

UŽITNÝ VZOR

(11) Číslo dokumentu:

34 519

(13) Druh dokumentu: **U1**

(51) Int. Cl.:

C12Q 1/6895 (2018.01)

C12Q 1/6858 (2018.01)

C12N 15/11 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2020-37953**
(22) Přihlášeno: **07.09.2020**
(47) Zapsáno: **10.11.2020**

(73) Majitel:
VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV
OVOCNÁŘSKÝ HOLOVOUSY s.r.o., Holovousy,
CZ

(72) Původce:
RNDr. Jana Čmejlová, Ph.D., Vitiněves, CZ
RNDr. Radek Čmejla, Ph.D., Vitiněves, CZ
Ing. Pavol Suran, Makov, SK
Ing. František Paprštejn, CSc., Holovousy, CZ

(54) Název užitného vzoru:
**Sada primerů pro stanovení S-alel a alel
promotoru genu MGST u třešně ptačí
(Prunus avium L.) v jediné reakci**

Sada primerů pro stanovení S-alel a alel promotoru genu MGST u třešně ptačí (*Prunus avium* L.) v jediné reakci

5 Oblast techniky

Řešení se týká sady primerů navržených pro detekci jednotlivých S-alel a alel promotoru genu MGST zodpovědných za samosprašnost/cizosprašnost u třešně ptačí (*Prunus avium* L.), kdy je tato detekce prováděna fragmentační analýzou v jediné reakci.

10

Dosavadní stav techniky

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

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

K úspěšnému opylení a oplození dojde, pokud je S-alela v genomu haploidního pylového zrna odlišná od obou S-alel diploidního pestíku. Přesný mechanismus, který brání samoopylení, není dosud znám. Podle v současnosti uznávaného modelu (Tao R, 2010, Matsumoto D, 2016a, 2016b a 2019) se předpokládá existence „obecného inhibitoru“, který může inaktivovat všechny S-RNázy pronikající dovnitř prorůstající pylové láčky z pletiv pestíku. Tímto obecným inhibítorem je pravděpodobně víceproteinový komplex nazývaný SCF (podle obdobného komplexu z čeledi *Solanaceae* a *Rosaceae*) a podílí se na něm proteiny PavSLFLs, PavSFBL2, MGST, DnaJ-like protein a další minoritní proteiny (Matsumoto D, 2016b a 2019). SFB protein pylové láčky je pak podle tohoto modelu schopen selektivně rozpoznat S-RNázu, která se s ním vyskytuje v jednom lokusu, a chránit ji před degradací obecným inhibítorem. S-RNáza tak může vykonávat svoji funkci – degradovat RNA v prorůstající pylové láčce, což indukuje zastavení růstu pylové láčky již v blizně a zabráňuje samoopylení. Význam SFB proteinu pro cizosprašnost je dobře dokumentován

55

mutacemi/deleci SFB proteinu, kterými bylo dosaženo samosprašnosti třešni (viz dále). Kromě toho byl popsán význam genu kódujícího glutathion-S-transferázu z M-lokusu (MGST), jehož protein je součástí výše uvedeného SCF komplexu, kdy snížením exprese MGST je také možné docílit alespoň částečné samosprašnosti třešni (Ono K, 2018).

5 Pro úspěšné opylení je znalost S-alel jednotlivých odrůd zcela zásadní jak pro pěstitele, tak pro šlechtitele třešni, neboť řada kulturních odrůd nese stejné S-alely a nejsou tak schopné se navzájem opylit. V současnosti končí číslování S-alel alelou S38, některé z nich však byly později popsány jako identické (např. S8=S3, S11=S7, S15=S5; Sonneveld T, 2001, 2003, Wünsch A, 2004) a řada z těchto S-alel byla zatím popsána pouze u planě rostoucích třešni (např. alely S10, S17 až S21, De Cuyper B, 2005). V roce 2017 bylo v databázi čítající celkem 1203 převážně kulturních odrůd třešni identifikováno 24 různých S-alel (Schuster M, 2017). U kulturních odrůd se nejčastěji vyskytují alely S3, S6, S1 a S4 (pořadí dle frekvence výskytu), které dohromady tvoří cca 65 % alel vyskytujících se ve výše uvedené databázi (Schuster M, 2017). Celkem pak je popsáno 60 tzv. 15 inkompatibilních skupin odrůd třešni nesoucích stejnou kombinaci S-alel. Některé inkompatibilní skupiny čítají více jak 100 odrůd, které nelze v rámci jejich inkompatibilní skupiny navzájem vůbec úspěšně opylit – např. inkompatibilní skupina III (S3S4, 113 odrůd), VI (S3S6, 104 odrůd) nebo II (S1S3, 103 odrůd). U odrůd se shodnou jednou S-alelou je pak šance na úspěšné opylení pouze 50 % oproti odrůdám s oběma jinými S-alelami (opylení je schopné pouze pylové zrna nesoucí S-alelu odlišnou od obou S-alel mateřské rostliny). 25 odrůd naopak vykazuje unikátní S-genotypy a jsou považovány za univerzální opylovače všech odrůd. 20

Také byly popsány samosprašné třešně, které obsahují jednu ze tří dosud publikovaných samosprašných S-alel (označované s apostrofem jako S3', S4' a S5'). Všechny tyto alely mají 25 mutovanou SFB složku inkompatibility. Jedinou alelou, která vznikla přirozeně, je alela S5' (Marchese A, 2007), zbylé dvě vznikly ozařováním (Lewis D, 1954). U alely S3' došlo v S-lokusu k rozsáhlé deleci DNA, která zatím nebyla přesně určena. U alely S4' nastala delece 4 nukleotidů v SFB genu vedoucí k posunu čtecího rámce a předčasnému ukončení vznikajícího proteinu, který navíc obsahuje odlišný C-konec. U alely S5' se v SFB genu bodovou mutací vytvořil předčasný stop kodon a dle předpokladu tím dochází ke zkrácení vznikajícího proteinu. Samosprašné alely 30 byly do křížení zařazeny relativně nedávno, jsou však stále častěji využívány pro tvorbu moderních samosprašných odrůd třešni (převážně alela S4'). Zvláštní skupinu samosprašných třešni tvoří skupina původně španělských odrůd, které neobsahují žádnou z výše uvedených mutovaných S-alel, ale jejich alespoň částečná samosprašnost je dána inzercí sekvence podobné transpozónu do 35 promotorové oblasti genu pro glutathion-S-transferázu v M-lokusu (MGST). Přestože funkce tohoto genu při opylení není zcela jasná, funkční experimenty dokládají, že snížení exprese MGST díky této inzerci skutečně vede k narušení mechanismu cizosprašnosti (Ono, 2018). V současnosti je ve výše uvedené databázi zapsáno 72 samosprašných odrůd, jejich tržní potenciál je však různý (Schuster M, 2017).

40 Po rozpoznání významu S-lokusu pro cizosprašnost třešni a možnost jejich úspěšného opylení byly S-alely nejprve identifikovány biochemickými metodami (Bošković R, 1996). V novém tisíciletí se postupně začaly jednotlivé S-alely identifikovat molekulárně genetickými metodami, a to nejprve alelicky specifickými primery (identifikace sekvence DNA pro prvních šest S-alel, 45 Sonneveld T, 2001). Poté byly z důvodu popisu dalších S-alel navrženy univerzální primery s rozlišením jednotlivých S-alel na základě délkového polymorfizmu intronů v genu pro S-RNázu.

Zdokonalené univerzální primery pro amplifikaci prvního intronu v polymerázové řetězové reakci (PCR) (PaConsI-F + PaConsI-R2, Sonneveld T, 2003, Sonneveld T, 2006) dávají velikosti PCR 50 fragmentů v rozmezí od 234 do 451 bp, což je výhodné rozmezí pro použití ve fragmentační analýze využívající kapilární elektroforézu, která umožňuje velmi přesně a jednoduše stanovit délku fragmentů. Pro analýzu na agarózovém gelu tyto primery příliš vhodné nejsou, protože u řady S-alel se výsledný PCR produkt liší od jiné S-alely pouze o několik málo nukleotidů. Odlišení velikostí fragmentů vytvořených pomocí těchto primerů na kapilárním genetickém 55 analyzátoru však nemusí postačovat, jelikož u některých alel vznikají stejně dlouhé, nebo téměř

stejně dlouhé fragmenty (např. S1 a S34; S2 a S7 a S12; S14 a S23, S22 a S24, respektive samosprašné S-alely versus příslušné původní cizosprašné S-alely). Navíc tyto univerzální primery nelze použít pro amplifikaci poměrně hojně se vyskytující alely S13 (Sonneveld T, 2003), neboť dávají (i díky přítomnosti mikrosatelitu v amplifikovaném úseku) téměř nezatelný, popřípadě nulový signál (Sonneveld T, 2006, Vaughan SP, 2006).

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

Z důvodu nemožnosti rozlišit všechny S-alely podle délkového polymorfizmu intronů v genu pro S-RNázu byly vhodné délkově se lišící oblasti hledány i v SFB genu jednotlivých S-alel. V 5' UTR oblasti tohoto genu byl identifikován krátký intron lišící se délkou mezi mnoha S-alelami (81 až 122 bp). Primery navržené pro oblast SFB genu však nejsou příliš použitelné pro diskriminaci mezi jednotlivými alelami a mají tyto zásadní nevýhody: 1/ amplifikací mnoha S-alel vzniká při PCR naprosto stejně dlouhý fragment (např. S1, S4, S9 a S19; S5 a S17; S10 a S22, respektive S13 a S14), 2/ rozdíly v délkách amplifikovaných fragmentů jsou příliš malé pro spolehlivé odlišení i na kapilárním genetickém analyzátoru (často rozdíl pouze jediného nukleotidu, což může být problém pro automatické vyhodnocování, je vhodné zařadit do současné analýzy patřičné kontroly), 3/ amplifikace u alel S9 a S14 je slabá/nespolehlivá a 4/ navržené primery jsou natolik degenerované, že je PCR amplifikace velmi náročná a vyžaduje pečlivou optimalizaci amplifikačních podmínek. Publikovaný protokol pro PCR amplifikaci obsahuje cykly s průběžně se snižující teplotou nasedání primerů (Vaughan SP, 2006), což je pro multiplexování s dalšími primery zcela nevhodné. V praxi tyto primery nejsou samostatně používány, nicméně v kombinaci s primery pro amplifikaci prvního intronu S-RNázy byli autoři schopni postupnou analýzou na kapilárním genetickém analyzátoru rozlišit jednotlivé S-alely S1 až S22, samosprašné alely však nebyly uvažovány (Vaughan SP, 2006).

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

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

U samosprašné alely S4' byly rozsah delece v SFB genu a její umístění jednoznačně identifikovány (Sonneveld T, 2005) a systém pro její detekci a odlišení od alely S4 byl navržen např. v Ikeda K, 2004. Tento systém využívá sady dvou párů primerů pro tzv. nested PCR (dvoukolovou PCR), kde tyto primery specificky amplifikují obě tyto alely. Rozlišení mezi nimi je pak podle této publikace zajištěno buď elektroforézou v denaturujícím polyakrylamidovém gelu, nebo štěpením restrikcími enzymy EcoRV nebo MboI a následnou elektroforézou v agarózovém gelu. Oba tyto

přístupy jsou poměrně pracné a nevhodné pro fragmentační analýzu. Dalším přístupem je qPCR (PCR v reálném čase) amplifikace příslušné oblasti s následnou HRM analýzou (vysokorozlišovací analýzou křivek tání) navržená v Muñoz-Espinoza et al. (2017). Tato technika však umožňuje rozlišit pouze alely S4 a S4' a není možné ji kombinovat s identifikací dalších S-alel v jediné reakci.

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

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

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

Jediným způsobem umožňujícím rychlé zpracování mnoha vzorků je výše uvedený detekční systém Vaughana a kol. (2006) využívající fragmentační analýzu na kapilárním genetickém analyzátoru jednak s fluorescenčně značenými primery pro amplifikaci oblasti prvního intronu genu pro S-RNázu a jednak oblasti intronu v 5' UTR genu pro SFB. Kombinací délky obou fragmentů je pak určena výsledná S-alela. Nedostatky používaných primerů byly uvedeny výše. Navíc byla od doby zveřejnění této publikace identifikována řada nových S-alel (od S23 výše), u mnoha z nich nebyly publikovány sekvence SFB genů a nebyla publikována ani délka jejich fragmentů amplifikovaných s primery pro oblast 5' UTR genu pro SFB. Vzhledem k malé délkové variabilitě tohoto úseku DNA se dá předpokládat další zkomplikování jednoznačné identifikace genotypu S-alel. Sekvence genů pro nově identifikované S-RNázy pak také ztížily určení S-alel na základě oblasti kolem prvního intronu tohoto genu, když byly identifikovány S-alely, jejichž amplifikací vznikají stejně dlouhé fragmenty jako u dříve publikovaných S-alel. Vhodnost tohoto systému pro správné určení S-alel se tak v dnešní době stává velmi diskutabilní. Navíc tento systém naprosto neřeší detekci stále častěji se prosazujících samosprašných S-alel, které nelze tímto postupem identifikovat.

Z tohoto důvodu existuje potřeba vyvinout nový detekční systém pro stanovení S-alel u třešní, který by řešil potřebu jednoduché detekce co nejvyššího množství v současnosti známých S-alel včetně samosprašných a alel promotoru genu MGST ideálně v jediné reakci.

Podstata technického řešení

Výše uvedené nedostatky současného stavu techniky odstraňuje sada primerů pro stanovení S-alel a alel promotoru genu MGST u třešně ptačí (*Prunus avium* L.) v jediné reakci fragmentační analýzou s detekcí příslušných PCR produktů na kapilárním genetickém analyzátoru. Tato sada umožňuje dle známých sekvencí jednoznačnou identifikaci cizosprašných alel S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7, S9, S10, S12, S13, S14, S16, S22, S23, S24, S25 a S38 a samosprašných alel S3', S4' a S5'; a současně i identifikaci alel promotoru MGST, kdy je rozlišována přirozeně se vyskytující alela (MGSTwt, wild type) podmiňující cizosprašnost, alela s delecí nejasného významu pro sprašnost (MGSTdel) a alela s inzercí (MGSTins), která způsobuje částečnou samosprašnost. Tato sada obsahuje primery, jejichž sekvence jsou:

	CTTGTCTTGSTTTYGYTTTCTTC	(SEQ ID NO. 1)
	CCATTGTTGCACAAATTGAAA	(SEQ ID NO. 2)
15	GTATCATTGCCACYTTCCACG	(SEQ ID NO. 3)
	TGGTCTCCCTAACATGACCC	(SEQ ID NO. 4)
	TGAACGAAATCTCAACTCATAAATC	(SEQ ID NO. 5)
	TCATTTTGTTTCCACCTACCC	(SEQ ID NO. 6)
	TCTGTCTGGTTGTTTGCTGG	(SEQ ID NO. 7)
20	TCTAATAATGGATCTGCTCATCTAATT	(SEQ ID NO. 8)
	GCTAACCCCTTACATTTTGACCC	(SEQ ID NO. 9)
	ATATGTCTGTCTATCTATCTGTTTCTCA	(SEQ ID NO. 10)
	CCACAATTTGAACGTCAGAAC	(SEQ ID NO. 11)
	TCTGTGTTTCTAAAGGATGGC	(SEQ ID NO. 12)
25	TTCATTAAAGGAGTAGCATATCTGTAT	(SEQ ID NO. 13)
	GATTCGCCATATCTCATGAC	(SEQ ID NO. 14)
	TCTAGCTTTTATTCTTGCGAGG	(SEQ ID NO. 15)
	GATCTCCTATGCCCTAGAGAA	(SEQ ID NO. 16)
	GCTTGGACAAAATTGACTTGTG	(SEQ ID NO. 17)
30	GATCACAATCACCCAAAGGAGG	(SEQ ID NO. 18)
	AAAGCCTTCAAGTGGGAAAG	(SEQ ID NO. 19)
	ATAAATGGGTCAGTGGTGGG	(SEQ ID NO. 20)
	TTGCTTACAGGTCATTACTTACACG	(SEQ ID NO. 21)

35 přičemž:

pro identifikaci alely S1 obsahuje sada primery SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3 a SEQ ID NO. 4, z nichž SEQ ID NO. 1 a SEQ ID NO. 3 jsou vhodně fluorescenčně označeny pro současnou detekci dalších alel v průběhu fragmentační analýzy;

40 pro identifikaci alely S2 obsahuje sada primery SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3 a SEQ ID NO. 5, z nichž SEQ ID NO. 1 a SEQ ID NO. 3 jsou vhodně fluorescenčně označeny pro současnou detekci dalších alel v průběhu fragmentační analýzy;

45 pro identifikaci alely S3 obsahuje sada primery SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 11, SEQ ID NO. 12, SEQ ID NO. 13 a SEQ ID NO. 14, z nichž SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 12 a SEQ ID NO. 13 jsou vhodně fluorescenčně označeny pro současnou detekci dalších alel v průběhu fragmentační analýzy;

50 pro identifikaci alely S3' obsahuje sada primery SEQ ID NO. 1 a SEQ ID NO. 2, z nichž SEQ ID NO. 1 je vhodně fluorescenčně označen pro současnou detekci dalších alel v průběhu fragmentační analýzy;

- pro identifikaci alely S4 obsahuje sada primery SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 15 a SEQ ID NO. 16, z nichž SEQ ID NO. 1 a SEQ ID NO. 15 jsou vhodně fluorescenčně označeny pro současnou detekci dalších alel v průběhu fragmentační analýzy;
- 5 pro identifikaci alely S4' obsahuje sada primery SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 15 a SEQ ID NO. 16, z nichž SEQ ID NO. 1 a SEQ ID NO. 15 jsou vhodně fluorescenčně označeny pro současnou detekci dalších alel v průběhu fragmentační analýzy;
- 10 pro identifikaci alely S5 obsahuje sada primery SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 17 a SEQ ID NO. 18, z nichž SEQ ID NO. 1 a SEQ ID NO. 18 jsou vhodně fluorescenčně označeny pro současnou detekci dalších alel v průběhu fragmentační analýzy;
- 15 pro identifikaci alely S5' obsahuje sada primery SEQ ID NO. 1 a SEQ ID NO. 2, z nichž SEQ ID NO. 1 je vhodně fluorescenčně označen pro současnou detekci dalších alel v průběhu fragmentační analýzy;
- 20 pro identifikaci alely S6 obsahuje sada primery SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3 a SEQ ID NO. 6, z nichž SEQ ID NO. 1 a SEQ ID NO. 3 jsou vhodně fluorescenčně označeny pro současnou detekci dalších alel v průběhu fragmentační analýzy;
- 25 pro identifikaci alely S7 obsahuje sada primery SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3 a SEQ ID NO. 7, z nichž SEQ ID NO. 1 a SEQ ID NO. 3 jsou vhodně fluorescenčně označeny pro současnou detekci dalších alel v průběhu fragmentační analýzy;
- 30 pro identifikaci alely S9 obsahuje sada primery SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3 a SEQ ID NO. 8, z nichž SEQ ID NO. 1 a SEQ ID NO. 3 jsou vhodně fluorescenčně označeny pro současnou detekci dalších alel v průběhu fragmentační analýzy;
- 35 pro identifikaci alely S10 obsahuje sada primery SEQ ID NO. 1 a SEQ ID NO. 2, z nichž SEQ ID NO. 1 je vhodně fluorescenčně označen pro současnou detekci dalších alel v průběhu fragmentační analýzy;
- 40 pro identifikaci alely S12 obsahuje sada primery SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3 a SEQ ID NO. 9, z nichž SEQ ID NO. 1 a SEQ ID NO. 3 jsou vhodně fluorescenčně označeny pro současnou detekci dalších alel v průběhu fragmentační analýzy;
- 45 pro identifikaci alely S13 obsahuje sada primery SEQ ID NO. 3 a SEQ ID NO. 10, z nichž SEQ ID NO. 3 je vhodně fluorescenčně označen pro současnou detekci dalších alel v průběhu fragmentační analýzy;
- 50 pro identifikaci alely S14 obsahuje sada primery SEQ ID NO. 1 a SEQ ID NO. 2, z nichž SEQ ID NO. 1 je vhodně fluorescenčně označen pro současnou detekci dalších alel v průběhu fragmentační analýzy;
- 55 pro identifikaci alely S16 obsahuje sada primery SEQ ID NO. 1 a SEQ ID NO. 2, z nichž SEQ ID NO. 1 je vhodně fluorescenčně označen pro současnou detekci dalších alel v průběhu fragmentační analýzy;
- 50 pro identifikaci alely S22 obsahuje sada primery SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3 a SEQ ID NO. 8, z nichž SEQ ID NO. 1 a SEQ ID NO. 3 jsou vhodně fluorescenčně označeny pro současnou detekci dalších alel v průběhu fragmentační analýzy;
- 55 pro identifikaci alely S23 obsahuje sada primery SEQ ID NO. 1 a SEQ ID NO. 2, z nichž SEQ ID NO. 1 je vhodně fluorescenčně označen pro současnou detekci dalších alel v průběhu fragmentační analýzy;

pro identifikaci alely S24 obsahuje sada primerů SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3 a SEQ ID NO. 6, z nichž SEQ ID NO. 1 a SEQ ID NO. 3 jsou vhodně fluorescenčně označeny pro současnou detekci dalších alel v průběhu fragmentační analýzy;

5

pro identifikaci alely S25 obsahuje sada primerů SEQ ID NO. 1 a SEQ ID NO. 2, z nichž SEQ ID NO. 1 je vhodně fluorescenčně označen pro současnou detekci dalších alel v průběhu fragmentační analýzy;

10

pro identifikaci alely S38 obsahuje sada primerů SEQ ID NO. 1 a SEQ ID NO. 2, z nichž SEQ ID NO. 1 je vhodně fluorescenčně označen pro současnou detekci dalších alel v průběhu fragmentační analýzy;

15

pro identifikaci alely MGSTins obsahuje sada primerů SEQ ID NO. 19 a SEQ ID NO. 20, z nichž SEQ ID NO. 19 je vhodně fluorescenčně označen pro současnou detekci dalších alel v průběhu fragmentační analýzy;

20

pro identifikaci alely MGSTwt obsahuje sada primerů SEQ ID NO. 19 a SEQ ID NO. 21, z nichž SEQ ID NO. 19 je vhodně fluorescenčně označen pro současnou detekci dalších alel v průběhu fragmentační analýzy, a

25

pro identifikaci alely MGSTdel obsahuje sada primerů SEQ ID NO. 19 a SEQ ID NO. 21, z nichž SEQ ID NO. 19 je vhodně fluorescenčně označen pro současnou detekci dalších alel v průběhu fragmentační analýzy.

30

Výše uvedená sada primerů obsahuje primerů SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 11, SEQ ID NO. 14, SEQ ID NO. 20 a SEQ ID NO. 21 vykazující homologii vyšší než 90 % k primerům známým z dosavadního stavu techniky (Sonneveld T, 2003, Sonneveld T, 2005, Sonneveld T, 2006, Ono K, 2018). V těchto dokumentech však autoři neuvažovali použít primerů k vytvoření systému pro současnou detekci všech známých alel S-locusu (včetně samosprašných) a alel promotoru MGST v jediné reakci; výše uvedené primerů byly navíc použity v kombinaci s jinými párovými primerů než v citovaných dokumentech; a míra shody výše citovaných primerů s primerů dle tohoto vynálezu je koincidence, neboť ve všech případech je příslušná genomická oblast výhodná (popřípadě jediná možná) pro návrh primerů pro amplifikaci příslušných S-alel.

35

Výše uvedené kombinace primerů pro amplifikaci S-alel a promotorové oblasti MGST jsou vhodné pro současnou nebo individuální identifikaci jednotlivých výše uvedených S-alel a alel promotoru MGST u třešně ptačí (*Prunus avium* L.) metodou fragmentační analýzy. Ve výhodném provedení technického řešení jsou PCR amplikony S-alel detekovány pomocí kapilární elektroforézy s tím, že každý amplikon je fluorescenčně označen. Fluorescenční označení amplikonů je zajištěno použitím fluorescenčně značeného primeru v PCR reakci tak, aby bylo možné každý amplikon jednoznačně identifikovat podle kombinace použitého fluorescenčního označení a jeho velikosti.

40

45

Návrh sady primerů podle technického řešení pro stanovení S-alel a alel promotoru MGST u třešně ptačí (*Prunus avium* L.) byl proveden v několika krocích: 1/ porovnání sekvencí genů pro jednotlivé S-RNázy, respektive SFB geny u známých S-alel, respektive sekvencí promotorových oblastí genu MGST vyskytujících se u třešně; 2/ vytipování oblastí dostatečně konzervovaných, popřípadě dostatečně heterogenních pro návrh univerzálních, resp. alelicky specifických primerů; 3/ lokalizace mutací vyskytujících se u samosprašných S-alel; 4/ návrh primerů pro detekci jednotlivých S-alel a alel promotoru MGST, přičemž byla brána do úvahy potřeba univerzálnosti (SEQ ID NO. 1 až SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 19), respektive specifity jednotlivých primerů (všechny ostatní primerů) dle požadavků navrhovaného systému, zároveň musela být zohledněna i délka vznikajících amplikonů a jejich fluorescenční značení, aby byla umožněna současná detekce všech S-alel a alel promotoru MGST v jedné reakci; 5/ optimalizace PCR podmínek. Univerzální podmínky, které by měly být splněny při navrhování primerů pro multiplexní amplifikaci DNA,

55

jsou následující: 1/ vysoká specifita primerů eliminující necílené amplifikace; 2/ obdobná teplota tání všech primerů; 3/ eliminace tvorby dimerů mezi jednotlivými primery.

5 Při navrhování byly brány do úvahy všechny dostupné sekvence S-alel a promotoru MGST, popřípadě byly dosud neznámé části sekvencí S-RNáz stanoveny na pracovišti přihlašovatele. Nárokovaná sada primerů byla navržena tak, aby bylo možné jednoznačně stanovit cizosprašné S-alely S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7, S9, S10, S12, S13, S14, S16, S22, S23, S24, S25 a S38 a zároveň samosprašné alely S3', S4' a S5', tento výčet S-alel obsahuje všechny alely běžně se vyskytující v kulturních třešních. Tato sada také umožňuje stanovení cizosprašné alely MGSTwt, samosprašné alely MGSTins promotoru MGST a alely MGSTdel nejasného významu pro sprašnost, neboť
10 jediná odrůda, ve které byla tato alela zatím identifikována, je samosprašná z důvodu současného výskytu samosprašné alely S5'.

Na základě známých sekvencí dalších S-alel s neosekvenovaným místem nasedání primeru SEQ ID NO. 1 (např. S28, S30, S31, S34, ...) a jejich sekvenčního porovnání s výše uvedenými S-alelami však lze předpokládat úspěšnou identifikaci i těchto S-alel. Vznikající PCR fragmenty by podle porovnání sekvencí všech známých S-alel měly být délkově unikátní, a tedy jednoznačně identifikovatelné nárokovanou sadou primerů. Vzhledem k vzácnému výskytu těchto S-alel však
15 nebylo možné nárokovanou sadu primerů na těchto S-alelách ověřit.

20 Prvním krokem pro stanovení S-alel a alel promotoru genu MGST u třešně ptačí (*Prunus avium* L.) je izolace genomové DNA, následuje PCR s využitím navrhované sady primerů pro specifickou amplifikaci výše uvedených S-alel/alel promotoru MGST a stanovení délky ampliconů pomocí fragmentační analýzy za využití kapilární elektroforézy. Finálním krokem je vyhodnocení přítomnosti jednotlivých S-alel/alel promotoru MGST.
25

Příklady provedení technického řešení jsou zde uvedeny pouze pro ilustraci a žádným způsobem neomezuji rozsah této přihlášky, který je vymezen připojeným nárokem a podrobně popsán v popisu technického řešení. Odborník v oboru bude schopen učinit různé modifikace použitého
30 způsobu PCR, uvedených primerů a fluorescenčního označení primerů tak, aby nedošlo ke snížení specifity PCR detekce jednotlivých S-alel/alel promotoru MGST. Odborník v oboru bude schopen též snížit počet současně detekovaných S-alel v jedné reakci, popřípadě vynechat analýzu MGST promotoru, např. z důvodu uzpůsobení nárokované sady primerů pro detekci pouze určitých S-alel v potomstvu určitého křížení, a to dle typu rodičovských S-alel. Popřípadě může odborník v oboru
35 použít místo degenerovaného primeru jednotlivé primery se sekvencemi odpovídajícími degenerovanému primeru, avšak s odpovídajícími alternativními nukleotidy v místě degenerace.

40 Objasnění výkresů

Obr. 1: Schéma lokusu S-alel a promotorové oblasti MGST včetně vyznačení navržených primerů. Není uvedeno v měřítku.

45 Obr. 2: Sekvence amplifikovaných úseků u jednotlivých sekvenčně ověřených S-alel/alel promotoru MGST a místa nasedání primerů na ně. Šedivě podbarvené sekvence reprezentují místa nasedání primerů s uvedením jejich SEQ ID NO. Případné mutace v místě nasedání primerů jsou buď provedeny záměrně (alela S5, SEQ ID No. 17), nebo nejsou překážkou pro úspěšnou amplifikaci příslušné alely.

Příklady uskutečnění technického řešení

Příklad 1: Návrh sekvencí primerů

- 5 Pro detekci S-alel a alel promotoru MGST v jediné reakci byly pomocí programu Vector NTI Advance navrženy primery pro PCR amplifikaci tak, aby celý systém fungoval ve své komplexnosti a amplifikované fragmenty měly správnou délku umožňující jejich jednoznačnou identifikaci pomocí fragmentační analýzy.
- 10 Sekvence jednotlivých S-alel (S-RNázy i SFB genu) a promotorové oblasti MGST genu a identifikované inserce byly získány z veřejně dostupné databáze The National Center for Biotechnology Information, databáze GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>), případné chybějící začátky genu pro S-RNázu byly sekvenačně ověřeny na pracovišti přihlašovatele (tam, kde to bylo možné díky výskytu příslušné S-alely v genofondových sbírkách
- 15 přihlašovatele, viz Obr. 2). Referenční čísla jednotlivých sekvencí pro S-RNázu a SFB jsou uvedena v tabulce 1.

20 Tabulka 1 – Referenční sekvence jednotlivých alel S-RNázy pro oblast prvního až druhého exonu (použity pro návrh primerů SEQ ID NO. 1 a SEQ ID NO. 2); pro oblast druhého a třetího exonu (použity pro návrh primerů SEQ ID NO. 3 až 10); respektive SFB genu (použity pro návrh primerů SEQ ID NO. 11 až 18). Jsou uvedeny všechny S-alely s publikovanou sekvencí v této oblasti, přestože některé z nich neobsahují místo nasedání primeru SEQ ID NO. 1. Kódy odkazují na přístupové číslo v databázi GenBank.

Číslo S-alely	Referenční sekvence		
	S-RNáza (Exon 1 až Exon 2)	S-RNáza (Exon 2 až Exon 3)	SFB
S1	AJ635282*)	AJ635281	AB111518
S2	AJ635284*)	AJ635283	AB111519
S3	AY571663	AJ635285	AY571665
S3'	Viz Obr. 2	***)	
S4	AJ635288*)	AJ635287	AY649872
S4'	Viz Obr. 2	***)	AY649873
S5	AJ635290*)	AJ635289	AY805050
S5'	EU077235	EU077235	EU077237
S6	AY571664	AJ635291	AY571666
S7	EU035974	AJ635268	EU035976
S9	AJ635271*)	AJ635270	DQ422809
S10	JQ280519	AJ635272	AY805053
S12	AY259115	AJ635274	AY805054.1
S13	DQ385842**)	JQ280526	AY805055.1
S14	AJ635278*)	AJ635277	
S16	AJ635280*)	AJ635279	AY805056.1
S17		AJ862656	
S18		AJ862657	
S19		AJ862658	
S20		AJ862659	
S21		AJ863119	
S22	EF429142	DQ336138	
S23	AY259114	AY259114	
S24	AY259112	AY259112	
S25	AY259113	AY259113	
S28	DQ266440**)	DQ266440	

S30	DQ266442**)	DQ266442	
S31	JQ280529**)	DQ266443	
S34	JQ280525**)	JQ280525	
S37		JQ280522	
S38	JQ280516	JQ280516	

*) Referenční sekvence začíná za místem nasedání primeru SEQ ID NO. 1. Místo nasedání tohoto primeru bylo osekvenováno v laboratoři přihlašovatele, celá amplifikovaná sekvence je uvedena na Obr. 2.

5

***) Referenční sekvence začíná za místem nasedání primeru SEQ ID NO. 1, sekvence byla použita pouze pro návrh primeru SEQ ID NO. 2.

10

****) Dle publikované literatury by samosprašné alely S3' a S4' měly mít v této oblasti stejnou sekvenci jako příslušné cizosprašné alely.

V případě inzerce v promotoru MGST byla publikována pouze sekvence předmětné inzerce bez širšího kontextu okolní sekvence (referenční číslo v GenBank: LC371380), pro návrh primerů byla proto využita i publikovaná referenční genomická sekvence odrůdy Satonishiki, PAV_r1.0 BDGV01000543.1 (referenční číslo příslušné části v GenBank: NW_018921783.1). Celá inzerce včetně okolí byla ověřena sekvenováním v laboratoři přihlašovatele, amplifikovaná sekvence je uvedena na Obr. 2. Nově identifikovaná alela MGSTdel byla osekvenována v laboratoři přihlašovatele a je taktéž uvedena na Obr. 2.

20 Sekvence pro jednotlivé geny byly porovnány programem Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo>). Na základě porovnání sekvencí S-RNáz byly vytipovány oblasti vhodné pro návrh jednotlivých primerů, tedy oblasti dostatečně konzervované pro návrh univerzálních primerů (SEQ ID NO. 1 až SEQ ID NO. 3) a oblasti specifické pro jednotlivé S-alely (SEQ ID NO. 4 až 10). Dále byly identifikovány příčinné mutace pro samosprašnost u jednotlivých S-alel a jejich okolí (návrh primerů SEQ ID NO. 11 až SEQ ID NO. 18). Rovněž byla přesně zamapována inzerce v promotoru MGST (návrh primerů SEQ ID NO. 19 až SEQ ID NO. 21).

30 V prvním kroku návrhu nárokované sady primerů byly upraveny stávající primery používané pro amplifikaci okolí prvního intronu (SEQ ID NO. 1 a SEQ ID NO. 2). Vzhledem k velmi krátkému exonu 1 S-RNázy, který je pouze relativně konzervován a byl pro něj v dosavadním stavu techniky používán degenerovaný primer, bylo nezbytné zachovat forward primer v téměř původní podobě.

35 Tento primer byl na základě nových sekvencí znovu degenerován a částečně posunut, aby byla odstraněna jedna z dříve používaných degenerací forward primeru (SEQ ID NO. 1). Reverse primer byl taktéž částečně posunut, aby vyhovoval výslednému návrhu sady primerů pro multiplexní uspořádání celého systému (SEQ ID NO. 2).

40 Ve druhém kroku byl navrhnout univerzální primer SEQ ID NO. 3 v oblasti exonu 3 S-RNázy v reverse orientaci, k němu byly do páru navrženy alelicky specifické forward primery v oblasti druhého intronu pro identifikaci S-alel, které nelze dle současného stavu techniky rozlišit podle délky PCR fragmentu okolí prvního intronu S-RNázy (SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 5, SEQ ID NO. 6, SEQ ID NO. 7, SEQ ID NO. 8, SEQ ID NO. 9 a SEQ ID NO. 10).

45 Ve třetím kroku byly navrženy primery pro specifické odlišení samosprašných alel S3' (SEQ ID NO. 11 až SEQ ID NO. 14), S4' (SEQ ID NO. 15 a SEQ ID NO. 16), respektive S5' (SEQ ID NO. 17 a SEQ ID NO. 18). Primery pro odlišení S3 a S3' (SEQ ID NO. 11 a SEQ ID NO. 14) byly použity podle Sonneveld T, 2005, neboť rozsah delece u alely S3' nebyl identifikován a z literatury nevyplývalo, zda v příslušné sekvenci S3' chybí oba primery, nebo pouze jeden z nich. K oběma primerům však byly navrženy nové primery pro amplifikaci příslušné oblasti s takovou velikostí,

50

aby vyhovovala požadavkům fragmentační analýzy. Primery pro odlišení S4 a S4' (SEQ ID NO. 15 a SEQ ID NO. 16) obklopují místo čtyřnukleotidové delece způsobující samosprašnost a vznikající PCR fragmenty lze na základě velikosti jednoznačně přiřadit k těmto alelám. Pro rozlišení alel S5 a S5' byl navržen specifický primer rozpoznávající přímo místo příčinné mutace (SEQ ID NO. 17).
5 Tento primer obsahuje ve dvacátém nukleotidu od 5' konce destabilizační mutaci pro zvýšení specifity, aby rozpoznával pouze častěji se vyskytující alelu S5.

Ve čtvrtém kroku byly navrženy primery pro amplifikaci jednotlivých alel promotoru MGST (SEQ ID NO. 19 až SEQ ID NO. 21). Pro amplifikaci všech alel byl navržen společný reverse primer SEQ ID NO. 19, který pro amplifikaci alely s inzercí využívá forward primer SEQ ID NO. 20 a pro amplifikaci přirozeně se vyskytující alely a alely s delecí využívá společný forward primer SEQ ID NO. 21.
10

Přehled míst nasedání navržených primerů pro jednotlivé alely včetně amplifikovaných sekvencí ukazuje Obrázek 2. Případné mutace v místě nasedání primerů jsou buď provedeny záměrně (alela S5, SEQ ID No. 17), nebo nejsou překážkou pro úspěšnou amplifikaci příslušné alely a případná degenerace příslušných primerů by nebyla pro celý systém přínosem.
15

Předpokládané délky jednotlivých PCR amplifikovaných fragmentů podle analýzy referenčních sekvencí jsou uvedeny v Tabulce 2 pro S-alely (pouze S-alely s osekvenovanými místy nasedání obou primerů pro amplifikaci příslušného fragmentu) a Tabulce 3 pro alely promotoru genu MGST. Přehled míst nasedání navržených primerů na jednotlivé alely uvedené v Tabulce 2 a Tabulce 3 včetně amplifikovaných sekvencí ukazuje Obrázek 2.
20

25 Tabulka 2 - Předpokládané délky jednotlivých PCR amplifikovaných fragmentů podle analýzy referenčních sekvencí - uvedeno v nukleotidech ve sloupcích s příslušným fluorescenčním značením, včetně primerů použitých pro amplifikaci příslušného fragmentu (forward + reverse).

S-alela	Barva				
	Modrá (FAM)	Modrá (FAM)	Modrá (FAM)	Červená (PET)	Černá (NED)
S1	377 (SEQ ID NO. 1 + SEQ ID NO. 2)			240 (SEQ ID NO. 4 + SEQ ID NO. 3)	
S2	342 (SEQ ID NO. 1 + SEQ ID NO. 2)			303 (SEQ ID NO. 5 + SEQ ID NO. 3)	
S3	232 (SEQ ID NO. 1 + SEQ ID NO. 2)	99 (SEQ ID NO. 11 + SEQ ID NO. 12)	125 (SEQ ID NO. 13 + SEQ ID NO. 14)		
S3'	232 (SEQ ID NO. 1 + SEQ ID NO. 2)				

S- alela	Barva				
	Modrá (FAM)	Modrá (FAM)	Modrá (FAM)	Červená (PET)	Černá (NED)
S4	449 (SEQ ID NO. 1 + SEQ ID NO. 2)				184 (SEQ ID NO. 15 + SEQ ID NO. 16)
S4'	449 (SEQ ID NO. 1 + SEQ ID NO. 2)				180 (SEQ ID NO. 15 + SEQ ID NO. 16)
S5	391 (SEQ ID NO. 1 + SEQ ID NO. 2)	90 (SEQ ID NO. 17 + SEQ ID NO. 18)			
S5'	390 (SEQ ID NO. 1 + SEQ ID NO. 2)				
S6	441 (SEQ ID NO. 1 + SEQ ID NO. 2)			225 (SEQ ID NO. 6 + SEQ ID NO. 3)	
S7	343 (SEQ ID NO. 1 + SEQ ID NO. 2)			250 (SEQ ID NO. 7 + SEQ ID NO. 3)	
S9	354 (SEQ ID NO. 1 + SEQ ID NO. 2)			267 (SEQ ID NO. 8 + SEQ ID NO. 3)	
S10	362 (SEQ ID NO. 1 + SEQ ID NO. 2)				
S12	343 (SEQ ID NO. 1 + SEQ ID NO. 2)			148 (SEQ ID NO. 9 + SEQ ID NO. 3)	
S13				121 (SEQ ID NO. 10 + SEQ ID NO. 3)	
S14	329 (SEQ ID NO. 1 + SEQ ID NO. 2)				

S-alela	Barva				
	Modrá (FAM)	Modrá (FAM)	Modrá (FAM)	Červená (PET)	Černá (NED)
S16	411 (SEQ ID NO. 1 + SEQ ID NO. 2)				
S22	420 (SEQ ID NO. 1 + SEQ ID NO. 2)			260 (SEQ ID NO. 8 + SEQ ID NO. 3)	
S23	329 (SEQ ID NO. 1 + SEQ ID NO. 2)				
S24	420 (SEQ ID NO. 1 + SEQ ID NO. 2)			225 (SEQ ID NO. 6 + SEQ ID NO. 3)	
S25	373 (SEQ ID NO. 1 + SEQ ID NO. 2)				
S38	308 (SEQ ID NO. 1 + SEQ ID NO. 2)				

Tabulka 3 – Předpokládané délky jednotlivých PCR amplifikovaných fragmentů podle analýzy referenčních sekvencí uvedených na Obr. 2 - délky jednotlivých amplifikovaných fragmentů v nukleotidech, včetně primerů použitých pro amplifikaci příslušného fragmentu (forward + reverse).

Alela promotoru MGST	Modrá (FAM)	Délka (nt)
MGSTins	SEQ ID NO. 20 + SEQ ID NO. 19	197
MGSTwt	SEQ ID NO. 21 + SEQ ID NO. 19	145
MGSTdel	SEQ ID NO. 21 + SEQ ID NO. 19	137

Odborníkovi v oboru je známo, že velikost analyzovaných PCR fragmentů vyhodnocená při kapilární elektroforéze závisí kromě skutečné délky sekvence i na sekvenčních vlastnostech amplifikovaného fragmentu, použitím fluorescenčním značení, použitím přístroji a podmínkách elektroforézy (viz také www.thermofisher.com). Může se tedy lišit od délek uvedených v Tabulce 2 a 3 a je vhodné systém vždy ověřit na referenčních odrůdách, popřípadě sekvenováním jednotlivých PCR fragmentů.

15 Příklad 2: Stanovení S-alel a alel promotoru genu MGST u odrůd třešně ptačí (*Prunus avium* L.)

Pro amplifikaci S-alel byla použita DNA izolovaná z lýtka třešně ptačí (*Prunus avium* L.) soupravou Exgene Plant SV (GeneAll) podle návodu výrobce. Připravená DNA byla použita jako templát pro PCR reakci s následujícími reakčními podmínkami: 2 µl DNA (10 ng/ml); 5 µl Phusion Flash High-

Fidelity PCR Master Mix (ThermoFisher Scientific), primery v koncentracích a fluorescenčně označené dle Tabulky 4, PCR voda do celkového objemu 10 µl.

Tabulka 4 - Koncentrace a fluorescenční značení použitých primerů

5

Primer	Fluorescenční značení	Výsledná koncentrace (nM)
SEQ ID NO. 1	FAM	1000
SEQ ID NO. 2	-	1000
SEQ ID NO. 3	PET	200
SEQ ID NO. 4	-	250
SEQ ID NO. 5	-	250
SEQ ID NO. 6	-	150
SEQ ID NO. 7	-	250
SEQ ID NO. 8	-	1500
SEQ ID NO. 9	-	250
SEQ ID NO. 10	-	250
SEQ ID NO. 11	-	170
SEQ ID NO. 12	FAM	170
SEQ ID NO. 13	FAM	350
SEQ ID NO. 14	-	350
SEQ ID NO. 15	NED	150
SEQ ID NO. 16	-	150
SEQ ID NO. 17	-	225
SEQ ID NO. 18	FAM	225
SEQ ID NO. 19	FAM	110
SEQ ID NO. 20	-	110
SEQ ID NO. 21	-	110

PCR amplifikace probíhala v PCR cyklieru C1000 (Biorad) s následujícím teplotním profilem: 98 °C/30 s; cyklování: 26x (98 °C/10 s, 60 °C/10 s, 72 °C/15 s); závěrečná extenze 72 °C/15 s.

- 10 Fragmentační analýza ampliconů byla provedena s využitím genetického analyzátoru AB3500 (ThermoFisher Scientific). Detekce S-alel v daném vzorku byla provedena pomocí GeneMapper® Software 5 (ThermoFisher Scientific) na základě tabulky 2 pro vyhodnocení S-alel, respektive tabulky 3 pro vyhodnocení alel promotoru MGST (viz výše). Všechny PCR amplifikované fragmenty u pozorovaných S-alel/alel promotoru genu MGST byly navíc ověřeny sekvenováním s primery použitými pro amplifikaci jednotlivých fragmentů.

15 Navrhovaná sada primerů byla ověřena na referenčních odrůdách uvedených v Tabulce 5 představujících výběr odrůd s jednotlivými identifikovanými alelami a zároveň na celé genofondové sbírce přihlašovatele.

20 Pomocí nárokové sady primerů byly určeny S-alely a alely promotoru genu MGST u všech odrůd ve shodě s publikovanými údaji ve veřejné databázi odrůd třešní (Schuster M, 2017), nebo byly potvrzeny sekvenčně na pracovišti přihlašovatele.

25 Tabulka 5 – Odrůdy třešně ptačí (*Prunus avium* L.) použité pro ověření navržené sady primerů

Referenční odrůda	Dle databáze (Schuster, 2017)		Identifikovaná		Dle Ono, 2018		Identifikovaná	
	S-alela 1	S-alela 2	S-alela 1	S-alela 2	Alela promotor	Alela promotor u MGST-	Alela promotor u MGST-	Alela promotor u MGST-
Adélka	S1	S6	S1	S6	-	-	MGST wt	MGST wt
Sam	S2	S4	S2	S4	-	-	MGST wt	MGST wt
Axel	S3	S3'	S3	S3'	-	-	MGST wt	MGST wt
Stella	S3	S4'	S3	S4'	-	-	MGST wt	MGST wt
Ptačka z Plzně	S5	S16	S5	S16	-	-	MGST wt	MGST wt
Kronio	S5'	S6	S5'	S6	-	-	MGSTdel	MGST wt
Cristobalina	S3	S6	S3	S6	MGSTwt	MGSTins	MGST wt	MGSTins
Charger	S1	S7	S1	S7	-	-	MGST wt	MGST wt
Horka	S9	S13	S9	S13	-	-	MGST wt	MGST wt
Margit	S4	S12	S4	S12	-	-	MGST wt	MGST wt
Mora di Cazzano	S3	S14	S3	S14	-	-	MGST wt	MGST wt
Rita	S5	S22	S5	S22	-	-	MGST wt	MGST wt

5 Průmyslová využitelnost

- Nárokovaná sada primerů výrazně zjednodušuje stanovení S-alel/alel promotoru MGST u odrůd třešni, protože umožňuje identifikaci S-alel/alel promotoru MGST metodou fragmentační analýzy s analýzou na kapilárním genetickém analyzátoru v jediné reakci. Je velmi dobře použitelná i pro tzv. molekulárními markery asistované šlechtění (MAS). V případě analýzy hybridů ze šlechtění zaměřeného na produkci samosprašných odrůd třešni totiž umožňuje velkokapacitní testování produkovaných hybridů s možností vyselektovat perspektivní samosprašné semenáče již po několika týdnech růstu, a to ve stádiu prvních listů. Bez molekulárních analýz je třeba veškeré potomstvo obsahující i nežádoucí cizosprašné genotypy udržovat ve výsadbě po dobu cca 6 let, kdy je teprve možné provést polní zkoušky samosprašnosti. Takto raná selekce šlechtitelského materiálu přináší nemalé finanční úspory díky tomu, že šetří práci, materiál i prostor nezbytné pro pěstování semenáčů třešni. S-alely je však důležité stanovit i u cizosprašných třešni z důvodu výběru vhodných opylovacích odrůd, a to jak pro účely šlechtění, tak pro komerční produkci třešni.
- Navrhovaná sada primerů tak jednoznačně přináší zdokonalení dosavadního stavu techniky, kdy doposud probíhala analýza S-alel/alel promotoru MGST u třešni v několika reakcích, a je průmyslově využitelná jak ve šlechtitelské, tak pěstitelské praxi.

Seznam použité literatury:

- 5 Bonin A, Bellemain E, Bronken Eidesen P, Pompanon F, Brochmann C, Taberlet P. (2004) How to track and assess genotyping errors in population genetics studies. *Mol Ecol.* 13(11): 3261-73
- Bošković R, Tobutt KR (1996) Correlation of stylar ribonuclease zymograms with incompatibility alleles in sweet cherry. *Euphytica* 90 (2): 245–250
- 10 Cachi AM, Wünsch A. (2011) Characterization and mapping of non-S gametophytic self-compatibility in sweet cherry (*Prunus avium* L.). *J Exp Bot.* 62(6): 1847-56
- Crane MB, Brown AG (1937) Incompatibility and sterility in the sweet cherry, *Prunus avium* L. *J. Pomol. Hort. Sci.* 15: 86-116
- 15 De Cuyper B, Sonneveld T, Tobutt KR (2005) Determining self-incompatibility genotypes in Belgian wild cherries. *Mol Ecol.* 14(4): 945-55
- Ikeda K, Watari A, Ushijima K, Yamane H, Hauck NR, Iezzoni AF, Tao R (2004) Molecular Markers for the Self-compatible S4'-haplotype, a Pollen-part Mutant in Sweet Cherry (*Prunus avium* L.) *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 129(5):724–728
- 20 Lewis D, Crowe LK (1954) Structure of the incompatibility gene. *Heredity* 8: 357–363
- 25 Lisek A, Rozpara E, Głowacka A, Kucharska D, Zawadzka M (2015) Identification of S-genotypes of sweet cherry cultivars from Central and Eastern Europe. *Hort. Sci.* 42(1): 13–21
- Marchese A, Bošković RI, Caruso T, Raimondo A, Cutuli M, Tobutt KR (2005) A new self-compatibility haplotype in the sweet cherry 'Kronio', S5', attributable to a pollen-part mutation in the SFB gene. *Journal of Experimental Botany* 58 (15-16): 4347–4356
- 30 Matsumoto D, Tao R (2016a) Distinct Self-recognition in the *Prunus* S-RNase-based Gametophytic Self-incompatibility System. *The Horticulture Journal* 85(4): 289-305
- 35 Matsumoto D, Tao R (2016b) Recognition of a wide-range of S-RNases by S locus F-box like 2, a general-inhibitor candidate in the *Prunus*-specific S-RNase-based self-incompatibility system. *Plant Mol Biol* 91: 459-469
- Matsumoto D, Tao R (2019) Recognition of S-RNases by an S locus F-box like protein and an S haplotype-specific F-box like protein in the *Prunus*-specific self-incompatibility system. *Plant Mol Biol.* <https://doi.org/10.1007/s11103-019-00860-8>
- 40 Muñoz-Espinoza C, Espinosa E, Bascuñán R, Tapia S, Meneses C, Almeida A (2017) Development of a molecular marker for self-compatible S4' haplotype in sweet cherry (*Prunus avium* L.) using high-resolution melting. *Plant Breeding.* 136: 987-993
- 45 Ono K, Akagi T, Morimoto T, Wünsch A, Tao R (2018) Genome Re-Sequencing of Diverse Sweet Cherry (*Prunus avium*) Individuals Reveals a Modifier Gene Mutation Conferring Pollen-Part Self-Compatibility. *Plant Cell Physiol.* 59(6): 1265-1275
- 50 Schuster, M (2012) Incompatible (S-)genotypes of sweet cherry cultivars (*Prunus avium* L.). *Sci. Hortic.* 148: 59–73
- Schuster, M (2017) Self-incompatibility (S) genotypes of cultivated sweet cherries – An overview 55 2017. In: *OpenAgrar-Repositorium*. DOI: 10.5073/20171213-111734

- Sonneveld T, Robbins TP, Bokviæ R, Tobutt KR (2001) Cloning of six cherry self-incompatibility alleles and development of allele-specific PCR detection. *Theor Appl Genet* 102: 1046-1055
- 5 Sonneveld T, Tobutt KR, Robbins TP (2003) Allele-specific PCR detection of sweet cherry self-incompatibility (S) alleles S1 to S16 using consensus and allele-specific primers. *Theor Appl Genet.* 107(6): 1059-70
- Sonneveld T, Tobutt KR, Vaughan SP, Robbins TP. (2005) Loss of pollen-S function in two self-compatible selections of *Prunus avium* is associated with deletion/mutation of an S haplotype-specific F-box gene. *Plant Cell.* 17(1): 37-51
- 10 Sonneveld T, Robbins TP, Tobutt KR (2006) Improved discrimination of self-incompatibility S-RNase alleles in cherry and high throughput genotyping by automated sizing of first intron polymerase chain reaction products. *Plant Breeding* 125(3): 305-307
- Szikriszt B, Doğan A, Ercisli S, Akcay ME, Hegedüs A, Halász J (2013) Molecular typing of the self-incompatibility locus of Turkish sweet cherry genotypes reflects phylogenetic relationships among cherries and other *Prunus* species. *Tree Genetics and Genomes*, 9(1): 155-165
- 20 Tao R, Iezzoni AF (2010) The S-RNase-based gametophytic self-incompatibility system in *Prunus* exhibits distinct genetic and molecular features. *Sci. Hortic.* 124: 423–433
- Ushijima K, Sassa H, Dandekar AM, Gradziel TM, Tao R, Hirano H (2003) Structural and Transcriptional Analysis of the Self-Incompatibility Locus of Almond: Identification of a Pollen-Expressed F-Box Gene with Haplotype-Specific Polymorphism. *Plant Cell* 15(3): 771-81
- 25 Vaughan SP, Russell K, Sargent DJ, Tobutt KR. (2006) Isolation of S-locus F-box alleles in *Prunus avium* and their application in a novel method to determine self-incompatibility genotype. *Theor Appl Genet.* 112(5): 856-66.
- 30 Wünsch A, Hormaza JI (2004) Cloning and characterization of genomic DNA sequences of four self-incompatibility alleles in sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Theor Appl Genet.* 108(2): 299-305
- 35 Yamane H, Ikeda K, Ushijima K, Sassa H, Tao R. (2003) A pollen-expressed gene for a novel protein with an F-box motif that is very tightly linked to a gene for S-RNase in two species of cherry, *Prunus cerasus* and *P. avium*. *Plant Cell Physiol.* 44(7): 764-9.

NÁROKY NA OCHRANU

1. Sada primerů pro stanovení cizosprašných S-alel S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7, S9, S10, S12, S13, S14, S16, S22, S23, S24, S25 a S38, samosprašných alel S3', S4' a S5' a alel promotoru genu MGST MGSTwt, MGSTdel a MGSTins u třešně ptačí (*Prunus avium* L.) v jediné reakci metodou fragmentační analýzy, **vyznačující se tím**, že obsahuje primery, jejichž sekvence jsou

	CTTGTTCTTGSTTTYGYTTTCTTC	(SEQ ID NO. 1)
10	CCATTGTTGCACAAATTGAAA	(SEQ ID NO. 2)
	GTATCATTGCCACYTTCCACG	(SEQ ID NO. 3)
	TGGTCTCCCTAACATGACCC	(SEQ ID NO. 4)
	TGAACGAAATCTCAACTCATAAATC	(SEQ ID NO. 5)
	TCATTTTGTTCACCTACCC	(SEQ ID NO. 6)
15	TCTGTCTGGTTGTTTTGCTGG	(SEQ ID NO. 7)
	TCTAATAATGGATCTGCTCATCTAATT	(SEQ ID NO. 8)
	GCTAACCCCTACATTTTGACCC	(SEQ ID NO. 9)
	ATATGTCTGTCTATCTATCTGTTTTCTCA	(SEQ ID NO. 10)
	CCACAATTTGAACGTCAGAAC	(SEQ ID NO. 11)
20	TCTGTGTTTTCTAAAGGATGGC	(SEQ ID NO. 12)
	TTCATTAAGGAGTAGCATATCTGTAT	(SEQ ID NO. 13)
	GATTCGCCATATCTCATGAC	(SEQ ID NO. 14)
	TCTAGCTTTTATTCTTGCGAGG	(SEQ ID NO. 15)
	GATCTCCTATGCCCTAGAGAA	(SEQ ID NO. 16)
25	GCTTGGACAAAATTGACTTGTG	(SEQ ID NO. 17)
	GATCACAATCACCCAAAGGAGG	(SEQ ID NO. 18)
	AAAGCCTTCAAGTGGGAAAG	(SEQ ID NO. 19)
	ATAAATGGGTCAGTGGTGGG	(SEQ ID NO. 20)
30	TTGCTTACAGGTCATTAATTACACG	(SEQ ID NO. 21),

příčemž:

pro identifikaci alely S1 obsahuje sada primery SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3 a SEQ ID NO. 4, z nichž SEQ ID NO. 1 a SEQ ID NO. 3 jsou vhodně fluorescenčně označeny pro současnou detekci dalších alel v průběhu fragmentační analýzy;

pro identifikaci alely S2 obsahuje sada primery SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3 a SEQ ID NO. 5, z nichž SEQ ID NO. 1 a SEQ ID NO. 3 jsou vhodně fluorescenčně označeny pro současnou detekci dalších alel v průběhu fragmentační analýzy;

pro identifikaci alely S3 obsahuje sada primery SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 11, SEQ ID NO. 12, SEQ ID NO. 13 a SEQ ID NO. 14, z nichž SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 12 a SEQ ID NO. 13 jsou vhodně fluorescenčně označeny pro současnou detekci dalších alel v průběhu fragmentační analýzy;

pro identifikaci alely S3' obsahuje sada primery SEQ ID NO. 1 a SEQ ID NO. 2, z nichž SEQ ID NO. 1 je vhodně fluorescenčně označen pro současnou detekci dalších alel v průběhu fragmentační analýzy;

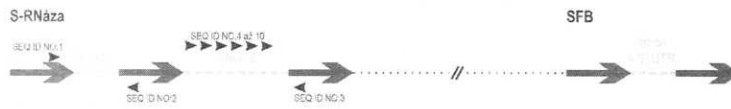
pro identifikaci alely S4 obsahuje sada primery SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 15 a SEQ ID NO. 16, z nichž SEQ ID NO. 1 a SEQ ID NO. 15 jsou vhodně fluorescenčně označeny pro současnou detekci dalších alel v průběhu fragmentační analýzy;

- pro identifikaci alely S4' obsahuje sada primery SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 15 a SEQ ID NO. 16, z nichž SEQ ID NO. 1 a SEQ ID NO. 15 jsou vhodně fluorescenčně označeny pro současnou detekci dalších alel v průběhu fragmentační analýzy;
- 5 pro identifikaci alely S5 obsahuje sada primery SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 17 a SEQ ID NO. 18, z nichž SEQ ID NO. 1 a SEQ ID NO. 18 jsou vhodně fluorescenčně označeny pro současnou detekci dalších alel v průběhu fragmentační analýzy;
- 10 pro identifikaci alely S5' obsahuje sada primery SEQ ID NO. 1 a SEQ ID NO. 2, z nichž SEQ ID NO. 1 je vhodně fluorescenčně označen pro současnou detekci dalších alel v průběhu fragmentační analýzy;
- 15 pro identifikaci alely S6 obsahuje sada primery SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3 a SEQ ID NO. 6, z nichž SEQ ID NO. 1 a SEQ ID NO. 3 jsou vhodně fluorescenčně označeny pro současnou detekci dalších alel v průběhu fragmentační analýzy;
- 20 pro identifikaci alely S7 obsahuje sada primery SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3 a SEQ ID NO. 7, z nichž SEQ ID NO. 1 a SEQ ID NO. 3 jsou vhodně fluorescenčně označeny pro současnou detekci dalších alel v průběhu fragmentační analýzy;
- 25 pro identifikaci alely S9 obsahuje sada primery SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3 a SEQ ID NO. 8, z nichž SEQ ID NO. 1 a SEQ ID NO. 3 jsou vhodně fluorescenčně označeny pro současnou detekci dalších alel v průběhu fragmentační analýzy;
- 30 pro identifikaci alely S10 obsahuje sada primery SEQ ID NO. 1 a SEQ ID NO. 2, z nichž SEQ ID NO. 1 je vhodně fluorescenčně označen pro současnou detekci dalších alel v průběhu fragmentační analýzy;
- 35 pro identifikaci alely S12 obsahuje sada primery SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3 a SEQ ID NO. 9, z nichž SEQ ID NO. 1 a SEQ ID NO. 3 jsou vhodně fluorescenčně označeny pro současnou detekci dalších alel v průběhu fragmentační analýzy;
- 40 pro identifikaci alely S13 obsahuje sada primery SEQ ID NO. 3 a SEQ ID NO. 10, z nichž SEQ ID NO. 3 je vhodně fluorescenčně označen pro současnou detekci dalších alel v průběhu fragmentační analýzy;
- 45 pro identifikaci alely S14 obsahuje sada primery SEQ ID NO. 1 a SEQ ID NO. 2, z nichž SEQ ID NO. 1 je vhodně fluorescenčně označen pro současnou detekci dalších alel v průběhu fragmentační analýzy;
- 50 pro identifikaci alely S16 obsahuje sada primery SEQ ID NO. 1 a SEQ ID NO. 2, z nichž SEQ ID NO. 1 je vhodně fluorescenčně označen pro současnou detekci dalších alel v průběhu fragmentační analýzy;
- 55 pro identifikaci alely S22 obsahuje sada primery SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3 a SEQ ID NO. 8, z nichž SEQ ID NO. 1 a SEQ ID NO. 3 jsou vhodně fluorescenčně označeny pro současnou detekci dalších alel v průběhu fragmentační analýzy;
- pro identifikaci alely S23 obsahuje sada primery SEQ ID NO. 1 a SEQ ID NO. 2, z nichž SEQ ID NO. 1 je vhodně fluorescenčně označen pro současnou detekci dalších alel v průběhu fragmentační analýzy;
- pro identifikaci alely S24 obsahuje sada primery SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3 a SEQ ID NO. 6, z nichž SEQ ID NO. 1 a SEQ ID NO. 3 jsou vhodně fluorescenčně označeny pro současnou detekci dalších alel v průběhu fragmentační analýzy;

- 5 pro identifikaci alely S25 obsahuje sada primery SEQ ID NO. 1 a SEQ ID NO. 2, z nichž SEQ ID NO. 1 je vhodně fluorescenčně označen pro současnou detekci dalších alel v průběhu fragmentační analýzy;
- 10 pro identifikaci alely S38 obsahuje sada primery SEQ ID NO. 1 a SEQ ID NO. 2, z nichž SEQ ID NO. 1 je vhodně fluorescenčně označen pro současnou detekci dalších alel v průběhu fragmentační analýzy;
- 15 pro identifikaci alely MGSTins obsahuje sada primery SEQ ID NO. 19 a SEQ ID NO. 20, z nichž SEQ ID NO. 19 je vhodně fluorescenčně označen pro současnou detekci dalších alel v průběhu fragmentační analýzy,
- 20 pro identifikaci alely MGSTwt obsahuje sada primery SEQ ID NO. 19 a SEQ ID NO. 21, z nichž SEQ ID NO. 19 je vhodně fluorescenčně označen pro současnou detekci dalších alel v průběhu fragmentační analýzy, a
- pro identifikaci alely MGSTdel obsahuje sada primery SEQ ID NO. 19 a SEQ ID NO. 21, z nichž SEQ ID NO. 19 je vhodně fluorescenčně označen pro současnou detekci dalších alel v průběhu fragmentační analýzy.

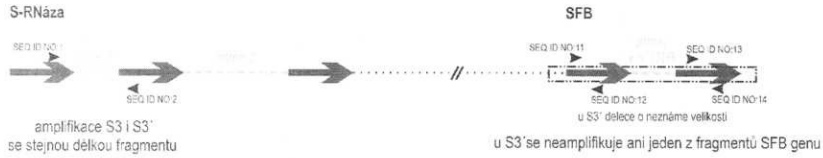
9 výkresů

1. část detekčního systému - detekce všech S-alel

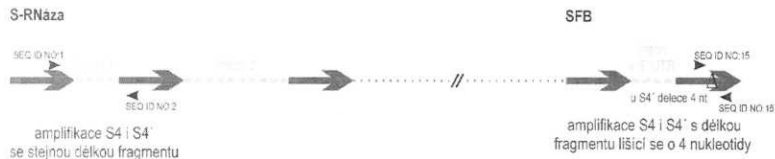


2. část detekčního systému - odlišení samosprašných alel S3', S4', respektive S5' od jejich cizosprašných protějšků

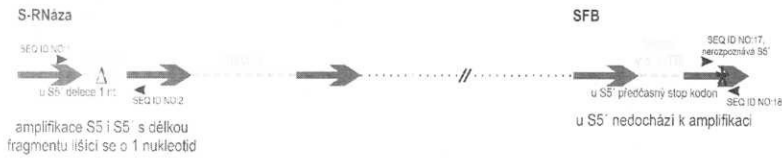
A) alela S3' (rozsáhlá neznámá delece v SFB genu)



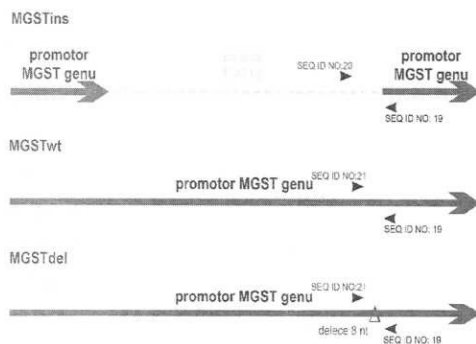
B) alela S4' (přímá detekce 4nt delece)



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



3. část detekčního systému - detekce alel promotoru MGST



Obr. 1

S-RNáza S1, AJ635282 + vlastní sekvence

SEQ ID NO. 1 (forward) CTTGTTCTTGCTTTTGCTTTCTTCTTTTGTACGTTATG
 AGCAGTGGTGGGTTGCATTACAATCTTCTGCATATATCCTATATGCATATAATCAGATTGCAT
 TTTTCACTTATATATTTTGTTCAGAGAAGTATTTGTGTGTATTCGATGATATATCACATGACA
 TGCGGTGTATTGAATTCACCCACATATTTTTCATTTAATCTAACGCACAACCTTTCTTTGGA
 TGAGTAAGTATTTGGGGATTGTTTTCTGCATGTCCTTTTATATTTTCATCCTCTTTTGT
 CTTTCTGATATTTGTTTTAATAAGTGCAGTCTATTCATCACAATAATTTTGGCAGGATCTTA
 TGACTACTTTCAATTTGTGCAACAATGG SEQ ID NO. 2 (reverse)

SEQ ID NO. 4 (forward) TGGTCTCCCTAACATGACCCTTATAATAATGGATATCCTC
 CAATTAAGGACCTACTATTATTCTGTATGTATATATTCAAAATACTGTACCAAAATTA
 TAAATTTAATAATCAGGGTTAACGAAGAGAAAAACAAATTTATCCAATAATGTCTACATTG
 TTTGCATGTCTCAGTACCCTAAATGCGATCCAACTGAAGAGATCTTGGCCCGACGTGGAA
 AGTGGCAATGATAC SEQ ID NO. 3 (reverse)

S-RNáza S2, AJ635284 + vlastní sekvence

SEQ ID NO. 1 (forward) CTTGTTCTTGCTTTTGCTTTCTTCTTGTGTTTCATTATG
 AGCACTGGTGATGGTGGGTTGCATTACAATCCTTTGCTCTATATATCCTACATGCGTATAAT
 CAGCATTGCGTTTTTCTACTTGTATTTTTTTGTTTCAGAGAACTATTGTGCGTGTTCGATGA
 TATATCACATGGCATGCGGTGTATTGACTTCACCCACATATTTTTCATTTAATCTAACGCAC
 AACTTTCTTTGGATAAGTAAGTATTGGGAATTGCTTTTTCTGCATGTCCTCAATTTATTTTC
 ATCCTCTTTTTATTTGGCAGGATCTTACGACTATTTTCAATTTGTGCAACAATGG SEQ ID
 NO. 2 (reverse)

S-RNáza S2, AJ635283

SEQ ID NO. 5 (forward) TGAACGAAATCTCAACTCATAAATCAAATTTATTTTAAAG
 AATCCTATAGATGGCATGAGTAGACATAAATATCCCCACGAGAGGCACCTGCTTACTTTGT
 CACGCAATTGAATGTATCCTTGAATTGTGGTAGGTATTAACACTACAGGCAGAGATCGAATTA
 ATTTATCACTCATAAATCTAACTATCGCTTAAGTTTGTACTTTCTCTCAAATATTTATATAT
 TGCTTGGATGTCTCAGTCACCTCAGTTGCGAGCCAACTGAAGAGATCTTGGCCCGACGTGG
 AAAGTGGCAATGATAC SEQ ID NO. 3 (reverse)

S-RNáza S3, AY571663

SEQ ID NO. 1 (forward) CTTGTTCTTGGTTTTGCTTTCTTCTTGTGTTTCATTATC
 AGCGCTGGTGATGGTGGGTTGCCTTACAATCTTTTGCTCTATATATCCTATATGCATATAAT
 CAGCATTGCGTTTTTCTACTTGTATTTTTTTGTTTCAGAGAACTATATTGTGTGTGTTGCAAT
 AAGTGCAGTCTATTCATCACAATAATTTTCGAGGATCTTATGTCTATTTTCAATTTGTGCA
 ACAATGG SEQ ID NO. 2 (reverse)

Obr. 2-1

SFB S3, AY571665

SEQ ID NO. 11 (forward) CCACAATTTGAACGTCAGAACGACAATGATGACCCAT
 ATGATATAGAAGAACTTCAGTGGTCACCTTTTTTCCAATGAAAAGTTTGAGCAGTTCTCCAAT
 TTAAGCCATCCTTTAGAAAACACAGA SEQ ID NO. 12 (reverse)

SEQ ID NO. 13 (forward) TTCATTAAAGGAGTAGCATATCTGTATTTGTGTAATT
 ACGAATCCAAGCAAGTTCTTGAACAGGAATTCAATTGGCCGTCATGAGATATGGCGAAATC
 SEQ ID NO. 14 (reverse)

S-RNáza S3' - vlastní sekvence

SEQ ID NO. 1 (forward) CTTGTTCTTGGTTTTGCTTTCTTCTTGTGTTTCATTATC
 AGCGCTGGTGATGGTGGGTTGCCTTACAATCTTTTGCTCTATATATCCTATATGCATATAAT
 CAGCATTGCGTTTTTCTACTTGTATTTTTTGTTCAGAGAACTATATTGTGTGTGTTGCAAT
 AAGTGCAGTCTATTCATCACATAAATTTTCGCAGGATCTTATGTCTATTTTCAATTTGTGCA
 ACAATGG SEQ ID NO. 2 (reverse)

S-RNáza S4, AJ635288 + vlastní sekvence

SEQ ID NO. 1 (forward) CTTGTTCTTGGCTTTCGCTTTCTTCATTTGTTACGTTATG
 AGCAGTGGTGGGTTGCATTACAATCTTCTGCTCTTTAAATCTTATATGCATATAATCAGCAT
 TGCGTTTTTCTACGTGTATTTTTTGTTCAGAGAACTGTTGTGTGCGTTCAATGATATATC
 ACATGAACATGCCGTGTATCGAATTCACCCACATATTTTCATTTAATCTAACGCACAACCTT
 TCTTCGGATGAGTAAGTATTTGGGGATTGTATTTTGCATGTCCTCTTTTTATTTTCATCCTC
 TTTACTTTTTGTTTATCTGATAATTGTTACAATAAGTTCAGCCTACTGGAAAGCTAAAGTTA
 TATGTTCTTTATCTTGAAATCCTTATTTATGATAGCATTAACTTCTCACAATAATTTTGG
 CAGGATCTTATGACTATTTTCAATTTGTGCAACAATGG SEQ ID NO. 2 (reverse)

SFB S4, AY649872

SEQ ID NO. 15 (forward) TCTAGCTTTTATTCTTGGCAGGAGAAGGGTATGCGAA
 AAATTGACTTCTGGGTTCTGCAAGAAAACGGTGGAAACAATTGTGTCCTTTTATTTATCCT
 TCTCATTATTATGGTACACTCGGTATTAGTAAAGATAACGAACTCTTAATGAAAAGAGAGA
 TTTCTCTAGGGGCATAGGAGATC SEQ ID NO. 16 (reverse)

S-RNáza S4' - vlastní sekvence

SEQ ID NO. 1 (forward) CTTGTTCTTGGCTTTCGCTTTCTTCATTTGTTACGTTATG
 AGCAGTGGTGGGTTGCATTACAATCTTCTGCTCTTTAAATCTTATATGCATATAATCAGCAT
 TGCGTTTTTCTACGTGTATTTTTTGTTCAGAGAACTGTTGTGTGCGTTCAATGATATATC

Obr. 2-2

ACATGAACATGCCGTGTATCGAATTCACCCACATATTTTTTCATTTAATCTAACGCACAACCTT
TCTTCGGATGAGTAAGTATTTGGGGATTGTATTTTGCATGTCCTCTTTTTATTTTCATCCTC
TTTACTTTTTGTTTATTCTGATAATTGTTACAATAAGTTCAGCCTACTGGAAAGCTAAAGTTA
TATGTTCTTTATTCTTGAAATCCTTATTTATGATAGCATTAAACATTCACAATAATTTTGG
CAGGATCTTATGACTATTTTCAATTTGTGCAACAATGG SEQ ID NO. 2 (reverse)

SFB S4', AY649873

SEQ ID NO. 15 (forward) TCTAGCTTTTTATTCTTGCGAGGAGAAGGGTATGCGAAA
AATTGACTTCTGGGTTCTGCAAGAAAAACGGTGGAAACAATTGTGTCCTTTTATCCTTCTCA
TTATTATGGTACACTCGGTATTAGTAAAGATAACGAACCTTAATGGAAAAGAGAGATTTCT
CTAGGGGCATAGGAGATC SEQ ID NO. 16 (reverse)

S-RNáza S5, AJ635290 + vlastní sekvence

SEQ ID NO. 1 (forward) CTGTTCTTGCTTTTGCTTTCTTCTTTTGTATGTTATG
AGCAGTGGTGGGTTGCATTACAATCTTTTCCTCTTTATATCCTATAAATGTGCATATAATCA
GCATTGCGTTTTTTCTGCTTTTATATTTTGTATAGAAACTATTGTGTGTGTTAGATGATAT
ATATCAAACGACATGCGGTGTATTGAATTCACCCACATATTTTGCATTTAATCTAACGCACA
ACTTTCCTTTGGATGAGTAAGTATTTGGTGATTGTTTTTCTGCATGTCCTCTTTTTATTTTC
ATAATCTTTTGTATTCTGGTAATTGTTTGAATAAGCGCAGTCTATTCATCACAATAATT
TTGGCAGGATCTTATGACTATTTTCAATTTGTGCAACAATGG SEQ ID NO. 2
(reverse)

SFB S5, AB111520

SEQ ID NO. 17 (forward) GCTTGGACAAAATTGACTTATGGGTTTTGCAAGAAAAA
CAGTGGAAAGAATTGTGTCCTGTTATTTTCCTCCTTTGGGTGATTGTGATC SEQ ID
NO. 18 (reverse)

S-RNáza S5', EU077235

SEQ ID NO. 1 (forward) CTGTTCTTGCTTTTGCTTTCTTCTTTTGTATGTTATG
AGCAGTGGTGGGTTGCATTACAATCTTTTGTCTTTTATATCCTATAAATGTGCATATAATCA
GCATTGCGTTTTTTCTGCTTTTATATTTTGTATAGAAACTATTGTGTGTGTTAGATGATAT
ATATCAAATGACATGCGGTGTATTGAATTCACCCACATATTTTGCATTTAATCTAACGCACA
ACTTTCCTTTGGATGAGTAAGTATTTGGTGATTGTTTTTCTGCATGTCCTCTTTTTATTTTCA
TAATCTTTTGTATTCTGGTAATTGTTTGAATAAGCGCAGTCTATTCATCACAATAATTT
TGGCAGGATCTTATGACTATTTTCAATTTGTGCAACAATGG SEQ ID NO. 2
(reverse)

Obr. 2-3

S-RNáza S6, AY571664

SEQ ID NO. 1 (forward) CTTGTTCTTGCTTTTGCTTTCTTCTTGTGTTTCATTAT
 GAGCAATGGTGGGGTTGCATTGCATTACAATCTTTTGCTCTTTATAATATGTGCATACAATT
 GATTCTAAAAAATATGCATATAAATTTGCATGTATTTTTCTACTTCTATTTTATGTTTGA
 TAAATATTTGTGTGTTTCGATGATATATATATCATGTAACGGAGGATTTTGATCTAGCGCAC
 AACCTTCTTTGACTGAGTAACTACTTTGGGAATTACTTTTTCTGCATGTGTTTCTTCGTTTA
 CTCTAGTTGTTGTTGCAATAAGTGCAGCGGAAATATGTTCTCTATACATCAAATCCTTATT
 TAAGATCTTTTAGATAATTTTGGCAGGATCTTATGTCTATTTTCAATAATTTTGGCAGGATC
 TTATGTCTATTTTCAATTTGTGCAACAATGG SEQ ID NO. 2 (reverse)

SEQ ID NO. 6 (forward) TCATTTTGTTTTCCACCTACCCTTTAGCTTTTAGTTTTT
 ACCAAATTAGATTGTTAGTATGAACATATATAATACTCTTTTTTATAACATTCGTCATC
 TGGTTAGGCACACACATTATCTTGAATATATATCTAAGTACAAAATTGCTTGGATGTCTCAG
 TCCCCTCACTGCGATCCAACTGCAGACATCTTGGCCGGACGTGGAAAGTGGCAATGATAC
 SEQ ID NO. 3 (reverse)

S-RNáza S7, EU035974

SEQ ID NO. 1 (forward) CTTGTTCTTGCTTTTGCTTTCTTCTTGTGTTTCATTATG
 AGCACTGGTGGGGTTGCATTACAATATTTTCCCTCTTTTATCCTATATGCATGTAATTCGAATT
 GCAATTTTCTACATCTGTTTTATGTTTAGAAAAATATTGTGCGTGTCAATGATATATCAAG
 TAACGGAGGACTTGATCTATCCACAACCTTCCGGATGAGTAACTATTTGGGAATTACTTT
 TTCGATAGTTGTTGCTAAAATTATGTTCTCTATAACATCAAATACTTAAGATACCATTAAACC
 TTCTCACAACAATTTTGGCAGGATCTTATGACTATTTTCAATTTGTGCAACAATGG SEQ ID
 NO. 2 (reverse)

SEQ ID NO. 7 (forward) TCTGTCTGGTTGTTTTGCTGGCTGTTTTTCTCCTTTTA
 TTGAAGTATTTTCGGACAAAACAAAACAAAATGACGCTAATAGTCAGAATCAAATTTAG
 AATTCAATTTTCAATTTGTCGGGTTAATGAGAAAACAAAATCTATACCTACGTTTTACTTTTT
 CTCACAATATCCTTGGATGTCTCAGTATCCTCATATGCGATCCAACTGAAGATATCTTGGC
 CAGACGTGGAAAGTGGCAATGATAC SEQ ID NO. 3 (reverse)

S-RNáza S9, AJ635271 + vlastní sekvence

SEQ ID NO. 1 (forward) CTTGTTCTTGCTTTTGCTTTCTTCTTTTGTACGTTATG
 AGCAGCAGTGGTGGGGTTGCATTACAATCTTTTGCTCTTTAAATATCCTATAATCAGCATTGC
 GTTTTCTACTTGTGCTTTTTGTTTCATAGAAACAATTGTGTGTCTGATGATAGATCACATGA
 CATGTTGAATTCACCCACATATTTTTCATTTAATCAAACGCACAACCTTTATATGGATGAGTA
 AGTATTCGGGGATTGCTTTCGTGCATGTCTCTTTTGTGTTATCTGATAATTTGTTGCAATAA
 GTGCAGTCTATTATCACAATAATTTTCGCAGGATCTTACGACTATTTTCAATTTGTGCAAC
 AATGG SEQ ID NO. 2 (reverse)

Obr. 2-4

S-RNáza S9, AJ635270

SEQ ID NO. 8 (forward) TGTAATAATGGATCTGCTCATCTAATTGAAGGACCTGCG
 TATATTCAAAATATTGTACATAATGAAAGGTTTAAAACCAAACGCAGTTTAATACTCAGGT
 TTAGTGAAGAAAAAACAATCTTGTTCAAAATGAAAATTGAAGTACCCCTAAATTTGTTT
 CGTTTTTATCAAATATGTATATATTGTTTGGATGTCTCAGTACCCTAAATTGCGATCCAAA
 CTGAAGAGATCTTGGCCGGACGTGGAAGTGGCAATGATACA SEQ ID NO. 3
 (reverse)

S-RNáza S10, JQ280519

SEQ ID NO. 1 (forward) CTTGTTCTTGCTTTGCTTTCTTCTTGTGTTTCATTATG
 AGCACTGGTGAGTTGCATTACAATCTTTCGCTCTTTATAATATGCGTATAATTTGCATTGTA
 TTTTTCTACTTCTCTTTTATGTTTGGAGAAATATTATGTATGTTTCGATTCGATGATATCTAG
 CGCATAACTTTCTTTGGCCGAGTAAGTACTTGGGCATTACTTTTCTGCATGCTTTCTTTTCGT
 TTAATCTGATAGTTATTGCAATAAGTGCTGCGGAAATATGTTCTTTATACATCAAATCTT
 ATTTAAGATACCATTAACCTTCTCACAATAGTTTTTCGAGGATCTTATGTTTATTTCAATT
 TGTGCAACAATGG SEQ ID NO. 2 (reverse)

S-RNáza S12, AY259115

SEQ ID NO. 1 (forward) CTTGTTCTTGCTTTGCTTTCTTCTTGTGTTTCATCATG
 AGCGCTGGCGATGGTGAGTTGCGTTACAATCTTTGCTCTATATATCCTCTATGCATATAAT
 CAGCATTGCGTTTTTCTACTTGTATTTTTTGTTCAGAGAACTATTGTGTATGTTTCGATGAT
 ATATCACATGACATGCGGTGTATTGACTTCACCCACATATTTTTGATTTAATAATCTAACGC
 ACAACTTTCTTTGGATAAGTAAGTATTGGGAATTGCTTTTCTGCATGTCCTTTTTATTTT
 CATCCTCTTTTACTTGGCAGGATCTTACGACTATTTTCAATTTGTGCAACAATGG SEQ ID
 NO. 2 (reverse)

SEQ ID NO. 9 (forward) GCTAACCTTACATTTTGACCCAAAAAATACTTA
 CGTTTTACTTTTTCTCAAATATGTATATATTGCTTGGGTGTCTCAGTCCCCTGAAATGCAA
 ACCAACTGAAGAAATCTTGGCCGGACGTGGAAGTGGCAATGATAC SEQ ID NO. 3
 (reverse)

S-RNáza S13, JQ280526

SEQ ID NO. 10 (forward) ATATGTCTGTCTATCTATCTGTTTTCTCAAATATGAA
 TATATTGCTTGGATGTCTCAGTACCCTGATTTGCGATCCGATCTGAAAAGATCTTGGCCCGA
 CGTGGAAAGTGGCAATGATAC SEQ ID NO. 3 (reverse)

S-RNáza S14, DQ266445 + vlastní sekvence

SEQ ID NO. 1 (forward) CTTGTTCTTGCTTTGCTTTCTTCTTTTGTACGTTATG
 AGCAGTGGTGGGTGGCATTACAACCTTTGCTCTTTATATCCTATATGCATATATATATA

Obr. 2-5

ATCAGCATTGCGTTTTACTACTTGTATTTTTTGTTCACAGAACTATTGTGTGTGTTTCGATGA
 TATATCATATGACATGCGGTGTATTTGGTGATTGTTTTTCTGCCTGTCTCTTTTTATTTTC
 ATCATCTTTTCGTTTATTCTGATAACTGTTTGCAATAAGTGCAGTCTATTGATCACAATAATT
 TTGGCAGGATCTTATGACTATTTTCAATTTGTGCAACAATGG SEQ ID NO. 2
 (reverse)

S-RNáza S16, AJ635280 + vlastní sekvence

SEQ ID NO. 1 (forward) CTTGTTCTTGCTTTTGCTTTCTTCTTGTGTTTTATTATG
 AGCACTGGTGATGGTGGGTTGCATTACAATCTTTTTGCTCCTTATTTTCTATATGCATAAAAT
 TAGCATTGCATTTGTCTACTTTTATGTTATGTTTAGAGAAATGTTGTGTGTTTCGATGATA
 TATATATATAGGTAATGGAGGACTTGATCTAGCGCACAACTTCTTTGGATGAGTAACTATT
 TGGGAACTTTTAGTCCGCATGGTTTCTTTTCGTTTACTCTGATAGTTGTTGCCATAAGTGCA
 GTATTCATTATTGGTAGCTACGATTATGTTCTTTTATACATCAAATCCTTATTTAAGATACCA
 TCAACCTTCTCACAATTATTTTGGCAGGATCTTATGTCTATTTTCAATTTGTGCAACAATGG
 SEQ ID NO. 2 (reverse)

S-RNáza S22, EF429142

SEQ ID NO. 1 (forward) CTTGTTCTTGCTTTTGTTTTCTTCTTGTGTTTTATTATG
 AGCACTGGTGGGTTGCATTACAATCTTTTTCTCGTTATATCCTATACGCTAATTAGCATGAA
 TTGCATTTTTCTACTTCTAATGTTTAGAGAAATATCATGTGTATTAGATGATACAGGTGGCA
 TGCGCTGTATTGAATCAGCCCATATTTTTTCATTTGATCTATCGCATAACTTTGTTTGGATGA
 GTAACATTTTTGGGAATTATTTTTCTGCATGGTTTCTTTTCGTTTACTCTGAAAGTTGTACCG
 ATAAGTGCAGTATTCATCATTTGGAAGCTAAAAATATGTTATTTATACATCACATACTTATTT
 AAGATACCATTAACTTCTCACAATAATTCTGGCAGGATCTTATGTCTATTTTCAATTTGTG
 CAACAATGG SEQ ID NO. 2 (reverse)

SEQ ID NO. 8 (forward) TCTAATAATGGATCTGCTCATCTAATTAAGGACCTGTT
 ATTTTGTACTTGGCTATATAGTCAAAGGATTATACATAGTGGAAAGGATTAATAATATTC
 AAGTTAATTTAAAAATTTTATTTGTTTGTGTTGGAATTACAAAATATTATTCAAAAATGAA
 AATTAAGCATCCCTAAATTTATTTATTTTCTCAGTACCCTCAATTGCGAAAAGATCTGAAG
 AAATCTTGGCCCGACGTGGAAAGTGGCAATGATAC SEQ ID NO. 3 (reverse)

S-RNáza S23, AY259114

SEQ ID NO. 1 (forward) CTTGTTCTTGCTTTTGCTTTCTTCTTTTGTACGTTATG
 AGCAGTGGTGGGTTGCATTACAACCTTTTGCTCTTTATATCCTATATGCATATATATATATA
 ATCAGCATTGCGTTTTACTACTTGTATTTTTTGTTCACAGAACTATTGTGTGTGTTTCGATGA

Obr. 2-6

TATATCATATGACATGCGGTGTATTTGGTGAATGTTTTCTGCCTGTCCCCTTTTTATTTTC
 ATCATCTTTCGTTTATTCTGATAACTGTTTGAATAAGTGCAGTCTATTGATCACAATAATT
 TTGGCAGGATCTTATGACTATTTCAATTTGTGCAACAATGG SEQ ID NO. 2
 (reverse)

S-RNáza S24, AY259112

SEQ ID NO. 1 (forward) CTTGTTCTTGCTTTTGTCTTCTTGTGTTTCATTAT
 GAGCACTGGTGGGTTGCATTACCCTCTTTTTCTCGTTATATCCTATACGCTAATTAGCATGA
 ATTGCATTTTTCTACTTCTAATGTTTAGAGAAATATCATGTGTATTAGATGATACAGGTGGC
 ATGCGCTGTATTGAATCAGCCATATTTTTTCATTTGATCTATCGCATAACTTTGTTTGGATG
 AGTAACTATTTTGGGAATTATTTTCTGCATGGTTCTTTTCGTTTACTCTGAAAGTTGTACC
 GATAAGTGCAGTATTCATCATTTGGAAGCTAAAAATATGTTATTTATACATCACATACTTATT
 TAAGATACCATTAACCTTCTCACAATAATTCTGGCAGGATCTTATGTCTATTTTCAATTTGT
 GCAACAATGG SEQ ID NO. 2 (reverse)

SEQ ID NO. 6 (forward) TCATTTTGTCTTCCACCTACCCTTTAGCTTTTAGTTTTT
 ACCAAATTAGATTGTTAGTATGAACATATATAATACTTTTTTTTTATAACATTCGTCATC
 TGGTTAGGCACACACATTATTTTGAATATATATCTAAGTACAAAATTGCTTGGATGTCTCAG
 TCCCCTCAACTGCGATCCAACTGCAGACATCTTGGCCGGACGTGGAAAGTGGCAATGATAC
 SEQ ID NO. 3 (reverse)

S-RNáza S25, AY259113

SEQ ID NO. 1 (forward) CTTGTTCTTGCTTTTGTCTTCTTTTGTACGTTAT
 GAGCAGTGGTGGGTTGCATTACAATCTTTTGTCTTTTATATCCTATATGCATGTAATCAGCA
 TTGCGTTTTTCTACTTGTATTTTTTATTTCAGAGAACTATTGTGTGTGTTGGATGACATGCA
 GTGTATTGAATTCACCCACATATTTTTCATTTAATCTAACGCACAACCTTTGTTTGGATGAGC
 AAGTATTTGGTGATTGTTTTTCTGCATGTCCTCTTTTTATTTTCTTAATCTTTTGTATTTC
 TGATAATTGTTTGAATAAGTGCAGTCTTATTCATCACAATAATTTTGGCAGGATCTTATGA
 CTATTTTCAATTTGTGCAACAATGG SEQ ID NO. 2 (reverse)

S-RNáza S38, JQ280518

SEQ ID NO. 1 (forward) CTTGTTCTTGCTTTTGTCTTCTTTTGTACGTTAT
 GAGCAGTGGTGGGTTGCATTACATCTTTTGTCTTTTAAATCTTATATGCATATAATCAACA
 TTGTGTTTTTCTACTTGTATTTTTTGGGGATTGTATTCTGCATGTCCTCTTTTGTATTCT

Obr. 2-7

GATAATTGTTACAATAACTGCAGCCTACTGGAAACCTAAAGTTAATTATGTTCTTTATTCTT
CAAATCCTTATTTATGATAGCATTAAATATTCTCACATAATTTTGGCAGGATCTTATGACTA
TTTTCAATTTGTGCAACAATGG SEQ ID NO. 2 (reverse)

MGSTins, LC371380 + vlastní sekvence

SEQ ID NO. 19 (forward) AAAGCCTTCAAGTGGGAAAGGGAAAAGAAAATAAAAA
AAACAATTGAAAACGTTGAAGGCCACAAGGTATCCTAGGGGTGGCAATTTCCGACTCGACCC
GTTACACGACTCGAAACCCGCACGGGAAAAACACGACCCAAACACGACCCATTAATAAATGG
GTAATTTTCGGGTCAACCCACCACTGACCCATTTAT SEQ ID NO. 20 (reverse)

MGStwt, NW_018921783.1

SEQ ID NO. 19 (forward) AAAGCCTTCAAGTGGGAAAGGGAAAAGAAAATAAAAA
AAACAATTGAAAACGTTGAAGGCCACAAGGTATCCGTAACCCTCTCTCCTCCAAGTGGCAGG
CAGCCTGCACTCATTTATGGACGTGTAAGTAATGACCTGTAAGCAA SEQ ID NO. 21
(reverse)

MGSTdel, vlastní sekvence

SEQ ID NO. 19 (forward) AAAGCCTTCAAGTGGGAAAGGGAAAAGAAAATAAAAA
AAACAATTGAAAACGTTGAAGGCCACAAGGTATCCGTAACCCTCTCTCCTCCAAGTGGCTGC
ACTCATTTATGGACGTGTAAGTAATGACCTGTAAGCAA SEQ ID NO. 21 (reverse)

Obr. 2-8