

UŽITNÝ VZOR

(11) Číslo dokumentu:

34 908

(13) Druh dokumentu: **U1**

(51) Int. Cl.:

C12Q 1/6895 (2018.01)

C12Q 1/6858 (2018.01)

C12N 15/11 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2021-38517**

(22) Přihlášeno: **04.02.2021**

(47) Zapsáno: **09.03.2021**

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

(72) Původce:
RNDr. Jana Čmejlová, Ph.D., Vitiněves, CZ
RNDr. Radek Čmejla, Ph.D., Vitiněves, CZ
Ing. František Paprštejn, CSc., Holovousy, CZ
Ing. Jitka Blažková, Holovousy, CZ

(54) Název užitého vzoru:
**Sada pramerů pro stanovení nové S-alely
identifikované u genotypu 'Těchlovická I'
třešně ptačí (Prunus avium L.)**

Sada primerů pro stanovení nové S-alely identifikované u genotypu 'Těchlovická I' třešně ptačí (*Prunus avium* L.)

5 Oblast techniky

Řešení se týká sady primerů navržených pro detekci nové S-alely identifikované u genotypu 'Těchlovická I' třešně ptačí (*Prunus avium* L.), kdy jsou tento genotyp a jeho potomci nesoucí dosud neznámou S-alelu univerzálními opylovači ostatních odrůd třešní.

10

Dosavadní stav techniky

15 Třešeň ptačí (*Prunus avium* L.) patří primárně mezi cizosprašné rostliny. Cizosprašnost je systém vyvinutý rostlinami za účelem zabránění samoopylení, aby byla zajištěna co nejvyšší výměna genů v rámci populace. U třešně je cizosprašnost zajištěna multialelickým S-lokusem (konkrétní alely se označují jako S-alely a odlišují se čísly), který v rámci nerekombinujícího haplobloku nese dva geny kódující proteiny zodpovědné za cizosprašnost, tj. gen pro S-RNázu zodpovědný za samičí (pestíkovou) část cizosprašnosti a gen pro S-haplotypově specifický F-box (SFB) zajišťující samčí (pylovou) část cizosprašnosti (Ushijima K, 2003, Yamane H, 2003). K úspěšnému opylení a oplození dojde, pokud je S-alela v genomu haploidního pylového zrna odlišná od obou S-alel diploidního pestíku, avšak přesný mechanismus, který brání samoopylení, není dosud znám (Tao R, 2010, Matsumoto D, 2016a, 2016b a 2019).

25 Cizosprašnost třešně má dalekosáhlé negativní důsledky pro jejich komerční pěstování. Již ve čtyřicátých letech minulého století bylo potvrzeno, že ne všechny odrůdy třešně je možné navzájem opylit (Crane MB, 1937). Pro úspěšné pěstování určité odrůdy proto byly vždy uváděny experimentálně zjištěné vhodné opylovací odrůdy, které je nezbytné do komerčních sadů vysadit, aby bylo dosaženo maximální možné produkce plodů. Obvyklý počet stromů opylovací odrůdy je 10 %, nebo je realizována 30 výsadba sadu s kombinacemi odrůd v jednotlivých řadách, tedy v poměru 1:1. Nejkritičtější požadavkem při výběru vhodné opylovací odrůdy je (kromě odlišnosti S-alel) shodnost doby plného rozkvetu, protože k úspěšnému opylení třešně dochází zpravidla během cca 4 až 5 dnů doby kvetení dané odrůdy (Stösser R, 1983). Období kvetení však u různých odrůd třešně, od nejranějších až po nejpozději kvetoucí, probíhá cca 1 měsíc (Vittrup ChJ, 1996), proto je časová shodnost kvetení obou odrůd zcela 35 zásadní. Pro následnou sklizeň pak může být problematické, pokud odrůdy společně vysazené v sadu dozrávají v odlišnou dobu, nebo se plody liší významně charakteristikami plodu a produkci není možné smíchat. Opylovací odrůda navíc nemusí mít plody tržní kvality, což by v důsledku snižovalo možný hektarový výnos. Proto je snahou pěstitelů a šlechtitelů vhodného opylovače pro komerční výsadby „synchronizovat“ s pěstovanou odrůdou nejen z hlediska stejné doby hlavního kvetení, ale i z hlediska 40 zrání a kvality plodů, aby byla zaručena maximální možná sklizeň, a to nejen z hlediska kvantity, ale také kvality.

Genotyp 'Těchlovická I' (také označován jako Ziklova) nese ve svém genomu novou S-alelu, která nebyla dosud popsána, jak bylo zjištěno díky analýze sekvence okolí prvního intronu S-RNázy, jak byla amplifikována původci užitého vzoru, pomocí algoritmu BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Vzhledem k zásadně se lišící sekvenci ji nelze identifikovat ani sadou primerů nárokovanou přihlašovatelem v uděleném užitém vzoru 34519 s názvem „Sada primerů pro stanovení S-alel a alel promotoru genu MGST u třešně ptačí (*Prunus avium* L.) v jediné reakci“, ani dříve popsanými univerzálními primery pro amplifikaci oblasti kolem prvního intronu S-RNázy (Sonneveld T, 2003, Sonneveld T, 2006). Z důvodu zcela nové S-alely je možné tento genotyp využít coby univerzálního opylovače všech odrůd třešně, u kterých byly dosud S-alely 50 identifikovány.

Stejně hodnotní coby univerzální opylovači však mohou být i potomci 'Těchlovické I' nesoucí tuto S-alelu, neboť přenosem této S-alely do dalších genotypů třešně je možné rozšířit dobu plného kvetení univerzálního opylovače na celé období kvetení třešně, a tím zajistit vhodné univerzální opylovače pro všechny dosud známé odrůdy. Stejně tak je u těchto potomků možné rozšířit dobu zrání na celé produkční období třešně. V neposlední řadě je možné získat odrůdu s kvalitnějšími plody pro komerční uplatnění, než má původní genotyp s touto S-alelou 'Těchlovická I'.

Pro jednoznačnou identifikaci potomků genotypu 'Těchlovická I' nesoucích ve svém genomu nově identifikovanou S-alelu tak existuje potřeba vyvinout molekulárně genetický systém pro rychlou a spolehlivou detekci této nové S-alely.

Podstata technického řešení

Výše uvedenou potřebu identifikace nově popsané S-alely řeší sada primerů pro stanovení nové S-alely identifikované u genotypu 'Těchlovická I' třešně ptačí (*Prunus avium* L.) polymerázovou řetězovou reakcí (PCR) s detekcí příslušného PCR produktu např. elektroforézou na gelu, nebo při použití fluorescenčně značeného primeru fragmentační analýzou na kapilárním genetickém analyzátoru. Tato sada obsahuje primery:

CTCTCTTTGGTCTTCTTCTTGTGC (SEQ ID NO. 1)
GCTTGCTGATTGTAAATAAAGTGC (SEQ ID NO. 2).

Prvním krokem pro detekci této S-alely třešně ptačí (*Prunus avium* L.) je izolace genomové DNA, následuje PCR s využitím navržené sady primerů pro specifickou amplifikaci výše uvedené S-alely a identifikace přítomnosti ampliconu. PCR amplifikaci je vhodné provést za současné amplifikace jakéhokoliv kontrolního genu s primery poskytujícími délkově odlišitelný produkt, aby byla potvrzena amplifikovatelnost DNA z jakékoliv odrůdy třešně ptačí v PCR reakci. Finálním krokem je vyhodnocení přítomnosti nově popsané S-alely z genotypu 'Těchlovická I'.

Příklady provedení technického řešení jsou zde uvedeny pouze pro ilustraci a žádným způsobem neomezují rozsah této přihlášky, který je vymezen připojeným nárokem a podrobně popsán v popisu technického řešení. Odborník v oboru bude schopen učinit různé modifikace použitého způsobu PCR, uvedených primerů a fluorescenčního označení primeru tak, aby nedošlo ke snížení specifity PCR detekce nově popsané S-alely z odrůdy 'Těchlovická I'. Odborník v oboru bude schopen využít jakýkoliv kontrolní gen pro důkaz amplifikovatelnosti použité DNA v PCR reakci.

Objasnění výkresů

Obr. 1: Sekvence amplifikovaného úseku nově popsané S-alely z odrůdy 'Těchlovická I' a místa nasedání primerů na ni. Šedivě označené sekvence reprezentují místa nasedání primerů s uvedením jejich SEQ ID NO. (SEQ ID NO. 2 je v reverzní orientaci).

Obr. 2: Elektroforéza PCR produktů amplifikovaných se specifickými primery pro S-alelu z genotypu 'Těchlovická I' (171 bp) a primery rozpoznávajícími promotor genu MGST, který byl u všech genotypů použit jako gen pro kontrolu amplifikovatelnosti DNA v reakci (145 bp). Vzorky jsou naneseny na agarózový gel v následujícím pořadí (v závorce jsou uvedeny jejich S-alely): negativní kontrola bez přidané DNA, 'Těchlovická I' (S4STěchl), 'Těchlovan' (S3S6), 'Halka' (S1S4'), 'HL 18187' (S2S3'), 'Uriase de Bystrita' (S5S12), 'Rita' (S5S22), 'Italia 2' (S13S14), '437 NDR' (S7S9).

Obr. 3: Fragmentační analýza PCR produktů amplifikovaných se specifickými primery pro S-alelu z genotypu 'Těchlovická I' (169 bp) a primery rozpoznávajícími promotor genu MGST, který byl

u všech genotypů použit jako gen pro kontrolu amplifikovatelnosti DNA v reakci (139 bp). Fragmentační analýza byla provedena na kapilárním genetickém analyzátoru AB3500, pro PCR byl v každém páru primerů použit jeden primer značený 6-FAM. Uvedeny jsou výstupy fragmentační analýzy u genotypů 'Těchlovická I' (S4STěchl), 'Těchlovan' (S3S6), 'Halka' (S1S4'), 'HL 18187' (S2S3'), 'Uriase de Bystrita' (S5S12), 'Rita' (S5S22) a 'Italia 2' (S13S14).

Příklady uskutečnění technického řešení

10 Příklad 1: Návrh sekvencí primerů

Pro detekci nově popsané S-alely z genotypu 'Těchlovická I' byly pomocí programu Vector NTI Advance navrženy primery pro PCR amplifikaci tak, aby amplifikované fragmenty měly vhodnou délku umožňující jejich jednoznačnou identifikaci jak na agarózovém gelu, tak fragmentační analýzou. Jejich specifita byla ověřena algoritmem Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) proti sekvencím pocházejícím z třešně ptačí (*Prunus avium* L.).

Byly vybrány následující primery:

20 CTCTCTTTGGTCTTCTTCTTGTGC (SEQ ID NO. 1) a
GCTTGCTGATTGTAATAAACTGC (SEQ ID NO. 2).

Navržené primery nerozpoznávají žádnou známou sekvenci S-RNázy z třešně ptačí (*Prunus avium* L.).

25 Příklad 2: Detekce nově popsané S-alely z genotypu 'Těchlovická I' třešně ptačí (*Prunus avium* L.) metodou elektroforézy v agarózovém gelu

Pro amplifikaci S-alel byla použita DNA izolovaná z lýka třešně ptačí (*Prunus avium* L.) soupravou Exgene Plant SV (GeneAll) podle návodu výrobce. Byly použity DNA z genotypu 'Těchlovická I' (S4STěchl) a kontrolních genotypů 'Těchlovan' (S3S6), 'Halka' (S1S4'), 'HL 18187' (S2S3'), 'Uriase de Bystrita' (S5S12), 'Rita' (S5S22), 'Italia 2' (S13S14) a '437 NDR' (S7S9) obsahujících jiné, a to velmi často se vyskytující S-alely. Připravená DNA byla použita jako templát pro PCR reakci s následujícími reakčními podmínkami: 2 µl DNA (10 ng/ml); 5 µl Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix (ThermoFisher Scientific), níže uvedené primery SEQ ID NO. 1 až SEQ ID NO. 4, každý ve výsledné koncentraci 500nM, PCR voda do celkového objemu 10 µl. Jako kontrola amplifikovatelnosti přidané DNA byly použity primery pro amplifikaci promotoru genu MGST (nenárokované SEQ ID NO. 3 a SEQ ID NO. 4). Negativní kontrola neobsahuje přidanou DNA.

40 PCR amplifikace probíhala v PCR cyklu C1000 (Biorad) s následujícím teplotním profilem: 98 °C/30 s; cyklování: 40x (98 °C/10 s, 60 °C/10 s, 72 °C/15 s); závěrečná extenze 72 °C/15 s. Po ukončení reakce byly vzniklé PCR amplikony analyzovány elektroforeticky na 3% agarózovém gelu, výsledky této analýzy jsou zachyceny na Obrázku 2.

45 Pro PCR detekci nově popsané S-alely z genotypu 'Těchlovická I' třešně ptačí se v reakci použily tyto primery:

CTCTCTTTGGTCTTCTTCTTGTGC (SEQ ID NO. 1) a
GCTTGCTGATTGTAATAAACTGC (SEQ ID NO. 2)

50 a tyto primery poskytly očekávaný fragment o délce 171 bp.

Pro PCR detekci kontrolního genu MGST se v reakci použily tyto primery:

55 AAAGCCTTCAAGTGGGAAAG (SEQ ID NO. 3) a

TTGCTTACAGGTCATTACTTACACG (SEQ ID NO. 4)

a tyto primery poskytly očekávaný fragment o délce 145 bp.

- 5 PCR fragment odpovídající S-RNáze z genotypu 'Těchlovická I' (171 bp) byl identifikován pouze u tohoto genotypu, u ostatních genotypů s jinými S-alelami nebyl pozorován. K amplifikaci kontrolního genu MGST (145 bp) však došlo ve všech reakcích, primery pro amplifikaci S-RNázy z 'Těchlovická I' jsou tedy zcela specifické pro tento genotyp.
- 10 PCR fragment získaný z genotypu 'Těchlovická I' odpovídající délkově S-RNáze byl vyříznut z gelu a vyzolován Expin™ Combo GP kitem podle doporučení výrobce (GeneAll Biotechnology). Izolovaný fragment byl dle návodu výrobce osekvenován kitem BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (ThermoFisher Scientific) za použití amplifikačních primerů a následně analyzován na
- 15 Sekvence byla ověřena metodou Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), kdy jako sekvence s nejvyšší identitou byla identifikována S22 S-RNáza ze slivoně skvělé (*Prunus speciosa*) pocházející z Japonska s procentem identity 77,2 % v rámci 96 % délky sekvence uvedené na Obrázku 1. Nejblížejším homologem z třešně ptačí (*Prunus avium* L.) byla S7 S-RNáza s homologií 88,2 %, avšak pouze v rámci 25 % délky sekvence uvedené na Obrázku 1. Získaná sekvence naopak plně odpovídala amplifikaci unikátní sekvence identifikované dříve na pracovišti přihlašovatele (Obr. 1).
- 20

Příklad 3: Detekce nově popsané S-alely z genotypu 'Těchlovická I' třešně ptačí (*Prunus avium* L.) fragmentační analýzou

- 25 Pro amplifikaci S-alel byla použita DNA izolovaná z lýka třešně ptačí (*Prunus avium* L.) soupravou Exgene Plant SV (GeneAll) podle návodu výrobce. Byly použity DNA z genotypu 'Těchlovická I' a kontrolních genotypů 'Těchlovan' (S3S6), 'Halka' (S1S4'), 'HL 18187' (S2S3'), 'Uriase de Bystrita' (S5S12), 'Rita' (S5S22), 'Italia 2' (S13S14) obsahujících S-alely uvedené v závorce. Připravená DNA byla použita jako templát pro PCR reakci s následujícími reakčními podmínkami: 1 µl DNA (10 ng/ml);
- 30 5 µl Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix (ThermoFisher Scientific), výše uvedené primery SEQ ID NO. 1 a 2, každý ve výsledné koncentraci 120nM, výše uvedené primery SEQ ID NO. 3 a SEQ ID NO. 4, každý ve výsledné koncentraci 90nM, PCR voda do celkového objemu 10 µl. Primery SEQ ID NO. 1 a SEQ ID NO. 3 byly fluorescenčně značeny na svém 5' konci fluoroforem 6-FAM.
- 35 PCR amplifikace probíhala v PCR cykleru C1000 (Biorad) s následujícím teplotním profilem: 98 °C/30 s; cyklování: 28x (98 °C/10 s, 60 °C/10 s, 72 °C/15 s); závěrečná extenze 72 °C/15 s.

- 40 1 µl PCR produktu byl smíchán s 15 µl Hi-Di™ formamidu a 0,5 µl velikostního standardu GeneScan™ 600 LIZ™ dye Size Standard v2.0 (obojí od ThermoFisher Scientific). Vzorby byly denaturovány při 95 °C 5 min a fragmentační analýza amplikonů byla provedena s využitím genetického analyzátoru AB3500 dle návodu výrobce (ThermoFisher Scientific). Detekce amplifikovaných fragmentů v daném vzorku byla provedena pomocí GeneMapper® Software 5 (ThermoFisher Scientific), výstup z fragmentační analýzy je uveden na obrázku 3.

- 45 Odborníkovi v oboru je známo, že velikost analyzovaných PCR fragmentů vyhodnocená při kapilární elektroforéze závisí kromě skutečné délky sekvence i na sekvenčních vlastnostech amplifikovaného fragmentu, použitím fluorescenčním značení, použitím přístroji a podmínkách elektroforézy (viz také www.thermofisher.com). Může se tedy lišit od délek uvedených v Příkladu 2 výše a v tomto konkrétním příkladu byla příslušná velikost fragmentů 169 nukleotidů pro nově popsanou S-alelu z genotypu
- 50 'Těchlovická I' a 139 nukleotidů pro kontrolní MGST fragment.

Průmyslová využitelnost

Nárokovaná sada primerů umožňuje stanovení nově popsané S-alely z genotypu 'Těchlovická I' třešně ptačí (*Prunus avium* L.). Vzhledem k tomu, že se jedná o nově identifikovanou S-alelu, budou tento genotyp a jeho potomci nesoucí tuto S-alelu použitelní coby univerzální opylovači všech odrůd třešní s dříve popsanými S-alelami. Vzhledem ke krátkému období kvetení jednotlivých odrůd oproti celkové době kvetení všech různých odrůd třešní lze původní genotyp 'Těchlovická I' použít k vytvoření nových hybridů nesoucích tuto S-alelu, kteří svou dobou kvetení pokryjí celé období kvetení třešní. Tak by byli zajištěni vhodní univerzální opylovači pro všechny dosud známé odrůdy. Stejně tak je u těchto potomků možné rozšířit dobu zrání na celé produkční období třešní, aby byla zjednodušena sklizeň odrůdově smíšených sadů třešní. V neposlední řadě je možné získat odrůdu s kvalitnějšími plody pro komerční uplatnění, než má původní genotyp s touto S-alelou 'Těchlovická I'.

Nárokovaná sada primerů je tedy průmyslově využitelná pro tak zvané molekulárními markery asistované šlechtění (MAS) se zaměřením na detekci nově popsané S-alely z genotypu 'Těchlovická I' třešně ptačí (*Prunus avium* L.). Umožňuje velkokapacitní testování produkovaných hybridů s možností vyselektovat perspektivní semenáče s touto novou S-alelou již po několika týdnech růstu, a to ve stádiu prvních listů. Bez molekulárních analýz je třeba veškeré potomstvo obsahující i nežádoucí genotypy s jinými S-alelami udržovat ve výsadbě po dobu cca 6 let, kdy je teprve možné provést opylovací zkoušky v sadu. Takto raná selekce šlechtitelského materiálu přináší nemalé finanční úspory díky tomu, že šetří práci, materiál i prostor nezbytné pro pěstování semenáčů třešní. Identifikování jedinci nesoucí nově popsanou S-alelu z genotypu 'Těchlovická I' budou využitelní jak ve šlechtitelské, tak pěstitelské praxi.

Seznam použité literatury

- Cmejlova J, Cmejla R, Suran P., Paprstejn F (2020) Sada primerů pro stanovení S-alel a alel promotoru genu MGST u třešně ptačí (*Prunus avium* L.) v jediné reakci – užitiný vzor 34519
- Crane MB, Brown AG (1937) Incompatibility and sterility in the sweet cherry, *Prunus avium* L. J. Pomol. Hort. Sci. 15: 86-116
- Matsumoto D, Tao R (2016a) Distinct Self-recognition in the *Prunus* S-RNase-based Gametophytic Self-incompatibility System. The Horticulture Journal 85(4): 289-305
- Matsumoto D, Tao R (2016b) Recognition of a wide-range of S-RNases by S locus F-box like 2, a general-inhibitor candidate in the *Prunus*-specific S-RNase-based self-incompatibility system. Plant Mol Biol 91: 459-469
- Matsumoto D, Tao R (2019) Recognition of S-RNases by an S locus F-box like protein and an S haplotype-specific F-box like protein in the *Prunus*-specific self-incompatibility system. Plant Mol Biol. 100: 367–378
- Sonneveld T, Tobutt KR, Robbins TP (2003) Allele-specific PCR detection of sweet cherry self-incompatibility (S) alleles S1 to S16 using consensus and allele-specific primers. Theor Appl Genet. 107(6): 1059-70
- Sonneveld T, Robbins TP, Tobutt KR (2006) Improved discrimination of self-incompatibility S-RNase alleles in cherry and high throughput genotyping by automated sizing of first intron polymerase chain reaction products. Plant Breeding 125(3): 305-307
- Stösser R, Anvari SF (1983) Pollen tube growth and fruit set as influenced by senescence of stigma, style and ovules. ACTAHORTIC. 139: 13-22

Tao R, Iezzoni AF (2010) The S-RNase-based gametophytic self-incompatibility system in *Prunus* exhibits distinct genetic and molecular features. *Sci. Hortic.* 124: 423–433

5 Ushijima K, Sassa H, Dandekar AM, Gradziel TM, Tao R, Hirano H (2003) Structural and Transcriptional Analysis of the Self-Incompatibility Locus of Almond: Identification of a Pollen-Expressed F-Box Gene with Haplotype-Specific Polymorphism. *Plant Cell* 15(3): 771-81

10 Vittrup ChJ (1996) Flowering period of 175 sweet cherry cultivars with regard to cross pollination possibilities. *ACTA HORTIC.* 423: 39-48

Yamane H, Ikeda K, Ushijima K, Sassa H, Tao R. (2003) A pollen-expressed gene for a novel protein with an F-box motif that is very tightly linked to a gene for S-RNase in two species of cherry, *Prunus cerasus* and *P. avium*. *Plant Cell Physiol.* 44(7): 764-9.

NÁROKY NA OCHRANU

- 5 1. Sada primerů pro stanovení S-alely u genotypu 'Těchlovická I' třešně ptačí *Prunus avium* L. metodou PCR **vyznačující se tím**, že obsahuje primery, jejichž sekvence jsou

CTCTCTTTGGTCTTCTTCTTGTGC SEQ ID NO. 1 a
GCTTGCTGATTGTAAATAAACTGC SEQ ID NO. 2.

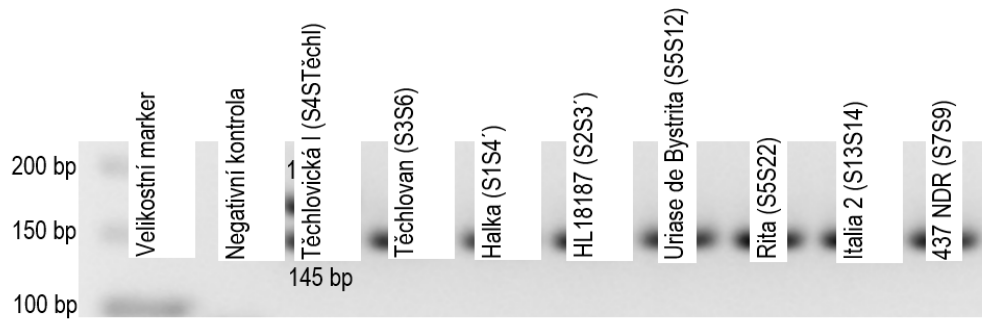
10

3 výkresy

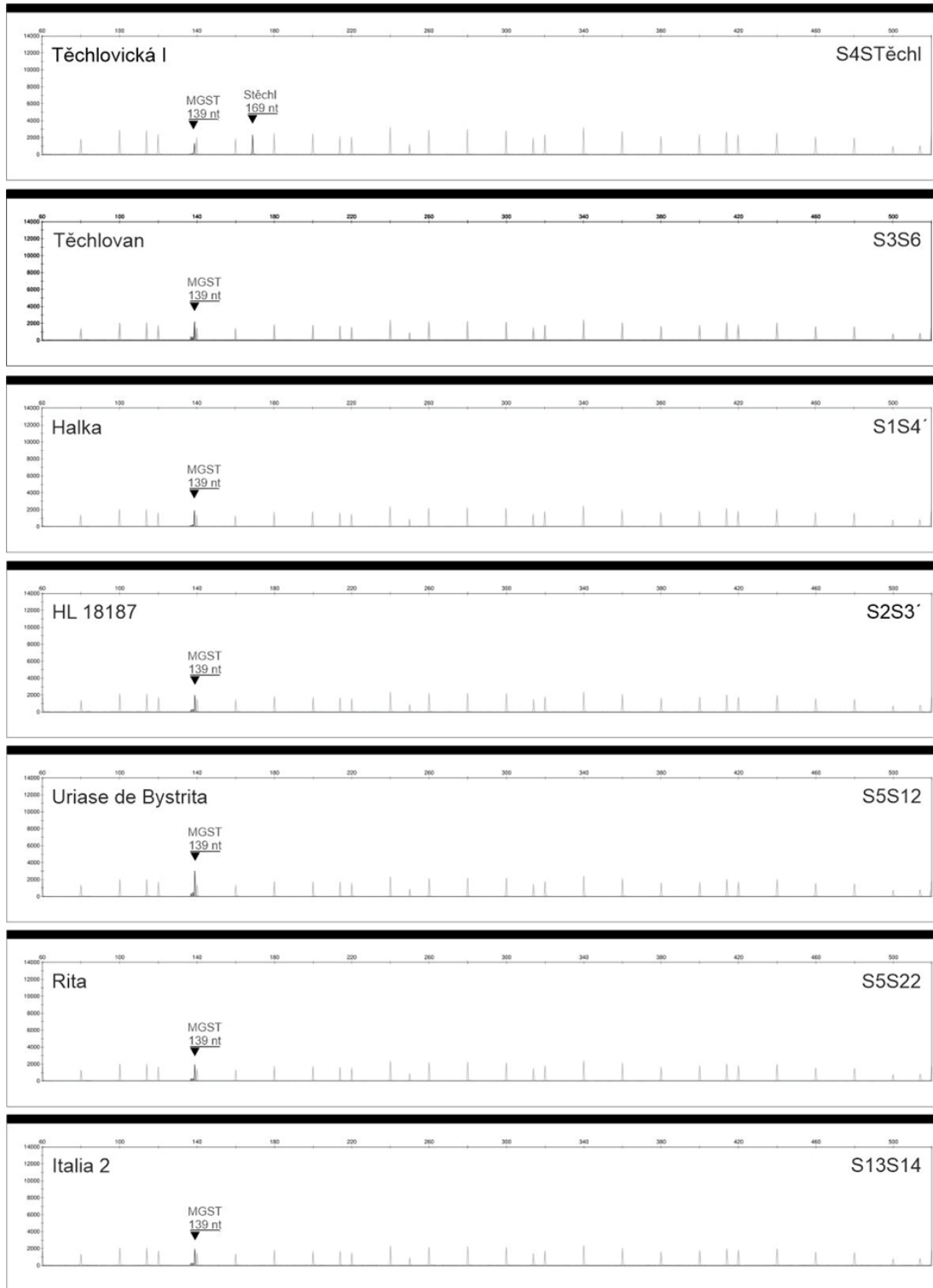
CZ 34908 U1

1 10 20 30 40 SEQ ID NO. 1
C T A A G T A T G G C G A T G T T G A A A T C G T C A C T C G C T T T C A A T A T T C T C T C
50 60 70 80 90
SEQ ID NO. 1
T T T G G T C T T C T T C T T G T G C T T C A T T A T G A G C G C T G G T G G G T A A A A T G
100 110 120 130 140
T G T G C T C T A T G G T A T A T T A A A T T T A G T T T A T T A T T G T T A A C G C A C G A
150 160 170 180
C T T T G T T T C T T T G G A T C A A G T A A C T A T T T G T A G T A G T T G A A A T A A A
190 200 210 220 230
SEQ ID NO. 2
T G C A G T T T A T T T A C A A T C A G C A A G C T A A A A T T A T G T T T T T T A C G C A G
240 250 260 270 280
G A T C T T A T C A A T A T T T T C A G T T T G T G C A A C A A T G G C C A G C A A C C A C C
290 300 310 320
T G C G C A G T T A G C A A A A A C C T T G T T A T C A A A T C C C G C C A T C A A A A T
331
C T

Obr. 1



Obr. 2



Obr. 3