



VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV
OVOCNÁŘSKÝ HOLOVOUSY s.r.o.

ÚSTAV EXPERIMENTÁLNÍ BOTANIKY
AV ČR, v.v.i.

**MOLEKULÁRNÍMI MARKERY
ASISTOVANÉ ŠLECHTĚNÍ TŘEŠNĚ
PTAČÍ (*PRUNUS AVIUM* L.)**

**– SELEKCE NA DOBU SKLIZŇOVÉ ZRALOSTI,
VELIKOST, BARVU A PEVNOST PLODŮ**

Ivona Žďárská a kol.



**CERTIFIKOVANÁ
METODIKA
2023**



VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOCNÁŘSKÝ
HOLOVOUSY s.r.o.

Ústav experimentální botaniky Akademie věd České republiky v.v.i.

**Molekulárními markery asistované šlechtění třešně
ptačí (*Prunus avium* L.) – selekce na dobu sklizňové
zralosti, velikost, barvu a pevnost plodů**

Ivona Žďárská a kol.



Ústav experimentální
botaniky AV ČR, v. v. i.

CERTIFIKOVANÁ METODIKA

2023

Autoři: Ing. Ivona Žďárská¹, RNDr. Radek Čmejla, Ph.D.¹, Mgr. Kateřina Holušová, Ph.D.², Ing. Pavol Suran¹, Ing. Jiří Sedlák, Ph.D.¹, Ing. Kamila Pluhařová¹, Ing. Lubor Zelený¹, Mgr. Jan Bartoš, Ph.D.², RNDr. Jana Čmejlová, Ph.D.¹

¹VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOCNÁŘSKÝ HOLOVOUSY s.r.o., Holovousy 129, 508 01 Holovousy, Česká republika

²Ústav experimentální botaniky Akademie věd České republiky v.v.i., Centrum strukturní a funkční genomiky rostlin, Šlechtitelů 31, 779 00 Olomouc, Česká republika

Kontakt na vedoucího autorského kolektivu:

ivona.zdarska@vsuo.cz

Autoři fotografií a obrázkových schémat:

kolektiv autorů

Odborný oponent:

doc. Dr. Ing. Pavel Vejl, Česká zemědělská univerzita v Praze, Katedra genetiky a šlechtění

Oponent ze státní správy:

Ing. Josef Vačkář, Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Oddělení trvalých kultur

Název: Molekulárními markery asistované šlechtění třešně ptačí (*Prunus avium* L.) – selekce na dobu sklizňové zralosti, velikost, barvu a pevnost plodů

Dedikace: Metodika je výsledkem řešení výzkumného projektu Národní agentury pro zemědělský výzkum (NAZV) č. QK1910290 s názvem „Rozvoj a aplikace molekulárně genetických metod pro racionalizaci šlechtitelských postupů třešně (*Prunus avium* L.)“.

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

ISBN 978-80-87030-97-4 (online; pdf)

<https://doi.org/10.60615/a01h-d866>



OBSAH

1.	Úvod	4
2.	Cíl metodiky	7
3.	Vlastní popis metodiky	7
3.1	Úvod	7
3.1.1	Molekulární markery pro predikci sklizňové zralosti.....	8
3.1.1.1	<i>SNP chr4_16353619</i>	8
3.1.2	Molekulární markery pro predikci velikosti plodů.....	8
3.1.2.1	<i>SSR marker CPSCT038</i>	8
3.1.2.2	<i>SSR marker BPPCT034</i>	8
3.1.2.3	<i>Alely promotoru PavCNR12</i>	9
3.1.2.4	<i>SSR marker G2SSR1566</i>	9
3.1.2.5	<i>SNP chr2_29787028</i>	10
3.1.3	Molekulární markery pro predikci barvy plodů.....	10
3.1.3.1	<i>Delece adeninu (A) v genu PavMYB10.1</i>	10
3.1.3.2	<i>Pav-Rf-SSR</i>	10
3.1.3.3	<i>SNP chr3_23939472</i>	10
3.1.3.4	<i>Delece části chromozomu 3</i>	11
3.1.4	Molekulární markery pro predikci pevnosti plodů	11
3.1.4.1	<i>SNP chr4_16000421</i>	11
3.2	Materiál a metody	11
3.2.1	Rostlinný materiál	11
3.2.2	Fenotypové hodnocení.....	12
3.2.2.1	<i>Sklizňová zralost</i>	12
3.2.2.2	<i>Velikost plodů</i>	12
3.2.2.3	<i>Barva plodů</i>	12
3.2.2.4	<i>Pevnost plodů</i>	13
3.2.3	Příprava DNA	13
3.2.4	Fragmentační analýza.....	15
3.2.5	Sekvenování	16
3.2.5.1	<i>PCR amplifikace</i>	16
3.2.5.2	<i>Gelová elektroforéza</i>	17
3.2.5.3	<i>Eluce DNA fragmentů z gelu</i>	17
3.2.5.4	<i>Sekvenování</i>	18
3.2.6	Alelická diskriminace pomocí real-time PCR.....	18
3.2.7	SBE analýza.....	20
3.3	Vyhodnocení a interpretace dat	23
3.3.1	Vyhodnocení fragmentační analýzy	23
3.3.2	Vyhodnocení sekvenování promotoru genu <i>PavCNR12</i>	29
3.3.3	Vyhodnocení alelické diskriminace <i>PavMyb10.1</i>	35
3.3.4	Vyhodnocení analýzy SBE.....	38
4.	Závěrečné shrnutí doporučení pro MAS	45
5.	Srovnání novosti postupů	46
6.	Popis uplatnění certifikované metodiky	47
7.	Ekonomické aspekty	50
8.	Seznam použité související literatury	51
9.	Seznam publikací, které předcházely metodice	53
10.	Dedikace	53
11.	Osvědčení o uznání metodiky	54

1. ÚVOD

Třešeň ptačí (*Prunus avium* L.) patří mezi velmi významné ovocné plodiny mírného klimatického pásma se stále se zvyšující celosvětovou produkcí (1,9 milionů tun v roce 2000 s nárůstem na 2,77 milionů tun v roce 2021, www.fao.org/faostat/en/#data/QCL). Největšími pěstiteli z pohledu sklizně jsou Turecko, Spojené státy americké a Chile, které zajišťují zhruba polovinu celosvětové produkce. V České republice se v letech 2015-2021 sklídilo průměrně téměř 9,2 tis. tun tohoto ovoce za rok ([Ovoce 2022 web.pdf](http://Ovoce_2022_web.pdf) (eagri.cz)). Třešně se nejčastěji konzumují bez úpravy bezprostředně po sklizni, hojně se však využívají i jako surovina při pečení, kompotují se, či se z nich vyrábí marmeláda. Třešně mají využití i ve výrobě nápojů, a to jak nealkoholických (např. ovocné šťávy), tak i alkoholických (likéry, destiláty).

Na světě existují nižší tisíce odrůd, jen informační systém genetických zdrojů pro USA eviduje 827 různých položek třešně ptačí (ars-grin.gov). Jsou však stále šlechtěny a registrovány nové a nové odrůdy. Současné šlechtitelské programy třešni se zaměřují na produkci nových genotypů, které vykazují vynikající vlastnosti v širokém rozmezí znaků preferovaných různými prvky produkčního, zpracovatelského a prodejního řetězce, konzumenty nevyjímaje. Mezi tyto vlastnosti patří jak fenologické znaky, jako je doba zrání, tak plodové charakteristiky, např. velikost, barva či pevnost plodů.

Vzhledem ke krátké skladovatelnosti plodů hledají šlechtitelé způsob, jak prodloužit sklizňové období třešni, aby se zvýšila jejich dostupnost během roku. Období jejich zrání trvá zpravidla 8 týdnů, v prvních a posledních dvou týdnech však zraje jen velmi málo kvalitních odrůd. Zatímco zpozdit sklizeň lze v mírném podnebné pásmu zakládáním sadů ve vyšších nadmořských výškách, posun k dřívějšímu zrání třešni je obvykle zajišťován cíleným šlechtěním časně zrajících odrůd, neboť pěstování třešni v teplejších oblastech často naráží na nedostatečnou délkou chladového období (dormance). Zejména jsou požadovány odrůdy zrající ve stejném období jako 'Burlat' (tj. v 2. třešňovém týdnu), případně časněji (např. Malchev, 2016; Quero García, 2019).

Hmotnost sklizených třešni z jednoho stromu je pro pěstitele bezpochyby zásadním faktorem pro jeho prosperitu, avšak jedním z hlavních parametrů určujících cenu produkce za kilogram je velikost plodů (Quero García, 2019). Velikost je u třešni často hodnocena jako průměrná hmotnost jednoho plodu, případně je pro porovnávání používán průměrný průměr plodu. Dříve obvyklá hmotnost plodu byla přibližně 5 g (tj. průměr plodů třešni byl okolo 20 mm), dnešní moderní odrůdy mají hmotnost vyšší než 10 g a průměrem se blíží 30 mm (např. 'Summit') (Sarisu, 2019).

Velikost plodu není jediná vlastnost, která ovlivňuje spotřebitele či zpracovatele při nákupu, velmi důležitá je i barva plodu. Preferovanou barvou třešni je ve většině oblastí tmavě červená, v Asii jsou však upřednostňovány pestré až žluté plody (Bujdosó, 2017). Barva plodů je dána zejména obsahem antokyanů, které patří mezi zdraví prospěšné látky s antioxidačním účinkem, selekce tmavě červených plodů tak má kromě vizuálního efektu i zdravotní přínos (Antognoni, 2020). Barva plodů je klasifikována například subjektivním porovnáním hodnocené odrůdy s barvou referenčních odrůd (např. Holušová, 2023) nebo může být objektivně měřena chromametrem (např. Antognoni, 2020).

Velmi důležitým parametrem plodů je i jejich pevnost, která významně ovlivňuje velice krátkou skladovatelnost sklizených třešní. Plody s menší pevností dužniny se při transportu a manipulaci snadno otláčí/poškodí a následně podléhají rychlejší zkáze. Proto není překvapující trend šlechtit třešně s pevnou dužninou (Quero García, 2019). Pevnost plodů může být opět hodnocena subjektivně porovnáním s referenčními odrůdami nebo objektivně pomocí penetrometru (např. Holušová, 2023).

Vyšlechtění nové odrůdy třešní trvá obvykle více jak 20 let, počítaje od opylení květu po její komerční dostupnost. Dalších několik let se nově registrovaná odrůda prosazuje na trhu. Šlechtění třešní je velice náročný proces s nízkou účinností během celého procesu výběru nového perspektivního genotypu. Problematické jsou hned první kroky šlechtění – úspěšné opylení a vypěstování semenáčků. Např. Quero García (2019) uvádí data získaná během 11 opylovacích sezón, kdy bylo opyleno 266 115 květů, z toho bylo získáno 12 488 plodů (4,1 %), avšak pouze 2625 hybridních semenáčků, účinnost celého procesu tak byla pouze 0,99 %. Množství opylených květů, získaných plodů a následně vyprodukovaných semenáčků lze zvýšit různými postupy, např. použitím opylovacích stanů s hmyzími opylovači, použitím plodů z volného sprášení kvalitních odrůd, optimalizací podmínek stratifikace vyluštěných semen před výsevem a následného klíčení, či použitím technik *in vitro* (tzv. „embryo rescue“ u raně plodících třešní) (Asanica, 2016). Po vyklíčení semene následuje dlouhá juvenilní doba (obvykle 5-6 let), než začnou tyto hybridní genotypy kvést a plodit. Po tuto dobu je třeba všechny tyto nově vytvořené genotypy udržovat ve výsadbě, což je finančně, časově i prostorově velmi náročné. Neméně pracné je i následné víceleté hodnocení fenologických a fenotypových vlastností, které předchází přihlášení vybraného genotypu k registraci coby nové odrůdy.

Jakákoliv metoda, která by mohla zlepšit účinnost šlechtění třešní, by tedy byla velmi přínosná a měla by vysoký potenciální ekonomický dopad. Nejslibnější přístupy využívají techniky molekulární genetiky a identifikované molekulární markery asociované s významnými fenologickými a fenotypovými znaky v procesu tzv. molekulárními markery asistované selekce (Marker-Assisted Selection, MAS). Bohužel však bylo do nedávné doby identifikováno a pro šlechtění využíváno jen několik molekulárních markerů a kandidátních genů (pro přehled Quero García, 2022, podrobněji viz níže). Strategie pro vývoj nových markerů byly omezeny primárně na tradiční mapování a analýzu lokusů kvantitativního znaku (Quantitative Trait Loci, QTL), kdy byly pro mapování využívány tzv. SSR (Simple Sequence Repeats) markery nebo tzv. CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences) markery (viz dále). V nedávné době pak byly vyvinuty čipy obsahující jednonukleotidové polymorfizmy (Single Nucleotide Polymorphisms, SNP) vybrané pro mapování QTL u třešní a višně (Peace, 2012; Vanderzande, 2020). I modernější varianta tohoto čipu s označením 6 + 9 K SNP array však obsahuje pouze 3955 spolehlivých polymorfních SNP pro třešně, což znamená průměrnou hustotu 1 SNP na 86 kb třešňového genomu. Tyto SNP však nejsou v genomu rozmístěny rovnoměrně a každý chromozom tak obsahuje alespoň jednu oblast větší než 500 kb neobsahující žádný z analyzovaných SNP (Vanderzande, 2020). Přelomová je proto publikace Holušová et al. (2023), ve které byly pro identifikaci molekulárních markerů asociovaných s významnými vlastnostmi využity celogenomové sekvence 235 odrůd třešní z genofondové sbírky Výzkumného a šlechtitelského ústavu ovocnářského Holovousy s.r.o. (dále jen VŠÚO Holovousy). Díky tomu bylo rozlišení genetické mapy třešně sníženo až na průměrně 1 SNP na

cca 200 bp. Použitím celogenomové asociační studie (Genome-Wide Association Study, GWAS) byly nalezeny nové molekulární markery pro vlastnosti, jako jsou doba sklizňové zralosti či plodové charakteristiky (velikost, barva a pevnost plodů), které byly následně validovány na 64 dříve neanalyzovaných hybridech a moderních odrůdách (Holušová, 2023).

Dále budou v této metodice popsány dosud známé molekulární markery používané pro MAS u třešni společně s identifikovanými QTL, popřípadě kandidátními geny, a to pro znaky, jako jsou doba sklizňové zralosti, barva, velikost či pevnost plodů. Přehled dosud používaných markerů lze nalézt v Quero García et al. (2022).

Hlavní QTL pro dobu sklizňové zralosti byly nedávno zamapovány do několika oblastí na chromozomu 4 (Dirlewanger, 2012; Quero García, 2014; Isuzugawa, 2019; Calle, 2020a) a jako kandidátní geny byly uvedeny transkripční faktory NAC nacházející se v této oblasti. Další QTL byly nalezeny na chromozomech 1, 2, 3 a 5. Dosud však nebyly publikovány žádné molekulární markery použitelné pro MAS. Až v roce 2023 Holušová et al. identifikovali jako velmi významné pro predikci doby zrání dva SNP z chromozomu 4, chr4_16353619 a chr4_4523736. V jejich blízkosti se nacházejí dva geny s potenciálním vlivem na zrání plodů - diacylglycerolkináza 5, respektive aquaporin *NIP1-1*.

Molekulární markery pro velikost plodů patří mezi první markery, které byly používány pro MAS u třešni. QTL asociované s velikostí plodů byly nalezeny na chromozomech 1, 2, 3, 5 a 6 (Zhang, 2010, Rosyara, 2013, Campoy, 2015, Calle, 2020b). Nejčastěji používanými jsou SSR markery CPSC038 a BPPCT034 z chromozomu 2, které byly identifikovány v pracích Zhang et al. (2010) a Rosyara et al. (2013). Oba SSR markery se nacházejí v blízkosti kandidátního genu pro velikost plodů *PavCNR12*, u něhož byly popsány tři varianty promotorové oblasti spojené s různou velikostí plodů (De Franceschi, 2013). V této publikaci byl jako diagnostický SSR marker analyzován i G2SSR1566, nacházející se bezprostředně za tímto kandidátním genem. Holušová et al. (2023) identifikovali hned několik SNP velmi významně asociovaných s velikostí plodů na chromozomu 2 (např. chr2_29776624, chr2_29776725, chr2_29787028, chr2_31850964), respektive chromozomu 1 (chr1_33914270).

V současném šlechtění třešni je používáno hned několik molekulárních markerů pro selekci semenáčů s určitou barvou plodů. Sooriyapathirana et al. (2010) objevili hlavní QTL pro barvu slupky a dužniny třešni na chromozomu 3 s kandidátním genem *PavMYB10*, méně významné QTL pak na chromozomech 6 a 8. QTL na chromozomu 3 byl potvrzen v Calle et al. (2021). Pro analýzu barvy je ve šlechtění v USA používán SSR marker Pav-Rf-SSR (Sandefur, 2016), kde byl tento marker schopen predikovat barvu u více než 95 % genotypů, použitelnost tohoto markeru u mnohem heterogennějších evropských odrůd však byla zpochybněna v Čmejla et al. (2021). Kromě toho byl objeven polymorfismus v genu *PavMYB10.1*, kdy byla přirozeně se vyskytující alela asociována s červenou barvou plodů, alela s delecí jednoho adeninu vedoucí k předčasnému ukončení syntézy proteinového produktu tohoto genu byla asociována s pestrou barvou plodů a v případě delece tohoto genu byly plody žluté (Jin, 2016). Přirozeně se vyskytující alela pak měla být dominantní nad ostatními alelami, alela s delecí jednoho adeninu pak nad delecí celého genu. Tento jednoduchý model však byl později popsán jako ne zcela přesný, když byly nalezeny odrůdy s barvou plodů neodpovídající danému modelu (Čmejla, 2021; Liu, 2023). Celogenomovým sekvenováním byly identifikovány velmi silně asociované SNP v dříve identifikované oblasti na chromozomu 3 (např. chr3_23939472, chr3_19315249, chr3_24544649, chr3_25100670), navíc byla u žlutých

třešní identifikována rozsáhlá delece této oblasti zahrnující hned 5 transkripčních faktorů Myb, které se mohou podílet na syntéze anthokyanů (Holušová, 2023). Liu et al. (2023) následně popsali u dalších žlutých odrůd tutéž deleci, kromě toho našli v daném místě i relativně krátkou inzerci.

QTL asociované s pevností plodů byly nalezeny na všech chromozomech, přičemž za nejsignifikantnější z nich se považují QTL na chromozomech 1, 4 a 6 (Quero García, 2014; Campoy, 2015; Cai, 2019; Calle, 2020a; Calle, 2020b). Kandidátní geny spadají často do kategorie enzymů ovlivňujících strukturu buněčné stěny, případně se účastní signálních drah hormonů podílejících se na zrání plodů (Cai, 2019), molekulární markery pro MAS však v těchto pracích nebyly zveřejněny. Prvními publikovanými jsou až SNP popsané v Holušová et al. (2023). Porovnáním celogenomových sekvencí odrůd s větší a menší pevností plodů byly tyto markery identifikovány hned na několika chromozomech, ty nejsignifikantnější se nacházely na chromozomu 4 (např. chr4_16000421), respektive 1 (např. chr1_61827812) a spadaly do dříve identifikovaných QTL.

2. CÍL METODIKY

Šlechtění třešní je zdouhavý a finančně i prostorově náročný proces vyžadující velký objem lidské práce. Cílem této metodiky je poskytnutí unikátního nástroje pro predikci hned několika šlechtitelsky důležitých vlastností, jakými jsou doba sklizňové zralosti, respektive velikost, barva a pevnost plodu, kdy použití metod molekulární genetiky umožní odstranění neperspektivních semenáčů již v prvním vegetačním roce, aniž by musely být dopěstovány do plodnosti. Analýza markerů pro tyto znaky může proběhnout v jediné reakci zde popsanou metodou tzv. Single Base Extension (SBE), kdy pro ni byly vybrány nejvýznamnější SNP identifikované metodou GWAS založenou na celogenomovém sekvenování (Holušová, 2023). Predikční schopnost uvedených molekulárních markerů je v této metodice porovnána s dříve používanými markery pro velikost a barvu plodů. I pro tyto markery je v metodice popsán pracovní postup jejich detekce. V neposlední řadě přináší metodika popis genotypů jednotlivých markerů u vybraných odrůd vhodných do šlechtitelských programů se zaměřením na zkvalitnění uvedených vlastností.

3. VLASTNÍ POPIS METODIKY

3.1 Úvod

V této části jsou podrobněji popsány jednotlivé molekulární markery pro predikci sklizňové zralosti, velikosti, barvy a pevnosti plodů, a to včetně popisu jejich výhodných/nevýhodných alel a referenčních odrůd. Uvedeny budou v současnosti/nedávné době používané molekulární markery, i když byla jejich vypovídací hodnota v některých případech zpochybněna. V následujících pasážích pak jsou podrobně popsány možné způsoby jejich detekce, včetně příkladných výstupů z jednotlivých analýz. V případě existence více molekulárních markerů pro stejnou vlastnost je provedeno porovnání jejich predikčních schopností. Coby referenční genom je pro mapování pozic jednotlivých molekulárních markerů

v celé metodice používán genom odrůdy 'Tieton', verze 2, který byl zveřejněn v publikaci Wang et al. (2020).

3.1.1 Molekulární markery pro predikci sklizňové zralosti

3.1.1.1 SNP chr4_16353619

Pro predikci doby sklizňové zralosti je možné použít nově identifikovaný molekulární marker typu jednonukleotidového polymorfizmu nacházející se na chromozomu 4 v pozici 16353619 (Holušová, 2023) dle referenčního genomu. Homozygotní genotyp A/A SNP chr4_16353619 je signifikantně asociován s časným zráním třešně, zatímco odrůdy zrající v pozdějším období nesou genotyp G/G. Průměrná doba zrání odrůd s genotypem A/A byla 11,9 dní po odrůdě 'Kišiněvskaja' (odrůda, která zpravidla zraje jako první z cca 300 odrůd udržovaných v genofondové sbírce třešně VŠÚO Holovousy). Odrůdy s heterozygotním SNP chr4_16353619, tj. A/G, zrají průměrně 18,4 dne po vybrané referenční odrůdě, odrůdy s genotypem G/G tohoto markeru pak 29,4 dne po ní. Při analýze lze coby referenční použít např. odrůdy 'Burlat', 'Rivan', 'Adélka' pro genotyp A/A, 'Jacinta', 'Kasandra' či 'Aranka' pro heterozygotní uspořádání A/G a odrůdy 'Kordia', 'Felicita' a 'Tamara' pro genotyp G/G.

3.1.2 Molekulární markery pro predikci velikosti plodů

3.1.2.1 SSR marker CPSCT038

Tento molekulární marker byl poprvé popsán v roce 2010 (Zhang, 2010), podrobněji pak v práci Rosyara et al. (2013). V genomu odrůdy 'Tieton' ho lze najít v oblasti 30,3 Mb na chromozomu 2 (referenční sekvence v databázi GenBank: AY426223.1). S velikostí plodů byly asociovány 4 alely ze 7 publikovaných (Ordidge, 2021), zbylé tři alely jsou poměrně vzácné. Za nejprůzračnější pro velikost plodu se považuje alela s délkou při fragmentační analýze 190 nukleotidů (nt). Tuto alelu v homozygotním stavu nese řada moderních odrůd, např. 'Kordia', 'Tamara' nebo 'Tim'. Za méně výhodnou, asociovanou spíše se střední velikostí plodů, se považuje alela s délkou 204 nt, kterou lze v homozygotní sestavě nalézt například u odrůdy 'Lapins'. Heterozygotně v kombinaci s alelou 190 nt se vyskytuje u řady odrůd, např. 'Regina', 'Stella', 'Van' či 'Sonata'. Za již nepříznivou pro velikost plodů se pokládá vzácná alela 202 nt, ta se vyskytuje například u třešně se žlutými plody 'Dönissenova' či 'Stark Gold Sweet Cherry'. S velmi malou velikostí plodů bývá asociována alela 192 nt, kterou lze v homozygotním stavu nalézt u třešně 'Ladeho pozdní' nebo 'Charger'.

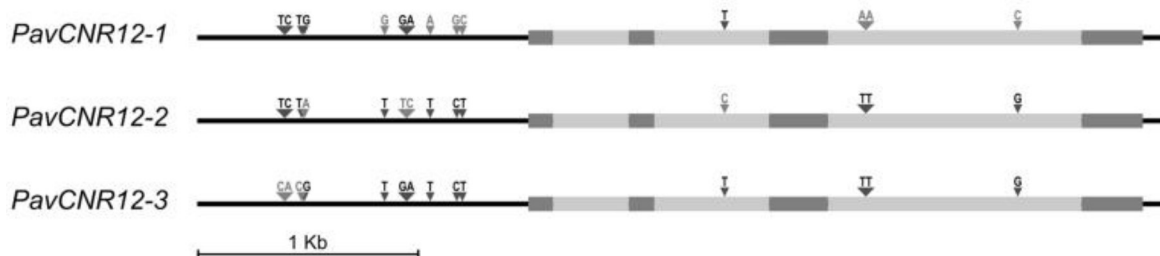
3.1.2.2 SSR marker BPPCT034

Molekulární marker BPPCT034 bývá obvykle analyzován společně s výše uvedeným markerem CPSCT038 a stejně tak byl popsán v pracích Zhang et al. (2010) a Rosyara et al. (2013). V genomu třešně ptačí se nachází nedaleko CPSCT038, v genomu 'Tietonu' je to oblast přibližně 33,3 Mb (referenční sekvence v GenBank: AF374945.1). U tohoto markeru bylo pozorováno 20 různých alel (Ordidge, 2021), většina z nich je však vzácných a vliv jednotlivých alel na velikost plodů byl hodnocen pouze u několika málo z nich. Ty jsou v následujícím textu řazeny od alely predikující největší plody po alelu asociovanou obvykle s malými plody. V případě tohoto markeru je alelou predikující největší plody poměrně vzácná alela s délkou 237 nt, kterou nesou společně s alelou 255 nt odrůdy 'Aranka' či 'Helga'.

Vyskytuje se i u odrůdy 'Burlat', zde v kombinaci s alelou 223 nt. Další velmi výhodnou alelou pro velikost plodů je naopak velmi hojná alela 255 nt, referenčními odrůdami s homozygotní sestavou mohou být 'Kordia', 'Tamara' nebo 'Tim'. Další v pořadí jsou alely 235 nt a 225 nt asociované již se střední až malou velikostí plodů. Alela 235 nt v kombinaci s alelou 255 nt se vyskytuje např. u odrůd 'Rainer', 'Bing', 'Lapins', 'Sonata' či 'Emperor Francis', naopak alelu s délkou 225 nt, lze nalézt společně s alelou 255 nt u odrůd 'Lambert', 'Kassandra', 'Abundance' či třešně se žlutými plody 'Stark Gold Sweet Cherry'. Homozygotně se pak vyskytuje u třešně s velmi malými plody 'Ladeho pozdní'. S ještě o něco menší velikostí plodů byla asociována poměrně vzácná alela 225 nt, jako kontrolní lze v tomto případě použít odrůdy 'Windsor' nebo 'Mona Cherry', kde se tato alela vyskytuje v kombinaci s alelou 255.

3.1.2.3 Alely promotoru *PavCNR12*

Gen *PavCNR12* (Cell Number Regulator gene 12, gen regulující počet buněk 12) byl asociován s velikostí plodů třešně v publikaci De Franceschi et al. (2013). Gen *PavCNR12* se nachází mezi dříve identifikovanými SSR markery CPSCT038 a BPPCT034, ve verzi 2 genomu 'Tietonu' v oblasti 31,9 Mb. Uvedená práce popisuje 3 alely promotoru tohoto genu lišící se několika nukleotidy (obrázek 1) - *PavCNR12-1* (číslo v databázi GenBank: KC139086), *PavCNR12-2* (KC139087) a *PavCNR12-3* (KC139088), kdy s největšími plody je asociována alela *PavCNR12-1* (homozygotně např. u odrůd 'Kordia', 'Tamara' nebo 'Tim'), naopak s nejmenšími třešněmi alela *PavCNR12-3* (homozygotně u odrůd 'Ladeho pozdní' nebo 'Seneca'). Alela *PavCNR12-2* se vyskytuje v kombinaci s alelou *PavCNR12-1* např. u odrůd 'Rainer', 'Bing', 'Van', 'Sonata' či 'Emperor Francis'.



Obrázek 1: Schéma rozdílů jednotlivých alel promotoru genu *CNR12* (De Franceschi, 2013).

3.1.2.4 SSR marker G2SSR1566

Také marker G2SSR1566 byl analyzován v souvislosti s velikostí plodů u třešně (De Franceschi, 2013), jelikož se nachází bezprostředně za genem *PavCNR12* (rovněž 31,9 Mb). Byly popsány tři délkové alely – 225 nt asociovaná s alelou promotoru *PavCNR12-1* a největší velikostí plodů, 250 nt ve vazbě s *PavCNR12-2* a střední velikostí plodů, respektive u malých plodů 228 nt vyskytující se společně s alelou *PavCNR12-3*. Kontrolními odrůdami pro alelu 225 nt mohou být 'Kordia', 'Tamara' nebo 'Tim' (všechny homozygotní), pro alelu 250 nt pak heterozygoté 'Rainer', 'Bing' či 'Emperor Francis' (druhá alela 225 nt). 228 nt lze homozygotně nalézt u odrůdy 'Ladeho pozdní' a 'Seneca', v kombinaci s alelou 225 nt se pak vyskytuje u odrůd 'Lambert', 'Abundance' či 'Stark Gold Sweet Cherry'.

3.1.2.5 SNP chr2_29787028

Nejnověji popsáný molekulární marker SNP chr2_29787028 asociovaný s hmotností plodů se nachází v přibližně stejné oblasti třešňového genomu jako výše zmiňované molekulární markery analyzované v souvislosti s velikostí plodů (Holušová, 2023). Odrůdy s vysokou hmotností plodů mívají alelickou sestavu tohoto markeru A/A, jako například 'Kordia', 'Tamara' nebo 'Felicitá'. Střední hmotnost plodů vykazuje kombinace A/G tohoto markeru, tu lze nalézt u odrůd 'Rainer', 'Bing', 'Van', 'Lambert' či 'Halka'. Odrůdy s kombinací G/G ('Feldes Frühe Schwarze', 'Reidler' či 'Ladeho pozdní') mívají nízkou hmotnost plodů.

3.1.3 Molekulární markery pro predikci barvy plodů

3.1.3.1 Delece adeninu (A) v genu *PavMYB10.1*

Jin et al. (2016) identifikovali tři varianty genu *PavMYB10.1* – 1/ alelu přirozeně se vyskytujícího typu (wild type), která byla asociována s červenou barvou plodů, 2/ alelu s delecí jednoho adeninu v pozici 23995550 (chromozom 3), která vede k posunu čtecího rámce a předčasnému ukončení syntézy kódovaného proteinu, kdy tato alela byla asociována s pestrá barvou plodů, a 3/ variantu s rozsáhlejší, avšak neidentifikovanou delecí v této oblasti, která se v homozygotním uspořádání vyskytuje u žlutých třešní. Podle modelu publikovaného v Jin et al. (2016) je alela přirozeně se vyskytujícího typu dominantní a způsobuje červenou až tmavě červenou barvu plodů, i když se vyskytuje v kombinaci s alelou s delecí adeninu, nebo alelou s rozsáhlejší delecí. Stejně tak alela s delecí adeninu má dominantní účinek vzhledem k alele s rozsáhlejší delecí a třešně obsahující tyto dvě alely jsou pestré. Tento model však neplatí zcela univerzálně, jak později zjistili Čmejla et al. (2021) a Liu et al. (2023). Coby příklady odrůd s homozygotní sestavou alely přirozeně se vyskytujícího typu lze uvést například odrůdy 'Kordia', 'Horka' či 'Sam', delecí adeninu v obou alelách nesou např. odrůdy 'Charger' a 'Rainer'. Heterozygoty obsahujícími tyto dvě alely jsou pak např. 'Karešova', 'Jacinta' nebo 'Tim'. Homozygotní delece celé oblasti byla pozorována u třešní se žlutými plody 'Stark Gold Sweet Cherry' nebo 'Droganova'.

3.1.3.2 *Pav-Rf-SSR*

Jako velmi spolehlivý marker pro predikci barvy plodů u třešní byl popsán *Pav-Rf-SSR* (chr3_23875906–23876253 v genomu odrůdy 'Tieton') (Sandefur, 2016), který byl úspěšně využit u více jak 95 % severoamerických kultivarů třešní. Takto vysoké procento úspěšnosti predikce barvy plodů však nebylo potvrzeno u evropských odrůd (Čmejla, 2021). Podle původní práce (Sandefur, 2016) byly alely s délkou 351 a 361 nukleotidů asociovány s mahagonovou barvou třešní a byly dominantní. Naopak alela s délkou 357 nukleotidů bývá v homozygotním stavu asociována s pestrá barvou plodů. Jako neinformativní byly popsány alely s délkou 355 a 359 nukleotidů. Kombinaci alel 351+357 je možné najít např. u odrůdy 'Tamara', naopak 'Sam' obsahuje alely 355+361 a 'Sonata' alely 359+361. Kombinaci 357+357 predikující pestrá barvu plodů lze nalézt u odrůd 'Rainer', 'Charger' či 'Abundance', ale také 'Karešova' či 'Jacinta' s červenou barvou plodů.

3.1.3.3 SNP chr3_23939472

Holušová et al. (2023) popsali jednonukleotidový polymorfismus na chromozomu 3 v pozici 23939472, který se nachází mezi dříve používanými markery *Pav-Rf-SSR* a delece A

v *PavMYB10.1*. Alela obsahující v dané pozici guanin (G) byla asociována s pestrá barvou plodů, naopak alela s cytosinem (C) se vyskytovala u červených a žlutých třešní a dominovala nad alelou G. Příklady odrůd s kombinací G/G mohou být 'Ladeho pozdní', 'Merpet' nebo 'Rainer', naopak C/C obsahují např. odrůdy 'Kordia', 'Aranka', 'Felicita' či 'Vanda'. Mezi heterozygoty s kombinací alel G/C patří odrůdy 'Burlat', 'Halka' nebo 'Jacinta'.

3.1.3.4 Delece části chromozomu 3

U třešní se žlutými plody byla v práci Jin (2016) predikována delece oblasti obsahující *PavMYB10* o neznámé délce. Rozsah delece v této oblasti byl následně identifikován v Holušová et al. (2023) a potvrzen v Liu et al. (2023), kde je ve skutečnosti deletováno 5 genů pro různé varianty transkripčního faktoru MYB10, které mají stejnou doménovou strukturu a jsou vysoce homologní (Holušová, 2023). Alela bez delece je dominantní (homozygotně se vyskytuje např. u odrůd 'Felicita', 'Kordia' nebo 'Tamara'), v Evropě velmi vzácná alela s delecí se homozygotně vyskytuje např. u odrůdy 'Stark Gold Sweet Cherry' nebo 'Droganova'.

3.1.4 Molekulární markery pro predikci pevnosti plodů

3.1.4.1 SNP chr4_16000421

Jedinými konkrétními dosud popsanými markery pro predikci pevnosti plodů jsou SNP popsané v práci Holušová et al. (2023). S pevností plodů, a to jak slupky, tak dužniny, byl nejvíce asociován SNP chr4_16000421. Genotypy s homozygotní kombinací A/A vykazují vysokou pevnost plodů a jsou to například odrůdy 'Kordia', 'Felicita' nebo 'Vanda'. Naopak nejměkčí plody se vyskytují u genotypů s kombinací T/T, ty reprezentují například odrůdy 'Adélka', 'Rivan' nebo 'Helga'. Příkladem středně pevných třešní s kombinací A/T mohou být 'Jacinta', 'Burlat' a 'Aranka'.

3.2 Materiál a metody

Jelikož jsou výše uvedené markery různých typů, jsou pro ně využívány různé detekční postupy. SSR markery jsou analyzovány fragmentační analýzou, ideálně prováděnou na kapilárním genetickém analyzátoru. Jednonukleotidové polymorfizmy je možné analyzovat sekvenováním (zde popsáno pro analýzu alel promotoru genu *CNR12*, kde je třeba analyzovat hned několik blízkých SNP, aby byly jednotlivé alely rozlišeny), popřípadě levnější alelickou diskriminací pomocí PCR. Pokud je analyzováno více SNP markerů, avšak každý pochází z jiného lokusu, lze s výhodou použít techniku prodlužující fragment o jeden nukleotid označovanou SBE. Ať již je pro analýzu příslušných markerů použita jakákoliv technika, prvním krokem je vždy izolace DNA z rostlinného materiálu.

3.2.1 Rostlinný materiál

Výchozím materiálem pro DNA analýzy je zpravidla část listu semenáčku třešně odebraná ve stádiu 2-3 pravých listů, izolace DNA vyžaduje pouze přibližně 100 mg jemně nadrceného materiálu. Pro analýzu starších stromků je vhodnější použít pro izolace DNA lýko.

3.2.2 Fenotypové hodnocení

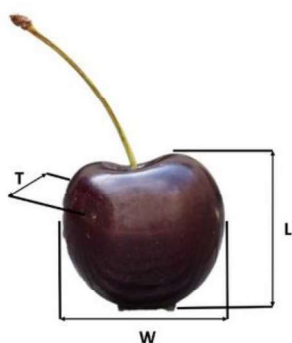
Pro fenotypové hodnocení a následný vývoj molekulárních markerů byla v práci Holušová et al. (2023) použita data z hodnocení devíti po sobě jdoucích let (2012-2020), kdy byly hodnoceny 2-3 stromy od každého genotypu v plodném věku. V případě potřeby provést fenotypové hodnocení se doporučuje sledovat analyzované znaky alespoň po dvě vegetační sezóny.

3.2.2.1 Sklizňová zralost

Doba sklizňové zralosti velmi závisí na klimatických podmínkách v jednotlivých letech, a proto byla vztažena k první zrající odrůdě v genofondové sbírce VŠÚO Holovousy, což je odrůda 'Kišiněvskaja'. Den její sklizňové zralosti byl definován jako den 0, hodnoty pro další odrůdy pak udávají, o kolik dní později dozrály oproti této odrůdě. 'Kišiněvskaja' obvykle zraje 0-2 dny před dobře známou odrůdou 'Früheste der Mark' (syn. 'Krüppers Frühkirsche' nebo 'Rychlice německá').

3.2.2.2 Velikost plodů

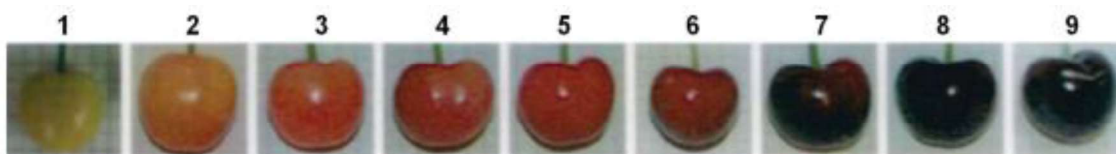
U třešní se zpravidla stanovují tři rozměry – šířka (w), výška (l) a tloušťka (t) (obrázek 2, Holušová, 2023). Měření probíhá u deseti plodů posuvným měřítkem, výsledek se zprůměruje. Hmotnost plodů se stanovuje včetně stopek u 100 plodů digitálními vahami s rozlišením alespoň 0,1 g, výsledek se zprůměruje.



Obrázek 2: Jednotlivé rozměry měřené u plodu třešně.

3.2.2.3 Barva plodů

Barvu plodů hodnotí zkušený hodnotitel podle devítibodové klasifikační stupnice. Orientační foto plodů jsou uvedena na obrázku 3, referenční odrůdy pak v tabulce 1 (obojí převzato z Holušová, 2023).



Obrázek 3: Devítibodová klasifikační stupnice pro stanovení barvy plodů.

Tabulka 1. Příklady referenčních kultivarů pro barvu plodů

Hodnocení	Popis	Příklady referenčních kultivarů podle deskriptoru ¹⁾ a podle CPVO ²⁾
1	žlutá	Gold Sweet Cherry ¹⁾ , Bigarreau d'Or ²⁾ , Dönnissens Gelbe ²⁾
2	žlutá s rozmytím	Vega ²⁾
3	žlutá s líčkem (pestrá)	Napoleonova ¹⁾ , Tardif de Vignola ²⁾
4	světle červená	Krupnoplodnaya ²⁾
5	červená	Montmorency ¹⁾ , Alex ²⁾ , Sunburst ²⁾
6	hnědočervená	Burlat ²⁾ , Kordia ²⁾ , Lapins ²⁾
7	tmavě červená	Karešova ¹⁾ , Hedelfinger Riesenkirsche ²⁾ , Stella ²⁾
8	načernalá	Annabella ²⁾ , Namosa ²⁾
9	černá	Knauffs Schwarze ¹⁾

¹⁾ Paprštein et al (1992); ²⁾ UPOV (2006)

3.2.2.4 Pevnost plodů

Pevnost plodů hodnotí zkušený hodnotitel jako pevnost slupky a dužniny podle devítibodové klasifikační stupnice (1 – velmi měkká, 9 – velmi pevná). Příklady odrůd s jednotlivými hodnoceními jsou uvedeny v tabulce 2 (Holušová 2023)

Tabulka 2. Příklady referenčních kultivarů pro pevnost plodů

Vlastnost	Hodnocení	Popis	Příklady referenčních kultivarů podle deskriptoru ¹⁾ a podle CPVO ²⁾
Pevnost slupky	1	velmi měkká	
	3	měkká	Merpet
	5	střední	Rivan, Merton Heart, Merton Glory
	7	pevná	Summit, Rainier, Sweetheart
	9	velmi pevná	Bianca, Lambert, Giorgia, Droganova
Pevnost dužniny	1	velmi měkká	Královna Hortenzie ¹⁾
	3	měkká	Early Rivers ^{1,2)}
	5	střední	Toprichterova ¹⁾ , Kordia ²⁾ , Sunburst ²⁾
	7	pevná	Bigarreau cherries ¹⁾ , Reverchon ²⁾ , Van ²⁾
	9	velmi pevná	Moser ¹⁾ , Kavics ²⁾ , Sumtare ²⁾

¹⁾ Paprštein et al (1992); ²⁾ UPOV (2006)

3.2.3 Příprava DNA

DNA byla extrahována s využitím komerčně dodávaného DNA izolačního kitu Exgene Plant SV mini (GeneAll Biotechnology, Co., Ltd.) na bázi kolon, postupuje se podle návodu výrobce.

1. Rostlinný materiál (list, skalpelem naškrábané lýko po odstranění kůry) se nadrtí najemno v třecí misce za přítomnosti tekutého dusíku.
2. Standardně se cca 100 mg dobře zhomogenizovaného vzorku přenesse sterilní špachtličkou do 2ml zkumavky.
3. Přidá se 400 μ l pufru PL a 3 μ l roztoku RNázy A (100 mg/ml). Proveďte se intenzivní zvortexování. (Pozn.: Při zpracovávání většího množství vzorků je možné přichystat si potřebný objem roztoku PL a RNázy A dopředu a ke vzorku již přidávat 403 μ l směsi.)
4. Pokud se zpracovává pouze jeden vzorek, pokračuje se následným krokem. Pokud se zpracovává větší množství vzorků, nechají se již připravené vzorky v PL pufru inkubovat při pokojové teplotě do okamžiku, než jsou všechny vzorky převedeny do PL pufru podle bodů 1-3. Pak se pokračuje následujícím krokem č. 5.
5. Vzorky se inkubují 15 minut při 65 °C ve vyhřívaném bloku, každých 5 minut se provede zvortexování.
6. K homogenátu se přidá 140 μ l pufru PD. Vzorky se zvortexují a inkubují se 5 minut na ledu.
7. Homogenát se přenesse pomocí tenké kovové špachtličky nebo 1ml špičky s filtrem s ustříženou špičkou na EzSep filtr (modrá barva) a centrifuguje se 2 minuty.
8. Proteklý lyzát se opatrně bez narušení pelety přenesse špičkou s filtrem do nové 1,5ml zkumavky; typicky se jedná o 420 μ l lyzátu.
9. K lyzátu se přidá pufr BD v množství 1,5 násobku objemu lyzátu (k 420 μ l lyzátu se přidá 630 μ l); roztoky je nutné okamžitě promíchat otáčením zkumavky nebo propipetováním.
10. 700 μ l směsi z kroku 7 se přenesse špičkou s filtrem na zelené SV kolony se sběrnou zkumavkou. Centrifuguje se 1 minutu. Proteklá tekutina se vyleje, hrany sběrné zkumavky se otřou buničitou vatou. SV kolona se opět vsune do sběrné zkumavky.
11. Na kolonu se nanese špičkou s filtrem zbytek lyzátu. Centrifuguje se 1 minutu. Proteklá tekutina se vyleje, hrany sběrné zkumavky se otřou buničitou vatou. SV kolona se opět vsune do sběrné zkumavky.
12. Na SV kolonu se přidá 700 μ l pufru CW, centrifuguje se 1 minutu. Proteklá tekutina se vyleje, hrany sběrné zkumavky se otřou buničitou vatou. SV kolona se opět vsune do sběrné zkumavky.
13. Na SV kolonu se přidá 300 μ l pufru CW, centrifuguje se 1 minutu. Proteklá tekutina se vyleje, hrany sběrné zkumavky se otřou buničitou vatou. SV kolona se opět vsune do sběrné zkumavky. Centrifuguje se 1 minutu, aby se zcela odstranil CW pufr z filtru. Po stočení se SV kolona opatrně vsune do čisté 1,5ml zkumavky.
14. Na SV kolonu se přidá 100 μ l pufru AE. Nechá se inkubovat 5 minut při pokojové teplotě, poté se stáčí 1 minutu.
15. Orientační určení čistoty a množství izolované DNA se provádí spektrometricky při vlnových délkách 260 nm (kvantita) a 280 nm (čistota jako poměr naměřených hodnot při vlnových délkách 260/280 nm). Izolovaná DNA by měla mít čistotu přibližně 1,8. Pokud je čistota nižší, nelze vyloučit negativní dopad na prováděné analýzy.
16. Eluovanou DNA je možné použít pro další aplikace nebo zamrazit v $\leq -18^{\circ}\text{C}$.

3.2.4 Fragmentační analýza

Fragmentační analýzou mohou být podle této metodiky hodnoceny čtyři SSR markery současně: tři pro velikost plodů (G2SSR1566, CPSCT038 a BPPCT034) a jeden SSR marker asociovaný s barvou plodů (Pav-Rf-SSR). Prvním krokem je provedení polymerázové řetězové reakce (PCR), přičemž vždy jeden z páru primerů je fluorescenčně značen (6-FAM); následně se vzorek připraví pro fragmentační analýzu.

1. V PCR boxu se do stojánku připraví potřebný počet 0,2ml PCR zkumavek včetně zkumavek pro kontrolní vzorky (např. kontrola bez přidané DNA, extrakční kontrola).
2. Do stojánku se připraví 1,5ml mikrozkušavka, do které se dle počtu reakcí připraví adekvátní množství Primer master mixu (tabulka 3):

Tabulka 3. Rozpis pro 100 µl Primer master mixu pro fragmentační analýzu

Primer (100µM)	Analyzovaný marker (znak)	Sekvence	Objem
6-FAM-G2SSR1566-F	G2SSR1566	CGCAGCCAATCTCACTTCGG	2,5 µl
G2SSR1566-R	(velikost plodů)	GGAGCTATTCGAGTCGTCA ¹⁾	2,5 µl
6-FAM-CPSCT038-F	CPSCT038	CAGGAACCCTATTCCCACAA ²⁾	10 µl
CPSCT038-R	(velikost plodů)	TCAATGGCACCCATTTTACA ²⁾	10 µl
6-FAM-BPPCT034-F	BPPCT034	CTACCTGAAATAAGCAGAGCCAT ²⁾	2,5 µl
BPPCT034-R	(velikost plodů)	CAATGGAGAATGGGGTGC ²⁾	2,5 µl
6-FAM-Pav-Rf-SSR-F	Pav-Rf-SSR	ATGCTGCATTGTGAAAGTGG ³⁾	2,5 µl
Pav-Rf-SSR-R	(barva plodů)	GGTGTCTACCCCAGTTAAAAACG ³⁾	2,5 µl
voda			65 µl
Celkem			100 µl

¹⁾ De Franceschi et al. (2013); ²⁾ Rosyara et al. (2013); ³⁾ Sandefur et al. (2016)

V případě analýzy menšího počtu markerů se odpovídající pár primerů nahradí v Primer master mixu stejným objemem vody. Primer master mix je možné skladovat při -20 °C ve tmě po dobu minimálně půl roku.

3. Do stojánku se připraví 1,5ml mikrozkušavka, do které se dle počtu reakcí připraví adekvátní množství PCR master mixu (tabulka 4).

Tabulka 4. Rozpis pro PCR master mix pro fragmentační analýzu

Složka	Na 1 vzorek
PCR voda	2 µl
Primer master mix	1 µl
Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific)	5 µl
Celkem	8 µl

4. Připravený PCR master mix se krátce vortexuje a krátce se centrifuguje.
5. PCR master mix se rozpipetuje do 0,2ml PCR zkumavek po 8 µl/zkušavku.
6. K master mixu se postupně pipetují 2 µl izolované DNA o koncentraci 10 ng/µl.

7. Podmínky PCR byly optimalizovány pro cykler C1000 (Bio-Rad) s následujícím cyklem: úvodní denaturace – 98 °C, 30 s; 24 cyklů (98 °C 10 s; 55 °C 10 s; 72 °C 15 s); závěrečné dosyntetizování neúplných fragmentů – 72 °C, 15 s; finální chlazení 8 °C.
8. PCR produkty se přímo použijí pro fragmentační analýzu, nebo je možné je uchovávat při teplotě ≤ -18 °C ve tmě po dobu minimálně jednoho roku.
9. Pro fragmentační analýzu se smíchá 1 μ l PCR produktu s 15 μ l Hi-Di™ formamidu a 0,5 μ l velikostního standardu GeneScan™ 600 LIZ™ dye Size Standard v2.0 (obojí od ThermoFisher Scientific) přímo v destičce určené pro analýzu vzorků v příslušném kapilárním genetickém analyzátoru. Vzorky se denaturují v cykleru při 95 °C/5 min a fragmentační analýza ampliconů se provede např. s využitím genetického analyzátoru AB3500 (ThermoFisher Scientific) s továrním nastavením přístroje.
10. Výsledky se analyzují např. softwarem GeneMapper (ThermoFisher Scientific), který je schopen vyhodnotit relativní délku jednotlivých fragmentů v nukleotidech. Vzhledem k možnému vlivu značení primerů či podmínek elektroforézy při fragmentační analýze na výslednou velikost fragmentu je naprosto nezbytné analyzovat kontrolní odrůdy pro každou alelu každého markeru, aby bylo možné provést přepočítání na velikosti alel publikované v literatuře. Odrůdy obsahující jednotlivé alely byly popsány výše pro každý marker.

3.2.5 Sekvenování

Sekvenační analýza se používá pro určení alel promotoru genu *PavCNR12*, jehož jednotlivé alely byly asociovány s velikostí plodů. Pro sekvenování určitého úseku DNA je třeba tento úsek nejprve amplifikovat pomocí PCR, gelovou elektroforézou rozdělit amplifikované úseky DNA podle velikosti a vyříznout příslušný amplicon z gelu. Amplicon se z gelu vyizoluje, provede se sekvenační reakce, produkt se přečistí a analyzuje pomocí genetického analyzátoru. Podle původní práce (v De Franceschi, 2013) se promotor amplifikuje coby dva částečně se překrývající fragmenty C1 a C2.

3.2.5.1 PCR amplifikace

1. V PCR boxu se do stojánku připraví potřebný počet 0,2ml PCR zkumavek včetně zkumavek pro kontrolní vzorky (např. kontrola bez přidané DNA, extrakční kontrola).
2. Do stojánku se připraví dvě 1,5ml mikrozkušavky (první pro amplifikaci úseku C1, druhá pro amplifikaci úseku C2), do kterých se dle počtu reakcí připraví adekvátní množství PCR master mixu (tabulka 5):

Tabulka 5. Rozpis pro PCR master mix

Složka	Na 1 vzorek
PCR voda	6 μ l
For primer (5 μ M)	1 μ l
Rev primer (5 μ M)	1 μ l
qPCR 2x Blue Master Mix (Top-Bio)	10 μ l
Celkem	18 μl

Pro PCR se použijí následující PCR primery publikované v De Franceschi, 2013:

CNR12-C1-for: 5'-AGTGGCAACATAACTGGATG a
CNR12-C1-rev: 5'-AAGTTTGGTGTGTTGAACTTGTCT, respektive

CNR12-C2-for: 5'-TTGCCATAAATAGATATCCAAAA a
CNR12-C2-rev: 5'-GATTTCCATCAGCCATCTG).

3. Připravený PCR master mix se krátce vortexuje a krátce se centrifuguje.
4. PCR master mix se rozpipetuje do 0,2ml PCR zkumavek po 18 µl/zkumavku.
5. K PCR master mixu se postupně pipetují 2 µl izolované DNA o koncentraci cca 10 ng/µl.
6. Podmínky PCR byly optimalizovány pro cykler C1000 (Bio-Rad) s následujícím cyklem: úvodní denaturace – 94 °C, 5 min; 40 cyklů (94 °C 10 s; 55 °C 10 s; 72 °C 1 min); závěrečné dosyntetizování neúplných fragmentů – 72 °C, 7 min; finální chlazení 8 °C.
7. PCR produkty se analyzují gelovou elektroforézou, nebo je možné je uchovávat při teplotě ≤ -18 °C ve tmě po dobu minimálně jednoho roku.

3.2.5.2 Gelová elektroforéza

1. Agarózový gel se připraví v mikrovlnné troubě rozvařením agarózy (2 g agarózy/100 ml gelu) v příslušném objemu 0,5x TBE pufru (VWR) v kádince/Erlenmeyerově baňce.
2. Po úplném rozvaření se gel ochladí na cca 40-50 °C (kádinku lze udržet v ruce bez popálení), ke gelu se přidá UV vizualizační činidlo pro DNA, např. SafeView (ABM) v koncentraci 1 µl na 20 ml gelu.
3. Ochlazený gel se nalije do elektroforetické vaničky s přichystanými hřebínky o požadovaném počtu zubů. Po ztuhnutí se gel vloží do elektroforetické vany a zalije se stejným pufrem, z kterého je připraven.
4. K 20 µl PCR produktu se přidají 4 µl nanášecího pufru, např. 6X TriTrack DNA Loading Dye (Thermo Fisher Scientific), a vzorek se opatrně nanese na gel tak, aby nepřetekl do sousedních jamek.
5. Dále se na gel nanese velikostní standard dle velikosti očekávaného produktu (fragment C1: 743 bp, fragment C2: 917 bp), např. GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific) dle doporučení výrobce.
6. Elektroforéza probíhá při konstantním napětí cca 10 V/1cm délky gelu podle potřeby. Vlastní běh je nutné opticky kontrolovat na UV transiluminátoru; zpravidla trvá 30 minut až 1 hodinu.

3.2.5.3 Eluce DNA fragmentů z gelu

Pro izolaci DNA fragmentů z gelu byl využit DNA izolační kit Expin Combo GP od firmy GeneAll dle následujícího postupu:

1. Na UV prosvětlovači se z gelu pomocí skalpelu vyříznou požadované fragmenty s co nejmenším množstvím okolního gelu a vloží se do označených 1,5ml mikrozkušavek. Je nezbytné, aby doba prosvícení gelu UV světlem byla co nejkratší.
2. Do každé zkumavky se přidá 500 µl pufru GB.

3. Vyříznuté gelové bločky se nechají zcela roztát při pokojové teplotě (zpravidla 30-60 min), nebo pro urychlení postupu lze zkumavky temperovat na 50 °C v termobloku (zpravidla 5-10 min.).
4. Směs (maximálně 700 µl) se přepipetuje na SV kolonu ve sběrné zkumavce, centrifuguje se 1 min. Proteklá tekutina se vyleje, hrany sběrné zkumavky se otrou buničitou vatou. SV kolona se opět vsune do sběrné zkumavky.
5. Na SV kolonu se přidá 700 µl pufru NW, nechá se stát 1-5 min. Centrifuguje se 1 min. Proteklá tekutina se vyleje, hrany sběrné zkumavky se otrou buničitou vatou. SV kolona se opět vsune do sběrné zkumavky.
6. Centrifuguje se 1 minutu, aby se zcela odstranil NW pufr z filtru. Po stočení se SV kolona opatrně vsune do čisté 1,5ml mikrozkušavky.
7. Na SV kolonu se přidá 50 µl pufru EB (případně 30-200 µl podle potřeby). Nechá se inkubovat 1 minutu při pokojové teplotě, poté se stáčí 1 minutu.
8. Eluovanou DNA je možné použít v dalším kroku nebo zamrazit v ≤ -18 °C.

3.2.5.4 Sekvenování

1. Podle počtu vzorků se ve stojánku připraví potřebný počet 0,2ml zkumavek. Jako templát slouží PCR amplikony přečištěné z gelu, tj. fragment C1 a fragment C2 pro každou odrůdu.
2. Složení premixu pro sekvenační reakci uvádí následující tabulka 6:

Tabulka 6. Rozpis pro sekvenování

Složka	Na 1 vzorek
PCR purifikovaný produkt	6 µl
Sekvenační primer CNR12-C1-rev nebo CNR12-C2-for (5µM)	1 µl
BigDye Terminator RR kit v3.1	2 µl
BigDye Seq buffer 5x	1 µl
Celkem	10 µl

Pro sekvenování se použijí primery CNR12-C1 rev pro fragment C1, respektive CNR12-C2 for pro fragment C2, sekvence primerů jsou uvedeny výše v odstavci PCR amplifikace.

3. Podmínky PCR byly optimalizovány pro cykler C1000 (Bio-Rad) s následujícím cyklem: úvodní denaturace – 95 °C, 5 min; 35 cyklů (95 °C 30 s; 55 °C 20 s; 60 °C 4 min); finální chlazení 8 °C.
4. Po dokončení sekvenační PCR se k sekvenační reakci přidá 45 µl SAM Solution (Thermo Fisher Scientific). Špičkami s ustríženou špičkou se přidá 10 µl BigDye XTerminator Solution (Thermo Fisher Scientific). Směs se vortexuje 30 minut při přibližně 1 200 RPM.
5. Následně se směs stočí 1-2 minuty ve stolní minicentrifuze.
6. Do sekvenační destičky až na dno se napipetuje 25 µl vzorku bez XTerminator partikulí a bez bublin. Vzorky se poté analyzují na genetickém analyzátoru GA3500 (Thermo Fisher Scientific) dle návodu výrobce.

3.2.6 Alelická diskriminace pomocí real-time PCR

Alelická diskriminace je analýza, v rámci které jsou detekovány různé varianty cílové sekvence DNA, z nichž každá je detekována jinak fluorescenčně značenou sondou, a to během PCR reakce v reálném čase. Tento postup se používá pro analýzu delece adeninu (A) v genu

PavMYB10.1 pro predikci barvy plodů. Sonda značená 6-FAM detekuje v navrženém uspořádání reakce přirozeně se vyskytující (WT) variantu genu *PavMyb10.1* obsahující klastř pěti adeninů (5A), sonda značená HEX se váže na alelu s delecí jednoho adeninu (4A), která způsobuje patrně částečnou inaktivaci proteinu a měla by být asociována s pestrou barvou plodů. Do reakce je přidán i systém pro detekci kontrolního genu (*aktin 7*), jelikož v případě homozygotní delecce genu *PavMYB10.1*, která byla pozorována u žlutých třešní, nedochází k detekci signálu ani 6-FAM, ani HEX. Amplifikace *aktinu 7* (sonda IRDye700) tak potvrzuje přítomnost amplifikovatelné DNA v reakci. Metoda byla optimalizována pro real-time PCR cykly Rotor-Gene Q (Qiagen).

1. Do stojánku se připraví potřebný počet 0,1ml stripů včetně mikrozkušavek pro NTC (netemplátovaná kontrola) a pozitivní kontrolu.
2. Do stojánku se připraví 1,5ml mikrozkušavka, do které se dle počtu reakcí napipetuje adekvátní množství Primer master mixu (tabulka 7):

Tabulka 7: Rozpis pro 100 µl Primer/sonda master mixu pro alelickou diskriminaci

Primer/sonda (100µM)	Analyzovaný gen	Sekvence	Objem
PavMyb10.1-F	<i>PavMyb10.1</i>	GGTGGTCATTGATTGCTGGA ¹⁾	5 µl
PavMyb10.1-R		CCGTTTGAATATGGTCCAAAA ²⁾	5 µl
6-FAM-PavMyb10.1-5A(WT)		ATGTG AAAA ATTATTGGAACACTC ²⁾	5 µl
HEX-PavMyb10.1-4A(mut)		ATGTG AAA ATTATTGGAACACTC ²⁾	5 µl
Aktin7-F	<i>Aktin 7</i> (kontrola amplifikace)	CAGATCATGTTTGAGACATTCAATGT ³⁾	5 µl
Aktin7-R		CATCACCAGAGTCCAGCACAAT ³⁾	5 µl
IRDye700-aktin7		ATGGGAAGCTCATTCAATGCCAGAA ²⁾	4 µl
voda			66 µl
Celkem			100 µl

¹⁾ Jin et al. (2016); ²⁾ Čmejla et al. (2020); ³⁾ Marini et al. (2017)

3. Do stojánku se připraví 1,5ml mikrozkušavka, do které se napipetuje adekvátní množství PCR master mixu dle následující tabulky (tabulka 8).

Tabulka 8. Rozpis pro PCR master mixu pro alelickou diskriminaci

Složka	Na 1 vzorek
PCR voda	7 µl
Primer/sonda master mix	1 µl
qPCR 2x Blue Master Mix (Top-Bio)	10 µl
Celkem	18 µl

4. Do 0,1ml stripů se pipetuje 18 µl PCR master mixu.
5. K premixu se mimo PCR box postupně pipetuje 2 µl vzorku DNA.
6. Pro real-time PCR se využije zařízení Rotor-Gene Q (Qiagen) s následujícími podmínkami amplifikace: aktivace polymerázy a denaturace genomové DNA (94 °C/5 minut); 40 cyklů (94 °C/20 s; 58 °C/20 s; 72 °C/20 s) s paralelním čtením v zeleném (510 nm), žlutém (555 nm) a karmínovém (710 nm) kanálu. Výsledky se analyzují softwarem Rotor-Gene Q při použití následujících parametrů: Dynamic tube:

ANO; Slope correct: ANO; Ignore first: Fakultativně; Threshold: 0,01 a Eliminate cycles before: Dle potřeby. Výsledek je validní, pokud jsou pozitivní kontroly pozitivní v očekávaném rozmezí pro příslušnou pozitivní kontrolu a negativní kontrola je negativní.

3.2.7 SBE analýza

SBE (Single Base Extension – extenze DNA fragmentu o jednu bázi) analýza je multiplexní reakce, kterou lze uplatnit při genotypování více znaků najednou. V SBE analýze jsou pro detekci obvykle využívány markery typu SNP, nicméně je možné ji použít pro detekci inzercí či delecí, pak bývají navrženy na rozhraní mezi původní sekvencí a uvedenou mutací. Pro každý marker je navržen specifický detekční primer, jehož 3' konec bezprostředně nasedá před diagnostický SNP. Na 5' konci primeru může být připojena nekomplementární extenze. Díky této extenzi je možné primer prodloužit na požadovanou délku tak, aby bylo možné fragmenty pro různé SNP rozlišit na základě jejich délky. V reakční směsi jsou přítomny jen dideoxyribonukleotidy (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP), přičemž každý je označen jinou fluorescenční barvou. Začleněním takto značeného ddNTP za primer je polymerace ukončena. Získaná směs fragmentů prodloužených přesně o jeden fluorescenčně značený ddNTP, který odpovídá příslušnému SNP, je následně separována pomocí kapilární elektroforézy v genetickém analyzátoru, kde je detegována fluorescence a délka jednotlivých fragmentů.

Do SBE analýzy byly začleněny všechny čtyři vybrané znaky, a to barva plodů, doba sklizňové zralosti, hmotnost plodů a pevnost plodů (dle pořadí vrcholů ve výstupu SBE). Tato analýza umožňuje současnou detekci všech alel markerů ve vazbě s uvedenými znaky, a to konkrétně markeru G/T v oblasti delece 5 genů PavMyb10 s krátkou inzercí (označováno jako in/del 5x Myb) a SNP markeru G/C v pozici chr3_23939472 asociovaných s barvou plodu, SNP markeru A/G v pozici chr4_16353619 ve vazbě s dobou sklizňové zralosti, SNP markeru A/G v pozici chr2_29787028 predikujícího hmotnost plodu a SNP markeru A/T v pozici chr4_16000421 asociovaného s pevností plodu. Na základě celogenomového sekvenování byly navrženy amplifikační primery pro oblast, kde se vyskytují tyto analyzované markery. Dále byly navrženy specifické SBE primery, které detekují nukleotid v pozici vybraných markerů (zeleně je u primeru na 5' konci označena extenze):

in/del5xMyb10-b+r-PCR-F (pestrá/červená alela):

GAATAATAATTAATCACAAAAGACTATGCAC

in/del5xMyb10-y-PCR-F (žlutá alela): GAGGCAAAGAAGAAGGAAGAG

in/del5xMyb10-y+b+r-PCR-R: CTGCCAAAGACAATAGAAGAGAG

in/del5xMyb10-b+r-SBE-F (pestrá/červená alela): CTGCAGGTTGGCACCATTAC

in/del5xMyb10-y-SBE-R (žlutá alela): **TTTTT**CCAGGAGGCAGTCCAGCA

chr3_23939472-PCR-F: CCTCCATTGGGTTTTGCC

chr3_23939472-PCR-R: AAATTAGAGATAGGAAGAGGAACTG

chr3_23939472-SBE-R1: **AAAAAAA**CAAATCATCATCCAAAACCTTGAGAGA

chr3_23939472-SBE-R2: **AAAAA**CCAAATTATCATCCAAAACCTTAGGAGA

chr4_16353619-PCR-F: GATTGTCTTGTCGTTTAGGGTG
 chr4_16353619-PCR-R: TTTGTTTTTGGCCGATAGGTTCC
 chr4_16353619-SBE-F: TTTTTTTTTTTATTTGAGATCACGATCACAGTTAAT

chr2_29787028-PCR-F: GCCTCTGTTGTCAAAGAATGAG
 chr2_29787028-PCR-R: AAGCATATGGGTTTGGGATGC
 chr2_29787028-SBE-F:
 AAAAAAAAAAAAAAAAAAGCATTGTATTGGGATCAAATATACA

chr4_16000421-PCR-F: CCGCCATTTTTGAATTTTTGGGTC
 chr4_16000421-PCR-R: TCAACTACGTGTATTTGGTTTCGAA
 chr4_16000421-SBE-R: CCCCCCCTTGATGTTTTACATAGAATACATTGTGATTTAT

Pro predikci znaku barva plodu byly vybrány dva lokusy. Detekční SBE primery pro lokus v oblasti genů *PavMyb10* byly navrženy v místě zlomu inserce/delece. Byly navrženy dva SBE primery, pro žlutou a pro pestrou/červenou alelu zvlášť. Pro žlutou alelu byly navrženy primery s výslednou délkou 24 nukleotidů a pro červenou alelu byly navrženy primery s výslednou délkou 20 nukleotidů. Pro detekci SNP markeru v pozici chr3_23939472 asociovaného s druhým lokusem pro barvu byly navrženy dva SBE primery, a to z toho důvodu, že v této oblasti je více jednonukleotidových polymorfismů a bylo potřeba obsáhnout všechny alely. Tyto primery byly navrženy na výslednou délku 33 a 34 nukleotidů. SBE primer pro detekci SNP markeru v pozici chr4_16353619 pro znak doba sklizňové zralosti byl navržen s výslednou délkou 35 nukleotidů. SBE primer pro detekci SNP markeru v pozici chr2_29787028 pro znak hmotnost plodu byl navržen na výslednou délku 43 nukleotidů a SBE primer pro detekci SNP markeru v pozici chr4_16000421 pro znak pevnost plodu byl navržen na výslednou délku 41 nukleotidů. Potřebné délky extenzí, aby byly jednotlivé fragmenty snadno přiřaditelné jednotlivým markerům, byly stanoveny experimentálně.

Pro analýzu byl použit následující postup:

1. Vzorky DNA se před amplifikací naředí na koncentraci 10 ng/μl.
2. Do stojánku se připraví potřebný počet 0,2ml mikrozkušavek pro PCR reakci včetně mikrozkušavek pro NTC (netemplátovaná kontrola) a pozitivní kontrolu.
3. Do stojánku se připraví 1,5ml mikrozkušavka, do které se dle počtu reakcí napipetuje adekvátní množství PCR Primer master mixu (tabulka 9):

Tabulka 9: Rozpis pro 100 μl PCR Primer master mixu pro SBE analýzu

Primer (10μM)	Analyzovaný znak	Objem
indel5xMyb10-b+r-PCR-F	barva: pestrá/červená alela	7 μl
indel5xMyb10-y-PCR-F	barva: žlutá alela	3 μl
indel5xMyb10-y+b+r-PCR-R	barva: obě alely	5 μl
chr3_23939472-PCR-F	barva plodu	7 μl
chr3_23939472-PCR-R		7 μl
chr4_16353619-PCR-F	sklizňová zralost	3 μl
chr4_16353619-PCR-R		3 μl
chr2_29787028-PCR-F	hmotnost plodu	4 μl

chr2_29787028-PCR-R		4 µl
chr4_16000421-PCR-F		5 µl
chr4_16000421-PCR-R	pevnost plodu	5 µl
voda		47 µl
Celkem		100 µl

- Do stojánku se připraví 1,5ml mikrozkuřavka, do které se napipetuje adekvátní množství PCR master mixu dle následující tabulky (tabulka 10).

Tabulka 10. Rozpis pro PCR master mixu pro SBE analýzu

Složka	Na 1 vzorek
PCR voda	8 µl
PCR Primer master mix	1 µl
qPCR 2x Blue Master Mix (Top-Bio)	10 µl
Celkem	19 µl

- Do 0,2ml mikrozkuřavek se pipetuje 19 µl PCR master mixu.
- K premixu se mimo PCR box postupně pipetuje 1 µl vzorku DNA.
- Amplifikace DNA fragmentů probíhá v termocykleru C1000 (Biorad) s nastaveným teplotním profilem: počáteční denaturace (94 °C/5 minut); amplifikace ve 40 cyklech (95 °C/30 s, 58 °C/30 s, 72 °C/30 s); závěrečná extenze (72 °C/5 minut).
- Amplifikované fragmenty se purifikují pomocí HT ExoSAP-IT™ High-Throughput PCR Product Cleanup (Thermo Fisher Scientific) přidáním 2 µl HT ExoSAP-IT™ k 5 µl produktu PCR.
- Tato směs se inkubuje v termocykleru C1000 (Biorad) po dobu 20 minut při 37 °C a poté po dobu 20 minut při 80 °C.
- Do stojánku se připraví potřebný počet 0,2ml mikrozkuřavek pro SBE reakci včetně mikrozkuřavek pro NTC (netemplátovaná kontrola) a pozitivní kontrolu.
- Do stojánku se připraví 1,5ml mikrozkuřavka, do které se dle počtu reakcí napipetuje adekvátní množství SBE Primer master mixu (tabulka 11):

Tabulka 11: Rozpis pro 100 µl SBE Primer master mixu pro SBE analýzu

Primer (10µM)	Analyzovaný znak	Objem
indel5xMyb10-b+r-SBE-F	barva: pestrá/červená alela	6 µl
indel5xMyb10-y-SBE-R	barva: žlutá alela	3 µl
chr3_23939472-SBE-R1		5 µl
chr3_23939472-SBE-R2	barva plodu	5 µl
chr4_16353619-SBE-F	sklizňová zralost	4 µl
chr2_29787028-SBE-F	hmotnost plodu	1,5 µl
chr4_16000421-SBE-R	pevnost plodu	2,5 µl
voda		73 µl
Celkem		100 µl

- Do stojánku se připraví 1,5 ml mikrozkuřavka, do které se napipetuje adekvátní množství SBE master mixu dle následující tabulky (tabulka 12).

Tabulka 12. Rozpis pro SBE master mixu pro SBE analýzu

Složka	Na 1 vzorek
PCR voda	3 μ l
SBE Primer master mix	1 μ l
SNaPshot Multiplex Ready Reaction Mix (Thermo Fisher Scientific)	5 μ l
Celkem	9 μl

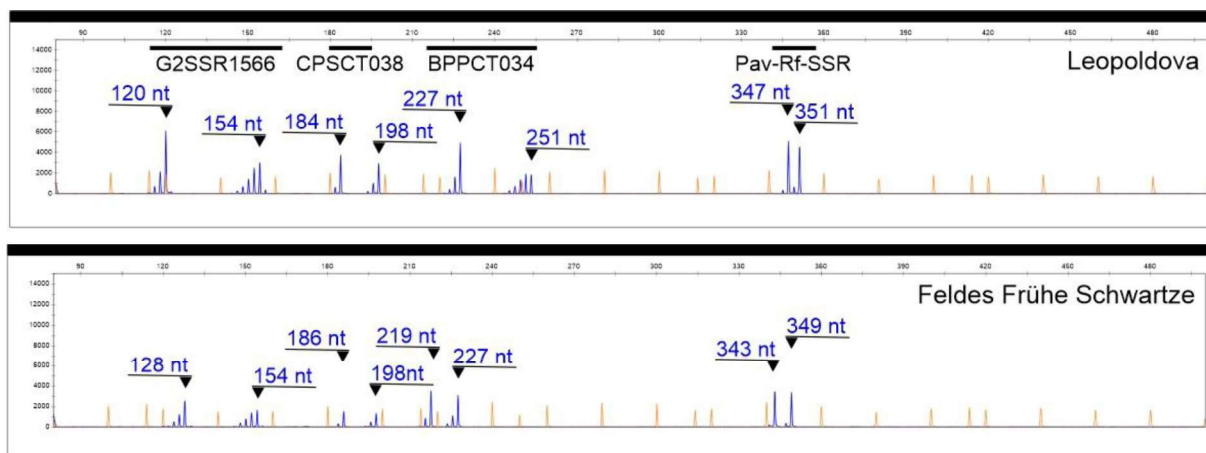
11. Do 0,2ml mikrozkušavek se pipetuje 9 μ l SBE master mixu.
12. K premixu se mimo PCR box postupně pipetuje 1 μ l purifikovaného amplifikovaného fragmentu.
13. Reakce probíhá v termocykleru C1000 (Biorad) s nastaveným teplotním profilem: amplifikace ve 4 cyklech (96 °C/10 s, 50 °C/5 s, 60 °C/30 s).
14. Po ukončení reakce se produkty znovu purifikují tak, že se 1 μ l enzymu SAP (Thermo Fisher Scientific) přidá k 10 μ l produktu SBE reakce.
15. Připravená směs se inkubuje v termocykleru 1 hodinu při 37 °C a poté 15 minut při 75 °C.
16. Vzorky se připraví k analýze pomocí genetického analyzátoru tak, že se nejprve vytvoří směs 9 μ l Hi-Di formamidu a 0,2 μ l velikostního standardu GeneScan 120 LIZ dye (oba Thermo Fisher Scientific) a k této směsi se přidá 1 μ l analyzovaného vzorku.
17. Připravené vzorky se před samotnou analýzou denaturují po dobu 5 minut při 95 °C v termocykleru, SBE analýza se provede na genetickém analyzátoru ABI PRISM 3500 (Thermo Fisher Scientific) s firemním nastavením.

3.3 Vyhodnocení a interpretace dat

Pro správnou interpretaci dat je nezbytné využít kontrolní odrůdy, a to zejména v případě fragmentačních analýz. Vyhodnocení výsledků bude provedeno nejprve podle použitých metod pro analýzu jednotlivých markerů, jelikož některé přístupy analyzují markery pro více vlastností najednou. Následně bude učiněno shrnutí výsledků podle jednotlivých analyzovaných znaků a doporučení pro výběr vhodného markeru a metody jeho analýzy. Pokud bylo provedeno statistické porovnání fenotypů alelických kombinací daného markeru, byl proveden nejprve test shodnosti rozptylů (F-test) a následně studentův t-test v programu Excel (verze 2013).

3.3.1 Vyhodnocení fragmentační analýzy

Fragmentační analýzou mohou být najednou hodnoceny tři dříve publikované SSR markery pro velikost plodů (G2SSR1566, CPSCT038 a BPPCT034) a jeden SSR marker asociovaný s barvou plodů (Pav-Rf-SSR). Do vyhodnocení byly zařazeny pouze odrůdy s alelami, ke kterým byla dříve přiřazena velikost plodů. Všechny SSR markery jsou odečítány v modrém kanálu a ve výstupu se může objevit až 8 majoritních vrcholů. Některé tyto SSR markery vykazují poměrně vysoký tzv. „stutter“, tj. fragmenty kratší o 2 nt zpravidla s nižší výškou signálu. Ty vznikají skluzem polymerázy při PCR. Hlavním faktorem, který ovlivňuje vznik stutteru, je délka repetice a její sekvence, tento fenomén nelze reakčními podmínkami příliš ovlivnit. Ukázky výstupu fragmentační analýzy jsou na obrázku 4.



Obrázek 4: Příklady výstupu fragmentační analýzy u dvou odrůd, modrý kanál. Marker G2SSR1566 se odečte v analyzované oblasti cca 115 až 160 nukleotidů (nt), CPSCT038 spadá do oblasti cca 180 až 200 nt, BPPCT034 má velikost v rozmezí cca 215 až 255 nt a Pav-Rf-SSR lze identifikovat ve velikostním pásmu cca 340-355 nt. Oranžové vrcholky představují velikostní marker.

Na základě analýzy kontrolních odrůd (viz kapitola 3.1) se provede převod výstupních hodnot z fragmentačních analýz na publikované velikosti příslušných markerů, aby bylo možné predikovat fenotyp sledovaného znaku (uvedeno v tabulkách níže). Jelikož o změně délky fragmentů rozhodují podmínky kapilární elektroforézy či použitý typ značení primeru, jsou tyto posuny individuální pro každou laboratoř a nelze se tedy spoléhat na hodnoty uvedené v této metodice. Tyto posuny nemusí být pro analyzovaný marker konstantní a mohou se lišit i s délkou jednotlivých alel.

Pro zhodnocení vlivu alelických sestav jednotlivých markerů na patřičný fenotyp byla provedena analýza více jak 100 odrůd z genofondové sbírky VŠÚO Holovousy, které nesly alely jednotlivých markerů asociované s fenotypovou hodnotou příslušného znaku. Odrůdy nesoucí alely s nejasným vlivem na fenotyp byly z analýzy vyřazeny.

Statistické vyhodnocení markeru G2SSR1566 – velikost plodů

Byla zkoumána asociace markeru G2SSR1566 s šířkou a hmotností plodů. V testované kolekci odrůd byly nalezeny alely 225; 228 a 250 dříve spojené s určitou velikostí plodů, a to v následujících kombinacích: 225/225; 225/250; 225/228; 250/250; 228/250 a 228/228.

Tabulka 13: Analýza šířky plodů (mm) podle markeru G2SSR1566

Alelické kombinace G2SSR1566						
Délka (nt) dle publikované literatury ¹⁾	225/225	225/250	225/228	250/250	228/250	228/228
Délka (nt) dle této metodiky	120/120	120/154	120/128	154/154	128/154	128/128
Počet vzorků	54	34	16	1	5	1
Průměr (mm)	24,09	22,24	22,21	19,99	18,51	19,4
SD	2,27	1,90	1,68	0	1,64	0
Variační koeficient	0,09	0,09	0,08	0	0,09	0
Minimum (mm)	18,28	18,58	19,47	19,99	16,59	19,4
Maximum (mm)	28,05	27,176	26,69	19,99	20,74	19,4

¹⁾ De Franceschi et al. (2013)

Tabulka 14: Analýza hmotnosti plodů (g) podle markeru G2SSR1566

Alelické kombinace G2SSR1566						
Délka (nt) dle publikované literatury ¹⁾	225/225	225/250	225/228	250/250	228/250	228/228
Délka (nt) dle této metodiky	120/120	120/154	120/128	154/154	128/154	128/128
Počet vzorků	54	34	16	1	5	1
Průměr (g)	6,95	5,67	5,59	4,39	3,77	3,77
SD	1,63	1,27	0,97	0	1,07	0
Variační koeficient	0,23	0,22	0,17	0	0,28	0
Minimum (g)	3,17	3,88	4,13	4,39	2,55	3,77
Maximum (g)	10,98	9,82	8,19	4,39	5,63	3,77

¹⁾ De Franceschi et al. (2013)

Závěr pro analýzu G2SSR1566: Na základě provedených analýz a údajů z literatury se doporučuje pozitivní selekce semenáčů obsahujících alespoň jednu alelu s velikostí 225 nt, ideálně homozygotů 225/225. Ti vykazují v průměru téměř o 2 mm (téměř 1,3 g) větší šířku (hmotnost) než heterozygoti obsahující alelu 225 v kombinaci s jinou alelou ($p=1,53 \times 10^{-5}$ pro velikost a $p=1,16 \times 10^{-5}$ pro hmotnost). Tito heterozygoti jsou pak v průměru o více než 2 mm širší a o 1-2 gramy těžší než ostatní kombinace alel, ty však byly zastoupeny pouze malým počtem vzorků.

Statistické vyhodnocení markeru CPSCT038 – velikost plodů

Marker CPSCT038 je také možné využít pro predikci šířky a hmotnosti plodů. V analyzovaných odrůdách byly nalezeny čtyři alely dříve asociované s velikostí plodů (190; 192; 202 a 204) a jejich následující kombinace: 190/190; 190/192; 190/202; 190/204; 204/204 a 192/204.

Tabulka 15: Analýza šířky plodů (mm) podle markeru CPSCT038

Alelické kombinace CPSCT038						
Délka (nt) dle publikované literatury ^{1,2)}	190/190	190/192	190/202	190/204	204/204	192/204
Délka (nt) dle této metodiky	184/184	184/186	184/196	184/198	198/198	186/198
Počet vzorků	49	18	3	33	3	5
Průměr (mm)	24,26	22,22	22,35	22,02	21,53	19,53
SD	2,3	1,81	1,14	2,09	1,65	1,72
Variační koeficient	0,09	0,08	0,05	0,1	0,08	0,09
Minimum (mm)	18,28	19,4	21,24	16,59	19,99	16,7
Maximum (mm)	28,05	26,69	23,91	27,18	23,83	21,72

¹⁾ Rosyara et al. (2013)

Tabulka 16: Analýza hmotnosti plodů (g) podle markeru CPSCT038

Alelické kombinace CPSCT038						
Délka (nt) dle publikované literatury ¹⁾	190/190	190/192	190/202	190/204	204/204	192/204
Délka (nt) dle této metodiky	184/184	184/186	184/196	184/198	198/198	186/198
Počet vzorků	49	18	3	33	3	5
Průměr (g)	7,1	5,65	4,91	5,59	4,99	4,23
SD	1,63	1,06	0,65	1,36	0,86	0,93
Variační koeficient	0,23	0,19	0,13	0,24	0,17	0,22
Minimum (g)	3,17	3,77	4,13	2,55	4,37	2,98
Maximum (g)	10,98	8,19	5,72	9,82	6,21	5,63

¹⁾ Rosyara et al. (2013)

Závěr pro analýzu CPSCT038: Na základě provedených analýz a údajů z literatury se doporučuje pozitivní selekce semenáčů obsahujících alespoň jednu alelu s velikostí 190 nt, ideálně homozygotů 190/190. Tito homozygoté jsou v průměru o 2 a více mm širší než ostatní kombinace s alelou 190 ($p=1,66 \times 10^{-6}$) a zároveň jsou o téměř 1,5 a více g těžší ($p=6,43 \times 10^{-7}$).

Statistické vyhodnocení markeru BPPCT034 – velikost plodů

Byla vyhodnocena asociace SSR markeru BPPCT034 s šířkou plodů a hmotností. V testované kolekci odrůd byly pozorovány alely 223; 225; 235; 237 a 255 dříve asociované s velikostí plodů, a to v následujících kombinacích: 223/237; 237/255; 255/255; 235/235; 223/255; 235/255; 225/255; 235/237; 225/235 a 223/235.

Tabulka 17: Analýza šířky plodů (mm) podle markeru BPPCT034

Alelické kombinace BPPCT034										
Délka (nt) dle publikované literatury ¹⁾	223/237	237/255	255/255	235/235	223/255	235/255	225/255	235/237	225/235	223/235
Délka (nt) dle této metodiky	217/229	229/251	251/251	227/227	217/251	227/251	219/251	227/229	219/227	217/227
Počet vzorků	2	2	39	2	23	30	5	1	1	6
Průměr (mm)	24,8	24,72	24,56	22,93	22,4	22	21,42	20,77	20,62	19,62
SD	0,63	0	2,12	2,93	1,95	1,97	0,62	0	0	2,64
Variační koeficient	0,03	0	0,09	0,13	0,09	0,09	0,03	0	0	0,13
Minimum (mm)	24,17	24,71	18,7	19,99	19,4	18,28	20,24	20,77	20,62	16,59
Maximum (mm)	25,43	24,72	28,05	25,86	26,69	27,18	22,06	20,77	20,62	23,68

¹⁾ Rosyara et al. (2013)**Tabulka 18:** Analýza hmotnosti plodů (g) podle markeru BPPCT034

Alelické kombinace BPPCT034										
Délka (nt) dle publikované literatury ¹⁾	223/237	237/255	255/255	235/235	235/255	223/255	225/255	235/237	225/235	223/235
Délka (nt) dle této metodiky	217/229	229/251	251/251	227/227	217/251	227/251	219/251	227/229	219/227	217/227
Počet vzorků	2	2	39	2	30	23	5	1	1	6
Průměr (g)	7,21	7,02	7,28	6,20	5,55	5,72	5,28	4,37	4,94	4,38
SD	0,06	0,77	1,62	1,81	1,26	1,18	0,56	0	0	1,65
Variační koeficient	0,01	0,11	0,22	0,29	0,23	0,21	0,11	0	0	0,38
Minimum (g)	7,16	6,24	3,17	4,39	3,43	3,77	4,39	4,37	4,94	2,55
Maximum (g)	7,27	7,79	10,98	8,02	9,82	8,19	6,01	4,37	4,94	7,29

¹⁾ Rosyara et al. (2013)

Závěr pro analýzu BPPCT034: Na základě provedených analýz a údajů z literatury se doporučuje pozitivní selekce semenáčů obsahujících alespoň jednu alelu s velikostí 237 nebo 255 nt. Ideální z pohledu tohoto markeru jsou homozygoté 237/237 (neidentifikováno v analyzovaném souboru) a 255/255, popřípadě heterozygoté 237/255, kteří průměrně vykazují alespoň o 1,5 mm větší šířku ($p=1,02 \times 10^{-8}$) a 1 gram větší hmotnost než všechny ostatní alelické varianty ($p=1,27 \times 10^{-8}$). Největší průměr plodů a druhou nejvyšší hmotnost vykazuje v těchto výsledcích kombinace 223/237, hodnoceny však byly pouze dva vzorky s touto kombinací alel a nelze tak u ní činit rozsáhlejší závěry.

Statistické vyhodnocení markeru Pav-Rf-SSR – barva plodů

Pro statistické vyhodnocení asociace barvy plodu a SSR markeru Pav-Rf-SSR byly použity alely 351; 357 a 361 dříve asociované s určitou barvou plodů, ostatní alely jsou neinformativní. Hodnoceny byly kombinace obsahující alespoň jednu alelu 351 nebo 361, druhá byla libovolná (dominance alel 351 a 361), respektive kombinace 357/357 nezbytná pro pestrou až světle červenou barvu třešní.

Tabulka 19: Analýza barvy plodů podle markeru Pav-Rf-SSR (stupnice 1-9: 1: žluté; 1,01-5: pestré až světle červené; 5,01-9: tmavě červené až černé)

Alelické kombinace Pav-Rf-SSR					
Délka (nt) dle publikované literatury ¹⁾	351/x	361/x	(351/x) + (361/x) ^{*)}	357/357	ostatní kombinace
Délka (nt) dle této metodiky	343/x	353/x	(343/x) + (353/x)	349/349	ostatní
Počet vzorků	14	40	50	26	70
Průměr	7,96	7,98	7,96	4,72	6,19
SD	0,55	1,2	1,1	2,21	2,41
Variační koeficient	0,07	0,15	0,14	0,47	0,39
Minimum	7	3	3	3	1
Maximum	9	9	9	8,75	9

¹⁾ Sandefur et al. (2016)

^{*)} Souhrnná kategorie zahrnující podle dostupné literatury (Sandefur, 2016) všechny červené třešně.

x=libovolná alela

Přestože je barva plodů hodnocena subjektivně, existují hranice rozdělující jednotlivé barevné typy třešní (hodnocení škálou 1-9: 1=žluté třešně; 2-5=pestré až světle červené třešně; 6-9=tmavě červené až černé třešně, více viz Holušová, 2023). Proto je u tohoto znaku možné kromě statistického vyhodnocení jednotlivých markerů provést i analýzu spolehlivosti predikce jednotlivých markerů.

Vyhodnocení spolehlivosti predikce barvy podle Pav-Rf-SSR

Tabulka 20: Korelace alelické kombinace Pav-Rf-SSR a barvy plodu – absolutní počty

Barva vs. genotyp (n=146)			
	žluté	pestré až světle červené	tmavě červené až černé
(351/x) + (361/x) ^{*)}	0	2	48
357/357	0	17	9
ostatní kombinace	4	20	46
Celkem	4	39	103

^{*)} Souhrnná kategorie zahrnující podle dostupné literatury (Sandefur, 2016) všechny červené třešně.

x=libovolná alela

Tabulka 21: Korelace barvy plodu a alelické kombinace Pav-Rf-SSR – relativně

Podmíněnost barvy plodu alelickou kombinací Pav-Rf-SSR (%)			
	žluté n=4	pestré až světle červené n=39	tmavě červené až černé n=103
(351/x) + (361/x)*)	0	5,13	46,6
357/357	0	43,59	8,74
ostatní kombinace	100	51,28	44,66
Celkem	100	100	100

*) Souhrnná kategorie zahrnující podle dostupné literatury (Sandefur, 2016) všechny červené třešně.
x=libovolná alela

Tabulka 22: Korelace alelické kombinace a barvy plodu Pav-Rf-SSR – relativně

Alelické kombinace Pav-Rf-SSR – predikovatelnost barvy (%)			
	(351/x) + (361/x)*) n=50	357/357 n=26	ostatní kombinace n=70
žluté	0	0	5,71
pestré až světle červené	4	65,38	28,57
tmavě červené až černé	96	34,62	65,72
Celkem	100	100	100

*) Souhrnná kategorie zahrnující podle dostupné literatury (Sandefur, 2016) všechny červené třešně.
x=libovolná alela

Závěr pro analýzu Pav-Rf-SSR: Marker je vhodný pro selekci třešní s červenou barvou plodů (výskyt dominantní alely 351 a 361), kde v genofondové sbírce VŠÚO vykázal 96% spolehlivost predikce této barvy (průměrná hodnota fenotypu 7,96). Spolehlivější se jeví alela 351, při jejím výskytu byla barva plodů daného genotypu hodnocena nejméně hodnotou 7. Naopak podmíněnost genetické predeterminace pestré barvy plodů homozygotním výskytem 357/357 (Sandefur, 2026) nebyla potvrzena, jedna třetina vzorků s touto alelickou kombinací vykazovala červenou barvu třešní a naopak pouze 43,59 % třešní s pestrými plody mělo tuto alelickou kombinaci předpokládanou pro pestré třešně. Navíc nebylo u téměř poloviny vzorků možné podle tohoto markeru barvu predikovat, neboť v nich obsažené alely nebyly asociované s žádnou barvou plodů.

3.3.2 Vyhodnocení sekvenování promotoru genu *PavCNR12*

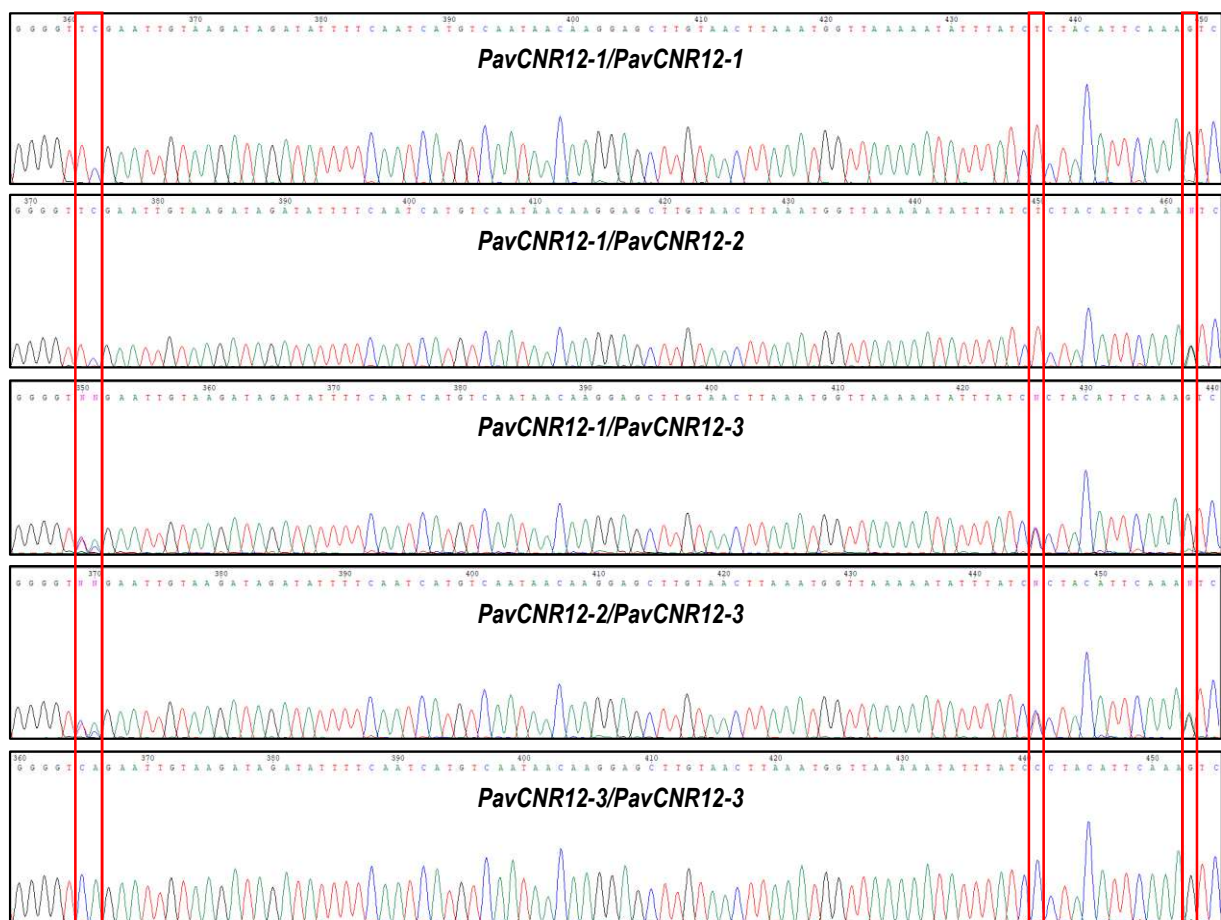
Metoda sekvenování se výhodně používá pro charakterizaci jednotlivých variant promotoru genu *PavCNR12*, které byly asociovány s velikostí plodů. Jednotlivé alely promotoru genu *PavCNR12* se totiž liší několika bodovými mutacemi, pro zjištění typu alely je třeba zhodnotit více polymorfních míst (obrázky 5-8). Ve vzácných případech nelze vyloučit přítomnost i dalších mutací, jejich vliv na velikost plodů však nebyl stanoven (vyřazeny z analýzy). Jako referenční pro oba sekvenované fragmenty C1 a C2 jsou používány sekvence z databáze GenBank s čísly KC139086 (*PavCNR12-1*), KC139087 (*PavCNR12-2*) a

KC139088 (*PavCNR12-3*).| Polymorfizmy mezi těmito sekvencemi jsou uvedeny v tabulce 23 níže.

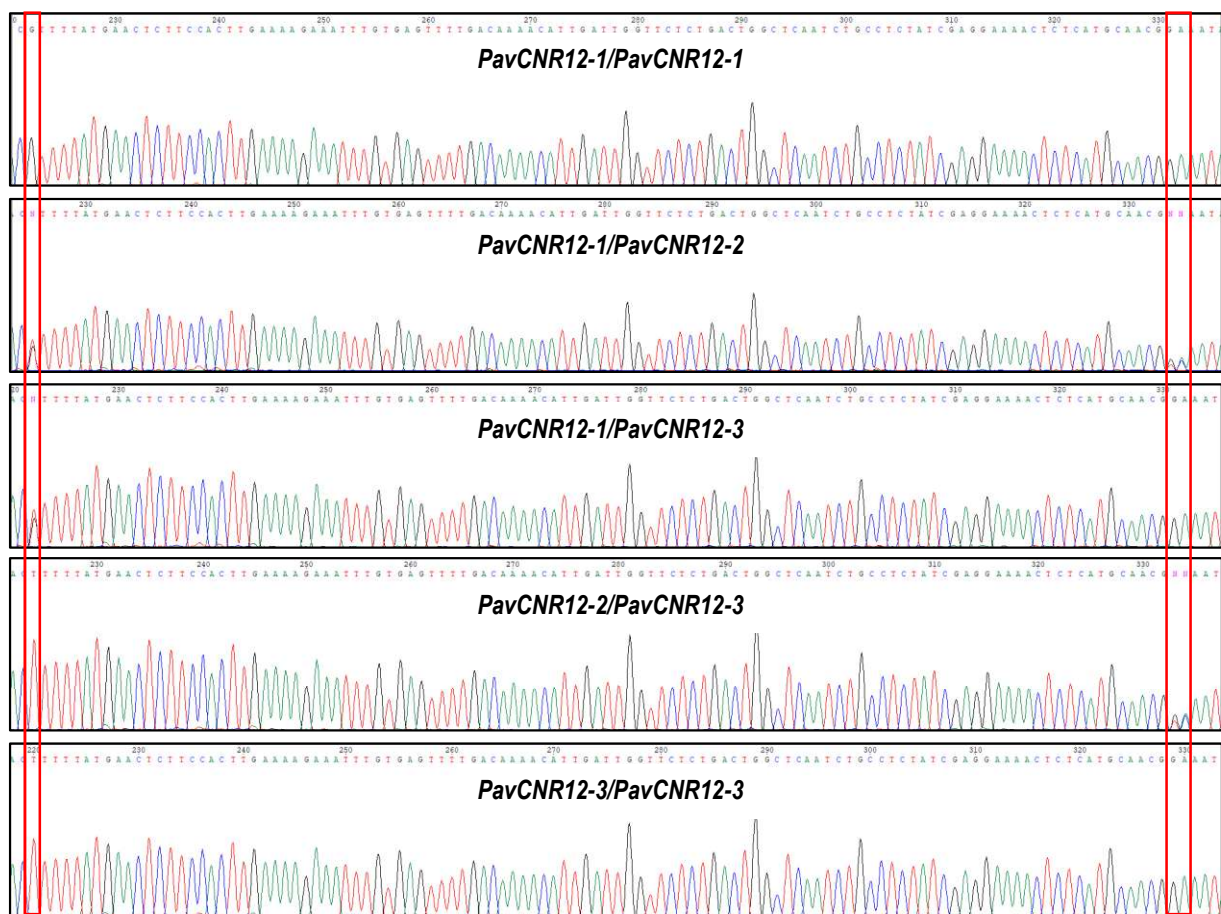
Tabulka 23: Polymorfizmy v jednotlivých alelách promotoru genu *PavCNR12* (nukleotid odlišující danou alelu od ostatních je uveden tučným červeným písmem).

Nukleotid	<i>PavCNR12-1</i>	<i>PavCNR12-2</i>	<i>PavCNR12-3</i>
394	T	T	C
395	C	C	A
470	T	T	C
482	G	A	G
844	G	T	T
953	G	T	G
954	A	C	A
1049	A	T	T
1169	G	C	C
1194	C	T	T

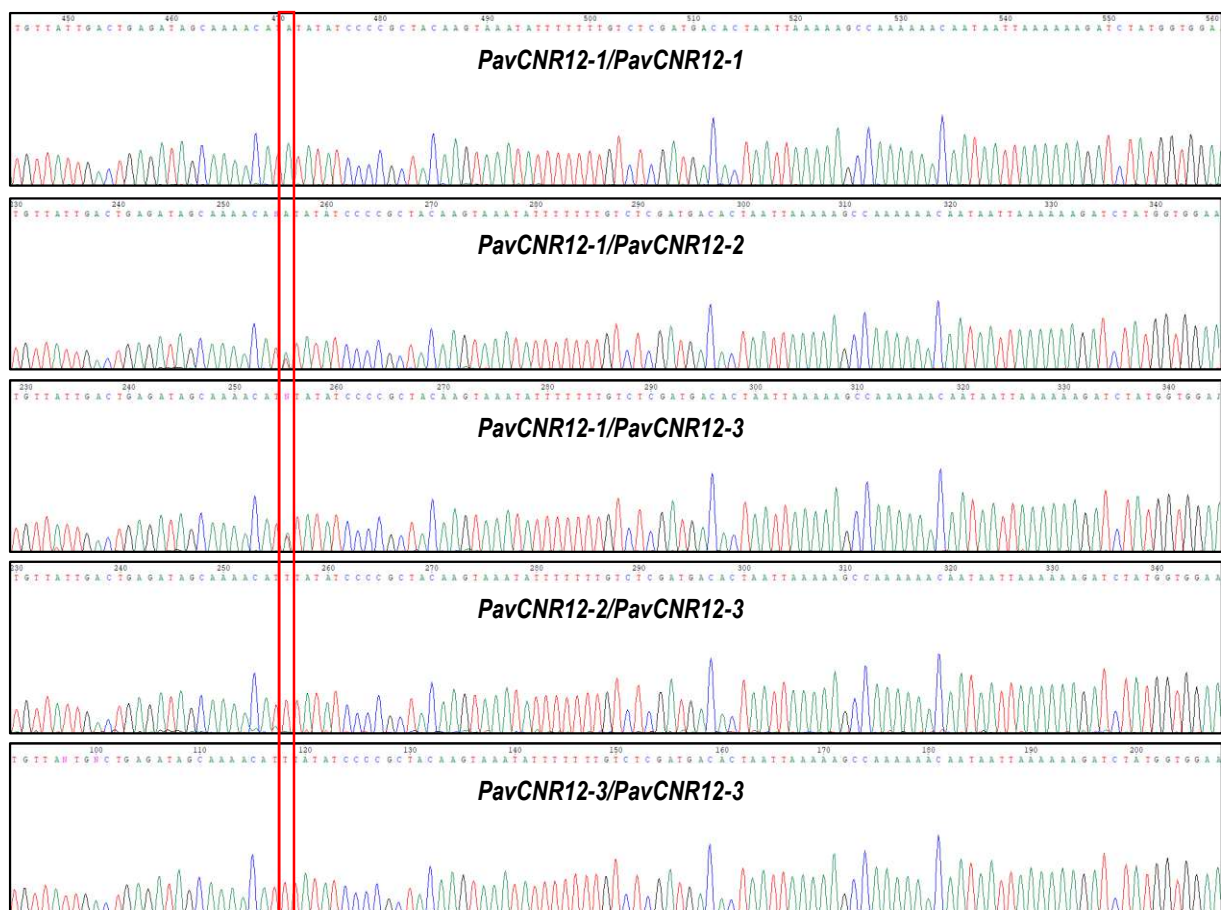
Jak vyplývá z tabulky 23 výše, jednoznačnou přítomnost alely *PavCNR12-1* lze zjistit analýzou nukleotidů 844 (G), 1049 (A), 1169 (G), respektive 1194 (C). Alela *PavCNR12-2* se vyznačuje nukleotidem A v pozici 482, respektive sekvencí TC v pozici 953-954. Alelu *PavCNR12-3* je pak možné diagnostikovat na základě výskytu nukleotidů CA v pozici 394+395 a C coby nukleotidu 470. Pro identifikaci alely promotoru genu *PavCNR12* je při hodnocení vhodné využívat více nukleotidů ve výše uvedených pozicích, na všech obrázcích níže jsou uvedeny sekvence ve směru forward, přestože některé byly sekvenovány z reverzního primeru.



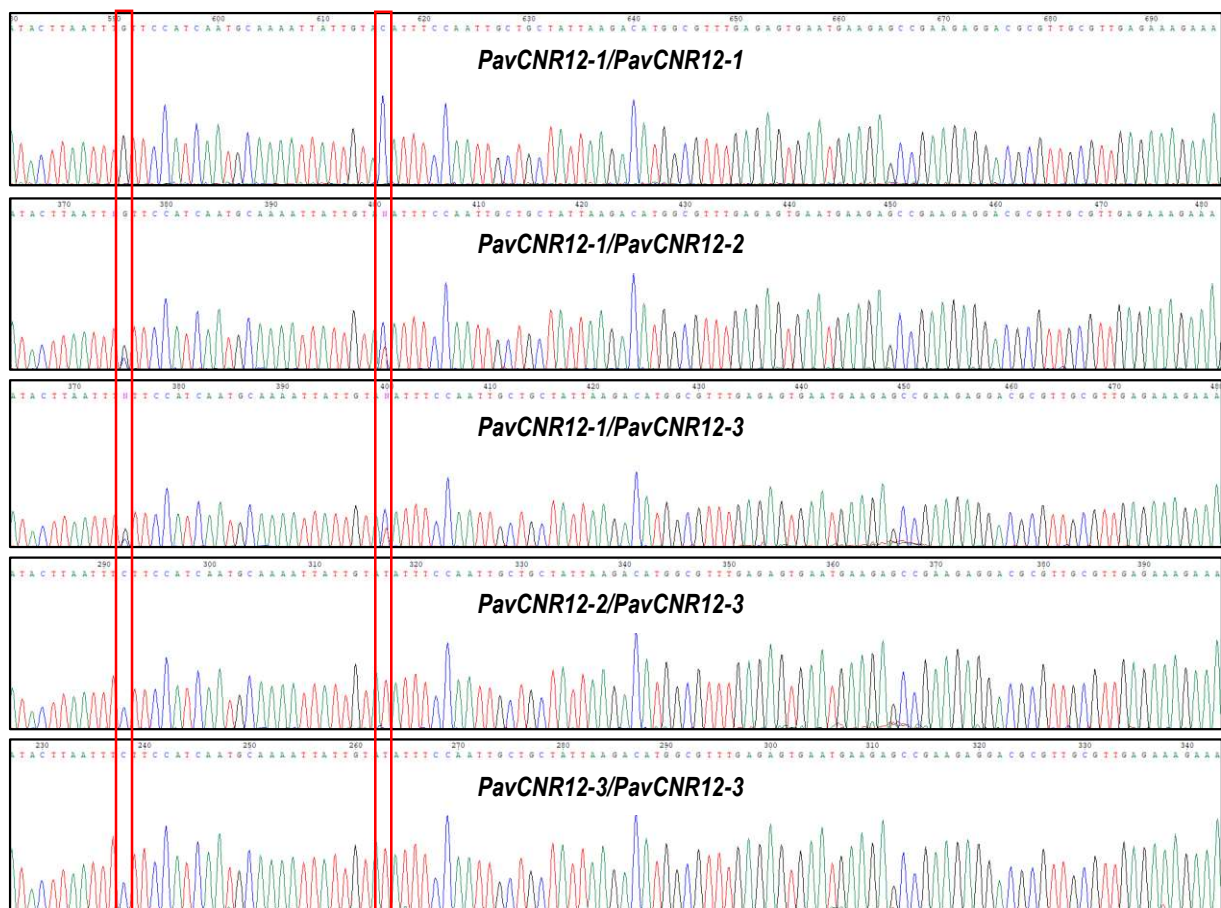
Obrázek 5: Sekvence fragmentu PavCNR12-C1 – nukleotidy 394+395, 470 a 482 (červené obdélníky). Polymorfismus lze nalézt v nukleotidech 394+395, 470, respektive 482 sekvencí jednotlivých alel promotoru *PavCNR12* (čísla v databázi GenBank KC139086, KC139087 a KC139088 pro alely *PavCNR12-1*, *PavCNR12-2*, respektive *PavCNR12-3*). Alela *PavCNR12-1* vykazuje v pozicích 394 a 395 nukleotidy tymin (T) a cytosin (C), v pozici 470 obsahuje T a nukleotid 482 se prezentuje jako guanin (G). Alela *PavCNR12-2* má stejně jako varianta *PavCNR12-1* v pozicích 394 a 395 nukleotidy T a C a v pozici 470 T, odlišuje se v pozici 482 přítomností adeninu (A). Naopak alela *PavCNR12-3* se odlišuje od zbylých dvou alel v pozicích 394 a 395, které tvoří nukleotidy CA, a v pozici 470, která vykazuje C, nukleotid 482 je G stejně jako u alely *PavCNR12-1*. Kombinace *PavCNR12-2/PavCNR12-2* nebyla pro sekvenaci k dispozici.



Obrázek 6: Sekvence fragmentu *PavCNR12-C2* – nukleotidy 844 a 953+954 (červené obdélníky). Je znázorněn polymorfismus v nukleotidech 844, respektive 953+954 sekvencí jednotlivých alel promotoru *PavCNR12* (čísla v databázi GenBank KC139086, KC139087 a KC139088 pro alely *PavCNR12-1*, *PavCNR12-2*, respektive *PavCNR12-3*). Alela *PavCNR12-1* má v pozici 844 nukleotid G a v pozicích 953+954 obsahuje GA. Alela *PavCNR12-2* vykazuje v pozici 844 nukleotid T a nukleotidy 953+954 jsou na rozdíl od ostatních variant TC. Konečně alela *PavCNR12-3* má v pozici 844 nukleotid T, v pozicích 394 a 395 se shoduje s *PavCNR12-1* (nukleotidy GA). Kombinace *PavCNR12-2/PavCNR12-2* nebyla k dispozici.



Obrázek 7: Sekvence fragmentu PavCNR12-C2 – nukleotid 1049 (červený obdélník). Polymorfismus nukleotidu 1049 sekvencí jednotlivých alel promotoru *PavCNR12* (čísla v databázi GenBank KC139086, KC139087 a KC139088 pro alely *PavCNR12-1*, *PavCNR12-2*, respektive *PavCNR12-3*). Alela *PavCNR12-1* má v pozici 1049 nukleotid A, varianty *PavCNR12-2* a *PavCNR12-3* zde mají nukleotid T. Kombinace *PavCNR12-2/PavCNR12-2* nebyla k dispozici.



Obrázek 8: Sekvence fragmentu PavCNR12-C2 – nukleotidy 1169 a 1194 (červené obdélníky). Polymorfismus nukleotidů 1169 a 1194 sekvencí jednotlivých alel promotoru *PavCNR12* (čísla v databázi GenBank KC139086, KC139087 a KC139088 pro alely *PavCNR12-1*, *PavCNR12-2*, respektive *PavCNR12-3*). Alela *PavCNR12-1* obsahuje v pozici 1169 nukleotid G a v pozici 1194 nukleotid C, varianty *PavCNR12-2* a *PavCNR12-3* vykazují v těchto pozicích nukleotid C, respektive T. Kombinace *PavCNR12-2/PavCNR12-2* nebyla k dispozici.

Pro zhodnocení vlivu alelické sestavy promotoru genu *PavCNR12* na velikost plodů byla provedena analýza 111 odrůd z genofondové sbírky VŠÚO Holovousy. Použity byly stejné odrůdy jako pro analýzu SSR markerů asociovaných s velikostí plodů.

Statistické vyhodnocení markeru promotoru CNR12 – velikost plodů

Pro statistické vyhodnocení byly použity pouze odrůdy vykazující alely promotoru *PavCNR12-1* (predikovány největší plody), *PavCNR12-2* a *PavCNR12-3* (nejmenší plody). Velmi vzácně (zejména plané třešně) byly v sekvenovaných fragmentech nalezeny i další mutace, tyto genotypy byly ze všech analýz vyloučeny.

Tabulka 24: Analýza šířky plodů (mm) podle markeru CNR12

Alelické kombinace promotoru CNR12 (dle de Franceschi, 2013)						
	1/1	1/2	1/3	2/2	3/3	2/3
Počet vzorků	55	33	16	1	1	5
Průměr (mm)	24,18	22,13	21,77	19,99	19,40	18,51
SD	2,29	1,82	1,28	0	0	1,64
Variační koeficient	0,09	0,08	0,06	0	0	0,09
Minimum (mm)	18,28	18,58	19,47	19,99	19,40	16,59
Maximum (mm)	28,05	27,18	23,65	19,99	19,40	20,74

Tabulka 25: Analýza hmotnosti plodů (g) podle markeru CNR12

Alelické kombinace promotoru CNR12 (dle de Franceschi, 2013)						
	1/1	1/2	1/3	2/2	3/3	2/3
Počet vzorků	55	33	16	1	1	5
Průměr (g)	6,99	5,62	5,37	4,39	3,77	3,77
SD	1,66	1,19	0,75	0	0	1,07
Variační koeficient	0,24	0,21	0,14	0	0	0,28
Minimum (g)	3,17	3,88	4,13	4,39	3,77	2,55
Maximum (g)	10,98	9,82	6,48	4,39	3,77	5,63

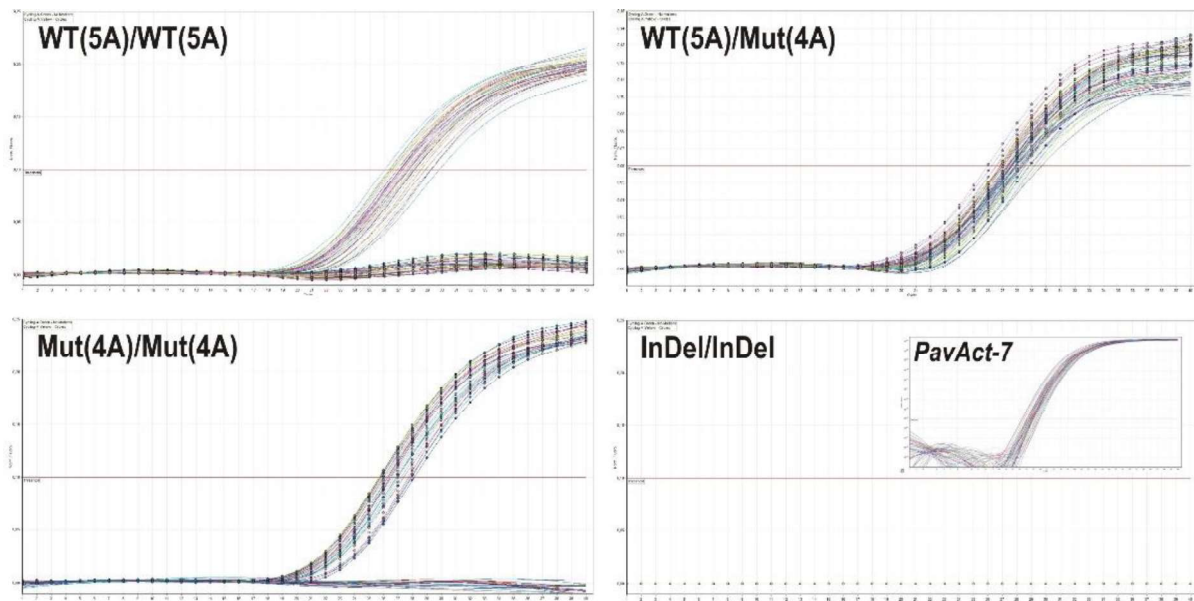
Závěr pro analýzu promotoru CNR12: Na základě provedených analýz a údajů z literatury se doporučuje pozitivní selekce semenáčů obsahujících alespoň jednu alelu *PavCNR12-1*, ideální je vybírat semenáče s homozygotní sestavou *PavCNR12-1/PavCNR12-1*, které mají průměrně o 2 mm širší plody ($p=4,11 \times 10^{-5}$) a téměř o 1,4 g těžší plody ($2,51 \times 10^{-5}$) než druhá nejlepší kombinace *PavCNR12-1/PavCNR12-2*.

3.3.3 Vyhodnocení alelické diskriminace *PavMyb10.1*

Přítomnost deleční mutace v genu *PavMyb10.1* je využívána pro predikci barvy plodů a je jednoduše detekována metodou alelické diskriminace. Ta byla popsána v publikaci Čmejla et al. (2021).

Alelická diskriminace je vyhodnocena podle relativních hodnot fluorescence dosažených v jednotlivých detekčních kanálech. Pokud amplifikační křivka překoná nastavenou hranici pouze v kanálu pro detekci 6-FAM, pak vzorek obsahuje *PavMyb10.1* pouze ve variantě WT a dle prvotní publikované literatury by se mělo jednat o třešeň s červenými plody (Jin, 2016). Detekce pouze amplikonů značených HEX značí přítomnost výhradně alely s delecí jednoho adeninu, plody by podle primárního zdroje popisujícího tuto mutaci měly být pestré. V případě nulové detekce signálu 6-FAM i HEX je třeba prověřit detekční kanál pro IRDye700, ve kterém je detekován amplikon kontrolního genu *PavAct-7*. Pokud amplifikace překonala nastavenou hranici, pak vzorek obsahuje pouze DNA s deletovanou oblastí, ve které

se nachází analyzovaný gen *PavMyb10.1*, a plody této třešně budou žluté. V kombinaci s metodou relativní kvantifikace umožňuje postup i stanovení deletované alely v heterozygotním uspořádání. Vyhodnocení je založeno na porovnání rozdílů hodnot Ct pro 6-FAM – IRDye700 (v případě možné kombinace InDel alely s 5A alelou naznačuje rozdíl vyšší nebo roven 2,79 heterozygota), respektive HEX - IRDye700 (v případě možné kombinace InDel alely s 4A alelou predikuje rozdíl vyšší nebo roven 2,36 heterozygota), spolehlivost určení správného genotypu je cca 90 % (Čmejla, 2021). V případě, že je IRDye700 negativní, je třeba analýzu zopakovat, neboť tento vzorek neobsahoval detekovatelnou DNA. Ukázky výstupů alelické diskriminace jsou na obrázku 9.



Obrázek 9: Výstupy z alelické diskriminace alel *PavMyb10.1*. Hladké křivky reprezentují fluorescenci 6-FAM, tedy WT alelu s 5A, křivky s kroužky pak fluorescenci HEX značící přítomnost alely s delecí 1 adeninu (4A). Obrázek vlevo nahoře tak reprezentuje vzorky s potenciálně červenými plody, vlevo dole s pestrými plody. Vpravo nahoře jsou zachyceni heterozygoté 4A/5A, vpravo dole pak vzorky neobsahující ani alelu 4A, ani alelu 5A a s úspěšnou amplifikací *aktinu* 7 (ve výřezu), u těch je předpokládána žlutá barva plodů (Čmejla, 2021).

Statistické vyhodnocení markeru *PavMyb10.1*- barva plodů

Marker *PavMyb10.1* se podle dostupné literatury (Jin, 2016) ve výsledném hodnocení prezentuje ve třech možných formách: 1/ zcela dominantní alela 5A asociovaná s červenou barvou plodů, 2/ alela 4A, která by měla v homozygotním uspořádání, případně v kombinaci s delecí variantou, predikovat pestrou barvu třešní a 3/ nulová amplifikace *PavMyb10.1*, která je v homozygotní sestavě podmínkou žluté barvy třešní, nezbytná je však současná amplifikace kontrolního genu *PavAct-7*. Odhalení kombinací alel 4A, respektive 5A s deletovanou alelou je problematické.

Tabulka 26: Analýza barvy plodů podle markeru *PavMyb10.1*

(stupnice 1-9: 1: žluté; 1,01-5: pestré až světle červené; 5,01-9: tmavě červené až černé, použity stejné vzorky jako pro fragmentační analýzu Pav-Rf-SSR)

Alelické kombinace Myb10.1				
	4A	4A/5A	5A	Negativní pro 4A i 5A
Počet vzorků	21	60	61	4
Průměr	3,36	6,47	8,02	1
SD	1,06	2,03	0,89	0
Variační koeficient	0,32	0,31	0,11	0
Minimum	3	3	3	1
Maximum	8,25	8,75	9	1

Vzhledem k jasné dané hranici mezi jednotlivými hodnoceními barvy plodů byla i u tohoto markeru provedena analýza spolehlivosti predikce.

Vyhodnocení spolehlivosti predikce barvy podle PavMyb10.1

Tabulka 27: Korelace alelické kombinace a barvy plodu podle PavMyb10.1- absolutní počty

Barva vs. genotyp (n=146)			
	žluté	pestré až světle červené	tmavě červené až černé
negativní pro 4A a 5A	4	0	0
4A	0	20	1
4A/5A	0	18	42
5A	0	1	60
Celkem	4	39	103

Tabulka 28: Korelace barvy plodu a alelické kombinace podle PavMyb10.1 – relativně

Podmíněnost barvy plodu alelickou kombinací PavMyb10.1 (%)			
	žluté n=4	pestré až světle červené n=39	tmavě červené až černé n=103
negativní pro 4A a 5A	100	0	0
4A	0	51,29	0,97
4A/5A	0	46,15	40,78
5A	0	2,56	58,25
Celkem	100	100	100

Tabulka 29: Korelace alelické kombinace a barvy plodu podle *PavMyb10.1* – relativně

Alelické kombinace <i>PavMyb10.1</i> – predikovatelnost barvy (%)				
	Negativní pro 4A a 5A n=4	4A n=21	4A/5A n=60	5A n=61
žluté	100	0	0	0
pestré až světle červené	0	95,24	30	1,64
tmavě červené až černé	0	4,76	70	98,36
Celkem	100	100	100	100

Závěr pro analýzu alelické diskriminace PavMyb10.1: Na základě provedených analýz je možné tuto analýzu použít se 100% spolehlivostí pro selekci semenáčů se žlutými plody (negativní při amplifikaci *PavMyb10.1*, pozitivní *aktin 7*). Více jak 95 % genotypů vyhodnocených jako 4A bude mít pestrou barvu, naopak víc jak 98 % třešní diagnostikovaných jako 5A bude mít červenou barvu plodů. Problematické jsou však genotypy s alelickou sestavou 4A/5A, téměř třetina z nich v genofondové sbírce měla pestrou barvu, více jak dvě třetiny měly červenou barvu plodů. Kvůli nemožnosti predikovat barvu u heterozygotů se tento molekulární marker spíše nedoporučuje pro predikci barvy, ač bylo publikováno, že přítomnost jedné alely 5A je dostačující pro červenou barvu plodů (Jin, 2016). Taktéž odhalení kombinací alely 5A, respektive 4A s InDel alelou není zcela spolehlivé, i když by to bylo žádoucí – tyto genotypy s červenými, respektive pestřými plody by při vzájemném křížení mohly dát vznik i potomstvu se žlutými třešněmi, pokud by došlo k současnému výskytu dvou deletovaných alel.

3.3.4 Vyhodnocení analýzy SBE

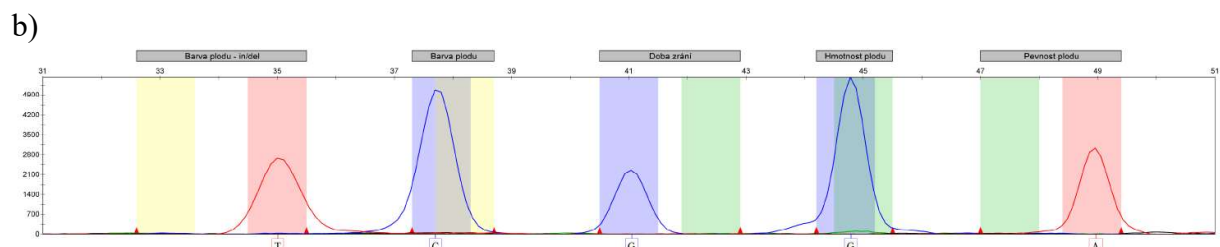
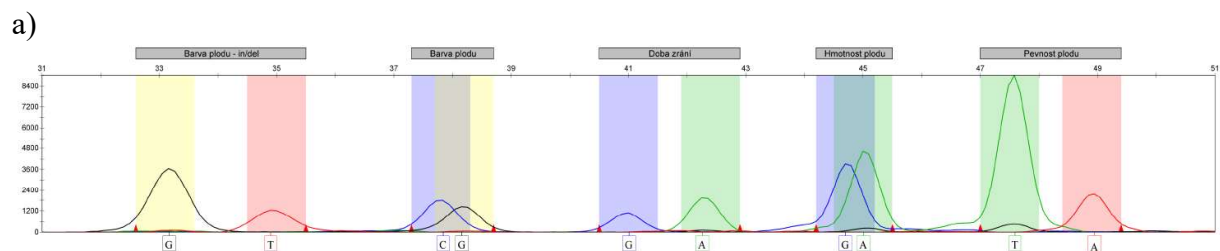
Výsledek SBE analýzy se vyhodnocuje pomocí softwaru GeneMapper v5.0 (Thermo Fisher Scientific). Výsledkem je elektroforeogram obsahující vrcholy v barvě konkrétního nukleotidu v místě SNP a zároveň jsou tyto vrcholy rozděleny na základě délky (obrázky 10a-e). Ve všech případech došlo k posunu v délce několika nukleotidů oproti předpokládané pozici (tabulka 30).

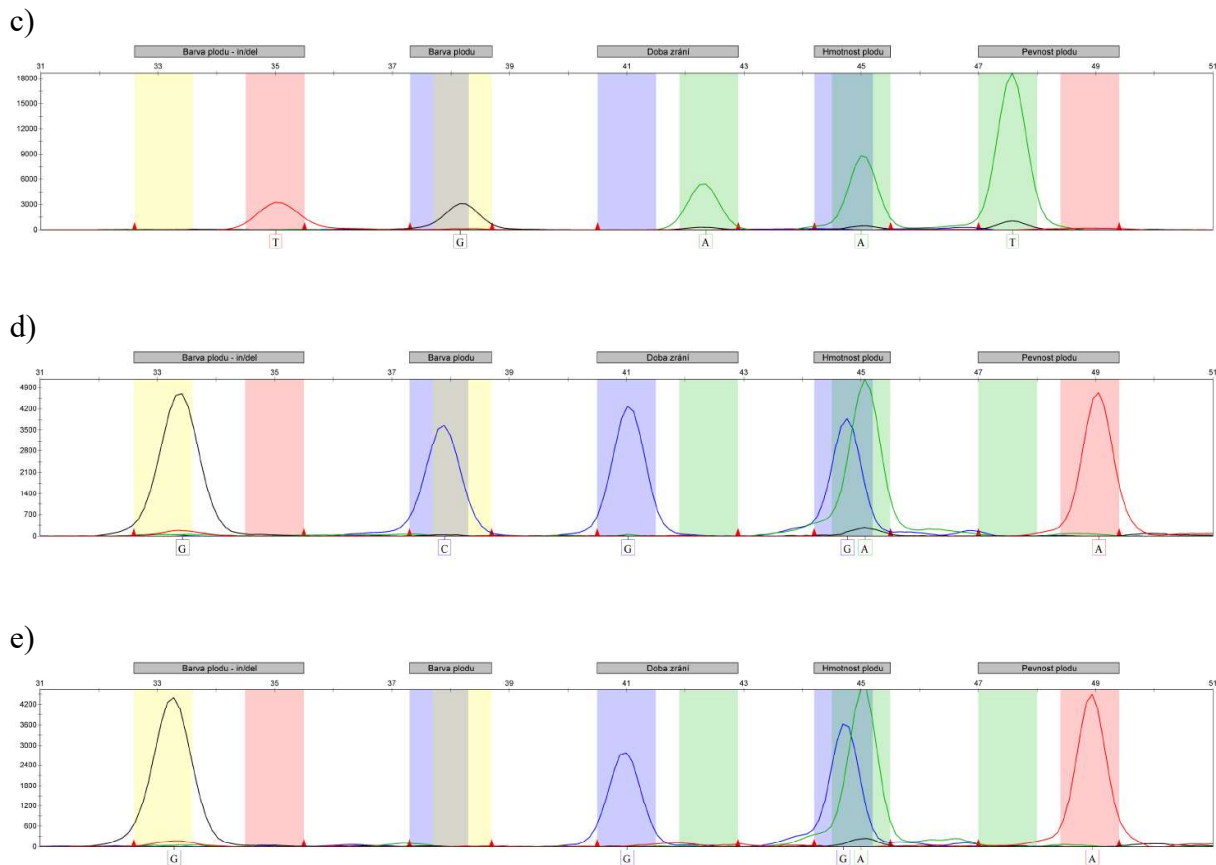
Tabulka 30: Vyhodnocení analýzy SBE – změna délky detekovaných fragmentů oproti délce detekčního SBE primeru – teoreticky by měly být detekovány fragmenty o 1 nt delší, než je použitý SBE primer, v praxi jsou však pozorovány poměrně velké změny délky oproti předpokladu (popis markerů odpovídá elektroforeogramům).

Marker – alela	Délka SBE primeru (nt)	Přibližná detekovaná délka (nt)
Barva plodu-in/del – G	24	33
Barva plodu-in/del – T	20	35
Barva plodu – C	33+34	37,75
Barva plodu – G	33+34	38,25
Doba zrání – G	35	41
Doba zrání – A	35	42,25
Hmotnost plodu – G	43	44,75
Hmotnost plodu – A	43	45
Pevnost plodu – T	41	47,5
Pevnost plodu – A	41	49

Nesoulad mezi skutečnou délkou fragmentu a délkou fragmentu pozorovanou při fragmentační analýze je však běžně popisovaný jev. Tento posun může být způsoben použitím jak fluorescenční značky, která má vliv na mobilitu získaného produktu, tak sekvencí analyzovaného oligonukleotidu. Posun z těchto důvodů je patrný i u analýz pro konkrétní SNP, kde se jednotlivé alely nezobrazují přesně pod sebou, ale s posunem jednoho až několika nukleotidů. Čím je oligonukleotid kratší, tím bývá tento posun větší, vliv na výslednou délku fragmentu genotypizovaného SNP má také polymer použitý při práci na genetickém analyzátoru (Goodwin et Alimat, 2017). V uvedeném případě byl použit polymer POP7 (Thermo Fisher Scientific) a kapiláry o délce 50 cm. I přes tyto posuny jsou však jednotlivé SNP v případě multiplexní reakce dobře velikostně rozlišitelné, jednotlivé vrcholy byly ověřeny použitím jednotlivých primerů v reakci. V rámci některých analyzovaných SNP je možné pozorovat, že jedna alela má oproti druhé poměrně nízký signál. Je to pravděpodobně dáno sekvencí daného lokusu, nízkou prioritou inkorporace jednoho nukleotidu oproti druhému za příslušný primer a různou svítivostí jednotlivých fluorescenčních značek. Případné sekvenční odlišnosti v místě nasedání primerů byly vyloučeny.

Analýza SBE umožňuje detekci více jednonukleotidových polymorfizmů nacházejících se v různých částech genomu v jediné reakci. V analýze podle této metodiky jsou detekovány alelické sestavy celkem pěti SNP (zleva doprava: 2 SNP pro barvu plodů: inserce/delece 5 transkripčních faktorů Myb/WT sekvence této oblasti (v elektroforeogramech označeno souhrnně jako Barva plodu-in/del) + SNP chr3_23939472 (označeno jako Barva plodu); 1x SNP pro dobu sklizňové zralosti (označeno jako doba zrání): SNP chr4_16353619; 1x SNP pro velikost plodů: SNP chr2_31850964 a 1x SNP pro pevnost plodů: chr4_16000421). U všech analyzovaných SNP se předpokládá přítomnost maximálně dvou variant SNP, jak bude popsáno dále na obrázcích 10a-e.





Obrázek 10: Příklady vyhodnocené SBE analýzy. Barevné rámečky vymezují oblasti pro jednotlivé alely SNP markerů důležitých šlechtitelských znaků u třešně ptačí. Primery použité pro analýzu markerů u znaků barva plodu v pozici SNP chr3_23939472, žlutá alela v pozici *PavMyb10* (in/del marker) a rovněž pevnost plodu byly v reverzní orientaci, avšak vyhodnocení příslušných nukleotidů je u všech znaků ve forwardové orientaci, aby byly výsledky jednotné s publikovanou literaturou (Holušová, 2023). a) Jedinec s heterozygotní sestavou ve všech SNP markerech s genotypem G/T pro marker znaku barva plodu–in/del a C/G pro marker znaku barva plodu v pozici chr3_23939472, tato kombinace určuje červenou barvu plodů, genotyp A/G pro marker znaku doba zrání v pozici chr4_16353619 je určující pro časněji zrající třešně, genotyp A/G pro marker znaku hmotnost plodu v pozici chr2_29787028 je určující pro plody s vyšší hmotností, genotyp A/T pro marker znaku pevnost plodu v pozici chr4_16000421 je určující pro plody s nižší pevností; b) Jedinec s homozygotní sestavou ve všech SNP markerech s genotypem T/T pro marker znaku barva plodu-in/del a C/C pro marker znaku barva plodu v pozici chr3_23939472, což je určující pro červenou barvu plodu, genotyp G/G pro marker znaku doba zrání v pozici chr4_16353619 je určující pro pozdně zrající třešně, genotyp G/G pro marker znaku hmotnost plodu v pozici chr2_29787028 je určující pro plody s nízkou hmotností, genotyp A/A pro marker znaku pevnost plodu v pozici chr4_16000421 je určující pro plody s vysokou pevností; c) Jedinec s homozygotní sestavou ve všech SNP markerech s genotypem T/T pro marker znaku barva plodu-in/del a G/G pro marker znaku barva plodu v pozici chr3_23939472, což je určující pro pestrou barvu plodu, genotyp A/A pro marker znaku doba zrání v pozici chr4_16353619 je určující pro časně zrající třešně, genotyp A/A pro marker znaku hmotnost plodu v pozici chr2_29787028 je určující pro plody s vysokou

hmotností, genotyp T/T pro marker znaku pevnost plodu v pozici chr4_16000421 je určující pro plody s nízkou pevností; d) Jedinec s genotypem G/G pro marker znaku barva plodu-in/del a C/C pro marker znaku barva plodu v pozici chr3_23939472, což je určující pro žlutou barvu plodu, případně marker znaku barva třešně v pozici chr3_23939472 u žlutých třešní může zcela chybět (obrázek e), genotyp G/G pro marker znaku doba zrání v pozici chr4_16353619 je určující pro pozdně zrající třešně, genotyp A/G pro marker znaku hmotnost plodu v pozici chr2_29787028 je určující pro plody s vyšší hmotností, genotyp A/A pro marker znaku pevnost plodu v pozici chr4_16000421 je určující pro plody s vysokou pevností.

Statistické vyhodnocení markerů in/del 5x Myb+SNP chr3_23939472 – barva plodů

Pro predikci barvy plodů je třeba hodnotit dva markery. Jako první se vyhodnocuje marker in/del 5x Myb, který vykazuje alely G a T. Detekce pouze guaninu u tohoto markeru predikuje žlutou barvu plodů, a to bez ohledu na alelickou sestavu SNP marker chr3_23939472. Heterozygotní kombinace G/T a detekce pouze T u markeru in/del 5x Myb značí pestrou až černou barvu plodů, pro rozlišení mezi těmito fenotypy je třeba vyhodnotit SNP marker chr3_23939472. Ten vykazuje alely C a G, kdy guanin v této pozici třešňového genomu predikuje pestrou až světle červenou barvu plodu, naopak cytosin tmavě červené až černé plody. U žlutých třešní nemusí být tento marker detekován.

Tabulka 31: Analýza barvy plodů podle markerů in/del 5x Myb+SNP chr3_23939472 (stupnice 1-9: 1: žluté; 1,01-5: pestré až světle červené; 5,01-9: tmavě červené až černé; pro analýzu použity pouze vzorky analyzované ostatními markery asociovanými s barvou plodů)

Alelické kombinace in/del 5x Myb+SNP chr3_23939472								
in/del 5x Myb chr3_23939472	T/T C/C	T/T C/G	T/T G/G	G/T C/C	G/T C/G	G/T G/G	G/G C/C	G/G -/-
Počet vzorků	41	65	31	2	2	1	1	3
Průměr	8,04	7,57	3,30	8,36	3	3	1	1
SD	0,93	1,2	0,47	0,64	0	0	0	0
Variační koeficient	0,12	0,16	0,14	0,08	0	0	0	0
Minimum	3,33	3	3	7,71	3	3	1	1
Maximum	9	9	4,83	9	3	3	1	1

Vyhodnocení spolehlivosti predikce barvy podle in/del 5x Myb+SNP chr3_23939472 – v tomto hodnocení jsou všechny genotypy s alelickou kombinací GG markeru in/del 5x Myb spojeny do jedné kategorie, neboť tato kombinace predikuje žlutou barvu třešní bez ohledu na alelickou sestavu markeru SNP chr3_23939472. Zbylé genotypy jsou pak spojeny do jedné kategorie podle výsledku analýzy SNP chr3_23939472, neboť ostatní alelické kombinace markeru in/del 5x Myb (G/T a T/T) nejsou relevantní pro určení výsledné barvy plodu.

Tabulka 32: Korelace alelické kombinace a barvy plodu – absolutní počty

Barva vs. genotyp (n=146)			
in/del 5x Myb + SNP chr3_23939472	žluté	pestré až světle červené	tmavě červené až černé
G/G+x/x ^{*)}	4	0	0
y/y+G/G ^{*)}	0	33	0
y/y+C/G ^{*)}	0	5	61
y/y+C/C ^{*)}	0	1	42
Celkem	4	39	103

*) x/x=jakákoliv kombinace, či tento SNP není detekován; y/y=jakákoliv kombinace kromě G/G

Tabulka 33: Korelace barvy plodu a alelické kombinace – relativně

Podmíněnost barvy plodu alelickou kombinací in/del 5x Myb+SNP chr3_23939472 (%)			
in/del 5x Myb + SNP chr3_23939472	žluté n=4	pestré až světle červené n=39	tmavě červené až černé n=103
G/G+x/x ^{*)}	100	0,00	0,00
T/T+G/G	0	84,62	0
T/T+C/G	0	12,82	59,22
T/T+C/C	0	2,56	40,78
Celkem	100	100	100

*) x/x=jakákoliv kombinace, či tento SNP není detekován; y/y=jakákoliv kombinace kromě G/G

Tabulka 34: Korelace alelické kombinace a barvy plodu – relativně

Alelické kombinace in/del 5x Myb+SNP chr3_23939472 - predikovatelnost barvy (%)				
in/del 5x Myb + SNP chr3_23939472	G/G+x/x ^{*)} n=4	y/y+G/G n=33	y/y+C/G n=66	y/y+C/C n=43
žluté	100	0	0	0
pestré až světle červené	0	100	7,58	2,33
tmavě červené až černé	0	0	92,42	97,67
Celkem	100	100	100	100

*) x/x=jakákoliv kombinace, či tento SNP není detekován; y/y=jakákoliv kombinace kromě G/G

Závěr pro SBE analýzu barvy plodů: Kombinace dvou molekulárních markerů přináší velmi přesnou predikci barvy plodů. 100 % třešní se žlutými plody vykazovalo u analýzy in/del 5x Myb genotyp G/G, což je nezbytná podmínka pro tuto barvu. Současná analýza SNP chr3_23939472 ukázala buď genotyp C/C, nebo tento SNP není detekován, vzhledem k současné literatuře však není alelická kombinace SNP chr3_23939472 rozhodující pro žlutou

barvu třešní (Holušová, 2023). Genotyp T/T+G/G u 100 % vzorků odpovídal pestrým třešním. Naopak genotypy T/T+C/G a T/T+C/C, korespondovaly s červenou barvou plodů, a to v téměř 94 %, respektive 98 %.

Statistické vyhodnocení markeru SNP chr4_16353619 – doba sklizňové zralosti

SNP marker chr4_16353619 vykazuje alely A a G, kdy adenin v této pozici třešňového genomu predikuje časnou sklizňovou zralost, naopak guanin pozdní zrání.

Tabulka 35: Analýza sklizňové zralosti podle markeru SNP chr4_16353619

(den po sklizňové zralosti referenční odrůdy 'Kišněvskaja'; pro analýzu použity všechny vzorky z Holušová, 2023)

Alelické kombinace SNP chr4_16353619			
	A/A	A/G	G/G
Počet vzorků	23	77	135
Průměr	11,86	18,24	29,36
SD	6,57	6,57	4,91
Variační koeficient	0,55	0,36	0,17
Minimum	1,67	0,00	13,00
Maximum	29,00	37,50	50,75

Závěr pro SBE analýzu doby zrání: Výhodná alelická kombinace tohoto markeru se stanoví podle cíle šlechtění – genotypy A/A budou dozrávat časně (průměrná doba zrání v genofondové sbírce VŠÚO Holovousy byla cca 12 dní po první zrající odrůdě 'Kišněvskaja'), naopak alelická kombinace G/G predikuje pozdější zralost (průměrně téměř 30 dní po první zrající odrůdě 'Kišněvskaja'). Statistická významnost rozdílu mezi jednotlivými genotypy byla pro A/A vs A/G $1,05 \times 10^{-4}$, A/A vs G/G $1,32 \times 10^{-24}$ a A/G vs G/G $4,17 \times 10^{-12}$.

Statistické vyhodnocení markeru SNP chr2_29787028 – velikost plodů

Marker SNP chr2_29787028 byl detekován ve variantách A a G, kdy přítomnost adeninu byla asociována s větší velikostí plodů než alela G.

Tabulka 36: Analýza šířky plodů (mm) podle markeru SNP chr2_29787028

(pro analýzu použity pouze vzorky analyzované ostatními markery asociovanými s velikostí plodů)

Alelické kombinace SNP chr2_29787028			
	A/A	A/G	G/G
Počet vzorků	44	53	13
Průměr (mm)	24,75	22,09	20,06
SD	1,87	1,86	1,94
Variační koeficient	0,08	0,08	0,1
Minimum (mm)	18,28	18,58	16,59
Maximum (mm)	28,05	27,18	21,72

Tabulka 37: Analýza hmotnosti plodů (g) podle markeru SNP chr2_29787028 (pro analýzu použity pouze vzorky analyzované ostatními markery asociovanými s velikostí plodů)

Alelické kombinace SNP chr2_29787028			
	A/A	A/G	G/G
Počet vzorků	44	53	13
Průměr (g)	7,43	5,54	4,4
SD	1,39	1,19	0,97
Variační koeficient	0,19	0,21	0,22
Minimum (g)	3,17	3,88	2,55
Maximum (g)	10,98	9,82	5,63

Závěr pro SBE analýzu velikosti plodů: Za nejuvhodnější je považována kombinace A/A tohoto markeru, kdy v analyzovaném souboru měly plody s touto kombinací alel průměrně o víc jak 2,5 mm širší plody a byly průměrně o téměř 2 g těžší než plody s heterozygotní kombinací A/G. Statistická významnost rozdílu šířky plodů mezi jednotlivými genotypy byla pro A/A vs A/G $5,51 \times 10^{-10}$, A/A vs G/G $1,05 \times 10^{-3}$ a A/G vs G/G $2,31 \times 10^{-10}$. Statistická významnost rozdílu hmotnosti mezi jednotlivými genotypy byla pro A/A vs A/G $1,74 \times 10^{-10}$, A/A vs G/G $2,45 \times 10^{-3}$ a A/G vs G/G $1,57 \times 10^{-9}$.

Statistické vyhodnocení markeru SNP chr4_16000421 – pevnost plodů

SNP marker chr4_16000421 byl u analyzovaných vzorků identifikován jako thymin, popřípadě adenin, kdy přítomnost alely T byla asociována s měkčími plody, naopak plody s alelou A byly hodnoceny jako pevnější.

Tabulka 38: Analýza pevnosti slupky podle markeru SNP chr4_16000421 (stupnice 1-9: 1=nejměkčí; 9=nejpevnější; pro analýzu použity všechny vzorky z Holušová, 2023)

Alelické kombinace SNP chr4_16353619			
	T/T	A/T	A/A
Počet vzorků	22	75	138
Průměr	5,66	5,99	7,4
SD	0,69	0,59	0,46
Variační koeficient	0,12	0,10	0,06
Minimum	3,71	3,71	5,75
Maximum	7,00	7,50	8,25

Tabulka 39: Analýza pevnosti dužniny podle markeru SNP chr4_16000421

(stupnice 1-9: 1=nejměkčí; 9=nejpevnější; pro analýzu použity všechny vzorky z Holušová, 2023)

Alelické kombinace SNP chr4_16353619			
	T/T	A/T	A/A
Počet vzorků	22	75	138
Průměr	4,52	5,12	6,91
SD	0,9	0,93	0,62
Variační koeficient	0,2	0,18	0,09
Minimum	2,71	2,43	4,63
Maximum	6,13	6,57	8,67

Závěr pro SBE analýzu pevnosti plodů: Z hlediska pevnosti plodů, a to jak slupky, tak dužniny, je vhodné provádět selekci genotypů A/A, které vykazují u položek genofondu VŠÚO o cca 1,5 vyšší bodovou hodnotu pevnosti na devítibodové stupnici hodnocení. Tento rozdíl je statisticky vysoce signifikantní, kdy byla pro genotyp A/A stanovena významnost odlišnosti (p-value) 6×10^{-36} oproti genotypu A/T a 5×10^{-11} oproti T/T pro pevnost slupky, pro dužninu pak 3×10^{-28} , respektive 2×10^{-11} . Odlišnost heterozygotů A/T od homozygotů T/T je pak statisticky poměrně malá (p-value 0,027 pro slupku, 0,009 pro dužninu).

4. ZÁVĚREČNÉ SHRnutí DOPORUČENÍ PRO MAS

Pro dobu zrání je znám pouze jediný marker chr4_16353619, jeví se však jako velmi spolehlivý a umožňuje predikovat, zda bude analyzovaný genotyp zrát časně (kombinace A/A), respektive pozdně (G/G).

Pro analýzu barvy plodu byly použity tři markery známé z literatury – Pav-Rf-SSR analyzovaný fragmentační analýzou, mutace v genu PavMyb10.1 testovaná alelickou diskriminací a dvojice doplňujících se markerů in/del 5x Myb + SNP chr3_23939472 analyzovaná technikou SBE. Zcela jednoznačně nejlepším molekulárním markerem je dvojice in/del 5x Myb + SNP chr3_23939472 umožňující 100% predikci žlutého fenotypu, 97% spolehlivost určení pestré barvy plodů a přesnost predikce červené barvy plodů byla v analyzovaném souboru 95 %. Tato kombinace molekulárních markerů tak umožňuje velmi přesně predikovat všechny tři kategorie barvy plodů, od žlutých, přes pestré až po tmavě červené/černé. Marker Pav-Rf-SSR je všeobecně použitelný pouze pro selekci třešní s červenou barvou plodů (přítomnost dominantní alely 351 a 361), kde v genofondové sbírce VŠÚO vykázal 96% spolehlivost predikce této barvy. Pro selekci třešní se žlutou nebo pestrou barvou plodů však není přínosný. Naopak analýzu promotoru genu *PavMyb10.1* lze velmi spolehlivě využít při MAS zaměřené na šlechtění žlutých třešní. Teoreticky ji lze aplikovat při výběru rodičů, kdy jsou pro šlechtění vybráni rodiče se stejnou homozygotní kombinací (buď 5A/5A, nebo 4A/4A), pak bude „zaručena“ i uniformní barva plodů potomstva (stejná jako u rodičů). Tento marker však není možné použít na predikci barvy třešní u heterozygotů 4A/5A.

Co se týče velikosti plodu, ta patří k nejčastěji testovaným vlastnostem pomocí MAS a existuje pro ni hned několik markerů – SSR markery G2SSR1566, CPSCT038 a BPPCT34 analyzované fragmentační analýzou; promotor *PavCNR12*, který byl sekvenován, a konečně SNP chr2_29787028 analyzovaný metodou SBE. Všechny tyto markery se jeví jako velmi spolehlivé, nejlepší alelické sestavy pro každý marker umožňují vybrat třešně s potenciálně největšími plody.

Tabulka 40: Porovnání markerů používaných pro analýzu velikosti plodů

Marker	Nejlepší alelická kombinace	Průměrná velikost plodů s touto kombinací alel (mm)	Průměrná hmotnost plodů s touto kombinací alel (g)	Počet vyselektovaných genotypů (z celkového počtu 111 analyzovaných vzorků)
G2SSR1566	225/225	24,08	6,94	56
CPSCT038	190/190	24,24	7,08	50
BPPCT034	237/255 a 255/255	24,55	7,25	42
Promotor <i>PavCNR12</i>	1/1	24,16	6,97	57
SNP chr2_29787028	A/A	24,75	7,43	44

Za nejlepší marker se tak považuje SNP chr2_29787028, který dokáže vyselektovat genotypy s největšími plody, rozdíly fenotypů mezi jednotlivými markery však nejsou příliš velké. Všechny markery jsou tak velmi kvalitní, pro zvýšení spolehlivosti lze analyzovat více těchto markerů najednou, aby byla vyloučena možná rekombinace mezi markerem a příčinným genem.

Poslední analyzovanou vlastností je pevnost plodů, pro kterou existuje pouze jediný molekulární marker použitelný pro MAS, a to SNP chr4_16353619. Představuje však velmi silný nástroj pro selekci pevnějších plodů s potenciálem delší skladovatelnosti.

U všech analyzovaných hospodářsky významných znaků tak byly vybrány jako markery s nejlepší predikční schopností SNP/indel markery popsané v Holušová et al. (2023). Pro výhodnou současnou analýzu všech těchto markerů byla vyvinuta sada primerů pro SBE. Je samozřejmě možné snížit počet analyzovaných znaků či jednotlivé markery analyzovat samostatně, například sekvenováním za použití primerů pro PCR amplifikaci těchto markerů používaných při SBE, záleží pouze na zaměření šlechtitelského programu.

5. SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ

Tato metodika přináší jako první srovnání využitelnosti jednotlivých molekulárních markerů asociovaných s barvou a velikostí plodů pro efektivní šlechtění třešní, a to jak dříve používaných, tak nově identifikovaných v rámci projektu, během jehož řešení vznikla i tato metodika. Bylo popsáno velmi omezené použití dříve používaných markerů pro predikci barvy

plodů, naopak se potvrdila efektivita dříve používaných markerů asociovaných s velikostí plodů. Jako nejpřesnější se pro predikci barvy a velikosti plodů jeví nově identifikované markery in/del 5x Myb + SNP chr3_23939472, respektive SNP chr2_31850964 (Holušová, 2023). Kromě toho se tato metodika zabývá jako první detekcí molekulárních markerů asociovaných s pevností plodů třešní a jejich dobou sklizňové zralosti popsaných v Holušová et al. (2023). Uvádí rovněž metodické postupy pro detekci jednotlivých molekulárních markerů, zcela nová je pak analýza SBE, která v popsaném uspořádání umožňuje testování 5 markerů pro 4 hospodářsky velmi důležité znaky v jediné reakci.

6. POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY

Certifikovaná metodika je určena dvěma okruhům uživatelů: 1) šlechtitelům třešní, kterým může pomoci při rozhodování o výběru vhodných rodičovských kombinací pro zamýšlené křížení; 2) pracovníkům laboratoře molekulární biologie, kteří mohou využít podrobný návod pro zavedení selekce pomocí popsaných molekulárních markerů do svých laboratoří.

V tabulce 41 jsou uvedeny šlechtitelsky zajímavé odrůdy a jejich alelické kombinace pro vybrané markery, které byly asociovány se sklizňovou zralostí, barvou, velikostí (hmotností) a pevností plodů. Jedná se o markery typu SNP/indel, které je možné testovat v jedné reakci pomocí metody SBE (viz kapitoly 3.2.7 a 3.3.4). Odborníci v oboru molekulární biologie však budou schopni ve své praxi využít i ostatní výše popsané jednotlivé markery a metody jejich detekce, pokud jim a šlechtitelům budou více vyhovovat.

Homozygotní kombinace zpravidla představují mezní fenotypové projevy, heterozygotní kombinace vedou k průměrnějším fenotypům. Šlechtitelské úsilí tak většinou cílí na získání výhodných homozygotních kombinací ze třech důvodů: i) maximalizovat daný fenotypový projev; ii) vytvořit další generaci potenciálních rodičů, kteří budou potomstvu vždy předávat jen výhodnou alelu; iii) při výběru vhodných rodičovských homozygotních kombinací se zjednoduší a zlevní navazující molekulárně-genetické analýzy (potomstvo rodičů se stejnou homozygotní sestavou daného markeru nebude nutné testovat). Kombinací znalostí obou zainteresovaných skupin uživatelů, šlechtitelů a pracovníků laboratoře, tak dojde k jednoznačnému synergickému efektu, který povede k zintenzivnění a zefektivnění stávajících i nových šlechtitelských programů.

Tabulka 41. Přehled alelických kombinací vybraných SNP markerů pro sklizňovou zralost, barvu, velikost (hmotnost) a pevnost plodů u šlechtitelsky zajímavých odrůd používaných ve šlechtitelských programech. Barevně jsou vyznačeny homozygotní kombinace, které zaručují, že potomstvo vždy ponese příslušnou alelu.

Znak Marker	Sklizňová zralost	Barva plodů	Hmotnost plodů		Pevnost plodů
	chr4_16353619	chr3_23939472	chr2_29787028	chr4_16000421	
Odrůda	Alela pro ranější zrání	Alela pro červenou barvu	Alela pro velké plody	Alela pro pevné plody	
	Alela pro pozdější zrání	Alela pro pestrou barvu	Alela pro malé plody	Alela pro měkké plody	
Naresa	A/G	C/C	A/G	A/T	
Celeste	G/G	C/G	A/A	A/A	
Sweet heart	G/G	C/G	A/G	A/A	
Naprumi	A/G	C/C	A/G	A/T	
Nabigos	A/G	C/G	A/G	A/T	
Adélka	A/A	C/C	A/A	T/T	
Amid	G/G	C/C	A/A	A/A	
Aranka	A/G	C/C	A/A	A/T	
Asenova Raná	A/G	G/G	A/G	A/T	
Axel	G/G	C/G	A/G	A/A	
Bing	G/G	C/G	A/G	A/A	
Burlat	A/A	C/G	A/A	A/T	
Elza	G/G	C/C	A/A	A/A	
Fabiola	G/G	C/G	A/A	A/A	
Felicita	G/G	C/C	A/A	A/A	
Halka	G/G	C/G	A/G	A/A	
Helga	A/A	C/G	A/A	T/T	
Horka	G/G	C/C	A/A	A/A	
Hudson	G/G	C/G	A/G	A/A	
Huldra	G/G	C/G	A/G	A/A	
Irena	G/G	C/G	A/A	A/A	

Jacinta	A/G	C/G	A/A	A/T
Justýna	G/G	C/G	A/A	A/A
Kasandra	A/G	C/G	A/A	A/T
Katalin	G/G	C/G	A/A	A/A
Kordia	G/G	C/C	A/A	A/A
Ladeho pozdni	G/G	G/G	G/G	A/A
Lambert	G/G	C/G	A/G	A/A
Linda	G/G	C/C	A/G	A/A
Margit	G/G	C/G	A/G	A/A
Merchant	A/G	C/G	A/A	A/T
Merpet	A/A	G/G	A/A	T/T
Merton bigarreau	G/G	C/G	A/A	A/A
Merton Glory	A/G	G/G	A/A	A/T
Regina	G/G	C/G	A/G	A/A
Rivan	A/A	C/G	A/G	T/T
Sandra	G/G	C/G	A/A	A/A
Stark Hardy Giant	G/G	C/G	A/A	A/A
Starkrimson cherry	G/G	C/G	A/A	A/A
Stella	G/G	C/G	A/G	A/A
Summit	G/G	C/G	A/A	A/A
Sylvana	G/G	C/C	A/A	A/A
Sylvia	G/G	C/C	A/A	A/A
Tamara	G/G	C/G	A/A	A/A
Téchlovan	G/G	C/C	A/A	A/A
Van	G/G	C/G	A/G	A/A
Vanda	G/G	C/C	A/A	A/A

Poznámka: Všechny uvedené odrůdy vykazují v markeru in/del 5x Myb kombinaci alel TT.

7. EKONOMICKÉ ASPEKTY

Při klasickém šlechtění je nezbytné čekat několik let po provedeném křížení na fenotypový projev, který je nutné několik let hodnotit. Studie z poslední doby a tato metodika však přináší revoluci do klasického šlechtění využitím molekulárních markerů pro informované a cílené šlechtění výhodných znaků, které jsou s těmito markery asociovány (MAS). MAS sice nedokáže zkrátit dobu vyšlechtění odrůdy – neovlivní délku doby do plodnosti stromů, ale brzkou eliminací neperspektivních hybridů dojde k zefektivnění procesu šlechtění.

Přínos MAS se bude lišit podle jednotlivých pracovišť a s ohledem na rozsah a cíle šlechtitelských programů. Washington State University odhadla, že použitím MAS ušetřila v letech 2010 a 2011 celkem 75-80 000 USD odstraněním více jak poloviny z téměř 3 000 třešňových semenáčů coby neperspektivních, úspora tedy byla cca 1 200 Kč na odstraněný semenáček (Peace, 2017; Sebolt, 2011). V následujících dvou letech to bylo více jak 80 000 USD, když bylo zachováno pouze 15 % perspektivních semenáčů z cca 3 400 rostlin (úspora cca 620 Kč/semenáček; Edge-Garza, 2014). Úspory z použití MAS ve šlechtění ovocných dřevin byly kalkulovány i pro jabloně, kdy bylo publikováno, že MAS je v programu jejich šlechtění nákladově efektivní, pokud je odstraněno více než 12 % neperspektivních hybridů (Wannemuehler, 2019).

Lze předpokládat, že náklady na udržování semenáčů budou obdobné i v České republice. Materiální náklady zahrnují náklady pro pěstování semenáčů 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 prvního stupně (hnojivo, přípravky na ochranu rostlin, nářadí pro provedení řezu, amortizace mechanizace potřebné k údržbě sadu aj.), všechny stupně kultivace pak vyžadují i zavlažování. Personální náklady jsou dány náročnou údržbou a provedením všech prací spojených s kultivací a evidencí semenáčů do fáze plodnosti a následným minimálně tříletým hodnocením semenáčů v plné plodnosti. Nedílnou součástí šlechtění nových odrůd ovocných stromů jsou i náklady na likvidaci desetiletého porostu sadu genotypů po provedené selekci prvního stupně.

Za předpokladu, že by do křížení vstupovali rodiče, kteří by byli heterozygotní v jednom markeru, bude cílená homozygotní kombinace zastoupena ve 25 % potomstva, tedy $\frac{3}{4}$ hybridů mohou být ihned eliminovány jako neperspektivní. Při křížení na dva znaky ponese cílenou homozygotní kombinaci 6,25 % potomstva, u třech znaků 1,56 % a u všech čtyř popsaných znaků pouze 0,4 % (!) potomstva, tedy více jak 90 % semenáčů nebude muset být v případě časné selekce dále pěstováno a místo nich mohou být pěstovány jiné vyselektované hybridy. Náklady na dopěstování 500 semenáčů třešně z řízeného opylení dvou rodičů do konce prvního selekčního cyklu (tedy 12 let kultivace) se v podmínkách České republiky pohybují kolem 1,5 mil. Kč, tj. průměrně cca 125 000 Kč/rok. Při využití MAS podle této metodiky pro selekci pěti set semenáčů ve srovnání s klasickým šlechtitelským postupem se odhaduje průměrná roční úspora v řádech vyšších desítek tisíc korun ročně (může dosáhnout i 100 000 Kč/rok) na materiálních a hlavně personálních nákladech, a to v závislosti na procentu odstraněných semenáčů (zefektivnění šlechtitelského procesu).

Druhým efektem využití MAS je zintenzívnění šlechtitelského procesu. Konečným cílem šlechtění je vytvoření odrůdy s novými, komerčně zajímavými znaky, která by se tržně prosadila. Ekonomický přínos pro šlechtitele je pak realizován formou licenčních poplatků za využití právně chráněných odrůd, které lze smluvně sjednat jako paušální částku za prodaný stromek, roub či očko odrůdy anebo za část tržeb z prodaného ovoce z nově vyšlechtěné odrůdy. Jak bylo uvedeno výše, pomocí MAS lze eliminovat významnou část neperspektivního potomstva již na začátku šlechtitelského procesu a využít tak nenaplněné/uvolněné kapacity (zejména prostorové) pro další šlechtitelské programy, které mohou být s větší intenzitou prováděny paralelně. Na základě zkušeností VŠÚO s komercializací vlastních odrůd třešní se odhaduje ekonomický potenciál komerčně úspěšné odrůdy ve výši cca 1 mil. EUR.

8. SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY

www.fao.org/faostat/en/#data/QCL

[Situční a výhledová zpráva ovoce 2022, Ministerstvo zemědělství, www.eagri.cz \(https://eagri.cz/public/web/file/715198/Ovoce_2022_web.pdf\)](https://eagri.cz/public/web/file/715198/Ovoce_2022_web.pdf)

[Search Accessions GRIN-Global \(ars-grin.gov\)](http://ars-grin.gov)

- Antognoni F, Potente G, Mandrioli R. et al. Fruit Quality Characterization of New Sweet Cherry Cultivars as a Good Source of Bioactive Phenolic Compounds with Antioxidant and Neuroprotective Potential. *Antioxidants* 2020; 9(8): 677.
- Asanica A, Tudor V, Catita P et al. In Vitro Embryo Culture of Some Sweet Cherry Genotypes. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*. 2016; 10: 172-177.
- Bujdosó G, Hrotko K in *Cherries: Botany, Production and Uses*. (ed. Quero García J, Iezzoni A, Puławska J, Lang G) kap. 1 (CABI Publishing, 2017).
- Cai L, Quero García J, Barreneche T et al. A fruit firmness QTL identified on linkage group 4 in sweet cherry (*Prunus avium* L.) is associated with domesticated and bred germplasm. *Sci Rep*. 2019; 9: 5008.
- Calle A, Wunsch A. Multiple-population QTL mapping of maturity and fruit-quality traits reveals LG4 region as a breeding target in sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Hortic Res*. 2020a; 7: 1–13.
- Calle A, Balas F, Cai L et al. Fruit size and firmness QTL alleles of breeding interest identified in a sweet cherry ‘Ambrunés’ × ‘sweetheart’ population. *Mol Breed*. 2020b; 40: 86.
- Calle A, Serradilla MJ, Wunsch A. QTL mapping of phenolic compounds and fruit colour in sweet cherry using a 6+9K SNP array genetic map. *Sci Hortic*. 2021; 280: 109900.
- Campoy JA, Le Dantec L, Barreneche T et al. New insights into fruit firmness and weight control in sweet cherry. *Plant Mol Biol Report*. 2015; 33: 783–96.
- Čmejla R, Žďárská I, Suran P et al. A new allelic discrimination real-time PCR assay for PavMYB10.1 genotyping to predict sweet cherry fruit colour: a comparison with the Pav-Rf-SSR assay. *J Hortic Sci Biotechnol*. 2021; 96: 260–9.
- De Franceschi P, Stegmeir T, Cabrera A et al. Cell number regulator genes in *Prunus* provide candidate genes for the control of fruit size in sweet and sour cherry. *Mol Breed*. 2013; 32: 311–26.

- Dirlewanger E, Quero García J, Le Dantec L et al. Comparison of the genetic determinism of two key phenological traits, flowering and maturity dates, in three *Prunus* species: peach, apricot and sweet cherry. *Hered* 2012; 109, 280–292.
- Edge-Garza DA, Rowland T, Sandefur P et al. Routine marker-assisted seedling selection focused on fruit quality improves breeding efficiency in three tree fruit programs. *Program and Abstracts of 7th International Rosaceae Genomics Conference*; 24–26. června 2014; Seattle, USA; str. 116.
- Holušová K, Čmejlová J, Suran P et al. High-resolution genome-wide association study of a large Czech collection of sweet cherry (*Prunus avium* L.) on fruit maturity and quality traits, *Horticulture Research*, sv. 10, č. 1, leden 2023, uhac233.
- Isuzugawa K, Shirasawa K, Kurosaka S et al. QTL analysis and candidate gene SNP for harvest day in sweet cherry (*Prunus avium* L.). V: Beppu K, Bessho H, Haji T et al., ed. VIII International Cherry Symposium. sv. 1235. Int Soc Horticultural Science: Leuven 1, Belgie, 2019, 33–40.
- Jin W, Wang H, Li M et al. The R2R3 MYB transcription factor PavMYB10.1 involves in anthocyanin biosynthesis and determines fruit skin colour in sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Plant Biotechnol J.* 2016; 14:2120–33.
- Liu C, Qi X, Song L, et al. Large-fragment deletion encompasses the R2R3 MYB transcription factor, PavMYB10.1, causes yellow fruits in sweet cherry (*Prunus avium* L.), *Scientia Horticulturae* 2023; 309, 111648.
- Malchev S, Zhivondov A. Breeding programme for developing new sweet cherry cultivars in the Fruit Growing Institute, Plovdiv, Bulgaria. *Agricultural Science and Technology.* 2016; 8(4), 289-291.
- Ordidge M, Litthauer S, Venison E et al. Towards a Joint International Database: Alignment of SSR Marker Data for European Collections of Cherry Germplasm. *Plants.* 2021; 10(6): 1243.
- Paprštein F, Blažková J, Blažek J et al. Klasifikátor, Descriptor List, Genus *Cerasus* Mill. Výzkumný ústav rostlinné výroby Praha-Ruzyne, Drnovská 507/73, Praha, 1992.
- Peace C, Bassil N, Main D et al. Development and evaluation of a genome-wide 6K SNP array for diploid sweet cherry and tetraploid sour cherry. *PLoS ONE* 2012; 7, e48305.
- Peace C. DNA-informed breeding of rosaceous crops: promises, progress and prospects. *Hortic Res* 2017; 4, 17006.
- Quero García J, Fodor A, Reignier A et al. QTL detection of important agronomic traits for sweet cherry breeding. In: Ayala M, Zoffoli JP, Lang GA, eds. VI International Cherry Symposium. sv. 1020. Int Soc Horticultural Science: Leuven 1, Belgie, 2014, 57–64.
- Quero García, J. Cherry breeding in the world: current analysis and future perspectives. *Italus Hortus.* 2019; 26(1): 9-20.
- Quero García J, Branchereau C, Barreneche T et al. DNA-informed breeding in sweet cherry: current advances and perspectives. *Italus Hortus.* 2022; 29: 14–37.
- Rosyara UR, Bink MCAM, van de Weg E et al. Fruit size QTL identification and the prediction of parental QTL genotypes and breeding values in multiple pedigreed populations of sweet cherry. *Mol Breed.* 2013; 32: 875–87.
- Sandefur P, Oraguzie N, Peace C. A DNA test for routine prediction in breeding of sweet cherry fruit color, Pav-R-f-SSR. *Mol Breed.* 2016; 36: 33.
- Sarisu HC, Karamürsel F, Öztürk FP. Introducing Different Cherry Cultivars to Inner and Crossover Areas. *Tarim Bilimleri Dergisi* 2019; 25: 11-20.

Sebolt AM. Breeder profile: Nnadozie Oraguzie. *RosBREED Newslett* 2011; 2: 5–6.

Sooriyapathirana SS, Khan A, Sebolt AM et al. QTL analysis and candidate gene mapping for skin and flesh colour in sweet cherry fruit (*Prunus avium* L.). *Tree Genet Genomes*. 2010; 6: 821–32.

UPOV 2006. Protocol for distinctness, uniformity and stability tests. *Prunus avium* L. Sweet cherry. <http://www.cpvo.europa.eu>.

Vanderzande S, Zheng P, Cai L et al. The cherry 6+9K SNP array: a cost-effective improvement to the cherry 6K SNP array for genetic studies. *Sci Rep*. 2020; 10: 7613.

Wang J, Liu W, Zhu Det al. Chromosome-scale genome assembly of sweet cherry (*Prunus avium* L.) cv. Tieton obtained using long-read and hi-C sequencing. *Hortic Res*. 2020; 7: 1–11.

Wannemuehler S D, Luby JJ, Yue C et al. A Cost–Benefit Analysis of DNA Informed Apple Breeding. *HortScience* 2019; 54(11): 1998-2004.

Zhang G, Sebolt AM, Sooriyapathirana SS et al. Fruit size QTL analysis of an F1 population derived from a cross between a domesticated sweet cherry cultivar and a wild forest sweet cherry. *Tree Genet Genomes*. 2010; 6: 25–36.

9. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE

Čmejla R, Žďárská I, Suran P et al. A new allelic discrimination real-time PCR assay for PavMYB10.1 genotyping to predict sweet cherry fruit colour: a comparison with the Pav-Rf-SSR assay. *J Hortic Sci Biotechnol*. 2021; 96: 260–9.

Holušová K, Čmejlová J, Suran P et al. High-resolution genome-wide association study of a large Czech collection of sweet cherry (*Prunus avium* L.) on fruit maturity and quality traits, *Horticulture Research*, sv. 10, č. 1, leden 2023, uhac233.

Žďárská I, Čmejlová J, Sedlák J et al. Sada primerů pro stanovení alel markerů důležitých šlechtitelských znaků v jedné reakci metodou single-base extension u třešně ptačí (*Prunus avium* L.) - přihláška užitého vzoru, značka spisu: PUV2023-41225

10. DEDIKACE

Metodika je výsledkem řešení výzkumného projektu Národní agentury pro zemědělský výzkum (NAZV) č. QK1910290 s názvem „Rozvoj a aplikace molekulárně genetických metod pro racionalizaci šlechtitelských postupů třešní (*Prunus avium* L.)“.



v y d á v á

OSVĚDČENÍ

UKZUZ 213622/2023

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: **MOLEKULÁRNÍMI MARKERY ASISTOVANÉ ŠLECHTĚNÍ TŘEŠNĚ PTAČÍ (*PRUNUS AVIUM L.*) – SELEKCE NA DOBU SKLIZŇOVÉ ZRALOSTI, VELIKOSTI, BARVU A PEVNOST PLODŮ**

Autor/autoři: **Ing. Ivona Žďárská, RNDr. Radek Čmejla, Ph.D.,
Mgr. Kateřina Holušová, Ph.D., Ing. Pavol Suran, Ing. Jiří Sedlák, Ph.D.,
Ing. Kamila Pluhařová, Ing. Lubor Zelený, Mgr. Jan Bartoš, Ph.D.,
RNDr. Jana Čmejlová, Ph.D.**

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

**Ústav experimentální botaniky Akademie věd České republiky v.v.i,
Centrum strukturní a funkční genomiky rostlin**

Místo vydání: **Holovousy**

Rok vydání: **2023**

Metodika byla vypracovaná v rámci výzkumného projektu MZe ČR NAZV č. QK1910290 „Rozvoj a aplikace molekulárně genetických metod pro racionalizaci šlechtitelských postupů třešní (*Prunus avium L.*)“.

Brno 13. 12. 2023

Ing. Daniel Jurečka

ředitel ústavu

.....
podpis/elektronický podpis
zástupce odborného útvaru státní správy

Souhlas ředitele Odboru precizního zemědělství, výzkumu a vzdělávání MZe ČR:

V dne

Ing. Jan Adamec
Digitální podpis:
19.12.2023 08:53

.....
podpis/elektronický podpis
ředitele/ředitelky
Odboru precizního zemědělství,
výzkumu a vzdělávání

**Molekulárními markery asistované šlechtění třešně ptačí (*Prunus avium* L.)
– selekce na dobu sklizňové zralosti, velikost, barvu a pevnost plodů**

Vydal:

VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOCNÁŘSKÝ HOLOVOUSY s. r. o.
Holovousy 129, 508 01 Holovousy

1. vydání, 2023

ISBN 978-80-87030-97-4 (online; pdf)

<https://doi.org/10.60615/a01h-d866>

