

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra genetiky a šlechtění



**Studium opylovacích poměrů samosprašných odrůd třešní
analýzou DNA**

Diplomová práce

Autor práce: Bc. et Bc. Kateřina Hřebcová

Obor studia: Rostlinná produkce

Vedoucí práce: Ing. Petr Sedlák, Ph. D.

© 2018 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Studium opylovacích poměrů samosprašných odrůd třešní analýzou DNA" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 4. dubna 2018

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Petru Sedlákovi, Ph.D., za odborné vedení, rady, pomoc a trpělivost. Stejně tak chci poděkovat za trpělivost a podporu všem osobám dotčeným mým studiem, tedy především mé milé rodině.

Studium opylovacích poměrů samosprašných odrůd třešně analýzou DNA

Souhrn

Autoinkompatibilita (cizosprašnost) je jedním z nejdůležitějších mechanismů, který rostliny využívají s cílem zabránit samoopylení a následnému inbreedingu. Je geneticky řízena multialelickým S-lokusem, který je schopen rozeznat a odmítnout pyl stejného S-fenotypu. Genotypy se stejnými alelami jsou tedy vzájemně inkompatibilní a odrůdy se stejnými genotypy nejsou schopny vzájemného opylení.

Třešeň ptačí (*Prunus avium* L.) ve své divoké formě je rostlinou autoinkompatibilní (cizosprašnou). Naprostá většina kulturních odrůd třešně ptačí patří mezi odrůdy cizosprašné. Prvním komerčně uvedeným kultivarem samosprašné třešně byla odrůda Stella, vyšlechtěná v Kanadě z křížence odrůdy Lambert a autokompatibilního semenáče, který vznikl ozářením. Odrůda Stella se posléze stala i základem ke šlechtění dalších samosprašných odrůd (Lapins, Sunburst, domácí odrůda Halka).

Moderní metody extrakce DNA a její následné analýzy, zejména amplifikace pomocí PCR, gelová elektroforéza a velmi přesná metoda kapilární elektroforézy, umožňují přesné určení genotypu u testovaných jedinců.

Cílem této práce bylo prostřednictvím analýzy DNA zjistit míru samoopylení u samosprašné odrůdy Stella. V této práci byla testována DNA jednak vyvíjejících se embryí plodů zkoumaných jedinců pro určení genotypů potomstva, jednak z pupenů jednotlivých stromů pro určení paternity.

Vyslovená hypotéza předpokládala vysokou míru samoopylení a minoritní zastoupení genetického materiálu dalších odrůd v potomstvu stromu odrůdy Stella. Získané výsledky po statistickém vyhodnocení procentuálního zastoupení jednotlivých genotypů v odebraných plodech odrůdy Stella potvrdily platnost vyslovené hypotézy a jsou předmětem diskuse.

Klíčová slova: *Prunus avium* L., samosprašné odrůdy, odrůda Stella, S-lokus inkompatibility, DNA analýza

Study of pollination dynamics of self-compatible varieties of sweet cherry using DNA analysis

Summary

Self-incompatibility is one of the most important mechanisms used by plants to prevent self-pollination and consequently inbreeding. It is genetically controlled by the S-locus, which allows the recognition and rejection of S-phenotypically identical pollen. Genotypes with identical S-alleles are mutually incompatible and varieties with identical genotypes have no ability of mutual pollination.

Sweet cherry (*Prunus avium* L.) in its wild form is naturally self-incompatible plant. The very most of cultural varieties of sweet cherry belongs to self-incompatible ones. Stella is the first self-fruitful sweet cherry introduced for commercial planting. It was selected from the variety Lambert and an autocompatible seedling gained as a result of X-ray irradiation experiments in Canada. Later it stayed as a parent for other self-compatible varieties of sweet cherry (Lapins, Sunburst, Czech variety Halka).

Modern methods of DNA extraction and its further analysis, namely PCR amplification, gel electrophoresis and very precise method of capilar electrophoresis, enable exact detection of genotypes in individuals tested. In this experiment, DNA was isolated both from developping embryos in fruits to detect the genotypes of offspring and from the buds of the trees for parentage detection.

In this thesis, the rate of self-pollination in self-compatible variety Stella was determined. Hypothesis declared supposed a high rate of self-pollination and a minor share of genetic materials of other varieties in Stella's offsprings. In this experiment, DNA of both developping embryos in fruits to detect the genotypes of offspring and from the buds of the trees for parentage detection was tested.

The results obtained proved the assumption declared in hypothesis and after statistical evaluation of genotypes percentage in fruits of variety Stella were discussed.

Keywords: *Prunus avium* L., self-compatible varieties, Stella variety, S-locus of incompatibility, DNA analysis

Obsah

1	Úvod	8
2	Vědecká hypotéza a cíle práce	9
2.1	Vědecká hypotéza	9
2.2	Cíle práce	9
3	Teoretická část – literární přehled	10
3.1	Rod <i>Prunus</i>	10
3.1.1	Taxonomické zařazení.....	10
3.1.2	Charakteristika rodu	10
3.1.3	Opylovací poměry v rámci rodu <i>Prunus</i>	11
3.2	<i>Prunus avium</i> L.	13
3.2.1	Charakteristika druhu	13
3.2.2	Hospodářský význam	13
3.2.3	Biologicky aktivní látky obsažené v pletivech <i>Prunus avium</i> L.	13
3.3	Opylovací poměry u druhu <i>Prunus avium</i> L. a jeho kulturních odrůd	15
3.3.1	Mechanismus účinku genu S-RNase a genu SFB	15
3.3.1.1	S-RNase gen	15
3.3.1.1.1	Historie identifikace	15
3.3.1.1.2	Struktura	16
3.3.1.1.3	Funkce	17
3.3.1.2	SFB gen.....	19
3.3.1.2.1	Historie identifikace	19
3.3.1.2.2	Struktura	19
3.3.1.2.3	Funkce	19
3.3.2	Princip autokompatibility u rodu <i>Prunus</i>	20
3.4	Metody analýzy genetického materiálu	22
3.4.1	Extrakce DNA	22
3.4.2	Elektroforéza.....	23
3.4.2.1	Gelová elektroforéza	23
3.4.2.2	Kapilární elektroforéza	24
3.4.3	PCR.....	24
3.4.4	Genotypizace	25
3.4.5	Stella.....	28
4	Experimentální část	30
4.1	Materiál a metody	30
4.1.1	Materiál.....	30
4.1.1.1	Rostlinný materiál	30
4.1.1.2	Soupis chemikálií.....	31

4.1.1.2.1	Kity pro extrakci a analýzu DNA	31
4.1.1.2.2	Chemikálie pro elektroforézu	31
4.1.1.2.3	Chemikálie pro kapilární elektroforézu	31
4.1.1.3	Přístroje a pomůcky	31
4.1.2	Metody.....	32
4.1.2.1	Příprava rostlinného materiálu.....	32
4.1.2.2	Extrakce DNA	32
4.1.2.3	Podmínky PCR	33
4.1.2.4	Elektroforéza.....	33
4.1.2.5	Kapilární elektroforéza	34
4.1.2.6	Statistické vyhodnocení	34
4.2	Výsledky	34
4.2.1	Výsledky PCR amplifikace	34
4.2.2	Výsledky kapilární elektroforézy.....	36
4.2.2.1	Rodičovské genotypy	36
4.2.2.2	Genotypy potomstva stromu S.....	37
4.2.2.3	Genotypy potomstva stromu M	39
4.2.2.4	Genotypy potomstva stromu P.....	40
4.2.2.5	Četnost genotypů a S alel v jednotlivých subpopulacích.....	41
4.2.2.5.1	Četnost genotypů potomstev	41
4.2.2.5.2	Četnost S alel v potomstvech.....	42
4.2.2.6	Statistické vyhodnocení frekvence S alel v subpopulacích.....	43
5	Diskuse	45
6	Závěr	51
7	Literatura.....	52
8	Internetové zdroje	60
9	Seznam obrázků, tabulek a grafů.....	61

1 Úvod

Třešeň obecná (*Prunus avium* L.) je rozšířena především v mírném pásmu buď jako divoce rostoucí strom nebo ve svých nesčetných odrůdách jako strom pěstovaný zejména pro sklizeň ovoce – třešňi, které má různorodé použití buď jako ovoce pro přímý konzum nebo pro další zpracování v potravinářském průmyslu. Světová produkce třešňi byla v roce 2016 2 317 956 tun a vykazuje stálý mírný vzestup. Největším producentem bylo Turecko (599 650 t), na 2. místě USA (288 480 t) na 3. místě Írán (220 393 t), na 4. místě Chile (123 224 t), na 5. místě Uzbekistán (95 267 t). V České republice bylo v tomto období vyprodukováno 2 535 tun (FAO, 2016).

Třešně jsou ovoce celosvětově velmi oblíbené pro své chuťové vlastnosti i výživové hodnoty, jsou vynikajícím zdrojem živin a fytochemických látek, obsahují polyfenoly, jako např. hydroxycinamáty, flavonoidy, prokyanidiny nebo anthokyany. Mnohé z těchto látek jsou předmětem výzkumu pro své předpokládané antioxidační účinky.

Pěstování třešňi vykazuje specifika především vzhledem k faktu, že se jedná o rostlinu cizosprašnou. Odrůdy třešňi jsou zařazeny do skupin dle schopnosti vzájemného opylování, která je dána jak genotypem – zastoupením S alel na lokusu řídícím inkompatibilitu, tak také raností odrůdy a tím danou dobou kvetení. Pro zakladatele komerčních produkčních sadů je tedy důležité správně naplánovat složení pěstovaných odrůd, aby došlo k optimálnímu opylení a tím zajištění maximálního výnosu. I pro malopěstitele – zahrádkáře může být fakt autoinkompatibility vybrané odrůdy značně omezující, nemá-li ve svém blízkém okolí vhodného opylovače a nedisponuje dostatkem prostoru pro výsadbu více jedinců.

I proto se již mnoho desetiletí cílem šlechtitelů vyprodukovat odrůdy třešňi, jejichž genotyp vykazuje tzv. autokompatibilitu, samosprašnost, a tedy schopnost opylení vlastním pylem, příp. pylem jedince se stejným genotypem. První pokusy o produkci samosprašné třešně proběhly v Anglii v 50. letech minulého století. Z tohoto programu pak v Kanadě v letech 60. vzešla první komerčně uvedená samosprašná odrůda Stella. V dnešní době je na trhu několik dalších samosprašných odrůd a úsilí šlechtitelů se ubírá celosvětově k vyšlechtění dalších autokompatibilních variet, které by obohatily ovocnářský trh.

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

2.1 Vědecká hypotéza

Narušení funkčnosti mechanismu autoinkompatibility třešní vede k tomu, že v potomstvu samosprašných odrůd třešní v běžných výsadbách významně převažují jedinci původem ze samoopylení. Práce řeší míru samoopylení a volného opylení v potomstvu vybraných stromů s využitím DNA markerů.

2.2 Cíle práce

Cílem teoretické části práce je podrobně popsat princip autoinkompatibility u druhu *Prunus avium* L., princip narušení tohoto mechanismu, který způsobuje schopnost samooplození, dále použité metody analýzy DNA a identifikaci jednotlivých genotypů.

Cílem experimentální části je odebrat vzorky plodů ze stromů samosprašné odrůdy Stella a z nejbližších okolních stromů cizosprašných odrůd, z embryí plodů izolovat DNA a analyzovat ji markery identifikujícími genotypovou konstituci S-locusu, který vykazuje dostatečně široký polymorfismus pro odhad původu potomstev ve vztahu k rodičovským rostlinám a interpretovat polymorfismy v potomstvech vhodnou formou naznačující genetické vztahy v populaci.

3 Teoretická část – literární přehled

3.1 Rod *Prunus*

3.1.1 Taxonomické zařazení

říše *Plantae* – rostliny

oddělení *Magnoliophyta* - rostliny krytosemenné

třída *Rosopsida* - vyšší dvouděložné rostliny

řád *Rosales* – růžotvaré

čeleď *Rosaceae* – růžovité

podčeleď *Amygdaloideae*

(BioLib, 2016)

3.1.2 Charakteristika rodu

Dle Kirschnera (2002) má rod *Prunus* (slivoň, střemcha, mandloň, mahalebka, bobkovišeň, třešeň, meruňka, broskvoň) původ pravděpodobně v západní Asii. Lze jej nalézt především v mírném pásu severní polokoule. Areál rodu *Prunus* dnes zahrnuje téměř celou Evropu, ale i severní Afriku, Blízký i Dálný Východ, jižní Austrálii a Nový Zéland, a mírné pásmo amerického kontinentu (Basanta et al., 2014). Do rodu *Prunus* (cca 230 druhů) patří mnoho zemědělsky významných druhů ovocných stromů. Ve střední Evropě nalezneme 13 využívaných kulturních druhů, jen polovina z nich je původní.

Do rodu *Prunus* řadíme (téměř vždy opadavé, zřídka stálezelené) stromy, keře nebo polokeře s kořenovými výmladky (Kirschner, 2002). Řapíkaté listy jsou střídavé, celistvé, pilovité, vroubkované, někdy celokrajné nebo laločnaté. Pětčetné oboupohlavní květy vyrůstající na brachyblastech jsou buď samostatné nebo uspořádané v okolících, chocholících či hroznech. Kališní lístky za květu většinou opadávají (pouze u *P. serotina* jsou vytrvalé). Oválné až téměř okrouhlé korunní lístky mají bílou nebo růžovou barvu. Na dně miskovité až lahvicovité češule se nachází jeden svrchní semeník se dvěma vajíčky a jedinou prodlouženou čnělkou.

Charakteristickými plody jsou peckovice s dřevnatým endokarpem (Kirschner, 2002). Tento dužnatý plod, peckovice, má oplodí rozlišené na blanitý exokarp, dužnatý a šťavnatý mezokarp a tvrdý, signifikovaný endokarp (pecka). Jedlou částí plodu je mezokarp. Komerčně se nejvíce využívá plodů broskví a nektarinek náležících ke druhu *Prunus persica* L., švestek druhu *Prunus domestica* L. a *Prunus salicina* Lindl., višňi druhu *Prunus cerasus* L., meruněk druhu *Prunus armeniaca* L. a třešňi druhu *Prunus avium* L.



Obrázek 1: Třešňový strom v moderním produkčním sadu

Zdroj: <http://docplayer.cz/docs-images/61/46004791/images/97-3.png>

3.1.3 Opylovací poměry v rámci rodu *Prunus*

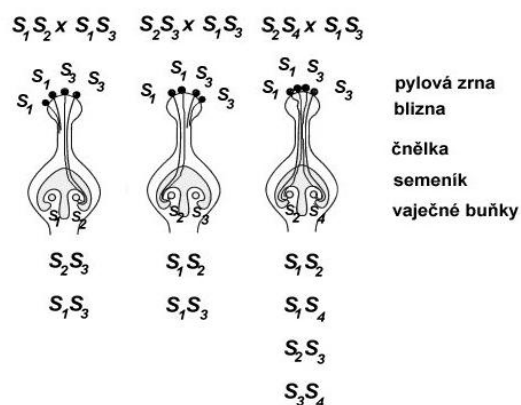
Jednotliví zástupci rodu *Prunus* vykazují různé opylovací poměry, resp. se liší v míře schopnosti samoopylení. Jak uvádí Watkins (1976), broskvoň (*P. persica* L.) je běžně samosprašná, meruňka (*P. armeniaca* L.) je částečně samosprašná, mandloň (*P. dulcis* L.), slivoň (*P. domestica* L.) a třešeň (*P. avium* L.) jsou v převážné většině svých kultivarů cizosprašné.

Autoinkompatibilita je geneticky řízený reprodukční mechanismus definovaný jako neschopnost plodné oboupohlavní rostliny produkovat po samoopylení zygoty (de Nettancourt, 2001). De Nettancourt (2001) dále uvádí, že přispívá k diverzifikaci a

diferenciaci druhů udržováním genetické diverzity. Autoinkompatibilita je mezi krytosemennými rostlinami široce rozšířena, vyskytuje se u cca 60 % krytosemenných (Allen a Hiscock, 2008).

V případě rodu *Prunus* se jedná o inkompatibilitu gametofytickou. Ta byla poprvé popsána Eastem a Mangelsdorfem (1925) u druhu *Nicotiana sanderae*. V tomto systému je inkompatibilita způsobena vzájemným působením pylu a pestíku, tedy haploidním genomem pylového zrna a diploidním genomem pletiva čnělky, kterou pylová láčka prorůstá do semeníku k vaječné buňce. Jakmile pylové zrno nese shodnou alelu jako pletivo pestíku, pylová láčka vykazuje neschopnost růstu a oplodnění tedy nenastane.

Gametofytická inkompatibilita u rodu *Prunus* je determinována jedním lokusem S, který je multialelický a obsahuje alely $S_1, S_2, S_3, \dots, S_n$. Diploidní sporofyt je většinou heterozygotní (např. S_1S_2, S_1S_3). Každé pylové zrno obsahuje pouze jednu z alel S. Ke kompatibilnímu opylení dojde pouze v tom případě, kdy se daná alela pylu setká s odlišnými alelami v pestíku. Z toho jasně vyplývá (obr. 2), že k plnohodnotnému opylení (potenciálně stoprocentnímu) je zapotřebí vytvořit podmínky tím, že máme k dispozici jako opylovače rostlinu se zcela odlišnou sadou S alel.



Obrázek 2: Schéma oplození u různých mateřských a otcovských genotypů

Zdroj: <https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/js13/genetika/web/pages/05-generativni-rozvoj-inkompatibilita.html>

3.2 *Prunus avium* L.

3.2.1 Charakteristika druhu

Třešeň ptačí (*Prunus avium* L., syn. *Cerasus avium* (L.) Moench., *Prunus cerasus* L. (var.) *avium* L., *Prunus avium* (L.) L. a *Cerasus nigra* Mill.) je druh na našem území původní. Jedná se o dosti variabilní strom, zpravidla vysoký 3 – 35 m. V rámci druhu jsou rozlišovány tři výrazné skupiny, které jsou hodnoceny jako poddruhy nebo odrůdy. Jedná se o planou maloplodou (plody do 10 mm) varietu *avium* (ptáčnici, třešeň ptačí pravou, třešeň ptačí planou), dále o pěstované či zplanělé velkoplodé (plody nad 10 mm): varietu *juliana* (L.) Pojark. (srdcovku) a varietu *duracina* (L.) Pojark. (chrupku), (Chrtek, 1992). Vyskytuje se roztroušeně po celém území České republiky (Chrtek, 1992; Kirschner, 2002), především v termofytiku a nižších polohách mezofytika). V České republice je v četných kultivarech pěstována především v ucelených třešňových produkčních oblastech, hlavní jsou ve středních Čechách, v Českém středohoří a na jižní Moravě (Chrtek, 1992; Kirschner, 2002).

3.2.2 Hospodářský význam

Třešně jsou hospodářsky nejvýznamnější jako ovocné stromy, poskytující velmi oblíbené chutné plody, bohaté na mnoho pro lidský organismus prospěšných látek. Jsou ceněny i pro svoji ranost, po jahodách je to v podstatě první ovoce, které je v sezóně k dispozici. Pecky planě rostoucích druhů jsou využívány jako semena, semenáče pak ve šlechtitelství i jako podnože pro mnohé ušlechtilé odrůdy třešní, višní a sladkovišní. Plody třešně jsou vhodné především pro přímý konzum, ale i pro další potravinářské a konzervářské zpracování, oblíbené jsou zejména ve formě kompotů, džemů, ale používají se i k výrobě destilátů a likérů.

3.2.3 Biologicky aktivní látky obsažené v pletivech *Prunus avium* L.

Plody třešně jsou bohatým a ceněným zdrojem různorodých bioaktivních látek. Obsahují malé množství karbohydrátů, především jednoduchých cukrů, jako je glukóza, fruktóza, sacharóza a sorbitol (D-glucitol), dále organické kyseliny, jako je kyselina jablečná, kyselina citronová, kyselina jantarová, kyselina mléčná a kyselina šťavelová (Ballistreri et al., 2013). Jsou také velmi dobrým zdrojem vitamínů, především vitamínu C (Schmitz-Eiberger a Blanke,

2012), a důležitých minerálů, především draslíku, fosforu, vápníku a hořčíku (Yigit et al., 2009).

Třešně též obsahují některé fenolické látky jako fenolové kyseliny (hydroxycinamáty) a flavonoidy (anthokyaniny, flavan-3-oly a flavonoly), u kterých jsou předpokládány významné antioxidační účinky (Ballistreri et al., 2013).

Díky vysokému obsahu uvedených látek je u třešní předpokládán pozitivní efekt zejména v prevenci kardiovaskulárních onemocnění, prevenci rakoviny či jiných chorob způsobených oxidativním stresem. V nedávných výzkumech byl také v extraktech plodů pozorován protirakovinný efekt zejména ve spojení s fenolickými látkami (Serra et al., 2011). Také Bastos et al. (2015) naměřili signifikantní množství zdraví prospěšných látek v plodech a stopkách třešní (které jsou tradičně využívány i v lidovém léčitelství), látek, které vykazovaly protinádorový potenciál (u buněčných linií karcinomu tlustého střeva).

Jak již bylo předesláno, třešně jsou velmi oblíbené ovoce zejména pro své chuťové vlastnosti, pro svoji ranost, a vzhledem k výsledkům nedávných výzkumů mají díky obsahu nejrůznějších pozitivně působících látek dobrý potenciál zaujmout i z hlediska zdravé výživy. Jejich pěstování je zajímavé i z ekonomického hlediska (Radičević et al., 2016). To představuje zajímavou výzvu nejen pro pěstitele (ať už v komerčních produkčních sadech či malopěstitele a zahrádkáře), ale zejména pro šlechtitele. Jak uvádějí Lisek et al. (2015), pěstování třešní je vzhledem k cizosprašnosti druhu *Prunus avium* L. o něco komplikovanější než u ovocných druhů samosprašných, architektura ovocných sadů vyžaduje důkladnou znalost vzájemné kompatibility jednotlivých odrůd, dostupnost kompatibilních variet, vhodnost do daného prostředí a obecně vyžaduje respektování mnoha limitujících faktorů. V dnešní době roste množství a dostupnost odrůd samosprašných (autokompatibilních), které představují dobrou alternativu, která plánování složení produkčního sadu značně usnadňuje. Také pro zahrádkáře, kteří mnohdy disponují velmi omezeným prostorem, je nabídka samosprašných odrůd vítaným řešením. Jak velko- tak maloproducenty samozřejmě zajímá především potenciální výnos těchto odrůd, který úzce souvisí s jejich schopností samoopylení.

3.3 Opylovací poměry u druhu *Prunus avium* L. a jeho kulturních odrůd

Třešeň ptačí ve své divoké formě je druhem autoinkompatibilním, tedy neschopným samooplození. Stejně tak většina pěstovaných kulturních odrůd. Jak již bylo řečeno, u tohoto druhu se jedná o gametofytickou autoinkompatibilitu řízenou geneticky multialelickým S lokusem (Crane a Lawrence, 1929), obsahujícím dva geny – S-RNase (Bošković a Tobutt, 1996; Tao et al., 1999) a SFB (Yamane et al., 2003). U tohoto druhu je růst pylové láčky v čnělce zastaven, pokud je S haplotyp pylu stejný jako S haplotyp totožný s kterýmkoliv S haplotypem pletiva pestíku. Kultivary stejného S genotypu jsou tak vzájemně inkompatibilní a jsou zařazeny do stejné skupiny. Toto zařazení je důležité jak pro šlechtitele, tak pro pěstitele, kterým pomáhá při plánování použití jednotlivých odrůd v sadech.

3.3.1 Mechanismus účinku genu S-RNase a genu SFB

Výzkumy prováděné od 90. let minulého století identifikovaly dva geny nacházející se těsně u sebe na S lokusu, odpovědné za řízení autoinkompatibility u rodu *Prunus*. Jak uvádějí ve svém přehledu Kao a Tsukamoto (2004), jedná se o S-RNase jako gen samičí (samičí determinant, gen pestíku) a SFB (S F-box) jako samčí gen (samčí determinant, gen pylu). Dle Taa a lezzoni (2010) vedly tyto výzkumy k rozvoji dalších molekulárních technik vhodných k určení S genotypu a dalšímu studiu autokompatibility. Tyto techniky jsou dnes celosvětově využívány ve šlechtitelských programech.

3.3.1.1 S-RNase gen

3.3.1.1.1 Historie identifikace

Fyziologie a mechanismus gametofytické autoinkompatibility byla v největším rozsahu studována u druhů čeledi *Solanaceae*. Úseky DNA kódující glykoproteiny vázané na S alely byly poprvé získány z *Nicotiana glauca* (Anderson et al., 1986a, 1986b, 1989). Získané sekvence přesvědčivě ukazovaly na aktivitu RNázy pletiva čnělky v procesu rozpoznání a rejekce. Tyto a další studie ukázaly u *Solanaceae*, že produktem S alel pletiva pestíku je základní

glykoprotein známý jako S-RNáza (McClure et al., 1989a, 1989b). Na stejném principu funguje autoinkompatibilita také u čeledi *Plantaginaceae*.

Přibližně ve stejné době, kdy genové analýzy u *Petunia inflata* a *Nicotiana* prokázaly odpovědnost samotného genu S-RNase za rozpoznání a rejekci pylu u *Solanaceae* (Lee et al., 1994; Murfett et al., 1994), Sassa et al. (1992, 1993, 1996) a Broothaerts et al. (1995) publikovali výsledky ukazující, že S-RNase je gen odpovědný za inkompatibilitu také u druhů *Pyrus* a *Malus* čeledi *Rosaceae*.

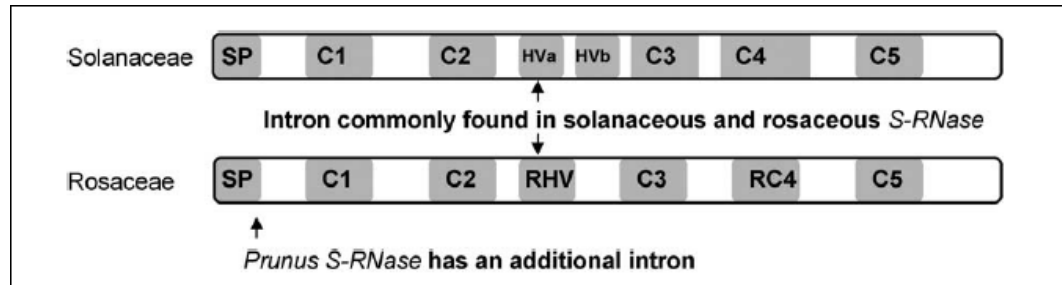
Protože *Prunus* je též příslušníkem čeledi *Rosaceae*, existoval předpoklad, že i u třešně je za autoinkompatibilitu odpovědný tentýž gen. Přesto trvalo několik let, než byl izolován. Důvodem byla především poměrně nízká podobnost příslušných DNA sekvencí mezi rody *Prunus* a *Pyrus/Malus*, a také fakt, že u rodu *Prunus* jsou přítomny i další geny RNase, nemající se systémem autoinkompatibility souvislost. Teprve s identifikací genu u druhu *Prunus dulcis* (Tao et al., 1997) bylo umožněno ho izolovat i u třešně (Tao et al., 1999).

3.3.1.1.2 Struktura

Dosavadní analýzy struktury ukazují, že tento gen má u všech tří čeledí stejný původ a velice podobnou strukturu, a to navzdory faktu, že se jedná o gen s vysokou mírou divergence (Tao a lezzoni, 2010). U lilkovitých bylo identifikováno pět stálých oblastí (C1 – C5) a s výjimkou oblasti C4 shodných u růžovitých a jitrocelovitých (Ushijima et al., 1998). Oblasti C2 a C3 obsahují rezidua katalytického histidinu. Čtvrtá oblast, u růžovitých RC4, se od C4 oblasti lilkovitých liší v umístění a sekvenci aminokyselin. Další odlišnost ve struktuře genu je v přítomnosti hypervariabilní oblasti RHV u růžovitých, zatímco u ostatních dvou čeledí byla identifikována přítomnost dvou hypervariabilních oblastí HVa a HVb (Ioerger et al., 1991; Xue et al., 1996). Tyto hypervariabilní oblasti zřejmě hrají klíčovou roli v rozpoznávání vlastního či cizího materiálu, ovšem další výzkumy naznačují důležitou roli i ostatních oblastí tohoto genu (Zisovich et al., 2004; Ortega et al., 2006; Vieira et al., 2007).

Dalším rozdílem, který odlišuje gen S-RNase u rodu *Prunus* je přítomnost dalšího intronu, jehož původ a význam není zatím objasněn. Pouhá přítomnost dvou intronů však postačuje k rozlišení S-RNase genu odpovědného za autoinkompatibilitu od non-S-RNase genu

v pestíku rodu *Prunus*, který v systému autoinkompatibility nehraje roli. Toto zjištění bylo využito k vývoji molekulárních metod schopných rozlišit S alely u rodu *Prunus* (Tao a Iezzoni, 2010).



Obrázek 3: Struktura genu S-RNase u *Solanaceae* a *Rosaceae* (*Prunus*)

Zdroj: Tao a Iezzoni, 2010

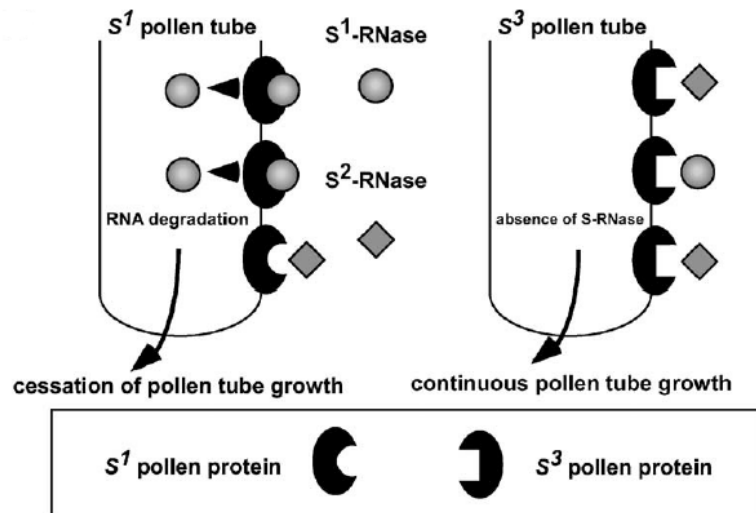
3.3.1.1.3 Funkce

Série experimentů u lilkovitých naznačila, že gen S-RNase způsobuje cytotoxický efekt v čnělce prostřednictvím aktivity RNázy. Huang et al. (1994) dokázali klíčovou roli RNázy v procesu rejekce pylu v čnělce u *Petunia inflata*. Kowayama et al. (1994) objevili u autokompatibilní varianty *Lycopersicon peruviana* souvislost mezi autokompatibilitou a nedostatkem aktivity genu S-RNase. McClure et al. (1990) prokázali degradaci rRNA u inkompatibilní varianty *Nicotiana glauca*, ale nikoliv u kompatibilní.

Ačkoliv tyto experimenty probíhaly převážně u *Solanaceae*, právě přítomnost katalytického histidinu v oblastech C2 a C3 genu S-RNase i u dalších čeledí napovídala, že stejnou funkci má gen i u *Rosaceae*.

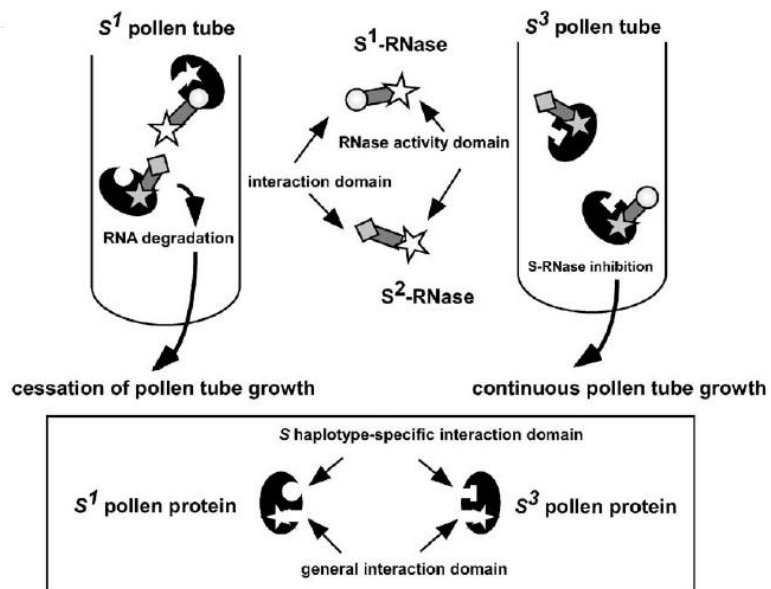
Byly navrženy dva modely funkcionality S-RNase genu. Model „gatekeeper“, který předpokládá rozpoznávací mechanismus, jenž umožňuje vstup do čnělky pouze shodnému genu S-RNase (Thompson a Kirch, 1992). Druhý model (McCubbin a Kao, 2000) počítal s přítomností inhibitoru, který deaktivoval vše kromě shodného genu S-RNase. Imunochemické studie prováděné u *Solanum chacoense* prokázaly, že S-RNáza je schopna vstoupit do čnělky jak u kompatibilního S haplotypu, tak u nekompatibilního, a inhibitorový model tak byl obecně přijat (Luu et al. 2000, 2001). Avšak po zjištění, že S alely pylu kódují F-box protein, který může být součástí proteolýzy, byl degradační model S-RNase genu

považován za pravděpodobnější než inhibiční (Ushijima et al., 2003; Hua et al., 2008; Zhang et al., 2009). Pro *Rosaceae* je tento model v procesu rozeznání genotypu pylu a pestíku také pokládán za pravděpodobnější (Tao a lezzoni, 2010).



Obrázek 4: Model „gatekeeper“.

Zdroj: Tao a lezzoni, 2010



Obrázek 5: Model inhibitor.

Zdroj: Tao a lezzoni, 2010

3.3.1.2 SFB gen

3.3.1.2.1 Historie identifikace

Pylový (samčí) determinant gametofytické autoinkompatibility byl objeven o mnoho let později než samičí (pestíkový) – S-RNase gen. První známky přítomnosti pylové S alely se objevily u S lokusu u *Plantaginaceae*. DNA analýza S lokusu u *Antirrhinum hispanicum* odhalila přítomnost F-box genu v pylu, umístěného 9 kpb pod genem S-RNase (Lai et al., 2002).

S lokus rodu *Prunus* je daleko menší než u *Solanaceae* a *Plantaginaceae*. Nezávisle na sobě jej zkoumaly japonské týmy, především u mandloně. Zjištěné vlastnosti SFB genu u mandloně jako vysoká úroveň polymorfismu, specifická exprese v pylu a nízká fyzická vzdálenost od genu S-RNase, podporovaly hypotézu, že se jedná o samčí determinant autoinkompatibility (Matsumoto et al., 2008). Yamane et al. (2003) objevili během experimentu, při kterém porovnávali S-RNase alely u kompatibilních a inkompatibilních třešní a višní, tentýž SFB gen.

Přímý důkaz, že SFB gen řídí alelickou specifitu pylu byl získán z transgenového experimentu u *Petunia inflata* (Sijacic et al., 2004).

3.3.1.2.2 Struktura

SFB obsahuje u rodu *Prunus* jediný intron, u čeledí *Solanaceae* a *Plantaginaceae* nebyl identifikován žádný. Dále obsahuje dvě variabilní oblasti V1 a V2 a dvě hypervariabilní oblasti HVa a HVb (Ikeda et al., 2004a). Tyto oblasti jsou pravděpodobně hydrofilní, resp. nikoliv silně hydrofobní, což naznačuje, že mohou být exponovány na povrchu a účastnit se procesu rozpoznání specifity alel.

3.3.1.2.3 Funkce

Aminokyselinové sekvence pylového SFB všech funkčních autoinkompatibilních S haplotypů uchovávají F-box motiv na N-konci, což naznačuje, že fungují jako F-box proteiny. F-box protein je známá složka E3 ubiquitin-ligázy (SCF komplex), která reguluje degradaci proteinů v systému ubiquitin/proteasomové proteolýzy (Deshaies, 1999). F-box

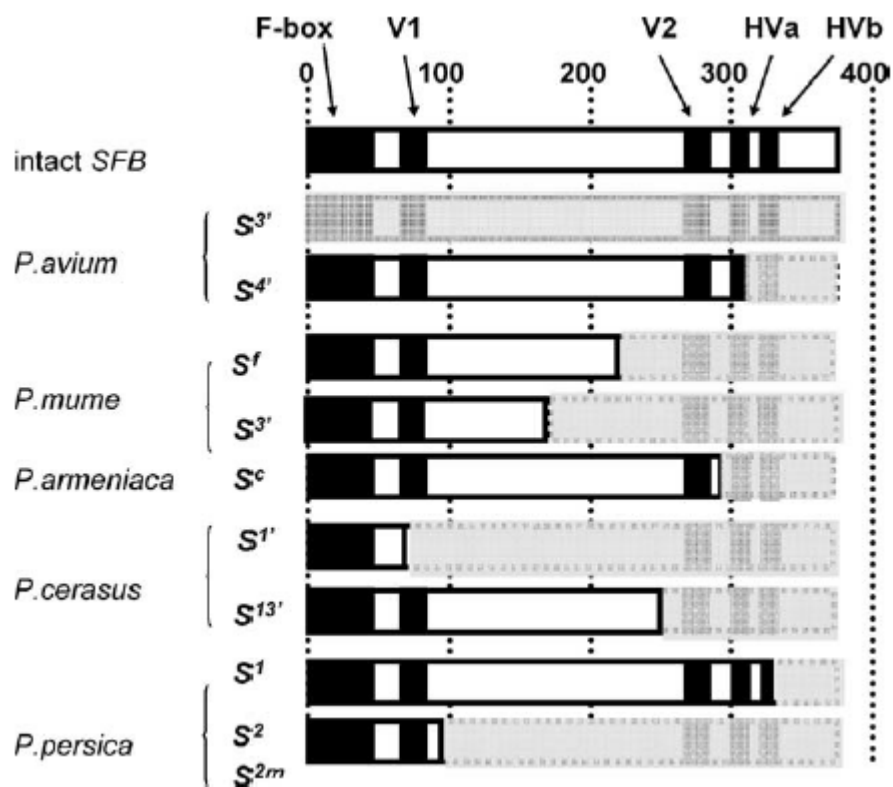
protein funguje jako receptor proteinů určených k polyubiquitinaci v SCF komplexu. Tyto proteiny jsou degradovány 26S proteasomem. Původním předpokladem tedy bylo, že SCF komplex obsahující SFB může polyubiquitinovat všechny neshodné S-RNase geny k degradaci, ale specificky interagovat se shodným S-RNase genem, aby byla zachována jeho aktivita a růst pylové láčky v čnělce byl zastaven (Ushijima et al., 2003, 2004; Kao a Tsukamoto, 2004). Tyto hypotézy byly potvrzeny u *Solanaceae* a *Plantaginaceae*, ale další experimenty naznačily, že u rodu *Prunus* je substrátem pro SCF komplex jiná molekula než S-RNase (Tao a Iezzoni, 2010).

Komplexní fungování mechanismu autoinkompatibility řízené S lokusem stále čeká na objasnění, mimo jiné i proto, že porušení tohoto mechanismu, tedy autokompatibilita, se různí nejen u jednotlivých druhů rodu, ale i u jednotlivých kultivarů v rámci druhů.

3.3.2 Princip autokompatibility u rodu *Prunus*

Autokompatibilita byla popsána u více druhů rodu *Prunus* a za její příčinu jsou obecně pokládány mutace, z nichž většina byla nalezena na S lokusu. Především se jedná o mutace na samčím determinantu (SFB gen), i když byly popsány mutace i na samičím (S-RNase gen) (Yamane a Tao, 2009; Hegedús et al., 2012). Byly popsány i mutace genetického materiálu pylu nesouvisející s S lokusem (Wünsch a Hormaza, 2004a; Vilanova et al., 2006; Wünsch et al., 2010; Cachi a Wünsch 2011; Wu et al., 2011; Zuriaga et al., 2012, 2013).

U třešně byly první autokompatibilní mutantní rostliny získány v institutu Johna Innese. Jednalo se o mutanty JI2420 a JI2434, získané opylením pylem ozářeným rentgenovými paprsky (Lewis a Crowe, 1954). U JI2420 se jednalo o mutaci typu posun čtecího rámce na SFB₄ genu, u JI2434 o kompletní delecí SFB₃ genu (Ushijima et al., 2004; Sonneveld et al., 2005). JI2420 je jedním z předků první komerčně uvedené samosprašné odrůdy Stella, která se stala základem pro další šlechtění autokompatibilních odrůd.



Obrázek 6: Schéma neporušeného a mutovaného genu SFB u různých druhů rodu *Prunus*, u kterých byla zjištěna autokompatibilita. Šedé oblasti znázorňují chybějící části genu, u *P. avium* také kompletní delecí SFB₃.

Zdroj: Tao a lezzoni, 2010

Kromě toho byly popsány i další, tentokrát spontánně vzniklé, samosprašné odrůdy. Španělskou odrůdu Cristobalina popsal Hugard (1978), další, Kronio, popsali Calabrese et al. (1984) v Itálii. U obou byla zjištěna kompatibilita způsobená dysfunkcí samčího determinantu, tedy v genetickém materiálu pylu. U Kronia je autokompatibilita způsobena delecí na genu SFB₅, který tak generuje zkrácený protein (Marchese et al., 2007). Naopak u Cristobaliny bylo zjištěno, že dysfunkce pylu je způsobena v jiné oblasti a není spojena s S lokusem (Wünsch a Hormaza, 2004a; Wünsch et al., 2010). Cachi a Wünsch (2011) posléze genetickým mapováním prokázaly, že změny u odrůdy Cristobalina se nacházejí ve stejné chromosomové oblasti jako u samosprašné odrůdy meruňky Katy (Zuriaga et al., 2012, 2013). Podobně Vilanova et al. (2006) popsali stejný princip autokompatibility u odrůdy meruňky Canino, i když není zřejmé, zda je původcem stejný gen.

Cachi a Wünsch (2014) podrobily experimentům další dvě španělské odrůdy, u kterých byla předpokládána autokompatibilita – Son Miró a Talegal Ahín. Jejich výzkumy nejen potvrdily tento předpoklad, ale podrobnými pokusy křížením i genetickým mapováním poodhalily principy samosprašnosti u obou odrůd. Kultivar Talegal Ahín je pravděpodobně geneticky spřízněn s odrůdou Cristobalina, neboť vykazoval stejné rysy dysfunkce samčího determinantu (pylu) a zároveň i pravděpodobné působení ještě dalšího mechanismu nespojeného s S lokusem. Tyto dvě odrůdy spojuje i přítomnost stejného S haplotypu (alely S₆), navíc pocházejí ze stejného regionu ve Španělsku.

Naproti tomu u odrůdy Son Miró bylo zjištěno, že autokompatibilita má zřejmě původ v mutacích jak samčího, tak samičího determinantu. Pokusy navíc ukázaly, že tento typ autokompatibility je odlišný od těch typů mutací popsaných u odrůd Kronio (Marchese et al., 2007), JI2420 nebo JI2434 (Ushijima et al., 2004; Sonneveld et al., 2005).

Z výše uvedeného je tedy zřejmé, že autokompatibilita u jednotlivých druhů rodu *Prunus* i jednotlivých kultivarů druhu *Prunus avium* L. může být způsobena různými mechanismy, téměř vždy se však jedná o mutace nebo delece především na samčím determinantu, někdy i na determinantu samičím, a v některých případech zasahují i genetické změny kódované v jiných chromosomových oblastech než na S lokusu.

3.4 Metody analýzy genetického materiálu

3.4.1 Extrakce DNA

Pro extrakci rostlinné DNA je možno vybrat z mnoha existujících protokolů k tomu určených, ať už se jedná o klasické protokoly – fenol-chloroformovou extrakci a různé její modifikace, extrakci s využitím magnetických částic, extrakci na principu adsorpce na silikát, nebo využít komerčních kitů, kterých je na trhu dostatečné množství. Jejich použití je velice jednoduché a časově nenáročné, při zpracování velkého množství vzorků však může být limitující jejich vyšší cena. Pokud je nutno zpracovat vzorky v řádu desítek, je použití těchto kitů s velkou výhodou.

3.4.2 Elektroforéza

3.4.2.1 Gelová elektroforéza

Pro dělení makromolekul DNA a orientační zjištění velikosti rozdělených částí je nejpraktičtější metodou gelová elektroforéza. Je založena na principu pohybu makromolekul (v tomto případě fragmentů DNA) v porézním gelu. Díky svému zápornému náboji se molekuly DNA v gelu pohybují směrem ke kladné elektrodě a podle své velikosti procházejí „sítím“ gelu. Hustota tohoto „síta“ se volí prostřednictvím koncentrace gelu závislé na předpokládané velikosti fragmentů DNA.

Nejčastěji se užívají dva typy gelu a elektroforézy:

- agarózová gelová elektroforéza, a to buď horizontální, nebo vertikální. Tento typ je vhodný pro fragmenty o velikosti v rozmezí 10 bp – 20 kbp. Dle předpokládané velikosti fragmentů se volí koncentrace gelu (od 0,4% až po 5% roztok). Pro srovnání a kalibraci se ke zkoumaným vzorkům přidává směs fragmentů DNA o známé velikosti. Vzorky se na start nanášejí po obarvení barvou viditelného spektra (např. bromfenolová modř). Rozdělené frakce je možné buď přenést na speciální membrány (fólie) tzv. blotováním a podrobit hybridizaci nebo pomocí fluorescenčních barviv např. ethidiumbromidem interkalací mezi nukleotidy vizualizovat na transiluminátoru v UV světle s následnou fotodokumentací (Průša, 1997).
- polyakrylamidová gelová elektroforéza je druhým nejčastěji používaným způsobem. Elektroforetickým médiem je zde polyakrylamidový gel (denaturační, obvykle s ureou, nebo nedenaturační). Jedná se o vertikální elektroforézu. Směs akrylamidu a bisakrylamidu polymerizuje při pokojové teplotě v pufru (TAE – Tris-báze, acetát, EDTA) pomocí volných radikálů. Použitá koncentrace akrylamidu se liší podle velikosti separovaných fragmentů DNA od 3,5% (fragmenty 1 - 2 kbp) až po 20% gely pro separaci malých fragmentů 10 - 100 bp (Průša, 1997).

3.4.2.2 Kapilární elektroforéza

S daleko větší přesností lze velikost fragmentů nukleových kyselin změřit metodou tzv. kapilární elektroforézy, kdy lze dostat výsledky s přesností v řádu jednotek bp (párů bází). Kapilární elektroforéza využívá elektrokinetických principů elektroforézy a elektroosmózy k separaci látek uvnitř křemenné kapiláry. Tomuto způsobu elektroforézy se říká vysokoúčinná kapilární elektroforéza (HPCE) a provádí se několika způsoby - jako volná elektroforéza, gelová elektroforéza, ale i jako izoelektrická fokusace. Pro analýzu nukleových kyselin se používá kapilární elektroforéza gelová (CGE).

Metoda využívá pohybu elektricky nabitých látek v elektrickém proudu rozpuštěných ve vodivém médiu – kapiláře naplněné elektrolytem nebo gelem. Dopravným jevem je elektroosmotický tok. Na vnitřním povrchu kapiláry v místě styku s vodivým roztokem vzniká elektrická dvojvrstva. Pevná část (stěna kapiláry) je nabitá nepohyblivým plošným záporným elektrickým nábojem. Z kapalně části se kladné ionty připojí ke stěně kapiláry (dvojvrstva) a ionty se pohybují ke katodě. Pohyblivá vrstvička se žene kapilárou a strhne s sebou celý průřez kapaliny v kapiláře. Roztok putuje kapilárou celý najednou, zatímco u klasické elektroforézy putují jen ionty (Murray et al., 2002).

3.4.3 PCR

Princip PCR spočívá v amplifikaci (namnožení) libovolně malého úseku vlákna DNA. Původní dvouvláknová DNA (dsDNA) je za pomoci vysoké teploty (rozmezí 92 - 98 °C) denaturována na dvě jednovláknové DNA (ssDNA), doba denaturace se různí podle velikosti fragmentů, bývá v desítkách sekund. V druhém kroku následuje za snížené teploty (50 - 60 °C) připojení nebo nasednutí primerů (tzv. annealing) na tyto jednovláknové templátové DNA. Doba se opět různí dle délky primerů, od desítek sekund po minuty. Ve třetím, posledním kroku se syntetizují nové řetězce (fáze elongace). Jedná se o extenzi připojených primerů DNA polymerázou, která musí být termostabilní. V této fázi jsou připojovány jednotlivé deoxynukleotidy ve směru 5'→3'. Teplota je v této fázi dána teplotním optimem použité DNA polymerázy. Celý cyklus se opakuje v průměru 30x, počet opakování závisí na

koncentraci výchozí templátové DNA, teoreticky se může opakovat ad infinitum (Mullis, 1990). Úspěch metody závisí na vhodném výběru DNA polymerázy a primerů.

3.4.4 Genotypizace

Na základě výsledků gelové a kapilární elektroforézy a jejich porovnání se známými hodnotami velikostí alel lze přesně stanovit genotypy S lokusu jednotlivých vzorků. Schuster (2012) sumarizoval dosavadní výsledky genotypizace a referoval 734 funkčních genotypů třešňových kultivarů, zařazených do 47 skupin (tzv. incompatibility groups, IG), do skupiny univerzálních dárců a do skupiny autokompatibilních. V každé skupině (IG) jsou zařazeny kultivary se stejným genotypem a jsou vzájemně inkompatibilní. Univerzálními dárci jsou kultivary s jedinečnou kombinací S alel (Sharma et al., 2015).

S alely byly původně identifikovány biochemickými metodami analýzou proteinů pestíku (Bošković et al., 1997). Vývoj molekulárních metod umožnil identifikaci S alel pomocí PCR amplifikace genu S-RNase (Wiersma et al., 2001; Gisbert et al., 2008). Identifikace S alel třešně je možná amplifikací intronu I a II genu S-RNase za použití obecných primerů a také amplifikací genu S-RNase za použití specifických primerů. Tyto specifické primery vyvinuli pro alely $S_1 - S_{16}$ Sonneveld et al. (2001, 2003) a pro alely $S_{17} - S_{19}$, $S_{21} - S_{25}$, S_{34} a S_{37} Szikriszt et al. (2013). Efektivita využití obecných i specifických primerů pak byla potvrzena mnoha studiemi (Békefi et al., 2003; De Cuyper et al., 2005; Schuster et al., 2007; Ipek et al., 2011; Ercisli et al., 2012; Szikriszt et al., 2013).

Analýzou genu S-RNase metodami založenými na PCR amplifikaci bylo identifikováno šest nejčastěji se vyskytujících S alel třešně, $S_1 - S_6$ (Sonneveld et al., 2001; Wiersma et al., 2001). Následně byly Sonneveldem et al. (2003) identifikovány další alely, $S_7 - S_{16}$. V průběhu těchto analýz bylo zjištěno, že alely S_8 , S_{11} a S_{15} jsou identické s alelami S_3 , S_7 a S_5 (Sonneveld et al., 2001, 2003; Wunsch a Hormaza, 2004b). V dalších letech pak byly identifikovány další S alely v třešni ptačí a v kulturních varietách třešně v mnoha regionech Evropy. De Cuyper et al. (2005) objevili v třešni ptačí v Belgii alely $S_{17} - S_{22}$. Alely S_{19} a S_{22} byly nalezeny také v lokálních kulturních odrůdách v jihozápadním Německu (Schuster et al., 2007), alela S_{22}

byla identifikována také v místních kultivarech v jihovýchodním Španělsku (Gisbert et al., 2008). Další šest alel, s označením $S_{27} - S_{32}$, bylo identifikováno v divokých třešních rostoucích v pralese v anglickém Kentu (Vaughan et al., 2008). Szikriszt et al. (2013) identifikovali alelu S_{37} v kulturních odrůdách v oblasti Černého moře, a také alelu S_{34} , jejíž výskyt byl předtím znám u višně (*Prunus cerasus* L.).

V následujících tabulkách je uveden přehled některých kulturních odrůd třešní (světových i českých) včetně jejich zařazení do skupin (IG) a jejich S genotypu (tab. 1, pro ilustraci je uvedeno pouze prvních 30 skupin). Tab. 2 pak ukazuje některé známé zástupce tzv. donorů, kultivarů náležejících do skupiny 0, kultivarů s jedinečným složením S alel, které mohou fungovat jako univerzální opylovači.

IG	Alely	Zástupci	Zástupci ČR
I	S1 S2	Sparkle, Starking Hardy Giant, Early Rivers	Kaštánka
II	S1 S3	Van, Regina, Cristalina	Aranka, Justyna, Marta, Karešova
III	S3 S4	Bing, Lambert, Napoleon	Amid, Sandra
IV	S2 S3	Sue, Vega, Velvet, Rychlice	HL 15361
V	S4 S5	Late Black Bigarreau, Turkey Heart, Carmen	Tim
VI	S3 S6	Merton Heart, Hartland, Kordia	Kordia, Granát, Těchlovan
VII	S3 S5	Moreau, Hooker's Black, Hedelfingen	Chlumecká pozdní
VIII	S2 S5	Malling Black Eagle, Vista, Balzams	
IX	S1 S4	Sylvia, Chinook, Black Giant	Halka
X	S6 S9	Krupnoplodnaja, Ferobi, Folfer	
XI	S2 S7	Guigne d'Annonay, Early Purple (Hinode)	
XII	S1 S6	Noble, Buholzer, Turca	
XIII	S2 S4	Vic, Sam, Patricia	
XIV	S1 S5	Bianca, Seneca, Valera	
XV	S5 S6	Elfrida, Eriane, Zweitfrühe	
XVI	S3 S9	Burlat, Mona, Nalina	
XVII	S4 S6	Heidi, Merton Glory, Nutberry Black	Debora, Irena
XXVIII	S1 S9	Smoky Dun, Valerij Cskalov, Zoe	Tamara
XIX	S3 S13	Reverchon, Sir Tom, Wellington A	
XX	S1 S6	Hertford, Noble, Mermat	Fabiola, Vanda
XXI	S4 S9	Inge, Merpet, Summer Sun	
XXII	S3 S12	Linda, Princess, Schneiders	
XXIII	S3 S16	San Pritisa A, Strawberry Heart	
XXIV	S6 S12	Aida, Flamentiner, Segorbina	
XXV	S2 S6	Fercer, Kirdar, Luke	Lívia, Vilma, Early Korvik
XXVI	S5 S13	Ferbolus, Goodnestone Black, Unterländer	
XXVII	S4 S12	Katalin, Kavics, Margit	
XXVIII	S1 S7	Charger, Ortenauer, Paulis	
XXIX	S4 S7	Nigde, Stolzer, Sultan	
XXX	S6 S7	Brennkirsche Doll, Schwarze Schüttler	

Tabulka 1: Přehled některých světových a českých odrůd, jejich genotyp a zařazení do IG

Zdroj: Schuster, 2012; Sharma et al., 2016

Odrůda	S - genotyp
Caddusa	S13 S22
Grosszweiete	S6 S14
Halbhaslacher	S5 S7
Moscatella	S17 S22
Nucigliara	S14 S16
Orleans 171	S10 S11

Tabulka 2: Kultivary – univerzální opylovači a jejich genotypy

Zdroj: Schuster, 2012

V tabulce 3 jsou přehledně uvedeny některé autokompatibilní odrůdy. V každé z nich je přítomna alela mutovaného genu, nesoucí označení S_4' k odlišení od standardní alely S_4 . Výjimku tvoří kultivary JI2434 (ve dvou varietách, AH a EM) a kultivar JI2538, u kterých je přítomna mutovaná alela S_3' , a také odrůda Kronio s mutovanou alelou S_5' .

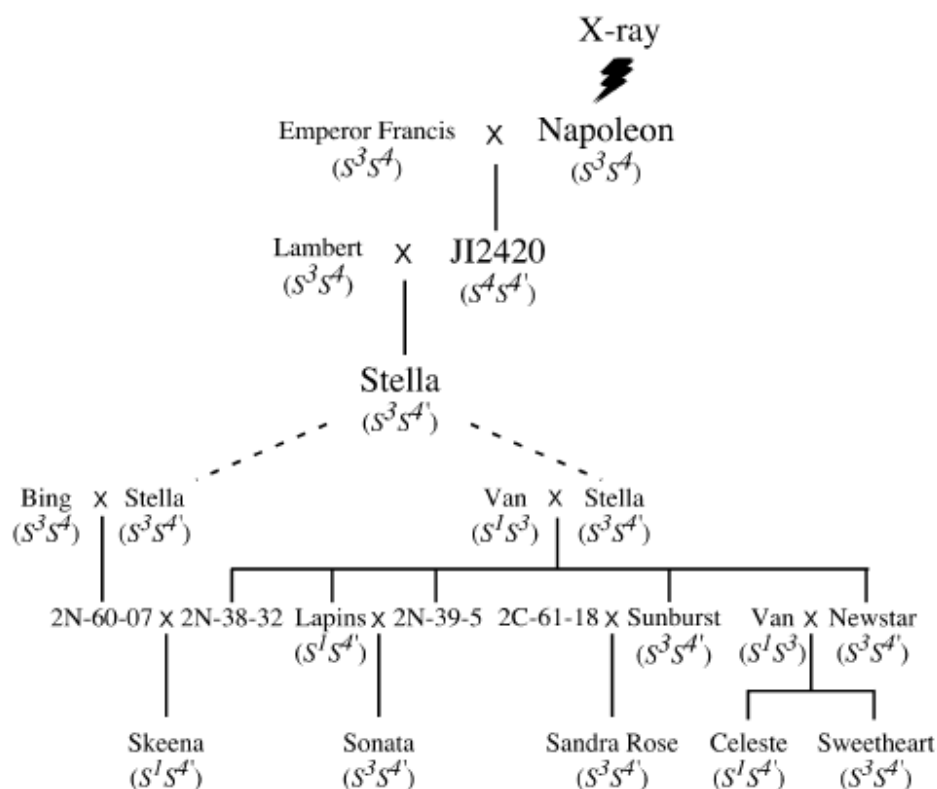
Odrůda	S - genotyp
Blackgold	S_4' S6
Blaze Star	S_4' S6
Celeste	S1 S_4'
Glacier	S_4' S9
JI 2420	S_4' S_4'
JI 2434 AH	S_3 S_3' nebo S_3 S_3
JI 2434 EM	S_3' S4
JI 2538	S1 S_3'
Kronio	S_5' S6
Lapins	S1 S_4'
Pál	S_4' S9
Newstar	S_3 S_4'
Paulus	S_4' S9
Petrus	S_4' S9
Sandra Rose	S_3 S_4'
Santina	S1 S_4'
Selah	S_3 S_4'
Skeena	S1 S_4'
Sonata	S_3 S_4'
Stardust	S1 S_4'
Starkrimson	S_3 S_4'
Sumesi	S_3 S_4'
Staccato	S_3 S_4'
Stella	S_3 S_4'
Sunburst	S_3 S_4'
Sweetheart	S_3 S_4'
Tehranivee	S_3 S_4'
Vandalay	S_3 S_4'
Waiyin No.7	S_3 S_4'

Tabulka 3: Autokompatibilní kultivary a jejich genotypy

Zdroj: Schuster, 2012

3.4.5 Stella

Odrůda Stella byla první samosprašnou třešní, která byla uvedena na trh. Autokompatibilita byla u třešní vyvolána ozářením rentgenovými paprsky, tyto experimenty byly prováděny v institutu Johna Innese (Norwich, Anglie) a jejich výsledkem byla produkce několika autokompatibilních semenáčů. Potomkem jednoho z nich byla i Stella (Lapins, 1970). Jako odrůda byla vyselektována v roce 1964 z potomků křížence odrůdy Lambert a semenáče JI2420.



Obrázek 7: Rodokmen odrůdy Stella a jejích vybraných potomků

Zdroj: Ushijima et al., 2004

Stella byla jako první samosprašná odrůda použita v šlechtitelských programech určených k produkci dalších autokompatibilních odrůd a stala se tak prapředkem většiny z nich. Genotyp odrůd vyšlechtěných ze Stelly obsahuje mutovanou S alelu S_4' genu SFB, zatímco potomci dalšího ze semenáčů vyprodukovaných v institutu Johna Innese, JI2434 nesou mutovanou alelu S_3' taktéž v genu SFB. Existují i další, již zmíněné, genotypy autokompatibilních odrůd. Sicilský kultivar Kronio nese mutaci na alele S_5' genu SFB, španělský kultivar Cristobalina pak má standardní výbavu S alel S_3S_6 , přesto je

autokompatibilní, neboť princip její samosprašnosti není svázán s S lokusem SFB genu (Folta et Gardiner, 2009).

Stella je, jak již bylo řečeno, odrůdou plně autokompatibilní a může také působit jako univerzální opylovač. Tato práce mapuje podíl samoopylení této odrůdy u stromu, v jehož bezprostřední blízkosti rostou dvě další neznámé kulturní odrůdy a jeden náhodný semenáč.

4 Experimentální část

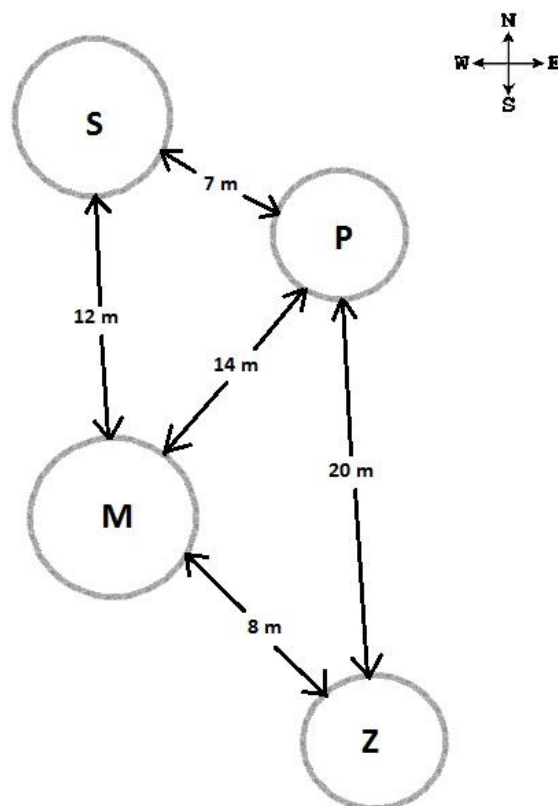
4.1 Materiál a metody

4.1.1 Materiál

4.1.1.1 Rostlinný materiál

Ze tří stromů třešně (odrůda Stella, neznámá kulturní odrůda a náhodný semenáč „ptáčnice“) byly odebrány nezralé plody. Do dalšího zpracování byly uloženy při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Z odrůdy Stella (vzorky S) bylo odebráno 50 kusů, z neznámé odrůdy (vzorky M) 24 kusů, z náhodného semenáče (vzorky P) pak bylo odebráno 33 kusů. Ze všech nezralých plodů byla vypreparována a opět zmražena embrya, tyto vzorky byly označeny S1 – S50, M1 – M24, P1 – P33.

Dále byly z dostupných stromů v blízkém okolí odebrány 2- 3 pupeny pro určení genotypů potenciálních otců. Tyto vzorky nesou označení S, M, P, Z. Jejich rozmístění a vzdálenosti mezi nimi schematicky znázorňuje obr. 7.



Obrázek 8: Schematické znázornění rozmístění a vzdáleností stromů

4.1.1.2 Soupis chemikálií

4.1.1.2.1 Kity pro extrakci a analýzu DNA

- Kit pro extrakci DNA z rostlinného materiálu Invisorb[®] Spin Plant Mini Kit (Strattec Molecular GmbH, Berlin, Německo)
- Kit pro PCR reakce QIAGEN Multiplex PCR *Plus* Kit (QIAGEN, Venlo, Nizozemsko)

4.1.1.2.2 Chemikálie pro elektroforézu

- agaróza
- pufr (Tris, EDTA, kyselina boritá), TBE pufr
- DNA standard (ThermoScience, Litva)
- ethidiumbromid (zásobní roztok 1mg/ml, výsledná koncentrace 0,5 µg/ml)

4.1.1.2.3 Chemikálie pro kapilární elektroforézu

- Standard LIZ 600 (Life Technologies, USA)
- Formamide Hi-Di (Life Technologies, USA)

4.1.1.3 Přístroje a pomůcky

- vortex TechnoKartell TK 3S (Hertz, Německo)
- termoblok TDB-120 (Biosan, Litva)
- centrifuga Eppendorf 5415 D (Eppendorf, Německo)
- centrifuga Eppendorf 5430 R (Eppendorf, Německo)
- thermocycler T-gradient (Biometra, SRN)
- dokumentační systém Gel-Doc (Bio-Rad, USA)
- pipety Eppendorf (Eppendorf, Německo)
- centrifugační mikrozkuhavky (Schoeller, Německo)
- ABI PRISM 310 (Life Technologies, USA)

4.1.2 Metody

4.1.2.1 Příprava rostlinného materiálu

- Z nezralých plodů tří stromů (odrůda Stella, neznámá kulturní odrůda a semenáč) byla za aseptických podmínek (nůž byl pokaždé opálen, aby se zabránilo kontaminaci) vypreparována embrya, přenesena do centrifugačních mikrozkušavek a homogenizována. Jednalo se o vzorky S1 - S50, M1 – M24, P1 – P33, tedy celkem 107 vzorků.
- Z letorostů čtyř stromů (odrůda Stella, dvě neznámé kulturní odrůdy a semenáč) byly odebrány 2-3 pupeny, v mikrocentrifugačních zkumavkách v prostředí tekutého dusíku nadrceny na co nejjemnější prášek.

Z takto připravených vzorků byla extrahována DNA kitem Invisorb® Spin Plant Mini Kit.

4.1.2.2 Extrakce DNA

- Ke vzorkům do zkumavek bylo přidáno 400 μ l lyzačního pufru P a 20 μ l proteinázy K, protřepáno na vortexu a převrácením promícháno. Vzorky byly inkubovány v termobloku při 65 °C po dobu 30 minut.
- Supernatant byl přenesen do připravené filtrační zkumavky, které byly centrifugovány po dobu 1 min. při 11000 rpm. Poté byl odstraněn prefiltr a přidány 4 μ l RNázy A (100 mg/ml). Dále bylo přidáno 200 μ l vázacího pufru A.
- Roztok byl přenesen do vázací kolonky a inkubován po dobu 1 minuty. Kolonky byly centrifugovány po dobu 2 minut. Vázací kolonky byly přemístěny do nových zkumavek.
- V dalším kroku bylo přidáno 550 μ l promývacího roztoku I. Vázací kolonky byly po dobu 1 minuty centrifugovány, poté byl filtrát odstraněn a kolonky opět přemístěny do nových zkumavek.
- Do vázací kolonky bylo přidáno 550 μ l promývacího roztoku II, po dobu 1 minuty byly kolonky centrifugovány, poté byl filtrát znovu odstraněn. Tento krok byl ještě jednou opakován. Na závěr byly kolonky centrifugovány po dobu 4 minut k odstranění zbylého promývacího roztoku.

- Vázací kolonky byly opět přemístěny do nových zkumavek a bylo přidáno 100 µl elučního roztoku přehřátého na 65 °C a kolonky centrifugovány po dobu 1 min.

4.1.2.3 Podmínky PCR

Byly připraveny dvě nezávislé PCR reakce, jedna pro amplifikaci markeru S-RNase, druhá pro marker SFBoxu. Použit byl dle návodu Kit pro PCR reakce QIAGEN Multiplex PCR *Plus* Kit (QIAGEN, Venlo, Nizozemsko).

Pro amplifikaci genu S-RNase 10µl reakce obsahovala:

- 5 µl Multiplex PCR Master Mix
- 1 µl primeru (1 µM) PaCons1-F - FAM 5´MCT TGT TCT TGS TTT YGC TTT CTT C3´
- 1 µl primeru (1 µM) PaCons1-R2 – 5´GCC ATT GTT GCA CAA ATT GA3´
- 3 µl DNA

Pro amplifikaci genu SFBox 10µl reakce obsahovala:

- 5 µl Multiplex PCR Master Mix
- 1 µl primeru (1 µM) 6-NED-FBOX5´A – NED 5´TTK SCH ATT RYC AAC CKC AAA AG3´
- 1 µl primeru (1 µM) F-BOX intron-R – 5´CWG GTA GTC TTD SYA GGA TG3´
- 3 µl DNA

Teplotně časový profil: 1x 95 °C 5 min, 5x 95 °C 30 s, 58 °C 90 s, 72 °C 30 s, 23x 95 °C 30 s, 56 °C 90 s, 72 °C 30 s, 1x 72 °C 50 min (thermocycler T-gradient Biometra, SRN).

4.1.2.4 Elektroforéza

Pro otestování kvality amplifikace bylo 5 µl vzorku smícháno s nanášecí barvou (1 µl) složenou z 40% vodného roztoku sacharózy a 0,05% přídatku bromfenolové a xylencyanolové modři. Vzorky byly separovány v 2% agarózovém gelu (Serva) v elektroforézovém pufu 1xTBE (Sambrook et al., 1989) při 120 V 30 minut a vizualizovány

pomocí dokumentačního systému GelDoc (Bio-Rad). Velikost PCR produktů byla odhadnuta na základě velikostního standardu GeneRuler 100bp plus (Thermo Fisher).

4.1.2.5 Kapilární elektroforéza

Vzorky S-RNase byly pro silnější amplifikaci 10x ředěny deionizovanou vodou. Vzorky SFBox byly ředěny 3x. Do zkumavek stripu byla nanesena směs ředěných amplikonů (1 + 1 μ l) a zakápnuta směsí HiDi formamidu (Life Technologies) a standardu LIZ600 (Life Technologies). (10 μ l formamidu + 0,5 μ l LIZ standardu). Stripy byly umístěny do robotického ramene kapilární elektroforézy ABI PRISM 310 a analyzovány. Modul Standard Microsatelite byl modifikován z hlediska napětí a doby nástřiku (injection), použité parametry byly 10 kV po dobu 5 sekund. Doba separace vzorku byla 28 minut.

4.1.2.6 Statistické vyhodnocení

Výsledky byly graficky zpracovány a statisticky vyhodnoceny v programu MS Excel 2007. Byly také použity metodiky výpočtu heterozygotnosti očekávané (H_E – heterozygosity expected) dle Nei a Li (1979), a výpočtu polymorfního informačního obsahu PIC (Polymorphism Information Content) dle Botsteina et al. (1980).

4.2 Výsledky

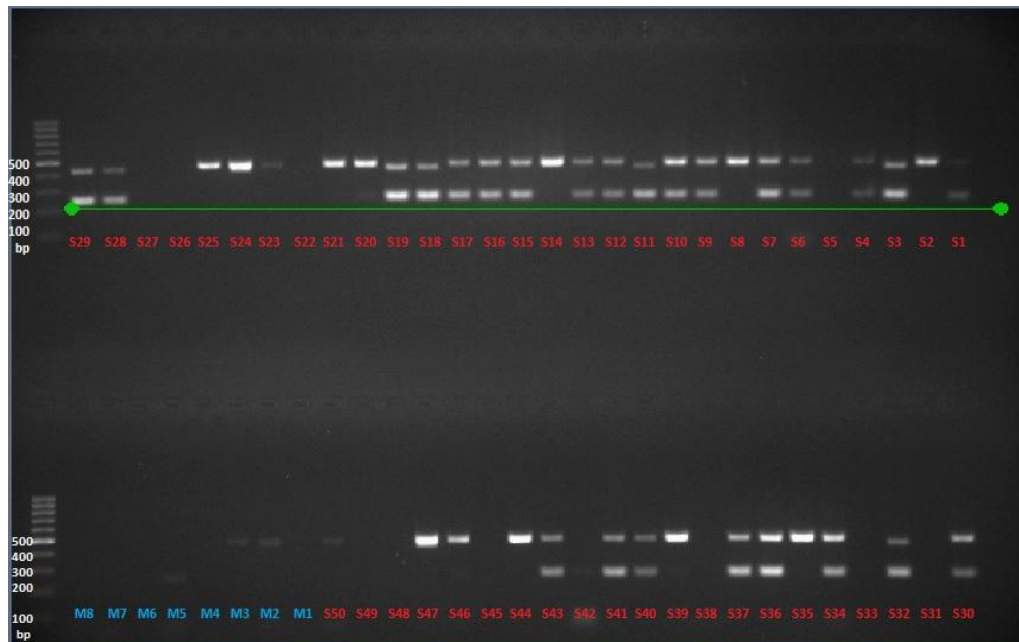
4.2.1 Výsledky PCR amplifikace

Výsledky PCR amplifikace byly značně nevyrovnané z hlediska kvality. Zatímco u potomstva odrůdy Stella (S) a u potomstva semenáče P amplifikace většinou vykazala kvalitní a dobře čitelné výsledky, vzorky potomstva odrůdy M byly zřetelné pouze v cca polovině případů.

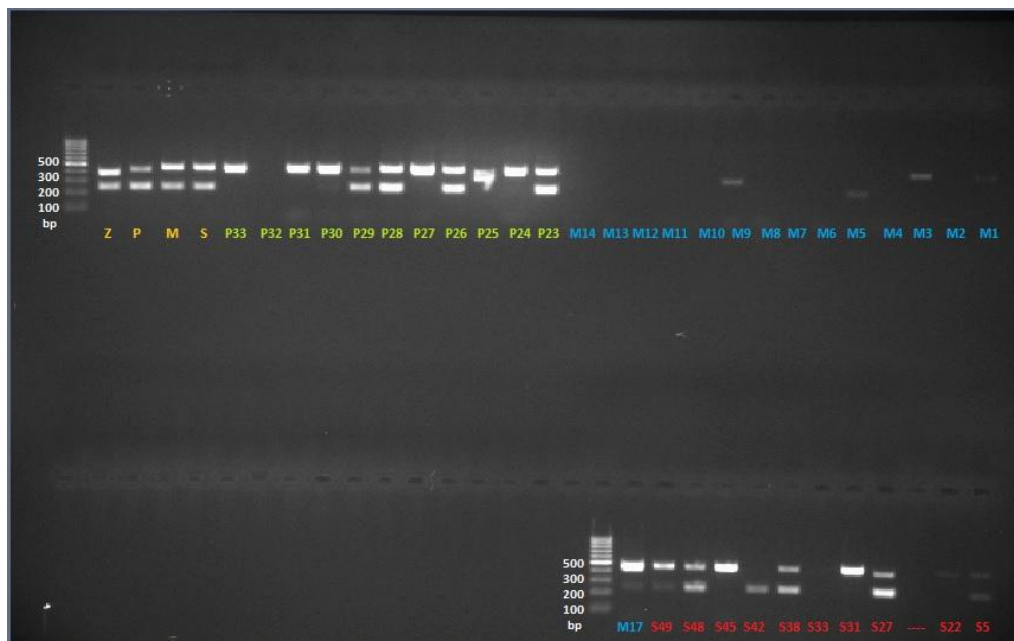
Z tohoto důvodu byla amplifikace opakována s pozměněnou koncentrací DNA (místo 3 μ l DNA bylo použito 1 μ l DNA + 2 μ l vody). Jednalo se o vzorky S5, S22, S27, S31 S33, S38, S42, S45, S48, S49, M1 - M14, M17 u amplifikace genu S-RNase a o vzorky S22, S42, S46, M1 –

M14, P4, P5, P10 a P18 u amplifikace genu SFB. Ani změna koncentrace DNA kvalitu amplifikace, zejména u vzorků řady M, nezlepšila.

Na níže uvedených elektroforeogramech jsou pouze pro ilustraci uvedeny některé výsledky amplifikace.



Obrázek 9: Elektroforeogram – amplifikace genu S-RNase, vzorky S1 – S50, M1 – M8



Obrázek 10: Elektroforeogram – amplifikace genu S-RNase, vzorky Z, P, M, S, P23 – P33, opakovaná amplifikace vzorků M1 – M14, M17, S5, S22, S27, S31 S33, S38, S42, S45, S48, S49

4.2.2 Výsledky kapilární elektroforézy

Kapilární elektroforéza umožnila detekovat přesné délky amplifikovaných markerů a ty bylo možno u jednotlivých sledovaných embryí porovnat se známými hodnotami S alel. Tabulka 4 obsahuje přehled délkových polymorfismů markerů genů pro S-RNasu a F-Box protein, jejichž kombinace je určující při určování S alel (genotypů) testovaných jedinců. Tučně jsou označeny alely kulturních odrůd.

S alela	S-RNase (I. intron)	SFB (5' UTR intron)
S1	379	188
S2	342	N/A
S3	232	200
S4	449	187
S5	394	187
S6	442	178
S7	342	178
S9	354	N/A
S10	364	175
S12	344	183
S14	330	188
S16	412	175
S18	339	181
S19	425	188
S20	324	169
S21	374	191
S22	420	172
S28	367	183
S31	207	182

Tabulka 4: Standardy alel

Zdroj: Sharma et al., 2017

4.2.2.1 Rodičovské genotypy

V tabulce 5 jsou uvedeny výsledky kapilární elektroforézy, určení genotypů a zařazení do skupin testovaných stromů pro určení paternity, vzorky S, M, P, Z.

vzorek	strom	SRnase1	SRnase2	Fbox1	Fbox2	Genotyp	SI-group
S	Stella	232	450	187	200	S3S4	SC
M		232	450	187	200	S3S4	SC nebo III
P	ptáčnice	232	421	200	N/A	S3Sn	neurčeno
Z		232	380	187	200	S1S3	II

Tabulka 5: Výsledky kapilární elektroforézy pro testované stromy, vzorky S, M, P, Z

Výsledky u vzorku S potvrdily genotyp odrůdy Stella (S_3S_4), u vzorku M byl zjištěn genotyp S_3S_4 , vzorek tedy buď reprezentuje také odrůdu Stella, nebo se jedná o cizosprašnou odrůdu z SI skupiny III.

Vzorek Z odpovídal genotypově některé z odrůd z SI skupiny II (S_1S_3).

Genotyp náhodného semenáče, „ptáčnice“, dle výsledků neodpovídal žádné ze známých odrůd. Kapilární elektroforéza vzorku P ukázala dva jasné vrcholy odpovídající haplotypu S_3 (232 bp pro S-RNase a 200 bp pro SFB) a jeden samostatný vrchol (421 bp) pro S-RNase, který neodpovídá žádnému známému haplotypu. Ve výsledcích je tento neznámý haplotyp označen jako S_n .

4.2.2.2 Genotypy potomstva stromu S

V tabulce 6 jsou popsány genotypy potomstva stromu S, odrůdy Stella. Z 50 vzorků amplifikovalo 49. Devět plodů nepocházelo ze samoopylení, otcovský pyl těchto plodů pocházel ze stromu P. Šestnáct plodů bylo homozygotních S_4S_4 , 24 plodů mělo stejný genotyp jako matka S_3S_4 .

vzorek	embryo	DNA (matka x otec)	SRnase1	SRnase2	Fbox1	Fbox2	Genotyp	SI-group
S1	Stella	Stella S3S4 X Stella S3S4	232	450	187	200	S3S4	SC
S2	Stella	Stella S3S4 X Stella S3S4	450	450	187	187	S4S4	SC
S3	Stella	Stella S3S4 X ptáčnice (S3Sn)	232	421	200	N/A	S3Sn	neurčeno
S4	Stella	Stella S3S4 X Stella S3S4	232	450	187	200	S3S4	SC
S5	Stella	Stella S3S4 X Stella S3S4	232	450	187	200	S3S4	SC
S6	Stella	Stella S3S4 X Stella S3S4	232	450	187	200	S3S4	SC
S7	Stella	Stella S3S4 X Stella S3S4	232	450	187	200	S3S4	SC
S8	Stella	Stella S3S4 X Stella S3S4	450	450	187	187	S4S4	SC
S9	Stella	Stella S3S4 X Stella S3S4	232	450	187	200	S3S4	SC
S10	Stella	Stella S3S4 X Stella S3S4	232	450	187	200	S3S4	SC
S11	Stella	Stella S3S4 X ptáčnice (S3Sn)	232	421	200	N/A	S3Sn	neurčeno
S12	Stella	Stella S3S4 X Stella S3S4	232	450	187	200	S3S4	SC
S13	Stella	Stella S3S4 X Stella S3S4	232	450	187	200	S3S4	SC
S14	Stella	Stella S3S4 X Stella S3S4	450	450	187	187	S4S4	SC
S15	Stella	Stella S3S4 X Stella S3S4	232	450	187	200	S3S4	SC
S16	Stella	Stella S3S4 X Stella S3S4	232	450	187	200	S3S4	SC
S17	Stella	Stella S3S4 X Stella S3S4	232	450	187	200	S3S4	SC
S18	Stella	Stella S3S4 X ptáčnice (S3Sn)	232	421	200	N/A	S3Sn	neurčeno
S19	Stella	Stella S3S4 X ptáčnice (S3Sn)	232	421	200	N/A	S3Sn	neurčeno
S20	Stella	Stella S3S4 X Stella S3S4	450	450	187	187	S4S4	SC
S21	Stella	Stella S3S4 X Stella S3S4	450	450	187	187	S4S4	SC
S22	Stella	Stella S3S4 X Stella S3S4	450	450	187	187	S4S4	SC
S23	Stella	Stella S3S4 X Stella S3S4	450	450	187	187	S4S4	SC
S24	Stella	Stella S3S4 X ptáčnice (S3Sn)	421	450	187	N/A	S4Sn	SC
S25	Stella	Stella S3S4 X Stella S3S4	450	450	187	187	S4S4	SC
S26	Stella	Stella S3S4 X Stella S3S4	232	450	187	200	S3S4	SC
S27	Stella	Stella S3S4 X ptáčnice (S3Sn)	232	421	200	N/A	S3Sn	neurčeno
S28	Stella	Stella S3S4 X ptáčnice (S3Sn)	232	421	200	N/A	S3Sn	neurčeno
S29	Stella	Stella S3S4 X ptáčnice (S3Sn)	232	421	200	N/A	S3Sn	neurčeno
S30	Stella	Stella S3S4 X Stella S3S4	232	450	187	200	S3S4	SC
S31	Stella	Stella S3S4 X Stella S3S4	450	450	187	187	S4S4	SC
S32	Stella	Stella S3S4 X ptáčnice (S3Sn)	232	421	200	N/A	S3Sn	neurčeno
S33	Stella	Stella S3S4 X Stella S3S4	232	450	187	200	S3S4	SC
S34	Stella	Stella S3S4 X Stella S3S4	232	450	187	200	S3S4	SC
S35	Stella	Stella S3S4 X Stella S3S4	450	450	187	187	S4S4	SC
S36	Stella	Stella S3S4 X Stella S3S4	232	450	187	200	S3S4	SC
S37	Stella	Stella S3S4 X Stella S3S4	232	450	187	200	S3S4	SC
S38	Stella	Stella S3S4 X Stella S3S4	232	450	187	200	S3S4	SC
S39	Stella	Stella S3S4 X Stella S3S4	450	450	187	187	S4S4	SC
S40	Stella	Stella S3S4 X Stella S3S4	232	450	187	200	S3S4	SC
S41	Stella	Stella S3S4 X Stella S3S4	232	450	187	200	S3S4	SC
S42	Stella	Stella S3S4 X Stella S3S4	232	450	187	200	S3S4	SC
S43	Stella	Stella S3S4 X Stella S3S4	232	450	187	200	S3S4	SC
S44	Stella	Stella S3S4 X Stella S3S4	450	450	187	187	S4S4	SC
S45	Stella	Stella S3S4 X Stella S3S4	450	450	187	187	S4S4	SC
S46	Stella	Stella S3S4 X Stella S3S4	450	450	187	187	S4S4	SC
S47	Stella		N/A	N/A	N/A	N/A		
S48	Stella	Stella S3S4 X Stella S3S4	232	450	187	200	S3S4	SC
S49	Stella	Stella S3S4 X Stella S3S4	450	450	187	187	S4S4	SC
S50	Stella	Stella S3S4 X Stella S3S4	450	450	187	187	S4S4	SC

Tabulka 6: Výsledky kapilární elektroforézy potomstva stromu S

4.2.2.3 Genotypy potomstva stromu M

Tabulka 7 popisuje zastoupení genotypů v potomstvu stromu M. Z 24 vzorků řady M amplifikovalo pouze 13, statisticky je tedy vzorek příliš malý. I přesto je zde znatelná výrazně vyšší heterogenita potomstva v porovnání s potomstvem stromu S, a to přestože oba mateřské stromy mají stejný genotyp. Možné příčiny jsou předmětem diskuse.

Pouze dva plody (M3 a M21) stromu M byly homozygotní S_4S_4 , u pěti plodů byl zjištěn genotyp S_1S_4 (M15, M18, M19, M24), resp. S_1S_3 (M23), kde otcovský pyl pocházel ze stromu Z, tři plody pocházely z opylení stromem P (2 plody [M2, M17] s genotypem S_4S_n , 1 plod [M20] s genotypem S_3S_n). U dvou plodů (M9, M16) bylo zaznamenáno opylení pylem s alelou S_{12} , která pravděpodobně pochází z neidentifikované kulturní odrůdy z okolí (v jednom případě byl určen genotyp S_3S_{12} , v druhém případě nebyla identifikována mateřská alela). Poslední plod (M22) byl opylen haplotypem S_{16} z opět neidentifikovaného stromu a byl u něj zjištěn genotyp S_3S_{16} .

vzorek	embryo	DNA (matka x otec)	SRnase1	SRnase2	Fbox1	Fbox2	Genotyp	SI-group
M1	M							
M2	M	M S3S4 X ptáčnice (S3Sn)	421	450	187	N/A	S4Sn	neurčeno
M3	M	M S3S4 X Stella S3S4	450	450	187	187	S4S4	SC
M4	M							
M5	M							
M6	M							
M7	M							
M8	M							
M9	M	M S3S4 X neurčeno	344	N/A	N/A	183	S3,4S12	XXII nebo XXVII
M10	M							
M11	M							
M12	M							
M13	M							
M14	M							
M15	M	M S3S4 X Z S1S3	379	450	187	187	S1S4	IX
M16	M	M S3S4 X neurčeno	232	344	200	N/A	S3S12	XXII
M17	M	M S3S4 X ptáčnice (S3Sn)	421	450	187	N/A	S4Sn	neurčeno
M18	M	M S3S4 X Z S1S3	379	450	187	187	S1S4	IX
M19	M	M S3S4 X Z S1S3	379	450	187	187	S1S4	IX
M20	M	M S3S4 X ptáčnice (S3Sn)	232	421	200	N/A	S3Sn	neurčeno
M21	M	M S3S4 X Stella S3S4	450	450	187	187	S4S4	SC
M22	M	M S3S4 X neurčeno	232	412	175	200	S3S16	XXIII
M23	M	M S3S4 X Z S1S3	232	N/A	189	200	S1S3	II
M24	M	M S3S4 X Z S1S3	380	450	187	187	S1S4	IX

Tabulka 7: Výsledky kapilární elektroforézy potomstva stromu M

4.2.2.4 Genotypy potomstva stromu P

V tabulce 8 je uveden přehled genotypů potomstva stromu P. Z 33 vzorků amplifikovalo 31, z toho u jednoho vzorku (P1) amplifikovala pouze 1 alela S_3 . U jedenácti plodů byl identifikován genotyp S_4S_n , u devíti plodů genotyp S_3S_4 , u čtyř plodů genotyp $S_{12}S_n$, u dvou plodů genotyp $S_{16}S_n$. Vždy u jednoho plodu byly identifikovány genotypy S_3S_n , S_1S_3 , S_3S_{12} a genotyp s ojedinělým výskytem alely S_3S_{14} .

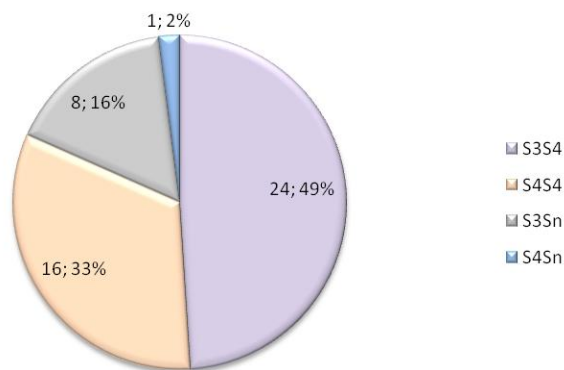
vzorek	embryo	DNA (matka x otec)	SRnase1	SRnase2	Fbox1	Fbox2	Genotyp	SI-group
P1	ptáčnice	ptáčnice S3Sn X neurčeno	232	N/A	200	N/A	S3S?	neurčeno
P2	ptáčnice	ptáčnice S3Sn X S3S4	232	450	187	200	S3S4	III nebo SC
P3	ptáčnice	ptáčnice S3Sn X S3S4	232	450	187	200	S3S4	III nebo SC
P4	ptáčnice	ptáčnice S3Sn X S3S4	232	450	175	200	S3S4	III nebo SC
P5	ptáčnice	ptáčnice S3Sn X neurčeno	411	421	187	200	S16Sn	neurčeno
P6	ptáčnice	ptáčnice S3Sn X S3S4	232	450	187	200	S3S4	III nebo SC
P7	ptáčnice	ptáčnice S3Sn X S3S4	421	450	187	N/A	S4Sn	neurčeno
P8	ptáčnice	ptáčnice S3Sn X neurčeno	344	421	173	N/A	S12Sn	neurčeno
P9	ptáčnice	ptáčnice S3Sn X neurčeno	232	331	200	N/A	S3S14	XXXIV
P10	ptáčnice	ptáčnice S3Sn X S3S4	421	450	187	N/A	S4Sn	neurčeno
P11	ptáčnice	ptáčnice S3Sn X S3S4	421	450	187	N/A	S4Sn	neurčeno
P12	ptáčnice	ptáčnice S3Sn X neurčeno	344	421	183	200	S12Sn	neurčeno
P13	ptáčnice	ptáčnice S3Sn X S3S4	232	450	187	200	S3S4	III nebo SC
P14	ptáčnice	ptáčnice S3Sn X S3S4	421	450	187	N/A	S4Sn	neurčeno
P15	ptáčnice	ptáčnice S3Sn X S3S4	421	450	187	N/A	S4Sn	neurčeno
P16	ptáčnice	ptáčnice S3Sn X Z S1S3	232	379	187	200	S1S3	II
P17	ptáčnice	ptáčnice S3Sn X S3S4	421	450	187	N/A	S4Sn	neurčeno
P18	ptáčnice	ptáčnice S3Sn X neurčeno	344	421	183	200	S12Sn	neurčeno
P19	ptáčnice	ptáčnice S3Sn X neurčeno	232	344	183	200	S3S12	XXII
P20	ptáčnice	ptáčnice S3Sn X neurčeno	412	421	175	N/A	S16Sn	neurčeno
P21	ptáčnice							
P22	ptáčnice	ptáčnice S3Sn X S3S4	232	450	187	200	S3S4	III nebo SC
P23	ptáčnice	ptáčnice S3Sn X S3S4	232	450	187	200	S3S4	III nebo SC
P24	ptáčnice	ptáčnice S3Sn X S3S4	421	450	187	N/A	S4Sn	neurčeno
P25	ptáčnice	ptáčnice S3Sn X neurčeno	344	421	173	187/200	S12Sn	neurčeno
P26	ptáčnice	ptáčnice S3Sn X S3S4	232	450	187	200	S3S4	III nebo SC
P27	ptáčnice	ptáčnice S3Sn X S3S4	421	450	187	N/A	S4Sn	neurčeno
P28	ptáčnice	ptáčnice S3Sn X S3S4	232	450	187	200	S3S4	III nebo SC
P29	ptáčnice	ptáčnice S3Sn X S3S4	232	421	200	N/A	S3Sn	neurčeno
P30	ptáčnice	ptáčnice S3Sn X S3S4	421	450	187	N/A	S4Sn	neurčeno
P31	ptáčnice	ptáčnice S3Sn X S3S4	421	450	187	N/A	S4Sn	neurčeno
P32	ptáčnice				187	187		
P33	ptáčnice	ptáčnice S3Sn X S3S4	421	450	187	200	S4Sn	neurčeno

Tabulka 8: Výsledky kapilární elektroforézy potomstva stromu P

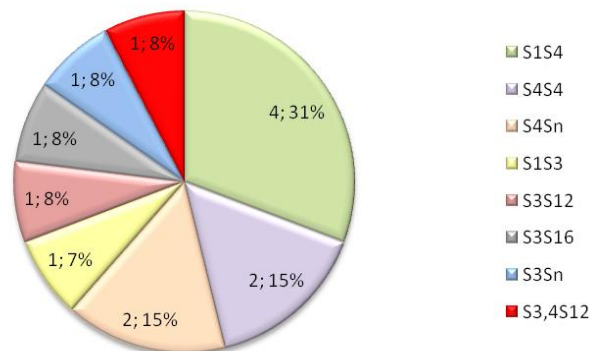
4.2.2.5 Četnost genotypů a S alel v jednotlivých subpopulacích

4.2.2.5.1 Četnost genotypů potomstev

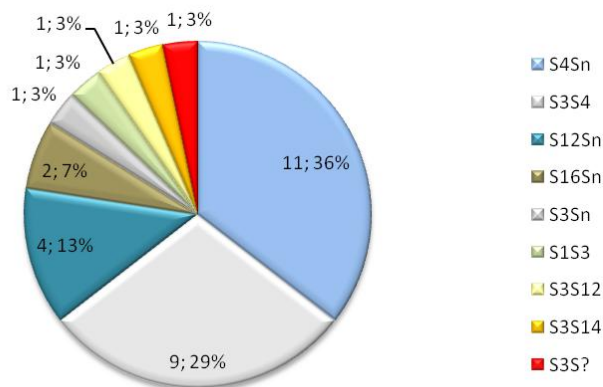
Genotypová frekvence potomstva stromu S je znázorněna na grafu 1. Je zde patrná výrazně nižší míra heterogenity genotypů než u potomstva stromů M a P (grafy 2 a 3). To je pravděpodobně dáno samosprašností a tedy vysokou mírou samoopylení u odrůdy Stella, blíže jsou pak frekvence genotypů a jejich pravděpodobné příčiny rozebrány v diskusi.



Graf 1: Procentuální zastoupení genotypů v potomstvu stromu S



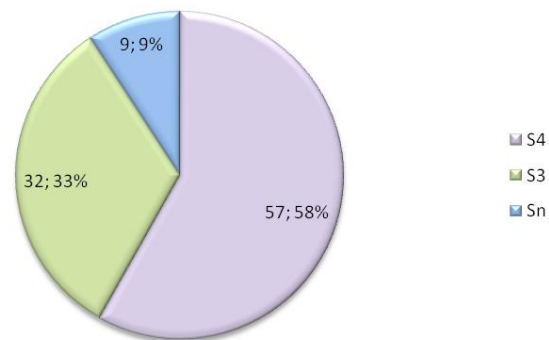
Graf 2: Procentuální zastoupení genotypů v potomstvu stromu M



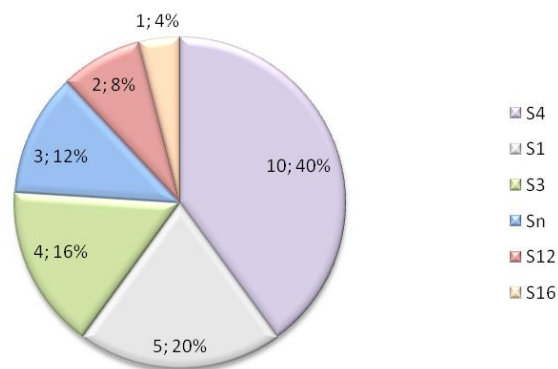
Graf 3: Procentuální zastoupení genotypů v potomstvu stromu P

4.2.2.5.2 Četnost S alel v potomstvech

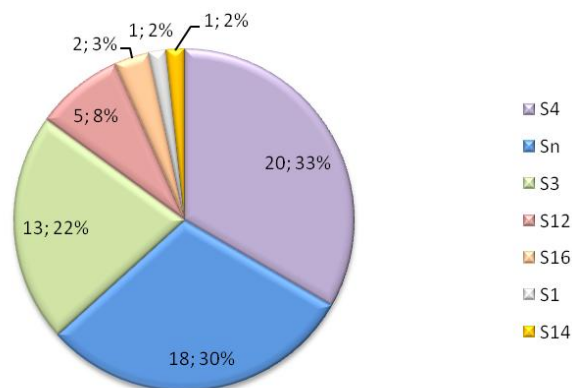
S alely jsou v potomstvu stromu S přítomny tři (S_3 , S_4 a S_n), první dvě jsou pravděpodobně především produktem samoopylení, jen v malé míře je zde jako otcovská alela zastoupena alela S_n , která je původem ze stromu P. Jejich frekvence jsou znázorněny v grafu 1. V grafech 2 a 3 je znázorněno zastoupení S alel u potomstev stromů M a P, kde je zřetelně vidět i větší počet přítomných S alel (6 v potomstvu stromu M, resp. 7 v potomstvu stromu P).



Graf 4: Procentuální zastoupení S alel v potomstvu stromu S



Graf 5: Procentuální zastoupení S alel v potomstvu stromu M



Graf 6: Procentuální zastoupení S alel v potomstvu stromu P

4.2.2.6 Statistické vyhodnocení frekvence S alel v subpopulacích

Pozorovaná četnost všech S alel v potomstvech sledovaných stromů je souhrnně uvedena v tabulce 9. V tabulce 10 je pak uvedena vypočítaná četnost očekávaná pro χ^2 (chí-kvadrát) test.

	S1	S3	S4	Sn	S12	S14	S16
S	0	32	57	9	0	0	0
M	5	4	10	3	2	0	1
P	1	13	20	18	5	1	2

Tabulka 9: Pozorovaná četnost S alel v potomstvech

	S1	S3	S4	Sn	S12	S14	S16
S	3,213	26,240	46,590	16,066	3,749	0,536	1,607
M	0,820	6,694	11,885	4,098	0,956	0,137	0,410
P	1,967	16,066	28,525	9,836	2,295	0,328	0,984
χ^2				56,924			
p - value				0,0000000816			

Tabulka 10: Očekávaná četnost S alel v potomstvech, χ^2 a p - value

Kritická hodnota při stupni volnosti 12 a na hladině významnosti 0,05 je 21,03. Hodnota χ^2 je pro dané subpopulace 56,924, je tedy výrazně vyšší než kritická hodnota, zároveň p-value $0,0000000816 < 0,05$. Můžeme tedy zamítnout nulovou hypotézu shodnosti frekvencí alel a předpokládat závislost počtu haplotypů na mateřské rostlině.

Dále byla v subpopulacích vyhodnocena (tab. 11) heterozygotnost pozorovaná (H_o) a heterozygotnost očekávaná (H_E) (Nei a Li, 1979) a také polymorfní informační obsah (Polymorfism Information Content – PIC) (Botstein et al., 1980).

	heterozygotnost pozorovaná (H _O)	heterozygotnost očekávaná (H _E)	PIC
S	0,67	0,55	0,467
M	0,85	0,75	0,7186
P	1,00	0,74	0,7002
χ^2		0,131	
p - value		0,99795	

Tabulka 11: Hodnoty H_O, H_E a PIC

Hodnota χ^2 je pro H_O a H_E v daných potomstvech 0,131 a je tedy menší než kritická hodnota 5,99 při stupni volnosti 2 a hladině významnosti 0,05. P-value 0,998 > 0,05 též potvrzuje platnost nulové hypotézy a tedy nezávislosti heterozygotnosti očekávané a pozorované.

Výsledky této analýzy korespondují s předpoklady opylovací dynamiky u samosprašných i cizosprašných kultivarů a jsou podrobně diskutovány v následující kapitole.

5 Diskuse

Přesná znalost opylovacích poměrů u samosprašných odrůd, tedy znalost podílu samosprašení a cizosprašení, může být významným faktorem při designu produkčních i semenných sadů. Stejně tak je klíčová znalost principů autoinkompatibility a zařazení jednotlivých autoinkompatibilních kultivarů druhu *Prunus avium* L. do tzv. SI skupin (SIG, IG – self-incompatible groups), jak je přehledně prezentuje např. Schuster (2012). S postupující dobou přibývá nově popsanych haplotypů, nově vyšlechtěných odrůd a přibývají i nové SI skupiny. Stejně tak přibývají i nové samosprašné odrůdy, které jsou vítaným zjednodušením při navrhování zmíněných sadů.

Tato práce se zabývala opylovacími poměry u samosprašné odrůdy Stella, potažmo i volným opylením dalších stromů v těsné blízkosti tohoto autokompatibilního jedince. Byla metodicky řešena s využitím standardních nástrojů, používaných v posledních letech výzkumnými pracovišti na celém světě (Wünsch a Hormaza, 2004a, 2004b; Marchese et al., 2007; Vaughan et al., 2008; Cachi a Wünsch, 2011; Lisek et al., 2015; Sharma et al. 2016, 2017).

Analýza DNA u stromu S potvrdila, že se jedná o samosprašnou odrůdu (S_3S_4 , resp. S_3S_4'). Strom S také vykazoval největší homogenitu potomstva. Malá pestrost alel (pouze 3) a jejich frekvence v potomstvu (S_4 – 58 %, S_3 - 33 %, S_n – 9 %) také poukazuje na samosprašnost. Stejně tak statistické výsledky – hodnota PIC (Polymorfism Information Content) 0,467 značí u kodominantních alel nižší míru polymorfismu (Chesnokov a Artemyeva, 2015). Také výpočet hodnoty heterozygotnosti očekávané (0,55) s porovnáním s heterozygotností pozorovanou (0,67) vypovídá o samosprašnosti odrůdy.

Na tomto místě je ovšem nezbytné si uvědomit, že hodnota H_E je konstruována pro výpočet očekávané heterozygotnosti v panmiktické populaci dle Hardy – Weinbergova zákona, kde jednou z podmínek jeho platnosti je nepřítomnost mutací. V případě druhu, který je při nepřítomnosti mutací striktně cizosprašný (heterozygotnost pozorovaná je tedy vždy 1) a samosprašnost je zapříčiněna právě přítomností mutace, je nutno toto při vyhodnocování parametrů H_E a H_O vždy brát do úvahy. Proto je možno přítomnost 33 % homozygotů v potomstvu stromu S považovat za potvrzení jeho autokompatibility.

Dalším zajímavým zjištěním, vycházejícím z analýzy genotypů potomstva stromu S, je míra samoopylení. 82 % potomků mělo genotyp S_3S_4 nebo homozygotní genotyp S_4S_4 , které pocházely ze samoopylení. Jen 18 % plodů pocházelo z opylení pylem z jiného stromu, ve všech případech, vzhledem k přítomnosti alely S_n , ze stromu P („ptáčnice“). Teoreticky by též otcovská alela S_4 mohla pocházet ze stromu M, ale, jak je podrobněji diskutováno dále, tato alela je pravděpodobně nemutovaná a nemůže tak stát v roli opylovače.

Tyto výsledky ve srovnání s ostatními testovanými potomstvy poukazují na vysokou míru samoopylení u autokompatibilní odrůdy. 82 % procent potomků pocházejících ze samoopylení je poměrně vysoká hodnota, např. Granger (1997) popsal u odrůdy Stella míru samoopylení pouze 30 %. Příčiny takto vysoké míry samoopylení mohou být různé, nejpravděpodobnější jsou zřejmě místní podmínky – vzdálenost možných dalších opylovačů, jejich genotypová sestava, ale třeba i klimatické podmínky (směr převládajících větrů, které do jisté míry pomáhají či naopak znesnadňují včelám a jiným vektorům pylu jejich úlohu). V tomto případě byl v těsné blízkosti (cca 7 m) pouze jeden možný opylovač (strom P), jeho alela S_n se v potomstvu stromu S objevila devětkrát, a ve vzdálenosti přes 20 m druhý (strom Z), u kterého však jako otcovská přicházela v úvahu pouze jedna alela z jeho genotypu (S_1). Strom M s genotypem S_3S_4 (vzdálený cca 12 m) jako opylovač pravděpodobně nemohl být funkční, neboť jeho S_4 alela zřejmě není mutovaná S_4' , jak je tomu v případě Stelly a není s ní tedy kompatibilní. Další z alel neznámého původu, které byly v tomto experimentu identifikovány (S_{12} , S_{14} a S_{16}), se v potomstvu stromu S neuplatnily.

Analýza DNA určila genotyp stromu M jako S_3S_4 . Jedná se tedy buď také o samosprašnou odrůdu nebo o některý z kultivarů SI skupiny III s genotypem S_3S_4 , kde alela S_4 není mutovaná. Protože tento typ analýzy není schopen odlišit, zda je v haplotypu S_4 přítomen gen normální nebo zmutovaný, nelze ani s jistotou potvrdit, zda se jedná o alelu S_4 nebo S_4' a tedy o samosprašný nebo cizosprašný kultivar. Vzhledem ke stáří stromu (minimálně 30 let) by se mohlo v případě samosprašné odrůdy jednat také o Stelly, nebo v případě cizosprašné odrůdy by přicházela v úvahu kultivar Napoleonova. Přesnější rozlišení by bylo možné buď na základě fenotypových charakteristik, nebo samozřejmě nejpřesněji za pomoci analytických metod, které mohou identifikovat a rozlišit jednotlivé alely. Ushijima et al. (2004) použili k popsání alel S_4 a S_4' metodu shotgun sekvenování, Ikeda et al. (2004b) využili nested PCR.

Potomstvo stromu M vykazovalo výrazně vyšší heterogenitu, co se týče výskytu jednak genotypů v potomstvu (7, resp. 8 genotypů, u jednoho z nich nebyla identifikována mateřská alela), jednak výskytu S alel (6 S alel – v pořadí četnosti S_4 [40 %], S_1 [20 %], S_3 [16 %], S_n [12 %], S_{12} [8 %], S_{16} [4 %]). Hodnota PIC 0,7186 značí vysokou míru genetické diverzity, také nejvyšší zjištěné hodnoty H_E a H_0 (0,75, resp. 0,85) naznačují, že mateřský strom M je kultivar cizosprašný. V potomstvu byl zaznamenán výskyt pouze dvou homozygotů S_4S_4 , přesněji pravděpodobně S_4S_4' , které zřejmě nepocházejí ze samoopylení a donorem pylu s alelou S_4 je zřejmě strom S, nacházející se cca 12 m severním směrem.

Také absence genotypu S_3S_4 v potomstvu a již zmíněná výrazně vyšší variabilita genotypů a přítomných S alel v porovnání s potomstvem stromu S může napovídat potřebu cizosprašení a že se tedy v případě stromu M nejedná o kultivar Stella, ale spíše o některý z kultivarů SI skupiny III s genotypem S_3S_4 , kde alela S_4 není mutovaná. Výsledky analýzy potomstva tedy také ukazují spíše na oblíbenou a dříve běžně na trhu dostupnou a pěstovanou odrůdu Napoleonova, jak již byla zmíněna výše. Vzhledem k nízkému počtu úspěšně amplifikovaných vzorků tohoto potomstva, a tedy statistické neprůkaznosti, jde však pouze o odhad, který by mohl být potvrzen pouze detailními analýzami DNA mateřského stromu.

Genotyp stromu P neodpovídal žádné ze známých odrůd, jedná se tedy skutečně o náhodný semenáč, nikoliv např. o kořenový výmladek některého z okolních stromů. Kapilární elektroforézou byl prokázán haplotyp S_3 a dále haplotyp, jehož profil neodpovídal žádnému dosud známému (v této práci je označován jako S_n). Stejný haplotyp popsali Sharma et al. (2017) ve studii, zabývající se genotypovou diverzitou u planě rostoucích třešní v České republice. Jimi popsáný haplotyp byl nalezen v lokalitě Doupovských hor, testovaný jedinec, jehož stáří je přibližně 15 let, se nachází v okrese Praha – Západ, v obci Černošice – Mokropsy, tedy v jiné geografické lokalitě, byť stále v rámci České republiky.

V potomstvu stromu P byla vysoká genotypová heterogenita očekávána vzhledem k přirozené autoinkompatibilitě studovaného druhu. Hodnota PIC (0,7002) a hodnoty H_E a H_0 (0,74, resp. 1,0) toto očekávání potvrdily. Zde je namístě připomenout, že hodnota H_E je samozřejmě hodnotou teoretickou, a že reálnou hodnotou vzhledem k cizosprašnosti jedince je H_0 , tedy heterozygotnost pozorovaná. V potomstvu byla potvrzena přítomnost 8, resp. 9 (jeden z genotypů nebyl plně identifikován) genotypů. Pozoruhodná je přítomnost

mateřského genotypu S_3S_n u jednoho z testovaných plodů, s ohledem na to, že se vyskytl pouze v jediném případě, jedná se pravděpodobně o chybu buď měření, nebo zápisu.

Vysokou variabilitu zaznamenaly i přítomné S alely, v této subpopulaci se objevilo všech sedm, které byly v tomto experimentu identifikovány. Hojně se zde uplatnila otcovská alela S_4 (33 %), která mohla pocházet jak z autokompatibilní Stelly (strom S) nebo ze stromu M, které jsou také oba nejbližší. Z nejvzdálenějšího identifikovaného stromu Z se alela S_1 uplatnila pouze ve 2 % (jediný výskyt). Není bez zajímavosti, že v 8 % (5 výskytů) zde byla zastoupena alela S_{12} , jejíž původ je neznámý a strom, ze kterého pocházela, se musel nacházet ve výrazně větší vzdálenosti. Obdobně alela S_{16} , která byla identifikována ve 2 případech (4 %) a alela S_{14} (jediný výskyt v potomstvu stromu P i v celém experimentu). Výlučně mateřská alela S_n byla zastoupena 30%, alela S_3 , která také pochází ze samičího determinantu, 22 %.

Haplotyp S_n navíc vykázal poměrně vysokou míru úspěšnosti jako opylovač, v potomstvu autokompatibilní Stelly se vyskytoval jako jediný cizí opylovač, budeme-li předpokládat, že nemutovaná alela S_4 stromu M se u ní nemohla uplatnit.

Analýza vzorku Z ukázala genotypovou příslušnost stromu do SI skupiny II (S_1S_3). Přesné určení odrůdy by bylo možné bližším studiem fenotypu, pro účely této práce však přesná znalost odrůdy není zcela podstatná. Vzhledem k tomu, že se jedná o starší strom (cca 30 let), lze předpokládat, že jde o některou v té době v tuzemsku dostupnou a běžnou odrůdu, zejména připadá v úvahu Karešova, příp. Troprichterova.

Haplotyp S_1 pocházející ze stromu Z se jako opylovač uplatnil především v potomstvu stromu M (5 výskytů, což představovalo 20 % přítomných alel). V potomstvu stromu P, vzdáleném cca 20 m, byla tento haplotyp identifikován pouze v jediném případě.

Potomstvo stromu Z nebylo předmětem tohoto experimentu, jeho plody nebyly k dispozici.

Výsledky představeného experimentu tak přinesly několik zajímavých zjištění. Výskyt nového haplotypu, který byl poprvé popsán v roce 2017 Sharmou et al. v severozápadních Čechách, v oblasti jižně od Prahy. Sharma et al. ho popsali u dvou jedinců z 20 zkoumaných v Doupovských horách a jistě by mohlo být užitečné pokusit se zmapovat výskyt tohoto haplotypu i v regionu Dolní Berounka, popř. i v dalších oblastech. Dalším logickým krokem by

pak mělo být i přesné popsání jeho genetické struktury za pomoci mikrosatelitních markerů nebo již zmíněných metod (Ikeda et al, 2004b, Ushijima et al., 2004). Tento haplotyp by tak mohl být dobře využitelným opylovačem.

Ve stejné studii Sharmy et al. (2017) je též popsán výskyt haplotypu S_{14} , který identifikovali ve 13 % ze 123 vzorků, což představovalo největší frekvenci v nekulturním genofondu. V našem experimentu byl zaznamenán v ojedinělém výskytu. Tento haplotyp se vyskytuje u kulturních třešní v Íránu a vzácně v Evropě (Schuster, 2012). V genetickém materiálu planých třešní na našem území je však zřejmě hojnější a jeho mapování by také mohlo přinést výsledky využitelné ve šlechtitelských programech, zejména třešní pro lesní výsadby a rekultivace. Stejně jako haplotyp S_n může haplotyp S_{14} fungovat jako spolehlivý opylovač.

Mapování a udržování genetické diverzity u planých třešní by tak mohlo představovat zajímavý úkol např. v lesnictví.

Získaná data také potvrdila předpoklad vysoké míry samoopylení u samosprašných odrůd, přestože existují studie (Granger, 1997; Brandt et al., 1999) popisující vyšší procento (71 %) cizosprášení u samosprašných kultivarů (konkrétně u Stelly). Dalším poznatkem získaným v tomto experimentu je fakt, že samosprašné odrůdy mohou fungovat také jako velice dobrý univerzální opylovač. Granger (2004) identifikoval Stellu jako opylovače u 8 z 11 zkoumaných odrůd (u dvou z nich dokonce jako opylovač 100%), v našem experimentu byla Stella pravděpodobně převažujícím opylovačem pro strom M (40% zastoupení alely S_4 , za předpokladu, že by byla potvrzena cizosprašnost stromu M), u stromu P také převažovala alela S_4 , i když v tomto případě by pro jasné tvrzení, že opylovačem byla Stella, byly nutné další analýzy odlišující alely S_4 a S_4' v potomstvu stromu P.

Přestože autokompatibilní odrůdy jsou schopny produkovat ovoce i bez opylení dalšími odrůdami, některé studie potvrzují, že lepší výsledky sklizně lze dosáhnout, je-li v dosahu samosprašné odrůdy i další opylovač (Granger, 1997; Choi a Andersen, 2001).

Pro praktické využití samosprašných odrůd v sadovnictví či zahrádkářství je vždy zapotřebí brát zřetel na účely a možnosti pěstování. Drobný zahrádkář, nedisponující místem pro výsadbu více než jednoho stromu, může v současné době využít nabídky mnoha

samosprašných odrůd třešní a dočká se solidní úrody. Při rekonstrukcích starých sadů nebo při zakládání nových produkčních sadů je dnes možno využít veškerých poznatků o samo- i cizosprašných odrůdách, a s ohledem na místní podmínky je vhodně kombinovat. Vždy je samozřejmě nutné respektovat požadavky jednotlivých kultivarů na půdu a klimatické podmínky, jejich fenotypové charakteristiky (velikost koruny, charakteristiky plodů se zřetelem na vlastnosti sensorické, odolnost při skladování či transportu), vhodnost použití podnoží s ohledem na prostor (bujně či málo rostoucí), ranost sklizně i ranost kvetení. Samosprašné kulturní odrůdy druhu *Prunus avium* L. mají a v budoucnosti budou mít důležité místo v portfoliu kultivarů třešní, protože mohou značně zjednodušit rozhodování o výběru vhodných odrůd a tím být i ekonomicky výhodnější.

Na druhou stranu je zapotřebí nezapomínat na velice prospěšnou a potřebnou biologickou a genetickou diverzitu u kteréhokoliv planého či kulturního druhu, potřebnou z hlediska konkurenceschopnosti i z hlediska např. odolnosti proti chorobám či škůdcům, a nenechat rozhodovat pouze ekonomická hlediska. Mapování, udržování, a kde je to možné i rozšiřování genetické variability by mělo být jedním ze základních úkolů výzkumníků. Pokud se tyto cíle daří skloubit s požadavky na efektivnost (zejména finanční) komerčního pěstování jakýchkoliv plodin, tím lépe.

6 Závěr

- Prvním cílem této diplomové práce bylo v dostupné literatuře zmapovat a popsat princip autoinkompatibility u druhu *Prunus avium* L., popsat princip narušení tohoto mechanismu a popsat metody analýzy DNA, které umožňují studium a identifikaci genotypů potomstev i rodičovských rostlin. Literatura na toto téma je poměrně rozsáhlá, dostupné studie byly zmapovány, přesto je v této problematice stále mnoho konkrétních principů neobjasněných. Stejně tak jsou stále nově identifikovány další neznámé alely S lokusu.
- Druhým cílem bylo experimentálně ověřit míru samoopylení u autokompatibilní odrůdy Stella. Z této odrůdy a z nejbližších okolních stromů cizosprašných odrůd byly odebrány vzorky nezralých plodů, z embryí byla izolována DNA a analyzována markery, které identifikují genotypovou konstituci S lokusu. Dále byly z těchto odebrány pupeny, z nichž byla rovněž izolována DNA, a byly identifikovány jejich genotypy k určení paternity. Získané výsledky byly zaznamenány a statisticky vyhodnoceny. Cíl práce byl splněn.
- Výsledky po statistickém vyhodnocení potvrdily vyslovenou hypotézu, která předpokládala statisticky významně vysokou míru samoopylení u autokompatibilní odrůdy Stella.

7 Literatura

- Allen, A. M., Hiscock, S. J. 2008. Evolution and phylogeny of self-incompatibility systems in angiosperms. In: Self-Incompatibility. In: Flowering Plants: Evolution, Diversity, and Mechanisms. Edited by Franklin-Tong. V. E. Springer-Verlag. Berlin. 73 – 101.
- Anderson, M. A., Cornish, E. C., Mau, S. L., Williams, E. G., Hoggart, R., Atkinson, A., Bönig, I., Grego, B., Simpson, R., Roche, P. J., Haley, J. D., Penschow, J. D., Niall, H. D., Tregear, G. W., Coghlan, J. P., Crawford, R. J., Clarke, A. E., 1986a. Cloning of cDNA for a stelar glycoprotein associated with expression of self-incompatibility in *Nicotiana glauca*. *Nature*. 321. 38–44.
- Anderson, M. A., McGadden, G. I., Bernatzky, R., Atkinson, A., Orpin, T., Dedman, H., Tregear, G. W., Coghlan, J. P., Crawford, R. J., Clarke, A. E. 1986b. Sequence variability of three alleles of the self-incompatibility gene of *Nicotiana glauca*. *Plant Cell*. 1. 483–491.
- Anderson, M. A., McGadden, G. I., Bernatzky, R., Atkinson, A., Orpin, T., Dedman, H., Tregear, G., Fernlyey, R., Clarke, A. E. 1989. Sequence variability of three alleles of the self-incompatibility gene of *Nicotiana glauca*. *Plant Cell*. 1. 483–491.
- Ballistreri, G., Continella, A., Gentile, A., Amenta, M., Fabroni, S., Rapisarda, P. 2013. Fruit quality and bioactive compounds relevant to human health of sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars grown in Italy. *Food Chemistry*. 140 (4). 630–638.
- Basanta, M., de Escalada Plá, M. F., Raffo, M. D., Stortza, C. A., Rojas, A. M. 2014. Cherry fibers isolated from harvest residues as valuable dietary fiber and functional food ingredients. *Journal of Food Engineering*. 126. 149–155.
- Bastos, C., Barros, L., Dueñas, M., Calheta, R. C., Queiroz, M. J. R. P., Santos-Buelga, C., Ferreira, I. C. F. R. 2015. Chemical characterisation and bioactive properties of *Prunus avium* L.: The widely studied fruits and the unexplored stems. *Food Chemistry*. 173. 1045–1053.
- Békefi, Z., Tobutt, K. R., Sonneveld, T. 2003. Determination of (in)compatibility genotypes of Hungarian sweet cherry (*Prunus avium* L.) accessions by PCR based methods. *International Journal of Horticultural Science*. 9. 37–42.
- Bošković, R., Russel, K., Tobutt, K. R. 1997. Inheritance of stelar ribonucleases in cherry progenies, and reassignment of incompatibility alleles to two incompatibility groups. 1997. *Euphytica*. 95. 221–228.
- Bošković, R., Tobutt, K. R. 1996. Correlation of stelar ribonuclease zymograms with incompatibility alleles in sweet cherry. *Euphytica*. 90. 245–250.
- Botstein, D., White, R. L., Skalnick, M. H., Davies, R. W. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. *The American Journal of Human Genetics*. 32. 314–331.

- Brandt, B., Granger, A. R., Witherspoon, J., Collins, G. G. 1999. Identification of pollen donors for the sweet cherry cultivars 'Stella' and 'Summit' by isozyme analysis. *Animal Production Science*. 39. 473-477.
- Broothaerts, W., Janssens, G. A., Proost, P., Broekaert, W. F. 1995. cDNA cloning and molecular analysis of two self-incompatibility alleles from apple. *Plant Molecular Biology*. 27. 499-511.
- Cachi, A. M., Wünsch, A. 2011. Characterization and mapping of non-S gametophyte self - compatibility in sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Journal of Experimental Botany*. 62. 1847-1856.
- Calabrese, F., Fenech, L., Raimondo, A. 1984. Kronio: una cultivar di ciliegio molto precoce e autocompatibile. *Frutticoltura*. 46 (5). 27-30.
- Crane, M. B., Lawrence, W. J. C. 1929. Genetical and cytological aspects of incompatibility and sterility in cultivated fruits. *Journal of Pomology and Horticultural Science*. 7. 276-301.
- De Cuyper, B., Sonneveld, T., Tobutt K. R. 2005. Determining self-incompatibility genotypes in Belgian wild cherries. *Molecular Ecology*. 14. 945-955.
- De Nettancourt, D. 2001. *Incompatibility and Incongruity in Wild and Cultivated Plants*. Springer. Berlin.
- Deshaies, R. J., 1999. SCF and cullin/RING H2-based ubiquitin ligases. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 15. 435-467.
- East, E. M., Mangelsdorf, A. J. 1925. A New Interpretation of the Hereditary Behavior of Self-Sterile Plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 11 (2). 166-171.
- Ercisli, S., Radunic, M., Gadze, J., Ipek, A., Skaljic, M., Cmelik, Z. 2012. S-RNase based S-genotyping of Croatian sweet cherry (*Prunus avium* L.) genotypes. *Scientia Horticulturae*. 139. 21-24.
- Folta, K. M., Gardiner, S. E. (Eds.) 2009. *Plant Genetics/Genomics*. Vol. 6. *Genetics and Genomics of Rosaceae*. Springer. New York, USA. 635 s. ISBN 978-0-387-77490-9.
- Gisbert, A. D., Badenes, M. L., Tobutt, K. R., Llacer, G., Romero, C. 2008. Determination of the S-allele composition of sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars grown in the southeast of Spain by PCR analysis. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*. 83. 246-252.
- Granger, A. R. 1997. Pollen gene flow in South Australian cherry (*Prunus avium* L.) orchards. *Australian Journal of Experimental Agriculture*. 37. 583-589.
- Granger, A. R. 2004. Gene flow in cherry orchards. *Theoretical and Applied Genetics*. 108. 497-500.

- Hegedűs, A., Lénárt, J., Halász, J. 2012. Sexual incompatibility in *Rosaceae* fruit tree species: molecular interactions and evolutionary dynamics. *Biologia Plantarum*. 56. 201–209.
- Hua, Z., Fields, A., Kao, T. H., 2008. Biochemical models for S-RNase-based selfincompatibility. *Molecular Plant*. 4. 575–585.
- Huang, S., Lee, H. S., Karunandaa, B., Kao, T. H. 1994. Ribonuclease activity of *Petunia inflata* S proteins is essential for rejection of self-pollen. *Plant Cell*. 6. 1021–1028.
- Hugard, J. 1978. Origine du pollen et varietes pollinisatrices. *Le Fruit Belge*. 381. 11–32.
- Chesnokov, Y. V., Artemyeva, A. M. 2015. Evaluation of the measure of polymorphism information of genetic diversity. *Agricultural Biology*. 50. 5. 571 – 578.
- Choi, C., Andersen, R. L. 2001. Variable fruit set in self-fertile sweet cherry. *Canadian Journal of Plant Science*. 81. 753–760
- Chrtek, J. 1992: *Amygdalaceae* D. Don. In: Hejný, S., Slavík, B. (eds.). *Květena České republiky* 3. Academia. Praha. 542 s. ISBN: 80-200-0256-1.
- Ikeda, K., Igic, B., Ushijima, K., Yamane, H., Hauck, N. R., Nakano, R., Sassa, H., Iezzoni, A. F., Kohn, J. R., Tao, R. 2004a. Primary structural features of the S haplotype specific F-box protein, SFB, in *Prunus*. *Sexual Plant Reproduction*. 16. 235–243.
- Ikeda, K., Watari, A., Ushijima, K., Yamane, H., Hauck, N. R., Iezzoni, A. F., Tao, R. 2004b. Molecular markers for the self-compatible S40-haplotype, a pollen-part mutation in sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 129. 724–728.
- Ipek, A., Gulen, H., Akcay, M. E., Ipek, M., Ergin, S., Eris, A. 2011. Determination of self-incompatibility groups of sweet cherry genotypes from Turkey. *Genetics and Molecular Research*. 10. 253–260.
- Ioerger, T. R., Gohlke, J. R., Xu, B., Kao, T. H. 1991. Primary structural features of the self-incompatibility protein in Solanaceae. *Sexual Plant Reproduction*. 4. 81–87.
- Kao, T. H., Tsukamoto, T. 2004. The molecular and genetic bases of S-RNase-based self-incompatibility. *Plant Cell*. 16 (Suppl.). 72–83.
- Kirschner, J. 2002: *Rosaceae* Juss., *Prunus* L. In: Kubát, K., Hroudá, L., Chrtek, J. jun., Kaplan, Z., Kirschner, J., Štěpánek, J. (eds.). *Klíč ke květeně České Republiky*. Academia, Praha. 928 s. ISBN: 80-200-0836-5.
- Koyama, Y., Kunz, C., Newbigin, E., Clarke, A. E., Anderson, M. A. 1994. Selfcompatibility in a *Lycopersicon peruvianum* variant (LA2157) is associated with a lack of style S-RNase activity. *Theoretical and Applied Genetics*. 88. 859–864.

- Lai, Z., Ma, W., Han, B., Liang, L., Zhang, Y., Hong, G., Xue, Y. 2002. An F-box gene linked to the self-incompatibility (S) locus of *Antirrhinum* is expressed specifically in pollen and tapetum. *Plant Molecular Biology*. 50. 29–42.
- Lapins, K. O. 1970. Stella – a self-fruitful sweet cherry. *Canadian Journal of Plant Science*. 51. 252-253.
- Lee, H. S., Huang, S., Kao, T. H. 1994. S proteins control rejection of incompatible pollen in *Petunia inflata*. *Nature*. 367. 560–563.
- Lewis, D., Crowe, L. K. 1954. Structure of the incompatibility gene. IV types of mutation in *Prunus avium* L. *Heredity*. 8. 357–363.
- Lisek, A., Rozpara, E., Głowacka, A., Kucharska, D., Zawadzka, M. 2015. Identification of S-genotypes of sweet cherry cultivars from Central and Eastern Europe. *Horticultural Science*. 42. 13–21.
- Luu, D. T., Qin, X., Morse, D., Cappadocia, M. 2000. S-RNase uptake by compatible pollen tubes in gametophytic self-incompatibility. *Nature*. 407. 649–651.
- Luu, D. T., Qin, X., Morse, D., Cappadocia, M. 2001. Rejection of S-heteroallelic pollen by a dual-specific S-RNase in *Solanum chacoense* predicts a multimeric SI pollen component. *Genetics*. 159. 329–335.
- Marchese, A., Bošković, R. I., Caruso, T., Raimondo, A., Cutuli, M., Tobutt, K. R. 2007. A new self-compatibility haplotype in the sweet cherry ‘Kronio’, S59, attributable to a pollen-part mutation in the SFB gene. *Journal of Experimental Botany*. 58 (15/16). 4347–4356.
- Matsumoto, D., Yamane, H., Tao, R. 2008. Characterization of SLFL1, a pollen expressed F-box gene located in the *Prunus* S locus. *Sexual Plant Reproduction*. 21. 113–121.
- McClure, B. A., Gray, J. E., Anderson, M. A., Clarke, A. E. 1990. Self-incompatibility in *Nicotiana glauca* involves degradation of pollen rRNA. *Nature*. 347. 757–760.
- McClure, B. A., Haring, V., Ebert, P. R., Anderson, M. A., Simpson, R. J., Sakiyama, F., Clarke, A. E. 1989a. Self-incompatibility in *Nicotiana glauca* involves degradation of pollen rRNA. *Nature*. 347. 757–760.
- McClure, B. A., Haring, V., Ebert, P. R., Anderson, M. A., Simpson, R. J., Sakiyama, F., Clarke, A. E. 1989b. Style self-incompatibility gene products of *Nicotiana glauca* are ribonucleases. *Nature*. 342. 955–957.
- McCubbin, A. G., Kao, T. H. 2000. Molecular recognition and response in pollen and pistil interactions. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 16. 333–364.
- Mullis, K. B. 1990. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American*. 262 (4). 56-61, 64-5.

- Murray, R. K., et al. Harperova biochemie. 2002. 2. vydání. H&H Jinočany. 872 s. ISBN 80-7319-013-3.
- Murfett, J., Atherton, T. L., Mou, B., Gasser, C. S., McClure, B. A. 1994. S-RNase expressed in transgenic *Nicotiana* causes S-allele-specific pollen rejection. *Nature*. 367. 563–566.
- Nei, M., Li, W. H. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 76. 5269-5273.
- Ortega, E., Bošković, R. I., Sargent, D. J., Tobutt, K. R. 2006. Analysis of S-RNase alleles of almond (*Prunus dulcis*): characterization of new sequences, resolution of synonyms and evidence of intragenic recombination. *Molecular Genetics and Genomics*. 276. 413–426.
- Průša, R. 1997. *Základy analytických metod v klinické molekulární biologii*. 2. lékařská fakulta UK a LAMBDA BIO-MED spol. s r.o. Praha. 48 s. ISBN: 80-238-0940-7.
- Radičević, S., Cerović, R., Nikolić, D., Đorđević, M. 2016. The effect of genotype and temperature on pollen tube growth and fertilization in sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Euphytica*. 209. 121–136.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. Plainview, N. Y. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sassa, H., Hirano, H., Ikehashi, H. 1992. Self-incompatibility-related RNases in styles of Japanese pear (*Pyrus serotina* Rehd.). *Plant Cell Physiology*. 33. 811–814.
- Sassa, H., Hirano, H., Ikehashi, H. 1993. Identification and characterization of stilar glycoproteins associated with self-incompatibility genes of Japanese pear, *Pyrus serotina* Rehd. *Molecular and General Genetics*. 241. 17–25.
- Sassa, H., Nishio, T., Kowiyama, Y., Hirano, H., Koba, T., Ikehashi, H. 1996. Self incompatibility (S) alleles of the *Rosaceae* encode members of a distinct class of the T2/S ribonuclease superfamily. *Molecular and General Genetics*. 250. 547–557.
- Schmitz-Eiberger, M. A., Blanke, M. M. 2012. Bioactive components in forced sweet cherry fruit (*Prunus avium* L.), antioxidative capacity and allergenic potential as dependent on cultivation under cover. *LWT - Food Science and Technology*. 46 (2). 388–392.
- Serra, A. T., Matias, A. A., Almeida, A. P. C., Bronze, M. R., Alves, P. M., de Sousa, H. C., Duarte, C. M. M. 2011. Processing cherries (*Prunus avium*) using supercritical fluid technology. Part 2. Evaluation of SCF extracts as promising natural chemotherapeutical agents. *The Journal of Supercritical Fluids*. 55 (3). 1007–1013.
- Sharma, K., Cachi, A. M., Sedlák, P., Skřivanová A., Wünsch A. 2016. S-genotyping of 25 sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars from the Czech Republic. *The Journal of Horticultural*

Sharma, K., Korecký, J., Soldateschi, E. D. P., Sedlák, P. 2017. S-Genotype Diversity in Wild Cherry Populations in the Czech Republic. *Scientia Agriculturae Bohemica*. 48 (1). 92–97.

Schuster, M. 2012. Incompatible (S-) genotypes of sweet cherry cultivars (*Prunus avium* L.). *Scientia Horticulturae*. 148. 59–73.

Schuster, M., Flachovsky, H., Köhler, D. 2007. Determination of self-incompatible genotypes in sweet cherry (*Prunus avium* L.) accessions and cultivars of the German Fruit Gene Bank and from private collections. *Plant Breeding*. 126. 533–540.

Sijacic, P., Wang, X., Skirpan, A. L., Wang, Y., Dowd, P. E., McCubbin, A. G., Huang, S., Kao, T. H. 2004. Identification of the pollen determinant of S-RNase-mediated self-incompatibility. *Nature*. 429. 302–305.

Sonneveld, T., Robbins, T. P., Bošković, R., Tobutt, K. R. 2001. Cloning of six cherry self-incompatibility alleles and development of allele-specific PCR detection. *Theoretical and Applied Genetics*. 102. 1046–1055.

Sonneveld, T., Tobutt, K. R., Robbins, T. P. 2003. Allele-specific PCR detection of sweet cherry self-incompatibility (S) alleles *S1* to *S16* using consensus and allele-specific primers. *Theoretical and Applied Genetics*. 107. 1059–1070.

Sonneveld, T., Tobutt, K. R., Vaughan, S. P., Robbins, T. P. 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. 37–51.

Szikriszt, B., Doğan, A., Ercisli, S., Akcay, M. E., Hegedús, 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. 155–165.

Tao, R., Iezzoni, A. F. 2010. The S-RNase-based gametophytic self-incompatibility system in *Prunus* exhibits distinct genetic and molecular features. *Scientia Horticulturae*. 124. 423–433.

Tao, R., Yamane, H., Sassa, H., Mori, H., Gradziel, T. M., Dandekar, A. M., Sugiura, A. 1997. Identification of stylar RNases associated with gametophytic self-incompatibility in almond (*Prunus dulcis*). *Plant Cell Physiology*. 38. 304–311.

Tao, R., Yamane, H., Sugiura, A., Murayama, H., Sassa, H., Mori, H. 1999. Molecular typing of S-alleles through identification, characterization and cDNA cloning for S-RNases in sweet cherry. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 124. 224–233.

- Thompson, R. D., Kirch, H. H. 1992. The S locus of flowering plants: when self rejection is self-interest. *Trends in Genetics*. 8. 381–387.
- Ushijima, K., Sassa, H., Dandekar, A. M., Gradziel, T. M., 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. 771–781.
- Ushijima, K., Sassa, H., Tao, R., Yamane, H., Dandekar, A. M., Gradziel, T. M., Hirano, H. 1998. Cloning and characterization of cDNAs encoding S-RNases from almond (*Prunus dulcis*): primary structural features and sequence diversity of the SRNases in *Rosaceae*. *Molecular and General Genetics*. 260. 261–268.
- Ushijima, K., Yamane, H., Watari, A., Takechi, E., Ikeda, K., Hauck, N. R., Iezzoni, A. F., Tao, R. 2004. The S haplotype-specific F-box protein gene, SFB, is defective in self-compatible haplotypes of *Prunus avium* and *P. mume*. *The Plant Journal*. 39. 573–586.
- Vaughan, S. P., Bošković, R., Gisbert-Climent, A., Russell, K., Tobutt, K. R. 2008. Characterisation of novel S-alleles from cherry (*Prunus avium* L.). *Tree Genetics and Genomes*. 4. 531–541.
- Vieira, J., Morales-Hojas, R., Santos, R. A. M., Vieira, C. P. 2007. Different positively selected sites at the gametophytic self-incompatibility pistil S-RNase gene in the *Solanaceae* and *Rosaceae* (*Prunus*, *Pyrus*, and *Malus*). *Journal of Molecular Evolution*. 65. 175–185.
- Vilanova, S., Badenes, M. L., Burgos, L., Martinez-Calvo, J., Llacer, G., Romero, C. 2006. Self-compatibility of two apricot selections is associated with two pollen-part mutations of different nature. *Plant Physiology*. 142. 629–641.
- Watkins, R. 1976. Cherry, plum, peach, apricot and almond. *In*: Simmonds, N. W. (ed.) *Evolution of Crop Plants*. Longman, London, pp 242–247.
- Wiersma, P. A., Wu, Z., Zhou, L., Hampton, C., Kappel, F. 2001. Identification of new self-incompatibility alleles in sweet cherry (*Prunus avium* L.) and clarification of incompatibility groups by PCR and sequencing analysis. *Theoretical and Applied Genetics*. 102. 700–708.
- Wu, J., Gu, C., Du, Y. H., Wu, H. Q., Liu, W. S., Liu, N., Lu, J., Zhang, S. L. 2011. Self-compatibility of 'Katy' apricot (*Prunus armeniaca* L.) is associated with pollen-part mutations. *Sexual Plant Reproduction*. 24. 23–35.
- Wünsch, A., Hormaza, J. I. 2004a. Genetic and molecular analysis in Cristobalina sweet cherry, a spontaneous self-compatible mutant. *Sexual Plant Reproduction*. 17. 203–210.
- Wünsch, A., Hormaza, J. I. 2004b. S-allele identification by PCR analysis in sweet cherry cultivars. *Plant Breeding*. 123. 327–331.

- Wünsch, A., Tao, R., Hormaza, J. I. 2010. Self-compatibility in 'Cristobalina' sweet cherry is not associated with duplications or modified transcription levels of S-locus genes. *Plant Cell Reproduction*. 29. 715–721.
- Xue, Y., Carpenter, R., Dickinson, H. G., Coen, E. S. 1996. Origin of allelic diversity in *Antirrhinum* S locus RNases. *Plant Cell*. 8. 805–814.
- Yamane, H., Tao, R. 2009. Molecular basis of self-(in)compatibility and current status of S-genotyping in *Rosaceous* fruit trees. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*. 78. 137–157.
- 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 and Cell Physiology*. 44. 764–769.
- Yigit, D., Baydas, E., Gülerüz, M. 2009. Elemental analysis of various cherry fruits by wavelength dispersive x-ray fluorescence spectrometry. *Asian Journal of Chemistry*. 21 (4). 2935-2942.
- Zisovich, A. H., Stern, R. A., Sapir, G., Shafir, S., Goldway, M. 2004. The RHV region of S-RNase in the European pear (*Pyrus communis*) is not required for the determination of specific pollen rejection. *Sexual Plant Reproduction*. 17. 151–156.
- Zhang, Y., Zhao, Z., Xue, Y. 2009. Roles of proteolysis in plant self-incompatibility. *Annual Review of Plant Biology*. 60. 21–42.
- Zuriaga, E., Molina, L., Badenes, M. L., Romero, C. 2012. Physical mapping of a pollen modifier locus controlling self-incompatibility in apricot and synteny analysis within the *Rosaceae*. *Plant Molecular Biology*. 79. 229–242.
- Zuriaga, E., Munoz-Sanz, J. V., Molina, L., Gisbert, A. D., Badenes, M. L., Romero, C. 2013. An S-locus independent pollen factor confers selfcompatibility in 'Katy' apricot. *Plos One*. 8 (1). e53947.

8 Internetové zdroje

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2016. [online] *FAO statistical database*. [cit. 2018-02-25]. Dostupné z <http://faostat.fao.org.infozdroje.czu.cz>

BioLib. 24. 3. 2016. [online] [cit. 2016-03-24]. Dostupné z <http://www.biolib.cz/cz/taxon/id39509/>

9 Seznam obrázků, tabulek a grafů

Obrázek 1: Třešňový strom v moderním produkčním sadu	11
Obrázek 2: Schéma oplození u různých mateřských a otcovských genotypů	12
Obrázek 3: Struktura genu S-RNase u <i>Solanaceae</i> a <i>Rosaceae</i> (<i>Prunus</i>).....	17
Obrázek 4: Model „gatekeeper“	18
Obrázek 5: Model inhibitor.....	18
Obrázek 6: Schéma neporušeného a mutovaného genu SFB u různých druhů rodu <i>Prunus</i> , u kterých byla zjištěna autokompatibilita. Šedé oblasti znázorňují chybějící části genu, u <i>P. avium</i> také kompletní delecí SFB ₃	21
Obrázek 7: Rodokmen odrůdy Stella a jejích vybraných potomků	28
Obrázek 8: Schematické znázornění rozmístění a vzdáleností stromů	30
Obrázek 9: Elektroforeogram – amplifikace genu S-RNase, vzorky S1 – S50, M1 – M8	35
Obrázek 10: Elektroforeogram – amplifikace genu S-RNase, vzorky Z, P, M, S, P23 – P33, opakovaná amplifikace vzorků M1 – M14, M17, S5, S22, S27, S31 S33, S38, S42, S45, S48, S49	35
Tabulka 1: Přehled některých světových a českých odrůd, jejich genotyp a zařazení do IG ...	26
Tabulka 2: Kultivary – univerzální opylovači a jejich genotypy	27
Tabulka 3: Autokompatibilní kultivary a jejich genotypy	27
Tabulka 4: Standardy alel.....	36
Tabulka 5: Výsledky kapilární elektroforézy pro testované stromy, vzorky S, M, P, Z	37
Tabulka 6: Výsledky kapilární elektroforézy potomstva stromu S	38
Tabulka 7: Výsledky kapilární elektroforézy potomstva stromu M.....	39
Tabulka 8: Výsledky kapilární elektroforézy potomstva stromu P	40
Tabulka 9: Pozorovaná četnost S alel v potomstvech	43
Tabulka 10: Očekávaná četnost S alel v potomstvech, χ^2 a p - value	43
Tabulka 11: Hodnoty H_O , H_E a PIC.....	44
Graf 1: Procentuální zastoupení genotypů v potomstvu stromu S	41
Graf 2: Procentuální zastoupení genotypů v potomstvu stromu M.....	41
Graf 3: Procentuální zastoupení genotypů v potomstvu stromu P	41
Graf 4: Procentuální zastoupení S alel v potomstvu stromu S	42
Graf 5: Procentuální zastoupení S alel v potomstvu stromu M.....	42
Graf 6: Procentuální zastoupení S alel v potomstvu stromu P	42