

Výzkumný a šlechtitelský ústav ovocnářský Holovousy s.r.o.

Česká zemědělská univerzita v Praze

Selekce jabloní v rané vývojové fázi s využitím molekulárních markerů

Radek Vávra a kol.



CERTIFIKOVANÁ METODIKA

2015

©Výzkumný a šlechtitelský ústav ovocnářský Holovousy s.r.o.

Autorský kolektiv:

Výzkumný a šlechtitelský ústav ovocnářský Holovousy s.r.o.

Ing. Radek Vávra, Ph.D., Ing. Ivona Žďárská, Ing. Veronika Kadlecová Ph.D., Ing. Jan Blažek
CSc.

Česká zemědělská univerzita v Praze

doc. Dr. Ing. Pavel Vejl, Ing. Petr Sedlák, Ph.D., Mgr. Martina Melounová Ph.D.

Název: Selekce jabloní v rané vývojové fázi s využitím molekulárních markerů

Vydal: Výzkumný a šlechtitelský ústav ovocnářský Holovousy s.r.o.

Holovousy 129, 508 01 Hořice

Vyšlo v roce 2015

Vydáno bez jazykové úpravy.

Kontakt na vedoucího autorského kolektivu: vavra@vsuo.cz

Foto: Radek Vávra

Oponentní posudky vypracovali:

Státní správa: Ing. Josef Vačkář, Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský

Odborný oponent: doc. Dr. Ing. Jaroslav Salava, Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.

Metodika je výsledkem řešení projektu Ministerstva zemědělství ČR číslo QH81142 Sloupcové jabloně s odolností proti chorobám. V průběhu zpracování metodiky byla rovněž využita infrastruktura projektu CZ.1.05/2.1.00/03.0116.

Ministerstvo zemědělství schválilo publikaci jako certifikovanou metodiku a doporučilo ji pro využití v zemědělské praxi. Publikaci bylo uděleno Osvědčení číslo 69248/2015-MZE-17221 v souladu s podmínkami „Metodiky hodnocení výsledků výzkumu a vývoje“.

©Výzkumný a šlechtitelský ústav ovocnářský Holovousy s.r.o., 2015

ISBN 978-80-87030-43-1

OBSAH

ABSTRAKT	4
ABSTRACT	4
1. ÚVOD.....	5
2. CÍL METODIKY	7
3. VLASTNÍ POPIS METODY	8
3.1. Selekce hybridních semenáčků pomocí umělé infekce patogenem <i>Venturia inaequalis</i> v raných vývojových fázích	8
3.2. Selekce pomocí molekulárních markerů.....	9
3.2.1. Molekulární markery <i>Co</i> genu řídícího sloupcový růst jabloní.....	9
3.2.2. Molekulární markery genů <i>Md-ACO1</i> a <i>Md-ACS1</i> ovlivňujících měknutí plodů jabloní	11
3.2.3. Molekulární marker lokusu <i>MdMYB10</i> , zodpovědného za červené zbarvení dužniny plodů jabloní	14
3.2.4. Molekulární markery lokusů <i>MdMYBA</i> a <i>BC226-STS</i> , zodpovědných za červené zbarvení slupky plodů jabloní	15
3.2.5. Molekulární marker genu <i>PI1</i> , řídící rezistenci vůči padlí jabloňovému	18
3.2.6. Molekulární QTL marker lokusu <i>FBF7</i> , asociovaný s odolností vůči spále růžovitých	19
3.2.7. Molekulární markery genů řídících rezistenci vůči strupovitosti	22
3.2.8. Molekulární markery predikující náchylnost vůči kroužkovité hniliobě plodů	33
3.2.9. Systém Multiplex-PCR pro detekci SSR markerů vybraných znaků.....	34
4. SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ.....	39
5. POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY	39
6. EKONOMICKÉ ASPEKTY	39
7. SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY.....	40
8. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE	43
9. PŘÍLOHY.....	43

ABSTRAKT

Mezi aktuální šlechtitelské cíle u jabloní patří vysoká kvalita plodů, dobré pěstitelské vlastnosti a trvalá rezistence vůči chorobám jako je strupovitost jabloně (původce *Venturia inaequalis*), padlý jabloňové (původce *Podosphaera leucotricha*) a bakteriální spála růžovitých (původce *Erwinia amylovora*) (Kellerhals *et al.* 2008). Vyšlechtění nové odrůdy ovšem představuje velmi zdlouhavý a náročný proces. Kombinací klasického šlechtění a poznatků z rostlinné genomiky můžeme dosáhnout značného zjednodušení tohoto procesu. Předkládaná metodika se zabývá začleněním molekulárních metod, konkrétně MAS (Marker-Assisted Selection), do selekce jabloní v raných vývojových fázích. MAS slouží k identifikaci hybridních semenáčků, vzniklých záměrným křížením a nesoucích alely pro požadovaný fenotypový projev, prostřednictvím markerů, které jsou v těsné vazbě s těmito znaky (Banchi *et al.* 2013). Selekcí pomocí molekulárních markerů je možné vybírat hybridní semenáče z provedeného řízeného křížení již v prvním roce vegetace, což může podstatně urychlit šlechtitelský proces a snížit náklady selekce. Z toho důvodu se MAS stala velmi významným nástrojem šlechtitelů na celém světě.

ABSTRACT

The current breeding objectives for apples are high quality of fruits, good agronomic characteristic and durable resistance against diseases such as apple scab (*Venturia inaequalis*), powdery mildew (*Podosphaera leucotricha*) and fire blight (*Erwinia amylovora*) (Kellerhals *et al.* 2008). However, breeding of new cultivar is a very long and difficult process. With the combination of classical breeding and knowledge of plant genomics it can be achieved a significant simplification of this process. Submitted methodology focuses on integration of molecular methods, namely MAS (Marker-Assisted Selection), into the early selection of apple trees. Marker-Assisted Selection is used to identify hybrid seedlings originated from controlled crosses and carrying alleles for the requested phenotype through markers that are closely linked with these traits (Banchi *et al.* 2013). Through selection using molecular markers seedlings can be selected already in a first year of vegetation which can considerably speed up breeding process and reduce costs. Consequently MAS has become a very important tool for breeders all over the world.

1. ÚVOD

Jabloně patří v České republice rozlohou pěstitelských ploch a objemem produkce mezi nejpěstovanější ovocný druh. V rámci vysoké produkce je však nutné udržovat i vysokou tržní kvalitu plodů. V oblasti pěstování ovocných druhů dochází neustále ke změnám ze strany poptávky spotřebitelů i v pěstebních podmínkách (výkyvy počasí, výskyt nových patogenů a škůdců, intenzifikace pěstování). Důležitým úkolem šlechtitelů je dosáhnout u nových odrůd vlastností a znaků odpovídajících aktuálním požadavkům trhu a potřebám pěstitelů. Značnou překážku však představuje velmi dlouhá doba potřebná pro vyšlechtění nové odrůdy. Vhodným doplněním klasického šlechtění (fenotypového hodnocení) je zařazení MAS (marker-assisted selection – selekce s využitím molekulárních markerů) do procesu šlechtění. Využití molekulárních markerů jako doplněk pro selekci nově vzniklých hybridů v rané vývojové fázi při řízeném křížení nebo pro hodnocení stávající kolekce šlechtitelského materiálu, představuje usnadnění a zkrácení doby potřebné pro vyhodnocení stálosti vlastností daného perspektivního hybridu. V současné době se šlechtitelé zaměřují na šlechtění rezistentních odrůd především kvůli vysokým finančním ztrátám pěstitelů v důsledku významných chorob jádrovin jako je strupovitost jabloně, padlí jabloňové nebo bakteriální spála růžovitých a též kvůli potřebě snižování použití chemických přípravků v integrované produkci. Přítomnost genů, řídících rezistence vůči těmto chorobám, je detekovatelná pomocí různých molekulárních markerů. DNA markery jsou vyvinuty i pro další ekonomicky významné znaky jabloní jako je sloupcový růst, červená barva dužniny, barva slupky plodů a měknutí dužniny.

Jednou z nejzávažnějších chorob jabloní je strupovitost jabloně, která je způsobena patogenem *Venturia inaequalis*. Odolnost jabloní vůči této chorobě je podmíněna přítomností určitých genů rezistence. Ve šlechtění nových odrůd jsou nejčastěji využívány lokusy *Rvi6* a *Rvi7*, jejichž donorem je *Malus floribunda* klon 821, avšak tyto lokusy jsou v současnosti již překonané novými rasami patogena. Dalšími využívanými lokusy jsou *Rvi2* (donorem je semenáč R12740-7A klon TSR34T15), *Rvi4* (donorem je semenáč R12740-7A klon TSR33T239; nositelem je například odrůda 'Regia'), *Rvi5* (donorem je semenáč 9-AR2T193), *Rvi8* (donorem je klon GMAL3631-W193B), *Rvi9* (donorem je odrůda 'Dolgo'), *Rvi10* (donorem je Antonovka PI172623; nositelem je například odrůda 'Angold'), *Rvi13* (donorem je odrůda 'Durello di Forlì'), *Rvi14* (donorem je odrůda 'Dülmener Rosen'), *Rvi15* (donorem je klon GMAL2473) (Jha *et al.* 2009). Na začátku procesu šlechtění nových odrůd se u semenáčků vzniklých zámrným křížením vybraných rodičovských komponent dělají primární selekce na odolnost pomocí umělých infekcí patogenem *V. inaequalis*. Následně se u vybraných jedinců provedou detekce přítomnosti genů rezistence s využitím molekulárních markerů. Využití molekulárních markerů je rovněž nezbytné při tvorbě pyramidální rezistence, vzhledem k tomu, že detekce kumulace genů rezistence k jednomu patogenu by byla velmi obtížná jen na základě fenotypového projevu po infekci (Peil *et al.* 2008).

Další chorobou u jabloní je padlí jabloňové způsobené patogenem *Podosphaera leucotricha*. Rezistence vůči této chorobě je řízena několika majorgeny, nejvíce je využívaný gen *Pl1*

původem z botanického druhu *Malus robusta* (Markussen *et al.* 1995). Dále jsou využívány později identifikované geny *Pl-d* (Visser a Verhaegh 1977), *Pl-m* (Dayton 1977) nebo gen *Pl-w* z asijské odrůdy 'White Angel' (Gallot *et al.* 1985). Částečnou odolnost vůči chorobě mohou vykazovat i odrůdy bez výskytu majorgenů na základě přítomnosti souboru minorgenů. Za zdroje s polygenně řízenou rezistencí se označují odrůdy 'Worcester Pearmain', 'Golden Delicious' a 'Lord Lambourne' (Bergendal a Nybom 1966). Zajímavé informace přineslo porovnávání sekvencí v oblasti *Pl1* genu se sekvencemi rodu *Malus*, kdy nejvyšší maximální podobnost byl zjištěna se sekvencí, která odpovídá genu pro flavonoid 3'hydroxylázu. Mezi geny syntetizujícími flavonoidy (jako je například gen *MdMYB10*) a rezistencí vůči padlí mohou tedy existovat určité souvislosti. Nasvědčoval by tomu i fakt, že někteří kříženci *M. robusta* jsou současně donory *Pl1* genu i *MdMYB10* genu.

U choroby bakteriální spála růžovitých, která je způsobena bakterií *Erwinia amylovora*, nebyla monogenní rezistence zjištěna. Byli však identifikovány QTL (quantitative trait loci) asociované s odolností vůči spále. Rezistenci vůči spále vykazují některé klony *Malus robusta* a *Malus fusca* a odrůdy 'Splendor' a 'Winesap' (Bassil a Lewers 2009). Za vysoce rezistentní jsou považovány i odrůdy 'Prima', 'Priscilla', 'Enterprise' a 'Liberty' (Janick *et al.* 1996). Donory některých již existujících molekulárních markerů jsou odrůdy 'Kidd's Orange Red', 'Starking Delicious', 'Rubinola', 'Fiesta' a 'Cox's Orange Pipin' (Khan *et al.* 2007).

Sloupcový růst u jabloní je řízen dominantní alelou *Co* (recesivní homozygot *coco* má standardní růst; heterozygot *Coco* má kolumnární růst) (Lapins 1974). Donorem genu *Co* je mutant odrůdy 'McIntosh', která byla pojmenována 'McIntosh Wijcik'. Rozpoznat sloupcový růst u hybridních semenáčků je velmi obtížné, proto je pro provedení včasné a přesné selekce velmi vhodné využít molekulární marker. Problémem však zůstává, že molekulární markery pro sloupcový růst jsou vazbové (nejsou přímo v genu, jsou s ním jen ve vazbě) a je možná jejich rekombinace (výskyt markerů u genotypů s normálním růstem nebo naopak absence markerů u genotypů se sloupcovým růstem). Před aplikací těchto markerů je tedy nezbytné vyloučit možnost výskytu kombinací markerujících alel s nemutovanou recesivní alelou *co*.

Na měknutí dužniny se ve velké míře podílí fytohormon etylén, který je u vyšších rostlin syntetizován dvěma enzymaticky katalyzovanými kroky. Prekurzorem etylénu je S-adenosyl-L-methionin (SAM). V prvním kroku ACC-syntáza (ACS) cyklizuje SAM na 1-aminocyklopropan-1-karboxylovou kyselinu (ACC). Ve druhém kroku dochází v důsledku působení ACC-oxidázy (ACO) k oxidativní přeměně ACC na etylén (Kende 1993). Tvorba ACS je u jabloní řízena lokusem *Md-ACS1*, který může nést dvě alely a to původní s normální transkripční aktivitou a mutovanou (s inzercí v promotoru) s nízkou transkripční aktivitou (Sunako *et al.* 1999). Podobně tvorba ACO je řízena lokusem *Md-ACO1*, který může nést dvě alely, u jedné z alel došlo k deleci v promotorové oblasti genu a je rovněž zodpovědná za sníženou produkci etylénu (Costa *et al.* 2005). Pro včasné určení jedinců, kteří budou mít plody s pomalým měknutím dužniny je podstatná detekce mutovaných alel pomocí molekulárních markerů.

Molekulární markerování lze využít i pro včasnu determinaci jedinců s červeně zbarvenou dužninou plodů, za kterou jsou zodpovědná barviva anthokyany. Regulátorem exprese genů bisyntetické dráhy anthokyanů je MYB-třída transkripčních faktorů (Ban *et al.* 2007). U jabloně byl identifikován transkripční faktor *MdMYB10* (Chagné *et al.* 2007). Pomocí PCR markeru je detekovatelná dominantní alela *MdMYB10* genu. Typickým donorem alely zodpovědné za červené zbarvení dužniny je *M. robusta*, odrůdy s výrazně červenou dužninou jsou odvozeny od botanického druhu *M. pumila* var. *niedzwetzkyana* (Dvořák *et al.* 1976), u ní jsou však s červeným zbarvením dužniny spojené některé nežádoucí vlastnosti jako je malá velikost plodů, rychle měknoucí dužnina a trpká chut'.

Anthokyany jsou zodpovědné také za červené zbarvení slupky plodu. V rámci MAS byly identifikovány dva lokusy (Ban *et al.* 2007). Lokus *BC226-STS* může nést tři alely (a1, a2, A1). Alelické kombinace a1a1, a1a2 a a2a2 predikují základní žluté zbarvení a alelické kombinace A1A1, A1a1 a A1a2 predikují základní červené zbarvení slupky. Určení jednotlivých alel má význam při záměrném šlechtění s cílem získat například žlutoplodou odrůdu křížením dvou červenoplodých odrůd, které kromě dominantní A1 alely obsahují jednu z recessivních alel a1 nebo a2. Lokus *MdMYBA* může nést dvě alely. Alelu, která je nemutovaná a je spojena s červenou barvou slupky, alelu, která má mutaci v podobě delece a je spojena se žlutou barvou slupky. Exprese transkripčního faktoru *MdMYBA* je mnohem intenzivnější u odrůd s výraznou červenou barvou slupky a je rovněž pozitivně ovlivněna nižšími teplotami a dopadem UV-B záření, což jsou všeobecně známé faktory vedoucí k výraznějšímu vybarvování plodů jabloní (Ban *et al.* 2007).

2. CÍL METODIKY

Šlechtění ovocných druhů, tudíž i jabloní (*Malus domestica* Borkh.), je časově velmi náročné z důvodu dlouhé generační doby, potřeby prostoru pro každoroční výsadbu nových kříženců jak ve skleníkových tak v polních podmínkách, a náročné rovněž manuálně a z hlediska nákladů. Tvorba nové odrůdy zabere nejméně 15 – 20 let s vynaložením obrovských finančních prostředků (Flachowsky *et al.* 2011). Nicméně za poslední dvě desetiletí se přístupy ke zdokonalení šlechtění jabloní značně změnily, a to díky rozvoji molekulárních metod. Cílem této metodiky je zjednodušení klasického šlechtiteckého procesu s využitím molekulárních markerů pro selekci vhodných jedinců již v raných fázích vývoje. Selekcí pomocí molekulárních markerů umožňuje precizně určit požadované znaky hybridních semenáčků několik let před tím, než by bylo možné jejich hodnocení podle fenotypu v polních podmínkách. Dále umožňuje včasnu detekci hromadění různých genů rezistence v jednom genotypu a snižuje počet generací nutných pro obnovení genotypu kulturního druhu po křížení s exotickým genotypem nebo planým druhem (Dirlewanger *et al.* 2004).

3. VLASTNÍ POPIS METODY

3.1. Selekce hybridních semenáčků pomocí umělé infekce patogenem *Venturia inaequalis* v raných vývojových fázích

Rostlinný materiál

V rámci řízeného křížení je u vybraných rodičovských kombinací opylováno přibližně 200 květů (u kombinací, kde se předpokládá širší šlechtitelské využití daného potomstva je výjimečně opylován větší počet květů). Ze sklizených dozrálých plodů jsou vyluštěna semena a přes zimu stratifikována standardním postupem (stratifikace po dobu 8 týdnů při teplotě 5 °C). V únoru až březnu jsou semena vysévána do bedniček a ty umístěny do skleníku. Inokulace patogenem probíhají na semenáčcích ve fázi 2 – 4 pravých listů.

Inokulum

Směsná vodní suspenze konidií je připravena smytím konidií patogena *V. inaequalis* z lézí infikovaných listů náchylných odrůd během předchozího vegetačního období. Infikované listy by měly být odebrány z různých výsadeb, případně pěstitelských lokalit tak, aby reprezentovaly co nejširší spektrum patotypů patogena. Koncentrace vodní suspenze je upravena pomocí mikroskopu a Bürkerovy počítací komůrky na hodnotu zhruba 5×10^5 konidií $\times 1 \text{ ml}^{-1}$. Poté je možné suspenzi až do použití uchovat v mrazicím boxu při teplotě -18 °C. Před provedením umělých inokulací je po rozmrazení opět zkontrolována koncentrace konidií pod mikroskopem v Bürkerově počítací komůrce.

Průběh umělé infekce

Hybridní semenáčky ve fázi 2 – 4 pravých listů jsou inokulovány patogenem rozprášením vodní suspenze konidií na listy až do skapání ručním rozprašovačem. Inokulované semenáčky jsou udržovány v uzavřené komoře s řízenými podmínkami při teplotě 18 – 20 °C a téměř 100% relativní vzdušné vlhkosti po dobu 48 hodin. Tato doba je postačující ke vzniku infekce. Po této době jsou semenáčky přemístěny zpět do skleníku. Po 21 dnech, kdy jsou symptomy strupovitosti jabloně již dostatečně viditelné, je provedeno hodnocení fenotypového projevu napadení.

Hodnocení

Pro hodnocení projevu napadení bylo použito klasifikační bonitační stupnice (0 – 4) podle Shay and Hough 1952 (upraveno Chevalier *et al.* 1991). Semenáčky ve třídách 0 – 3a jsou považovány za rezistentní, semenáčky zařazené do tříd 3b a 4 jsou považovány za náchylné vůči strupovitosti jabloně. Semenáčky s reakcí ve třídách 0 a 1 vykazují hypersenzitivní reakci k infekcím patogenem *V. inaequalis* a jsou označovány jako skupina rezistentních jedinců R1 (vysoký stupeň rezistence). Semenáčky hodnocené ve třídách 2 a 3a, které indikují nižší stupeň rezistence, jsou označovány jako skupina rezistentních jedinců R2 (nízký stupeň rezistence). Semenáčky s reakcí ve skupině 3b a 4 jsou označovány jako náchylné a jsou označovány písmenem S (náchylné - z anglického slova susceptible).

Tabulka 1: Klasifikační bonitační stupnice pro hodnocení projevu infekce

0	žádné makroskopicky pozorovatelné symptomy (imunní reakce)
1	drobné skvrnky velikosti špendlíkových hlaviček (asi 0,5 mm v průměru, "pin-points pits"), bodové skvrny někdy splývají v nepravé 1 – 2 mm v průměru velké samostatné skvrny, nevyskytují se sporulace (hypersenzitivní reakce)
2	chlorotické nebo nekrotické skvrny, 2 - 5 mm v průměru, bez sporulace (středně resistentní reakce)
3a	třída mezi skupinami 2 a 3, směs nekrotických a chlorotických nesporulujících skvrn, několik poškození s ohraničenou sporulací (slabě rezistentní reakce)
3b	omezený výskyt nekróz, slabé, ale viditelné konidiové sporulace, poškození vytvářející nečetnou a omezenou sporulaci (nízká citlivost)
4	silný výskyt nekróz se sporulací, infikované listy předčasně opadávají, klasická poškození s velmi vysokou sporulací (vysoce citlivá reakce)

3.2. Selekcí pomocí molekulárních markerů

V předešlých letech byly optimalizovány molekulární markery řady genů, které jsou prakticky využitelné ve šlechtění jabloní. Pomocí těchto markerů je možné charakterizovat a následně selektovat požadované genotypy již v raných fázích vývoje. V této metodice jsou konkrétně popsány optimalizované markery následujících genů:

<i>Co</i>	sloupcový růst
<i>Rvi2</i>	rezistence vůči strupovitosti
<i>Rvi4</i>	rezistence vůči strupovitosti
<i>Rvi6</i>	rezistence vůči strupovitosti
<i>Rvi8</i>	rezistence vůči strupovitosti
<i>Rvi15</i>	rezistence vůči strupovitosti
<i>Pl1</i>	rezistence vůči padlý jabloňovému
<i>FBF7QTL</i>	rezistence vůči spále růžovitých
lokus	náchynost vůči <i>Botryosphaeria dithidea</i>
<i>Md-ACO1</i>	měknutí plodů
<i>Md-ACS1</i>	měknutí plodů
<i>Md-MYB</i>	červené zbarvení dužnin a slupky plodů

Markery jsou založeny na principu PCR, PCR-RFLP, SSR a SNP. Byly vyvinuty rovněž postupy multiplex PCR pro současné hodnocení většího počtu markerů s automatickým vyhodnocováním pomocí fragmentační analýzy na kapilární elektroforéze.

3.2.1. Molekulární markery *Co* genu řídícího sloupcový růst jabloní

Pro praktickou selekci na sloupcový růst jabloní jsou dobré využitelné dva vazbové markery a to SSR marker CH03d11 a marker SCAR287. Podle sestavené vazbové mapy *Co* genu u mapovací populace 'Telamon' x 'Braeburn', vykazují tyto markery nejtěsnější vazbu s genem *Co*, s chybovostí odhadnutou na 2 % (CH03d11), respektive 3,6 % (SCAR287). Problémem

vazbových markerů však zůstává možnost jejich výskytu u genotypů s normálním růstem (např. odrůda ‘Selena’) nebo naopak absence u odrůd s růstem sloupcovým, což může do určité míry omezit jejich využití v praktické selekci. Výsledky hodnocení 212 odrůd poukazují na skutečnost, že existují odrůdy s normálním růstem, které i přesto vykazují přítomnost alely 173 bp markeru CH03d11 (17,9 % odrůd) anebo alely 287 bp markeru SCAR287 (18,9 % odrůd). Tuto skutečnost je potřebné brát v úvahu a před aplikací obou markerů je nezbytné vyloučit možný výskyt rekombinací markerujících alel s nemutovanou recesivní alelou *co*.

Marker SCAR287

Tento marker je odvozený od původního markeru SCAR682 (Tian *et al.* 2005), u kterého se však vyskytovaly nespecifické amplifikace, což bylo potřeba omezit. Nově navržený marker SCAR287 je dominantní (neumožňuje vzájemně odlišit genotypy *CoCo* a *Coco*) a je poměrně jednoduše detekovatelný pomocí agarázové elektroforézy. Přítomnost dominantní alely *Co* charakterizuje fragment o velikosti 287 bp.

Tabulka 2: Primery použité k amplifikaci markeru SCAR278

Primer	Sekvence	Lokus	Délka markerujícího fragmentu	Annelační teplota
SCAR287-F	5'CGTTAAGTAACACTGCACGATGA3'	SCAR682	287 bp	59 °C
SCAR287-R	5'CCGCTGGAGAACACTAATCA3'			

Podmínky PCR amplifikace:

Složení reakční směsi (12,5 µl) pro primerový páár SCAR287-F/R: 50 ng genomové DNA; 0,7 U *Taq* polymerázy (Thermo Fisher Scientific); BSA 0,5 µg/12,5 µl; 10 mM Tris-HCl (pH 8,8); 50 mM KCl; 0,08% Nonidet P40; 1,5 mM MgCl₂; 200 µM dNTP; 0,4 µM každého z primerů; 2 mM tetramethylamonium oxalát (Top Bio).

Teplotní a časový průběh PCR: 1 cyklus počáteční denaturace 95 °C/3 min, 35 cyklů (denaturace 95 °C/30 s, annealing 59 °C/30 s, extenze 72 °C/45 s), 1 cyklus extenze 72 °C/5 min. Amplifikované PCR produkty byly separovány v 1,5% agarázovém gelu v 1xTBE pufru po dobu 90 minut. Produkty PCR byly vizualizovány ethidium bromidem.

SSR marker CH03d11

Mikrosatelitní marker CH03d11 (Liebhard *et al.* 2002) má kodominantní charakter, umožňuje tedy rozlišit homozygoty *CoCo* a heterozygoty *Coco*. Pro aplikaci tohoto markeru doporučujeme využít detekci na principu kapilární elektroforézy, která je citlivější než klasická gelová elektrofréza a dokáže zachytit i velmi malé rozdíly v počtu nukleotidů. Přítomnost dominantní alely *Co* charakterizuje amplikon o velikosti 172 bp, amplikony o velikosti 114 bp, 118 bp resp. 122 bp nejsou markerující.

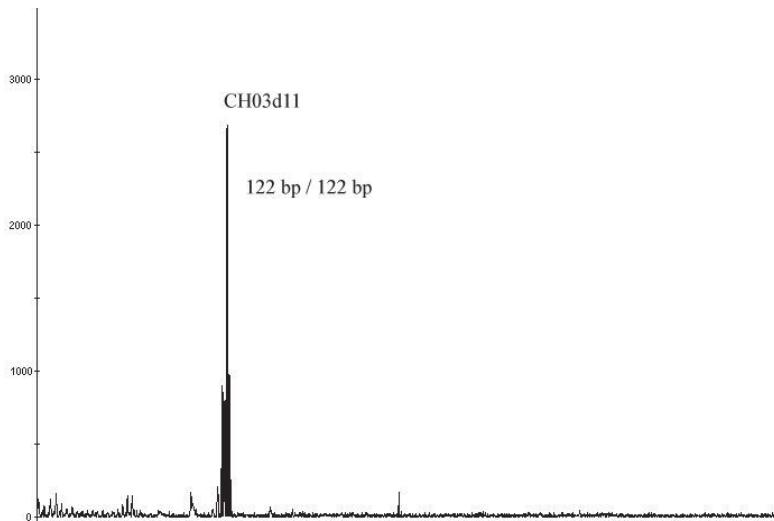
Tabulka 3: Primery použité k amplifikaci markeru CH03d11

Primer	Sekvence	Lokus	Délka markerujícího fragmentu	Annelační teplota
CH03d11-F	5'ACCCCACAGAAACCTTCTCC3'	CH03d11	172 bp	62 °C
CH03d11-R	5'CAACTGCAAGAATCGCAGAG3'			

Podmínky PCR amplifikace:

Složení reakční směsi (12,5 µl) pro primerový pár CH03d11-F/R: 50 ng genomové DNA; 0,7 U *Taq* polymerázy (Thermo Fisher Scientific); BSA 0,5 µg/12,5 µl; 75 mM Tris-HCl (pH 8,8); 20 mM (NH₄)₂SO₄; 0,01% Tween 20; 5,0 mM MgCl₂; 200 µM dNTP; 0,48 µM každého z primerů; 2 mM tetramethylamonium oxalát (Top Bio). Tepletovní a časový průběh PCR: 1 cyklus počáteční denaturace 95 °C/3 min, 35 cyklů (denaturace 95 °C/30 s, annealing 62 °C/30 s, extenze 72 °C/45 s), 1 cyklus extenze 72 °C/5 min.

Polymorfismy SSR markeru CH03d11 byly vyhodnoceny pomocí ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer (Applied BiosystemsTM) s POP-4 polymerem (Applied BiosystemsTM). Bylo použito fluorescenční značení F-primeru (CH03d11-F-NED). Pro vyhodnocení velikosti SSR alel byl použit GeneScanTM-600LIZ® Size Standard (Applied BiosystemsTM). Stanovení velikosti amplikonů bylo provedeno programem GeneMapper® ver. 4.1 (Applied BiosystemsTM).

Obrázek 1: Vzorový chromatogram mikrosatelitního markeru CH03d11

3.2.2. Molekulární markery genů *Md-ACO1* a *Md-ACS1* ovlivňujících měknutí plodů jabloní

U genu *Md-ACS1*, který je zodpovědný za biosyntézu ACC-syntázy, byla nalezena variabilita v promotorové oblasti. Alela nesoucí inzerci v promotoru byla označena jako *Md-ACS1-2* a je zodpovědná za výrazně sníženou transkripční aktivitu tohoto genu. Odrůdy s homozygotní sestavou alel *Md-ACS1-2* produkují jen velmi malé množství etylénu v porovnání s odrůdami s homozygotní sestavou původní alely *Md-ACS1-1*, která má normální transkripční aktivitu.

I u genu *Md-ACO1*, který řídí syntézu ACC-oxidázy, byla charakterizována variabilita v promotorové oblasti. Alela nesoucí tuto deleci byla označena jako *Md-ACO1-1* a byla rovněž zodpovědná za sníženou produkci etylénu. Na měknutí plodů spolupůsobí oba hodnocené geny *ACS1* i *ACO1* a statisticky bylo potvrzeno, že mutace genu *Md-ACS1* působí na snížení produkce etylénu výrazně intenzivněji oproti mutaci genu *Md-ACO1*.

Pro selekci genotypů s předpokládanou sníženou produkcí etylénu byly navrženy PCR markery detekující inzerci v lokusu *Md-ACS1* a deleci v lokusu *Md-ACO1*. V hodnocených genotypech se můžou vyskytovat různé kombinace obou těchto markerů. Například obě kauzální mutace v lokusech *Md-ACO1* i *Md-ACS1* byly detekovány u odrůdy 'Fuji', pro kterou je typické pomalé měknutí plodů. Homozygotní sestava mutované alely pouze v lokusu *Md-ACO1* byla detekována u odrůd 'Meteor' a 'Red Delicious'. Homozygotní sestava mutované alely pouze v lokusu *Md-ACS1* byla detekována u odrůd 'Gala', 'Gloster', 'Gold Bohemia', 'Melrose', 'Rubín', 'Rubinstep' a 'Rucla'.

Marker *Md-ACS1*

Přítomnost inzerce v lokusu *Md-ACS1* byla detekována pomocí kodominantního PCR markeru (Sunako *et al.* 1999). Alela s normální transkripční aktivitou je charakterizována přítomností fragmentu o velikosti 489 bp, mutovaná alela s omezenou transkripční aktivitou je určena přítomností fragmentu o velikosti 655 bp. Při amplifikaci dochází k vytvoření rovněž dalšího nespecifického fragmentu o velikosti kolem 590 bp, který však nemá žádný vliv na úspěšnou detekci obou markerujících fragmentů.

Tabulka 4: Primery použité k amplifikaci markeru *Md-ACS1-CZU*

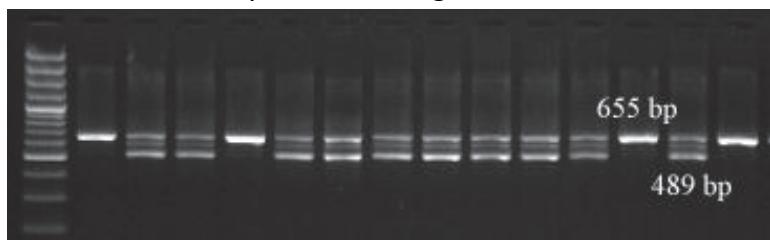
Primer	Sekvence	Lokus	Délka markerujícího fragmentu	Annelační teplota
ACS1-5'F	5'AGAGAGATGCCATTGGTTCGTAC3'	Md-ACS1	655 bp	60 °C
ACS1-5'R	5'CCTACAAACTGCGTGGGGATTATAAGTGT3'		489 bp	

Podmínky PCR amplifikace:

Složení reakční směsi (25 µl) pro primerový páru ACS1-5'-F/R: 50 ng genomové DNA; 1 x PCR pufr (Thermo Fisher Scientific); 2,5 mM MgCl₂; 200 µM dNTP; 0,2 µM každého z primerů; 1,2 U *Taq* polymerázy (Thermo Fisher Scientific). Teplotní a časový průběh PCR: 1 cyklus počáteční denaturace 94 °C/3 min, 35 cyklů (denaturace 94 °C/30 s, annealing 60 °C/1 min, extenze 72 °C/2 min), 1 cyklus extenze 72 °C/10 min.

Amplifikované PCR produkty byly separovány v 1,5% agarózovém gelu v 1xTBE pufru po dobu 90 minut. Produkty PCR byly vizualizovány ethidium bromidem.

Obrázek 2: Vzorový elektroforeogram kodominantního markeru Md-ACS1-CZU



Marker Md-ACO1-CZU

Experimentálně bylo zjištěno, že původně navržený PCR marker pro detekci delece v lokusu *Md-ACO1* (Costa *et al.* 2005) vykazoval nespecifické amplifikace. Proto byl navržený nový PCR marker a označen jako Md-ACO1-CZU. Alela s normální transkripční aktivitou je charakterizována přítomností fragmentu o velikosti 512 bp, mutovaná alela s omezenou transkripční aktivitou je určena přítomností fragmentu o velikosti 450 bp.

Tabulka 5: Primery použité k amplifikaci markeru Md-ACO1-CZU

Primer	Sekvence	Lokus	Délka markerujícího fragmentu	Annelační teplota
CZU-ACO1-F	5'CCAGTTACCCGACTACCCATT3'	Md-ACO1	450 bp	63,4 °C
CZU-ACO1-R	5'TTCAAATCTTGGCTCCTTGG3'		512 bp	

Podmínky PCR amplifikace:

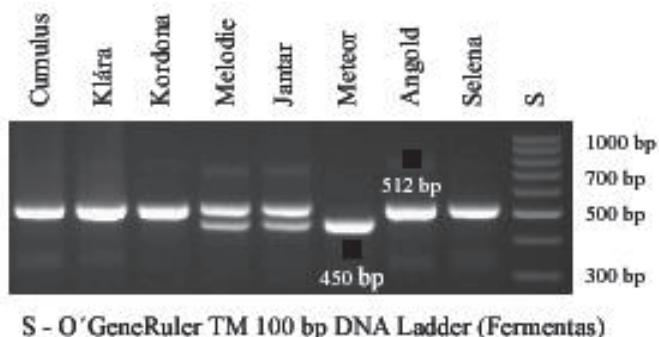
Složení reakční směsi (12,5 µl) pro primerový páár CZU-ACO1-F/R: 50 ng genomové DNA; 0,7 U *Taq* polymerázy (Thermo Fisher Scientific); BSA 0,5 µg/12,5 µl; 10 mM Tris-HCl (pH 8,8); 50 mM KCl; 0,08% Nonidet P40; 1,5 mM MgCl₂; 200 µM dNTP; 0,4 µM každého z primerů; 4 mM tetramethylamonium oxalát (Top Bio).

Teplotní a časový průběh PCR: 1 cyklus počáteční denaturace 95 °C/3 min, 35 cyklů (denaturace 95 °C/30 s, annealing 63,4 °C/50 s, extenze 72 °C/50 s), 1 cyklus extenze 72 °C/10 min. Amplifikované PCR produkty byly separovány v 1,5% agarázovém gelu v 1xTBE pufru po dobu 90 minut. Produkty PCR byly vizualizovány ethidium bromidem.

Obrázek 3: Vzorový elektroforeogram kodominantního markeru Md-ACO1-CZU



Obrázek 4: Vzorový elektroforeogram kodominantního markeru Md-ACO1-CZU u vybraných odrůd jabloní



S - O'GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder (Fermentas)

3.2.3. Molekulární marker lokusu *MdMYB10*, zodpovědného za červené zbarvení dužniny plodů jabloní

Na červeném zbarvení dužniny u plodů jabloní se podílí gen *MdMYB10*, který patří do MYB-třídy transkripčních faktorů regulujících exprese genů biosyntetické dráhy anthokyanů. Pro selekci genotypů s červeně zbarvenou dužninou byl navržen dominantní PCR marker, pomocí kterého lze detektovat dominantní alelu genu *MdMYB10* (Chagné *et al.* 2007). Přítomnost markeru je charakterizována fragmentem o velikosti 786 bp.

Tabulka 6: Primery použité k amplifikaci markeru *MdMYB10*

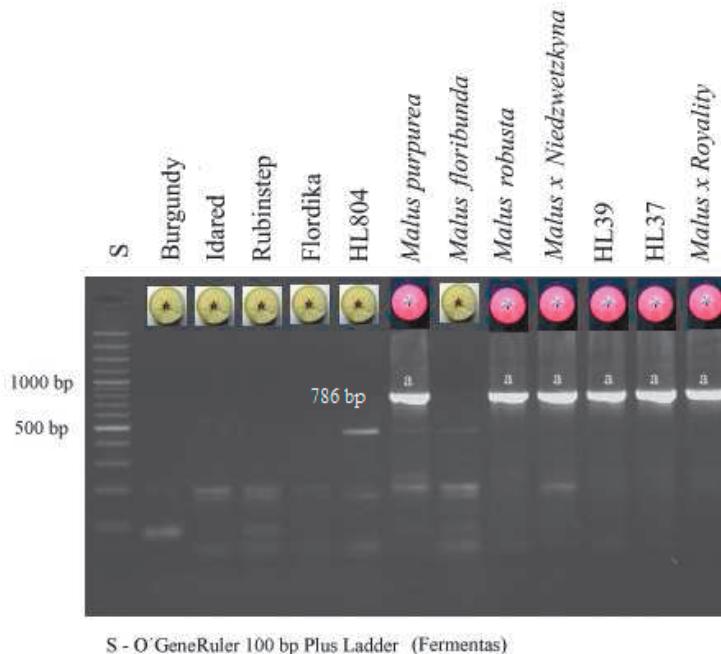
Primer	Sekvence	Lokus	Délka markerujícího fragmentu	Annelační teplota
MdMYB10-F	5'CGAGTGCTAACAGCAACC3'	MdMYB10	786 bp	55,7 °C
MdMYB10-R	5'CCTCTGTTGGCCGAATACAC3'			

Podmínky PCR amplifikace:

Složení reakční směsi (12,5 µl) pro primerový pár MdMYB10-F/R: 50 ng genomové DNA; 0,5 U *Taq* polymerázy (Thermo Fisher Scientific); BSA 0,5 µg/12,5 µl; 10 mM Tris-HCl (pH 8,8); 50 mM KCl; 0,08% Nonidet P40; 1,3 mM MgCl₂; 100 µM dNTP; 0,2 µM každého z primerů; 2,4 mM tetramethylamonium oxalát (Top Bio).

Teplotní a časový průběh PCR: 1 cyklus počáteční denaturace 94 °C/2 min 45 s, 40 cyklů (denaturace 94 °C/55 s, annealing 55,7 °C/55 s, extenze 72 °C/1 min 39 s), 1 cyklus extenze 72 °C/10 min. Amplifikované PCR produkty byly separovány v 1,5% agarázovém gelu v 1xTBE pufru po dobu 90 minut. Produkty PCR byly vizualizovány ethidium bromidem.

Obrázek 5: Vzorový elektroforeogram dominantního markeru *MdMYB10* u vybraných genotypů jabloní



3.2.4. Molekulární markery lokusů *MdMYBA* a *BC226-STS*, zodpovědných za červené zbarvení slupky plodů jabloní

Gen *MdMYBA* stejně jako *MdMYB10* patří do MYB-třídy transkripčních faktorů a také jejich translační produkty jsou si sekvenčně podobné. Lokus *MdMYBA* může nést dvě alely: dominantní alelu a odpovídající nezmutované sekvenci *MdMYBA*, která vytváří původní formu transkripčního faktoru spojenou s červenou barvou slupky a recesivní alelu b, u které došlo k mutaci v podobě delece a je spojena se žlutou barvou slupky. U lokusu *BC226-STS* byly identifikovány tři alely (a1, a2, A1), které se vzájemně odlišují několika inzercemi a delecemi. Recesivní homozygoti (alelické kombinace a1a1, a1a2 a a2a2) vykazují žluté zbarvení slupky, zatímco dominantní homozygoti nebo heterozygoti (alelické kombinace A1A1, A1a1 a A1a2) vykazují červené zbarvení slupky. Odrůdy se zelenou barvou slupky, jako například 'Granny Smith', však tento marker detektovat neumožňuje.

Marker *MdMYBA*

Pro selekci genotypů s červeně zbarvenou slupkou byl navržen kodominantní PCR marker, pomocí kterého lze detektovat červeno-žlutý polymorfismus barvy slupky jabloní (Ban *et al.* 2007). Pomocí navržených primerů dochází k amplifikaci dvou fragmentů. Nemutovanou alelu, charakterizující červené zbarvení slupky, definuje fragment o velikosti 732 bp. Mutovanou alelu, charakterizující žluté zbarvení slupky, definuje fragment o velikosti 656 bp.

Tabulka 7: Primery použité k amplifikaci markeru MdMYBA

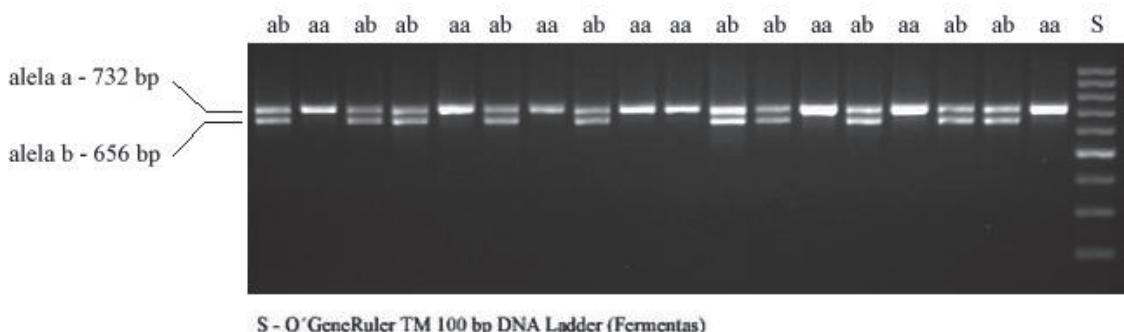
Primer	Sekvence	Lokus	Délka markerujícího fragmentu	Annelační teplota
MdMYBA-F	5'ATTCTAGGTGTCTTCTGGAGTGTA3'	MdMYBA	732 bp	63,5 °C
MdMYBA-R	5'AGGTCCAATTCGTACAATG3'		656 bp	

Podmínky PCR amplifikace:

Složení reakční směsi (12,5 µl) pro primerový pár MdMYBA-F/R: 50 ng genomové DNA; 0,7 U *Taq* polymerázy (Thermo Fisher Scientific); BSA 0,5 µg/12,5 µl; 10 mM Tris-HCl (pH 8,8); 50 mM KCl; 0,08% Nonidet P40; 1,5 mM MgCl₂; 200 µM dNTP; 0,4 µM každého z primerů; 4 mM tetramethylammonium oxalát (Top Bio).

Teplotní a časový průběh PCR: 1 cyklus počáteční denaturace 95 °C/3 min 10 s, 30 cyklů (denaturace 94 °C/30 s, annealing 63,5 °C/50 s, extenze 72 °C/50 s), 1 cyklus extenze 72 °C/10 min. Amplifikované PCR produkty byly separovány v 1,5% agarázovém gelu v 1xTBE pufru po dobu 60 minut. Produkty PCR byly vizualizovány ethidium bromidem.

Obrázek 6: Vzorový elektroforeogram kodominantního markeru MdMYBA



Marker BC226-STS

Původní specifické PCR markery lokusu *BC226-STS* byly konvertovány z RAPD markeru, který charakterizoval červeno-žlutý polymorfismus barvy slupky jabloní (Cheng *et al.* 1996). Avšak nevhodou konvertovaných RAPD markerů je tvorba nespecifických amplikonů. Problematická byla rovněž identifikace alel, protože markerující fragmenty vykazovaly malé velikostní rozdíly a při velikosti amplikonů nad 1100 bp jsou tyto diference pomocí agarázové elektroforézy obtížně identifikovatelné. Proto byly navrženy dva nové primerové páry Barva-a1-F/R a Barva-a2-F/R. Tyto nové PCR markery již vykazují vysokou specifičnost. Primerový pár Barva-a1-F + Barva-a1-R poskytoval u alely a1 předpokládaný fragment o velikosti 215 bp. U alel A1 a a2 byl amplikon velký 138 bp. Primerový pár Barva-a2-F + Barva-a2-R poskytoval u alely a2 fragment o velikosti 286 bp, u alel A1 a a1 byla velikost amplikonu 123 bp. V následující tabulce je znázorněna velikost amplikonů u jednotlivých alelických kombinací.

Tabulka 8: Velikost amplifikovaných fragmentů u jednotlivých alelických kombinací s použitím primerů Barva-a1 a Barva-a2

Genotyp	Kombinace primerů	
	Barva-a1-F + Barva-a1-R	Barva-a2-F + Barva-a2-R
a1a1	215 bp 155 bp nemarkující fragment 138 bp	123 bp
a2a2	155 bp nemarkující fragment 138 bp	286 bp
a1a2	215 bp 155 bp nemarkující fragment 138 bp	286 bp 123 bp
A1A1	155 bp nemarkující fragment 138 bp	123 bp
A1a1	215 bp 155 bp nemarkující fragment 138 bp	123 bp
A1a2	155 bp nemarkující fragment 138 bp	286 bp 123 bp

Tabulka 9: Primery použité k amplifikaci markeru BC226-STS

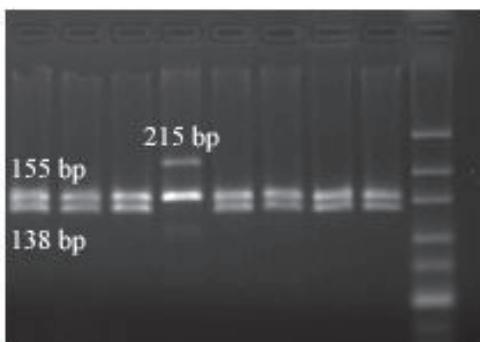
Primer	Sekvence	Lokus	Délka markerujícího fragmentu	Annelační teplota
Barva-a1-F	5'GGCGTGTGGAGAGTATC3'	BC226-STS	215 bp	50 °C
Barva-a1-R	5'TGGTGTGGATCATTTGTTGG3'		138 bp	
Barva-a2-F	5'ATTACATCAGTACCAAAACAGGC3'		286 bp	49,2 °C
Barva-a2-R	5'TCGTAAACAAATGGTGGTGCT3'		123 bp	

Podmínky PCR amplifikace:

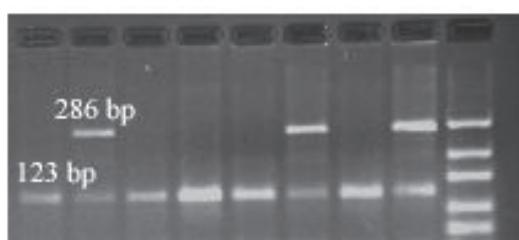
Složení reakční směsi (12,5 µl) pro primerový pár Barva-a1-F/R: 50 ng genomové DNA; 0,7 U *Taq* polymerázy (Thermo Fisher Scientific); BSA 0,5 µg/12,5 µl; 10 mM Tris-HCl (pH 8,8); 50 mM KCl; 0,08% Nonidet P40; 1,8 mM MgCl₂; 200 µM dNTP; 0,48 µM každého z primerů; 2 mM tetramethylammonium oxalát (Top Bio).

Teplotní a časový průběh PCR: 1 cyklus počáteční denaturace 95 °C/3 min, 35 cyklů (denaturace 94 °C/30 s, annealing 50 °C/30 s, extenze 72 °C/1 min), 1 cyklus extenze 72 °C/7 min. Amplifikované PCR produkty byly separovány v 1,5% agarázovém gelu v 1xTBE pufru po dobu 90 minut. Produkty PCR byly vizualizovány ethidium bromidem.

Obrázek 7: Vzorový elektroforeogram markeru BC226-STS s použitím primerů Barva-a1



Obrázek 8: Vzorový elektroforeogram markeru BC226-STS s použitím primerů Barva-a2



3.2.5. Molekulární marker genu *Pl1*, řídící rezistenci vůči padlì jabloňovému

Markery využívané pro studium rezistence k padlì jabloňovému (*Podosphaera leucotricha*) se zaměřují především na detekci jednotlivých majorgenů. Nejvýznamnějším DNA markerem, který se poprvé uplatnil v selekci genotypů vykazujících rezistenci vůči padlì jabloňovému a postihoval přítomnost nebo absenci majorgenu *Pl1* původem z botanického druhu *Malus robusta*, byl RAPD marker OPAT 20 (Markussen *et al.* 1995). OPAT 20 je vazbový marker, který se nachází 4,5 cM od genu *Pl1*. Později byl tento RAPD marker konvertován do SCAR PCR markeru AT20-450 (Frey *et al.* 2004). Nicméně, jak již bylo zmíněno výše, častou nevýhodou konvertovaných RAPD markerů je tvorba nespecifických amplikonů, které můžou ovlivnit správné určení genotypu. Také SCAR marker AT-20-450 opakovaně poskytoval při testování řadu nespecificky amplifikujících fragmentů. Z toho důvodu byl navržen a optimalizován nový PCR marker Pl1C(CZU).

Vazební PCR marker Pl1C

Nově navržený Pl1C marker vykazuje mendelistickou segregaci, je specifický a spolehlivě amplifikující a lze jej tudíž považovat za vhodný v procesu MAS. Přítomnost markeru je charakterizována fragmentem o velikosti 170 bp.

Tabulka 10: Primery použité k amplifikaci markeru PI1C

Primer	Sekvence	Lokus	Délka markerujícího fragmentu	Annelační teplota
PI1C-F	5' TGGTTCCGGATAGCTGTTCC3'			
PI1C-R	5' CTCGTCGGATCCCACAATAT3'	PI1	170 bp	64 °C

Podmínky PCR amplifikace:

Složení reakční směsi (12,5 µl) pro primerový pár PI1C-F/R: 50 ng genomové DNA; 0,7 U *Taq* polymerázy (Thermo Fisher Scientific); BSA 0,5 µg/12,5 µl; 10 mM Tris-HCl (pH 8,8); 50 mM KCl; 0,08% Nonidet P40; 2 mM MgCl₂; 200 µM dNTP; 0,48 µM každého z primerů; 2 mM tetramethylammonium oxalát (Top Bio).

Teplotní a časový průběh PCR: 1 cyklus počáteční denaturace 95 °C/3 min, 35 cyklů (denaturace 95 °C/30 s, annealing 64 °C/30 s, extenze 72 °C/1 min), 1 cyklus extenze 72 °C/7 min. Amplifikované PCR produkty byly separovány v 1,5% agarázovém gelu v 1xTBE pufru po dobu 90 minut. Produkty PCR byly vizualizovány ethidium bromidem.

Obrázek 9: Vzorový elektroforeogram dominantního markeru PI1C

3.2.6. Molekulární QTL marker lokusu *FBF7*, asociovaný s odolností vůči spále růžovitých

Pro charakterizaci QTL *FBF7* asociovaného s odolností vůči spále růžovitých (původce *Erwinia amylovora*) byly navrženy molekulární markery AE10-375, GE-8019 a CHF7-Fb1 (Khan et al. 2007). Markery AE10-375 a GE-8019 byly konvertované z RAPD na SCAR markery a marker CHF7-Fb1 je mikrosatelitní.

SCAR marker AE10-375

Marker AE10-375 je dominantní a jeho přítomnost charakterizuje fragment o velikosti 375 bp.

Tabulka 11: Primery použité k amplifikaci markeru AE10-375

Primer	Sekvence	Lokus	Délka markerujícího fragmentu	Annelační teplota
AE10-375-F	5' CTGAAGCGCACGTTCTCC3'			
AE10-375-R	5' CTGAAGCGCATTTCTGATAG3'	F7QTL	375 bp	60 °C

Podmínky PCR amplifikace:

Složení reakční směsi (12,5 µl) pro primerový pár AE10-375-F/R: 50 ng genomové DNA; 0,7 U *Taq* polymerázy (Thermo Fisher Scientific); BSA 0,5 µg/12,5 µl; 10 mM Tris-HCl (pH 8,8); 50 mM KCl; 0,08% Nonidet P40; 2,5 mM MgCl₂; 200 µM dNTP; 0,2 µM každého z primerů; 2 mM tetramethylammonium oxalát (Top Bio).

Teplotní a časový průběh PCR: 1 cyklus počáteční denaturace 94 °C/3 min, 35 cyklů (denaturace 94 °C/30 s, annealing 60 °C/1 min, extenze 72 °C/1 min), 1 cyklus extenze 72 °C/6 min. Amplifikované PCR produkty byly separovány v 1,5% agarázovém gelu v 1xTBE pufru po dobu 60 minut. Produkty PCR byly vizualizovány ethidium bromidem.

SCAR marker GE-8019

Marker GE-8019 je dominantní a jeho přítomnost charakterizuje fragment o velikosti 397 bp.

Tabulka 12: Primery použité k amplifikaci markeru GE-8019

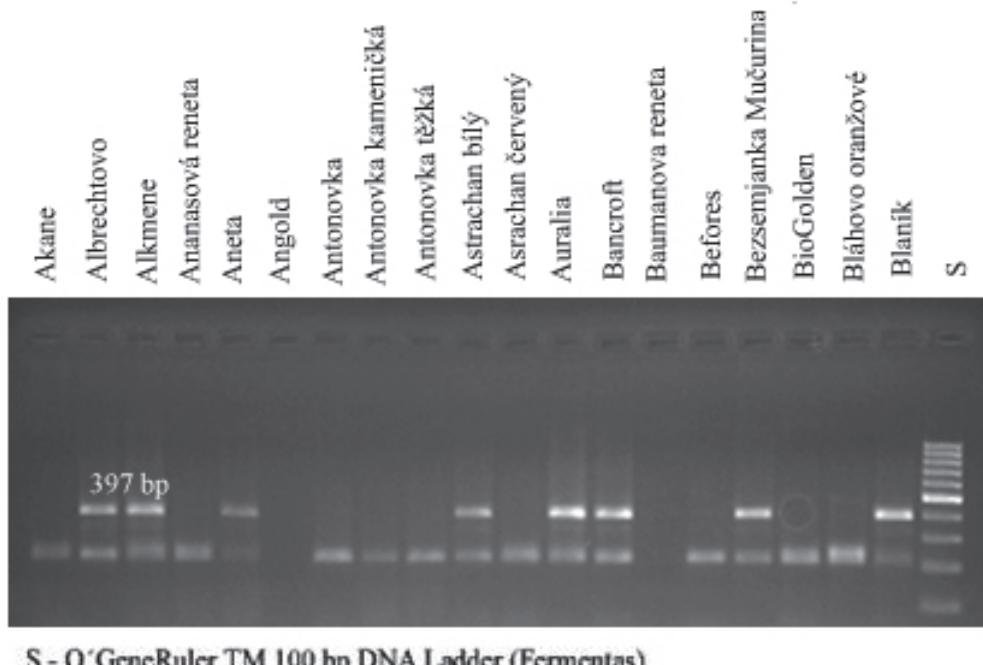
Primer	Sekvence	Lokus	Délka markerujícího fragmentu	Annelační teplota
GE-8019-F	5' TTGAGACCGATTTCTGTGTG3'	F7QTL	397 bp	60 °C
GE-8019-R	5' TCTCTCCCAGAGCTTCATTGT3'			

Podmínky PCR amplifikace:

Složení reakční směsi (12,5 µl) pro primerový pár GE-8019-F/R: 50 ng genomové DNA; 0,7 U *Taq* polymerázy (Thermo Fisher Scientific); BSA 0,5 µg/12,5 µl; 10 mM Tris-HCl (pH 8,8); 50 mM KCl; 0,08% Nonidet P40; 2,5 mM MgCl₂; 200 µM dNTP; 0,2 µM každého z primerů; 2 mM tetramethylammonium oxalát (Top Bio).

Teplotní a časový průběh PCR: 1 cyklus počáteční denaturace 94 °C/3 min, 35 cyklů (denaturace 94 °C/30 s, annealing 60 °C/1 min, extenze 72 °C/1 min), 1 cyklus extenze 72 °C/6 min. Amplifikované PCR produkty byly separovány v 1,5% agarázovém gelu v 1xTBE pufru po dobu 60 minut. Produkty PCR byly vizualizovány ethidium bromidem.

Obrázek 10: Vzorový elektroforeogram dominantního markeru GE-8019 u vybraných odrůd jablek



S - O'GeneRuler TM 100 bp DNA Ladder (Fermentas)

SSR marker CHF7-Fb1

Mikrosatelitní marker CHF7-Fb1 je kodominantní a markerující alelu charakterizuje fragment o velikosti 201 bp. Druhý amplifikovaný nemarkující fragment má velikost 163 bp.

Tabulka 13: Primery použité k amplifikaci markeru CHF7-Fb1

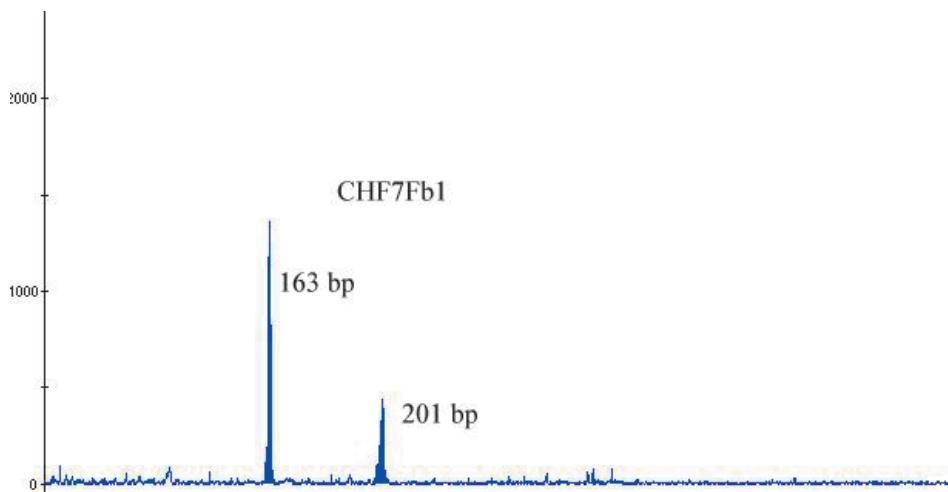
Primer	Sekvence	Lokus	Délka markerujícího fragmentu	Annelační teplota
CHF7-Fb1-F	5'AGCCAGATCACATGTTTCATC3'	F7QTL	201 bp	66,4 °C
CHF7-Fb1-R	5'ACAAACGGCCACCAGTTTATC3'			

Podmínky PCR amplifikace:

Složení reakční směsi (12,5 µl) pro primerový pár CHF7-Fb1-F/R: 50 ng genomové DNA; 0,7 U *Taq* polymerázy (Thermo Fisher Scientific); BSA 0,5 µg/12,5 µl; 75 mM Tris-HCl (pH 8,8); 20 mM (NH₄)₂SO₄; 0,01% Tween 20; 5 mM MgCl₂; 200 µM dNTP; 0,48 µM každého z primerů; 2 mM tetramethylamonium oxalát (Top Bio). Teplotní a časový průběh PCR: 1 cyklus počáteční denaturace 95 °C/3 min, 35 cyklů (denaturace 95 °C/30 s, annealing 66,4 °C/30 s, extenze 72 °C/45 s), 1 cyklus extenze 72 °C/5 min.

Polymorfismy SSR markeru CH-F7-Fb1 byly vyhodnoceny pomocí ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer (Applied BiosystemsTM) s POP-4 polymerem (Applied BiosystemsTM). Bylo použito fluorescenční značení F-primeru (CHF7-Fb1-F-FAM). Pro vyhodnocení velikosti SSR alel byl použit GeneScanTM-600LIZ® Size Standard (Applied BiosystemsTM). Stanovení velikosti amplikonů bylo provedeno programem GeneMapper® Version 4.1 (Applied BiosystemsTM).

Obrázek 11: Vzorový chromatogram mikrosatelitního markeru CHF7-Fb1



3.2.7. Molekulární markery genů řídících rezistenci vůči strupovitosti

V rámci selekce genotypů rezistentních vůči strupovitosti (původce *Venturia inaequalis*) jsou vyvinuty molekulární markery pro lokusy *Rvi2*, *Rvi4*, *Rvi6*, *Rvi8* a *Rvi15*.

Ve šlechtění rezistentních odrůd je nejvíce využívaný lokus *Rvi6* (*Vf*). Pro tento lokus bylo již navrženo několik molekulárních markerů, například kodominantní vazebný SCAR marker lokusu *AL07* a dominantní vazebný SCAR marker *AM19* (Tartarini *et al.* 1999). Dále bylo zjištěno, že uvnitř lokusu *Rvi6* se nalézají 4 paralogy tohoto rezistentního genu, označené jako *Vfa1*, *Vfa2*, *Vfa3* a *Vfa4* (Xu a Korban 2002). Tyto jednotlivé geny vykazují velmi silnou homologii, ale liší se dobou exprese. Geny *Vfa1*, *Vfa2* jsou exprimovány v mladých nevyvinutých listech, zatímco exprese genu *Vfa4* probíhá ve vyspělých listech. Strukturním charakterem patří do skupiny R genů, které kódují extracelulární LRR a transmembránové domény. Transkript genu *Vfa3* je nefunkční (Malnøy *et al.* 2007). Pro praktickou selekci rezistentních genotypů se jako nevhodnější jeví použití mikrosatelitního markeru *CHVf1* (Vinatzer *et al.* 2004), který byl použit pro hodnocení přítomnosti ortologu *Vf1* a nově navrženého PCR markeru *VfAD*, který byl použit pro hodnocení přítomnosti ortologu *Vf4*.

Pro identifikaci genotypů nesoucích gen rezistence *Rvi4* byl navržen molekulární marker *AD13-SCAR* (Boudichevskaia *et al.* 2006). Jedná se o vazební SCAR marker vzniklý konverzí RAPD markeru. Síla vazby zjištěna mezi markerem *AD13-SCAR* a lokusem *Rvi4* byla přibližně 8 cM. Při analýzách různých genotypů jabloní však docházelo k tvorbě řady nespecifických amplikonů, které znesnadňovaly správnou genotypizaci. Z těchto důvodů byl navržen nový primerový pár, který umožňuje amplifikaci kratšího fragmentu DNA a současně postihuje inzerčně deleční polymorfismus. Byl tedy vytvořen nový PCR marker *AD13-SCAR-CZU2*, u kterého je již tvorba nespecifických amplikonů značně omezena.

Lokusy *Rvi2* a *Rvi8* se zabýval již Bus *et al.* (2005), který se ve své práci domnívá, že gen *Rvi8* je v těsné genové vazbě s *Rvi2* lokusem a dokonce nevylučuje, že tyto dva geny mohou být

vzájemně alelické. Pro tyto dva lokusy navrhl vazebné SCAR markery vzniklé konverzí RAPD markerů: marker lokusu *Rvi2* OPL19-SCAR a marker lokusu *Rvi8* OPB18-SCAR. Pro praktické využití těchto markerů je nutné brát v potaz jejich charakter, a sice že se jedná o vazebné typy markerů, které u vybraných kontrastních rodičů mohou úspěšně markerovat segregaci potomků. Jejich aplikace může být úspěšná pouze za předpokladu, že jako jeden z rodičů bude použit fenotypově ověřený rodič s rezistencí vůči konkrétním rasám *Venturia inaequalis*, nebo standardní, literaturou popsaný, donor lokusů *Rvi2* a *Rvi8*. U tohoto rodiče bude existovat cis vazba mezi konkrétním lokusem a markerem. Druhý rodič musí vykazovat náchylnost vůči stupovitosti a současně absenci PCR markerů.

Rovněž pro gen *Rvi15* byla sestavena přesná genetická mapa, na základě které bylo navrženo několik vazebních molekulárních markerů (Galli *et al.* 2010). Jedná se o dva mikrosatelitní markery CH02f06 a CH02c02a a o tři SNP markery ARGH17, ARGH37 a GmTNL1. Vzhledem k tomu, že genotypy GMAL2473 a R1274-7A nesoucí gen *Rvi15* se na vzniku odrůd podílely jen minimálně, je v široké odrůdové kolekci jen relativně malá frekvence SSR a SNP markerů lokusu *Rvi15*. Tato skutečnost může být výhodná pro případné využití donorů genu *Rvi15* ve šlechtění s využitím MAS.

SSR marker CH-Vf1 lokusu *Rvi6*

Mikrosatelitní marker CH-Vf1 je kodominantní a vykazuje těsnou vazbu s *Vf1* ortologem. Markerující alelu charakterizuje amplikon o velikosti 155 bp, amplikony o velikosti 136 bp, 164 bp resp. 169 bp nejsou markerující. Mezi CH-Vf1 markerem a *Rvi6* genem se nepředpokládá vznik rekombinací (Vinatzer *et al.* 2004).

Tabulka 14: Primery použité k amplifikaci markeru CH-Vf1

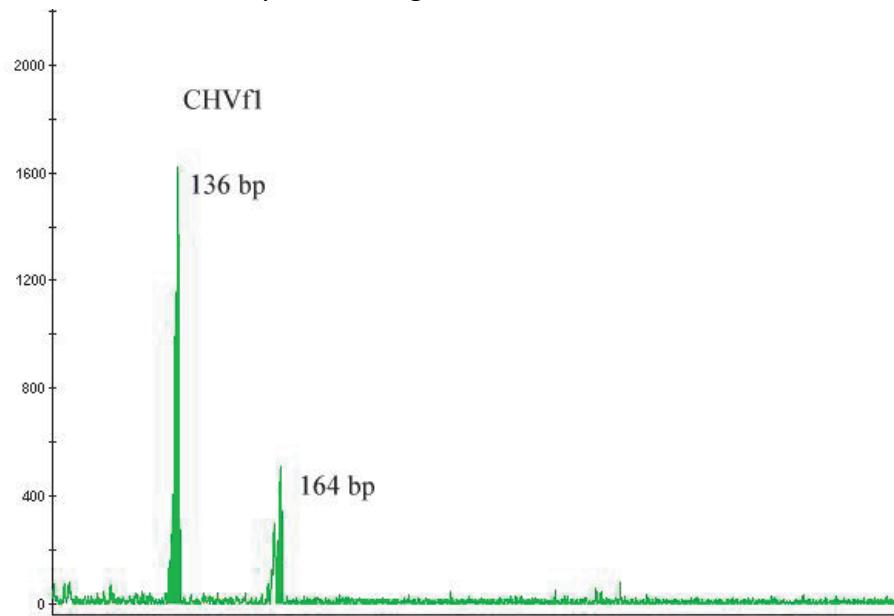
Primer	Sekvence	Lokus	Délka markerujícího fragmentu	Annelační teplota
CH-Vf1-F	5'ATCACACCAGCAGCAAAG3'	<i>Rvi6</i>	155 bp	66,9 °C
CH-Vf1-R	5'CATACAAATCAAAGCACAAACCC3'			

Podmínky PCR amplifikace:

Složení reakční směsi (12,5 µl) pro primerový pár CH-Vf1-F/R: 50 ng genomové DNA; 0,7 U *Taq* polymerázy (Thermo Fisher Scientific); BSA 0,5 µg/12,5 µl; 75 mM Tris-HCl (pH 8,8); 20 mM (NH₄)₂SO₄; 0,01% Tween 20; 5 mM MgCl₂; 200 µM dNTP; 0,48 µM každého z primerů; 2 mM tetramethylamonium oxalát (Top Bio). Teplotní a časový průběh PCR: 1 cyklus počáteční denaturace 95 °C/3 min, 35 cyklů (denaturace 95 °C/30 s, annealing 66,9 °C/30 s, extenze 72 °C/45 s), 1 cyklus extenze 72 °C/5 min.

Polymorfismy SSR markeru CH-Vf1 byly vyhodnoceny pomocí ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer (Applied BiosystemsTM) s POP-4 polymerem (Applied BiosystemsTM). Bylo použito fluorescenční značení F-primeru (CH-Vf1-F-VIC). Pro vyhodnocení velikosti SSR alel byl použit GeneScanTM-600LIZ® Size Standard (Applied BiosystemsTM). Stanovení velikosti amplikonů bylo provedeno programem GeneMapper® Version 4.1 (Applied BiosystemsTM).

Obrázek 12: Vzorový chromatogram mikrosatelitního markeru CH-Vf1



PCR marker VfAD lokusu *Rvi6*

Marker byl navržen na základě úplné kódující sekvence *HcrVf4* genu *Malus floribunda* klonu M18-6Cs (Broggini *et al.* 2009), jedná se tudíž o typ genového dominantního markeru detekujícího přímo vlastní *Rvi6* gen. U genotypů s přítomností *Rvi6* genu poskytuje dvojice primerů VfAD specifický produkt o velikosti 1100 bp. Jistou nevýhodou genového markeru může být, že genotypy s absencí detekovaného genu jsou charakteristické výskytem tak zvaných nulových alel.

Tabulka 15: Primery použité k amplifikaci markeru VfAD

Primer	Sekvence	Lokus	Délka markerujícího fragmentu	Annelační teplota
VfA	5'GGTGGTAAGATAAAATCCTCTTG3'	<i>Rvi6</i>	1100 bp	66,8 °C
VfD	5'AAATGCCAGGAATCCAGATG3'			

Podmínky PCR amplifikace:

Složení reakční směsi (12,5 µl) pro primerový pár VfAD: 50 ng genomové DNA; 0,7 U *Taq* polymerázy (Thermo Fisher Scientific); BSA 0,5 µg/12,5 µl; 10 mM Tris-HCl (pH 8,8); 50 mM KCl; 0,08% Nonidet P40; 1,5 mM MgCl₂; 200 µM dNTP; 0,48 µM každého z primerů; 2 mM tetramethylamonium oxalát (Top Bio).

Teplotní a časový průběh PCR: 1 cyklus počáteční denaturace 95 °C/3 min, 35 cyklů (denaturace 94 °C/30 s, annealing 66,8 °C/30 s, extenze 72 °C/1 min), 1 cyklus extenze 72 °C/7 min. Produkty amplifikace byly separovány v 1,5% agarázovém gelu v 1xTBE pufru po dobu 1 hodiny. Produkty PCR byly vizualizovány ethidium bromidem.

PCR marker AD13-SCAR-CZU2 lokusu *Rvi4*

U vazebného PCR markeru AD13-SCAR-CZU2 jsou elektroforetickou separací detekovány rozdíly typu delece. Markerující alelu genu *Rvi4* charakterizuje amplikon o velikosti 237 bp. Další dva amplikony o velikosti 559 bp a 377 bp charakterizují nemarkující alely.

Tabulka 16: Primery použité k amplifikaci markeru AD13-SCAR-CZU2

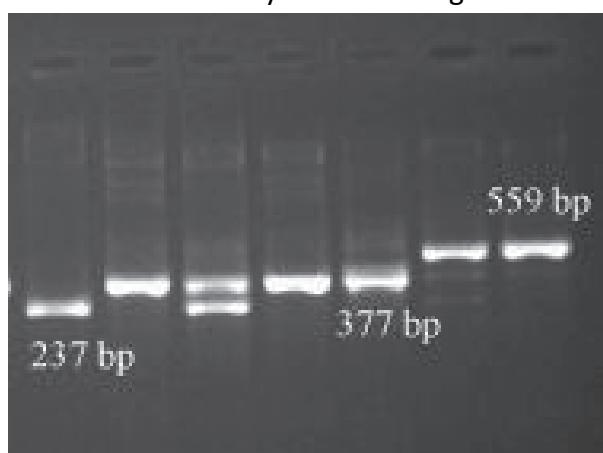
Primer	Sekvence	Lokus	Délka markerujícího fragmentu	Annelační teplota
AD13-SCAR-CZU2-F	5'CATCTGTTGGGTGAAGTGGTAGG3'	<i>Rvi4</i>	237 bp	58 °C
AD13-SCAR-CZU2-R	5'AAATAAGAAAAACGCACAGTTCCC3'			

Podmínky PCR amplifikace:

Složení reakční směsi (12,5 µl) pro primerový pár AD13-SCAR-CZU2-F/R: 50 ng genomové DNA; 0,6 U *Taq* polymerázy (Thermo Fisher Scientific); BSA 0,5 µg/12,5 µl; 10 mM Tris-HCl (pH 8,8); 20 mM (NH₄)₂SO₄; 0,08% Nonidet P40; 1,5 mM MgCl₂; 100 µM dNTP; 0,2 M primer AD13-F; 0,2 M primer AD13-R; 4,8 % DMSO.

Teplotní a časový průběh PCR: 1 cyklus počáteční denaturace 94 °C/3 min, 40 cyklů (denaturace 94 °C/40 s, annealing 58 °C/1 min, extenze 72 °C/1 min), 1 cyklus extenze 72 °C/10 min. Produkty amplifikace byly separovány v 1,5% agarázovém gelu v 1xTBE pufru po dobu 1 hodiny. Produkty PCR byly vizualizovány ethidium bromidem.

Obrázek 13: Vzorový elektroforeogram kodominantního markeru AD13-SCAR-CZU2



SCAR marker OPL19 lokusu *Rvi2*

OPL19-SCAR je konvertovaný vazebný RAPD marker lokusu *Rvi2* (Bus *et al.* 2005). Amplifikací dochází k tvorbě dvou fragmentů. Fragment o přibližné velikosti 1120 bp je nemarkující a vyskytoval se u všech hodnocených genotypů. Fragment o velikosti 433 bp je potenciálním markerem, jelikož se vyskytoval jen u genotypů, kterých původ je odvozen od klonu TSR34T15 ruského semenáče R12740-7A.

Tabulka 17: Primery použité k amplifikaci markeru OPL19

Primer	Sekvence	Lokus	Délka markerujícího fragmentu	Annelační teplota
OPL19-F	5'ACCTGCACTACAATCTCACTAAC3'	Rvi2	433 bp	55 °C
OPL19-R	5'GACTCGTTCCACTGAGGATATTG3'			

Podmínky PCR amplifikace:

Složení reakční směsi (12,5 µl) pro primerový pár OPL19-F/R: 30 ng genomové DNA; 0,6 U *Taq* polymerázy (Thermo Fisher Scientific); BSA 0,5 µg/12,5 µl; 10 mM Tris-HCl (pH 8,8); 50 mM KCl; 0,08% Nonidet P40; 1,3 mM MgCl₂; 100 µM dNTP; 0,1 µM každého z primerů; 4,8 % DMSO.

Teplotní a časový průběh PCR: 1 cyklus počáteční denaturace 94 °C/2 min 45 s, 40 cyklů (denaturace 94 °C/55 s, annealing 55 °C/55 s, extenze 72 °C/1 min 39 s), 1 cyklus extenze 72 °C/10 min. Produkty amplifikace byly separovány v 1,5% agarózovém gelu v 1xTBE pufru po dobu 1,5 hodiny. Produkty PCR byly vizualizovány ethidium bromidem.

SCAR marker OPB18 lokusu Rvi8

OPB18-SCAR je rovněž konvertovaný vazebný RAPD marker lokusu Rvi8 (Bus *et al.* 2005). Amplifikací dochází k tvorbě až 6 různě velkých amplikonů. Markerující fragment velikosti 799 bp byl detekován pouze u minoritního počtu genotypů. Jedná se o odrůdy Antonovka, Antonovka těžká, Borovinka a Bogajevskij Charvanskij, které byly získány z bývalého SSSR a novozélandská odrůda Wellington. Podobně jako u mnoha dalších SCAR markerů i u markeru OPB18-SCAR je velkým problém tvorba nespecifických fragmentů.

Tabulka 18: Primery použité k amplifikaci markeru OPB18

Primer	Sekvence	Lokus	Délka markerujícího fragmentu	Annelační teplota
OPB18-F	5'CCACAGCAGTCATTGGGA3'	Rvi8	799 bp	59 °C
OPB18-R	5'CCACAGCAGTGCATAAAC3'			

Podmínky PCR amplifikace:

Složení reakční směsi (12,5 µl) pro primerový pár OPL19-F/R: 30 ng genomové DNA; 0,6 U *Taq* polymerázy (Thermo Fisher Scientific); BSA 0,5 µg/12,5 µl; 10 mM Tris-HCl (pH 8,8); 50 mM KCl; 0,08% Nonidet P40; 1,3 mM MgCl₂; 100 µM dNTP; 0,1 µM každého z primerů; 4,8 % DMSO.

Teplotní a časový průběh PCR: 1 cyklus počáteční denaturace 94 °C/2 min 45 s, 40 cyklů (denaturace 94 °C/55 s, annealing 59 °C/55 s, extenze 72 °C/1 min 39 s), 1 cyklus extenze 72 °C/10 min. Produkty amplifikace byly separovány v 1,5% agarózovém gelu v 1xTBE pufru po dobu 1,5 hodiny. Produkty PCR byly vizualizovány ethidium bromidem.

SSR marker CH02f06 lokusu *Rvi15*

Mikrosatelitní marker CH02f06 je ve vzdálenosti 4,1 cM od genu *Rvi15* (Galli *et al.* 2010). Markerující alelu lokusu CH02f06 charakterizuje fragment o velikosti 142 bp. Tento molekulární marker byl optimalizován jako součást multiplex PCR a podmínky jeho amplifikace a fragmentační analýzy jsou popsány níže.

Tabulka 19: Primery použité k amplifikaci markeru CH02f06

Primer	Sekvence	Lokus	Délka markerujícího fragmentu	Annelační teplota
CH02f06-F	5'CCCTCTTCAGACCTGCATATG3'	<i>Rvi15</i>	142 bp	56 °C (multiplex)
CH02f06-R	5'ACTGTTCCAAGCGCTCAGG3'			

SSR marker CH02c02a lokusu *Rvi15*

Mikrosatelitní marker CH02c02a je ve vzdálenosti 2 cM od genu *Rvi15* (Galli *et al.* 2010). Markerující alelu lokusu CH02c02a charakterizuje fragment o velikosti 172 bp. Tento molekulární marker byl rovněž optimalizován jako součást multiplex PCR a podmínky jeho amplifikace a fragmentační analýzy jsou popsány níže.

Tabulka 20: Primery použité k amplifikaci markeru CH02c02a

Primer	Sekvence	Lokus	Délka markerujícího fragmentu	Annelační teplota
CH02c02a-F	5'CTTCAAGTTCAGCATCAAGACAA3'	<i>Rvi15</i>	172 bp	56 °C (multiplex)
CH02c02a-R	5'TAGGGCACACTTGCTGGTC3'			

SNP marker ARGH17 lokusu *Rvi15*

Marker ARGH17 je vazební a nachází se ve vzdálenosti 0,3 cM od genu *Rvi15* (Galli *et al.* 2010). Detekce polymorfizmu probíhala na základě sekvence a následně na základě metody PCR-RFLP. SNP, který rozlišuje rezistentní a náchylné genotypy se nachází v rozpoznávacím palindromu AG|CT pro restrikční endonukleázu *A*ul. U rezistentního genotypu došlo v tomto místě k výměně C báze za bázi A, tudíž restriktáza *A*ul dané místo nerozštěpí. PCR marker ARGH17 má před štěpením délku 378 bp. Po restrikci enzymem *A*ul vznikají u rezistentní alely genu *Rvi15* fragmenty o velikosti 321 bp, 49 bp a 8 bp. U alely zodpovědné za náchylnost vznikají fragmenty o velikosti 227 bp, 56 bp, 49 bp, 38 bp a 8 bp.

Tabulka 21: Primery použité k amplifikaci markeru ARGH17

Primer	Sekvence	Lokus	Délka markerujícího fragmentu	Annelační teplota
ARGH17-F	5'TTGCCGACGTTCGTGATGCT3'	<i>Rvi15</i>	321 bp	59 °C
ARGH17-R	5'GATATCCTTGTTGGACAACC3'			

Podmínky PCR amplifikace

Složení reakční směsi (12,5 µl) pro primerový pár ARGH17-F/R: 2 ng genomové DNA; 1 U *Taq* polymerázy (Roche); BSA 0,5 µg/12,5 µl; 10 mM Tris-HCl (pH 8,8); 50 mM KCl; 2 mM MgCl₂; 200 µM dNTP; 0,4 µM každého z primerů; 2 mM tetramethylamonium oxalát (Top Bio).

Teplotní a časový průběh PCR: 1 cyklus počáteční denaturace 95 °C/3 min, 35 cyklů (denaturace 94 °C/30 s, annealing 59 °C/1 min, extenze 72 °C/1 min), 1 cyklus extenze 72 °C/10 min.

Obrázek 14: Vzorový elektroforeogram markeru ARGH17 před štěpením



Purifikace a sekvenace amplikonů

Purifikace: Amplikony byly separovány v 1% agarázovém gelu v 1x TBE pufru při konstantním napětí 120 V po dobu 130 minut. Vyříznuté bločky s amplikony byly purifikovány pomocí MiniElute PCR Purification Kit (Qiagen). Extrakce proběhla podle postupu doporučeného výrobcem kitu. Získaná DNA byla kvantifikována UV spektrofotometricky a naředěna na koncentraci 5 ng · µl⁻¹.

Sekvenační reakce: Pro sekvenaci PCR produktu byl použit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies). Složení sekvenační reakce uvádí tabulka 22.

Tabulka 22: Složení sekvenační reakce

Složka	Objem	Koncentrace
PCR produkt (5 ng · µl ⁻¹)	4 µl	20 ng · 20 µl ⁻¹
5x Sequencing Buffer (Life Technologies)	4 µl	1x
Primer F resp. R (1 pikomol · µl ⁻¹)	3,2 µl	3,2 pikomolů · 20 µl ⁻¹
Terminator Ready Reaktion Mix (Life Technologies)	2 µl	2 µl · 20 µl ⁻¹

Purifikace produktu sekvenační reakce

Produkt sekvenační reakce (objem 20 µl) byl doplněn 2 µl roztoku glykogenu (koncentrace 20 ng · µl⁻¹, Thermo Fisher Scientific), 2 µl 3M octanu sodného a 50 µl 96% čistého etanolu. Po 15 minutové inkubaci při laboratorní teplotě byla provedena centrifugace (13200 otáček/min) po dobu 30 minut. Supernatant byl odstraněn pipetou. Pelet byl propláchnut 250 µl 70% čistého etanolu. Vzorky byly následně odstředěny při 13200 otáček/min po dobu 15 minut. Oplachovací proces byl ještě jednou zopakován. Pelet byl po odsátí supernatantu vysušen ve vyhřívaném bloku Bio TDB-120 (Biosan) při teplotě 50 °C po dobu 45 minut. Vysušený pelet byl následně rozpuštěn v 15 µl Hi-Di formamidu. Takto připravené vzorky

byly denaturovány v polypropylenových stripech v termocyklu C1000TM Thermal Cycler (BioRad) při teplotě 95 °C po dobu 5 minut. Po denaturaci byly vzorky ochlazeny na teplotu 0 °C.

Vlastní sekvenace: Sekvenace byla provedena pomocí genetického analyzátoru ABI PRISM 310 Genetic Analyser (Life Technologies). Podmínky sekvenace jsou uvedeny v tabulce 23.

Tabulka 23: Podmínky kapilární elektroforézy při sekvenaci markerů

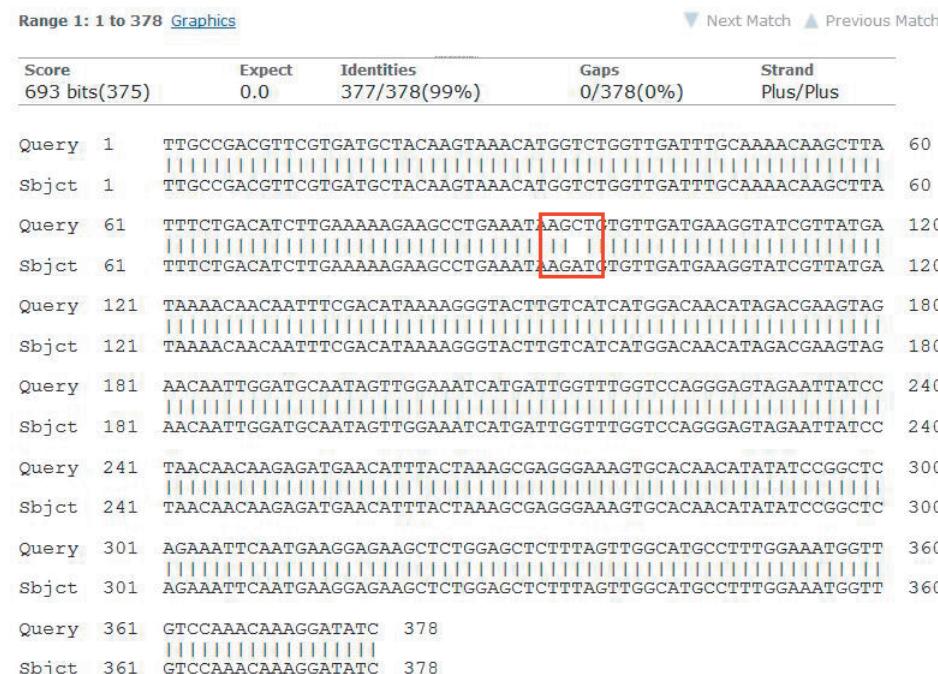
Parametry separace	Hodnoty
Délka kapiláry (cm)	36
Modul	P4StdSeq(1ml)E
Polymer	POP4
Virtuální filtr	E
Doba nástřiku (s)	30
Napětí při nástřiku (kV)	1
Teplota při separaci (°C)	50
Napětí při separaci (kV)	11,3
Doba separace (minuty)	28

Získané sekvence byly vyhodnoceny pomocí programu DNA Sequencing Analysis (Life Technologies).

Obrázek 15: Porovnání sekvence markeru ARGH17 u náchyné odrůdy ‘Golden Delicious’ (Query) a rezistentního genotypu GMAL 2473 (Sbjct).

GMAL2473

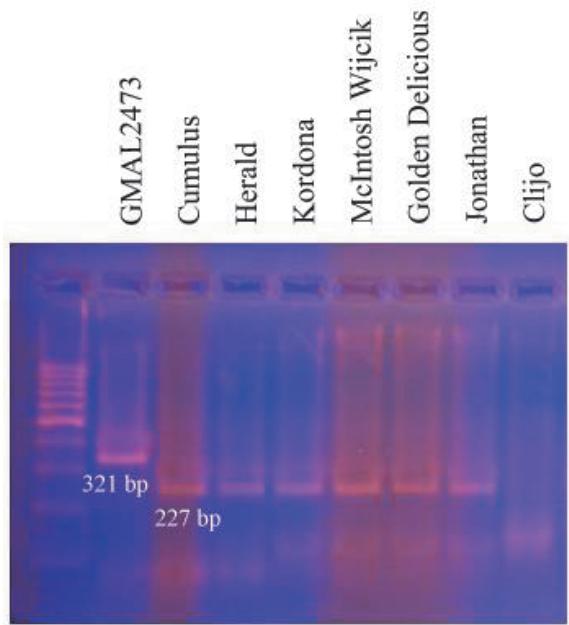
Sequence ID: Icl|26355 Length: 378 Number of Matches: 1



Podmínky restrikčního štěpení:

Složení reakční směsi: 5,15 µl PCR produktu; 1,2 µl pufru Tango (Thermo Fisher Scientific); 0,5 µl enzymu *Aul* (Thermo Fisher Scientific); 5,3 µl vody. Teplotní a časový průběh: štěpení probíhá při teplotě 37 °C po dobu 10 hodin. Polymorfismy jsou detekovány na základě elektroforetické separace v 2% agarózovém gelu v prostředí 1xTBE pufru.

Obrázek 16: Vzorový elektroforeogram markeru ARGH17 po restrikčním štěpení u vybraných odrůd jabloní



SNP marker ARGH37 lokusu *Rvi15*

Marker ARGH37 je vazební a nachází se ve vzdálenosti 1,2 cM od genu *Rvi15* (Galli *et al.* 2010). Detekce polymorfizmu probíhá na základě sekvence. Amplifikací vzniká produkt o velikosti 397 bp. Rezistentní alelu genu charakterizuje polymorfismus na pozici 332 od F primeru, kde došlo k výměně báze T za C bázi. Báze T se nachází i u všech genotypů s pozitivní přítomností markeru ARGH17 ('Jerseymac', 'Julyred', D2249, R1274-7A, GMAL 2473 a TSR33T239; navíc rovněž u odrůd 'James Grieve Compact', 'Lord Lambourne' a 'Rubín').

Tabulka 24: Primery použité k amplifikaci markeru ARGH37

Primer	Sekvence	Lokus	Délka markerujícího fragmentu	Annelační teplota
ARGH37-F	5'TGCACCGACATTAGCAACACTG3'	<i>Rvi15</i>	397 bp	59 °C
ARGH37-R	5'GAAACAACTTCTTTGAGAGTTG3'			

Podmínky PCR amplifikace:

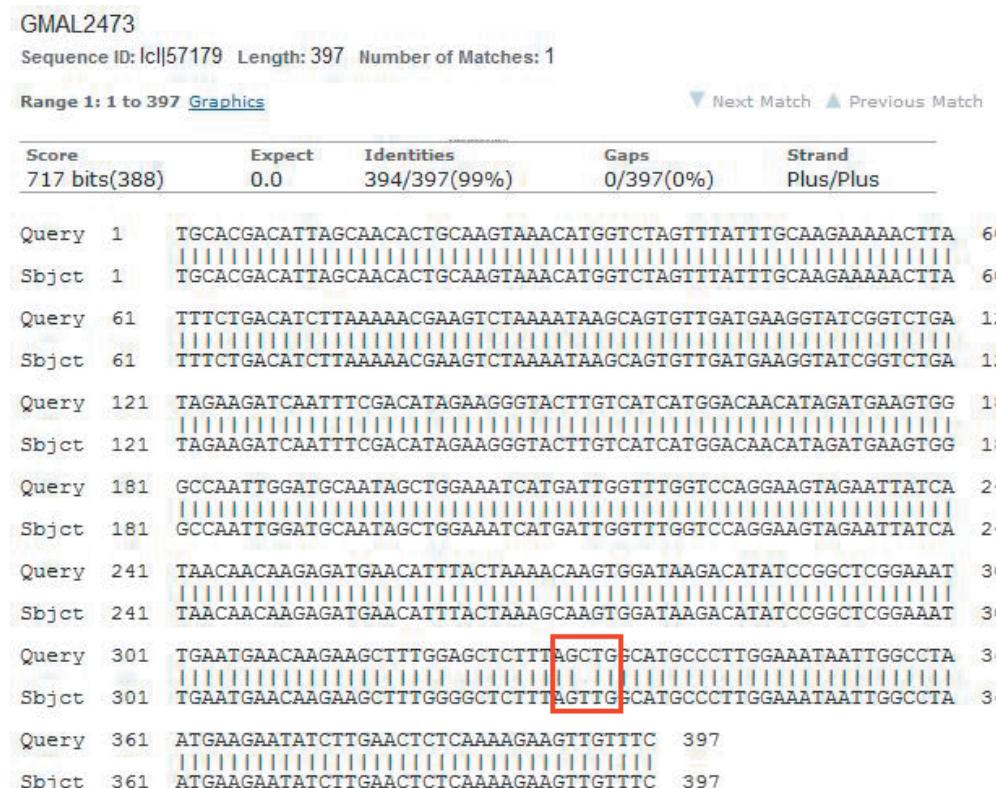
Složení reakční směsi (12,5 µl) pro primerový pár ARGH37-F/R: 2 ng genomové DNA; 1 U *Taq* polymerázy (Roche); BSA 0,5 µg/12,5 µl; 10 mM Tris-HCl (pH 8,8); 50 mM KCl; 2 mM MgCl₂; 200 µM dNTP; 0,4 µM každého z primerů; 2 mM tetramethylamonium oxalát (Top Bio).

Teplotní a časový průběh PCR: 1 cyklus počáteční denaturace 95 °C/3 min, 35 cyklů (denaturace 94 °C/30 s, annealing 59 °C/1 min, extenze 72 °C/1 min), 1 cyklus extenze 72 °C/10 min.

Purifikace a sekvenace amplikonů

Pro purifikaci amplikonů, sekvenační reakci a vyhodnocení byly použity zcela identické postupy, jako při sekvenaci markeru ARGH17.

Obrázek 17: Porovnání sekvence markeru ARGH37 u citlivé odrůdy ‘Golden Delicious’ (Query) a rezistentního genotypu GMAL 2473 (Sbjct).



SNP marker GmTNL1 lokusu *Rvi15*

Marker GmTNL1 je vazební a nachází se ve vzdálenosti 0,5 cM od genu *Rvi15* (Galli *et al.* 2010). Detekce polymorfizmu probíhá na základě sekvenování. Amplifikací vznikají dva produkty o velikosti 439 bp a 451 bp (v pozici 381 až 392 byla zjištěna delece 12 bp). Rezistentní alel genu charakterizuje polymorfismus na pozici 263 od F primeru, kde došlo k výměně báze T za G bázi. Báze T se nachází u genetických zdrojů D2249, R1274-7A, GMAL2473, TSR33T239, kde byl prokázán i marker ARGH17 a ARGH37, tento polymorfismus se však nenachází u žádné z odrůd.

Tabulka 25: Primery použité k amplifikaci markeru GmTNL1

Primer	Sekvence	Lokus	Délka markerujícího fragmentu	Annelační teplota
GmTNL1-F	5'CGATACCTTCATCAACACAGC3'			
GmTNL1-R	5'AGAAAGAAAATTGTACATGTACTG3'	Rvi15	439 bp	59 °C

Podmínky PCR amplifikace:

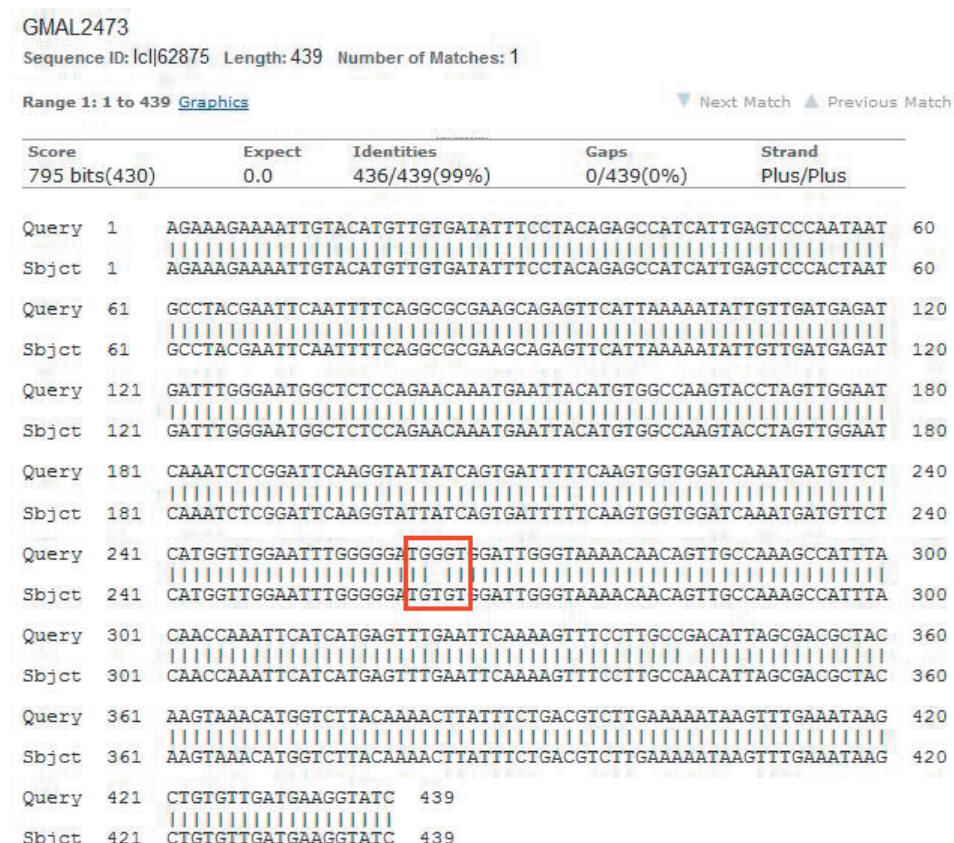
Složení reakční směsi (12,5 µl) pro primerový pár ARGH37-F/R: 2 ng genomové DNA; 1 U *Taq* polymerázy (Roche); BSA 0,5 µg/12,5 µl; 10 mM Tris-HCl (pH 8,8); 50 mM KCl; 2 mM MgCl₂; 200 µM dNTP; 0,4 µM každého z primerů; 2 mM tetramethylamonium oxalát (Top Bio).

Teplotní a časový průběh PCR: 1 cyklus počáteční denaturace 95 °C/3 min, 35 cyklů (denaturace 94 °C/30 s, annealing 59 °C/1 min, extenze 72 °C/1 min), 1 cyklus extenze 72 °C/10 min.

Purifikace a sekvenace amplikonů

Pro purifikaci amplikonů, sekvenační reakci a vyhodnocení byly použity zcela identické postupy, jako při sekvenaci markeru ARGH17.

Obrázek 18: Porovnání sekveny markeru GmTNL1 u citlivé odrůdy 'Golden Delicious' (Query) a rezistentního genotypu GMAL 2473 (Sbjct).



3.2.8. Molekulární markery predikující náchylnost vůči kroužkovité hnilobě plodů

Kroužkovitá hniloba plodů je způsobena polyfágní houbou *Botryosphaeria dothidea* (Moug. ex Fr.) Ces. & De Not.. Pro využití v rámci MAS byly nalezeny následující SSR markery spojené s náchylností jabloní vůči houbě *B. dothidea* (Zhuang et al. 2011):

CH04d02 (vazba 8,2 cM od předpokládaného genu náchylnosti vůči Mx1 izolátu houby *B. dothidea*) – markerující alela je charakterizována fragmentem o velikosti 142 bp.

Tabulka 26: Primery použité k amplifikaci markeru CH04d02

Primer	Sekvence	Lokus	Délka markerujícího fragmentu	Annelační teplota
CH04d02-F	5'CGTACGCTGCTTCTTTGCT3'	-	142 bp	56 °C (multiplex)
CH04d02-R	5'CTATCCACCACCCGTCAACT3'			

CH01e01 (vazba 16,9 cM od předpokládaného genu náchylnosti vůči Ls1 izolátu houby *B. dothidea*) – markerující alela je charakterizována fragmentem o velikosti 108 bp.

Tabulka 27: Primery použité k amplifikaci markeru CH01e01

Primer	Sekvence	Lokus	Délka markerujícího fragmentu	Annelační teplota
CH01e01-F	5'GGTTGGAGGGACCAATCATT3'	-	108 bp	56 °C (multiplex)
CH01e01-R	5'CCCACTCTGTGCCAGATC3'			

CH02c02b (vazba 8,4 cM od předpokládaného genu náchylnosti vůči Ls1 izolátu houby *B. dothidea*) – markerující alela je charakterizována fragmentem o velikosti 110 bp.

Tabulka 28: Primery použité k amplifikaci markeru CH02c02b

Primer	Sekvence	Lokus	Délka markerujícího fragmentu	Annelační teplota
CH02c02b-F	5'TGCATGCATGGAAACGAC3'	-	110 bp	56 °C (multiplex)
CH02c02b-R	5'TGGAAAAAGTCACACTGCTCC3'			

CH03a03 (vazba 13,4 cM od předpokládaného genu náchylnosti vůči Lw048 izolátu houby *B. dothidea*) – markerující alela je charakterizována fragmentem o velikosti 153 bp.

Tabulka 29: Primery použité k amplifikaci markeru CH03a03

Primer	Sekvence	Lokus	Délka markerujícího fragmentu	Annelační teplota
CH03a03-F	5'GTGGTGGTAATGACGAGAACCT3'	-	153 bp	56 °C (multiplex)
CH03a03-R	5'AAGCAAAGTAGCCAAACTGCAT3'			

Tyto molekulární markery byly optimalizovány jako součást multiplex PCR, podmínky jejich amplifikace a fragmentační analýzy jsou popsány níže.

Mezi odrůdy, u kterých nebyl detekován žádný z potenciálních markerů a neměly by tudíž být náchylné vůči kroužkovité hnilobě plodů způsobené houbou *Botryosphaeria dothidea*, patří například 'Herald', 'Kordona', 'Pom Pink', 'Pom For You', 'Goldcats', 'Redcats', 'Suncats', 'McIntosh Wijcik'.

3.2.9. Systém Multiplex-PCR pro detekci SSR markerů vybraných znaků

Multiplex amplifikace představuje systém, kdy během jedné PCR je současně amplifikováno několik mikrosatelitních lokusů, jejichž polymorfismus je následně detekován na základě odlišně fluorescenčně značených primerů pomocí kapilární elektroforézy. Tento způsob analýzy umožňuje automatické identifikace polymorfismů velkého počtu lokusů v relativně krátkém čase.

U všech mikrosatelitních lokusů byly pro amplifikaci použity fluorescenčně značené F-primery.

Tabulka 30: Primery použité pro multiplex PCR I

Primery	Sekvence (5' → 3')	Barva	Gen	Znak
CH-Vf1-F	ATCACCACAGCAGCAAAG	6-FAM	<i>Rvi6</i>	rezistence vůči strupovitosti
CH-Vf1-R	CATACAAATCAAAGCACAAACCC			
CH03d11-F	ACCCCCACAGAAACCTTCTCC	NED	<i>Co</i>	sloupcový růst
CH03d11-R	CAACTGCAAGAACATCGCAGAG			
CH04g10-F	CAAAGATGTGGTGTGAAGAGGA	PET	-	polymorfismus
CH04g10-R	GGAGGCAAAAAGAGTGAACCT			

Tabulka 31: Primery použité pro multiplex PCR II

Primery	Sekvence (5' → 3')	Barva	Gen	Znak
CH04d02-F	CGTACGCTGCTTCTTTGCT	6-FAM	-	náchylnost vůči kroužkovité skvrnitosti (izolát Mxl)
CH04d02-R	CTATCCACCACCCGTCAACT			
CH01e01-F	GGTTGGAGGGACCAATCATT	VIC	-	náchylnost vůči kroužkovité skvrnitosti (izolát Lsl)
CH01e01-R	CCCACTCTGTGCCAGATC			
CH04e03-F	TTGAAGATGTTGGCTGTGC	NED	-	polymorfismus
CH04e03-R	TGCATGCTGTCTCCTCCAT			

Tabulka 32: Primery použité pro multiplex PCR III

Primery	Sekvence (5' → 3')	Barva	Gen	Znak
CH02f06-F	CCCTCTCAGACCTGCATATG	6-FAM	<i>Rvi15</i>	rezistence vůči strupovitosti
CH02f06-R	ACTGTTTCCAAGCGCTCAGG			
CH02c02a-F	CTTCAAGTTCAGCATCAAGACAA	VIC	<i>Rvi15</i>	rezistence vůči strupovitosti
CH02c02a-R	TAGGGCACACTTGCTGGTC			
CH03a03-F	GTGGTGGTAATGACGAGAACCT	NED	-	náchylnost vůči kroužkovité skvrnitosti (izolát Lw048)
CH03a03-R	AAGCAAAGTAGCCAAACTGCAT			
CH02c02b-F	TGCATGCATGGAAACGAC	PET	-	náchylnost vůči kroužkovité skvrnitosti (izolát Lsl)
CH02c02b-R	TGGAAAAAGTCACACTGCTCC			

Tabulka 33: Primery použité pro multiplex PCR IV

Primery	Sekvence (5' → 3')	Barva	Gen	Znak
CH-F7-Fb1-F	AGCCAGATCACATGTTTCATC	6-FAM	<i>FBF7QT</i> <i>L</i>	rezistence vůči spále růžovitých
CH-F7-Fb1-R	ACAAACGGCCACCAGTTTATC			
CH-Vf1-F	ATCACCAACCAGCAGCAAAG	VIC	<i>Rvi6</i>	rezistence vůči stupovitosti
CH-Vf1-R	CATACAAATCAAAGCACAACCC			
CH03d11-F	ACCCCCACAGAAACCTTCTCC	NED	<i>Co</i>	sloupcový růst
CH03d11-R	CAACTGCAAGAACATCGCAGAG			
CH04g10-F	CAAAGATGTGGTGTGAAGAGGAA	PET	-	polymorfismus
CH04g10-R	GGAGGCAAAAGAGTGAACCT			
Md-ACS1-F	AGAGAGATGCCATTGTTCTGAC	6-FAM	<i>Md-ACS1</i>	měknutí plodů
Md-ACS1-R	CCTACAAACTTGCGTGGGGATTATAAGTGT			
CZU-ACO1-F	CCAGTTACCCGACTACCCATT	6-FAM	<i>Md-ACO1</i>	měknutí plodů
CZU-ACO1-R	TTCAAATCTGGCTCCTTGG			

Podmínky PCR amplifikace:

Složení reakční směsi (12,5 µl) pro SSR multiplex I: 14 ng genomové DNA; 0,5 U *Taq* polymerázy (Roche); BSA 0,5 µg/12,5 µl; 10 mM Tris-HCl (pH 8,8); 50 mM KCl; 1,5 mM MgCl₂; 200 µM dNTP; 0,16 µM CHVf1-F(6-FAM)/R primerů; 0,2 µM CH03d11-F(NED)/R primerů; 0,2 µM CH04g10-F(PET)/R primerů; 2 mM tetramethylamonium oxalát (Top Bio). Složení reakční směsi (12,5 µl) pro SSR multiplex II: 14 ng genomové DNA; 0,5 U *Taq* polymerázy (Roche); BSA 0,5 µg/12,5 µl; 10 mM Tris-HCl (pH 8,8); 50 mM KCl; 1,5 mM MgCl₂; 200 µM dNTP; 0,12 µM CH04d02-F(6-FAM)/R primerů; 0,2 µM CH01e01-F(VIC)/R primerů; 0,2 µM CH04e03-F(NED)/R primerů; 2 mM tetramethylamonium oxalát (Top Bio).

Složení reakční směsi (12,5 µl) pro SSR multiplex III: 14 ng genomové DNA; 0,5 U *Taq* polymerázy (Roche); BSA 0,5 µg/12,5 µl; 10 mM Tris-HCl (pH 8,8); 50 mM KCl; 1,5 mM MgCl₂; 200 µM dNTP; 0,2 µM CH02f06-F(6-FAM)/R primerů; 0,26 µM CH02c02a-F(NED)/R primerů; 0,2 µM CH03a03-F(PET)/R primerů; 0,2 µM CH02c02b-F(VIC)/R primerů; 2 mM tetramethylamonium oxalát (Top Bio).

Složení reakční směsi (12,5 µl) pro SSR multiplex IV: 14 ng genomové DNA; 0,5 U *Taq* polymerázy (Roche); BSA 0,5 µg/12,5 µl; 10 mM Tris-HCl (pH 8,8); 50 mM KCl; 1,5 mM MgCl₂; 200 µM dNTP; 0,25 µM CHF7Fb1-F(6-FAM)/R primerů; 0,16 µM CHVf1-F(VIC)/R primerů; 0,2 µM CH03d11-F(NED)/R primerů; 0,2 µM CH04g10-F(PET)/R primerů; 0,25 µM Md-ACS1-F(6-FAM)/R primerů; 0,25 µM CZU-ACO1-F(6-FAM)/R primerů; 2 mM tetramethylamonium oxalát (Top Bio).

Teplotní a časový průběh PCR: 1 cyklus počáteční denaturace 95 °C/15 min, 35 cyklů (denaturace 94 °C/30 s, annealing 56 °C/1 min, extenze 72 °C/30 s), 1 cyklus extenze 72 °C/1 hod.

Podmínky fragmentační analýzy pomocí kapilární elektroforézy byly optimalizovány s využitím přístroje ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Příprava vzorku pro fragmentační analýzu spočívá v jeho naředění apyrogenní ddH₂O, přidání Hi-DI formamidu pro kapilární elektroforézu (Applied Biosystems), velikostního standardu

GeneScanTM - 600 LIZ® Size Standard (Applied Biosystems). Následně byly vzorky v termocykleru denaturovány při teplotě 95 °C a ochlazeny na teplotu 0 °C. Denaturace vzorků probíhá v polypropylénových stripech zakrytých PCR fólií. Takto připravené vzorky byly vloženy do podavače ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Tabulka 34: Ředění PCR amplikonů a příprava vzorků multiplexů

Multiplex	Ředění PCR		Vzorek pro fragmentační analýzu		
	PCR produkt (μl)	H ₂ O (μl)	Ředěný PCR produkt (μl)	LIZ 600 (μl)	Hi-DI formamid (μl)
I	1	9	1	0,2	12
II	1	49	1	0,2	12
III	1	19	1	0,2	12
IV	1	19	1	0,2	12

Denaturace produktů (v termocykleru): denaturace probíhá při teplotě 95 °C po dobu 10 minut, následně byly vzorky ochlazeny na teplotu 0 °C na dobu 10 minut.

Tabulka 35: Podmínky pro fragmentační analýzu multiplexů

Parametry separace	Multiplex			
	I	II	III	IV
Délka kapiláry (cm)	36	36	36	36
Modul	GS STR POP4 (1 ml) G5			
Polymer	POP4	POP4	POP4	POP4
Virtuální filtr	G5	G5	G5	G5
Doba nástřiku (s)	5	5	5	5
napětí při nástřiku (kV)	15	15	15	15
teplota při separaci (°C)	60	60	60	60
Napětí při separaci (kV)	15	15	15	15
Doba separace (minuty)	20	24	20	30

Na následujících obrázcích jsou uvedeny chromatogramy programu GeneMapper 4.1 (Applied Biosystems), které dokumentují výstupní charakterizaci polymorfních alel jednotlivých SSR lokusů multiplexů I, II, III a IV.

Multiplex I:

- CHVf1 markerující alela 154 bp, nemarkerující 136 bp, 163 bp, 169 bp
- CH03d11 markerující alela 172 bp, nemarkerující 114 bp, 118 bp
- CH04d10 alela 133 bp a další

Multiplex II:

- CH04d02 markerující alela 142 bp, nemarkerující 115 bp, 117 bp, 129 bp
- CH01e01 markerující alela 108 bp, nemarkerující 106 bp, 114 bp
- CH04e03 alela 180 bp, 206 bp a další

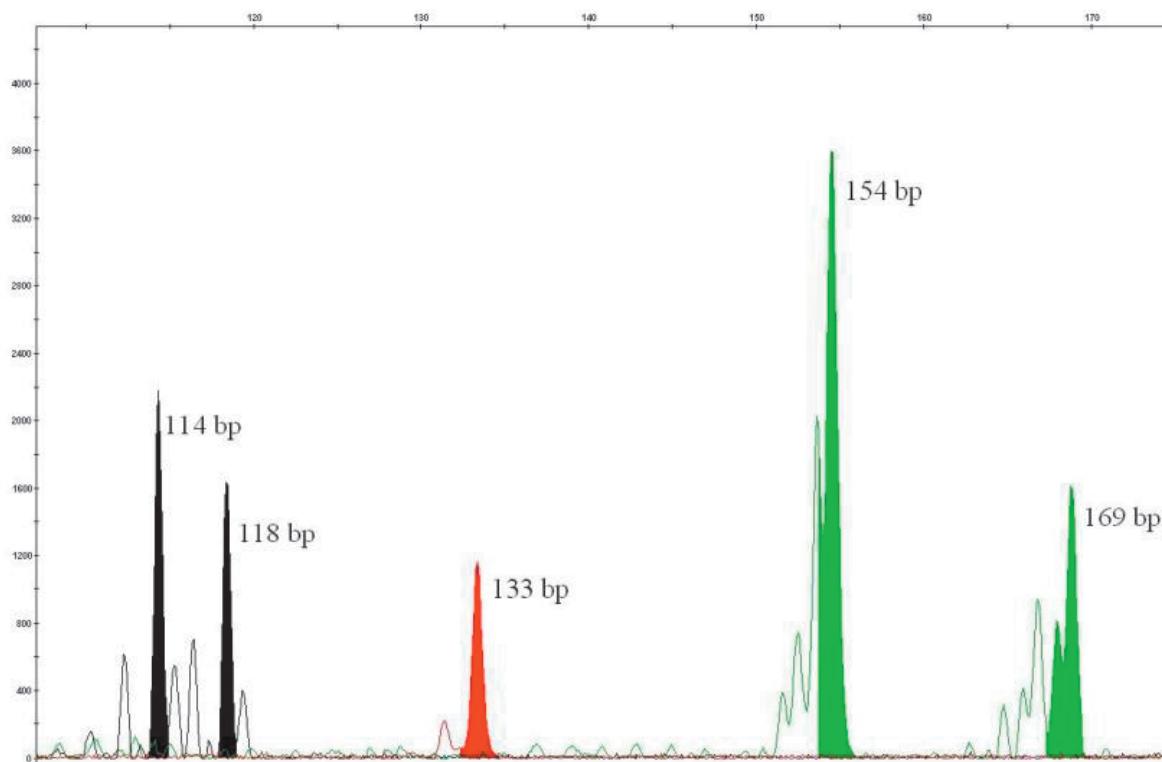
Multiplex III:

- CH02f06 markerující alela 142 bp, nemarkerující 134 bp, 142 bp, 148 bp, 154 bp
- CH02c02a markerující alela 172 bp, nemarkerující 138 bp, 152 bp, 160 bp, 179 bp
- CH03a03 markerující alela 153 bp, nemarkerující 149 bp, 165 bp, 177 bp
- CH02c02b markerující alela 110 bp, nemarkerující 114 bp, 120 bp

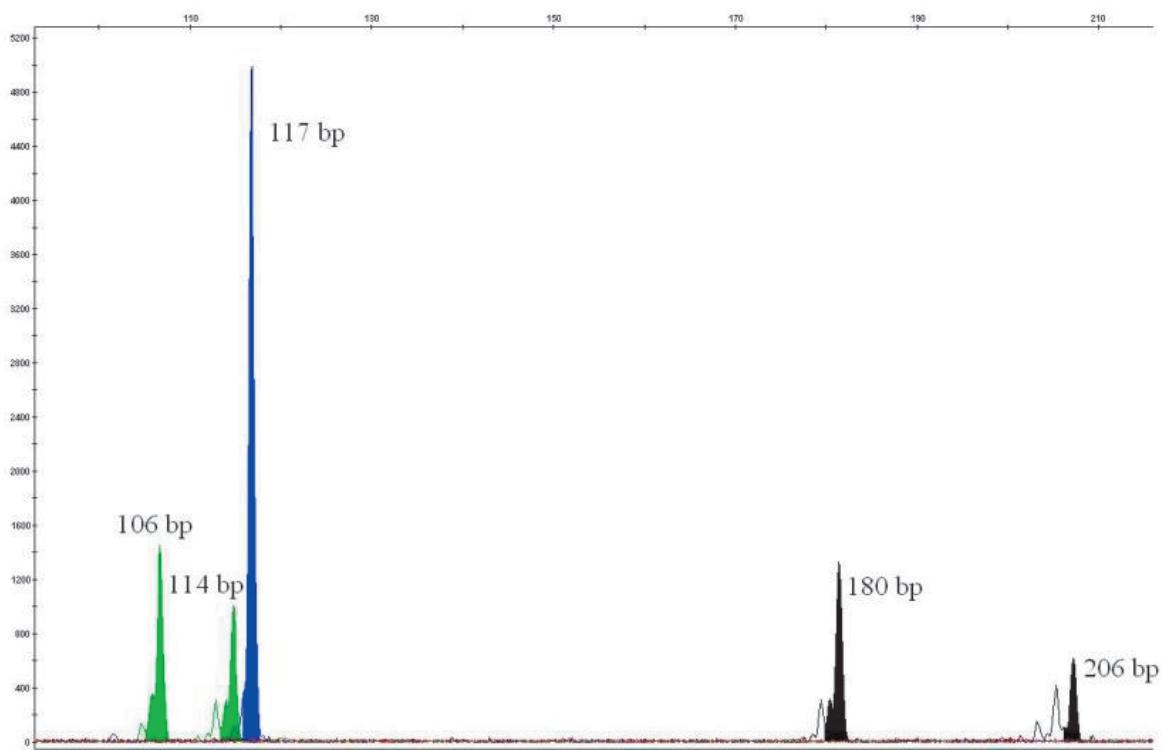
Multiplex IV:

- CHF7Fb1 markerující alela 201 bp, nemarkerující 163 bp
- CHVf1 markerující alela 154 bp, nemarkerující 136 bp, 164 bp
- CH03d11 markerující alela 172 bp, nemarkerující 114 bp, 118 bp
- CH04g10 alela 133 bp a další
- Md-ACS1 markerující alela 655 bp, nemarkerující 489 bp
- CZU-ACO1 markerující alela 450 bp, nemarkerující 512 bp

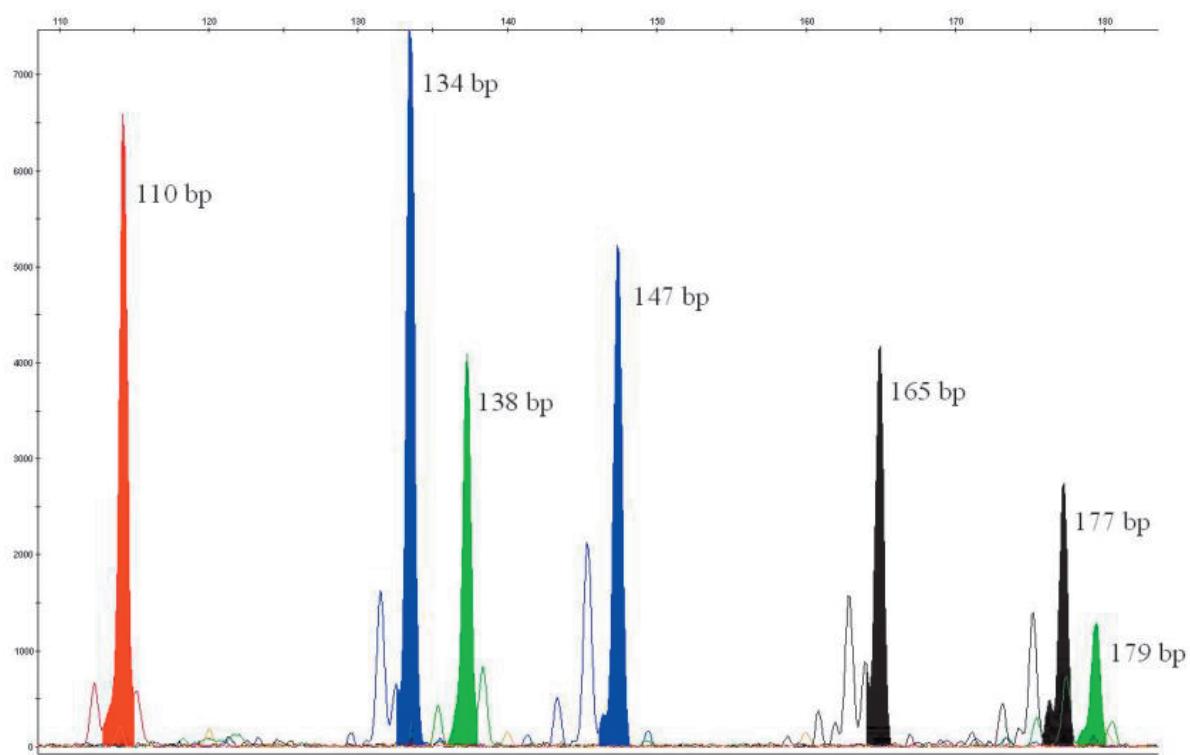
Obrázek 19: Vzorový chromatogram multiplexu I



Obrázek 20: Vzorový chromatogram multiplexu II



Obrázek 21: Vzorový chromatogram multiplexu III



Obrázek 22: Vzorový chromatogram multiplexu IV



4. SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ

Šlechtitelské strategie se neustále přizpůsobují novým metodám a zahrnují jak klasické tak molekulární techniky selekce. Doplnění klasického šlechtění o tyto molekulární metody vede k úspoře prostoru i času a následně rovněž k úspoře finančních prostředků, což je v dnešní době rozhodující faktor. Metodika, která by souhrnně popisovala celý proces selekce jabolní s využitím moderních molekulárních metod v raných fázích vývoje, nebyla dosud v České republice vydána. V této metodice je největší důraz kladen na přehledné zobrazení jednotlivých molekulárních markerů aktuálně požadovaných znaků jabolní, včetně podrobného popisu metody jejich detekce.

5. POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY

Metodika je určena šlechtitelům, kteří mají zájem o zařazení moderních molekulárních metod do procesu šlechtění jako vhodný doplněk fenotypového hodnocení. Vzhledem k tomu, že jsou zde podrobně popsány optimalizované laboratorní postupy a metody detekce jednotlivých molekulárních markerů, je tato metodika vhodná rovněž pro univerzity a výzkumné ústavy, které se touto problematikou zabývají.

6. EKONOMICKÉ ASPEKTY

Využívání molekulárních markerů pro selekci požadovaných genotypů již v raných stádiích vývoje má řadu přínosů a přispívá k zefektivnění šlechtitelského procesu. Genotypy, které nenesou požadovaný znak, jsou vyřazeny již ve stádiu semenáčků, čímž dochází k nemalé úspoře prostoru potřebného pro vysazování stromků ve školce a následně též v hybridním sadu. Díky snížení počtu hybridů dochází k nemalým úsporám i z časového hlediska, jak při vysazování, roubování či očkování, tak při následujícím hodnocení a ošetřování pokusných výsadeb. Celkově tak dochází k výraznému zkrácení šlechtitelského procesu. K finančním

úsporám dochází například díky snížení spotřeby podnoží, ochranných postřiků a dalších provozních nákladů. Nemalou výhodou molekulárních markerů je rovněž schopnost rozlišit genotypy s pyramidální rezistencí vůči patogenům, což by pouhým fenotypovým hodnocením bylo hodně časově náročné, případně by nebylo možné výběr.

7. SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY

- Ban Y., Honda CH., Hatsuyama Y., Igarashi M., Bessho H. a Moriguchi T. (2007) Isolation and Functional Analysis of a MYB Transcription Factor Gene that is a Key Regulator for the Development of Red Coloration in Apple Skin. *Plant Cell Physiology* 48(7): 958–970.
- Banchi E., Poles L., Magnago P., Pindo M., Costa F., Velasco R., Sargent D.J. (2013) A cost-effective strategy for Marker Assisted Selection (MAS) in Apple (*M. pumila* Mill.): The experience from the Fondazione Edmund Mach programme for resistance and quality traits. *Molecular Markers Horticulture Symposium*, September 25-27 2013, Riva del Garda (TN), Italy (*poster*).
- Bassil N., Lewers K. (2009) Genomics opportunities, new crops and new products. In: Folta K.M., Gardiner S.E. (eds.) *Genetics and Genomics of Rosaceae*. Springer Science, New York, USA, s. 55-70.
- Boudichevskaia A., Flachowsky H., Peil A., Fischer C., Dunemann F. (2006) Development of a multiallelic SCAR marker to scab resistance gene *Vr1/Vh4/Vx* from R12740-7A apple and its utility for molecular breeding. *Tree Genetics & Genomes* 2 (4): 186-195.
- Bergendal P.Q., Nybom N. (1966) Pome fruit breeding at Balsgard. In: Proc. of the Balsgard Fruit Breeding Symposium of August 31st–September 2nd 1964 at Fjäkestad, Sweden: 189–196.
- Costa F., Stella S., Van de Weg W.E., Guerra W., Cecchinelli M., Dallavia J., Koller B., Sansavini S. (2005) Role of the genes *Md-ACO1* and *Md-ACS1* in ethylene production and shelf life of apple (*Malus domestica* Borkh.). *Euphytica* 141: 181–190.
- Broggini G.A.L., Galli P., Parravicini G., Gianfranceschi L., Gessler C., Patocchi A. (2009) *HcrVf* paralogs are present on linkage groups 1 and 6 of Malus. *Genome* 52: 129-138.
- Bus V.G.M., Laurens F.N.D., Van De Weg W.E., Rusholme R.L., Rikkerink E.H.A., Gardiner S.E., Bassett H.C.M., Kodde L.P., Plummer K.M. (2005) The *Vh8* locus a new gene-for-gene interaction between *Venturia inaequalis* and the wild apple *Malus sieversii* is closely linked to the *Vh2* locus in *Malus pumila* R12740-7A. *New Phytologist* 166: 1035-1049.
- Costa F., Stella S., Van de Weg W. E., Guerra W., Cecchinelli M., Dallavia J., Koller B., Sansavini S. (2005) Role of the genes *Md-ACO1* and *Md-ACS1* in ethylene production and shelf life of apple (*Malus domestica* Borkh). *Euphytica* 141: 181-190.
- Dayton D.F. (1977) Genetic immunity to apple mildew incited by *Podosphaera leucotricha*. *HortScience* 12: 225 – 226.

- Dirlewanger E., Graziano E., Joobeur T., Garriga-Caldere F., Cosson P., Howad W., Arus P. (2004) Comparative mapping and marker-assisted selection in *Rosaceae* fruit crops. PNAS 101 (26): 9891–9896.
- Dvořák A., Vondráček J., Kohout K., Blažek J. (1976) Jablka. Academia, Praha. ISBN 80-200-0958-2
- Flachowsky H., Le Roux P.M., Peil A., Patocchi A., Richter K. a Hanke M.V. (2011) Application of a high-speed breeding technology to apple (*Malus domestica*) based on transgenic early flowering plants and marker-assisted selection. New Phytologist 192: 364–377.
- Gallott S.E., Lamb R.C., Aldwinckle H.S. (1985) Resistance to powdery mildew from some small fruited *Malus* cultivars. HortScience 20: 1085 – 1087.
- Frey J.E., Frey B., Sauer C., Kellerhals M. (2004) Efficient low-cost DNA extraction and multiplex fluorescent PCR method for marker-assisted selection in breeding. Plant Breeding 123: 554-557.
- Galli P., Broggini G.A.L., Kellerhals M., Gessler C. (2010) High-resolution genetic map of the *Rvi15* (*Vr2*) apple scab resistance locus. Molecular Breeding 26: 531-572.
- Chagné D., Carlisle CH.M., Blond C., Volz R.K., Whitworth C.J., Oraguzie N.C., Crowhurst R.N., Allan A.C., Espley R.V., Hellens R.P., Gardiner S.E. (2007) Mapping a candidate gene (*MdMYB10*) for red flesh and foliage colour in apple. BMC Genomics 2007 (8): 212.
- Cheng F.S., Weeden N.F., Brown S.K. (1996) Identification of co-dominant RAPD markers tightly linked to fruit skin color in apple. Theoretical and Applied Genetics 93: 222–227.
- Chevalier M., Lespinasse Y., Renaudin S. (1991) A microscopic study of the different classes of symptoms coded by the *Vf* gene in apple for resistance to scab (*Venturia inaequalis*). Plant Pathology 40: 249–256.
- Janick J., Cummins J.N., Brown S.K., Hemmat M., (1996) Apples. In: Janick J., Moore J.N. (eds.), Fruit Breeding, Vol. 1, Tree and Tropical Fruits. New York, John Wiley & Sons, Inc.: 1–77.
- Jha G., Thakur K., Thakur, P. (2009) The *Venturia* apple pathosystem: pathogenicity mechanism and plant defence responses. Journal of Biomedicine and Biotechnology 2009: 1-10
- Kellerhals M., Patocchi A., Duffy B., Frey J. (2008) Modern approaches for breeding high quality apples with durable resistance to scab, powdery mildew and fire blight. In: Boos, Markus (Ed.) Ecofruit - 13th International Conference on Cultivation Technique and Phytopathological Problems in Organic Fruit-Growing: Proceedings to the Conference from 18th February to 20th February 2008 at Weinsberg/Germany, s. 226-231.
- Kende H. (1993) Ethylene biosynthesis. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 44: 283–307.
- Khan M.A., Durel C.H.E., Duffy B., Drouet D., Kellerhals M., Gessler C., Patocchi A. (2007) Development of molecular markers linked to the 'Fiesta' linkage group 7 major QTL for

- fire blight resistance and their application for marker-assisted selection. *Genome* 50: 568-577.
- Lapins K.O. (1974) Spur type growth habit in 60 apple progenies. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 99: 568-572.
- Liebhard R., Gianfranceschi L., Koller B., Ryder C.D., Van De Tarchini E., Van De Weg E., Gessler C. (2002) Development and characterization of 140 new microsatellites in apple (*Malus x domestica* Borkh.). *Molecular Breeding* 10: 217-241.
- Malnoy M., Xu M., Borejsza-Wysocka E.E., Korban S.S., Aldwinckle, H.S. (2007) The role of *Vfa1*, *Vfa2* and *Vfa4* genes in resistance to *Venturia inaequalis* in transgenic McIntosh apple plants. *Acta Horticulturae* 738: 323-326.
- Markussen T., Kruger J., Schmidt H., Dunemann F. (1995) Identification of PCR-based markers linked to the powdery mildew resistance gene *P1* from *Malus robusta* in cultivated apple. *Plant Breeding* 114: 530-534.
- Peil A., Dunemann F., Richter K., Hoefer M., Király I., Flachowsky H., Hanke M.V. (2008) Resistance breeding in apple at Dresden-Pillnitz. In: Boos M (ed) Ecofruit. Proceedings of 13th international conference on cultivation technique and phytopathological problems in organic fruit-growing, Weinsberg, Germany, 18–20 Feb 2008, s. 220–225.
- Shay J.R., Hough L.F. (1952) Evaluation of apple scab resistance in selections of *Malus*. *American Journal of Botany* 39: 288–297.
- Sunako T., Sakuraba W., Senda M., Akada S., Ishikawa R., Niizeki M., Harada T. (1999) An allele of the ripening-specific 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase Gene (ACS1) in apple fruit with a long storage life. *Plant Physiology* 119: 1297-1303.
- Tartarini S., Gianfranceschi L., Sansavini S., Gessler C. (1999) Development of reliable PCR markers for the selection of the *Vf* gene conferring scab resistance in apple. *Plant Breeding* 118: 183-166.
- Tian Y., Wang C., Zhang J., James C., Dai H. (2005) Mapping *Co*, a gene controlling the columnar phenotype of apple, with molecular markers. *Euphytica* 145: 181-188.
- Vinatzer B.A., Patocchi A., Tartarini S., Gianfranceschi L., Sansavini S., Gessler C. (2004) Isolation of two microsatellite markers from BAC clones of the *Vf* scab resistance region and molecular characterization of scab-resistant accessions in *Malus* germplasm. *Plant Breeding* 123: 321-326.
- Visser T., Verhaegh J.J. (1977) Resistance to powdery mildew (*Podosphaera leucotricha*) of apple seedlings growing under glasshouse and nursery conditions. Proc Eucarpia Meeting of Fruit Tree Breeding, Angers 1977, s. 111 – 120.
- Zhuang Y., Liu H. T., Li C.M., Wang Y., Zhao, Y. B., Chen D.M., Han Z.H., Zhang X.Z. (2011) Inheritance of and Molecular Markers for Susceptibility of *Malus domestica* to fruit Ring Rot (*Botryosphaeria dothidea*). *Journal of Phytopathology* 159: 782-788.
- Xu M., Korban S.S. (2002) A cluster of four receptor-like genes resides in the *Vf* locus that confers resistance to apple scab disease. *Genetics* 162: 1995-2006.

8. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE

- Žďárská I., Vávra R., Suran P. (2015) Selekcce semenáčků na rezistenci ke strupovitosti jabloně infekcemi patogenem Venturia inaequalis. Zahradnictví 14 (1), příloha Ovocnářství: 34-35.
- Vávra R., Falta V., Litschmann T. (2014) Which genes of apple scab resistance keep control against pathogen V. inaequalis in future? 16th International Conference on Organic Fruit. Hohenheim, s. 162 – 166.
- Sedlák P., Vávra R., Vejl P., Boček S., Kloutvorová J. (2013) Efficacy loss of strobilurins used in protection against apple scab in Czech orchards. Horticultural Science 40 (2): 45–51.
- Vávra R., Blažek J., Vejl P. (2013) Růstové charakteristiky vybraných sloupcových genotypů jabloní. Vědecké práce ovocnářské 23: 47-57.
- Vávra R., Litschmann T., Falta V. (2013) Virulence patogena Venturia inaequalis na genotypech jabloní nesoucích geny rezistence v letech 2010 – 2013. Zahradnictví 12: 16 – 19.
- Vávra R., Sedlák P., Vejl P., Boček S. (2011) Characterisation of Venturia inaequalis populations in commercial apple orchards in the Czech Republic. In: Salaš, P. (ed): "Plants in conditions of changing climate". Lednice 20.- 21. 10. 2011, Úroda, Scientific supplement, s. 652 – 661.
- Melounová M., Vejl P., Zoufalá J., Blažek J., Vávra R. (2009) New PCR marker of deletion in Md-ACO1 loci controlling aplle fruit softening during storage. Sborník příspěvků mezinárodní konference Nové poznatky z genetiky a šľachtenia poľnohospodárskych rastlín, VÚRV Piešťany, 21. 10. 2009: 119-120.
- Vejl P., Melounová M., Zoufalá J., Sedlák P., Vávra R., Blažek J., Paprštejn F. (2009) Molecular markers of Rvi2, Rvi4, Rvi5, Rvi6 and Rvi8 genes in apple varieties and genetic resources collected in the Czech republic and their application in apple scab resistance breeding. Sborník příspěvků mezinárodní konference Nové poznatky z genetiky a šľachtenia poľnohospodárskych rastlín, VÚRV Piešťany, 21. 10. 2009, s. 18-21.
- Vejl P., Zoufalá J., Melounová M., Blažek J., Vávra R., Paprštejn F. (2009) Vývoj nových DNA markerů paralogů genů v lokusu Rvi6 zodpovědných za rezistenci jabloní vůči strupovitosti. Sborník příspěvků Osivo a sadba IX. odborný a vědecký seminář, Česká zemědělská univerzita v Praze 10.2.2009, s. 116-125.
- Zoufalá J., Vejl P., Melounová M., Blažek J., Křelinová J. (2009) Apple genetic resources and their molecular analysis. Agriculture 55(2): 69-79.
- Zoufalá J., Vejl P., Melounová M., Blažek J., Paprštejn, F., Křelinová J. (2009) Genetická analýza jabloní s červenou barvou dužniny. Sborník příspěvků Osivo a sadba IX. odborný a vědecký seminář, Česká zemědělská univerzita v Praze 10.2.2009, s. 106-115.

9. PŘÍLOHY

Příloha 1. Ukázka hodnocení vybraných odrůd jabloní pomocí tří multiplex SSR systémů

Odrůda	Multiplex I						Multiplex II						Multiplex III					
	CHv ₁	CH03d11		CH04g10		CH04dd02		CH01e01	CH04e03		CH02f06		CH02c02a	CH03a03		CH02c02b		
		CH03d11	CH04g10	CH04dd02	CH01e01	CH04e03	CH02f06		CH02c02a	CH03a03				CH02c02b				
Akane	169/169	114/118	133/141	117/142	106/114	192/206	139/154	172/176	149/165	110/114								
Albrechtovo	136/169	114/122	135/137	117/142	106/116	192/202	139/154	140/180	149/149	110/124								
Alkmene	136/169	114/114	133/133	117/117	106/114	192/206	145/154	152/170	147/165	114/124								
Ananasová reneta	124/136	114/118	133/133	117/117	106/114	180/194	142/154	170/174	149/165	110/110								
Andego	134/169	114/114	133/135	117/117	106/108	194/202	139/142	160/180	153/165	110/120								
Aneta	154/169	114/114	133/133	117/117	106/114	194/194	154/154	174/178	153/177	114/114								
Angold	134/169	114/114	133/133	117/129	106/108	194/194	148/154	174/174	153/165	110/120								
Antonovka	134/136	108/114	133/133	115/117	106/114	194/200	145/148	176/190	163/169	110/110								
Antonovka kamenička	134/169	110/114	133/133	117/129	106/114	194/198	139/148	176/180	149/163	110/110								
Antonovká těžká	134/136	108/114	133/133	115/117	106/114	194/200	145/148	176/190	163/169	110/110								
Astrachan bílý	169/169	112/118	137/137	115/117	104/106	192/198	134/154	174/174	165/165	110/124								
Astrachan červený	136/169	114/118	133/133	115/117	102/108	194/200	134/154	174/174	149/165	110/124								
Atlanta	136/136	114/172	133/141	117/117	106/116	186/194	142/145	157/162	161/165	114/114								
Auralia	136/169	118/120	133/133	117/117	106/116	186/192	145/154	152/174	149/165	114/124								
Bancroft	169/169	114/172	133/137	117/117	104/108	180/180	142/154	152/174	149/165	114/114								
Baumanova reneta	136/138	112/118	133/133	117/129	106/108	188/192	134/142	178/182	149/165	114/114								
Beforest	167/169	114/118	133/133	115/117	106/106	182/206	142/145	174/176	153/165	110/110								
Bezemjanka Micurina	134/136	114/118	133/135	115/117	106/114	204/206	139/142	186/206	147/149	124/124								
Bláhovo oranžové	136/169	114/114	133/133	117/142	102/108	186/204	145/145	152/170	165/165	110/110								
Blaník	154/169	114/118	133/167	117/117	106/108	192/194	145/150	138/140	149/165	114/114								
Bogajevskij Charvanskij	138/169	108/174	133/135	115/129	106/116	194/200	145/154	172/184	163/169	122/124								
Bojkovo	136/138	114/118	125/133	115/117	106/106	194/198	142/142	138/166	165/165	110/110								
Borovinka	134/169	116/118	135/135	115/117	106/106	204/204	142/145	176/206	147/147	122/124								
Braeburn	136/169	114/118	133/167	117/117	106/108	194/198	134/145	140/152	149/151	114/114								
Breuhahnovo	124/169	114/114	133/133	115/117	114/116	194/194	142/142	124/170	165/177	114/114								
Britemac	169/169	114/172	141/141	117/129	104/114	180/194	142/154	140/162	149/149	114/114								
Burgundy	134/136	114/118	133/133	117/117	108/114	182/192	139/154	178/178	163/163	110/110								

Odrůda	Mikrosatelitní lokusy						Multiplex III		
	Multiplex I			Multiplex II			CH02c02a	CH03aa03	CH02c02b
CHVf1	CH03d11	CH04g10	CH04d02	CH01e01	CH04e03	CH02f06	CH02c02a	CH03aa03	CH02c02b
Carola	136/154	110/120	133/133	117/117	102/114	192/192	152/186	165/165	114/114
Clijo	136/136	114/114	133/133	117/129	114/114	192/194	139/154	170/178	153/165
Clivia	136/136	114/114	133/141	117/129	102/116	186/194	150/154	152/174	165/177
Cornwallské hřebíčkové	136/136	114/122	133/133	117/117	106/108	188/192	134/142	138/178	149/177
Cortland	157/169	114/122	137/141	117/129	104/114	180/192	142/154	140/178	149/149
Cox's Orange Pipin	136/136	114/120	133/141	117/117	106/106	192/194	145/154	140/152	165/165
Cumulus	154/169	120/172	133/141	117/117	104/108	180/180	142/142	162/178	149/161
Daria	136/159	114/114	133/133	117/117	102/106	186/192	150/154	152/176	153/165
Delicia	124/169	114/172	133/141	117/117	104/114	194/206	148/154	174/186	149/149
Deliga	136/136	114/114	133/141	117/117	106/108	194/202	139/139	180/180	165/177
Delor	136/136	114/114	133/133	117/117	106/108	186/194	134/139	138/182	165/177
Delvit	169/169	114/114	133/133	117/117	104/114	194/194	145/154	140/170	149/163
Democrat	136/169	114/118	133/133	129/142	108/114	194/202	139/154	174/180	149/165
Desertnoe Isaeva	136/157	114/118	133/167	117/117	106/108	202/220	145/154	126/174	151/165
Diadém	136/169	114/118	133/133	117/117	102/114	186/194	150/154	152/170	149/165
Dima	136/169	114/172	133/135	117/117	106/106	194/218	139/142	176/178	165/165
Discovery	159/169	114/114	135/141	117/142	106/106	206/218	139/154	174/176	149/165
Dolores	136/154	114/172	133/133	117/117	106/114	180/194	154/154	170/172	149/177
Dublet	124/169	114/118	133/133	115/117	114/114	194/206	142/154	124/186	149/165
Dukát	136/169	114/118	133/133	117/117	102/114	192/194	145/154	152/170	149/165
Dülmener Rosen	159/163	114/118	125/133	117/129	102/108	182/198	145/154	174/188	165/179
Durello di Forli	136/136	108/174	133/135	115/117	104/106	190/198	145/145	176/180	153/163
Early Blaze	136/169	116/118	133/135	117/117	106/106	194/204	142/154	138/140	147/165
Elise Rathke	136/169	112/118	135/141	129/142	108/108	192/218	144/154	144/172	163/165
Elstar	136/136	114/114	133/133	129/129	106/108	186/194	139/154	174/180	165/177
Empire	169/169	114/172	133/141	117/117	104/104	194/198	134/154	138/174	149/163
Esopus Spittenburg	136/136	114/118	133/135	115/117	106/108	192/192	142/145	124/170	165/165
Fantasie	169/169	116/172	133/137	117/117	106/108	180/192	145/154	172/174	165/165
Fany	136/169	114/118	133/133	117/117	106/114	192/194	145/154	170/174	149/165

Odrůda	Mikrosatelitní lokusy						Multiplex II			Multiplex III		
	Multiplex I			Multiplex II			Multiplex II			Multiplex III		
	CHVf1	CH03d11	CH04g10	CH04d02	CH01e01	CH04e03	CH02f06	CH02c02a	CH03a03	CH02c02b		
Fiesta	154/169	114/118	133/167	115/117	106/106	194/196	142/154	164/178	153/165	110/124		
Flordika	154/159	114/118	133/135	117/117	106/106	192/206	139/145	170/174	165/165	114/114		
Florina	154/169	118/118	133/167	117/142	106/108	192/194	145/154	140/170	151/165	110/114		
Freedom	134/154	114/114	133/133	127/129	106/106	194/194	148/148	176/178	149/153	110/114		
Frosta	136/154	118/118	133/167	117/117	106/112	192/194	145/154	152/170	151/177	110/110		
Gala	134/134	114/114	133/133	117/129	106/108	192/194	134/154	138/174	151/153	114/120		
Gloster	136/169	114/118	125/135	115/117	104/106	194/194	142/145	138/140	151/165	110/110		
Gold Bohemia	136/169	114/114	133/133	117/129	114/114	186/194	134/154	138/174	149/177	120/120		
Goldcats	154/169	114/172	133/133	117/129	106/114	194/194	142/154	140/178	149/165	114/114		
Golden Delicious	136/169	114/114	133/133	117/129	108/116	194/194	139/154	174/180	153/177	114/120		
Goldstar	154/169	114/114	133/141	117/129	106/106	186/194	134/154	138/174	149/163	110/114		
Golida	154/169	114/114	125/133	117/129	104/108	194/194	134/154	138/174	149/163	110/110		
Granny Smith	136/136	110/114	125/133	115/117	106/108	192/194	142/154	160/174	177/177	110/110		
Hedvábné pozdněkvěté	136/169	114/114	133/133	117/117	108/116	192/198	145/145	162/164	165/173	134/136		
Herald	154/169	118/172	133/133	117/129	106/106	192/194	145/154	140/174	151/165	114/120		
Hladíkovo přírodné	136/138	114/114	133/135	117/117	108/114	192/194	142/142	124/152	151/165	110/114		
Holovouské malinové	136/136	114/118	133/133	115/129	106/106	192/204	139/145	170/180	149/165	114/124		
Honey Gold	169/169	114/118	133/135	117/129	108/108	192/194	139/145	170/180	153/165	110/120		
Champagner reinette	136/169	114/122	133/135	115/142	108/116	182/194	142/145	176/186	165/165	114/114		
Idared	136/169	114/118	133/133	115/142	106/108	182/194	145/154	164/172	165/165	110/110		
Ijunske Rane	144/154	122/178	133/167	117/117	104/108	182/192	142/142	174/176	147/153	110/114		
Jablonja Vatuse	130/163	98/114	133/133	115/117	98/106	200/200	134/145	140/186	149/177	110/110		
James Grieve	136/136	114/114	133/141	117/117	102/106	186/228	145/150	152/157	165/165	114/114		
James Grieve Compact	136/136	114/114	133/141	117/117	102/106	186/228	145/150	152/157	165/165	114/114		
James Grieve Red	136/136	114/114	133/141	117/117	102/106	186/228	145/150	152/157	165/165	114/114		
Jantar	136/169	114/118	133/133	117/117	108/108	182/194	139/154	172/180	153/165	110/120		
Jarka	136/169	114/122	133/141	117/129	108/114	186/194	134/139	138/174	149/153	114/114		
Jerseymac	169/169	114/172	133/135	117/142	106/106	180/194	142/145	162/162	147/165	114/114		
Jonadel	136/169	114/118	133/167	117/117	106/106	192/198	134/154	138/172	151/165	110/114		

Odrůda	Mikrosatelitní lokusy						Multiplex III			
	Multiplex I			Multiplex II			Multiplex III			
	CHVf1	CH03d11	CH04g10	CH04d02	CH01e01	CH04e03	CH02f06	CH02c02a	CH03a03	CH02c02b
Jonalicious	136/169	114/114	133/135	117/142	106/106	194/194	134/154	138/140	151/165	110/114
Jonalord	169/169	118/122	133/133	117/117	106/114	182/186	134/145	138/170	165/165	110/110
Jonamac	169/169	118/172	133/141	117/142	104/106	182/194	142/154	172/178	149/165	110/114
Jonathan	136/169	118/118	133/133	117/142	106/116	182/192	145/154	170/172	165/165	110/110
Julia	134/159	114/114	133/135	117/117	106/116	180/180	139/154	174/176	147/149	114/114
Julyred	169/169	114/172	133/141	115/142	104/106	180/194	142/145	162/162	165/165	114/114
Junnaja Sonata	169/169	109/114	125/133	115/115	108/116	192/198	142/145	124/176	165/177	110/114
Kachovskoje	136/159	110/122	125/167	115/117	106/108	194/198	154/154	176/176	165/169	110/110
Kanadské reneta	138/169	114/118	135/141	115/142	102/108	182/192	139/145	172/176	151/163	110/110
Kandil Sinap	159/169	109/162	165/167	125/127	102/112	188/194	142/154	162/176	155/163	110/110
Karmína	154/169	114/172	133/133	117/117	106/112	194/200	134/150	138/152	149/165	110/114
Kids Orange	136/163	114/118	133/135	117/117	102/106	192/194	134/145	138/152	151/165	114/114
Kitajka Pestraja	169/169	114/114	133/133	115/115	108/122	182/200	139/154	140/174	149/153	124/124
Klára	138/169	118/120	135/167	115/117	104/106	192/192	145/150	126/152	149/165	110/114
Kordona	154/169	118/172	137/167	117/117	104/106	180/192	145/154	140/174	165/165	114/114
Krásné zimní	134/154	114/122	133/167	117/117	104/112	182/188	143/150	162/176	153/155	110/114
Krasokvět Kitajka	159/169	114/118	133/167	115/117	106/106	192/192	129/145	170/186	147/153	114/114
Krasokvět žlutý	136/169	114/114	133/133	117/129	104/108	194/194	139/154	174/178	153/177	114/120
Lobo	136/169	114/172	133/141	117/129	104/114	180/192	139/142	178/178	149/149	114/114
Lodi	136/169	114/172	133/135	115/142	106/106	194/204	134/145	174/174	147/165	110/124
Lord Lambourne	136/169	114/122	133/141	117/117	106/114	186/200	134/150	138/152	149/165	114/114
Macoun	169/169	114/172	133/137	117/127	106/106	192/194	154/154	124/174	149/165	114/114
Macresa	134/154	114/172	133/141	117/117	104/106	194/200	142/154	174/178	149/149	114/114
McInosh Wijcik	169/169	122/172	137/141	117/117	104/106	180/194	142/154	174/178	149/165	114/114
McIntosh	169/169	122/172	137/141	117/117	104/106	180/194	142/154	174/178	149/165	114/114
Melba	136/169	114/172	133/141	115/117	104/104	180/194	142/154	162/174	149/161	114/114
Melodie	154/169	114/118	133/135	117/117	108/114	194/194	150/154	138/174	149/153	110/114
Melrose	169/169	118/118	133/167	117/142	104/106	192/194	134/154	138/172	151/165	110/114
Meteor	169/169	118/118	133/133	117/117	104/106	192/192	145/154	170/170	163/165	110/114

Odrůda	Mikrosatelitní lokusy						Multiplex III			
	Multiplex I			Multiplex II			Multiplex III			
	CHVf1	CH03d11	CH04g10	CH04d02	CH01e01	CH04e03	CH02f06	CH02c02a	CH03a03	CH02c02b
Mikra	154/169	110/114	133/133	117/129	102/108	192/194	148/154	174/186	153/165	114/114
Mio	136/169	112/114	133/137	117/129	104/114	192/200	137/154	174/176	149/165	110/114
Miodar	136/169	114/114	135/137	117/117	104/116	180/200	139/154	174/176	161/165	114/114
Mivibe	136/169	112/172	133/141	117/117	104/116	192/194	139/142	162/176	149/149	114/114
Monroe	154/169	114/118	133/135	115/117	106/116	194/194	142/154	162/174	153/165	114/114
Nabella	136/169	114/114	133/133	117/117	102/106	186/192	145/150	152/170	165/165	110/110
Naliv zlatý	136/169	114/114	133/133	115/129	104/106	192/192	142/144	124/140	147/177	110/120
Národní	157/169	110/114	133/135	117/129	108/114	200/218	142/142	152/180	163/165	110/110
Nela	136/154	114/172	133/133	115/117	108/114	200/228	150/154	152/174	149/161	114/114
Newfame	136/169	118/122	133/167	117/117	106/106	198/200	134/145	138/140	163/165	114/120
Noroc	136/169	114/118	133/135	117/129	108/114	194/204	139/154	164/186	147/153	110/124
Northern Spy	136/169	114/114	133/167	115/117	104/104	194/194	139/142	124/180	153/177	114/114
Oldenburgovo	124/169	114/118	133/133	115/117	104/104	194/194	148/154	170/186	149/149	110/124
Oldenburgovo červené	136/169	114/118	133/133	117/142	102/104	192/192	145/154	170/172	165/165	110/114
Orin	169/169	114/114	125/133	129/142	108/116	194/218	139/154	170/174	153/165	110/120
Otava	154/169	114/172	133/133	117/129	106/114	186/194	150/154	138/174	149/163	110/114
Ozark Gold	136/169	114/118	133/167	117/129	104/106	192/194	145/154	170/174	151/177	110/120
Paskevica	159/169	114/114	133/167	115/117	104/106	192/206	129/148	170/188	147/153	122/124
Pepin šafránový	136/169	109/114	133/135	115/117	104/108	192/192	129/145	170/176	165/177	110/110
Pidi	136/169	120/172	133/141	117/117	106/114	194/200	154/154	140/174	149/177	114/114
Pikolo	136/136	114/118	133/133	117/129	106/114	184/194	148/154	157/170	149/165	110/110
Poleeskoe	136/136	109/114	133/133	115/117	104/106	194/198	142/142	124/166	165/165	110/110
Pom For You	136/167	114/172	133/137	117/117	104/130	182/186	154/154	172/174	165/177	114/114
Pom Pink	169/169	114/172	133/141	117/117	102/106	180/194	142/145	152/178	165/165	114/114
Pomoda	136/157	114/118	133/141	115/117	106/108	194/206	139/154	164/176	149/165	110/110
Primadela	154/169	118/172	133/135	117/117	104/116	194/200	142/154	138/140	153/165	114/114
Primula	136/154	118/172	133/141	117/117	114/114	180/200	154/154	140/174	153/161	110/114
Priol's Delicious	124/136	114/114	133/133	115/117	106/114	194/230	142/150	152/170	165/165	114/114
Priscilla	154/169	118/172	141/167	117/117	104/106	174/194	142/145	140/178	151/153	110/114

Odrůda	Mikrosatelitní lokusy						Multiplex III		
	Multiplex I			Multiplex II			CH02c02a	CH03a03	CH02c02b
	CHVf1	CH03d11	CH04g10	CH04d02	CH01e01	CH04e03	CH02f06	CH02c02a	CH03a03
Produkta	134/169	114/114	133/135	117/117	108/114	194/194	139/142	160/180	163/177
Průsvitné letrní	136/169	114/114	133/139	115/115	104/106	192/194	134/144	140/174	147/165
Rajka	154/169	114/114	133/133	117/129	106/114	186/186	150/154	138/178	149/153
Reanda	159/163	114/118	125/133	117/129	102/108	182/198	145/154	174/188	165/179
Red Delicious	163/169	114/118	133/135	117/117	104/106	194/198	134/145	138/140	151/163
Red Fre	134/154	114/122	135/141	117/117	106/106	174/194	142/154	162/172	147/165
Red Wealthy	169/169	115/118	133/135	117/117	104/106	192/204	142/145	170/206	147/165
Redcats	136/169	114/172	133/141	117/129	104/106	180/186	142/145	157/178	165/165
Regia	136/163	114/122	133/141	117/117	106/106	194/198	142/145	152/172	163/165
Renet Ijunskej	144/169	114/114	133/133	117/117	104/108	192/194	143/154	174/186	149/153
Renet Simirenka	163/169	114/118	135/167	117/117	104/106	194/198	134/145	138/140	151/163
Rezista	136/154	114/118	133/141	117/129	104/104	180/194	150/154	140/152	163/177
Rome Beauty	136/159	118/122	133/135	117/117	106/108	182/200	145/154	126/178	149/165
Rosana	136/154	122/172	133/133	117/117	106/106	186/194	134/142	138/178	163/165
Rozmarýn bílý	136/169	114/114	133/133	115/127	102/122	182/200	127/139	140/160	149/153
Rubimeg	136/169	114/114	133/133	117/129	104/106	186/192	145/154	170/174	149/165
Rubín	136/169	112/114	133/133	117/129	104/114	186/194	134/154	138/174	149/177
Rubinola	154/169	114/172	133/133	117/129	108/114	180/194	134/154	138/174	149/177
Rubinstep	136/136	114/118	133/133	117/117	104/114	194/194	134/145	138/152	149/177
Ruciliva	136/169	114/114	133/133	117/117	114/114	186/192	154/154	170/174	149/149
Ruciliva	136/169	114/114	133/133	117/117	114/114	186/192	154/154	170/174	149/149
Ruciliva	136/169	114/114	133/133	117/117	114/114	186/192	154/154	170/174	149/149
Rumjanka Almatinskája	136/136	114/114	133/135	117/117	106/106	182/206	145/148	126/186	141/165
Selena	154/169	114/172	133/141	117/129	104/108	182/182	142/154	162/174	149/161
Sigovskoe	159/169	114/114	133/167	117/117	106/106	192/208	139/145	126/186	147/149
Sir Prize	154/169	114/114	133/133	117/129	106/108	194/200	139/139	174/180	153/153
Sláva Donbasa	136/138	114/118	125/133	117/142	104/106	194/194	142/142	124/138	165/165
Spalord	136/154	118/172	141/167	115/117	104/104	182/194	142/145	140/178	149/151

Odrůda	Mikrosatelitní lokusy									
	Multiplex I				Multiplex II				Multiplex III	
	CHVf1	CH03d11	CH04g10	CH04d02	CH01e01	CH04e03	CH02f06	CH02c02a	CH03a03	CH02c02b
Sparjon	163/169	118/172	133/135	117/117	106/106	182/194	134/145	138/170	163/165	110/114
Spartan	163/169	114/172	135/141	117/117	106/106	194/194	134/142	138/178	149/163	114/114
Spencer	169/169	114/172	133/141	117/117	104/108	180/194	139/154	174/180	149/153	114/120
Spigold	136/169	114/114	133/133	115/117	104/108	194/194	139/139	124/180	153/177	114/114
Starcast	136/136	114/172	133/137	117/129	104/106	186/194	154/154	174/174	165/165	114/114
Starking Delicious	163/169	114/118	135/167	117/117	104/106	194/198	134/145	138/140	151/163	110/114
Starkrimson	163/169	114/118	135/167	117/117	104/106	194/198	134/145	138/140	151/163	110/114
Sudetská reneta	136/169	114/114	133/133	117/117	106/106	194/202	142/148	170/180	165/165	124/124
Suncats	154/169	114/172	133/141	117/129	102/106	180/194	142/154	174/174	165/177	114/114
Šampión	169/169	114/114	133/133	117/129	104/114	186/194	150/154	138/174	149/177	114/114
Tábor	154/169	114/172	133/141	117/129	104/108	180/194	134/154	138/174	149/161	114/120
Topaz	136/154	114/172	133/133	117/129	106/114	186/194	134/154	138/174	163/177	74/110
Tydeman's Worcester	136/169	114/122	133/133	117/117	106/114	180/206	139/142	176/178	149/165	114/114
Vanda	154/169	114/172	133/141	117/117	106/106	186/194	134/142	138/178	163/165	110/110
Wysocina	154/169	114/172	137/141	117/117	104/106	194/200	142/154	174/178	149/149	114/114
Watervlietské mramorované	134/136	114/114	135/139	117/117	102/114	180/192	142/154	174/178	151/165	110/120
Wel Red	169/169	115/118	133/135	117/117	104/106	192/204	142/145	170/206	149/165	110/124
Wellington	136/169	114/118	133/137	117/117	106/114	180/204	142/145	176/178	147/149	114/114
Zarja Altau	154/169	114/118	137/141	142/142	92/104	192/200	144/154	174/174	147/165	110/110
Zimní citrónové	136/169	114/114	125/137	115/115	108/114	192/204	142/142	124/194	163/165	114/114
Zimní dezertní	169/169	118/118	133/135	129/142	104/114	188/192	134/154	138/172	163/165	110/110
Zita	169/169	114/114	133/133	117/142	106/114	194/200	139/142	162/176	149/169	110/114
Zuzana	136/136	114/114	133/141	115/117	102/104	194/230	142/145	138/157	165/165	114/114
Zvoša	136/169	114/118	125/133	115/129	104/104	186/192	150/154	138/174	165/177	110/114

Příloha 2.: Ukázka hodnocení českých odrůd jabloní pomocí PCR multiplexu IV

Odrůda	Multiplex IV					<i>Md-ACS-1</i>	<i>Md-ACO1-CU</i>
	CHF7Fb1	CHVf1	CH03d11	CH04g10			
Aneta	163/201	154/169	114/114	133/133	655/655	512/512	
Angold	163/201	134/169	114/114	133/133	489/655	512/512	
Blaník	163/201	154/169	114/118	133/167	489/655	512/512	
Clijo	163/201	136/136	114/114	133/133	489/655	512/512	
Cumulus	163/201	154/169	120/172	133/141	489/489	512/512	
Daria	163/207	136/159	114/114	133/133	489/489	512/512	
Diadém	163/207	136/169	114/118	133/133	489/489	512/512	
Dima	163/163	136/169	114/172	133/135	655/655	512/512	
Dublet	163/163	124/169	114/118	133/133	655/655	512/512	
Dukát	163/201	136/169	114/118	133/133	655/655	512/512	
Fantasia	163/201	169/169	116/172	133/137	655/655	512/512	
Fany	163/201	136/169	114/118	133/133	489/655	512/512	
Frosta	163/201	136/154	118/118	133/167	489/655	512/450	
Gold Bohemia	163/201	136/169	114/114	133/133	655/655	512/512	
Goldstar	163/201	154/169	114/114	133/141	489/655	512/512	
Golida	163/163	154/169	114/114	125/133	655/655	512/512	
Jantar	163/201	136/169	114/118	133/133	489/655	512/450	
Jarka	163/201	136/169	114/122	133/141	655/655	512/512	
Julia	163/163	134/159	114/114	133/135	489/655	512/512	
Karmína	163/201	154/169	114/172	133/133	655/655	512/450	
Klára	163/201	138/169	118/120	135/167	489/489	512/512	
Kordona	163/201	154/169	118/172	137/167	489/489	512/512	
Melodie	163/201	154/169	114/118	133/135	489/655	512/450	
Meteor	163/201	169/169	118/118	133/133	489/489	450/450	
Miodar	163/168	136/169	114/114	135/137	489/489	512/512	
Mivive	163/168	136/169	112/172	133/141	489/489	512/512	
Nabella	163/201	136/169	114/114	133/133	489/489	512/512	
Nela	163/163	136/154	114/172	133/133	489/655	512/512	

Odrůda	Multiplex IV					<i>Md-ACS-1</i>	<i>Md-ACO1-CZU</i>
	CHF7Fb1	CHVf1	CH03d11	CH04g10			
Otava	163/201	154/169	114/172	133/133		655/655	512/512
Produkta	163/163	134/169	114/114	133/135		489/655	512/512
Rajka	163/163	154/169	114/114	133/133		655/655	512/512
Rezista	163/163	136/154	114/118	133/141		489/655	512/512
Rosana	163/163	136/154	122/172	133/133		489/655	512/512
Rubimeg	163/201	136/169	114/114	133/133		655/655	512/512
Rubín	163/201	136/169	112/114	133/133		655/655	512/512
Rubinola	163/201	154/169	114/172	133/133		489/655	512/512
Rubinstep	163/201	136/136	114/118	133/133		655/655	512/512
Selena	163/201	154/169	114/172	133/141		489/489	512/512
Sparjon	163/201	163/169	118/172	133/135		489/655	512/450
Šampión	163/201	169/169	114/114	133/133		489/655	512/512
Tábor	163/201	154/169	114/172	133/141		489/655	512/512
Vanda	163/201	154/169	114/172	133/141		489/655	512/512
Zita	163/201	169/169	114/114	133/133		489/489	512/512
Zuzana	163/163	136/136	114/114	133/141		489/655	512/512
Zvoša	163/163	136/169	114/118	125/133		489/655	512/512

**MINISTERSTVO ZEMĚDĚLSTVÍ ČESKÉ REPUBLIKY
ODBOR ROSTLINNÝCH KOMODIT**

Sídlo: Těšnov 65/17, 110 00 Praha 1

v y d á v á

O S V Ě D Č E N Í

69248/2015-MZE-17221

o uznání uplatněné certifikované metodiky

v souladu s podmínkami „Metodiky hodnocení výsledků výzkumu a vývoje“

Název: Selekcí jabloní v rané vývojové fázi s využitím molekulárních markerů

Autorský tým: Ing. Radek Vávra, Ph.D., Ing. Ivona Žďárská, Ing. Veronika Kadlecová Ph.D., Ing. Jan Blažek CSc., doc. Dr. Ing. Pavel Vejl, Ing. Petr Sedlák, Ph.D., Mgr. Martina Melounová Ph.D.

Názvy organizací:

Výzkumný a šlechtitelský ústav ovocnářský Holovousy s.r.o.,
Česká zemědělská univerzita v Praze.

Místo vydání metodiky: neuvedeno.

Vypracováno v rámci řešení projektu Ministerstva zemědělství ČR číslo QH81142 Sloupové jabloně s odolností proti chorobám. V průběhu zpracování metodiky byla rovněž využita infrastruktura projektu CZ.1.05/2.1.00/03.0116.

V Praze dne 23. prosince 2015

(Razítko odborného orgánu státní správy):



(Jméno a funkce zástupce odborného útvaru státní správy): **Ing. Zdeněk Trnka**
Ředitel Odboru rostlinných komodit

(Podpis zástupce odborného útvaru státní správy):

Selekce jabloní v rané vývojové fázi s využitím molekulárních markerů

Autoři: Radek Vávra a kol.

VYDAL: VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOCNÁŘSKÝ HOLOVOUSY S.R.O.,
HOLOVOUSY 129, 508 01 HOŘICE

Tisk: Žaket - kartografické vydavatelství a tiskárna

Počet kopií: 500

e-mail: vavra@vsuo.cz

ISBN 978-80-87030-43-1