

**Stanovení cizosprašnosti/samosprašnosti
u třešně ptačí (*Prunus avium* L.)
molekulárně genetickými metodami
a její ověření v praxi**

Jana Čmejlová a kol.



NCK Národní Centrum Kompetence
Biotechnologické centrum
pro genotypování rostlin

**CERTIFIKOVANÁ METODIKA
2020**

Autoři: RNDr. Jana Čmejlová, Ph.D., Ing. Pavol Suran, Ing. Lubor Zelený,
Ing. František Paprštejn, CSc., RNDr. Radek Čmejla, Ph.D.
VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOCNÁŘSKÝ
HOLOVOUSY, s. r. o.

Název: Stanovení cizosprašnosti/samosprašnosti u třešně ptačí (*Prunus avium* L.)
molekulárně genetickými metodami a její ověření v praxi

Vydal: VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOCNÁŘSKÝ
HOLOVOUSY, s. r. o.
Holovousy 129, 50801 Holovousy

Vyšlo v roce: 2020

Oponenti: doc. Dr. Ing. Pavel Vejtl
Česká zemědělská univerzita v Praze, FAPPZ, Katedra genetiky a šlechtění
Bc. Tomáš Jan
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Národní odrůdový úřad,
Oddělení zkoušek odlišnosti, uniformity a stálosti

Vydáno bez jazykové úpravy

Publikace je realizačním výstupem projektu TAČR TN01000062/07 – Biotechnologické centrum pro genotypování rostlin, Dílčí projekt 007 – Ovoce; při řešení bylo využito infrastruktury projektu LO1608.

Publikace byla certifikována 60238/2020-MZE-18140

© VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOCNÁŘSKÝ HOLOVOUSY, s. r. o., 2020

www.vsuo.cz

ISBN: 978-80-87030-76-9

OBSAH

| | |
|---|----|
| ANOTACE | 5 |
| 1. Úvod | 7 |
| 2. Cíl metodiky | 14 |
| 3. Vlastní popis metodik | 14 |
| 3.1 Popis navrženého systému primerů | 14 |
| 3.2 Izolace DNA | 16 |
| 3.3 Multiplexní PCR a fragmentační analýza | 17 |
| 3.4 Vyhodnocení výsledků | 19 |
| 3.4.1 Příklady vyhodnocení S-alel | 23 |
| 3.4.2 Příklady vyhodnocení alel promotoru MGST | 30 |
| 3.5 Ověření opylovacích poměrů v polních podmínkách | 31 |
| 4. Srovnání novosti postupů | 33 |
| 5. Popis uplatnění metodiky | 34 |
| 6. Ekonomické aspekty | 35 |
| 7. Seznam použité související literatury | 38 |
| 8. Seznam publikací, které předcházely metodice | 41 |
| 9. Přílohy | 43 |

ANOTACE

Třešeň ptačí (*Prunus avium* L.) je cizosprašná rostlina, což má dalekosáhlé negativní důsledky pro její komerční pěstování. Pro úspěšné pěstování určité odrůdy je vždy třeba uvádět experimentálně zjištěné vhodné opylovací odrůdy, které je třeba společně vysázet do sadu pro zajištění maximální možné produkce plodů. U třešni je cizosprašnost primárně dána multialelickým S-lokusem, který v rámci nerekombinujícího haplobloku nese dva geny kódující proteiny zodpovědné za cizosprašnost, tj. gen pro S-RNázu zodpovědný za samičí (pestíkovou) část cizosprašnosti a gen pro S-haplotypově specifický F-box (SFB) zajišťující samčí (pylovou) část cizosprašnosti. Dvě odrůdy nesoucí stejné S-alely se nemohou navzájem oplodnit, avšak mutacemi S-alel lze docílit velmi výhodné samosprašnosti třešni. Dalším mechanismem dosažení alespoň částečné samosprašnosti třešni je snížení exprese MGST genu, ke kterému u některých španělských odrůd třešni došlo insercí sekvence podobné transpozónu do promotorové oblasti tohoto genu. Tato metodika přináší zcela unikátní postup umožňující stanovit všechny známé S-alely (včetně samosprašných S-alel) a alely promotoru genu MGST v jediné reakci, čímž dochází k významnému zjednodušení v současnosti používaných postupů. Navržený postup analýzy S-alel/alel promotoru MGST značně zrychluje, zlevňuje a současně snižuje možnou chybovost. Zároveň metodika popisuje postup pro testování opylovacích poměrů v podmínkách sadu.

ANNOTATION

Sweet cherry (*Prunus avium* L.) is a self-incompatible plant, however, self-incompatibility has extensive negative consequences for its commercial planting. For successful cultivation of a particular cultivar it is necessary to have experimentally identified suitable pollination cultivars that have to be co-planted in an orchard for a maximal fruit production. Self-incompatibility of sweet cherries is primarily given by a multiallelic S-locus bearing two genes as part of one non-recombining haploblock – gene for S-RNase responsible for a female (pistil) part of self-incompatibility and gene encoding S-haplotype specific F-box (SFB) protein ensuring a male (pollen) part of self-incompatibility. Two cultivars bearing the same S-alleles cannot be mutually fertilized, however, a very advantageous self-compatibility trait can be obtained by S-allele mutations. Another mechanism to attain at least partial self-compatibility is lowering

the MGST expression as it occurs naturally in some Spanish sweet cherry cultivars due to a transposon-like sequence insertion into the MGST promoter. This methodology brings a unique procedure allowing the determination of all known S-alleles (including self-compatible S-alleles) and alleles of the MGST promoter in only one reaction, and thus highly simplifies currently used methods. The suggested procedure allows faster, cheaper and concurrently less erring analysis of S-alleles/MGST promoter alleles. The methodology also describes a process for a pollinating ratio testing in field conditions.

1. Úvod

Třešeň ptačí (*Prunus avium* L.), jedna z nejvýznamnějších ovocných plodin v našem klimatickém pásu se sklízí statisíce tun ročně, patří primárně mezi cizosprašné rostliny. Cizosprašnost je systém vyvinutý rostlinami za účelem zabránění samooplození, aby byla zajištěna co nejvyšší výměna genů v rámci populace. Cizosprašnost třešni však má dalekosáhlé negativní důsledky pro jejich komerční pěstování. Již ve čtyřicátých letech minulého století bylo potvrzeno, že ne všechny odrůdy třešni je možné navzájem oplodit (Crane MB, 1937). Pro úspěšné pěstování určité odrůdy jsou proto vždy uváděny experimentálně zjištěné vhodné opylovací odrůdy, které je nezbytné do komerčních sadů vysadit, aby bylo dosaženo maximální možné produkce plodů. Obvyklý počet stromů opylovací odrůdy je 10 %, nebo je realizována výsadba sadu s kombinací odrůd v jednotlivých řadách, tedy v poměru 1:1. I v případě výsadby vhodné opylovací odrůdy však může sklizeň ohrozit mimo jiné odlišnost doby kvetení, délky kvetení nebo intenzity kvetení, které jsou ovlivněny mnoha faktory, ať již biotickými, nebo abiotickými. Výsadba dvou odrůd třešni v komerčním sadu může být komplikací i pro sklizeň, kdy obě odrůdy zpravidla dozrávají v odlišnou dobu, nebo se plody významně liší charakteristikami plodu a produkci není možné smíchat. Opylovací odrůda navíc nemusí mít plody tržní kvality, což by v důsledku snižovalo možný hektarový výnos. Proto je jedním z trendů moderního šlechtitelství produkce samosprašných odrůd, které by značně zjednodušovaly management třešňových sadů. Dalším šlechtitelským cílem je křížení třešni pro zlepšení jejich kvalitativních a kvantitativních znaků. I zde však může být cizosprašnost velkou komplikací, neboť řadu odrůd s kvalitními šlechtitelsky zajímavými parametry nelze navzájem oplodit. Identifikovat vhodné opylovací odrůdy, popřípadě prokázat samosprašnost klasickými opylovacími metodami je však velmi časově náročné a pracné. Z tohoto důvodu byly pro usnadnění nalezení vhodné opylovací odrůdy, případně pro prokázání samosprašnosti, zavedeny laboratorní metody.

U třešni je cizosprašnost primárně dána multialelickým S-lokusem (konkrétní alely se označují jako S-alely a odlišují se čísly), který v rámci nerekombinujícího haplobloku nese dva geny kódující proteiny zodpovědné za cizosprašnost, tj. gen pro S-RNázu zodpovědný za samičí (pestíkovou) část cizosprašnosti a gen pro S-haplotypově specifický F-box (SFB) zajišťující samčí (pylovou) část cizosprašnosti (Ushijima K, 2003, Yamane H, 2003).

K úspěšnému opylení a oplození dojde, pokud je S-alela v genomu haploidního pylového zrna odlišná od obou S-alel diploidního pestíku. Přesný mechanismus, který brání samooplození, není dosud znám. Podle v současnosti uznávaného modelu (Tao R, 2010, Matsumoto D, 2016a, 2016b a 2019) se v pylové láčce předpokládá existence „obecného inhibitoru“, který může inaktivovat všechny S-RNázy pronikající dovnitř prorůstající pylové láčky z pletiv pestíku. Tímto obecným inhibítorem je pravděpodobně víceproteinový komplex nazývaný SCF podle obdobného komplexu z čeledi *Solanaceae* a *Rosaceae* a podílí se na něm proteiny PavSLFLs, PavSFB2, MGST, DnaJ-like protein a další minoritní proteiny (Matsumoto D, 2016b a 2019). SFB protein pylové láčky je pak podle tohoto modelu schopen selektivně rozpoznat S-RNázu, která se s ním vyskytuje v jednom lokusu, a chránit ji před degradací obecným inhibítorem. S-RNáza tak může vykonávat svoji funkci, tedy degradovat RNA v prorůstající pylové láčce, což indukuje zastavení růstu pylové láčky již v blizně a zabraňuje samooplození. Význam SFB proteinu pro cizosprašnost je dobře dokumentován mutacemi/delecí SFB proteinu, kterými bylo dosaženo samosprašnosti třešň (viz dále). Kromě toho byl popsán význam genu kódujícího glutation-S-transferázu z M-lokusu (MGST), jehož protein je součástí výše uvedeného SCF komplexu. Snížením exprese MGST je také možné docílit alespoň částečné samosprašnosti třešň (Ono K, 2018).

Znalost S-alel jednotlivých odrůd je zcela zásadní jak pro pěstitele, tak i pro šlechtitele třešň, neboť řada kulturních odrůd nese stejné S-alely a nejsou tedy schopné se navzájem oplodnit. V současnosti končí číslování S-alel alelou S38, některé z nich však byly později popsány jako identické, např. S8=S3, S11=S7 a S15=S5, (Sonneveld T, 2001, 2003, Wünsch A, 2004). Řada z těchto S-alel byla popsána u planě rostoucích třešň (např. alely S17 až S21, De Cuyper B, 2005). V roce 2017 bylo v databázi čítající celkem 1203 převážně kulturních odrůd třešň identifikováno 24 různých S-alel (Schuster M, 2017). U kulturních odrůd se v pořadí dle frekvence výskytu nejčastěji vyskytují alely S3, S6, S1 a S4, které dohromady tvoří cca 65 % alel vyskytujících se ve výše uvedené databázi (Schuster M, 2017). Celkem pak je popsáno 60 tzv. inkompatibilních skupin odrůd třešň nesoucích stejnou kombinaci S-alel. Některé inkompatibilní skupiny čítají více jak 100 odrůd, které nelze v rámci jejich inkompatibilní skupiny navzájem vůbec úspěšně oplodnit, např. inkompatibilní skupina III (S3S4, 113 odrůd), VI (S3S6, 104 odrůd) nebo II (S1S3, 103 odrůd). U odrůd se shodnou jednou S-alelou je pak teoretická šance na úspěšné oplození pouze 50 % oproti oplození odrůd s oběma jinými S-alelami, protože oplození

je schopné pouze pylové zrno nesoucí S-alelu odlišnou od obou S-alel mateřské rostliny. 25 odrůd naopak vykazuje unikátní S-genotypy a jsou považovány za univerzální opylovače všech odrůd.

Také byly popsány samosprašné třešně, které obsahují jednu ze tří dosud publikovaných samosprašných S-alel. Původní cizosprašné S-alely, ze kterých vznikly, jsou pak v případě samosprašných variant označovány s apostrofem, tj. jako S3', S4' a S5'. Všechny tyto alely mají mutovanou SFB složku inkompatibility. Jedinou alelou, která vznikla přirozeně, je alela S5' (Marchese A, 2007), zbylé dvě vznikly ozařováním (Lewis D, 1954). U alely S3' došlo v S-lokusu k rozsáhlé deleci DNA, která zatím nebyla přesně určena. U alely S4' nastala delece 4 nukleotidů v SFB genu vedoucí k posunu čtecího rámce a předčasnému ukončení vznikajícího proteinu, který navíc obsahuje odlišný C-konec. U alely S5' se v SFB genu vytvořil bodovou mutací předčasný stop kodon a dle předpokladu tím dochází ke zkrácení vznikajícího proteinu. Samosprašné alely, převážně pak alela S4', byly do křížení zařazeny relativně nedávno, jsou však stále častěji využívány pro tvorbu moderních samosprašných odrůd třešní. Zvláštní skupinu samosprašných třešní tvoří skupina původně španělských odrůd, které neobsahují žádnou z výše uvedených mutovaných S-alel, ale jejich alespoň částečná samosprašnost je dána inzercí sekvence podobné transpozónu do promotorové oblasti genu pro glutathion-S-transferázu v M-lokusu (MGST). Přestože funkce tohoto genu při opylení a oplození není zcela jasná, funkční experimenty dokládají, že snížení exprese MGST díky této inzerci skutečně vede k narušení mechanismu cizosprašnosti (Ono K, 2018). V současnosti je ve výše uvedené databázi zapsáno 72 samosprašných odrůd, jejichž tržní potenciál je však různý (Schuster M, 2017).

Po rozpoznání významu S-lokusu pro cizosprašnost třešní a možnost jejich úspěšného opylení byly S-alely nejprve identifikovány biochemickými metodami (Bošković R, 1996). V novém tisíciletí se postupně začaly jednotlivé S-alely identifikovat molekulárně genetickými metodami, a to nejprve alelicky specifickými primery (identifikace sekvence DNA pro prvních šest S-alel, Sonneveld T, 2001). Poté byly z důvodu popisu dalších S-alel navrženy pro polymerázovou řetězovou reakci (PCR) univerzální primery pro amplifikaci různých úseků S-lokusu s rozlišením jednotlivých S-alel na základě délkového polymorfizmu intronů v genu pro S-RNázu, popřípadě SFB.

Zdokonalené univerzální primery pro amplifikaci prvního intronu a jeho okolí PaConsI-F + PaConsI-R2 (Sonneveld T, 2003, Sonneveld T, 2006) dávají velikosti PCR fragmentů v rozmezí od 234 do 451 bp, což je výhodné rozmezí pro použití ve fragmentační analýze využívající kapilární elektroforézu, která umožňuje velmi přesně a jednoduše stanovit délku fragmentů. Odlišení velikostí fragmentů vytvořených pomocí těchto primerů však nemusí postačovat ani na kapilárním genetickém analyzátoru, jelikož u některých S-alel vznikají stejně dlouhé, nebo téměř stejně dlouhé fragmenty, např. S1 a S34; S2 a S7 a S12; S14 a S23; S22 a S24, případně samosprašné S-alely versus příslušné původní cizosprašné S-alely. Navíc tyto univerzální primery nelze za běžných podmínek amplifikujících ostatní S-alely použít pro amplifikaci poměrně hojně se vyskytující alely S13 (Sonneveld T, 2003), neboť dávají téměř nezatelný, popřípadě nulový signál (Sonneveld T, 2006, Vaughan SP, 2006).

Univerzální primery pro PCR amplifikaci druhého intronu a jeho okolí PaConsII-F + PaConsII-R (Sonneveld T, 2003) jsou problematické hned z několika důvodů: 1) dávají vznik velkým fragmentům o délce 577 až 2385 bp, které nejsou vhodné pro fragmentační analýzu na kapilárním genetickém analyzátoru; 2) u alel S1 a S13 vznikají shodně dlouhé fragmenty; 3) alely S5, S13 a S16 se amplifikují velmi slabě; 4) téměř u všech alel vznikají při PCR slabší nespecifické pruhy a 5) také neodlišují samosprašné S-alely od původních cizosprašných alel. Z důvodu malé odlišnosti mezi některými PCR produkty je navíc nezbytné na agarózovém gelu analyzovat současně i standardy pro příslušné S-alely, což analýzu dále prodražuje. Všechny tyto skutečnosti komplikují použití tohoto páru primerů pro analýzu S-alel a v praxi není analýza délky druhého intronu příliš často používána.

Z důvodu nemožnosti rozlišit všechny S-alely podle délkového polymorfizmu intronů v genu pro S-RNázu byly vhodné délkově se lišící oblasti hledány i v SFB genu jednotlivých S-alel. V 5' UTR oblasti tohoto genu byl identifikován krátký intron lišící se délkou mezi mnoha S-alelami. Primery navržené pro tuto oblast SFB genu však nejsou příliš ideální pro diskriminaci mezi jednotlivými alelami a mají tyto zásadní nevýhody: 1) amplifikací mnoha S-alel vzniká při PCR naprosto stejně dlouhý fragment, např. S1, S4, S9 a S19; S5 a S17; S10 a S22, respektive S13 a S14; 2) rozdíly v délkách amplifikovaných fragmentů jsou příliš malé pro spolehlivé odlišení i na kapilárním genetickém analyzátoru a často reprezentují rozdíl pouze jediného nukleotidu; 3) amplifikace u alel S9 a S14 je slabá a nespolehlivá a 4) navržené primery jsou natolik degenerované, že je PCR

amplifikace velmi náročná a vyžaduje pečlivou optimalizaci amplifikačních podmínek. Publikovaný protokol pro PCR amplifikaci obsahuje cykly s průběžně se měnící teplotou nasedání primerů (Vaughan SP, 2006), což je pro multiplexování s dalšími primery zcela nevhodné. V praxi tyto primery nejsou samostatně používány, nicméně kombinací s nezávislou PCR reakcí s primery pro amplifikaci prvního intronu S-RNázy byly postupnou analýzou na kapilárním genetickém analyzátoru rozlišeny jednotlivé S-alely S1 až S22 (Vaughan SP, 2006). Samosprašné alely však nebyly opět uvažovány.

Dalším přístupem umožňujícím jednoznačnou analýzu S-alel pak bývají alelicky specifické primery, např. 13 párů primerů specifických pro alely S1 až S16 (Sonneveld T, 2001, 2003), popřípadě alelicky specifické primery pro S17 až S19, S21/25, S34 a S37 (Szikriszt B, 2013). PCR produkty s alelicky specifickými primery jsou obvykle analyzovány elektroforeticky na agarózových gelech.

Pro identifikaci samosprašné alely S3', u které není znám rozsah delece v SFB genu, a její odlišení od alely S3 byla navržena detekce pomocí primerů vyskytujících se v deletované části SFB genu (Sonneveld T, 2005). U S3' tak není příslušný 822 bp dlouhý fragment amplifikován, přičemž amplifikovatelnost templátové DNA v této reakci je ověřena na kontrolním genu. U alely S3 jsou pak v jediné reakci amplifikovány oba fragmenty – fragment S3 alely i kontrolní fragment. Analýza výše popsané PCR reakce elektroforézou na gelu však není schopná správně identifikovat odrůdy s kombinací alel S3S3'.

U samosprašné alely S4' byly rozsah delece v SFB genu a její umístění jednoznačně identifikovány (Sonneveld T, 2005) a systém pro její detekci a odlišení od alely S4 byl navržen např. v Ikeda K. (2004). Tento systém využívá sady dvou párů primerů pro tzv. nested PCR (dvoukolovou PCR), kde tyto primery specificky amplifikují obě tyto alely. Rozlišení mezi nimi je pak podle této práce zajištěno buď elektroforézou v denaturujícím polyakrylamidovém gelu, nebo štěpením restrikčními enzymy *EcoRV* nebo *MboI* a následnou elektroforézou v agarózovém gelu. Oba tyto přístupy jsou poměrně pracné a nevhodné pro fragmentační analýzu. Dalším přístupem je např. amplifikace příslušné oblasti metodou qPCR, tedy PCR v reálném čase, s následnou vysokorozlišovací analýzou křivek tání, tzv. HRM analýzou navrženou Muñoz-Espinoza et al. (2017). Tato technika však umožňuje rozlišit pouze alely S4 a S4' a není možné ji kombinovat s identifikací dalších S-alel v jediné reakci.

U samosprašné alely S5' je možné ověřit přítomnost bodové mutace například sekvenováním, což je ale drahé, pracné a tudíž nevhodné pro analýzu velkého počtu vzorků. Zároveň bylo publikováno, že je tato mutace ve vazbě s odlišnou délkou SSR markeru nacházejícího se ve druhém intronu S-RNázy oproti délce tohoto SSR markeru u alely S5 (Marchese A, 2007), což opět vyžaduje nezávislou analýzu této mutace.

Pro identifikaci inserce sekvence podobné transpozónu do promotorové oblasti genu MGST byly navrženy specifické primery, kdy se forward primer nachází v sekvenci této inserce a reverse primer v promotoru MGST (Ono K, 2018).

Pro analýzu S-alel u třešně ptačí (*Prunus avium* L.) je v současném stavu techniky používáno více přístupů. Všechny používané detekční systémy pro identifikaci všech S-alel spočívají v provedení několika nezávislých PCR reakcí. Často jsou využívány obě sady výše uvedených univerzálních primerů pro amplifikaci prvního, respektive druhého intronu genu pro S-RNázu a jejich okolí a analýza fragmentů probíhá na gelu. Pro dourčení/potvrzení výsledků se popřípadě používají alelicky specifické primery. Jiná pracoviště využívají pouze alelicky specifické primery. Všechny tyto přístupy jsou pracné a časově i materiálově náročné. S vyšším objemem lidské práce pak také narůstá možnost chybné identifikace S-alel. Pro názornost pracnosti postupů nevyužívajících fragmentační analýzu na kapilárním sekvenátoru uvádíme, že De Cuyper (2005) použil pro identifikaci S-genotypu u 65 planých třešní obsahujících i v té době nepopsané S-alely celkem 220 různých PCR reakcí s následnou elektroforézou na gelu. I při analýze známých S-alel je však podobný systém identifikace S-alel náročný a není rovněž vhodný pro analýzu velkého množství odrůd třešní, u kterých neexistuje žádná informace o jejich možném S-alelickém složení (Vaughan SP, 2006).

Jediným způsobem umožňujícím rychlé zpracování mnoha vzorků je výše uvedený detekční systém Vaughana et al. (2006) využívající fragmentační analýzu na kapilárním genetickém analyzátoru s fluorescenčně značenými primery pro amplifikaci jednak oblasti prvního intronu genu pro S-RNázu a jednak oblasti intronu v 5' UTR genu pro SFB. Kombinací délky obou fragmentů je pak určena výsledná S-alela. Nedostatky používaných primerů byly uvedeny výše. Navíc byla od doby zveřejnění této publikace identifikována řada nových S-alel, a to od S23 výše. U mnoha z nich nebyly publikovány sekvence SFB genů a nebyla publikována ani délka jejich fragmentů amplifikovaných s primery pro oblast 5' UTR genu SFB. Vzhledem k malé délkové variabilitě tohoto

úseku DNA se dá předpokládat další zkomplikování jednoznačné identifikace genotypu S-alel. Vhodnost tohoto systému pro správné určení S-alel se tak v dnešní době stává velmi diskutabilní. Navíc tento systém neřeší detekci stále častěji se prosazujících samosprašných S-alel, které nelze tímto postupem identifikovat.

Z těchto důvodů existuje potřeba vyvinout nový detekční systém pro stanovení S-alel/alel promotoru MGST u třešní, který by řešil potřebu jednoduché detekce co nejvyššího množství v současnosti známých S-alel včetně samosprašných a alel promotoru genu MGST, ideálně v jediné reakci. Identifikace S-alel/alel promotoru MGST totiž usnadňuje šlechtitelům a pěstitelům nalezení vhodné opylovací odrůdy, popřípadě určit samosprašnost analyzovaného genotypu.

Stanovením kompatibility odrůd dle S-alel však výběr odrůd pro vzájemné opylování nekončí, neboť příslušnost do různých inkompatibilních skupin ještě není zárukou úspěšného oplození v polních podmínkách. Dalším velmi důležitým faktorem, který ovlivňuje opylení a následné oplození, je termín kvetení jednotlivých odrůd. Nejkritičtějším požadavkem při výběru vhodné opylovací odrůdy je kromě odlišnosti S-alel právě shodnost doby plného rozkvětu, protože k úspěšnému opylení a oplození dochází u třešní zpravidla během cca 4–5 dnů doby kvetení dané odrůdy (Stösser R, 1983). V některých chladnějších letech a u některých odrůd k němu může docházet až maximálně během 13 dnů (Roversi A, 1998). Období kvetení však probíhá u různých odrůd třešní, od nejranějších až po nejpozději kvetoucí, během zhruba jednoho měsíce (Vítrop CJ, 1996). Proto je časová shodnost kvetení obou odrůd zcela nezbytná a je stanovována několikaletým fenologickým pozorováním kvetení v sadech. V případě, že je termín kvetení shodný, je dalším limitujícím faktorem genetická a fyziologická stránka blizny a pylových zrn (Brant BA, 1999; Hedhly A, 2004). Často se stává, že nejen vlivem teploty a vlhkosti pylové zrna na blizně nevyklíčí, nebo láčka klíčícího pylového zrna neproroste pestíkem až k vajíčku (Hedhly A, 2003; Hedhly A, 2004). Další příčiny mohou být genetické, kdy může docházet ke kumulaci letálních mutací snižující výsledné procento oplození. S ohledem na existenci výše zmíněných překážek úspěšného opylení a oplození je nedílnou součástí určování kompatibility odrůd také ověření opylovacích poměrů odrůd opylovacím testem v polních podmínkách.

2. Cíl metodiky

Cílem této metodiky je výrazné zjednodušení molekulárně genetických metod charakterizace cizosprašnosti/samosprašnosti u třešně ptačí (*Prunus avium* L.). Tato metodika, na rozdíl od dříve používaných technik, umožňuje jednoznačnou identifikaci S-alel/alel promotoru MGST metodou fragmentační analýzy s analýzou na kapilárním genetickém analyzátoru v jediné reakci. Byla ověřena na nejčastěji se vyskytujících S-alelách a všech známých alelách promotoru MGST. Zároveň uvádí postup pro testování opylovacích poměrů v podmínkách sadu.

3. Vlastní popis metodik

3.1 Popis navrženého systému primerů

Pro tuto metodiku byl navržen systém primerů umožňující detekci S-alel/alel promotoru MGST v jediné multiplexní reakci. Systém využívá: 1) upravené primery pro amplifikaci prvního intronu genu pro S-RNÁzu nacházející se v prvním (forward primer) a druhém exonu S-RNÁzy (reverse primer); 2) alelicky specifické primery navržené ve druhém intronu genu pro S-RNÁzu (forward primer) využívající pro amplifikaci univerzální reverse primer v oblasti třetího exonu genu pro S-RNÁzu společný pro více S-alel; 3) primery pro rozlišení alel S3 a S3' v oblasti rozsáhlé delece SFB genu; 4) primery pro rozlišení alel S4 a S4' obklopující čtyřnukleotidovou delecí v SFB genu; 5) primery pro rozlišení alel S5 a S5', kdy je forward primer navržen tak, aby byl zcela specifický pro detekci alely S5 a nerozpoznával alelu S5'; 6) pro identifikaci alel promotoru genu MGST využívá navržená sada primerů společný reverse primer a dva specifické forward primery, jeden pro amplifikaci alely s insercí sekvence podobné transpozónu (MGSTins), druhý pro amplifikaci přirozeně se vyskytující alely promotoru (MGSTwt), respektive nově identifikované alely s delecí 8 nukleotidů (MGSTdel).

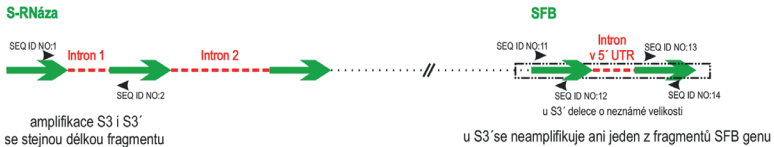
Schéma pozice jednotlivých primerů je uvedeno na Obrázku 1.

1. část detekčního systému - detekce všech S-alel

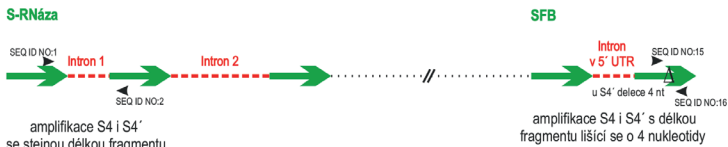


2. část detekčního systému - odlišení samosprašných alel S3', S4', respektive S5' od jejich cizosprašných protějšků

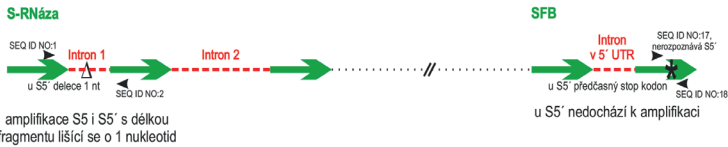
A) alela S3' (rozsáhlá neznámá delece v SFB genu)



B) alela S4' (přímá detekce 4nt delece)



C) alela S5' (přímá detekce místa s bodovou mutací)



3. část detekčního systému - detekce alel promotoru MGST

MGSTins



MGSTwt



MGSTdel



Obrázek 1. Schéma S-lokusu obsahujícího geny pro S-RNázu a SFB, respektive M-lokusu obsahujícího gen MGST. Uvedena přibližná pozice nasedání jednotlivých primerů, v případě analýzy samosprašných S-alel i princip jejich odlišení od původních cizosprašných alel. Obrázek není uveden v měřítku.

Tímto systémem budou pravděpodobně identifikovány všechny známé S-alely, přestože jsou některé z nich velmi vzácné a nebylo je možné ověřit z důvodu nepřítomnosti dané S-alely v genofondových sbírkách VŠÚO Holovousy. Pro detekci S-alel jsou však použity univerzální primery pro amplifikaci okolí prvního intronu S-RNázy, které byly téměř v nezměněné podobě použity pro identifikaci těchto vzácných S-alel. Na základě analýzy příslušných sekvencí lze předpokládat, že tímto systémem primerů bude možné jednoznačně identifikovat i neověřené S-alely. Zároveň by na základě známých sekvencí měly být identifikovány všechny alely promotoru MGST.

Specifita navrženého systému byla ověřena sekvenováním všech PCR amplifikovaných fragmentů pro jednotlivé S-alely/alely promotoru MGST.

Metodika byla testována a validována s použitím konkrétních reagentů, souprav a přístrojů (viz níže). Odborníci v oboru však budou schopni metodiku verifikovat pro konkrétní vybavení laboratoře a používané laboratorní reagenty. Také budou moci učinit různé modifikace použitého způsobu PCR, uvedených primerů a fluorescenčního označení primerů tak, aby nedošlo ke snížení specificity PCR detekce jednotlivých S-alel/alel promotoru MGST. Odborníci v oboru budou též schopni snížit počet současně detekovaných S-alel v jedné reakci, popřípadě vynechat analýzu alel promotoru MGST, např. z důvodu uzpůsobení použité sady primerů pro detekci pouze určitých S-alel v potomstvu určitého křížení, a to dle typu rodičovských S-alel.

Vlastní metodika pro použití v praxi sestává z několika kroků: izolace DNA, multiplexní PCR, fragmentační analýza, vyhodnocení výsledků, a to jak pro S-alely, tak pro alely promotoru MGST, a ověření opylovacích poměrů v polních podmínkách.

3.2 Izolace DNA

Z odebraných vzorků rostlinného materiálu (lýko, listy) byla izolována celková DNA izolačním kitem Exgene™ Plant SV mini (GeneAll) dle návodu výrobce. Homogenizace vzorků byla prováděna v tekutém dusíku, navážka vzorku činila 100 mg. Koncentrace DNA ve vzorku byla stanovena pomocí spektrofotometru NanoDrop Lite (ThermoFisher Scientific), pro standardizovanou analýzu byla ředěna PCR vodou na koncentraci 10 ng/μl.

Pro ověření navrženého systému detekce S-alel/alel promotoru MGST byly použity genotypy uchovávané v genofondových sbírkách VŠÚO Holovousy a zde vyšlechtěné genotypy. Vzorek odrůdy 'Cristobalina' nesoucí běžně se nevyskytující alelu MGSTins byl darem od dr. Mirka Schustera z Julius Kühn-Institut, Pillnitz, Německo. Vzorek odrůdy 'Kronio' obsahující běžně se nevyskytující samosprašnou alelu S5' a nově identifikovanou alelu MGSTdel byl darem od prof. Tiziana Carusa z Università degli Studi di Palermo, Palermo, Itálie.

3.3 Multiplexní PCR a fragmentační analýza

Připravená DNA byla použita jako templát pro PCR reakci s následujícími reakčními podmínkami: 2 μ l DNA; 5 μ l Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix (ThermoFisher Scientific), primery v koncentracích a fluorescenčně označené dle Tabulky 1, PCR H₂O do celkového objemu 10 μ l.

Tabulka 1. Primery navržené pro identifikaci jednotlivých S-ale/alel promotoru MGST, kde dle nomenklatury International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) Y zastupuje C nebo T, respektive S zastupuje G nebo G, jejich fluorescenční značení a koncentrace. Jsou uvedeny i rozpoznávané alely uvedených genů.

| Primer | Sekvence | Fluorescenční značení | Výsledná koncentrace (nM) | Rozpoznávaná alela genu |
|---------------|------------------------------|-----------------------|---------------------------|---|
| SEQ ID NO. 1 | CTTGTCTCTGSTTTYGYTTTCTTC | FAM | 1000 | pravděpodobně všechny publikované S-RNázy kromě S13 |
| SEQ ID NO. 2 | CCATTGTTGCACAAATTGAAA | - | 1000 | všechny S-RNázy se známou sekvencí |
| SEQ ID NO. 3 | GTATCAITGCCACYTTCACG | PET | 200 | rozpoznává většímu publikovaných S-RNáz se 100% homologií * |
| SEQ ID NO. 4 | TGGTCTCCCTAAACATGACCC | - | 250 | S1 S-RNáza |
| SEQ ID NO. 5 | TGAACGAAATCTCAACTCATAAATC | - | 250 | S2 S-RNáza |
| SEQ ID NO. 6 | TCATTTTGTTCACCTACC | - | 150 | S6 a S24 S-RNáza |
| SEQ ID NO. 7 | TCTGTCTGGTTGTTTTGCTGG | - | 250 | S7 S-RNáza |
| SEQ ID NO. 8 | TCTAATAAATGGATCTGCTCACTAAAT | - | 1500 | S9 a S22 S-RNáza |
| SEQ ID NO. 9 | GCTAACCCTTACATTTTGACCC | - | 250 | S12 S-RNáza |
| SEQ ID NO. 10 | ATAIGTCTGTCTATCTATCTGTTTCTCA | - | 250 | S13 S-RNáza |
| SEQ ID NO. 11 | CCACAATTTGAACGTCAGAAC | - | 170 | S3 SFB |
| SEQ ID NO. 12 | TCTGTGTTTTCTAAAGGATGGC | FAM | 170 | S3 SFB |
| SEQ ID NO. 13 | TTCATTAAGGAGTAGCAATCTGTAT | FAM | 350 | S3 SFB |
| SEQ ID NO. 14 | GATTCGCCATCTCATGAC | - | 350 | S3 SFB |
| SEQ ID NO. 15 | TCTAGCTTTTATCTTGGGAGG | NED | 150 | S4 a S4' SFB |
| SEQ ID NO. 16 | GATCTCCTATGCCCTAGAGAA | - | 150 | S4 a S4' SFB |
| SEQ ID NO. 17 | GCTTGGACAAAATGACTTGTG | - | 225 | S5 SFB |
| SEQ ID NO. 18 | GATCACAATCACCCAAAGGAGG | FAM | 225 | S5 a S5' SFB |
| SEQ ID NO. 19 | AAAGCCTTCAAGTGGGAAAG | FAM | 110 | MGSTwt, MGSTdel, MGS'Tins |
| SEQ ID NO. 20 | ATAAATGGGTCAGTGTGGG | - | 110 | MGSTwt, MGSTdel |
| SEQ ID NO. 21 | TTGCTTACAGGTCATTACTACAG | - | 110 | MGSTins |

* Přestože rozpoznává většímu publikovaných S-RNáz se 100% homologií, v navrženém detekčním systému je tento primer vyžadován pouze pro specifickou amplifikaci alel S1, S2, S6, S7, S9, S12, S13, S22 a S24 v páru s alelicky specifickými primery (SEQ ID NO. 4-10) z intronu 2 těchto S-RNáz.

PCR amplifikace probíhala v PCR cyklieru C1000 (Biorad) s následujícím teplotním profilem: 98 °C/30 s; cyklování: 26x (98 °C/10 s, 58 °C/10 s, 72 °C/15 s); závěrečná extenze 72 °C/15 s. Pro fragmentační analýzu byl smíchán 1 µl PCR produktu s 15 µl Hi-Di™ formamidu a 0,5 µl velikostního standardu GeneScan™ 600 LIZ™ dye Size Standard v2.0 (obojí od ThermoFisher Scientific). Vzorky byly denaturovány při 95 °C/5 min a fragmentační analýza ampliconů byla provedena s využitím genetického analyzátoru AB3500 (ThermoFisher Scientific).

3.4 Vyhodnocení výsledků

Výsledky byly analyzovány softwarem GeneMapper™ (ThermoFisher Scientific), který je schopen vyhodnotit délky jednotlivých fragmentů v nukleotidech, a nálezy byly interpretovány podle Tabulky 2 pro stanovení S-alel, případně Tabulky 3 pro určení alel promotoru MGST. Je známo, že velikost analyzovaných PCR fragmentů vyhodnocená při kapilární elektroforéze závisí kromě skutečné délky sekvence i na sekvenčních vlastnostech amplifikovaného fragmentu, použitím fluorescenčním značení, použitím přístroji a podmínkách elektroforézy (viz např. www.thermofisher.com). Může se tedy lišit od délek zjištěných na základě reálné sekvence. Proto jsou v Tabulce 2 a 3 uvedeny kromě předpokládaných délek fragmentů označených kurzívou i délky stanovené při fragmentační analýze dle výše uvedeného postupu označené tučně, jak byly ověřeny na genotypech udržovaných v genofondových sbírkách VŠÚO Holovousy a vyšlechtěných tamtéž. Z důvodu někdy i poměrně velkých rozdílů je vhodné systém vždy ověřit na referenčních odrůdách se známými S-alelami/alelami MGST, popřípadě sekvenováním jednotlivých PCR fragmentů. V případě výskytu fragmentů nepřiraditelných na základě délek uvedených v Tabulkách 2 a 3 se doporučuje tento fragment identifikovat sekvenováním. Při analýze cca 350 položek genofondových sbírek a několika set genotypů vzniklých křížením však nebyl žádný neočekávaný fragment identifikován kromě dříve neznámé alely promotoru MGST u odrůdy 'Kronio'. Tento fragment byl sekvenováním identifikován jako nová alela promotoru MGST s delecí 8 nukleotidů nejasného významu pro mechanismus opylení třešně, neboť tato odrůda je samosprašná díky alele S5'.

Tabulka 2. Vyhodnocení fragmentačních analýz pro S-alely. Délky jednotlivých amplifikovaných fragmentů jsou uvedeny v nukleotidech ve sloupcích s příslušným fluorescenčním značením, v závorce uvedeny primery použité pro amplifikaci příslušného fragmentu (forward + reverse). *Délky alel kurzívou*: předpokládané délky podle analýzy referenčních sekvencí v databázi GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>, pro některé S-alely uvedeno více sekvencí s odlišnou délkou amplifikovaného fragmentu), popřípadě dle vlastního sekvenování. **Délky alel tučným písmem**: délky stanovené při fragmentační analýze dle výše uvedeného postupu.

| S-alela | Barva fragmentu při fragmentační analýze | | | | |
|------------|--|--|--|--|--|
| | Modrá (FAM) | Modrá (FAM) | Modrá (FAM) | Červená (PET) | Černá (NED) |
| S1 | 376/378 (379) (SEQ ID NO: 1 + SEQ ID NO: 2) | | | 240 (240) (SEQ ID NO: 4 + SEQ ID NO: 3) | |
| S2 | 342/343/344 (342) (SEQ ID NO: 1 + SEQ ID NO: 2) | | | 303 (302) (SEQ ID NO: 5 + SEQ ID NO: 3) | |
| S3 | 232 (231) (SEQ ID NO: 1 + SEQ ID NO: 2) | 99 (94) (SEQ ID NO: 11 + SEQ ID NO: 12) | 125 (122) (SEQ ID NO: 13 + SEQ ID NO: 14) | | |
| S3' | 232 (231) (SEQ ID NO: 1 + SEQ ID NO: 2) | | | | |
| S4 | 449 (450) (SEQ ID NO: 1 + SEQ ID NO: 2) | | | | 184 (181) (SEQ ID NO: 15 + SEQ ID NO: 16) |
| S4' | 449 (450) (SEQ ID NO: 1 + SEQ ID NO: 2) | | | | 180 (177) (SEQ ID NO: 15 + SEQ ID NO: 16) |
| S5 | 391 (392) (SEQ ID NO: 1 + SEQ ID NO: 2) | 90 (86) (SEQ ID NO: 17 + SEQ ID NO: 18) | | | |

| S-alela | Barva fragmentu při fragmentační analýze | | | |
|------------|---|-------------|---|-------------|
| | Modrá (FAM) | Modrá (FAM) | Červená (PET) | Černá (NED) |
| S5' | 390 (391) (SEQ ID NO: 1 + SEQ ID NO: 2) | | | |
| S6 | 441 (442) (SEQ ID NO: 1 + SEQ ID NO: 2) | | 225 (223) (SEQ ID NO: 6 + SEQ ID NO: 3) | |
| S7 | 343 (342) (SEQ ID NO: 1 + SEQ ID NO: 2) | | 250 (249) (SEQ ID NO: 7 + SEQ ID NO: 3) | |
| S9 | 354 (354) (SEQ ID NO: 1 + SEQ ID NO: 2) | | 266 (265) (SEQ ID NO: 8 + SEQ ID NO: 3) | |
| S10 | 362 (SEQ ID NO: 1 + SEQ ID NO: 2) | | | |
| S12 | 343/344 (343) (SEQ ID NO: 1 + SEQ ID NO: 2) | | 148/149 (147) (SEQ ID NO: 9 + SEQ ID NO: 3) | |
| S13 | | | 121 (119) (SEQ ID NO: 10 + SEQ ID NO: 3) | |
| S14 | 329/332 (330) (SEQ ID NO: 1 + SEQ ID NO: 2) | | | |
| S16 | 412 (412) (SEQ ID NO: 1 + SEQ ID NO: 2) | | | |

| S-alela | Barva fragmentu při fragmentační analýze | | | |
|------------|---|-------------|--|-------------|
| | Modrá (FAM) | Modrá (FAM) | Modrá (FAM) | Černá (NED) |
| S22 | 420 (421) (SEQ ID NO: 1 + SEQ ID NO: 2) | | Červená (PET) 253/260 (258) (SEQ ID NO: 8 + SEQ ID NO: 3) | |
| S23 | 329 (SEQ ID NO: 1 + SEQ ID NO: 2) | | | |
| S24 | 420 (SEQ ID NO: 1 + SEQ ID NO: 2) | | 224 (SEQ ID NO: 6 + SEQ ID NO: 3) | |
| S25 | 373 (373) (SEQ ID NO: 1 + SEQ ID NO: 2) | | | |
| S28 | 366 (SEQ ID NO: 1 + SEQ ID NO: 2) | | | |
| S30 | 383 (SEQ ID NO: 1 + SEQ ID NO: 2) | | | |
| S31 | 206 (SEQ ID NO: 1 + SEQ ID NO: 2) | | | |
| S34 | 376 (SEQ ID NO: 1 + SEQ ID NO: 2) | | | |
| S38 | 308 (SEQ ID NO: 1 + SEQ ID NO: 2) | | | |

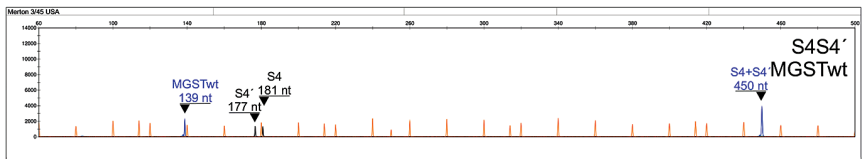
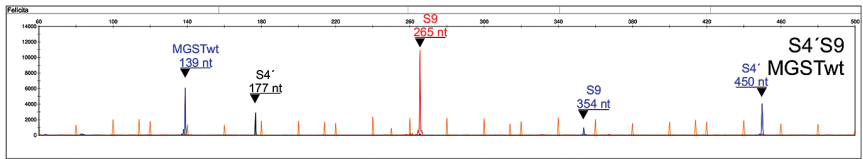
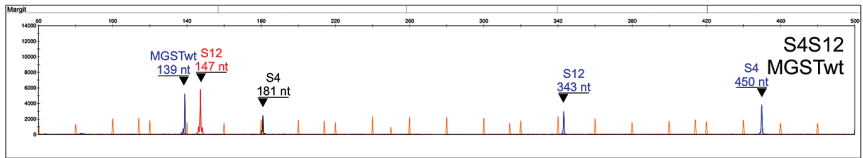
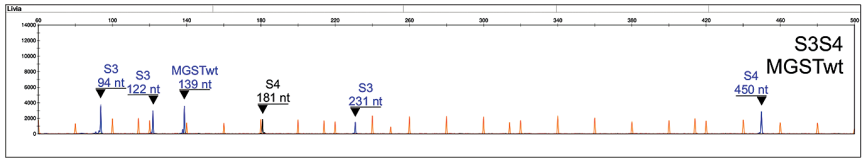
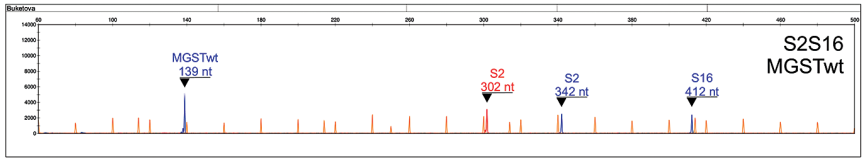
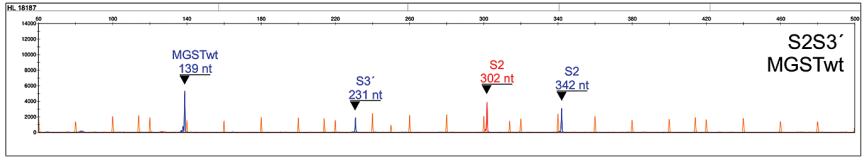
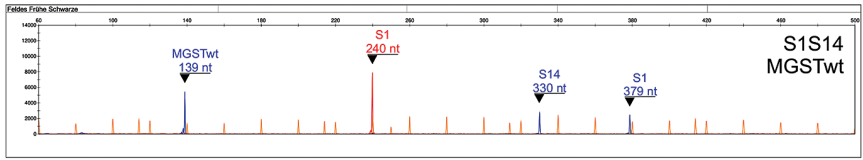
Tabulka 3. Vyhodnocení fragmentačních analýz pro promotor MGST. Délky jednotlivých amplifikovaných fragmentů jsou uvedeny v nukleotidech, v závorce uvedeny primery použité pro amplifikaci příslušného fragmentu (forward + reverse). *Délky alel kurzívou*: předpokládané délky podle analýzy referenčních sekvencí v databázi GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>), popřípadě dle vlastního sekvenování. **Délky alel tučným písmem**: délky stanovené při fragmentační analýze dle výše uvedeného postupu.

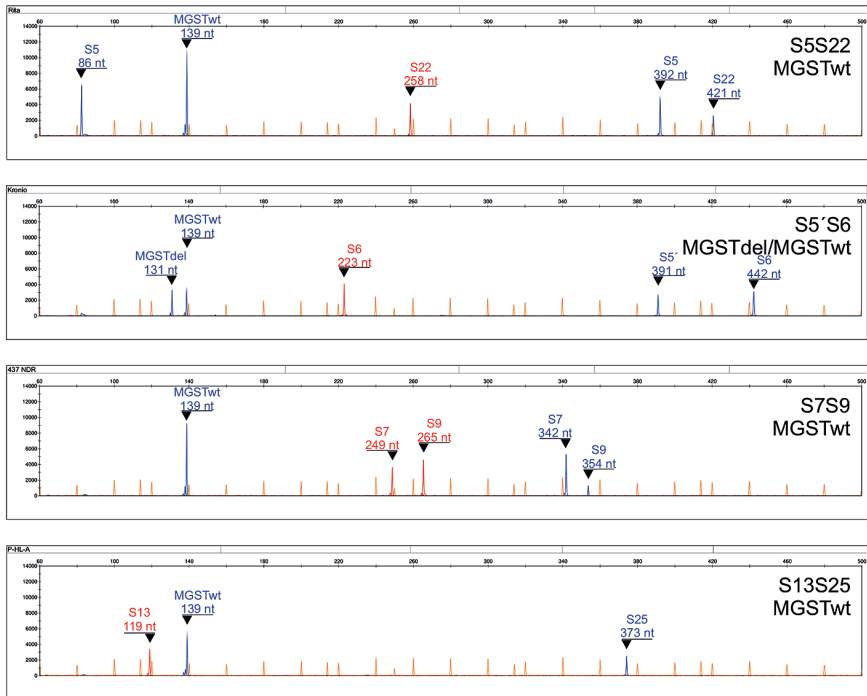
| Alela promotoru MGST | Barva fragmentu při fragmentační analýze: modrá (FAM) |
|----------------------|--|
| MGSTins | <i>191 (197)</i> (SEQ ID NO: 20 + SEQ ID NO: 19) |
| MGSTwt | <i>145 (139)</i> (SEQ ID NO: 21 + SEQ ID NO: 19) |
| MGSTdel | <i>137 (131)</i> (SEQ ID NO: 21 + SEQ ID NO: 19) |

Výsledky analýzy genofondové sbírky a vybraných genotypů šlechtitelské kolekce Výzkumného a šlechtitelského ústavu ovocnářského Holovousy, s.r.o. jsou uvedeny v Příloze 1.

3.4.1 Příklady vyhodnocení S-alel

Jelikož je třešeň ptačí (*Prunus avium* L.) primárně cizosprašný diploidní organizmus, očekává se identifikace dvou odlišných S-alel s tím, že v případě homozygotně samosprašných odrůd mohou být obě alely stejné, a identifikace až dvou různých alel promotoru MGST. Ukázky fragmentačních analýz pro všechny identifikované S-alely, respektive alely promotoru MGST nalezené v genofondových sbírkách VŠÚO Holovousy jsou uvedeny na Obrázku 2.



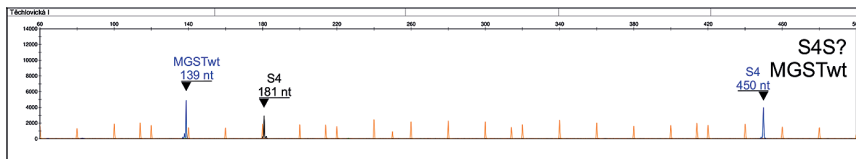


Obrázek 2. Ukázka fragmentační analýzy s různými S-alely/alelymi promotoru MGST

Zvláštní pozornost je třeba věnovat vyhodnocení genotypů s určitými kombinacemi S-alel. Pokud je identifikována pouze jediná S-alela jiná než S3, S3', S4' nebo S5', může se jednat o výskyt nové S-alely, kterou nelze identifikovat navrženou sadou primerů. Pokud je nalezena pouze alela S3, S3', S4' nebo S5', je nutné kromě možnosti nálezu nové alely také počítat s možností, že se může jednat o kombinace S-alel S3S3', S3'S3', S4'S4', případně S5'S5'.

Výskyt S-alely, kterou nelze identifikovat navrženou sadou primerů

U genotypu s označením 'Těchlovická I' byla výstupem z fragmentační analýzy identifikace pouze alely S4 (Obrázek 3). Vzhledem k tomu, že kombinace alel S4S4 by neměla být z genetického hlediska možná, lze očekávat, že druhou S-alelou je S-alela, kterou nelze amplifikovat ani univerzálními primery obklopujícími první intron. Při pokusu o její identifikaci je možné použít primery amplifikující druhý intron S-RNázy, popřípadě intron v 5' UTR SFB genu a případný produkt osekvenovat.

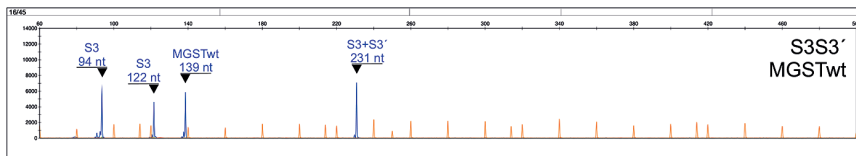


Obrázek 3. Fragmentační analýza u genotypu 'Těchlovická I' pouze s identifikovanou alelou S4

U genotypu s označením 'Těchlovická I' byla následně skutečně identifikována S-alela, která nebyla dosud popsána, a je dále analyzována.

Kombinace alel S3S3'

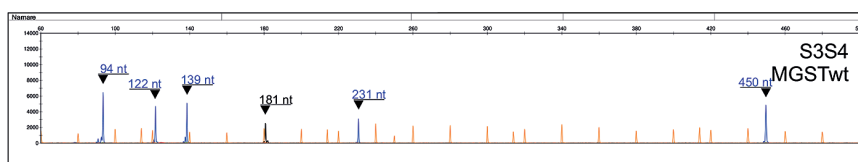
Kombinace alel S3S3' bude na výstupu z fragmentační analýzy vypadat následovně (Obrázek 4a).



Obrázek 4a. Fragmentační analýza u genotypu '16/45' s alelami S3S3'

Na Obrázku 4a lze identifikovat pouze vrcholy charakteristické pro S-alelu S3 a fragment o délce 139 nukleotidů alely MGSTwt. Kombinace alel S3S3 by neměla být z genetického hlediska možná. Může se tedy jednat buď o kombinaci alely S3 s S-alelou, kterou nelze identifikovat navrženou sadou primerů, nebo o kombinaci alel S3S3', neboť alela S3' poskytuje při amplifikaci vrchol o délce 231 nukleotidů stejně jako alela S3 a žádný jiný fragment. Obě tyto možnosti však lze od sebe poměrně snadno odlišit vzhledem k tomu, že výška vrcholu je úměrná množství vstupní DNA pro jeho amplifikaci. V ideálním případě se 100% účinností amplifikace by dvojnásobné množství vstupní DNA znamenalo dvakrát vyšší signál amplifikovaného fragmentu. Ve výše uvedeném případě se fragmenty o délce 94 a 122 nukleotidů amplifikují pouze u alely S3. Oproti tomu fragment o délce 231 nukleotidů se bude amplifikovat u alely S3 i S3'.

Pokud by tedy daný genotyp obsahoval pouze alelu S3, bude výška vrcholu o délce 231 nukleotidů přibližně dvakrát nižší, než by tomu bylo při současné amplifikaci alel S3 a S3' v téměř vzorku. Pro porovnání různých vzorků však nelze pracovat s absolutní výší signálu fragmentu o délce 231 nukleotidů, jelikož je tato výše dána množstvím DNA vstupujícím do reakce, popřípadě dalšími faktory ovlivňujícími celkovou amplifikovatelnost DNA. S výhodou však lze využít poměr výšek signálů ostatních fragmentů ve fragmentační analýze a výšky signálu fragmentu o délce 231 nukleotidů u srovnávacích vzorků obsahujících alelu S3 v kombinaci se známou S-alelou jinou než S3' (viz např. Obrázek 4b).



Obrázek 4b. Fragmentační analýza u odrůdy 'Namare' s alelami S3S4

Již na první pohled je zřejmé, že zatímco na Obrázku 4a je výška všech vrcholů téměř identická, na Obrázku 4b má vrchol fragmentu o délce 231 nukleotidů přibližně poloviční výšku signálu ve srovnání s fragmenty o délce 94 nukleotidů a 122 nukleotidů, které jsou typické pouze pro alelu S3. Následující Tabulka 4 ukazuje výšky signálů a poměr mezi nimi u fragmentů o délce 94, 122 a 231 nukleotidů, které vznikají amplifikací alely S3, respektive S3' (zde pouze 231 nukleotidů). Nezbytným předpokladem pro porovnávání těchto poměrů je však použití stejného premixu primerů použitých pro PCR amplifikaci. Vzhledem k citlivosti fragmentační analýzy by i malá změna koncentrace jednotlivých primerů velmi významně ovlivnila výstup fragmentační analýzy a výsledky by nebyly porovnatelné.

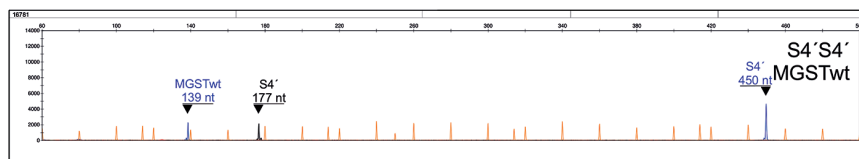
Tabulka 4. Poměry výšek signálů fragmentů o délce 94, 122 a 231 nukleotidů u různých genotypů s alelou S3.

| Genotyp | S-alely | Výšky signálu u jednotlivých fragmentů alely S3 | | | Poměry výšek signálů | | |
|---------------------------|--------------|---|--------|--------|----------------------|-------------|--------|
| | | 94 nt | 122 nt | 231 nt | 231/94 | 231/122 | 94/122 |
| Pivovka | S3S7 | 8267 | 6237 | 4854 | 0,59 | 0,78 | 1,33 |
| Schneiderova | S3S12 | 2838 | 2156 | 1404 | 0,49 | 0,65 | 1,32 |
| 17010 | S3S4' | 2249 | 1505 | 1227 | 0,55 | 0,82 | 1,49 |
| Rossii de Bistrita | S3S9 | 3406 | 2468 | 1696 | 0,50 | 0,69 | 1,38 |
| Grevenbroicher | S3S13 | 3401 | 2543 | 1875 | 0,55 | 0,74 | 1,34 |
| Namare | S3S4 | 6490 | 4709 | 3129 | 0,48 | 0,66 | 1,38 |
| 16/45 | S3S3' | 6810 | 4619 | 7096 | 1,04 | 1,54 | 1,47 |
| Axel | S3S3' | 3819 | 2578 | 3389 | 0,89 | 1,31 | 1,48 |

Jak ukazuje Tabulka 4, poměr mezi výškami signálu fragmentů o délce 94, respektive 122 nukleotidů, a výškou signálu vrcholu o délce 231 nukleotidů není ovlivněn absolutní hodnotou signálu. Z Tabulky 4 je patrné, že u genotypů 'Axel' s dříve známou kombinací alel S3S3' a '16/45' došlo ke zvýšení poměru výšek signálů fragmentů o délce 231/94, respektive 231/122 na zhruba dvojnásobek, zatímco poměr 94/122 zůstal zachován. Je tomu tak proto, že jsou oba tyto fragmenty amplifikovány pouze z jediné S-alely (S3), zatímco fragment o délce 231 nukleotidů se amplifikuje z alely S3 i S3'. Poměry mezi výše uvedenými fragmenty se u jednotlivých kombinací S-alel mírně liší. Účinnost amplifikace jednotlivých fragmentů je totiž ovlivněna dalšími faktory, např. současnou amplifikací ostatních fragmentů v reakci, případnou fragmentací vstupní DNA, přítomností inhibitorů DNA polymerázy v reakci, které mohou upřednostňovat syntézu kratších fragmentů, a dalšími.

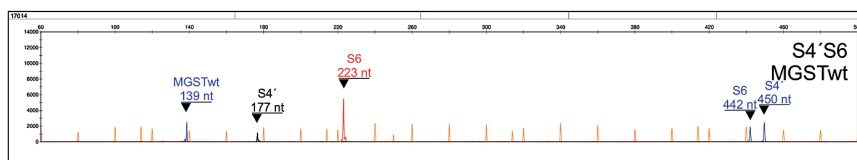
Kombinace dvou stejných samosprašných S-alel

U genotypů s kombinací dvou stejných samosprašných S-alel (S3'S3', S4'S4', respektive S5'S5') budou při fragmentační analýze identifikovány fragmenty odpovídající jedinému typu S-alely, viz Obrázek 5a pro kombinaci alel S4'S4'.



Obrázek 5a. Fragmentační analýza genotypu '16781' s alelami S4'S4'

I v tomto případě lze pro identifikaci, že se jedná o kombinaci dvou stejných samosprašných S-alel a nikoliv o kombinaci samosprašné S-alely s S-alelou, kterou nelze identifikovat uvedenou sadou primerů, využít poměry výšek signálů fragmentů amplifikovaných v reakci obdobně jako při identifikaci kombinace S3S3'. Zde bude nezbytné použít jako kontrolní fragment, ke kterému bude výška signálu fragmentu specifického pro samosprašnou S-alelu poměřována, fragment vznikající amplifikací promotoru MGST, obvykle MGSTwt. Pro porovnání je třeba vybrat odrůdy s alelou S4' a jakoukoliv jinou identifikovanou S-alelou, u kterých se předpokládá přítomnost stejného počtu alel MGSTwt (viz dále). V uvedeném příkladu lze využít poměry signálů fragmentů o délce 177 a 450 nukleotidů vznikajících amplifikací alely S4' vůči signálu fragmentu o délce 139 nukleotidů (MGSTwt). Jejich poměr by měl být přibližně dvojnásobný oproti poměru získanému při amplifikaci odrůdy pouze s jedinou samosprašnou alelou S4' (viz Obrázek 5b).



Obrázek 5b. Fragmentační analýza genotypu '17014' s alelami S4'S6

Tabulka 5. Poměry výšek signálů fragmentů o délce 139, 177 a 450 nukleotidů u různých genotypů s alelou S4'.

| Genotyp | S-alely | Výšky signálu u jednotlivých fragmentů | | | Poměry výšek signálů | | |
|------------|---------|--|--------------|--------------|----------------------|-------------|---------|
| | | 139 nt (MGSTwt) | 177 nt (S4') | 450 nt (S4') | 177/139 | 450/139 | 177/450 |
| Lapins | S1S4' | 1342 | 588 | 1328 | 0,44 | 0,99 | 0,44 |
| Grace Star | S4'S9 | 5929 | 2800 | 5948 | 0,47 | 1,00 | 0,47 |
| 16689 | S4'S6 | 842 | 353 | 817 | 0,42 | 0,97 | 0,43 |
| 16948 | S2S4' | 2211 | 1015 | 2375 | 0,46 | 1,07 | 0,43 |
| 17010 | S3S4' | 2070 | 905 | 1946 | 0,44 | 0,94 | 0,47 |
| 17014 | S4'S6 | 2497 | 1160 | 2504 | 0,46 | 1,00 | 0,46 |
| 16781 | S4'S4' | 2299 | 2155 | 4674 | 0,94 | 2,17 | 0,46 |
| 16946 | S4'S4' | 4155 | 4118 | 8529 | 0,99 | 2,05 | 0,48 |

Z Tabulky 5 je zřejmé, že u genotypů '16781' a '16946' došlo ke zvýšení poměru výšek signálů fragmentů o délce 177/139, respektive 450/139 na zhruba dvojnásobek, zatímco poměr 177/450 zůstal zachován.

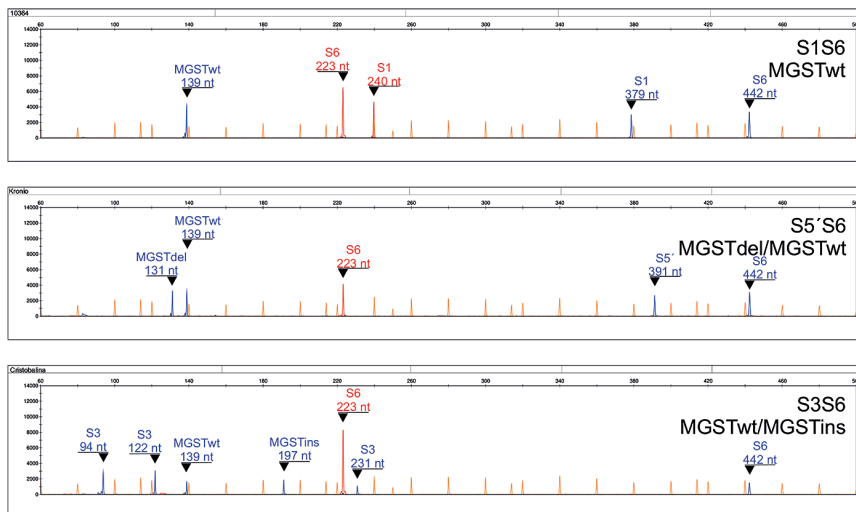
Analogicky by se postupovalo i při identifikaci genotypů S3'S3' a S5'S5', kdy lze v případě genotypu S3'S3' použít poměr výšek signálů fragmentu o délce 231 nukleotidů specifického pro S3 i S3' a fragmentu specifického pro alelu promotoru MGST. V případě genotypu S5'S5' lze použít poměr výšek signálů fragmentu o délce 391 nukleotidů specifického pro alelu S5' a fragmentu specifického pro alelu promotoru MGST. Genotypy S3'S3' a S5'S5' však nebyly pro analýzu k dispozici.

Ve všech případech genotypů se dvěma stejnými samosprašnými S-alelami je třeba použít jako kontrolu odrůdy se stejnou samosprašnou alelou a jakoukoliv jinou identifikovanou S-alelou (kromě kombinace S3S3'), u kterých se předpokládá přítomnost stejného počtu alel porovnávané alely MGST. Případně je možné do fragmentační analýzy zařadit jakýkoliv jiný referenční gen místo MGST. Ani zde však není jisté, kolik kopií alely daného kontrolního genu jednotlivé genotypy ve skutečnosti obsahují. Z tohoto důvodu se doporučuje používat více kontrolních odrůd a kontrolní odrůdu s případnými zjevnými diskrepancemi z analýzy vyloučit. Mohla by totiž obsahovat jiný počet dané alely kontrolního genu než analyzovaný vzorek. Analýza všech poměrů opět vychází z předpokladu, že byl pro analýzu porovnávaných vzorků využit stejný premix primerů.

3.4.2 Příklady vyhodnocení alel promotoru MGST

Hlavním důvodem pro zařazení analýzy promotoru MGST do navržené sady primerů je identifikace alely promotoru MGST s inzercí sekvence podobné transpozónu (MGSTins) zodpovědné za alespoň částečnou samosprašnost třešní (Ono K, 2018) s délkou amplifikovaného fragmentu 197 nukleotidů. Pokud nejsou identifikovány dvě různé alely promotoru MGST, předpokládá se, že daný genotyp nese dvě shodné alely. I když samozřejmě nelze vyloučit přítomnost jiných alel MGST promotoru, které není možné amplifikovat navrženou sadou primerů, jejich výskyt není na základě publikované literatury očekáván. Z důvodu korektnosti je však na výstupech z fragmentačních analýz uváděno pouze MGSTwt a nikoliv MGSTwt/MGSTwt. U odrůdy 'Kronio' byla identifikována zcela nová alela s delecí 8 nukleotidů (označovaná zde MGSTdel) oproti

přirozeně se vyskytující sekvenci MGSTwt. Význam této delece pro mechanismus opylení však není zřejmý, jelikož je tato odrůda samosprašná z důvodu přítomnosti samosprašné alely S5' a potomci této odrůdy, kteří by měli přítomnou pouze alelu MGSTdel a nikoliv S5', nebyli pro testy samosprašnosti k dispozici. Ukázka výstupů z fragmentačních analýz odrůd s různými alelami promotoru MGST je uvedena na Obrázku 6.



Obrázek 6. Fragmentační analýza genotypu '10364' a odrůd 'Kronio' a 'Cristobalina', které obsahují různé alely promotoru MGST.

3.5 Ověření opylovacích poměrů v polních podmínkách

Pro otestování opylovacích poměrů dvou odrůd je nejdříve nutné získat pyl z genotypu třešně, kterým bude opylován mateřský strom. Začíná se tedy odběrem větví ve fenofázi uzavřených květů BBCH 55 (stádia květů jsou uvedena podle Meier U, 1994) ze stromů a jejich přenesením do vnitřních podmínek s řízenou teplotou. Zde se nechají nakvést do stádia BBCH 57-59, kdy jsou květy stále ještě uzavřené. V tomto stádiu se květy odeberou z větví a mechanicky se z nich vyjmou prašníky. Ty se uloží do prodyšných izolačních obalů a vysuší buď v sušičce, nebo působením jiného zdroje tepla. Teplota sušení by měla být v rozmezí 30 až 40 °C. Doba sušení závisí na množství prašníků, obvykle se pohybuje kolem 48 hodin. Po sušení se prašníky rozdrtí v hmoždíři a sesypou do hermeticky uzavíratelné nádoby a uloží do -20 °C.

Větve mateřského stromu s neotevřenými květy ve vývojovém stádiu BBCH 57 je nutné pečlivě zaizolovat prodyšnou textilií tak, aby byl zcela zamezen přístup hmyzu a jiných vektorů, kteří by mateřské květy kontaminovali nežádoucím pylem. K samotné zkoušce vzájemné kompatibility, tedy k opylení, se přistupuje ve fázi plného kvetení BBCH 65 mateřského stromu. Před samotným opylením se přenese pyl do mikrozkušavky s objemem 2 ml, z které bude pyl nanášen na blizny mateřských květů. Pro opylování se použije dřevěná tyčinka s pryžovou hadičkou nasazenou na jednom konci. Před odstraněním ochranné textilie z izolovaných větví si osoba provádějící opylení vydezinfikuje ruce etanolem a před samotným opylováním dezinfekci zopakuje. Opylení se provede ponořením pryžové části tyčinky do mikrozkušavky s pylem a přenesením pylu na rozkvetlé květy mateřského stromu s odhalenými bliznami. Pryžová část s ulpěným pylem se jemně otfře o bliznu tak, aby nedošlo k poškození pestíku. Během opylování se počítají opylené květy a konečný počet se zaeviduje. Doporučovaný minimální počet opylených květů je 150. Po opylení se větve opět zaizolují ochranou textilií, aby se zabránilo kontaminaci nežádoucím pylem. V případě, že došlo k oplození, se začnou z opylených květů vyvíjet plůdky. Izolační textilie se odstraní ve fázi BBCH 71-72, kdy už jsou viditelné zelené plůdky. Zralé plody ve vývojové fázi BBCH 87 se sklídí a zaznamená se jejich počet. Následně se vypočte úspěšnost oplození podle vzorce: $(SP/KV) \cdot 100$, kde SP je počet sklizených zralých plodů a KV znamená počet opylených květů.

Výše uvedený postup se použije jak pro ověřování cizosprašnosti mezi dvěma různými odrůdami, tak pro testy míry samosprašnosti u genotypů s předpokladem samosprašnosti.

V první řadě je účinnost oplození ovlivněna typem S-alel rodičů. Při ověřování inkompatibilitu u 14 kombinací odrůd se stejnými S-alelami a promotorem MGST přirozeně se vyskytujícího typu nebyl z celkem 2 100 opylených květů získán žádný plod. Inkompatibilita mezi danými odrůdami tak byla potvrzena, nebyla pozorována přítomnost jiného mechanismu umožňujícího sprášení (jako např. u alely MGSTins). U 10 kombinací cizosprašných odrůd s různými S-alelami a promotorem MGST přirozeně se vyskytujícího typu bylo dosaženo účinnosti oplození 0,5 až 14 %. Jak ukazuje Tabulka 6, u 8 různých genotypů s identifikovanou samosprašnou alelou S4' a promotorem MGST přirozeně se vyskytujícího typu bylo dosaženo účinnosti samosprašení od 7,1 do 40,8 %.

Tabulka 6. Ověřování samosprašnosti nových genotypů třešní

| Genotyp | S-alely | Opyleno květů (ks) | Sklizeno plodů (ks) | Účinnost oplození (%) |
|----------|---------|--------------------|---------------------|-----------------------|
| 16865 | S4'S6 | 49 | 20 | 40,8 |
| 16695 | S4'S6 | 82 | 31 | 37,8 |
| VČ 22/19 | S3S4' | 105 | 36 | 34,3 |
| 16649 | S4'S6 | 122 | 40 | 32,8 |
| 16686 | S4'S6 | 95 | 11 | 11,6 |
| VČ 22/27 | S1S4' | 170 | 18 | 10,6 |
| 14613 | S4'S9 | 138 | 10 | 7,2 |
| VČ 23/69 | S2S4' | 112 | 8 | 7,1 |

Účinnost opylení a následného oplození je však vždy třeba sledovat několik let, aby byl omezen vliv biotických a abiotických faktorů, které mohou velmi významně ovlivnit výsledný počet sklizených plodů. Za dostatečnou je považována minimálně 10% účinnost oplození (Skřivanová A, 2015), ať již se jedná o samooplození, nebo oplození cizím pylovým zrnem. Velmi vysoká procenta oplození však také nejsou zcela žádoucí, neboť může docházet k takzvanému přeplozování a zdrobnění plodů. Pokud daný genotyp vykazuje známky možného přeplozování, je vhodná probírka plodů. Alternativně je v některých případech možné řešit přeplozování volbou vhodnější podnože, v případě cizosprašných odrůd i výběrem jiného opylovače.

4. Srovnání novosti postupů

Pro analýzu S-alel je v současném stavu techniky používáno mnoho přístupů. Žádný z nich však neumožňuje identifikaci všech nejčastěji se vyskytujících S-alel/alel promotoru MGST v jediné multiplexní reakci. Ve většině dosavadních postupů jsou pro amplifikaci v prvním kroku obvykle používány univerzální primery amplifikující první intron S-RNázy a jeho okolí. Některé S-alely však dávají při amplifikaci s těmito primery délkově shodné fragmenty. Tyto S-alely je pak třeba dourčit, a to zpravidla další PCR amplifikací s primery specifickými pro jednotlivé S-alely. Některé laboratoře pak rovnou využívají alelicky specifické primery. To však není vhodný přístup při analýze

genotypů se zcela neznámým S-alelickým složením. I v případě, že jsou možné S-alely předpokládány, např. jsou při křížení známy S-alely obou rodičů, nelze vyloučit volné sprášení místo cíleného křížení a dourčení S-alel pak může být velmi pracné. O analýze promotoru MGST genu existuje jediná publikace (Ono K, 2018), která identifikuje příčinnou inzerci zodpovědnou za alespoň částečnou samosprašnost třešňi. Rutinní diagnostika tohoto lokusu není v příslušné publikaci řešena.

Postup popsaný v této metodice je tak zcela unikátní v tom, že dokáže v jediné multiplexní reakci identifikovat všechny nejčastěji se vyskytující S-alely/alely promotoru MGST, a to včetně samosprašných S-alel. Umožňuje tak velmi rychlou a nenáročnou identifikaci genotypu třešně z pohledu cizosprašnosti/samosprašnosti bez ohledu na původ analyzovaného genotypu.

5. Popis uplatnění metodiky

Vzhledem ke stanovení molekulární podstaty cizosprašnosti/samosprašnosti v jediné reakci je tato metodika vhodná při každé analýze S-alel/alel promotoru MGST třešňi. Její výhody se uplatní zejména při velkokapacitním použití. Je totiž aplikovatelná pro tzv. molekulárními markery asistované šlechtění (MAS), např. při selekci genotypů pocházejících ze šlechtění zaměřeného na produkci samosprašných odrůd třešňi, kdy umožňuje vyselektovat perspektivní samosprašné semenáče již po několika týdnech růstu. Bez molekulárních analýz je třeba veškeré potomstvo obsahující i nežádoucí cizosprašné genotypy udržovat ve výsadbě po dobu cca 6 let a více, kdy je teprve možné provést polní zkoušky samosprašnosti založené na fenotypu. Takto raná selekce šlechtitelského materiálu přináší nemalé finanční úspory díky tomu, že šetří práci, materiál i prostor, které jsou nezbytné pro pěstování semenáčů třešňi. S-alely je však důležité stanovit i u cizosprašných třešňi z důvodu výběru vhodných opylovacích odrůd, a to jak pro účely šlechtění, tak pro komerční produkci třešňi.

Vzhledem k výše popsanému možnému využití je tato metodika určena zejména šlechtitelům pro rutinní stanovování molekulární podstaty cizosprašnosti/samosprašnosti, popřípadě pro komerční pěstitele třešňi pro stanovení opylovacích poměrů. Dále je tato metodika využitelná pro stanovení S-alel/alel promotoru MGST jako součást charakterizace genotypů třešňi v evropských i světových genofondových sbírkách.

6. Ekonomické aspekty

Ekonomické aspekty aplikace metodiky stanovení S-alel/alel promotoru MGST v jediné reakci do praxe lze rozdělit dle předpokládané rychlosti zavedení na ty s brzkým efektem a na ty s efektem pozdějším.

Zavedení této metodiky do praxe může mít okamžité ekonomické dopady do čtyř oblastí – 1) úspora materiálových nákladů a času v laboratořích, které se stanovení S-alel/alel promotoru MGST věnují; 2) výnosy z prodeje již předpřipravených souprav pro určování S-alel/alel promotoru MGST; 3) výnosy z laboratorního stanovení S-alel/alel promotoru MGST prováděných na zakázku; a 4) úspory ve šlechtitelských programech, neboť nebude nutné stanovovat S-alely/alely promotoru MGST pomocí polních pokusů.

Doposud neexistuje žádná jiná metodika, pomocí které by bylo možné stanovit S-alely, včetně všech samosprašných S-alel, a současně také alely promotoru MGST v jediné reakci. Existuje mnoho separátních metod pro stanovení každé komponenty zvlášť. Cena za takovéto stanovení se může pohybovat v tisících korun a délka analytického procesu může přesáhnout při analýze zcela neznámých genotypů týden i více podle kombinace S-alel/alel promotoru MGST a dle způsobu jejich detekce (viz kapitola 3. Srovnání novosti postupů). Čistě materiálové náklady na provedení navrhované metodiky se pohybují okolo 150 Kč/genotyp, nemluvě o úspoře času, který může laboratoř věnovat jiným aktivitám, protože analýza trvá jen jeden den.

Metodika sice velmi podrobně popisuje postup stanovení S-alel/alel promotoru MGST včetně použitých reagensů, lze však předpokládat, že někteří uživatelé metodiky budou chtít raději využít již předmíchaných sad primerů pro jejich detekci. Výnos z prodeje těchto sad pak bude příjmem pro VŠÚO Holovousy. Předpokládá se cena v rozmezí 8 000 až 10 000 Kč za ověřenou předmíchanou sadu primerů včetně kontrolních DNA pro jednotlivé S-alely/alely MGST vystačující pro analýzu 100 vzorků DNA, v závislosti na odebraném objemu. Další příjem může laboratoř generovat prováděním analýz S-alel/alel promotoru MGST formou služby pro externí zákazníky. Cena za analýzu bude stanovena se zohledněním všech faktorů, které ovlivňují náklady na provedení testu, tedy včetně práce, energie a amortizace využívaných přístrojů, a na základě aktuálního zájmu ze strany zákazníků.

V rámci šlechtitelských programů budou úspory realizovány díky tomu, že bude možné pomocí této metodiky stanovit kombinaci S-alel/alel promotoru MGST a potenciál samosprašnosti již ve fázi malého semenáčku. Odpadne tak několikaleté pěstování neperspektivních genotypů a polní pokusy, které jsou jinak nutné ke stanovení inkompatibilní skupiny či samosprašnosti. Při využití této metodiky ve srovnání s klasickým postupem zjišťování podmínek opylovacích poměrů se odhaduje úspora v řádech stovek tisíc korun ročně na materiálních a hlavně personálních nákladech při provedení selekce na pěti stech kusech semenáčků ročně ve spojení s hledáním samosprašných jedinců. Materiální náklady zahrnují snížení nákladů pro dopěstování semenáčků ve skleníku (substrát, sadbovače, hnojivo, přípravky na ochranu rostlin, odpisy budovy skleníku aj.), dopěstování výsadbového materiálu v ovocné školce (podnože, hnojivo, vyvazovací materiál a pomůcky, přípravky na ochranu rostlin, amortizace mechanizace potřebné k údržbě ovocné školky atd.) a výsadbu a pěstování genotypů na trvalém stanovišti selekčního sadu (opěrná konstrukce sadu, hnojivo, přípravky na ochranu rostlin, nářadí pro provedení řezu, amortizace mechanizace potřebné k údržbě sadu aj.). Personální náklady jsou dány náročnou údržbou a provedením všech prací spojených s kultivací a evidencí semenáčků do fáze plodnosti. Dále zahrnují provedení opakovaných opylovacích testů (přibližně 10 let kultivace každého ročníku semenáčků) a také prací spojených s odborným vyhodnocením opylovacích testů a následným provedením selekce. Nedílnou součástí jsou i náklady na likvidaci desetiletého porostu sadu genotypů po provedené selekci.

Ekonomické aspekty s dlouhotrvajícím efektem jsou především ve využití metod k vyšlechtění nových odrůd třešní se žádanou kombinací S-alel či samosprašné odrůdy.

Šlechtitelský program třešní VŠÚO Holovousy, s. r. o. je v současnosti považován za světovou špičku ve šlechtění třešní, což potvrzují zájemci o pěstování třešní z řad velkých světových komerčních korporací obchodujících s třešněmi. Jedinečnost šlechtitelského programu lze spatřit i v samotném umístění šlechtitelské stanice. Nachází se v oblasti na pomezí výskytu přímořského a kontinentálního klimatu. Selektované odrůdy tak mají potenciál výborně se vyrovnat s různými a značně rozdílnými klimatickými podmínkami pěstitelských stanovišť. Šlechtění ovocných druhů jako zástupců plodin tzv. trvalých kultur je značně zdlouhavý proces, kdy k registraci nové odrůdy dochází průměrně po 25 letech od zahájení činnosti a dalších minimálně 10 let trvá, než se odrůda prosadí na trhu. Z tohoto důvodu je značnou výhodou více než padesátiletá nepřerušená šlechtitelská činnost VŠÚO Holovousy. Molekulární biologie umožní efektivně zrychlit

šlechtění a rychleji se tak přizpůsobit např. změnám klimatu, poptávce zákazníků, rezistencím na choroby, problémům s opylovači, zajištění samosprašnosti odrůdy apod.

Odrůdy třešni VŠÚO Holovousy se proslavily především prostřednictvím dokončení selekce a registrací odrůdy 'Kordia' a vyšlechtěním odrůdy 'Tamara'. Odrůda 'Kordia' se od své registrace v ČSSR v roce 1981 stala světově uznávanou standardní odrůdou pěstovanou v mnohamilionových partiích stromků a setkala se s vysokou oblibou u konzumentů ovoce. Odrůda 'Tamara' registrovaná v ČR v roce 2015 začíná zaujímat významnou pozornost pěstitelů třešni ve světě, má udělenou právní ochranu v EU, Švýcarsku, USA, Austrálii a bylo požádáno o právní ochranu i v Chile a Číně. Její množení je v současnosti v desítkách tisíc stromků ročně s exponenciálním růstem produkce stromků i ovoce. To dokazuje, že VŠÚO Holovousy je schopen úspěšně komercializovat výsledky svého šlechtitelského programu a zejména zaměření jedné části šlechtitelského programu na samosprašné třešně je do budoucnosti velmi progresivním krokem.

Ekonomickým efektem v případě vyšlechtění nových samosprašných odrůd nebo odrůd se specifickými S-alelami jsou licenční poplatky za využití právně chráněných odrůd. Licenční poplatky lze v tomto případě realizovat jako paušální částku za prodaný stromek odrůdy anebo za část tržeb z prodaného ovoce z nově vyšlechtěné odrůdy. Volba typu licenčního poplatku a jeho výše se stanovuje smluvně a má svá specifika vzhledem k oblasti pěstování na světě. Reálným předpokladem je vyšlechtění jedné nové odrůdy třešně s potenciálem celosvětového úspěchu za deset let. Volba licenčního poplatku podporujícího množení odrůdy bude vzhledem k současnému stavu cen zvolena na reálné průměrné úrovni 1 EUR, tj. 26 Kč za prodaný stromek. Doba platby licenčních poplatků je průměrně 25 let od udělení ochranných práv k odrůdě. Počet rozmnožených stromů od odrůdy stoupá v prvních letech exponenciálně a po deseti letech pak zpravidla lineární měrou. Na základě množení odrůd třešni 'Tamara' (komercializace od roku 2011) a 'Irena' (komercializace od roku 2016) lze usoudit na množství prodaných stromů. Odrůda 'Tamara' dosáhla množení po osmi letech komercializace počtu přes 45 tis. kusů za rok. Odrůda třešně 'Irena' dosáhla množení po třech letech komercializace počtu přes 12 tis. kusů za rok. V prvních deseti letech lze tedy u nové odrůdy předpokládat množení průměrně v řádech 12,5 tis. kusů ročně, v dalších patnácti letech pak vzrostou na průměrnou hodnotu 60 tis. kusů ročně. Pro výpočet lze počítat s rozmnožením 1 milionu stromků za dobu 25 let. Ekonomický potenciál při vyšlechtění nové odrůdy i s využitím této metodiky lze tedy odhadnout na 26 milionů korun při uvažování současných cen.

7. Seznam použité související literatury

- Bonin A, Bellemain E, Bronken Eidesen P, Pompanon F, Brochmann C, Taberlet P (2004) How to track and assess genotyping errors in population genetics studies. *Mol Ecol.* 13(11): 3261–73
- Bošković R, Tobutt KR (1996) Correlation of stilar ribonuclease zymograms with incompatibility alleles in sweet cherry. *Euphytica* 90(2): 245–250
- Brant BA, Granger R, Witherspoon J, Collins GG (1999) Identification of pollen donors for the sweet cherry cultivars ‘Stella’ and ‘Summit’ by isozyme analysis. *Austral. J. Exp. Agric.* 39(4): 473–477
- Cachi AM, Wünsch A (2011) Characterization and mapping of non-S gametophytic self-compatibility in sweet cherry (*Prunus avium* L.). *J Exp Bot.* 62(6): 1847–56
- Crane MB, Brown AG (1937) Incompatibility and sterility in the sweet cherry, *Prunus avium* L. *J. Pomol. Hort. Sci.* 15: 86–116
- De Cuyper B, Sonneveld T, Tobutt KR (2005) Determining self-incompatibility genotypes in Belgian wild cherries. *Mol Ecol.* 14(4): 945–55
- Hedhly A, Hormaza JI, Herrero M (2004) Effect of temperature on pollen tube kinetics and dynamics in sweet cherry, *Prunus avium* (Rosaceae). *Amer. J. Bot.* 91: 558–564.
- Hedhly A, Hormaza JI, Herrero M (2003) The effect of temperature on stigmatic receptivity in sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Plant Cell & Environment.* 26: 1673–1680
- Ikeda K, Watari A, Ushijima K, Yamane H, Hauck NR, Iezzoni AF, Tao R (2004) Molecular Markers for the Self-compatible S4'-haplotype, a Pollen-part Mutant in Sweet Cherry (*Prunus avium* L.) *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 129(5):724–728
- Lewis D, Crowe LK (1954) Structure of the incompatibility gene. *Heredity* 8: 357–363
- Lisek A, Rozpara E, Głowacka A, Kucharska D, Zawadzka M (2015) Identification of S-genotypes of sweet cherry cultivars from Central and Eastern Europe. *Hort. Sci.* 42(1): 13–21
- Marchese A, Bošković RI, Caruso T, Raimondo A, Cutuli M, Tobutt KR (2005) A new self-compatibility haplotype in the sweet cherry ‘Kronio’, S5', attributable to a pollen-part mutation in the SFB gene. *Journal of Experimental Botany* 58 (15-16): 4347–4356

- Matsumoto D, Tao R (2016a) Distinct Self-recognition in the Prunus S-RNase-based Gametophytic Self-incompatibility System. *The Horticulture Journal* 85(4): 289–305
- Matsumoto D, Tao R (2016b) Recognition of a wide-range of S-RNases by S locus F-box like 2, a general-inhibitor candidate in the Prunus-specific S-RNase-based self-incompatibility system. *Plant Mol Biol* 91: 459–469
- Matsumoto D, Tao R (2019) Recognition of S-RNases by an S locus F-box like protein and an S haplotype-specific F-box like protein in the Prunus-specific self-incompatibility system. *Plant Mol Biol.* 100: 367–378
- Meier U, Graf H, Hack H, Hess M, Kennel W, Klose R, Mappes D, Seipp D, Stauss R, Streif J, van den Boom T (1994) Phänologische Entwicklungsstadien des Kernobstes (*Malus domestica* Borkh. und *Pyrus communis* L.), des Steinobstes (Prunus-Arten), der Johannisbeere (*Ribes*-Arten) und der Erdbeere (*Fragaria x ananassa* Duch.). *Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd.* 46, 141–153
- Muñoz-Espinoza C, Espinosa E, Bascuñán R, Tapia S, Meneses C, Almeida A (2017) Development of a molecular marker for self-compatible S4' haplotype in sweet cherry (*Prunus avium* L.) using high-resolution melting. *Plant Breeding.* 136: 987–993
- Ono K, Akagi T, Morimoto T, Wunsch A, Tao R (2018) Genome Re-Sequencing of Diverse Sweet Cherry (*Prunus avium*) Individuals Reveals a Modifier Gene Mutation Conferring Pollen-Part Self-Compatibility. *Plant Cell Physiol.* 59(6): 1265–1275
- Schuster M (2012) Incompatible (S-)genotypes of sweet cherry cultivars (*Prunus avium* L.). *Sci. Hortic.* 148: 59–73
- Schuster M (2017) Self-incompatibility (S) genotypes of cultivated sweet cherries – An overview 2017. In: *OpenAgrar-Repositoryum*. DOI: 10.5073/20171213–111734
- Skřivanová A, Blažková J (2015) Opylovací poměry vybraných odrůd třešní. *Vědecké práce ovocnářské*, 24: 67–72
- Sonneveld T, Robbins TP, Bokviæ R, Tobutt KR (2001) Cloning of six cherry self-incompatibility alleles and development of allele-specific PCR detection. *Theor Appl Genet* 102: 1046–1055
- Sonneveld T, Tobutt KR, Robbins TP (2003) Allele-specific PCR detection of sweet cherry self-incompatibility (S) alleles S1 to S16 using consensus and allele-specific primers. *Theor Appl Genet.* 107(6): 1059–70

- Sonneveld T, Tobutt KR, Vaughan SP, Robbins TP (2005) Loss of pollen-S function in two self-compatible selections of *Prunus avium* is associated with deletion/mutation of an S haplotype-specific F-box gene. *Plant Cell*. 17(1): 37–51
- Sonneveld T, Robbins TP, Tobutt KR (2006) Improved discrimination of self-incompatibility S-RNase alleles in cherry and high throughput genotyping by automated sizing of first intron polymerase chain reaction products. *Plant Breeding* 125(3): 305–307
- Stösser R, Anvari SF (1983) Pollen tube growth and fruit set as influenced by senescence of stigma, style and ovules. *Acta Hort.* 139: 13–22
- Szikriszt B, Doğan A, Ercisli S, Akcay ME, Hegedüs A, Halász J (2013) Molecular typing of the self-incompatibility locus of Turkish sweet cherry genotypes reflects phylogenetic relationships among cherries and other *Prunus* species. *Tree Genetics and Genomes*, 9(1): 155–165
- Roversi A, Ughini V (1998) How long should the period for a successful pollination of sweet cherry be? *Acta Hort.* 468: 615–620
- Tao R, Iezzoni AF (2010) The S-RNase-based gametophytic self-incompatibility system in *Prunus* exhibits distinct genetic and molecular features. *Sci. Hort.* 124: 423–433
- Ushijima K, Sassa H, Dandekar AM, Gradziel TM, Tao R, Hirano H (2003) Structural and Transcriptional Analysis of the Self-Incompatibility Locus of Almond: Identification of a Pollen-Expressed F-Box Gene with Haplotype-Specific Polymorphism. *Plant Cell* 15(3): 771–81
- Vaughan SP, Russell K, Sargent DJ, Tobutt KR (2006) Isolation of S-locus F-box alleles in *Prunus avium* and their application in a novel method to determine self-incompatibility genotype. *Theor Appl Genet*. 112(5): 856–66
- Vittrup CJ (1996) Flowering period of 175 sweet cherry cultivars with regard to cross pollination possibilities. *Acta Hort.* 423: 39–48
- Wünsch A, Hormaza JI (2004) Cloning and characterization of genomic DNA sequences of four self-incompatibility alleles in sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Theor Appl Genet*. 108(2): 299–305
- Yamane H, Ikeda K, Ushijima K, Sassa H, Tao R (2003) A pollen-expressed gene for a novel protein with an F-box motif that is very tightly linked to a gene for S-RNase in two species of cherry, *Prunus cerasus* and *P. avium*. *Plant Cell Physiol*. 44(7): 764–9

8. Seznam publikací, které předcházely metodice

- Čmejlová J, Suran P, Zelený L (2019) Identifikace samosprašných genotypů třešně vyšlechtěných ve VŠÚO Holovousy. Vědecké práce ovocnářské 26: 37–44
- Čmejlová J, Suran P, Paprštejn F, Čmejla R (2020) Sada primerů pro stanovení S-alel a alel promotoru genu MGST u třešně ptačí (*Prunus avium* L.) v jediné reakci. Přihláška užitého vzoru č. PUV 2020-37953
- Nekvindová V, Žďárská I, Čmejla R, Skřivanová A, Suran P (2018) Stanovení opylovacích poměrů genotypů třešně pomocí S-alel. Úroda: 163–166
- Paprštejn F, Patzak J, Sedlák J, Henychová A (2018) Certifikovaná metodika hodnocení genofondu třešně s využitím molekulárně genetických metod. ISBN: 978-80-87030-62-2
- Patzak J, Henychová A, Paprštejn F, Sedlák J (2019) Molecular S-genotyping of sweet cherry (*Prunus avium* L.) genetic resources. Hort. Sci. (Prague), 46: 146–152
- Patzak J, Henychová A, Paprštejn F, Sedlák J (2020) Evaluation of S-incompatibility locus, genetic diversity and structure of sweet cherry (*Prunus avium* L.) genetic resources by molecular methods and phenotypic characteristics, The Journal of Horticultural Science and Biotechnology, 95:1, 84–92
- Skřivanová A, Blažková J (2015) Opylovací poměry vybraných odrůd třešně. Vědecké práce ovocnářské 24: 67–72
- Skřivanová A, Suran P, Zelený L, Vejražka K (2019) Čmelák jako vektor pylu při řízeném opylení třešně. In: Osivo a sadba: XIV. Národní odborný a vědecký seminář. Praha: Česká zemědělská univerzita, s. 251–257. ISBN 978-80-213-2922-5

Poděkování

Poděkování patří Lence Křivohlávkové a Lence Tůmové za vynikající technickou práci v laboratoři, Petře Chudobové, Martině Rejlové, Lucii Westfálové a Lucii Drbohlavové za odběr vzorků.

9. Přílohy

Příloha 1. S-alely a alely promotoru MGST stanovené u genotypů genofondové sbírky a vybraných genotypů šlechtitelské kolekce udržovaných ve VŠÚO Holovousy (názvy genotypů jsou uvedeny podle databáze GRIN Czech, verze 1.10.3, <https://grinczech.vurv.cz/gringlobal/search.aspx>, popřípadě bez diakritiky).

| Odrůda | S-alela 01 | S-alela 02 | MGST alela 01 | MGST alela 02* |
|-----------|------------|------------|---------------|----------------|
| 7/2 | S5 | S9 | MGSTwt | |
| 1 NDR | S3 | S6 | MGSTwt | |
| 1/23-4 | S3 | S9 | MGSTwt | |
| 1032 NDR | S2 | S3 | MGSTwt | |
| 133-3-13 | S3 | S4 | MGSTwt | |
| 13S-22-8 | S3 | S4' | MGSTwt | |
| 13S-5-22 | S1 | S4' | MGSTwt | |
| 16/45 | S3 | S3' | MGSTwt | |
| 19 NDR | S1 | S13 | MGSTwt | |
| 219 NDR | S1 | S3 | MGSTwt | |
| 24 NDR | S3 | S4 | MGSTwt | |
| 27/74 | S3 | S12 | MGSTwt | |
| 29 NDR | S3 | S12 | MGSTwt | |
| 29/74 | S3 | S12 | MGSTwt | |
| 2D 28-31 | S3 | S4' | MGSTwt | |
| 35 NDR | S3 | S5 | MGSTwt | |
| 4 C 17-31 | S1 | S4 | MGSTwt | |
| 4 NDR | S3 | S9 | MGSTwt | |
| 41/1 | S1 | S3' | MGSTwt | |
| 41/2 | S1 | S3' | MGSTwt | |
| 437 NDR | S7 | S9 | MGSTwt | |
| 45 NDR | S3 | S4 | MGSTwt | |
| 478 NDR | S3 | S9 | MGSTwt | |
| 6/38-3 | S3 | S9 | MGSTwt | |
| 620 NDR | S3 | S9 | MGSTwt | |

| Odrůda | S-alela 01 | S-alela 02 | MGST alela 01 | MGST alela 02* |
|---------------------------|-------------------|-------------------|--------------------------|---------------------------|
| Abesse de Moulins | S1 | S4 | MGSTwt | |
| Abundance | S1 | S3 | MGSTwt | |
| Adelka | S1 | S6 | MGSTwt | |
| Adlerkirsche von Bartschi | S3 | S4 | MGSTwt | |
| Alfa | S1 | S6 | MGSTwt | |
| Allers Spaete | S1 | S5 | MGSTwt | |
| Alma | S1 | S5 | MGSTwt | |
| Amid | S3 | S4 | MGSTwt | |
| Angela | S3 | S4 | MGSTwt | |
| Annabella | S1 | S5 | MGSTwt | |
| Aranka | S1 | S3 | MGSTwt | |
| Asenova rana | S3 | S9 | MGSTwt | |
| Axel | S3 | S3' | MGSTwt | |
| Bada | S2 | S4 | MGSTwt | |
| Badaconska cerna | S3 | S4 | MGSTwt | |
| Badeborner | S3 | S4 | MGSTwt | |
| Baltavarska | S3 | S4 | MGSTwt | |
| Barbara | S3 | S4 | MGSTwt | |
| Basler Adler | S1 | S5 | MGSTwt | |
| Basler Langstieler | S1 | S2 | MGSTwt | |
| Beta | S1 | S5 | MGSTwt | |
| Bianca | S1 | S5 | MGSTwt | |
| Bigareau Oratovskeho | S3 | S4 | MGSTwt | |
| Bigarreau de Schrecken | S1 | S3 | MGSTwt | |
| Bing Cherry | S3 | S4 | MGSTwt | |
| Bladorozova | S4 | S13 | MGSTwt | |
| Blankensburg 39 | S3 | S4 | MGSTwt | |
| Bleyhls Braune | S3 | S5 | MGSTwt | |
| Boambe de Cotnari | S3 | S4 | MGSTwt | |
| Boppardska rana | S3 | S5 | MGSTwt | |

| Odrůda | S-alela 01 | S-alela 02 | MGST alela 01 | MGST alela 02* |
|--------------------------------|-------------------|-------------------|----------------------|-----------------------|
| Branauer | S1 | S5 | MGSTwt | |
| Buetners Spaete Knorpelkirsche | S3 | S4 | MGSTwt | |
| Buketova | S2 | S16 | MGSTwt | |
| Burbank | S1 | S3 | MGSTwt | |
| Burlat | S3 | S9 | MGSTwt | |
| Burlat Spur 69-120-A3 | S3 | S9 | MGSTwt | |
| Cerna | S1 | S6 | MGSTwt | |
| Cerna spicka | S5 | S14 | MGSTwt | |
| Cerna z Horan | S4 | S12 | MGSTwt | |
| Crispin (NY 8182) | S1 | S6 | MGSTwt | |
| Cristimar | S6 | S12 | MGSTwt | |
| Cristobalina | S3 | S6 | MGSTwt | MGSTins |
| Deacon | S2 | S4 | MGSTwt | |
| Debora | S4 | S6 | MGSTwt | |
| Dekanka | S1 | S6 | MGSTwt | |
| Delta | S5 | S6 | MGSTwt | |
| Dneprovka | S6 | S9 | MGSTwt | |
| Doenissenova | S3 | S6 | MGSTwt | |
| Droganova | S1 | S5 | MGSTwt | |
| Durone di Vignola II. | S6 | S13 | MGSTwt | |
| Durone Nero I. | S3 | S13 | MGSTwt | |
| Ebony | S2 | S4 | MGSTwt | |
| Emperor Francis | S3 | S4 | MGSTwt | |
| Erika | S3 | S4 | MGSTwt | |
| Esperens Knorpelkirsche | S3 | S4 | MGSTwt | |
| F 19, 3, 21 | S1 | S4 | MGSTwt | |
| Fabiola | S1 | S6 | MGSTwt | |
| Farnstaedter Schwarze | S3 | S5 | MGSTwt | |
| Faw 1092 | S1 | S4 | MGSTwt | |
| Faw 132.75 | S3 | S4' | MGSTwt | |
| Faw 13444 | S1 | S14 | MGSTwt | |

| Odrůda | S-alela 01 | S-alela 02 | MGST alela 01 | MGST alela 02* |
|------------------------|-------------------|-------------------|--------------------------|---------------------------|
| Faw 1352 | S3 | S5 | MGSTwt | |
| Feldes Fruehe Schwarze | S1 | S14 | MGSTwt | |
| Felicita | S4' | S9 | MGSTwt | |
| Fruehe Meckenheim | S1 | S4 | MGSTwt | |
| Fruehe Rote Knorpel | S2 | S3 | MGSTwt | |
| Gamma | S1 | S6 | MGSTwt | |
| Garnns Bunte | S1 | S3 | MGSTwt | |
| Gaucher | S3 | S5 | MGSTwt | |
| Gaucher | S3 | S5 | MGSTwt | |
| Gehrdener | S3 | S4 | MGSTwt | |
| Gel | S3 | S5 | MGSTwt | |
| Georgia | S1 | S13 | MGSTwt | |
| Germ 3 | S3 | S12 | MGSTwt | |
| Germersdorf 1 | S3 | S12 | MGSTwt | |
| Germersdorfer | S3 | S12 | MGSTwt | |
| Gil Peck | S2 | S3 | MGSTwt | |
| Gimsdon | S3 | S6 | MGSTwt | |
| Gloria | S1 | S13 | MGSTwt | |
| Grace Star | S4' | S9 | MGSTwt | |
| Granat | S3 | S6 | MGSTwt | |
| Grevenbroicher | S3 | S13 | MGSTwt | |
| Grollova chrupka | S3 | S4 | MGSTwt | |
| Groll's Weisse | S1 | S3 | MGSTwt | |
| H 11/4 | S4 | S12 | MGSTwt | |
| H 15/25 | S3 | S13 | MGSTwt | |
| H 15/31 | S4 | S13 | MGSTwt | |
| H 15/36 | S4 | S6 | MGSTwt | |
| H 21/16 | S3 | S5 | MGSTwt | |
| H 21/40 | S1 | S6 | MGSTwt | |
| H 41/15 | S3 | S5 | MGSTwt | |

| Odrůda | S-alela 01 | S-alela 02 | MGST alela 01 | MGST alela 02* |
|--------------------|-------------------|-------------------|--------------------------|---------------------------|
| Halka | S1 | S4' | MGSTwt | |
| Hedelfingenska | S3 | S5 | MGSTwt | |
| Helga | S1 | S3 | MGSTwt | |
| H-III-7-2 | S5 | S12 | MGSTwt | |
| Hildesheim | S1 | S3 | MGSTwt | |
| Holovouska chrupka | S3 | S5 | MGSTwt | |
| Horka | S1 | S6 | MGSTwt | |
| Hudson | S1 | S4 | MGSTwt | |
| Huldra | S3 | S6 | MGSTwt | |
| Charger | S1 | S7 | MGSTwt | |
| Chebros | S2 | S3 | MGSTwt | |
| Chery Self Fer 46 | S1 | S3' | MGSTwt | |
| Chlumecka cerna | S3 | S5 | MGSTwt | |
| Ijunskaja Rannaja | S3 | S9 | MGSTwt | |
| Italia 14 | S13 | S14 | MGSTwt | |
| Italia 2 | S13 | S14 | MGSTwt | |
| Italia 4 | S3 | S5 | MGSTwt | |
| Italia 9 | S3 | S5 | MGSTwt | |
| Jacinta | S3 | S4 | MGSTwt | |
| Jubilee | S1 | S5 | MGSTwt | |
| Justyna | S1 | S3 | MGSTwt | |
| Karesova | S1 | S3 | MGSTwt | |
| Karesova Horicka | S1 | S3 | MGSTwt | |
| Kasandra | S1 | S3 | MGSTwt | |
| Kassins Auslese | S2 | S3 | MGSTwt | |
| Kassins Fruehe | S2 | S3 | MGSTwt | |
| Kastanka | S1 | S2 | MGSTwt | |
| Katalin | S4 | S12 | MGSTwt | |
| Kisinevskaja | S2 | S6 | MGSTwt | |
| Kitajevskaja | S3 | S4 | MGSTwt | |

| Odrůda | S-alela 01 | S-alela 02 | MGST alela 01 | MGST alela 02* |
|-------------------|------------|------------|---------------|----------------|
| Knauff's Schwarze | S2 | S6 | MGSTwt | |
| Konservnaja | S6 | S9 | MGSTwt | |
| Kordia | S3 | S6 | MGSTwt | |
| Korned | S4 | S13 | MGSTwt | |
| Korvik/2/66 | S2 | S6 | MGSTwt | |
| Korvik/2/74 | S3 | S6 | MGSTwt | |
| Kristin | S3 | S4 | MGSTwt | |
| Kronio | S5' | S6 | MGSTwt | MGSTdel |
| Kunces Kirsche | S2 | S4 | MGSTwt | |
| Ladeho pozdni | S1 | S3 | MGSTwt | |
| Ladzanska L-1 | S5 | S13 | MGSTwt | |
| Lambert | S3 | S4 | MGSTwt | |
| Lamida | S1 | S3 | MGSTwt | |
| Lapins | S1 | S4' | MGSTwt | |
| Leopoldova | S2 | S4 | MGSTwt | |
| Libejovicka rana | S4 | S22 | MGSTwt | |
| Linda H-156 | S3 | S12 | MGSTwt | |
| Livia | S3 | S4 | MGSTwt | |
| Lotka Trzebnicka | S2 | S3 | MGSTwt | |
| Lyonska rana | S6 | S9 | MGSTwt | |
| Magda | S1 | S3 | MGSTwt | |
| Mamutka | S2 | S4 | MGSTwt | |
| Margit | S4 | S12 | MGSTwt | |
| Marta | S1 | S3 | MGSTwt | |
| Mednanska | S4 | S5 | MGSTwt | |
| Merchant | S4 | S9 | MGSTwt | |
| Merla | S1 | S6 | MGSTwt | |
| Mermat | S1 | S6 | MGSTwt | |
| Merpel | S3 | S4 | MGSTwt | |
| Merton 11/45 | S3' | S4 | MGSTwt | |
| Merton 3/45 | S4 | S4' | MGSTwt | |

| Odrůda | S-alela 01 | S-alela 02 | MGST alela 01 | MGST alela 02* |
|---------------------------|-------------------|-------------------|--------------------------|---------------------------|
| Merton bigarreau | S1 | S3 | MGSTwt | |
| Merton Bounty | S1 | S3 | MGSTwt | |
| Merton Favourite | S1 | S3 | MGSTwt | |
| Merton Glory | S4 | S6 | MGSTwt | |
| Merton Grane | S1 | S3 | MGSTwt | |
| Merton Heart | S3 | S6 | MGSTwt | |
| Merton Late | S1 | S4 | MGSTwt | |
| Merton Premier | S2 | S3 | MGSTwt | |
| Merton Reward | S1 | S4 | MGSTwt | |
| Mohrenkirsche von Haase | S4 | S14 | MGSTwt | |
| Moldavskaja cernaja | S1 | S6 | MGSTwt | |
| Mona Cherry | S3 | S6 | MGSTwt | |
| Moravska Rychlice | S2 | S3 | MGSTwt | |
| Moreau | S3 | S9 | MGSTwt | |
| Moretta di Cazzano | S3 | S6 | MGSTwt | |
| Moser | S6 | S13 | MGSTwt | |
| Mramorovana chrupka | S1 | S5 | MGSTwt | |
| Muencheberger Fruehernte | S3 | S4 | MGSTwt | |
| Nalina | S3 | S9 | MGSTwt | |
| Namare | S3 | S4 | MGSTwt | |
| Namosa | S3 | S4 | MGSTwt | |
| Nanni | S2 | S4 | MGSTwt | |
| Napoleonova | S3 | S4 | MGSTwt | |
| Napoleonova Comp. SE 5046 | S3 | S4 | MGSTwt | |
| Nemecka rychlice | S2 | S3 | MGSTwt | |
| Nero I. | S3 | S13 | MGSTwt | |
| Nero II C1 | S6 | S13 | MGSTwt | |
| New York | S3 | S4 | MGSTwt | |
| Noble | S1 | S3 | MGSTwt | |
| Noir de Guben | S1 | S5 | MGSTwt | |

| Odrůda | S-alela 01 | S-alela 02 | MGST alela 01 | MGST alela 02* |
|-------------------------|-------------------|-------------------|--------------------------|---------------------------|
| Nordwunder | S3 | S12 | MGSTwt | |
| NY 1193 | S1 | S3 | MGSTwt | |
| NY 1495 | S1 | S4 | MGSTwt | |
| NY 3308 | S3 | S6 | MGSTwt | |
| NY 55365 | S1 | S4 | MGSTwt | |
| Oktavia | S1 | S3 | MGSTwt | |
| Picanlon | S6 | S13 | MGSTwt | |
| Pivka | S1 | S3 | MGSTwt | |
| Pivovka | S3 | S7 | MGSTwt | |
| Pollux | S2 | S3 | MGSTwt | |
| Precoce Nero di Vignole | S1 | S3 | MGSTwt | |
| Preurodna srdcovka | S3 | S6 | MGSTwt | |
| Pumra SE 5009 | S3 | S12 | NT | |
| R 17-327 | S1 | S5 | MGSTwt | |
| Rainer | S1 | S4 | MGSTwt | |
| Rana cerna Edra SI 5068 | S1 | S2 | MGSTwt | |
| Rana Laskovka | S1 | S5 | MGSTwt | |
| Rebekka | S1 | S3 | MGSTwt | |
| Regina | S1 | S12 | MGSTwt | |
| Reidler | S2 | S6 | MGSTwt | |
| Rekord | S3 | S12 | MGSTwt | |
| Rita | S5 | S22 | MGSTwt | |
| Rivan | S1 | S2 | MGSTwt | |
| Rossii de Bistrita | S3 | S9 | MGSTwt | |
| Roundel | S1 | S2 | MGSTwt | |
| Rube | S3 | S12 | MGSTwt | |
| Rusalka | S1 | S3 | MGSTwt | |
| Sakvicka | S6 | S13 | MGSTwt | |
| Salmo | S1 | S4 | MGSTwt | |
| Sam | S2 | S4 | MGSTwt | |

| Odrůda | S-alela 01 | S-alela 02 | MGST alela 01 | MGST alela 02* |
|----------------------------------|-------------------|-------------------|--------------------------|---------------------------|
| Sandra | S3 | S4 | MGSTwt | |
| Sandra Rose | S3 | S4' | MGSTwt | |
| Santina | S1 | S4' | MGSTwt | |
| Semenac c. 13 | S1 | S4 | MGSTwt | |
| Semenac z Vrsovky | S2 | S3 | MGSTwt | |
| Seneca | S1 | S5 | MGSTwt | |
| Schauenburger | S1 | S5 | MGSTwt | |
| Schmidt | S2 | S4 | MGSTwt | |
| Schneiders Spaete Knorpelkirsche | S3 | S12 | MGSTwt | |
| Schoene von Marienhoehe | S1 | S2 | MGSTwt | |
| Schubacks Fruehe Schwarze | S1 | S3 | MGSTwt | |
| Schwarze von Loberot | S5 | S13 | MGSTwt | |
| Simonis | S2 | S4 | MGSTwt | |
| Skeena | S1 | S4' | MGSTwt | |
| Skierniewice 1 | S2 | S3 | MGSTwt | |
| Skierniewice 3 | S2 | S3 | MGSTwt | |
| Skorospielka | S2 | S3 | MGSTwt | |
| Sofijskaja Rannaja | S1 | S4 | MGSTwt | |
| Solimavi | S3 | S4 | MGSTwt | |
| Solnečný sar | S3 | S13 | MGSTwt | |
| Sonata | S3 | S4' | MGSTwt | |
| Spansche Knorpel | S3 | S6 | MGSTwt | |
| Sparkle IR-476-1A | S1 | S2 | MGSTwt | |
| Spitze Braune | S3 | S14 | MGSTwt | |
| Star | S3 | S4 | MGSTwt | |
| Stark Gold Sweet Cherry | S3 | S6 | MGSTwt | |
| Stark Hardy Giant | S1 | S2 | MGSTwt | |
| Starkrimson Cherry | S3 | S4' | MGSTwt | |
| Stella | S3 | S4' | MGSTwt | |
| Stella compact | S3 | S4' | MGSTwt | |

| Odrůda | S-alela 01 | S-alela 02 | MGST alela 01 | MGST alela 02* |
|--------------------------------|-------------------|-------------------|--------------------------|---------------------------|
| Sue | S2 | S3 | MGSTwt | |
| SUE IR 494-119 | S2 | S3 | MGSTwt | |
| Summit | S1 | S2 | MGSTwt | |
| Sunburst | S3 | S4' | MGSTwt | |
| Svestickova | S1 | S7 | MGSTwt | |
| Sweet Early | S1 | S9 | MGSTwt | |
| Sweet Haest | S1 | S4' | MGSTwt | |
| Sweetheart | S3 | S4' | MGSTwt | |
| Sylvana | S1 | S6 | MGSTwt | |
| Sylvia | S1 | S4 | MGSTwt | |
| Symphony | S1 | S4' | MGSTwt | |
| Szomoyai F | S2 | S4 | MGSTwt | |
| Szwecja | S1 | S2 | MGSTwt | |
| Tamara | S1 | S9 | MGSTwt | |
| Tavriscanka | S4 | S6 | MGSTwt | |
| Techlovan | S3 | S6 | MGSTwt | |
| Techlovicka I | S4 | S-TechI | MGSTwt | |
| Teickners Schwarze Herzkirsche | S2 | S3 | MGSTwt | |
| Tilledaer Schwarze Princes | S1 | S3 | MGSTwt | |
| Tim | S4 | S5 | MGSTwt | |
| Timpurii de Bystrita | S5 | S6 | MGSTwt | |
| Tropichterova | S1 | S3 | MGSTwt | |
| Trusenskaja | S5 | S13 | MGSTwt | |
| Ulster | S3 | S4 | MGSTwt | |
| Unterlaender | S5 | S13 | MGSTwt | |
| Uriase de Bystrita | S5 | S12 | MGSTwt | |
| Valerij Tschakalov | S1 | S9 | MGSTwt | |
| Valeska | S1 | S3 | MGSTwt | |
| Van | S1 | S3 | MGSTwt | |
| Van 2D-14-11 | S1 | S3 | MGSTwt | |

| Odrůda | S-alela 01 | S-alela 02 | MGST alela 01 | MGST alela 02* |
|---------------------|------------|------------|---------------|----------------|
| Van Spur | S1 | S3 | MGSTwt | |
| Vanda | S1 | S6 | MGSTwt | |
| Vega | S2 | S3 | MGSTwt | |
| Velka cerna chrupka | S6 | S13 | MGSTwt | |
| Velvet | S2 | S3 | MGSTwt | |
| Venus | S1 | S3 | MGSTwt | |
| Vic | S2 | S4 | MGSTwt | |
| Viktoria | S3 | S14 | MGSTwt | |
| Vilma | S2 | S6 | MGSTwt | |
| Vineland | S1 | S5 | MGSTwt | |
| Viola | S4 | S12 | MGSTwt | |
| Vista | S2 | S5 | MGSTwt | |
| Viva | S2 | S3 | MGSTwt | |
| Vlachuv semenac | S3 | S4 | MGSTwt | |
| Vogue | S2 | S3 | MGSTwt | |
| Voltragende Knorpel | S3 | S4 | MGSTwt | |
| Vosenka | S3 | S9 | MGSTwt | |
| Walpurigiskirsche | S3 | S5 | MGSTwt | |
| Werdersche Braune | S3 | S6 | MGSTwt | |
| Wessel Hoefst | S1 | S3 | MGSTwt | |
| Windsor | S1 | S3 | MGSTwt | |
| Winklerova rana | S3 | S22 | MGSTwt | |
| Zalanka | S1 | S4 | MGSTwt | |
| Zukunft | S1 | S3 | MGSTwt | |
| Zweitfruehe | S5 | S6 | MGSTwt | |

* *Vzhledem k tomu, že není možné vyloučit přítomnost alely MGST promotoru, která se neamplifikuje navrženou sadou primerů, je v případě identifikace pouze alely MGSTwt z důvodu korektnosti uvedena tato alela pouze jednou. Vzhledem k tomu, že v literatuře nebyly jiné alely promotoru MGST popsány (kromě alely MGSTins), lze však předpokládat, že se bude jednat o kombinaci alel MGSTwt/ MGSTwt.*



Ministerstvo zemědělství, odbor zemědělských komodit, Těšnov 65/17, Praha 1, 110 00

v y d á v á

OSVĚDČENÍ

60238/2020-MZE-18140

o uznání metodiky v souladu s podmínkami Metodiky hodnocení výzkumných organizací a programů účelové podpory výzkumu, vývoje a inovací, schválené usnesením vlády dne 8. února 2017, číslo 107 a její samostatné přílohy č. 4 schválené usnesením vlády dne 29. listopadu 2017 č. 837.

Název metodiky: Stanovení cizosprašnosti/samosprašnosti u třešně ptačí (*Prunus avium* L.) molekulárně genetickými metodami a její ověření v praxi

Autoři: **Jana Čmejlová a kol.**

Název organizace: **Výzkumný a šlechtitelský ústav ovocnářský Holovousy s.r.o.**

Místo vydání: **Výzkumný a šlechtitelský ústav ovocnářský Holovousy s.r.o.**

Rok vydání: **2020**

Metodika byla vypracována v rámci výzkumného projektu TAČR č. **TN01000062/7 „Biotechnologické centrum pro genotypování rostlin, Dílčí projekt 007 - Ovoce“**

Využívá projekt „Pravidla pro odvětví zemědělství, lesnictví, rybolov“? **NE**

V Praze dne

4. 12. 2020



Razítko odborného orgánu státní správy

Jméno zástupce odborného útvaru státní správy:

Funkce zástupce odborného útvaru státní správy:

Ing. Miroslava Czetmayer Ehrlichová

ředitelka odboru zemědělských komodit

.....
Podpis zástupce odborného útvaru státní správy

Souhlas ředitele Odboru vědy, výzkumu a vzdělávání MZE:

V Praze dne

4. 12. 2020

.....
U. Z. Radoš

Mgr. Jan Radoš
pověřen zastupováním ředitele odboru

**Stanovení cizosprašnosti/samosprašnosti u třešně ptačí (*Prunus avium* L.)
molekulárně genetickými metodami a její ověření v praxi**

Autoři: RNDr. Jana Čmejlová, Ph.D., Ing. Pavol Suran, Ing. Lubor Zelený,
Ing. František Paprštejn, CSc., RNDr. Radek Čmejla, Ph.D.

Vydal: VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOCNÁŘSKÝ HOLOVOUSY, s.r.o.

Grafická úprava, sazba a tisk: ŽAKET – KARTOGRAFICKÉ VYDAVATELSTVÍ A TISKÁRNA

Počet kopií: 50

ISBN: 978-80-87030-76-9