

## HODNOCENÍ INKOMPATIBILITY U GENOFONDU POZDŇÍCH ODRŮD TŘEŠNĚ

### EVALUATION OF INCOMPATIBILITY AT GERMPLASM OF LATE SWEET CHERRY VARIETIES

Josef Patzak<sup>1</sup>, Alena Henychová<sup>1</sup>, František Paprštejn<sup>2</sup>, Jiří Sedlák<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Chmelařský institut s.r.o., Žatec

<sup>2</sup> VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOCNÁŘSKÝ HOLOVOUSY s.r.o.,  
508 01 Holovousy

e-mail: patzak@chizatec.cz

#### ABSTRACT

Sweet cherry belongs to an economical important vegetatively propagated fruit crop. Sweet cherries are self-incompatible determined by a gametophytic self-incompatibility system (GSI), controlled by a multi-allelic S-locus. There is important to select suitable pollen donors for successful fruit production in individual variety plantation. Today, it is possible to detect individual alleles of S-locus by PCR molecular markers. In analysis of late sweet cherry varieties, we detected 10 different S-alleles in total 18 combinations of S-locus, belonging to 17 incompatibility groups. S3, S1 and S4 were the most frequent alleles and III (S3S4) and II (S1S3) were the most frequent incompatibility group. Results are useful for the selection of pollen donors for ensuring of sufficient yields.

**Keywords:** sweet cherry (*Prunus avium* L.), S-RNase alleles, self-incompatibility, PCR molecular markers, incompatibility groups

Třešeň představuje ekonomicky významnou vegetativně množenou ovocnou plodinu. U třešně je vyvinuta auto-inkompatibilita, založená na systému gametofytické inkompatibility (GSI), která je kontrolována multi-alelickým S-lokusem. Pro úspěšnou produkci plodů je tak důležité vybrat vhodné opylovače do výsadeb pro jednotlivé odrůdy. Jednotlivé alely S-lokusu lze dnes detekovat pomocí PCR molekulárních markerů. V rámci analýzy 60 pozdně zrajících odrůd třešně jsme detekovali 10 různých S-alel v celkem 18 kombinacích S-lokusu, patřících do 17 skupin inkompatibility. Nejfrekventovanější byly S3, S1 a S4 alely a skupiny inkompatibility III (S3S4) a II (S1S3). Výsledky lze použít pro výběr vhodných opylovačů pro zajištění dostatečných výnosů.

**Klíčová slova:** třešeň ptačí (*Prunus avium* L.), alely S-RNase, auto-inkompatibilita, PCR molekulární markery, skupiny inkompatibility

Projekt je řešen ve spolupráci s Chmelařským institutem s.r.o. v Žatci, který v době podání projektu disponoval laboratoří molekulárních analýz a měl zkušenosti s hodnocením genomu ovocných dřevin. Studium fenotypových charakteristik a výsledky molekulárních analýz DNA mají za cíl popsat genetickou variabilitu kolekcí odrůd třešně s výhledem využití získaných výsledků ve šlechtitelských programech.

Plochy pěstování třešni narůstají díky vysoké ziskovosti v celosvětovém měřítku. V Evropě jsou velkými producenty třešni Itálie a Španělsko. V České republice bylo v roce 2017 v intenzivních sadech registrováno 889 hektarů třešni. Za posledních 5 let zůstala plocha tuzemských produkčních sadů přibližně konstantní, ale výnosy mají ve finančním vyjádření vzrůstající tendenci (Buchtová 2017). Pozdně dozrávající třešně (od začátku 4. třešňového týdne) mají na trhu větší komerční význam než rané odrůdy.

Opylovací poměry jsou u třešni složitější, odrůdy jsou většinou cizosprašné. Jedná se o systém gametofytické inkompatibility. Systém je založen na expresi genů S-RNázy a F-box SFB. Jednotlivé alely S-RNázy brání růstu pylové láčky při opylení, která není schopna prorůst do semeníku opylované odrůdy a tím brání samosprašení (Schuster 2012). Proto navzájem inkompatibilní odrůdy nejsou schopné oplození. Výběr vhodných opylovačů pro jednotlivé odrůdy je především důležitý v komerčních výsadbách s omezeným počtem odrůd. Vhodný opylovač se svým kvetením musí časově překrývat s opylovanou odrůdou a měl by mít rovněž pravidelnou vysokou násadu květů. Inkompatibilita je z pohledu genetiky determinována jedním nebo více lokusy, označovanými symbolem S.

V řešeném projektu byla pomocí molekulárních markerů hodnocena variabilita S-locusu v kolekci genetických zdrojů za účelem zmapování inkompatibility jednotlivých odrůd třešni.

## MATERIÁL A METODY

V rámci řešení projektu byla na 60 vzorcích DNA pozdně zrajících odrůd třešni z genofondu

VŠÚO Holovousy s.r.o. provedena identifikace S-locusů. DNA byla izolována SDS metodou podle Goulão *et al.* (2001), doplněná přečištěním přes ChargeSwitch® gDNA Plant Kit (Invitrogen, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). Pro PCR identifikaci S-locusů byly použity univerzální primerové kombinace pro Intron 1 a 2, a specifické alelické kombinace pro S2, S3, S4, S7, S9, S10, S12, S13, S14 a S16 alely (Sonneveld *et al.* 2003, Iezzoni *et al.* 2008, Sharma *et al.*, 2014). K amplifikaci bylo použito standardního protokolu, profilu a chemikálií PCR reakce. Vzorky byly nejprve denaturovány 3 minutovou inkubací při 94 °C. Polymerázová řetězová reakce měla následující časový a teplotní profil: 35 cyklů – denaturace 30 s při 94 °C, „annealing“ primerů 60 s při 54 °C a elongace 90 s při 72 °C. Reakce pak byla ukončena závěrečnou 10 minutovou elongací při 72 °C a zchlazením na 4 °C. Separace PCR produktů S-locusů byla prováděna na 1 – 2% agarózovém gelu a produkty byly vizualizovány ethidium bromidem podle Patzaka (2001). Molekulární velikosti jednotlivých PCR produktů jsou odečteny pomocí molekulárních standardů pGEM DNA markeru a 100 bp ladderu (Promega, Madison, WI, USA). Vyhodnocení S-locusů a skupin autoinkompatibility proběhlo podle Schustera (2012).

## VÝSLEDKY A DISKUSE

V rámci analýzy 60 pozdně zrajících odrůd třešni jsme detekovali 10 různých S-alel. Nejfrekventovanějšími S-alelami byly S3, S1 a S4 (Tabulka 1). V současnosti je popsáno celkem 18 S-alel (S1 až S7, S9, S10, S12, S13, S14, S16, S17, S19, S21, S22, S24), které popsal Schuster (2012) u 734 odrůd třešni. Na základě kombinací jednotlivých S-locusů byly vytvořeny skupiny inkompatibility, které sdružují jednotlivé odrůdy, u nichž je vzájemné opylení geneticky vyloučeno. Tyto vzájemné kombinace S-locusu tvoří celkem 47 skupin inkompatibility a skupinu „0“ s unikátními kombinacemi (Schuster 2012). U pozdně zrajících odrůd třešni bylo zjištěno 18 kombinací S-locusu a patřily do 17 skupin inkompatibility, jak je uvedeno v tabulce 1. Nejvíce odrůd třešni patřilo do skupiny inkompatibility III (S3S4) a II (S1S3). U 40

odrůd jsme potvrdili již dříve známé kombinace S-lokusů, u 5 odrůd ('Bing', 'Droganova žlutá', 'Hedelfingenská', 'Vanda', 'Viola') byly nalezeny odlišné kombinace a u 15 odrůd byly kombinace S-lokusů nově detekované.

## ZÁVĚR

Genetická charakterizace odrůd třešně usnadní a zjednoduší rozhodování šlechtitelů při

výběru vhodných rodičovských párů, s cílem zefektivnění šlechtitelských programů. Bez výzkumu genomu třešně pomocí molekulárních metod by došlo v nejbližší době ke ztrátě dominantní pozice České republiky v oblasti šlechtění této ekonomicky vysoce významné plodiny. Znalost opylovacích poměrů je u třešně i klíčová i pro dosažení dostatečných výnosů.

## PODĚKOVÁNÍ

Výzkum byl financován z projektu QJ 1510001 Národní agentury pro zemědělský výzkum. Výsledek byl vytvořen za finanční podpory MŠMT v rámci programu NPU I, projekt LO1608 „Výzkumné ovocnářské centrum“. Byla rovněž využita infrastruktura operačního programu CZ.1.05/2.1.00/03.0116.

## LITERATURA

- BUCHTOVÁ, I. *Situační a výhledová zpráva ovoce*. Ministerstvo zemědělství, Praha, 2017, 88 s.
- GOULAO, L., C.M. CABRITA, C.M OLIVIERA and J.M. LEITAO. Comparing RAPD and AFLP analysis in discrimination and estimation of genetic similarities among apple (*Malus x domestica* Borkh.) cultivars. *Euphytica* 2001, (119): 259–270.
- IEZZONI, A.F. Cherries – Chapter 5. In: HANCOCK, J.F. *Temperate Fruit Crop Breeding: Germplasm to Genomics, Springer, New York*. 2008, 150–175. ISBN 978-1-4020-6907-9.
- PATZAK, J. Comparison of RAPD, STS, ISSR and AFLP molecular methods used for assessment of genetic diversity in hop (*Humulus lupulus* L.). *Euphytica*. 2001, (121): 9–18.
- SHARMA, K., P. SEDLÁK, D. ZEKA, P. VEJL and J. SOUKUP. Allele-specific PCR detection of sweet cherry self-incompatibility alleles S3, S4 and S9 using consensus and allelespecific primers in the Czech Republic. *Hortic. Sci.* 2014, (41): 153–159.
- SCHUSTER, M. Incompatible (S-) genotypes of sweet cherry cultivars (*Prunus avium* L.). *Sci. Hortic.* 2012, (148): 59–73.
- SONNEVELD, T., K.R. TOBUTT and T.P. ROBBINS. Allele-specific PCR detection of sweet cherry self-incompatibility (S) alleles S1 to S16 using consensus and allele-specific primers. *Theor. Appl. Genet.* 2003, (107): 1059–1070.

## TABULKY

**Tabulka 1.** Detekované S-lokusy a skupiny inkompatibility u pozdních odrůd třešní

**Table 1.** Detected S-locus and incompatibility groups in late cherry varieties

Skupina autoinkompatibility <sup>1)</sup>	Alely <sup>2)</sup>	Odrůdy <sup>3)</sup>
I	S1S2	Starking Hardy Giant, Summit
II	S1S3	Bing, Durone Nero 1, Hedelfingenská, Hildesheim, Holovouská chrupka, Ladeho pozdní, Nero 1, Oktavia, Pivka, Regina, Troprichterova, Van, Windsor
III	S3S4	Amid, Büttners späte Knorpelkirsche, Emperor Francis, Kristin, Lambert, Lapins, Napoleonova, Nero 2, Sandra, Staccato, Star, Stella, Sunburst, Sweet Heart, Ulster
IV	S2S3	Sue, Vogue,
V	S4S5	Carmen
VI	S3S6	Dönissenova žlutá, Kordia, Těchlovan
IX	S1S4	Halka, Hudson, Rainier
XIII	S2S4	Sam, Vosenka
XIV	S1S5	Basler Adlerkirche, Mramorovaná chrupka, Švestičková
XVII	S4S6	Debora, Irena
XVIII	S1S9	Tamara
XX	S1S6	Fabiola, Horka, Sylvana, Vanda, Velká černá chrupka
XXII	S3S12	Germersdorfer, Schneiderova, Thurn Taxis (Pumra)
XXV	S2S6	Vilma
XXVII	S4S12	Viola
XLIV	S3S7	Pivovka
0	S4	Těchlovická
	S19	Droganova žlutá

1) Group of self-incompatibility, 2) Alleles, 3) Varieties