

SEGREGATION ANALYSIS OF AGRICULTURAL IMPORTANT TRAITS OF APPLES

STUDIUM SEGREGACE MARKERŮ HOSPODÁŘSKY VÝZNAMNÝCH ZNAKŮ JABLONÍ

Zoufalá J.¹, Vejl P.¹, Melounová M.¹, Blažek J.², Křelinová J.², Paprštejn F.²

¹ Department of Genetics and Breeding, Faculty of Agrobiolgy, Food and Natural Resources, Czech University of Life Sciences, Kamýcká 129, 165 21 Praha 6 - Suchbøl, Czech Republic

² Research and Breeding Institute of Pomology Holovously., Holovously 1, 508 01, Hořice, Czech Republic

E-mail: zoufala@af.czu.cz, vejl@af.czu.cz

ABSTRACT

Segregation of four PCR markers was tested in this work. There were chosen markers describing red flesh, softening of flash, resistance to scab (*Venturia inaequalis*) and resistance to powdery mildew (*Podosphaera leucotricha*). Segregation of these markers was rated by χ^2 test in four F1 progenies: cross 4 – HL 37 (Florina x *M. robusta*) x Flordika, cross 22 – HL 39 (Florina x *M. robusta*) x Rubinstep, cross 27 HL 804 (FAW 3566 x A 679-2) x HL 39 (Florina x *M. robusta*), cross 21 – HL 423 (Florina x *M. robusta*) x Rubinstep. Cross 4 was already selected by infection tests in a greenhouse. In this cross was detected more dominant homozygotes (51,4 %) and heterozygotes (32,4 %) in *Vf* gene, than was expected. By segregation analysis of *Vf* gene and *Md-ACS1* gene was found, that variety Rubinstep was not fatherly component of crosses 21 and 22. In this segregation analysis was found, that markers of genes *MdMYB10*, *Md-ACS1*, *Vf* and *Pll* could be used in MAS (marker-assisted selection).

Key words: Apple, segregation analysis, *MdMYB10* gene, *Md-ACS1* gene, *Vf* gene, *Pll* gene

Acknowledgments: This work was financed by grant Mze ČR QH 81142.

ÚVOD

Šlechtění jabloní jakožto víceletých dřevin je poměrně náročný a dlouhý proces. Selektce je ztížena především dlouhou juvenilní fází, ve které není možné hodnotit hospodářsky významné vlastnosti. K urychlení a zpřesnění selektce mohou přispět molekulárněgenetické markery, které detekují monogenně řízené vlastnosti (TARTARINI, 2003).

Velké množství markerů využívaných při selekci souvisí s detekcí genů zajišťujících odolnost vůči strupovitosti jabloní (*Venturia inaequalis*). Nejvýznamnější jsou markery genu *Vf*, který je odvozen od botanického druhu *Malus floribunda* klon 821 (TARTARINI *et al.*, 1999). Tento marker využil k hodnocení nových českých odrůd odvozených od donoru *Vf* genu z *Malus floribunda* VEJL *et al.* (2003). VEJL *et al.* (2003) také sledoval segregaci tohoto markeru ve štěpících potomstvech, které byly podrobeny selekci za použití skleníkových infekčních testů. Padlí jabloňové (*Podosphaera leucotricha*) způsobuje značné ekonomické ztráty z důvodu snížení produkce u napadených stromů, snížení kvality a estetické hodnoty plodů. Četné studie odhalily vysokou hladinu rezistence u některých botanických druhů jabloní, a to zejména u *Malus robusta* a *Malus zumi* (JANICK *et al.*, 1996). MARKUSEN *et al.* (1995) navrhl RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) marker, který identifikoval dominantní alelu genu *PII* odvozeného z botanického druhu *Malus robusta*.

Kromě rezistence jabloní vůči významným patogenům patří mezi základní šlechtitelské cíle i kvalita plodů, jejich dobrá skladovatelnost a nutriční hodnotnost (JANICK *et al.*, 1996). Nadměrné měknutí dužniny má vliv na další sensorické vlastnosti plodů, jako pevnost, šřavnatost, křehkost dužniny a zvýšenou moučnatost dužniny (ORAGUZIE *et al.*, 2004). Etylen je klíčový regulátor procesu zrání jablek a omezení jeho biosyntézy je základní mechanismus, zajišťující skladování jablek v prostředí kontrolované atmosféry (HARADA *et al.*, 2000). Některé odrůdy produkují velmi malé množství etylenu během skladování a mohou tak být skladovány při nízké teplotě až jeden rok, aniž by došlo ke zhoršení jejich kvalitativních parametrů (SUNAKO *et al.*, 1999). SUNAKO *et al.* (1999) zjistil, že jedna alela genu pro ACC-syntázu (*Md-ACS*) má v oblasti promotoru inserci. Tuto alelu označil *Md-ACSI-2* a uvádí, že tato inserce v promotoru způsobuje velmi nízkou transkripční aktivitu tohoto genu. HARADA *et al.* (2000) určil odrůdy s homozygotní sestavou alel *Md-ACSI-2*, které produkují jen velmi malé množství etylenu v porovnání s odrůdami s homozygotní sestavou původní alely *Md-ACSI-1*, která má normální transkripční aktivitu. SUNAKO *et al.* (1999) navrhnul PCR (Polymerase Chain Reaction) marker, který detekuje obě alely genu *Md-ACS* pro ACC-syntázu. Tento marker je schopný odlišit homozygotní i heterozygotní sestavu alel. HARADA *et al.* (2000) hodnotil 35 odrůd, které byly sklizeny a umístěny na 12 dní do inkubátoru se stálou teplotou 20 °C. Tyto podmínky zajistily klimakterickou fázi a maximální produkci etylenu. Nejvyšší produkce etylenu dosáhla odrůda Jersey mac s homozygotní sestavou alel *Md-ACSI-1*, zatímco nejnižší syntéza etylenu byla zaznamenána u odrůdy Megumi s homozygotní sestavou alel *Md-ACSI-2*.

Červené zbarvení dužniny je podle průzkumů u konzumentů žádané. Čerstvé ovoce s červenou pigmentací, tedy s obsahem anthokyanů, představuje vynikající zdroj antioxidantů (CHAGNÉ *et al.*, 2007). Barva dužniny je jedna z pomologických charakteristik. Je to znak méně variabilní než barva slupky. Dužnina často není jednobarevná a například cévní svazky mohou být zbarveny výrazněji (DVOŘÁK *et al.*, 1976). Anthokyanová barviva náležejí do skupiny látek sekundárních metabolitů, které se také označují jako flavonoidy. U rostlin zastávají flavonoidy různorodé funkce od obranných, protistresových až po funkci atraktantů pro opylovače (ESPLEY *et al.*, 2006). Odrůdy s výrazně červenou dužninou jsou odvozeny od botanického druhu *M. pumila* var. *Niedzwetzkyana* (DVOŘÁK *et al.*, 1976). Hybridy odvozené od *M. pumila* var. *Niedzwetzkyana* mají s červeným zbarvením dužniny spojené některé nežádoucí vlastnosti jako je malá velikost plodů, rychle měknoucí dužnina a trpká chuť. Úkolem šlechtitelů je získat odrůdy s červenou dužninou, které by postrádali další negativní vlastnosti (CHAGNÉ *et al.*, 2007). CHAGNÉ *et al.* (2007) vyvinul PCR marker, pomocí kterého detekoval dominantní alelu genu *MdMYB10*, který zajišťuje červené zbarvení dužniny a testoval jeho segregaci v hybridních potomstvech.

Cílem této práce bylo hodnocení segregace čtyř zvolených markerů v hybridních potomstvech. Hodnoceny byly markery genu *Vf*, který zajišťuje rezistenci vůči strupovitosti, genu *Pl1* řídicího rezistenci vůči padlí jabloňovému, genu *Md-ACS1*, který má vliv na měknutí dužniny jablek a genu *MdMYB10*, který determinuje červené zbarvení dužniny plodů.

MATERIÁL A METODIKA

Veškerý biologický materiál použitý pro analýzy byl získán ve Výzkumném a šlechtitelském ústavu ovocnářském v Holovousích. Pro hodnocení segregace jednotlivých markerů byla vybrána čtyři hybridní potomstva vzniklá záměrným křížením. Jednalo se o tyto křížení: kombinace 4 – HL 37 (Florina x *M. robusta*) x Flordika, kombinace 22 – HL 39 (Florina x *M. robusta*) x Rubinstep, kombinace 27 HL 804 (FAW 3566 x A 679-2) x HL 39 (Florina x *M. robusta*), kombinace 21 – HL 423 (Florina x *M. robusta*) x Rubinstep. Kvalitní vysokomolekulární DNA byla získána pomocí izolačního kitu DNeasy Plant mini kit firmy Qiagen (SRN). Izolace probíhala podle standardního postupu uváděného výrobcem.

Hodnocení přítomnosti genu MdMYB10

Přítomnost genu *MdMYB10* byla zjišťována pomocí dominantního markeru, který identifikoval CHAGNÉ *et al.* (2007). Přítomnost markeru je charakterizována fragmentem o velikosti 786 bp. Amplifikace tohoto markeru byla optimalizována pomocí teplotního gradientu a také bylo upraveno složení PCR reakce, které uvádí CHAGNÉ *et al.* (2007). Do reakce bylo přidáno BSA (bovinní sérum albumin) a PCR Enhancer (Top-Bio, ČR), který obsahuje 0,1 M tetramethyl ammonium oxalát. Amplifikace byla testována u botanických druhů *M. pumila* var. *Niedzwetzkyana* a *M. robusta*, který byl donorem tohoto genu u testovaných kombinačních křížení. Tyto botanické druhy jabloní jsou donory červeného zbarvení dužniny (CHAGNÉ *et al.*, 2007). Složení PCR reakce pro tento marker a její teplotní profil je shrnut v tabulkách 1 a 2.

Tab. 1 Složení PCR reakce všech analyzovaných markerů v objemu 25 μ l

Marker	dsDNA	PCR pufr	MgCl ₂ (mM)	DNTP (μ M)	Primer F (μ M)	Primer R (μ M)	Taq polymeráza	PCR Enhancer (mM)	BSA (mg)
		Fermentas (Litva)			Proligo (USA)		Fermentas (Litva)	Top-bio (ČR)	
<i>MdMYB10</i>	50 ng	1 x	0,65	100	0,2	0,2	1 U	2,4	2,5
<i>Md-ACSI</i>	50 ng	1 x	2,5	200	0,2	0,2	1,2 U		
<i>Vf</i> gen	50 ng	1 x	1,5	200	0,2	0,2	0,6 U		
<i>PII</i> gen	10 ng	1 x	2,5	300	1,2		1,2 U		

Analýza *Md-ACSI* genu

Pro hodnocení alelické sestavy *Md-ACSI* genu byl vybrán kodominantní specifický marker. Alela *Md-ACSI-1* s normální transkripční aktivitou je charakterizována přítomností fragmentu o velikosti 489 bp, alela *Md-ACSI-2* s omezenou transkripční aktivitou a nízkou produkcí etylenu je určena přítomností fragmentu o velikosti 655 bp (SUNAKO *et al.*, 1999). ORAGUZIE *et al.* (2004) dále uvádí složení PCR reakce a její průběh, které bylo užito i v této práci a je uvedeno v tabulkách 1 a 2. Teplota nasedání primerů byla optimalizována pomocí teplotního gradientu.

Detekce genu *Vf*

Přítomnost genu *Vf* byla určena pomocí kodominantního markeru navrženého TARTARINI *et al.* (1999). Pro aplikaci tohoto markeru bylo vybráno složení PCR reakce a její průběh, který optimalizoval VEJL *et al.* (2003). Souhrnný teplotní a časový profil je uveden v tabulce 2. Tabulka 1 shrnuje chemické složení PCR reakce pro detekci *Vf* genu.

Hodnocení přítomnosti markeru genu *PII*

Pro detekci genu *PII* byl zvolen dominantní RAPD marker, který navrhl MARKUSEN *et al.* (1995). Pro aplikaci tohoto markeru byl použit teplotní a časový profil a složení PCR reakce standardně využívané v laboratoři genetických analýz katedry genetiky a šlechtění jak uvádí VEJL *et al.* (2005). Amplifikace byla testována u botanického druhu *M. robusta*, který uvádí MARKUSEN *et al.* (1995) jako donor genu *PII*. Složení i profil PCR reakce jsou uvedeny v tabulkách 1 a 2.

Tab. 2 Souhrn profilů PCR reakcí použitých pro detekci jednotlivých markerů

Marker	Před-denaturace		Hlavní cyklus denaturace, annealing, extenze						Závěrečná extenze	
<i>MdMYB10</i>	1 cyklus		40 cyklů						1 cyklus	
	94 °C	165 s	94 °C	55 s	55,7 °C	55 s	72°C	99 s	72 °C	600 s
<i>Md-ACS1</i>	1 cyklus		35 cyklů						1 cyklus	
	94 °C	180 s	94 °C	60 s	60 °C	60 s	72°C	150 s	72 °C	600 s
<i>Vf gen</i>	1 cyklus		35 cyklů						1 cyklus	
	94 °C	120 s	94 °C	30 s	60 °C	60 s	72°C	120 s	72 °C	600 s
<i>PII gen</i>	1 cyklus		40 cyklů						1 cyklus	
	94 °C	180 s	94 °C	20 s	35 °C	45 s	72°C	105 s	72 °C	360 s

Elektroforetická separace PCR produktů

Pro separaci PCR produktů byla použita horizontální agarózová elektroforéza (BioRad, USA). Separace probíhala při konstantním napětí 4 V.cm⁻¹ v prostředí TBE pufru, v 1,5% gelu po dobu 90 minut. Vizualizace a dokumentace gelů byla realizována pomocí dokumentačního zařízení GelDoc (BioRad, USA) a programu QuantityOne (BioRad, USA).

Hodnocení segregace markerů v hybridních potomstvech

Segregace byla statisticky hodnocena pomocí neparametrického χ^2 testu. Tento test se využívá pro ověření shody nalezených štěpných poměrů s teoreticky očekávanými štěpnými poměry. Pro výpočet je používána Pearsonova hodnota, která je dána obecným vzorcem 1 (BRABENEC *et al.*, 2000).

Výpočet χ^2 testu

$$\chi^2 = \frac{d^2}{e} \quad (1)$$

- d - difference každé jednotlivé třídy proti teoreticky očekávané hodnotě této třídy
- e - teoreticky očekávaná hodnota třídy - přepočítaná, tj. skutečný celkový počet jedinců je nutno rozdělit dle teoreticky předpokládaného štěpného poměru.

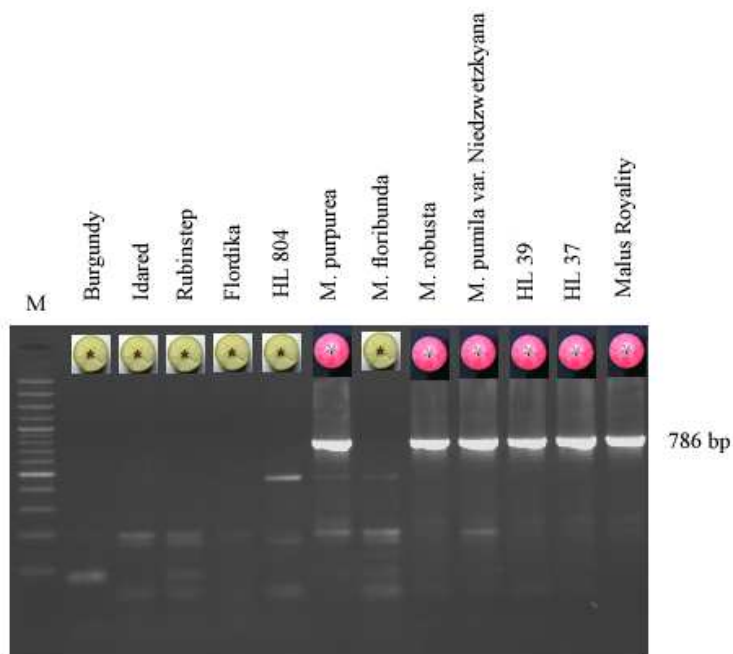
VÝSLEDKY A DISKUZE

Optimalizace amplifikace markeru červeného zbarvení dužniny (MdMYB10)

Marker využitý pro detekci červeného zbarvení dužniny je dominantní. Přítomnost dominantní alely genu *MdMYB10* je charakterizována fragmentem o velikosti 786 bp. Teplota nasedání primerů byla optimalizována pomocí teplotního gradientu. Jako optimální byla zvolena anelační teplota 55,7 °C. CHAGNÉ *et al.* (2007) přidával do PCR reakce 0,72 % formamid. Tato látka je silný denaturant, může napomáhat lepší denuraci templátové DNA a zamezuje tvorbě sekundárních struktur DNA. Tento efekt popisují například KOLÁROVÁ & DRÁBNER (2000). Při optimalizaci chemického složení PCR reakce bylo potvrzeno, že formamid nezlepšoval výsledek amplifikace. Jako zlepšující prvek byla vybrána látka tetramethyl ammonium oxalát (PCR Enhancer, Top-Bio, ČR) a BSA (bovinní sérum albumin) (SMITH *et al.*, 1995). Tyto dvě komponenty částečně omezily vznik nespecifických fragmentů.

Obr. 1 Elektroforeogram amplifikace markeru *MdMYB10*

(M - hmotnostní standard *GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder*, Fermentas)

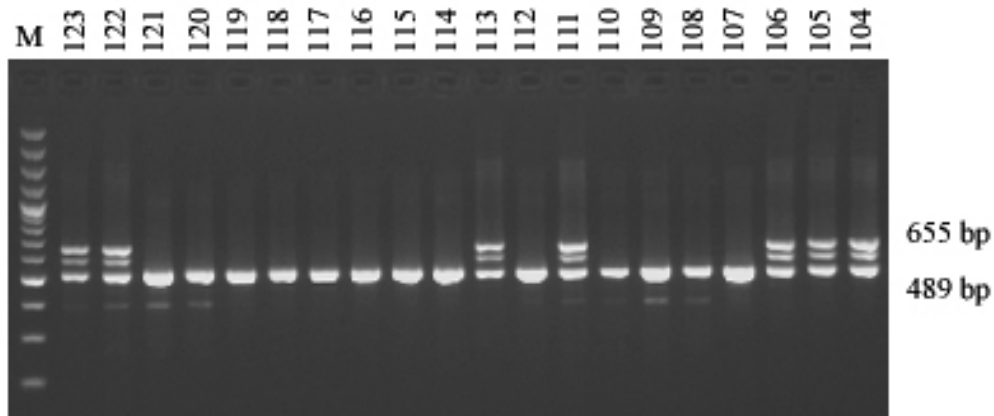


Detekce genu ACS1 zodpovědného za měknutí dužniny

Marker pro detekci tohoto genu je kodominantní a odlišuje alelu *ACS1-1* se standardní transkripční aktivitou, kterou představuje fragment o velikosti 489 bp a alelu *ACS1-2*, která má transkripční aktivitu omezenou inzercí v promotoru a je určena fragmentem o délce 655 bp (SUNAKO *et al.*, 1999). Teplota nasedání tohoto primerového páru byla také optimalizována pomocí teplotního gradientu. Při amplifikaci docházelo k vytvoření dalšího nespecifického fragmentu o velikosti přibližně 590 bp, který SUNAKO *et al.* (1999) neuvádí.

Amplifikace tohoto fragmentu neměla žádný vliv na úspěšnou detekci obou markerujících fragmentů. Tuto skutečnost dokumentuje vzorový elektroforeogram na obrázku 2.

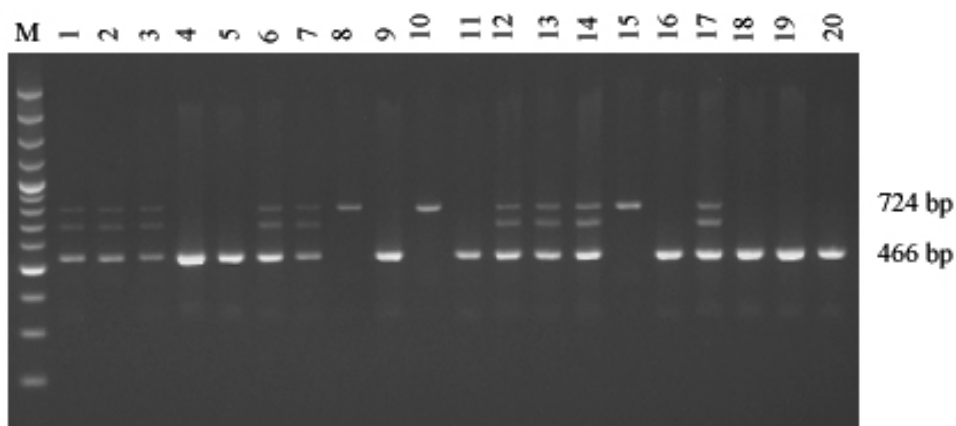
Obr. 2 Vzorový elektroforeogram segregace markeru ACS1 u kombinačního křížení 27
(M - hmotnostní standard GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder, Fermentas)



Hodnocení alelické sestavy genu Vf

Pro detekci kodominantního markeru charakterizujícího Vf gen byla použita metodika podle VEJL *et al.* (2003). Přítomnost dominantní alely charakterizuje fragment o velikosti 466 bp, recesivní alela je zastoupena fragmentem o velikosti 724 bp. Heterozygotní genotyp je určen přítomností obou fragmentů.

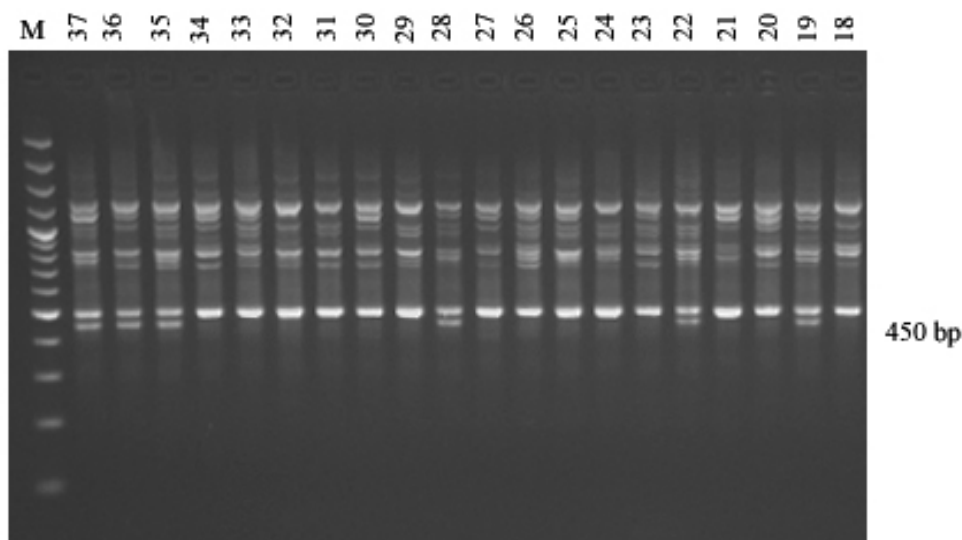
Obr. 3 Vzorový elektroforeogram segregace markeru Vf u kombinačního křížení 4
(M- hmotnostní standard GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder, Fermentas)



Detekce genu *P11*

Detekce genu *P11* byla realizována pomocí dominantního RAPD markeru navrženého MAKRUSEN *et al.* (1995). Pro dominantní alelu je charakteristická přítomnost fragmentu o velikosti 450 bp. Na obrázku 4 je zobrazen vzorový elektroforeogram markeru genu *P11*.

Obr. 3 Vzorový elektroforeogram segregace markeru *P11* u kombinačního křížení 4 (M - hmotnostní standard GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder, Fermentas)



Hodnocení segregace jednotlivých markerů

Pro analýzu segregace schopnosti vybraných markerů byla využita potomstva první filiaální generace, která vznikla záměrným křížením ve VŠÚO v Holovousích. U kombinací 21, 22 a 27 bylo vybráno pro hodnocení 40 jedinců. Z kombinačního křížení 4 bylo odebráno pouze 37 jedinců, protože u této kombinace byla před odběrem materiálu pro genetické analýzy provedena selekce na rezistenci vůči strupovitosti jabloní, která se provádí pomocí skleníkových infekčních testů.

Pro šlechtitelskou praxi je považována shoda mezi zjištěným štěpným poměrem a teoreticky očekávaným, pokud pravděpodobnost shody dosahuje alespoň 0,05 (ZADINA & JERMOLEV, 1976). Této pravděpodobnosti nebylo dosaženo pouze u kombinace 4 u markeru genu *Vf* a kombinace 21 u markeru genu *P11*. Nízká pravděpodobnost shody u markeru genu *Vf* v kombinaci 4 je pravděpodobně způsobena selekcí semenáčků na rezistenci vůči strupovitosti jabloní za pomoci skleníkových infekčních testů. Tyto testy se běžně provádí ve VŠÚO v Holovousích, nejsou však stoprocentně úspěšné. Selektive citlivých semenáčků, recesivních homozygotů, zapříčinila vyšší výskyt dominantních homozygotů (51,4 %) a heterozygotů (32,4 %). Tento fakt se naopak neprojevil u kombinačních křížení 21, 22 a 27, u kterých byly infekční testy a selekce citlivých jedinců provedeny až po odběru materiálu pro genetické analýzy. V kombinačním křížení 21 byla nalezena heterozygotní sestava genu *P11* pouze u třech semenáčků. Toto zjištění může být způsobeno malým rozsahem testovaného

potomstva. Nízký počet semenáčků s heterozygotní sestavou genu *Pl1* by mohl zapříčinit také nekulturní habitus rostlin, který byl spolu s genem předán donorem *M. robusta*.

Při hodnocení segregace markerů *Vf* a *Md-ACSI* byly zjištěny u kombinací 21 a 22 rozpory mezi detekovaným štěpným poměrem a štěpným poměrem odvozeným na základě detekovaných genotypů rodičovských komponent. U obou kombinací byli detekováni dominantní homozygoti, recesivní homozygoti a heterozygoti v genu *Vf*, ačkoliv odrůda Rubinstep, která vznikla jako kříženec odrůd Clivia a Rubín, je v genu *Vf* recesivní homozygot. Obě mateřské komponenty HL 39 a HL 423 disponují heterozygotní sestavou genu *Vf*. Také v markeru *ACSI* štěpila obě potomstva, ačkoliv odrůda Rubinstep má genotyp 2/2, tedy obě alely s nízkou transkripční aktivitou a obě rodičovské komponenty vykazovaly genotyp 1/1, to znamená obě alely s normální transkripční aktivitou. Touto analýzou bylo zjištěno, že mohlo dojít k chybě na několika místech v přípravě tohoto křížení, například mohlo dojít k cizosprášení, záměně pylu, chybného označení křížení, chybného označení semen při stratifikaci, nebo špatného označení při výsevu. U kombinací 21 a 22 byl otcovský genotyp pro účely výpočtu χ^2 testu nahrazen předpokládaným genotypem, tak aby odpovídal genotypům nacházejícím se v potomstvu.

Tab. 3 Segregace markerů u kombinačního křížení 4 : HL 37 (*Florina* x *M. robusta*) x *Flordika*

Markerovaný gen	Mateřský genotyp	Otcovský genotyp	Očekávaný štěpný poměr	Skutečný štěpný poměr	χ^2	Pravděpodobnost shody štěpných poměrů
<i>Vf</i>	<i>Vfvf</i>	<i>Vfvf</i>	9,25 <i>VfVf</i> 18,5 <i>Vfvf</i> 9,25 <i>vfvf</i>	19 <i>VfVf</i> 12 <i>Vfvf</i> 6 <i>vfvf</i>	13,7	P < 0.01
<i>ACSI</i>	1/1	2/2	40 1/2	40 1/2		P = 1
<i>MdMYB10</i>	<i>Mdmd</i>	<i>mdmd</i>	18,5 <i>Mdmd</i> 18,5 <i>mdmd</i>	16 <i>Mdmd</i> 21 <i>mdmd</i>	0,68	P ∈ <0,5 ; 0,3>
<i>Pl1</i>	<i>Pl1pl1</i>	<i>pl1pl1</i>	18,5 <i>Pl1pl1</i> 18,5 <i>pl1pl1</i>	16 <i>Pl1pl1</i> 21 <i>pl1pl1</i>	0,68	P ∈ <0,5 ; 0,3>

Tab. 4 Segregace markerů u kombinačního křížení 27 : HL 804 (*FAW 3566* x *A 679-2*) x HL 39 (*Florina* x *M. robusta*)

Markerovaný gen	Mateřský genotyp	Otcovský genotyp	Očekávaný štěpný poměr	Skutečný štěpný poměr	χ^2	Pravděpodobnost shody štěpných poměrů
<i>Vf</i>	<i>vfvf</i>	<i>Vfvf</i>	20 <i>Vfvf</i> 20 <i>vfvf</i>	25 <i>Vfvf</i> 15 <i>vfvf</i>	2,5	P ∈ <0,3 ; 0,1>
<i>ACSI</i>	1/2	1/1	20 1/2 20 1/1	14 1/2 26 1/1	1,6	P ∈ <0,3 ; 0,1>
<i>MdMYB10</i>	<i>mdmd</i>	<i>Mdmd</i>	20 <i>Mdmd</i> 20 <i>mdmd</i>	15 <i>Mdmd</i> 25 <i>mdmd</i>	2,5	P ∈ <0,3 ; 0,1>
<i>Pl1</i>	<i>pl1pl1</i>	<i>Pl1pl1</i>	20 <i>Pl1pl1</i> 20 <i>pl1pl1</i>	22 <i>Pl1pl1</i> 18 <i>pl1pl1</i>	0,4	P ∈ <0,7 ; 0,5>

Tab. 5 Segregace markerů u kombinačního křížení 22 : HL 39 (Florina x *M. robusta*) x Rubinstep, respektive neznámý otec

Markerovaný gen	Mateřský genotyp	Předpokládaný otcovský genotyp	Očekávaný štěpný poměr	Skutečný štěpný poměr	χ^2	Pravděpodobnost shody štěpných poměrů
<i>Vf</i>	<i>Vfvf</i>	<i>Vfvf</i>	10 <i>VfVf</i> 20 <i>Vfvf</i> 10 <i>vfvf</i>	6 <i>VfVf</i> 18 <i>Vfvf</i> 16 <i>vfvf</i>	3,4	$P \in <0,3 ; 0,1>$
<i>ACSI</i>	1/1	1/2	20 1/2 20 1/1	18 1/2 22 1/1	0,4	$P \in <0,7 ; 0,5>$
<i>MdMYB10</i>	<i>Mdmd</i>	<i>mdmd</i>	20 <i>Mdmd</i> 20 <i>mdmd</i>	24 <i>Mdmd</i> 16 <i>mdmd</i>	1,6	$P \in <0,3 ; 0,1>$
<i>PlI</i>	<i>PlIplI</i>	<i>plIplI</i>	20 <i>PlIplI</i> 20 <i>plIplI</i>	21 <i>PlIplI</i> 19 <i>plIplI</i>	0,1	$P \in <0,9 ; 0,7>$

Tab. 6 Segregace markerů u kombinačního křížení 21 : HL 423 (Florina x *M. robusta*) x Rubinstep, respektive neznámý otec

Markerovaný gen	Mateřský genotyp	Předpokládaný otcovský genotyp	Očekávaný štěpný poměr	Skutečný štěpný poměr	χ^2	Pravděpodobnost shody štěpných poměrů
<i>Vf</i>	<i>Vfvf</i>	<i>Vfvf</i>	10 <i>VfVf</i> 20 <i>Vfvf</i> 10 <i>vfvf</i>	8 <i>VfVf</i> 14 <i>Vfvf</i> 15 <i>vfvf</i>	3,7	$P \in <0,3 ; 0,1>$
<i>ACSI</i>	1/1	1/2	20 1/2 20 1/1	18 1/2 22 1/1	0,4	$P \in <0,7 ; 0,5>$
<i>MdMYB10</i>	<i>mdmd</i>	<i>mdmd</i>	40 <i>mdmd</i>	40 <i>mdmd</i>		$P = 1$
<i>PlI</i>	<i>PlIplI</i>	<i>plIplI</i>	20 <i>PlIplI</i> 20 <i>plIplI</i>	3 <i>PlIplI</i> 37 <i>plIplI</i>	28,9	$P < 0,01$

ZÁVĚR

Segregační analýzou byla ověřena funkčnost čtyř zvolených PCR markerů. Jednalo se o markery genu *Vf*, který zajišťuje rezistenci vůči strupovitosti, genu *PlI* řídicího rezistenci vůči padlí jabloňovému, genu *Md-ACSI*, který má vliv na měknutí dužniny jablek a genu *MdMYB10*, který determinuje červené zbarvení dužniny plodů.

Tyto markery je možné využít při šlechtění nových odrůd v procesu MAS (markery asistovaná selekce). Zároveň je pomocí nich možné hodnotit genetické zdroje, které jsou ve šlechtění jabloní využívány. Zároveň bylo prokázáno, že tyto markery mohou sloužit i pro testování paternity u nadějných novošlechtění, která vznikla záměrnou hybridizací, stejně tak i k potvrzení původu starších odrůd, u kterých jsou známé rodičovské komponenty.

LITERATURA

BRABENEC, V., ŠAŘECOVÁ, P., LADÝŘOVÁ, R., HOŠKOVÁ, P.: Cvičení a přednášky z biometriky s řešenými příklady pro AF a ITSZ. Provozně ekonomická fakulta ČZU v Praze ve vydavatelství Credit Praha, 2000.

DVOŘÁK, A., VONDRÁČEK, J., KOHOUT, K., BLAŽEK, J.: Jablka. Academia, Praha, 1976. ISBN 80-200-0958-2

ESPLEY, R.V., HELLENS, R.P., PUTTERILL, J., STEVENSON, D.E., KUTTY-AMMA, S., ALLAN A.C.: Red colouration in apple fruits is due to the activity of the MTB transkription factor, MdMYB10. The Plant Journal, 49, 2007, s. 414-427, ISSN 0960-7412

HARADA, T., SUNAKO, T., WAKASA, Y., SOEJIMA, J.: An allele of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene (Md-ACS1) accounts for the low level of ethylene production in climacteric fruits of some apple cultivars, Theor Appl Genet, 101, 2000, s. 742-746, ISSN 1432-2242

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.: Mapping a candidate gene (MdMYB10) for red flesh and foliage colour in apple, BMC Genomics, 212(8), 2007, ISSN 1471-2164/

JANICK, J., CUMMINS, J., N., BROWN, S.K., HEMMAT, M.: Apples. Fruit breed, Volume I: Tree and tropical fruits, 1996. ISBN 0-471-31014-x

KOLÁROVÁ, M., DRÁBNER, P.: New specificity and yield enhancer of polymerase chain reactions, Nucleic Acids Research, 28(13), 2000.

MARKUSSEN, T., KRUGER, J., SCHMIDT, H., DUNEMANN, F.: Identification of PCR-based markers linked to the powdery–mildew–resistance gene *Pll* from *Malus robusta* in cultivated apple, Plant Breeding, 114, 1995, s. 530 – 534. ISSN 0179-9541

ORAGUZIE, N.C., IWANAMI, H., SOEJIMA, J., HARADA, T.: Inheritance of the Md-ACS1 gene its relationship to fruit softening in apple (*Malus x domestica* Borkh.), Theor Appl Genet, 108, 2004, s. 1526-1533. ISSN 1432-2242

SMITH J. R., CARPTEN J. D., BROWNSTEIN M. J., GHOSH S., MAGNUSON V. L., GILBERT D. A., TRENT J. M. ,COLLINS F. S.: Approach to Genotyping Errors Caused by Nontemplated Nucleotide Addition by Taq DNA Polymerase, Genome Res., 5, 1995, s. 312-317

SUNAKO, T., SAKURABA, W., SENDA, M., AKADA, S., ISHIKAWA, R., NIIZEKI, M., HARADA, T.: 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, 1999, s. 1297-1303. ISSN 0032-0889

TARTARINI S.: Marker assisted selection in pome fruit breeding. Proceedings of the XXVI. International Horticultural Congress: Genetics and Breeding of tree Fruit and Nuts. Toronto, August 11-17, 2002, Canada. ISHS. Acta Hort., 2003, 622, s. 129-140.

TARTARINI, S., GIANFRANCESCO, L., SANSAVINI, S., GESSLER, C.: Development of reliable PCR markers for the selection of the *V_f* gene conferring scab resistance in apple, Plant Breeding, 118, 1999, s. 183-166. ISSN 0179-9541

VEJL, P., SKUPINOVÁ, S., BLAŽEK, J., SEDLÁK, P., BARDOVÁ, M., BLAŽKOVÁ, H., MILEC, Z.: PCR markers of apple resistance to scab (*Venturia inaequalis* CKE.) controlled by *V_f* gene in Czech apple breeding, Plant, Soil and Environment, 49(9), 2003, s. 427–432. ISSN 1214-117

VEJL, P., MELOUNOVÁ, M., SEDLÁK, P., ZOUFALÁ, J., BLAŽKOVÁ, H., MILEC, Z., BLAŽEK, J., VÁVRA, R., KŘELINOVÁ, J.: Molekulární markery ve šlechtění jabloní. PowerPrint ČZU, Praha, 2005. ISBN 80-213-1287-4

ZADINA, J., JERMOLEV, E.: Šlechtění bramboru. Academia, Praha, 1976.