

IDENTIFIKACE SAMOSPRAŠNÝCH GENOTYPŮ TŘEŠNÍ VYŠLECHTĚNÝCH VE VŠÚO HOLOVOUSY

IDENTIFICATION OF SWEET CHERRY SELF-COMPATIBLE GENOTYPES BREED IN VŠÚO HOLOVOUSY

Jana Čmejlová, Pavol Suran, Lubor Zelený

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

e-mail: jana.cmejlova@vsuo.cz

ABSTRACT

Sweet cherry (*Prunus avium* L.) is primarily a self-incompatible plant, however, gene mutations enabling its self-compatibility exist. Self-compatibility very importantly simplifies management of commercial orchards and lowers risk of loss/lowering crop yield occurring in self-incompatible varieties. Self-compatible varieties are therefore a modern trend in a cherry breeding. As only few commercially successful self-compatible varieties with high quality fruits exists, VŠÚO Holovousy focused in one program on their breeding. 105 potentially self-compatible genotypes with mutated S4' allele have been prepared. Using molecular methods 77 genotypes carrying this self-compatible S-allele have been identified.

Keywords: Sweet cherry, *Prunus avium* L., breeding, self-compatibility, S-alleles, S4'

Třešeň ptačí (*Prunus avium* L.) je primárně cizospašnou rostlinou, existují však genové mutace umožňující její samospašnost. Ta velmi významně zjednodušuje management komerčních sadů a snižuje riziko ztráty/snížení úrody vyskytující se u cizospašných odrůd. Z tohoto důvodu jsou samospašné odrůdy moderním trendem šlechtění. Jelikož neexistuje mnoho kvalitních komerčně úspěšných samospašných odrůd, VŠÚO Holovousy se v rámci jednoho programu zaměřil na jejich šlechtění. Bylo připraveno 105 potenciálně samospašných genotypů nesoucích mutovanou alelu S4'. Použitím molekulárních metod bylo identifikováno 77 genotypů nesoucích tuto samospašnou S-alelu.

Klíčová slova: Třešeň ptačí, *Prunus avium* L., křížení, samospašnost, S-alely, S4'

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 třešní však má dalekosáhlé negativní důsledky pro jejich komerční pěstování. Již ve čtyřicátých letech minulého století bylo potvrzeno, že ne všechny odrůdy třešní je možné navzájem opylit (Crane 1937). Pro úspěšné pěstování určité odrůdy proto byly vždy uváděny experimentálně zjištěné vhodné opylovací odrůdy, které je nezbytné do komerčních sadů taktéž vysadit, aby bylo dosaženo maximální možné produkce plodů. Obvyklý počet stromů opylovací odrůdy je 10 % stromů požadované odrůdy, nebo je realizována výsadba sadu s kombinací odrůd v jednotlivých řadách, tedy v poměru 1 : 1. I v případě výsadby vhodné opylovací odrůdy však může sklizeň ohrozit mimo jiné odlišnost doby kvetení, délky kvetení nebo intenzity kvetení, které jsou ovlivněny mnoha faktory, ať již biotickými, nebo abiotickými. Výsadba dvou odrůd třešní v komerčním sadu může být komplikací i pro agrotechniku a sklizeň, kdy obě odrůdy zpravidla dozrávají v odlišnou dobu, nebo se plody liší významně tvarem plodu a produkci není možné smíchat. Navíc nemusí mít opylovací odrůda plody tržní kvality, což by v důsledku snižovalo možný výnos z jednotky plochy. Proto je jedním z trendů moderního šlechtitelství produkce samosprašných odrůd, které značně zjednoduší management třešňových sadů. První komerčně zajímavou samosprašnou odrůdou třešní byla 'Stella', kříženec nesamosprašné odrůdy 'Lambert' a samosprašného klonu 'JI2420' (Lapins 1971). V současnosti je ve veřejně dostupné databázi obsahující celkem 1203 odrůd z celého světa zapsáno 67 samosprašných odrůd s různými kvalitativními vlastnostmi (Schuster 2017).

U třešní je cizosprašnost primárně dána multialelickým S-lokusem, který v rámci nerekombinujícího haplobloku nese dva geny kódující proteiny zodpovědné za cizosprašnost: 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 2003, Yamane 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 2010, Matsumoto 2016a, 2016b a 2019) se předpokládá existence „obecného inhibitoru“, který může inaktivovat všechny S-RNázy pronikající dovnitř prorůstající pylové láčky z pletiv pestíku. Tento obecný inhibitor pravděpodobně tvoří komplex proteinů nazývaný SCF (podle obdobného komplexu z čeledi *Solanaceae* a *Rosaceae*) a podílí se na něm proteiny PavSLFLs, PavSFB2, MGST, DnaJ-like protein a další minoritní proteiny (Matsumoto 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 tímto obecným inhibitorem. S-RNáza tak může vykonávat svoji funkci – degradovat RNA v prorůstající pylové láčce, což indukuje zastavení růstu pylové láčky již v blizně a zabraňuje samoopylení. Význam SFB proteinu pro cizosprašnost je dobře dokumentován mutacemi/delecí SFB proteinu, kterými bylo dosaženo samosprašnosti třešní. Kromě toho byl popsán i význam genu kódujícího glutation-S-transferázu z M-lokusu (MGST), jehož protein je součástí výše uvedeného SCF inhibičního komplexu. Snižováním exprese MGST je také možné docílit alespoň částečné samosprašnosti třešní (Ono 2018).

V současnosti byly popsány samosprašné třešně, které obsahují buď jednu ze tří dosud publikovaných samosprašných S-alel (označované s apostrofem jako S3', S4' a S5'), nebo mají mutovaný promotor genu MGST. Všechny samosprašné S-alely mají inaktivovanou SFB složku inkompatibility. Jedinou alelou, která vznikla přirozeně, je alela S5' (Marchese 2007), zbylé dvě vznikly ozařováním (Lewis 1954). U alely S3' došlo v S-lokusu k rozsáhlé delecii, která zatím nebyla přesně určena (Sonneveld 2005). 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 (Sonneveld 2005). U alely S5' se v SFB genu bodovou mutací vytvořil předčasný stop kodon (Marchese 2007). U MGST je alespoň částečná samosprašnost dána inzercí transpozónu podobné sekvence do promotorové oblasti genu MGST. Přestože funkce tohoto genu při opylení není zcela jasná, i funkční experimenty dokládají, že snížení exprese MGST, díky této inzerci, vede k narušení mechanismu cizosprašnosti (Cachi 2011).

Samosprašné S-alely byly do křížení zařazeny relativně nedávno, jsou však stále častěji využívány pro tvorbu moderních samosprašných odrůd třešňí (téměř výlučně alela S4'). Z 67 samosprašných odrůd zapsaných ve výše uvedené databázi mají 2 odrůdy alelu S3', 53 odrůd obsahuje alelu S4' a 2 odrůdy mají S5', 10 odrůd pak má mutovaný gen MGST (skupina původně španělských odrůd) (Schuster 2017). Tržní potenciál v současnosti známých samosprašných odrůd je však různý a jejich podíl na celosvětové produkci třešňí zůstává zatím nízký, jelikož tyto třešně stále nedosahují nejkvalitnějších parametrů, ať již se týkají vlastností stromů, nebo plodů. Rovněž co se týče doby zrání nepokrývají samosprašné odrůdy celé produkční období třešňí. Proto je třeba šlechtit nové samosprašné odrůdy a VŠÚO Holovousy coby tradiční šlechtitel třešňí se této činnosti v posledních letech velmi intenzivně věnuje. Identifikovat samosprašný genotyp třešňí v rámci populace potomstva vzniklého křížením samosprašných odrůd s nesamosprašnými odrůdami třešně ptačí (*Prunus avium* L.) klasickými šlechtitelskými metodami je velmi pracné. Bez asistence molekulární genetiky se samosprašnost třešňí prokazuje včasnou prostorovou izolací květonosných větví/celých rostlin před rozkvetem stromu a hodnocením následné násady plodů (tzv. test samosprašnosti). Tento test je však možné provádět nejdříve po 5 až 6 letech od výsevu hybridního osiva, kdy se zpravidla na pravokorenných semenáčích objevují první květy. Oproti tomu molekulární metody umožňují rozpoznat samosprašné genotypy již v prvním roce života semenáče.

Tento článek popisuje nově vyvinutou molekulárně genetickou metodu identifikace

samosprašné alely S4' použité ve šlechtění pro zajištění samosprašnosti třešňí, tato metoda je využitelná při rané selekci šlechtitelského materiálu. Cílem této práce bylo: 1) ověřit funkčnost a specifitu primerů navržených pro budoucí komplexní analýzu S-alel u třešňí fragmentační analýzou na kapilárním genetickém analyzátoru a 2) analyzovat připravené potenciálně samosprašné genotypy.

MATERIÁL A METODY

Pro křížení byl použit pyl samosprašných odrůd třešňí 'Early Star', 'Halka', 'Lapins', 'Newstar', 'Sandra Rose', 'Santina', 'Sonata', 'Stella' a 'Sunburst' pro opylení komerčně úspěšných nesamosprašných odrůd 'Aranka', 'Kordia', 'Regina', 'Vanda', 'Merton late', 'Krupnoplodnaja', 'Sam', 'Starking Hardy Giant' a 'Van'. Toto uspořádání (samosprašná odrůda v roli otce a cizosprašná odrůda v roli matky) bylo použito z důvodu zajištění zkřížení dvou odrůd, neboť přirozeně zabraňuje samoopylení, ke kterému by mohlo dojít v případě, že by byla samosprašná odrůda matkou. U samosprašné odrůdy 'Symphony' a potenciálně samosprašného křížence 'Van compact' x 'Stella compact' byly analyzovány genotypy z volného sprášení. Z jednotlivých křížení bylo získáno celkem 105 genotypů (viz Tabulka 1), které byly následně studovány molekulárně genetickými metodami. Přítomnost samosprašné alely S4' byla analyzována i u samosprašných rodičovských odrůd použitých pro křížení.

Z odebraných vzorků byla z lýka izolačním kitem Plant SV mini (GeneAll) dle návodu výrobce izolována celková DNA. Homogenizace vzorků byla prováděna v tekutém dusíku, navážka vzorku činila 100 mg. Koncentrace DNA ve vzorku byla stanovena pomocí spektrofotometru NanoDrop Lite (Thermo Fisher Scientific).

Pro amplifikaci samosprašné alely S4' byly pomocí programu Vector NTI Advance navrženy specifické primery amplifikující alely S4/S4' SFB genu tak, aby SFB ostatních S-alel nerozpoznávaly. Nejprve bylo provedeno porovnání sekvencí SFB genů jednotlivých známých S-alel nalezených v databázi na serveru NCBI (<https://www.ncbi>).

nlm.nih.gov/nuccore), byly v nich vyhledány oblasti s nízkou homologií obklopující místo s inkriminovanou delecí 4 nukleotidů a zde byly navrženy specifické primery pro amplifikaci S4/S4' alel. Specifita navržených primerů byla ověřena na kontrolních odrůdách, které obsahují, respektive neobsahují S4/S4' alely. Pro kontrolu přítomnosti amplifikovatelné DNA byly použity navržené kontrolní primery pro MGST gen.

Připravená DNA byla použita jako templát pro multiplexovou PCR reakci s následujícími reakčními podmínkami: 2 μ l DNA (10 ng/ml); 250nM primery (každý ze 4 primerů uvedených v Tabulce 2), 10 μ l Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific), do 20 μ l doplněno vodou. PCR amplifikace probíhala v PCR cyklu C1000 (Biorad) s následujícím teplotním profilem: 98 °C/1 minutu; cyklování: 40x (98 °C/10 s, 58 °C/10 s, 72 °C/15 s); závěrečná extenze 72 °C/30 s.

Po ukončení reakce byly výsledné PCR amplikony analyzovány elektroforeticky na 4% agarózovém gelu s patřičnými kontrolami (Obrázek 2) a příslušné proužky pro S-alely byly vyřezány z gelu. DNA byla izolována z gelu kitem ExpinTM Combo GP (GeneAll) podle návodu výrobce a následně osekvenována kitem BigDyeTM Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied BiosystemsTM). Získané sekvence byly programem Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) porovnány s databází GenBank.

VÝSLEDKY A DISKUSE

Detekce mutované samosprašné alely S4' probíhala PCR amplifikací oblasti SFB genu s příslušnou mutací, kdy byly pro analýzu S4/S4' alel navrženy nové primery, které umožňují specifickou amplifikaci oblasti s čtyřnukleotidovou delecí v S4 SFB genu s délkou analyzovaného fragmentu výhodnou pro plánovanou fragmentační analýzu na kapilárním genetickém analyzátoru. Totožnost amplifikovaných S4/S4' alel byla ověřena sekvenováním (ukázka sekvenčního výstupu na Obrázku 1), získané sekvence byly ověřeny v databázi GenBank. Specifita primerů pro alely S4/S4' byla prokázána na kontrolních odrůdách s jinými známými S-alely (nulová amplifikace u odrůd neobsahujících S4/S4' není ukázána).

Celkem bylo analyzováno 105 genotypů vzniklých z křížení samosprašných odrůd třešní s komerčně úspěšnými nesamosprašnými odrůdami, popřípadě z volného sprášení (potenciálně) samosprašných genotypů. Ze všech vzorků byla izolována DNA, která byla amplifikována v multiplexové PCR reakci. Tato reakce obsahovala jednak primery pro amplifikaci kontrolního genu, který by se měl amplifikovat u všech DNA (MGST, 145 bp), a jednak primery pro specifickou amplifikaci S4/S4' alel. V případě nemutované alely S4 vzniká produkt o délce 184 bp, u mutované alely S4' o délce 180 bp, u ostatních S-alel žádný produkt nevzniká. Výsledky příkladné analýzy fragmentů na gelu jsou ukázány na Obrázku 2, již zde lze identifikovat, které vzorky obsahují mutovanou a které nemutovanou alelu. Pro ověření byly amplifikované fragmenty S-alel osekvenovány.

Výskyt mutované alely S4' byl potvrzen celkem u 77 genotypů. Na první pohled jsou zajímavé výsledky křížení 'Lapins' x 'Vanda', respektive 'Sonata' x 'Aranka'. V prvním případě bylo získáno 25 samosprašných genotypů z 25 analyzovaných hybridů, ve druhém 12 samosprašných genotypů z 12 analyzovaných hybridů, je zde tedy 100% účinnost přenosu mutované alely S4'. Nepřítomnost druhé S-alely otce v potomstvu však není překvapující, neboť pylové zrno s nesamosprašnou alelou (S1 v případě 'Lapins', respektive S3 v případě 'Sonaty') není schopné opylit pestík nesoucí tutéž alelu ('Vanda' má S-alely S1S6, 'Aranka' pak S1S3) a všichni potomci z těchto křížení by tedy měli být samosprašní. V následujících letech budou u všech samosprašných genotypů ověřeny míra samosprašnosti, fenotypické/fenologické vlastnosti stromů a kvalita plodů.

V tomto článku bylo popsáno podrobně ověření navrhované sady primerů pro detekci samosprašné alely S4', kde tato sada bude v budoucnu použita společně s dalšími primery pro amplifikaci ostatních S-alel v komplexní fragmentační analýze na kapilárním genetickém analyzátoru, což je velmi ekonomický a přesný způsob analýzy délky krátkých fragmentů. V nedávné době bylo publikováno několik systémů pro detekci mutované alely S4', které však nevyhovují našim budoucím potřebám.

Například systém vyvinutý v Ikeda *et al.*, 2004 popisuje poměrně pracné dvoukrokové tzv. nested PCR s následnou analýzou na polyakrylamidovém gelu, popřípadě se štěpením amplifikovaného produktu restriktivními enzymy a analýzou na agarózovém gelu, tento systém je pro plánovanou fragmentační analýzu zcela nevyhovující. Zhu *et al.* (2004) sice vyvinuli specifické primery pro rozpoznání mutovaného S4' SFB genu, amplifikovaný fragment je však pro poměrně dlouhý (449 bp) a takto dlouhé úseky se ve srovnání s obvykle používanými kratšími úseky (100 až 200 bp) při multiplexové fragmentační analýze hůře amplifikují a detekují. Nejnovějším systémem detekce samosprašné alely S4' je vysokorozlišovací analýza krivek tání (Muñoz-Espinoza 2017), tato analýza však funguje na zcela jiném principu a nelze ji využít při plánované fragmentační analýze. Z důvodu výše uvedených nevýhod dosavadních postupů detekce alely S4' byl vyvinut nový systém pro identifikaci této alely splňující požadavky našeho

cílového záměru komplexní analýzy všech S-alel obvykle používaných ve šlechtění třešní.

ZÁVĚR

Molekulárně genetická analýza sice není schopná celkově zrychlit proces vyšlechtění nové samosprašné odrůdy, protože je stále třeba klasickými postupy zhodnotit kvalitu nového hybridu, umožňuje však velmi zintenzivnit šlechtitelský proces zaměřený na samosprašné odrůdy. Po molekulárně genetické analýze potomstva vzniklého křížením samosprašných odrůd třešní s nesamosprašnými odrůdami jsou v populaci nových genotypů udržování a testování pouze samosprašní jedinci. Eliminace nesamosprašných jedinců z této populace přináší značnou časovou i finanční úsporu, neboť u nich nejsou zbytečně prováděny testy na samosprašnost a odpadá starost o jejich další pěstování a hodnocení fenotypových a fenologických znaků.

PODĚKOVÁNÍ

Tato práce vznikla za finanční podpory projektu MZe ČR QK1910290. Využito bylo rovněž infrastruktury projektu CZ. 1.05/2.1.00/03.0116.

LITERATURA

- CACHI, A.M. and A. WÜNSCH. Characterization and mapping of non-S gametophytic self-compatibility in sweet cherry (*Prunus avium* L.). *J. Exp. Bot.* 2011, **62**(6): 1847–56.
- CRANE, M.B. and A.G. BROWN. Incompatibility and sterility in the sweet cherry, *Prunus avium* L. *J. Pomol. Hort. Sci.* 1937, (15): 86–116.
- IKEDA, K., A. WATARI, K. USHIJIMA, H. YAMANE, N.R. HAUCK, A.F. IEZZONI and R. TAO. Molecular Markers for the Self-compatible S4'-haplotype, a Pollen-part Mutant in Sweet Cherry (*Prunus avium* L.) *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 2004, **129**(5):724–728.
- LAPINS, K.O. Stella, a self fruitful sweet cherry. *Can. J. Plant Sci.* 1971, (51): 252–253.
- LEWIS, D. and L.K. CROWE. Structure of the incompatibility gene. *Heredity.* 1954, (8): 357– 363.
- MARCHESE, A., R.I. BOŠKOVIĆ, T. CARUSO, A. RAIMONDO, M. CUTULI and K.R. TOBUTT. 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.* 2007, **58** (15, 16): 4347–4356.
- MATSUMOTO, D. and R. TAO. Distinct Self-recognition in the *Prunus* S-RNase-based Gametophytic Self-incompatibility System. *The Horticulture Journal.* 2016a, **85**(4): 289–305.
- MATSUMOTO, D. and R. TAO. 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.* 2016b, (91): 459–469.

- MATSUMOTO, D. and R. TAO. 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.* 2019, **100**(4, 5): 367–378.
- MUÑOZ-ESPINOZA, C., E. ESPINOSA, R. BASCUÑÁN, S. TAPIA, C. MENESES and A.M. ALMEIDA. Development of a molecular marker for self-compatible S4' haplotype in sweet cherry (*Prunus avium* L.) using high-resolution melting. *Plant Breeding*. 2017, **136**(6): 987–993.
- ONO, K., T. AKAGI, T. MORIMOTO, A. WÜNSCH and R. TAO. Genome Re-Sequencing of Diverse Sweet Cherry (*Prunus avium*) Individuals Reveals a Modifier Gene Mutation Conferring Pollen-Part Self-Compatibility. *Plant Cell Physiol.* 2018, **59**(6): 1265–1275.
- SCHUSTER, M. Self-incompatibility (S) genotypes of cultivated sweet cherries – An overview 2017. In: *OpenAgrar-Repositoryum*. 2017, DOI: 10.5073/20171213-111734.
- SONNEVELD, T., K.R. TOBUTT, S.P. VAUGHAN and T.P. ROBBINS. 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*. 2005, **17**(1): 37–51.
- TAO, R. and A.F. IEZZONI. The S-RNase-based gametophytic self-incompatibility system in *Prunus* exhibits distinct genetic and molecular features. *Sci. Hortic.* 2010, (124): 423–433.
- USHIJIMA, K., H. SASSA, A.M. DANDEKAR, T.M. GRADZIEL, R. TAO and H. HIRANO. 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*. 2003, **15**(3): 771–81.
- YAMANE, H., K. IKEDA, K. USHIJIMA, H. SASSA and R. TAO. 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.* 2003, **44**(7): 764–9.
- ZHU, M., X. ZHANG, K. ZHANG, L. JIANG and L. ZHANG. Development of a Simple Molecular Marker Specific for Detecting the Self-Compatible S4' Haplotype in Sweet Cherry (*Prunus avium* L.) *Plant Molecular Biology Reporter*. 2004, (22): 387–398.

TABULKY A GRAFY

Tabulka 1. Křížení samosprašných odrůd třešní s komerčně úspěšnými nesamosprašnými odrůdami (samosprašné odrůdy jsou uvedeny tučně kurzívou)

Table 1. Crossing of self-compatible cherry varieties with commercially successful self-incompatible varieties (self-compatible varieties are in bold and italics)

Otec (S-alely) ¹⁾	Matka (S-alely) ²⁾	Počet potomků ³⁾	Počet samosprašných potomků ⁴⁾
<i>Early Star (S4'S9)</i>	Kordia (S3S6)	2	0
<i>Early Star (S4'S9)</i>	Aranka (S1S3)	4	4
<i>Halka (S1S4')</i>	Kordia (S3S6)	4	2
<i>Halka (S1S4')</i>	Sam (S2S4)	1	0
<i>Halka (S1S4')</i>	Regina (S1S3)	1	1
<i>Lapins (S1S4')</i>	Kordia (S3S6)	1	0
<i>Lapins (S1S4')</i>	Regina (S1S3)	1	1
<i>Lapins (S1S4')</i>	Vanda (S1S6)	25	25
<i>Newstar (S3S4')</i>	Regina (S1S3)	2	2
<i>Sandra Rose (S3S4')</i>	Regina (S1S3)	1	0
<i>Santina (S1S4')</i>	Kordia (S3S6)	30	15
<i>Sonata (S3S4')</i>	Aranka (S1S3)	12	12
<i>Stella (S3S4')</i>	Kordia (S3S6)	3	1
<i>Stella (S3S4')</i>	Krupnoplodnaja (S5S9)	4	3
<i>Stella (S3S4')</i>	Merton Late (S1S4)	1	1
<i>Stella (S3S4')</i>	S.H.Giant (S1S2)	1	1
<i>Stella (S3S4')</i>	Van (S1S3)	1	1
<i>Stella (S3S4')</i>	Vanda (S1S6)	1	0
<i>Sunburst (S3S4')</i>	Aranka (S1S3)	1	1
volné sprášení	Van C. (S1S3) x <i>Stella C. (S3S4')</i>	3	2
volné sprášení	<i>Halka (S1S4')</i>	1	1
volné sprášení	<i>Symphony (S1S4')</i>	5	4
Celkem		105	77

1) Father (S-alleles), 2) Mother (S-alleles), 3) Offspring number, 4) Self-compatible offspring number

Tabulka 2. Primery použité pro amplifikaci

Table 2. Primers used for amplification

Primer ¹⁾	Sekvence ²⁾
S4/S4'SFB-F	5' TCTAGCTTTTATTCTTGCGAGG
S4/S4'SFB-R	5' GATCTCCTATGCCCCTAGAGAA
MGST-F	5' AAAGCCTTCAAGTGGGAAAG
MGST-R	5' TTGCTTACAGGTCATTACTTACACG

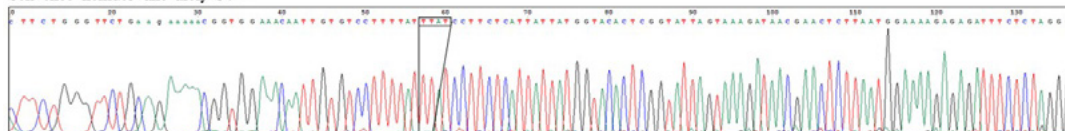
1) Primer, 2) Sequence

OBRÁZKY

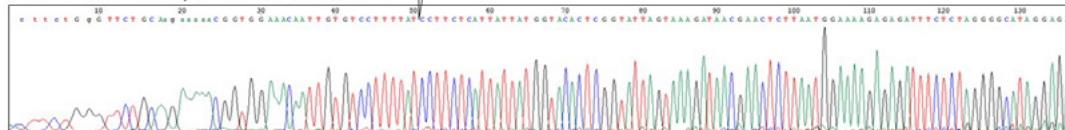
Obrázek 1. Sekvence nemutované alely S4 a mutované alely S4'

Figure 1. Sequences of non-mutated allele S4 and mutated allele S4'

Sekvence nemutované alely S4¹⁾



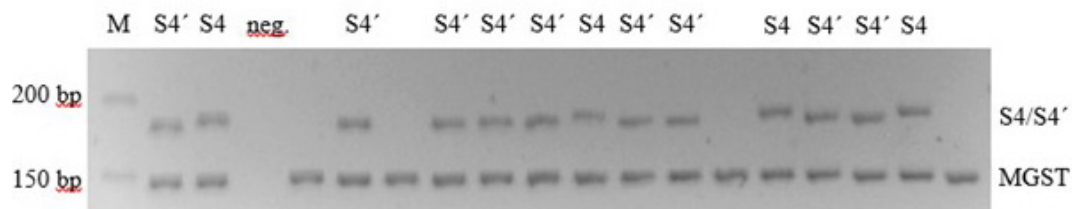
Sekvence mutované alely S4' s delecí 4 nukleotidů²⁾



1) Sequence of non-mutated allele S4, 2) Sequence of mutated allele S4' with 4 nucleotide deletion

Obrázek 2. Analýza S4/S4' alel

Figure 2. Analysis of S4/S4' alleles



M – velikostní marker, neg. – negativní kontrola bez DNA

M - size marker, neg. – negative control without DNA