vakuolách, kde pH ve vakuole ovlivňuje stabilitu antokyanů a jejich barvu (Kim et al. 2003).



Obrázek 7: Zjednodušená biosyntetická cesta flavonoidů (Kim et al. 2003).

3.11 Hodnocení přítomnosti genů řídících barvu slupky a dužniny

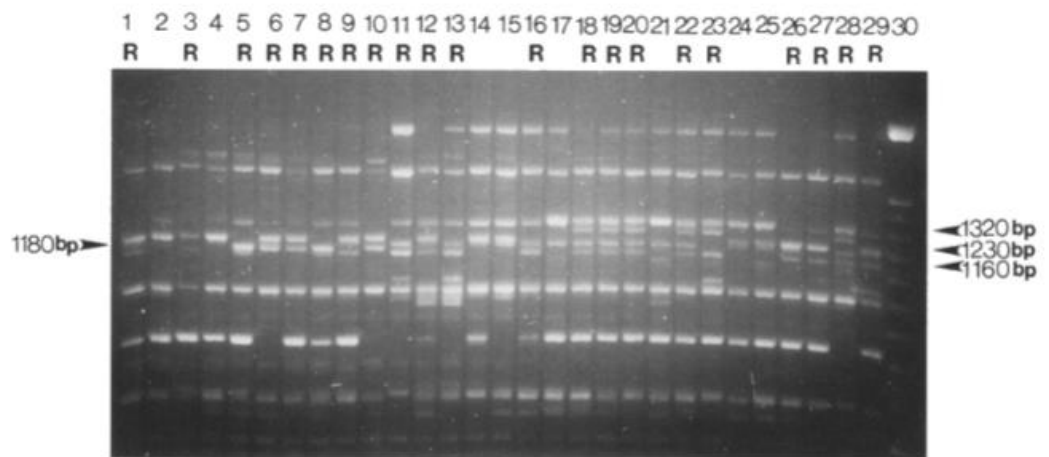
Barva slupky jablek určuje jejich ekonomickou hodnotu, protože, jak bylo popsáno dříve, spotřebitelé preferují červené odrůdy. Možnost selekce fenotypu ještě v ranných vývojových stádiích je pro šlechtitele velice výhodná. Vzhledem k tomu že barva slupky je závislá na akumulaci antokyanu, studium genetických a epigenetických mechanismů, které mohou ovlivnit syntézu pigmentu je esenciální (Ban et al. 2007, Takos et al, 2006).

První hypotéza týkající se řízení barvy slupky byla představena Crane & Lawrence (1933), kteří předpokládali existenci jediného dominantního genu kontrolujícího syntézu antokyanu. Schmidt (1988), předpokládal, že modifikující geny za určitých podmínek mohou anulovat efekt lokus *Rf* zodpovědného za červené zbarvení slupky. White & Lespinasse (1986) navrhli model dvou kodominantních genů A a B, kdy za žlutozelený fenotyp byla zodpovědná homozygotně recesivní sestava genů.

Cheng et al. (1996) se pokusili identifikovat kodominantní RAPD marker, který by byl těsně spojen s určitým fenotypem slupky. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) metoda spočívající v použití několika nespecifických primerů (10-12 nukleotidů), které by se vážou na fragmentovaný DNA templát a amplifikují náhodně

různě veliké fragmenty. Tato metoda nevyžaduje definovaný DNA templát. Po amplifikaci vzniká relativně unikátní vzor jednotlivého genotypu, který se porovnává s dalšími profily.

Cheng et al. (1996) navrhli 350 nespecifických primerů, které testovali na populaci kříženců odrůd 'Rome Beauty' (červenoplodé) x 'White Angel' (žlutoplodé). Jeden primer průměrně amplifikoval 11 až 12 bandů. Jeden z primerů (anotovaný jako BC226), amplifikoval 2 fragmenty přítomné jenom v odrůdách s červenou slupkou – 1160 a 1180 bp. Fragment velký 1230 bp byl asociován se žlutým fenotypem. Několik fragmentů bylo asociováno s červeným i žlutým fenotypem slupky. Sekvence vybraných fragmentů objevila jejich vysokou homologii s několika krátkými delecemi, na jejichž základě byly navrženy specifické primery. Opětovná analýza kříženců odrůd 'Rome Beauty' x 'White Angel' s novými primery odhalila přesnější asociace uvedených fragmentů s příslušnými fenotypy.



Obrázek 8: Amplifikace pomocí RAPD markeru (Cheng et al. 1996)

3.11.1 Rodina transkripčních faktorů MYB

Zbarvení slupky a dužniny jablek je způsobeno akumulací antokyanů a podmíněno především geneticky. Genetické studie zaměřené na danou problematiku odhalují významnou roli rodiny transkripčních faktorů MYB.

MYB je rozsáhlá rodina transkripčních faktorů (TF) mající důležité funkce v regulaci biosyntézy rostlinných sekundárních metabolitů. Mezi biologické procesy, na kterých se funkčně podílí MYB TF patří obranné a stresové reakce, diferenciace a funkce buněk, vývoj semen a květů, regulace primárního a sekundárního metabolismu. Charakteristickým znakem MYB TF jsou dobře zachovaná vazebná místa pro DNA, tzv. doménu MYB, a každý protein MYB obsahuje jedno, dvě, tři nebo čtyři opakování domén MYB. Na základě těchto opakujících se domén se dělí do různých tříd (Dubos et al. 2010).

První identifikovaný gen – C1 (Paz-Ares et al. 1987), kódující MYB, byl objeven v genomu kukuřice (*Zea spp.*), kde se podílí na biosyntetické dráze antokyanů v aleuronové vrstvě zrn. MYB TF jsou nalezeny ve *Chrysanthemum morifolium* (*CmMYB1*) (Zhu et al. 2013) a *Panicum virgatum* (*PvMYB4a*) (Shen et al. 2011), kde působí jako represory tvorby ligninu. U *Arabidopsis thaliana*, *AtMYB111*, *AtMYB12* a *AtMYB11* nezávislé na sobě řídí aktivaci řady genů určujících obsah flavonolů. U jablek geny *MdMYB3*, *MdMYBA* (*MdMYB1*) a *MdMYB10* (mimo jiné homologní formy jablečných MYB) řídí biosyntézu antokyanu ve slupce, dužnině a listech (Misra et al. 2010; Pandey et al. 2012; Pandey et al. 2014).

Geny *MdMYB10*, *MdMYBA* (*MdMYB1*) jsou homology transkripčních faktorů genů regulujících syntézu antokyanu u *Arabidopsis thaliana*. Největší podobnost vykazuje gen *AtMYB 113* (Jaakola, 2013). V databázi NCBI a v některých starších studiích transkripční faktory *MdMYB* mohou být uvedeny jako *myb-113 like*.

3.11.2 Gen pro transkripční faktor *MdMYB10* řídící červené zbarvení dužniny plodu jabloní

Espley et al. (2006) charakterizovali gen *MdMYB10*, který vykazoval výraznou expresi u jabloní s červenou dužninou a je sekvenčně podobný známým antokyanovým transkripčním faktorům. Měření úrovně exprese byla provedena na genotypech s červenou dužninou a na modifikované odrůdě 'Red Field'.

Chagné et al. (2007) identifikovali lokus *Rni*, který je hlavním genetickým faktorem pro červené olistění a zbarvení dužniny jablek a popsal kosegregace *MdMYB10*

s daným lokusem. Celkem mezi pět kandidátních genů, ve kterých byly objeveny polymorfismy, jenom *MdMYB10* měl mutace typu delece o délce 4 nukleotidů v intronové oblasti, který souvisel s červenou dužninou. K této sekvenci byl navržen PCR primer, který tvořil 786 bp dlouhý fragment, který ukázal 100 % kosegregaci s červenou dužninou u hybridních fenotypů.

3.11.3 Gen pro transkripční faktor *MdMYBA* řídící červené zbarvení slupky plodu jabloní

Ban et al. (2007) provedli izolaci a charakterizaci genu *MdMYBA*. Exprese *MdMYBA* je intenzivnější u kultivarů s červenou slupkou než u nečervených kultivarů, což ukazuje na specifickou regulaci tohoto TF v závislosti na genotypu a pletivu.

TF *MdMYBA* se specificky váže do promotorové oblasti genu pro enzym antokyanidin syntáza. Jeho exprese, stejně jako exprese antokyaninových biosyntetických genů, včetně *MdCHS*, *MdF3H*, *MdANS* a *MdUFGT*, je indukována UV-B zářením a sníženou teplotou (Ban et al. 2007).

Geny *MdMYB1* (Tako et al. 2006) a *MdMYBA* (Ban et al. 2007) byly objeveny přibližně ve stejnou dobu a další studia ukázala na to, že sekvence obou genů jsou naprosto identické. Navíc *MdMYBA* a *MdMYB10* sdílí 98 % sekvenční identity (Lin – Wang et al. 2010). Takže *MdMYBA* má vysokou podobnost s MYB transkripčními faktory popsanými u jiných plodin (Zimmermann et al. 2004).

Mapování *MdMYBA* ukazuje na jeho těsnou vazbu s markerem BC226 – STS (Cheng et al. 1996), který je asociován s červenou slupkou plodů jabloní. Vzdálenost mezi TF *MdMYBA* a markerem je 1,5 cM (1,7 % rekombinací). Společná lokalizace genu *MdMYB10* a *MdMYBA* ve vazebné skupině 9 je ukázkou, že tyto geny jsou alelické (Espley et al. 2007; Chagné et al. 2013). Telias et al. (2011) uvádí, že *MdMYBA* a *MdMYB1* jsou alely představující lokus *MdMYB10*. Podobnost genů z rodiny TF MYBA, ukazuje na to, že syntézu a akumulaci pigmentu v plodu regulují více genů, ale gen *MdMYBA* je klíčový zejména pro barvu slupky (Ban et al, 2007).

Charakterizace markeru *MdMYBA* provedena Ban et al. (2007) ukazuje na délkový polymorfismus mezi alelami *MdMYBA*. Elektroforetická analýza ampliconů vykazuje segregaci delšího fragmentu (723 bp) s červeným fenotypem a kratšího fragmentu (656 bp) s nečerveným, což naznačuje, že v genu *MdMYBA* došlo k deleci, která přispěla ke ztrátě jeho funkčnosti.

MdMYBA má nejméně 3 alely: *MdMYBA - 1*, *MdMYBA - 2* a *MdMYBA - 3*, kde alela *MdMYBA - 1* je jediná dominantní alela kontrolující syntézu antokyanu. Alely *MdMYBA - 2* a *MdMYBA - 3* v nečervených kultivarech demonstrují nízkou úroveň exprese i po ošetření UV – zářením a nízkými teplotami (Teliás et al. 2011).

V rámci dané diplomové práce je pro přehlednost používáno označení *MdMYBA* podle Ban et al. (2007).

Řada genetických studií poukazuje na vliv transponovatelných elementů v rostlinách na regulaci exprese transkripčních faktorů. Například retrotranspozony v genomu *Zea mays spp.* a tzv. bloody orange (*Citrus x sinensis*) mají vliv na geny zodpovědné za biosyntézu antokyanu a odolnost proti stresu vyvolanému nízkými teplotami (Ito, 2013).

3.11.4 Geny rodiny transkripčních faktorů MYB a jejich funkce v jiných rostlinách

Geny rodiny MYB jsou hojně zastoupeny v rostlinách a plní v různé regulační funkce.

Gen *AtMYB96* (*Arabidopsis thaliana*) indukuje odolnost vůči patogenům, je součástí signální dráhy ABA (Seo et al. 2009; Seo & Park, 2010) Geny *AtMYB15* a *AtMYB44* se podílejí na uzavírání průduchů listu, čímž se zlepšuje suchovzdornost rostliny (Jung et al. 2008; Ding et al. 2009).

Inhibice genu *GbMYB5* (*Gossypium barbadense*) naopak přispěla ke snížení suchovzdornosti sníženou aktivitou antioxidantních enzymů a sníženým obsahem prolinu. Nadměrná exprese téhož genu u tabáku dospěla k opačným výsledkům, navíc byla indukována exprese dalších genů (SOD, CAT, SAMDC) (Chen et al. 2015).

Rostliny s nadměrnou expresí genu *AtMYB20* vykazují lepší odolnost vůči solnému stresu. Řada MYB TF reaguje na indukci světelným, teplotním nebo osmotickým stresem (*AtMYB18*, *OsMYB4*) (Yang et al. 2009; Soltész et al. 2012). *Arabidopsis thaliana* obsahující gen *MdMYB10* z jabloně vykazuje lepší toleranci k osmotickému stresu (Guo et al., 2011).

3.12 Transponovatelné elementy

Transponovatelné elementy (transpozony, TE) jsou genetické sekvence, které mají schopnost přesouvat se v rámci genomu z jednoho místa na druhé. Transpozony hrají významnou roli v evoluci a adaptaci rostlinných genomů. Jsou jedním z hlavních zdrojů genetické variability rostlin (Lisch, 2013). Vyvolávají mutace a chromozomové přestavby, které mohou vést ke změně v úrovni exprese genů (zde TE mají role enchanceru nebo inhibitoru) a ke změně fenotypů. Transpozony tvoří významnou část

rostlinného genomu (> 80 % genomu kukuřice) (Schnable et al. 2009) a mají velký vliv na jeho strukturu a velikost (Mhiri et al. 2022).

3.12.1 Klasifikace DNA transpozónů a retrotranspozónů

Existují dvě hlavních třídy transpozónů. Třída I neboli retrotranspozony (RT) a třída II neboli DNA transpozony (Orozco-Arias et al. 2019):

Retrotranspozony (RT) jsou elementy, které využívají mechanismus "copy and paste" transpozice. Nejprve se transkribují DNA sekvence do RNA, která je poté zpětně přepsána z RNA do DNA a vložena na nové místo v genomu.

RT I. třídy vyžadují pro přepis z RNA do DNA enzym reverzní transkriptázu, kterou kódují sami nebo využívají enzym kódovaný jinými retrotranspozony, tzv. autonomní a neautonomní retrotranspozony. Proces transpozice je náchylný k chybám, tedy nově vytvořená kopie může obsahovat mutace, které ji inaktivují.

LTR retrotranspozony (LTR – RT) – mají dlouhé repetitivní sekvence na koncích (tzv. Long Terminal Repeat). LTR sekvence, lemující retrotranspozony, obvykle kódují enzymy reverzní transkriptázy a integrázy, které zprostředkují „copy and paste“ mechanismus (Orozco-Arias et al. 2019).

LTR – RT můžeme rozlišit na 2 skupiny na základě vnitřního uspořádání kódující domény: gypsy a copia (Gao et al. 2012):

Gypsy LTR – RT: Dlouhé kolem 10 kilobází, strukturně složitější, mají do pěti ORF, které kódují proteiny potřebné pro transpozici a také regulační oblasti, které řídí jejich aktivitu. Gypsy retrotranspozony se v genomu vyskytují také ve vysokém počtu kopií.

Copia LTR –RT: relativně krátké (asi 5 kilobází) a mají jednoduchou organizaci se dvěma otevřenými čtecími rámci (ORF), které kódují proteiny potřebné pro retrotranspozice. Mají také poměrně vysokou míru mutací a v genomu se obvykle vyskytují ve vysokém počtu kopií.

Non – LTR retrotranspozony – retrotranspozony, které nemají repetitivní sekvence na koncích. Rozlišují se LINE (dlouhé rozptýlené jaderné elementy) a SINE (krátké rozptýlené jaderné elementy).

DNA transpozony jsou elementy, které používají mechanismus transpozice "cut and paste". Pro svoje transpozice využívají enzym transponáza. DNA transpozony mohou kódovat vlastní transponázu nebo využívat transponázu produkovanou jiným DNA transpozónem, rozlišujeme autonomní a neautonomní DNA transpozony (Makałowski et al. 2019).

3.12.2 Vliv transpozónů na regulace rostlinných genů

Delece a inserce transpozónu vede ke strukturním změnám genomu rostlin, takové změny se týkají nejen nekódujících oblastí, ale i funkčních strukturních genů. Inserce TE v regulační oblasti genu nebo v samotném genu vede ke změně v jeho expresi. Transpozony mohou mít enchancerovou nebo inhibitorovou funkci. U rostlin často nastává změna fenotypů, když se transponovatelný element začlení do genu regulujícího syntézu i akumulaci pigmentu (Ramakrishnan et al. 2021).

První TE a jejich funkce v rostlinném genomu byly objeveny a popsány Barbarou McClintockovou v 50. letech 20. století, která sledovala nestabilní pigmentace kukuřičných zrn. McClintocková popsala dva transponovatelné elementy Ac (aktivátor) a Dc (disociátor), které svou transpozicí způsobují mozaikovitě zbarvení zrn a listů u kukuřice (McClintock, 1950).

U *Arabidopsis thaliana* retrotranspozón anotovaný jako ONSEN může ovlivňovat regulaci blízkých genů. Domény ONSEN jsou za normálních podmínek utlumeny, ale mohou být aktivovány stresem vyvolaným vysokými teplotami. ONSEN inserovaný do regulační oblasti genů vykazuje zvýšenou expresi v podmínkách tepelného stresu v porovnání s nemodifikovanou variantou (Ito et al. 2013).

V tzv. bloody orange (*Sinesis x citrus*), lokus Ruby, který kóduje transkripční faktor syntézy antokyanu MYB, obsahuje LTR – retrotranspozónovou inserci v regulační oblasti. Exprese Ruby je řízena promotorem, který se nachází uvnitř LTR – RT. Studie uvádí, že aktivace LTR – RT je způsobena reakcí na stres nízkými teplotami (Butelli et al. 2012).

V genomu *Malus domestica* byl objeven LTR – RT, který má enchancerovou aktivitu v upstreamové oblasti genu *MdMYBA*, anotovaný jako redTE. Jeho úloha spočívá ve zvyšování exprese genu a tím i syntézy pigmentu ve slupce (Zhang et al. 2019).

3.13 Mapování a charakterizace LTR retrotranspozónu – redTE Zhang et al. (2019)

V roce 2019 Zhang et al. provedli celogenomické sekvenování jabloně u odrůdy Hanfu a provedli analýzu její genetické struktury, čímž odhalili roli retrotranspozónu v syntéze a akumulaci pigmentů ve slupce plodu.

Porovnáním genomu Golden Delicious (GDDH13) a Hanfu (HFTH1) bylo objeveno celkem přes 30 tisíc mutací typu inserce/delece (indel) způsobených aktivitou

transponovatelných elementů. Analýza všech LTR – retrotranspozonů, které tvoří 75 % od všech transponovatelných elementů, objevila 7313 neporušených LTR – RT v HFTH1 (o průměrné délce 7868 bp). V genomu GDDH13 bylo nalezeno 62 % podobných LTR – RT (Zhang et al. 2019).

Přibližně 31 % z celkového množství LTR – RT v HFTH1 se vyznačuje specifickou TSD sekvencí z obou stran od LTR, která byla nalezená jenom v genomu odrůdy Hanfu. Jedna z dvou TSD sekvencí byla nalezena v GDDH13 na odpovídající pozici. Tato skutečnost naznačuje, že na tomto místě v genomu Golden Delicious mohlo dojít ke deleci jednoho LTR – RT s TSD a zbyl zde jen pozůstatek TSD sekvence (Zhang et al. 2019).

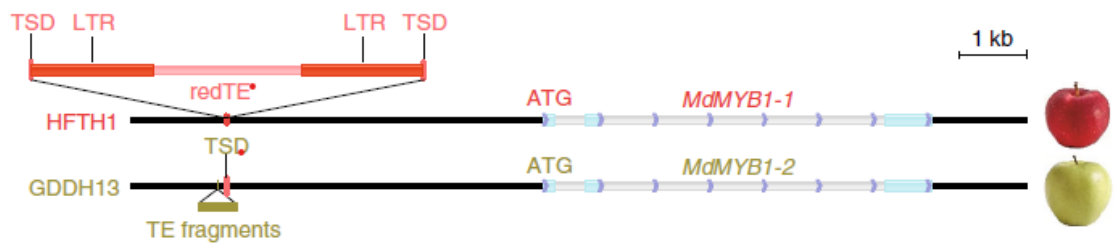
Tento specifický, pro HFTH1 genom, gypsy – like LTR – RT s dvěma TSD sekvencemi ('CATAT') je anotován Zhang et al. (2019) jako redTE, a nachází se v upstreamové oblasti genu *MdMYBA* a je asociován s červeným fenotypem slupky plodu jabloní.

Porovnání sekvence *MdMYBA* v obou genomech ukázalo na jeden SNP v intronové oblasti, patnáct SNP a pět indelů v upstreamu *MdMYBA*. V genomu HFTH1, ve vzdálenosti 3297 bp před ATG iniciačním kodonem genu *MdMYBA*, se nachází inserce dlouhá 4097 bp. Jedná se o redTE. Obě doprovodné LTR sekvence o velikosti 1274 bp jsou zcela identické, což může naznačovat na relativně nedávnou inserci (Zhang et al. 2019).

Celkem ze 3913 gypsy – like LTR retrotranspozonů nalezených v genomu HFTH1, jenom jeden měl 96 % podobnosti s redTE (anotovány jako redTE – like), ostatní byly podobné průměrně v 75 %. RedTE – like transpozon má více mutací v LTR sekvencích, které ukazují, že je starší než redTE. RedTE byl nalezen jenom v genomu HFTH1, a nikoliv v GDDH13. V genomu GDDH13 byla nalezena jedna 501 bp inserce, také v upstreamové oblasti genu *MdMYBA* (3394 bp od iniciačního kodonu ATG). Gen *MdMYBA* u GDDH13 se nachází na negativním vlákně, kde vznikla mutace typu chromozomové přestavby, která vedla ke ztrátě redTE (501 bp dlouhá inserce je pozůstatkem TSD sekvence a malé části redTE) (Zhang et al. 2019).

Specifické primery pro redTE navržené Zhang et al. (2019) ukázaly dokonalou segregaci s červeným fenotypem. Žádný redTE nebyl nalezen v kultivarech s nečervenou slupkou. Následná analýza 75 kříženců obou kultivarů Huayue (nečervených) a Honeycrisp (červených) dokazuje úplnou segregaci redTE s červeným fenotypem, která podporuje hypotézu o jediné dominantní mutaci ovlivňující fenotyp. Analýza odrůd s červenou dužninou na segregaci se specifickým redTE markerem, neukázala žádné výsledky, to naznačuje, že exprese genu *MdMYB10* na redTE není závislá.

Zhang et al. (2019) provedli transgenní přenos redTE do listů *Nicotiana benthamiana* pro ověření enhancerového účinku redTE na expresi genu tzv. firefly luciferase. Výsledky ukázaly na zvýšenou expresi genu luciferázy v porovnání s úrovní exprese s běžným promotorem tohoto genu.



Obrázek 9: Molekulární struktura alel MdMYB1-1 a MdMYB1-2 s doprovodnými sekvencemi. Místa inserce před alelami MdMYB1-1 a MdMYB1-2 jsou označena červeně (HFTTH1) a zlatožlutě (GDDH13). Místa inserce před alelami MdMYB1-1 a MdMYB1-2 jsou označena červeně (HFTTH1) a zlatožlutě (GDDH13) (Zhang et al. 2019)

4. Materiál a metody

4.1 Rostlinný materiál

4.1.1 Odrůdy jabloní

Pro analýzy bylo použito 49 odrůd jabloní se známou barvou slupky plodu. Jednalo se o stromy, které procházely ze VŠÚO Holovousy s.r.o. Pro extrakci DNA byly použité listové čepele mladých listů, které byly odebrány z polní výsadby v letních měsících.

4.1.2 Hybridní kombinace

Pro hodnocení segregace markerů byly použité 3 hybridní kombinace – potomstva záměrných křížení následujících odrůd: 'Herald' x 'Cumulus', 'Herald' x 'Kordona', 'Rubinola' x 'Kordona'. U každé hybridní kombinace bylo hodnoceno celkem 50 jedinců z náhodně vybraných semenáčků a byla vždy odebrána listová čepel, která byla použita pro izolaci DNA. Odběr listů byl proveden na začátku léta.

4.2 Extrakce genomické DNA a hodnocení kvality a kvantity DNA

Odebrané listy odrůd semenáčků byly umístěny do mobilního chladicího boxu a převezené do laboratoře. Z každého vzorku bylo odebráno 100 mg čerstvého biologického materiálu, který byl následně zmrazen v kapalném dusíku a do izolace byl uchováván při -80°C .

Pro extrakci DNA byl použit komerční kit DNeasy® Plant Mini Kit (QIAGEN). Před extrakcí byl rostlinný materiál homogenizován pomocí skleněné tyčinky do práškové formy. Pro extrakci byl použit nezměněný postup, který je přímo doporučen výrobcem kitu (QIAGEN). Izolovaná DNA byla rozpuštěna v 50 μl elučního pufru. Kvantita extrahované DNA byla hodnocena spektrofotometricky na přístroji NanoPhotometr (Implen). Pomocí tohoto přístroje byly hodnoceny poměry absorbancí A260/A280 a A260/A230, které slouží k posouzení potenciální kontaminace extrahované DNA různými organickými sloučeninami. Vzhledem k tomu, že cílem práce nebylo hodnocení variability výtěžnosti extrahované DNA, nebyla tato data následně statisticky vyhodnocována.

4.3 Detekce alelických variant genu *MdMYBA* podle Ban et al. (2007)

O schopnosti genotypu jabloní syntetizovat červené pigmenty ve slupce rozhoduje na prvním místě přítomnost deleční mutace v genu *MdMYBA*, kterou popsali Ban et al. (2007). Pro amplifikaci byla použita dvojice primerů, *MdMYBA* F (5'-ATTCTAGGTGTCTTTCTGGAGTGTA-3') *MdMYBA* R (5'-AGGTCCAATTTCCGTACAATG-3'), kterou popsali výše uvedení autoři. Velikost amplikonů u nemutovaných genotypů s červenou barvou slupky byla 723 bp. Velikost amplikonů u mutované alely typické pro genotypy se žlutou barvou byla 656 bp. Pro detekci inzerčně – delečního polymorfismu *MdMYBA* byl použit postup uvedený v certifikované metodice (Vávra et al. 2015).

Podmínky PCR amplifikace:

Složení reakční směsi (12,5 µl) pro primerový pár *MdMYBA*-F/R: 50 ng genomové DNA; 0,7 U *Taq* polymerázy (Thermo Fisher Scientific); BSA 0,5 µg/12,5 µl; 10 mM Tris-HCl (pH 8,8); 50 mM KCl; 0,08 % Nonidet P40; 1,5 mM MgCl₂; 200 µM dNTP; 0,4 µM každého z primerů; 4 mM tetramethylamonium oxálat (Top Bio). Teplotní a časový průběh PCR: 1. cyklus počáteční denaturace 95 °C/3 min, následuje 35 cyklů (denaturace 94 °C/30 s, annealing 63,5 °C/50 s, extenze 72 °C/50 s), závěrečná extenze 72 °C/10 min. Amplifikované PCR produkty byly separovány v 1,5 % agarózovém gelu v 1xTBE pufru po dobu 90 minut. Produkty PCR byly vizualizovány ethidium bromidem (Vávra et al. 2015).

4.3.1 Ověření sekvenční specifity amplikonů genu *MdMYBA* pomocí Sangerovy sekvenace

Byly vybrány 2 odrůdy se žlutou barvou slupky ('Rezista', 'Otava'), a dvě s červenou barvou slupky ('Topaz' a 'Karmína'). Na základě předchozího metodického postupu bylo zjištěno, že odrůdy s červenou barvou jsou v homozygotní sestavě s oběma nemutovanými alelami, a naopak obě žlutoplodé odrůdy nesou obě mutované alely. U těchto čtyř odrůd byly získány PCR amplikony, které byly separované ve 2 % agarózovém gelu v 1xTBE pufru po dobu 90 minut, při napětí 120 V. Amplikony byly vizualizovány pomocí ethidium bromidu na agarózovém gelu. Následně byly, pomocí skalpelu, vyříznuty bločky s požadovaným amplikonem. Z agarózových bloček byly vyzolovány PCR fragmenty pomocí kitu GeneJET Gel extraction kit (Thermo Fisher Scientific). Při extrakci byl dodržen postup doporučený výrobcem kitu. Na závěr byly vzorky rozpuštěny v 20 µl ddPCR H₂O (pH 8,0). Eluovaná DNA byla kvantifikována spektrofotometricky na přístroji NanoPhotometr (Implen). Sekvenace byla u každého amplikonu provedena vždy podle F i R primerů. Pro Sangerovu sekvenaci byla použita služba firmy Eurofins Genomics (eurofinsgenomics.eu) a složení sekvenační reakce je

popsáno na internetových stránkách (eurofinsgenomics.eu). Vlastní sekvenace byla provedena pomocí genetického analyzáru ABI Prism 3730XL. Získaná hrubá sekvenační data byla následně zpracovaná v programu Bioedit 7.2 (www.nucleics.com).

4.4 Detekce retrotranspozonu redTE podle Zhang et al. (2019)

Další genetický faktor rozhodující o intenzitě červené barvy ve slupce plodů jabloní, respektive o intenzitě exprese výše uvedeného genu *MdMYBA*, je přítomnost retrotranspozonu s enchancerovou aktivitou, který Zhang et al. (2019) označili jako redTE.

4.4.1 Bionformatická analýza enchanceru redTE

V databázi NCBI (National Center for Biotechnology Information) byly vybrány dva referenční genotypy, respektive jejich celogenomická sekvence. Jednalo se o červenoplodý genotyp 'Hanfu' (ASM411538v1). Tento genotyp ve své práci použili Zhang et al. (2019). Druhým genotypem byl dihaploid odrůdy 'Golden Delicious' (ASM211411v1) se žlutou barvou plodu. U obou referenčních genotypů byla identifikována pozice transkripčního faktoru *MdMYBA*, který se nachází na 9. chromozomu. Byla identifikována pozice exonu a intronu a v exonu 1 byl nalezen start kodon AUG. U obou referenčních genotypů byla vybrána oblast nacházející se před start kodonem. U genotypu 'Hanfu' byla identifikována pozice obou LTR sekvencí a vlastní redTE enchancer. Tato sekvence s retrotranspozonem u genotypu 'Hanfu' byla pomocí programu BioEdit porovnaná se sekvencí předcházející start kodon AUG u odrůdy 'Golden Delicious'.

4.4.2 Identifikace pozice primerů navržených Zhang et al. (2019)

Pomocí programu BioEdit byla provedena identifikace primerového páru, který podle Zhang et al. (2019) amplifikoval 750 bp fragment u červenoplodého genotypu 'Hanfu', a primerového páru amplifikujících podle Zhang et al. (2019) 501 bp ampikon u odrůdy 'Golden Delicious'. Specifita obou výše uvedených párů primerů podle Zhang et al. (2019) byla *in silico* ověřena podle aplikace Primer – Blast, která je součástí online dostupné aplikace Blast (blast.ncbi.nlm.nih.gov). Pro vyhodnocení specifity byly použity jako referenční genotypy celogenomické sekvence, které používali rovněž Zhang et al. (2019).

4.4.3 Optimalizace amplifikace specifických markerů navržených Zhang et al. (2019)

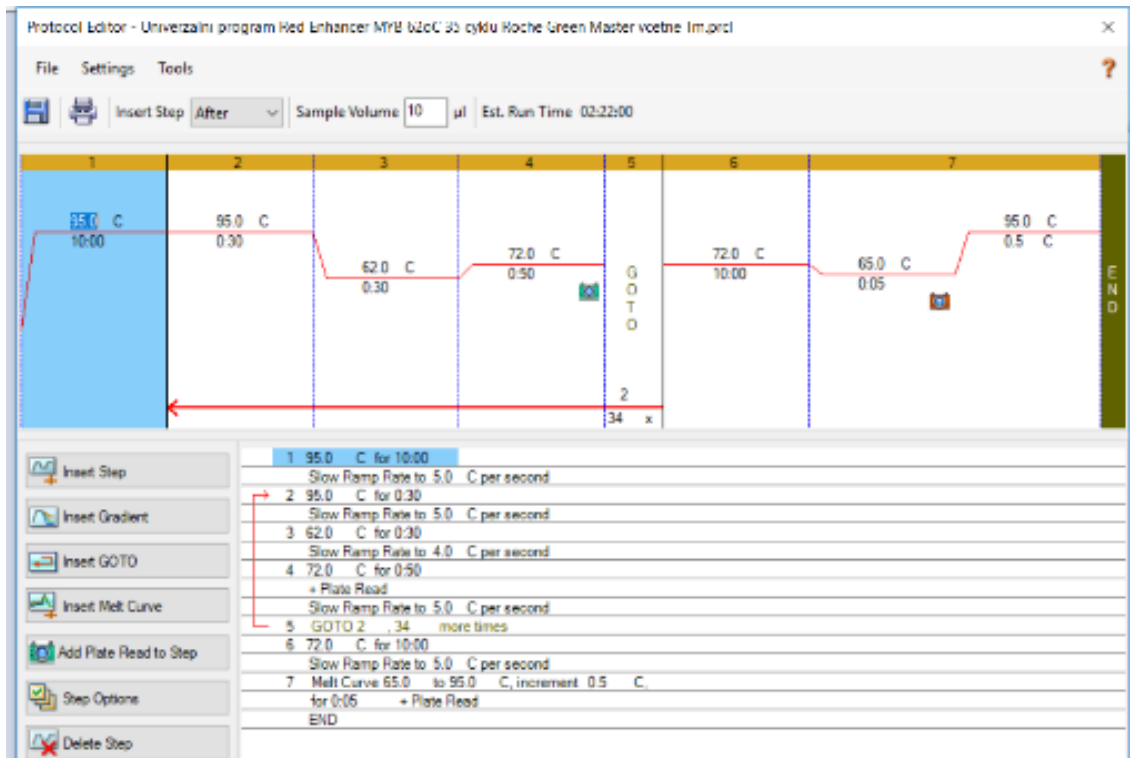
Pro amplifikaci 750 bp fragmentu u červenoplodých genotypů byly použité následující primery – F1 (5'-GGTCACCCAACCCACACTGGGCCTTG-3') a R1 (5'-CGGCCGCAATCGCAAGACGCAGA-3'), navržené Zhang et al. (2019). U žlutoplodých genotypů byly pro získání 501 bp fragmentu použité primery – F2 (5'-GGATACATGCACTATTGATGCGCT-3') a R2 (5'-GGGAGTGTGATATCCGACAGTGTGTCT-3'), navržené Zhang et al. 2019. Vzhledem k tomu, že Zhang et al. (2019) neuvádějí žádné informace o podmínkách amplifikace, byla provedena optimalizace annelační teploty pomocí gradientové PCR. Pro oba primerové páry bylo použito následující složení: 20 ng genomické DNA ve 10 µl reakci, 500 nM F primer a 500 nM R primer. Pro amplifikace byl použit amplifikační kit FastStart Essential DNA Green Master (Roche). Vlastní amplifikace probíhala v termocykleru CFX Connect™ (BioRad). Amplifikační program a teplotní gradient je uvedený na následujícím obrázku (obrázek 10). Získané amplikony byly separované v 1,5 % agarózovém gelu při napětí 120 V po dobu 120 minut. Fragments byly vizualizované pomocí ethidium bromidu. Pro archivaci elektroforeogramů byl použit dokumentační systém Quantity One 1–D Analysis Software (BioRad).

4.4.4 Navržení nového PCR markeru pro detekci redTE

Vzhledem k tomu, že výše uvedené markery, publikované Zhang et al. (2019) nevykazovaly patřičnou specifitu, bylo přistoupeno k návržení vlastního PCR markeru. Pro návržení markeru se vycházelo z hypotézy, že v genomu červenoplodých jablek ('Hanfu') i žlutoplodých jablek ('Golden Delicious') se budou nacházet sekvence identické oblasti vhodné pro umístění F a R primerů, které budou amplifikovat PCR produkt s variabilní délkou v závislosti na barvě slupky. Pro tyto účely byla použita data výše popsané bioinformatické analýzy. Pomocí funkce Primer – Blast (blast.ncbi.nlm.nih.gov) byla navržena dvojice primerů MalMYB s následujícími sekvencemi MalMYB F4 (5'-CCCAAATTTGAAACGGGAGCTT-3') MalMYB R4 (5'-CATTGCCTGCTGAAAGTACGATGA-3').

Dle výsledků bioinformatické analýzy byla předpokládána velikost amplikonů u červenoplodých odrůd ('Hanfu') 288 bp a u žlutoplodých odrůd ('Golden Delicious') 788 bp. Pro amplifikaci nově navrženého markeru byl použit rovněž amplifikační kit FastStart Essential DNA Green Master (Roche) a reakční směs o objemu 10 µl obsahovala 20 ng genomické DNA, koncentrace primerů MalMYB F4 a MalMYB R4 byla 500 nM. Pro amplifikace byl použit rovněž termocykler CFX Connect™ (BioRad). Volba optimální annelační teploty byla provedena pomocí gradientu, který je uveden na obrázku 10. Jako optimální byla zvolena annelační teplota 62 °C. Získané amplikony byly separované v 2 % agarózovém gelu v 1xTBE pufru, po dobu 90 minut při napětí 120 V. PCR amplikony

byly vizualizované pomocí ethidium bromidu a digitalizovány pomocí systému Quantity One 1–D Analysis Software (BioRad).



Obrázek 10: Optimalizace annelační teploty pomocí gradientové PCR (CFX Maestro; BioRad)

4.4.5 Optimalizace protokolu pro amplifikaci nově navrženého markeru MalMYB

Prvním stupněm pro hodnocení specifičnosti byla tzv. melting analýza, která je součástí postamplifikačního programu. Výsledek melting analýzy je znázorněn křivkou (obrázky 24 a 25), která je součástí výstupu programu CFX Maestro (BioRad). Druhým stupněm ověření specifičnosti bylo vyhodnocení velikosti amplikonů v agaróзовé elektroforéze. Poslední a nejpřesnější způsob vyhodnocení specifičnosti byla sekvenační analýza. Pro sekvenační analýzu byl použit sekvenační protokol popsáný v kapitole 4.3.1.

4.4.6 Vyhodnocení segregace nově navrženého markeru MalMYB

Nově navržený kodominantní marker (primerový pár MalMYB F4 R4), byl amplifikován u všech hybridních kombinací ('Herald' x 'Cumulus', 'Herald' x 'Kordona', 'Rubinola' x 'Kordona'). Původní nemutovaná alela s funkčním redTE (288 bp) byla označena písmenem W (wild) a mutovaná (788 bp), typická pro žlutoplodé odrůdy, byla označena M (mutation). Jelikož rodičovské odrůdy výše uvedených hybridních

kombinací byly tímto markerem genotypizovány, byly určeny teoreticky očekávané štěpné poměry, které byly porovnány se skutečnými štěpnými poměry alelických kombinací navrženého markeru. Pro porovnání byl použit neparametrický Personův χ^2 test a program Statistica 12 (Statsoft).

5. Výsledky

5.1 Hodnocení fenotypů barvy slupky u kolekce modelových odrůd a u hybridních kombinací

Vzhledem k tomu, že listové čepele byly odebírány v letních měsících, kdy se hodnocené odrůdy nacházely ve fázi růstu a vybarvování plodů, nebylo možné hodnotit fenotyp ve výsadbách VŠÚO Holovousy s.r.o. Proto pro popis odrůd byly použité literární prameny. Popis zbarvení slupky je prezentován v kapitole 3.5. Tento popis považuji za přesnější, protože v literárních pramenech je uvedena standardní barva slupky typická pro dané odrůdy, zatímco literární prameny současně uvádějí vliv vnějších podmínek (sluneční záření, teplota) na intenzitu vybarvení a na typický poměr mezi červenou a žlutou barvou slupky. U semenáčku třech hodnocených hybridních kombinací nebylo možné provést hodnocení barvy, protože se jednalo o rostliny staré několik měsíců.

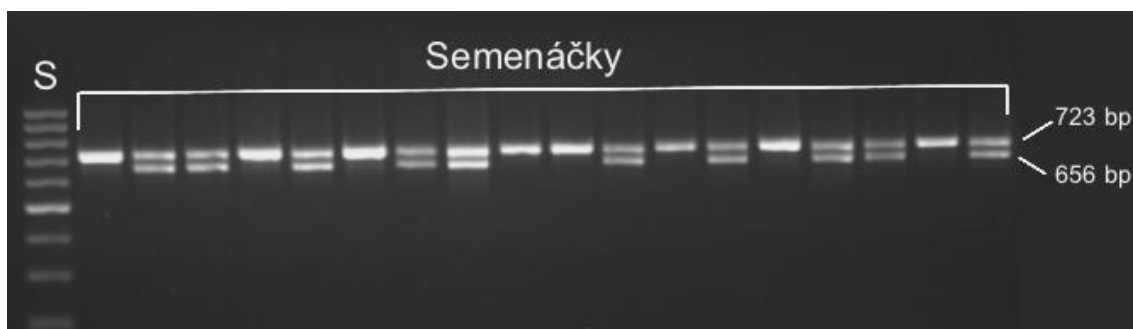
5.2 Hodnocení kvality a kvantity izolované genomické DNA

V metodické části diplomové práce jsem uvedla, že cílem experimentu nebyla optimalizace izolace DNA, přesto považují za vhodné ve výsledkové části uvést, že extrahovaná DNA dosahovala výtěžnosti i čistoty, které jsou vhodné pro PCR analýzu. Průměrná výtěžnost genomické DNA získané z jednoho gramu čerstvé hmoty listové čepele byla 47 µg DNA. Variační koeficient byl roven 5,3 %. Průměrná hodnota poměru absorbance A260/A280 dosáhla hodnoty 1,97 a variační koeficient byl roven 6,3 %. Průměrná hodnota poměru absorbance A260/A230 byla rovna 2,08, variační koeficient byl roven 5,7 %. Oba poměry absorbance svědčí o vysoké čistotě extrahované DNA, respektive o minimálně kontaminaci organickými sloučeninami.

5.3 Výsledky identifikace alelických variant genu *MdMYBA* podle Ban et al. (2007)

Na základě výsledků uvedených v certifikované metodice Vávra et al. (2015), jsem předpokládala, že použitá dvojice primerů bude schopna detekovat inzerčně – deleční polymorfismus. Jinými slovy, u kolekce hodnocených odrůd se budou vyskytovat dvě alelické varianty, kterým odpovídají PCR produkty o velikosti 723 bp a 656 bp. Tento předpoklad byl potvrzen skutečně u všech hodnocených odrůd. U semenáčku hybridních kombinací byly zjištěny pouze dva PCR produkty s výše uvedenými velikostmi. Tento výsledek je dokumentován na obrázku 11, který znázorňuje segregaci použitého markeru v hybridní kombinaci 'Herald' x 'Cumulus'. Vzhledem k tomu, že evolučně původní alela (723 bp) neobsahovala delece, budu tuto alelu v diplomové

práci označovat písmenem W (wild) a mutovanou (656 bp) alelu s delecí budu označovat M (mutation). Pro heterozygoty budu používat označení W/M.



Obrázek 11: Semenáčky z křížení odrůd 'Herald' x 'Cumulus'. S – velikostní standard (GeneRuler 100bp DNA Ladder; Thermo Fisher Scientific)

5.3.1 Genotypizace kolekce odrůd pomocí markeru podle Ban et al. (2007)

V následující tabulce (Tabulka 1: Odrůdy) je uveden přehled odrůd a přehled detekovaných alelických kombinací markeru genu *MdMYBA* podle Ban et al. (2007). Z této tabulky je patrné, že z celkového počtu 49 odrůd bylo detekováno 41 odrůd s alelickou kombinací W/W, 2 odrůdy s kombinací M/M a 6 s kombinací W/M.

Jediné dvě odrůdy, které vykazovaly homozygotní sestavu mutovaných alel byly 'Otava' a 'Rezista', pro které je charakteristická žlutá barva a které mají v obou případech oranžové líčko. U ostatních odrůd, které nesly aspoň jednu nemutovanou alelu, se předpokládalo, že budou mít funkční gen *MdMYBA* a budou vytvářet červené zbarvení. Jedinou výjimkou je odrůda 'Bohemia Gold', která je typická žlutou barvou, ale její genotyp odpovídá nemutovanému homozygotovi. Příčina této výjimky bude diskutována v kapitole diskuse.

Tabulka 1: Odrůdy

Odrůda	Markery		Barva slupky
	MdMYBA	redTE	
Angold	W/W	W/W	žlutozelená, červené líčko
Blaník	W/W	W/W	růžová, červené překrytí
Bohemia Gold	W/W	W/W	zelenožlutá bez rzivosti
Braeburn	W/W	W/W	zelená, oranžové překrytí
Clijo	W/W	W/W	zelenožlutá, červené žíhání
Cumulus	W/W	W/W	žlutozelená, červené překrytí
Discovery	W/W	W/W	žlutá, červené líčko
Florina	W/W	W/W	zelená, fialové překrytí
Frosta	W/W	W/W	žlutá, červené skvrny
Fuji	W/W	W/W	zelenožlutá, červené líčko
Gala	W/W	W/W	žlutá, červené překrytí
Gloster	W/W	W/W	zelenožlutá, tmavé fialové překrytí
Golden Delicious	W/M	M/M	zelenožlutá, růžové líčko
Golida	W/W	W/W	žlutozelená, červené překrytí
Herald	W/M	W/M	žlutozelená, červené překrytí
Idared	W/W	W/W	žlutozelená, karmínové překrytí
Jarka	W/W	W/W	žlutá, červené páskování
Julie	W/W	W/W	zelená, červené páskování
Karmína	W/W	W/W	zelenožlutá, karmínové mramorování
King Jonagold	W/M	W/M	zelenožlutá, červené překrytí
Klára	W/W	W/W	žlutá, červené překrytí
Kordona	W/W	W/W	zelenožlutá, červené líčko
Lady Silvia	W/W	W/W	žlutozelená, červené překrytí
Melodie	W/W	W/W	žlutá, červené překrytí
Melrose	W/W	W/W	žlutozelená, hnědočervené překrytí
Meteor	W/W	W/W	červená až purpurová
Miodar	W/W	W/W	zelená, růžové líčko
Ontario	W/W	W/W	zelená, červené líčko
Ontario Red	W/W	W/W	zelená, červené líčko
Orion	W/M	M/M	zelenožlutá, oranžové líčko
Otava	M/M	M/M	žlutozelená, oranžové překrytí
Primadela	W/W	W/W	zelenožlutá, červené žíhání
Produkta	W/M	M/M	zelenožlutá, červené líčko
Rezista	M/M	M/M	zelenožlutá, světlé oranžové líčko
Rosana	W/W	W/W	zelenožlutá, červené líčko
Rubens	W/W	W/W	žlutá, oranžové překrytí

Rubimeg	W/W	W/W	zelená, červené žíhání
Rubín	W/W	W/W	zelenožlutá, červené líčko
Rubinola	W/W	W/W	zelenožlutá, červené páskování
Rubinstep	W/W	W/W	žlutá, oranžové překrytí, červené žíhání
Rucla	W/W	W/W	zelenožlutá, purpurové překrytí
Šampion	W/M	W/M	zelenožlutá, oranžové líčko
Selena	W/W	W/W	zelenožlutá, oranžové překrytí, červené líčko
Spartan	W/W	W/W	zelenožlutá, tmavé červené překrytí
Topaz	W/W	W/W	žlutá, oranžové mramorování
Vanda	W/W	M/M	zelenožlutá, červené mramorování
Vysočina	W/W	W/W	zelená, purpurové žíhání
Zuzana	W/W	W/W	zelenožlutá, oranžové až červené žíhání

5.3.2 Sekvenování genu *MdMYBA*

Z obrázku 11 je patrné, že na základě porovnání s velikostním standardem přibližná velikost amplikonů je 723 bp a 656 bp. Je to jasný důkaz, že dvojice primerů, navržených Ban et al. (2007), specificky amplifikuje část genu *MdMYBA*. Pro ověření bylo provedeno Sangerovo sekvenování u dvou odrůd se žlutou barvou slupky 'Otava' a 'Rezista' a u dvou odrůd s červenou barvou slupky 'Topaz' a 'Karmína'. Na následujícím obrázku (obrázek 14) jsou uvedeny získané konsensus sekvence, které byly vyhodnoceny v programu BioEdit. Tento obrázek znázorňuje vzájemné porovnání těchto sekvencí, ze kterého je patrná sekvence s delecí.

5.3.3 Porovnání sekvence markeru *MdMYBA* podle Ban et al. (2007) s databází NCBI

Pro sekvenační analýzy byly použity dvě žlutoplodé odrůdy ('Otava' a 'Rezista') a dvě červenoplodé ('Topaz' a 'Karmína'). U všech čtyř odrůd byly získány konsensus sekvence. Počty nukleotidů jednotlivých amplikonů plně souhlasily s výsledky, které publikoval Ban et al. (2007). Bylo zjištěno, že obě červenoplodé odrůdy mají zcela identickou sekvenci markerů a stejně jako žlutoplodé odrůdy jsou zcela shodné. Získané sekvence byly porovnány s NCBI databází. Porovnání bylo provedeno vždy pro žlutoplodé a červenoplodé odrůdy. Výsledky porovnání jsou uvedeny na obrázcích 12 a 13. Z obrázku je patrné, že sekvence u obou červenoplodých odrůd vykazovala 100 % homologii s publikovanou sekvencí části genu *MdMYBA* u červenoplodých odrůd jako jsou 'Rall's' a 'Royal Gala'.

Sekvence markeru u žlutoplodých odrůd 'Otava' a 'Rezista' vykazovaly rovněž vysokou míru podobnosti se sekvencemi publikovanými NCBI databází (více než 99 %).

NIH National Library of Medicine
National Center for Biotechnology Information

BLAST® » blastn suite » results for RID-2D415BR0013

Home Recent Results Saved Strategies Help

[Edit Search](#) Save Search Search Summary [How to read this report?](#) [BLAST Help Videos](#) [Back to Traditional Results Page](#)

ⓘ Your search is limited to records that include: *Malus domestica* (taxid:3750)

Job Title Karmina Topaz
 RID 2D415BR0013 Search expires on 04-01 15:47 pm [Download All](#) **▼**
 Program BLASTN [Citation](#) **▼**
 Database nt [See details](#) **▼**
 Query ID Icl|Query_73463
 Description None
 Molecule type dna
 Query Length 727
 Other reports [Distance tree of results](#) [MSA viewer](#) **?**

Filter Results

Organism only top 20 will appear exclude
 Type common name, binomial, taxid or group name
 + [Add organism](#)

Percent Identity to E value to Query Coverage to
[Filter](#) [Reset](#)

Descriptions Graphic Summary Alignments Taxonomy

Sequences producing significant alignments Download **▼** Select columns **▼** Show 100 **▼** **?**

select all 33 sequences selected [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#) [MSA Viewer](#)

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Malus domestica genome assembly, chromosome_9	Malus domestica	1343	2053	100%	0.0	100.00%	35819836	OU744999.1
<input checked="" type="checkbox"/> Malus domestica genome assembly, chromosome_9	Malus domestica	1343	2053	100%	0.0	100.00%	35912611	OU744961.1
<input checked="" type="checkbox"/> Malus domestica genome assembly, chromosome_9	Malus domestica	1343	2053	100%	0.0	100.00%	36124330	OU744550.1
<input checked="" type="checkbox"/> Malus x domestica cultivar Ralls MYB1 transcription factor gene, complete cds	Malus domestica	1343	1343	100%	0.0	100.00%	7242	HQ259417.2
<input checked="" type="checkbox"/> Malus x domestica cultivar Royal Gala MYB10 (MYB10) gene, promoter region and complete cds	Malus domestica	1343	1343	100%	0.0	100.00%	7147	EU518249.2
<input checked="" type="checkbox"/> Malus x domestica MYB transcription factor (MYB1) gene, MYB1-2 allele, promoter region and com...	Malus domestica	1343	1343	100%	0.0	100.00%	6245	DQ886415.1
<input checked="" type="checkbox"/> Malus x domestica MYB transcription factor (MYB1) gene, MYB1-1 allele, promoter region and com...	Malus domestica	1343	1343	100%	0.0	100.00%	6246	DQ886414.1
<input checked="" type="checkbox"/> Malus domestica genome assembly, chromosome_9	Malus domestica	824	2038	100%	0.0	98.50%	37073583	OU696685.1
<input checked="" type="checkbox"/> Malus x domestica MYB transcription factor (MYB1) gene, MYB1-3 allele, promoter region and com...	Malus domestica	737	1160	91%	0.0	97.69%	6176	DQ886416.1
<input checked="" type="checkbox"/> PREDICTED: Malus domestica transcription factor MYB113-like (LOC103421948), transcript variant ...	Malus domestica	381	633	47%	3e-103	100.00%	1199	XM_029107484.1
<input checked="" type="checkbox"/> PREDICTED: Malus domestica transcription factor MYB113-like (LOC103421948), transcript variant ...	Malus domestica	374	626	46%	4e-101	100.00%	1195	XM_029107483.1

Obrazek 12: Porovnání sekvence čevenoplodých odrůd 'Topaz' a 'Karmína' s databází NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

NIH National Library of Medicine
National Center for Biotechnology Information

BLAST® » blastn suite » results for RID-2D4HZWB0013

Home Recent Results Saved Strategies Help

[Edit Search](#) Save Search Search Summary How to read this report? BLAST Help Videos Back to Traditional Results Page

Your search is limited to records that include: Malus domestica (taxid:3750)

Job Title Rezista Otava

RID 2D4HZWB0013 Search expires on 04-01 15:56 pm [Download All](#)

Program BLASTN Citation

Database nt See details

Query ID lcl|Query_30645

Description None

Molecule type dna

Query Length 656

Other reports [Distance tree of results](#) [MSA viewer](#)

Filter Results

Organism only top 20 will appear exclude

Type common name, binomial, taxid or group name

[Add organism](#)

Percent Identity E value Query Coverage

to to to

[Filter](#) [Reset](#)

Descriptions Graphic Summary Alignments Taxonomy

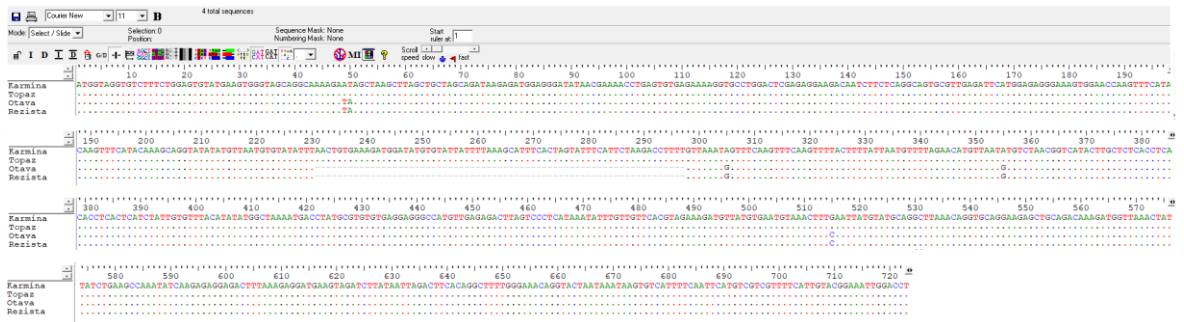
Sequences producing significant alignments Download Select columns Show 100

select all 33 sequences selected [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#) [MSA Viewer](#)

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Malus x domestica MYB transcription factor (MYB1) gene, MYB1-3 allele, promoter region and com...	Malus domestica	1166	1166	99%	0.0	98.93%	6176	DQ886416.1
<input checked="" type="checkbox"/> Malus domestica genome assembly, chromosome: 9	Malus domestica	776	1862	99%	0.0	99.30%	35819836	OU744999.1
<input checked="" type="checkbox"/> Malus domestica genome assembly, chromosome: 9	Malus domestica	776	1862	99%	0.0	99.30%	35912611	OU744961.1
<input checked="" type="checkbox"/> Malus domestica genome assembly, chromosome: 9	Malus domestica	776	1862	99%	0.0	99.30%	36124330	OU744550.1
<input checked="" type="checkbox"/> Malus x domestica cultivar Ralls MYB1 transcription factor gene, complete cds	Malus domestica	776	1184	99%	0.0	99.30%	7242	HQ259417.2
<input checked="" type="checkbox"/> Malus x domestica cultivar Royal Gala MYB10 (MYB10) gene, promoter region and complete cds	Malus domestica	776	1184	99%	0.0	99.30%	7147	EU518249.2
<input checked="" type="checkbox"/> Malus x domestica MYB transcription factor (MYB1) gene, MYB1-2 allele, promoter region and com...	Malus domestica	776	1184	99%	0.0	99.30%	6245	DQ886415.1
<input checked="" type="checkbox"/> Malus x domestica MYB transcription factor (MYB1) gene, MYB1-1 allele, promoter region and com...	Malus domestica	776	1184	99%	0.0	99.30%	6246	DQ886414.1
<input checked="" type="checkbox"/> Malus domestica genome assembly, chromosome: 9	Malus domestica	492	1881	99%	1e-136	99.63%	37073583	OU896685.1

Obrazek 13: Porovnání sekvence žlutoplodých odrůd 'Otava' a 'Rezista' s databází NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

Důkaz toho, že rozdíl mezi alelou W (červenoplodé odrůdy) a alelou M (žlutoplodé odrůdy) je způsoben delecí, vyplývá i z porovnání sekvencí markerů u odrůd 'Otava', 'Rezista', 'Topaz' a 'Karmína', který je uveden na obrázku 14. Z tohoto obrázku je patrná nejen delece o velikosti 67 bp, ale i 4 SNP, kterými se dané žlutoplodé a červenoplodé odrůdy liší.



Obrázek 14: Porovnání oskenovaných červenoplodých a žlutoplodých odrůd vůči sobě (BioEdit)

5.4 Výsledky detekce retrotranspozonu redTE podle Zhang et al. (2019)

5.4.1 Výsledky ověření specifiity nasedání primerů navržených Zhang et al. (2019)

Specifita nasedání primerových páru F1 R1 a F2 R2, které jsou detailně popsané v kapitole 4.4.3, byla ověřena pomocí volně dostupného online nástroje Primer – Blast (blast.ncbi.nlm.nih.gov). Vzhledem k tomu, že Zhang et al. (2019) ve své práci uváděl referenční genotypy, pro navržení primerů a ostatní analýzy, byla použita dihaploidní odrůda ‘Golden Delicious’ (ASM211411v1) a červenoplodá odrůda ‘Hanfu’ (ASM411538v1). Tyto 2 genotypy jsem zvolila jako referenční a pomocí výše uvedeného programu jsem predikovala, kde tyto primerové páry nasedají. Z práce Zhang et al. (2019) vyplývá, že dvojice primerů F1 R1 by měla nasedat pouze u červenoplodého genotypu (ASM411538v1) a naopak dvojice F2 R2 by měla nasedat u žlutoplodého ‘Golden Delicious’ (ASM211411v1). Výsledky této *in silico* analýzy dokumentují následující obrázky (obrázek 15 a 16 (a, b)).

Primer pair 1

	Sequence (5'→3')
Forward primer	GGTCACCCAACCCACACTGGGCCTTG
Reverse primer	CGGCCGCAATCGCAAGACGCAGA

Products on target templates

>CM014057.1 Malus domestica cultivar HFTH1 chromosome 9, whole genome shotgun sequence

product length = 750

Forward primer	1	GGTCACCCAACCCACACTGGGCCTTG	26
Template	31758376	31758351

Reverse primer	1	CGGCCGCAATCGCAAGACGCAGA	23
Template	31757627	31757649

>CM014061.1 Malus domestica cultivar HFTH1 chromosome 13, whole genome shotgun sequence

product length = 930

Reverse primer	1	CGGCCGCAATCGCAAGACGCAGA	23
Template	33861794	33861772

Reverse primer	1	CGGCCGCAATCGCAAGACGCAGA	23
Template	33860865	33860887

product length = 509

Reverse primer	1	CGGCCGCAATCGCAAGACGCAGA	23
Template	5942263T.....A....	5942241

Reverse primer	1	CGGCCGCAATCGCAAGACGCAGA	23
Template	5941755A....	5941777

>CM014063.1 Malus domestica cultivar HFTH1 chromosome 15, whole genome shotgun sequence

product length = 614

Reverse primer	1	CGGCCGCAATCGCAAGACGCAGA	23
Template	2636240	2636218

Reverse primer	1	CGGCCGCAATCGCAAGACGCAGA	23
Template	2635627	2635649

Obrázek 15: Ověření specifiity nasedání dvojice primerů F1 R1 u odrůdy Hanfu podle Zhang et al. (2019) v databázi NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

Z obrázku 15 vyplývá, že dvojice primerů navržená Zhang et al. (2019) F1 R1 má skutečně u genotypu 'Hanfu' amplifikovat produkt 750 bp. Nicméně *in silico* analýza ukázala, že tato dvojice primerů nasedá i na dalších místech, a tudíž tato dvojice primerů bude poskytovat nespecifické amplikony.

```

Primer pair 1
-----
Sequence (5'->3')
Forward primer      GGTCAACCAACCCACACTGGGCCTTG
Reverse primer     CGGCCGCAATCGCAAGACGCAGA

Products on target templates
>NC_041801.1 Malus domestica cultivar Golden Delicious isolate X9273 #13 chromosome 13, ASM211411v1

product length = 930
Features flanking this product:
  7934 bp at 5' side: zinc finger protein constans-like 5-like
  243712 bp at 3' side: (r)-mandelonitrile lyase 3-like

Reverse primer 1      CGGCCGCAATCGCAAGACGCAGA  23
Template          34105843 ..... 34105821

Reverse primer 1      CGGCCGCAATCGCAAGACGCAGA  23
Template          34104914 ..... 34104936

>NC_041805.1 Malus domestica cultivar Golden Delicious isolate X9273 #13 chromosome 17, ASM211411v1

product length = 823
Features flanking this product:
  25510 bp at 5' side: uncharacterized protein loc103426221
  15933 bp at 3' side: probable acyl-activating enzyme 6

Reverse primer 1      CGGCCGCAATCGCAAGACGCAGA  23
Template          33545427 ..... 33545405

Reverse primer 1      CGGCCGCAATCGCAAGACGCAGA  23
Template          33544605 ..... 33544627

>NC_041790.1 Malus domestica cultivar Golden Delicious isolate X9273 #13 chromosome 2, ASM211411v1

product length = 759
Features flanking this product:
  53412 bp at 5' side: low quality protein: disease resistance protein rpp4-like
  2465 bp at 3' side: uncharacterized protein loc114822620

Reverse primer 1      CGGCCGCAATCGCAAGACGCAGA  23
Template          4452526 T.....A. 4452504

Reverse primer 1      CGGCCGCAATCGCAAGACGCAGA  23
Template          4451768 ..... 4451790

```

Obrázek 16 (a): Ověření specifiity nasedání dvojice primerů F1 R1 u odrůdy 'Golden Delicious' podle Zhang et al. (2019) v databázi NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

>NC_041804.1 Malus domestica cultivar Golden Delicious isolate X9273 #13 chromosome 16, ASM211411v1

product length = 564
Features flanking this product:
3816 bp at 5' side: folate synthesis bifunctional protein, mitochondrial-like
21869 bp at 3' side: uncharacterized protein loc103426541

```
Reverse primer 1 CGGCCGCAATCGCAAGACGCAGA 23
Template 38289625 .....C.....T... 38289603

Reverse primer 1 CGGCCGCAATCGCAAGACGCAGA 23
Template 38289062 ..... 38289084
```

>NC_041795.1 Malus domestica cultivar Golden Delicious isolate X9273 #13 chromosome 7, ASM211411v1

product length = 611
Features flanking this product:
12014 bp at 5' side: cysteine-rich receptor-like protein kinase 10
13732 bp at 3' side: cysteine-rich receptor-like protein kinase 10

```
Reverse primer 1 CGGCCGCAATCGCAAGACGCAGA 23
Template 1293650 T...T.....T..... 1293628

Reverse primer 1 CGGCCGCAATCGCAAGACGCAGA 23
Template 1293040 .....T..A..A.... 1293062
```

Obrázek 16 (b): Pokračování ověření specifity nasedání dvojice primerů F1 R1 u odrůdy 'Golden Delicious' podle Zhang et al. (2019) v databázi NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

Z obrázku 16 (a, b) je patrné, že dvojice primerů F1 R1 nasedá i na 'Golden Delicious' a vytváří větší počet amplikonů. Tento výsledek je v rozporu s předpoklady Zhang et al. (2019), kteří uvádějí, že primery F1 R1 jsou specifické pro červenoplodé.

Podle Zhang et al. (2019) by se dvojice primerů F2 R2 neměla hybridizovat u červenoplodé odrůdy 'Hanfu', přesto *in silico* analýza poukázala, že primery F2 R2 tvoří amplikon velký 60 bp (obrázek 17).

Primer pair 1

	Sequence (5'->3')
Forward primer	GGATACATGCACTATTGATGCGCT
Reverse primer	GGGAGTGTGATATCCGACAGTGTGTCT
Products on target templates	
>CM014057.1 Malus domestica cultivar HFTH1 chromosome 9, whole genome shotgun sequence	
product length = 61	
Forward primer	1 GGATACATGCACTATTGATGCGCT 24
Template	31757942C 31757919
Reverse primer	1 GGGAGTGTGATATCCGACAGTGTGTCT 27
Template	31757882 31757908

Obrázek 17: Ověření specifity nasedání dvojice primerů F2 R2 u odrůdy 'Hanfu' podle Zhang et al. (2019) v databázi NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

Další výrazný rozpor ze závěry Zhang et al. (2019) je patrný z obrázku 18, kde F2 R2 dvojice primerů měla poskytovat 501 bp velký produkt. Avšak podle *in silico* analýzy F2 R2 primery u 'Golden Delicious' nenacházejí adekvátní místo pro hybridizaci.

Input PCR template: none
Specificity of primers: No target templates were found in selected database: Malus domestica ASM211411v1 [GCF_002114115.1] chromosomes plus unplaced and unlocalized scaffolds
Other reports: > Search Summary

— Detailed primer reports

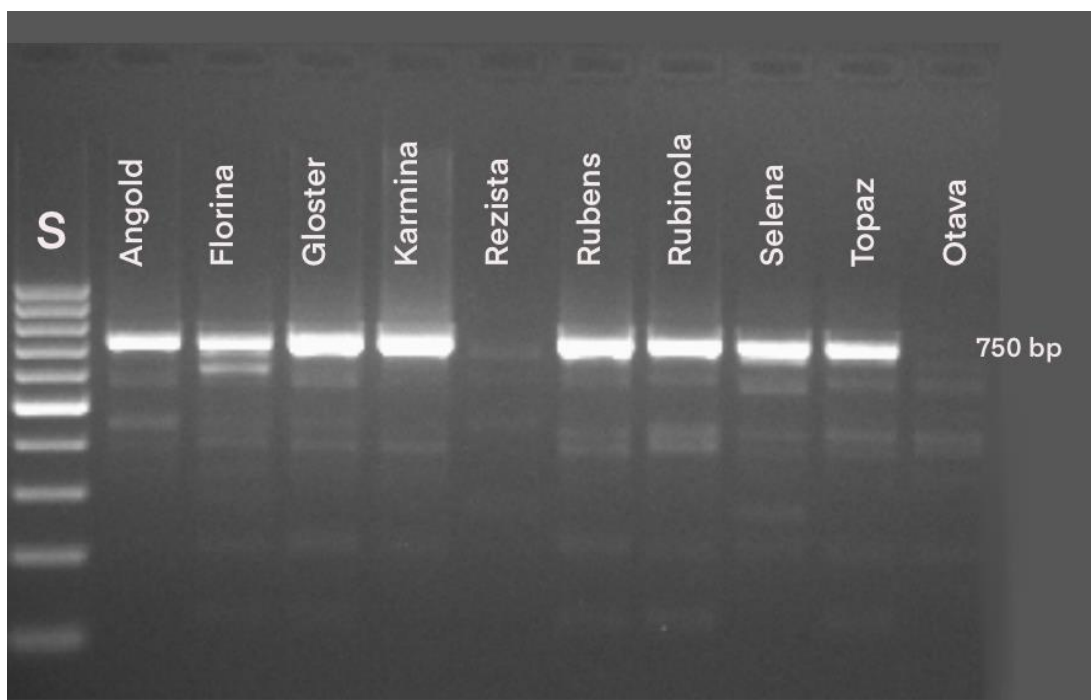
Primer pair 1						
	Sequence (5'->3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GGATACATGCACTATTGATGCGCT	24	61.63	45.83	6.00	2.00
Reverse primer	GGGAGTGTGATATCCGACAGTGTGTCT	27	65.66	51.85	6.00	3.00

Obrázek 18: Ověření specifity nasedání dvojice primeru F2 R2 u odrůdy 'Golden Delicious' podle Zhang et al. (2019) v databázi NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

5.4.2 Výsledky optimalizace specifických primerů redTE podle Zhang et al. (2019)

Hlavním cílem optimalizace bylo určení optimální teploty, která měla vést k amplifikaci specifických fragmentů, které uvádějí Zhang et al. (2019) a které jsem blíže charakterizovala v kapitole 5.4.1.

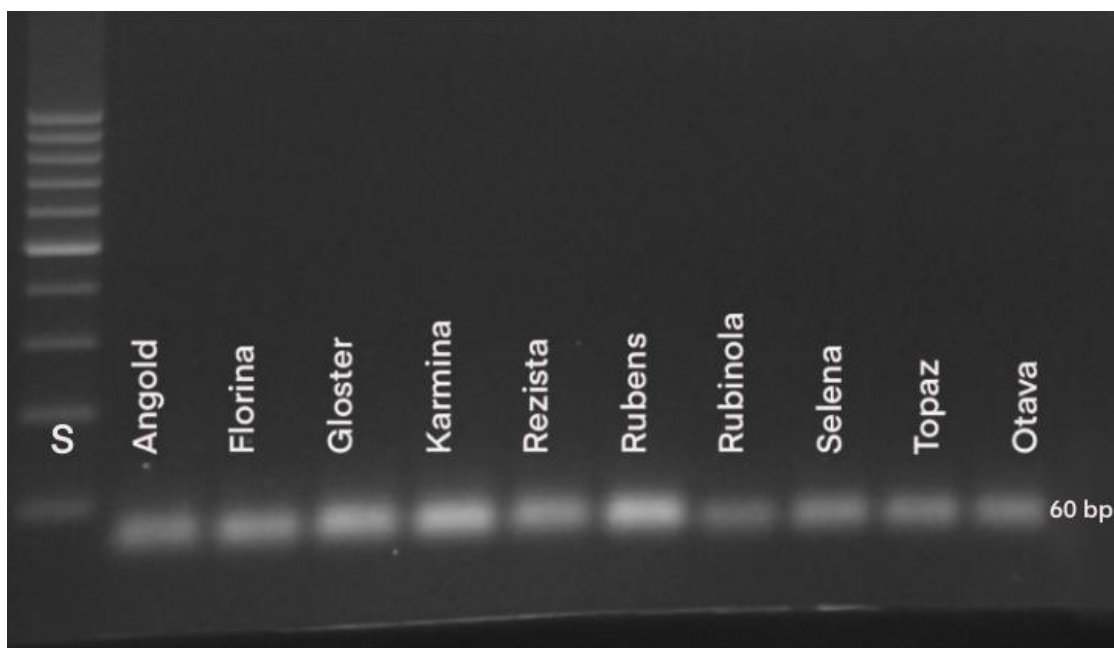
Pomocí gradientové PCR byla vybrána jako annelační teplota 62 °C, a to proto, že při této teplotě červenoplodé odrůdy amplifikovaly intenzivně 750 bp a u žlutoplodých odrůd byla intenzita amplifikace nespecifických fragmentů nejnižší. Tento výsledek optimalizace je uvedený na obrázku 19.



Obrázek 19: Optimalizace amplifikace primerů F1 R1 podle Zhang et al. (2019). S – velikostní standard (GeneRuler 100bp DNA Ladder; Thermo Fisher Scientific)

Na obrázku 20 je vidět neúspěšný výsledek optimalizace F2 R2 primerů podle Zhang et al. (2019) *In silico* analýza specifičnosti primerů F2 R2 znázorněná na obrázku 17 předpokládá, že F2 R2 dvojice primerů by měla poskytovat amplikon o velikosti 60 bp; tento produkt je patrný i z obrázku 20.

In silico analýza nasedání primerů F2 R2 u ‘Golden Delicious’ předpokládá, že tyto primery u žlutoplodých odrůd nebudou amplifikovat 501 bp velký fragment, který uvádějí Zhang et al. (2019). Výsledek *in silico* analýzy byl potvrzen i experimentálně, na obrázku 20 jsou znázorněny dvě žlutoplodé odrůdy (‘Otava’ a ‘Rezista’), u kterých k amplifikaci produktu 501 bp nedochází.



Obrázek 20: Optimalizace amplifikace primerů F2 R2 podle Zhang et al. (2019). S – velikostní standard (GeneRuler 100bp DNA Ladder; Thermo Fisher Scientific)

5.4.3 Výsledky návržení nového markeru MalMYB

Z předchozích kapitol je jednoznačně patrné, že dvě primerové dvojice (F1 R1 a F2 R2) navržené Zhang et al. (2019) není možné úspěšně použít pro detekci polymorfismu redTE enchanceru, a to zejména z těchto důvodů:

- i. Dvojice primerů F1 R1 amplifikují i u žlutoplodých odrůd, jedná se o nespecifické amplifikace, které mohou znesnadňovat genotypizace.
- ii. Dalším důvodem je situace týkající se primerů F2 R2, které u žlutoplodých odrůd nevytvářejí požadovaný PCR produkt o velikost 501 bp.

Z těchto důvodů bylo provedeno návržení vlastního markeru, který představuje primerový pár MalMYB F4 R4 (uveden na obrázku 21), který bude amplifikovat odlišně velké fragmenty u červenoplodých a žlutoplodých odrůd. *In silico* analýza specifity nově navrženého primeru je uvedena na následujících obrázcích, stejně jako v případě primerů Zhang et al. (2019) jsem zvolila jako referenční genotyp 'Hanfu' a 'Golden Delicious' (ASM411538v1, ASM211411v1).

Primer pair 1

	Sequence (5'->3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	CCCAAAATTTGAAACGGGAGCTT	23	60.49	43.48	7.00	2.00
Reverse primer	CATTGCCTGCTGAAAGTACGATGA	24	61.68	45.83	4.00	2.00

Products on target templates

>CM014057.1 Malus domestica cultivar HFTH1 chromosome 9, whole genome shotgun sequence

product length = 288

Forward primer	1	CCCAAAATTTGAAACGGGAGCTT	23
Template	31758127	31758105
Reverse primer	1	CATTGCCTGCTGAAAGTACGATGA	24
Template	31757840	31757863

Obrázek 21: Ověření specifity nasedání primerů MalMYB F4 R4 u genotypu 'Hanfu' (ASM411538v1) v databázi NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

Primer pair 1

	Sequence (5'->3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	CCCAAAATTTGAAACGGGAGCTT	23	60.49	43.48	7.00	2.00
Reverse primer	CATTGCCTGCTGAAAGTACGATGA	24	61.68	45.83	4.00	2.00

Products on target templates

>NC_041797.1 Malus domestica cultivar Golden Delicious isolate X9273 #13 chromosome 9, ASM211411v1

product length = 788

Features flanking this product:

47697 bp at 5' side: utp--glucose-1-phosphate uridylyltransferase
3321 bp at 3' side: transcription factor myb113-like

Forward primer	1	CCCAAAATTTGAAACGGGAGCTT	23
Template	35611375	35611397
Reverse primer	1	CATTGCCTGCTGAAAGTACGATGA	24
Template	35612162	35612139

Obrázek 22: Ověření specifity nasedání primerů MalMYB F4 R4 u genotypu 'Golden Delicious' (ASM211411v1) v databázi NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

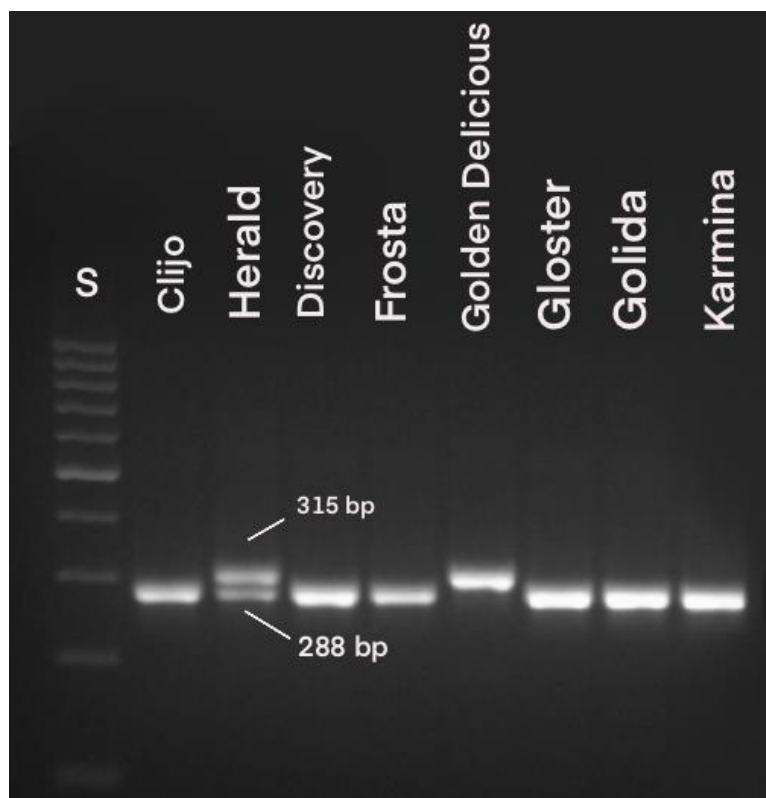
Z těchto obrázků vyplývá, že navržená dvojice primerů F4 R4 u červenoplodých odrůd by měla amplifikovat pouze jeden ampikon o velikosti 288 bp, u žlutoplodých odrůd 788 bp.

Z obrázků 22 je patrné, že navržená dvojice primerů nasedá v oblasti 3321 bp před genem *MdMYBA* TF (myb-113 like). Tento výsledek je shodný se Zhang et al. (2019).

5.4.4 Výsledný optimalizovaný protokol pro amplifikaci nově navrženého markeru MalMYB

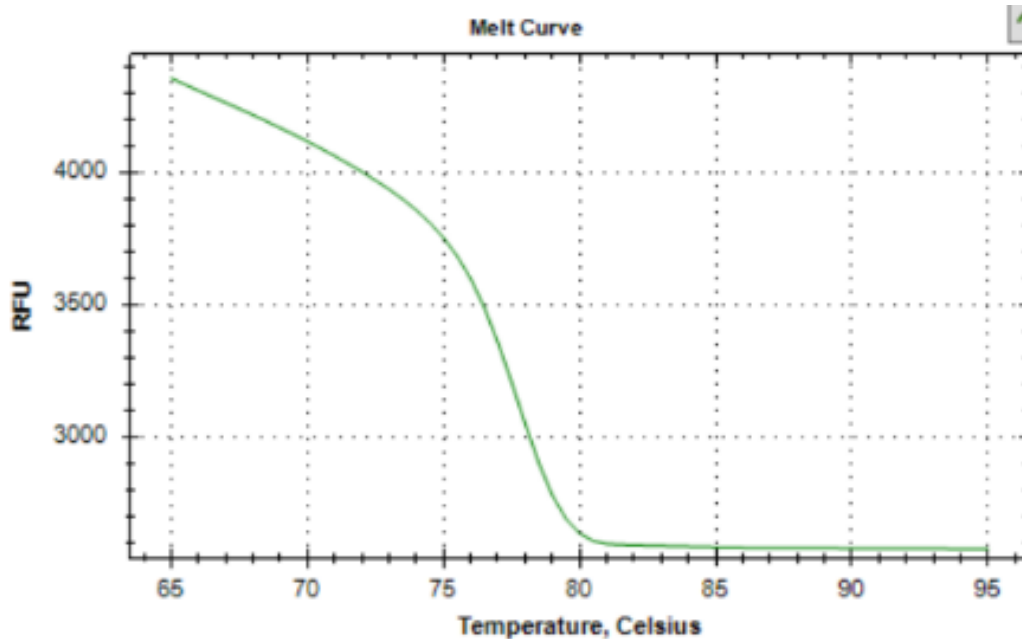
Pro dvojici primeru F4 R4 byla pomocí gradientové PCR stanovena optimální annelační teplota 62°C. Složení reakce i teplotní a časový profil byl stejný jako profil optimalizovaný pro primerové dvojice F1 R1, F2 R2 podle Zhang et al. (2019) (obrázek číslo 10).

Výsledky amplifikace jsou prezentované na elektroforeogramu 23.

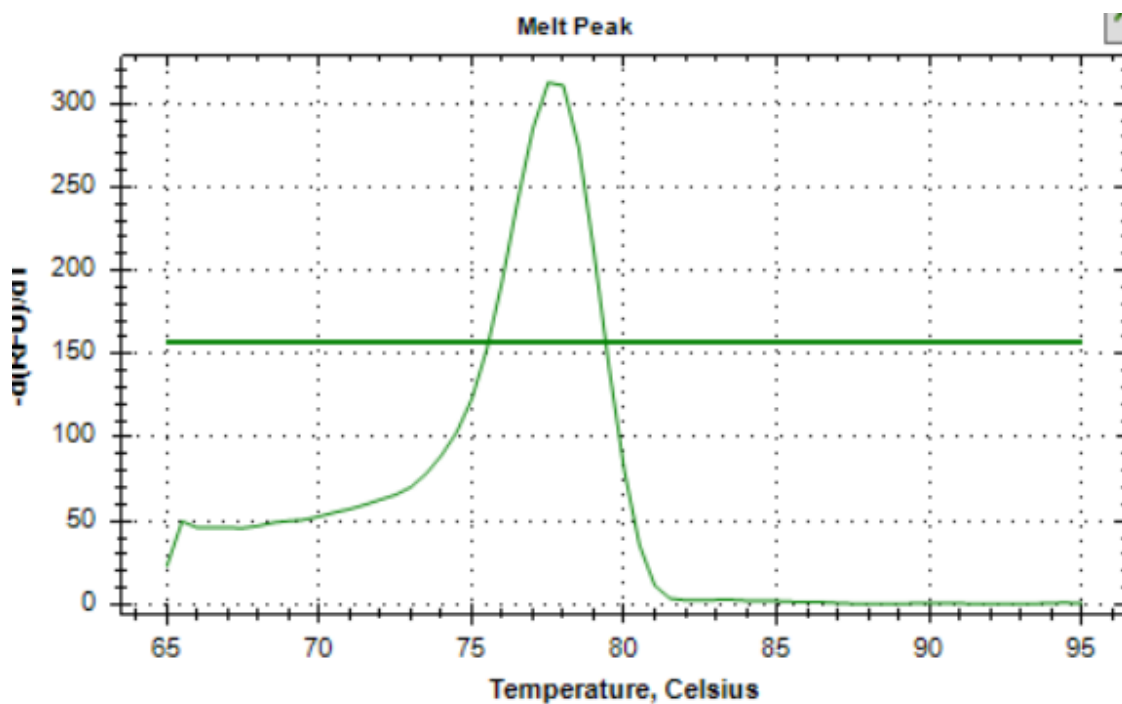


Obrázek 23: Elektroforeogram znázorňuje amplikony, které tvoří dvojice primerů MalMYB F4 R4. S – velikostní standard (GeneRuler 100bp DNA Ladder; Thermo Fisher Scientific)

Z výše uvedeného obrázku je patrné, že nově navržená dvojice primerů poskytovala pouze dva amplikony, které se lišily svojí velikostí. Na základě porovnání získaných ampliconů s velikostním standardem bylo odhadnuto, že kratší amplicon odpovídá velikosti 288 bp, tato velikost by měla představovat část funkčního redTE enchanceru vyskytujícího se u odrůd s červenou barvou slupky. Tento amplicon je označen jako alela W a z výše uvedeného obrázku 23 a z tabulky 1, kde je prezentovaná genotypizace všech odrůd je patrné, že tato W alela je charakteristická pro červenoplodé odrůdy. Jedinou výjimkou je odrůda ‘Bohemia Gold’, která je žlutoplodá a současně u ní dochází k amplifikaci alel typických pro červenoplodé. *In silico* bioinformatická analýza prezentovaná obrázkem 22 předpokládala, že u žlutoplodých odrůd (‘Golden Delicious’) by amplicon tvořený primery F4 R4 měl být velký 788 bp. Z výše uvedeného elektroforeogramu je patrné, že amplicon žlutoplodých odrůd má větší velikost, než amplicon červenoplodých odrůd (288 bp), ale zcela jistě jeho velikost neodpovídá 788 bp. Specifičnost amplifikace nově navrženého páru byla ověřena melting analýzou. Na následujících obrázcích (24 a 25) je zobrazena amplifikační křivka znázorňující melting analýzu a melting peak představující jeden jasný symetrický pík charakterizující specifickou amplifikaci – syntézu jednoho produktu.



Obrázek 24: Amplifikační křivky RT – PCR, melting analýza (CFX Maestro; BioRad)



Obrázek 25: Amplifikační křivky RT – PCR, melting peak (CFX Maestro; BioRad)

5.4.5 Výsledky sekvenační analýzy nově navrženého markeru

Z bioinformatické analýzy vyplynulo, že navržená dvojice primerů by měla u červenoplodých odrůd vytvářet produkt o velikosti 288 bp. Velikost tohoto produktu byla orientačně ověřena elektroforetickou separací (obrázek 23). Rovněž sekvenační analýza potvrdila, že u obou hodnocených odrůd ('Karmína' a 'Topaz') byl produkt skutečně velký 288 bp. Tyto dvě červenoplodé odrůdy se vzájemně sekvencí nelišily. Získané sekvence červenoplodých odrůd jsou na obrázku 26 označeny jako 'Query' tato sekvence byla porovnaná s údaji v NCBI databázi a vykazovala 100 % identitu s referenční sekvencí červenoplodých genotypů 'Hanfu'. Sekvence genotypu 'Hanfu' je na obrázku označena jako 'Sbjct'.

Malus domestica cultivar HFTH1 chromosome 9, whole genome shotgun sequence

Sequence ID: [CM014057.1](#) Length: 34800404 Number of Matches: 1

Range 1: 31757840 to 31758127 [GenBank](#) [Graphics](#)

[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
532 bits(288)	6e-150	288/288(100%)	0/288(0%)	Plus/Minus
Query 1		CCCCAAAATTTGAAACGGGAGCTTAAGAATTTTTACTCTGAATTAATgaaaaagtacaaa		60
Sbjct 31758127		CCCCAAAATTTGAAACGGGAGCTTAAGAATTTTTACTCTGAATTAATGAAAAAGTACAAA		31758068
Query 61		tatagtGTAAGGATGCTCATTACTAACAGTGCATGGTCCACTTTTTGGACAATGGTTA		120
Sbjct 31758067		TATAGTGTAAAGGATGCTCATTACTAACAGTGCATGGTCCACTTTTTGGACAATGGTTA		31758008
Query 121		TCTGTCATATTATTCAATTTTCTTCTACATAAATATTTATTGtacgataaataaataaaa		180
Sbjct 31758007		TCTGTCATATTATTCAATTTTCTTCTACATAAATATTTATTGTACGATAAATAAATAAAA		31757948
Query 181		ttgtagGATACATGCACTATTGATGCCCTTACATATAAGACACACTGTCGGATATCAC		240
Sbjct 31757947		TTGTAGGATACATGCACTATTGATGCCCTTACATATAAGACACACTGTCGGATATCAC		31757888
Query 241		ACTCCCTTCTCTTCTAGTCCTACTCATCGTACTTTTCAGCAGGCAATG		288
Sbjct 31757887		ACTCCCTTCTCTTCTAGTCCTACTCATCGTACTTTTCAGCAGGCAATG		31757840

Obrázek 26: Porovnání odrůd 'Karmína' a 'Topaz' s referenční odrůdou 'Hanfu' (ASM411538v1) v databázi NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

Dvojice primerů F4 R4 by podle bioinformatické analýzy měla u žlutoplodých odrůd ('Golden Delicious') vytvářet produkt o velikosti 788 bp, elektroforetická analýza ale ukázala jiný výsledek. Amplikon u žlutoplodých odrůd vykazoval přibližnou velikost 315 bp, tento výsledek byl potvrzen rovněž sekvenační analýzou. Nebyla sekvenována odrůda 'Golden Delicious' procházejících z VŠÚO Holovousy s.r.o., ale dvě odlišné žlutoplodé odrůdy, u kterých nebyly doposud publikovány žádné genomické sekvence ('Rezista' a 'Otava'). U těchto dvou žlutoplodých odrůd bylo na základě sekvenace zjištěno, že amplikon je velký 315 bp. Obě žlutoplodé odrůdy měly zcela identickou sekvenci tohoto markeru. Tyto výsledky jsou patrné z obrázku 27, kde je sekvence markeru F4 R4 u odrůd 'Rezista' a 'Otava' porovnaná s referenční sekvencí žlutoplodé

odrůdy 'Golden Delicious', která by dle databáze NCBI měla skutečně poskytovat amplicon o velikosti 788 bp. Z porovnání sekvencí vyplývá, že rozdíly mezi zjištěnými sekvencemi u odrůd 'Rezista' a 'Otava' jsou způsobeny inzercí o velikosti 27 bp v genomu odrůd 'Rezista' a 'Otava'. Dále byla nalezena delece o velikosti 500 bp v ampliconech odrůd 'Rezista' a 'Otava'. Poslední rozdíly jsou způsobeny třemi SNP, kterými se liší odrůdy 'Rezista' a 'Otava' od referenčního genotypu 'Golden Delicious'. Odrůda 'Golden Delicious' z VŠÚO Holovousy s.r.o., která byla analyzována v rámci diplomové práce, sice nebyla sekvenována, ale na základě elektroforetické separace byl u této odrůdy detekován amplicon o velikosti 315 bp. Proto lze vyslovit domněnku, že sekvence ampliconů mnou hodnocené odrůdy 'Golden Delicious' bude stejná nebo velice podobná jako sekvence u odrůdy 'Golden Delicious' (ASM211411v1) dostupné v databázi NCBI. Příčiny zjištěných rozdílů budou diskutované v kapitole diskuse.



Obrázek 27: Porovnání odrůd 'Rezista' a 'Otava' s referenčním genotypem 'Golden Delicious' (ASM211411v1) (BioEdit)

5.4.6 Výsledky segregace nově navrženého markeru MalMYB

V dané diplomové práci byly úspěšně optimalizovány a navrženy dva markery pro detekce polymorfismu typu inserce-delece. První z markerů byl lokalizovaný přímo v genu pro TF *MdMYBA*, druhý z markerů charakterizoval variabilitu redTE enchanceru. Z hlediska klasické genetiky je možné oba markery charakterizovat mendelistickou dědičností. Oba markery jsou kodominantní, to znamená, že na základě elektroforetické separace jsme schopni odlišit všechny alelické kombinace (W/W, M/M, W/M). Pro ověření segregace těchto markerů byly vybrány hybridní kombinace.

První představovala potomstvo z křížení odrůd 'Rubinola' x 'Kordona', obě odrůdy jsou z pohledu obou hodnocených markerů W/W, jinými slovy současně předpokládáme, že potomstvo nebylo ovlivněno cizím pylem a jednotlivé semenáčky by měly mít genotyp W/W u obou hodnocených markerů. Tento výsledek byl skutečně potvrzen a potomstvo bylo u použitých genetických markerů uniformní.

Druhá hybridní kombinace vznikla křížením 'Herald', která je heterozygot (W/M) z hlediska obou markerů. Druhým partnerem pro křížení byla odrůda 'Cumulus', která

je v obou markerech W/W homozygot. Z hlediska klasické genetiky se v potomstvu předpokládá výskyt 50 % potomků s genotypem W/M a 50 % s W/W. Tento předpoklad platil pro oba hodnocené markery. Celkem bylo analyzováno 50 potomků a u markeru *MdMYBA* bylo zjištěno 27 potomků s genotypem W/M a 23 potomků s genotypem W/W. Hodnota X^2 byla rovna 0,16 a hodnota $p=0,6889$ (hladina významnosti $\alpha=0,05$). U markeru F4 R4 bylo zjištěno 22 potomků s genotypem W/M a 28 potomků s genotypem W/W. Hodnota X^2 byla rovna 0,36, hodnota $p=0,5478$ (hladina významnosti $\alpha=0,05$). Z výsledků statistické analýzy je patrné, že skutečně získané štěpné poměry je možné považovat u obou markerů za shodné s teoretickým mendelistickým štěpným poměrem.

Poslední hybridní kombinace představovala potomstvo vzniklé křížením odrůd 'Herald' (W/M) a 'Kordona' (W/W). Z hlediska klasické genetiky i v tomto případě by měli potomci štěpit v poměru 1:1. U markeru *MdMYBA* bylo získáno 26 potomků s W/M a 24 s W/W. Hodnota X^2 byla rovna 0,04, hodnota $p=0,8415$. U markeru F4 R4 bylo získáno 29 potomků s genotypem W/M a 21 s genotypem W/W. Hodnota X^2 byla rovna 0,64, $p=0,4222$ (hladina významnosti $\alpha=0,05$). Z výsledků neparametrického X^2 testu vyplynulo, že i u této hybridní kombinace je možné získané štěpné poměry obou markerů považovat za shodné s teoretickým mendelistickým štěpným poměrem.

6. Diskuse

6.1 Význam molekulárních markerů ve šlechtění jabloní

Pro řešení diplomové práce bylo vybráno 49 odrůd z VŠÚO Holovousy s.r.o., z toho je 45 odrůd s červenou barvou slupky. Nejžádanější jsou jablka s celoplošným červeným překrytím a s jasným červeným líčkem nebo žiháním. Červená jablka jsou vnímána jako vizuálně atraktivnější. Červená barva slupky je asociována se zralostí ovoce, sladkou chutí a šťavnatější dužinou, a to nejen u jablek, ale také u různého exotického ovoce (Boyer, 2004; Prokop a Fančvičová, 2012). Proto se domnívám, že potvrdit genetický mechanismus tvorby červeného pigmentu ve slupkách jablek je velice důležité, a to nejen z hlediska molekulární genetiky, ale zejména z praktických šlechtitelských důvodů. Šlechtitelé v současné době využívají při selekci velice často různé typy molekulárních markerů. Některé z těchto markerů jsou založené na existenci genové vazby mezi přítomností markeru a alelickou variantou genu, který mnohdy není znám na sekvenční úrovni. Ve své diplomové práci jsem ale použila odlišné typy markerů, které jsou založené na hledání přesně definovaných změn nukleotidů v původních a mutovaných alelách. U markeru *MdMYBA* se jedná o inzerčně – deleční polymorfismus (Ban et al. 2007). U markeru *redTE* (Zhang et al. 2019) se jedná o změnu sekvence způsobenou retrotranspozicí. Z těchto důvodů považuji nově navržené markery za vysoce spolehlivé a přesné. Alelické varianty jsem jasně doložila sekvenační analýzou. Vzhledem k tomu, že se nejedná o vazebné markery, zde neexistuje žádné riziko vzniku rekombinací mezi přítomností markerů a fenotypovým projevem. Domnívám se, že tyto typy markerů šlechtitelé preferují právě z důvodu jejich vysoké spolehlivosti.

Vývoj a použití molekulárních markerů, které by zajišťovaly rychlou a relativně levnou selekci jabloní v ranných vývojových stádiích, je důležitou součástí šlechtitelského procesu. Vzhledem k tomu, že v různých částech světa se vyskytují unikátní kultivary jabloní s odlišnými genotypy, ne každý navržený marker pro konkrétní vlastnost bude úplně specifický pro každou existující odrůdu. Svou diplomovou práci jsem zaměřila na studium genetických mechanismů kontrolujících barvu slupky jabloní. Domnívám se, že právě tento znak je z hlediska jeho variability typickým výsledkem šlechtitelského procesu. Barva plodu jabloní je typický odrůdový znak (Kutina et al. 1991; Hričovský et al. 2000). Barva plodu je zcela jistě genetické založená, ale současně musíme brát v potaz i vliv vnějších podmínek, které rozhodují o intenzitě barvy a o poměru zastoupení jednotlivých barev na povrchu plodu (Tacos et al. 2006). V literární rešerši jsem se zaměřila zejména na genetické a biochemické mechanismy kontrolující zbarvení plodů. Například Ban et al. (2007) a Zhang et al. (2019) kladou velký důraz na přítomnost transkripčních faktorů a zesilovač (enhancer) transkripce transkripčních

faktorů, které rozhodují o intenzitě zbarvení. Domnívám se, že intenzita transkripce genů zodpovědných za syntézu enzymů biochemické dráhy červených pigmentů jablek je typickým příkladem fenotypového projevu s výrazným vlivem vnějších faktorů. Jablůň domácí, respektive její domestikace jasně dokazuje, že se jedná o ovocný druh vykazující vysokou variabilitu nejenom barvy plodů, ale i jejich tvaru, chuti a dalších pomologických znaků. Příčinu této variability lze hledat v rekombinacích genů, ke kterým dochází na základě záměrných i nezáměrných křížení. Rekombinacemi by však nemohly vznikat nové alelické varianty způsobující buď zvýšenou intenzitu tvorby červeného pigmentu nebo naopak ztrátu schopnosti červené pigmenty syntetizovat. Tyto mechanismy vedoucí k variabilitě plodů popisují například (Cheng et al. 1996; Ban et al. 2007; Zhang et al. 2019). Ve své diplomové práci jsem zvolila modelovou kolekci odrůd s variabilitou barvy plodu, která byla způsobena kombinací různých mechanismů – inserčně – deleční mutace a existencí funkčního či nefunkčního redTE enchanceru.

Proto vývoj specifických a funkčních molekulárních markerů vyžaduje dostupnost většího množství osekvenovaných genotypů různých odrůd jabloní (Masojć, 2002). Zejména je důležité mapování genů, které řídí syntézu a kumulaci pigmentů v různých částech rostlin. Vzhledem k tomu, že barva dužniny a slupky jablek je řízena polygenně (Ban et al. 2007), použití jen dvou markerů nemusí být zcela dostatečné. Ve spolupráci s VŠÚO Holovousy s.r.o. byly pro hodnocení vybrané takové odrůdy, kde fenotypová kategorizace byla zcela jednoznačná, a to z pohledu znaků, které jsem charakterizovala následovně: odrůda není schopna syntetizovat žádný červený pigment a ve finále se jeví jako žlutoplodá. Druhou kategorií byly odrůdy, které byly schopny červený pigment syntetizovat, a to bez ohledu na to, jak velká část povrchu plodů byla červeným pigmentem překryta. Z popisu odrůd uvedených v kapitole 3.5 je patrné, že intenzita překrytí plodů červenou barvou, intenzita červené barvy, způsob vytváření líčka a žíhaní byla mezi červenoplodými odrůdy velice variabilní. Domnívám se, že i tímto způsobem vyjádřeny fenotyp je v souladu s tvrzením Ban et al. (2007), že barva plodů podléhá polygenní dědičnosti. Nicméně se domnívám, že mnou studovaný gen pro TF *MdMYBA* (Ban et al. 2007) a přítomnost neporušeného redTE enchanceru (Zhang et al. 2019) hrají klíčovou roli ve schopnosti odrůd syntetizovat červený, respektive žlutý pigment ve slupce plodů.

Fenotypový projev odrůd, které vznikají spontánními mutacemi, se může neshodovat s jejich alelickou sestavou. To naznačuje, že pro přesnější genotypizaci takových odrůd je potřeba větší množství specifických markerů. Na začátku řešení diplomové práce jsem vyslovila vědeckou hypotézu, že mohou existovat odrůdy u kterých může být zjištěn nesoulad mezi detekovanými alelami mnou použitých markerů a detekovaným fenotypem – barvou slupky. Oba typy markerů použitých v diplomové práci (*MdMYBA*, redTE) vycházejí z prvotních molekulárních studií Ban et al. (2007) a Zhang et al. (2019), vzhledem k tomu, že oba markery představují jasně definované polymorfismy lze u nich předpokládat mendelistickou dědičnost. To znamená, že

výsledný fenotyp je dán kombinací rodičovských alel, které odrůda získala od matky a otce. Mendelistickou dědičnost obou markerů jsem při řešení diplomové práce doložila segreganční analýzou u třech potomstev vzniklých zaměřeným křížením (kapitola 5.4.6). Dvě kombinace použitých rodičovských komponent poskytly potomstva, která z hlediska mendelistické genetiky odpovídají testovacímu zpětnému křížení a metoda χ^2 test potvrdila shodu získaných štěpných poměrů s teoreticky očekávaným poměrem 1:1. Pouze jedna hybridní kombinace představovala křížení homozygotních jedinců, a tudíž u potomstva se očekávala uniformita. Tato uniformita byla potvrzena i molekulární genetickou analýzou. Vávra et al. (2015) popisují celou řadu molekulárních markerů, které jsou ve většině případů založené právě na mendelistické dědičnosti. Proto se domnívám, že zejména molekulární marker charakterizující variabilitu redTE enchanceru by mohl být s úspěchem použit pro selekci semenáčků s požadovanou červenou barvu plodů v juvenilní fázi vývoje.

V předcházející části diskuse jsem se zmínila o tom, že variabilita zbarvení plodů může být z hlediska genetického vysvětlována celou řadou změn genomu. Domnívám se, že ke vzniku identického fenotypového projevu – ke žluté barvě plodů, může vést větší počet odlišných genetických mechanismů. Za tyto genetické mechanismy považuji různé typy mutací. Může se jednat o různé mutace jediného genu, nebo o mutace zcela jiných mnohdy neznámých genů. Ve své diplomové práci jsem se zaměřila na dvě známé kauzální mutace. Ale výsledky genotypizace potvrdily, že zcela jistě ke žluté barvě plodů zřejmě povede větší počet kauzálních mutací.

Příkladem výše uvedené skutečnosti jsou dvě odrůdy použité pro řešení této diplomové práce 'Bohemia Gold' a 'Golden Delicious'. Obě odrůdy jsou charakteristické žlutou barvou slupky, ačkoli provedená genotypizace pomocí dvou markerů (*MdMYBA* a redTE) ukazuje na přítomnost dominantních alel odpovídajících červenému zbarvení slupky. Odrůda 'Bohemia Gold', která je typicky žlutoplodá, se jeví jako dominantní homozygot v obou markerech (*MdMYBA* a redTE). Lze tudíž předpokládat, že během šlechtění odrůdy 'Bohemia Gold' nastala kumulace bodových mutací, které neovlivňují velikost amplifikovaného fragmentu, ale mohou mít vliv na funkčnost klíčových genů (Qi et al. 2014). Tuto skutečnost lze také vysvětlit tím, že mohly vzniknout mutace v genech, které produkují transkripční faktory pro další geny syntetizující enzymy pro biosyntetickou dráhu antokyanů, které nebyly doposud popsány. Odrůda 'Bohemia Gold' vznikla jako náhodná pupenová mutace odrůdy 'Bohemia', která je typicky červenoplodá. Samotná odrůda 'Bohemia' je pupenová mutace odrůdy 'Rubín'. 'Rubín' je odrůda se zelenožlutou základní barvou slupky a červeným líčkem, její barevný mutant 'Bohemia' je charakteristický výrazným celoplošným červeným zbarvením.

Odrůda 'Golden Delicious' se podle markeru *MdMYBA* jeví jako heterozygot, ale je typickou žlutoplodou odrůdou. Marker redTE u 'Golden Delicious' se vyskytuje v homozygotní recesivní sestavě, což odpovídá žlutému fenotypu. U této odrůdy je jasně, že žlutá barva vzniká z důvodu nefunkčnosti redTE elementu (Zhang et al. 2019).

Jinými slovy, tato genetická změna má tak velký účinek, že musí výrazně inhibovat expresi vlastního genu pro transkripční faktor *MdMYBA*, jehož gen u odrůdy 'Golden Delicious' zcela jistě není poškozen deleční mutací popsanou Ban et al. (2007). Můžeme tudíž předpokládat, že intenzita exprese *MdMYBA* podléhá velice přísné kontrole redTE elementu. Jelikož redTE element se u odrůdy 'Golden Delicious' nenachází v neporušené formě je i exprese *MdMYBA* genu výrazně utlumena. Výrazně utlumena však neznamená, že k expresi *MdMYBA* zcela nedocházelo. To, že odrůda 'Golden Delicious' je schopna vytvářet poměrně nenápadné líčko je popisováno řadou autorů (Kutina et al. 1991; Hričovský et al. 2000). I přes tuto skutečnost je odrůda 'Golden Delicious' chápána jako odrůda žlutoplodá. Vzhledem k tomu, že i Zhang et al. (2019) ve svých analýzách použili jako referenční odrůdu 'Golden Delicious', používala jsem tuto odrůdu i při řešení své diplomové práci. Zhang et al. (2019) své výsledky konfrontovali s publikovanou celogenomickou sekvencí 'Golden Delicious' (ASM211411v1). Rovněž v mé diplomové práci byla odrůda 'Golden Delicious' použita jako referenční genom, a to zejména v části práce zaměřené na bioinformatickou analýzu vstupních dat. Z této analýzy vyplynulo, že v genomu odrůdy 'Golden Delicious' jsem identifikovala gen *MdMYBA* bez typické delece pro některé jiné žlutoplodé odrůdy. Zjistila jsem však, že narozdíl od červenoplodé odrůdy ('Hanfu' (ASM411538v1)) analyzované Zhang et al. (2019), je gen *MdMYBA* transkribován z negativního vlákna. Je zajímavé, že tuto zásadní informaci Zhang et al. (2019) ve své práci vůbec nezmiňují. Mohu se tudíž domnívat, že při domestikaci jabloní mohlo dojít k velké řadě různě velkých genomických změn, které mohly být mimo jiné způsobeny různými chromozomovými přestavbami. Celogenomické sekvenování dihaploida odrůdy 'Golden Delicious' může mít tudíž žlutou barvu plodů způsobenou kombinací chromozomové aberace a změny struktury transponovatelného elementu obsahujícího redTE enhancer.

V této diplomové práci pro sekvenování byly vybrány odrůdy s jednoznačnou korelací mezi alelami obou markerů a barvou slupky plodů. Vzhledem k tomu, že odrůdy 'Rubín', 'Bohemia' a 'Bohemia Gold' zmíněné v předešlé části diskuse mají stejný genetický základ, doporučovala bych jejich osekvenování pro přesnější porovnání sekvence genu *MdMYBA*. Pro tyto analýzy bych doporučila osekvenovat celý gen *MdMYBA* a současně osekvenovat i oblast před genem *MdMYBA*, kde by teoreticky mohla být nalezena variabilita v regulačních oblastech tohoto genu. Primery navržené Ban et al. (2007) jsou vhodné pro amplifikace jen částí genu *MdMYBA*, proto předpokládám, že rozdíly se mohou nacházet mimo oblast nasedání primerů u odrůd 'Bohemia Gold' a 'Golden Delicious'.

6.2 Hodnocení markeru *MdMYBA* Ban et al. (2007)

Při řešení této diplomové práce jsem se zaměřila na optimalizaci amplifikačního protokolu pro již existující marker pro barevný polymorfismus slupky způsobený genem *MdMYBA* (Ban et al. 2007).

Primery navržené Ban et al. (2007) poskytují kvalitní a specifickou amplifikaci dvou fragmentů (723 bp a 656 bp). Oba fragmenty jsou dokonale asociovány s původní nemutovanou alelou W (723 bp) u červenoplodých genotypů a mutovanou alelou M u žlutoplodých genotypů (656 bp). Dvojice primerů navržených Ban et al. (2007) byla otestována na 49 odrůdách, které představují všechny možné varianty genotypu (WW, WM, MM). Tyto primery umožňují nejen odlišit od sebe homozygotní sestavy alel, ale i sestavy heterozygotní.

Z obrázku 12 je patrné, že sekvence genu *MdMYBA* u žlutoplodých odrůd 'Otava' a 'Rezista' vykazuje jen 99 % shodu. Ban et al. (2007) pro navržení primerů využili odrůdy 'Tsugaru' a 'Jonathan'. Předpokládám, že mezi těmito odrůdami a mnou osekvenovanými odrůdami 'Otava' a 'Rezista' mohou existovat sekvenční rozdíly, které ovlivňují přesnost shody. Z genetického hlediska tyto rozdíly mohly být způsobeny existencí různých mikromutací, které jsou typické pro vegetativně množené rostlinné druhy.

6.3 Hodnocení markeru redTE Zhang et al. (2019)

Podle mnou provedené bioinformatické analýzy dvojice primerů F1 R2 a F2 R2 navržených Zhang et al. (2019) se nepodařilo prokázat jejich funkčnost a specifitu. Důkazy jejich nespecifity jsou prezentovány v kapitolách 5.4.1 a 5.4.2.

Červenoplodá odrůda 'Hanfu' použitá Zhang et al. (2019) není zřejmě v Evropě dostupná pro šlechtění ani pro komerční pěstování. Proto jsem nemohla jí využít ani v experimentální části a skutečně ověřit amplifikaci produktů pomocí primerů F1 R1 navržených Zhang et al. (2019). Nicméně jsem měla k dispozici celý osekvenovaný genom 'Hanfu' (Zhang et al. 2019), zveřejněný v databázi NCBI. V této databázi jsem pomocí funkce Primer – Blast ověřila, že primery F1 R1 v genotypu 'Hanfu' nasedají zcela nespecificky (obrázek 15) a mohou tvořit více nespecifických fragmentů, ačkoli daná dvojice primerů by podle Zhang et al. (2019) by měla tvořit jeden specifický fragment o velikosti 750 bp. Dvojice primerů F2 R2, která podle Zhang et al. (2019) je specifická pro odrůdy se žlutou slupkou, tvoří u červenoplodé odrůdy 'Hanfu' jeden fragment o velikosti 60 bp.

Druhá odrůda použitá Zhang et al. (2019) byla 'Golden Delicious'. Tato odrůda je celosvětově rozšířená a jednoduše dostupná. Podle Zhang et al. (2019) F1 R1 dvojice primerů by neměla u 'Golden Delicious' amplifikovat žádný fragment, ačkoli analýza nasedání primerů pomocí Primer – Blast ukázala výskyt několika nespecifických

fragmentů (obrázek 16 a, b). Primerová dvojice F2 R2, kterou Zhang et al. (2019) uvádí jako specifickou pro 'Golden Delicious' tvořící fragment o velikosti 501 bp, podle Primer – Blast analýzy však žádný fragment netvoří (obrázek 18).

Příčiny značných rozdílů mezi výsledky Zhang et al. (2019) a mnou provedenou *in silico* analýzou mohou spočívat v tom, že Zhang et al. (2019) ve své práci vůbec neuvádějí protokol amplifikace navržených primerů. Referenční odrůda 'Hanfu' byla doposud sekvenována jenom Zhang et al. (2019) a není možné hodnotit kvalitu zpracování sekvenačních dat. Nicméně, podle výsledků bioinformatické analýzy specifity dvojic primerů F1 R1 a F2 R2 navržených Zhang et al. (2019) pro obě referenční odrůdy mohu hodnotit dané primery jako nespolehlivé.

Dále jsem experimentálně ověřila funkčnost a specifitu primerů navržených Zhang et al. (2019). Po provedení optimalizace amplifikační teploty byly primery otestovány na 49 odrůdách zahrnující všechny možné alelické sestavy (Tabulka 1). Primery F1 R1 zcela intenzivně amplifikovaly fragmenty o velikosti 750 bp u červenoplodých odrůd, což plně souhlasí se Zhang et al. (2019), ale navíc amplifikovaly nspecifické fragmenty jak u červenoplodých, tak i u žlutoplodých odrůd (obrázek 19), což jen potvrzuje výsledky mnou provedené bioinformatické analýzy. Předpokládám, že provedení optimalizace teploty nasedání F1 R1 primerů zvláště pro žluté odrůdy, by mohlo zvýraznit amplifikaci nspecifických fragmentů nebo naopak způsobit jejich úplný zánik.

Funkčnost dvojice primerů F2 R2 navržených Zhang et al. (2019) byla také ověřena experimentálně. Byly použité odrůdy představující různé genotypy, včetně dvou žlutoplodých odrůd 'Rezista' a 'Otava', u kterých by dané primery měly amplifikovat specifický 501 bp velký fragment (Zhang et al. 2019). Nicméně výsledky experimentů jen potvrzují výsledky mnou provedené bioinformatické analýzy (obrázek 20).

Z již uvedených důvodů jsem navrhla nový kodominantní marker (kapitola 5.4.3) představovaný dvojicí primerů F4 R4. Jako referenční odrůdy pro bioinformatickou analýzu byly použité stejné odrůdy jako u Zhang et al. (2019) – 'Hanfu' a 'Golden Delicious' (ASM411538v1, ASM211411v1) nacházející se v NCBI databázi. Z výsledků uvedených v kapitole 5.4.3 je patrné, že primery F4 R4 nasedají na referenční genotypy specificky a amplifikují dva fragmenty (788 bp u žlutoplodých a 288 bp u červenoplodých odrůd). Protože F4 R4 primery nasedají v oblasti 3321 bp před genem *MdMYBA*, což je shodné s výsledky Zhang et al. (2019), se dá usoudit, že primery budou amplifikovat redTE marker navržený Zhang et al. (2019)

Pro amplifikaci byl optimalizován amplifikační protokol a použité odrůdy, které představují různé alelické sestavy, včetně 'Golden Delicious' z VŠÚO Holovousy s.r.o. Podle analýzy nasedání primerů F4 R4 v programu Primer – Blast bylo stanoveno, že dané primery tvoří u referenční odrůdy 'Golden Delicious' (ASM211411v1) fragment velký 788 bp. Ale u odrůdy 'Golden Delicious' (VŠÚO Holovousy s.r.o.) skutečně došlo

k amplifikaci fragmentu o velikosti 315 bp, což zřejmě potvrzuje existující rozdíly mezi genotypem odrůdy 'Golden Delicious' dostupné v databázi NCBI a genotypem odrůdy 'Golden Delicious' pěstovaným v VŠÚO Holovousy s.r.o. Vzhledem k tomu, že u žádného z hodnocených genotypů se žlutou barvou slupky plodů se nevyskytoval ampikon s očekávanou velikostí 788 bp, vyslovila jsem hypotézu, že skutečná detekovaná velikost 315 bp nemůže odpovídat nespécifické náhodné změně genomu. Amplifikovaný fragment o velikosti 315 bp byl detekován nejenom u referenčního genotypu 'Golden Delicious' ale i u dalších odrůd, a to jak v homozygotní kombinaci, tak i heterozygotní kombinaci. Domnívám se, že tato alela (315 bp) byla jednoznačně předávána prostřednictvím gamet při vzniku hodnocených odrůd. Nemohlo se tudíž jednat o náhodnou deleční mutaci (788 bp vs. 315 bp), ke které by došlo neočekávatelně a nepředvídatelně u jediné odrůdy. Domnívám se, že žlutá barva u hodnocených odrůd s výjimkou, jíž výše diskutované odrůdy 'Bohemia Gold' je způsobená existencí alelické varianty redTE enchanceru, která ve všech případech odpovídala ampikonu o velikosti 315 bp. Jinými slovy u žádného genotypu nebyl získán očekávaný ampikon o velikosti 788 bp. Alely nově navrženého markeru redTE enchanceru byly sekvenovány. Alela markeru o velikosti 288 bp byla identická se sekvencí kterou pod označením (ASM411538v1) v databázi NCBI publikovali Zhang et al. (2019) u červenoplodé odrůdy 'Hanfu'. Osekvenovala jsem rovněž i alely s nepředpokládanou velikostí 315 bp. Z obrázku 27 je patrné, že mnou získaná sekvence vykazovala homologie s referenční odrůdou 'Golden Delicious' (ASM211411v1) z databáze NCBI. Homologie byla potvrzena s negativním vláknem této sekvence. Tento výsledek byl předpokládán, protože i samotný gen *MdMYBA* v referenční odrůdě 'Golden Delicious' je lokalizovaný právě na negativním vlákně. Zhang et al. (2019) předpokládají, že celý redTE, respektive část redTE enchanceru se u odrůdy 'Hanfu' respektive 'Golden Delicious' nachází před start kodonem genu *MdMYBA*. Tento výsledek jsem svou sekvenční a bioinformatickou analýzou potvrdila s jediným rozdílem oproti předpokládanému výsledku Zhang et al. (2019). Tímto rozdílem byla existence inzerčně – delečního polymorfismu u mnou hodnoceného ampikonu o velikosti 315 bp, který byl elektroforeticky potvrzen rovněž při genotypizaci odrůdy 'Golden Delicious' z VŠÚO Holovousy s.r.o. Kombinace inzerce a delece byla potvrzena skutečná velikost ampikonu (315 bp), která korespondovala s výsledky elektroforetické separace. Výsledky sekvenční analýzy, zejména jejich porovnání s publikovanou referenční odrůdou 'Golden Delicious' pak mohly být nápomocné pro zodpovězení otázky, proč primery publikované Zhang et al. (2019) nebyly funkční u odrůdy 'Golden Delicious'. Je zajímavé, že Zhang et al. (2019) se ve své práci odkazují na zcela identickou sekvence genomu 'Golden Delicious' jakou jsem použila já při řešení své diplomové práce. Tyto autoři vůbec nezmiňují žádné problémy, které by u odrůdy 'Golden Delicious' s amplifikací nastaly. Vzhledem k tomu, že odrůda 'Golden Delicious' je masově celosvětově pěstovaná, její reprodukce probíhá pomocí klonování – roubování, je vysoce pravděpodobné, že právě u odrůdy 'Golden Delicious'

může docházet ke kumulaci různých typů somatických mutací. Výsledkem je celá řada klonů odrůdy 'Golden Delicious' (Kaserovic et al. 2004). Jaké typy genetických změn jsou zodpovědné za odlišení těchto klonů není přesně známo. Teoreticky by se mohlo jednat i o změnu v sekvenci před genem *MdMYBA*, která je zodpovědná za amplifikaci produktu o velikosti 315 bp. Jinými slovy v databázi NCBI je uvedena sekvence jiného klonu, než který byl hodnocen v mé diplomové práci. Toto vysvětlení však nepovažuji za příliš pravděpodobné, a to z následujícího důvodu. Amplikon o velikosti 315 bp byl získán nejen u odrůdy 'Golden Delicious' z VŠÚO Holovousy s.r.o., ale i u dalších žlutoplodých odrůd a v heterozygotní kombinaci byl získán i u červenoplodých odrůd. Jednoznačně nelze tvrdit, že tyto odrůdy s amplikonem o velikosti 315 bp by měly svůj původ jednoznačně odvozený od jediného klonu 'Golden Delicious'. S mnohem větší pravděpodobností se tato alela o velikosti 315 bp do mnou hodnocených odrůd dostala přenosem z většího počtu donorů (rodičů). Proto se domnívám, že mnohem pravděpodobnější vysvětlení je, že u žlutoplodých odrůd s nefunkčním redTE se nachází mnou definovaná sekvence s velikostí 315 bp a nikoliv 788 bp alela predikována na základě porovnání s referenční sekvencí 'Golden Delicious' (ASM211411v1). Je teoreticky možné, že při finálním skládání dat publikované celogenomické sekvence na chromozomové úrovni mohlo dojít u referenční sekvenci (ASM211411v1) k chybě.

7. Závěr

Diplomová práce byla zaměřena na nalezení a optimalizaci dvou molekulárních markerů genetických mechanismů zodpovědných za syntézu červených pigmentů ve slupce jablek. Závěry diplomové práci je možné formulovat jako odpovědi na vytýčené vědecké hypotézy:

- i. První vědecká hypotéza předpokládala, že k syntéze červených pigmentů ve slupce plodů jabloní dochází tehdy, pokud v genu pro transkripční faktor *MdMYBA* nedochází k mutaci (Ban et al. 2007). Tato vědecká hypotéza byla jednoznačně potvrzena. U všech odrůd s červenou barvou slupky byl detekován gen pro funkční TF *MdMYBA*. Při použití optimalizovaného markeru byly všechny červenoplodé odrůdy typické tím, že u nich nebyla detekována kauzální delece vedoucí k nefunkčnosti TF.
- ii. Druhá vědecká hypotéza předpokládala, že intenzita červeného zbarvení slupky plodu je ovlivněna přítomností funkční retrotranspozonové inserce s enchancerovou aktivitou (redTE), která je lokalizována před start kodonem *MdMYBA* (Zhang et al. 2019). Pro detekci kompletního redTE enchanceru, který má transpozonový původ, byl navržen a validován nový molekulární marker, který je založen na inzerčně – delečním polymorfismu. U odrůd s různou intenzitou červené barvy byla detekována sekvence odpovídající funkčnímu redTE enchanceru červenoplodé odrůdy 'Hanfu', který popsal Zhang et al. (2019). Platnost druhé hypotézy byla tudíž potvrzena.
- iii. Třetí vědecká hypotéza předpokládala, že mohou existovat žlutoplodé odrůdy, u kterých je absence červeného pigmentu způsobena jinými mutacemi než polymorfismy popsané u genu *MdMYBA* (Ban et al. 2007) a redTE enchanceru (Zhang et al. 2019). Jinými slovy tato hypotéza předpokládala, že mohou existovat doposud neznáme *de novo* vzniklé pupenové mutace zodpovědné za vznik žlutoplodých genotypů. Platnost této hypotézy je možné rovněž přijmout, a to díky molekulárním analýzám odrůdy 'Bohemia Gold'. Tato odrůda je typicky žlutoplodá, přesto genotypizování pomocí obou molekulárních markerů (*MdMYBA*, redTE) prokázalo u této odrůdy přítomnost původních nemutovaných alel, které jsou teoreticky zodpovědné za tvorbu červených pigmentů. Jinými slovy kauzální mutace zodpovědné za žlutou barvu plodů nebyly u odrůdy 'Bohemia Gold' detekovány. Neschopnost syntetizovat červené pigmenty u této odrůdy mohou být způsobeny jinými mutacemi studovaných

genů nebo mutacemi dalších genů, které hrají rovněž klíčovou roli v biosyntéze pigmentů slupky jablek.

Z praktického šlechtitelského hlediska byla při řešení této diplomové práce ověřena funkčnost markeru *MdMYBA* podle Ban et al. (2007) a současně byl navržen zcela nový funkční marker, který umožňuje charakterizovat alelické varianty redTE enchanceru. Tento nový marker spolehlivě amplifikuje u všech hodnocených genotypů a koreluje s fenotypovým projevem. Jedná se o kodominantní marker, který umožňuje odlišit všechny tři alelické kombinace. Marker vykazuje mendelistickou dědičnost. Mendelistická segregace markeru byla statistické potvrzena u vybraných hybridních kombinací. Rozdíly mezi alelami tohoto nově navrženého markeru jsou inzerně delečního typu a je možné je bez problémů detekovat pomocí agarózové elektroforézy. Nově navržený marker redTE enchanceru dle mého názoru splňuje všechny požadavky kladené na molekulární markery a má tudíž aplikační potenciál pro využití při selekci juvenilních semenáčků s červenou, respektive žlutou barvou plodů.

8. Literatura

- Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. 2002. *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. Isolating, Cloning, and Sequencing DNA. New York: Garland Science. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26837/>
- Anderson EN. 2019. *Fruit from the Sands: The silk road origins of the foods we eat*. By Robert N. spengler III. 2019. University of California press, Berkeley. 392 pp. *Ethnobiology letters* **10**:109–110. Society of Ethnobiology. Available from <http://dx.doi.org/10.14237/ebl.10.1.2019.1636>.
- Ban Y, Honda C, Hatsuyama Y, Igarashi M, Bessho H, Moriguchi T. 2007. Isolation and functional analysis of a MYB transcription factor gene that is a key regulator for the development of red coloration in apple skin. *Plant & cell physiology* **48**:958–970. Oxford University Press (OUP). Available from <http://dx.doi.org/10.1093/pcp/pcm066>.
- Blesso CN. 2019. Dietary anthocyanins and human health. *Nutrients* **11**:2107. MDPI AG. Available from <http://dx.doi.org/10.3390/nu11092107>.
- Boyer J, Liu RH. 2004. Apple phytochemicals and their health benefits. *Nutrition journal* **3**:5. Springer Nature. Available from <http://dx.doi.org/10.1186/1475-2891-3-5>.
- Butelli E, Licciardello C, Zhang Y, Liu J, Mackay S, Bailey P, Reforgiato-Recupero G, Martin C. 2012. Retrotransposons control fruit-specific, cold-dependent accumulation of anthocyanins in blood oranges. *The plant cell* **24**:1242–1255. Oxford University Press (OUP). Available from <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.111.095232>.
- Chagné D, Carlisle ChM, Blond C, Volz RK, Whithworth CJ, Orguzie NC, Crowhurst RN, Allan A C, Expley RV, Hellens RP, Gardiner SE. 2007. Mapping a candidate gene (MdMYB10) for red flesh and foliage colour in apple. *BMC genomics* **8**:212. Available from <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-8-212>.
- Chakavarti B, Chakavarti D. 2008. Electrophoretic separation of proteins. *Journal of visualized experiments: JoVEDOI: 10.3791/758*. MyJove Corporation. Available from <http://dx.doi.org/10.3791/758>.
- Chen T, Li W, Hu X, Guo J, Liu A, Zhang B. 2015. A cotton MYB transcription factor, GbMYB5, is positively involved in plant adaptive response to drought stress.

- Plant & cell physiology **56**:917–929. Oxford University Press (OUP). Available from <http://dx.doi.org/10.1093/pcp/pcv019>.
- Collard BCY, Mackill DJ. 2008. Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* **363**:557–572. The Royal Society. Available from <http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2007.2170>.
- Crane MB, Lawrence WJC. 1933. Genetical studies in cultivated apples. *Journal of genetics* **28**:265–296. Springer Science and Business Media LLC. Available from <http://dx.doi.org/10.1007/bf02981775>.
- Ding Z, Li S, An X, Liu X, Qin H, Wang D. 2009. Transgenic expression of MYB15 confers enhanced sensitivity to abscisic acid and improved drought tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Yi chuan xue bao [Journal of genetics and genomics]* **36**:17–29. Elsevier BV. Available from [http://dx.doi.org/10.1016/S1673-8527\(09\)60003-5](http://dx.doi.org/10.1016/S1673-8527(09)60003-5).
- Douaihy B, Sobierajska K, Jasińska AK, Boratyńska K, Ok T, Romo A, Machon N, Didukh Y, Bou Dagher-Kharrat M, Boratyński A. 2012. Morphological versus molecular markers to describe variability in *Juniperus excelsa* subsp. *excelsa* (Cupressaceae). *AoB plants* **2012**:ls013. Oxford University Press (OUP). Available from <http://dx.doi.org/10.1093/aobpla/pls013>.
- Dubos C, Stracke R, Grotewold E, Weisshaar B, Martin C, Lepiniec L. 2010. MYB transcription factors in *Arabidopsis*. *Trends in plant science* **15**:573–581. Elsevier BV. Available from <http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2010.06.005>.
- Dvořák A., Vondráček, J., Kohout, K. a Blažek, J. *Jablka*. 1976. *Jablka*. 1. Vydání. Academia. Praha. 588 s. ISBN 509-21-857.
- Espley RV, Hellens RP, Putterill J, Stevenson DE, Kutty-Amma S, Allan AC. 2007. Red colouration in apple fruit is due to the activity of the MYB transcription factor, MdMYB10. *The Plant journal: for cell and molecular biology* **49**:414–427. Wiley. Available from <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-313x.2006.02964.x>.
- Frisch M, Melchinger AE. 2005. Selection theory for marker-assisted backcrossing. *Genetics* **170**:909–917. Oxford University Press (OUP). Available from <http://dx.doi.org/10.1534/genetics.104.035451>.

- Ghomi K, Sabouri A, Sabouri H, Rabiei B. 2013. Mapping QTLs for traits related to salinity tolerance at seedling stage of rice (*Oryza sativa* L.): An agrigenomics study of an Iranian rice population. U.S. National Library of Medicine. Available from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23638881/>
- Guo H et al. 2017. Expression of the MYB transcription factor gene BpIMYB46 affects abiotic stress tolerance and secondary cell wall deposition in *Betula platyphylla*. *Plant biotechnology journal* **15**:107–121. Available from <http://dx.doi.org/10.1111/pbi.12595>.
- Hričovský, I et al. 2000. *Pomológia - jablone, hrušky, čerešne, višne, škrupinové ovocie. Nezávislosť*. **266 s.** ISBN: 80-85217-81-3.
- Hričovský, I. et al. 1990. *Praktické ovocinárstvo. Príroda*. Bratislava. s. 26–31. ISBN 80–07–00024–0.
- Hyson DA. 2011. A comprehensive review of apples and apple components and their relationship to human health. *Advances in nutrition (Bethesda, Md.)* **2**:408–420. Elsevier BV. Available from <http://dx.doi.org/10.3945/an.111.000513>.
- Ito H, Yoshida T, Tsukahara S, Kawabe A. 2013. Evolution of the ONSEN retrotransposon family activated upon heat stress in Brassicaceae. *Gene* **518**:256–261. Elsevier BV. Available from <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2013.01.034>.
- Ito H. 2013. Small RNAs and regulation of transposons in plants. *Genes & genetic systems* **88**:3–7. Genetics Society of Japan. Available from <http://dx.doi.org/10.1266/ggs.88.3>.
- Jaakola L. 2013. New insights into the regulation of anthocyanin biosynthesis in fruits. *Trends in plant science* **18**:477–483. Elsevier BV. Available from <http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2013.06.003>.
- Jha G, Thakur K, Thakur P. (n.d.). *The Venturia Apple Pathosystem: Pathogenicity mechanisms and plant defense responses*. U.S. National Library of Medicine. Available from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20150969/>
- Jung C, Seo JS, Han SW, Koo YJ, Kim CH, Song SI, Nahm BH, Choi YD, Cheong J-J. 2008. Overexpression of AtMYB44 enhances stomatal closure to confer abiotic stress tolerance in transgenic *Arabidopsis*. *Plant physiology* **146**:623–635. Oxford University Press (OUP). Available from <http://dx.doi.org/10.1104/pp.107.110981>.

- Keserovic Z, Gvozdenovic D, Magazin N. 2004. Golden Delicious and Elstar clones. Pages 45–48 *Savremena poljoprivreda*. Serbia. ISSN: 0350-1205 Available from <https://agris.fao.org>
- Kellerhals M, Patocchi A, Duffy B, Frey J. 1970, January 1. Modern approaches for breeding high quality apples with durable resistance to scab, powdery mildew, and fire blight. Available from <https://orgprints.org/id/eprint/13699/>
- Kim S-H, Lee J-R, Hong S-T, Yoo Y-K, An G, Kim S-R. 2003. Molecular cloning and analysis of anthocyanin biosynthesis genes preferentially expressed in apple skin. *Plant science: an international journal of experimental plant biology* **165**:403–413. Elsevier BV. Available from [http://dx.doi.org/10.1016/s0168-9452\(03\)00201-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0168-9452(03)00201-2).
- Korban SS. (Ed.). 2021. *The Apple Genome*. 2021. *Compendium of Plant Genomes* DOI: 10.1007/978-3-030-74682-7. Available from <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-030-74682-7>.
- Kumawat G, Kanta Kumawat C, Chandra K, Pandey S, Chand S, Nandan Mishra U, Lenka D, Sharma R. 2021. Insights into marker assisted selection and its applications in plant breeding. Page *Plant Breeding - Current and Future Views*. IntechOpen. Available from <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.95004>.
- Kutina J a kol. 1991. *Pomologický atlas 2*. Praha: Zemědělské nakladatelství Brázda. Praha. 300s. ISBN 80-209-0089-6.
- Le T-N et al. 2014. DNA demethylases target promoter transposable elements to positively regulate stress responsive genes in *Arabidopsis*. *Genome biology* **15**:458. Springer Science and Business Media LLC. Available from <http://dx.doi.org/10.1186/s13059-014-0458-3>.
- Lin-Wang K, Bolitho K, Grafton K, Kortstee A, Karunairetnam S, McGhie TK, Espley RV, Hellens RP, Allan AC. 2010. An R2R3 MYB transcription factor associated with regulation of the anthocyanin biosynthetic pathway in *Rosaceae*. *BMC plant biology* **10**:50. Springer Science and Business Media LLC. Available from <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2229-10-50>.
- Makałowski W, Gotea V, Pande A, Makałowska I. 2019. Transposable elements: Classification, identification, and their use as a tool for comparative genomics. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **1910**:177–207. Available from http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4939-9074-0_6.

- Makarevitch I, Waters AJ, West PT, Stitzer M, Hirsch CN, Ross-Ibarra J, Springer NM. 2015. Transposable elements contribute to activation of maize genes in response to abiotic stress. *PLoS genetics* **11**:e1004915. Public Library of Science (PLOS). Available from <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1004915>.
- Masojć P. 2002. The application of molecular markers in the process of selection. *Cellular & molecular biology letters* **7**:499–509. Available from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12378256>.
- Mcclintock B. 1950. The origin and behavior of mutable loci in maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **36**:344–355. Available from <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.36.6.344>.PMC1063197.
- Mhiri C, Borges F, Grandbastien M-A. 2022. Specificities and dynamics of transposable elements in land plants. *Biology* **11**. Available from <http://dx.doi.org/10.3390/biology11040488>.
- Misra P et al. 2010. Modulation of transcriptome and metabolome of tobacco by Arabidopsis transcription factor, AtMYB12, leads to insect resistance. *Plant physiology* **152**:2258–2268. American Society of Plant Biologists (ASPB). Available from <http://dx.doi.org/10.1104/pp.109.150979>.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* **51 Pt 1**:263–273. Available from <http://dx.doi.org/10.1101/sqb.1986.051.01.032>.
- Musacchi S, Serra S. 2018. Apple fruit quality: Overview on pre-harvest factors. *Scientia horticulturae* **234**:409–430. Elsevier BV. Available from <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2017.12.057>.
- Naito K, Zhang F, Tsukiyama T, Saito H, Hancock CN, Richardson AO, Okumoto Y, Tanisaka T, Wessler SR. 2009. Unexpected consequences of a sudden and massive transposon amplification on rice gene expression. *Nature* **461**:1130–1134. Springer Science and Business Media LLC. Available from <http://dx.doi.org/10.1038/nature08479>.
- Němcová V, Buchtová I. 2022. Situační a výhledová zpráva ovoce. Ministerstvo zemědělství. Praha. ISBN 978-80-7434-676-7, ISSN 1211-7692, MK ČR E 11003.

Dostupné z https://eagri.cz/public/web/file/688961/Ovoce_2021_Web.pdf (accessed 2023).

- Orozco-Arias S, Isaza G, Guyot R. 2019. Retrotransposons in plant genomes: Structure, identification, and classification through bioinformatics and machine learning. *International journal of molecular sciences* **20**:3837. MDPI AG. Available from <http://dx.doi.org/10.3390/ijms20153837>.
- Pandey A, Misra P, Chandrashekar K, Trivedi PK. 2012. Development of AtMYB12-expressing transgenic tobacco callus culture for production of rutin with biopesticidal potential. *Plant cell reports* **31**:1867–1876. Springer Science and Business Media LLC. Available from <http://dx.doi.org/10.1007/s00299-012-1300-6>.
- Pandey A, Misra P, Khan MP, Swarnkar G, Tewari MC, Bhambhani S, Trivedi R, Chattopadhyay N, Trivedi PK. 2014. Co-expression of Arabidopsis transcription factor, ATMYB12, and soybean isoflavone synthase, GMIFS1, genes in tobacco leads to enhanced biosynthesis of isoflavones and flavonols resulting in osteoprotective activity. U.S. National Library of Medicine. Available from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24102754/>
- Paz-Ares J, Ghosal D, Wienand U, Peterson PA, Saedler H. 1987. The regulatory c1 locus of *Zea mays* encodes a protein with homology to myb proto-oncogene products and with structural similarities to transcriptional activators. *The EMBO journal* **6**:3553–3558. Available from <http://dx.doi.org/10.1002/j.1460-2075.1987.tb02684.x>.
- Pehlivan FE. 2017. Vitamin C: An Antioxidant Agent. Page Vitamin C. InTech. Available from <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.69660>.
- Pervez MT, Hasnain MJU, Abbas SH, Moustafa MF, Aslam N, Shah SSM. 2022. A comprehensive review of performance of next-generation sequencing platforms. *BioMed research international* **2022**:3457806. Hindawi Limited. Available from <http://dx.doi.org/10.1155/2022/3457806>.
- Praciak A. 2022. *Malus domestica* (apple). *CABI Compendium* **CABI Compendium**. CABI Publishing. Available from <http://dx.doi.org/10.1079/cabicompendium.31964>.
- Prokop P, Fancovicová J. 2012. Beautiful fruits taste good: the aesthetic influences of fruit preferences in humans. *Anthropologischer Anzeiger; Bericht über die*

biologisch-anthropologische Literatur **69**:71–83. Schweizerbart. Available from <http://dx.doi.org/10.1127/0003-5548/2011/0120>.

Qi J, Chen Y, Copenhaver GP, Ma H. 2014. Detection of genomic variations and DNA polymorphisms and impact on analysis of meiotic recombination and genetic mapping. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111**:10007–10012. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Available from <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1321897111>.

Quadrana L. 2020. The contribution of transposable elements to transcriptional novelty in plants: the FLC affair. *Transcription* **11**:192–198. Informa UK Limited. Available from <http://dx.doi.org/10.1080/21541264.2020.1803031>.

Ramakrishnan M, Satish L, Kalendar R, Narayanan M, Kandasamy S, Sharma A, Emamverdian A, Wei Q, Zhou M. 2022. Correction: Ramakrishnan et al. The Dynamism of Transposon Methylation for Plant Development and Stress Adaptation. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 11387. *International journal of molecular sciences* **23**. Available from <http://dx.doi.org/10.3390/ijms232214107>.

Sahebi M et al. 2018. Contribution of transposable elements in the plant's genome. *Gene* **665**:155–166. Elsevier BV. Available from <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2018.04.050>.

Sambrook J, Green MR. 2001. Polymerase Chain Reaction. Pages 456–461 in *Molecular cloning a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **74**:5463–5467. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Available from <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>.

Schmidt H. 1988. Inheritance of anthocyanin in apple fruit skin. *Acta Hort* **224**:89–97.

Schnable PS et al. 2009. The B73 maize genome: complexity, diversity, and dynamics. *Science (New York, N.Y.)* **326**:1112–1115. American Association for the Advancement of Science (AAAS). Available from <http://dx.doi.org/10.1126/science.1178534>.

- Seo PJ, Park C-M. 2010. MYB96-mediated abscisic acid signals induce pathogen resistance response by promoting salicylic acid biosynthesis in Arabidopsis. *The new phytologist* **186**:471–483. Wiley. Available from <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03183.x>.
- Seo PJ, Xiang F, Qiao M, Park J-Y, Lee YN, Kim S-G, Lee Y-H, Park WJ, Park C-M. 2009. The MYB96 transcription factor mediates abscisic acid signaling during drought stress response in Arabidopsis. *Plant physiology* **151**:275–289. Oxford University Press (OUP). Available from <http://dx.doi.org/10.1104/pp.109.144220>.
- Shen H et al. 2012. Functional characterization of the switchgrass (*Panicum virgatum*) R2R3-MYB transcription factor PvMYB4 for improvement of lignocellulosic feedstocks. *The new phytologist* **193**:121–136. Wiley. Available from <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-8137.2011.03922.x>.
- Simpson MG. 2010. *Pant Systematics*, Second edition. *Plant Molecular Systematics*. p 607 – 622. Academic Press. ISBN: 9780080922089 Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128126288500146>
- Soltész A, Vágújfalvi A, Rizza F, Kerepesi I, Galiba G, Cattivelli L, Coraggio I, Crosatti C. 2012. The rice *Osmyb4* gene enhances tolerance to frost and improves germination under unfavourable conditions in transgenic barley plants. *Journal of applied genetics* **53**:133–143. Springer Science and Business Media LLC. Available from <http://dx.doi.org/10.1007/s13353-011-0081-x>.
- Strange A, Li P, Lister C, Anderson J, Warthmann N, Shindo C, Irwin J, Nordborg M, Dean C. 2011. Major-effect alleles at relatively few loci underlie distinct vernalization and flowering variation in Arabidopsis accessions. *PLoS one* **6**:e19949. Public Library of Science (PLOS). Available from <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0019949>.
- Takos AM, Jaffé FW, Jacob SR, Bogs J, Robinson SP, Walker AR. 2006. Light-induced expression of a MYB gene regulates anthocyanin biosynthesis in red apples. *Plant physiology* **142**:1216–1232. Oxford University Press (OUP). Available from <http://dx.doi.org/10.1104/pp.106.088104>.
- Telias A, Lin-Wang K, Stevenson DE, Cooney JM, Hellens RP, Allan AC, Hoover EE, Bradeen JM. 2011. Apple skin patterning is associated with differential expression of MYB10. *BMC plant biology* **11**:93. Available from <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2229-11-93>.

- Vávra R, Žďárská I, Kadlecová V, Blažek J, Vejl P, Sedlák P, Melounová M. 2015. Selekce jabloní v rané vývojové fázi s využitím molekulárních markerů. Výzkumný a šlechtitelský ústav ovocnářský Holovousy s.r.o. ISBN 978-80-87030-41-1. Dostupné z <https://metodiky.agrobiologie.cz> (accessed 2022).
- Velasco R et al. 2010. The genome of the domesticated apple (*Malus × domestica* Borkh.). *Nature genetics* **42**:833–839. Springer Science and Business Media LLC. Available from <http://dx.doi.org/10.1038/ng.654>.
- White AG, Lespinasse Y. 1986. The inheritance of fruit colour in apple (*Malus pumila* Mill). *Malus pumila* Mill.). *Agronomie* **6**:105–110.
- Yang SW, Jang I-C, Henriques R, Chua N-H. 2009. FAR-RED ELONGATED HYPOCOTYL1 and FHY1-LIKE associate with the Arabidopsis transcription factors LAF1 and HFR1 to transmit phytochrome A signals for inhibition of hypocotyl elongation. *The plant cell* **21**:1341–1359. Oxford University Press (OUP). Available from <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.109.067215>.
- Zha J, Koffas MAG. 2017. Production of anthocyanins in metabolically engineered microorganisms: Current status and perspectives. *Synthetic and systems biotechnology* **2**:259–266. Available from <http://dx.doi.org/10.1016/j.synbio.2017.10.005>.
- Zhang YZ, Li PM, Cheng LL. 2010. Developmental changes of carbohydrates, organic acids, amino acids, and phenolic compounds in ‘Honeycrisp’ apple flesh”. *Food Chemistry* **123**:1013–1018.
- Zhao CL, Chen ZJ, Bai XS, Ding C, Long TJ, Wei FG, Miao KR. 2014. Structure-activity relationships of anthocyanidin glycosylation. *Molecular diversity* **18**:687–700. Springer Science and Business Media LLC. Available from <http://dx.doi.org/10.1007/s11030-014-9520-z>.
- Zhu L, Shan H, Chen S, Jiang J, Gu C, Zhou G, Chen Y, Song A, Chen F. 2013. The heterologous expression of the chrysanthemum R2R3-MYB transcription factor CmMYB1 alters lignin composition and represses flavonoid synthesis in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS one* **8**:e65680. Public Library of Science (PLoS). Available from <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0065680>.
- Zimmermann IM, Heim MA, Weisshaar B, Uhrig JF. 2004. Comprehensive identification of *Arabidopsis thaliana* MYB transcription factors interacting with R/B-like BHLH

proteins. *The Plant journal: for cell and molecular biology* **40**:22–34. Wiley.
Available from <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02183.x>.

9. Seznam použitých zkratek

bp – base pair (*párů bází*)

ddNTP – dideoxynukleotid trifosfát

ddPCR – droplet digital PCR

dNTP – deoxynukleotid trifosfát

F primer – primer vymežující sekvenci z levé strany

ORF – Open Reading Frame (otevřený čtecí rámeček)

R primer – primer vymežující sekvenci z pravé strany

SNP – Single Nucleotide Polymorphisms

TSD – Target Site Duplication

TBE – Tris-borát-EDTA, elektroforetický pufř

TF – transkripční faktor