

Agritec Plant Research s. r. o.

Zemědělská 2520/16, 787 01 Šumperk



METODIKA DETEKCE NOSITELŮ ODOLNOSTI VŮČI VÝRŮSTKOVÉ MOZAICE (PEMV) A PADLÍ U HRACHU (*PISUM SATIVUM* L.)

Autoři:

Ing. Michaela Ludvíková, Ph.D.

Mgr. Jiří Horáček, Ph.D.

Ing. Radmila Dostálová

2025

METODIKA DETEKCE NOSITELŮ ODOLNOSTI VŮČI VÝRŮSTKOVÉ MOZAICE (PEMV) A PADLÍ U HRACHU (*PISUM SATIVUM* L.)

Metodika vypracovaná jako výstup projektu Technologické agentury České republiky v rámci Programu TREND FW10010461: „Moderní technologie ve šlechtění olejnin a luskovin - zavedení tvorby dihaploidů a molekulární identifikace donorů rezistence ve šlechtitelských programech olejnin a luskovin”

Michaela Ludvíková, Jiří Horáček, Radmila Dostálová
ludvikova@agritec.cz, horacek@agritec.cz, dostalova@agritec.cz

Vydal Agritec Plant Research s.r.o.
V nakladatelství AGRITEC, výzkum, šlechtění a služby, s.r.o. Šumperk
www.agritec.cz

© Agritec Plant Research s.r.o., Šumperk, 2025.

Oponentní posudky vypracovali:

doc. Mgr. Pavel Matušinský, Ph.D., Katedra botaniky, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci, 17. listopadu 1192/12, 779 00 Olomouc

RNDr. Kateřina Tománková, Ph.D., Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Oddělení molekulární biologie, Šlechtitelů 773/23, Holice, 77900 Olomouc

Publikaci bylo uděleno Osvědčení č. UKZUZ 188845/2025 o uznání v souladu s podmínkami „Metodiky hodnocení výsledků výzkumu a vývoje“

Tato publikace nesmí být přetiskována vcelku ani po částech, uchovávána v médiích, přenášena nebo uváděna do oběhu pomocí elektronických, mechanických, fotografických či jiných prostředků bez uvedení osoby, která má k publikaci práva podle autorského zákona nebo bez jejího výslovného souhlasu. S případnými náměty na jakékoliv změny nebo úpravy se obraťte písemně na osobu uvedenou výše.

ISBN 978-80-87360-79-8

Obsah

1. CÍL METODIKY	4
2. POPIS METODIKY.....	4
2.1. ÚVOD	4
2.2. PADLÍ U HRACHU.....	5
2.3. PEMV.....	6
2.4. VÝVOJ METODY	7
3. MATERIÁL A METODY	8
3.1. PŘÍSTROJE A POMŮCKY.....	8
3.2. CHEMIKÁLIE	8
3.2.1. Chemikálie pro izolaci DNA	8
3.2.2. Chemikálie pro PCR.....	9
3.2.3. Chemikálie pro elektroforézu	9
3.2.4. Chemikálie pro restrikční reakci	9
3.3. PŘÍPRAVA ROZTOKŮ A PUFŘŮ	9
3.4. ROSTLINNÝ MATERIÁL	10
3.5. IZOLACE GENOMOVÉ DNA	10
3.5.1. Izolace genomové DNA metodou CTAB/chloroform	10
3.5.2. Izolace genomové DNA pomocí kitu ISOLATE II Plant DNA kit (Meridian Bioscience)	11
3.6. METODIKA ANALÝZY DNA MARKERŮ DETEKUJÍCÍCH REZISTENCI VŮČI PEMV A PADLÍ U HRACHU: PCR REAKCE	12
3.7. ELEKTROFORÉZA DNA, FOTODOKUMENTACE	13
3.7.1. Elektroforéza v agarózovém gelu	13
3.8. RESTIKČNÍ ANALÝZA	14
3.9. ELEKTROFORÉZA DNA, FOTODOKUMENTACE	15
3.10. ANALÝZA MOLEKULÁRNÍCH DAT A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ	15
3.10.1. Vyhodnocení získaných elektroforeogramů	15
4. SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ	16
5. ZÁVĚR – POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY.....	16
6. EKONOMICKÉ ASPEKTY.....	16
7. DEDIKACE	17
8. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE	17
9. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	17
10. OBRAZOVÁ PŘÍLOHA	19

1. CÍL METODIKY

Cílem metodiky je vytvoření podrobného návodu pro využití molekulárních markerů pro rychlou a spolehlivou identifikaci rezistence/senzitivity hrachu setého (*Pisum sativum* L.) k houbovým a virovým chorobám hrachu: výrůstkové mozaice hrachu (PEMV) a padlí. Postup je návodem pro polymerázovou řetězcovou reakci (PCR) a následnou restrikční analýzu s aplikací pro šlechtění hrachu a hodnocení genových zdrojů.

2. POPIS METODIKY

2.1. Úvod

Hrách patří mezi nejrozšířenější druhy luskovin, pěstuje se v celém mírném pásmu převážně jako jarní plodina pro lidskou výživu a krmivo pro hospodářská zvířata. Je pěstován především pro semena, která mají vysoký obsah bílkovin (21–24 % hrubých bílkovin), který je asi 2 x vyšší než u obilovin. Skladba aminokyselin je rovněž příznivější než u obilovin, neboť má více nepostradatelných (sirných) aminokyselin, vyšší obsah vitaminů i minerálních látek.

Virus výrůstkové mozaiky hrachu (PEMV – *Pea enation mosaic virus*) je celosvětově označován za nejnebezpečnější a ekonomicky nejzávažnější chorobu hrachu. Je přenosný mšicemi a k přenosu dochází již po krátké době sání. Mezi typické a nezaměnitelné projevy na rostlinách hrachu, kromě výrůstků, patří i mozaika přecházející v typické „dvůrky“. Později vznikají deformace lusků, snižuje se HTS (Hull, 1981). Dědičnost rezistence proti viróze PEMV zajišťuje dominantní gen *En* (Schroeder a Barton, 1959), dle literatury lokalizovaný ve třetí vazebné skupině LGIII (Marx et al., 1985; Yu et al., 1995, Randhawa a Weeden, 2009). Virus může způsobovat významné výnosové ztráty od 10 až do 100 % (Hull, 1981; Jain et al., 2013).

Padlí hrachu (*Erysiphe pisi* DC., *Ascomycetes*) je specializovaná forma *E. pisi* f. *sp. pisi* (Hammarl) Boerema, schopná patogenese pouze na hrachu. V teplejších a sušších pěstitelských oblastech způsobuje každoročně výnosové ztráty v rozmezí 10–60 % (Nagaraju a Pal, 1990; Heringa et al., 1969; Tivari et al., 1997).

Prakticky veškeré odrůdy polního a dřeňového hrachu v dosavadní historii šlechtění této plodiny byly vytvořeny dvěma klasickými postupy, (1) dřívější hybridizací rodičovských genotypů a (2) pozdější mutagenezí (chemomutageneze a radiomutageneze; cca od 50. let minulého století; Blixt, 1972; Jaranowski, 1976) většinou následovanou pozitivním výběrem v rámci různých šlechtitelských schémat. Celý proces byl značně zdlouhavý náročný na pěstební plochy, práci a finance.

Polymorfismy nukleových kyselin se vyznačují přítomností variabilních pozic v DNA, v nichž se vyskytují dvě nebo více variant alel, které jsou v populaci zastoupeny v určité frekvenci. Jednonukleotidový polymorfismus (SNP) označuje variabilní stav pouze v jediném nukleotidu na konkrétním místě v genomu. SNP se mohou vyskytovat napříč celým genomem. V kódujících nebo regulačních sekvencích DNA mohou ovlivnit výsledný fenotyp daného jedince, avšak jejich

častější výskyt je zaznamenán v nekódujících oblastech DNA, kde však mohou být ve vazbě s geny ovlivňujícími fenotypový projev zkoumaného znaku. Genetický marker je detekovatelný gen nebo variabilní sekvence DNA, u které je známo její umístění na chromozomu nebo kontigu. Lze je rozdělit na markery fenotypové, jejichž projevem je pozorovatelný rozdíl ve fenotypovém projevu alel, biochemické, u nichž je možno detekovat vznik rozdílných proteinových produktů (izoenzymů), a DNA markery, které se liší na úrovni sekvencí nukleotidů. Mezi posledně jmenované patří markery založené na délkovém polymorfismu fragmentů DNA vzniklých restrikcí štěpením (RFLP), analýza polymorfních segmentů DNA založená na PCR a celogenomové markery založené na sekvenaci DNA, ke kterým se řadí i detekce a analýza SNP.

Prudký rozvoj molekulární genetiky, funkční genomiky a vysoce výkonného celogenomového sekvenování umožňuje v ideálním případě přímo identifikaci a lokalizaci genů na jednotlivých chromozomech v rámci vazebných skupin, respektive molekulárních DNA markerů s předmětnými geny těsně svázaných. Tomu musí předcházet detailní fenotypování, tedy popis vybraných kvalitativních či kvantitativních znaků dle klasifikátoru dané plodiny a jejich přiřazení k datům genotypovým nástroji bioinformatiky (GWAS analýza). Kombinace metod molekulární genetiky (včetně recentního „přečtení“ kompletního genomu hrachu) a bioinformatiky dává šlechtitelům hrachu k dispozici účinný nástroj pro zpřesnění, zrychlení a finanční zefektivnění procesu selekce a tvorbu kvalitativně nových a konkurenceschopných odrůd hrachu (Dostálová et al., 2020; Ludvíková et al., 2022).

Jako alternativa k využití molekulárních markerů pro vyhledávání zdrojů rezistence byly v minulosti ve firmě Agritec jako výsledek experimentů s genetickými modifikacemi hrachu za pomoci konstruktů na bázi fragmentů obalového proteinu virů výrůstkové mozaiky hrachu (PEMV) a svinování listů hrachu (Pisum Seed-borne Mosaic Virus - PSbMV) vytvořeny linie hrachu se zvýšenou odolností ke zmíněným virovým patogenům (Šváblová a Griga, 2009).

2.2. Padlí u hrachu

Erysiphe pisi DC. (*Ascomycetes*) je specializovaná forma *E.pisi* f. sp. *pisi*, schopná patogeneze pouze na hrachu. Genetické zdroje rezistence hrachu proti padlí byly objeveny jednak v peruánských populacích hrachu (Harland, 1948), a jednak v komerční odrůdě dřeňového hrachu Stratagem, odvozené z mexické populace Mexique 4 (Pierce, 1948; Cousin, 1965). Dosud byly u hrachu identifikovány tři geny rezistence k padlí, jmenovitě *er1* (Janila et al., 2004), *er2* (Tiwari et al., 1999) a *Er3* (Cobos et al., 2018), umístěné na vazebných skupinách LGVI, III a IV. Studie prokázaly, že gen *er1* je homologem lokusu „O“ (MLO) (Pavan et al., 2011). Následné analýzy identifikovaly celkem jedenáct alel (*er1-1* až *er1-11*; Devi et al., 2022), z nichž *er1-1* a *er1-2* jsou využívány šlechtiteli.

Na základě využití GWAS mapovací populace u souboru jedinců s širokou genetickou základnou je hlavní variabilita rezistence k padlí v námi analyzované populaci hrachu zprostředkována zejména skrze geny lokalizované na chromozomu 1 (vazebná skupina LGVI), dále pak na chromozomu 2, 4 a 5. Markery lokalizované na chromozomu 1 se nejevily jako vhodné pro využití restrikce. Testované markery (74 a 76) leží na chromozomech 5 a 2, odpovídající vazebným skupinám LGIII a LGI.

2.3. PEMV

Virus výrůstkové mozaiky hrachu (PEMV – Pea enation mosaic virus) je celosvětově označován za nejnebezpečnější a ekonomicky nejzávažnější chorobu hrachu. Je přenosný mšicemi (např. kyjatkou hrachovou - *Acyrtosiphon pisum*), k přenosu dochází již po krátké době sání. Dobře se přenáší i mechanicky. Přežívá na jetelovinách nebo vıkvích (Vıchov, 2024). Pıřznaky napadenı (obrazky 1 a 2) se projevujı zesvtlenım žilek, průhlednými chlorotickmi skvrnami a na spodnı straně list tvorbou výrůstků (enacı). Mezi typick a nezamniteln projevy na rostlinách hrachu, kromě výrůstků, patıř i mozaika pırechzejıcı v typick „dvůrky“. Později vznikajı deformace lusků, snıžuje se HTS (Hull, 1981). Muže docházet ke zkrcenı internodií a zakrslosti vegetanıho vrcholu. Typick pıřznaky se vyskytujı pıř teplotách kolem 22 °C, pıř vyš teplotě muže docházet k maskovnı pıřznak.



Obr. 1 a 2: Pıřznaky napadenı PEMV

Ddınost rezistence proti viróze PEMV zajiřtuje dominantnı gen *En* (Schroeder a Barton, 1959), dle literatury lokalizovan ve tıřetı vazebn skupině LGIII (Marx et al., 1985; Yu et al., 1995, Randhawa a Weeden, 2009). Virus muže způsobovat vznamn vynosov ztráty od 10 ař do 100 % (Hull, 1981; Jain et al., 2013).

V dıřıvjch studiıch byl lokus rezistence k PEMV *En* mapovan ve vazebn skupině LGIII, jeř v referennı sekvenci odpovd chromozomu 5 (Marx et al., 1985; Randhawa a Weeden, 2009; Jain et al., 2013). Mapovnı vyuřıvajıcı porovnnı genu rezistence *En* dvou rodičů rezistentnı odrůdy Lifter a nchyln odrůdy Radley (Jain et al., 2013) pomocı genotypovnı SSR markerů u RILs mapovacı populace poskytuje markery pro řlechtnı za pıředpokladu, ře řlechtitel uřije tento konkrtnı gen rezistence *En*. Avřak s vyuřıtım GWAS mapovacı populace u souboru jedinců s řirokou genetickou základnou je zıřejm, ře hlavnı variabilita rezistence k PEMV v nmı analyzovan populaci hrachu je zprostředkována skrze geny na chromozomu 1 (vazebn skupina LGVI). Na chromozomu 1 leřı i testovan markery 78 a 81.

Rozdıln výsledky mapovnı mohou být dány odliřnm genetickm mechanismem rezistence k PEMV v mapovacıch populacıch obou studiı nebo i odliřnmi kmeny viru PEMV vyuřıtmi k infekci v provedench testech. Výhodou dosařench výsledků GWAS studie je, ře lze jako donora genů rezistence vyuřıt vyš počet pvod hrachu a pıřpadn lze do řlechtitelskho záměru zahrnout a vzjemn kombinovat i vyš počet lokusů s nıřm efektem na znak rezistence k PEMV.

2.4. Vývoj metody

Za účelem identifikace DNA markerů spojených s agronomickými znaky (délka rostliny, počet větví, typ olistění, tvar a barva semene, počet a hmotnost semen, HTS, odolnost vůči padlí a PEMV) a kvalitativními znaky semen (obsah N-látek a škrobu) byla provedena asociační analýza (GWAS) u hrachu setého (*Pisum sativum* L.). Soubor 564 genotypů polního a dřeňového hrachu byl hodnocen v letech 2019 a 2020 na třech lokalitách (Šumperk, Olomouc, Smržice). Vybrané genotypy hrachu pochází z registrovaných komerčních odrůd rodu *Pisum*, zdrojů rezistence k houbovým a virovým patogenům využívaných ve šlechtění, odrůd/linií z kolekce z Ruska (získaných v projektu KONTAKT), planých druhů/forem rodu *Pisum*, vlastního novošlechtění polního a dřeňového hrachu společností Agritec a SEMO a mutantních linií s nízkým obsahem kyseliny fytové. Výběr byl proveden tak, aby pokrýval genetickou diverzitu druhu a zároveň obsahoval šlechtitelský materiál selektovaný ve vybraných znacích.

Pro zjištění SNP variant byla použita metoda DArTseq analýzy sekvenování knihoven DNA s redukovanou komplexitou. K redukci komplexity je využíván systém kombinace dvou restrikčních enzymů, z nichž jeden je metylačně sensitivní. V porovnání s jinými metodami redukce komplexity genomu se DArTseq zaměřuje na unikátní oblasti v genomu, které jsou často typické pro genové oblasti s vysokou informativní hodnotou. Výsledky byly bioinformaticky zpracovány, přičemž detekovány byly zejména jednonukleotidové polymorfismy napříč celým genomem. Výsledky celogenomového genotypování byly následně propojeny s pozorovanými fenotypovými daty při celogenomové asociační studii (GWAS), jejímž výsledkem byla identifikace konkrétních SNP markerů asociovaných s danými fenotypovými projevy.

Asociační analýzou byla získána sada 376 SNP markerů spojených s výše uvedenými vlastnostmi, jejichž pozice na jednotlivých chromozomech byla určena na základě referenční sekvence hrachu. Pro detekci SNP je uvedena 69 bp dlouhá sekvence přiléhající k asociovaným SNP. Na základě referenční sekvence (<https://urgi.versailles.inra.fr/Species/Pisum/Pea-Genome-project>) byly navrženy primery pro amplifikaci dané oblasti a dle konkrétních SNP markerů vybrány restrikční enzymy umožňující snadné testování přítomnosti referenční/alternativní alely. Použité kombinace primerů a jim odpovídající restrikční enzymy jsou uvedeny v tabulkách 3 a 5.

Test primerů a test následné restrikce byly provedeny se souborem 49 vzorků se známými fenotypy (32 šlechtitelských linií z firmy Agritec, 8 registrovaných odrůd rezistentních k padlí, 8 linií s deklarovanou rezistencí k padlí a virózám z kolekce genových zdrojů a 1 planá forma hrachu).

Pro detekci mutací byla nejprve izolována DNA z rostlinného materiálu. Listy rostlin byly homogenizovány v kapalném dusíku a pomocí Isolate II Genomic DNA Kit (Bioline Meridian Bioscience) z nich byla izolována genomová DNA dle protokolu výrobce. DNA získaná ze 100 mg materiálu byla rozpuštěna ve 100 µl elučního pufru a zamražena.

Vyizolovaná DNA byla použita pro PCR amplifikaci a restrikční reakci s použitím odpovídajícího restrikčního enzymu (tabulka 5). Složení reakční směsi pro PCR bylo: 20–50 ng DNA, 1x Dream Taq PCR buffer, 100 µM každého nukleotidu, 0,5 µM každého primeru a 0,5 U Dream Taq polymerázy (Thermo Scientific). Produkty PCR reakce byly rozděleny na 1,5% agarózovém gelu barveném ethidium bromidem, nasvíceny UV světlem a nasnímány. Teplotní profil PCR

reakcí u markerů 74, 76, 78 i 81 byl 94 °C/ 10 min a následně 35 cyklů: 94 °C/ 30 s, 55 °C/ 30 s, 72 °C/ 60 s. Závěrečná elongace byla 72 °C/ 5 min. 10 µl vzorku po PCR reakci bylo pro kontrolu nanášeno na agarózový gel. Zbýlých 5 µl bylo štěpeno pomocí příslušného restrikčního enzymu a rovněž nanášeno na gel (tabulky 5 a 6).

3. MATERIÁL A METODY

3.1. Přístroje a pomůcky

- Termocykler pro PCR.
- Centrifuga na mikrozkušavky 1,5 ml.
- Analytické váhy.
- Zařízení pro horizontální elektroforézu.
- Zdroj stejnosměrného proudu pro elektroforézu.
- Třepačka typu vortex.
- Termoblok s nastavitelnou teplotou (55–65 °C).
- Mikrovlnná trouba na přípravu agarózového gelu.
- Zařízení na fotodokumentaci gelů (transluminátor + fotoaparát).
- Automatické pipety s nastavitelným objemem.
- Spotřební plasty (mikrozkušavky 1,5 ml, mikrohomogenizátory, pipetovací špičky).
- Stojan na zkumavky.
- Rukavice.

3.2. Chemikálie

Všechny použité chemikálie jsou čistoty *p.a.* nebo označené jako vhodné pro molekulární biologii. Pro přípravu pufrů se používá destilovaná nebo demineralizovaná voda, pro přípravu roztoků pro PCR a pro izolaci DNA se používá sterilní demineralizovaná voda.

3.2.1. Chemikálie pro izolaci DNA

- | | |
|-------------------------------------|------|
| • Tris (hydroxymethyl) aminomethan. | TRIS |
| • Chlorid sodný. | NaCl |
| • Kys. ethylendiamintetraoctová. | EDTA |
| • Hexadecyltrimethylamonium bromid. | CTAB |
| • Polyvinylpyrolidon. | PVP |
| • Merkaptoethanol. | ME |
| • Chloroform. | |
| • Ethanol 75%. | |
| • Isopropanol. | |

3.2.2. Chemikálie pro PCR

- Termostabilní Taq DNA polymeráza (např. Dream Taq, Thermo Scientific).
- Směs nukleotidů dNTPs (dATP, dTTP, dCTP, dGTP).
- 10x koncentrovaný pufr pro PCR (dle typu polymerázy).
- Primery – viz tabulka 3.
- PCR voda.

3.2.3. Chemikálie pro elektroforézu

- Agaróza pro elektroforézu (např. Agarose Molecular grade, BIOLINE).
- TRIS báze.
- Kyselina octová.
- EDTA
- Ethidium bromid.
- Marker pro určení velikosti DNA fragmentů na gelu (např. Gene Ruler 100 bp Plus DNA ladder, Thermo Fisher Scientific).

3.2.4. Chemikálie pro restrikční reakci

- Restriktáza dle konkrétního markeru.
- 10x koncentrovaný pufr (dle použité restriktázy).

3.3. Příprava roztoků a pufrů

Tabulka 1

Roztok	Složky	Množství	Poznámka
Extrakční pufr s CTAB pro izolaci DNA	TRIS báze CTAB EDTA NaCl PVP voda	18,6 g 10 g 3,7 g 40,9 g 5 g 400 ml	Upravit pH na 8,0 pomocí HCl, doplnit vodou do 500 ml. Před použitím přidat ME (40 µl / 100 ml roztoku).
Pufr 1xTE	TRIS báze EDTA voda	1,21 g 0,37 g 900 ml	Upravit pH na 8,0 pomocí HCl a doplnit vodou do 1L.
Pufr 50xTAE	TRIS báze kyselina octová EDTA voda	242 g 57,1 ml 18,6 g 900 ml	Doplnit vodou do 1L, pH roztoku je 8,0.

3.4. Rostlinný materiál

Pro izolaci genomové DNA hrachu jsou využívány čerstvé, nepoškozené a zdravé listy hrachu. Listy se odebírají ve skleníkových či polních podmínkách, do laboratoře jsou transportovány v chladicím boxu a jsou ihned zpracovány. Pro potřeby dlouhodobého uchování je možné listy zamrazit při -80°C . Veškeré zkumavky je potřeba označit popisem pro identifikaci vzorku.

3.5. Izolace genomové DNA

3.5.1. Izolace genomové DNA metodou CTAB/chloroform

1. Paralelně umožňuje přípravu vzorků dle kapacity centrifugy. Do mikrozkuvek se vloží cca 100 mg (ne více) rostlinného materiálu, přidá se 500 μl extrakčního pufru s CTAB a provede se homogenizace plastovým mikrohomogenizátorem.
2. Obsah zkumavek se promíchá na vortexu a vloží do vyhřívaného termobloku na 65°C . Extrakce probíhá 60 min za občasného promíchání na vortexu.
3. Zkumavky se vyjmou z termobloku, po vychladnutí se k extraktu přidá 500 μl chloroformu. Směs se důkladně promíchá na vortexu a provede se centrifugace 15 min při 12000 rpm.
4. Horní vodná fáze (300 μl) se odpipetuje do nové mikrozkuvky. Přidá se 15 μl roztoku RNasy A. Inkubace probíhá 30 min při laboratorní teplotě.
5. Přidá se 150 μl 5M NaCl a 300 μl isopropanolu. Obsah zkumavky se lehce promíchá otočením. Provede se centrifugace 15 min při 12000 rpm. Vysrážená DNA vytváří bílou usazeninu na dně mikrozkuvky.
6. Provede se opatrná dekantace supernatantu, sediment zůstává ve zkumavce.
7. K sedimentu DNA se přidá 500 μl 75% ethanolu, obsah se promíchá na vortexu a provede se centrifugace 5 min při 12000 rpm.
8. Provede se opatrná dekantace supernatantu. Zbylý supernatant se odsaje pipetou.
9. Sediment ve zkumavkách se rozpustí v 300 μl pufru 1xTE.
10. Získaná genomová DNA se přečistí přesrážením. Do zkumavek se přidá 30 μl 3M octanu sodného a 300 μl ledového isopropanolu. Vzorky umístíme do -20°C nejméně na 1 hodinu (optimálně přes noc).
11. Provede se centrifugace 15 min při 12000 rpm. Vysrážená DNA vytváří bílou usazeninu na dně mikrozkuvky. Supernatant se odsaje pipetou.
12. K sedimentu DNA se přidá 500 μl ledového 75% ethanolu, obsah se promíchá na vortexu a provede se centrifugace 5 min při 12000 rpm.
13. Provede se opatrná dekantace supernatantu. Zbylý supernatant se odsaje pipetou.
14. Sediment ve zkumavkách se rozpustí v 200 μl pufru 1xTE.
15. Takto získaná DNA má již dostatečnou čistotu pro následující aplikace.

Pozn. Průměrný výtěžek z listů hrachu se pohybuje kolem 20–40 ng/ μl DNA. Není nutné měřit či kontrolovat množství a kvalitu izolované DNA pomocí spektrofotometru a/nebo gelové elektroforézy. Toto lze prověřit jen v případě pochybností nebo neúspěchu výsledku PCR. V případě, že PCR nevychází

optimálně, může být řešením optimalizace teplotního profilu pro konkrétní laboratoř (nejlépe vyzkoušet na termálním cykleru gradient teplot); případně také dodatečná purifikace DNA prostřednictvím ethanolové precipitace.

3.5.2. Izolace genomové DNA pomocí kitu ISOLATE II Plant DNA kit (Meridian Bioscience)

1. Proveďte se homogenizace a lyze materiálu: do mikrozkušavek se vloží do 100 mg rostlinného materiálu, přidá se 400 µl Lysis buffer PA1 + 10 µl Proteinase K (100 µg/ml) a provede se homogenizace plastovým homogenizátorem.
2. Směs se krátce vortexuje.
3. Proveďte se inkubace 10 min při 65 °C za občasného promíchání na vortexu. Směs se přepipetuje na kolonku Isolate II Filter (fialová).
4. Vloží se kolonka ISOLATE II (fialová) do nové odběrové zkumavky (2 ml) a lyzát se nanese na kolonku.
5. Centrifuguje se 2 min při 12000 rpm. Supernatant se uchová a kolonka ISOLATE II se vyhodí. Pokud neprošla všechna kapalina, opakuje se centrifugace. Pokud je ve zkumavce viditelný pelet, přepipetuje se čirý supernatant, aniž by se narušil pelet, do nové 1,5ml mikrocentrifugační zkumavky.
6. Přidá se 450 µl vazebného pufru PB. Důkladně se promíchá pipetováním nebo vortexováním.
7. Kolonka ISOLATE II Plant DNA Spin Column (zelená) se umístí do nové zkumavky a napipetuje se do ní vzorek (max. 700 µl). Centrifuguje se po dobu 1 minuty při 12000 rpm a vyleje se supernatant. Pro vyšší objemy se opakuje vlití vzorku a centrifugační krok.
8. Přidá se 400 µl promývacího pufru PAW1 do kolonky ISOLATE II Plant DNA Spin Column. Centrifuguje se po dobu 1 minuty při 12000 rpm a následně se vyleje supernatant.
9. Přidá se 700 µl promývacího pufru PAW2 do kolonky ISOLATE II Plant DNA Spin Column. Centrifuguje se po dobu 1 minuty při 12000 rpm a následně se vyleje supernatant.
10. Přidá se dalších 200 µl promývacího pufru PAW2 do kolonky ISOLATE II Plant DNA Spin Column. Centrifuguje se 2 minuty při 12000 rpm, aby se odstranil promývací pufr a zcela se vysuší membrána kolonky.
11. Kolonka ISOLATE II Plant DNA Spin Column se umístí do nové 1,5ml mikrocentrifugační zkumavky. Na membránu se napipetuje 50 µl Elution Buffer PG (zahřátého na 65 °C). Inkubuje se po dobu 5 minut při 65 °C. Centrifuguje se po dobu 1 minuty při 12000 rpm. Tento krok se opakuje s dalšími 50 µl Elution Buffer PG (65 °C) a provede se eluce do stejné zkumavky.
12. Eluát je připravený pro PCR.

Pozn. Na trhu je jako alternativa dostupná řada komerčních kitů pro izolaci DNA z rostlin, nutno vždy postupovat dle návodu výrobce.

3.6. Metodika analýzy DNA markerů detekujících rezistenci vůči PEMV a padlí u hrachu: PCR reakce

Všechny práce probíhají ve sterilním boxu, aby se zabránilo možným kontaminacím chemikálií a vzorků. Pracovní plochy se před započetím práce otřou 70% etanolem. Zkumavky s chemikáliemi i se vzorky se v průběhu práce udržují v chladu (používá se chladicí stojánek). K pipetování se používají sterilní špičky s filtrem. Používají se latexové nebo nitrilové laboratorní rukavice.

1. Chemikálie pro PCR (10x PCR pufr, roztoky primerů, směs dNTPs) se po rozmrznutí umístí do chladicího stojánu.
2. Pro práci s větším množstvím vzorků je výhodné používat PCR stripy (po 8 mikrozkušavkách), nebo PCR platíčka (96 mikrozkušavek). Samostatné PCR mikrozkušavky jsou vhodné pouze pro malé počty vzorků.
3. Každou PCR mikrozkušavku/strip/platíčko je třeba dobře označit, aby nedošlo k záměně vzorků.
4. Každý vzorek je pro jednotlivé markery analyzován pomocí kombinací 2 primerů. Seznam primerů je uveden v tabulce 3.
5. Připraví se potřebné množství reakční směsi (master-mix) dle tabulky 2.
6. Do označených 0,2 ml mikrozkušavek (ve stripech či platíčku) se rozpipetuje reakční směs po 13 μ l.
7. Do reakční směsi v mikrozkušavkách se napipetují 2 μ l vzorku DNA tak, aby se zabránilo kontaminaci okolních mikrozkušavek vzorkem. Vzorky se promíchají špičkou. Mikrozkušavky se uzavřou víčky, na platíčko se přilepí folie.
8. Mikrozkušavky s reakční směsí se vloží do PCR termocykleru a spustí se příslušný teplotní program (tabulka 4).
9. Po ukončení teplotního programu lze vzorky krátkodobě uchovávat v lednici, nebo i delší dobu zamražené při -20°C .

Přístroje:

Termocykler, např. BIO-RAD C1000

Použité chemikálie:

Dream Taq DNA Polymerase 5 U/ μ l (Thermo Scientific)
 10x Dream Taq Green Buffer (Thermo Scientific)
 dNTPs set (Thermo Scientific)

Tabulka 2: Příprava reakční směsi (master-mixu) pro PCR

Chemikálie	1 reakce	10 reakcí
sterilní H ₂ O	8,1 μ l	81 μ l
10xPCR pufr	1,5 μ l	15 μ l
směs dNTPs (10 mM)	0,3 μ l	3 μ l
primer 1 (5 μ M)	1,5 μ l	15 μ l
primer 2 (5 μ M)	1,5 μ l	15 μ l
DNA polymeráza (5 U/ μ l)	0,1 μ l	1 μ l

Tabulka 3: Sekvence primerů pro PCR

PEMV	
Primer	Sekvence
PEMV 78F	CCTCTGCTCACACTTTCAACA
PEMV 78R	CAGAACTGGTGTAGGTAGATCA
PEMV 81F	AGTGGTTGAGCTAAGGTTTTGA
PEMV 81R	ATCTCTGAAGCACGGACACT
padlí	
Primer	Sekvence
ER 74F	CTCCTTCCACTCCACCTTCA
ER 74R	ATATGGTCTCGCGTATGGGG
ER 76F	TCCAGAAGATCAGCTGCAGT
ER 76R	GTTGGGATGGAAAGCTGGTG

Tabulka 4: Teplotní program pro PCR

Krok	Počet cyklů	Teplota	Čas
Denaturace DNA	1x	94 °C	10 min
Denaturace DNA	35x	94 °C	30 s
Nasednutí primerů		55 °C	30 s
Elongace DNA		72 °C	60 s
Elongace DNA	1x	72 °C	5 min

10 µl vzorku po PCR reakci bylo pro kontrolu nanášeno na agarózový gel. Zbýlých 5 µl bylo štěpeno pomocí příslušného restrikčního enzymu a rovněž nanášeno na gel.

3.7. Elektroforéza DNA, fotodokumentace

V tomto kroku je možné zkontrolovat výsledek PCR reakce. POZOR: EtBR je silný mutagen, karcinogen. Je nezbytné pracovat v rukavicích!

3.7.1. Elektroforéza v agarózovém gelu

1. Připraví se 1,5% agarózový gel: 1,5 g agarózy se rozmíchá ve 100 ml 1xTAE pufru a rozvaří v mikrovlnné troubě. Po vychladnutí na 50 °C se do roztoku přidá 5 µl roztoku ethidium bromidu (10 mg/ml) a směs se naleje do elektroforetické vaničky. Odstraní se případné bubliny ve gelu. Vloží se hřeben a gel se nechá ztuhnout.
2. Ztuhlý gel i s vaničkou se vloží do elektroforetické aparatury, naplněné 1xTAE pufrem. Gel je v pufru celý ponořen. Opatrně se vyjme hřeben.
3. 10 µl reakční směsi po PCR se napipetuje do jamek v agarózovém gelu. Do krajních jamek se napipetuje marker (Gene Ruler 100 bp Plus DNA ladder, Thermo Scientific). Pokud se alternativně použije reakční PCR pufr bez obsahu nanášecí barvy, je nutné koncentrát nanášecího roztoku přidat do reakční směsi dodatečně před nanášením vzorku na gel.
4. Připojí se zdroj stejnosměrného proudu. Elektroforéza probíhá 1 hodinu při konstantním napětí 150 mV.

5. Gel po elektroforéze se vyjme z vaničky a přenesení na UV-transluminátor (vlnová délka excitačního světla je 280–302 nm). Provede se fotodokumentace pomocí digitálního fotoaparátu s nasazeným oranžovým filtrem.
6. Výsledný snímek je zpracován v PC a jakémkoliv vhodném grafickém programu
7. Provedeme kontrolu výsledku PCR – zda vyšel fragment požadované délky (tabulka 5).

3.8. Restrikční analýza

Zbylých 5 µl reakční směsi po PCR je podrobena restrikční analýze pomocí příslušného restrikčního enzymu (tabulka 5).

Všechny práce opět probíhají ve sterilním boxu. K pipetování se používají sterilní špičky s filtrem. Používají se latexové nebo nitrilové laboratorní rukavice.

1. 10x pufr pro příslušný restrikční enzym se nechá rozmraznout ve stojánku.
2. Pro práci s větším množstvím vzorků je výhodné používat PCR stripy (po 8 mikrozkušavkách), nebo PCR platíčka (96 mikrozkušavek). Samostatné PCR mikrozkušavky jsou vhodné pouze pro malé počty vzorků.
3. Každou PCR mikrozkušavku/ strip/ platíčko je třeba dobře označit, aby nedošlo k záměně vzorků.
4. Připraví se potřebné množství reakční směsi dle tabulky 6.
5. Restrikční endonukleázu pro pipetování vytáhneme z mrazničky a následně hned dáme zpět.
6. Do označených 0,2 ml mikrozkušavek (ve stripech či platíčku), které obsahují 5 µl PCR produktu, se rozpipetuje reakční směs po 5 µl.
7. Vzorky se promíchají špičkou. Mikrozkušavky se uzavřou víčky, na platíčko se přilepí folie.
8. Mikrozkušavky s reakční směsí se vloží do PCR termocykleru a spustí se teplotní program s příslušnou teplotou pro konkrétní enzym (tabulka 5).
9. Po ukončení teplotního programu lze vzorky krátkodobě uchovávat v lednici, nebo i delší dobu zamražené při –20 °C.

Přístroje:

Termocykler, např. BIO-RAD C1000; případně i termostat

Použité chemikálie:

Restriktáza *MboI*/ *BstUI* (10 U/µl)

10x pufr odpovídající restriktáze

Tabulka 5: Restrikce: příslušné enzymy pro jednotlivé markery a očekávaná délka fragmentů

Marker	Velikost PCR produktu (bp)	Použitá restrikční endonukleáza	Teplota pro restrikci	Fragmenty po restrikci (bp)	Genotyp na základě restrikce
74.	555	<i>Mbol</i>	37 °C	359 a 196	S
				297, 196 a 62	R
76.	223	<i>Mbol</i>	37 °C	147 a 76	S
				223	R
78.	422	<i>Mbol</i>	37 °C	422	S
				206 a 216	R
81.	409	<i>Bst</i> UI (<i>Bsh</i> 1236I)	37 °C	409	S
				296 a 113	R

Pozn. S značí senzitivní a R rezistentní genotyp.

Tabulka 6: Příprava reakční směsi (master-mixu) pro restrikci

Chemikálie	1 reakce	10 reakcí
sterilní H ₂ O	3,9 µl	39 µl
10x pufr	1 µl	10 µl
Restriktáza <i>Mbol</i> / <i>Bst</i> UI	0,1 µl	1 µl

3.9. Elektroforéza DNA, fotodokumentace

Elektroforézu provedeme dle kroku 4.7. Umožní nám vizualizovat fragmenty po restrikci u analyzovaných vzorků.

3.10. Analýza molekulárních dat a interpretace výsledků

3.10.1. Vyhodnocení získaných elektroforeogramů

Na fotografii gelu se sleduje velikost amplifikovaných fragmentů po restrikční analýze odpovídající rezistentním či senzitivním genotypům u konkrétních vzorků. Velikosti vyhodnocovaných fragmentů pro jednotlivé markery jsou uvedeny v předposledním sloupci tabulky 5. Pokud vzorek neobsahuje restrikční místo, zůstává PCR produkt v původní velikosti. Výsledky elektroforézy po restrikční analýze pro všechny výše uvedené markery jsou i s popisem vyobrazeny v přílohách této metodiky.

4. SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ

Předkládaná metodika je svého druhu první česky vydanou komplexní metodickou prací, zaměřenou na detekci genotypů hrachu rezistentních vůči PEMV a padlí. Metodika je určena především pro pracovníky výzkumných a šlechtitelských pracovišť, kteří budou její výsledky využívat pro výzkum, šlechtění a v zemědělské praxi. Metodika bude uplatněna ve šlechtitelských a výzkumných programech týkajících se hrachu setého (*Pisum sativum* L.)

5. ZÁVĚR – POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY

Byla vyvinuta a optimalizována metodika pro rychlou a spolehlivou detekci rezistence/senzitivity u genotypů hrachu setého (*Pisum sativum* L.) k houbovým a virovým chorobám hrachu: výrůstkové mozaice hrachu (PEMV) a padlí. Postup je návodem pro polymerázovou řetězcovou reakci (PCR) a následnou restriční analýzu (CAPS) s aplikací pro šlechtění hrachu a hodnocení genových zdrojů.

Metodika je určena pro pracoviště, které se zabývají problematikou šlechtění hrachu. Identifikované markery mohou být využity pro efektivní šlechtění hrachu – selekci s využitím markerů (MAS = Marker-Assisted Selection).

Pomocí této metodiky mohou zemědělské laboratoře, vybavené pro metody molekulární biologie, samostatně provádět detekci rezistence/senzitivity u genotypů hrachu setého (*Pisum sativum* L.) k výrůstkové mozaice hrachu a padlí již v časných fázích vývoje rostlin. Metodika může být využita pro šlechtění nových odrůd s ověřenými rezistencemi k PEMV a padlí. Metodika bude uplatněna prostřednictvím šlechtitelské firmy Semo, a.s.

6. EKONOMICKÉ ASPEKTY

Spolehlivá a rychlá metoda identifikace genotypů hrachu rezistentních vůči PEMV a padlí může mít pro uživatele značný ekonomický význam. Využitelná je zejména v oblasti šlechtění. Virus výrůstkové mozaiky hrachu (PEMV – *Pea enation mosaic virus*) je celosvětově označován za nejnebezpečnější a ekonomicky nejzávažnější chorobu hrachu a při napadení porostu způsobuje zásadní ekonomické ztráty.

Taktéž padlí hrachu je závažnou chorobou hrachu způsobující v teplejších a sušších pěstitelských oblastech každoročně výnosové ztráty až 60 %.

Výhodou využití molekulárních markerů pro šlechtitele je možnost rychlého testování rozsáhlého materiálu, kdy navíc je možné testovat rostliny v klíčovém stavu a dále si ponechat jen rostliny vhodného genotypu. Byť se metoda využití molekulárních markerů jeví jako relativně nákladná, její zavedení může pro pracoviště výhledově znamenat značný ekonomický přínos. Pro detekci rezistentních šlechtitelských materiálů představuje využití molekulárních markerů způsob rychlejší a přesnější ve srovnání s inokulačními testy. Výsledkem je zkrácení času na vývoj nových rezistentních odrůd. Pěstování odrůd, které jsou odolné vůči nejzávažnějším chorobám, vede k vyšším výnosům. Nezanedbatelná je též úspora na nákladech na chemickou ochranu.

Podrobné náklady na zavedení metody: v případě pracoviště s běžně vybavenou laboratoří pro metody molekulární biologie (termocykler pro PCR, centrifuga,

elektroforéza, váhy, pipety) budou náklady na zavedení postupů uvedených v metodice spočívat zejména v nákupu specifických oligonukleotidů pro PCR a izolačního kitu pro rostlinnou genomovou DNA (pokud již pracoviště obdobný kit nepoužívá). Cena 4 oligonukleotidů o velikosti 20 bp v množství 20 nmol, které vystačí pro několik stovek detekcí, je cca 800 Kč. Cena izolačního kitu pro 250 izolací je cca 15 tis.Kč. Restriktáza *Mbol* vychází na cca 2000 Kč pro 300 reakcí; *BstUI* cca 800 Kč za 500 reakcí. Ostatní položky (termostabilní DNA polymeráza, agaróza pro elektroforézu) jsou v molekulárně-biologických laboratořích běžně používány. Celkové náklady na analýzu jednoho vzorku jsou cca 85 Kč, z čehož největší část (60 Kč) tvoří náklady na izolaci kvalitní genomové DNA. V případě izolace genomové DNA metodou CTAB/chloroform se materiálové náklady na izolaci jednoho vzorku sníží na třetinu, metoda je však pracnější a zdlouhavější.

7. DEDIKACE

Metodika byla vypracována za finanční podpory projektu Technologické agentury České republiky v rámci Programu TREND FW10010461: „Moderní technologie ve šlechtění olejnin a luskovin - zavedení tvorby dihaploidů a molekulární identifikace donorů rezistence ve šlechtitelských programech olejnin a luskovin”.

8. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE

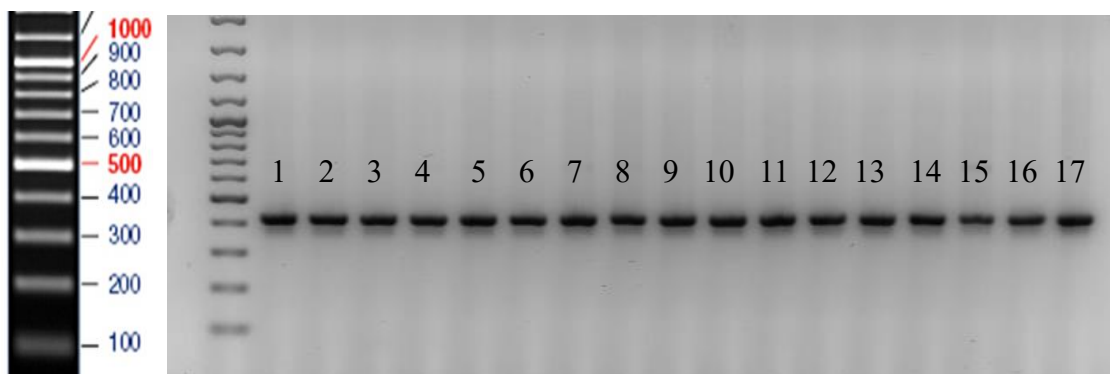
Ludvíková M., Dostálová R., Griga M. (2024): Využití molekulárních markerů pro šlechtění hrachu setého (*Pisum sativum* L.) na odolnost vůči PEMV. Úroda 12, roč. LXXII, vědecká příloha, s.89–96, ISSN 0139-6013.

9. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

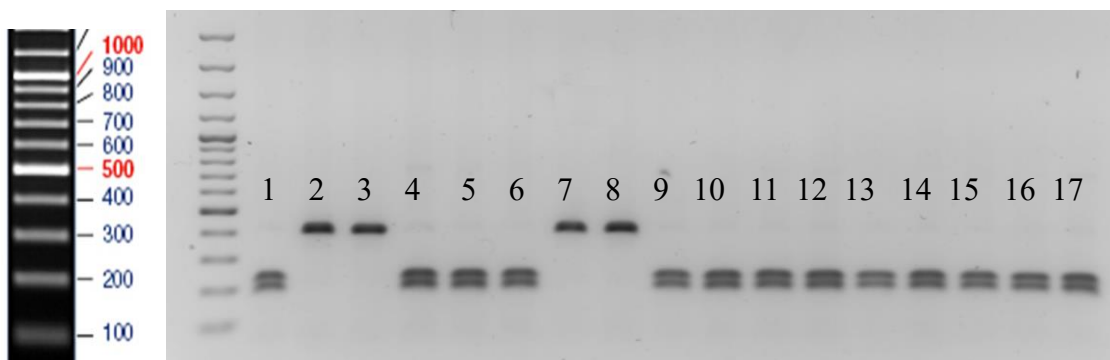
- Dostálová R., Hýbl M., Trněný O., Říha L., Griga M. (2020): Asociační analýza (GWAS) hrachu setého (*Pisum sativum* L.) a identifikace SNP markerů pro genomickou selekci hospodářsky významných znaků. Úroda 12, roč. LXVIII, vědecká příloha časopisu - Badalíková B., Šindelková I. (eds.): Aktuální poznatky v pěstování, šlechtění a ochraně rostlin, 27-34. ISSN 0139-6013.
- Blixt S. (1972): Mutation genetics in *Pisum*. Agr. Hort. Genet. 30: 1–293.
- Hull R. (1981): Pea enation mosaic virus. In: Kurstak, E. (ed): Handbook of Plant Virus Infections and Comparative Diagnosis, Elsevier/North-Holland Biomedical Press. Pp 239–256.
- Jain S., Weeden F.N., Porter L.D., Eigenbrode S.D., McPhee K. (2013): Finding linked markers to En for efficient selection of Pea Enation Mosaic Virus in pea. Crop Sci. 53: 1–8.
- Jaranowski J. (1976): Gamma-ray induced mutations in *Pisum arvense* L. s. l. Genet. Polonica 17: 479–495.
- Ludvíková M., Dostálová R., Hýbl M., Trněný O., Griga M. (2022): Vývoj CAPS markerů pro genomickou selekci hospodářsky významných znaků u hrachu setého (*Pisum sativum* L.) Úroda – vědecká příloha, 70 (12), s.73–81, ISSN 0139-6013.

- Marx G.A., Weeden N.F., Provvidenti R. (1985): Linkage relationships among markers in chromosome 3 and En, a gene conferring virus resistance. *Pisum Newsl.* 17: 57–60.
- Randhawa H., Weeden N.F. (2009): Refinement of the position of En on LGIII and identification of closely linked DNA markers. *Pisum Genet.* 41: 33–35.
- Schroeder W.T., Barton D.W. (1959): The nature and inheritance of resistance to the Pea Enation Mosaic Virus in garden pea, *Pisum sativum* L. *Phytopatology* 48: 628–632.
- Švábová L., Griga M. (2009): Genetické modifikace hrachu pro zvýšení odolnosti. *Úroda.* 57(11): 46–48. ISSN 0139-6013.
- Užitný vzor: Agritec Plant Research, s. r. o., SEMO a.s., Výzkumný ústav rostlinné výroby, v. v. i., Zemědělský výzkum, s.r.o., Ústav experimentální botaniky AV ČR, v. v. i. Sada asociovaných markerů jednonukleotidových polymorfismů v souboru znaků genotypů rodu *Pisum* L.: Radmila Dostálová, Miroslav Hýbl, Luděk Říha, Oldřich Trněný, Michaela Matoušková, Jan Šafář, Miroslav Griga. Česká republika. Užitný vzor CZ 34578.
- Víchová J. (2024): Choroby luskovin: Virové choroby; dostupné z <https://www.agromanual.cz/cz/clanky/ochrana-rostlin-a-pestovani/choroby/choroby-luskovin-virove-choroby>.
- Yu J., Gu W.K., Provvidenti R., Weeden N.F. (1995): Identifying and mapping two DNA markers linked to the gene conferring resistance to Pea Enation Mosaic Virus. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 120: 730–733.

10. OBRAZOVÁ PŘÍLOHA

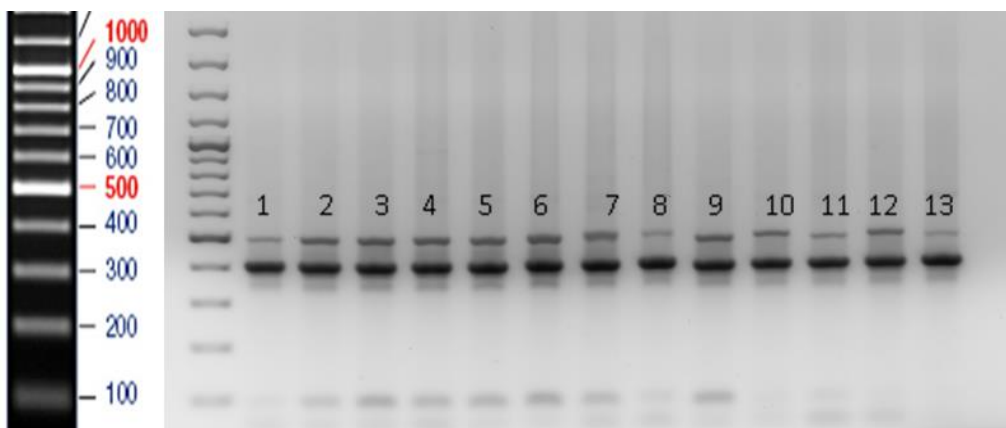


Obr. 3: Výsledek PCR amplifikace pro **marker 78** (odolnost k **PEMV**). Vlevo 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific), 1. – 17. amplifikované vzorky (422 bp).

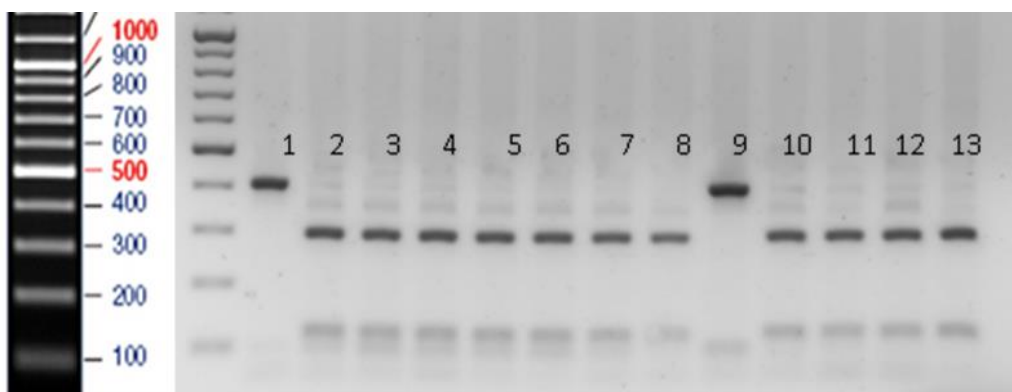


Obr. 4: Výsledek restrikční analýzy pro **marker 78**. Vlevo 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific), 1. – 17. amplifikované vzorky po restrikci (206 a 216/ 422 bp).

Vzorky 1, 4, 5, 6, 9 až 17 mají rezistentní genotyp – dávají po restrikci fragmenty o délce 206 a 216 bp. Vzorky 2, 3, 7 a 8 mají senzitivní genotyp; po restrikci zůstává fragment o velikosti 422 bp.

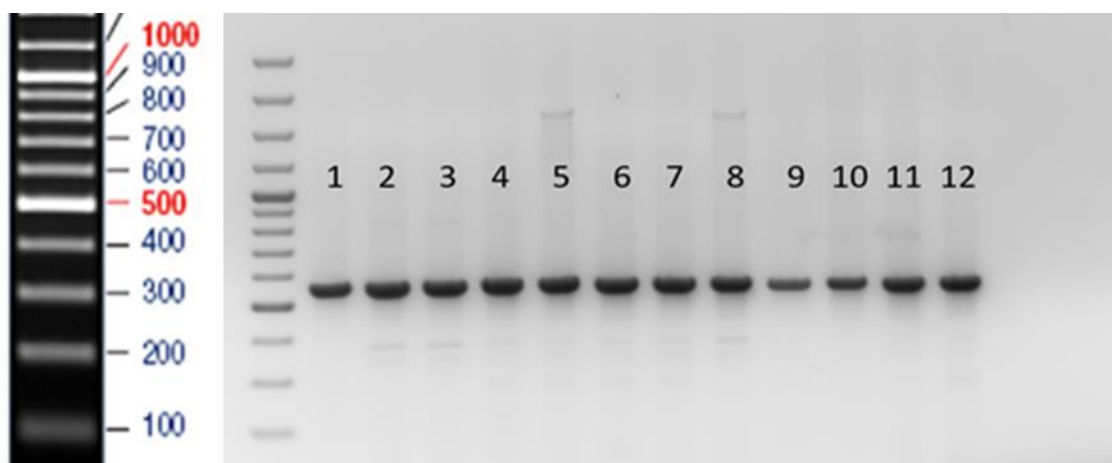


Obr. 5: Výsledek PCR amplifikace pro **marker 81** (odolnost k **PEMV**). Vlevo 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific), 1. – 13. amplifikované vzorky (409 bp).

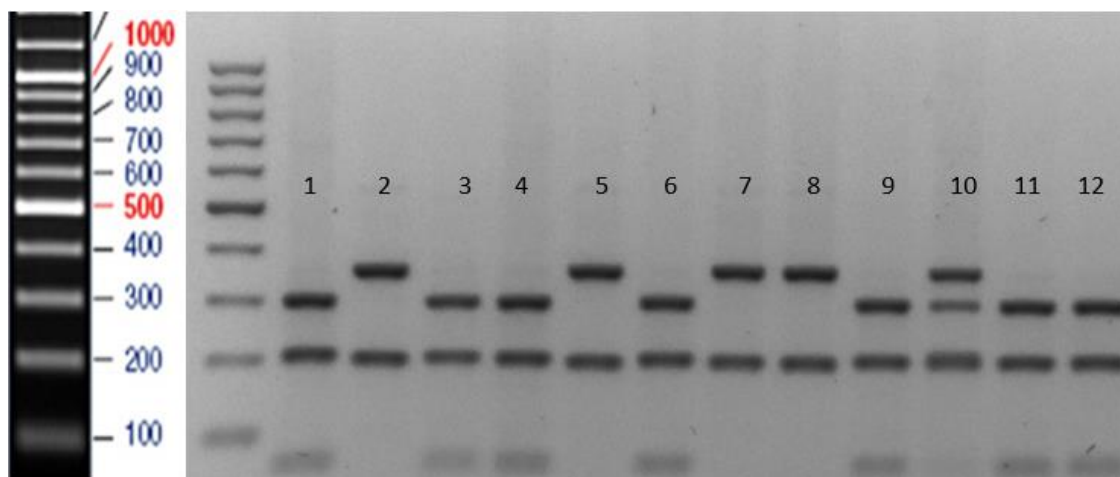


Obr. 6: Výsledek restrikční analýzy pro **marker 81**. Vlevo 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific), 1. – 13. amplifikované vzorky po restrikci (296 a 113/ 409 bp).

Vzorky 2 až 8 a 10 až 13 mají rezistentní genotyp – dávají po restrikci fragmenty o délce 296 a 113 bp. Vzorky 1 a 9 mají senzitivní genotyp; po restrikci zůstává fragment o velikosti 409 bp.

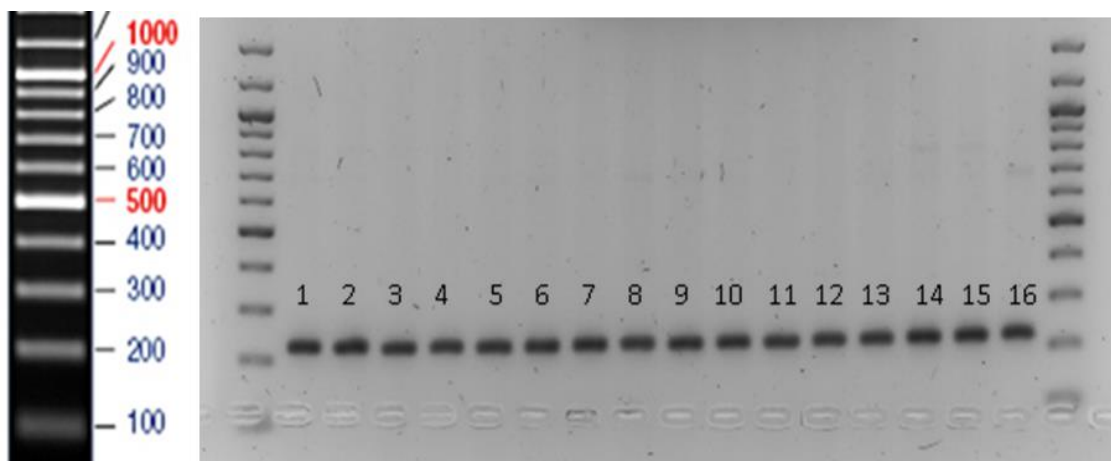


Obr. 7: Výsledek PCR amplifikace pro **marker 74** (odolnost k **padlí**). Vlevo 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific), 1. – 12. amplifikované vzorky (555 bp).

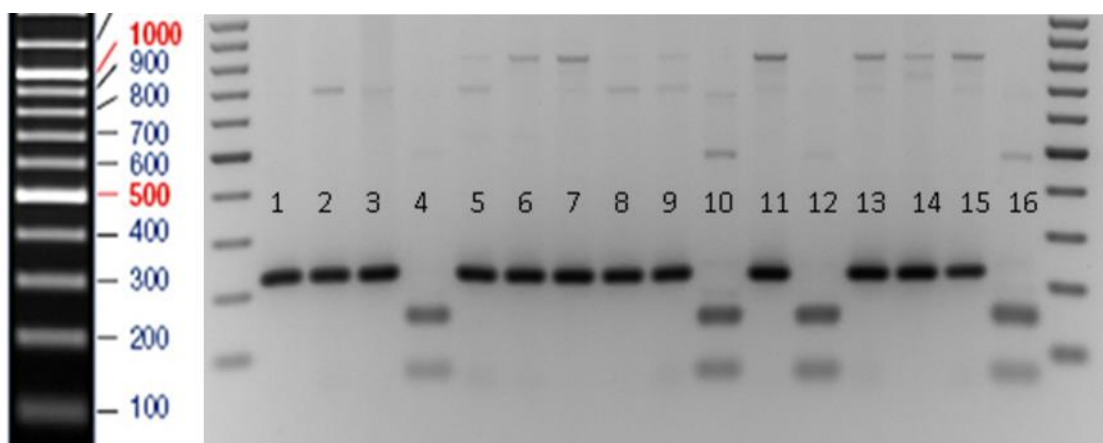


Obr. 8: Výsledek restrikční analýzy pro **marker 74**. Vlevo 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific), 1. – 12. amplifikované vzorky po restrikci (297, 196 a 62/ 359 a 196 bp).

Vzorky 1, 3, 4, 6, 9, 11 a 12 mají rezistentní genotyp – dávají po restrikci fragmenty o délce 297, 196 a 62 bp. Vzorky 2, 5, 7 a 8 a mají senzitivní genotyp; dávají po restrikci fragmenty o délce 359 a 196 bp. Vzorek 10 má heterozygotní genotyp, dává po restrikci fragmenty o velikosti 359 bp i 297 bp spolu se 196 bp.



Obr. 9: Výsledek PCR amplifikace pro **marker 76** (odolnost k **padlí**). Vlevo 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific), 1. – 16. amplifikované vzorky (223 bp).



Obr. 10: Výsledek restrikční analýzy pro **marker 76**. Vlevo 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific), 1. – 16. vzorky po restrikci (223 / 147 a 76 bp). Vzorky 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 13, 14 a 15 mají rezistentní genotyp – po restrikci zůstává fragment o velikosti 223 bp. Vzorky 4, 10, 12 a 16 mají senzitivní genotyp; dávají po restrikci fragmenty o délce 147 a 76 bp.