

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra genetiky a šlechtění



**Expresse alergenů genové rodiny *Mal d 4* a genů *PLA21*,
PLA23 a *TGase* ve slupce a dužnině jablek**

Diplomová práce

Autor práce: Klára Haiclová

Obor studia: Biotechnologie a šlechtění rostlin

Vedoucí práce: doc. Dr. Ing. Pavel Vejl

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Exprese alergenů genové rodiny *Mal d 4* a genů *PLA21*, *PLA23* a *TGase* ve slupce a dužnině jablek" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 15. 4. 2019

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala především vedoucímu své diplomové práce doc. Dr. Ing. Pavlu Vejlovi za jeho odborné vedení, veškeré konzultace, trpělivost a pomoc při náročném zpracování dat. Velké poděkování patří také Mgr. Martině Melounové, Ph.D. za vedení při laboratorní práci a za všechny cenné rady.

Expresse alergenů genové rodiny *Mal d 4* a genů *PLA21*, *PLA23* a *TGase* ve slupce a dužnině jablek

Souhrn

Jablečné plody mají ve výživě člověka důležitou roli. Pomáhají s regulací činnosti trávicího ústrojí působením pektinových látek, organických kyselin či enzymů. Také je jejich konzumací snižováno riziko mrtvice, srdečních chorob či rakoviny plic. V posledních letech byl ale zaznamenán vysoký nárůst počtu alergických reakcí objevujících se po konzumaci tohoto ovoce.

V této diplomové práci byla studována exprese izoformem *Mal d 1.02*, *Mal d 4.01*, *Mal d 4.02*, *Mal d 4.03*, *Mal d 4.04* a genů *PLA21*, *PLA23* a *TGase* u 14 odrůd jablek pocházejících z experimentálních výsadb VŠÚO Holovousy s.r.o. Byly studovány rozdíly v expresi genů vzhledem k roku sklizně, analyzovanému typu pletiva, odrůdě a biologickému replikátu. Vyhodnocení bylo provedeno pomocí metody stanovení relativní exprese genů, založené na kvantitativní Real-Time polymerázové řetězové reakci (qRT-PCR). Ke statistickému zpracování výsledků jsme použili hodnoty ΔCq , které byly vztaheny k referenčnímu genu pro aktin 7.

Z výsledků této diplomové práce vyplývá, že exprese genu *Mal d 1.02* je majoritní ve srovnání s ostatními zkoumanými geny, a to bez ohledu na rok sklizně, analyzovaný typ pletiva, odrůdu a biologický replikát. Bylo prokázáno, že rok sklizně hraje velkou roli při posuzování míry exprese analyzovaných genů. Je to pravděpodobně způsobeno odlišnými stresovými faktory, kterým byly v jednotlivých letech jablečné plody vystaveny. Při posuzování intenzity exprese nebyl výběr odrůdy důležitý zejména kvůli nízké míře exprese většiny genů napříč všemi odrůdami. Expresse testovaných genů se mezi biologickými replikáty nelišila, replikáty spolu úzce korelovaly, čímž jsme potvrdili správnost metodického postupu.

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

Klíčová slova: jabloň, *Malus x domestica*, izoalergeny, *Mal d 4*, *PLA21*, *PLA23*, *TGase*, qRT-PCR

Expression of allergens from gene family *Mal d 4* and genes *PLA21*, *PLA23* and *TGase* in apple skin and flesh

Summary

Apple fruit plays an important role in human nutrition. They help with the regulation of the digestive tract by the action of pectin substances, organic acids or enzymes. They also reduce risk of stroke, heart disease or lung cancer. However, in recent years there has been a high increase in the number of allergic reactions occurring after consumption of this fruit.

In this diploma thesis, the expression of isoforms *Mal d 1.02*, *Mal d 4.01*, *Mal d 4.02*, *Mal d 4.03*, *Mal d 4.04* and genes *PLA21*, *PLA23* and *TGase* in 14 apple varieties from experimental plots of VŠÚO Holovousy s.r.o. were studied. Differences in gene expression were studied, based on harvest year, tissue type analyzed, variety and biological replicate. The evaluation was performed using the method of relative gene expression based on quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR). For statistical processing of the results we used ΔCq values, which were related to the reference gene for actin 7.

The results of this thesis show that *Mal d 1.02* gene expression is major compared to the other genes examined, regardless of harvest year, analyzed tissue type, variety and biological replicate. The harvest year has been shown to play a major role in assessing the expression level of the analyzed genes. This is probably due to the different stress factors that apple fruits have been exposed to each year. In assessing the intensity of expression, the choice of variety was not particularly important due to the low expression of most genes across all varieties. Expression of test genes did not differ between biological replicates, replicates closely correlated, thus confirming the correctness of the methodologies.

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

Keywords: apple tree, *Malus x domestica*, isoallergens, *Mal d 4*, *PLA21*, *PLA23*, *TGase*, qRT-PCR

Obsah

1 Úvod	1
2 Vědecké hypotézy a cíle práce.....	2
2.1 Vědecké hypotézy	2
2.2 Cíle práce	2
3 Přehled literatury	3
3.1 <i>Malus x domestica</i> Borkh. (jabloň domácí).....	3
3.1.1 Popis druhu	3
3.1.2 Historie a rozšíření druhu.....	4
3.1.3 Fylogenetický původ druhu.....	5
3.1.4 Význam ovoce ve výživě člověka	5
3.1.4.1 Chemické složení jablečných plodů	6
3.2 Alergie.....	7
3.2.1 Alergeny	8
3.2.1.1 Nejčastější skupiny alergenů	9
3.2.1.1.1 Pyl.....	9
3.2.1.1.2 Plísně	9
3.2.1.1.3 Potraviny.....	9
3.2.2 Léčba alergických onemocnění	10
3.2.2.1 Eliminace alergenu.....	10
3.2.2.2 Léčba alergického zánětu	10
3.2.2.3 Alergenová imunoterapie.....	10
3.2.2.4 Pomocná léčba	11
3.3 Alergie na jablečné plody.....	11
3.3.1 Orální alergický syndrom (OAS).....	11
3.3.2 Zkřížené alergie (zkřížená reaktivita)	12
3.3.3 Jablečné alergený	12
3.3.3.1 Alergen <i>Mal d 1</i>	13
3.3.3.2 Alergen <i>Mal d 2</i>	15
3.3.3.3 Alergen <i>Mal d 3</i>	16
3.3.3.4 Alergen <i>Mal d 4</i>	17
3.3.3.5 Faktory ovlivňující množství alergenů v jablečných plodech	19
3.3.3.5.1 Odrůda.....	19

3.3.3.5.2 Skladování.....	19
3.3.3.5.3 Stres.....	20
3.3.3.5.4 Rozdílná exprese alergenů mezi slupkou a dužninou	20
3.3.4 Fosfolipidové signální dráhy.....	20
3.3.4.1 Fosfolipázy.....	21
3.3.4.1.1 <i>PLA</i> ₂	22
3.3.5 Transglutamináza (<i>TGase</i>).....	22
3.4. Kvantitativní polymerázová řetězová reakce (qRT-PCR)	23
3.4.1 Fluorescenční činidla	24
3.4.1.1 Nespecifické chemikálie	24
3.4.1.1.1 SYBR Green	24
3.4.1.2 Specifické chemikálie	25
3.4.1.2.1 Fluorescenčně značené primery	25
3.4.1.2.2 Fluorescenčně značené sondy	25
3.4.2 Využití qRT-PCR	26
3.4.2.1 Absolutní kvantifikace.....	27
3.4.2.2 Relativní kvantifikace	28
4 Materiál a metody.....	29
4.1 Rostlinný materiál	29
4.1.1 Analyzované odrůdy	29
4.2 Izolace RNA	41
4.2.1 Příprava materiálu	41
4.2.2 Izolace celkové RNA.....	42
4.2.3 Vyhodnocení výtěžnosti RNA	43
4.2.4 Syntéza cDNA	43
4.2.5 Amplifikace izoformy <i>Mal d 1.02</i> , izoforem genové rodiny <i>Mal d 4</i> , vybraných izoforem <i>PLA</i> ₂ a <i>TGase</i>	44
4.3 Zpracování dat z qRT-PCR	47
4.3.1 Stanovení parametru Ratio ΔCq	47
4.4. Statistické zpracování výsledků.....	47
5 Výsledky.....	48
5.1 Přehled stanovených hodnot Ratio ΔCq a variačních koeficientů (V _k)	48
5.2 Statistické vyhodnocení rozdílů hodnot Ratio ΔCq pro všechny geny	55
5.2.1 Analýza rozdílů dle roku sklizně	56

5.2.2	Analýza rozdílů dle typu pletiva	57
5.2.3	Analýza rozdílů dle testovaného genu.....	59
5.2.4	Analýza rozdílů dle testované odrůdy	61
5.2.5	Analýza rozdílů mezi biologickými replikáty	63
5.3	Statistické vyhodnocení rozdílů hodnot Ratio ΔCq pro genovou rodinu <i>Mal d 4</i> , <i>PLA21</i> , <i>PLA23</i> a <i>TGase</i>	64
5.3.1	Analýza rozdílů dle roku sklizně pro izoformy <i>Mal d 4</i> , <i>PLA21</i> , <i>PLA23</i> a <i>TGase</i>	66
5.3.2	Analýza rozdílů dle typu pletiva pro izoformy <i>Mal d 4</i> , <i>PLA21</i> , <i>PLA23</i> a <i>TGase</i>	68
5.3.3	Analýza rozdílů dle izoform <i>Mal d 4</i> , <i>PLA21</i> , <i>PLA23</i> a <i>TGase</i>	69
5.3.4	Analýza rozdílů dle testované odrůdy pro izoformy <i>Mal d 4</i> , <i>PLA21</i> , <i>PLA23</i> a <i>TGase</i>	71
5.3.5	Analýza rozdílů mezi biologickými replikáty pro izoformy <i>Mal d 4</i> , <i>PLA21</i> , <i>PLA23</i> a <i>TGase</i>	73
5.4	Statistické vyhodnocení rozdílů hodnot Ratio ΔCq pro izoformy <i>Mal d 4</i>	74
5.4.1	Analýza rozdílů dle roku sklizně pro izoformy <i>Mal d 4</i>	76
5.4.2	Analýza rozdílů dle typu pletiva pro izoformy <i>Mal d 4</i>	77
5.4.3	Analýza rozdílů dle testované izoformy <i>Mal d 4</i>	78
5.4.4	Analýza rozdílů dle testované odrůdy pro izoformy <i>Mal d 4</i>	80
5.4.5	Analýza rozdílů mezi biologickými replikáty pro izoformy <i>Mal d 4</i>	82
5.5	Statistické vyhodnocení rozdílů hodnot Ratio ΔCq pro izoformy <i>Mal d 4.01</i> , <i>Mal d 4.02</i> , <i>Mal d 4.03</i> a <i>TGase</i>	83
5.5.1	Analýza rozdílů dle roku sklizně pro izoformy <i>Mal d 4.01</i> , <i>Mal d 4.02</i> , <i>Mal d 4.03</i> a <i>TGase</i>	85
5.5.2	Analýza rozdílů dle typu pletiva pro izoformy <i>Mal d 4.01</i> , <i>Mal d 4.02</i> , <i>Mal d 4.03</i> a <i>TGase</i>	87
5.5.3	Analýza rozdílů dle izoform <i>Mal d 4.01</i> , <i>Mal d 4.02</i> , <i>Mal d 4.03</i> a <i>TGase</i>	88
5.5.4	Analýza rozdílů dle testované odrůdy pro izoformy <i>Mal d 4.01</i> , <i>Mal d 4.02</i> , <i>Mal d 4.03</i> a <i>TGase</i>	89
5.5.5	Analýza rozdílů mezi biologickými replikáty pro izoformy <i>Mal d 4.01</i> , <i>Mal d 4.02</i> , <i>Mal d 4.03</i> a <i>TGase</i>	91
5.6	Hodnocení závislosti míry exprese pomocí regresní a korelační analýzy.....	93
5.6.1	Hodnocení závislosti exprese studovaných genů biologického replikátu B na biologickém replikátu A	93
5.6.2	Hodnocení závislosti exprese studovaných genů z roku 2017 na rok 2016.....	94
5.6.3	Hodnocení závislosti exprese izoform <i>Mal d 4</i> , <i>PLA21</i> , <i>PLA23</i> a <i>TGase</i> na izoformě <i>Mal d 1.02</i>	94
6	Diskuze	109
6.1	Rostlinný materiál	109
6.2	Metodický postup izolace RNA, tvorby cDNA a amplifikace.....	109
6.3	Expres genů vyjádřená hodnotami Ratio ΔCq	110

6.4 Vliv jednotlivých třídících faktorů na hodnoty Ratio ΔCq všech testovaných genů	111
6.4.1 Vliv roku sklizně na míru exprese analyzovaných genů	111
6.4.2. Vliv typu pletiva na míru exprese analyzovaných genů	111
6.4.3 Vliv odrůdy na míru exprese analyzovaných genů	112
6.4.4 Vliv biologického replikátu na míru exprese analyzovaných genů	112
6.5 Rozdíly v míře exprese analyzovaných genů.....	113
7 Závěr.....	114
8 Seznam použité literatury	115
9 Seznam použitých zkratk	122

Seznam obrázků

Obrázek 1: Struktura alergenu Mal d 1.0101	14
Obrázek 2: Struktura alergenu Mal d 2	15
Obrázek 3: Struktura alergenu Mal d 3	17
Obrázek 4: Struktura alergenu Mal d 4	18
Obrázek 5: Amplifikační křivka s rozdílnými hodnotami Ct (=Cq)	27
Obrázek 6: Odrůda 'Nikoleta'	29
Obrázek 7: Odrůda 'Frosta'	30
Obrázek 8: Odrůda 'Jonagold Marnika'	31
Obrázek 9: Odrůda 'Topaz'	31
Obrázek 10: Odrůda 'Meteor'	32
Obrázek 11: Odrůda 'Flordika'	33
Obrázek 12: Odrůda 'Artiga'	34
Obrázek 13: Odrůda 'Jonagored Supra'	35
Obrázek 14: Odrůda 'Jonagored Supra'	36
Obrázek 15: Odrůda 'Idared'	37
Obrázek 16: Odrůda 'Lady Silvia'	38
Obrázek 17: Odrůda 'Reluga'	39
Obrázek 18: Odrůda 'Jonagold'	40
Obrázek 19: Odrůda 'Golden Delicious'	41

Seznam tabulek

Tabulka 1: Průměrný obsah některých látek a prvků v jablečných plodech	7
Tabulka 2: Schéma experimentu probíhajícího v termocykleru	45
Tabulka 3: Primerové páry použité pro amplifikaci analyzovaných genů v qRT-PCR (upraveno dle Pagliarani et al. 2013; Paris et al. 2017)	46
Tabulka 4: Aritmetické průměry výsledných hodnot Ratio ΔCq a jejich variační koeficienty pro izoformy Mal d 4 u analyzovaných vzorků dužniny plodů z ročníku 2016 a 2017	49
Tabulka 5: Aritmetické průměry výsledných hodnot Ratio ΔCq a jejich variační koeficienty pro izoformy Mal d 4 u analyzovaných vzorků slupky plodů z ročníku 2016 a 2017	50
Tabulka 6: Aritmetické průměry výsledných hodnot Ratio ΔCq a jejich variační koeficienty pro PLA21, PLA23 a TGase u analyzovaných vzorků dužniny plodů z ročníku 2016 a 2017	51
Tabulka 7: Aritmetické průměry výsledných hodnot Ratio ΔCq a jejich variační koeficienty pro PLA21, PLA23 a TGase u analyzovaných vzorků slupky plodů z ročníku 2016 a 2017	52
Tabulka 8: Aritmetické průměry výsledných hodnot Ratio ΔCq a jejich variační koeficienty pro izoformu Mal d 1.02 u analyzovaných vzorků dužniny plodů z ročníku 2016 a 2017	53
Tabulka 9: Aritmetické průměry výsledných hodnot Ratio ΔCq a jejich variační koeficienty pro izoformu Mal d 1.02 u analyzovaných vzorků slupky plodů z ročníku 2016 a 2017	54
Tabulka 10: Pravděpodobnost shody hodnot mediánů Ratio ΔCq mezi roky sklizně – výsledek Kruskal-Wallisovy analýzy	57
Tabulka 11: Pravděpodobnost shody mediánů Ratio ΔCq mezi typy pletiva – výsledek Kruskal-Wallisovy analýzy	58

Tabulka 12: Pravděpodobnost shody mediánů Ratio ΔCq mezi analyzovanými geny – výsledek Kruskal-Wallisovy analýzy	60
Tabulka 13: Pravděpodobnost shody mediánů Ratio ΔCq mezi analyzovanými odrůdami – výsledek Kruskal-Wallisovy analýzy	62
Tabulka 14: Pravděpodobnost shody mediánů Ratio ΔCq mezi biologickými replikáty A a B – výsledek Kruskal-Wallisovy analýzy	64
Tabulka 15: Pravděpodobnost shody hodnot mediánů Ratio ΔCq mezi roky sklizně pro izoformy Mal d 4, PLA21, PLA23 a TGase – výsledek Kruskal-Wallisovy analýzy	67
Tabulka 16: Pravděpodobnost shody mediánů Ratio ΔCq mezi typy pletiva pro izoformy Mal d 4, PLA21, PLA23 a TGase – výsledek Kruskal-Wallisovy analýzy	68
Tabulka 17: Pravděpodobnost shody mediánů Ratio ΔCq mezi izoformami Mal d 4, PLA21, PLA23 a TGase – výsledek Kruskal-Wallisovy analýzy	70
Tabulka 18: Pravděpodobnost shody mediánů Ratio ΔCq mezi analyzovanými odrůdami pro izoformy Mal d 4, PLA21, PLA23 a TGase – výsledek Kruskal-Wallisovy analýzy	72
Tabulka 19: Pravděpodobnost shody mediánů Ratio ΔCq mezi biologickými replikáty A a B pro izoformy Mal d 4, PLA21, PLA23 a TGase	74
Tabulka 20: Pravděpodobnost shody hodnot mediánů Ratio ΔCq mezi roky sklizně pro izoformy Mal d 4 – výsledek Kruskal-Wallisovy analýzy	76
Tabulka 21: Pravděpodobnost shody mediánů Ratio ΔCq mezi typy pletiva pro izoformy Mal d 4 – výsledek Kruskal-Wallisovy analýzy	77
Tabulka 22: Pravděpodobnost shody mediánů Ratio ΔCq mezi analyzovanými izoformami Mal d 4 – výsledek Kruskal-Wallisovy analýzy	79
Tabulka 23: Pravděpodobnost shody mediánů Ratio ΔCq mezi analyzovanými odrůdami pro izoformy Mal d 4 – výsledek Kruskal-Wallisovy analýzy	81
Tabulka 24: Pravděpodobnost shody mediánů Ratio ΔCq mezi biologickými replikáty A a B pro izoformy Mal d 4 – výsledek Kruskal-Wallisovy analýzy	82
Tabulka 25: Pravděpodobnost shody hodnot mediánů Ratio ΔCq mezi roky sklizně pro izoformy Mal d 4.01, Mal d 4.02, Mal d 4.03 a TGase – výsledek Kruskal-Wallisovy analýzy	86
Tabulka 26: Pravděpodobnost shody mediánů Ratio ΔCq mezi typy pletiva pro izoformy Mal d 4.01, Mal d 4.02, Mal d 4.03 a TGase – výsledek Kruskal-Wallisovy analýzy	87
Tabulka 27: Pravděpodobnost shody mediánů Ratio ΔCq mezi izoformami Mal d 4.01, Mal d 4.02, Mal d 4.03 a TGase – výsledek Kruskal-Wallisovy analýzy	88
Tabulka 28: Pravděpodobnost shody mediánů Ratio ΔCq mezi analyzovanými odrůdami pro izoformy Mal d 4.01, Mal d 4.02, Mal d 4.03 a TGase – výsledek Kruskal-Wallisovy analýzy	90
Tabulka 29: Pravděpodobnost shody mediánů Ratio ΔCq mezi biologickými replikáty pro izoformy Mal d 4.01, Mal d 4.02, Mal d 4.03 a TGase	92
Tabulka 30: Primerové páry pro izoformy Mal d 1.02, Mal d 4.01, Mal d 4.02 a Mal d 4.03 dle Botton et al. (2008)	110

Seznam grafů

Graf 1: Histogram stanovených hodnot Ratio ΔCq pro všechny geny v porovnání s Gaussovou křivkou normálního rozdělení	55
Graf 2: p-graf sestavený na základě hodnot Ratio ΔCq pro jednotlivé biologické replikáty v porovnání s očekávaným průběhem normálního rozdělení	56
Graf 3: Diferenciace mediánů a rozptyl hodnot Ratio ΔCq mezi roky sklizně	57

Graf 4: Diferenciace mediánů a rozptyl hodnot Ratio ΔCq mezi slupkou a dužninou	59
Graf 5: Diferenciace mediánů a rozptyl hodnot Ratio ΔCq mezi testovanými geny	61
Graf 6: Diferenciace mediánů a rozptyl hodnot Ratio ΔCq mezi testovanými odrůdami	63
Graf 7: Diferenciace mediánů a rozptyl hodnot Ratio ΔCq mezi biologickými replikáty	64
Graf 8: Histogram stanovených hodnot Ratio ΔCq pro genovou rodinu Mal d 4, PLA21, PLA23 a TGase v porovnání s Gaussovou křivkou normálního rozdělení	65
Graf 9: p-graf sestavený na základě hodnot Ratio ΔCq izoformem Mal d 4, PLA21, PLA23 a TGase v porovnání s očekávaným průběhem normálního rozdělení	66
Graf 10: Diferenciace mediánů a rozptyl hodnot Ratio ΔCq mezi roky sklizně pro izoformy Mal d 4, PLA21, PLA23 a TGase	68
Graf 11: Diferenciace mediánů a rozptyl hodnot Ratio ΔCq mezi slupkou a dužninou pro izoformy Mal d 4, PLA21, PLA23 a TGase	69
Graf 12: Diferenciace mediánů a rozptyl hodnot Ratio ΔCq mezi testovanými geny pro izoformy Mal d 4, PLA21, PLA23 a TGase	71
Graf 13: Diferenciace mediánů a rozptyl hodnot Ratio ΔCq mezi testovanými odrůdami pro izoformy Mal d 4, PLA21, PLA23 a TGase	73
Graf 14: Diferenciace mediánů a rozptyl hodnot ΔCq mezi biologickými replikáty pro izoformy Mal d 4, PLA21, PLA23 a TGase	74
Graf 15: Histogram stanovených hodnot Ratio ΔCq pro izoformy Mal d 4 v porovnání s Gaussovou křivkou normálního rozdělení	75
Graf 16: p-graf sestavený na základě hodnot Ratio ΔCq pro izoformy Mal d 4 v porovnání s očekávaným průběhem normálního rozdělení	76
Graf 17: Diferenciace mediánů a rozptyl hodnot Ratio ΔCq mezi roky sklizně pro izoformy Mal d 4 ..	77
Graf 18: Diferenciace mediánů a rozptyl hodnot Ratio ΔCq mezi slupkou a dužninou pro izoformy Mal d 4	78
Graf 19: Diferenciace mediánů a rozptyl hodnot Ratio ΔCq mezi testovanými izoformami Mal d 4	80
Graf 20: Diferenciace mediánů a rozptyl hodnot Ratio ΔCq mezi testovanými odrůdami pro izoformy Mal d 4	82
Graf 21: Diferenciace mediánů a rozptyl hodnot Ratio ΔCq mezi biologickými replikáty pro izoformy Mal d 4	83
Graf 22: Histogram stanovených hodnot Ratio ΔCq pro izoformy Mal d 4.01, Mal d 4.02, Mal d 4.03 a TGase v porovnání s Gaussovou křivkou normálního rozdělení	84
Graf 23: p-graf sestavený na základě hodnot Ratio ΔCq pro izoformy Mal d 4.01, Mal d 4.02, Mal d 4.03 a TGase v porovnání s očekávaným průběhem normálního rozdělení	85
Graf 24: Diferenciace mediánů a rozptyl hodnot Ratio ΔCq mezi roky sklizně pro izoformy Mal d 4.01, Mal d 4.02, Mal d 4.03 a TGase	86
Graf 25: Diferenciace mediánů a rozptyl hodnot Ratio ΔCq mezi slupkou a dužninou ro izoformy Mal d 4.01, Mal d 4.02, Mal d 4.03 a TGase	88
Graf 26: Diferenciace mediánů a rozptyl hodnot Ratio ΔCq mezi izoformami Mal d 4.01, Mal d 4.02, Mal d 4.03 a TGase	89
Graf 27: Diferenciace mediánů a rozptyl hodnot Ratio ΔCq mezi testovanými odrůdami ro izoformy Mal d 4.01, Mal d 4.02, Mal d 4.03 a TGase	91
Graf 28: Diferenciace mediánů a rozptyl hodnot Ratio ΔCq mezi biologickými replikáty pro izoformy Mal d 4.01, Mal d 4.02, Mal d 4.03 a TGase	92
Graf 29: Závislost exprese všech studovaných genů replikátu B na replikátu A	93
Graf 30: Závislost exprese všech studovaných genů roku sklizně 2017 na roku sklizně 2016	94

Graf 31: Závislost exprese Mal d 4.01 v dužnině na expresi Mal d 1.02 v dužnině	95
Graf 32: Závislost exprese Mal d 4.02 v dužnině na expresi Mal d 1.02 v dužnině	96
Graf 33: Závislost exprese Mal d 4.03 v dužnině na expresi Mal d 1.02 v dužnině	97
Graf 34: Závislost exprese Mal d 4.04 v dužnině na expresi Mal d 1.02 v dužnině	98
Graf 35: Závislost exprese PLA21 v dužnině na expresi Mal d 1.02 v dužnině	99
Graf 36: Závislost exprese PLA23 v dužnině na expresi Mal d 1.02 v dužnině	100
Graf 37: Závislost exprese TGase v dužnině na expresi Mal d 1.02 v dužnině	101
Graf 38: Závislost exprese Mal d 4.01 ve slupce na expresi Mal d 1.02 ve slupce	102
Graf 39: Závislost exprese Mal d 4.02 ve slupce na expresi Mal d 1.02 ve slupce	103
Graf 40: Závislost exprese Mal d 4.03 ve slupce na expresi Mal d 1.02 ve slupce	104
Graf 41: Závislost exprese Mal d 4.04 ve slupce na expresi Mal d 1.02 ve slupce	105
Graf 42: Závislost exprese PLA21 ve slupce na expresi Mal d 1.02 ve slupce	106
Graf 43: Závislost exprese PLA23 ve slupce na expresi Mal d 1.02 ve slupce	107
Graf 44: Závislost exprese TGase ve slupce na expresi Mal d 1.02 ve slupce	108

1 Úvod

Jablečné plody mají ve výživě člověka nezastupitelnou roli. Obsahují vitamíny, minerály, vlákninu i sekundární metabolity jako jsou flavonoidy, fenoly a karotenoidy. Jsou také schopné vázat toxické látky (Paris et al. 2017). Bylo potvrzeno, že konzumací jablek dochází ke snižování rizik mrtvice, srdečních chorob i rakoviny plic (Knekt et al. 1996; Knekt et al. 2000; Le Marchand et al. 2000). Pojídání jablek působí pozitivně i na náš chrup a na nervovou soustavu (Hričovský et al. 2003). Bohužel v posledních letech přibývá jedinců alergických na tento druh ovoce.

Jablečné plody jsou dokonce nejčastější příčinou alergických reakcí v rámci čeledi *Rosaceae* a jsou zodpovědné za čtvrtou nejčastější příčinu potravinových alergií (Burney et al. 2010). V současné době je jedinou prevencí proti alergickým reakcím vyhýbání se tomuto ovoci. Z toho důvodu se objevuje stále větší snaha produkovat jablečné plody, které nebudou způsobovat žádné alergické reakce (Paris et al. 2017).

V jablečných plodech byly dosud identifikovány 4 hlavní třídy alergenů – *Mal d 1*, *Mal d 2*, *Mal d 3* a *Mal d 4*. Za hlavní alergeny jablek se považují izoformy alergenu *Mal d 1*, jejichž exprese je tak dobře prozkoumána (Gao et al. 2008; Ahammer et al. 2017). Nejpoužívanější metodou pro kvantifikaci genové exprese je relativní kvantifikace, při které jsou pomocí qRT-PCR zjišťovány změny v množství mRNA testovaného genu v porovnání s referenčním genem (Livak & Schmittgen 2001).

V této diplomové práci byla hodnocena exprese izoalergenů *Mal d 1.02*, *Mal d 4.01*, *Mal d 4.02*, *Mal d 4.03*, *Mal d 4.04* a enzymů *PLA21*, *PLA23* a *TGase*, které by podle nové studie Paris et al. (2017) mohly mít také významný podíl na určení alergenicity jablek. Expresí genů byly porovnávány mezi dvěma roky sklizně, 14 analyzovanými odrůdami, dvěma biologickými replikáty a dvěma typy pletiva jablečných plodů – slupkou a dužninou.

2 Vědecké hypotézy a cíle práce

2.1 Vědecké hypotézy

Vědecké hypotézy, které byly použity v této diplomové práci, lze shrnout do následujících bodů:

1. Exprese izoalergenů genové rodiny *Mal d 4* a genů *PLA21*, *PLA23* a *TGase* je srovnatelná s expresí hlavních jablečných izoalergenů z rodiny *Mal d 1*.
2. Existují meziodrůdové rozdíly v expresi výše uvedených genů.
3. Intenzita exprese výše uvedených genů může být ovlivněna ročníkem, ve kterém byly sklizeny analyzované plody.

2.2 Cíle práce

Z výše uvedených hypotéz vyplývají následující cíle práce:

- A) Získat kolekci plodů alespoň 10 odrůd jablek, které byly vypěstovány v identických agrotechnických podmínkách experimentálních výsadeb VŠÚO Holovousy s.r.o.
- B) Optimalizovat metodický postup stanovení exprese výše uvedených nových jablečných alergenů.
- C) Pomocí kvantitativní PCR stanovit relativní exprese vybraných genů ve slupce i dužnině plodů okamžitě po sklizni.
- D) Provést statistické vyhodnocení výsledků s cílem porovnat rozdíly v expresi způsobené odrůdou a ročníkem.

3 Přehled literatury

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

3.1.1 Popis druhu

Rod *Malus* řadíme do čeledi růžovitých (*Rosaceae*) a podčeledi mandloňovitých (*Amygdaloideae*). Obsahuje kolem 30 původních druhů a několik desítek druhů hybridních. Mezi planě se vyskytující druhy jabloní patří např. *Malus sylvestris* Miller (jabloň lesní), *Malus dasycphylla* Borkh. (jabloň plstnatá), *Malus baccata* (L.) Borkh. (jabloň drobnoplodá) či *Malus floribunda* Sieb. (jabloň mnohokvětá). Velký význam má zejména poslední zmiňovaná jabloň, *Malus floribunda*, jelikož z ní byly vyšlechtěny odrůdy rezistentní vůči strupovitosti. V současné době hybridní druh *Malus x domestica* Borkh. (jabloň domácí) zahrnuje všechny kulturní odrůdy jabloní (Blažek 2001).

Jabloň domácí je nejvýznamnější ovocný druh mírného pásu, který je hojně pěstován v sadech i zahradách (Hejný & Slavík 2003). Je to strom vysoký obvykle 10 až 14 m, který poměrně mělce koření – většina kořenů se nalézá pouze v hloubce 20-60 cm (Dvořák 1980). Jeho kmen má borku šedou až tmavě šedou, loupající se v tenkých plátcích. Listy *M. domestica* jsou eliptické až úzce okrouhlé, obvykle až kolem 12 cm dlouhé a 6,5 cm široké, na vrcholu zašpičatělé a na okraji pilovité. Vrchní strana čepele je mírně ochlupená, spodní strana bývá plstnatá. Květenstvím jabloně domácí je chudokvětý chocholík se 4 až 8 oboupohlavními květy, které jsou 4 až 5 cm široké. Jejich korunní lístky jsou zbarveny bíle, z vnější strany jsou lehce narůžovělé (Blažek 2001).

Plodem jabloní jsou jablka (malvice) rozmanitých tvarů, velikostí i barev, závisejících na dané odrůdě. Obsahují 5-12 tmavě hnědých kapkovitých semen, byly už vyšlechtěny i odrůdy s absencí semen. Barva plodu je odrůdovým znakem a zpravidla se pohybuje od zelené, žluté, červené až po tmavě vínovou. Často však bývají na plodech barvy kombinované. Před vysycháním chrání plody vrstva kutikuly, dle jejíhož množství se dá rovněž dobře určit konkrétní odrůda. Kulturní jabloně zpravidla plodí kolem 150-200 kg jablek ročně (Dvořák 1980). Jabloň domácí se dožívá 80-150 let, produktivní věk jejích kultivarů je však kratší – plodit začínají mezi 5. až 15. rokem života (Blažek 2001).

Jabloni domácí se dobře daří na humózních půdách, bohatých na živiny. Průměrná roční teplota, která je optimální pro tento druh stromů, by se měla pohybovat nad 6,5°C. Roční úhrn srážek vhodný pro pěstování *M. domestica* by měl být mezi 500-800 mm (Hejný

& Slavík 2003). V oblastech s nižší úrovní srážek je potřeba pro pěstování jabloní závlaha. Jabloně se pěstují zejména v nadmořských výškách od 150 m do 400 m, přičemž je lze pěstovat i ve vyšších polohách, kde však hrozí mnohem častější promrznutí květů. Limitující podmínky pro pěstování jabloní obvykle zahrnují hladinu podzemní vody, půdní profil, srážkové poměry a konfiguraci terénu (Blažek 2001).

Odrůdy jabloní, které se běžně pěstují, jsou cizosprašné. Většina z nich je diploidních a jsou označovány za skvělé opylovače kvůli jejich dobře klíčovému pylu. Mezi triploidní odrůdy patří mj. odrůdy 'Boskoopské červené' a 'Jonagold' se špatně klíčivým pylem a tedy i neschopností opylovat jiné odrůdy (Sus 1992).

Odrůdy lze rozdělit podle doby zrání na rané (letní), podzimní, pozdně podzimní až raně zimní, zimní a pozdně zimní. Ve spojení s odrůdami se můžeme velmi často setkat s výrazem sklizňová zralost, která označuje stav, kdy jsou plody lehce odlučitelné od plodonoše, slupka je vybarvená světlejším odstínem a semena jsou nahnědlá. Optimální chuti dosahují plody při tzv. konzumní zralosti. Letní odrůdy mívají zpravidla konzumní zralost ve stejném období jako sklizňovou zralost. Podzimní odrůdy konzumně dozrávají za 2-8 týdnů po sklizňové zralosti, zatímco raně zimní za 8-12 týdnů. U pozdně zimních odrůd se období konzumní zralosti pohybuje od 12 do 24 týdnů po sklizňové zralosti (Sus 2000).

V současné době je v České republice registrováno přes 110 odrůd jabloní, z nichž na 90 odrůd je tuzemských a 50 z nich je významně odolných a rezistentních vůči strupovitosti (Nesrsta 2011). Mezi nejčastěji pěstované odrůdy patří zimní odrůdy 'Golden Delicious' a 'Idared', zvyšuje se zájem také o rezistentní zimní odrůdy (Nesrsta & Jan 2016).

3.1.2 Historie a rozšíření druhu

Již v době neolitu a doby bronzové sbírali obyvatelé z oblasti pohoří Tien Shan chutné šťavnaté plody jabloní, které byly velmi podobné plodům druhu *M. sylvestris*. Kvůli válečným výpadům a rozvoji obchodu se jablka postupně začala šířit směrem na západ do Malé Asie a jižní a jihovýchodní Evropy. Šíření bylo umožněno především znalostí vegetativního množení na principu roubování (Gharghani et al. 2009).

Ve starověkém Řecku jablka jako první popsal Theofrastos, který již rozlišoval plané a kulturně pěstované jabloně. V Římské říši se podrobněji jablečným plodům věnoval Plinius starší, který popsal 17 odrůd pěstovaných v Itálii. Řekové a Římané pak toto dnes již běžně dostupné ovoce rozšířili takřka do celé Evropy (Ferree & Warrington 2003; Gharghani et al.

2009). Pádem Římské říše však nastal na několik set let úpadek v pěstování jabloní, které byly nadále zušlechťovány pouze v klášterních zahradách a panovnických sídlech (Ferree & Warrington 2003). V českých zemích se pěstování ovocných stromů rozvíjelo zejména za vlády Karla IV. (Boček 2008)

3.1.3 Fylogenetický původ druhu

Na základě nejnovějších molekulárních genetických analýz bylo zjištěno, že *M. domestica* má mnohem větší genetickou podobnost s druhem *M. sieversii* než s *M. sylvestris*. *M. x domestica* Borkh. je tak pravděpodobně hybrid, který vznikl zpočátku náhodným výběrem semenáčů *M. sieversii* s atraktivními vzhledovými i chuťovými vlastnostmi (Velasco et al. 2010). Yamamoto et al. (2004) dokonce navrhuje, že pro *M. domestica* a *M. sieversii*, dva dosud rozlišované botanické druhy, by se mělo používat pouze jedno druhové jméno, a to *M. pumila* Mill.

Poté, co se jabloně začaly šířit z Blízkého východu směrem na západ, docházelo ke spontánnímu křížení *M. domestica* s *M. orientalis* (Velasco et al. 2010). Evropský druh *M. sylvestris* se na vzniku *M. domestica* nepodílel, teprve později byl využíván jako podnož pro vyšlechtěné kulturní odrůdy či sloužil jako donor genů pro odolnost vůči patogenům a škůdcům. Asijské druhy, u nichž se využívala jejich mrazuodolnost, *M. baccata* a *M. floribunda*, se rovněž podílely na vzniku mnoha vyšlechtěných odrůd jabloně domácí (Boček 2008).

3.1.4 Význam ovoce ve výživě člověka

Ovoce má ve výživě člověka nezastupitelnou roli. Obsahuje vitamíny, minerály, vlákninu i sekundární metabolity jako jsou flavonoidy, fenoly a karotenoidy. Všechny tyto látky mají důležitou antioxidační funkci – jsou schopné vázat toxické látky (Paris et al. 2017). Během trávicích procesů navíc zůstávají z ovoce pouze kationty, které mají odkyselující účinek (Blažek 2001). Konzumací ovoce a zeleniny tak může člověk předcházet nejrůznějším nemocem a snížit například i výskyt astmatu, kardiovaskulárních onemocnění či dokonce rakoviny (Le Marchand et al. 2000).

S celkovým snížením pohybu je nutno ovocem nahrazovat vysoce kalorické složky potravy – především tuky, cukry a bílkoviny. Proto se ovoce úspěšně používá při redukční

dietě. Průměrná spotřeba ovoce na jednoho člověka by se měla pohybovat mezi 80 až 100 kg ročně. Ovoce také pomáhá regulovat činnost trávicího ústrojí působením vlákniny, pektinových látek, organických kyselin a enzymů. Ovoce navíc povzbuzuje chuť k jídlu svou přitažlivou vůní a vzhledem (Blažek 2001).

V našich zeměpisných šířkách se v čerstvém stavu v zimním období konzumují převážně jablka. V České republice je spotřeba obyvatele na rok okolo 25 kg jablek z domácí produkce (Hričovský et al. 2003). Bylo potvrzeno, že konzumace jablek snižuje riziko mrtvice, srdečních chorob i rakoviny plic (Knekt et al. 1996; Knekt et al. 2000; Le Marchand et al. 2000). Navíc požívání jablek nemá pozitivní vliv jen na zvýšení odolnosti organismu proti nejružnějším onemocněním, ale působí také i na náš chrup a na nervovou soustavu (Hričovský et al. 2003).

3.1.4.1 Chemické složení jablečných plodů

Největší složkou ovoce je voda. Její obsah v dužnatých ovocných plodech se pohybuje kolem 79 % až 87 %. V ovoci jsou z dalších látek nejvíce zastoupeny sacharidy. Největší podíl ze sacharidů má škrob, který se během dozrávání hydrolyzuje na sacharózu a jednoduché cukry – glukózu a fruktózu. V jablečných plodech můžeme nalézt všechny tři druhy cukrů – množství glukózy a fruktózy je však mnohem vyšší než množství sacharózy. Množství celulózy se u jablek pohybuje kolem 1-2 %. Ze všech ovocných plodů, které se pěstují v našich podmínkách, je největší obsah cukrů právě u jablek a meruněk, přičemž u jablečných plodů se jeho množství pohybuje kolem 8-22 % (Blažek 2001).

Kromě cukrů lze v jablkách najít i pektinové látky (protopektin a pektin), které bývají hojně zastoupeny převážně v nezralém ovoci. V jablečných plodech se vyskytují i kyseliny (jejich podíl je kolem 0,2-1,6 %) – zvláště se jedná o kyselinu jablečnou. Aby ovoce mělo dobrou chuť, je nutný určitý poměr kyselin k množství cukru, přičemž rozložení kyselin v plodu bývá často nestejně (Blažek 2001; Hričovský et al. 2003).

Z dalších významných látek se v jablkách nacházejí třísloviny, které způsobují natrpklou chuť, při jejich vyšším obsahu může mít dokonce konzument až pocit svíravé chuti. Taniny jsou ve vyšší míře obsaženy v zelených plodech. Pokud převládá svíravá chuť i ve zralých plodech, je to způsobeno jejich nízkým obsahem cukru. Zvýšený obsah tříslovin mají zvláště plané druhy jabloní. Aromatické látky jsou v jablečných plodech zastoupeny především jako estery kyselin, aldehydy a silice (Blažek 2001).

V ovoci se nachází jen nižší obsah dusíkatých látek, z nichž polovinu tvoří bílkoviny a druhou polovinu dusitany a dusičnany. Obsah vitamínů v jablkách je hodně variabilní. Ačkoliv ovoce má vysoký obsah vitamínu C, jablečné plody ho obsahují poměrně málo (Blažek 2001). Jeho množství je u jablek závislé především na odrůdě. Mezi odrůdy s největším obsahem vitamínu C patří odrůdy 'Ontario', 'Boskoopské červené' a 'Wagenerovo'. Zejména odrůda 'Ontario' se považuje za odrůdu vhodnou i pro diabetiky (Hričovský et al. 2003). Množství vitamínu C v jablečných plodech ale závisí například i na zeměpisné poloze, klimatických činitelích, půdních a agrotechnických podmínkách, stupni zralosti, velikosti plodu a skladovacích podmínkách (Blažek 2001).

Jablečné plody jsou pro člověka významným zdrojem draslíku, vápníku, hořčíku, fosforu a železa. Je to způsobeno tím, že v ovoci jsou tyto prvky obsažené v takové formě, která je přístupná pro lidský organismus. Jablka mají ve srovnání s ostatními ovocnými plody zejména vyšší množství železa (Blažek 2001). Průměrný obsah některých zmiňovaných látek a prvků v jablečných plodech je uveden v Tabulce 1.

Tabulka 1: Průměrný obsah některých látek a prvků v jablečných plodech

Zdroj: Blažek 2001

Bílkoviny	Tuky	Cukry	Vápník	Fosfor	Železo	Vitamíny			
						A	B ₁	B ₂	C
%						mg %			
0,4	0,4	15,9	0,01	0,01	0,01	0,03	0,06	0,05	10

3.2 Alergie

Termínem alergie označujeme nepřiměřenou a přehnanou reakci imunitního systému jedince na látky, s nimiž se doposud setkával v běžném prostředí. Velmi často se jedná o látky exogenního (zevního) původu (Litzman et al. 2001).

Ferenčík (2005) uvádí, že v průmyslově vyspělých státech je nárůst počtu alergických osob každý rok o 5 %. Na vysokém počtu alergických reakcí se podílí mnoho faktorů – nezdravý životní styl spojený se špatnou výživou, kouřením či nedostatkem pohybu, život v uzavřených interiérech, zplodiny průmyslu nebo UV záření. Zmíněné vnější faktory mohou vyvolat alergické onemocnění či působí jen jako spouštěče těchto onemocnění. Velkou roli zde hrají i genetické predispozice (Špičák & Panzner 2004).

3.2.1 Alergeny

Alergen je označení pro antigen, který vyvolává alergickou reakci spojenou s tvorbou specifických protilátek třídy IgE (imunoglobulin E). Pokud se citlivý člověk opakovaně setká s alergenem, spustí se u něj kaskáda buněčných pochodů projevujících se jako klinické příznaky alergie. Ke spuštění této alergické reakce dochází pouze u lidí s abnormální imunitní reaktivitou. U ostatních osob dochází k fyziologické imunitní odpovědi, která se projevuje zvýšenou produkcí protilátek třídy IgG (imunoglobulin G; Litzman et al. 2001).

Alergeny lze rozdělit do dvou hlavních skupin, a to na alergeny hlavní a alergeny vedlejší. Hlavní alergeny jsou takové alergeny, které vyvolávají tvorbu specifické protilátky IgE u více než 50 % pacientů. Dále je můžeme charakterizovat pozitivitou kožních testů. Hlavní alergeny jsou přítomny v léčebných preparátech pro alergenovou imunoterapii, vyskytují se i v komerčně dodávaných testovacích soupravách (Špičák & Panzner 2004).

Ostatní alergeny jsou označovány jako vedlejší alergeny. Reakce vyvolané vedlejšími alergeny mohou mít jiné příznaky než reakce vyvolané hlavními alergeny. Vedlejší alergeny jsou často příčinou zkřížené reaktivity nejen biologicky příbuzných organismů, ale i evolučně vzdálených organismů (Špičák & Panzner 2004).

Mezi alergeny řadíme i tzv. panalergeny, u nichž je podobnost mezi bílkovinami, jež jsou obsaženy v epitopech, vyšší než 80 %. Panalergenů existuje velké množství druhů – patří mezi ně například i profiliny, lepek obilovin, kasein či polkaciny (Fuchs 2013).

Každý alergen má své specifické označení, které vychází z rodového a druhového jména jeho původce. První tři písmena jsou písmena rodu, následující písmeno je první písmeno druhu a nakonec je v označení alergenu obsažena číslice, která vyjadřuje, kdy bylo dosaženo purifikace. Například alergeny jabloně domácí *Malus domestica* jsou označovány jako *Mal d 1*. Jelikož bylo popsáno několik typů jablečných alergenů, označují se jako *Mal d 1*, *Mal d 2*, *Mal d 3* a *Mal d 4*. Stejně tak nejvýznamnější alergeny břízy bradavičnaté *Betula*

verrucosa jsou označovány jako *Bet v 1* a *Bet v 2*. Aby bylo možno odlišit izoalergeny a alergenové varianty, píše se za pořadové číslo alergenu tečka a za ní dvojčíselný kód. V rámci nomenklatury jsou popsány i izoformy, alergenové geny, rekombinantní alergeny a syntetické peptidy (Špičák & Panzner 2004).

Mezi alergeny, se kterými se můžeme nejčastěji setkat, patří pyly, plísně a potraviny (Litzman et al. 2001).

3.2.1.1 Nejčastější skupiny alergenů

3.2.1.1.1 Pyl

Pyly patří mezi největší skupinu alergenů venkovního prostředí, které se vyskytují pouze sezónně. Pylová sezóna začíná obvykle na jaře výskytem pylů stromů (např. bříz, lísek či olší). V letním období způsobují alergické reakce zejména pyly trav. Na podzim jsou naopak dominantní nejružnější plevele a byliny (např. pelyněk a lebeda). Pacienti mohou být alergičtí na pyl jedné rostliny, či naopak zkříženě reagovat na skupinu příbuzných rostlinných druhů (Fuchs 2013).

3.2.1.1.2 Plísně

Plísně se obvykle objevují na vlhkých místech, kde je dostatečně vysoká teplota. V domovním prostředí je tak lze obvykle nalézt na zdech koupelen nebo kuchyní, v květinách, v odpadkových koších či v nesprávně udržovaných klimatizacích. Ve venkovním prostředí se s plísněmi můžeme setkat zejména na listech, v hlíně, ve vlhké tlející hmotě či v substrátech (Špičák & Panzner 2004).

Dosud byly izolovány pouze hlavní alergeny druhů *Aspergillus fumigatus*, *Alternaria alternata* a *Cladosporium herbarum* (Špičák & Panzner 2004).

3.2.1.1.3 Potraviny

Alergeny vyskytující se v potravinách jsou proteiny či glykoproteiny, které mají přirozenou antigenní povahu. Zatím nejúčinnější možností léčby potravinových alergií je vyhýbání se potravinám, které obsahují daný alergen. To však může dále vést k problémům při sestavování nutričně vyváženého jídelníčku (Fuchs 2013).

3.2.2 Léčba alergických onemocnění

Mezi léčbu alergického onemocnění zahrnujeme eliminaci alergenu, léčbu alergického zánětu, imunoterapii a pomocnou léčbu.

3.2.2.1 Eliminace alergenu

Eliminace alergenu je nejsnazším léčebným i preventivním opatřením. Zvláště při alergiích na potraviny stačí pacientovi vyloučit tyto problematické alergeny z okolí. U eliminace vzdušných alergenů, mezi které patří například pyly či plísně, není vyhnutí se zdrojům alergických reakcí vždy nejjednodušší. I tak by se měl pacient snažit omezit styk s alergenem co nejvíce. Při úplné eliminaci alergenu není potřeba žádné další léčby (Špičák & Panzner 2004).

3.2.2.2 Léčba alergického zánětu

Pokud u pacienta dochází k tvorbě alergického zánětu, léčení probíhá za pomoci farmakoterapie. Mezi nejpoužívanější léky patří antihistaminika (blokují receptory pro histamin), kortikosteroidy (působí protizánětlivě) či kromony (stabilizují membrány živých buněk). Při zvýšených potížích se používají dokonce imunosupresivní a protizánětlivé látky (Špičák & Panzner 2004).

3.2.2.3 Alergenová imunoterapie

Při alergenové imunoterapii se postupně podávají zvyšující se dávky alergenu až na dávky udržovací. Následně se udržovací dávka pacientovi pravidelně aplikuje. Při opakovaném kontaktu pacienta s alergenem dochází ke zmírnění nebo dokonce ke zmizení obtíží spojených s alergickými reakcemi. Alergenová imunoterapie tak snižuje závažnost onemocnění, zlepšuje kvalitu života pacienta a omezuje podávání léků (Špičák & Panzner 2004).

3.2.2.4 Pomocná léčba

Pomocná léčba zahrnuje léky používající se ke zmírnění příznaků. Patří mezi ně například nejrůznější masti proti otokům, nosní a oční kapky či léky, které usnadňují odkašlávání (Bystroň 1997).

3.3 Alergie na jablečné plody

Ve vyspělých zemích jsou největším problémem potravinové alergie, které postihují asi 6-8 % dětí a 2-3 % dospělých lidí. Hlavní příčina rozdílu ve výskytu potravinové alergie mezi dětmi a dospělými lidmi je dána nedostatečnou zralostí imunitního systému dítěte (Špičák & Panzner 2004).

Potraviny rostlinného původu jsou u dětí starších pěti let a u mladých dospělých nejčastější příčinou alergických reakcí (Kanny et al. 2001). Zuidmeer et al. (2008) dokonce uvádí, že až 11,5 % dětí ve věku 0-6 let po celém světě trpí alergickými reakcemi na ovoce. U dospělých lidí citlivost na ovoce odhaduje kolem 6,6 %.

Zejména alergie na jablečné plody se stává velkým problémem pro řadu Evropanů. Jablka jsou dokonce nejčastější příčinou alergických reakcí v rámci čeledi *Rosaceae* a jsou zodpovědné za čtvrtou nejčastější příčinu potravinových alergií (Burney et al. 2010). Ačkoliv jsou jablka považována za zdravou složku lidské stravy, v současné době je jedinou prevencí proti alergickým reakcím vyhýbání se těmto plodům. Z tohoto důvodu se objevuje stále větší snaha produkovat ovoce, které nebude způsobovat žádné alergické reakce (Paris et al. 2017).

3.3.1 Orální alergický syndrom (OAS)

Alergie na jablka je často spojena s orálním alergickým syndromem (Bohle 2007). Orální alergický syndrom (OAS) je soubor orálních příznaků, které se u pacienta objeví ihned po požití potravin rostlinného původu (nejčastěji ovoce, ořechů či luštěniny). Alergie je však primárně pylově asociovaná. V dnešní době se proto můžeme často setkat s označením pylově-potravinový syndrom. Jeho podstatou je zkřížená reaktivita mezi pyly a potravinami rostlinného původu, která je dána existencí podobných či stejných alergenů v potravě i v pylovém zrnu. Rostlinná potravina, kterou pacient zkonzumuje, je tedy botanicky spřízněná s rostlinou, na jejíž pyl je daná osoba alergická (Špičák & Panzner 2004).

Mezi typické příznaky OAS řadíme pálení či svědění patra, jazyka, rtů, problémy s polykáním, kýchání a možné otoky v oblasti obličeje. Ve výjimečných případech může dojít i k angioedému či anafylaktickému šoku (Špičák & Panzner 2004).

3.3.2 Zkřížené alergie (zkřížená reaktivita)

Zkřížená alergie (též označována jako zkřížená reaktivita) je důležitá zejména pro lepší pochopení alergií na potraviny. Významnou roli zde hrají sekvence několika aminokyselin označovaných jako epitopy, proti kterým je namířena variabilní část IgE. Epitopy, které jsou společné pro druhově odlišné bílkoviny, označujeme jako sdílené epitopy (Fuchs 2013). Zkříženou reaktivitu lze popsat jako stav, kdy se IgE protilátka svými vazebnými místy naváže na bílkovinu primárně nevyvolávající její produkci (Petrů 2012).

Ke zkřížené reaktivitě dochází, jestliže podobnost bílkovin ve složení epitopů je vyšší nežli 70 % (Katelaris 2010). V evropských podmínkách se velmi často objevuje zkřížená reaktivita mezi ovocem či zeleninou a pylem stromu. Některé homologie si dokonce vysloužily vlastní označení – můžeme se tak setkat se syndromem bříza-ovoce-zelenina-ořechy či s homologií s LTP (Špičák & Panzner 2004). Bidat a Loigerot (2005) dokonce uvádějí, že více než polovina osob alergických na pyl břízy je také alergická na ovoce, zeleninu či na ořechy.

V posledních několika desítkách let se rozvíjejí metody, které pomáhají odhalovat alergicko-imunologické pochody na molekulární úrovni. Vědci už dokáží přesně určit sekvenci aminokyselin každého alergenu a díky tomu objevit kritická místa vazeb těchto sekvencí s IgE-specifickou protilátkou. Výjimkou už nejsou ani metody genového inženýrství, které umožňují mutageně vstupovat do epitopů a ovlivňovat tak původní alergenicitu antigenů (Sanz et al. 2011).

3.3.3 Jablečné alergen

V jablečných plodech byly dosud identifikovány 4 hlavní třídy alergenů – *Mal d 1*, *Mal d 2*, *Mal d 3* a *Mal d 4*. Všechny tyto alergen

alergen *Mal d 1*, *Mal d 2* a *Mal d 3* jsou homologní se skupinou tzv. PR-proteinů (Pathogenesis-Related Proteins), což jsou proteiny, které hrají důležitou roli při obranných

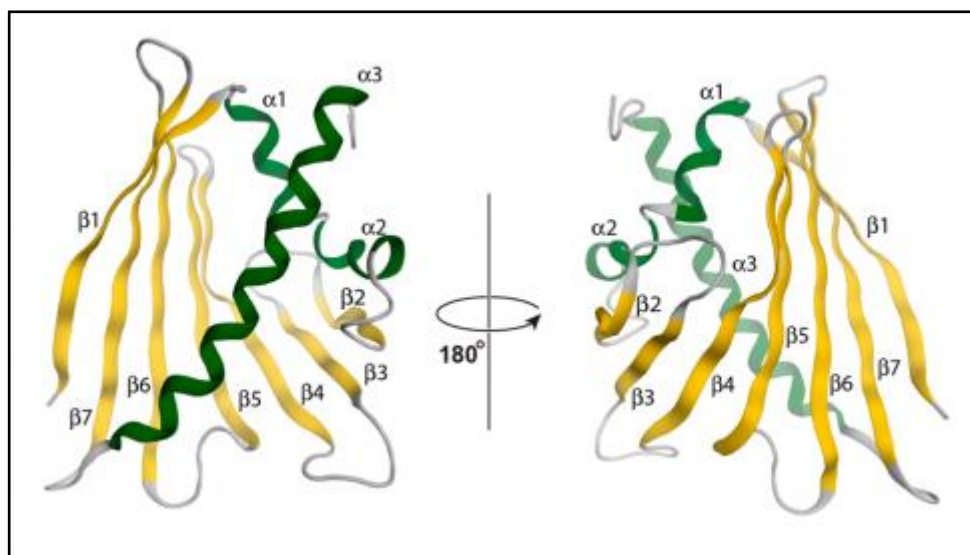
reakcích rostliny na napadení patogeny – houbami, bakteriemi, viry, či které se tvoří jako odpověď na nepříznivé podmínky prostředí (Breiteneder 2004). PR-proteiny dělíme celkem do 14 skupin a mnoho z nich je významných pro studium alergií – řadíme k nim zvláště proteiny ze skupin PR-2, PR-3, PR-4, PR-5, PR-8, PR-10, PR-12, PR-14 a PR-15 (van Loon et al. 2006).

Jablečné alergeny lze rozdělit podle jejich nejčastějšího geografického výskytu. *Mal d 1* je pokládán za hlavní alergen zejména ve střední a severní Evropě. Je vysoce homologní k alergenu pylu břízy *Bet v 1* a je proto velmi častý u pacientů, kteří jsou citliví na tento pyl. Vyvolává pouze mírné lokální příznaky – OAS (Ricci et al. 2005).

V jižní Evropě se nevyskytují rostliny z čeledi *Betulaceae*. Zde se přičítá alergická reakce na jablečné plody zejména alergenům *Mal d 3* a *Mal d 4* (van Ree et al. 1995). Projevy alergie se zde objevují i u pacientů, u kterých nebyla zaznamenána žádná zvýšená citlivost na pyl rostlin (Fernández-Rivas et al. 2006). Ve Středomoří se navíc alergie na jablka často vyskytuje společně s alergií na švestky a broskve (Fernández-Rivas et al. 1997).

3.3.3.1 Alergen *Mal d 1*

Alergen *Mal d 1* je protein s molekulovou hmotností 17-18 kDa, obsahující 158 až 159 aminokyselin. Má trojrozměrnou strukturu (Obrázek 1) sestávající ze tří α -helixů a sedmi antiparalelních β -skládaných listů (Ahammer et al. 2017).



Obrázek 1: *Struktura alergenu Mal d 1.0101*

Zdroj: *Ahammer et al. 2017*

Je to alergen citlivý na enzymatickou a tepelnou úpravu (Vanek-Krebitz et al. 1995). Alergeny *Mal d 1* mohou mít shodné aminokyselinové sekvence s *Bet v 1* až v 64 %. Díky tomu má alergen *Mal d 1* vysoký potenciál zkříženě reagovat s alergenem břízy *Bet v 1* (Gao et al. 2005).

Mal d 1 patří stejně jako alergen *Bet v 1* do skupiny PR-10 proteinů, které jsou kódované genem *Ypr10* (van Loon et al. 2006). PR-10 proteiny jsou homologní k ribonukleázám, některé z nich dokonce vykazují slabou ribonukleázovou aktivitu, díky čemuž mohou sloužit rostlinám jako obrana proti virům (Bufe et al. 1996). Tato skupina proteinů je v rostlinách velmi hojná, byla nalezena mj. i v pylech mnoha rostlinných druhů, ve velkém množství se nachází v ovoci, zelenině či v některých ořechách (van Loon et al. 2006).

9 genů z genové rodiny *Mal d 1* bylo lokalizováno na LG (Linkage Group) 16 (Gao et al. 2005). LG 16 obsahuje také geny, které ovlivňují chuť jablečného plodu, jeho kyselost (Maliepaard et al. 1998) či jeho šťavnatost (King et al. 2000). Vzdálenost mezi nimi a geny pro *Mal d 1* je však dostatečně velká na to, aby mohlo docházet k častým rekombinacím, které tak umožňují vyšlechtit odrůdu, jež bude mít nízkou alergenicitu (schopnost alergenu vyvolat alergickou reakci) a zároveň bude mít příjemnou chuť (Gao et al. 2005).

Bylo prokázáno, že množství alergenu *Mal d 1* v ovoci je závislé na genotypu odrůdy, na fázi dozrávání ovoce a rovněž i na podmínkách, ve kterých se ovoce skladuje (Hsieh et al.

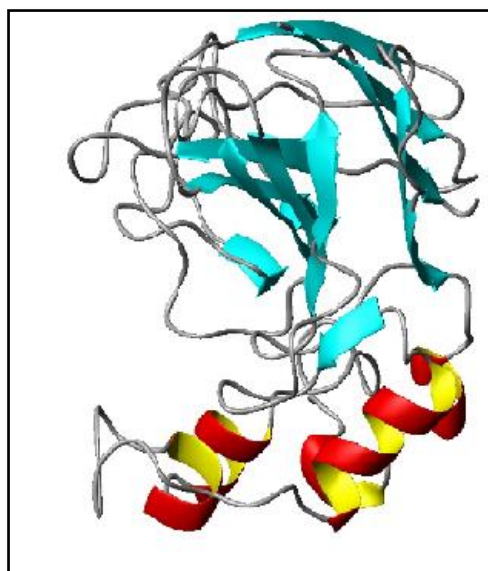
1995). Vysoká hladina exprese proteinu *Mal d 1* byla u jabloní nalezena nejen ve zralých jablečných plodech, ale i v dospělých listech napadených houbou *Venturia inaequalis*, která je původcem strupovitosti jabloní (Beuning et al. 2004).

Mal d 1 má mnoho izoform, které se dělí do skupin podle podobnosti sekvencí DNA (Gao et al. 2008). Bylo zjištěno, že přítomnost a množství jednotlivých *Mal d 1* izoalergenů ovlivňuje alergenicitu plodů více nežli celkový obsah proteinu *Mal d 1* (Pagliarani et al. 2013). Toto tvrzení bylo podpořeno o několik let později i Paris et al. (2017), která uvádí, že geny pro *Mal d 1.01*, *Mal d 1.02*, *Mal d 1.06A* a *Mal d 1.07* byly ve vyšší míře exprimovány v hyperalergenní odrůdě, zatímco v hypoalergenní odrůdě byla exprese těchto genů mnohem nižší. Zdá se tedy, že tyto izoalergeny hrají v alergicitě dané odrůdy velkou roli.

Vyšší množství proteinu *Mal d 1* je jednou z hlavních příčin alergických reakcí na jablka (Ahammer et al. 2017). To potvrdil i Dubois et al. (2015), který zjistil, že umlčením genů kódujících protein *Mal d 1* došlo k výraznému snížení alergicity jablečných plodů.

3.3.3.2 Alergen *Mal d 2*

Mal d 2 (Obrázek 2) je apoplastický protein mající molekulovou hmotnost 31 kDa (Pagliarani et al. 2015).



Obrázek 2: Struktura alergenu *Mal d 2*

Zdroj: <<http://fermi.utmb.edu/SDAP/ModelMolMol/280.jpg>>

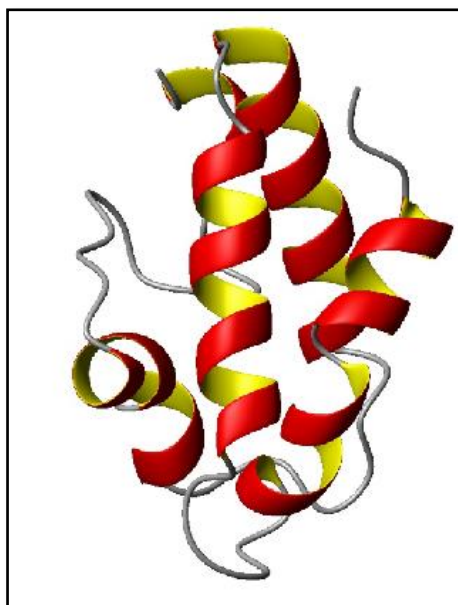
Mal d 2 je alergen patřící k PR-5 proteinům, což je proteinová rodina obsahující proteiny s rozličnými funkcemi. Je kódovaná genem *Ypr5* (van Loon et al. 2006). Někdy se můžeme setkat též s označením TLP (Thaumatolike Proteins), které zdůrazňuje podobnost mezi proteiny PR-5 a thaumatinem, poprvé izolovaným z plodů *Thaumatococcus daniellii* (Gao et al. 2005).

TLP proteiny mohou být produkovány jako reakce na napadení patogenem, na osmotický stres či se objevují v semenech rostlin jako proteiny s antifungálními účinky. Bylo dokonce prokázáno, že PR-5 proteiny pomáhají rostlinám vyrovnat se i se stresem způsobeným nízkými teplotami (Hon et al. 1995). Kromě toho jsou TLP proteiny považovány za jedny z panalergenů vyskytujících se v jídle či rostlinném pylu. TLP proteiny jsou vysoce odolné vůči denaturaci vyvolané změnou pH či vysokou teplotou. Kromě toho jsou rezistentní i vůči proteázám, což je způsobeno přítomností 16 cysteinů, které jsou spojeny osmi disulfidickými vazbami (Breiteneder 2004).

Alergen *Mal d 2* nebyl dosud přiřazen k žádné geografické oblasti, kde by způsoboval s vyšší hojností alergické reakce (Gao et al. 2005). Patří však k nejčastějším proteinům vyskytujícím se ve zralém jablečném plodu (Pagliarani et al. 2015). Tento alergen je totiž zodpovědný za sladkou chuť jablek (Oh et al. 2000).

3.3.3.3 Alergen *Mal d 3*

Alergen *Mal d 3* (struktura je znázorněna na Obrázku 3) je homologní k proteinům LTP (Kondo & Urisu 2009).



Obrázek 3: Struktura alergenu *Mal d 3*

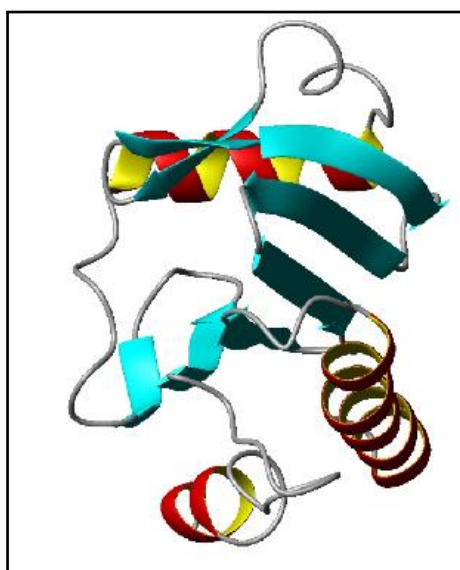
Zdroj: <<http://fermi.utmb.edu/SDAP/ModelMolMol/180.jpg>>

LTP proteiny patří do rodiny PR-14 proteinů a jsou považovány za panalergeny (Kondo & Urisu 2009). PR-14 proteiny totiž náleží ke konzervovaným proteinům, které se vyskytují i v jiných plodech než jen u rostlin čeledi *Rosaceae* (Asero et al. 2000). Jsou kódovány geny *Ypr14* a *Ltp* (van Loon et al. 2006) a byla u nich prokázána důležitá role při obraně rostlin proti bakteriím a houbám (García-Olmedo et al. 1995). LTP totiž fungují jako nosiče lipidů (van Loon et al. 2006).

LTP proteiny se skládají z osmi cysteinů tvořících čtyři disulfidické můstky, což jim zajišťuje vysokou stabilitu (Botton et al. 2008). Jsou to proteiny odolné vůči hydrolyze pepsinem a vůči denaturaci způsobené teplem, díky čemuž se hojně využívaly ke genetické modifikaci potravin (van Loon et al. 2006). LTP proteiny mají vysokou hladinu exprese především v nadzemních orgánech, jako jsou listy, květy a plody, zatímco v kořenech je jejich exprese mnohem nižší (Pagliarani et al. 2015).

3.3.3.4 Alergen *Mal d 4*

Alergen *Mal d 4*, kterým se podrobněji zabývá tato práce, je malý cytosolový protein, jehož molekulární hmotnost je 12-15 kDa (Obrázek 4; Pagliarani et al. 2015).



Obrázek 4: Struktura alergenu *Mal d 4*

Zdroj: <<http://fermi.utmb.edu/SDAP/ModelMolMol/183.jpg>>

Mal d 4 je protein řazený k profilinům. Profiliny se nacházejí ve všech eukaryotických buňkách, jejich funkce je často spojována s prodlužováním buněk, udržováním jejich tvaru, kvetením a vývojem pylu zahrnujícím růst a klíčivost pylu (Ramachandran et al. 2000; McKenna et al. 2004). Profiliny tak hrají důležitou roli během vývoje rostlin. Často je jejich přítomnost spojována s alergickými reakcemi zvláště na pyl rostlin (Asero et al. 2003; Paris et al. 2017). Radauer a Hoffmann-Sommergruber (2003) uvádí, že při zrání pylu se množství profilinů zvyšuje dokonce až stokrát. Profiliny se objevují jako hlavní alergeny například v pylu břízy *Bet v 2* či bojínku *Phl p 12* (Fuchs 2013).

Profiliny hrají také dominantní roli u pacientů trpících alergií na broskve a na pyl trav (Rodriguez-Perez et al. 2003b). Přecitlivělost na profiliny je také spojena s alergií na citrusové plody, meloun, banány a rajčata (Asero et al. 2003). Ačkoliv se profiliny vyskytují i v živočišných buňkách, zatím nebyla dosud objevena žádná zkřížená reakce mezi rostlinnými profiliny a živočišnými profiliny. Hlavním důvodem je nízká homologie. Navíc živočišné produkty se velmi často před konzumací tepelně upravují (Fuchs 2013).

Alergenní aktivita proteinu *Mal d 4* je omezena pouze na ústní dutinu, jelikož jsou profiliny nestabilní vůči enzymatickému trávení a působení vysokých teplot (Rodriguez-Perez et al. 2003a). U alergických pacientů tak způsobují pouze mírné symptomy (Ma et al. 2006).

Zdá se, že *Mal d 4* geny se vyvinuly z genu podobného genu *Bet v 2* (Gao et al. 2005). Projevuje se tak u nich silná zkřížená reaktivita na pyl břízy *Bet v 2* (van Ree et al. 1995).

Malá genová rodina profilinů *Mal d 4* je prezentovaná pouze 4 geny v jablečném genomu – *Mal d 4.01*, *Mal d 4.02*, *Mal d 4.03* a *Mal d 4.04*, který byl identifikován teprve nedávno ve studii Paris et al. (2017).

Dle Pagliarani et al. (2015) se izoformy *Mal d 4.01* a *Mal d 4.02* exprimují v menším množství nežli *Mal d 4.03*. Množství exprese *Mal d 4.03* se během dozrávání ovoce příliš nemění (Pagliarani et al. 2015), což může být způsobeno důležitou rolí profilinů, které se podílejí na růstu buněk a na stabilitě cytoskeletu (Schlüter et al. 1997). Paris et al. (2017) dokonce uvádí, že gen *Mal d 4.01* se ze všech 4 genů genové rodiny *Mal d 4* exprimoval v jablečném pylu nejméně. Naopak největší exprese dosáhl gen *Mal d 4.04*, který se exprimoval 10-30 krát více než ostatní tři *Mal d 4* geny (Paris et al. 2017). Zdá se tak, že *Mal d 4.04* je při klíčení pylu opravdu důležitý. Paris et al. (2017) tak navrhuje, že by měly být profiliny v budoucnu lépe prozkoumány. Zdá se totiž, že hrají velkou roli v pylově-potravinovém syndromu nejen u jablek, ale i u dalších druhů ovoce, a dokonce i zeleniny, se kterými mohou způsobovat zkřížené reakce (Paris et al. 2017).

3.3.3.5 Faktory ovlivňující množství alergenů v jablečných plodech

Množství alergenů v jablečných plodech je ovlivněno více faktory – např. odrůdou, skladováním či působením stresu. Míra exprese jablečných alergenů ve slupce a dužnině se rovněž velmi liší (Hsieh et al. 1995; Fernández-Rivas et al. 2006).

3.3.3.5.1 Odrůda

Jak již bylo zmíněno, jablečné odrůdy se velmi liší svou alergenicitou. Různé odrůdy mohou vyvolávat jak mírné alergické reakce u citlivých pacientů, tak i ty mnohem závažnější (Vieths et al. 1994). Zatímco plody 'Golden Delicious' byly označeny jako vysoce alergenní, plody odrůdy 'Gloster' způsobovaly alergickým pacientům pouze mírné obtíže (Hsieh et al. 1995). Zdá se rovněž, že starší odrůdy jabloní jsou obecně méně alergenní nežli nedávno vyšlechtěné odrůdy (Paris et al. 2017).

3.3.3.5.2 Skladování

Množství alergenů *Mal d 1* a *Mal d 3* se liší na základě podmínek, kterými jsou jablečné plody vystaveny před sklizní a během ní (Botton et al. 2008). Dozrávání plodů je

proces, který je velice náchylný na napadení patogeny, a dochází při něm k modifikaci struktury i chuti plodu (Cantu et al. 2008).

3.3.3.5.3 Stres

Vodní stres má velký vliv na rozměry jablečných plodů i na samotný vegetativní růst jabloní. Dle Botton et al. (2008) se míra transkripce genů souvisejících s alergeny jablek však při nedostatku vody výrazně nemění.

Byl proveden též experiment se zastíněním, které mělo vliv na transkripci genů souvisejících s alergeny nejen ve slupce, ale i v dužnině (Botton et al. 2008). Další výzkumy by se tak měly zabývat i touto cestou – zastínění může mít velký význam pro snížení alergenicity jablečné dužniny.

3.3.3.5.4 Rozdílná exprese alergenů mezi slupkou a dužninou

Pagliari et al. (2013) ve svém výzkumu dokázal, že exprese *Mal d 1* genů je vyšší ve slupce jablečných plodů nežli v jejich dužnině. Dá se tedy předpokládat, že alergickým pacientům by mělo stačit jablka pouze zbavit slupky – oloupat. Fernández-Rivas a Cuevas (1999) však zjistili, že oloupaním jablečných plodů se nelze vždy vyhnout alergickým reakcím. Geny tak nelze vyloučit výhradně na základě jejich úrovně exprese.

Pagliari et al. (2013) navrhuje, že pro pacienty, pro které je oloupaní slupky užitečné, lze omezit počet problematických genů na ty, které se exprimují pouze ve slupce. Borges et al. (2006) uvádí, že LTP proteiny, mezi které patří i alergen *Mal d 3*, jsou obsaženy zvláště ve slupkách ovoce, což podporuje již dřívější tvrzení, že exprese jablečných alergenů je vyšší ve slupce a dužnině jablek. Naproti tomu Ricci et al. (2010) uvádí, že odrůdy 'Fuji', 'Golden Delicious' a 'Jonagold' mají více alergenní dužninu nežli slupku. Zatímco u odrůd 'Fiesta', 'Florina', 'Gala' a 'Ohrin' je více alergenní slupka nežli dužnina. Bude tak potřeba ještě dalších výzkumů, které pomohou vyjasnit rozdíly mezi expresí alergenů ve slupce a v dužnině jablečného plodu.

3.3.4 Fosfolipidové signální dráhy

Fosfolipidy jsou součástí buněčných membrán a zároveň mohou sloužit jako zdroj signálních molekul. Fosfolipidy jsou tvořeny centrální molekulou glycerolu, na níž jsou pomocí esterové vazby navázány dva zbytky mastných kyselin a fosfátová skupina s polárním

koncem. Polární konec je tvořen různými molekulami – např. cholinem, inositolem a serinem (Meijer & Munnik 2003).

Fosfolipidy se v membránách vyskytují často s receptory. Aktivací receptoru dochází k aktivaci enzymu, který je schopen přeměnit strukturní fosfolipid na signální molekulu. Tímto způsobem jsou aktivovány fosfolipázy (Meijer & Munnik 2003).

3.3.4.1 Fosfolipázy

Fosfolipázy (PL) jsou enzymy hydrolyzující fosfolipidy, jež jsou součástí buněčných membrán. Jelikož fosfolipázy nejsou schopné procházet membránami, jejich účinku jsou vystaveny pouze fosfolipidy nacházející se na vnějším povrchu buňky.

Fosfolipázy lze rozdělit podle místa účinku na molekulu substrátu, do celkem čtyř skupin. Fosfolipázy A (PLA) provádí hydrolýzu acyl-esterové vazby na 1. (PLA₁) nebo na 2. (PLA₂) uhlíku fosfolipidu. Produktem jsou mastné kyseliny a lysofosfolipidy, které se následně mohou účastnit nejrůznějších signálních drah (Viehweger et al. 2002; Ryu 2004). PLA jsou aktivovány nejen během klíčení a v přítomnosti auxinu, ale i při mechanickém poranění a napadení patogeny, což potvrzuje roli těchto enzymů jako účastníků obranných mechanismů rostlin (Chandra et al. 1996).

Fosfolipázy B (PLB) jsou naproti PLA schopny štěpit obě vazby – katalyzují hydrolýzu esterové vazby mastných kyselin na glycerol nejen na prvním uhlíku, ale i na druhém. Rozklad glycerofosfátové vazby, při kterém se tvoří inositoltrifosfát a diacylglycerol, je katalyzován pomocí fosfolipázy C (PLC). Zvýšenou aktivitu PLC lze pozorovat po ošetření rostlin patogenními elicitory i během stresu způsobeného suchem (Munnik & Meijer 2001). Fosfolipáza D (PLD) katalyzuje hydrolýzu fosfolipidů. Vzniklými produkty jsou kyselina fosfatidová a volné polární konce (Vance & Vance 2002). I tento typ fosfolipázy vykazuje vyšší aktivitu při nepříznivých podmínkách jako je vodní deficit, nízká teplota, nedostatek živin či poranění a napadení patogeny (Wang et al. 2006).

V této diplomové práci byla předmětem výzkumu i role PLA₂ na alergenicitě jablečných plodů. Z tohoto důvodu bude tomuto typu fosfolipázy věnována následující podkapitola.

3.3.4.1.1 *PLA₂*

PLA₂ je superrodina lipolytických enzymů. Izoformy fosfolipázy *PLA₂* mohou být rozděleny na základě jejich lokalizace do celkem pěti skupin: sekretované neboli extracelulární *PLA₂* (*sPLA₂*), cytosolické a na vápníku závislé *PLA₂* (*cPLA₂*), intercelulární a na vápníku nezávislé *PLA₂* – někdy též označované jako Patatin-Like proteiny (*iPLA₂*), krevní destičky aktivující faktor acetylhydrolázy (PAF-AH) a lysozomální *PLA₂* (Chakraborti 2003). Pouze dvě z těchto skupin – *sPLA₂* a *iPLA₂*, byly dosud objeveny v rostlinách (Schaloske & Dennis 2006).

PLA₂ hrají důležitou úlohu v mnoha biologických procesech – například při vývoji a obranyschopnosti organismu či při syntéze prozánětlivých eikosanoidů (Paris et al. 2017). Paris et al. (2017) navrhuje, že právě eikosanoidy mohou zvyšovat senzibilizaci a alergickou reakci. Zkoumala proto v pylových zrnech expresi dvou izoform *PLA₂* – *PLA21* a *PLA23*, aby dokázala významnou úlohu *PLA₂* při určení alergenicity pylu a jablečných plodů různých odrůd.

Paris et al. (2017) ve své studii uvádí, že pylová zrna všech zkoumaných odrůd exprimovala oba geny *PLA₂*, přičemž *PLA23* byl exprimován mnohem více nežli *PLA21*. V experimentu byla v hypoalergenní odrůdě navíc zjištěna nižší aktivita *PLA₂*, což podporuje teorii, že *PLA₂* se určitou měrou podílí na alergicitě pylu dané odrůdy. Expres *PLA₂* genů v jablečných plodech však nebyla zjišťována, a proto je jí věnována i tato diplomová práce.

3.3.5 Transglutamináza (*TGase*)

Dosud nebyly stále plně pochopeny molekulární mechanismy, které se podílejí na senzibilizaci a zvýšené alergicitě pylu a potravin rostlinného původu. Je možné, že faktory spojené s buněčným stresem hrají v těchto mechanismech důležitou roli. Jsou totiž schopné modifikovat vazebnou kapacitu alergenních proteinů na IgE či aktivovat zánětlivou odpověď. Paris et al. (2017) navrhuje, že významnou úlohu zde může sehrát i transglutamináza (*TGase*), která byla ve vyšších rostlinách poprvé detekována u dělicích se buněk apikálních meristémů (Icekson & Apelbaum 1987).

TGase je rodina enzymů acyltransferáz, které jsou schopny posttranslačně modifikovat proteiny (Serafini-Fracassini & Del Duca 2008). V minulosti již byla u savců prokázána jejich schopnost regulovat syntézu eikosanoidů (Hallstrand et al. 2010) a stimulovat aktivitu sekrečních prozánětlivých *sPLA₂* (Cordella-Miele et al. 1993). *TGase* se tak může podílet na

vzniku alergických reakcí, jelikož sPLA2 jsou důležité při regulaci zánětlivých odpovědí organismu (Iorio et al. 2012).

U rostlin bylo zjištěno, že množství *TGase* se například v pylu zvyšuje při stresových podmínkách, jakými jsou extrémní teploty, relativní vlhkost či vysoké množství znečišťujících látek, což jsou faktory spojované i se změnou světového klimatu (Iorio et al. 2012). Je možné, že i u rostlin se *TGase* významně podílí na alergicitě jednotlivých odrůd tím, že zprostředkovává modifikaci proteinů včetně jablečných alergenů. Tuto teorii podporuje i Paris et al. (2017), která ve svém výzkumu uvádí, že *TGase* byla přítomna v pylových zrnech všech testovaných jablečných odrůd a navíc byla zjištěna její nižší aktivita u zkoumané hypoalergenní odrůdy 'Durello di Forlì'. Stále je však známo málo informací o roli rostlinné *TGase* v alergicitě jablečných odrůd, a z toho důvodu se její expresi věnuje i tato diplomová práce.

3.4. Kvantitativní polymerázová řetězová reakce (qRT-PCR)

qRT-PCR (quantitative Real-Time PCR) nebo též kvantitativní PCR v reálném čase je rychlá a vysoce účinná technika pro studování genové exprese či pro hodnocení fluorescence qRT-PCR produktů po ukončení jejich amplifikace. Tato metoda umožňuje kvantifikaci sledovaného úseku DNA (Pagliarani et al. 2013).

Na rozdíl od PCR u qRT-PCR je zaznamenáván přírůstek intenzity fluorescence po každém cyklu reakce. Na DNA se totiž specificky či nespecificky váží přidané fluorescenční reportéry, které na základě vazby vyzařují světelný signál. Tento signál je pak následně zachycen detektorem, počítač ho zpracuje a převede do grafu. Výhodou qRT-PCR je její cenová dostupnost. Nevýhodou qRT-PCR je použití vzorků standardů, včetně referenčního genu, pro každý experiment. Tím se zvyšuje potřebný čas i použité náklady ve srovnání s jinými metodami (Pagliarani et al. 2013).

Historie této metody se začala psát v roce 1992, kdy Higuchi et al. (1992) zrekonstruoval detekční systém monitorující PCR produkty v průběhu jejich amplifikace. Ke sledování využili fluorescenční barvivo ethidium bromid. Ethidium bromid se navázal na dvojšroubovici DNA a po excitaci UV světlem fluoreskoval. Zvýšení fluorescence při PCR tak znamenalo pozitivní amplifikaci (Higuchi et al. 1992).

Ethidium bromid se však nespecificky váže k DNA duplexům, a tak nespecifické produkty amplifikace, mezi které patří např. dimery primerů, přispěly k zesílení

fluorescenčního signálu a způsobovaly tak při vyhodnocení nepřesnosti. Z tohoto důvodu se toto fluorescenční barvivo dnes již téměř nepoužívá (Logan & Edwards 2009).

3.4.1 Fluorescenční činidla

Při qRT-PCR je důležitý výběr chemikálií, které nám pomáhají sledovat množství cílových sekvencí při amplifikaci. Výběr je závislý na typu reakce i na finančních možnostech. Obecně lze fluorescenční činidla rozdělit do dvou skupin, a to na nespecifické chemikálie představující barviva vázaná na DNA, a na specifické chemikálie, mezi které patří fluorescenčně značené primery a fluorescenčně značené sondy.

3.4.1.1 Nespecifické chemikálie

3.4.1.1.1 SYBR Green

SYBR Green je nejvyužívanější barvivo, které se nespecificky váže na dvouřetězcovou DNA (dsDNA). Jestliže je toto barvivo volně rozptýleno v roztoku, má nízkou fluorescenci. V případě, že se naváže na DNA, mnohonásobně (až 1000x) se zvýší jeho fluorescence. Celkový fluorescenční signál je tak přímo úměrný množství dsDNA (Bustin 2004).

Mezi výhody tohoto barviva patří možnost testovat více genů bez vytváření několika sond a jeho nízká cena oproti specifickým chemikáliím. Naopak mezi nevýhody SYBR Green patří nespecifičnost, protože je schopen vázat jakoukoliv dsDNA. Přítomnost nespecifických produktů v reakci tak může přispět k celkové fluorescenci a způsobit nepřesnosti při kvantifikaci. Docházet může i k interakci primerů mezi sebou, kdy se vytvoří struktury zvané primer-dimery. I ty jsou zdrojem fluorescenčního signálu, jenž může mít negativní vliv na kvantifikaci. Není vhodné používat toto barvivo i pro mnohonásobné reakce, jelikož nelze odlišit fluorescenční signály z různých produktů. Tuto nevýhodu však lze překonat vytvořením paralelní reakce ke zkoumání několika genů (např. gen a referenční gen) v qRT-PCR (Bustin 2004).

SYBR Green se používá při kvantifikaci mRNA, zjišťování genotypu či k detekci a kvantifikaci nukleových kyselin (Bustin 2004). Nejčastěji se můžeme setkat s barvivem SYBR Green I. SYBR Green I je asymetrické cyaninové barvivo, které se skládá z odlišných heterocyklických kruhů spojených methioninovou vazbou. Jeho maximální excitace dosahuje

497 nm (modré světlo), emise 520 nm (zelené světlo). Používat se začal v polovině 90. let, kdy byla zjištěna jeho výraznější citlivost v detekci amplikonů než u ethidium bromidu (Schneeberger et al. 1995). Mezi další používaná barviva patří např. i SYBR Green II či SYBR Gold.

3.4.1.2 Specifické chemikálie

Tento typ chemikálií používá zhášec, aby mohla být zjištěna specifická fluorescence, pouze pokud je cílový produkt amplifikován. Pokud nebyl detekován specifický cíl, je zhášec připojen na sondu nebo na primer. Fluorescenčně značené primery a sondy jsou výhodné, protože specificky detekují cílové sekvence i nespecifické produkty, a tak negativně neovlivňují přesnost kvantifikace. Jejich druhou hlavní výhodou je možnost provést mnohočetné reakce (VanGuilder et al. 2008).

3.4.1.2.1 Fluorescenčně značené primery

Na počátku 90. let Landgraf et al. (1991) použil fluorescenčně označené primery. Výhodou značených primerů je především jejich specifita, kdy emitují fluorescenci jedině při inkorporaci do správného amplikonu. Na rozdíl od nespecifických barviv se tak neváží na jakoukoliv sekvenci dsDNA. Mezi nejčastěji používané technologie patří Plexor, LUX a AmpliFluor.

3.4.1.2.2 Fluorescenčně značené sondy

Mezi fluorescenčně značené sondy patří hybridizační sondy, hydrolyzační sondy a Molecular Beacons. Hybridizační sondy představují dvojici značených sond. Jedna z těchto sond je označena donorovým fluoroforem na 3'-konci, druhá je značena akceptorovým fluoroforem na 5'-konci. Při hybridizaci s cílovou sekvencí naléhají sondy do těsné blízkosti, díky čemuž dochází k přenosu energie mezi donor-akceptorovým párem a k emisi fluorescence (Bernard et al. 1998).

Hydrolyzační sondy (*TaqMan* sondy) jsou oligonukleotidy delší než primery a s teplotou tání vyšší než mají primery. Sonda je na 5'-konci označena fluoroforem a na 3'-konci zhášecem. Pokud je během hybridizace vytvořen homoduplex, je aktivována polymeráza s 5'-3' exonukleázovou aktivitou, která sondu odštěpí. Tím je separován fluorofor a zhášec a dochází tak k nárůstu intenzity fluorescence. Mezi výhody této sondy patří fakt, že

k fluorescenci dochází pouze po hybridizaci na specifické místo amplikonu. Primer-dimery a další nespecifické produkty tak neovlivňují výsledné hodnoty (Livak et al. 1995).

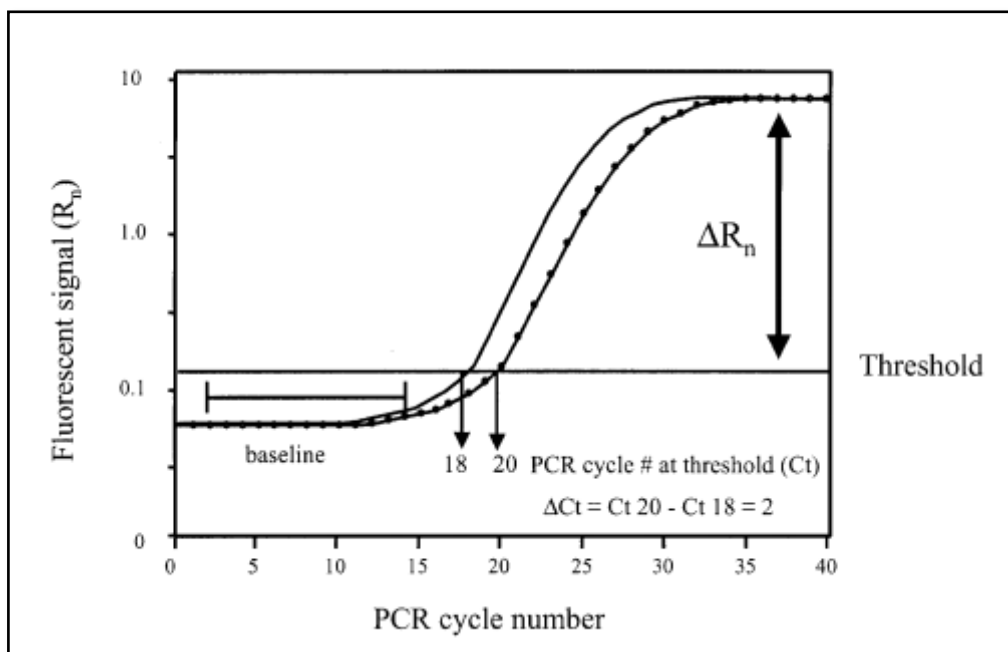
Molecular Beacons (molekulární majáky) představují jednořetězcové oligonukleotidy, které obsahují sekvenci komplementární k amplifikovanému úseku DNA. Na jednom konci je nesen zhášec, na druhém konci je nesen fluorofor. Fluorescence je emitována teprve poté, co molekulární majáky hybridizují do cílové sekvence. Při nižších teplotách v izolovaném stavu vytváří vlásenky, a to kvůli komplementaritě části sondy (Tyagi & Kramer 2012).

3.4.2 Využití qRT-PCR

Hlavním využitím Real-Time PCR je kvantifikace. Kvantitativní detekce se používá např. ke studiu genové exprese či lze s její pomocí po ukončení amplifikace hodnotit fluorescenci Real-Time PCR produktů. Kvantifikace se provádí matematickou analýzou amplifikačních křivek (Ginzinger 2002).

Amplifikační křivka (Obrázek 5) má sigmoidní tvar a je rozdělena celkem na čtyři části. První část křivky je tzv. background fáze, kde je cílové sekvence naamplifikováno příliš málo na to, aby mohla být fluorescence změřena. Další částí křivky je tzv. exponenciální fáze, ve které množství signálu (potažmo i amplifikovaného produktu) exponenciálně roste. Třetí část křivky lze pojmenovat jako lineární fázi, kdy množství produktu stoupá lineárně. Poslední čtvrtá část amplifikační křivky se nazývá plató fáze, kdy jsou komponenty vyčerpány, a tak nedochází ke zvyšování fluorescence i produktu (Ginzinger 2002).

Jako Threshold se označuje práh detekce fluorescenčního signálu, který je znázorněn horizontální přímkou. Místo, kde se přímka protíná s amplifikační křivkou, je popsáno jako Ct (cycle threshold). Hodnoty Ct, u některých softwarů označované jako Cq (quantification cycle), popisují číslo cyklu, ve kterém byl překročen limit detekce fluorescenčního signálu. Jsou úměrné množství výchozího templátu a využívají se pro výpočet míry genové exprese (Ginzinger 2002).



Obrázek 5: Amplifikační křivka s rozdílnými hodnotami C_t ($=C_q$). Baseline (též nazývána jako background fáze), v níž dochází k akumulaci signálu, který je stále pod měřitelnou hodnotou. Threshold označuje práh detekce fluorescenčního signálu. C_t (cycle threshold) popisuje číslo cyklu, ve kterém je překročen limit detekce. R_n označuje fluorescenční signál. ΔR_n je rozdíl fluorescenčního signálu vzorku a negativní kontroly, popř. pozadí.

Zdroj: Ginzinger 2002

Určení míry genové exprese může být provedeno dvěma způsoby – absolutní kvantifikací a relativní kvantifikací, která je používána častěji.

3.4.2.1 Absolutní kvantifikace

Absolutní kvantifikace stanovuje výchozí počet molekul DNA templátu ve srovnání se standardy o známých koncentracích. Při tomto způsobu kvantifikace se využívají kalibrační křivky standardů, ze kterých lze po porovnání hodnot C_q odečíst koncentrace neznámého vzorku. Absolutní kvantifikace je metoda, která je hojně využívána zejména v mikrobiologii či virologii, např. při determinaci výchozího počtu kopií cílových genů (Schmittgen & Livak 2008).

3.4.2.2 Relativní kvantifikace

Používanější metodou pro kvantifikaci genové exprese je relativní kvantifikace. Při relativní kvantifikaci jsou zjišťovány změny v množství mRNA testovaného genu v porovnání s referenčním genem. Nejčastěji se jako referenční geny používají „house keepingové“ geny, které by měly mít stálou úroveň genové exprese u všech typů pozorovaných vzorků (Livak & Schmittgen 2001). „House keepingové“ geny jsou totiž nezbytné pro udržení základních funkcí buňky a z toho důvodu by se měly neustále exprimovat. Často se při relativní kvantifikaci jako referenční gen využívá aktin (Eisenberg & Levanon 2013).

C_q amplifikační křivky cílového genu je při kvantifikaci normalizováno k C_q referenčního genu (Livak & Schmittgen 2001; Pfaffl 2001). Tím je získána hodnota ΔC_q . Porovnáním hodnot ΔC_q mezi vzorky získáváme hodnotu $\Delta\Delta C_q$ (Perkins et al. 2012).

4 Materiál a metody

4.1 Rostlinný materiál

Byla získána kolekce vzorků plodů jabloní ze 14 různých odrůd. Tyto odrůdy byly vypěstovány v identických agrotechnických podmínkách experimentálních výsadeb VŠÚO Holovousy s.r.o. Testované plody pochází ze dvou ročníků – ze sklizně v září roku 2016 a roku 2017. Byla na nich zkoumána exprese izoformy *Mal d 1.02*, izoalergenů genové rodiny *Mal d 4* a enzymů *PLA21*, *PLA23* a *TGase* pomocí kvantitativní polymerázové řetězové reakce (qRT-PCR).

4.1.1 Analyzované odrůdy

Odrůda 1 – 'Nikoleta'

Vznik odrůdy: 'Jonadel' x 'Rubín'

Popis odrůdy: 'Nikoleta' je zimní odrůda se vzrůstností středně bujnou až bujnou. Její plody rostou na krátkých a tlustých výhonech jednotlivě i ve shlucích. Jablka jsou velká, mají kuželovitý tvar. Základní barva jablek je žlutá, krycí červená, na jablkách je patrné výrazné žihání. Dužnina má žlutavou barvu, je středně šťavnatá, v chuti nasládlá. Sklízí se obvykle koncem září, konzumní zralosti dosahuje od listopadu. Odrůda 'Nikoleta' je středně odolná k houbovým chorobám (Nesrsta & Jan 2016).



Obrázek 6: Odrůda 'Nikoleta'

Zdroj: <http://eagri.cz/public/web/file/493584/Ovoce_2016.pdf>

Odrůda 2 – 'Frosta'

Vznik odrůdy: 'Florina' x 'Cox Orange pippin' x 'A 467-74'

Popis odrůdy: 'Frosta' je podzimní odrůda s bujnou vzrůstností. Její plody jsou středně velké až velké, se středním žebrováním. Základní barvou plodu je žlutá barva, krycí barvou je červená. Dužnina této odrůdy je žlutavá, tuhá a sladká. Sklizňové zralosti dosahuje koncem září, konzumní zralosti od poloviny října. Je rezistentní proti napadení strupovitostí (Nesrsta & Jan 2016).



Obrázek 7: Odrůda 'Frosta'

Zdroj: <http://eagri.cz/public/web/file/493584/Ovoce_2016.pdf>

Odrůda 3 – 'Jonagold Marnika'

Vznik odrůdy: řízená mutace odrůdy 'Jonagold'

Popis odrůdy: 'Jonagold Marnika' je zimní odrůda mající vzrůst zpočátku bujný, později střední. Její plody jsou středně velké a odolné proti otlakům. Základní barvou je zelenožlutá, krycí barvou oranžovočervená. Vybarvení plodů je závislé především na ročníku, ale i přístupu světla do koruny. Dužnina má žlutou barvu a je velmi šťavnatá. Sklizňové zralosti dosahuje koncem září, do konzumní zralosti se dostává od listopadu. Je náchylnější na padlí (Sus 1992).



Obrázek 8: Odrůda 'Jonagold Marnika'

Zdroj: <<https://www.kohaplant.sk/2008080103-jonagold-a-jeho-klony>>

Odrůda 4 – 'Topaz'

Vznik odrůdy: 'Rubín' x 'Vanda'

Popis odrůdy: 'Topaz' je zimní odrůda českého původu. Její plody mají střední velikost, jsou kulovitě kuželovité až ploše kulovité. Barva plodů je červeně žíhaná. Pro pěstování jsou doporučovány chladnější, dobře osluněné polohy, ve kterých mají plody lepší zbarvení. Dužnina je pevná a šťavnatá. Sklízí se v říjnu, konzumní zralosti dosahuje v prosinci. Stromy jsou rezistentní ke strupovitosti, padlím trpí jen velmi málo (Blažek et al. 2001).



Obrázek 9: Odrůda 'Topaz'

Zdroj: <<https://www.zahradnictvi-flos.cz/malus-domestica-topaz-jablon-zimni-topaz.html>>

Odrůda 5 – 'Meteor'

Vznik odrůdy: 'Melrose' x 'Megumi'

Popis odrůdy: 'Meteor' je zimní odrůda se vzrůstností středně bujnou až bujnou, která plodí jednotlivě na plodonosném obrostu. Plod má velký až velmi velký. Slupka má základní zelenožlutou barvu, krycí barvou je červená. Slupka je tlustá, na povrchu hladká. Dužnina má žlutavou barvu, je jemná, více šťavnatá. Sklizňové zralosti dosahuje na přelomu září a října, konzumní zralost je od listopadu. Odolnost proti napadení strupovitostí je nízká, proti padlí střední (Nesrsta & Jan 2016).



Obrázek 10: Odrůda 'Meteor'

Zdroj: <http://eagri.cz/public/web/file/493584/Ovoce_2016.pdf>

Odrůda 6 – 'Flordika'

Vznik odrůdy: 'Discovery' x 'Florina'

Popis odrůdy: Vzrůstnost zimní odrůdy 'Flordika' je středně bujná. K nasazení plodů obvykle dochází na krátkém obrostu ve shlucích i jednotlivě. Plod je středně velký až velký, bez žebrování. Základní barvou plodu je žlutozelená, krycí barvou je červená. Slupka je tlustá, na povrchu hladká. Dužnina má krémovou barvu, je středně pevná a šťavnatá. Sklizňové zralosti dosahuje tato odrůda koncem září, konzumní zralosti pak od listopadu. Je rezistentní proti napadení strupovitostí, vůči padlí má odolnost střední (Nesrsta & Jan 2016).



Obrázek 11: Odrůda 'Flordika'

Zdroj: <http://eagri.cz/public/web/file/493584/Ovoce_2016.pdf>

Odrůda 7 – 'Artiga'

Vznik odrůdy: 'Angold' x HL782

Popis odrůdy: 'Artiga' je zimní odrůda s bujnou vzrůstností. Plody jsou nasazeny na krátkých výhonech jednotlivě i ve shlucích. Jablečný plod je velký a je bez žeber. Základní barvou plodu je žlutozelená, krycí barva je červená. Slupka je středně tlustá, hladká a na povrchu nerovná. Dužnina má žlutavou barvu, je středně pevná a navinule sladká. Sklizňové zralosti dosahuje odrůda koncem října, konzumní zralost je od ledna. Odolnost vůči houbovým chorobám je vysoká (Nesrsta & Jan 2016).



Obrázek 12: Odrůda 'Artiga'

Zdroj: <http://eagri.cz/public/web/file/493584/Ovoce_2016.pdf>

Odrůda 8 – 'Jonagold Supra'

Vznik odrůdy: řízená mutace odrůdy 'Jonagold'

Popis odrůdy: Odrůda 'Jonagored Supra' je zimní barevnou mutací odrůdy Jonagold. Její vzrůstnost je bujná, plodí ve shlucích. Má střední až velké plody se zelenožlutou podkladovou barvou, kterou prostupuje forma žíhání a mramorování. Krycí barva je červená. Dužnina je pevná, krémové barvy. Sklizňová zralost začíná na přelomu září a října. Konzumní zralosti dosahuje v listopadu (Vysloužil 2015).



Obrázek 13: Odrůda 'Jonagored Supra'

Zdroj: <<https://www.zahradnictvi-spomysl.cz/jablon-jonagored-supra/>>

Odrůda 9 – 'Rucla'

Vznik odrůdy: 'Clivia' x 'Rubín'

Popis odrůdy: Vyrůstnost zimní odrůdy 'Rucla' je středně bujná až bujná. Plodí jednotlivě na dlouhém obrostu. Jablečné plody jsou středně velké až velké, bez žebrování. Základní barvou slupky je zelenožlutá, krycí barva je celoplošně rozmístěná, purpurová. Slupka je středně tlustá a na povrchu hladká. Dužnina má krémovou barvu, je tuhá a šťavnatá. Odrůda 'Rucla' dosahuje sklizňové zralosti začátkem října, konzumní zralosti na konci listopadu. Odolnost proti napadení strupovitostí a padlí je střední (Nesrsta & Jan 2016).



Obrázek 14: Odrůda 'Jonagored Supra'

Zdroj: <http://eagri.cz/public/web/file/493584/Ovoce_2016.pdf>

Odrůda 10 – 'Idared'

Vznik odrůdy: 'Wagenerovo' x 'Jonathan'

Popis odrůdy: 'Idared' je pozdně zimní červenoplodá odrůda, která je v současnosti nejrozšířenější odrůdou jabloně v České republice. Její vzrůstnost je středně bujná. Má středně velké plody, jejich barva je nazelenale žlutá, krycí barva je červená. Dužnina je bílá, jemná a šťavnatá. Je typická pozdní dobou zrání – sklizňová zralost je až ve druhé polovině října, a dobrou skladovatelností jejich plodů. Pro její pěstování jsou vhodnější spíše vlhčí oblasti a střední polohy. Tato odrůda je náchylná na strupovitost a na padlí a citlivější vůči mrazu (Blažek et al. 2001).



Obrázek 15: Odrůda 'Idared'

Zdroj: <<https://www.zahradnictvi-flos.cz/malus-domestica-idared-jablon-zimni-idared.html>>

Odrůda 11 – 'Lady Silvia'

Vznik odrůdy: 'Zvonkové' x 'Šampion'

Popis odrůdy: Vyrůstnost zimní odrůdy 'Lady Silvia' je středně bujná, plodí na tlustých výhonech převážně ve shlucích. Plod je středně velký až velký a je bez žebrování. Základní barva plodu je žlutozelená, krycí barva je červená. Slupka je tenká až středně tlustá, může být mastná. Dužninu má tato odrůda žlutavé barvy, středně šťavnatou. Sklizňová zralost této je ke konci září, konzumní zralost od poloviny listopadu. Má střední odolnost k houbovým chorobám (Nesrsta & Jan 2016).



Obrázek 16: Odrůda 'Lady Silvia'

Zdroj: <http://eagri.cz/public/web/file/493584/Ovoce_2016.pdf>

Odrůda 12 – 'Reluga'

Vznik odrůdy: 'Golida' x 'Topaz'

Popis odrůdy: Vyrůstnost stromu této zimní odrůdy je středně bujná, plodí na krátkých a středně tlustých až tlustých výhonech, a to převážně ve shlucích. Plod je velký a má středně znatelné žebrování. Základní barva jablečného plodu je žlutozelená, krycí barvou je červená s výrazným žiháním. Dužnina má zelenavou barvu a je středně pevná i šřavnatá. Sklizňové zralosti dosahuje začátkem října, konzumní zralost je od ledna. Odrůda je rezistentní proti napadení strupovitostí (Nesrsta & Jan 2016).



Obrázek 17: Odrůda 'Reluga'

Zdroj: <http://eagri.cz/public/web/file/493584/Ovoce_2016.pdf>

Odrůda 13 – 'Jonagold'

Vznik odrůdy: 'Golden Delicious' x 'Jonathan'

Popis odrůdy: Jedná se o zimní odrůdu amerického původu, jejíž vzrůstnost je bujná, později střední. Má středně velké plody, které jsou odolné proti otláčení a velmi dobře se skladují v moderních skladech s řízenou atmosférou. 'Golden Delicious' je pěstovaná v několika klonech lišících se charakterem vybarvování plodů. Základní barva je zelenožlutá, v pozdějších fázích žlutá, krytá je oranžovočervenou barvou. Dužnina má žlutavou barvu a je jemná a šťavnatá. Plody se sklízí koncem září nebo začátkem října, konzumní zralosti dosahuje od prosince. Stromy jsou velmi náchylné ke strupovitosti a padlí, a vyžadují tak vysokou chemickou ochranu (Blažek et al. 2001).



Obrázek 18: Odrůda 'Jonagold'

Zdroj: <<https://www.zahradnictvi-flos.cz/malus-domestica-jonagold-jablon-zimni-jonagold.html>>

Odrůda 14 – 'Golden Delicious'

Vznik odrůdy: náhodný semenáč

Popis odrůdy: 'Golden Delicious' je nejrozšířenější žlutoplodá zimní odrůda, jejíž vzrůstnost je zpočátku bujná. Vyznačuje se středně velkými plody, jež vyžadují větší šetrnost při sklizni. Žlutá barva slupky v době sklizně indikuje požadovanou kvalitu. Krycí barva není přítomna. Tato odrůda se pěstuje převážně v teplejších oblastech s dostatečně dlouhou vegetační dobou. Sklízí se v říjnu, konzumní zralosti dosahuje od prosince. V chladnějších oblastech má i v období plné plodnosti převážně zelené plody a častěji trpí rzivostí slupky. Jelikož je málo odolná proti strupovitosti, vyžaduje dobrou chemickou ochranu (Blažek et al. 2001).



Obrázek 19: Odrůda 'Golden Delicious'

Zdroj: <<https://www.zahradnictvi-spomysl.cz/jablon-golden-delicious/>>

4.2 Izolace RNA

4.2.1 Příprava materiálu

RNázy (ribonukleázy) jsou všudypřítomné a velmi stabilní enzymy, které katalyzují degradaci RNA na malé složky. Z toho důvodu je nutné vyhnout se během extrakce RNA kontaminacemi RNázami. Pro extrakci RNA byl tak používán plast RNase free. Veškeré používané laboratorní nástroje – pipety, špičky s filtry, třecí misky, tloučky, pinzety a skalpely, byly sterilizovány autoklávem. Přípravkem RNaseZAPTM firmy Sigma, který inhibuje RNázy, byly ošetřeny rukavice i pracovní plocha v laboratoři, ve které probíhal odběr vzorků a extrakce RNA.

Rovněž i veškeré analyzované plody byly nejdříve ošetřeny přípravkem RNaseZAPTM firmy Sigma, aby se vyloučila možnost kontaminace RNázami z vnějšího prostředí. Od každé ze 14 zkoumaných odrůd jabloní byly použity 3 plody, z nichž byly odebrány zvlášť směsné vzorky pletiva slupky a dužniny. K odebrání slupky i dužniny bylo použito více míst na ploše plodu. Plody, z nichž byly odebrány vzorky, pocházely ze dvou ročníků – ze sklizní v září roku 2016 a 2017.

Následně byly veškeré vzorky vloženy do polypropylenových zkumavek a okamžitě zmrazeny kapalným dusíkem, aby nedošlo k poškození RNA. Skladovány byly při teplotě -80°C.

4.2.2 Izolace celkové RNA

Třecí misky byly předem vychlazené kapalným dusíkem a ošetřeny RNaseZAP TM (Sigma). Do nich pak byly přeneseny obsahy polypropylenových zkumavek. Za stálého chlazení kapalným dusíkem došlo pomocí tloučku k homogenizaci vzorků do práškové struktury. Z tohoto prášku bylo asepticky odváženo a přeneseno 100 mg do sterilních 2ml zkumavek. Vzorky byly ponořeny do kapalného dusíku a k jejich vyjmutí došlo až před samotnou analýzou.

Izolace celkové RNA proběhla pomocí Spectrum Plant Total RNA Kit od firmy Sigma. Nejdříve bylo přidáno 500 μ l lyzačního pufru s obsahem 2-merkaptoetanolu do zkumavek s homogenizátem a 30 s byly ponechány homogenizaci na vibrační třepačce. Pak byly inkubovány 3 minuty při teplotě 56°C.

Zkumavky byly centrifugovány při 12 000 relativního centrifugačního zrychlení (RCF) po dobu 10 minut při teplotě 10°C, aby došlo k odstranění zbytku buněk. Supernatant bez rostlinných zbytků byl následně přenesen na filtrační kolonky ve 2ml zkumavkách. Opět byla provedena centrifugace při 12 000 RCF 1 minutu při teplotě 20°C.

Zkumavky byly zchlazeny pomocí ledu. Do zkumavek bylo přidáno 750 μ l vázacího roztoku. Následně byla směs dána na vibrační třepačku, aby se krátce promíchala. Ze zkumavky bylo odebráno 600 μ l a přeneseno na kolonku, která byla určena k navázání RNA. Tato směs byla následně centrifugována při 12 000 RCF 1 minutu při teplotě 20°C, následně byl filtrát odlit a zkumavka byla vysušena sterilní buničinou. Stejný postup byl aplikován i na zbývající část filtrátu.

300 μ l promývacího roztoku bylo přidáno na kolonku a následně byly zkumavky centrifugovány 12 000 RCF po dobu 1 minuty při teplotě 20°C. Následně byl filtrát odlit, zkumavky vysušeny a kolonky vráceny zpět do zkumavek. Na kolonky pak byla přidána směs 10 μ l DNázy I a 70 μ l digesčního pufru, který slouží k degradaci zbytků genomické DNA z kitu On-Column DNase I Digestion Set firmy Sigma. 15 minut byly vzorky inkubovány při laboratorní teplotě. Následně bylo na kolonku přidáno 500 μ l promývacího roztoku 1. Zkumavky byly opět centrifugovány 12 000 RCF 1 minutu v teplotě 20°C. Došlo k odlití filtrátu, vysušení zkumavek a vrácení vázacích kolonek zpět do zkumavek.

Kolonky byly při 2 opakováních promyty 500 μ l promývacího roztoku 2 a centrifugovány 12 000 RCF 1 minutu při teplotě 20°C. Aby byly vázací kolonky zbaveny zbytků promývacího roztoku, byly centrifugovány 30 s 12 000 RCF při teplotě 20°C.

Do nových 2ml zkumavek byly přendány vysušené kolonky. Na povrch filtru bylo přidáno 50 μ l elučního pufru. Kolonky se inkubovaly 5 minut při laboratorní teplotě a pak byly centrifugovány 12 000 RCF po dobu 1 minuty při teplotě 20°C.

4.2.3 Vyhodnocení výtěžnosti RNA

UV spektrofotometr (NanoPhotometer, Implen) byl použit pro vyhodnocení výtěžnosti izolované RNA. Pomocí pipety došlo k jemnému promíchání filtrátu a následně z něj byly odebrány 3 μ l, které sloužily k umístění na kyvetu. Vyhodnocení výtěžnosti RNA probíhalo při vlnové délce 260 nm. Následně byly vzorky ihned použity pro přepis do cDNA.

4.2.4 Syntéza cDNA

Pro syntézu cDNA byl použit Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit firmy Roche za použití univerzálního polyA primeru.

Byla připravena směs templátové RNA a oligo(dT)₁₈ primeru, přičemž celkové množství templátové RNA nepřesáhlo 1 μ g. Koncentrace oligo(dT)₁₈ primeru byla 2,5 μ M. Do celkového objemu 13 μ l byl přidán PCR H₂O (Roche). Celá směs byla denaturována v termocykleru při teplotě 60°C, následně zchlazena, aby byly eliminovány sekundární struktury molekul RNA.

K této směsi byly přidány 4 μ l reakčního pufru Transcriptor Reverse Transcriptase Reaction Buffer (Roche), 0,5 μ l Protector RNase Inhibitor (Roche), 2 μ l deoxynukleotidů a 0,5 μ l Transcriptor Reverse Transcriptase firmy Roche. Následně byla tato směs promíchána pipetou a vložena do termocykleru, aby mohla být inkubována při teplotě 50°C po dobu 60 minut.

cDNA, která byla získána, byla uchována při teplotě -80°C. Veškeré vzorky byly naředěny takovým způsobem, aby v 1 μ l roztoku bylo množství cDNA odpovídající produktur reverzní transkripce, který vznikne z 0,25 ng celkové RNA.

4.2.5 Amplifikace izoformy *Mal d 1.02*, izoform genové rodiny *Mal d 4*, vybraných izoform *PLA₂* a *TGase*

Pro amplifikaci izoform *Mal d 4*, *PLA₂* a *TGase* byl použit termocykler LightCycler Nano Instrument od firmy Roche a kit FastStart Essential DNA Green Master rovněž od firmy Roche. Byl připraven premix obsahující 5 μ l 2x mastermixu, 0,5 μ l F primeru (koncentrace 10 μ M) a 0,5 μ l R primeru (koncentrace 10 μ M) pro každou reakci. Byly připraveny stripy určené k amplifikaci house keepingového genu (actin) a hodnocených genů pro *Mal d 4*, *PLA₂* a *TGase*.

V jednom stripu se nachází celkem 8 jamek. Do každé této jamky bylo rozpipetováno 6 μ l premixu a 4 μ l naředěné cDNA. PCR H₂O o objemu 4 μ l byla použita jako negativní kontrola. Schématické znázornění jednoho z experimentů je uvedeno v Tabulce 2.

Tabulka 2: Schéma experimentu probíhajícího v termocykleru

	Jamka č. 1	Jamka č. 2	Jamka č. 3	Jamka č. 4	Jamka č. 5	Jamka č. 6	Jamka č. 7	Jamka č. 8
Strip A	<i>Mal d</i> 4.01 <i>Odrůda</i> č. 1	<i>Mal d</i> 4.01 <i>Odrůda</i> č. 1	<i>Mal d</i> 4.01 <i>Odrůda</i> č. 1	<i>Mal d</i> 4.01 <i>Odrůda</i> č. 2	<i>Mal d</i> 4.01 <i>Odrůda</i> č. 2	<i>Mal d</i> 4.01 <i>Odrůda</i> č. 2	<i>Mal d</i> 4.01 <i>Odrůda</i> č. 3	<i>Mal d</i> 4.01 <i>Odrůda</i> č. 3
Strip B	<i>Mal d</i> 4.01 <i>Odrůda</i> č. 3	<i>Mal d</i> 4.01 <i>Odrůda</i> č. 4	<i>Mal d</i> 4.01 <i>Odrůda</i> č. 4	<i>Mal d</i> 4.01 <i>Odrůda</i> č. 4	<i>Mal d</i> 4.01 <i>Odrůda</i> č. 5	<i>Mal d</i> 4.01 <i>Odrůda</i> č. 5	<i>Mal d</i> 4.01 <i>Odrůda</i> č. 5	<i>Mal d</i> 4.01 <i>Negativní kontrola</i>
Strip C	<i>Aktin 7</i> <i>Odrůda</i> č. 1	<i>Aktin 7</i> <i>Odrůda</i> č. 1	<i>Aktin 7</i> <i>Odrůda</i> č. 1	<i>Aktin 7</i> <i>Odrůda</i> č. 2	<i>Aktin 7</i> <i>Odrůda</i> č. 2	<i>Aktin 7</i> <i>Odrůda</i> č. 2	<i>Aktin 7</i> <i>Odrůda</i> č. 3	<i>Aktin 7</i> <i>Odrůda</i> č. 3
Strip D	<i>Aktin 7</i> <i>Odrůda</i> č. 3	<i>Aktin 7</i> <i>Odrůda</i> č. 4	<i>Aktin 7</i> <i>Odrůda</i> č. 4	<i>Aktin 7</i> <i>Odrůda</i> č. 4	<i>Aktin 7</i> <i>Odrůda</i> č. 5	<i>Aktin 7</i> <i>Odrůda</i> č. 5	<i>Aktin 7</i> <i>Odrůda</i> č. 5	<i>Aktin 7</i> <i>Negativní kontrola</i>

Amplifikace probíhala ve čtyřech krocích. Nejdříve byla aktivována polymeráza při teplotě 95°C (rychlost změny teploty 4°C/s) na 10 minut. Následovala tříkolová amplifikace se 45 cykly při 95°C (rychlost změny teploty 5°C/s) na 20 s. Třetí krok byl představen teplotou 61°C pro všechny primerové páry (rychlost změny teploty 4°C/s) na 20 s. A při posledním kroku byla teplota 72°C (rychlost změny teploty 4°C/s) na 20 s.

Při přípravě premixu byly použity primerové páry dle Pagliarani et al. (2013) a Paris et al. (2017), které jsou uvedeny v Tabulce 3.

Tabulka 3: Primerové páry použité pro amplifikaci analyzovaných genů v qRT-PCR
(upraveno dle Pagliarani et al. 2013; Paris et al. 2017)

Gen	Název primeru	Sekvence primeru 5'-3'	Teplota annealingu
<i>Mal d 1.02</i>	qMd1.01/02F qMd1.02R	GATTGAAGGAGATGCTTTGACA TTGGTGTGGTAGTGGCTGATA	61°C
<i>Mal d 4.01</i>	Md401fw Md401rv	CAGCCAGGCCCTGTTAATC AGAGACCCTGCTCAATAAGGTAA	61°C
<i>Mal d 4.02</i>	qMd402F qMd402R	GTGTTACTGTCAAGAAGAGCACAA GCTCAATGAGATAATCCGCA	61°C
<i>Mal d 4.03</i>	Md403fw Md403rv	GGCCAAGCTTTGGTTTTTC GCCTTGATCAATCAGGTAGTCT	61°C
<i>Mal d 4.04</i>	Md404Afor Md404Arev	GGCAAGCTCTAGTATTTGGAATCTAC TCGCCCAACCTCTCAACC	61°C
<i>PLA21</i>	PLA 21-For PLA 21-Rev	ATCGCACGACACAGTTCTCC TATTGTTCGGAACAGTGGGCG	61°C
<i>PLA23</i>	PLA 23-For PLA 23-Rev	AGTGCAGCCAAACGTTTCCTA CAGCCTCCATGACAAGGGTT	61°C
<i>TGase</i>	TGaseRTF TGaseRTR	AGGGATCAAGCTGGCATCTG AAGCATTTGCGAGGAAACCTT	61°C
<i>Aktin 7</i>	actin F actin R	CTATGTTCCCTGGTATTGCAGACC GCCACAACCTTGATTTTCATGC	61°C

4.3 Zpracování dat z qRT-PCR

Ovládací program termocykleru LightCycler Nano (Roche) mohl být použit pro analýzu relativní kvantifikace. V programu Microsoft Excel byly vypočteny parametry ΔCq a Ratio ΔCq , jelikož tyto údaje sloužící jako vstupní data pro statistické vyhodnocení ovládací program LightCycler Nano (Roche) nezobrazuje.

Hodnoty ΔCq a Ratio ΔCq nebyly v této diplomové práci použity, jelikož studentka FAPPZ ČZU v Praze Tereza Zunová při řešení své diplomové práce (Zunová 2018) prokázala, že hodnoty eficientí amplifikací studovaných genů a aktinu 7 se vzájemně minimálně lišily.

4.3.1 Stanovení parametru Ratio ΔCq

Parametr Ratio ΔCq vyjadřuje intenzitu exprese analyzovaných genů, která je normalizována k expresi house keepingového genu, aktinu 7. Tuto metodiku ve svém experimentu popsal Pagliarani et al. (2013). Pro výpočet parametrů ΔCq byl využit program Microsoft Excel, kam byla zadávána data z programu LightCycleru.

4.4. Statistické zpracování výsledků

Všechny statistické analýzy byly provedeny pomocí programu Dell Statistica version 13 (Dell Inc. 2015). Statistické hodnocení parametru ΔCq bylo provedeno podle následujícího schématu:

- Deskriptivní statistiky (aritmetický průměr, medián, směrodatná odchylka a variační koeficient)
- Vyhodnocení normality dat pomocí následujících testů: K-S, Lilliefors a Shapiro-Wilkova testu

Vzhledem k tomu, že hodnoty ΔCq nevykazovaly normální rozdělení, byl použit neparametrický Kruskal-Wallisův test pro vyhodnocení vlivu genu, ročníku, typu pletiva, odrůdy a biologického replikátu na hodnoty ΔCq .

- Pro vyhodnocení závislosti hodnot ΔCq mezi geny, ročníky, typy pletiva a replikáty byl použit lineární model regresní analýzy

5 Výsledky

5.1 Přehled stanovených hodnot Ratio ΔCq a variačních koeficientů (Vk)

Získali jsme dohromady 2688 hodnot Ratio ΔCq vyjadřujících relativní expresi studovaných genů vztaženou k expresi referenčního genu pro aktin 7. 2688 hodnot představuje 896 různých variant kombinací jednotlivých třídících faktorů – roku sklizně, typu pletiva, testovaného genu, odrůdy a biologického replikátu v celkem 3 měřeních (3 technických replikátech).

Pomocí programu Microsoft Excel jsme nejdříve vypočítali mediány hodnot Ratio ΔCq jednotlivých variant tří technických replikátů. Tím jsme pro každou variantu získali hodnoty Ratio ΔCq biologických replikátů A a B. Následně jsme spočítali aritmetické průměry biologických replikátů v rámci jednotlivých třídících faktorů a jejich variační koeficienty (%), které vyjadřují míru variability mezi replikáty A a B.

Na následujících tabulkách (Tabulka 4 až Tabulka 9) jsou pro jednotlivé varianty kombinací třídících faktorů uvedeny aritmetické průměry hodnot Ratio ΔCq a variační koeficienty (Vk) určující variabilitu biologických replikátů. Pro lepší přehlednost bylo vytvořeno celkem 6 tabulek rozdělených podle testovaného genu a typu pletiva. Izoformám *Mal d 4* se věnuje Tabulka 4 (pro dužninu) a Tabulka 5 (pro slupku). Sledované hodnoty pro *PLA21*, *PLA23* a *TGase* jsou znázorněny v Tabulce 6 (pro dužninu) a v Tabulce 7 (pro slupku). Tabulka 8 (pro dužninu) a Tabulka 9 (pro slupku) se zabývají expresí izoformy *Mal d 1.02*.

Z tabulek je pro oba typy testovaného pletiva patrná vyšší exprese izoformy *Mal d 1.02* ve srovnání s izoformami genové rodiny *Mal d 4* a s enzymy *PLA21*, *PLA23* i *TGase*.

Tabulka 4: Aritmetické průměry výsledných hodnot Ratio ΔCq a jejich variační koeficienty pro izoformy Mal d 4 u analyzovaných vzorků dužniny plodů z ročníku 2016 a 2017

		Izoformy Mal d 4							
		Mal d 4.01		Mal d 4.02		Mal d 4.03		Mal d 4.04	
Odrůda	Rok sklizně	Ratio ΔCq	Vk [%]	Ratio ΔCq	Vk [%]	Ratio ΔCq	Vk [%]	Ratio ΔCq	Vk [%]
'Artiga'	2016	1,010	0,280	2,066	0,274	0,426	1,328	0,011	6,734
	2017	0,575	3,197	1,205	0,352	0,245	0,868	0,007	10,879
'Flordika'	2016	0,950	0,521	0,709	1,197	0,213	0,998	0,010	14,142
	2017	0,553	0,896	0,417	2,207	0,122	1,159	0,003	47,140
'Frosta'	2016	0,887	0,399	1,956	0,362	0,432	0,982	0,002	47,140
	2017	0,526	2,689	1,141	0,310	0,252	1,406	0,002	47,140
'Golden Delicious'	2016	0,767	0,646	1,959	0,505	0,142	1,499	0,062	3,449
	2017	0,440	1,607	1,150	0,308	0,083	1,704	0,035	2,050
'Idared'	2016	0,963	1,175	1,763	0,160	1,808	0,352	0,036	9,959
	2017	0,574	1,725	1,031	0,549	1,049	0,472	0,018	7,857
'Jonagold'	2016	1,001	0,212	2,184	0,486	0,138	2,571	0,004	35,355
	2017	0,577	1,471	1,269	1,003	0,078	2,737	0,003	0,000
'Jonagold Marnika'	2016	0,761	0,372	2,378	0,268	0,221	0,962	0,001	0,000
	2017	0,453	2,969	1,393	0,254	0,132	1,613	0,002	47,140
'Jonagold Supra'	2016	0,688	0,822	2,122	0,167	0,240	0,589	0,005	15,713
	2017	0,396	1,252	1,242	0,342	0,144	3,928	0,004	20,203
'Lady Silvia'	2016	0,616	0,689	1,078	0,787	0,479	1,034	0,006	23,570
	2017	0,351	2,623	0,629	0,788	0,285	1,985	0,004	20,203
'Meteor'	2016	0,552	1,793	2,249	0,157	0,360	0,590	0,002	70,711
	2017	0,320	0,884	1,319	0,804	0,213	1,992	0,003	28,284
'Nikoleta'	2016	1,176	0,241	2,142	0,264	0,653	0,759	0,002	47,140
	2017	0,678	1,460	1,258	0,619	0,381	0,929	0,002	70,711
'Reluga'	2016	0,861	0,411	1,442	0,294	0,151	1,873	0,011	6,734
	2017	0,509	1,667	0,845	0,754	0,088	1,607	0,007	10,879
'Rucla'	2016	0,995	0,498	2,633	0,242	0,620	0,456	0,007	20,203
	2017	0,581	0,365	1,548	1,325	0,361	0,783	0,005	15,713
'Topaz'	2016	0,860	0,329	1,638	0,518	0,479	0,443	0,003	28,284
	2017	0,509	2,501	0,950	0,298	0,284	1,746	0,002	0,000

Tabulka 5: Aritmetické průměry výsledných hodnot Ratio ΔCq a jejich variační koeficienty pro izoformy Mal d 4 u analyzovaných vzorků slupky plodů z ročníku 2016 a 2017

		Izoformy Mal d 4							
		Mal d 4.01		Mal d 4.02		Mal d 4.03		Mal d 4.04	
Odrůda	Rok sklizně	Ratio ΔCq	Vk [%]	Ratio ΔCq	Vk [%]	Ratio ΔCq	Vk [%]	Ratio ΔCq	Vk [%]
'Artiga'	2016	0,693	0,612	1,109	0,574	0,116	1,837	0,002	47,140
	2017	0,411	1,550	0,651	1,521	0,068	2,080	0,002	47,140
'Flordika'	2016	0,851	0,416	0,625	1,131	0,157	1,802	0,013	16,971
	2017	0,492	1,583	0,372	1,521	0,091	3,108	0,008	9,428
'Frosta'	2016	0,686	0,618	1,237	0,572	0,196	1,808	0,002	70,711
	2017	0,400	0,531	0,717	0,394	0,115	0,618	0,002	47,140
'Golden Delicious'	2016	0,684	0,414	1,578	0,538	0,085	4,184	0,002	47,140
	2017	0,393	1,982	0,928	0,610	0,051	1,400	0,001	0,000
'Idared'	2016	0,929	0,457	1,038	0,545	0,109	2,595	0,002	70,711
	2017	0,548	0,904	0,610	1,276	0,064	3,341	0,001	0,000
'Jonagold'	2016	0,919	0,616	1,874	0,302	0,058	2,438	0,003	28,284
	2017	0,532	1,996	1,082	1,242	0,033	4,285	0,002	47,140
'Jonagold Marnika'	2016	0,820	0,517	1,713	0,289	0,054	2,619	0,002	47,140
	2017	0,490	2,745	0,993	0,570	0,032	2,245	0,002	47,140
'Jonagold Supra'	2016	0,965	0,513	1,789	0,277	0,073	1,937	0,001	0,000
	2017	0,555	1,658	1,037	0,682	0,044	1,626	0,001	0,000
'Lady Silvia'	2016	0,723	0,685	1,037	0,273	0,266	2,658	0,002	47,140
	2017	0,420	1,010	0,605	0,234	0,157	0,901	0,003	28,284
'Meteor'	2016	0,773	0,366	1,608	0,352	0,152	0,930	0,005	15,713
	2017	0,458	1,700	0,932	0,683	0,087	2,452	0,004	20,203
'Nikoleta'	2016	0,879	0,885	1,182	0,718	0,163	3,046	0,002	47,140
	2017	0,515	0,412	0,686	1,547	0,096	1,473	0,002	47,140
'Reluga'	2016	0,789	0,628	1,374	0,257	0,057	2,481	0,001	0,000
	2017	0,472	2,849	0,808	0,788	0,032	4,419	0,003	0,000
'Rucla'	2016	0,642	0,661	0,983	0,719	0,142	1,499	0,002	70,711
	2017	0,370	2,293	0,571	1,238	0,081	2,635	0,002	47,140
'Topaz'	2016	0,779	0,726	1,564	3,121	0,243	0,875	0,002	70,711
	2017	0,445	3,814	0,896	0,553	0,140	1,521	0,002	47,140

Tabulka 6: Aritmetické průměry výsledných hodnot Ratio ΔCq a jejich variační koeficienty pro PLA21, PLA23 a TGase u analyzovaných vzorků dužniny plodů z ročníku 2016 a 2017

Odrůda	Rok sklizně	PLA21		PLA23		TGase	
		Ratio ΔCq	Vk [%]	Ratio ΔCq	Vk [%]	Ratio ΔCq	Vk [%]
'Artiga'	2016	0,007	20,203	0,004	60,609	0,350	1,012
	2017	0,005	15,713	0,003	84,853	0,204	0,693
'Flordika'	2016	0,021	6,734	0,002	70,711	0,315	1,124
	2017	0,014	5,238	0,002	47,140	0,181	1,175
'Frosta'	2016	0,012	11,785	0,002	47,140	0,749	0,472
	2017	0,008	9,428	0,003	28,284	0,433	1,633
'Golden Delicious'	2016	0,012	0,000	0,016	4,562	0,591	0,479
	2017	0,007	10,879	0,010	7,443	0,347	1,020
'Idared'	2016	0,014	5,238	0,004	20,203	0,444	1,593
	2017	0,007	20,203	0,002	47,140	0,264	0,805
'Jonagold'	2016	0,016	4,562	0,015	4,877	0,544	1,431
	2017	0,010	7,443	0,007	32,636	0,323	1,314
'Jonagold Marnika'	2016	0,006	23,570	0,001	0,000	0,454	0,780
	2017	0,004	0,000	0,002	47,140	0,266	1,595
'Jonagold Supra'	2016	0,009	0,000	0,002	70,711	0,381	1,114
	2017	0,004	35,355	0,002	47,140	0,227	1,869
'Lady Silvia'	2016	0,006	23,570	0,003	84,853	0,418	0,677
	2017	0,003	47,140	0,002	70,711	0,241	1,174
'Meteor'	2016	0,017	8,319	0,004	35,355	0,356	1,790
	2017	0,012	18,446	0,002	70,711	0,208	2,040
'Nikoleta'	2016	0,0060	23,570	0,002	70,711	0,389	0,910
	2017	0,004	20,203	0,002	70,711	0,228	1,861
'Reluga'	2016	0,009	8,319	0,002	47,140	0,518	0,819
	2017	0,006	12,856	0,002	70,711	0,299	0,711
'Rucla'	2016	0,007	20,203	0,002	47,140	0,310	0,456
	2017	0,004	35,355	0,001	0,000	0,180	1,182
'Topaz'	2016	0,009	8,319	0,003	28,284	0,412	1,203
	2017	0,004	35,355	0,003	28,284	0,241	0,587

Tabulka 7: Aritmetické průměry výsledných hodnot Ratio ΔCq a jejich variační koeficienty pro PLA21, PLA23 a TGase u analyzovaných vzorků slupky plodů z ročníku 2016 a 2017

Odrůda	Rok sklizně	PLA21		PLA23		TGase	
		Ratio ΔCq	Vk [%]	Ratio ΔCq	Vk [%]	Ratio ΔCq	Vk [%]
'Artiga'	2016	0,008	9,428	0,008	9,428	0,533	1,061
	2017	0,005	15,713	0,005	0,000	0,314	0,450
'Flordika'	2016	0,025	5,657	0,013	10,879	0,584	0,848
	2017	0,014	15,713	0,007	10,879	0,341	1,038
'Frosta'	2016	0,002	47,140	0,007	10,879	0,690	0,718
	2017	0,002	47,140	0,002	70,711	0,420	2,866
'Golden Delicious'	2016	0,016	8,839	0,033	4,285	0,835	0,339
	2017	0,012	23,570	0,021	6,734	0,484	0,731
'Idared'	2016	0,015	47,140	0,003	47,140	0,696	0,712
	2017	0,013	10,879	0,002	47,140	0,411	0,861
'Jonagold'	2016	0,022	6,428	0,027	10,476	0,751	0,377
	2017	0,014	5,238	0,016	8,839	0,439	0,322
'Jonagold Marnika'	2016	0,013	5,657	0,024	9,027	0,874	0,324
	2017	0,008	9,428	0,014	5,238	0,510	0,277
'Jonagold Supra'	2016	0,007	20,203	0,012	23,570	0,917	0,540
	2017	0,006	23,570	0,007	20,203	0,533	1,195
'Lady Silvia'	2016	0,016	8,839	0,003	47,140	0,780	0,454
	2017	0,008	17,678	0,002	70,711	0,450	1,416
'Meteor'	2016	0,027	5,238	0,034	4,159	1,188	0,476
	2017	0,015	14,630	0,018	7,857	0,689	0,411
'Nikoleta'	2016	0,092	3,864	0,002	47,140	0,860	0,329
	2017	0,056	1,274	0,002	47,140	0,500	0,849
'Reluga'	2016	0,015	9,428	0,009	8,319	0,687	0,721
	2017	0,009	8,319	0,006	12,856	0,401	0,530
'Rucla'	2016	0,010	14,142	0,006	23,570	0,644	0,439
	2017	0,007	20,203	0,003	47,140	0,371	1,144
'Topaz'	2016	0,018	12,122	0,004	20,203	0,724	0,880
	2017	0,012	6,149	0,003	28,284	0,427	0,662

Tabulka 8: Aritmetické průměry výsledných hodnot Ratio ΔCq a jejich variační koeficienty pro izoformu Mal d 1.02 u analyzovaných vzorků dužniny plodů z ročníku 2016 a 2017

		<i>Mal d 1.02</i>	
Odrůda	Rok sklizně	Ratio ΔCq	Vk [%]
'Artiga'	2016	54,354	0,254
	2017	37,165	1,688
'Flordika'	2016	12,203	1,176
	2017	9,833	2,330
'Frosta'	2016	20,524	0,117
	2017	12,622	0,891
'Golden Delicious'	2016	69,689	0,316
	2017	26,099	0,539
'Idared'	2016	52,435	0,092
	2017	18,618	0,634
'Jonagold'	2016	62,359	0,112
	2017	65,857	0,119
'Jonagold Marnika'	2016	27,703	0,569
	2017	24,346	0,186
'Jonagold Supra'	2016	59,007	0,466
	2017	28,713	0,534
'Lady Silvia'	2016	44,168	0,147
	2017	9,857	0,803
'Meteor'	2016	41,730	0,495
	2017	19,600	1,277
'Nikoleta'	2016	43,436	0,858
	2017	27,612	1,027
'Reluga'	2016	16,699	0,906
	2017	22,191	1,192
'Rucla'	2016	13,506	1,901
	2017	16,895	0,599
'Topaz'	2016	19,918	0,696
	2017	9,113	0,908

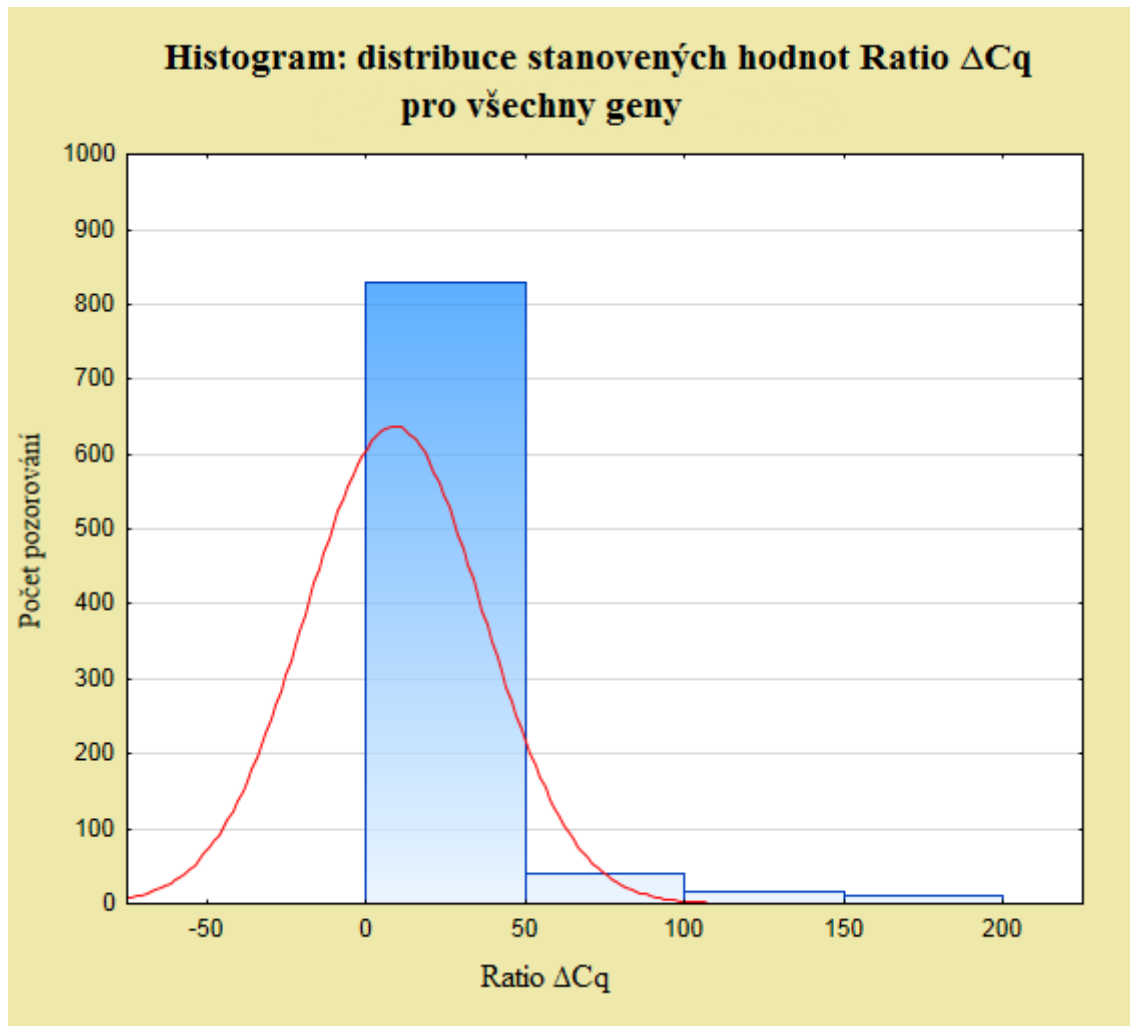
Tabulka 9: Aritmetické průměry výsledných hodnot Ratio ΔCq a jejich variační koeficienty pro izoformu Mal d 1.02 u analyzovaných vzorků slupky plodů z ročníku 2016 a 2017

		<i>Mal d 1.02</i>	
Odrůda	Rok sklizně	Ratio ΔCq	Vk [%]
'Artiga'	2016	81,155	1,737
	2017	77,645	0,709
'Flordika'	2016	55,296	0,746
	2017	46,329	0,943
'Frosta'	2016	83,800	0,895
	2017	72,247	0,615
'Golden Delicious'	2016	56,510	1,277
	2017	67,20	0,539
'Idared'	2016	121,801	1,914
	2017	98,494	0,502
'Jonagold'	2016	151,654	1,320
	2017	131,392	0,652
'Jonagold Marnika'	2016	179,415	0,305
	2017	158,733	0,260
'Jonagold Supra'	2016	79,545	0,429
	2017	82,303	0,718
'Lady Silvia'	2016	91,694	0,463
	2017	86,157	0,570
'Meteor'	2016	169,540	0,157
	2017	176,652	0,528
'Nikoleta'	2016	97,132	0,476
	2017	84,220	1,815
'Reluga'	2016	115,322	0,546
	2017	105,356	1,206
'Rucla'	2016	139,453	0,577
	2017	106,179	1,127
'Topaz'	2016	135,672	0,727
	2017	110,788	0,286

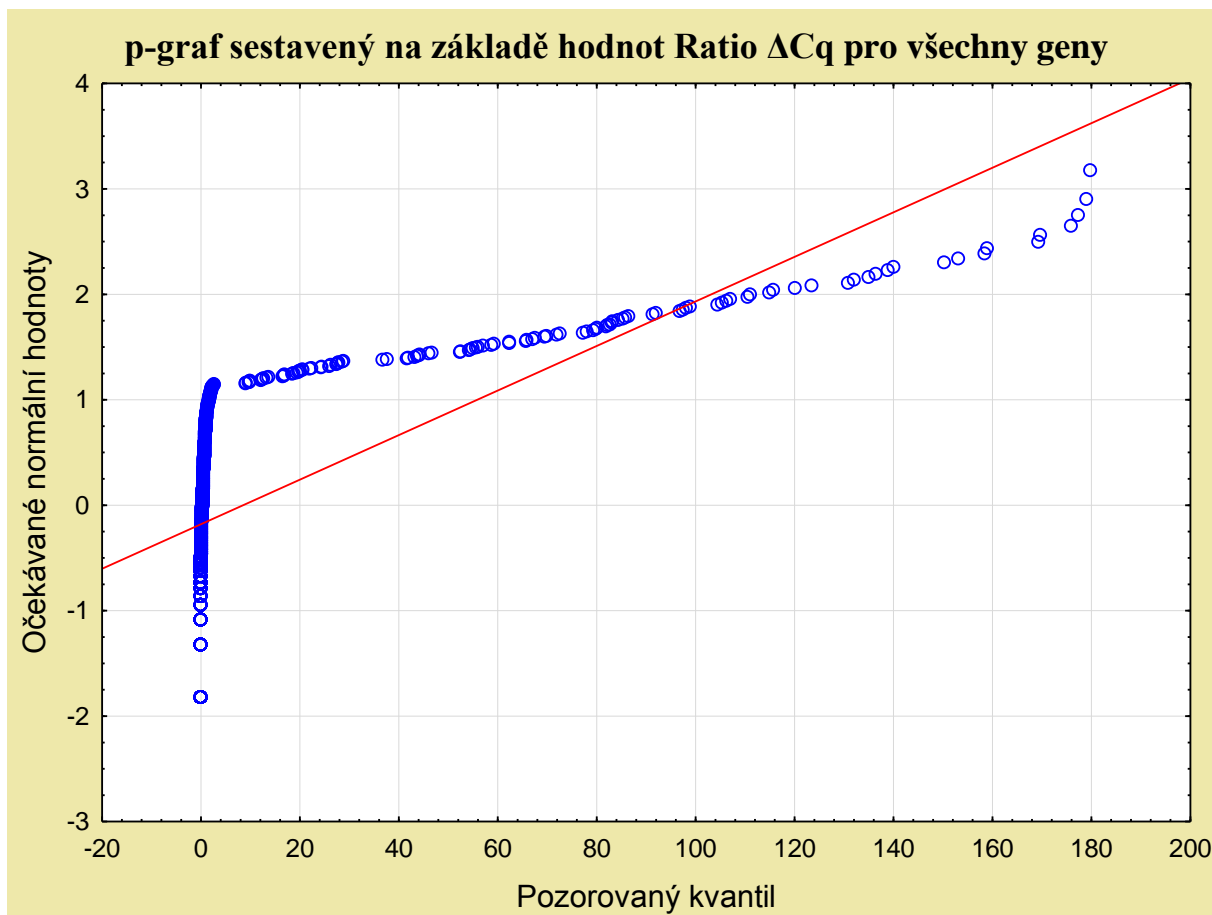
5.2 Statistické vyhodnocení rozdílů hodnot Ratio ΔCq pro všechny geny

Pro zvolení vhodné statistické analýzy bylo nejdříve provedeno vyhodnocení homogenity rozptylů hodnot Ratio ΔCq pro všechny biologické replikáty všech variant kombinací jednotlivých třídících faktorů. Nulová hypotéza na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ nebyla potvrzena. To znamená, že hodnoty nejsou homogenní a neodpovídají Gaussovu normálnímu rozdělení, jak je patrné z Grafu 1 a Grafu 2. Je to způsobeno několikanásobně vyšší expresí izoformy *Mal d 1.02* oproti ostatním testovaným genům.

Graf 1: Histogram stanovených hodnot Ratio ΔCq pro všechny geny v porovnání s Gaussovou křivkou normálního rozdělení



Graf 2: p-graf sestavený na základě hodnot Ratio ΔCq pro jednotlivé biologické replikáty v porovnání s očekávaným průběhem normálního rozdělení



Z Grafu 2 je zřejmé, že největšina hodnot se pohybovala kolem 0. I z toho lze usoudit, že získaný datový soubor nemá normální rozdělení. Pro statistické hodnocení tak nelze použít analýzu rozptylu vícenásobného třídění. Efekty jednotlivých třídících faktorů jsme tak hodnotili na základě neparametrického Kruskal-Wallisova testu, kterému jsou věnovány následující podkapitoly.

5.2.1 Analýza rozdílů dle roku sklizně

Vzorky jablečných plodů, které jsme testovali, pocházely ze dvou roků sklizně – z roku 2016 a 2017. Zjistili jsme, že na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ existuje statisticky významný rozdíl v míře exprese zkoumaných genů vyjádřené hodnotami mediánů Ratio ΔCq mezi oběma roky sklizně. Detailní hodnota statistické difference je uvedena v Tabulce 10.

Tabulka 10: Pravděpodobnost shody hodnot mediánů Ratio ΔCq mezi roky sklizně – výsledek Kruskal-Wallisovy analýzy

2016	0,001
	2017

Na krabicovém Grafu 3 je znázorněn rozdíl v expresi genů mezi roky sklizně a diferenciaci mediánů, rozptyl a oblast, v níž se nachází 25-75 % hodnot Ratio ΔCq .

Graf 3: Diferenciace mediánů a rozptyl hodnot Ratio ΔCq mezi roky sklizně



5.2.2 Analýza rozdílů dle typu pletiva

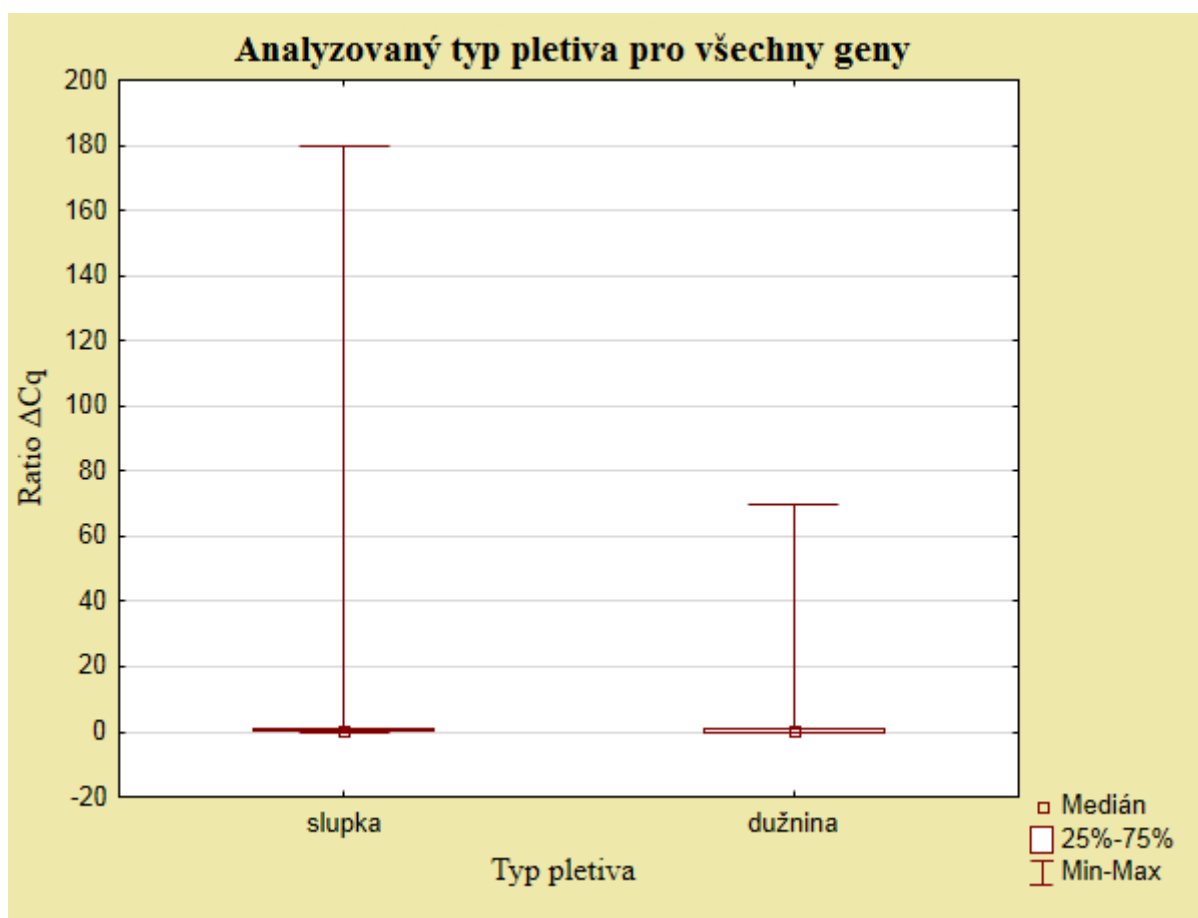
Vzorky, které jsme testovali, pocházely ze dvou částí jablečných plodů – z dužniny a ze slupky. Na základě Kruskal-Wallisovy analýzy jsme zjistili, že na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ neexistuje statisticky významný rozdíl v míře exprese zkoumaných genů vyjádřené hodnotami mediánů Ratio ΔCq mezi oběma typy pletiva. Detailní hodnota statistického rozdílu je uvedena v Tabulce 11.

Tabulka 11: Pravděpodobnost shody mediánů Ratio ΔCq mezi typy pletiva – výsledek Kruskal-Wallisovy analýzy

dužnina	0,737
	slupka

Pro lepší představu je na Grafu 4 znázorněn rozdíl v expresi genů mezi dužninou a slupkou a diferenciací mediánů, rozptyl a oblast, v níž se nachází 25-75 % hodnot Ratio ΔCq .

Graf 4: Diferenciace mediánů a rozptyl hodnot Ratio ΔCq mezi slupkou a dužninou



5.2.3 Analýza rozdílů dle testovaného genu

V této diplomové práci byla analyzována exprese izoalergenu *Mal d 1.02*, alergenů genové rodiny *Mal d 4* a genů *PLA21*, *PLA23* a *TGase*. S využitím Kruskal-Wallisovy analýzy bylo zjištěno, že na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ neexistuje statisticky významný rozdíl v míře exprese vyjádřené hodnotami mediánů Ratio ΔCq jen mezi některými geny. Detailní hodnoty statistických rozdílů jsou uvedeny v Tabulce 12.

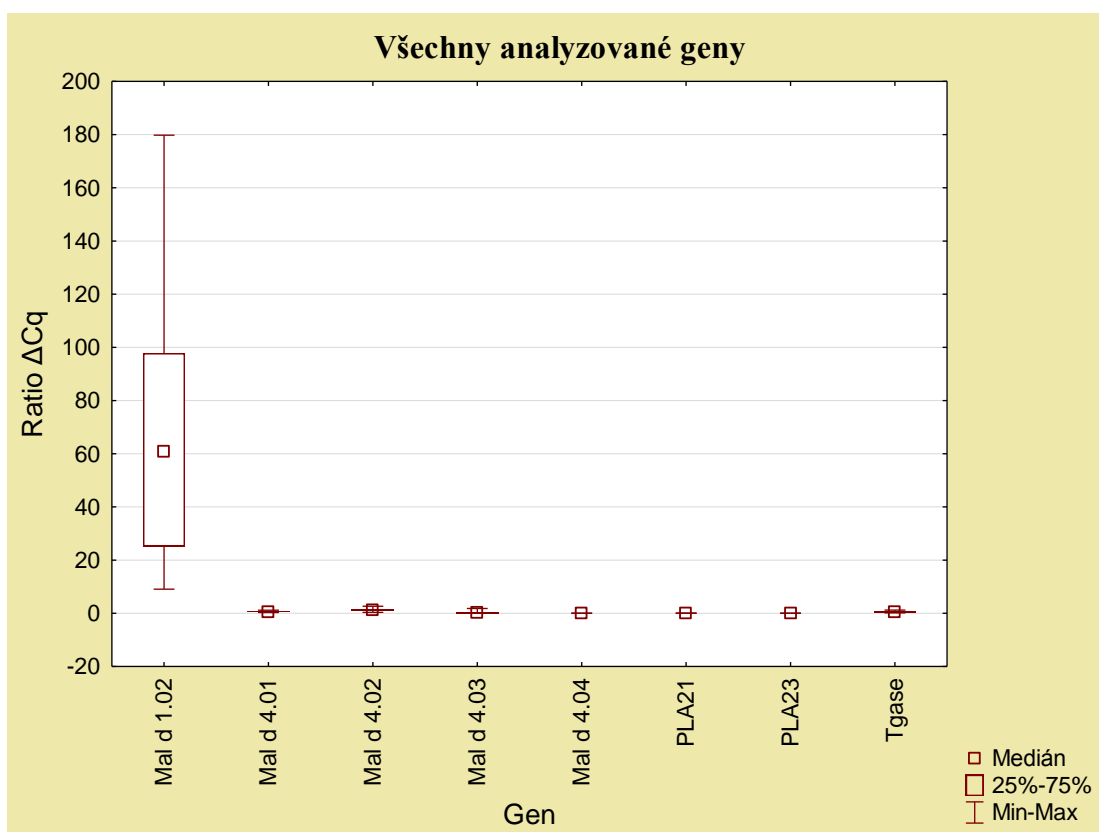
Tabulka 12: Pravděpodobnost shody mediánů Ratio ΔCq mezi analyzovanými geny – výsledek Kruskal-Wallisovy analýzy

<i>Mal d 4.01</i>	0,000						
<i>Mal d 4.02</i>	0,002	0,044					
<i>Mal d 4.03</i>	0,000	0,000	0,000				
<i>Mal d 4.04</i>	0,000	0,000	0,000	0,000			
<i>PLA21</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,038		
<i>PLA23</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,518	
<i>TGase</i>	0,000	1,000	0,000	0,054	0,000	0,000	0,000
	<i>Mal d 1.02</i>	<i>Mal d 4.01</i>	<i>Mal d 4.02</i>	<i>Mal d 4.03</i>	<i>Mal d 4.04</i>	<i>PLA21</i>	<i>PLA23</i>

Z Tabulky 12 je patrné, že statisticky nevýznamné rozdíly se vyskytují pouze mezi expresí *TGase* a dvou izoform genové rodiny *Mal d 4* – *Mal d 4.01* a *Mal d 4.03*, a mezi expresí *PLA23* a izoformy *Mal d 4.04* a *PLA21*.

Na krabicovém Grafu 5 je znázorněn rozdíl v expresi jednotlivých genů a diferenciaci mediánů, rozptyl a oblast, v níž se nachází 25-75 % hodnot Ratio ΔCq .

Graf 5: Diferenciace mediánů a rozptyl hodnot Ratio ΔCq mezi testovanými geny



5.2.4 Analýza rozdílů dle testované odrůdy

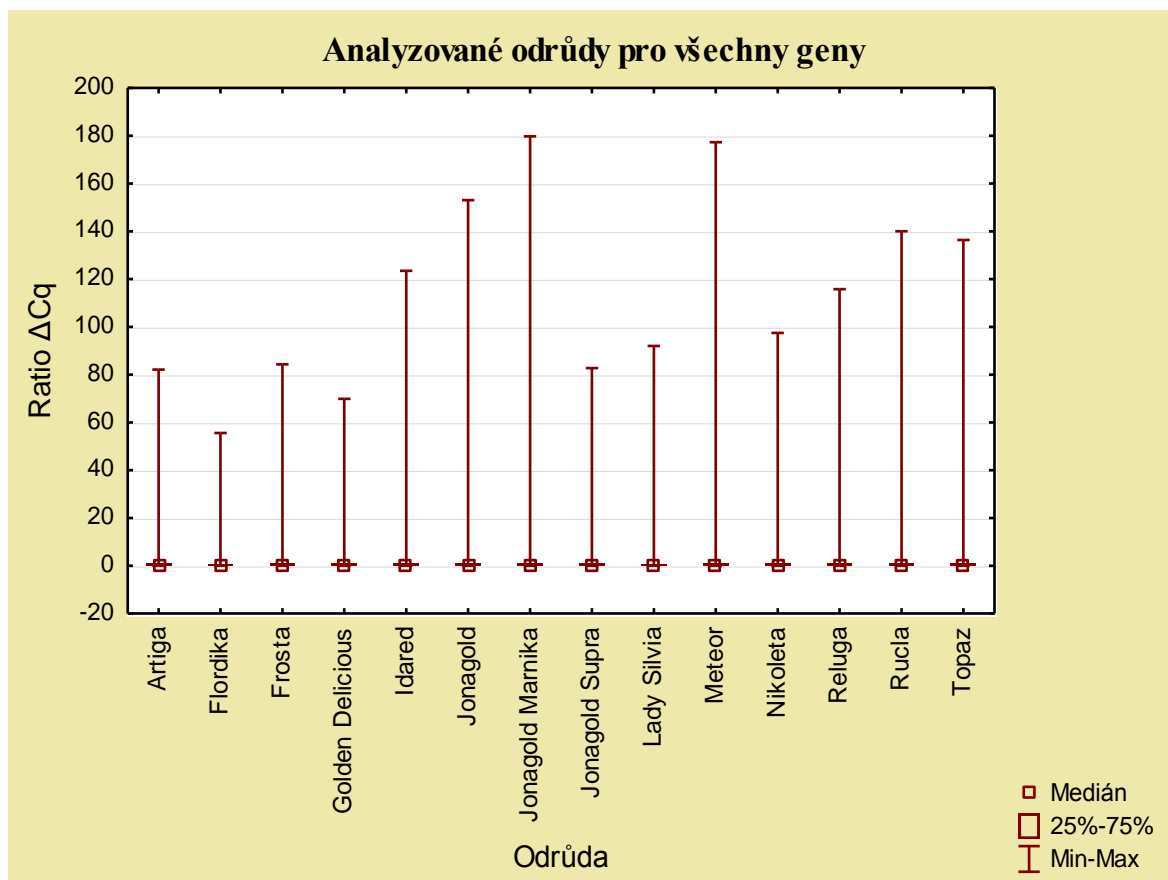
V této diplomové práci bylo zkoumáno celkem 14 odrůd. Na základě Kruskal-Wallisovy analýzy jsme zjistili, že na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ neexistuje statisticky významný rozdíl v míře exprese zkoumaných genů vyjádřené hodnotami mediánů Ratio ΔCq mezi žádnými dvěma odrůdami. Detailní hodnoty statistických rozdílů je uvedena v Tabulce 13.

Tabulka 13: Pravděpodobnost shody mediánů Ratio ΔCq mezi analyzovanými odrůdami – výsledek Kruskal-Wallisovy analýzy

'Flordika'	1,000													
'Frosta'	1,000	1,000												
'Golden Delicious'	1,000	1,000	1,000											
'Idared'	1,000	1,000	1,000	1,000										
'Jonagold'	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000									
'Jonagold Marnika'	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000								
'Jonagold Supra'	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000							
'Lady Silvia'	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000						
'Meteor'	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000					
'Nikoleta'	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000				
'Reluga'	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000			
'Rucla'	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000		
'Topaz'	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
		'Artiga'	'Flordika'	'Frosta'	'Golden Delicious'	'Idared'	'Jonagold'	'Jonagold'	'Jonagold Supra'	'Lady Silvia'	'Meteor'	'Nikoleta'	'Reluga'	'Rucla'

Pro lepší představu je na krabicovém Grafu 6 znázorněn rozdíl v expresi genů napříč testovanými odrůdami a diferenciací mediánů, rozptyl a oblast, v níž se nachází 25-75 % hodnot Ratio ΔCq .

Graf 6: Diferenciace mediánů a rozptyl hodnot Ratio ΔCq mezi testovanými odrůdami



5.2.5 Analýza rozdílů mezi biologickými replikáty

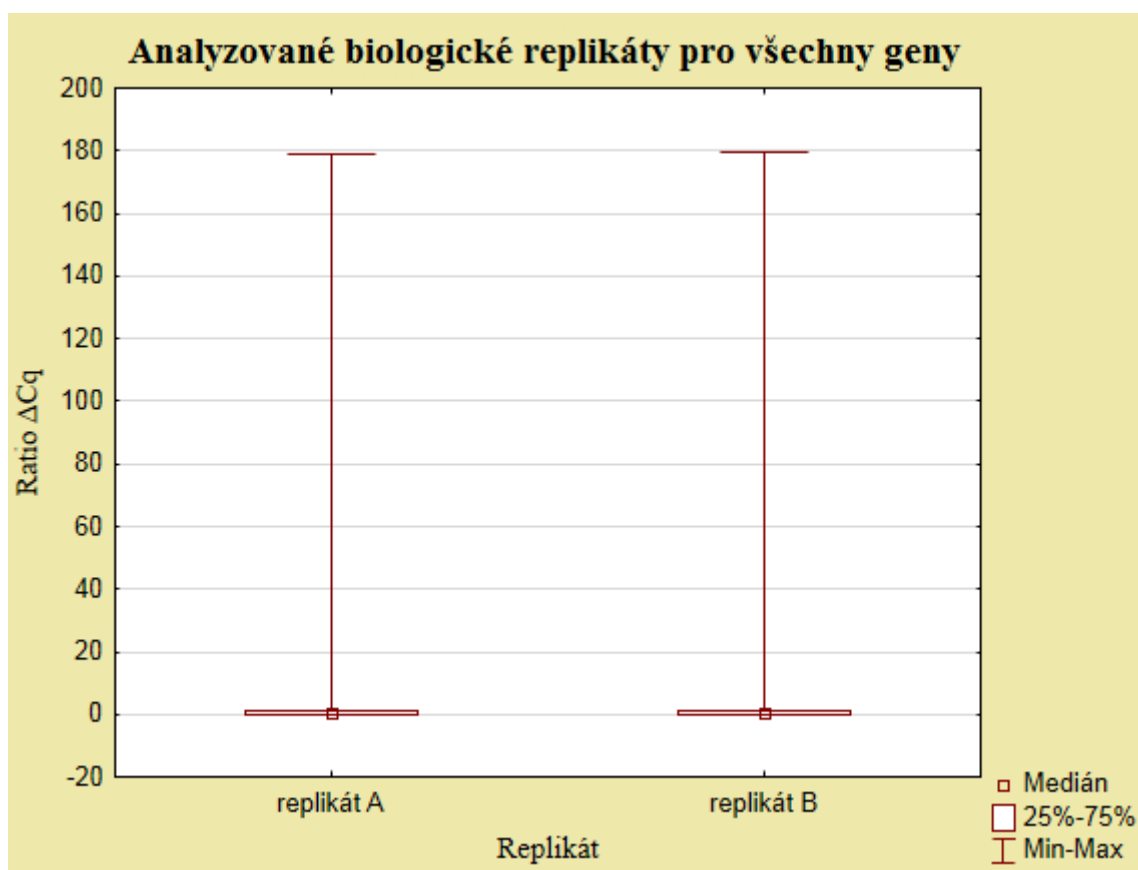
Jak již bylo uvedeno, každá varianta kombinací jednotlivých třídících faktorů byla testována ve dvou biologických replikátech – replikátu A a replikátu B. Pomocí Kruskal-Wallisovy analýzy jsme potvrdili, že na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ neexistuje statisticky významný rozdíl v míře exprese zkoumaných genů mezi biologickými replikáty. Detailní hodnota statistického rozdílu je uvedena v Tabulce 14.

Tabulka 14: Pravděpodobnost shody mediánů Ratio ΔCq mezi biologickými replikáty A a B – výsledek Kruskal-Wallisovy analýzy

replikát A	0,903
	replikát B

Rozdíl v expresi genů mezi biologickým replikátem A a biologickým replikátem B a diferenciací mediánů, rozptyl a oblast, v níž se nachází 25-75 % hodnot Ratio ΔCq , je zobrazen na Grafu 7.

Graf 7: Diferenciací mediánů a rozptyl hodnot Ratio ΔCq mezi biologickými replikáty



5.3 Statistické vyhodnocení rozdílů hodnot Ratio ΔCq pro genovou rodinu

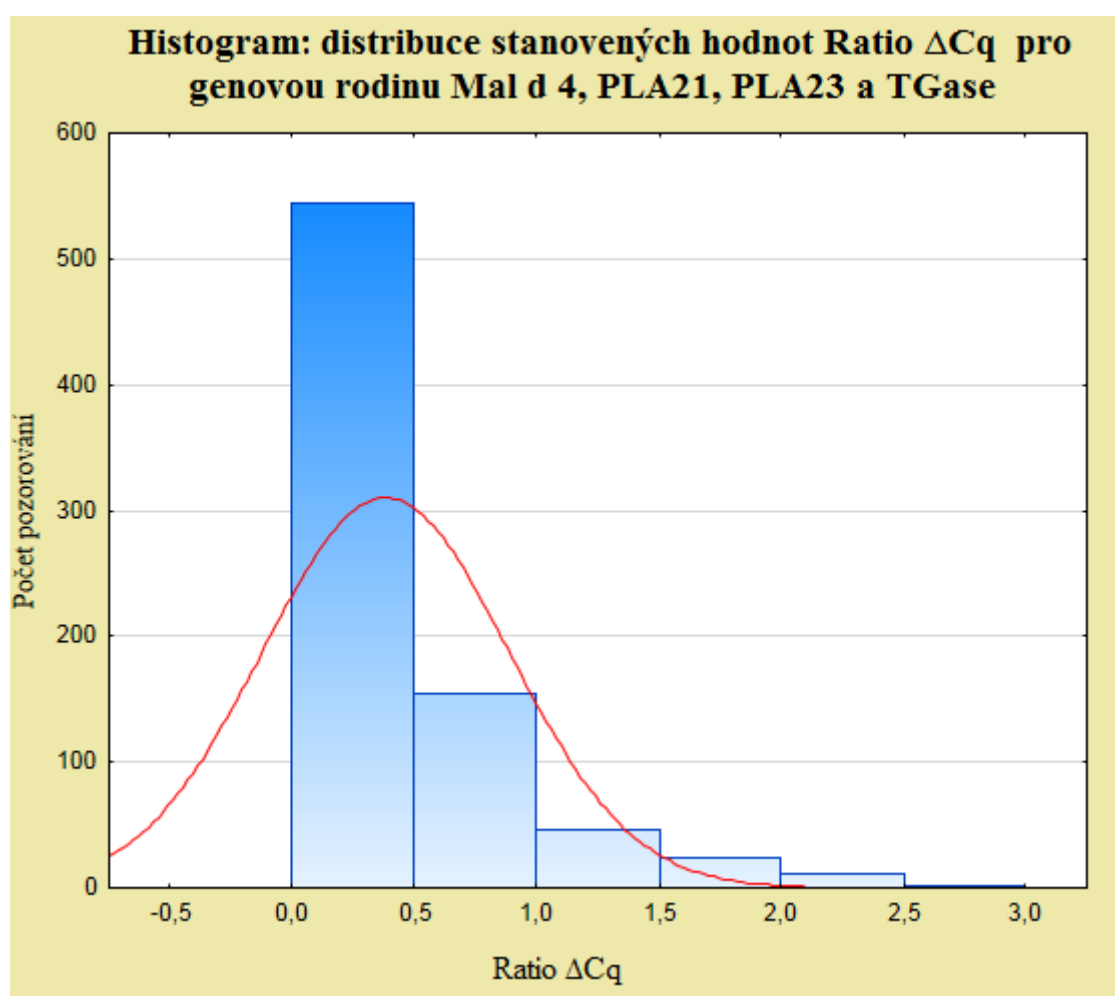
Mal d 4, PLA21, PLA23 a TGase

Jak již bylo uvedeno, důvodem, proč nejsou hodnoty Ratio ΔCq homogenní a neodpovídají Gaussovu normálnímu rozdělení, je zvýšená exprese *Mal d 1.02* oproti ostatním

zkoumaným genům. Vyloučili jsme tak všechny hodnoty získané pro izoformu *Mal d 1.02* a provedli statistická vyhodnocení rozdílů hodnot Ratio ΔCq pouze pro genovou rodinu *Mal d 4*, *PLA21*, *PLA23* a *TGase*.

Pro zvolení vhodné statistické analýzy jsme opět nejdříve provedli vyhodnocení homogenity rozptylů hodnot Ratio ΔCq pro izoformy *Mal d 4*, *PLA21*, *PLA23* a *TGase*, jak je uvedeno na Grafu 8.

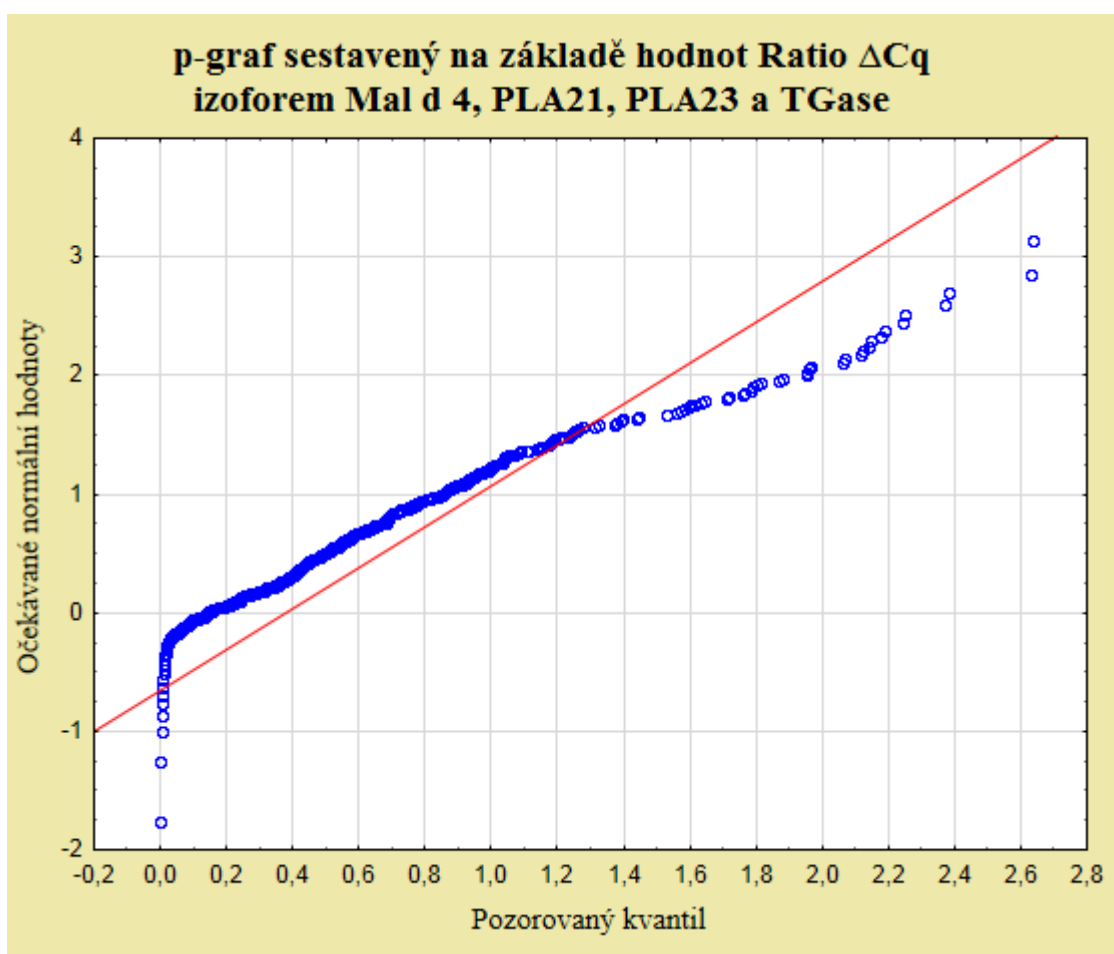
Graf 8: Histogram stanovených hodnot Ratio ΔCq pro genovou rodinu *Mal d 4*, *PLA21*, *PLA23* a *TGase* v porovnání s Gaussovou křivkou normálního rozdělení



Z Grafu 8 lze vyčíst, že nulová hypotéza na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ nebyla potvrzena. Hodnoty i přes vyloučení hodnot získaných pro izoformu *Mal d 1.02* tak nejsou homogenní a neodpovídají Gaussovu normálnímu rozdělení.

Pomocí statistického programu jsme sestavili i p-graf (Graf 9), který rovněž dokazuje, že datový soubor nemá normální rozdělení. Klasická ANOVA (analýza rozptylu) vícenásobného třídění tak nemohla být použita. Pro statistickou analýzu jsme si znovu vybrali neparametrický Kruskal-Wallisův test.

Graf 9: p-graf sestavený na základě hodnot Ratio ΔCq izoforem *Mal d 4*, *PLA21*, *PLA23* a *TGase* v porovnání s očekávaným průběhem normálního rozdělení



5.3.1 Analýza rozdílů dle roku sklizně pro izoformy *Mal d 4*, *PLA21*, *PLA23* a *TGase*

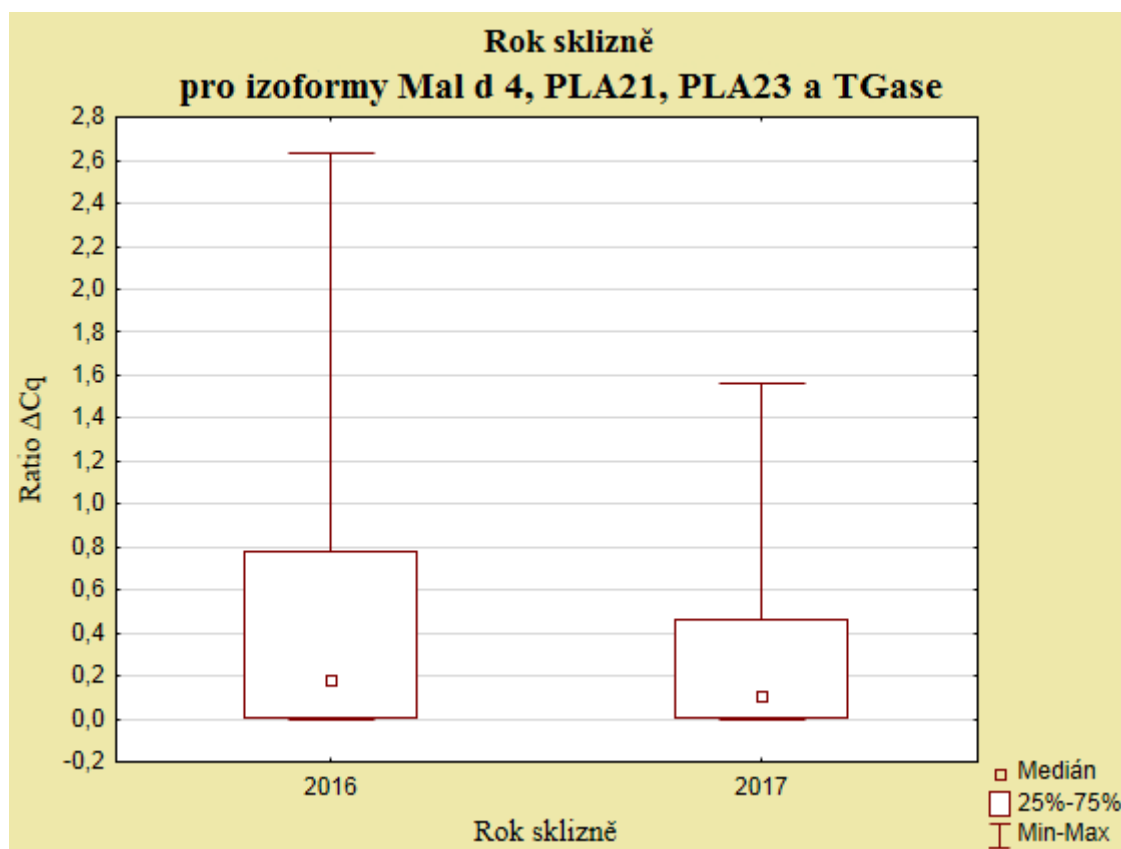
Pomocí statistického programu jsme zjistili, že na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ existuje statisticky významný rozdíl v míře exprese izoforem *Mal d 4*, *PLA21*, *PLA23* a *TGase* mezi oběma roky sklizně. Podrobnější vyhodnocení statistického rozdílu je uvedeno v Tabulce 15.

Tabulka 15: Pravděpodobnost shody hodnot mediánů Ratio ΔC_q mezi roky sklizně pro izoformy Mal d 4, PLA21, PLA23 a TGase – výsledek Kruskal-Wallisovy analýzy

2016	0,000
	2017

Na krabicovém Grafu 10 je znázorněn rozdíl mediánů, rozptyl a oblast, v níž se nachází 25-75 % hodnot Ratio ΔC_q .

Graf 10: Diferenciace mediánů a rozptyl hodnot Ratio ΔCq mezi roky sklizně pro izoformy *Mal d 4*, *PLA21*, *PLA23* a *TGase*



5.3.2 Analýza rozdílů dle typu pletiva pro izoformy *Mal d 4*, *PLA21*, *PLA23* a *TGase*

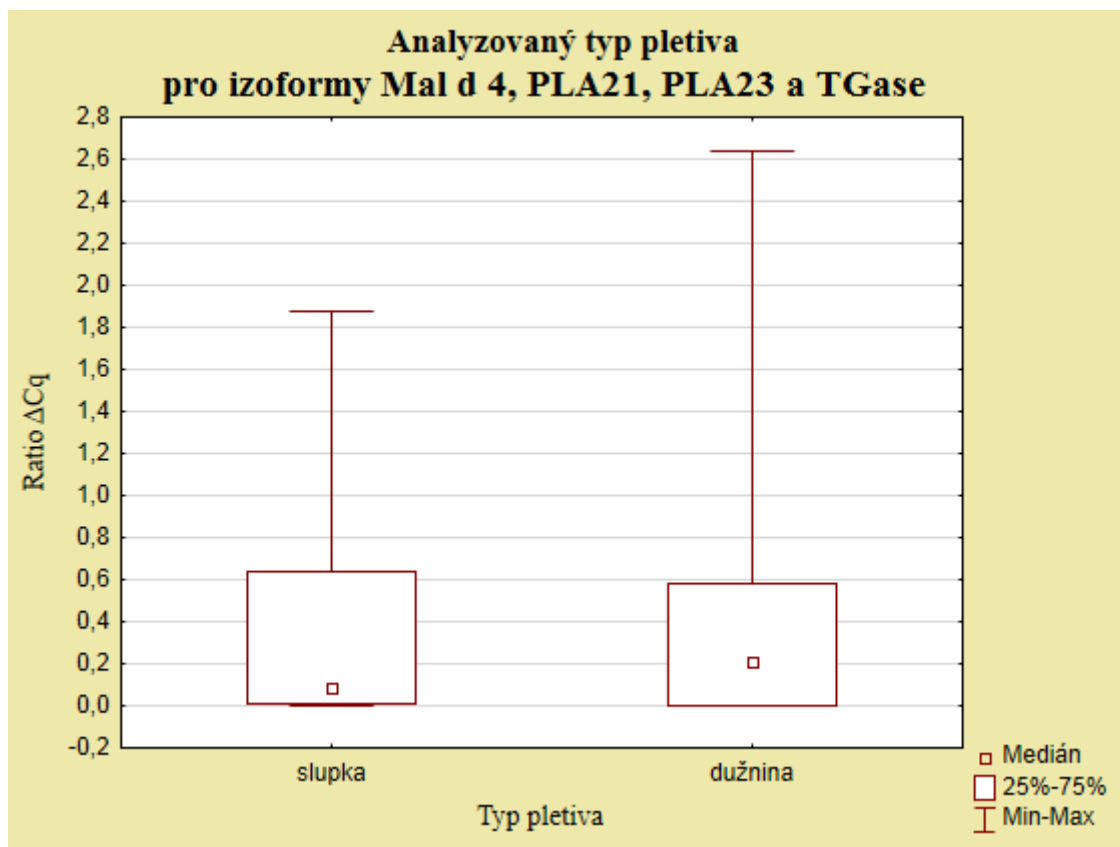
Na základě Kruskal-Wallisovy analýzy jsme zjistili, že na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ neexistuje statisticky významný rozdíl v míře exprese izoform *Mal d 4*, *PLA21*, *PLA23* a *TGase* vyjádřené hodnotami mediánů Ratio ΔCq mezi oběma typy pletiva – slupkou a dužninou. Detailní hodnota statistického rozdílu je uvedena v Tabulce 16.

Tabulka 16: Pravděpodobnost shody mediánů Ratio ΔCq mezi typy pletiva pro izoformy *Mal d 4*, *PLA21*, *PLA23* a *TGase* – výsledek Kruskal-Wallisovy analýzy

dužnina	0,948
slupka	

Na krabicovém Grafu 11 jsou vyobrazeny diference mediánů, rozptyl a oblast, v níž se nachází 25-75 % hodnot Ratio ΔCq .

Graf 11: Diference mediánů a rozptyl hodnot Ratio ΔCq mezi slupkou a dužninou pro izoformy Mal d 4, PLA21, PLA23 a TGase



5.3.3 Analýza rozdílů dle izoform Mal d 4, PLA21, PLA23 a TGase

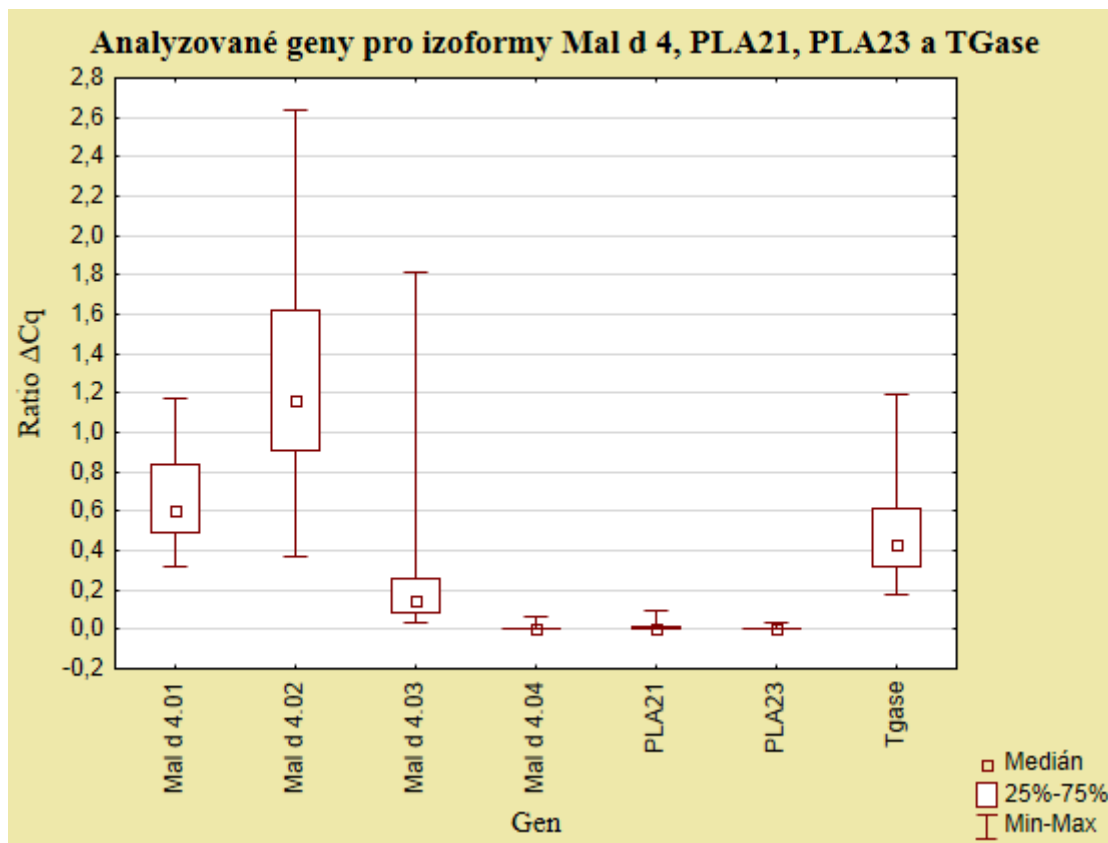
S využitím Kruskal-Wallisovy analýzy bylo zjištěno, že na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ neexistuje statisticky významný rozdíl v míře exprese vyjádřené hodnotami mediánů Ratio ΔCq jen mezi některými geny. Detailní hodnoty statistických rozdílů jsou uvedeny v Tabulce 17.

Tabulka 17: Praviděpodobnost shody mediánů Ratio ΔCq mezi izoformami *Mal d 4*, *PLA21*, *PLA23* a *TGase* – Výsledek Kruskal-Wallisovy analýzy

<i>Mal d 4.02</i>	0,006					
<i>Mal d 4.03</i>	0,000	0,000				
<i>Mal d 4.04</i>	0,000	0,000	0,000			
<i>PLA21</i>	0,000	0,000	0,000	0,000		
<i>PLA23</i>	0,000	0,000	0,000	1,000	0,149	
<i>TGase</i>	0,494	0,000	0,008	0,000	0,000	0,000
	<i>Mal d 4.01</i>	<i>Mal d 4.02</i>	<i>Mal d 4.03</i>	<i>Mal d 4.04</i>	<i>PLA21</i>	<i>PLA23</i>

Z Tabulky 17 je patrné, že statisticky nevýznamné rozdíly se vyskytují pouze mezi expresí *TGase* a izoformy *Mal d 4.01*, mezi expresí obou izoform *PLA* a mezi expresí *PLA23* a izoformy *Mal d 4.04*. Na krabicovém Grafu 12 je znázorněn rozdíl v expresi izoform *Mal d 4*, *PLA21*, *PLA23* a *TGase*.

Graf 12: Diferenciace mediánů a rozptyl hodnot Ratio ΔCq mezi testovanými geny pro izoformy *Mal d 4*, *PLA21*, *PLA23* a *TGase*



5.3.4 Analýza rozdílů dle testované odrůdy pro izoformy *Mal d 4*, *PLA21*, *PLA23* a *TGase*

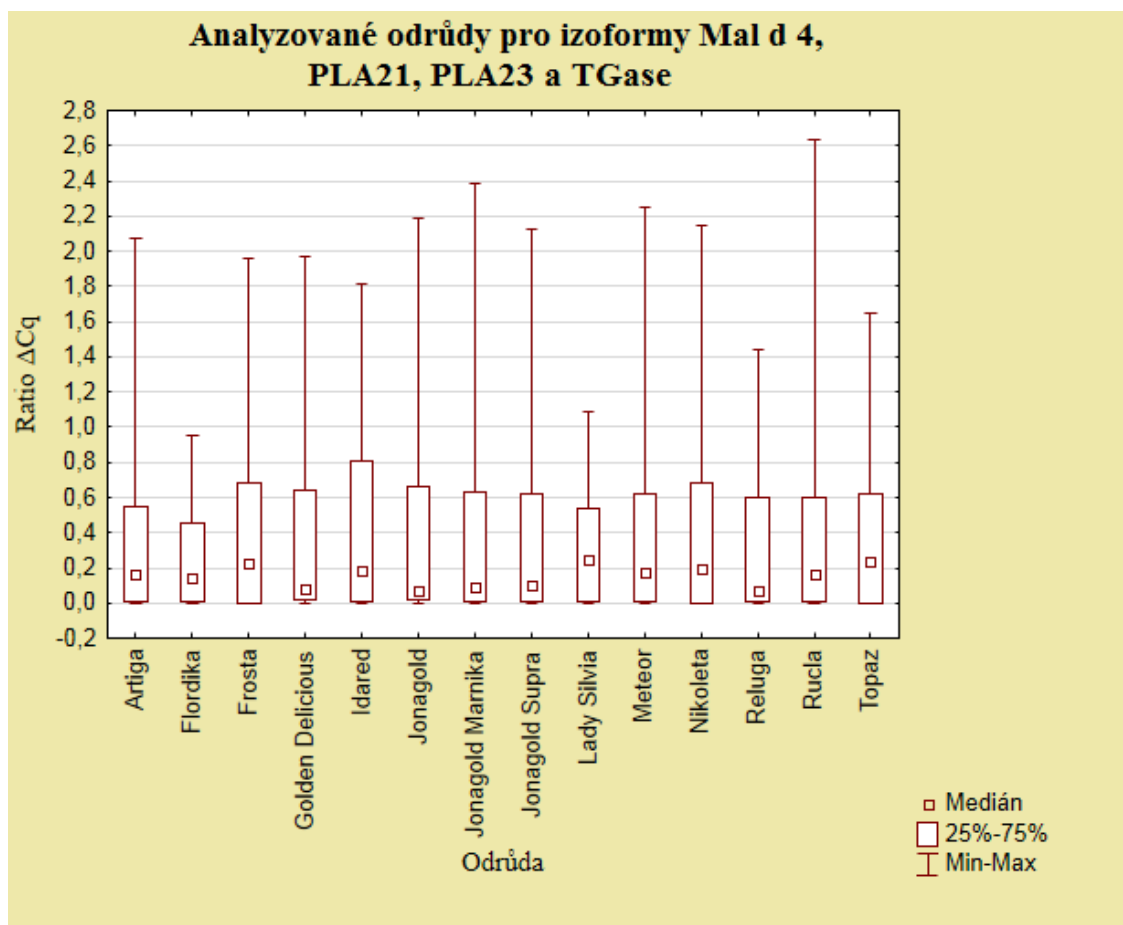
Využitím Kruskal-Wallisovy analýzy jsme dokázali, že na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ neexistuje statisticky významný rozdíl v míře exprese izoform *Mal d 4*, *PLA21*, *PLA23* a *TGase* mezi žádnými dvěma odrůdami. Detailní hodnoty statistických rozdílů jsou uvedeny v Tabulce 18.

Tabulka 18: Pravděpodobnost shody mediánů Ratio ΔCq mezi analyzovanými odrůdami pro izoformy Mal d 4, PLA21, PLA23 a TGase – výsledek Kruskal-Walisovy analýzy

'Flordika'	1,000													
'Frosta'	1,000	1,000												
'Golden Delicious'	1,000	1,000	1,000											
'Idared'	1,000	1,000	1,000	1,000										
'Jonagold'	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000									
'Jonagold Marnika'	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000								
'Jonagold Supra'	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000							
'Lady Silvia'	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000						
'Meteor'	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000					
'Nikoleta'	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000				
'Reluga'	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000			
'Rucla'	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000		
'Topaz'	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
		'Artiga'	'Flordika'	'Frosta'	'Golden Delicious'	'Idared'	'Jonagold'	'Jonagold'	'Jonagold Supra'	'Lady Silvia'	'Meteor'	'Nikoleta'	'Reluga'	'Rucla'

Na krabicovém Grafu 13 je znázorněn rozdíl v expresi izoformem Mal d 4, PLA21, PLA23 a TGase napříč testovanými odrůdami pomocí rozdílů mediánů.

Graf 13: Diferenciace mediánů a rozptyl hodnot Ratio ΔCq mezi testovanými odrůdami pro izoformy *Mal d 4*, *PLA21*, *PLA23* a *TGase*



5.3.5 Analýza rozdílů mezi biologickými replikáty pro izoformy *Mal d 4*, *PLA21*, *PLA23* a *TGase*

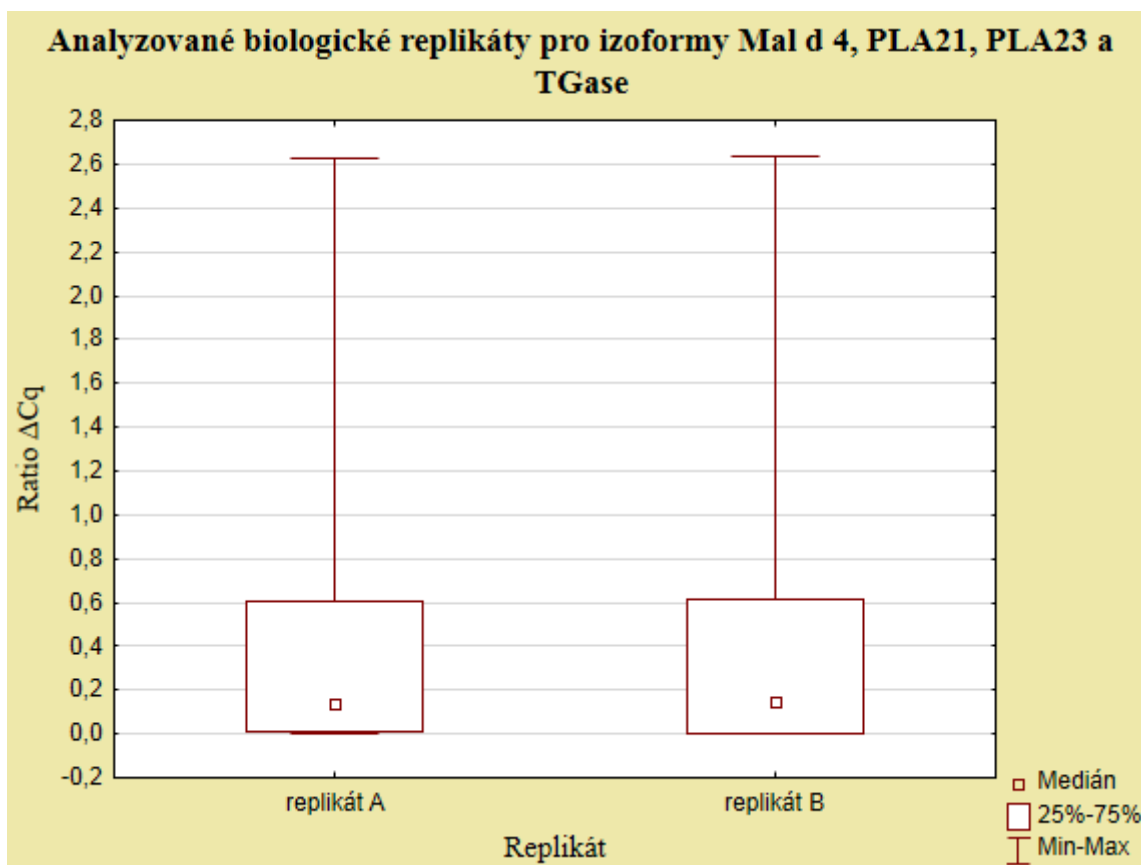
Kruskal-Wallisova analýza potvrdila, že na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ neexistuje statisticky významný rozdíl v míře exprese izoform *Mal d 4*, *PLA21*, *PLA23* a *TGase* mezi biologickými replikáty. Detailní hodnota statistického rozdílu je uvedena v Tabulce 19.

Tabulka 19: Pravděpodobnost shody mediánů Ratio ΔCq mezi biologickými replikáty A a B pro izoformy *Mal d 4*, *PLA21*, *PLA23* a *TGase*

replikát A	0,883
	replikát B

Rozdíl v expresi izoform *Mal d 4*, *PLA21*, *PLA23* a *TGase* mezi biologickým replikátem A a biologickým replikátem B je zobrazen na Grafu 14.

Graf 14: Diferenciace mediánů a rozptyl hodnot ΔCq mezi biologickými replikáty pro izoformy *Mal d 4*, *PLA21*, *PLA23* a *TGase*

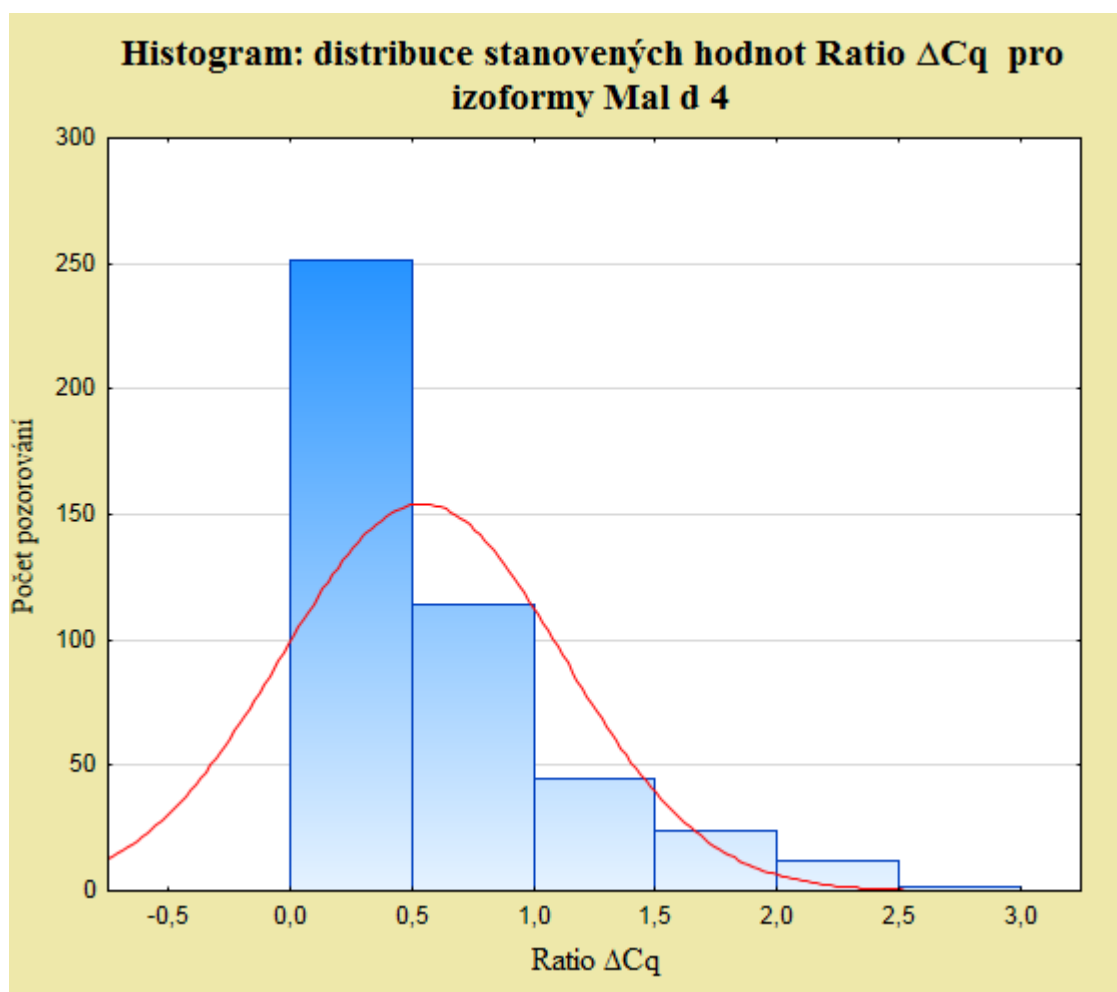


5.4 Statistické vyhodnocení rozdílů hodnot Ratio ΔCq pro izoformy *Mal d 4*

Provedli jsme statistická vyhodnocení rozdílů hodnot Ratio ΔCq pouze pro genovou rodinu *Mal d 4*. Abychom zvolili vhodnou statistickou analýzu, provedli jsme nejdříve

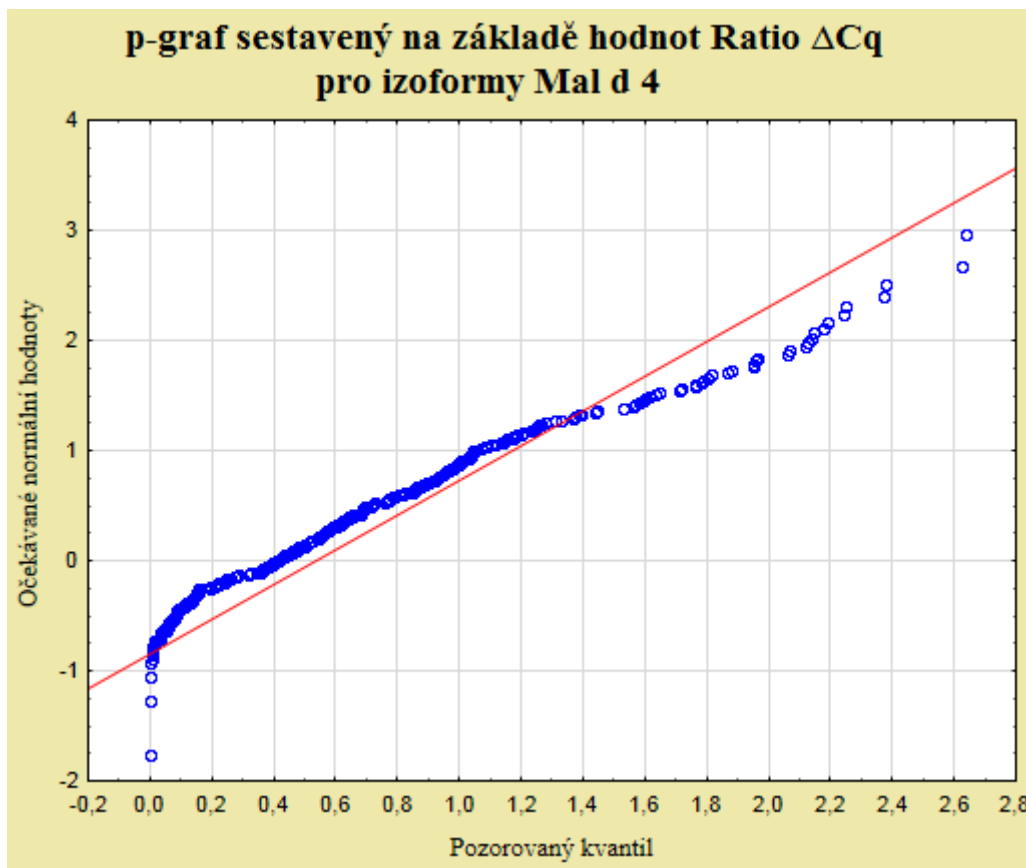
vyhodnocení homogenity rozptylů hodnot Ratio ΔCq pro genovou rodinu *Mal d 4*. Nulová hypotéza na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ nebyla potvrzena. To znamená, že hodnoty pro genovou rodinu *Mal d 4* nejsou homogenní a neodpovídají normálnímu rozdělení, jak je patrné z Grafu 15 a Grafu 16. Pravděpodobně je to způsobeno nižší expresí izoformy *Mal d 4.04* oproti ostatním testovaným izoformám téhož alergenu.

Graf 15: Histogram stanovených hodnot Ratio ΔCq pro izoformy *Mal d 4* v porovnání s Gaussovou křivkou normálního rozdělení



Z Grafu 15 i z Grafu 16 je zřejmé, že získaný datový soubor nemá normální rozdělení. Pro statistické hodnocení tak nelze použít analýzu rozptylu vícenásobného třídění. Efekty jednotlivých třídících faktorů pro izoformy *Mal d 4* jsme hodnotili na základě Kruskal-Wallisova testu.

Graf 16: p-graf sestavený na základě hodnot Ratio ΔCq pro izoformy *Mal d 4* v porovnání s očekávaným průběhem normálního rozdělení



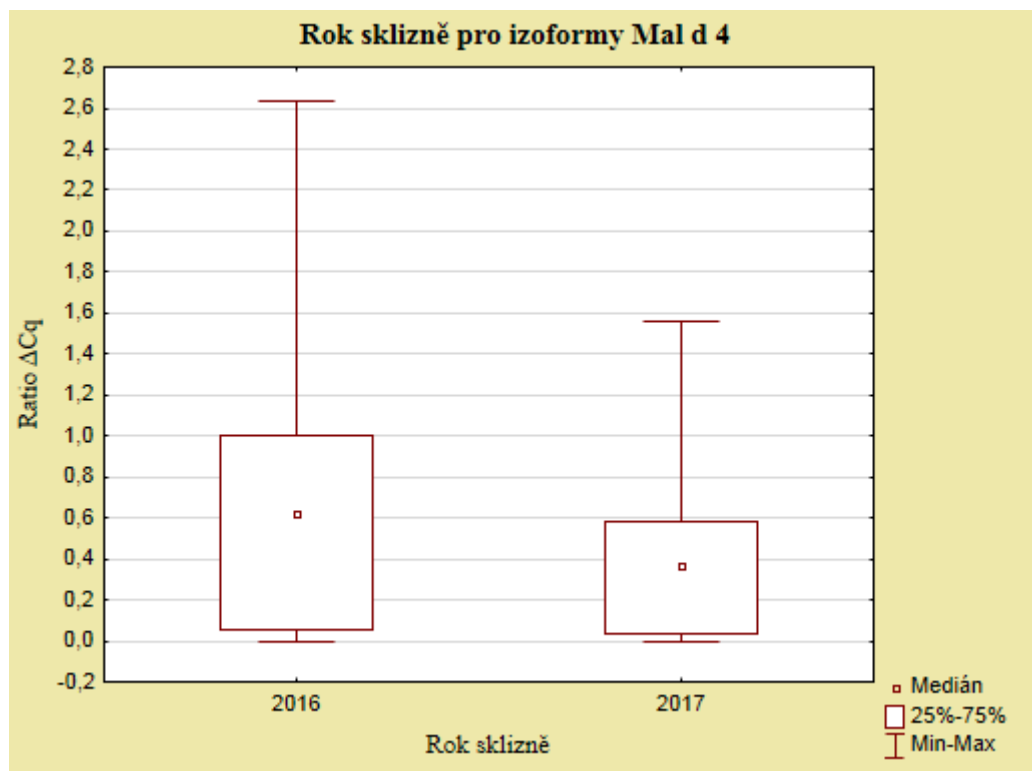
5.4.1 Analýza rozdílů dle roku sklizně pro izoformy *Mal d 4*

Na základě Kruskal-Wallisovy analýzy jsme zjistili, že na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ existuje statisticky významný rozdíl v míře exprese izoformem *Mal d 4* vyjádřené hodnotami mediánů Ratio ΔCq mezi oběma roky sklizně. Detailní hodnota statistické difference je uvedena v Tabulce 20. Na krabicovém Grafu 17 je znázorněn rozdíl v expresi izoformem *Mal d 4* mezi roky sklizně.

Tabulka 20: Pravděpodobnost shody hodnot mediánů Ratio ΔCq mezi roky sklizně pro izoformy *Mal d 4* – výsledek Kruskal-Wallisovy analýzy

2016	0,000
	2017

Graf 17: Diferenciace mediánů a rozptyl hodnot $\text{Ratio } \Delta Cq$ mezi roky sklizně pro izoformy *Mal d 4*



5.4.2. Analýza rozdílů dle typu pletiva pro izoformy *Mal d 4*

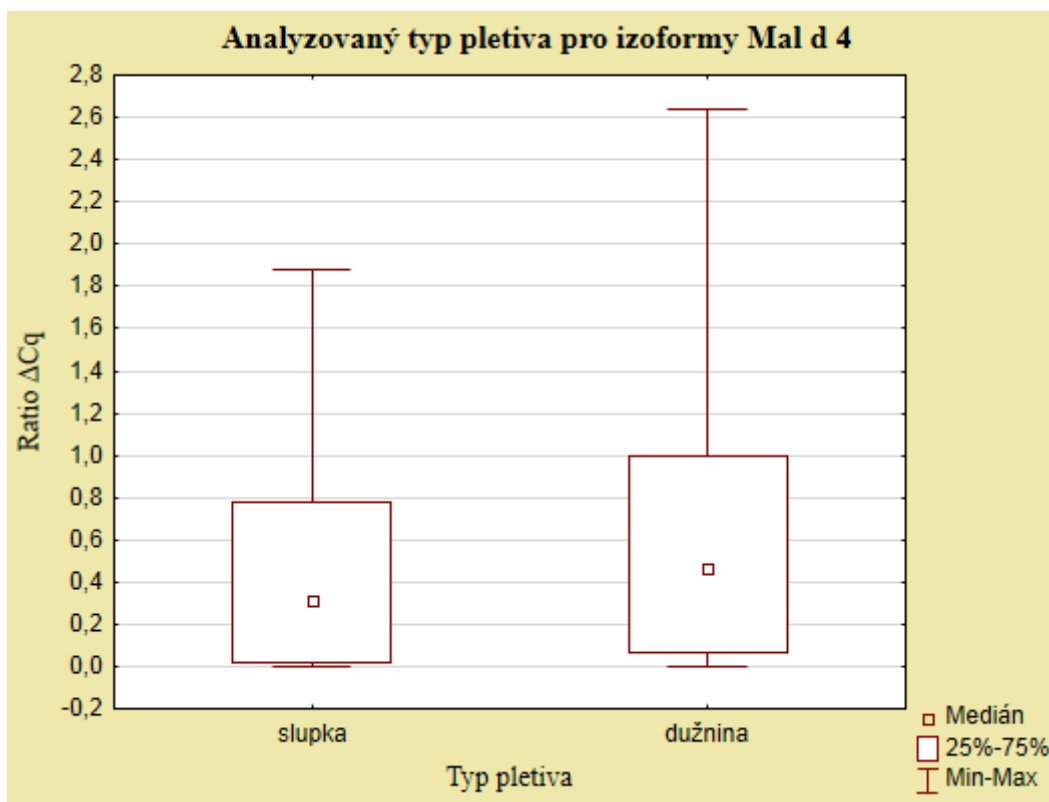
Na základě Kruskal-Wallisovy analýzy jsme zjistili, že na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ existuje statisticky významný rozdíl v míře exprese izoformem *Mal d 4* mezi oběma typy pletiva. Detailní hodnota statistického rozdílu je uvedena v Tabulce 21.

Tabulka 21: Pravděpodobnost shody mediánů $\text{Ratio } \Delta Cq$ mezi typy pletiva pro izoformy *Mal d 4* – výsledek Kruskal-Wallisovy analýzy

dužnina	0,003
	slupka

Pro lepší představu je na Grafu 18 znázorněn rozdíl v expresi izoforem *Mal d 4* mezi dužninou a slupkou. Je zde zobrazena diference mediánů, rozptyl a oblast, v níž se nachází 25-75 % hodnot Ratio ΔCq . Z Grafu 18 je patrné, že exprese izoforem *Mal d 4* je větší v dužnině nežli ve slupce.

Graf 18: Diference mediánů a rozptyl hodnot Ratio ΔCq mezi slupkou a dužninou pro izoformy *Mal d 4*



5.4.3 Analýza rozdílů dle testované izoformy *Mal d 4*

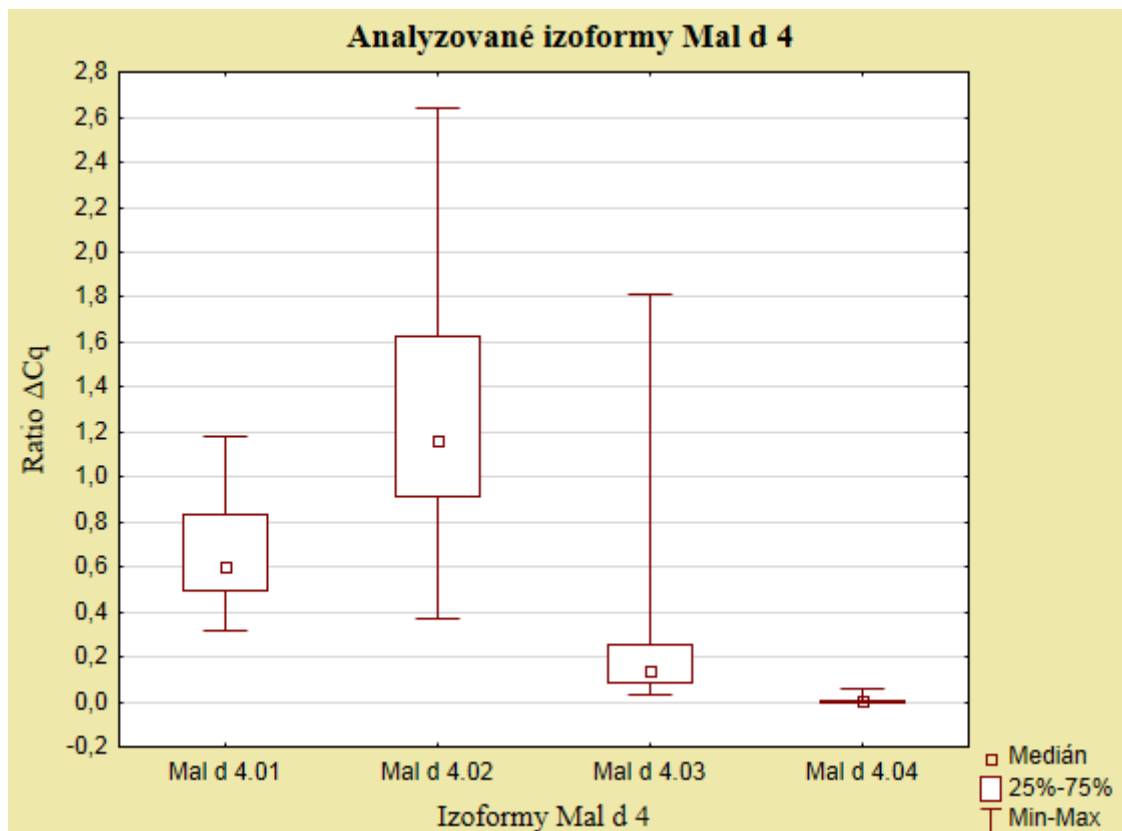
S využitím Kruskal-Wallisovy analýzy bylo zjištěno, že na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ existuje statisticky významný rozdíl v míře exprese mezi všemi izoformami *Mal d 4*. Detailní hodnoty statistických rozdílů jsou uvedeny v Tabulce 22.

Tabulka 22: Pravděpodobnost shody mediánů Ratio ΔCq mezi analyzovanými izoformami
Mal d 4 – výsledek Kruskal-Wallisovy analýzy

<i>Mal d 4.02</i>	0,000		
<i>Mal d 4.03</i>	0,000	0,000	
<i>Mal d 4.04</i>	0,000	0,000	0,000
	<i>Mal d 4.01</i>	<i>Mal d 4.02</i>	<i>Mal d 4.03</i>

Na krabicovém Grafu 19 je znázorněn rozdíl v expresi jednotlivých izoform *Mal d 4* – diferenciaci mediánů, rozptyl a oblast, v níž se nachází 25-75 % hodnot Ratio ΔCq . Je patrné, že exprese všech izoform *Mal d 4* se vzájemně liší. Izoforma *Mal d 4.02* se exprimuje nejvíce, zatímco izoforma *Mal d 4.04* se exprimuje nejméně.

Graf 19: Diferenciace mediánů a rozptyl hodnot Ratio ΔCq mezi testovanými izoformami *Mal d 4*



5.4.4 Analýza rozdílů dle testované odrůdy pro izoformy *Mal d 4*

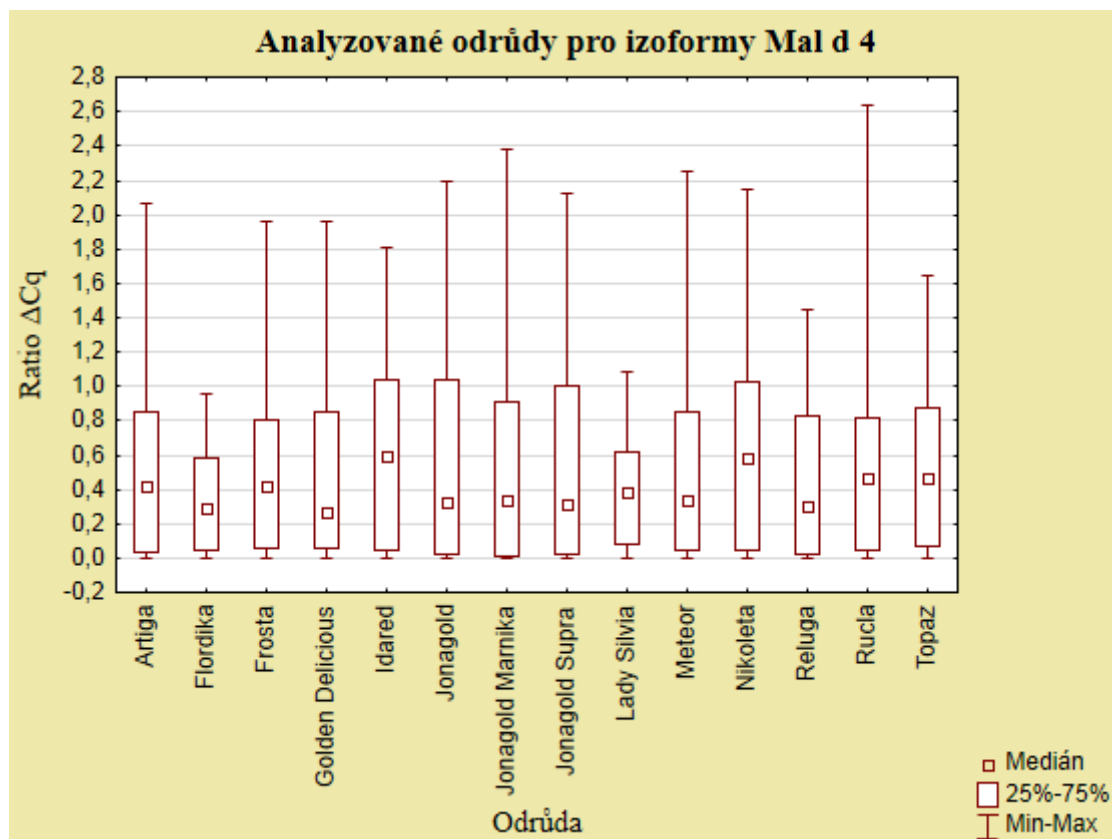
Na základě Kruskal-Wallisovy analýzy jsme zjistili, že na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ neexistuje statisticky významný rozdíl v míře exprese izoformem *Mal d 4* mezi žádnými dvěma odrůdami. Detailní hodnoty statistických rozdílů jsou uvedeny v Tabulce 23.

Tabulka 23: Pravděpodobnost shody mediánů Ratio ΔCq mezi analyzovanými odrůdami pro izoformy *Mal d 4* – výsledek Kruskal-Wallisovy analýzy

'Flordika'	1,000													
'Frosta'	1,000	1,000												
'Golden Delicious'	1,000	1,000	1,000											
'Idared'	1,000	1,000	1,000	1,000										
'Jonagold'	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000									
'Jonagold Marnika'	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000								
'Jonagold Supra'	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000							
'Lady Silvia'	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000						
'Meteor'	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000					
'Nikoleta'	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000				
'Reluga'	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000			
'Rucla'	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000		
'Topaz'	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
		'Artiga'												
		'Flordika'												
		'Frosta'												
		'Golden Delicious'												
		'Idared'												
		'Jonagold'												
		'Jonagold'												
		'Jonagold Supra'												
		'Lady Silvia'												
		'Meteor'												
		'Nikoleta'												
		'Reluga'												
		'Rucla'												

Pro lepší představu je na krabicovém Grafu 20 znázorněn rozdíl v expresi izoformem *Mal d 4* napříč testovanými odrůdami včetně diferenciací mediánů, rozptylu a oblasti, v níž se nachází 25-75 % hodnot Ratio ΔCq . Z Grafu 20 je také patrná nižší exprese izoformem *Mal d 4* dvou odrůd - 'Flordika' a 'Lady Silvia'.

Graf 20: Diferenciace mediánů a rozptyl hodnot Ratio ΔCq mezi testovanými odrůdami pro izoformy *Mal d 4*



5.4.5 Analýza rozdílů mezi biologickými replikáty pro izoformy *Mal d 4*

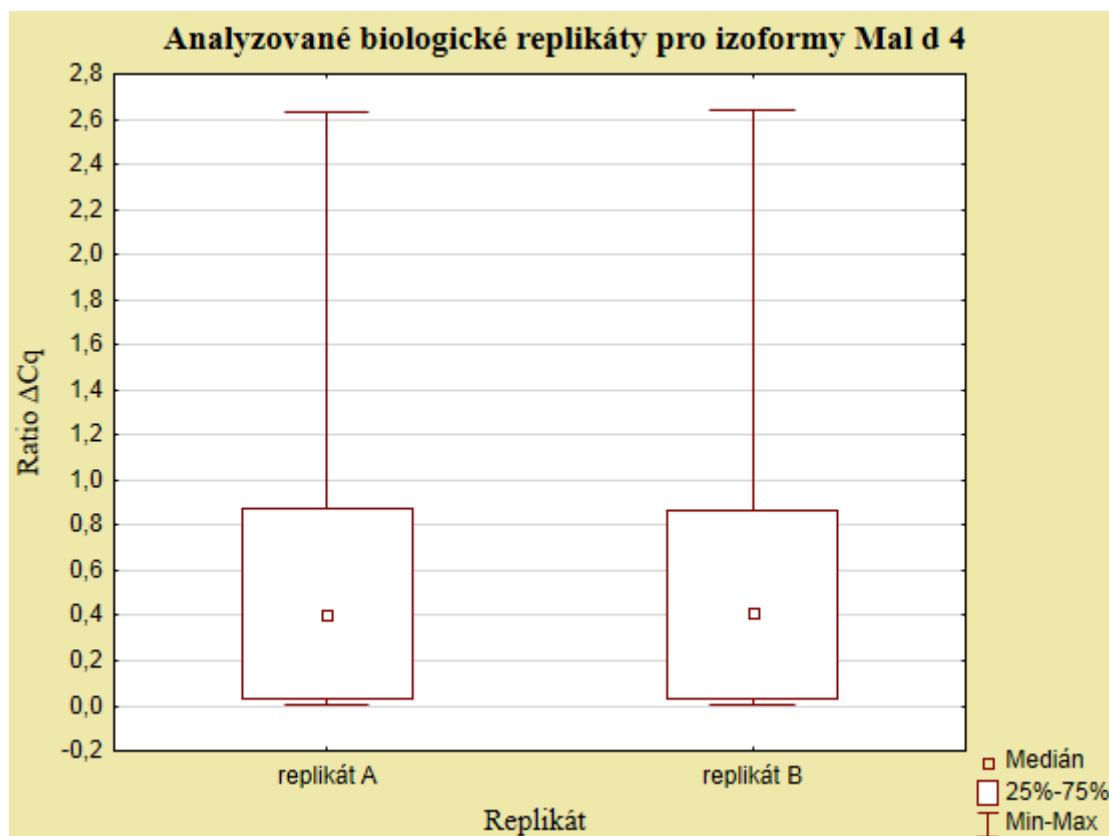
Pomocí Kruskal-Wallisovy analýzy jsme potvrdili, že na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ neexistuje statisticky významný rozdíl v míře exprese izoformem *Mal d 4* mezi oběma replikáty. Detailní hodnota statistického rozdílu je uvedena v Tabulce 24.

Tabulka 24: Pravděpodobnost shody mediánů Ratio ΔCq mezi biologickými replikáty A a B pro izoformy *Mal d 4* – výsledek Kruskal-Wallisovy analýzy

replikát A	0,893
replikát B	

Rozdíl v expresi izoforem *Mal d 4* mezi biologickým replikátem A a biologickým replikátem B – diferenciace mediánů, rozptyl a oblast, v níž se nachází 25-75 % hodnot Ratio ΔCq , je zobrazen na Grafu 21.

Graf 21: Diferenciace mediánů a rozptyl hodnot Ratio ΔCq mezi biologickými replikáty pro izoformy *Mal d 4*



5.5 Statistické vyhodnocení rozdílů hodnot Ratio ΔCq pro izoformy *Mal d*

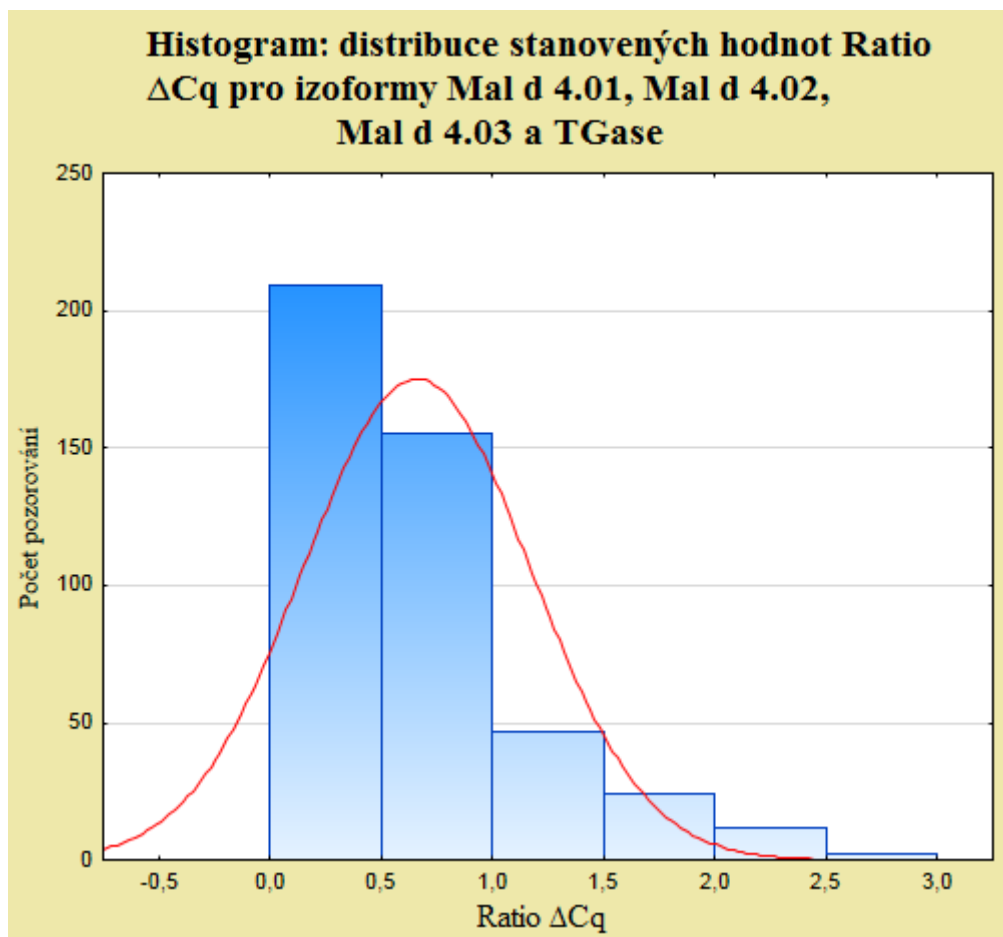
4.01, *Mal d 4.02*, *Mal d 4.03* a *TGase*

Z Grafu 12 je pozorovatelná nižší exprese izoformy *Mal d 4.04* a izoforem *PLA21* a *PLA22*. Z toho důvodu jsme provedli statistická vyhodnocení rozdílů hodnot Ratio ΔCq pouze pro izoformy *Mal d 4.01*, *Mal d 4.02*, *Mal d 4.03* a *TGase*, které se ve srovnání s výše uvedenými izoformami exprimovaly silněji.

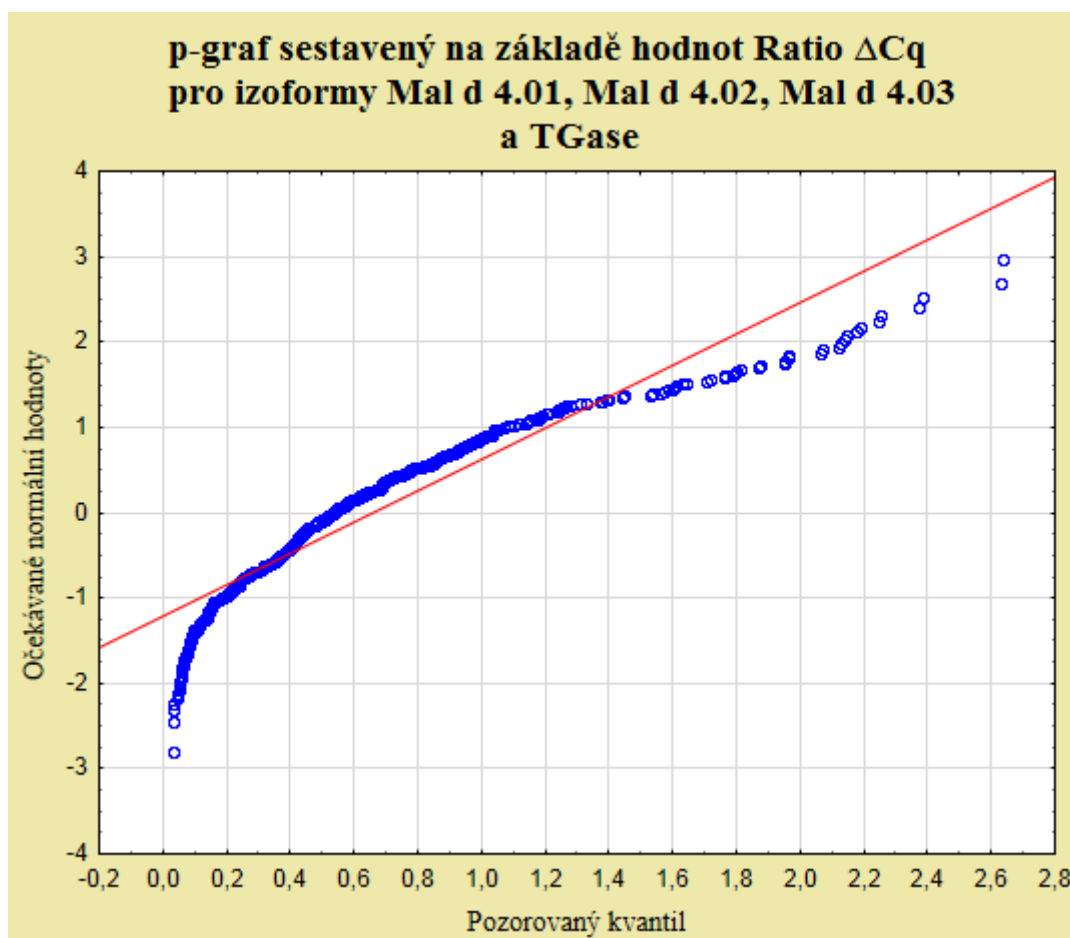
Abychom zvolili vhodnou statistickou analýzu, nejdříve jsme provedli vyhodnocení homogenity rozptylů hodnot Ratio ΔCq všech variant kombinací jednotlivých třídících faktorů pro vybrané izoformy *Mal d 4* a *TGase*. Nulová hypotéza na hladině významnosti $\alpha =$

0,05 nebyla potvrzena. Hodnoty tak nejsou homogenní a neodpovídají Gaussovu normálnímu rozdělení, což je patrné z Grafu 22 a Grafu 23.

Graf 22: Histogram stanovených hodnot Ratio ΔCq pro izoformy Mal d 4.01, Mal d 4.02, Mal d 4.03 a TGase v porovnání s Gaussovou křivkou normálního rozdělení



Graf 23: p-graf sestavený na základě hodnot ΔCq pro izoformy *Mal d 4.01*, *Mal d 4.02*, *Mal d 4.03* a *TGase* v porovnání s očekávaným průběhem normálního rozdělení



Ačkoliv se získaný datový soubor více přibližuje normálnímu rozdělení, stále pro něj nelze použít analýzu rozptylu vícenásobného třídění. Efekty jednotlivých třídících faktorů jsme tak hodnotili na základě neparametrického Kruskal-Wallisova testu, kterému jsou věnovány následující podkapitoly.

5.5.1 Analýza rozdílů dle roku sklizně pro izoformy *Mal d 4.01*, *Mal d 4.02*, *Mal d 4.03* a *TGase*

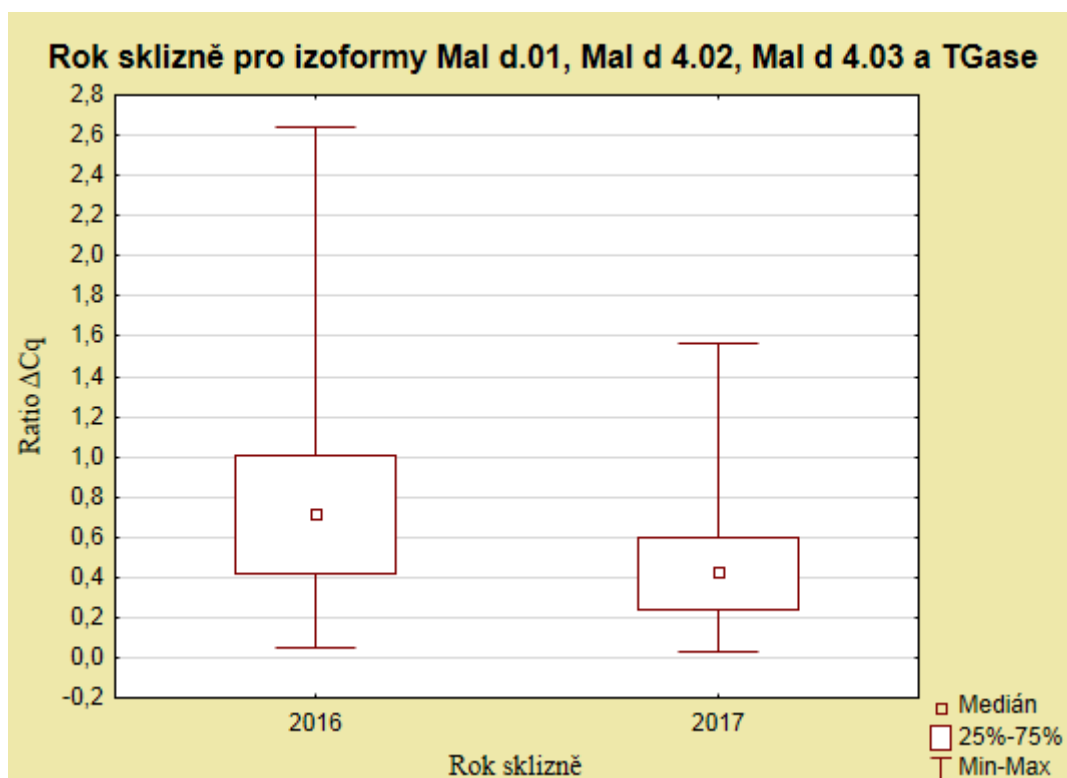
Bylo zjištěno, že na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ existuje statisticky významný rozdíl v míře exprese izoformem *Mal d 4.01*, *Mal d 4.02*, *Mal d 4.03* a *TGase* vyjádřené hodnotami mediánů ΔCq mezi oběma roky sklizně. Detailní hodnota statistické difference je uvedena v Tabulce 25.

Tabulka 25: Praviděpodobnost shody hodnot mediánů Ratio ΔCq mezi roky sklizně pro izoformy Mal d 4.01, Mal d 4.02, Mal d 4.03 a TGase – výsledek Kruskal-Wallisovy analýzy

2016	0,000
	2017

Na krabicovém Grafu 24 je znázorněn rozdíl v expresi izoformem Mal d 4.01, Mal d 4.02, Mal d 4.03 a TGase mezi roky sklizně pomocí diferenciacce mediánů, rozptylu a oblasti, v níž se nachází 25-75 % hodnot Ratio ΔCq .

Graf 24: Diferenciacce mediánů a rozptyl hodnot Ratio ΔCq mezi roky sklizně pro izoformy Mal d 4.01, Mal d 4.02, Mal d 4.03 a TGase



5.5.2 Analýza rozdílů dle typu pletiva pro izoformy *Mal d 4.01*, *Mal d 4.02*, *Mal d 4.03* a *TGase*

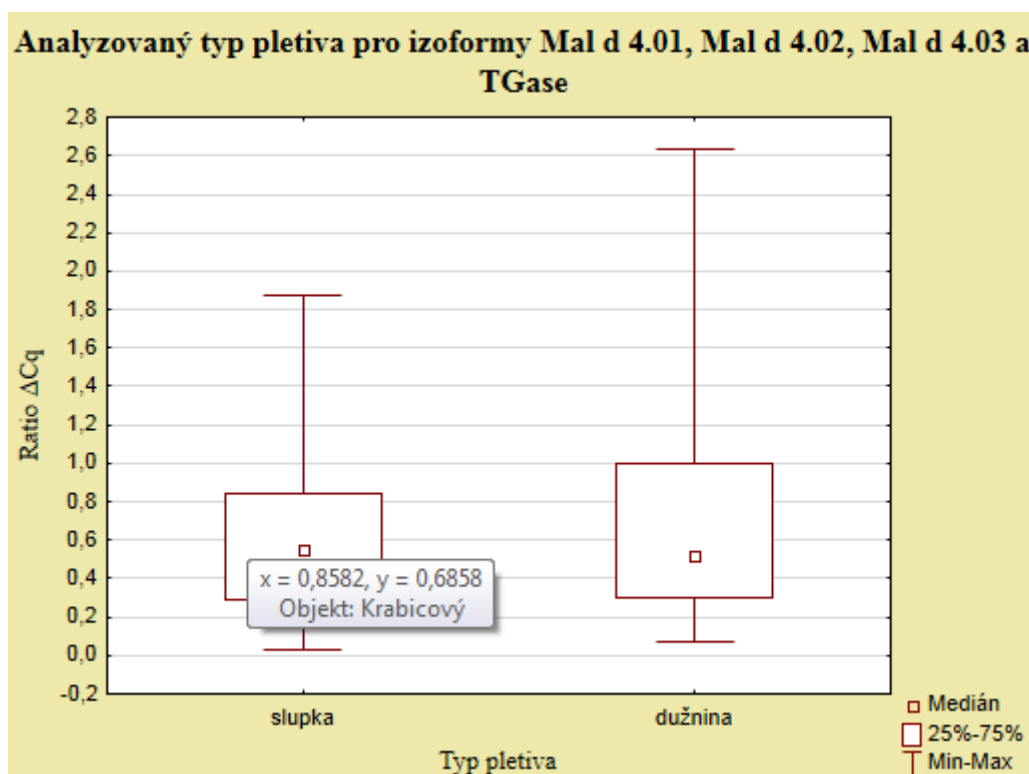
Na základě Kruskal-Wallisovy analýzy jsme zjistili, že na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ neexistuje statisticky významný rozdíl v míře exprese izoform *Mal d 4.01*, *Mal d 4.02*, *Mal d 4.03* a *TGase* mezi oběma typy pletiva. Detailní hodnota statistického rozdílu je uvedena v Tabulce 26.

Tabulka 26: Pravděpodobnost shody mediánů Ratio ΔCq mezi typy pletiva pro izoformy *Mal d 4.01*, *Mal d 4.02*, *Mal d 4.03* a *TGase* – výsledek Kruskal-Wallisovy analýzy

dužnina	0,283
	slupka

Pro lepší představu je na Grafu 25 znázorněn rozdíl v expresi izoform *Mal d 4.01*, *Mal d 4.02*, *Mal d 4.03* a *TGase* mezi dužninou a slupkou.

Graf 25: Diferenciace mediánů a rozptyl hodnot Ratio ΔCq mezi slupkou a dužninou ro izoformy Mal d 4.01, Mal d 4.02, Mal d 4.03 a TGase



5.5.3 Analýza rozdílů dle izoform Mal d 4.01, Mal d 4.02, Mal d 4.03 a TGase

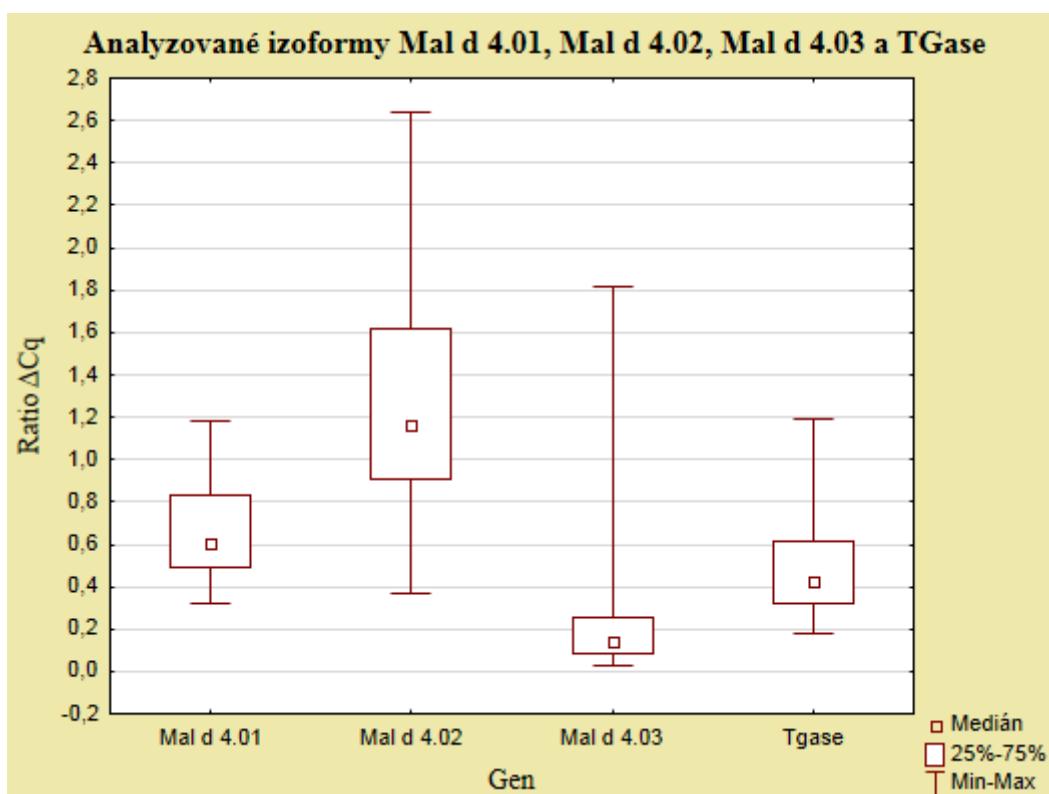
S využitím Kruskal-Wallisovy analýzy bylo zjištěno, že na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ existuje statisticky významný rozdíl v míře exprese mezi všemi vybranými izoformami Mal d 4 a TGase. Detailní hodnoty statistických rozdílů jsou uvedeny v Tabulce 27.

Tabulka 27: Pravděpodobnost shody mediánů Ratio ΔCq mezi izoformami Mal d 4.01, Mal d 4.02, Mal d 4.03 a TGase – výsledek Kruskal-Wallisovy analýzy

Mal d 4.02	0,000		
Mal d 4.03	0,000	0,000	
TGase	0,000	0,000	0,000
	Mal d 4.01	Mal d 4.02	Mal d 4.03

Na krabicovém Grafu 26 je znázorněn rozdíl v expresi vybraných izoform *Mal d 4* a *TGase* pomocí diference mediánů, rozptylu a oblasti, v níž se nachází 25-75 % hodnot $\text{Ratio } \Delta Cq$.

Graf 26: Diference mediánů a rozptyl hodnot $\text{Ratio } \Delta Cq$ mezi izoformami *Mal d 4.01*, *Mal d 4.02*, *Mal d 4.03* a *TGase*



5.5.4 Analýza rozdílů dle testované odrůdy pro izoformy *Mal d 4.01*, *Mal d 4.02*, *Mal d 4.03* a *TGase*

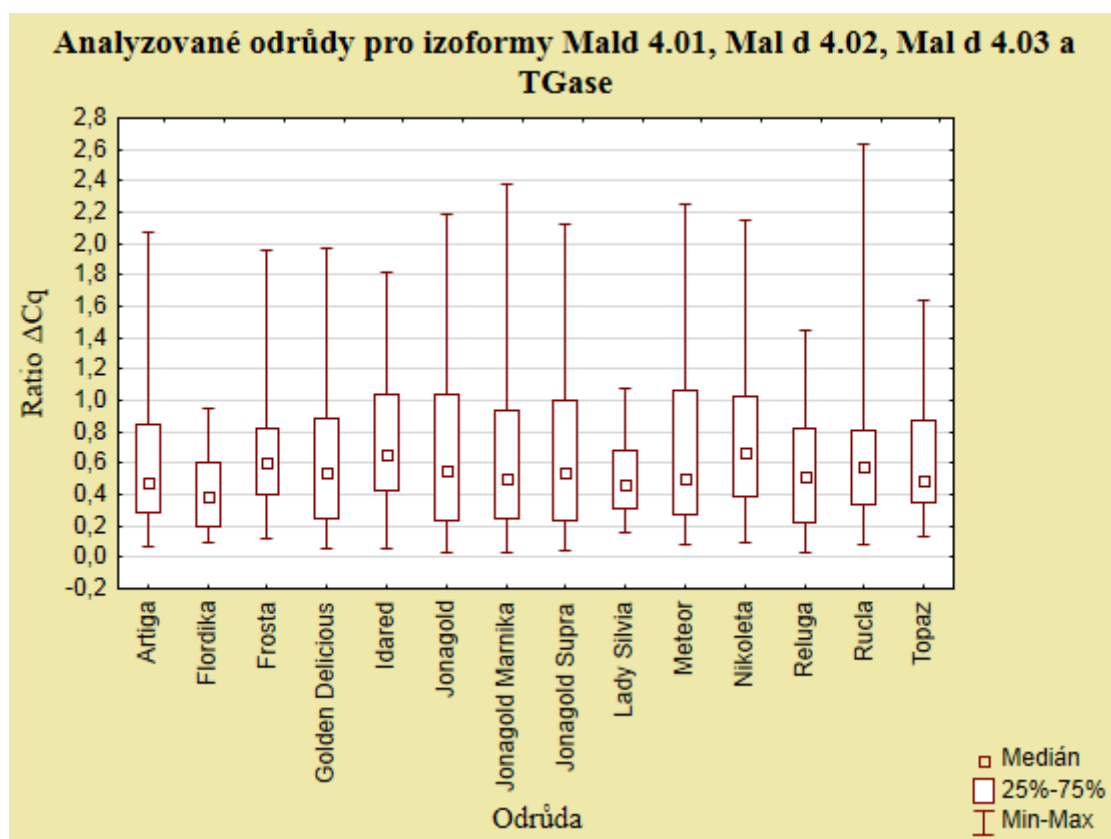
Na základě Kruskal-Wallisovy analýzy jsme zjistili, že na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ neexistuje statisticky významný rozdíl v míře exprese vybraných izoform *Mal d 4* a *TGase* mezi žádnými dvěma odrůdami. Detailní hodnoty statistických rozdílů jsou uvedeny v Tabulce 28.

Tabulka 28: Pravděpodobnost shody mediánů Ratio ΔCq mezi analyzovanými odrůdami pro izoformy Mal d 4.01, Mal d 4.02, Mal d 4.03 a TGase – výsledek Kruskal-Wallisovy analýzy

'Flordika'	1,000													
'Frosta'	1,000	1,000												
'Golden Delicious'	1,000	1,000	1,000											
'Idared'	1,000	0,507	1,000	1,000										
'Jonagold'	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000									
'Jonagold Marnika'	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000								
'Jonagold Supra'	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000							
'Lady Silvia'	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000						
'Meteor'	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000					
'Nikoleta'	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000				
'Reluga'	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000			
'Rucla'	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000		
'Topaz'	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
		'Artiga'	'Flordika'	'Frosta'	'Golden Delicious'	'Idared'	'Jonagold'	'Jonagold'	'Jonagold Supra'	'Lady Silvia'	'Meteor'	'Nikoleta'	'Reluga'	'Rucla'

Pro lepší představu je na krabicovém Grafu 27 znázorněn rozdíl v expresi vybraných izoformem Mal d 4 a TGase napříč testovanými odrůdami včetně diferenciacce mediánů, rozptylu a oblasti, v níž se nachází 25-75 % hodnot Ratio ΔCq .

Graf 27: Diferenciace mediánů a rozptyl hodnot Ratio ΔCq mezi testovanými odrůdami ro izoformy *Mal d 4.01*, *Mal d 4.02*, *Mal d 4.03* a *TGase*



5.5.5. Analýza rozdílů mezi biologickými replikáty pro izoformy *Mal d 4.01*, *Mal d 4.02*, *Mal d 4.03* a *TGase*

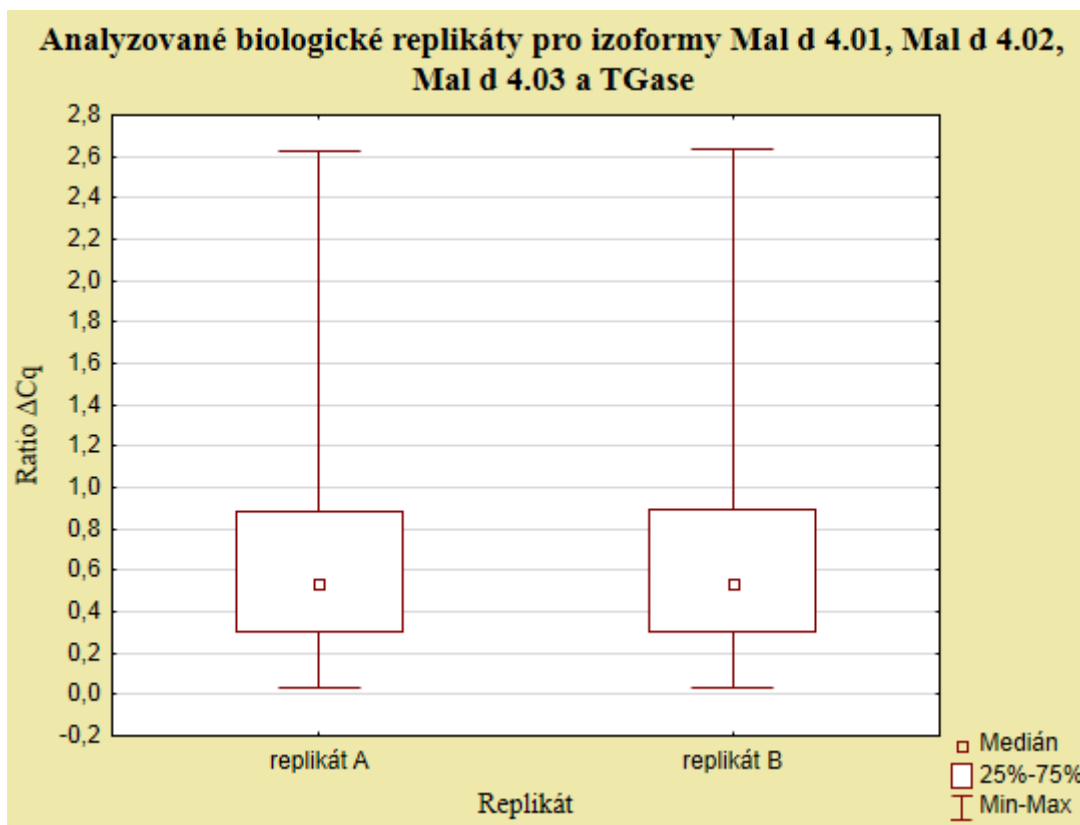
Pomocí Kruskal-Wallisovy analýzy jsme potvrdili, že na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ neexistuje statisticky významný rozdíl v míře exprese vybraných izoforem *Mal d 4* a *TGase* mezi biologickými replikáty. Detailní hodnota statistického rozdílu je uvedena v Tabulce 29.

Tabulka 29: Pravděpodobnost shody mediánů Ratio ΔCq mezi biologickými replikáty pro izoformy *Mal d 4.01*, *Mal d 4.02*, *Mal d 4.03* a *TGase*

replikát A	0,981
	replikát B

Rozdíl v expresi vybraných izoform *Mal d 4* a *TGase* mezi biologickým replikátem A a biologickým replikátem B včetně diferenciace mediánů, rozptylu a oblasti, v níž se nachází 25-75 % hodnot Ratio ΔCq , je zobrazen na Grafu 28.

Graf 28: Diferenciace mediánů a rozptyl hodnot Ratio ΔCq mezi biologickými replikáty pro izoformy *Mal d 4.01*, *Mal d 4.02*, *Mal d 4.03* a *TGase*



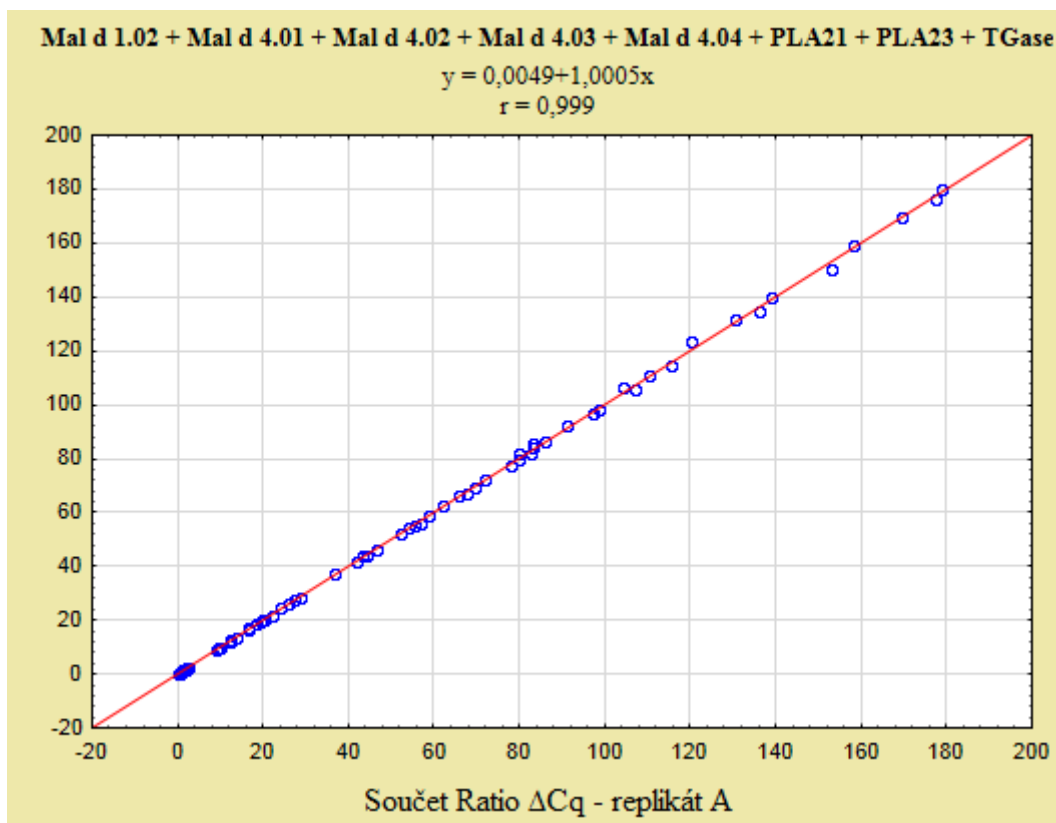
5.6 Hodnocení závislosti míry exprese pomocí regresní a korelační analýzy

Pro regresní a korelační analýzu jsme využili hodnot Ratio ΔC_q . Na následujících grafech jsou znázorněny průběh závislosti včetně rovnice přímky a hodnoty korelačního koeficientu (r).

5.6.1 Hodnocení závislosti exprese studovaných genů biologického replikátu B na biologickém replikátu A

Jako vstupní data jsme pro regresní a korelační analýzu použili hodnoty Ratio ΔC_q pro jednotlivé biologické replikáty A a B. Na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ byla prokázána statisticky významná závislost (99,9 %) míry exprese všech studovaných genů replikátu B na replikátu A, jak je uvedeno na Grafu 29.

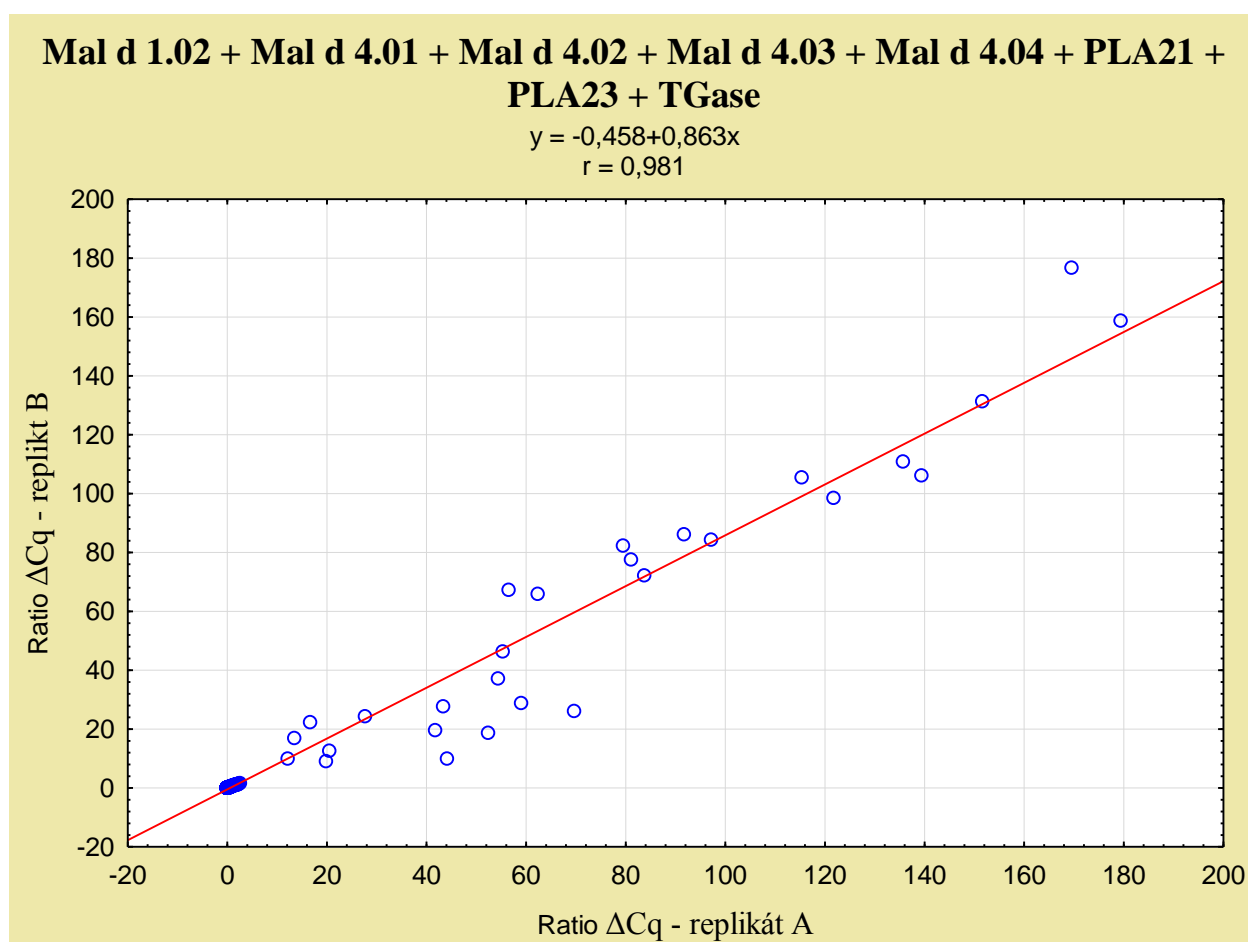
Graf 29: Závislost exprese všech studovaných genů replikátu B na replikátu A



5.6.2 Hodnocení závislosti exprese studovaných genů z roku 2017 na rok 2016

Jako vstupní data jsme pro regresní a korelační analýzu použili aritmetické průměry hodnot Ratio ΔCq biologických replikátů. Na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ byla prokázána statisticky významná závislost (98,1 %) míry exprese všech studovaných genů roku sklizně 2017 na roku sklizně 2016. Podrobnější analýza je uvedena na Grafu 30.

Graf 30: Závislost exprese všech studovaných genů roku sklizně 2017 na roku sklizně 2016

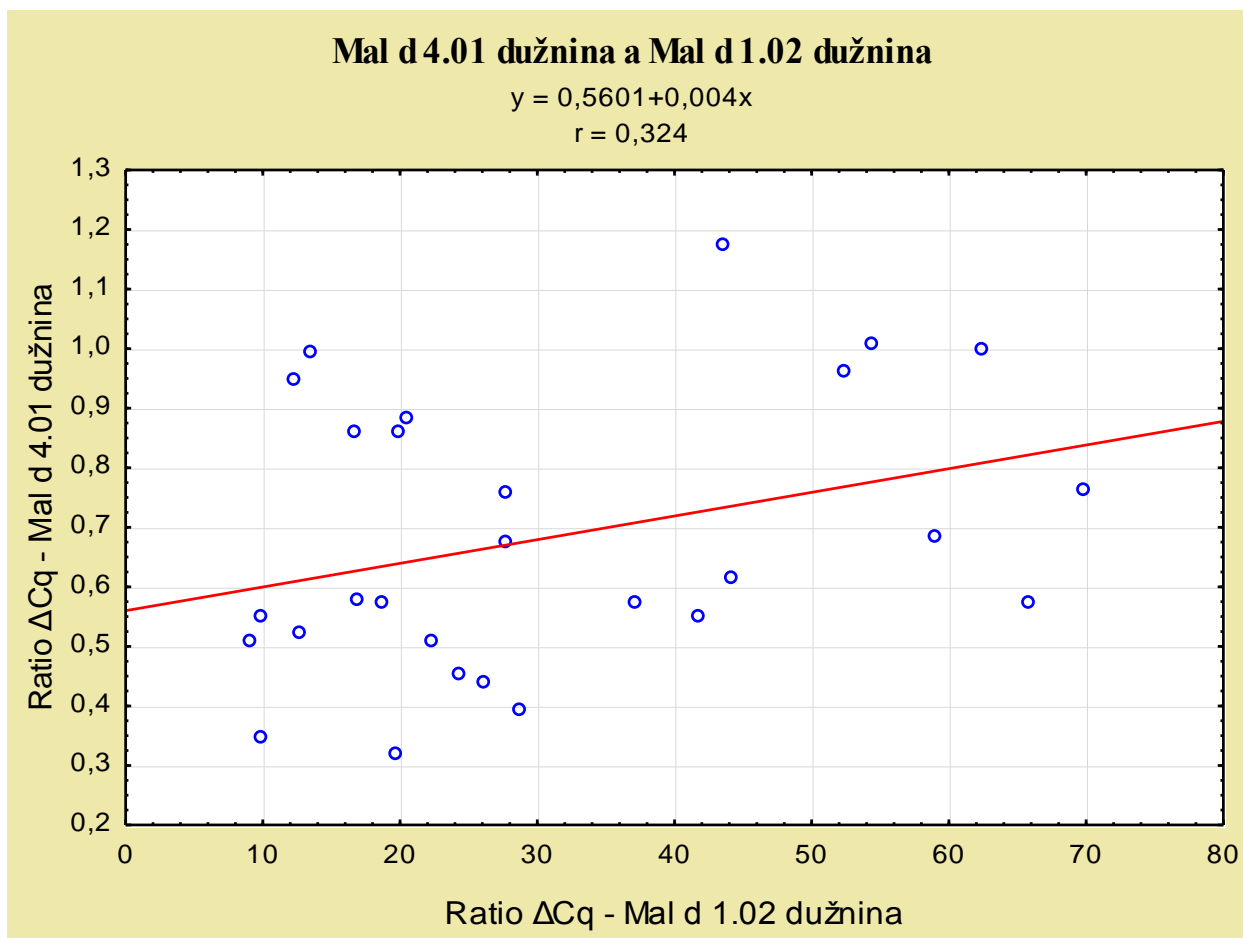


5.6.3 Hodnocení závislosti exprese izoforem *Mal d 4*, *PLA21*, *PLA23* a *TGase* na izoformě *Mal d 1.02*

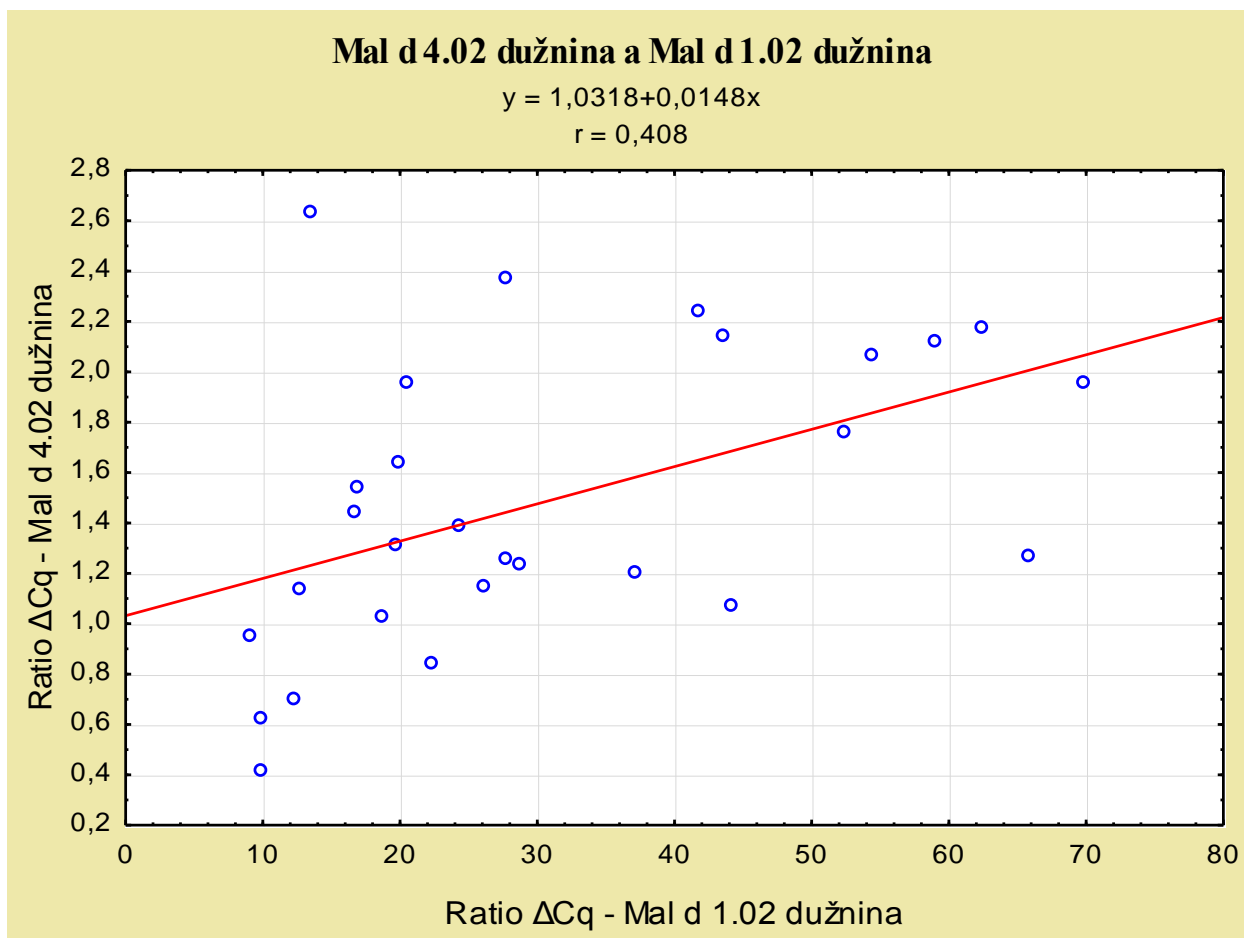
Jako vstupní data byly pro regresní a korelační analýzu použity aritmetické průměry hodnot Ratio ΔCq biologických replikátů. Výsledkem této analýzy je následujících 14 grafů (Graf 31 až Graf 44). Na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ jsme prokázali statistickou závislost

míry exprese některých studovaných genů na expresi izoformy *Mal d 1.02* pro určitý typ pletiva. Konkrétně byla statistická závislost prokázána u exprese *Mal d 4.02* v dužnině (Graf 31), *Mal d 4.04* v dužnině (Graf 34), *PLA23* v dužnině (Graf 36), *Mal d 4.02* ve slupce (Graf 39) a *TGase* ve slupce (Graf 44).

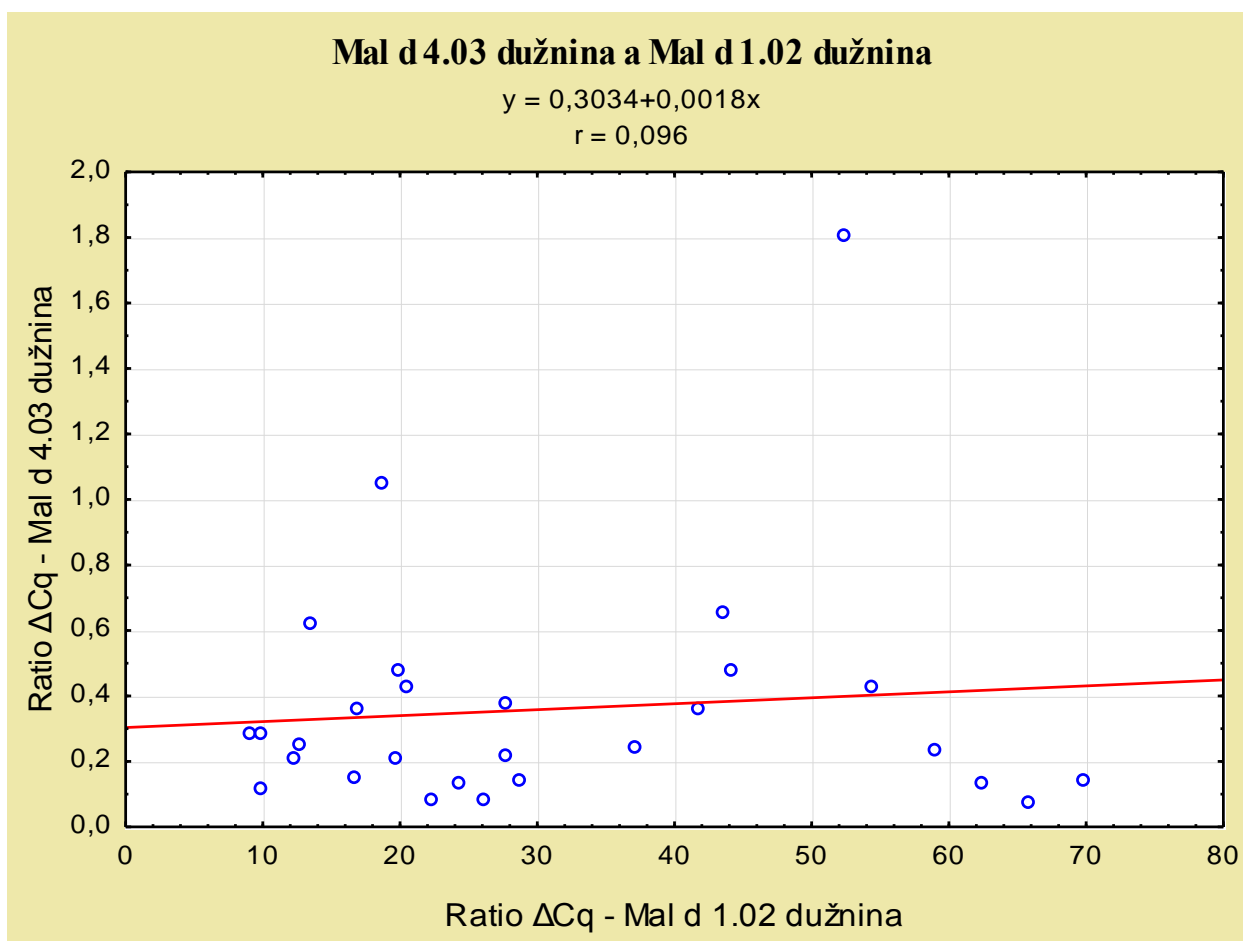
Graf 31: Závislost exprese *Mal d 4.01* v dužnině na expresi *Mal d 1.02* v dužnině



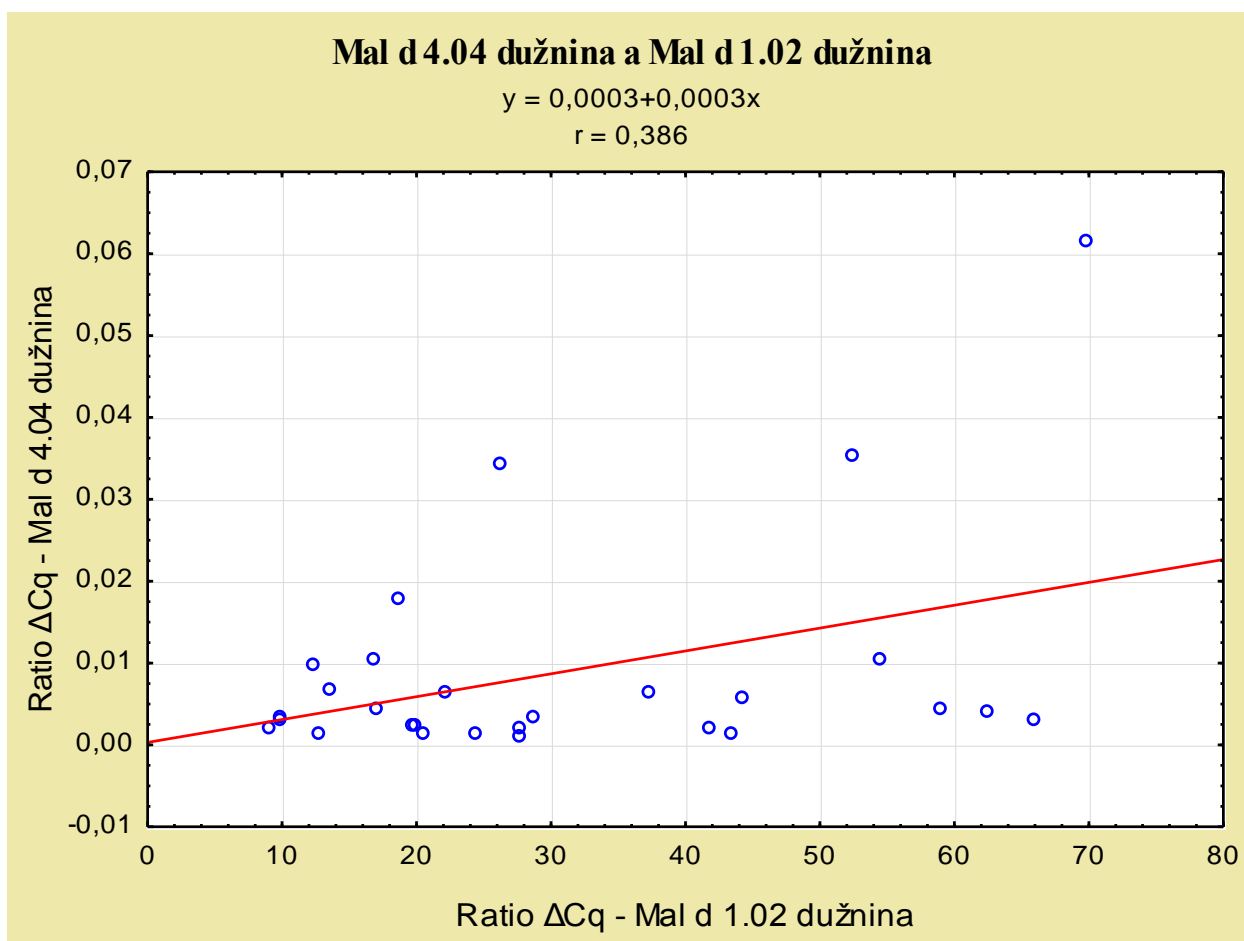
Graf 32: Zavislost exprese Mal d 4.02 v dužnině na expresi Mal d 1.02 v dužnině



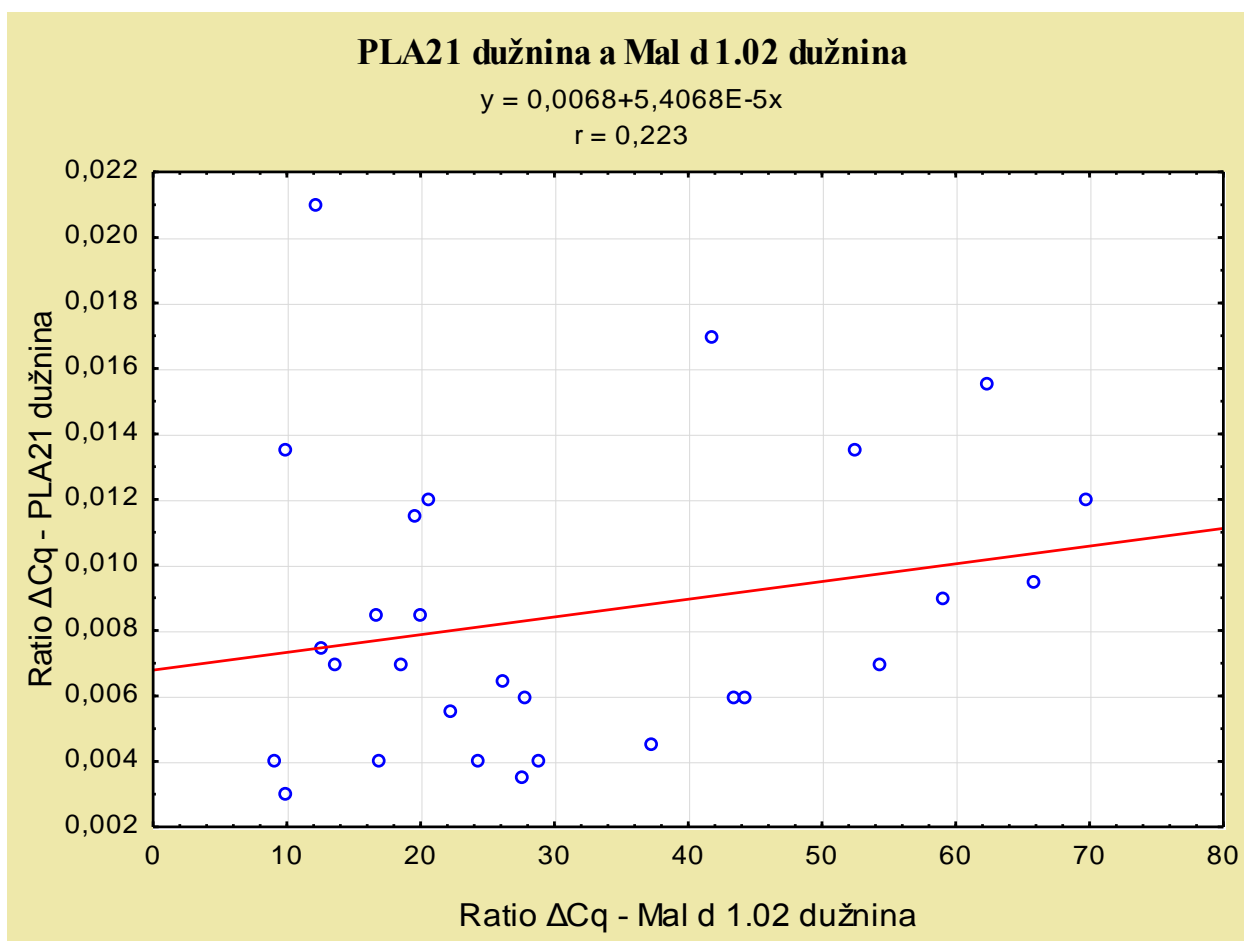
Graf 33: Závislost exprese Mal d 4.03 v dužnině na expresi Mal d 1.02 v dužnině



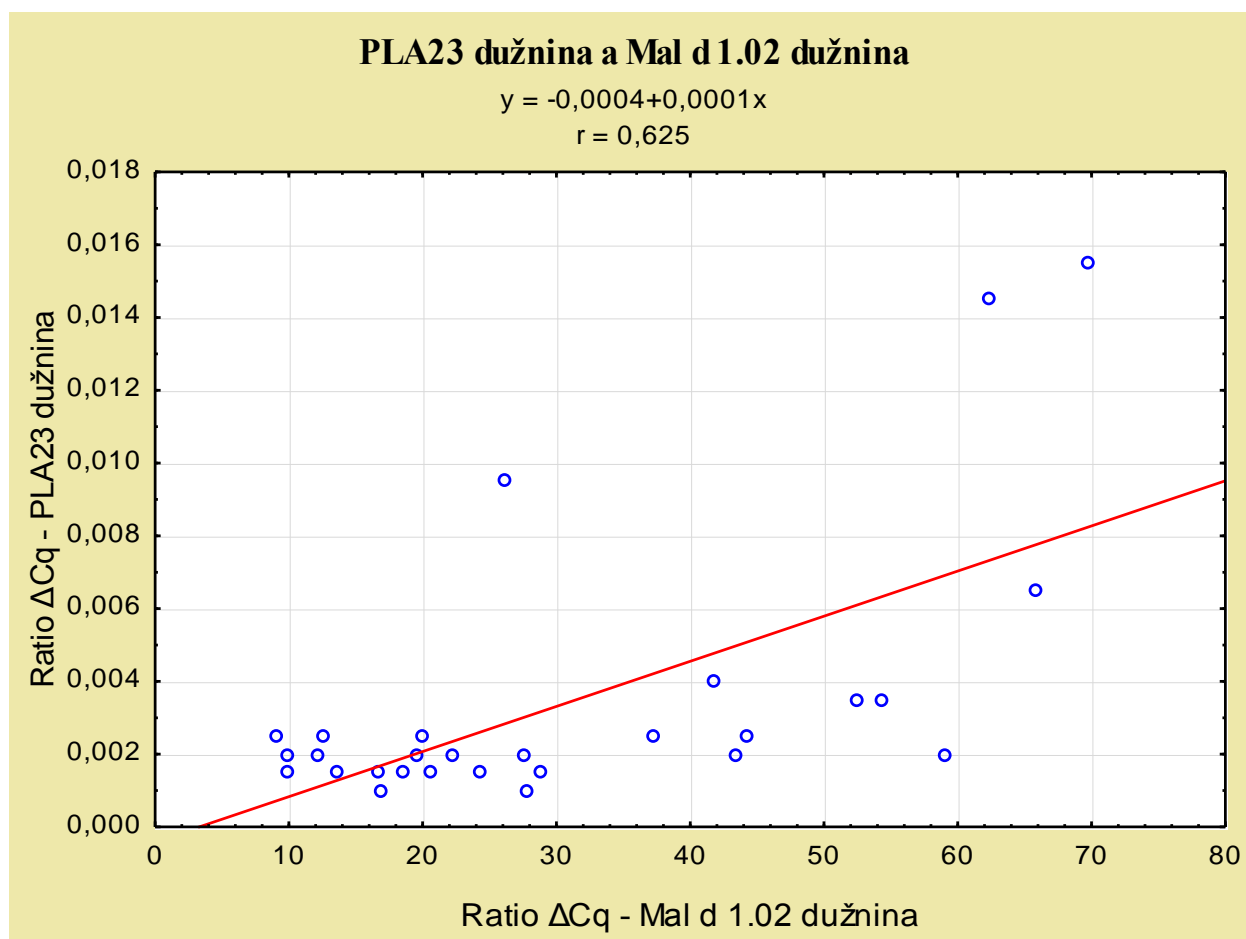
Graf 34: Zavislost exprese Mal d 4.04 v dužnině na expresi Mal d 1.02 v dužnině



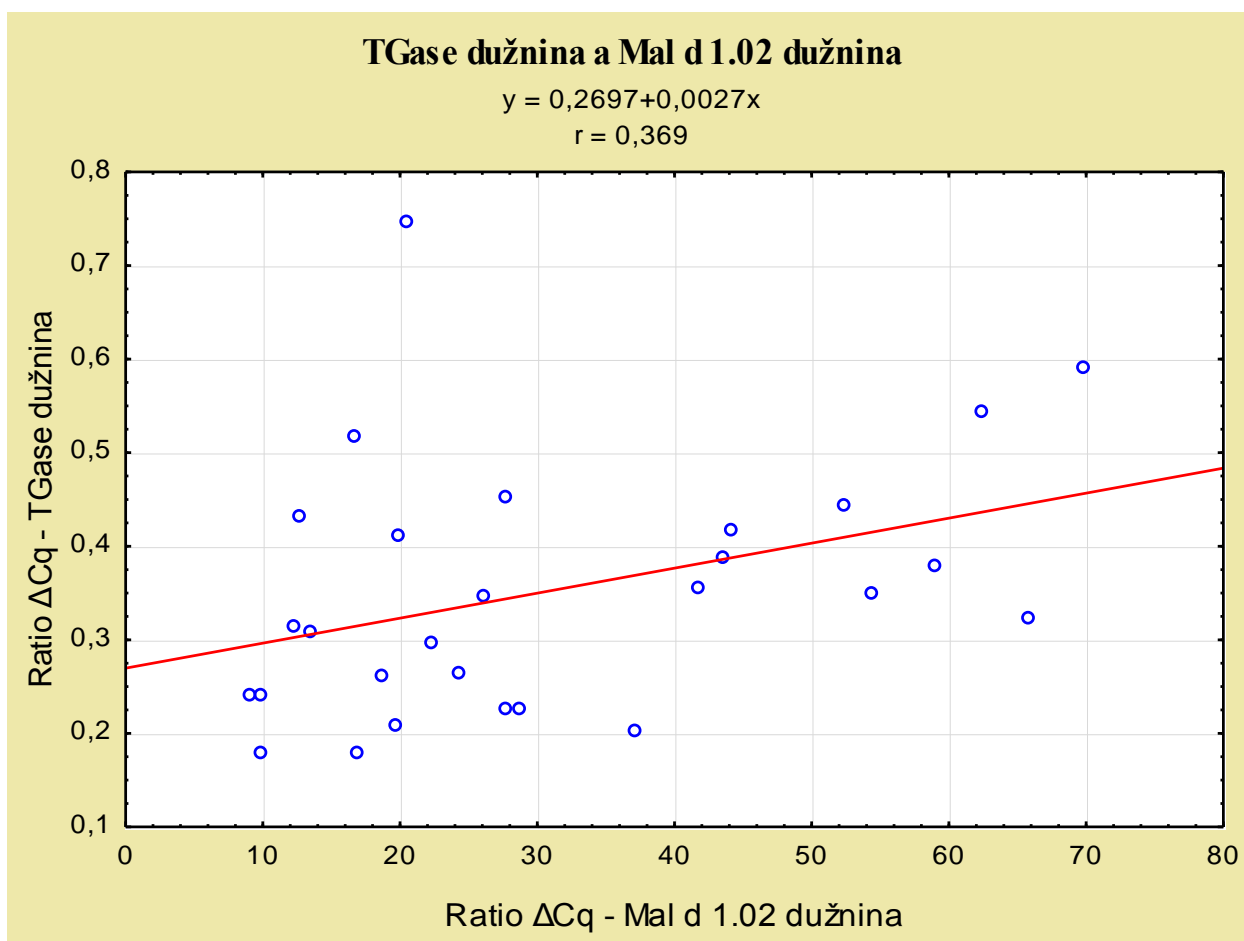
Graf 35: Závislost exprese PLA21 v dužnině na expresi Mal d 1.02 v dužnině



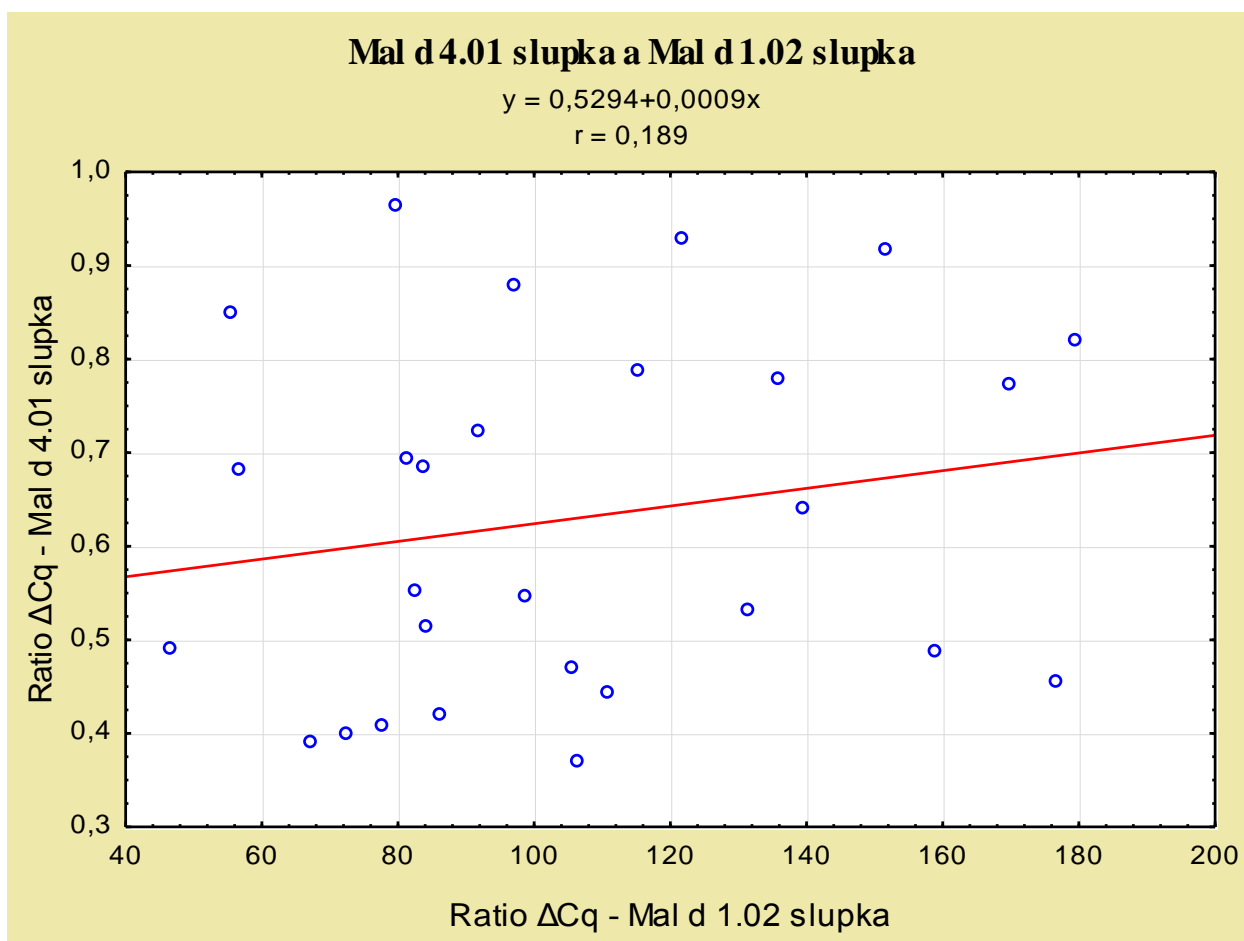
Graf 36: Závislost exprese PLA23 v dužnině na expresi Mal d 1.02 v dužnině



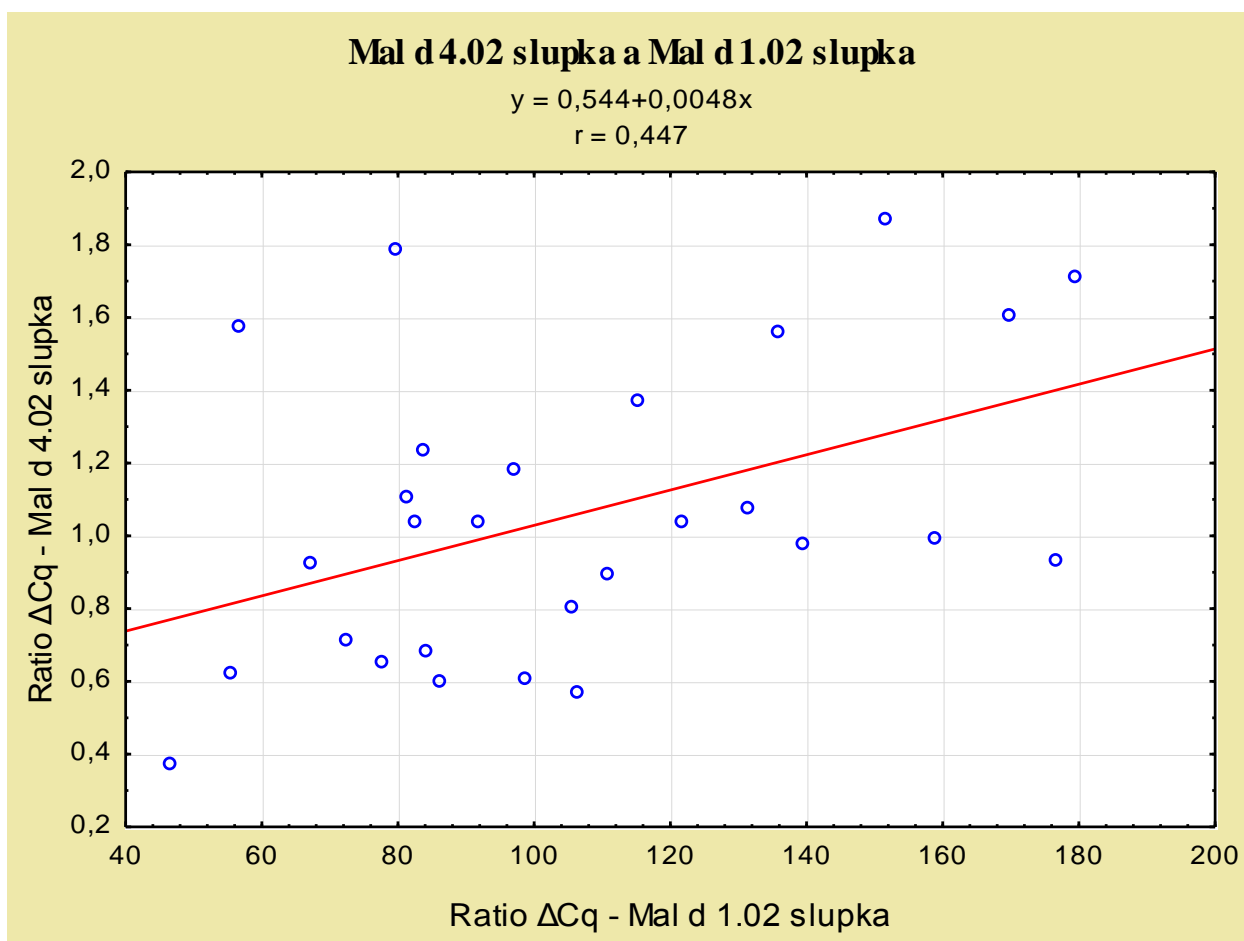
Graf 37: Závislost exprese TGase v dužnině na expresi Mal d 1.02 v dužnině



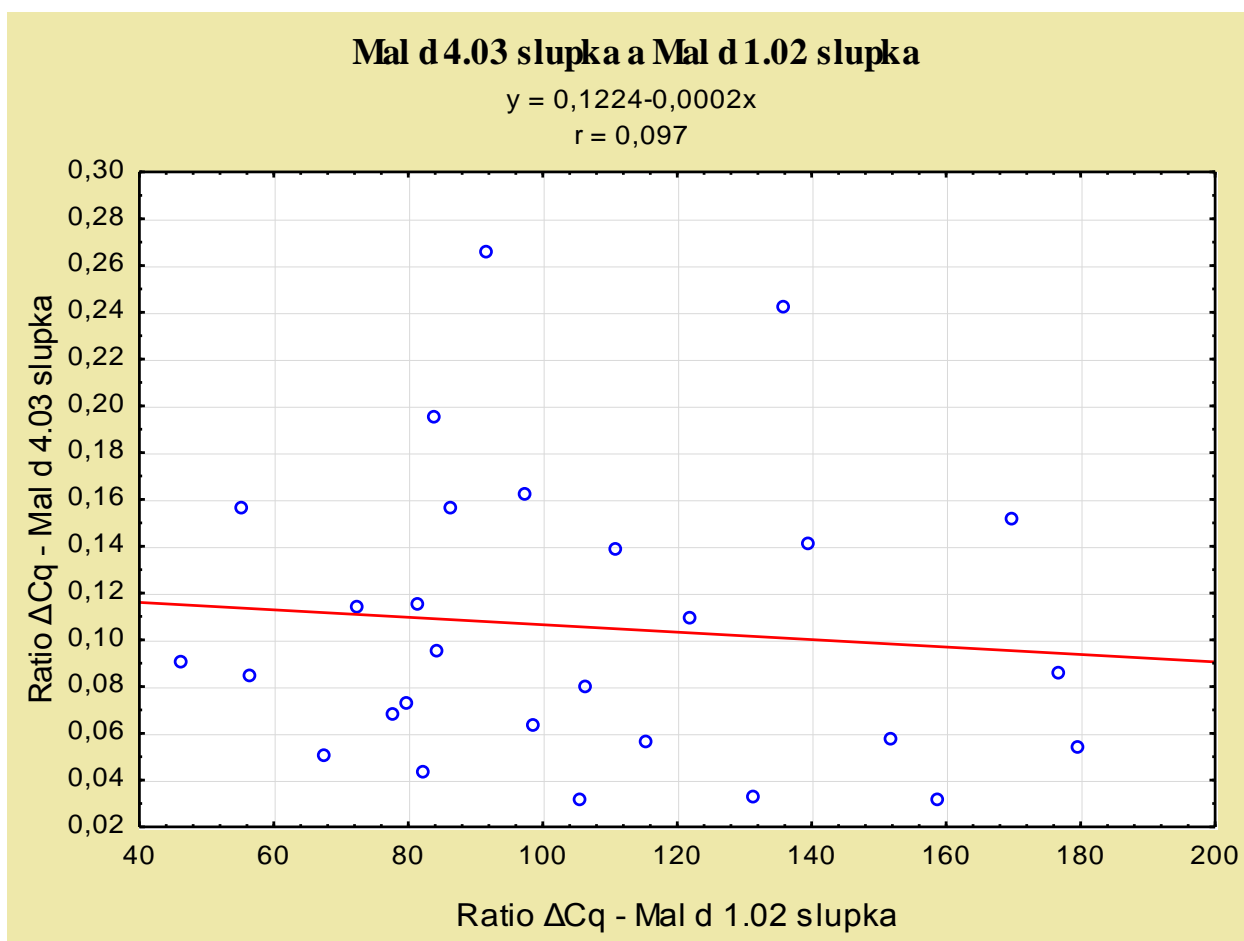
Graf 38: Zavislost exprese Mal d 4.01 ve slupce na expresi Mal d 1.02 ve slupce



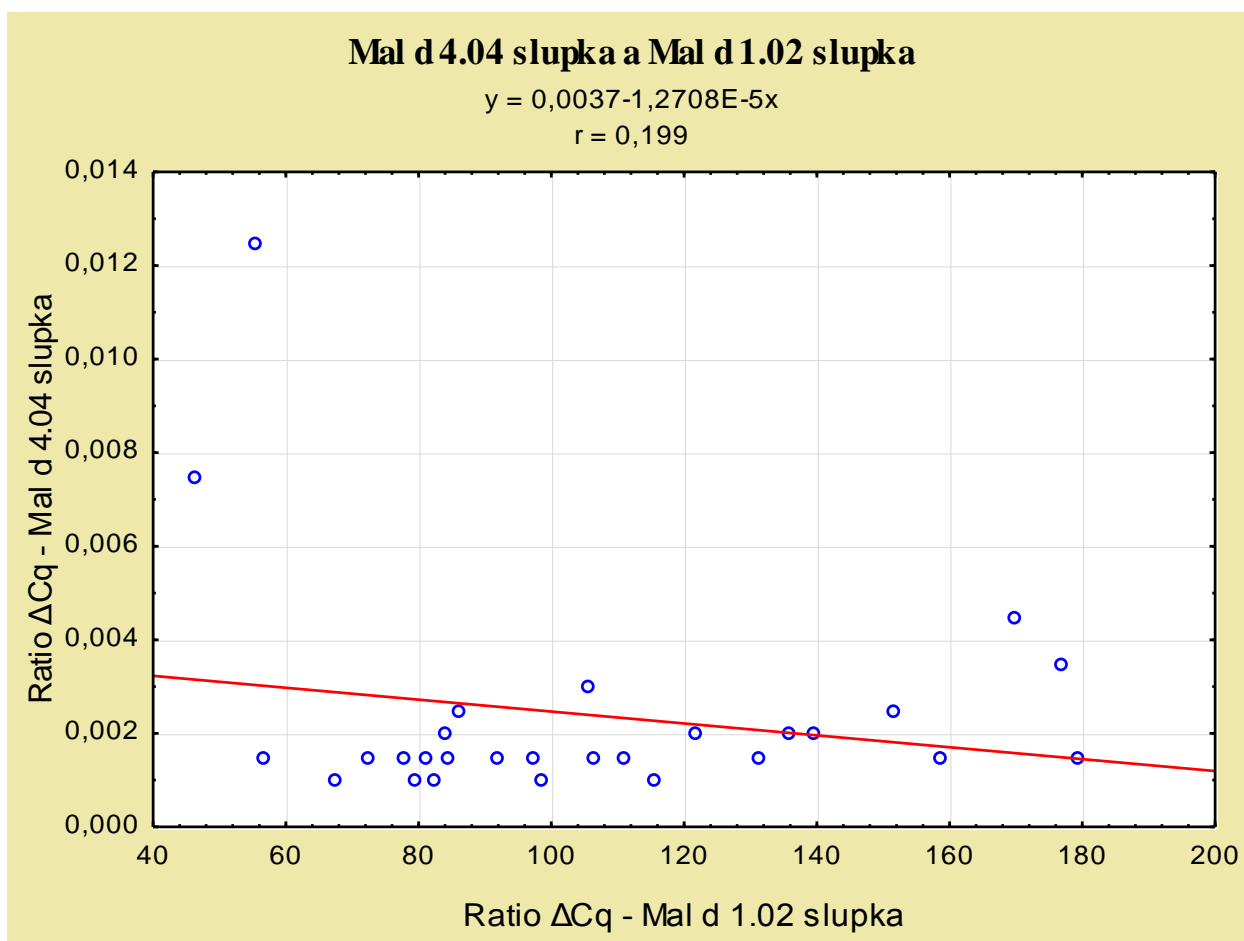
Graf 39: Zavislost exprese Mal d 4.02 ve slupce na expresi Mal d 1.02 ve slupce



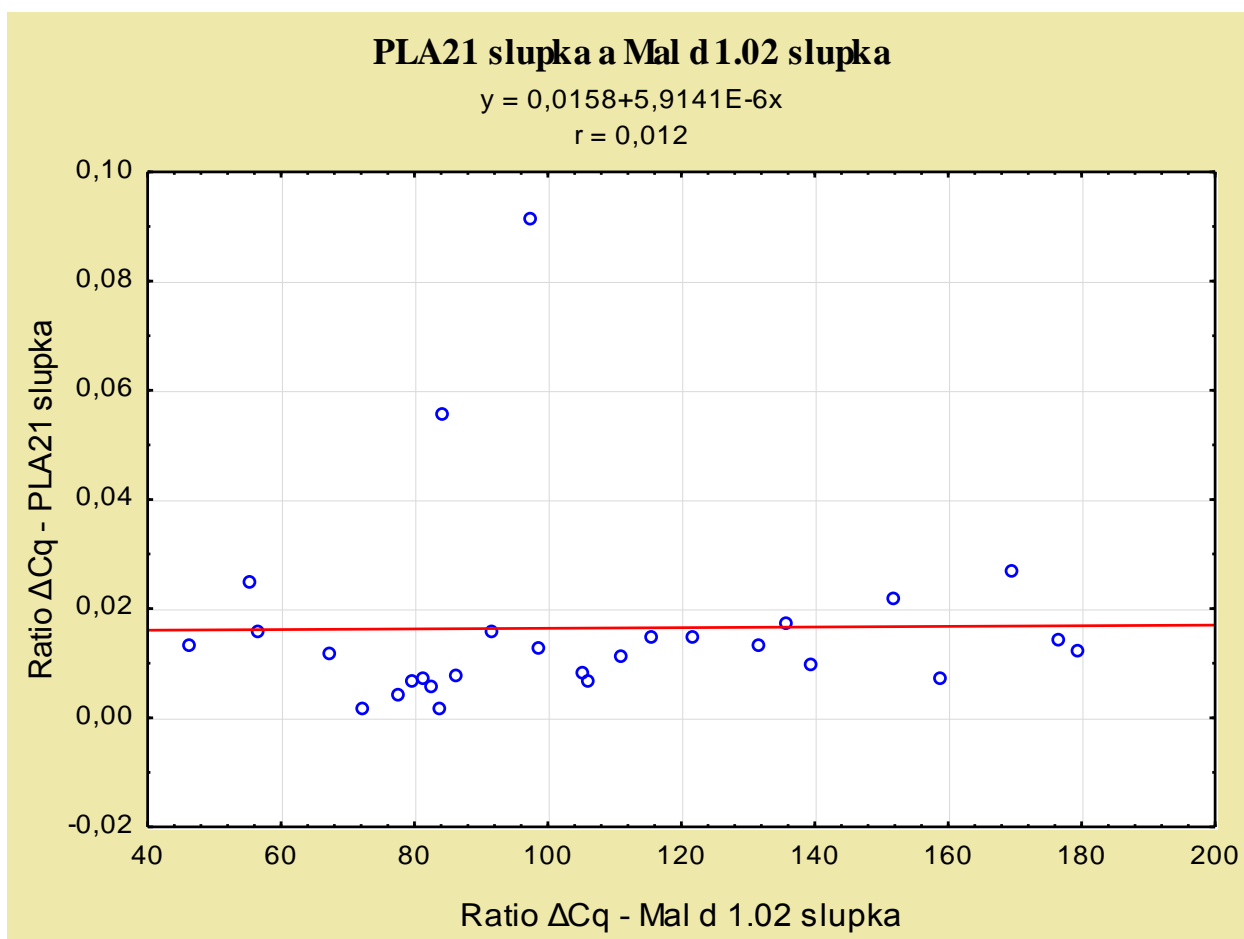
Graf 40: Zavislost exprese Mal d 4.03 ve slupce na expresi Mal d 1.02 ve slupce



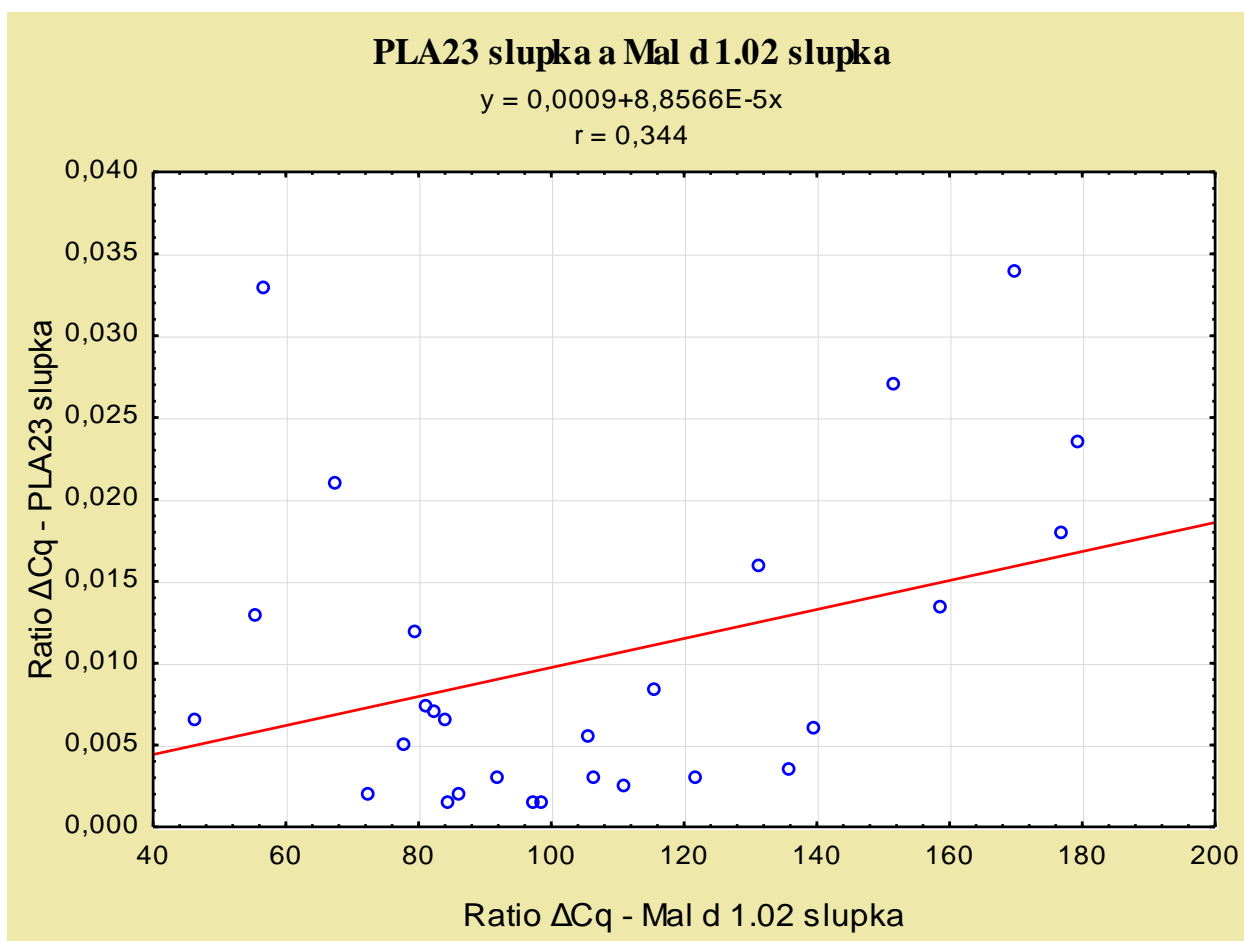
Graf 41: Zavislost exprese Mal d 4.04 ve slupce na expresi Mal d 1.02 ve slupce



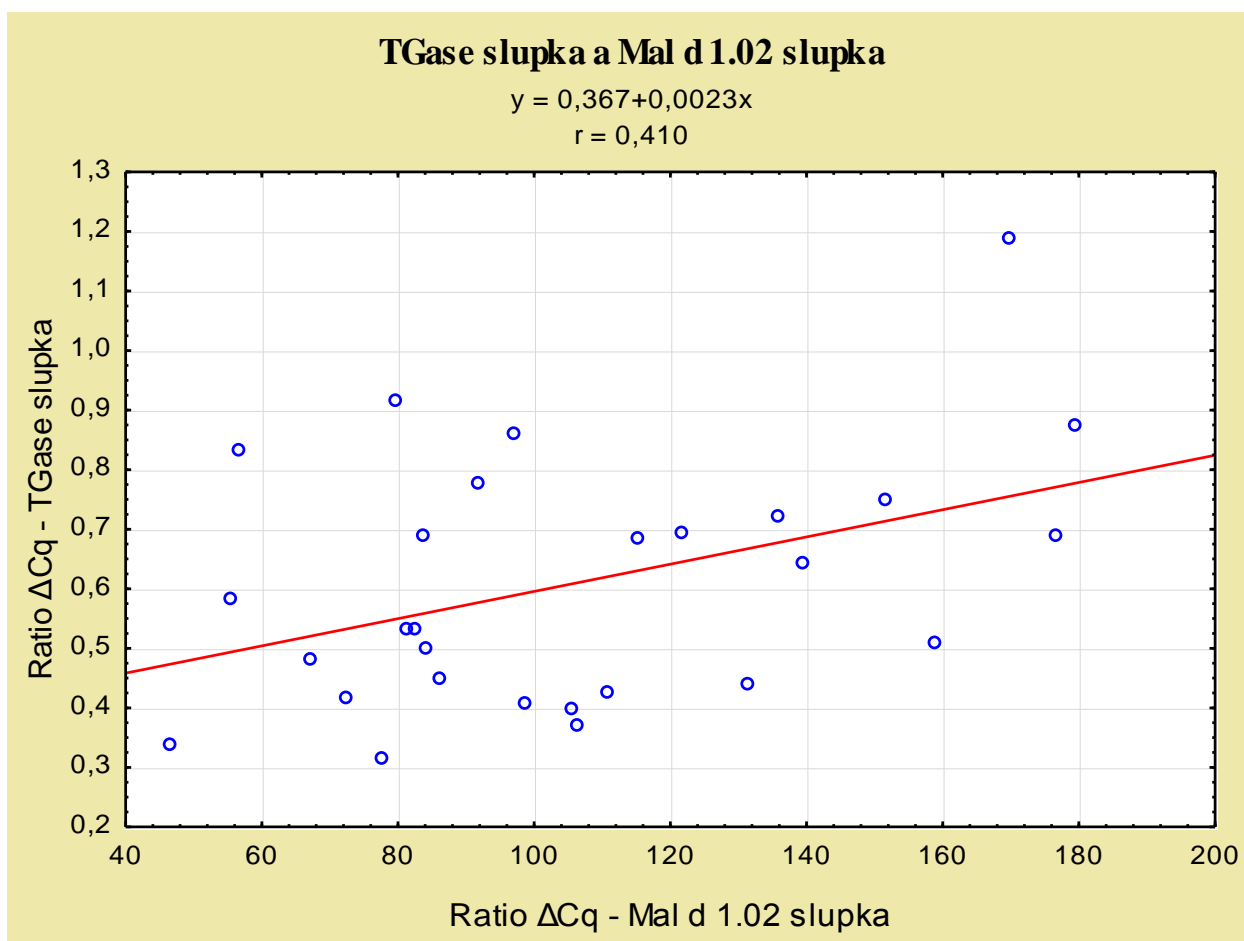
Graf 42: Závislost exprese PLA21 ve slupce na expresi Mal d 1.02 ve slupce



Graf 43: Závislost exprese PLA23 ve slupce na expresi Mal d 1.02 ve slupce



Graf 44: Závislost exprese TGase ve slupce na expresi Mal d 1.02 ve slupce



6 Diskuze

6.1 Rostlinný materiál

Jedním z cílů práce bylo získat kolekci plodů alespoň 10 odrůd jabloní, které byly vypěstovány v identických agrotechnických podmínkách experimentálních výsadeb VŠÚO Holovousy s.r.o. Celkem jsme získali jablečné plody 14 odrůd jabloní – konkrétně odrůdy 'Artiga', 'Flordika', 'Frosta', 'Golden Delicious', 'Idared', 'Jonagold', 'Jonagold Marnika', 'Jonagold Supra', 'Lady Silvia', 'Meteor', 'Nikoleta', 'Reluga', 'Rucla' a 'Topaz'. Všechny zmíněné odrůdy patří mezi zimní odrůdy, s výjimkou odrůdy 'Frosta', která je řazena mezi odrůdy podzimní. Většina analyzovaných odrůd byla českého původu. Kromě odrůdy 'Topaz' (vyšlechtěna v Ústavu experimentální botaniky AVČR, Střížovice) se jednalo o odrůdy vyšlechtěné ve VŠÚO Holovousy s.r.o. Jsou to odrůdy, u nichž nebyla hodnocena exprese alergenů zahraničními autory. Jejich výzkumem se ale zabývala studentka FAPPZ ČZU v Praze Anna Táborská (Táborská 2018). Mezi testované odrůdy původem ze zahraničí patří 'Golden Delicious', 'Idared', 'Jonagold', 'Jonagold Marnika' a 'Jonagold Supra'. Jablečné plody analyzovaných 14 odrůd byly sklizeny ve dvou letech – a to v září 2016 a 2017.

6.2 Metodický postup izolace RNA, tvorby cDNA a amplifikace

Pro izolaci celkové RNA byl pro tuto diplomovou práci využit Spectrum Plant Total RNA Kit od firmy Sigma, s jehož pomocí jsme dosáhli dostatečné výtěžnosti RNA. Dále jsme od téže firmy použili On-Column DNase 1 Digest Set, který odstranil kontaminující DNA, a přípravek RNaseZAP™ inhibující ribonukleázy, jež ovlivňují následnou výtěžnost. V dnešní době existuje již spousta izolačních kitů, např. Oh et al. (2000) využil ve své práci Extract-A-Plant isolation kit od firmy Clontech či Deng et al. (2012) izoloval RNA za pomoci TRIzol Reagent firmy Invitrogen.

Pro tvorbu cDNA jsme využili Transcription First Strand cDNA Synthesis Kit od firmy Roche za použití univerzálního polyA primeru. Lze však využít celá řada kitů pro přepis cDNA, např. GeneAmp RNA PCR Kit (Pagliarani et al. 2013).

Vytvořenou cDNA jsme použili pro qRT-PCR, která probíhala v termocykleru LightCycler Nano firmy Roche. Pomocí kitu FastStart Essentials DNA Green Master rovněž od firmy Roche, byly připraveny vzorky, které vstupovaly do reakce. Na trhu existují i jiné kity a termocyklery, které lze pro kvantitativní PCR použít. Například Botton et al. (2008) ve

své práci uvádí použití kitu Power SYBR Green PCR Master Mix a termocykleru Gene Amp PCR Systém 9700.

Primerové páry, které byly použity v této práci pro amplifikaci izoformy *Mal d 1.02* a *aktinu 7*, vycházely z experimentu Pagliarani et al. (2013). Pro izoformy genové rodiny *Mal d 4* a enzymy *PLA21*, *PLA23* a *TGase* byly použity sekvence primerů podle Paris et al. (2017). Všechny zmíněné primery jsou uvedeny v Tabulce 3 v části věnované metodice. V literatuře se ale můžeme setkat s použitím primerových párů pro izoformy *Mal d 1.02*, *Mal d 4.01*, *Mal d 4.02* a *Mal d 4.03* s odlišnými sekvencemi. Např. Botton et al. (2008) používal pro amplifikaci izoform *Mal d 1.02*, *Mal d 4.01*, *Mal d 4.02* a *Mal d 4.03* primery uvedené v Tabulce 30.

Tabulka 30: Primerové páry pro izoformy *Mal d 1.02*, *Mal d 4.01*, *Mal d 4.02* a *Mal d 4.03* dle Botton et al. (2008)

Gen	Sekvence primeru 5'-3'
Mal d 1.02	ACACCTCTGAGATTCCACCAC CAACTTGGTYTCGTAAGAGAC
Mal d 4.01	GCTCTGGTGGCGTAACTGTG CCTGGAGTCAAAGGCTCCTC
Mal d 4.02	CTCCGACCGGGTTGTATCTT GCCCTTCTTTCCTCGAATCA
Mal d 4.03	GTCTCAGAGCGCCTCTTTCC GGTTCACCCTGGATCACCAT

6.3 Exprese genů vyjádřená hodnotami Ratio ΔCq

Pro vyjádření míry exprese jednotlivých genů jsme použili hodnoty Ratio ΔCq , které jsme vypočítali z Cq hodnot, jež jsou výchozími daty programu LightCycler. Tyto výpočty

jsme prováděli za pomoci programu Microsoft Excel. Hodnoty Ratio ΔCq normalizovaly relativní expresi studovaných genů vzhledem k expresi „house keepingového“ genu pro aktin 7, který je často využívaným referenčním genem pro relativní kvantifikaci (Eisenberg & Levanon 2013). Jelikož eficeience PCR amplifikace byly u analyzovaných genů stejné (Zunová 2018), pro porovnání stačilo použít hodnot ΔCq .

6.4 Vliv jednotlivých třídících faktorů na hodnoty Ratio ΔCq všech testovaných genů

Mezi třídící faktory, které byly v této diplomové práci použity, patří rok sklizně, typ pletiva, odrůda, biologický replikát a analyzovaný gen. Právě těmto faktorům jsou věnovány následující kapitoly, ve kterých je provedeno shrnutí výsledků a jejich porovnání s výsledky ostatních autorů.

6.4.1 Vliv roku sklizně na míru exprese analyzovaných genů

Jak již bylo zmíněno, jablečné plody testované v této diplomové práci pocházely ze dvou roků sklizně – z let 2016 a 2017. Na základě Kruskal-Wallisovy analýzy byl potvrzen statisticky významný rozdíl mezi mírou exprese všech zkoumaných genů, jak je zobrazeno na Grafu 10. Stejného výsledku jsme dosáhli i v případě, kdy jsme statisticky vyhodnocovali pouze izoformy *Mal d 4* (Graf 17) či geny (*Mal d 4.01*, *Mal d 4.02*, *Mal d 4.03* a *TGase*), které vykazovaly vyšší hodnotu exprese (Graf 24). To je způsobeno spíše vlivem prostředí nežli genetickými faktory. Vliv prostředí může souviset s PR-proteiny, jejichž zvýšená exprese byla pozorována jako odpověď na nepříznivé podmínky prostředí či při napadení rostliny patogeny (Breiteneder 2004).

Tato diplomová práce je unikátní v tom, že porovnává expresi zkoumaných genů mezi dvěma ročníky. Většina ostatních autorů (např. Pagliarani et al. 2013; Paris et al. 2017) prováděla pouze jednoleté experimenty.

6.4.2. Vliv typu pletiva na míru exprese analyzovaných genů

Ve svých studiích zmiňovalo mnoho autorů (Borges et al. 2006; Ricci et al. 2010; Pagliarani et al. 2013) odlišnou expresi alergenů mezi slupkou a dužninou. Fernández-Rivas a

Cuevas (1999), Borges et al. (2006) či Pagliarani et al. (2013) ve svých pracích potvrzují předpoklad, že slupka má vyšší alergenicitu nežli dužnina. Rozdíl v míře exprese analyzovaných genů mezi slupkou a dužninou může být způsoben prvním kontaktem slupky jablečného plodu s nejrůznějšími patogeny a abiotickými stresory. Ricci et al. (2010) naproti tomu uvádí, že existují odrůdy, které mají více alergenní dužninu než slupku.

Při porovnání expresí analyzovaných genů mezi slupkou a dužninou v této práci nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl. Statisticky významný rozdíl byl prokázán, když byla porovnávána míra expresí mezi slupkou a dužninou v rámci izoform *Mal d 4* a při porovnávání expresí mezi vybranými izoformami *Mal d 4* (*Mal d 4.01*, *Mal d 4.02* a *Mal d 4.0*) a *TGase*.

6.4.3 Vliv odrůdy na míru exprese analyzovaných genů

Žádná ze 14 zkoumaných odrůd nevykazovala statisticky významný rozdíl v expresi analyzovaných genů s dalšími odrůdami. Mnoho autorů (např. Beuning et al. 2004; Gao et al. 2008) uvádí, že odrůda 'Golden Delicious' je vysoce alergenní. V této diplomové práci však nebyla její vysoká alergenicita hodnocením exprese analyzovaných genů potvrzena. Příčinou mohou být geny, které byly analyzovány v této práci. Kromě genu *Mal d 1.02* se nezdá, že by ostatní testované geny měly vysoký podíl na určení alergenicity dané odrůdy. Navíc se hodnoty Ratio ΔCq exprese genů *Mal d 4.04*, *PLA21* a *PLA23* u všech odrůd pohybovaly kolem 0, čímž významně ovlivnily celkové statistické vyhodnocení.

6.4.4 Vliv biologického replikátu na míru exprese analyzovaných genů

Jak již bylo v kapitole Materiál a metody zmíněno, každá odrůda, kterou jsme analyzovali, měla celkem 6 replikátů. Těchto 6 replikátů pocházelo z celkem 2 různých plodů (2 biologické replikáty) a vzorky z nich byly odebrány na třech místech (3 technické replikáty). Naším cílem bylo vytvořit vzorky, které by charakterizovaly odrůdu lépe nežli hodnocení jen jednoho plodu.

Kruskal-Wallisova analýza potvrdila náš předpoklad, že mezi biologickými replikáty neexistuje statisticky významný rozdíl, a to jak při hodnocení všech analyzovaných genů, tak i při hodnocení jen vybrané části testovaných genů. Pomocí regresní a korelační analýzy zobrazené na Grafu 29 jsme došli ke stejnému výsledku. Replikáty spolu úzce korelovaly a

byla u nich prokázána statisticky významná závislost. Tím jsme si ověřili, že metodika fungovala správně a že jsme během experimentu dobře postupovali.

6.5 Rozdíly v míře exprese analyzovaných genů

Nejvíce exprimovaným alergenem byl *Mal d 1.02*, již v dřívějších pracích prokázáný jako jeden z majoritních alergenů jablečných plodů (Sancho et al. 2006; Gao et al. 2008; Ahammer et al. 2017; Paris et al. 2017). Díky jeho výrazné expresi oproti ostatním analyzovaným alergenům výsledné hodnoty Ratio ΔCq neodpovídaly normálnímu rozdělení.

Izoformy *Mal d 4.01*, *Mal d 4.02* a *Mal d 4.03* společně s enzymem *TGase* se exprimovaly ve vyšší míře nežli izoforma *Mal d 4.04* a enzymy *PLA21* a *PLA23*. Botton et al. (2008) zkoumal expresi tří izoform alergenů *Mal d 4* – a to *Mal d 4.01*, *Mal d 4.02* a *Mal d 4.03*, přičemž exprese *Mal d 4.02* dosahovala nejvyšších hodnot Ratio ΔCq . Stejného výsledku bylo dosaženo i v této diplomové práci, kdy se ze všech zkoumaných izoform alergenů *Mal d 4* exprimovala v nejvyšší míře izoforma *Mal d 4.02*, jak je patrné z Grafu 19. Nejenže dosahovala nejvyššího rozptylu hodnot mediánů Ratio ΔCq , ale měla i nejvýše položený medián. Naproti tomu Paris et al. (2017) uvádí, že nejvyšších hodnot exprese dosahovala v jeho studii izoforma *Mal d 4.04*, která se exprimovala 10-30 krát více nežli ostatní tři izoformy alergenů *Mal d 4*. Rozdílné výsledky mezi prací Paris et al. (2017) a touto diplomovou prací mohou být způsobeny odlišným materiálem, který byl ve studiích použit. Zatímco v této diplomové práci jsme použili jako rostlinný materiál pouze jablečné plody, Paris et al. (2017) zkoumal expresi izoform *Mal d 4* v jablečném pylu.

Nejnižších hodnot exprese Ratio ΔCq dosahovaly v této diplomové práci geny *Mal d 4.04*, *PLA21* a *PLA23*. Paris et al. (2017) naproti tomu uvádí, že geny *PLA21* a *PLA23* byly exprimovány silněji než například *Mal d 4.01*. Odlišné výsledky opět mohou být způsobeny rozdílným analyzovaným materiálem.

7 Závěr

V této diplomové práci byly studovány nové alergeny a enzymy, které by se mohly na alergenicitě jablek významně podílet. Pomocí qRT-PCR byla analyzována exprese izoalergenů *Mal d 1.02*, genové rodiny *Mal d 4* a genů *PLA21*, *PLA23* a *TGase*. Metodologický postup byl optimalizován, metoda qRT-PCR se ukázala i u těchto genů výhodná a spolehlivá. Příprava směsných vzorků v podobě dvou biologických replikátů prokázala, že mezi replikáty neexistují statisticky významné rozdíly. Metoda je tudíž opakovatelná.

Hypotéza, že exprese izoformou *Mal d 4* a enzymů *PLA21*, *PLA23* a *TGase* bude srovnatelná s expresí hlavních jablečných izoalergenů z genové rodiny *Mal d 1*, byla na základě statistického vyhodnocení výsledků vyvrácena. Izoalergen *Mal d 1.02* vykazoval napříč jednotlivými třídícími faktory mnohem vyšší expresi nežli ostatní studované geny. Z ostatních analyzovaných genů se výrazněji exprimovaly pouze geny *Mal d 4.02*, *Mal d 4.01*, *TGase* a *Mal d 4.03* (sestupně seřazené dle míry exprese). Zanedbatelné exprese dosahovala izoforma *Mal d 4.04* a obě izoformy PLA_2 – *PLA21* a *PLA23*. Majoritními jablečnými alergeny tak zůstávají i nadále izoalergeny genové rodiny *Mal d 1*.

Hypotéza navrhuující, že existují meziodrůdové rozdíly v expresi výše uvedených genů, byla vyvrácena. Důvodem tohoto výsledku je fakt, že kromě izoalergenu *Mal d 1.02* se ostatní geny exprimovaly napříč všemi odrůdami v malé míře, čímž ovlivnily celkové statistické vyhodnocení.

Bylo zjištěno, že intenzita exprese analyzovaných genů byla výrazně ovlivněna ročníkem, ve kterém byly testované jablečné plody sklizeny. Všechny geny měly vyšší míru exprese v jablkách pocházejících ze sklizně roku 2016. Příčinou této odlišné exprese genů mezi dvěma ročníky mohou být rozdílné podmínky prostředí a s nimi spojené různé abiotické a biotické faktory.

Budoucí výzkumy věnující se alergenicitě jablečných plodů by se tak měly přednostně věnovat dalšímu studiu izoform genové rodiny *Mal d 1*, ale i podmínkám, jímž mohou být jablečné plody vystaveny.

8 Seznam použité literatury

Ahammer L, Grutsch S, Kamenik AS, Liedl KR, Tollinger M. 2017. Structure of the Major Apple Allergen Mal d 1. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **65**:1606-1612.

Asero R et al. 2000. Lipid Transfer Protein: A Pan-Allergen in Plant-Derived Foods That Is Highly Resistant to Pepsin Digestion. *International Archives of Allergy and Immunology* **122**:20-32.

Asero R, Mistrello G, Roncarolo D, Amato S, Zanoni D, Barocci F, Caldironi G. 2003. Detection of clinical markers of sensitization to profilin in patients allergic to plant-derived foods. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **112**:427-432.

Bernard PS, Lay MJ, Wittwer CT. 1998. Integrated Amplification and Detection of the C677T Point Mutation in the Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene by Fluorescence Resonance Energy Transfer and Probe Melting Curves. *Analytical Biochemistry* **255**:101-107.

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

Bidat É, Loigerot C. 2005. *Alergie u dětí*. Portál, Praha.

Blažek J. 2001. *Ovocnictví, 2. nezm. vyd.* Květ, Praha.

Boček S. 2008. *Ovocné dřeviny v krajině: pilotní vzdělávací program, Hostětín 2007/8 : sborník přednášek a seminárních prací*. ZO ČSOP Veronica, Brno.

Bohle B. 2007. The impact of pollen-related food allergens on pollen allergy. *Allergy* **62**:3-10.

Borges J-P, Jauneau A, Brulé C, Culerrier R, Barre A, Didier A, Rougé P. 2006. The lipid transfer proteins (LTP) essentially concentrate in the skin of Rosaceae fruits as cell surface exposed allergens. *Plant Physiology and Biochemistry* **44**:535-542.

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

Breiteneder H, Radauer C. 2004. A classification of plant food allergens☆. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **113**:821-830.

Breiteneder H. 2004. Thaumatin-like proteins - a new family of pollen and fruit allergens. *Allergy* **59**:479-481.

- Bufe A, Spangfort MD, Kahlert H, Schlaak M, Becker W-M. 1996. The major birch pollen allergen, Bet v 1, shows ribonuclease activity. *Planta* **199**:413-415.
- Burney P, Summers C, Chinn S, Hooper R, van Ree R, Lidholm J. 2010. Prevalence and distribution of sensitization to foods in the European Community Respiratory Health Survey: a EuroPrevall analysis. *Allergy* **65**:1182-1188.
- Bustin SA. 2004. A-Z of quantitative PCR. International University Line, La Jolla, Calif.
- Bystroň J. 1997. Alergie: průvodce alergickými nemocemi pro lékaře i pacienty. Mirago, Ostrava.
- Cantu D, Vicente AR, Greve LC, Dewey FM, Bennett AB, Labavitch JM, Powell ALT. 2008. The intersection between cell wall disassembly, ripening, and fruit susceptibility to *Botrytis cinerea*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**:859-864.
- Cordella-Miele E, Miele L, Beninati S, Mukherjee AB. 1993. Transglutaminase-Catalyzed Incorporation of Polyamines into Phospholipase A2. *The Journal of Biochemistry* **113**:164-173.
- Deng L-H, Lou M-W, Zhang C-F, Zeng H-C. 2014. Extraction of High-Quality RNA from Rubber Tree Leaves. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **76**:1394-1396.
- Dubois AEJ et al. 2015. First successful reduction of clinical allergenicity of food by genetic modification: Mal d 1 -silenced apples cause fewer allergy symptoms than the wild-type cultivar. *Allergy* **70**:1406-1412.
- Dvořák A. 1980. Pěstování jablek, 2., přeprac. a dopl. vyd. Státní zemědělské nakladatelství, Praha.
- Eisenberg E, Levanon EY. 2013. Human housekeeping genes, revisited. *Trends in Genetics* **29**:569-574.
- Ferenčík M. 2005. Imunitní systém: informace pro každého, Vyd. 1. české. Grada, Praha.
- Fernández-Rivas M, Bolhaar S, González-Mancebo E, Asero R, van Leeuwen A, Bohle B, Ma Y, Ebner C, Rigby N, Sancho AI. 2006. Apple allergy across Europe: How allergen sensitization profiles determine the clinical expression of allergies to plant foods. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **118**:481-488.
- Fernández-Rivas M, Vanree R, Cuevas M. 1997. Allergy to fruits without related pollinosis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **100**:728-733.

- Fernández-Rivas, Cuevas. 1999. Peels of Rosaceae fruits have a higher allergenicity than pulps. *Clinical and Experimental Allergy* **29**:1239-1247.
- Ferree DC, Warrington IJ. 2003. Apples: botany, production, and uses. CABI Pub., New York, NY.
- Fuchs M. 2013. Potravinové alergie. Maxdorf, Praha.
- Gao Z, Weg E, Matos CI, Arens P, Bolhaar STHP, Knulst AC, Li Y, Hoffmann-Sommergruber K, Gilissen LJWJ. 2008. Assessment of allelic diversity in intron-containing Mal d 1 genes and their association to apple allergenicity. *BMC Plant Biology* **8**.
- Gao ZS et al. 2005. Genomic cloning and linkage mapping of the Mal d 1 (PR-10) gene family in apple (*Malus domestica*). *Theoretical and Applied Genetics* **111**:171-183.
- García-Olmedo F, Molina A, Segura A, Moreno M. 1995. The defensive role of nonspecific lipid-transfer proteins in plants. *Trends in Microbiology* **3**:72-74. .
- Gharghani A, Zamani Z, Talaie A, Oraguzie NC, Fatahi R, Hajnajari H, Wiedow C, Gardiner SE. 2009. Genetic identity and relationships of Iranian apple (*Malus × domestica* Borkh.) cultivars and landraces, wild *Malus* species and representative old apple cultivars based on simple sequence repeat (SSR) marker analysis. *Genetic Resources and Crop Evolution* **56**:829-842.
- Ginzinger DG. 2002. Gene quantification using real-time quantitative PCR. *Experimental Hematology* **30**:503-512.
- Hallstrand TS, Wurfel MM, Lai Y, Ni Z, Gelb MH, Altemeier WA, Beyer RP, Aitken ML, Henderson WR, Morty RE. 2010. Transglutaminase 2, a Novel Regulator of Eicosanoid Production in Asthma Revealed by Genome-Wide Expression Profiling of Distinct Asthma Phenotypes. *PLoS ONE* 5 (e8583) DOI: 10.1371/journal.pone.0008583
- Hejný S, Slavík B. 2003. Květena České republiky, 2., nezm. vyd. Academia, Praha.
- Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. 1992. Simultaneous Amplification and Detection of Specific DNA Sequences. *Bio/Technology* **10**:413-417.
- Hon WC, Griffith M, Mlynarz A, Kwok YC, Yang DSC. 1995. Antifreeze Proteins in Winter Rye Are Similar to Pathogenesis-Related Proteins. *Plant Physiology* **109**:879-889.
- Hričovský I, Řezníček V, Sus J. 2003. Jabloně a hrušně, kdouloně, mišpule. Příroda, Bratislava.

- Hsieh L-S, Moos M, Lin Y. 1995. Characterization of apple 18 and 31 kd allergens by microsequencing and evaluation of their content during storage and ripening. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **96**:960-970.
- Chakraborti S. 2003. Phospholipase A2 isoforms: a perspective. *Cellular Signalling* **15**:637-665.
- Chandra S, Heinsteint PF, Low PS. 1996. Activation of Phospholipase A by Plant Defense Elicitors. *Plant Physiology* **110**:979-986.
- Icekson I, Apelbaum A. 1987. Evidence for Transglutaminase Activity in Plant Tissue. *Plant Physiology* **84**:972-974.
- Iorio RA, Di Sandro A, Paris R, Pagliarani G, Tartarini S, Ricci G, Serafini-Fracassini D, Verderio E, Del Duca S. 2012. Simulated environmental criticalities affect transglutaminase of *Malus* and *Corylus* pollens having different allergenic potential. *Amino Acids* **42**:1007-1024.
- Kanny G, Moneret-Vautrin D-A, Flabbee J, Beaudouin E, Morisset M, Thevenin F. 2001. Population study of food allergy in France☆. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **108**:133-140.
- Katelaris CH. 2010. Food allergy and oral allergy or pollen-food syndrome. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* **10**:246-251.
- King GJ et al. 2000. Quantitative genetic analysis and comparison of physical and sensory descriptors relating to fruit flesh firmness in apple (*Malus pumila* Mill.). *Theoretical and Applied Genetics* **100**:1074-1084.
- Knekt P, Isotupa S, Rissanen H, Heliövaara M, Järvinen R, Häkkinen S, Aromaa A, Reunanen A. 2000. Quercetin intake and the incidence of cerebrovascular disease. *European Journal of Clinical Nutrition* **54**:415-417.
- Knekt P, Jarvinen R, Reunanen A, Maatela J. 1996. Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: a cohort study. *BMJ* **312**:478-481.
- Kondo Y, Urisu A. 2009. Oral Allergy Syndrome. *Allergology International* **58**:485-491.
- Landgraf A, Reckmann B, Pingoud A. 1991. Quantitative analysis of polymerase chain reaction (PCR) products using primers labeled with biotin and a fluorescent dye. *Analytical Biochemistry* **193**:231-235.
- Le Marchand L, Murphy SP, Hankin JH, Wilkens LR, Kolonel LN. 2000. Intake of Flavonoids and Lung Cancer. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* **92**:154-160.

Litzman J, Kuklínek P, Rybníček O. 2001. Alergologie a klinická imunologie. Vydavatelství IDVPZ, Brno.

Livak KJ, Flood SJA, Marmaro J, Giusti W, Deetz K. 1995. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *Genome Research* **4**:357-362.

Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* **25**:402-408.

Logan J, Edwards KJ. 2009. Real-time PCR: current technology and applications. Caister Academic Press, Norfolk.

Ma Y et al. 2006. Characterization of recombinant Mal d 4 and its application for component-resolved diagnosis of apple allergy. *Clinical & Experimental Allergy* **36**:1087-1096.

Maliepaard C et al. 1998. Aligning male and female linkage maps of apple (*Malus pumila* Mill.) using multi-allelic markers. *Theoretical and Applied Genetics* **97**:60-73.

McKenna ST, Vidali L, Hepler PK. 2004. Profilin inhibits pollen tube growth through actin-binding, but not poly-l-proline-binding. *Planta* **218**:906-915.

Meijer HJG, Munnik T. 2003. Phospholipid-based signaling in plants. *Annual Review of Plant Biology* **54**:265-306.

Munnik T, Meijer HJG. 2001. Osmotic stress activates distinct lipid and MAPK signalling pathways in plants. *FEBS Letters* **498**:172-178.

Nesrsta D, Jan T. 2016. Ovoce 2016: Přehled odrůd ovoce, 1. Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Brno, Národní odrůdový úřad, Brno.

Nesrsta D. 2011. Jádroviny: přes 160 barevných fotografií a popisů odrůd jádrovín. Petr Baštan, Olomouc.

Oh DH, Song KJ, Shin YU, Chung W-I. 2000. Isolation of a cDNA Encoding a 31-kDa, Pathogenesis-related 5/thaumatin-like (PR5/TL) Protein Abundantly Expressed in Apple Fruit (*Malus domestica* cv. Fuji). *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **64**:355-362.

Pagliarani G, Paris R, Arens P, Tartarini S, Ricci G, Smulders MJM, van de Weg WE. 2013. A qRT-PCR assay for the expression of all Mal d 1 isoallergen genes. *BMC Plant Biology* **13**:51.

Pagliarani G, Paris R, Tartarini S, Sansavini S. 2015. Cloning and expression of the major allergen genes in apple fruit. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology* **84**:176-181.

- Paris R, Pagliarani G, Savazzini F, Aloisi I, Iorio RA, Tartarini S, Ricci G, Del Duca S. 2017. Comparative analysis of allergen genes and pro-inflammatory factors in pollen and fruit of apple varieties. *Plant Science* **264**:57-68.
- Perkins JR, Dawes JM, McMahon SB, Bennett DLH, Orengo C, Kohl M. 2012. ReadqPCR and NormqPCR: R packages for the reading, quality checking and normalisation of RT-qPCR quantification cycle (Cq) data. *BMC Genomics* **13**:1-8.
- Petrů V. 2012. *Dětská alergologie*. Mladá fronta, Praha.
- Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* **29**:45e-45.
- Radauer C, Hoffmann-Sommergruber K. 2003. Profilins. 105-124 in *Plant Food Allergens*. Blackwell Publishing, Oxford, UK.
- Ramachandran S, Christensen HEM, Ishimaru Y, Dong C-H, Chao-Ming W, Cleary AL, Chua N-H. 2000. Profilin Plays a Role in Cell Elongation, Cell Shape Maintenance, and Flowering in Arabidopsis. *Plant Physiology* **124**:1637-1647.
- Ricci G, Righetti F, Menna G, Bellini F, Miniaci A, Masi M. 2005. Relationship between Bet v 1 and Bet v 2 specific IgE and food allergy in children with grass pollen respiratory allergy. *Molecular Immunology* **42**:1251-1257.
- Ricci G et al. 2010. Allergenicity of different apple cultivars assessed by means of skin prick test and sensitisation to recombinant allergens Mal d 1 and Mal d 3 in a group of Italian apple-allergic patients **45**:1517-1523.
- Rodriguez-Perez R, Crespo JF, Rodríguez J, Salcedo G. 2003a. Profilin is a relevant melon allergen susceptible to pepsin digestion in patients with oral allergy syndrome. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **111**:634-639.
- Rodriguez-Perez R, Fernandez-Rivas M, Gonzalez-Mancebo E, Sanchez-Monge R, Diaz-Perales A, Salcedo G. 2003b. Peach profilin: cloning, heterologous expression and cross-reactivity with Bet v 2. *Allergy* **58**:635-640.
- Ryu SB. 2004. Phospholipid-derived signaling mediated by phospholipase A in plants. *Trends in Plant Science* **9**:229-235.
- Sancho AI et al. 2006. Effect of Postharvest Storage on the Expression of the Apple Allergen Mal d 1. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**:5917-5923.
- Sanz ML, Blázquez AB, Garcia BE. 2011. Microarray of allergenic component-based diagnosis in food allergy. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* **11**:204-209.

- Serafini-Fracassini D, Del Duca S. 2008. Transglutaminases: Widespread Cross-linking Enzymes in Plants. *Annals of Botany* **102**:145-152.
- Schaloske RH, Dennis EA. 2006. The phospholipase A2 superfamily and its group numbering system. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* **1761**:1246-1259.
- Schlüter K, Jockusch BM, Rothkegel M. 1997. Profilins as regulators of actin dynamics. *Biochimica et Biophysica Acta* **1359**:97-109.
- Schmittgen TD, Livak KJ. 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols* **3**:1101-1108.
- Schneeberger C, Speiser P, Kury F, Zeillinger R. 1995. Quantitative Detection of Reverse Transcriptase-PCR Products by Means of a Novel and Sensitive DNA Stain. *Genome Research* **4**:234-238.
- Sus J. 1992. Ovoce slovem i obrazem: jádroviny, peckoviny, skořápkoviny, bobuloviny a netradiční druhy ovoce. Vysoká škola zemědělská, Praha.
- Sus J. 2000. Obrazový atlas jádrovin: novější a vybrané starší odrůdy jabloní a hrušní. Květ, Praha.
- Špičák V, Panzner P. 2004. Alergologie. Galén, Praha.
- Testerink C, Munnik T. 2005. Phosphatidic acid: a multifunctional stress signaling lipid in plants. *Trends in Plant Science* **10**:368-375.
- Tyagi S, Kramer FR. 2012. Molecular beacons in diagnostics. *F1000 Medicine Reports* **4**:10.
- van Loon LC, Rep M, Pieterse CMJ. 2006. Significance of Inducible Defense-related Proteins in Infected Plants. *Annual Review of Phytopathology* **44**:135-162.
- van Ree R, Fernández-Rivas M, Cuevas M, van Wijngaarden, M, Aalberse RC. 1995. Pollen-related allergy to peach and apple: An important role for profilin. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **95**:726-734.
- Vance DE, Vance JE. 2002. *Biochemistry of lipids, lipoproteins, and membranes*, 4th ed. Elsevier, Boston.
- Vanek-Krebitz M, Hoffmann-Sommergruber K, Machado MLD, Susani M, Ebner C, Kraft D, Scheiner O, Breiteneder H. 1995. Cloning and Sequencing of Mal d 1, the Major Allergen from Apple (*Malus domestica*), and Its Immunological Relationship to Bet v 1, the Major Birch Pollen Allergen. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **214**:538-551.

- VanGuilder HD, Vrana KE, Freeman WM. 2008. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *BioTechniques* **44**:619-626.
- Velasco R et al. 2010. The genome of the domesticated apple (*Malus × domestica* Borkh.). *Nature Genetics* **42**:833-839.
- Viehweger K., Dordschbal, B., Roos, W. 2002. Elicitor-Activated Phospholipase A2 Generates Lysophosphatidylcholines That Mobilize the Vacuolar H Pool for pH Signaling via the Activation of Na⁻-Dependent Proton Fluxes. *The plant cell* **14**:1509-1525.
- Vieths S, Jankiewicz A, Schöning B, Aulepp H. 1994. Apple allergy: the IgE-binding potency of apple strains is related to the occurrence of the 18-kDa allergen. *Allergy* **49**:262-271.
- Vysloužil J. 2015. Databáze odrůd ovocných dřevin. Available from http://jirivyslouzil.cz/databaze_ovoce/jonagored-supra-2/ (accessed March 2019).
- Wang X, Devaiah S, Zhang W, WELTI R. 2006. Signaling functions of phosphatidic acid. *Progress in Lipid Research* **45**:250-278.
- Yamamoto T, Kimura T, Saito T, Kotobuki K, Matsuta N, Liebhard R, Gessler C, van de Weg WE, Hayashi T. 2004. Genetic linkage maps of Japanese and European pears aligned to the apple consensus map. *Acta Horticulturae* **663**:51-56.
- Zuidmeer L et al. 2008. The prevalence of plant food allergies: A systematic review. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **121**:1210-1218.
- Zunová T. 2018. Expres isoalergenů Mal d 1 ve slupce a dužnině jablek u plodů získaných z obchodních řetězců v České republice. Diplomová práce. Praha. 107 s. ČZU v Praze. Vedoucí práce doc. Dr. Ing. Pavel Vejl.

9 Seznam použitých zkratek

cPLA ₂	cytosolické fosfolipázy A ₂
Cq	quantification cycle
Ct	cycle threshold
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dsDNA	dvouřetězcová deoxyribonukleová kyselina
IgE	imunoglobulin E
IgG	imunoglobulin G
iPLA ₂	intercelulární fosfolipázy A ₂
LG	Linkage Group
LTP	Lipid Transfer Protein
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
OAS	orální alergický syndrom
PAF-AH	krevní destičky aktivující faktor acetylhydrolázy
PCR	polymerázová řetězová reakce
PL	fosfolipázy
PLA	fosfolipázy A
PLB	fosfolipázy B
PLC	fosfolipázy C
PLD	fosfolipázy D
PR-proteiny	Pathogenesis-Related Proteins
RCF	relativní centrifugační zrychlení
RNA	ribonukleová kyselina
RNáza	ribonukleóza
qRT-PCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase
sPLA ₂	sekretované fosfolipázy A ₂
TGase	transglutamináza
TLP	Thaumatins-Like Proteins

UV

ultrafialové