

Česká zemědělská univerzita v Praze
Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra genetiky a šlechtění

Molekulární detekce markerů genů *Md-ACS1*
a *Md-ACO1* zodpovědných za měknutí plodů jabloní

Diplomová práce

Vedoucí práce: Doc. Dr. Ing. Vejl Pavel

Autor práce: Johnová Eliška

2010

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma Molekulární detekce markerů genů Md-ACS1 a Md-ACO1 zodpovědných za měknutí plodů jabloní vypracovala samostatně a použil a jen pramenů, které cituji a uvádím v přiložené bibliografii.

V Praze dne: 10. 4. 2010

Eliška Johnová

Abstrakt

Genetické markery využívající polymorfismu nukleových kyselin mohou výrazně zkrátit a zefektivnit dlouhodobý šlechtitelský proces u jabloní. Jablka patří mezi klimakterické; ovoce zrání je způsobeno především zvýšením poměru mezi dýcháním a produkcí plynného fytohormonu etylénu. Etylén je klíčový regulátor procesu zrání jablek, a omezení jeho biosyntézy je základní mechanismus zajišťující dlouhodobé skladování jablek v prostředí kontrolované atmosféry.

U vyšších rostlin je syntéza etylénu z aminokyseliny L- metionu zajištěna dvěma enzymaticky katalyzovanými kroky. Prvním prekurzorem etylénu je S-adenosyl- L-metionin (SAM), který je dále přeměněn na kyselinu 1-aminocyklopropan-1-karboxylovou (ACC) a metyltioadenosin za účasti enzymu 1-aminocyklopropan-1-karboxylsyntázy (ACS). V druhém kroku dochází v důsledku působení 1-aminocyklopropan-1-karboxyl oxidázy (ACO) k oxidaci ACC za vzniku etylénu, oxidu uhličitého a kyanovodíku. Měknutí dužiny je nevratným procesem stárnutí plodů, způsobující snížování délky trvanlivosti a skladovatelnosti jablek.

Gen *Md-ACS1*, který je zodpovědný za biosyntézu etylénu obsahuje variabilitu v promotorové oblasti. Alela *Md-ACS1-2* nesoucí inzerci je zodpovědná za sníženou transkripční aktivitu tohoto genu. Odrůdy jabloní, které mají homozygotní kombinaci alel *Md-ACS1-2/2* produkují menší množství etylénu v porovnání s odrůdami s homozygotní sestavou původní alely *Md-ACS1-1*. Druhý gen *Md-ACO1*, který se spolupodílí na tvorbě etylénu syntézou ACC-oxidázy, obsahuje polymorfismus v lokusu *Md-ACO1*, alela obsahující delecii *Md-ACO-b* se výrazně podílí na zpomalení měknutí dužiny u odrůd jabloní při kombinaci s *Md-ACS1-2/2*, ale nevýznamně se projevuje v kombinaci s genotypem *Md-ACS1-1/2*.

Pomocí molekulárních markerů genů *Md-ACS1* a *Md-ACO1* bylo z 133 hodnocených odrůd jabloní určeno 27 odrůd s homozygotní sestavou alel *Md-ACS1-2* s redukovanou transkripční aktivitou, která zajišťuje velmi nízkou produkci etylénu. Pouze u odrůdy Fuji byly detekovány obě kauzální mutace v lokusech *Md-ACO1* i *Md-ACS1*, které způsobují velmi dlouhou skladovatelnost plodů.

Klíčová slova: jabloň, *Md-ACS1* gen, *Md-ACO1*gen, produkce etylénu, měknutí dužiny, skladovatelnost

Abstrakt

DNA molecular markers can be used in apple breeding programmes to increase breeding efficiency. Apple is a climacteric fruit; ripening is characterized by an increase in respiration accompanied by production of gaseous phytohormone ethylene. Ethylene is the key regulator of apple fruit ripening process, and suppression of the synthesis is the key mechanism by which controlled atmospheres extend the storage life of apples.

In higher plants the ethylene synthesis happens in two steps: The first step generates 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) from S-adenosyl-L-methionine (SAM) by ACC synthase (ACS). The second step converts ACC to ethylene by the action of ACC oxidase (ACO). Fruit softening is an irreversible process of senescence, which results in short shelf - life and storability of apple fruit.

Gene *Md-ACS1*, which is responsible for ethylene biosynthesis, has two allelic forms: *Md-ACS1-1* and *Md-ACS1-2*. Allele *Md-ACS1-2* generally confers low ethylene production. Genotypes homozygous for *Md-ACS1-2/2* allele produce less ethylene than *Md-ACS1-1* genotypes. The other gene *Md-ACO1* also has its role in ethylene biosynthesis. There is a close relationship among ethylene biosynthesis and fruit storability. Allele *Md-ACO-b* strongly reduces fruit softening in combination *with Md-ACS1-2/2*, but hardly works in combination with genotype *Md-ACS1-1/2*.

With help of molecular markers of genes *Md-ACS1* and *Md-ACO1*, of 133 cultivars/selections evaluated, 27 were marked to be homozygous *Md-ACS1-2* with reduced transcription activity, which guarantees very low ethylene production. It was only cultivar Fuji that was detected homozygous for both, *Md-ACO1* and *Md-ACS1*, which cause a very long storability of apple fruit.

Key words: apple tree, *Md-ACS1* gene, *Md-ACO1* gene, ethylene production, softening mass, storage potential.

Obsah

1.	Úvod	3
2.	Cíle práce	5
3.	Literární přehled.....	6
3.1	Systematické zařazení jabloní	6
3.2	Charakteristika jabloní	7
3.3	Šlechtění jabloní	9
3.4	Genetické markery.....	10
3.4.1	Markery založené na polymorfismu DNA.....	12
3.5	Měknutí dužiny jablek	16
3.5.1	Biosyntéza etylénu.....	18
3.5.2	Geny zodpovědné za měknutí dužiny	21
3.5.3	Markery pro geny zodpovědné za měknutí dužiny.....	24
4.	Materiál a metody.....	25
4.1	Rostlinný materiál	25
4.2	Izolace DNA z rostlinného materiálu	25
4.3	Hodnocení kvality a kvantity DNA.....	27
4.4	Analýza <i>Md-ACS1</i> genu	27
4.5	Analýza <i>Md-ACO1</i> genu.....	28
4.6	Elektroforetická separace	28
4.6.1	Příprava gelu	28
4.6.2	Příprava roztoků pro separaci.....	29
4.6.3	Vizualizace a dokumentace gelů	29
4.7	Statistická analýza	31
5.	Výsledky	33
5.1	Izolace DNA	33

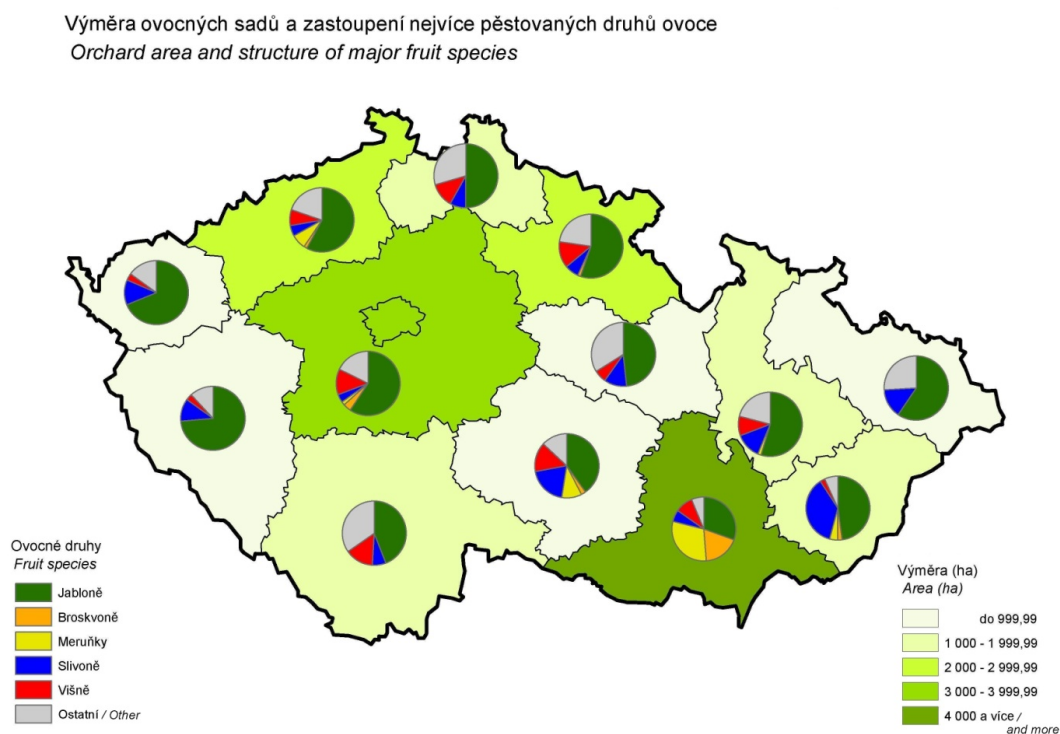
5.2	Detekce alel <i>Md-ACS1</i> a <i>Md-ACO1</i>	33
5.3	Vliv genotypů genů <i>Md-ACS1</i> a <i>Md-ACO1</i> na aritmetické průměry hodnot konzumní zralosti a skladovatelnosti	39
5.4	Frekvence genotypů u genů <i>Md-ACS1</i> a <i>Md-ACO1</i>	49
5.1	Frekvence alel u genů <i>Md-ACS1</i> a <i>Md-ACO1</i>	50
5.2	Frekvence alel a heterozygotů	52
6.	Diskuze.....	56
6.1	Amplifikace markerů <i>Md-ACS1</i>	56
6.2	Amplifikace markerů <i>Md-ACO1</i>	56
6.3	Detekce alelických sestav genů <i>Md-ACS1</i> a <i>Md-ACO1</i>	57
6.4	Prodlužování trvanlivosti jablek.....	59
6.5	Vliv technologie skladování na dlouhodobé uchování jablek.....	61
7.	Závěr	63
8.	Seznam zkratk.....	65
9.	Použitá literatura	66

1. Úvod

Jabloně jsou nejrozšířenějším ovocným druhem v mírném pásu obou polokoulí, tedy i v klimatických podmínkách České republiky. Ovocné sady se v Česku rozkládají na ploše cca 18 000 hektarů, z toho je zhruba 9 000 hektarů jabloňových (obr. 1.). V roce 2009 byla celková produkce jablek 151 000 tun. Nejpěstovanějšími odrůdami jabloní jsou Golden Delicious, Idared, Šampión a Bohemia, což jsou jablka s celkem uspokojivou dobou trvanlivosti, ale vysokou náchylností k houbovým chorobám.

Za Polskem jsou největšími producenty jablek v Evropské unii (EU) Itálie, Francie a Německo. Produkce českých pěstitelů jablek je v porovnání s výrobou celé EU zanedbatelná. Na českém trhu se dovozová jablka podílejí přibližně 40%, každoročně se v české obchodní síti prodá přibližně 120 000 tun jablek. Jablka se do Česka dovážejí především z Polska, Itálie, Německa, Belgie a Nizozemska.

Obr. 1. Výměra jabloňových sadů v ČR (Český statistický úřad, 2008)



Velkou výhodou a předností jablek je možnost jejich dlouhodobého skladování, jimž se dají plody udržet ve svěžím syrovém stavu a zajišťují tak přísun nutričně významných látek po téměř celou část roku. Trvanlivost je základní odrůdovou vlastností, avšak může být ovlivněna celou řadou činitelů, jako jsou např. klimaticko-půdní podmínky stanoviště, použitá podnož, výživa, způsob a doba sklizně a zejména

technika skladování. Délka skladování plodů jabloní je závislá na odolnosti jablek vůči předčasnému měknutí. K měknutí plodů dochází nejen v průběhu skladování, ale především během vyskladnění v průběhu prodeje konzumentům. Nadměrné měknutí plodů negativně ovlivňuje řadu senzorických i chuťových vlastností a snižuje tržní hodnotu.

Jabloně patří mezi vytrvalé rostliny s dlouhou ontogenezí. Šlechtitelské cíle je možné hodnotit přibližně ve třetím roce pěstování, kdy dosahují jabloně plodnosti, tato skutečnost značně komplikuje jejich šlechtění. Pomocí molekulárních markerů lze charakterizovat i velmi raná ontogenetická stádia, což umožňuje značně urychlit a zefektivnit šlechtitelský proces. DNA markery se používají pro hodnocení řady kvalitativních vlastností u jabloní jako např. rezistence vůči patogenům a škůdcům, růstový typ, barva slupky plodů a skladovatelnost.

V této diplomové práci se zabývám právě molekulární detekcí markerů genů *Md-ACS1* a *Md-ACO1*, které jsou zodpovědné za měknutí dužiny plodů jabloní, což výrazně ovlivňuje jejich trvanlivost.

2. Cíle práce

Cílem této práce bylo charakterizovat kolekce odrůd jabloní z hlediska výskytu mutovaných alel lokusů *Md-ACS1* a *Md-ACO1*, které jsou zodpovědné za sníženou tvorbu etylénu během skladování plodů. Dále jsem měla za úkol zhodnocení segregace markerů v hybridních potomstvech a ověření vlivu homozygotních či heterozygotních sestav mutovaných alel na prodloužení doby skladovatelnosti u jednotlivých odrůd v závislosti na období sklizně.

Cíle práce je možné shrnout do následujících bodů:

- Izolace DNA z vybraných odrůd a potomstev hybridních kombinací.
- Optimalizace PCR detekce mutace v promotorech genů *Md-ACS1* a *Md-ACO1*.
- Hodnocení kolekce vybraných odrůd a štěpících potomstev.
- Studium segregace markerů včetně statistického vyhodnocení.
- Posouzení vztahu mezi výskytem markerů a dobou skladovatelnosti u vybraných odrůd jabloní.
- Závěreční zpracování výsledků.

3. Literární přehled

3.1 Systematické zařazení jabloní

Dle botanické klasifikace patří jabloně do oddělení krytosemenných (*Magnoliophyta*), třídy vyšších dvouděložných rostlin (*Rodopsida*), řádu růžotvarých (*Rosales*), čeledi růžovitých (*Rosaceae*), podčeledi jablkovitých (*Maloideae*) a rodu *Malus* (Dvořák *et al.*, 1976; Blažek, 2001). Do tohoto rodu se řadí asi 25 - 30 původních druhů a několik desítek druhů hybridních. Systematika rodu *Malus* není jednoznačná, počet samostatných druhů kolísá v závislosti na autorovi od 11 do 36 druhů (Dvořák a Vondráček 1969; Dvořák *et al.*, 1976; Blažek, 2001).

Rod *Malus* se dělí do pěti sekcí:

- *Eumalus* představuje evropské a asijské druhy s listy s čepelí neoddělenou např. podsekcce *Pumilae* má kalich neopadavý a větší plody, podsekcce *Baccalae* má opadavý kalich a malé plody.
- *Sorbomalus* zahrnuje především plané jabloně Japonska a Číny s malými plody a s listy často dělenými.
- *Chloromeles*, kam patří druhy Severní Ameriky s velkými zelenými nebo žlutými nepoživatelnými, ale aromatickými plody.
- *Eriolobus* s druhem *M. trilobata* Schneid. rostoucím v Malé Asii.
- *Docyniopsis* zahrnuje některé druhy na Dálném východě (Dvořák a Vondráček, 1969).

Všechny kulturní odrůdy jabloní se nyní zařazují do hybridního druhu *Malus x domestica* Borkh. (Blažek *et al.*, 1998). Na vzniku evropských kulturních odrůd se podílely hlavně druhy patřící do sekce *Eumalus* - *M. sylvestris* (L) Mill., *M. pumila* Mill., *M. prunifolia* Borkh., *M. sieversii* Roem. a *M. baccata* (L) Borkh. Právě hybridy pocházející z *M. baccata* Borkh. bývají zejména v Americe nazývány „crab“, mají drobné plody a nakyslou chuť. Při rezistentním šlechtění se používají jako zdroj rezistence k strupovitosti odrůdy *M. floribunda* Sieb., ve šlechtění mrazuvzdorných odrůd *M. prunifolia* Borkh. (Dvořák a Vondráček, 1969; Dvořák *et al.*, 1976; Blažek, 2001).

Malus floribunda Sieb. většina typových podnoží je odvozena od *Malus pumila* Mill., která se vyskytuje na Balkáně, na Kavkaze, v jihovýchodním Rusku, v Kavkazsku, Iránu, Turkestánu až po pohoří Altaj. *Malus sylvestris* (L) Mill. je rozšířena v Evropě, v Zakavkazsku a západním Turkestánu, často bývá špatně rozpoznatelná od *M. pumila* Mill. Plody těchto jabloní jsou velmi rozmanité a připomínají kulturní odrůdy. V Turkestánu a na Kavkaze je možné sledovat celý vývojový proces zavedení plané jabloně do pěstování (Dvořák *et al.*, 1976).

3.2 Charakteristika jabloní

Jabloně rostou jako dlouhověkové stromy nebo keře, do výšky 6 až 10 m. Kulturní odrůdy se značně liší od planých především beztrnnými větvemi, většími listy, velkými a jakostními plody. Listy mají vesměs opadavé, uspořádané do vzestupné genetické spirály, nedělené, celistvé nebo laločnaté. Morfologie listů je odrůdově podmíněná. Čepel může být elipsoidní, vejčitá, srdčitá až okrouhlá. Povrch listů může být lesklý, matný, hladký nebo plstnatý (Blažek, 2001; Dvořák *et al.*, 1976).

Druhy rodu *Malus* i kulturní odrůdy jsou diploidní (mají 34 chromozómů), triploidní (s 51 chromozómy) i tetraploidní (s 68 chromozómy). Většina botanických druhů je diploidní, až na sekci *Chloromeles*, kde jsou kromě diploidních druhů *M. ioensis* Alph. a *M. angustifolia* Ait. pouze formy polyploidní. Všechny pěstované odrůdy jsou cizosprašné a vyžadují vhodného opylovače. Některé odrůdy mohou mít v teplých oblastech sklon k samosprašnosti. Významná je pylová inkompatibilita buď morfologického, fyziologického nebo anatomického utváření, která je současně geneticky podmíněná (Blažek, 2001; Dvořák *et al.*, 1976).

Oboupohlavné květy v chocholících jsou bílé, narůžovělé až červené. Kalich přirostlý k šišuli se skládá z pěti lístků, koruna z pěti plátků. Tyčinek se žlutými prašníky je zpravidla 20 až 25 a jsou uspořádány ve třech kruzích. Pětipouzdrý semeník je spodní se srostlými, na horním konci volnými čnělkami. Počet vajíček v semeníku kolísá mezi 10 - 20. Doba květu je závislá na odrůdě, stanovišti i klimatu. U nás kvetou jabloně po hrušních. V době rozkvětu je nejdříve a nejlépe vyvinut terminální květ (Dvořák a Vondráček, 1969; Walter, 1997).

Na vzniku plodu se podílí semeník a částečně kalich. Malvice obsahují obyčejně v pěti pouzdrech po dvou hnědých semenech (jádrech). Triploidní odrůdy mají špatně vyvinutá semena, která rovněž špatně klíčí. Jablka neobsahující jádra jsou

partenokarpická. Dužina obklopující jádřinec vznikla zdužnatěním češule. Z každého květu se vyvine plod. Při prvním opadu (po odkvětu) opadávají květy, v červnu opadávají již malé plody a před sklizní již vyvinuté plody. Jestliže se vyvine více jak 5 % květů, bývá úroda ještě velmi dobrá (Blažek, 2001; Dvořák *et al.*, 1976).

Velikost plodů je závislá jednak na druhu a odrůdě, jednak na způsobu ošetření. Mají specifickou váhu 0,75 až 0,9. Obsahují kolem 84 % vody, 8 % invertního cukru, 4 % třtinového a řepného cukru, 0,9 % buničiny, 0,5 % pentosanů, 0,4 % ligninu, 0,6 % volných kyselin především jablečné a citronové, 0,2 % vázaných kyselin, 0,3 % pektinových látek, 0,3 % tuku, 0,1 % tříslovin, 0,3 % popelovin a 0,4 % dusíkatých látek (Dvořák a Vondráček, 1969).

Jablka mají nízkou kalorickou hodnotu, obsahují málo bílkovin a tuků, nejvyšších obsahových hodnot dosahují tedy cukry. Cukry podléhají v plodech neustálým změnám. Během dozrávání plodů v nich téměř úplně mizí škrob a rychle se zvyšuje obsah sacharózy, která vlivem enzymů přechází ve fruktózu, takže plody sládnou. Přezráváním se obsah cukrů opět snižuje. Odrůdy, které dozrávají později, mají zpravidla vyšší obsah cukrů než odrůdy dozrávající dříve, velký vliv na obsah cukrů má i stanoviště. Z cukrů je nejvíce obsažena v jablkách sacharóza, fruktóza a glukóza, cukernatost kolísá mezi 6 - 16 % (Dvořák *et al.*, 1976). Sladkost plodů není ale podmíněna množstvím cukrů, nýbrž poměrem kyselin k cukrům. Třísloviny způsobují trpkou chuť plodů, zvláště při nižší cukernatosti, ovlivňují procesy trávení a způsobují hnědnutí dužiny. Při dozrávání plodů se obsah tříslovin snižuje. Jablka obsahují daleko vyšší hodnoty cukrů než hrušky. Obsah celulózy a pentozanů je poněkud nižší než u hrušek, zatímco pektinů je více než v hruškách. Z vitamínů je nejvíce zastoupen vitamín C, ve 100 g čerstvé dužiny se jeho obsah pohybuje v rozmezí 1,5 - 50 mg, ostatní vitamíny jsou obsaženy mnohem méně (Dvořák a Vondráček, 1969; Dvořák *et al.*, 1976).

Semena obsahují většinou asi 25 % oleje. Tvar plodů je velmi rozmanitý. Existují odrůdy s plody kulovitými, zploštělými, plochými, válcovitými, soudkovitými, kuželovitými, zvonkovitými a žebernatými. Také povrchová textura slupky může být různá - hladká, zdrsňená, mastná, suchá, lesklá. Barva slupky bývá zelená, žlutá až červená s různými přechody a zbarvením. Charakter slupky se u různých odrůd liší pevností, tuhostí, jemností apod. Také struktura, chuť, aroma, šťavnatost a barva dužiny jsou charakteristickými znaky odrůd. Struktura dužiny bývá jemná, chruplavá,

měkká, tuhá, hrubá. Chuť bývá sladká, navinule nebo výrazně sladká, aromatická, navinulá, kyselá, trpká, nahořklá (Dvořák a Vondráček, 1969).

3.3 Šlechtění jabloní

Prvotním místem vzniku kulturních jabloní je nejspíše oblast Zakavkazí, Iránu a západního Turkestánu. Odtud se tyto kvalitnější druhy šířily hlavně na jihozápad Malé Asie a dále přes Řecko a Itálii do ostatních částí Evropy (Dvořák a Vondráček, 1969; Dvořák *et al.*, 1976).

První písemné doklady o pěstování odrůd jabloní se objevují již ve starověkém Řecku asi 287 př.n.l. a v Římě. Římané také již ve starověku znali roubování a rozšiřovali tak ušlechtilé odrůdy i severně od Alp (Dvořák a Vondráček, 1969).

Slované začali pěstovat jabloně po vzoru Řeků, Římanů a Keltů prostřednictvím poznatků od věrozvěstů Cyrila a Metoděje, především v klášterních zahradách. Teprve během vlády Karla IV. nastává v našich zemích rozkvět ovocnářství. Nové odrůdy vznikaly především výběrem z náhodného sprášení.

V roce 1670 již bylo známo 153 odrůd. Na konci 18. století byla u nás založena Matějem Rösslerem první sbírka ovocných odrůd, z toho bylo 266 odrůd jabloní. Původně se pěstoval v ovocných zahradách a sadech velký počet odrůd. V 19. století se však u nás začal uplatňovat požadavek obchodníků na menší počet odrůd, pochopitelně nejlépe vyhovujících požadavkům konzumenta. V roce 1830 vznikla v Čechách Pomologická společnost, jejímž úkolem bylo udržet známé osvědčené odrůdy, vyhledat a vyzkoušet nové, správně je označit, pojmenovat a pečovat o všeobecné rozšíření (Dvořák a Vondráček, 1969; Dvořák *et al.*, 1976).

Jablka jsou v našich zemích tradičním ovocem, a proto se jejich výzkumem v současné době zabývá několik vědeckých pracovišť. Šlechtění jabloní bylo zaměřeno především na zlepšení kvality plodů a na dosažení vyššího výnosového potenciálu v místních ekologických podmínkách. Šlechtění s využitím genetického inženýrství může doplnit tradiční metody, které mají nevýhody jako je vysoce heterozygotní charakter genomu jabloní a dlouhý reprodukční cyklus (Blažek, 2001; Tartarini, 2002; Walter, 1997).

Zaměření genetických modifikací v posledních letech je především na odolnost proti chorobám a škůdcům např. k rezistenci proti strupovitosti, či k odolnosti proti mrazům. Dochází k rozvoji intenzivních pěstitelských systémů, uplatňují se nízké

tvary stromů stejnoměrného růstu ve větších hustotách, které jsou vhodné pro velkovýrobní technologii pěstování a mechanickou kultivaci i sklizeň. Dochází k zvyšování požadavků, jak na tvar, velikost, atraktivní zbarvení slupky a dužiny, tak na trvanlivost a skladovatelnost jablek (Dvořák *et al.*, 1976).

Jabloně se množí vegetativně, pomineme-li mutace, vznikají dceřiné rostliny geneticky shodné s původní mateřskou rostlinou - klony. Genotypy se udržují především xenovegetativním množení - roubováním a očkováním na vhodné podnože. Proto se v posledních desítkách let věnuje výrazná pozornost i šlechtění podnoží (Blažek *et al.*, 1998; Blažek, 2001; Walter, 1997).

V šlechtění jabloní se využívá především selekce semenáčů ze záměrného kombinačního křížení, selekce spontánní či indukované mutace nebo selekce transgenních rostlin (Ondřej a Drobník, 2002) vzniklých metodami genetického inženýrství.

Na rozdíl od jiných zemědělských plodin se šlechtění ovocných dřevin vyznačuje značnou dlouhodobostí. U jabloní trvá šlechtitelský cyklus minimálně 10 let, je limitován délkou juvenilní fáze, která končí generativní dobou. Proto je snaha co nejvíce zkracovat juvenilní fázi. K tomu účelu se používají různé pěstitelské postupy, technické prostředky i genetická variabilita, a však ne vždy jsou výsledky uspokojivé (Blažek *et al.*, 1998; Blažek, 2001). Vhodné rodičovské vlastnosti se z důvodů heterozygotního charakteru genomu jabloní v potomstvech štěpí, proto je snaha o rozvoj nových technik zajišťujících včasnou selekci semenáčů (Janick *et al.*, 1996; Walter, 1997).

V posledních letech dochází k rozvoji technik genového inženýrství, především k markerování významných genů. Výhodou je možnost rychlé selekce již během juvenilní fáze. Díky tomu se celý proces tvorby nových odrůd podstatně zrychluje.

3.4 Genetické markery

Se vzrůstající úrovní poznatků v oblasti analytických metod, molekulární genetiky a mapování genomu kulturních rostlin dochází k rozvoji aplikace genetických markerů v selekčních postupech. Molekulární markery, které jednoduše a stabilně signalizují přítomnost některé mnohem komplexněji založené vlastnosti v genotypu sledovaného jedince, stále častěji doplňují klasické metody genetických analýz. Dříve byly využívány především markery bílkovinné povahy- zásobní

bílkoviny a izoenzymy. Nepříznivou vlastností těchto bílkovinných markerů je jejich ontogenetická specifčnost, z tohoto hlediska jsou velice náročné na včasnost a přesnost stanovení. Charakteristické pro jejich analýzu je nutnost zachování enzymatické aktivity. Používají se v odrůdovém zkušebnictví, semenářské kontrole a při ověřování pravosti odrůd (Soltis a Soltis, 1989).

Dnes jsou markery založeny především na přirozeném výskytu polymorfismu sekvencí DNA a mohou charakterizovat celý genom. Vývoj metod pro detekci polymorfismu DNA a jeho využití pro fyzikální mapování, populační genetiku či šlechtění je jedním z nejdůležitějších mezníků molekulární genetiky (Janick *et al.*, 1996).

Pro účely molekulárních markerů se hodí především sekvence vyznačující se vysokým stupněm polymorfismu, častým a rovnoměrným výskytem v celém genomu, které generují mnohočetné, nezávislé a spolehlivé markery s vysokou reprodukovatelností. Musí poskytovat adekvátní rozlišení, rychlé a finančně nenáročné testování a měly by být nezávislé na vnějších podmínkách (Henry, 1997).

Mezi nejstarší typy markerů patří anatomicko-morfologické, které jsou založené na morfologických zvláštnostech, které nepřímo signalizují skrytou kvalitu např. fialová barva květů hrachu či bobu koreluje s vysokým obsahem antinutričních látek, nebo velikost a počet chloroplastů svěřacích buněk průduchů korelují se stupněm ploidie sledované rostliny. Další skupinou jsou fyziologické markery založené na sledování produktu určité biochemické dráhy, např. exprese genů *GUS* nebo genů rezistence k herbicidům koreluje s přítomností transgenů v pletivech. Nejpokročilejší a nejvariabilnější skupinou jsou biochemicko-genetické markery založené na analýze produktů exprese genů- proteinové markery nebo RNA analýza, nebo přímo genů samotných - DNA markery, založené na analýze polymorfismu bílkovin nebo fragmentů nukleových kyselin pomocí elektroforetické separace (Glick a Thompson, 1993; Henry, 1997; Tanksley, 1983).

Existuje celá řada různých typů molekulárních markerů a rozdíly v metodách jejich charakterizace vyžadují pečlivý výběr vhodného postupu. Nutné je zvážit dostupnost metody pro danou laboratoř, technickou, finanční a časovou náročnost, dostupnost DNA z hlediska její kvality i kvantity a v neposlední řadě charakter dědičnosti znaku či předpokládanou úroveň polymorfismu ve studované populaci. Molekulární markery obvykle nekorelují s fenotypem, zato jsou stabilní a detekované

ve všech pletivech a orgánech rostliny bez ohledu na její vývojové stádium a vlivy prostředí, pleiotropií účinky či genové interakce, epistáze (Glick a Thompson, 1993; Janick *et al.*, 1996).

Metody detekce polymorfismu DNA lze rozdělit na dvě skupiny. První jsou metody, které nejsou založené na PCR (Polymerase Chain Reaction), ale na hybridizaci DNA - DNA profily jsou vizualizovány hybridizací fragmentů genomické DNA štěpené restriční endonukleázou se značenou sondou. Druhá skupina metod založených na PCR - *in vitro* amplifikace pomocí specifických nebo nespecifických primerů (Glick a Thompson, 1993; Henry, 1997)

Mezi monogenně řízené vlastnosti jabloní, které lze detekovat pomocí PCR, můžeme zařadit například: resistenci vůči strupovitosti řízenou Vf genem, A-alely určující zbarvení slupky plodu, typ S-alel, které jsou odpovědné za autoinkompatibilitu jabloní, gen Co markerující sloupcový růst jabloní a marker genu *Md-ACS1*, který má vliv na produkci etylénu a tedy na zrání a měknutí dužniny plodů (Vejl *et al.*, 2005; Zoufalá *et al.*, 2009).

3.4.1 Markery založené na polymorfismu DNA

Polymorfní DNA je taková sekvence DNA, ve které lze v populaci nalézt jakoukoliv strukturní alternativu, prvotně danou substitucí báze v DNA. Polymorfismus lze definovat jako výskyt více než dvou genetických variant - alel genu v rámci jednoho druhu. Primární příčinou vzniku polymorfismu nukleových kyselin je bodová mutace, která může změnit pouze jednu bázi, nebo sekvenci několika nukleotidů. V průměru dochází k mutaci nukleové kyseliny na každou 100. bázi, strukturní gen obsahuje tisíc až tři tisíce bází, v každém strukturním genu je tedy několik desítek mutací. Existují však reparační mechanismy, které snižují výskyt vzniklých chyb. Enzymy endonukleázy výrazně redukují výskyt chyb v genomu, až na jednu setinu původního výskytu (Hruban *et al.*, 1999; Vejl *et al.*, 2002, Watson *et al.*, 1988).

Restriční endonukleázy se používají k detekci bodového polymorfismu, jsou schopné najít specifické místo, kde DNA rozštěpí. Vzniklé různě dlouhé fragmenty se oddělují pomocí gelové elektroforézy (Glick a Thompson, 1993; Henry, 1997).

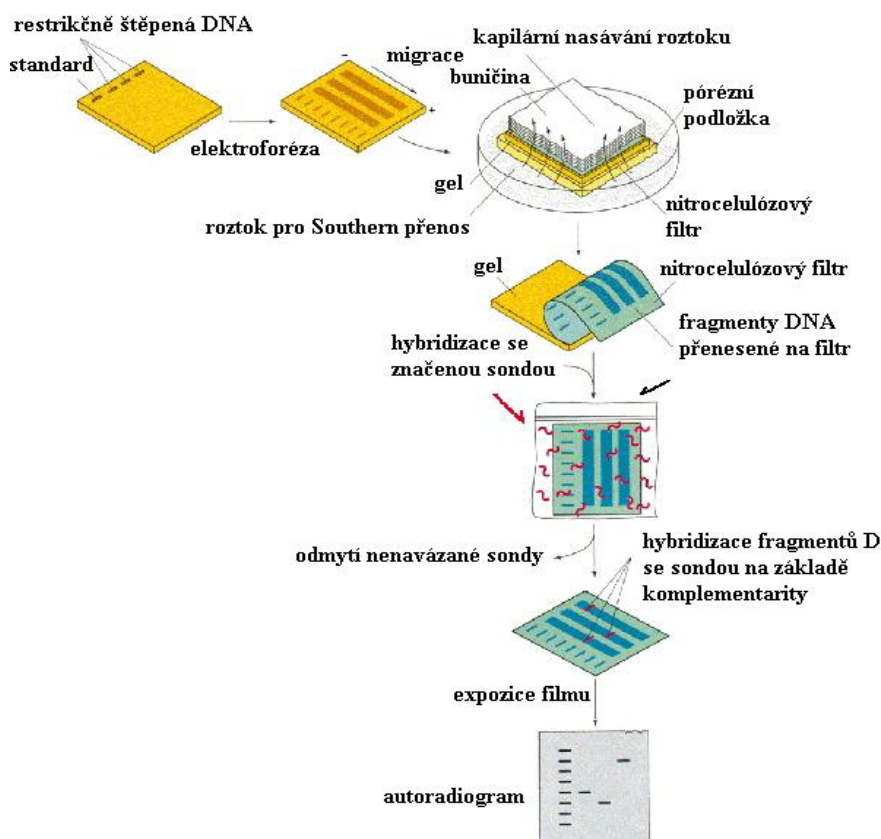
Aktuálně nejpoužívanějším prostředkem identifikace variability a vzniku polymorfní DNA je použití genetických markerů. Hlavní funkcí genetických markerů

je schopnost detekce alelických variant v sekvenci nukleotidů (Glick a Thompson, 1993; Henry, 1997; Tanksley, 1983). Princip DNA markerů je založen na specifickém restričním štěpení analyzované DNA, následné hybridizaci se značenou sondou, amplifikaci specifických fragmentů *in vitro* podmínkách a na různých kombinacích restričního štěpení a amplifikace. Vysoký polymorfismus DNA umožňuje detekovat konkrétní genový klastr, gen, konkrétní úsek genu nebo i jednotlivé bodové mutace, které mohou, ale i nemusí mít funkční důsledky ve stavbě proteinů. Pomocí DNA markerů lze charakterizovat i velmi raná ontogenetická stádia při minimálním množství biologického materiálu. Hlavním nedostatkem těchto markerů je, že zatím neumožňují popsat složité vztahy genů a genových komplexů, dokážou pouze detekovat geny. Projev genů ve fenotypu je potom již určován případnou interakcí genu s genovým pozadím a u kvantitativních znaků s vnějším prostředím. Mezi nejčastěji používané metody analýzy DNA patří metody označené zkratkami RFLP, PCR, RAPD a AFLP (Hruban *et al.*, 1999; Vejl *et al.*, 2002)

3.4.1.1 Délkový polymorfismus restričních fragmentů - RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

Princip této metody spočívá v detekci délkového polymorfismu fragmentů vzniklých štěpením pomocí restričních enzymů. Izolovaná DNA se rozštěpí restričními endonukleázami a získané fragmenty se podle velikosti oddělí na gelové elektroforéze. Z gelu se rozdělené fragmenty přenesou na nitrocelulózový filtr, který se vloží do nádoby s roztokem obsahujícím radioaktivně značenou sondu. Sonda se komplementárně naváže na fragmenty DNA, čímž umožní jejich detekci. RFLP markery jsou kodominantní, umožňují odlišit dominantního homozygota, heterozygota a recesivního homozygota, využívají se ke studiu kvalitativně i kvantitativně determinovaných znaků (Ondřej, 1992; Vejl *et al.*, 2002).

Obr. 2. Schéma metody RFLP- upraveno podle Ellison (1997)



3.4.1.2 Polymerázová řetězová reakce - PCR (Polymerase Chain Reaction)

Objevení termostabilní DNA polymerázy a následné namnožení úseku DNA v *in vitro* podmínkách v 80. letech minulého století znamenalo rychlý rozvoj PCR markerů, umožňujících amplifikaci jediné molekuly DNA a detekci jedné kopie genu (Innis a Gelfand, 1990). Tento zautomatizovaný proces simulující replikaci DNA probíhající ve zkumavce ve velmi malém objemu reakční směsi má za úkol syntetizovat požadované poměrně krátké fragmenty DNA vybrané z celkového genomu. V buňce je replikace prováděna za spotřeby ATP enzymatickým komplexem (Glick a Thompson, 1993). Naproti tomu PCR využívá jediný enzym - DNA polymerázu. Počet kopií templátové DNA závisí na počtu cyklů amplifikace, lze tedy dosáhnout namnožení libovolného množství DNA (Saiki a Gelfand, 1989; Sambrook *et al.*, 1989; Innis a Gelfand, 1990).

Metoda PCR je založena na cyklickém opakování tří teplotních fází - denaturace DNA, nasedání primerů „annealing“ a prodlužování nově vzniklého řetězce DNA (Griffin a Griffin, 1994; Innis a Gelfand, 1990). Z důvodů vysokých teplot (94 - 95 °C),

kteřé se používají pro denaturaci dvouřetězcové nukleové kyseliny, je jediným enzymem schopným si zachovat vysokou polymerázovou aktivitu nejvíce používaná termostabilní polymeráza *Taq* DNA polymeráza izolovaná z bakterie *Thermus aquaticus* žijící v termálních pramenech (Henry, 1997; Innis a Gelfand, 1990). V současné době se používá *Taq* DNA polymeráza, která je produktem genového inženýrství, má specifickou aktivitu 200000 U.mg⁻¹ organismů a molekulovou hmotnost 93310 Da (Vejl *et al.*, 2002). Denurací, která trvá 15 - 30 sekund získáme díky rozvolnění vodíkových můstků jednořetězcovou DNA. Jednořetězcové molekuly DNA jsou nezbytným substrátem pro enzymy DNA polymerázy (Glick a Thompson, 1993; Watson *et al.*, 1988).

Dalším krokem je hybridizace primerů. Požadované fragmenty jsou vybírány pomocí specifických ssDNA molekul - primerů o velikosti 8 - 25 bp které se na základě komplementarity váží na templátové vlákno. Nasedání primerů je označováno termínem „annealing“ a probíhá podle jednotlivých modifikací PCR při teplotách od 35 °C do 65 °C (Hruban a Majzlík, 2005). Ochlazení roztoku denaturované templátové DNA umožní vytvoření krátkého dvouřetězcového fragmentu s volnou 3' hydroxylovou skupinou, nutného pro zahájení prodlužovací fáze - extenze (Glick a Thompson, 1993; Innis a Gelfand, 1990; Sambrook *et al.*, 1989).

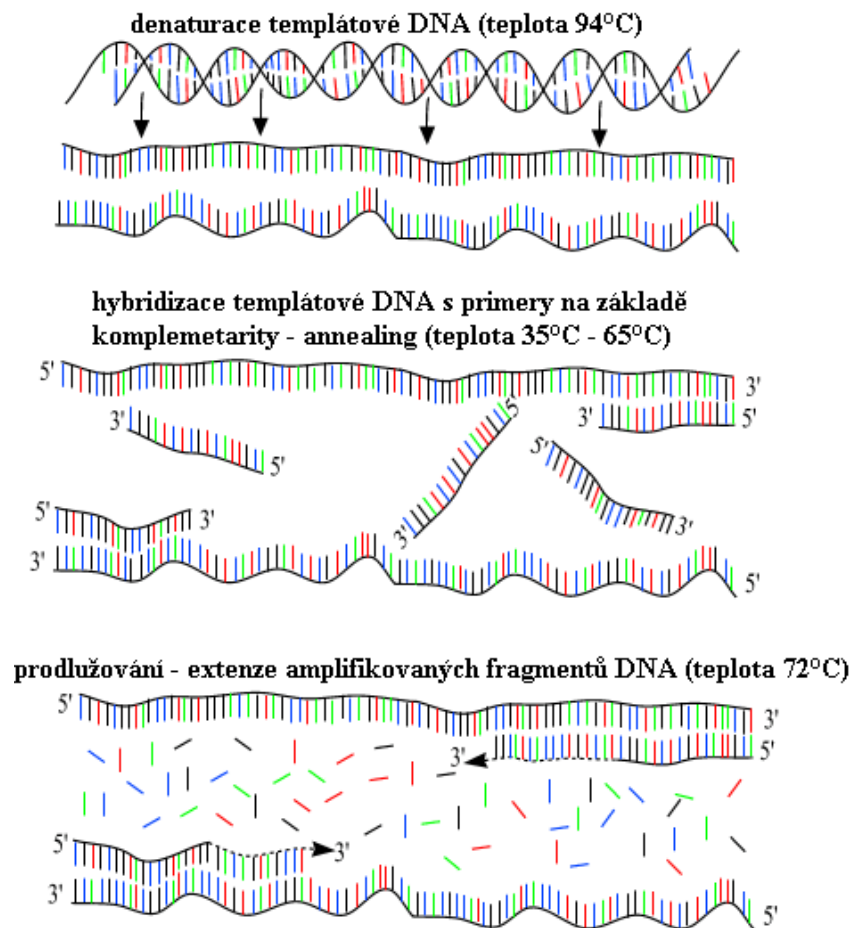
Zabudování volných nukleotidů do nově vznikajícího vlákna pomocí enzymu *Taq* DNA polymerázy obvykle při 72 °C začíná od jednoho primeru a délka řetězce je vymezena druhým primerem (Gelfand a White, 1990; Sambrook *et al.*, 1989). Počet cyklů je závislý na optimalizaci konkrétní reakce a na množství templátové molekuly DNA, obvykle 25 - 45 cyklů (Vejl *et al.*, 2002). Detekovaným markerem je potom fragment nebo směs fragmentů DNA, které po elektroforetické separaci zanechávají charakteristický elektroforetický profil.

Výše popsaná metoda se obvykle označuje jako SPLAT-PCR (Specific Polymorphic Locus Amplification Test), synonymum pro tento postup je STS marker (Single Tagged Site). Metod založených na PCR je celá řada a lze je kombinovat i s restrikčním štěpením. Metoda se potom nazývá CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence) označována rovněž jako PCR-RFLP. Další metodou využívající restrikční štěpení je AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism). Lze amplifikovat i náhodné fragmenty pomocí metody RAPD (Random Amplified

Polymorphic DNA) neboli náhodná amplifikace polymorfní DNA, kdy je použit pouze jeden náhodný primer nejčastěji o velikosti 10 nukleotidů. Modifikovaný postup RT-PCR - zpětné neboli reverzní PCR je určený pro amplifikaci RNA. Přepis molekuly RNA do molekuly cDNA je zajištěn reverzní transkriptázou (Glick a Thompson, 1993; Hruban a Majzlík, 2005; Innis a Gelfand, 1990; Vejl *et al.*, 2002).

Genetické markery mohou být jak dominantní, tak kodominantní povahy. Kodominantní markery dokážou odlišit jednotlivé genotypy, kdežto dominantní marker pouze informuje o přítomnosti nebo absenci dominantní alely (Glick a Thompson, 1993; Hruban a Majzlík, 2005; Innis a Gelfand, 1990).

Obr. 3. Schéma metody PCR - upraveno podle Vierstraete (2001)



3.5 Měknutí dužiny jablek

Měknutí dužiny je nevratným procesem stárnutí plodů, způsobující snížení délky trvanlivosti a skladovatelnosti jablek. Měknutí dužiny má vliv na sensorické vlastnosti plodů, jako je pevnost, barva slupky, konzistence, šťavnatost, křehkost,

chuť i zvýšenou moučnatost dužiny (Giovannoni, 2004; Harker *et al.*, 1997; Harker *et al.*, 2002; Jaeger *et al.*, 1998; Picton *et al.*, 1995). Doba trvanlivosti jablek je především geneticky podmíněna odrůdou, ale i stupeň zralosti při sklizni a podmínky skladování ji výrazně ovlivňují (Defilippi *et al.*, 2005; Johnston *et al.*, 2002; Saftner *et al.*, 2002; Zhu a Barritt, 2008).

Doba zrání je dědičně založená odrůdová vlastnost, ovlivňovaná klimatickými a stanovištními podmínkami i způsobem pěstování. Rozlišujeme dospívání plodů tj. proces zrání na stromě, který končí sklizňovou (fyziologickou) zralostí, a vlastní zrání, ke kterému dochází až po sklizni a které končí konzumní zralostí. V době sklizňové zralosti se plody zpravidla lehce oddělují od plodonoše a mají hnědě zbarvená semena. Pouze letní odrůdy při sklizňové zralosti nemají semena obvykle ještě vybarvena (Dvořák a Vondráček, 1969; Dvořák *et al.*, 1976). Childers (1969) uvádí, že plody sklizené v optimální sklizňové zralosti trpí nejméně fyziologickými skládkovými chorobami během skladování. Naproti tomu zralost konzumní je stupněm vyzrání plodů, ve kterém mají jablka nejvyšší chuťovou hodnotu a nejlepší vzhled.

Nejvhodnější doba sklizně je z pěstitelského a zvláště obchodního hlediska velmi významná, ale neexistuje dosud jednoznačná metoda určování sklizňové zralosti, která by byla použitelná ve všech oblastech a u všech odrůd. Zralost sklizňová a konzumní se časově téměř kryje pouze u letních odrůd, které mají všeobecně krátkou skladovatelnost. Podzimní a zimní odrůdy konzumně dozrávají teprve po uskladnění i několik měsíců po sklizni (Defilippi *et al.*, 2005; Dvořák a Vondráček, 1969; Goliáš, 2009).

Odrůdy jablek mají různé nároky na podmínky skladování, rozhodující je teplota a vlhkost. Příznivé podmínky skladování prodlužují uchovatelnost plodů zejména u odrůd podzimních a zimních. Obvykle se skladují při teplotě o až +1 °C při relativní vlhkosti 80 - 90 %. V těchto podmínkách jsou ztráty na váze velice malé, po šestiměsíčním uložení nepřesahují 5 % a šíření chorob je omezeno. Některé odrůdy však při nízkých teplotách trpí hnědnutím dužiny, a proto se musí skladovat při vyšší teplotě nad +3°C, optimální vlhkost zůstává kolem 80 - 90 %. Při optimálním skladování je trvanlivost u zimních odrůd o 2 - 3 měsíce vyšší (Dvořák a Vondráček, 1969; Dvořák *et al.*, 1976). Ideální jsou sklady s upravenou atmosférou, v nichž se reguluje teplota, vlhkost i složení vzduchu - zvýšená koncentrace oxidu uhličitého a snížená koncentrace kyslíku (Costa *et al.*, 2005; Dvořák a Vondráček, 1969; Goliáš,

2009)). Některé odrůdy produkují velmi malé množství etylénu a mohou být skladovány při nízkých teplotách až jeden rok, aniž by došlo k zhoršení jejich kvalitativních parametrů (Harada *et al.*, 2000; Sunako *et al.*, 1999).

Jablka patří mezi klimakterické ovoce, zrání je způsobeno zvýšením poměru mezi dýcháním a produkcí etylénu. Etylén je nejen zrajícím plodem uvolňován do vzduchu, ale sám jeho zrání zpětně urychluje a to i u plodů sousedních. Řada dalších biochemických změn doprovází tzv. klimakterium, dochází např. k zesílení respirace, přestavbě buněčné stěny - hydrolýze pektinů v buněčných stěnách a přeměně škrobu na cukr (Defilippi *et al.*, 2005; Jobling *et al.*, 1991; Kende, 1993; Powell *et al.*, 2003; Procházka *et al.*, 1998). Komplexní přestavba buněčných stěn během dozrávání probíhá činností enzymů např. polygalakturonáz, endo-1,4- β -glukonáz, pektin - methylesteráz, pektinových hydroláz a glykosidáz (Dong *et al.*, 1992; Brummell a Harpster, 2001; Powell *et al.*, 2003; Rose *et al.*, 1997). Právě etylén však hraje klíčovou roli v procesu zrání a je považován za hlavní příčinu měknutí dužiny plodů (Dong *et al.*, 1992; Giovannoni, 2004; Harada *et al.*, 2000).

3.5.1 Biosyntéza etylénu

Etylén je nejjednodušší uhlovodík s dvojnou vazbou a jediný plynný fytohormon. Již v roce 1901 byly popsány účinky etylénu (jako složky svítiplynu) na vývoj a růst rostlin. Ve třicátých letech bylo prokázáno, že etylén syntetizovaný v rostlinách je zodpovědný za zrychlené dozrávání plodů. Intenzivní výzkum etylénu začíná až v šedesátých letech minulého století díky plynové chromatografii. Etylén je značně reaktivní, snadno se oxiduje za vzniku etylénoxidu, etylénglykolu až formaldehydu (Kende, 1993; Luštinec a Žárský, 2003; Procházka *et al.*, 1998).

Etylén v malých koncentracích inhibuje prodlužovací růst a stimuluje radiální růst, dochází tak ke ztrátě gravitropické reakce a inhibici růstu kořenů. Redistribuce růstu ze směru podélného do příčného je spojena se změnou roviny buněčného dělení, reorientací mikrotubulů a celulósových mikrofibril podélně ke směru růstu.

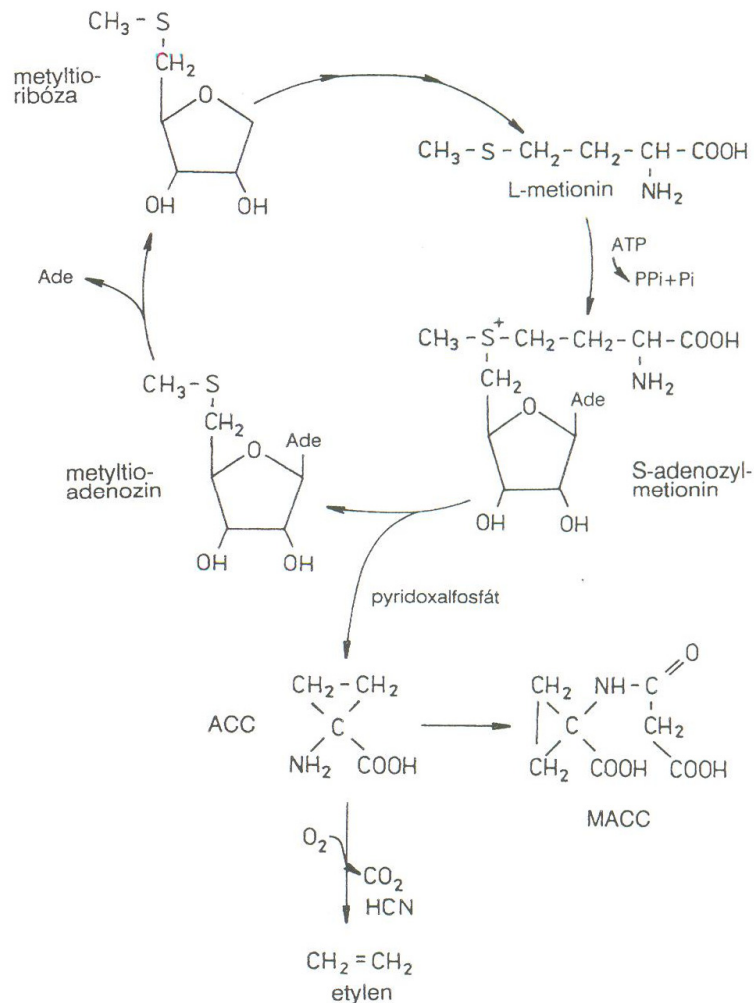
U vodních rostlin dochází k opačnému účinku, prodlužovací růst stonku a řapíků stimuluje. Jedná se o adaptaci, díky které se ponořené listy hromaděním etylénu navrátí nad hladinu. Také urychluje stárnutí pletiv a vyvolává opadávání listů, květů a plodů. (Luštinec a Žárský 2003; Procházka *et al.*, 1998). Je možné, že se

etylén účastní i regulace gravitropismu při klíčení semen některých dvouděložných rostlin a při epinastii listů (Procházka *et al.*, 1998).

Tento plynný fytohormon vzniká ve vyšších rostlinách a ve většině nižších z aminokyseliny L- metionu. Jako první meziprodukt vzniká S-adenosyl- L-metionin (SAM), který je dále přeměněn na kyselinu 1-aminocyklopropan-1-karboxylovou (ACC) a metyltioadenosin (obr. 4.). ACC je pak oxidována za vzniku etylénu, oxidu uhličitého a kyanovodíku. Koncentrace etylénu v buňce je velmi nízká, což je dáno jeho difundací do intracelulár a odtud do atmosféry. Ale téměř ve všech pletivech rostlin se nachází konjugovaná forma prekurzorů etylénu- kyselina 1-aminocyklopropan-1-karboxylová s kyselinou malonovou, N-malonyl-ACC (MACC), jeho obsah výrazně stoupá v podmínkách, ve kterých vzrůstá syntéza ACC např. při zrání ovocných plodů a zejména při působení stresových reakcí. Konjugát MACC je fyziologicky neaktivní a jen v malé míře je štěpen zpět na ACC (Kende, 1993; Procházka *et al.*, 1998).

Přeměna SAM na ACC je katalizována dvěma enzymy 1-aminocyklopropan-1-karboxyl syntázou (ACS) a 1-aminocyklopropan-1-karboxyl oxidázou (ACO). Enzym ACS je lokalizován v cytoplazmě a jako kofaktor vyžaduje pyridoxalfosfát. Má krátkou životnost a *in vitro* je značně nestálý, jeho syntéza *de novo* je indukována mnoha vnějšími faktory - zářením, teplotou, koncentrací kyslíku, oxidu uhličitého a také auxiny. Aplikace přirozených či syntetických auxinů výrazně zvyšuje tvorbu etylénu. ACC-syntázu lze specificky inhibovat reakcemi, které vyžadují pyridoxalfosfát jako kofaktor, např. kyselinou aminoxyoctovou nebo aminoetoxyvinylglycinem. (Bleecker a Kende, 2000; Kende, 1993; Procházka *et al.*, 1998).

Obr. 4. Syntéza etylénu (Procházka *et al.*, 1998)



Mezi antagonisty etylénu patří ionty Ag⁺ a některé cykloalkany, z nichž nejznámější je 5- norbornadien nebo 1-methylcyklopropen. Tyto látky ruší fyziologické účinky etylénu, tím že ho vytěsňují kompetitivně z vazby, nebo obsazují jeho funkční vazebná místa na receptoru (Smith *et al.*, 1990). Potlačení biosyntézy etylénu je hlavním mechanismem uchovávání plodů v řízené atmosféře (Gorney a Kader, 1996). V posledních letech se i na českém trhu objevila nová perspektivní metoda pro skladování jablek „SmartFresh“. Systém je založen na jednorázové aplikaci inhibitoru etylénu MCP (1-methylcyklopropenu). Je to látka netoxická, která brání dozrávání plodů a používá se ve velmi malých koncentracích. MCP se aplikuje do 6 dnů po sklizni na dobu 24 hodin, poté proces skladování pokračuje jako obvykle. Tato metoda umožňuje pěstitelům a distributorům udržet vysokou kvalitu v průběhu skladování, ale její efekt je patrný i po vyskladnění a u konečného spotřebitele. „SmartFresh“ zlepšuje fyziologické vlastnosti a vzhled plodů, jejich svěžest,

šťavnatost, vyváženost kyselin a také pevnost dužiny (Husáková, 2009). Jablka ošetřená 1-methylcyklopropenem vykazují sníženou syntézu etylénu a dochází u nich k zpomalení procesů senescence v porovnání s kontrolními neošetřenými plody (Defilippi *et al.*, 2004; Watkins *et al.*, 2000).

Inhibice tvorby etylénu může být způsobena i sníženou hladinou CO₂ v uzavřeném prostoru. Produkce etylénu podléhá zpětnovazebné regulaci, autokatalýze i autoinhibici. Autokatalýza se projevuje především při inkubaci preklimakterických ovocných plodů v atmosféře tohoto plynného hormonu, která indukuje prudký vzrůst vlastní syntézy etylénu v plodech. Jako příklad autoinhibice lze uvést tvorbu stresového etylénu, která je inhibována preinkubací v atmosféře etylénu (Abeles a Biles, 1991, Jobling *et al.*, 1991; Oraguzie *et al.*, 2004; Procházka *et al.*, 1998).

3.5.2 Geny zodpovědné za měknutí dužiny

Enzymy zajišťující katalýzu biosyntézy etylénu a jeho akumulaci v orgánech jsou kódovány dvěma velkými genovými rodinami ACS a ACO se vyskytují v různých pletivech a ontogenetických fázích u vyšších rostlin, ale ne všechny se účastní jeho uvolňování v průběhu dozrávání plodů a měknutí dužiny (Barry *et al.*, 2000; Bleecker a Kende, 2000; Binnie *et al.*, 2009; Hunter *et al.*, 1999)

U jabloní bylo identifikováno několik genů účastnících se měknutí dužiny.

Geny *Md-ACS1* jsou zodpovědné za expresi enzymu ACC-syntázy, díky kterému dochází k syntéze ACC z SAM, geny *Md-ACO1* se účastní přeměny ACC na etylén (Dong, *et al.*, 1992; Harada *et al.*, 1997; Harada *et al.*, 2000; Oraguzie *et al.*, 2004; Rosenfeld *et al.*, 1996; Sunako *et al.*, 1999). Costa *et al.* (2008) identifikovali další geny *Md-Exp*, které by se mohly podílet na měknutí plodů.

Díky rozvoji molekulárních metod a výpočetní techniky se v poslední době daří nalézat na chromozomech lokusy, které mají příčinný vztah k vývoji kvantitativních znaků. Tyto lokusy, u kterých se předpokládá, že obsahují polymorfismy mající vliv na vývoj kvantitativního znaku, se označují jako QTL (Quantitative Trait Loci; lokusy kvantitativních znaků). U jabloní byly zmapovány důležité QTL pro měknutí dužiny v oblasti LG01, LG08, LG10 a LG15 (King *et al.*, 2000; Maliepaard *et al.*, 2001).

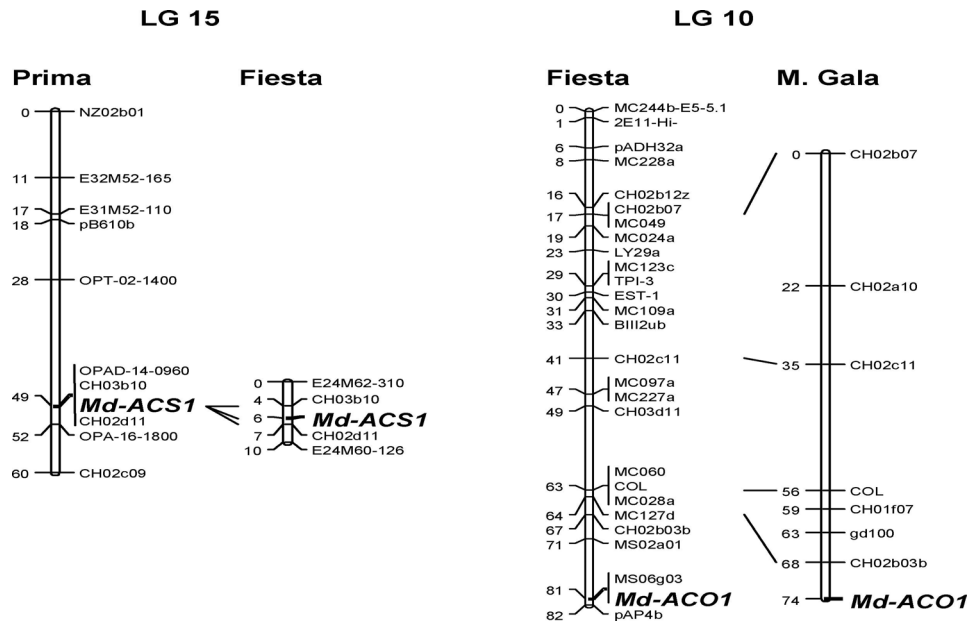
Md-ACS1 byl zmapován v rámci LG15 (obr. 5.) u odrůdy Prima a Fiesta (Costa *et al.*, 2005). Byly identifikovány tři alelické kombinace *Md-ACS1-1/1*, *Md-ACS1-1/2*

a *Md-ACS1 2/2* , které determinují vysokou, střední a nízkou produkci etylénu (Costa *et al.*, 2005; Harada *et al.*, 2000; Oraguzie *et al.*, 2004; Sunako *et al.*, 1999; Wakasa *et al.*, 2006). U některých odrůd jabloní byla zjištěna velmi malá produkce etylénu během skladování při pokojové teplotě, tyto odrůdy vykazovaly homozygotní sestavu alel *Md-ACS1-2/2*. Alela *Md-ACS1-2* obsahuje inzerci v oblasti promotoru, která způsobuje velmi nízkou transkripční aktivitu tohoto genu v porovnání s odrůdami s homozygotní sestavou původní alely *Md-ACS1-1* (Costa *et al.*, 2008; Harada *et al.*, 2000; Melounová *et al.*, 2009; Oraguzie *et al.*, 2004; Sunako *et al.*, 1999; Zhu a Barritt, 2008). Harada *et al.* (2000) hodnotil produkci etylénu u 35 odrůd, během 12 dní při pokojové teplotě kolem 20 °C. Tato teplota zajistila maximální produkci etylénu během klimakterické fáze. Nejvyšší produkce etylénu dosáhla odrůda Jersey mac s homozygotní sestavou alel *Md-ACS1-1/1*, zatímco nejnižší syntéza etylénu byla zaznamenána u odrůdy Megumi s homozygotní sestavou alel *Md-ACS1-2/2*. Oraguzie *et al.* (2007) došli ke stejným závěrům v pokusech, ve kterých se skladovali jablka při nízkých teplotách kolem 2 °C, odrůdy s homozygotní sestavou *Md-ACS1-2/2* měly nejnižší produkci etylénu oproti ostatním.

Md-ACO1 byl zmapován v rámci LG10 (obr. 5.) u kultivarů Fiesta a Mondial Gala (Costa *et al.*, 2005), je zodpovědný za 5 % fenotypovou variabilitu v pevnosti dužiny (Costa *et al.*, 2005; Wakasa *et al.*, 2006).

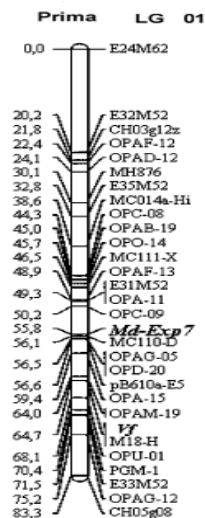
Costa *et al.* (2005) u genů *Md-ACO1* prokázali relativně malou roli v produkci etylénu, ale homozygoti *Md-ACO1-b/b* ještě snižují tvorbu etylénu u alelické homozygotní kombinace *Md-ACS1-2*, např. odrůda Fuji s homozygotní kombinací *Md-ACS1-2/2* a *Md-ACO1-b/b* může být skladována 8 měsíců při teplotě 0 °C - 4 °C, aniž by u ní docházelo k měknutí dužiny (Fan *et al.*, 1999).

Obr. 5. Genetická mapa genů *Md-ACS1* u odrůdy Prima a Fiesta, *Md-ACO1* u odrůd Fiesta a Mondial Gal (Costa *et al.*, 2005)



Gen *Md-Exp7* byl zmapován v oblasti LG10 u odrůdy Prima (obr. 6.) (Costa *et al.*, 2008). U kombinace alel genu *Md-Exp7* s normální transkripční aktivitou dochází k zvýšené syntéze etylénu, u odrůd s mutací v genu *Md-Exp7* je syntéza tohoto plynného fytohormonu skoro o 73% nižší. Výsledky Costa *et al.* (2008) poukazují na větší vliv *Md-Exp7* a *Md-ACO1* v kontrole měknutí dužniny u jablek než u *Md-ACS1*. U homozygotní alely *Md-ACS1-1/1* pozorovali v průměru pouze o 17 % zlepšení skladovatelnosti oproti nevýhodným genotypům *Md-ACS1-1/2* a *Md-ACS1-2/2*. V případě *Md-ACO1* se v průměru snížila syntéza etylénu až o 60 % u homozygotního genotypu *Md-ACO1-b/b* oproti nevýhodným alelám (Costa *et al.*, 2008).

Obr. 6.: Genetická mapa genů *Md-Exp7* u odrůdy Prima (Costa *et al.*, 2008)



3.5.3 Markery pro geny zodpovědné za měknutí dužiny

Sunako *et al.* (1999) navrhli vhodný PCR marker pro *Md-ACS1*, který detekuje homozygotní a heterozygotní sestavu alel. *Md-ACS1* marker byl vyvinut na základě zjištěné inserce v oblasti promotoru u alely *ACS1-2* genu řídícího syntézu ACC-syntázy, která nejspíš způsobuje nízkou expresi tohoto genu a tím i nízkou biosyntézu etylénu. Velikost markeru *Md-ACS1-1/1* je pouze 489 bp, zatímco velikost markeru *Md-ACS1-2/2* je 655 bp. Sekvence specifických markerů *Md-ACS-1-F* je 5'-AGAGA GATGCCATTTTTGTTTCGTAC-3' a *Md-ACS1-R* je 5'-CCT ACAAACTTGCGTGGGGAT TATAAGTGT-3' (Harada *et al.*, 2000; Sunako *et al.*, 1999).

Kodominantní *Md-ACO1* marker byl navrhnout na základě polymorfismu 62 páru bází ve třetím intronu *Md-ACO1*, který je pravděpodobně příčinou nízké transkripce tohoto genu (Costa *et al.*, 2005). Alela nesoucí delecii byla označena jako *Md-ACO1-b* a je zodpovědná za sníženou produkci etylénu. Amplikony alel *Md-ACO1-b* a *Md-ACO1-a* mají fragment velikosti 525 a 587 bp. Sekvence specifických markerů *Md-ACO1-F* je 5'-TCCCCC CAATG ACCACTCCA-3' a *Md-ACO-1-R* je 5'-GATTCCTTGGCCTTCATAGCTTC-3' (Costa *et al.*, 2005).

Na základě sekvence NCBI DQ439791, byly navrženy primery *CZU-ACO-1-F* 5'-CCAGTTACCCGACTACCCATT-3' a *CZU-ACO-1-R* 5'-TTCAAATCTTGGCTCCTTGG-3', tento marker byl označen jako *Md-ACO1-CZU* (Melounová *et al.*, 2009; Zoufalá *et al.*, 2009). Marker *CZU-ACO-1* vykazuje na rozdíl od markeru navrženého Costa *et al.* (2005) specifickou amplifikaci fragmentů o velikosti 450 bp (*Md-ACO1-a*) a 512 bp (*Md-ACO1-b*) (Melounová *et al.*, 2009).

4. Materiál a metody

4.1 Rostlinný materiál

Veškerý rostlinný materiál použitý pro analýzy DNA byl odebrán ve Výzkumném a šlechtitelském ústavu ovocnářském v Holovousích. V genové bance bylo odebráno 133 odrůd, všechny analyzované odrůdy jsou uvedeny v souhrnné výsledkové tabulce 1. Byla hodnocena i jedna hybridní kombinace Telamon x Breaburn, která je uvedena v tabulce 2. Odebrány byly 3 plně vyvinuté listy z každého stromu, které byly uloženy do uzavíratelných plastových sáčků a popsány. Při přepravě byl materiál uchovávan v přenosném chladícím boxu při teplotě 10 °C. V laboratoři byl materiál uchovávan při -20 °C do doby, než se přistoupilo k samotné izolaci DNA z jednotlivých vzorků.

4.2 Izolace DNA z rostlinného materiálu

Základní podmínkou pro úspěšné využití DNA markerů je získání vysokomolekulární neznečištěné DNA v dostatečném množství. Pro tuto práci byla použita metoda izolace kitem od firmy Qiagen (SRN) DNeasy Plant mini kit. Kit je dodáván se všemi potřebnými roztoky i speciálním sterilním plastovým materiálem. Při izolaci je nutné striktně dodržovat návod, který je součástí balení kitu. Izolace probíhala v následujících krocích:

- Polypropylenová mikrozkušavka s 100 mg naváženého rostlinného materiálu byla přemístěna do nádoby s kapalným dusíkem, kde došlo k homogenizaci vzorku a poté byl rostlinný materiál rozdrcen skleněnou tyčinkou.
- K homogenizovanému vzorku byl přidán 400 µl roztoku AP1 a 4 µl RNázy. Směs se důkladně promíchala na vibrační třepačce (Kartell, USA) a zkumavky byly vloženy do vodní lázně (Techne, Velká Británie) předehřáté na 65 °C, kde byly ponechány 10 minut. Během inkubace ve vodní lázni byl roztok několikrát ručně promíchán obrácením zkumavek.
- Po vyjmutí zkumavek z vodní lázně bylo ke směsi přidáno 130 µl roztoku AP2 a zkumavky byly po lehkém ručním promíchání uloženy na 5 min do mrazícího boxu s teplotou - 20°C.

- Poté byly zkumavky s roztokem odstředěny (Eppendorf, SRN) při otáčkách 13200 za minutu po dobu 5 minut.
- Došlo k oddělení pevné a kapalné fáze, kapalná fáze vzorku byla přelita do zkumavek s fialovou kolonou - QIAshredder mini spin column a opět odstředěna po dobu 2 minut při 13200 otáčkách za minutu.
- Přefiltrovaný roztok byl opět převeden do nových mikrozkušavek o objemu 1,5 ml (Eppendorf, SRN) a přidán 1,5 násobek získaného objemu roztoku AP3 - 675 μ l. Po přidání byl roztok opatrně promíchán nakláněním zkumavek.
- 700 μ l směsi bylo převedeno do zkumavek s bílou kolonou DNeasy mini spin column a odstředěn 1 minutu při 8000 otáčkách za minutu a přefiltrovaná frakce se ze zkumavky odlita.
- Zbývající množství roztoku bylo následně také převedeno do těchto zkumavek a znovu odstředěno.
- Bílá kolona s navázanou DNA byla přemístěna do nové sterilní zkumavky, bylo přidáno 500 μ l promývacího roztoku AW. Celá směs byla centrifugována 1 minutu při 8000 otáčkách za minutu. Po odstředění byl filtrát odstraněn.
- Tento krok byl ještě jednou zopakován, pouze odstředění probíhalo 2 minuty při 13200 otáčkách za minutu a filtrát byl znovu odstraněn.
- Kolona byla přemístěna do sterilní mikrozkušavky a objemu 2 ml (Deltalab, SRN) a navázaná DNA se rozpustila přidáním 100 μ l roztoku AE pufru, který musí být předehřátý na teplotu 65 °C. Po přidání se nechal roztok 5 minut působit a po inkubaci při laboratorní teplotě se odstředil 1 minutu při 8000 otáčkách za minutu.
- Celý krok byl ještě jednou opakován, kolona se odstranila a eluát obsahující izolovanou DNA byl uschován.

4.3 Hodnocení kvality a kvantity DNA

Množství a kvalita získané DNA byla hodnocena měřením absorbance UV záření na spektrofotometru (Eppendorf, SRN). Koncentrace DNA závisí na absorbanci záření při vlnové délce 260 nm. Z poměrů absorbancí při 260 a 280 nm se odečte čistota získané DNA.

Vysokomolekularita DNA byla zjišťována pomocí testovací agarózové elektroforézy. Jednotlivé vzorky se separovaly v 1,5 % agarózovém gelu s ethidium bromidem na horizontální elektroforéze v prostředí trisborátového pufru (Bio-Rad, USA) při konstantním napětí 4 V.cm⁻¹ a byly vizualizovány na UV transiluminátoru. Po ozáření UV paprsky emituje DNA s interkalárně navázaným ethidium bromidem oranžové světlo. Testovací elektroforeogramy byly vyfotografovány pomocí dokumentačního systému GelDoc (Bio Rad, USA).

4.4 Analýza *Md-ACS1* genu

Md-ACS1 marker byl vyvinut na základě zjištěné inserce v oblasti promotoru u alely *ACS1-2* genu řídicího syntézu ACC-syntázy, která způsobuje nízkou expresi tohoto genu a tím i nízkou biosyntézu etylénu. Velikost ampliconu alely *Md-ACS1-1* je pouze 489 bp, zatímco alela *Md-ACS1-2* s omezenou transkripční aktivitou a nízkou produkcí etylénu je určena přítomností fragmentu o velikosti 655 bp (Sunako *et al.*, 1999)

Pro hodnocení alelické sestavy *Md-ACS1* genu byly vybrány kodominantní specifické primery *Md-ACS1-F* je 5'-AGAGAGATGCCATTTTTGTTTCGTAC-3' a *Md-ACS1-R* je 5'-CCT ACAAACTTGCGTGGGGATTATAAGTGT-3' (Harada *et al.*, 2000; Sunako *et al.*, 1999). Pro amplifikaci byl použit modifikovaný postup podle Zoufalá (2008). Reakční roztok byl připraven v množství 12,5 µl a obsahoval: 50 ng templátové DNA, 1,25 U *taq* polymerázy (Fermentas, Litva), 1x PCR pufr, 1,25 mM MgCl₂, 100 µM DTP, 0,2 µM primer F a 0,2 µM primer R.

Amplifikace probíhala v termocykleru T- Gradient (Biometra, SRN) podle následujícího schématu: 1x (94°C, 3 minuty), 25x (94 °C, 30 sekund; 62,5 °C, 35 sekund; 72 °C, 90 sekund), 1x (72 °C, 5 minut).

4.5 Analýza *Md-ACO1* genu

Přítomnost delece v lokusu *Md-ACO1* byla detekována PCR kodominantním *Md-ACO1-CZU* markerem, který byl navrhnut na základě polymorfismu 62 páru bází ve třetím intronu *Md-ACO1*, který pravděpodobně příčinou nízké transkripce tohoto genu. Velikost ampliconu alely s normální transkripční aktivitou *ACO1-a* je 450 bp. Alela nesoucí delecí byla označena *Md-ACO1-b* je zodpovědná za sníženou produkci etylénu má amplicon o velikosti 512 bp (Melounová *et al.* 2009)

V této práci byly použity primery, které navrhla Melounová *et al.* (2009) *CZU-ACO-1-F* 5'-CCAGTTACCCGACTACCCATT -3' a *CZU-ACO-1-R* 5'-TTCAAATC TTGGCTCCTTGG-3'. Reakční směs *Md-ACO1-CZU* markeru o objemu 12,5 µl obsahovala 50 ng templátové DNA, 0,7 U *Taq* polymerázy (Fermentas) a 5 µg BSA. Koncentrace ostatních komponent PCR reakce byla následující: 10 mM Tris-HCl (pH 8,8), 50 mM KCl, 0,08%, Nonidet P40, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP, 0,4 µM primer F, 0,4 µM primer R a 4 mM tetramethylamonium oxalát (Top Bio). Amplifikace probíhala v termocykleru T- Gradient (Biometra, SRN) podle následujícího schématu: 1x (95°C, 3 minuty), 35x (94°C, 30 sekund; 63,4°C, 50 sekund; 72°C ,50 sekund), 1x (72°C, 10 minut).

4.6 Elektroforetická separace

Pro separaci PCR produktů byla použita horizontální agarová elektroforéza Sub Cell (Bio Rad, USA). Separace probíhala při konstantním napětí 4 V.cm⁻¹ v prostředí TBE pufru. Oba markery byly separovány v 1,5 % agarózovém gelu 1,5 hodiny.

4.6.1 Příprava gelu

Gel pro elektroforézu byl připravován v celkovém objemu 200 ml. Navážka agarózy byla promíchána s 200 ml 1x TBE pufru a roztok byl dobře rozvařen v mikrovlnné troubě. Po ochlazení směsi asi na 60 °C bylo přidáno 12,5 µl zásobního roztoku ethidium bromidu. Nosič gelu byl upevněn do odlévacího stojanu. Na nosič byly umístěny hřebínky s potřebným množstvím zoubků pro tvorbu nanášecích jamek. Směs byla nalita do připravené elektroforetické vany s hřebínky a ponechána na 30 min v klidu pro polymeraci.

4.6.2 Příprava roztoků pro separaci

Do mikrokumavky o objemu 0,5 ml s 12,5 µl testovaného PCR produktu bylo přidáno 1,7 µl nanášecího pufru (Fermentas, Litva) a vzniklá směs byla promíchána.

4.6.2.1 Roztoky použité pro elektroforézu

10x TBE pufr (Sambrook *et al.*, 1989)

- 450 mM Tris kyselina boritá (Penta, ČR), pH 8,0
- 10 mM EDTA (Penta, ČR)

1x TBE pufr (Sambrook *et al.*, 1989)

Naředit 10x TBE pufr 1x deionizovanou vodou

Elektroforetický pufr

- připravit 1x TBE pufr o objemu 1,5 l
- přidat 75 µl ethidium bromidu

Zásobní roztok ethidium bromidu (Sambrook *et al.*, 1989)

- 10 mg ethidium bromidu (Sigma, USA)
- 1 ml sterilní 2x deionizované H₂O
- při přípravě a manipulaci pracovat v ochranných rukavicích
- uchovávat ve tmě při teplotě 4°C

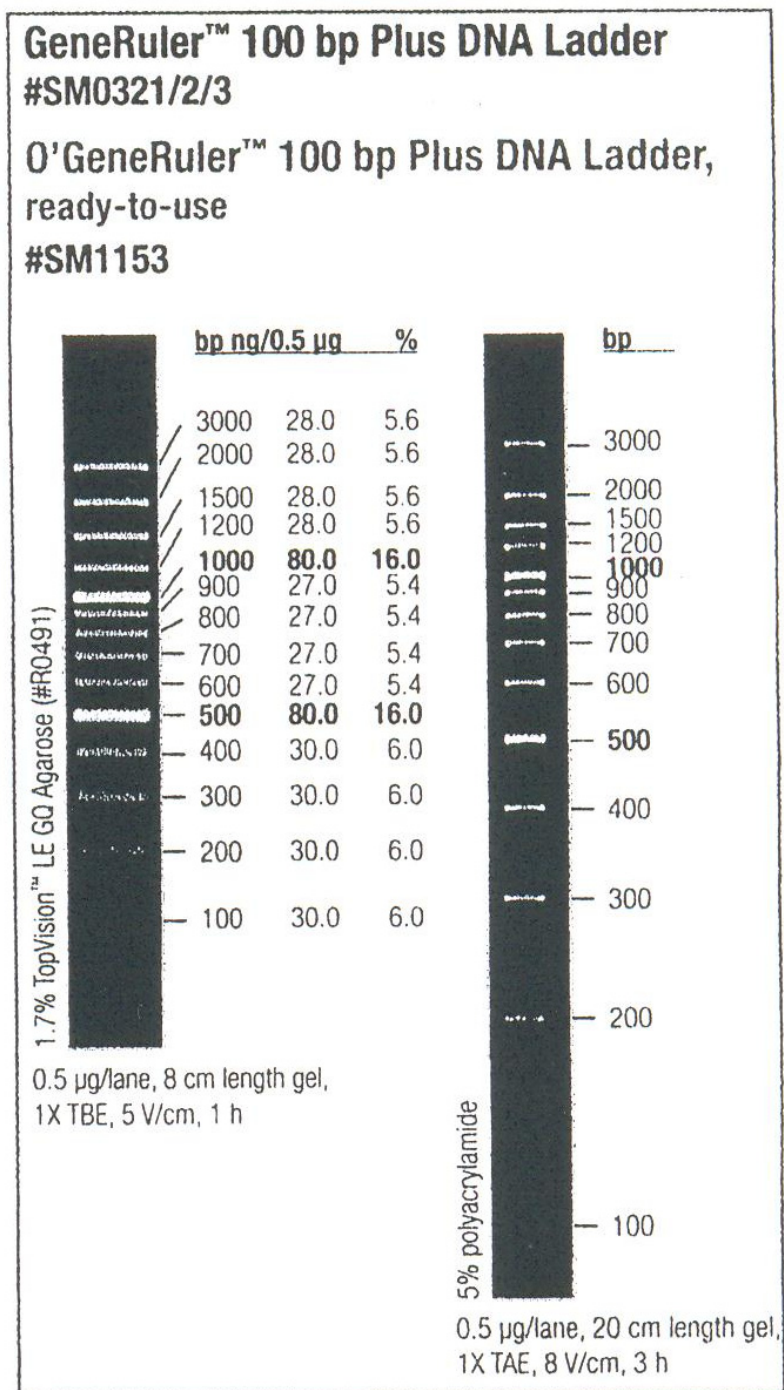
4.6.3 Vizualizace a dokumentace gelů

K vizualizaci jednotlivých elektroforeogramů byl použit UV-transiluminátor, který prosvítí agarózový gel UV zářením. UV záření je pohlceno ethidium bromidem, který se interkalárně váže do dvoušroubovice molekuly DNA a po absorpci UV záření o vlnové délce 302 - 366 nm emituje oranžové světlo. Vizualizace a dokumentace gelů byla realizována pomocí dokumentačního zařízení GelDoc (BioRad, USA).

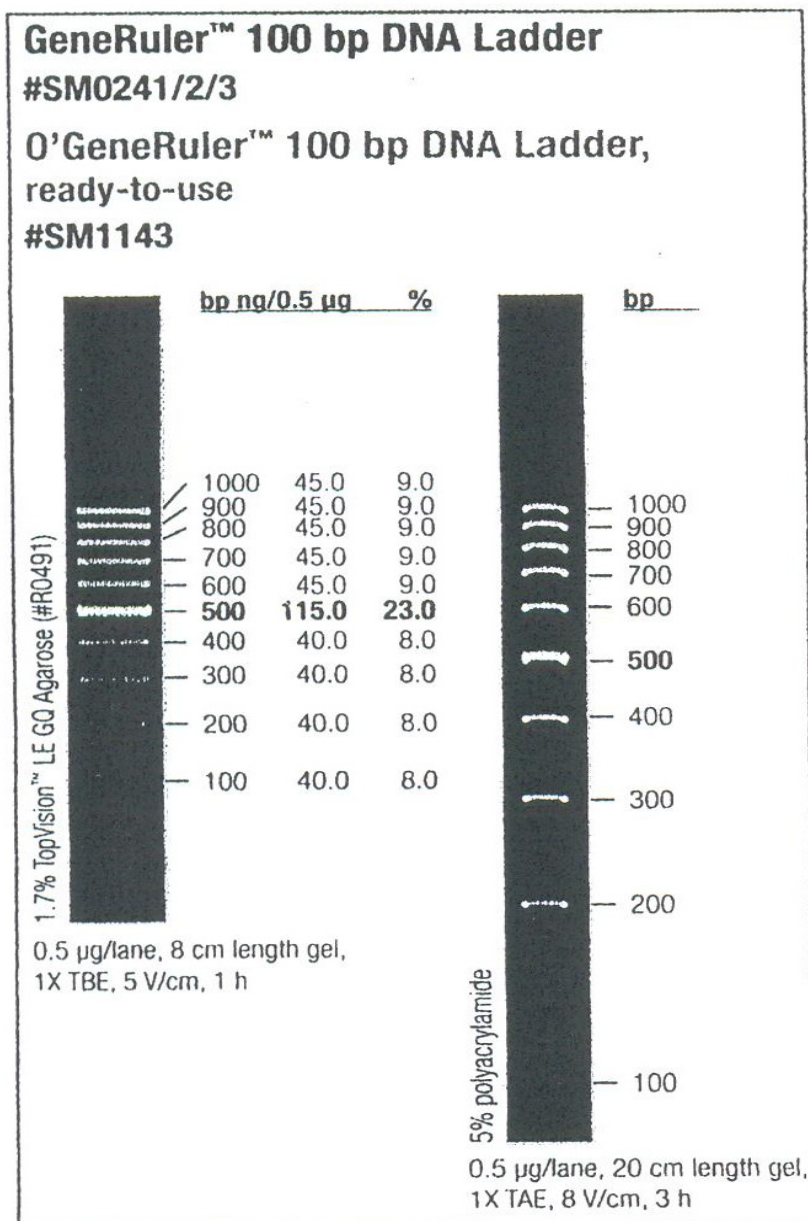
Velikost jednotlivých fragmentů byla porovnána s hmotnostním standardem GeneRuler 100bp DNA Ladder Plus (Fermentas, Litva) (obr. 7.) při detekci ampliconů PCR markeru *Md-ACS1* a s hmotnostním standardem GeneRuler 100bp

DNA Ladder (Fermentas, Litva) (obr. 8.) při detekci ampliconů PCR markeru *Md-ACO1-CZU*.

Obr. 7. Hmotnostní standard GeneRuler 100bp DNA Ladder Plus (Fermentas, Litva)



Obr. 8. Hmotnostní standard GeneRuler 100bp DNA Ladder (Fermentas, Litva)



4.7 Statistická analýza

Pro statistické zhodnocení byl použit program Statistica CZ 9, Statsoft. Pomocí χ^2 testu byla hodnocena závislost distribuce alel a genotypů u genů *Md-ACS1* a *Md-ACO1* na zařazení odrůd do skupin podle konzumní zralosti, dle skladovatelnosti od konzumní zralosti a podle celkové skladovatelnosti od sklizně. Segregace znaků obou genů *Md-ACS1* a *Md-ACO1* byla hodnocena rovněž programem Statistica CZ 9 χ^2 testem segregace.

Podle konzumní zralosti v týdnech od doby sklizně bylo rozděleno všech 133 odrůd do tří skupin, skupina A zahrnuje letní jablka, která dosahují konzumní zralosti

v době sklizně až do 3 týdnů po sklizni. Skupina B obsahuje odrůdy s konzumní zralostí od 4 až do 8 týdnů po sklizni. Skupina C zahrnuje odrůdy s konzumní zralostí delší než 8 týdnů po sklizni.

Dle skladovatelnosti od konzumní zralosti byly také rozděleny všechny analyzované odrůdy do tří skupin, skupina A obsahuje odrůdy se skladovatelností 1 až 5 týdnů od sklizně. Skupina B zahrnuje jablka s 6 až 12 týdenní skladovatelností od konzumní zralosti. Skupina C obsahuje nejdéle skladovatelné podzimní a zimní jablka se skladovatelností 13 a více týdnů od konzumní zralosti.

Podle celkové skladovatelnosti od doby sklizně bylo opět rozděleno všech 133 odrůd jablek do tří skupin. Skupina A obsahuje jablka s nejkratší skladovatelností od sklizně do 12 týdnů. Skupina B zahrnuje odrůdy s průměrnou celkovou skladovatelností od 13 týdnů po 22 týdnů od sklizně. Nejdéle skladovatelná jablka se nacházejí v poslední skupině C, která obsahuje odrůdy s 23 až 32 týdny dlouhou skladovatelností.

Dvouvýběrovým t-testem byly hodnoceny rozdíly mezi průměrnými hodnotami konzumní zralosti, skladovatelnosti od konzumní zralosti a celkové skladovatelnosti od doby sklizně u odrůd s jednotlivými alelickými kombinacemi genů *Md-ACS1* a *Md-ACO1*. Pro analýzu byl opět použit program Statistica CZ 9. Hodnoty rozdílů mezi průměrnou konzumní zralostí, skladovatelností od konzumní zralosti a celkovou skladovatelností od sklizně v týdnech u jednotlivých genotypů genu *Md-ACS1* a *Md-ACO1* byly následně graficky zpracovány pomocí krabicových grafů.

Pomocí programu TFPGA (Tools for Population Genetic Analysis) verze 1.3 (Miller, 1998) byly hodnoceny frekvence alel včetně počtu heterozygotů nesoucích alely genů *Md-ACS1* a *Md-ACO1* u jednotlivých skupin - konzumní zralost, skladovatelnost od konzumní zralosti, celková skladovatelnost od sklizně, které byly rozděleny do podskupin A, B, C podle doby v týdnech. Data byla dále zpracována na základě UPGMA (Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages – nevážené párování skupin za použití aritmetických průměrů). Tato program je schopný na základě několika různých metod shlukové analýzy vytvořit dendrogram, který znázorňuje graficky genetickou vzdálenost mezi porovnávanými skupinami odrůd určenou pomocí koeficientu podle Roger (1972).

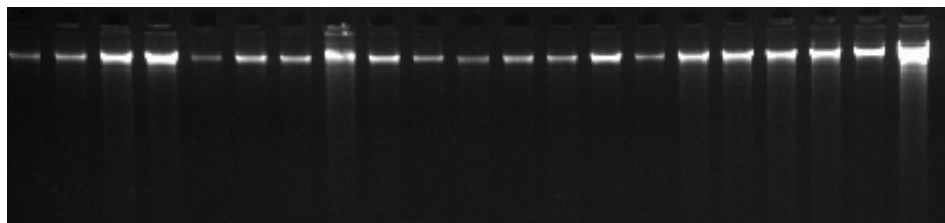
5. Výsledky

5.1 Izolace DNA

DNA použitá pro veškeré analýzy byla izolována pomocí izolačního kitu DNeasy Plant mini kit firmy Qiagen (SRN). Izolací bylo z 1 gramu čerstvé hmoty listů průměrně získáno 30 µg DNA. Pro hodnocení množství izolované DNA v roztoku bylo použito UV spektrofotometrie.

Pomocí testovací elektroforézy byla hodnocena kvalita DNA. Byla získána vysokomolekulární DNA, jak dokumentuje obrázek 9.

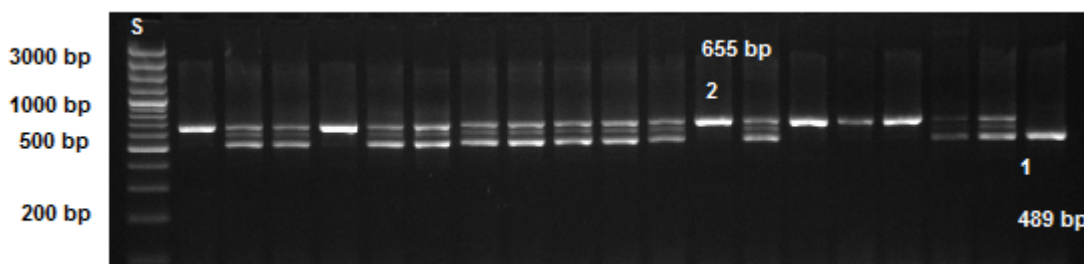
Obr. 9. Vzorový elektroforeogram testovací elektroforézy



5.2 Detekce alel *Md-ACS1* a *Md-ACO1*

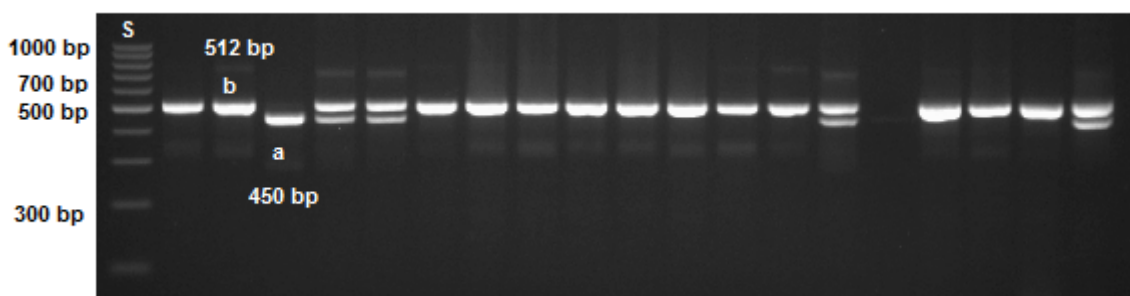
Velikost ampliconu alely *Md-ACS1-1* je pouze 489 bp, zatímco alela *Md-ACS1-2* s omezenou transkripční aktivitou a nízkou produkcí etylénu je určena přítomností fragmentu o velikosti 655 bp.

Obr. 10. Vzorový elektroforeogram detekce genu *Md-ACS1*, S - velikostní standard GeneRuler 100bp DNA Ladder Plus (Fermentas, Litva)



Přítomnost delece v lokusu *Md-ACO1* byla detekována kodominantním *Md-ACO1-CZU* markerem. Velikost ampliconu alely *ACO1-a* s normální transkripční aktivitou je 450 bp. Alela nesoucí deleci *Md-ACO1-b* jenž je zodpovědná za sníženou produkci etylénu má amplicon o velikosti 512 bp.

Obr. 11. Vzorový elektroforeogram detekce genu *Md-ACO1*, S - velikostní standard GeneRuler 100bp DNA Ladder (Fermentas, Litva)



Výsledková tabulka 1. část 1. - 5. obsahuje 133 odrůd jablek hodnocených pomocí vybraných molekulárních markerů *Md-ACS1* a *Md-ACO1-CZU*. U jednotlivých odrůd je uveden týden v měsíci a měsíc sklizně, konzumní zralost od sklizně v týdnech, skladovatelnost jednotlivých jablek od konzumní zralosti v týdnech a celková skladovatelnost od sklizně taktéž v týdnech, podle těchto tří kritérií byly jednotlivé odrůdy rozděleny do skupin A, B, C.

Tab. 1. část 1. Výsledková tabulka analyzovaných odrůd jablek

Odrůda	<i>Md-ACS1</i>	<i>Md-ACO1-CZU</i>	doba sklizně týden v měsíci	doba sklizně měsíc	konzumní zralost od sklizně (týdny)	skladovatelnost od konzumní zralosti (týdny)	celková skladovatelnost od sklizně (týdny)
Akane	2/2	a/a	1	září	1	8	9
Albrechtovo	1/1	a/a	3	září	5	17	22
Alkmene	2/2	a/a	2	září	2	11	13
Ananasová reneta	2/2	a/b	2	říjen	7	20	27
Aneta	2/2	a/a	1	září	7	9	16
Angold	1/2	a/a	4	září	6	16	22
Antonovka	1/1	a/a	3	září	1	7	8
Antonovka kamenička	1/1	a/a	2	září	0	2	2
Astrachan bílý	1/1	a/a	4	červenec	1	2	3
Astrachan červený	1/2	a/a	4	červenec	1	2	3
Auralia	1/2	a/a	1	říjen	9	12	21
Bancroft	1/2	a/a	2	říjen	10	14	24

Tab. 1. část 2. Výsledková tabulka analyzovaných odrůd jablem

<i>Odrůda</i>	<i>Md-ACSI</i>	<i>Md-ACOI-CZU</i>	doba sklizně týden v měsíci	doba sklizně měsíc	konzumní zralost od sklizně (týdny)	skladovatelnost od konzumní zralosti (týdny)	celková skladovatelnost od sklizně (týdny)
Baumanova reneta	1/2	a/a	3	září	11	16	27
Beforest	1/2	a/a	3	říjen	3	8	11
BioGolden	1/2	a/a	1	říjen	13	8	21
Bláhovo oranžové	1/2	a/a	1	říjen	9	12	21
Blaník	1/2	a/a	4	září	10	8	18
Boskopské	1/2	a/a	2	říjen	11	12	23
Braeburn	1/2	a/b	3	říjen	19	8	27
Breuhahnovo	12	a/a	1	říjen	9	14	23
Britemac	1/1	a/a	4	září	2	12	14
Carola	1/2	a/a	3	září	2	5	7
Clijo	1/2	a/a	2	říjen	5	15	20
Clivia	1/2	a/a	2	říjen	4	8	12
Cornwallské hřebíčkové	2/2	a/a	2	říjen	8	11	19
Cortland	1/1	a/a	2	říjen	4	11	15
Cox´s Orange Pipin	1/1	a/b	4	září	1	16	17
Daria	1/1	a/a	1	srpen	2	3	5
Diadém	1/1	a/a	2	září	0	8	8
Dima	2/2	a/a	3	červenec	2	4	6
Discovery	2/2	a/a	2	srpen	1	4	5
Dublet	2/2	a/a	3	srpen	2	3	5
Dukát	2/2	a/a	2	říjen	5	15	20
Early Blaze	1/1	a/a	1	září	0	4	4
Elise Rathke	1/1	a/a	4	září	2	12	14
Empire	1/2	a/b	4	září	2	12	14
Fantasie	1/2	a/a	4	září	0	14	14
Fany	1/2	a/b	2	říjen	8	8	16
Fiesta	2/2	a/b	2	říjen	8	19	27
Flordika	1/2	a/a	4	září	6	12	18
Freedom	1/2	a/a	1	říjen	5	7	12
Fuji	2/2	b/b	2	říjen	13	19	32
Gala	2/2	a/b	2	srpen	4	15	19
Gloster	2/2	a/b	2	říjen	11	12	23

Tab. 1. část 3. Výsledková tabulka analyzovaných odrůd jableň

Odrůda	Md-ACSI	Md-ACO1-CZU	doba sklizně týden v měsíci	doba sklizně měsíc	konzumní zralost od sklizně (týdny)	skladovatelnost od konzumní zralosti (týdny)	celková skladovatelnost od sklizně (týdny)
Gold Bohemia	2/2	a/a	2	září	4	16	20
Golden Delicious	1/2	a/a	3	říjen	3	19	22
Golden Delicious Smoothe	1/2	a/a	3	říjen	3	19	22
Goldstar	1/2	a/a	1	říjen	13	11	24
Golida	2/2	a/a	3	říjen	3	19	22
Granny Smith	1/2	a/a	4	říjen	19	20	39
Hedvábné pozdněkvěté	1/1	a/a	3	září	0	6	6
Hladíkovo přeúrodné	1/1	a/a	1	říjen	5	8	13
Holovouské Malinové	1/2	a/a	1	říjen	9	8	17
Honey Gold	2/2	a/a	1	říjen	7	9	16
Idared	1/2	a/b	2	říjen	8	19	27
James Grieve	1/1	a/a	3	srpen	2	4	6
James Grieve Compact	1/1	a/a	3	srpen	2	4	6
James Grieve Red	1/1	a/a	2	září	1	3	4
Jantar	1/2	a/b	2	říjen	12	11	23
Jarka	2/2	a/a	1	říjen	6	17	23
Jerseymac	1/1	a/a	1	srpen	2	6	8
Jonadel	1/2	b/b	2	říjen	4	8	12
Jonalicious	1/2	a/b	2	říjen	12	11	23
Jonalord	2/2	a/b	2	říjen	12	11	23
Jonamac	1/2	a/b	2	říjen	10	9	19
Jonathan	1/1	a/b	2	říjen	12	11	23
Julia	1/2	a/a	4	červenec	0	2	2
Kandil Sinap	1/1	a/a	1	říjen	8	14	22
Karmína	2/2	a/b	3	říjen	7	11	18
Katka	1/1	a/a	2	říjen	7	11	18
Kids Orange	1/2	a/b	1	říjen	6	16	22
King Jonagold	1/2	a/a	1	říjen	9	11	20
Klára	1/1	a/a	4	říjen	9	13	22
Kordona	1/1	a/a	1	říjen	9	8	17
Liberty	1/1	a/b	2	září	3	8	11

Tab. 1. část 4. Výsledková tabulka analyzovaných odrůd jableň

Odrůda	Md-ACS1	Md-ACO1-CZU	doba sklizně týden v měsíci	doba sklizně měsíc	konzumní zralost od sklizně (týdny)	skladovatelnost od konzumní zralosti (týdny)	celková skladovatelnost od sklizně (týdny)
Lobo	1/1	a/a	2	září	3	13	16
Lodi	1/1	a/a	1	srpen	0	1	1
Lord Lambourne	1/2	a/a	3	září	2	7	9
Macoun	1/1	a/a	1	říjen	4	13	17
Matčino	1/1	a/a	4	září	2	8	10
McInosh Wijcik	1/1	a/a	4	září	2	12	14
McIntosh	1/1	a/a	4	září	2	12	14
Melba	1/1	a/a	2	srpen	2	2	4
Melodie	1/2	a/b	4	září	10	4	14
Melrose	2/2	a/b	2	říjen	12	11	23
Meteor	1/1	b/b	4	září	6	19	25
Mikra	1/2	a/a	4	září	6	12	18
Mio	1/1	a/a	4	srpen	0	2	2
Miodar	1/1	a/a	2	červenec	0	3	3
Mivibe	1/1	a/a	1	srpen	3	3	6
Nabella	1/1	a/a	1	září	5	8	13
Nela	1/2	a/a	1	srpen	0	3	3
Northern Spy	1/1	a/a	1	říjen	9	11	20
Oldenburgovo	1/2	a/a	2	září	2	6	8
Oldenburgovo červené	2/2	a/a	3	září	2	6	8
Ontario	1/2	a/a	3	říjen	11	15	26
Orin	1/2	a/b	1	říjen	7	10	17
Otava	2/2	a/a	2	říjen	8	11	19
Ozark Gold	1/2	a/b	1	říjen	9	8	17
Pidi	1/2	a/a	1	září	5	4	9
Pom Pink	1/2	a/a	4	září	6	15	21
Prima	1/2	a/a	2	září	4	4	8
Primadela	1/1	a/b	2	říjen	8	11	19
Priol's Delicious	1/1	a/a	1	říjen	6	11	17
Produkta	1/2	a/a	1	říjen	9	10	19
Průsvitné letní	1/1	a/a	4	červenec	1	1	2

Tab. 1. část 5. Výsledková tabulka analyzovaných odrůd jableň

Odrůda	Md-ACS1	Md-ACO1-CZU	doba sklizně týden v měsíci	doba sklizně měsíc	konzumní zralost od sklizně (týdny)	skladovatelnost od konzumní zralosti (týdny)	celková skladovatelnost od sklizně (týdny)
Quen´s Cox	1/2	a/a	2	září	8	12	20
Rajka	2/2	a/a	4	září	2	16	18
Red Delicious	1/2	b/b	2	říjen	4	12	16
Red Wealthy	1/2	a/b	2	září	2	9	11
Rezista	1/2	a/a	4	říjen	2	12	14
Rome Beauty	1/2	a/a	2	říjen	8	15	23
Rosana	1/2	a/a	1	říjen	5	11	16
Rubimeg	2/2	a/a	1	říjen	5	11	16
Rubín	2/2	a/a	4	září	6	8	14
Rubinola	1/2	a/a	2	září	8	15	23
Rubinstep	2/2	a/a	1	říjen	9	8	17
Rucla	2/2	a/a	1	říjen	4	11	15
Selena	1/1	a/a	1	září	5	11	16
Sparjon	1/2	a/b	1	září	15	8	23
Spartan	1/1	a/b	3	září	7	12	19
Spencer	1/2	a/a	2	říjen	8	12	20
Spigold	1/2	a/a	2	říjen	12	8	20
Starking Delicious	1/2	b/b	2	říjen	4	15	19
Starkrimson	1/2	b/b	3	říjen	7	12	19
Sudetská reneta	1/2	a/b	1	říjen	9	12	21
Šampion	1/2	a/a	4	září	6	16	22
Tábor	1/2	a/a	4	září	6	12	18
Tydemán´s Worcester	1/1	a/a	3	srpen	0	2	2
Vanda	1/2	a/a	2	září	3	12	15
Zita	1/1	a/a	3	červenec	2	3	5
Zuzana	1/2	a/a	2	říjen	8	11	19
Zvoša	1/2	a/a	2	říjen	8	15	23

Segregace markerů *Md-ACS1* a *Md-ACO1-CZU* v hybridních potomstvech Telamon x Breaburn je znázorněna v tabulce 2. Teoreticky očekávaný štěpný poměr u genu *Md-ACS1* pro typ křížení 1/2 x 1/2 je 1:2:1. Skutečný štěpný poměr byl 33 jedinců s homozygotní alelickou kombinací 1/1, 112 heterozygotů a 56 jedinců s homozygotní kombinací 2/2. Pomocí χ^2 - testu byla zjištěna průkazná pravděpodobnost shody teoretických a skutečných štěpných poměrů. Pro křížení homozygotů a/a x a/a genu *Md-ACO1* byl teoretický štěpný poměr 0:1, dle očekávání nedošlo ke štěpení v hybridním potomstvu.

Tab. 2. Segregace markerů *Md-ACS1* a *Md-ACO1-CZU* v hybridních potomstvech Telamon x Breaburn

Telamon x Breaburn	typ křížení	teoretický štěpný poměr			skutečný štěpný poměr			χ^2	P
		1/1	1/2	2/2	1/1	1/2	2/2		
ACS1	1/2 x 1/2	1	2	1	33	112	56	7,896	(0,01;0,025)
		a/b	a/a		a/b	a/a			
ACO1	a/a x a/a	0	1		0	201		0	1

5.3 Vliv genotypů genů *Md-ACS1* a *Md-ACO1* na aritmetické průměry hodnot konzumní zralosti a skladovatelnosti

Rozdíly mezi průměrnou konzumní zralostí u jednotlivých genotypů genu *Md-ACS1* a *Md-ACO1* v týdnech jsou zobrazeny v tabulce 3. Na hladině významnosti $\alpha=0,05$ existuje statisticky průkazná rozdílnost v průměrné konzumní zralosti u homozygotů *Md-ACS1 -1/1* s normální transkripční aktivitou a u homozygotů či heterozygotů nesoucích alelu *Md-ACS1-2*. Pro gen *Md-ACO1* byly průkazné rozdíly v průměrné době konzumní zralosti pouze u genotypů *Md-ACO1-a/a* a *Md-ACO1-a/b* (tab. 3.).

Tab. 3. Výsledky parametrického t-testu porovnávacího vliv genotypů u genů *Md-ACS1* a *Md-ACO1* na průměrnou konzumní zralost.

ACS1	genotyp	průměrná konzumní zralost (týdny)	počet jedinců	t-test	P
1/1x1/2	1/1	3,372	43	-4,9273*	0,0000
	1/2	7,064	63		
1/1x2/2	1/1	3,372	43	-3,0877*	0,0029
	2/2	5,852	27		
1/2x2/2	1/2	7,064	63	1,3154	0,1918
	2/2	5,852	27		
ACO1	genotyp	průměrná konzumní zralost (týdny)	počet jedinců	t-test	P
a/axa/b	a/a	4,842	101	-4,3550*	0,0000
	a/b	8,500	26		
a/axb/b	a/a	4,842	101	-3,0877	0,3421
	b/b	6,333	6		
a/bxb/b	a/b	8,500	26	1,1791	0,2476
	b/b	6,333	6		

* označuje, že na hladině významnosti $\alpha=0,05$ existuje statisticky průkazná rozdílnost mezi genotypy

Rozdíly mezi průměrnou skladovatelností od konzumní zralosti u jednotlivých genotypů genů *Md-ACS1* a *Md-ACO1* v týdnech jsou zobrazeny v tabulce 4. Na hladině významnosti $\alpha=0,05$ existuje statisticky průkazná rozdílnost mezi homozygoty *Md-ACS1 -1/1* s normální transkripční aktivitou a homozygoty či heterozygoty nesoucích mutovanou alelu *Md-ACS1-2*. U genu *Md-ACO1* byly statisticky průkazné rozdíly v průměrné době skladovatelnosti od konzumní zralosti u homozygotů s alelou *Md-ACO1-a/a* u homozygotů či heterozygotů nesoucích alelu s delecí *Md-ACO1-b* (tab. 4.).

Tab. 4. Výsledky parametrického t-test porovnávacího vliv genotypů u genů *Md-ACS1* a *Md-ACO1* na průměrnou skladovatelnost od konzumní zralosti.

<i>ACS1</i>	genotyp	průměrná skladovatelnost (týdny)	počet jedinců	t-test	P
1/1x1/2	1/1	8,093	43	-3,2677*	0,0015
	1/2	10,984	63		
1/1x2/2	1/1	8,093	43	-3,0177*	0,0036
	2/2	11,667	27		
1/2x2/2	1/2	10,984	63	-0,6745	0,5018
	2/2	11,667	27		
<i>ACO1</i>	genotyp	průměrná skladovatelnost (týdny)	počet jedinců	t-test	P
a/axa/b	a/a	9,584	101	-1,9908*	0,0487
	a/b	11,615	26		
a/axb/b	a/a	9,584	101	-2,2747*	0,0250
	b/b	14,167	6		
a/bxb/b	a/b	11,615	26	-1,4278	0,1637
	b/b	14,167	6		

* označuje, že na hladině významnosti $\alpha=0,05$ existuje statisticky průkazná rozdílnost mezi genotypy

Rozdíly mezi průměrnou celkovou skladovatelností od sklizně u odrůd s jednotlivými alelickými kombinacemi genů *Md-ACS1* a *Md-ACO1* v týdnech jsou zobrazeny v tab. 5. Na hladině významnosti $\alpha=0,05$ existuje statisticky průkazná rozdílnost v průměrné celkové skladovatelnosti od sklizně mezi homozygoty *Md-ACS1 -1/1* s normální transkripční aktivitou a homozygoty či heterozygoty obsahujícími alelu *Md-ACS1-2*. Průkazné rozdíly průměrné celkové skladovatelnosti u genu *Md-ACO1* byly pouze při porovnávání homozygotů *Md-ACO1-a/a* a heterozygotů *Md-ACO1-a/b*.

Tab. 5. Výsledky parametrického t-test porovnávacího vliv genotypů u genů *Md-ACS1* a *Md-ACO1* na průměrnou celkovou skladovatelnost od sklizně.

ACS1	genotyp	průměrná celková sklad. (týdny)	počet jedinců	t-test	P
1/1x1/2	1/1	11,465	43	-4,9200*	0,0000
	1/2	18,048	63		
1/1x2/2	1/1	11,465	43	-3,5338*	0,0007
	2/2	17,519	27		
1/2x2/2	1/2	18,047	63	0,3474	0,7291
	2/2	17,519	27		
ACO1	genotyp	průměrná celková sklad. (týdny)	počet jedinců	t-test	P
a/axa/b	a/a	14,426	101	-3,7001*	0,0003
	a/b	20,115	26		
a/axb/b	a/a	14,426	101	-1,9430	0,0547
	b/b	20,500	6		
a/bxb/b	a/b	20,115	26	-0,1646	0,8703
	b/b	20,500	6		

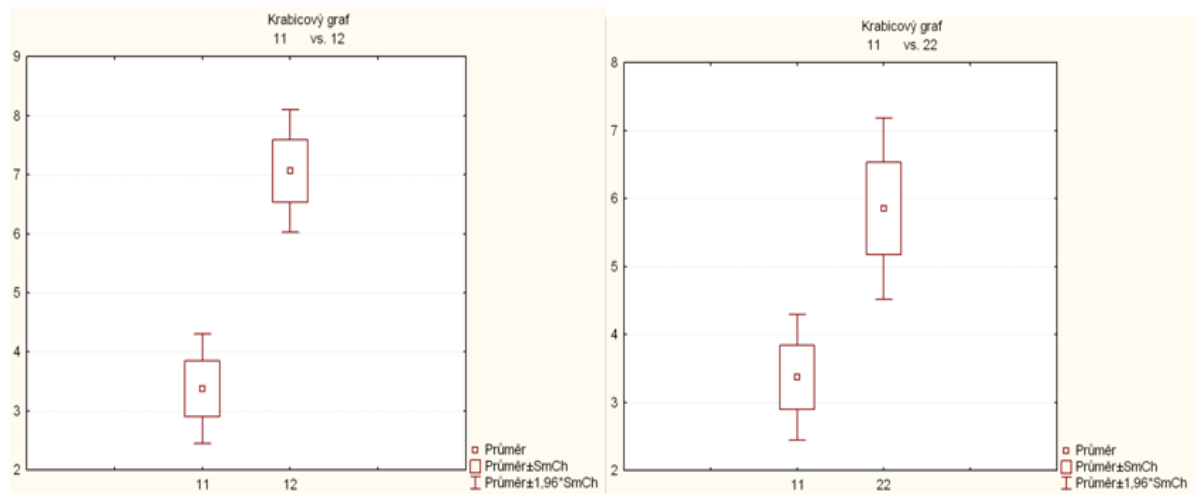
* označuje, že na hladině významnosti $\alpha=0,05$ existuje statisticky průkazná rozdílnost mezi genotypy.

Hodnoty rozdílů mezi průměrnou konzumní zralostí v týdnech, skladovatelností od konzumní zralosti v týdnech a celkovou skladovatelností od sklizně u jednotlivých genotypů genu *Md-ACS1* a *Md-ACO1* byly následně zpracovány pomocí krabicových grafů 1 – 6.

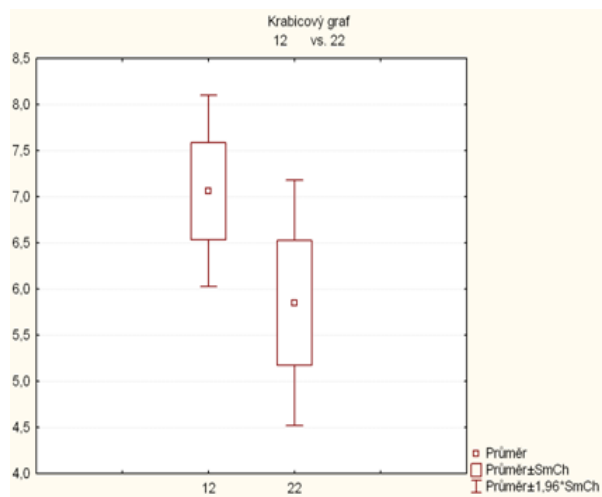
Graf. 1. Znázornění průměrných hodnot konzumní zralosti v týdnech u jednotlivých alelických kombinací genu *Md-ACS1* pomocí krabicových grafů.

Md-ACS1 -1/1 versus *Md-ACS1-1/2*

Md-ACS1-1/1 versus *Md-ACS1-2/2*

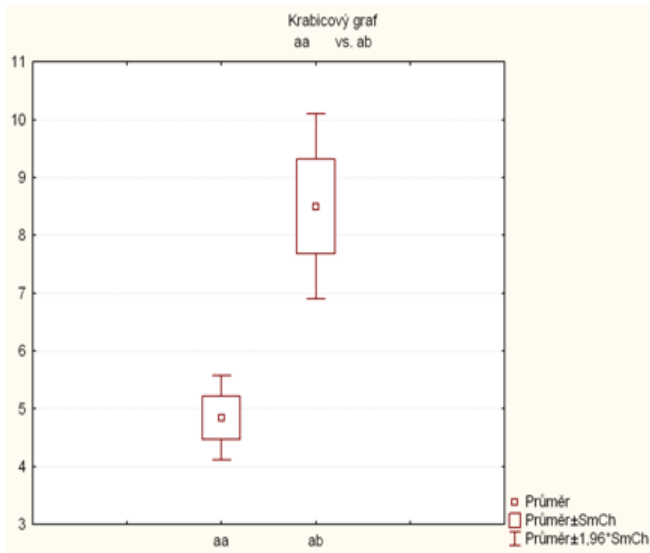


Md-ACS1-1/2 versus *Md-ACS1-2/2*

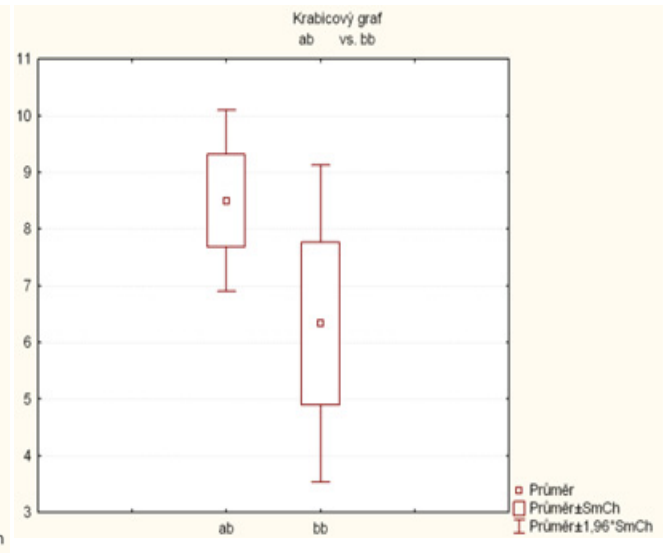


Graf. 2. Znárodnění průměrných hodnot konzumní zralosti v týdnech u jednotlivých alelických kombinací genu *Md-ACO1* pomocí krabicových grafů.

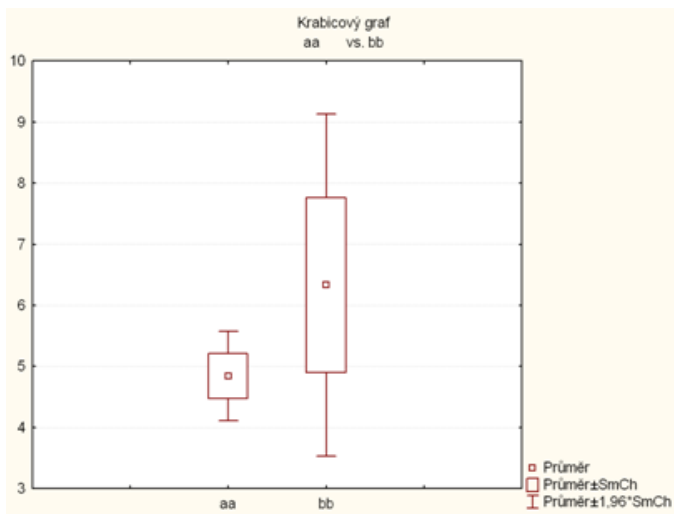
Md-ACO1-a/a versus *Md-ACO1* -a/b



Md-ACO1-a/b versus *Md-ACO1*- b/b

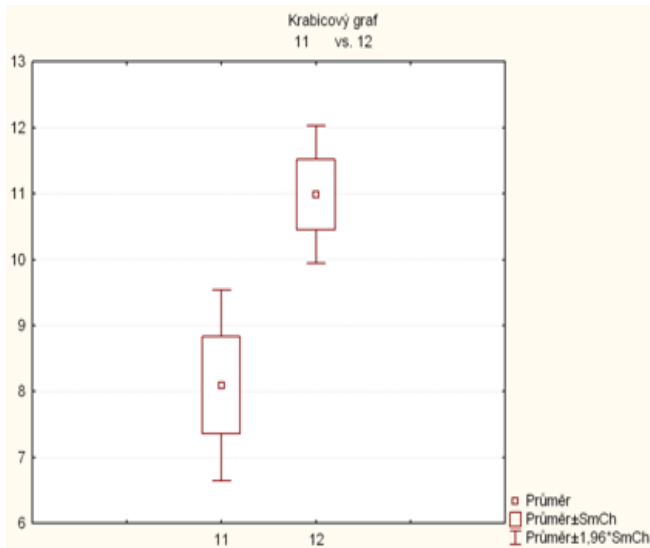


Md-ACO1-a/a versus *Md-ACO1* -b/b

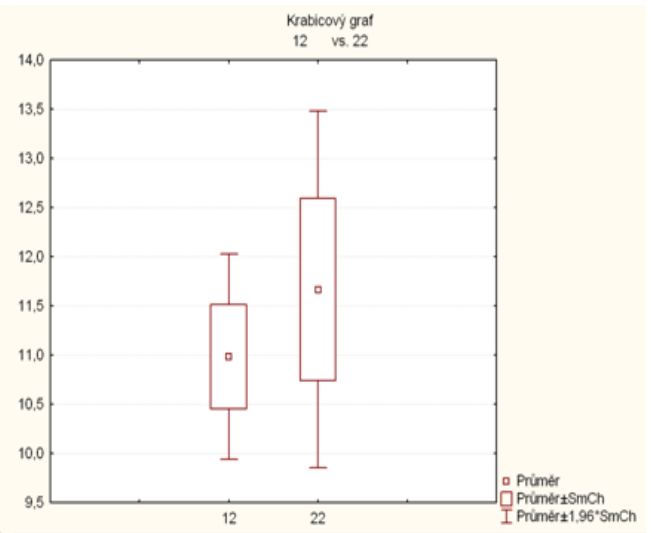


Graf. 3. Znázornění průměrných hodnot skladovatelnosti od konzumní zralosti v týdnech u jednotlivých alelických kombinací genu *Md-ACS1* pomocí krabicových grafů.

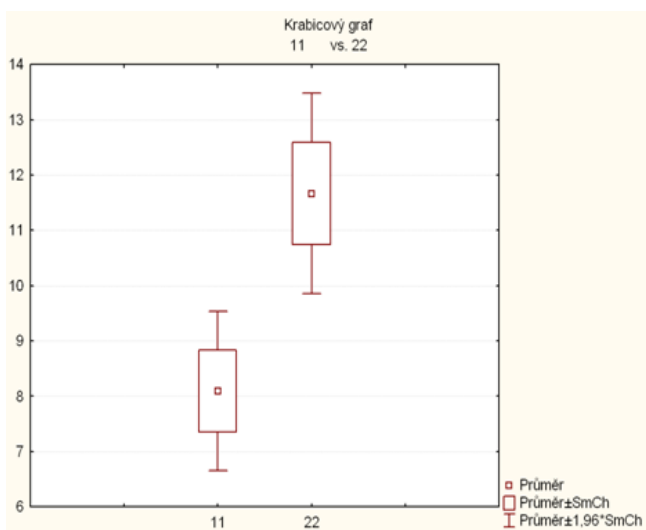
Md-ACS1-1/1 versus *Md-ACS1-1/2*



Md-ACS1-1/2 versus *Md-ACS1-2/2*

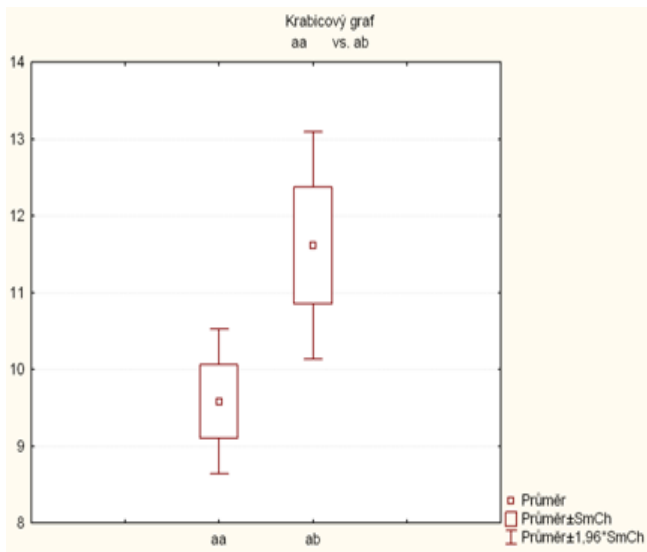


Md-ACS1-1/1 versus *Md-ACS1-2/2*

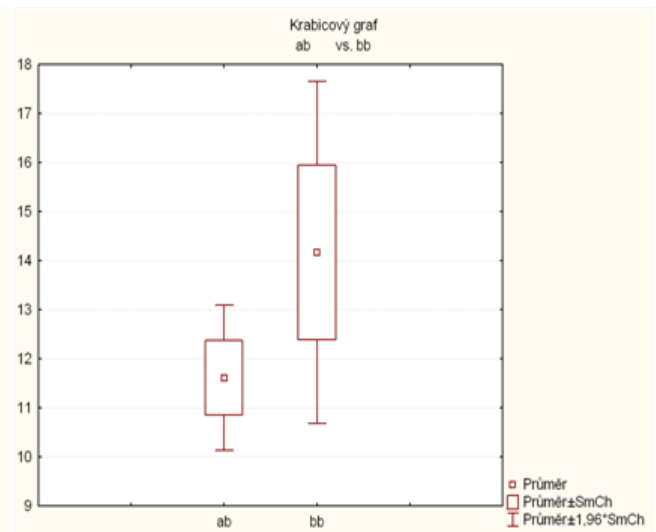


Graf. 4. Zázornění průměrných hodnot skladovatelnosti od konzumní zralosti v týdnech u jednotlivých alelických kombinací genu *Md-ACO1* pomocí krabicových grafů.

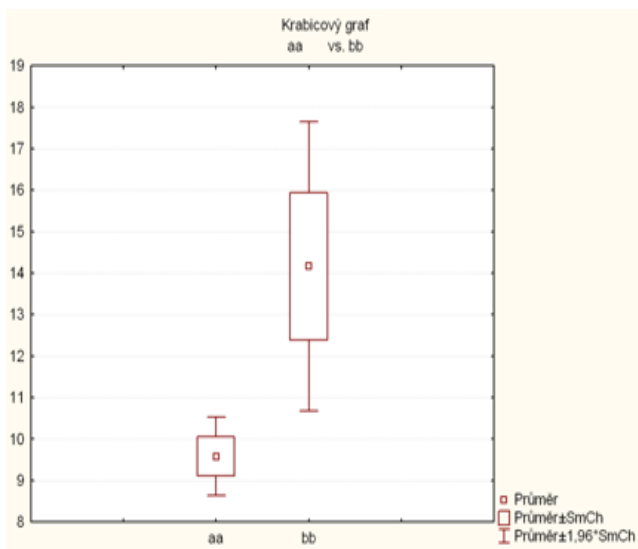
Md-ACO1 -a/a versus *Md-ACO1* -a/b



Md-ACO1 -a/b versus *Md-ACO1* -b/b

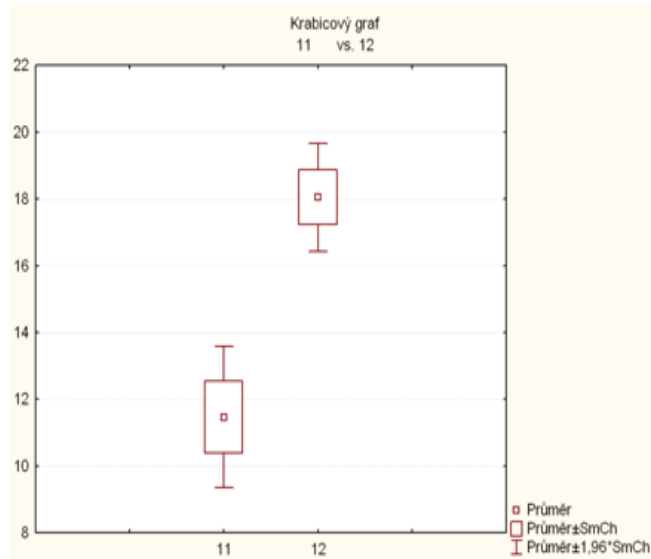


Md-ACO1 -a/a versus *Md-ACO1* -b/b

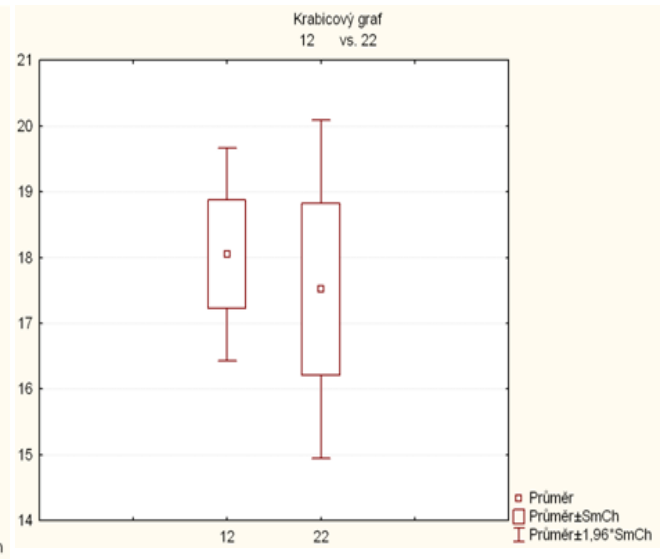


Graf. 5. Znázornění průměrných hodnot celkové skladovatelnosti od sklizně v týdnech u jednotlivých alelických kombinací genu *Md-ACS1* pomocí krabicových grafů.

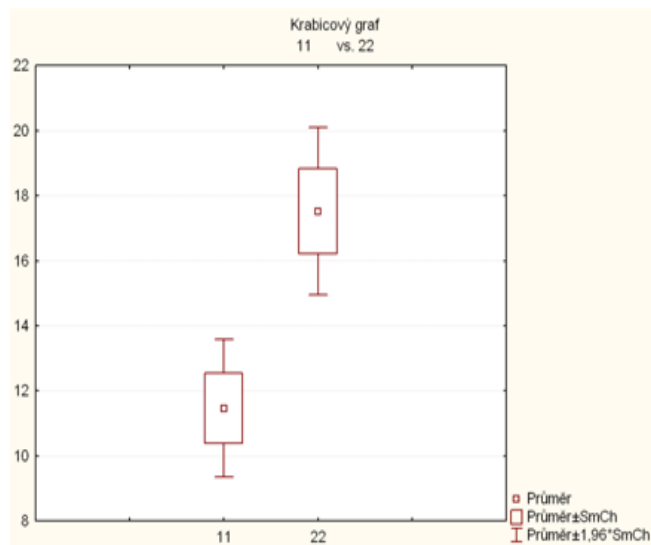
Md-ACS1-1/1 versus *Md-ACS1-1/2*



Md-ACS1-1/2 versus *Md-ACS1-2/2*

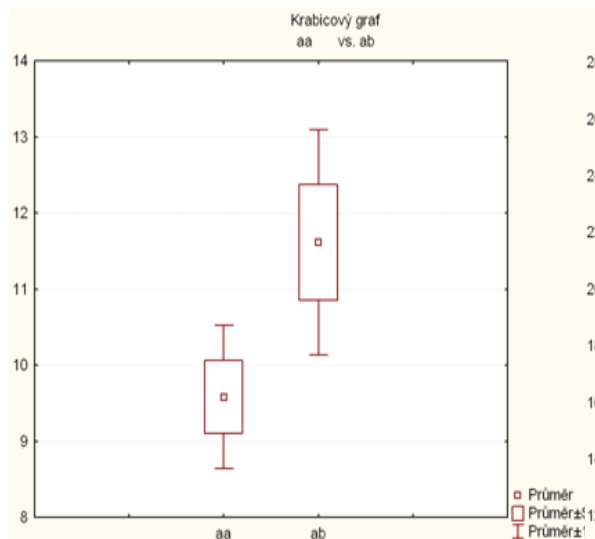


Md-ACS1-1/1 versus *Md-ACS1-2/2*

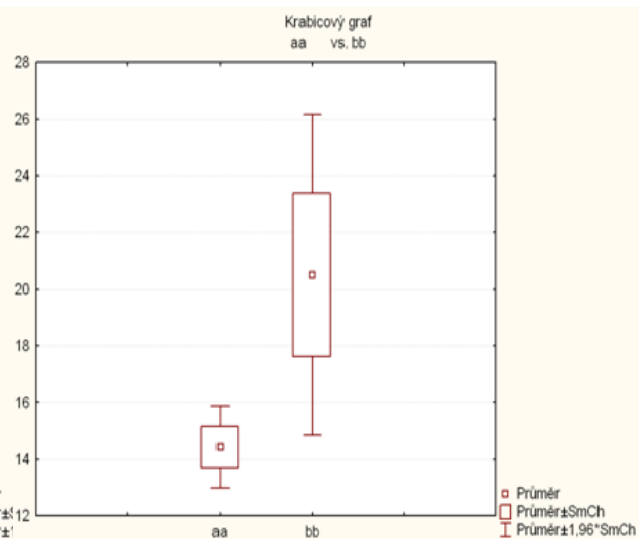


Graf. 6. Znázornění průměrných hodnot celkové skladovatelnosti od sklizně v týdnech u jednotlivých alelických kombinací genu *Md-ACO1* pomocí krabicových grafů.

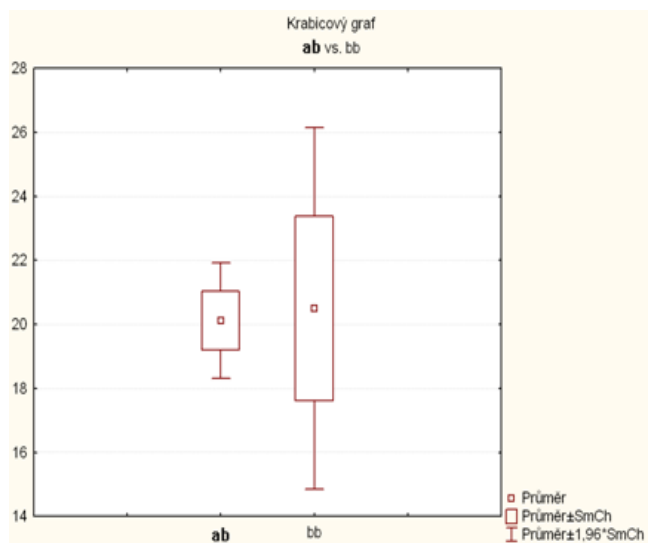
Md-ACO1 -a/a versus *Md-ACO1- a/b*



Md-ACO1 -a/a versus *Md-ACO1- b/b*



Md-ACO1 -a/b versus *Md-ACO1- b/b*



5.4 Frekvence genotypů u genů *Md-ACS1* a *Md-ACO1*

Pomocí χ^2 testu byla hodnocena závislost distribuce genotypů u genů *Md-ACS1* a *Md-ACO1* na zařazení odrůd do skupin podle konzumní zralosti, podle skladovatelnosti od konzumní zralosti a podle celkové skladovatelnosti.

Z tabulek 6. až 8. je patrné, že frekvence jednotlivých genotypů u genu *Md-ACS1* byla průkazně rozdílná u porovnávání skupin A se skupinami B a u porovnávání skupin A se skupinami C a to jak z hlediska konzumní zralosti (tab. 6.) a skladovatelnosti od konzumní zralosti (tab. 7.), tak z hlediska rozdělení odrůd do skupin podle celkové skladovatelnosti od sklizně (tab. 8.).

Na hladině významnosti $\alpha=0,05$ existuje statisticky průkazná rozdílnost v distribuci genotypů u genu *Md-ACO1* mezi skupinami odrůd rozdělených podle konzumní zralosti (tab. 6.) při porovnávání skupiny A se skupinou B a také při porovnávání skupiny A se skupinou C. U skupin rozdělených podle skladovatelnosti od konzumní zralosti (tab. 7.) se statisticky odlišily v distribuci genotypů genu *Md-ACO1* pouze odrůdy jabloní ze skupiny A a B. U skupin rozdělených podle celkové skladovatelnosti od sklizně byla statisticky průkazná rozdílnost na hladině významnosti $\alpha=0,05$ v distribuci genotypů u odrůd ze skupiny C a zbylých dvou skupin A, B (tab. 8.).

Tab. 6. Porovnání distribucí genotypů mezi skupinami odrůd rozdělených podle konzumní zralosti na základě χ^2 testu.

ACS1 skupiny	χ^2	P
AxB	10,9261*	0,0043
BxC	3,9064	0,1418
AxC	17,1328*	0,0002
ACO1 skupiny		
AxB	6,6787*	0,0355
BxC	5,9380	0,0514
AxC	12,5473*	0,0019

* označuje, že na hladině významnosti $\alpha=0,05$ existuje statisticky průkazná rozdílnost v distribuci genotypů

Tab. 7. Porovnání distribucí genotypů mezi skupinami odrůd rozdělených podle skladovatelnosti od konzumní zralosti na základě χ^2 testu.

ACS1 skupiny	χ^2	P
AxB	8,0832*	0,0176
BxC	0,9597	0,6189
AxC	9,5996*	0,0082
ACO1 skupiny		
AxB	6,9710*	0,0306
BxC	1,6373	0,4410
AxC	5,3433	0,0692

* označuje, že na hladině významnosti $\alpha=0,05$ existuje statisticky průkazná rozdílnost v distribuci genotypů

Tab. 8. Porovnání distribucí genotypů mezi skupinami odrůd rozdělených podle celkové skladovatelnosti od sklizně na základě χ^2 testu.

ACS1 skupiny	χ^2	P
AxB	6,8449*	0,0326
BxC	4,1100	0,1281
AxC	13,3577*	0,0001
ACO1 skupiny		
AxB	4,1890	0,1231
BxC	8,2866*	0,0159
AxC	17,2695*	0,0002

* označuje, že na hladině významnosti $\alpha=0,05$ existuje statisticky průkazná rozdílnost v distribuci genotypů

5.1 Frekvence alel u genů *Md-ACS1* a *Md-ACO1*

Závislost distribuce alel genů *Md-ACS1* a *Md-ACO1* u skupin odrůd rozdělených podle konzumní zralosti, podle skladovatelnosti od konzumní zralosti a podle celkové skladovatelnosti byla taktéž hodnocena χ^2 testem.

Na hladině významnosti $\alpha=0,05$ existuje statisticky průkazná rozdílnost v distribuci alel u skupiny A ve srovnání se skupinou B a C jak u genu *Md-ACS1*, tak i u genu *Md-ACO1* u skupin odrůd rozdělených dle konzumní zralosti i podle skladovatelnosti od konzumní zralosti (tab. 9. a 10.). Distribuce alel u skupin odrůd rozdělených podle celkové skladovatelnosti od sklizně byla statisticky průkazně rozdílná opět u skupiny A v porovnání se skupinou B i C u genu *Md-ACS1* (tab. 11.).

U genu *Md-ACO1* byla průkazná odlišnost frekvence alel u skupiny C v porovnávání se skupinou A a B (tab. 11.)

Tab. 9. Porovnání distribucí alel mezi skupinami odrůd rozdělených podle konzumní zralosti na základě χ^2 testu.

ACS1 skupiny	χ^2	P
AxB	7,6634*	0,0056
BxC	0,0021	0,9638
AxC	5,7623*	0,0164
ACO1 skupiny		
AxB	9,0945*	0,0026
BxC	0,5360	0,4641
AxC	12,4109*	0,0004

* označuje, že na hladině významnosti $\alpha=0,05$ existuje statisticky průkazná rozdílnost v distribuci alel

Tab. 10. Porovnání distribucí alel mezi skupinami odrůd rozdělených podle skladovatelnosti od konzumní zralosti na základě χ^2 testu.

ACS1 skupiny	χ^2	P
AxB	6,1509*	0,0131
BxC	0,9132	0,3393
AxC	8,6129*	0,0034
ACO1 skupiny		
AxB	7,2660*	0,0070
BxC	0,1640	0,6860
AxC	5,5030*	0,0190

* označuje, že na hladině významnosti $\alpha=0,05$ existuje statisticky průkazná rozdílnost v distribuci alel

Tab. 11. Porovnání distribucí alel mezi skupinami odrůd rozdělených podle celkové skladovatelnosti od sklizně na základě χ^2 testu.

ACS1 skupiny	χ^2	P
AxB	5,9724*	0,0145
BxC	2,7976	0,0944
AxC	11,7278*	0,0006
ACO1 skupiny		
AxB	1,7053	0,1916
BxC	7,5409*	0,0062
AxC	11,8731*	0,0006

* označuje, že na hladině významnosti $\alpha=0,05$ existuje statisticky průkazná rozdílnost v distribuci alel

5.2 Frekvence alel a heterozygotů

Frekvence alel v jednotlivých skupinách odrůd - A, B, C, včetně počtu heterozygotů nesoucích alely genů *Md-ACS1* a *Md-ACO1* byly získány pomocí populační genetické analýzy - TFPGA. Zastoupení počtu alel, alelickou frekvenci, počet heterozygotů a frekvenci heterozygotů u obou hodnocených genů zobrazuje pro jednotlivé skupiny odrůd - A, B, C rozdělených na základě hodnot konzumní zralosti tabulka 12., skladovatelnosti od konzumní zralosti tabulka 13. a u skupin odrůd rozdělených dle skladovatelnosti od sklizně jsou data v tabulce 14.

Dendogramy vyjadřující rozdílnost mezi genotypy zařazenými do jednotlivých skupin odrůd A, B, C rozdělených opět podle doby konzumní zralosti v týdnech, podle skladovatelnosti od konzumní zralosti v týdnech a podle celkové skladovatelnosti v týdnech jsou uvedeny v obr. 12 - 14.

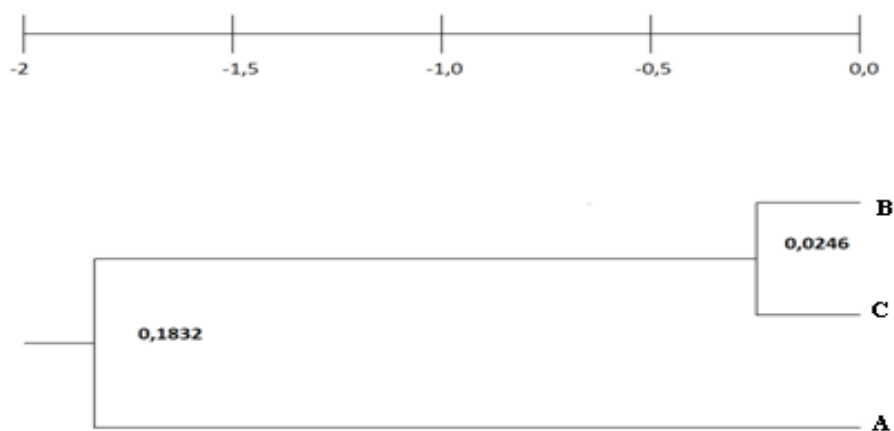
Tab. 12. Frekvence alel a heterozygotů u skupin A, B, C odrůd rozdělených dle konzumní skladovatelnosti.

skupina		alela	počet alel	alelická frekvence	počet heterozygotů	frekvence heterozygotů
A	ACS1	1	68	0,6939	14	0,2857
		2	30	0,3061	14	0,2857
	ACO1	a	94	0,9592	4	0,0816
		b	4	0,0408	4	0,0816

skupina		alela	počet alel	alelická frekvence	počet heterozygotů	frekvence heterozygotů
B	ACS1	1	50	0,4808	26	0,5000
		2	54	0,5192	26	0,5000
	ACO1	a	86	0,8269	8	0,1538
		b	18	0,1731	8	0,1538

skupina		alela	počet alel	alelická frekvence	počet heterozygotů	Frekvence heterozygotů
C	ACS1	1	31	0,4844	23	0,7188
		2	33	0,5156	23	0,7188
	ACO1	a	50	0,7813	12	0,3750
		b	14	0,2188	12	0,3750

Obr. 12. Dendrogram u jednotlivých skupin odrůd rozdělených dle konzumní zralosti, určený pomocí metody UPGMA, koeficientu podle Roger (1972).



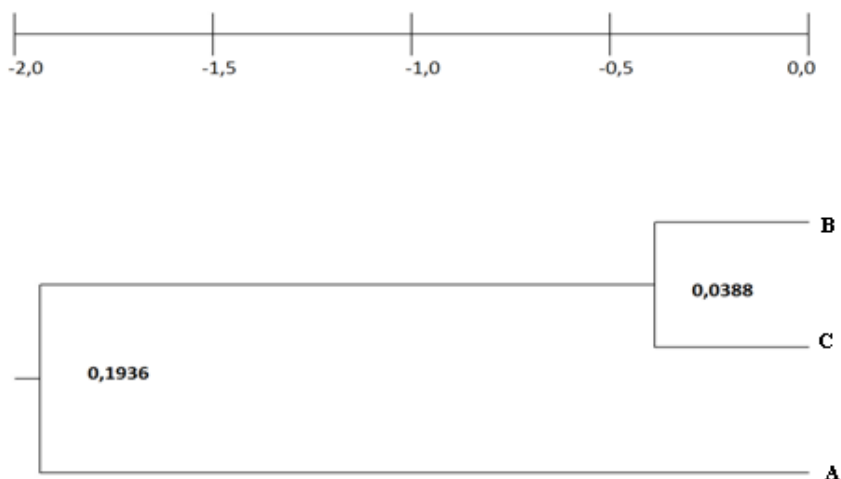
Tab. 13. Frekvence alel a heterozygotů u skupin A, B, C odrůd rozdělených dle skladovatelnosti od konzumní zralosti.

skupina		alela	počet alel	alelická frekvence	počet heterozygotů	frekvence heterozygotů
A	ACS1	1	37	0,7400	7	0,2800
		2	13	0,2600	7	0,2800
	ACO1	a	49	0,9800	1	0,0400
		b	1	0,0200	1	0,0400

skupina		alela	počet alel	alelická frekvence	počet heterozygotů	frekvence heterozygotů
B	ACS1	1	80	0,5405	38	0,5135
		2	68	0,4595	38	0,5135
	ACO1	a	123	0,8311	19	0,2568
		b	25	0,1689	19	0,2568

skupina		alela	počet alel	alelická frekvence	počet heterozygotů	frekvence heterozygotů
C	ACS1	1	32	0,4706	18	0,5294
		2	36	0,5294	18	0,5294
	ACO1	a	56	0,8235	6	0,1765
		b	12	0,1765	6	0,1765

Obr. 13. Dendrogram u jednotlivých skupin odrůd rozdělených dle skladovatelnosti od konzumní zralosti, určený pomocí metody UPGMA, koeficientu podle Roger (1972).



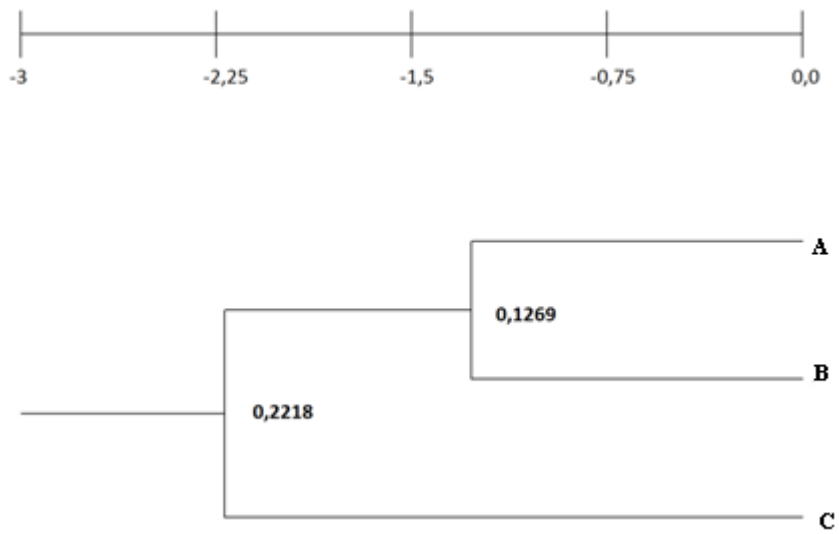
Tab. 14. Frekvence alel u jednotlivých skupin odrůd rozdělených dle celkové skladovatelnosti od sklizně.

skupina		alela	počet alel	alelická frekvence	počet heterozygotů	frekvence heterozygotů
A	ACS1	1	55	0,7051	13	0,3333
		2	23	0,2949	13	0,3333
	ACO1	a	74	0,9487	2	0,0513
		b	4	0,0513	2	0,0513

skupina		alela	počet alel	alelická frekvence	počet heterozygotů	frekvence heterozygotů
B	ACS1	1	75	0,5357	35	0,5000
		2	65	0,4643	35	0,5000
	ACO1	a	121	0,8643	13	0,1857
		b	19	0,1357	13	0,1857

skupina		alela	počet alel	alelická frekvence	počet heterozygotů	frekvence heterozygotů
C	ACS1	1	19	0,3958	15	0,6250
		2	29	0,6042	15	0,6250
	ACO1	a	33	0,6875	11	0,4583
		b	15	0,3125	11	0,4583

Obr. 14. Dendrogram u jednotlivých skupin odrůd rozdělených dle skladovatelnosti od sklizně, určený pomocí metody UPGMA, koeficientu podle Roger (1972).



6. Diskuze

6.1 Amplifikace markerů *Md-ACS1*

Pomocí kodominantního *Md-ACS1* markeru, který byl vyvinut Sunako *et al.* (1999) na základě zjištěné inserce v oblasti promotoru u alely *ACS1-2* genu řídicího syntézu ACC-syntázy, byl hodnocen soubor 133 odrůd jabloní. Shodně s Costa *et al.* (2008), Harada *et al.* (2000) a Sunako *et al.* (1999) byly identifikovány tři alelické kombinace *Md-ACS1-1/1*, *Md-ACS1-1/2* a *Md-ACS1 2/2*, které determinují vysokou, střední a nízkou produkci etylénu. Při amplifikaci docházelo k vytvoření dalšího nespecifického fragmentu o velikosti přibližně 590 pb, který již byl zjištěn Zoufalou (2008). Amplifikace tohoto fragmentu však neměla vliv na úspěšnou detekci obou markerujících fragmentů jak uvádí i Melounová *et al.* (2009).

Velikost amplikonu alely *Md- ACS1-1* byla pouze 489 bp, zatímco alela *Md-ACS1-2* s omezenou transkripční aktivitou byla určena přítomností fragmentu o velikosti 655 bp, ke stejným závěrům došli Costa *et al.* (2008), Harada *et al.* (2000) a Sunako *et al.* (1999). Homozygotní kombinaci alel *Md-ACS1-2/2*, která způsobuje nízkou expresi tohoto genu a tím i nízkou biosyntézu etylénu vykazovalo 27 odrůd z celkového analyzovaného souboru 133 jabloní (tab. 1. část 1 - 5).

6.2 Amplifikace markerů *Md-ACO1*

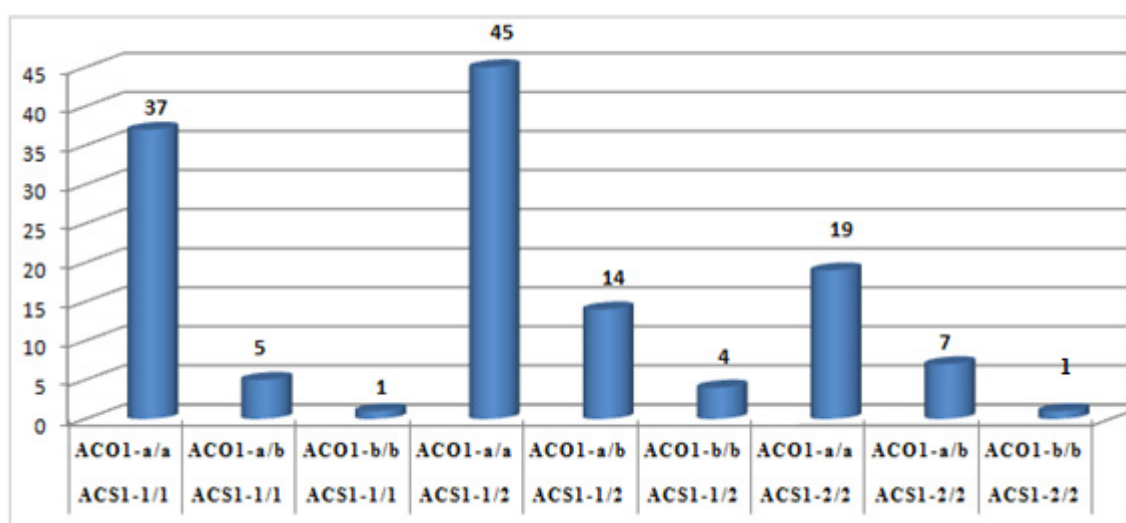
Pro detekci genu *Md-ACO1* u 133 odrůd jabloní byl použit kodominantní primer *Md-ACO1-CZU* navržený Melounovou *et al.* (2009) na základě delece 62 páru bází ve třetím intronu *Md-ACO1*, která je pravděpodobně příčinou nízké transkripce tohoto genu. Alela nesoucí deleci *Md-ACO1-b* je zodpovědná za sníženou produkci etylénu byla určena fragmentem o velikosti 512 pb. Alela *Md-ACO1-a* s normální transkripční aktivitou byla určena fragmentem o velikosti 450 bp, což odpovídá zjištěním Melounové *et al.* (2009)

Homozygotní sestavu alel *Md-ACO1-b/b*, která způsobuje nízkou expresi tohoto genu a tím i nízkou biosyntézu etylénu vykazovalo pouze 7 odrůd: Meteor, Jonadel, Red Delicious, Starking Delicious, Starkrimson a Fuji (tab. 1. část 1 - 5).

6.3 Detekce alelických sestav genů *Md-ACS1* a *Md-ACO1*

Články publikované Costa *et al.* (2005), Harada *et al.* (2000), Oraguzie *et al.* (2004, 2007) poukazují na skutečnost, že oba geny *Md-ACS1* a *Md-ACO1* se podílí na produkci etylenu během dozrávání plodů do konzumní zralosti a během skladování mají vliv na měknutí dužiny. Vzhledem k tomu, že na měknutí plodů se spolupodílí oba hodnocené geny *Md-ACS1* a *Md-ACO1*, bylo u kolekce 133 odrůd provedeno hodnocení kombinace obou markerů. Výsledek hodnocení je patrný z následujícího grafu 7.

Graf. 7. Počty odrůd s různými alelickými kombinacemi u markerů *Md-ACS1* a *Md-ACO1*-CZU



Homozygotní sestava mutované alely pouze v lokusu *Md-ACO1-b/b* byla detekována v kombinaci s genotypem *Md-ACS1-2* u odrůd: Jonadel, Red Delicious, Starkrimson a Starking Delicious. Odrůda Jonadel má celkovou skladovatelnost okolo 12 týdnů. Red Delicious, Starkrimson a Starking Delicious jsou blízké příbuzné odrůdy, mohou být skladovány přibližně 18-19 týdnů od sklizně. Jablka Meteor mající homozygotní genotyp *Md-ACO1-b/b* a *Md-ACS1-1/1* mohou být skladována až 25 týdnů po sklizni. Poměrně dlouhodobá skladovatelnost těchto pěti odrůd, přestože obsahují delece v obou alelách *Md-ACO1-b* se dá vysvětlit zjištěním Zhu a Barritt (2008), kteří hodnotili měknutí dužiny během 60 dní skladování při teplotách kolem 0°C u 60 kultivarů, zaznamenali významný vliv genotypů *Md-ACO1-b/b* a *Md-ACO1-a/b* při kombinaci s genotypem *ACS1-2/2*, ale nevýznamně se projevily v kombinaci s genotypem *ACS1-1/2*. I Costa *et al.* (2005) dospěli k závěru, že delece v alele *Md-ACO1-b* má relativně malý vliv na biosyntézu etylénu, pokud se nevyskytuje v kombinaci s alelou obsahující inzerci *Md-ACS1-2*.

Velmi dlouhá skladovatelnost přibližně 32 týdnů od sklizně je typická pro odrůdu Fuji, u které byly detekovány obě kauzální mutace v lokusech *Md-ACO1* i *Md-ACS1*. Toto zjištění se shoduje s údaji Costa *et al.* (2005) a Zhu and Barritt (2008). Odrůdu Fuji bych doporučila jako nejvhodnější pro šlechtění jabloní s dlouhodobou skladovatelností plodů.

Homozygotní sestava mutované alely pouze v lokusu *Md-ACS1-2* vykazovalo 19 odrůd: Akane, Alkmene, Aneta, Cornwallské hřebíčkové, Dima, Discovery, Dublet, Dukát, Gold Bohemia, Golida, Honey Gold, Jarka, Oldenburgovo červené, Otava, Rajka, Rubimeg, Rubín, Rubinstep a Rucla. U letních odrůd Dima a Discovery byla detekován homozygotní kombinace alel *Md-ACS1-2/2*, ale fenotypový projev mutace v tomto genu na delší skladovatelnost nebyl zaznamenán. Tuto skutečnost zjistili také Oraguzie *et al.* (2007), kteří hodnotili vnitřní koncentraci etylenu a měknutí dužiny u plodů 68 odrůd jabloní během 10 a 50 dní skladování při teplotách kolem 0°C. Inhibiční efekt mutované alely *Md-ACS1-2* se dle jejich měření projevil pouze u zimních odrůd, ale u letních odrůd, které mají dřívější termíny sklizně, sníženou syntézu etylénu nezaznamenali. Což může být způsobeno i nízkým zastoupením letních odrůd v hodnoceném souboru odrůd, které by obsahovaly genotyp *Md-ACS1-2/2*, jak v této práci, tak i v pokusech Oraguzie *et al.* (2007). Studie Watkins *et al.*, (2000) méně komerčně využívaných odrůd také prokazují vyšší syntézu etylénu u letních odrůd než u odrůd s pozdní sklizňovou zralostí.

Letní odrůdy obecně vykazují vyšší stupeň měknutí dužiny v období sklizňové zralosti než zimní odrůdy (Oraguzie *et al.*, 2004; Johnston *et al.*, 2002). Vincent (1989) zaznamenal již na počátku sklizňové zralosti u letních a raných podzimních odrůd měkčí strukturu dužiny, způsobenou pravděpodobně parenchymatickými buňkami s většími mezibuněčnými prostory, než u odrůd pozdních podzimních a zimních. Velká variabilita v pevnosti dužiny plodů jednotlivých odrůd po dlouhodobém skladování se dá tedy vysvětlit i rozdílným utvářením stavby parenchymatického pletiva během růstu jablek.

Kombinace genotypů *Md-ACS1-2/2* a *Md-ACO1-a/b* byla detekována u 7 odrůd: Ananasová reneta, Fiesta, Gala, Gloster, Jonalord, Karmína a Melrose, které mají dlouhou skladovatelnost od sklizně v přibližně 23 týdnů.

Rozdíly mezi jednotlivými genotypy genů *Md-ACS1* a *Md-ACO1* hodnocené pomocí parametrického t-testu u souboru 133 odrůd v průměrné konzumní zralosti

v týdnech, v průměrné skladovatelnosti od konzumní zralosti v týdnech a v celkové skladovatelnosti od sklizně v týdnech jsou zobrazeny v tab. 3. - 5. Na hladině významnosti $\alpha=0,05$ existuje statisticky průkazná rozdílnost jak v průměrné konzumní zralosti, průměrné skladovatelnosti od konzumní zralosti, tak v průměrné celkové skladovatelnosti od sklizně u homozygotů *Md-ACS1 -1/1* s normální transkripční aktivitou a u homozygotů či heterozygotů obsahujícími alelu *Md-ACS1-2*. Homozygotní sestavu alel *Md-ACS1-1* mají dle zjištěných výsledků především letní a časné podzimní odrůdy jablek, které mají velmi krátkou skladovatelnost od konzumní zralosti cca 6 až 8 týdnů. Letní odrůdy dosahují konzumní zralosti během sklizně nebo několik týdnů po sklizni, jsou určeny k přímé distribuci a prodeji konzumentům, v praxi se téměř vůbec nezaskladňují. Zimní a některé podzimní odrůdy, které mají dlouhou průměrnou skladovatelnost, většinou obsahují homozygotní genotyp *Md-ACS1-2/2* nebo heterozygotní *Md-ACS1-1/2* s insercí v oblasti promotoru, která způsobuje velmi nízkou transkripční aktivitu tohoto genu v porovnání s odrůdami letními s homozygotní sestavou původní alely *Md-ACS1-1*.

V průměrné konzumní zralosti, skladovatelnosti od konzumní zralosti a celkové skladovatelnosti od sklizně existovala statisticky průkazná rozdílnost na hladině významnosti $\alpha= 0,05$ u homozygotů *Md-ACO1-a/a* a u heterozygotů s alelickou sestavou *Md-ACO1-a/b*, pravděpodobně z důvodu nízké frekvence alel *Md-ACO1-b* u hodnoceného souboru 133 odrůd a nižšího vlivu genu *Md-ACO1* oproti *Md-ACS1* na produkci etylenu během skladování.

Z dendogramů vyjadřujících rozdílnost mezi genotypy jednotlivých skupin jablek A, B, C rozdělených opět podle doby konzumní zralosti v týdnech, podle skladovatelnosti od konzumní zralosti v týdnech je patrná větší genetická vzdálenost mezi skupinou A, která obsahuje především letní a časné podzimní odrůdy a než mezi skupinami B a C, které zahrnují většinou pozdní podzimní a zimní odrůdy s vyšší frekvencí mutované alely *Md-ACS1-2*, jenž způsobuje pomalejším měknutím jablek a tedy i delší skladovatelnost plodů.

6.4 Prodlužování trvanlivosti jablek

Z hlediska hodnocení vlivu jednotlivých genotypů genů *Md-ACS1* a *Md-ACO1* na skladovatelnost a uchovávání jednotlivých odrůd nelze opomenout, že pro dlouhodobou skladovatelnost jablek je stěžejní kvalita a stupeň zralosti při sklizni.

Optimální sklizňové období trvá 7-20 dní a závisí na odrůdě a povětrnostních podmínkách. Pokud je plod předčasně sklizen má horší chuťovou nebo nutriční hodnotu, protože obsahuje méně cukru a aromatických látek. Předčasně sklizené plody trpí více fyziologickými poruchami, zejména vadnutím a spálou slupky. Příliš pozdní sklizeň má za následek výrazné zkrácení doby uchovatelnosti i plodů s výhodnou alelickou sestavou genů *Md-ACS1* a *Md-ACO1* a zvýšení jejich citlivosti, vlivem menší pevnosti dužiny, k otlacení. Při opožděné sklizni se zvyšuje riziko vzniku sklovitosti dužiny, vnitřního rozpadu dužiny a dalších fyziologických poruch bez většího vlivu výhodných sestav mutovaných alel *Md-ACS1-2* a *Md-ACO1-b*. Je proto důležité, aby pěstitel přesně stanovil začátek sklizňové zralosti u jednotlivých odrůd snadnou odlučitelností stopky od podnože, obsahem škrobu, nebo změnou základní či krycí barvy. Nejpřesnější metody pro určování začátku sklizňové zralosti jsou biochemické, moderními přenosnými plynými chromatografy lze určit růst tvorby etylénu v plodech. Ručními penetrometry lze získat informace o pevnosti dužiny, penetrometrické hodnoty se však mění s velikostí plodů, způsoby pěstování a klimatickými podmínkami. Proto bych spíše tuto metodu doporučila jako měřítko pro posouzení vhodnosti plodů pro dlouhodobé skladování.

Dalším faktorem, který významně ovlivňuje dobu skladovatelnosti je technika sklizně a třídění. Při sklizni by mělo šetrně manipulovat s plody, aby nedocházelo k otlakům, které se projeví většinou během transportu a ve skladě jako hnědé skvrny, které mohou být příčinou hnití. Pokud chceme, aby jablka byla co nejdéle uchovávatelná, neměla by se porušit zásada, že se musí všechna sklizená jablka ještě téhož dne dopravit do skladu. Třídění plodů podle velikosti umožňuje jejich dobré balení, chrání je před poškozením během dopravy a další manipulací. Letní a ranně podzimní odrůdy se třídí ihned po sklizni. Pozdně podzimní a zimní odrůdy se zatím v ČR většinou třídí až po vyskladňování, v této skutečnosti vidím negativní vliv na dlouhodobé skladování. Ideální je, když se jablka roztřídí podle velikosti a kvality před skladováním, vyloučí se ze skladování plody příliš zralá nebo s prognózou krátkodobé skladovatelnosti či výskytu skládkových chorob a poruch. Tímto způsobem lze prodloužit skladovatelnost až o několik týdnů. Citovaná literatura však neuvádí, zda byly plody jednotlivých odrůdy před hodnocením míry změkčení dužiny během skladování sklizeny v optimální sklizňové zralosti, či jaká technologie sklizně a třídění byla použita. Pro přesnější posouzení vlivu genů *Md-ACS1* a *Md-ACO1* by bylo zapotřebí sledovat všechny faktory, které ovlivňují dobu skladovatelnosti.

6.5 Vliv technologie skladování na dlouhodobé uchování jablek

Zásadní vliv na měknutí dužiny a syntézu etylenu má zajištění samotného skladování. Převážný podíl české ovocnářské produkce se uskládá v chladírenských komorách, i když přední ovocnářské firmy se v posledních pěti letech zásadně přeorientovaly na technologii chlazení s doplňujícím účinkem zvolené plynné směsi, jedná se především o skladování v atmosféře ULO (Ultra low oxygen) s velmi nízkým obsahem kyslíku 1,5 - 2%. Upravuje se i koncentrace CO₂ v rozmezí 0–5 % v závislosti na odrůdě. Firmy, které využívají tuto technologii, se staly marketingově srovnatelné s dovozci z Evropské unie, protože mohou zvládnout prodej jablek v období po celý rok. Velmi nízký obsah kyslíku hlouběji zpomaluje látkové přeměny, plod méně dýchá, a tím spotřebovává méně zásobních látek, snižuje tak skladovací ztráty, příznivě působí i na inhibici epifytní mikroflóry (Goliáš, 2009).

Jablka patří mezi turgescencí plody, ztráta vody není běžným pozorováním viditelná, přesto vyžadují během skladování vyšší relativní vlhkost vzduchu (přibližně 80- 90%). Pokud se má dosáhnout nejnižší ztráty vlhkosti, musí mít okolní atmosféra vysokou relativní vlhkost a teplota nesmí být nižší, než je teplota produktu (Blažek, 2001).

Pro jednotlivé odrůdy se používají různé skladovací teploty v rozmezí od 0 do 5°C . Většina odrůd jablek jako např. Golden Delicious, Šampion, Jonagold, Idared, rubín, Spartan, Starkrimson Delicious a ostatní odrůdy této skupiny dobře snášejí skladování při teplotě 0 - 2°C. Angold, Boskoopské červené, Melrose, Jame Grieve Red, Jonathan a většina letních a raně podzimních odrůd vyžaduje teplotu 3 - 4°C , neboť tyto odrůdy trpí fyziologickými poruchami z chladu, které se projevují hnědnutím dužiny. Odrůdy Angold, Boskoopské červené, Coxova reneta, Jonathan a Zvonkové během zaskladňování vyžadují postupné zchlazování, pro ostatní je akceptovatelná doba zchlazování tři až čtyři dny. Každé kolísání teploty okolní atmosféry nebo kolísání teploty plodu zvyšuje hmotnostní ztráty, proto je nutné udržovat během skladování co nejstálější podmínky. Použití řízené atmosféry prodlužuje uchovatelnost jablek téměř na dvojnásobek (Blažek *et al.*, 1998; Blažek, 2001; Blažek, 2001; Husáková, 2009).

Domnívám se, že získání více výsledků hodnocení měknutí dužiny a trvanlivosti jednotlivých hybridních potomstev odrůd s mutací v genech *Md-ACS1* a *Md-ACO1* v optimálních skladovacích podmínkách, by byly pro pěstitelskou praxi přínosem. V posledních letech se již objevují práce např. Jobling *et al.* (1991), Oraguzie *et al.* (2007) nebo Zhu a Barritt (2008) zabývající se hodnocením koncentrace etylénu u plodů skladovaných při teplotách okolo 0°C. Costa *et al.* (2008) měřili penetrometry měknutí dužiny u jablek skladovaných při teplotách 2 - 4° C. Gorney *et al.* (1996) a Saftner, *et al.* (2002) se jako jedni z mála autorů zabývali skladováním jablek v podmínkách řízené atmosféry.

V rámci této diplomové práce by bylo vhodné vyhodnocovat koncentraci etylénu pomocí plyného chromatografu či měřit míru měknutí dužiny penetrometrem jak při sklizňové zralosti, tak i po dlouhodobém skladování plodů jednotlivých odrůd, u kterých byla provedena detekce markerů genů *Md-ACS1* a *Md-ACO1*, při optimálních nízkých teplotách v závislosti na odrůdě, ideálně v řízené atmosféře. Případně provést pokusy s aplikací inhibitorů typu MCP. Z časových, prostorových a ekonomických důvodů to však nebylo možné.

7. Závěr

Pomocí zvolených markerů byla charakterizována kolekce 133 odrůd jablek, které jsou využívány jako genetické zdroje při šlechtění nových odrůd. S údaji získanými aplikací těchto dvou markerů byly porovnávány u jednotlivých odrůd hodnoty konzumní zralosti, skladovatelnosti od konzumní zralosti a celkové skladovatelnosti od sklizně. Skladovatelnost jablek i jejich uchování u spotřebitele jsou důležitými kritérii při výběru vhodné odrůdy.

- Pro detekci genů *Md-ACS1* a *Md-ACO1*, které mají vliv na měknutí, byly použity vybrané kodominantní markery. Homozygotní sestava mutované alely pouze v lokusu *Md-ACO1* byla detekována u 6 odrůd: Jonadel, Meteor, Red Delicious, Starkrimson a Starking Delicious. Homozygotní sestavu mutované alely pouze v lokusu *Md-ACS1-2* vykazovalo 19 odrůd: Akane, Alkmene, Aneta, Cornwallské hřebíčkové, Dima, Discovery, Dublet, Dukát, Gold Bohemia, Golida, Honey Gold, Jarka, Oldenburgovo červené, Otava, Rajka, Rubimeg, Rubín, Rubinstep a Rucla. U odrůdy Fuji, která je typická pomalým měknutím plodů byly detekovány obě kauzální mutace v lokusech *Md-ACO1* i *Md-ACS1*.
- Inhibiční efekt mutované alely *Md-ACS1-2* na produkci etylenu a následné měknutí dužiny se projevil především u zimních odrůd, u kterých se tato alela vyskytovala s vyšší frekvencí než u letních odrůd.
- Gen *Md-ACS1* měl větší vliv na prodloužení skladovatelnosti než gen *Md-ACO1*, přesto však výskyt alely *Md-ACO1-b* s nízkou transkripční funkcí příznivě ovlivňoval homozygotní genotyp *Md-ACS1-2/2* ve zpomalení procesu měknutí dužiny.
- Pomocí parametrického t-testu byla prokázána rozdílnost, v průměrných hodnotách skladovatelnosti, homozygotů *Md-ACS1 -1/1* s normální transkripční aktivitou a homozygotů či heterozygotů obsahujícími alelu *Md-ACS1-2*.
- Zimní a některé podzimní odrůdy s dlouhou průměrnou skladovatelností, které většinou obsahovaly homozygotní genotyp *Md-ACS1-2/2* nebo

heterozygotní *Md-ACS1-1/2* měly větší genetickou vzdálenost od odrůd letních s homozygotní sestavou původní alely *Md-ACS1-1*.

- Selektce v hybridním potomstvu Telamon x Breaburn nebyla provedena, čemuž nasvědčuje vysoká pravděpodobnost shody očekávaného štěpného poměru se skutečně zjištěným.
- Pro šlechtění jabloní z hlediska dlouhodobého skladování plodů bych doporučila odrůdu Fuji.

8. Seznam zkratek

ACC - kyselina 1-aminocyklopropan-1-karboxylová

ACO - 1-aminocyklopropan-1-karboxyl oxidáza

ACS - 1-aminocyklopropan-1-karboxyl syntáza

AFLP - Amplified Fragment Length Polymorphism, délkový polymorfismus amplifikovaných fragmentů

ATP - Adenosintrifosfát

CAPS - Cleaved Amplified Polymorphic Sequence, délkový polymorfismus restričně štěpené amplifikované DNA = PCR-RFLP

cDNA - Komplementární DNA vzniká reverzní transkripcí z m-RNA

DNA - deoxyribonukleová kyselina

MACC - N-malonyl-1-aminocyklopropan-1-karboxylová kyselina

MCP - 1-metylcyklopropen

PCR- Polymerase Chain Reaction, polymerázová řetězová reakce

QTL - Quantitative Trait Loci, lokusy kvantitativních znaků

RAPD - Random Amplified Polymorphic DNA, náhodně amplifikovaná polymorfni DNA

RFLP- Restriction Fragment Length Polymorphism, Délkový polymorfismus restričních fragmentů

RNA- ribonukleová kyselina

RT-PCR - Reverse Transcription PCR, reverzní (zpětná) polymerázová reakce

SAM - S-adenosyl- L-metionin

SPLAT-PCR - Specific Polymorphic Locus Amplification Test, amplifikace specifického polymorfniho lokusu = STS-PCR

STS-PCR - Single Tagged Site, amplifikace jednoho cílového místa

Tag DNA polymeráza - polymeráza izolovaná z bakterie *Thermus aquaticus*

9. Použitá literatura

- Abeles, F. B., Biles, C. L. 1991. Cellulase activity in developing applefruits. *Sci. Hortic* 47 (1): 77-87.
- Barry, C. S., Llop-Tous, M. I., Grierson, D. 2000. The regulation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase gene expression during the transition from system-1 to system-2 ethylene synthesis in tomato. *Plant Physiol* 123 (3): 979-986.
- Binnie, J. E., McManus M. T. 2009. Characterization of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) oxidase multigene family of *Malus domestica* Borkh. *Phytochemistry* 70 (3): 348-360.
- Blažek, J. 2001. Pěstujeme jabloně. Praha: Brázda, ISBN 80-209-0294-5.
- Blažek, J., Beneš, V., Dlouhá, J., Janečková, M., Kneifl, V., Kosina, J., Lánský, M., Paprštejn, F., Pražák, M., Plíšek, B., Svoboda, A., Staněk, J., Sus, J., 1998. *Ovocnictví*. Praha: Květ, ISBN80-85362-43-0.
- Bleecker, A. B., Kende, H. 2000. Ethylene: A gaseous signal molecule in plants. *Annu Rev .Cell Dev. Biol.* 16 (3): 1-18.
- Brummell, D. A., Harpster, M. H. 2001. Cell wall metabolism in fruit softening a quality a its manipulation in transgenic plants. *Plant Mol Biol* 47: 311-340.
- Costa, F., Stella, S., Van de Weg, W. E., Guerra, W., Cecchinell, M., Dallivina, J., Koller, B., Sansavini, S. 2005. Role of the genes *Md-ACO1* a *Md-ACS1* in ethylene production a shelf life of apple (*Malus domestica* Borkh). *Euphytica* 141 (2): 181-190.
- Costa, F., Van de Weg, W. E., Stella, S., Dondini, L., Pratesi, D., Musacchi, S., Sansavini, S. 2008. Map position a functional allelic diversity of *Md-Exp7*, a new putative expansin gene associated with fruit softening in apple (*Malus × domestica* Borkh.) a pear (*Pyrus communis*). *Tree Genetics & Genomes* 4(3): 575-586.
- Český statistický úřad, dokumentace z webu, 2009. Dostupné v březnu 2010 na [http://www.czso.cz/csu/2008edicniplan.nsf/t/C600312DE1/\\$File/213308m2.jpg](http://www.czso.cz/csu/2008edicniplan.nsf/t/C600312DE1/$File/213308m2.jpg).
- Defilippi, B. G., Daekar, A. M., Kader, A. A. 2005. Relationship of ethylene biosynthesis, to volatile production, related enzymes, a precursor availability in apple peel a flesh. *J. Agric. Food Chem.* 53 (2):3133-3141
- Dong, J. G., Fernandez -Maculet, J. C., Yang S. F. 1992. Purification and charracterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase from apple fruit. *USA Proc. Natl. Acad.* 89 (3):9789-9793.
- Dvořák, A., Vondráček, J. 1969. *Jablka, malá pomologie I*. Státní zemědělské nakladatelství.

- Dvořák, A., Vondráček, J., Kohout, K. Blažek, J. 1976. Jablka. Praha: Academia. ISBN 80-200-0958-2.
- Ellison, J. 1997. Recombinant DNA - Restriction Fragment Length Polymorphisms. www publikace, <http://www.utexas.edu/courses/utgeneticstamu>, 1997, In: Vejl, P., Skupinová, S., Sedlák, P., Bardlová, M. 2002. Analýzy rostlinného genomu. Praha: ČZU v Praze, ISBN80-213-0903-2.
- Fan, X., Blankenship, S. M., Mattheis, J. P. 1999. 1-methylcyclopropene inhibits apple ripening. J. Am. Soc. Hortic. Sci. 124 (13):690-695.
- Gelfand, D. H., White, T. J. 1990. Thermostable DNA Polymerases. In: Innis, M. A. - Gelfand, D. H. - Sninsky, J. J. - White, T. J. (ed.): PCR protocols: A guide to methods and applications, San Diego, Academic. Press Inc. 129-141.
- Giovannoni, J. 2004. Genetic regulation of fruit development and ripening. Plant. Cell. 16 (1): 170-180.
- Glick, B. R. Thompson J. E. 1993. Methods in plant molecular biology and biotechnology. London: GRC Press. ISBN 0849351642.
- Goliáš, J. 2009. Podmínky pro uskladnění jablek, www publikace dostupná v březnu 2010 na http://www.agroweb.cz/tema-tydne/Podminky-pro-uskladneni-jablek__s47x32694.html.
- Gorney, J., Kader, A. 1996. Controlled-atmosphere suppression of ACC synthases and ACC oxidase in "Golden Delicious" apples during long-term cold storage. J. Am. Soc. Hortic. Sci. 121 (3): 751-755.
- Harada, T., Sunako, T., Sakuraba, W., Goto, S., Senda, M., Akada, S., Niizeki, M. 1997. Genomic nucleotide sequence of a ripening-related 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene (*Md-ACS-1*) in apple (accession no U89156) (PGR97-066), Plant Physiol. 113 (2): 1465.
- Harada, T., Sunako, T., Wakasa, Y., Soejima, J., Satoh, T., Niizeki, M. 2000. An allele of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene (*Md-ACS1*) accounts for the low level of ethylene production in climacteric fruits of some apple cultivars. Theor. Appl. Genet. 101 (5): 742-746.
- Harker, F. R., Maindonald, J., Murray, S. H., Gunson, F. A., Hallett, I. C., Walker, S. B. 2002. Sensory interpretation of instrumental measurements 1: texture of apple fruit. Postharvest Biol. Technol. 24 (2): 225-239.
- Harker, F. R., Redgwell, R. J., Hallett, I. C., Murray, S. H. 1997. Texture of fresh fruit. Hortic. Rev. 20 (3): 121-224.
- Henry, R. J. 1997. Practical applications of plant molecular biology. London: Chapman & Hall. ISBN 0-412-73220-3.
- Hruban, V., Stratil, A., Čepica S., Petr J., Hroudka M. 1999. Principy a aplikace molekulární genetiky ve šlechtění. Praha: ČZU v Praze. ISBN 80-213-0519-3.

- Hunter, D. A., Yoo, S. D., Butcher, S. M., McManus, M. T. 1999. Expression of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase during leaf ontogeny in white clover. *Plant Physiology* 120 (2): 131–142.
- Husáková, M. 2009. Trendy v moderním skladování ovoce, dostupné v březnu 2010 na http://www.agroweb.cz/rostlinna-vyroba/Trendy-v-modernim-skladovani-ovoce__s44x33806.html.
- Childers, N. F. 1969. *Modern fruit science*. New Brunswick.
- Innis, M. A., Gelfand, D. H. 1990. Optimization of PCRs. In: Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., White, T. J. (ed.): *PCR protocols: A guide to methods and applications*, New York: Academic Press. Inc. 3-12.
- Jaeger, S. R., Aani, Z., Wakeling, I. N., MacFie, H. J. H. 1998. Consumer preference for fresh and aged apples: a cross-cultural comparison. *Food. Qual. Preference* 9(1): 355-366.
- Janick, J., Cummins, J., Brown, N., Hemmat, M. 1996. *Apples. Fruit breed, Volume I: Tree and tropical fruits*. ISBN 0-471-31014-4.
- Jobling, J. J., McGlasson, W. B., Dilley, D. R. 1991. Induction of ethylene synthesising competency in 'Granny Smith' apples by exposure to low temperature in air, *Postharvest Biol. Technol.* 42 (1): 111-118. |
- Johnston, J. W., Hewett, E. W., Hertog, M. 2002. Postharvest softening of apple (*Malus domestica*) fruit: a review. *NZJ Crop. Hort. Sci.* 30 (3): 145-160.
- Kende, H. 1993. Ethylene biosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol Biol.* 44 (2): 283-307.
- King, G. J., Maliepaard, C., Lynn, J. R., Alston, F. H., Durel, C. E., Evans, K. M., Griffon, B., Laurens, F., Manganaris, A. G., Schrevels, E., Tartarini, S., Verhaegh, J. 2000. Quantitative genetics analysis and comparison of physical and sensory descriptors to fruit flesh firmness in apple (*Malus domestica* Mill.). *Theor. Appl. Genet.* 100 (5): 1074-1084.
- Maliepaard, C., Sillanpää, M. J., Van Ooijen, J.W., Jansen, R. C., Arjas, E. 2001. Bayesian versus frequentist analysis of multiple quantitative trait loci with an application to an outbred apple cross. *Theor. Appl. Genet.* 103(3): 1243-1253.
- Melounová, M., Vejl, P., Zoufalá, J., Blažek, J., Vávra, R. 2009. Nový PCR marker delece lokusu *Md-ACO1* ovlivňujícího měknutí plodů jabloní v průběhu skladování. In *Nové poznatky z genetiky a šlechtění polnohospodářských rostlin*. Zborník zo 16. Vedeckej konferencie, Piešťany: VÚRV. 199-200.
- Miller, M. P. 1998. *TFPGA (version 1.3). Tools for population genetic analysis*. Department of Biological Sciences, Northern Arizona University, Flagstaff, Arizona.
- Ondřej, M. 1992. *Genové inženýrství kulturních rostlin*. Praha: Academia, ISBN 80-200-0310.

- Ondřej, M.; Drobník, J. 2002. Transgenozé rostlin. Praha: Academia, ISBN 80-200-0958-2
- Oraguzie, N. C., Iwanami, H., Soejima, J., Harada, T., Hall, A. 2004. Inheritance of *Md-ACS1* gene a its relationship to fruit softening in apple (*Malus × domestica* Borkh.). Theor. Appl. Genet. 108 (8): 1526-1533.
- Oraguzie, N. C., Volz, R. K., Whitworth, C. J., Bassett, H. C. M., Hall, A. J., Gardiner, S. E. 2007. Influence of *Md-ACS1* allelotype a harvest season within an apple germplasm collection on fruit softening during cold air storage. Postharvest Biol Technol 44(4): 212-219.
- Picton, S., Gray, J. E., Grierson, D. 1995. Ethylene genes a fruit ripening. In: Davies PJ (ed) Plant hormones. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 372-394.
- Powell, A. L. T., Kalamakik, M. S., Kurien, P. A., Guerrieri, S., Bennett, A. B. 2003. Simultaneous transgenine suppression of LePG a LeExp1 influences fruit texture a juice viscosity in a fresh market tomato variety. J. Agric. Food Chem. 51 (1): 7450-7455.
- Procházka, S., Macháčková, I., Krekule, J., Šebánek, J. 1998. Fyziologie rostlin. Praha: Academia, ISBN 80-200-0586-2.
- Roger, J. 1972. Measures of genetic similarity and distance, Studies University texas, 7213: 145-153.
- Rose, J. K. C., Lee, H. H., Bennett, A. B. 1997. Expression of a divergent expansin gene is fruit-specific a ripening-regulated. 94(11): 5955-5960.
- Rosenfeld, C. L., Kiss, E., Hrazdira, G. 1996. *Md-ACS-2* (accession no U73815) a *Md-ACS-3* (accession no. U73816): two new 1-amniocyclopropane-1-carboxylate synthases in ripening apple fruit (PGR96-122), Plant Physiol. 112 (2): 1735.
- Saftner, R. A., Abbott, J. A., Conway, W. S., Barden, C. L., Vinyard, B. T. 2002. Instrumental a sensory quality characteristics of 'Gala' apples in response to prestorage heat, controlled atmosphere a air storage. J. Am. Soc. Hortic. Sci. 127 (3): 1006-1012.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H. 1989 Introduction AmpliTaq DNA polymerase. Amplification ,Perkin Elmer Cetus, 1- 4.
- Sambrook, J., Maniatis, T., Fritsch, E. F. 1989. Molecular cloning. A laboratory manual. Second edition, Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- Smith, A. R., Bell, M. H., Connens, C. P. K., Harpham, N. V. J., Raskin, I., Saers, I.O., Turner, R., Wood, C. K., Hall, M. A. 1990. In: Mechanisms of Plant Perception a Response to Environmental Stimuli. BSPGR Mon. No. 20, Pareccchments Ltd.Bristol 41.
- Soltis, D. E., Soltis, P. S. 1989. Isozymes in plant biology. Dioscorides Press, Portla, Oregon.

- Sunako, T., Sakuraba, W., Senda, M., Akada, S., Ishikawa, R., Niizeki, M., Harada, T. 1999. An allele of the ripening-specific 1-aminocyclopropane-1- carboxylic acid synthase gene (*ACS1*) in apple fruit with a long storage life. *Plant Physiol.* 119 (2): 1297-304.
- Tanksley, S. D. 1983. Molecular markers in plant breeding. *Plant. Mol. Biology Reporter*, 3-8.
- Vejl, P., Melounová, M., Sedlák, P., Zoufalá, J., Blažková, H., Milec, Z., Blažek, J., Vávra, R., Křelinová, J. 2005. Molekulární markery ve šlechtění jabloní. PowerPrint Praha:ČZU, ISBN 80-213-1287-4.
- Vejl, P., Skupinová, S., Sedlák, P., Bardlová, M. 2002. Analýzy rostlinného genomu. Praha: ČZU v Praze, ISBN80-213-0903-2.
- Vierstraete, A. 2001. PCR to amplify the requested gene. University of Ghent, www publikace, <http://allserv.rug.ac.be/~avierstr/>, In: Vejl, P., Skupinová, S., Sedlák, P., Bardlová, M. 2002. Analýzy rostlinného genomu. Praha: ČZU v Praze, ISBN80-213-0903-2.
- Vincent, J. F. V. 1989. Relationship between density and stiffness of apple flesh, *J. Sci. Food Agric.* 47 (2-3): 443-462.
- Wakasa, Y., Kudo, H., Ishikawa, R., Akada, S., Senda, M., Niizeki, M., Harada, T. 2006. Low expression of an endopolygalacturonase gene in apple fruit with long-term storage potential. *Postharvest Biol. Technol.* 39 (2): 193-198.
- Walter, V. 1997. Rozmnožování okrasných stromů a keřů. Praha: Brázda, ISBN 80-209-0268-6.
- Watkins, C. B., Nock, J. F., Whitaker, B. D. 2000. Response of early, mid a late season apple cultivars to postharvest application of 1-methylcyclopropene under air a controlled atmosphere storageconditions. *Postharvest Biol. Technol.* 19 (1): 17-32.
- Watson, J. D, Tooze, J. Kurtz, D. T. 1988. Rekombinantní DNA. Praha: Academica .
- Zhu, Y., Barritt, B. H. 2008. *Md-ACS1* a *Md-ACO1* genotyping of apple (*Malus x domestica* Borkh.) breeding parents a suitability for marker-assisted selection. *Tree Genetics a Genomes* 4 (2): 555-562.
- Zoufalá, J. 2008. Diplomová práce: Genetické zdroje jabloní a jejich genetická analýza. Praha: ČZU v Praze.
- Zoufalá, J., Vejl, P., Melounová, M., Blažek, J., Křelinová, J. 2009. Apple genetic resources and their molecular analysis. In: *Agriculture – J. Agric. Sci.* 55 (2): 69-79.