

# UŽITNÝ VZOR

(11) Číslo dokumentu:

# 37 383

(13) Druh dokumentu: **U1**

(51) Int. Cl.:

*C12Q 1/68* (2018.01)  
*C12Q 1/6844* (2018.01)  
*C12Q 1/686* (2018.01)  
*C12Q 1/6876* (2018.01)

(19)  
ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2023-41225**  
(22) Přihlášeno: **16.08.2023**  
(47) Zapsáno: **18.10.2023**

(73) Majitel:  
VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV  
OVOCNÁŘSKÝ HOLOVOUSY s.r.o., Holovousy,  
CZ  
Ústav experimentální botaniky AV ČR, v. v. i.,  
Praha 6, Lysolaje, CZ

(72) Původce:  
Ing. Ivona Žďárská, Mžany, CZ  
RNDr. Jana Čmejlová, Ph.D., Vitiněves, CZ  
Ing. Jiří Sedlák, Ph.D., Nový Bydžov, CZ  
Ing. Pavol Suran, Makov, SK  
Mgr. Kateřina Holušová, Ph.D., Hlušovice, CZ  
Mgr. Jan Bartoš, Ph.D., Olomouc, Nové Sady, CZ

(74) Zástupce:  
Ing. Ivona Žďárská, Stračovská Lhota 35, 503 15  
Mžany

(54) Název užitého vzoru:  
**Sada prumerů pro stanovení alel markerů  
důležitých šlechtitelských znaků v jedné  
reakci metodou single-base extension u  
třešně ptačí *Prunus avium* L.**

CZ 37383 U1

## Sada primerů pro stanovení alel markerů důležitých šlechtitelských znaků v jedné reakci metodou single-base extension u třešně ptačí *Prunus avium* L.

### 5 Oblast techniky

Řešení se týká sady primerů vyvinutých pro detekci markerů důležitých šlechtitelských znaků u třešně ptačí (*Prunus avium* L.), kterými jsou barva plodu, doba zrání, hmotnost a pevnost plodu, kdy tato detekce probíhá v jedné reakci metodou extenze DNA fragmentu o jednu bázi (single-base extension, SBE). Tato sada umožňuje současnou detekci všech alel markerů typu 10 jednonukleotidového polymorfizmu (SNP), kdy jsou tyto markery ve vazbě s uvedenými znaky, a to konkrétně markeru G/T v oblasti genu *PavMyb10* a SNP markeru G/C v pozici chr3\_23939472 asociovaných s barvou plodu, SNP markeru A/G v pozici chr4\_16353619 ve vazbě s dobou zrání, SNP markeru A/G v pozici chr2\_29787028 predikujícího hmotnost plodu a SNP markeru A/T 15 v pozici chr4\_16000421 asociovaného s pevností plodu. Navržená sada primerů je vhodná pro molekulárními markery asistovanou selekci (MAS) třešně pro výše uvedené důležité šlechtitelské znaky.

### 20 Dosavadní stav techniky

Třešeň ptačí (*Prunus avium* L.) patří mezi velmi významné ovocné plodiny mírného klimatického pásu pěstované celosvětově. Patří do čeledi *Rosaceae*, je diploidní a oproti jiným druhům má 25 relativně malý genom tvořený přibližně 340 Mb ( $2n = 16$ ) (Shirasawa et al. 2017). Na světě existuje několik málo tisíc odrůd třešní a nové odrůdy jsou neustále šlechtěny a registrovány. Poptávka je po třešních, které vykazují vynikající vlastnosti v širokém rozmezí znaků preferovaných různými 30 prvky produkčního, zpracovatelského a prodejního řetězce, konzumenty nevyjímaje. Pro zlepšení odrůd třešní se šlechtitelské programy zaměřují především na prodloužení sklizňové sezóny a zvýšení velikosti, kvality a atraktivity plodů (Quero-García et al. 2019).

Šlechtění nových odrůd je u ovocných stromů velmi dlouhý proces, od opylení až po komerční dostupnost nové odrůdy uplyne obvykle více jak 20 let. Po vyklíčení semene následuje dlouhá 35 juvenilní doba (obvykle 5 až 6 let), než začnou tyto hybridní genotypy kvést a plodit. Po tuto dobu je třeba všechny tyto nově vytvořené genotypy udržovat ve výsadbě, což je finančně, časově i prostorově velmi náročné. Neméně pracné je i následné víceleté hodnocení fenologických a fenotypových vlastností, které předchází přihlášení vybraného genotypu k registraci coby nová odrůda. Protože tradiční šlechtění je drahé a časově náročné, každá strategie, která urychlí proces a zlepší jeho efektivitu, má vysoký potenciální ekonomický dopad (Chavoshi et al. 2014). Nejslibnější přístupy využívají techniky molekulární genetiky a identifikované molekulární 40 markery asociované s významnými fenologickými a fenotypovými znaky v procesu MAS. Odhaduje se, že MAS ušetřil ~80 000 USD ročně, když byla odstraněna více jak polovina neperspektivních jedinců z 3 000 až 3 500 semenáčů (Edge-Garza et al. 2014; Peace 2017). Přesto bylo do nedávné doby identifikováno a ve šlechtění využíváno pouze několik molekulárních markerů a kandidátních genů (Quero-García et al. 2022). Strategie pro vývoj nových markerů byly 45 omezeny primárně na tradiční mapování a analýzu lokusů kvantitativního znaku (QTL), kdy byly pro mapování využívány především tzv. SSR (simple sequence repeats) markery. V nedávné době pak byly vyvinuty čipy obsahující jednonukleotidové polymorfizmy nazývané SNP vybrané pro mapování QTL u třešní a višňi (Peace 2017; Vanderzande et al. 2020). I modernější varianta tohoto čipu s označením 6 + 9 K SNP array však obsahuje pouze 3 955 spolehlivých polymorfních SNP 50 pro třešně, což znamená průměrnou hustotu 1 SNP na 86 kbp třešňového genomu. Tyto SNP však nejsou v genomu rozmístěny rovnoměrně a každý chromozom tak obsahuje alespoň jednu oblast větší než 500 kb neobsahující žádných z analyzovaných SNP (Vanderzande et al. 2020). Problémem může být i fakt, že mnoho známých QTL bylo u třešní popsáno po analýze jedné nebo 55 několika málo biparentálních populací. Přelomovou je proto publikace Holušová et al. (2023), ve které byly pro identifikaci molekulárních markerů asociovaných s významnými vlastnostmi

využity celogenomové sekvence více jak 235 odrůd třešní. Díky tomu bylo rozlišení genetické mapy třešně sníženo až na průměrně 1 SNP na cca 200 bp. Použitím analýzy GWAS (genome-wide association study) byly nalezeny nové molekulární markery pro vlastnosti, jako jsou doba zrání, hmotnost, barva a pevnost plodů, které byly následně validovány na 64 dříve neanalyzovaných hybridech (Holušová et al. 2023).

Vzhledem ke krátké skladovatelnosti třešní hledají šlechtitelé způsob, jak prodloužit jejich sklizňové období, aby se zvýšila dostupnost třešní během roku. Ve šlechtění pro tento znak je možné využít molekulární markery. Hlavní QTL pro dobu zrání byly nedávno zamapovány do několika oblastí na chromozomu 4 (Dirlewanger et al. 2012; Quero-Garcia et al. 2014; Isuzugawa et al. 2019; Calle et al. 2020a) a jako kandidátní geny byly uvedeny transkripční faktory NAC nacházející se v této oblasti. Další QTL byly nalezeny na chromozomech 1, 2, 3 a 5. Holušová et al. (2023) identifikovali jako velmi významné pro predikci doby zrání dva SNP z chromozomu 4, chr4\_16353619 a chr4\_4523736. V jejich blízkosti se nacházejí dva geny s potenciálním vlivem na zrání plodů - diacylglycerolkináza 5, respektive aquaporin NIP1-1.

Hmotnost a velikost plodů jsou jedním s nejdůležitějších parametrů určujících zisky producentů. I proto byly molekulární markery pro tento významný šlechtitelský znak mezi prvními použitými v MAS u třešní. QTL asociované s velikostí plodů byly nalezeny na chromozomech 1, 2, 3, 5 a 6 (Zhang et al. 2010; Rosyara et al. 2013; Campoy et al. 2020; Calle et al. 2020b). Nejčastěji používanými jsou SSR markery CPSC038 a BPPCT034 z chromozomu 2, které byly identifikovány v pracích Zhang et al. (2010) a Rosyara et al. (2013). Oba SSR markery se nacházejí v blízkosti kandidátního genu pro velikost plodů PavCNR12, u něhož byly popsány tři varianty promotorové oblasti spojené s různou velikostí plodů (De Franceschi et al. 2013). V této práci byl jako diagnostický SSR marker analyzován G2SSR1566, nacházející se bezprostředně za tímto kandidátním genem. Holušová et al. (2023) identifikovali hned několik SNP velmi významně asociovaných s velikostí plodů na chromozomu 2 (ve stejné oblasti, jako jsou dříve využívané markery, např. chr2\_29776624 pro délku plodu, chr2\_31850964 pro šířku plodu, chr2\_29776725 pro tloušťku plodu a chr2\_29787028 pro hmotnost plodu).

Také je v současném šlechtění třešní používáno několik molekulárních markerů pro selekci semenáčů s určitou barvou plodů. Sooriyathirana et al. (2010) objevili hlavní QTL pro barvu slupky a dužniny třešní na chromozomu 3 s kandidátním genem PavMYB10, méně významné QTL pak na chromozomech 6 a 8. QTL na chromozomu 3 byl potvrzen v Calle et al. (2021). Pro analýzu barvy je ve šlechtění v USA používán SSR marker Pav-Rf-SSR (Sandefur et al. 2016), použitelnost tohoto markeru u mnohem heterogennějších evropských odrůd však byla vyvrácena v Čmejla et al. (2021). Kromě toho byl objeven polymorfismus v genu PavMYB10.1, kdy byla přirozeně se vyskytující alela asociována s červenou barvou plodů, alela s delecí jednoho adeninu vedoucí k předčasnému ukončení syntézy proteinového produktu tohoto genu byla asociována s pestrou barvou plodů a v případě delece tohoto genu byly plody žluté (Jin et al. 2016). Přirozeně se vyskytující alela pak měla být dominantní nad ostatními alelami, alela s delecí jednoho adeninu pak nad delecí celého genu. Tento jednoduchý model však byl později popsán jako ne zcela přesný, když byly nalezeny odrůdy s barvou plodů neodpovídající danému modelu (Čmejla et al. 2021; Liu et al. 2023). Celogenomovým sekvenováním byly identifikovány velmi silně asociované SNP v dříve identifikované oblasti na chromozomu 3, např. chr3\_23939472, navíc byla u žlutých třešní identifikována rozsáhlá delece této oblasti zahrnující hned 5 transkripčních faktorů Myb, které se mohou podílet na syntéze anthokyanů (Holušová et al. 2023). Liu et al. (2023) následně popsali u dalších žlutých odrůd tutéž deleci, kromě toho našli i relativně krátkou inzerci.

Pevnost plodů ovlivňuje odolnost třešní vůči otlakům, a tím i jejich skladovatelnost a trvanlivost. Proto i tento znak patří mezi šlechtitelsky velmi významné. QTL asociované s pevností plodů byly nalezeny na všech chromozomech, přičemž za nejsignifikantnější z nich se považují QTL na chromozomech 1, 4 a 6 (Quero-Garcia et al. 2014; Campoy et al. 2015; Cai et al. 2019; Calle et al. 2020a; Calle et al. 2020b). Kandidátní geny spadají často do kategorie enzymů ovlivňujících strukturu buněčné stěny, případně se podílejí na drahách signalizace hormonů podílejících se na

zrání plodů (Cai et al. 2019). Porovnáním celogenomových sekvencí odrůd s větší a menší pevností plodů byly identifikovány SNP na několika chromozomech, např. chr4\_16000421, chr1\_61827812 a chr8\_19215607, ty nejvíce signifikantní se nacházely na chromozomu 4, respektive 1 a spadají do dříve identifikovaných QTL (Holušová et al. 2023).

5

Popsané molekulární markery jsou analyzovány různými metodami, např. SSR markery pomocí fragmentační analýzy na kapilárním genetickém analyzátoru, SNP je možné osekvenovat, případně použít techniky, jako jsou alelická diskriminace metodou real-time PCR, KASP (Kompetitive Allele Specific PCR) či v některých případech CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences). V dosavadním stavu techniky však neexistuje způsob umožňující detekci markerů pro všechny výše uvedené, hospodářsky velmi významné znaky v jediné reakci.

10

#### Podstata technického řešení

15

Popsaný nedostatek, tedy chybějící rychlou a relativně levnou metodu využitelnou pro MAS třešní a proveditelnou v běžné molekulární laboratoři, díky které je možné analyzovat větší množství SNP markerů vybraných znaků ve velkém počtu vzorků, řeší sada primerů pro současnou detekci SNP markerů příslušných důležitých šlechtitelských znaků, konkrétně barvy plodu, doby zrání, hmotnosti a pevnosti plodu u třešně ptačí (*Prunus avium* L.), metodou SBE podle technického řešení, jehož podstata spočívá v tom, že obsahuje primery, jejichž sekvence jsou:

20

primery pro znak barva plodu:

25

indelMyb10.1-PCR-F – pestrá/červená alela:

GAATAATAATTAATCACAAAAGACTATGCAC (SEQ ID NO. 1),

indelMyb10.1-PCR-F – žlutá alela: GAGGCAAAGAAGAAGGAAGAG (SEQ ID NO. 2),

indelMyb10.1-PCR-R – CTGCCAAAGACAATAGAAGAGAG (SEQ ID NO. 3),

30

indelMyb10.1-SBE – pestrá/červená alela (v orientaci forward):CTGCAGGTTGGCACCATTAC (SEQ ID NO. 4),

indelMyb10.1-SBE – žlutá alela (v orientaci reverse): TTTTTTCCAGGAGGCAGTCCAGCA (SEQ ID NO. 5),

35

chr3\_23939472-PCR-F: CCTCCCATTGGGTTTTGCC (SEQ ID NO. 6),

chr3\_23939472-PCR-R: AAATTAGAGATAGGAAGAGGAACTG (SEQ ID NO. 7),

chr3\_23939472-SBE 1 (v orientaci reverse):

AAAAAAAAACAAATCATCATCCAAAACCTTGAGAGA (SEQ ID NO. 8),

chr3\_23939472-SBE 2 (v orientaci reverse):

AAAAAACCAAATTATCATCCAAAACCTTAGGAGA (SEQ ID NO. 9),

40

primery pro znak doba zrání:

chr4\_16353619-PCR-F: GATTGTCTTGTCGTTTAGGGTG (SEQ ID NO. 10),

chr4\_16353619-PCR-R: TTTGTTTTTGGCCGATAGGTTCC (SEQ ID NO. 11),

chr4\_16353619-SBE (v orientaci forward):

45

TTTTTTTTTTTATTTGAGATCACGATCACAGTTAAT (SEQ ID NO. 12),

primery pro znak hmotnost plodu:

chr2\_29787028-PCR-F: GCCTCTGTTGTCAAAGAATGAG (SEQ ID NO. 13),

chr2\_29787028-PCR-R: AAGCATATGGGTTTGGGATGC (SEQ ID NO. 14),

50

chr2\_29787028-SBE (v orientaci forward):

AAAAAAAAAAAAAAAAAAGCATTTGTATTGGGATCAAATATACA (SEQ ID NO. 15),

primery pro znak pevnost plodu:

chr4\_16000421-PCR-F: CCGCCATTTTTGAATTTTTGGGTC (SEQ ID NO. 16),

55

chr4\_16000421-PCR-R: TCAACTACGTGATTTGGTTTCGAA (SEQ ID NO. 17),

chr4\_16000421-SBE (v orientaci reverse):

CCCCCCCCTTGATGTTTTACATAGAATACATTGTGATTTAT (SEQ ID NO. 18).

5 Pro selekci třešní na tyto hospodářsky významné znaky byly vybrány nejkvalitnější SNP markery z práce Holušová et al. (2023), kterou publikovali předkladatelé této přihlášky. Uvedené fenologické a fenotypové hodnoty asociované s jednotlivými alelami dále popsaných znaků byly získány na 235 odrůdách udržovaných v genofondových sbírkách Výzkumného a šlechtitelského ústavu ovocnářského Holovousy s.r.o. (viz Holušová et al. 2023).

10 Primery navržené pro detekci markeru znaku barva plodu se nacházejí na chromozomu 3, pro určení barvy je třeba diagnostikovat současně dva různé polymorfizmy – in/del v oblasti genu *PavMyb10* a SNP chr3\_23939472 (číslování pozic jednotlivých markerů vychází z referenčního genomu Tieton v2.0 (Wang et al., 2020), viz Holušová et al. (2023). Fenotypově barva plodu odpovídá devítibodové klasifikační stupnici, kdy hodnocení 1 až 1,99 odpovídá žluté barvě plodu, 15 hodnocení 2 až 4,99 je charakteristické pro pestrou barvu a hodnocení 5 až 9 určuje červenou barvu plodu. Pro jednoznačné odlišení pestré/červené od žluté barvy plodů slouží marker nacházející se na chromozomu 3 v oblasti genu *PavMyb10*. V tomto případě se nejedná o bodovou mutaci, ale o mutaci v podobě současné inserce (567 bp) a delece o velikosti několika kb (Holušová et al 2023; Liu et al. 2023). Detekční primery jsou navržené v místě zlomu inserce/delece tak, aby byla možná 20 stejná detekce jako u markerů typu SNP. V případě tohoto markeru nukleotid G charakterizuje žlutou alelu a nukleotid T charakterizuje alelu pro pestrou či červenou barvu plodů, která je dominantní nad žlutou alelou. Homozygotní sestava alel G/G je určující výhradně pro žlutou barvu plodů, homozygotní sestava T/T a heterozygotní sestava G/T podmiňují červenou a pestrou barvu (viz Obr. 1 a Obr. 2). Druhý polymorfizmus se nachází v pozici chr3\_23939472 a pomocí výše 25 uvedených primerů je možné detekovat diagnostický SNP marker G/C (Holušová et al. 2023), který je se znakem ve vazbě, a na základě této jednobodové mutace lze odlišit pestrou barvu plodu od červených a žlutých třešní. Pro detekci tohoto SNP je třeba využít dva různé detekční primery chr3\_23939472-SBE z důvodu dalších polymorfizmů vyskytujících se v této oblasti. Homozygotní sestava alel G/G je určující pro pestrou barvu, ostatní alelické sestavy se vyskytují u třešní 30 s červenou a žlutou barvou plodů (viz Obr. 1 a Obr. 2).

Primery navržené pro detekci markeru znaku doba zrání se nacházejí na chromozomu 4. Pomocí 35 nárokovaných primerů je možné v pozici chr4\_16353619 detekovat diagnostický SNP marker A/G (Holušová et al. 2023), který je se znakem ve vazbě, a na základě této jednobodové mutace lze odlišit 35 časné a pozdně zrající třešně. Průměrná doba zrání odrůd s genotypem A/A byla 11,9 dní po odrůdě Kišinėvskaja (odrůda, která zpravidla zraje jako první z cca 300 odrůd udržovaných v genofondu Výzkumného a šlechtitelského ústavu ovocnářského Holovousy s.r.o.). Odrůdy s genotypem A/G zrají průměrně 18,4 dne po vybrané referenční odrůdě a odrůdy s genotypem G/G pak 29,4 dne po ní. Homozygotní sestava alel G/G je tedy určující pro pozdně zrající třešně, 40 homozygotní sestava A/A a heterozygotní sestava A/G jsou určující pro časné, respektive časněji zrající třešně (viz Obr. 1 a Obr. 2).

Primery navržené pro detekci markeru znaku hmotnost plodu se nacházejí na chromozomu 2. Pomocí 45 nárokovaných primerů je možné v pozici chr2\_29787028 detekovat diagnostický SNP marker A/G (Holušová et al. 2023), který je se znakem ve vazbě, a na základě této jednobodové mutace lze odlišit plody, u kterých je předpokládána vyšší hmotnost, a plody, u kterých je předpokládána nižší hmotnost. Průměrná hmotnost odrůd s genotypem G/G byla 4,4 g, odrůdy s genotypem A/G měly průměrnou hmotnost 5,7 g a odrůdy s genotypem A/A pak 6,9 g. Homozygotní sestava alel G/G je tedy určující pro plody s nízkou hmotností, homozygotní sestava 50 A/A a heterozygotní sestava A/G jsou určující pro plody s vysokou, respektive vyšší hmotností (viz Obr. 1 a Obr. 2).

Primery navržené pro detekci markeru znaku pevnost plodu se nacházejí na chromozomu 4. Pomocí 55 nárokovaných primerů je možné v pozici chr4\_16000421 detekovat diagnostický SNP marker A/T (Holušová et al. 2023), který je se znakem ve vazbě, a na základě této jednobodové

mutace lze odlišit plody s nižší pevností od plodů s vyšší pevností. Fenotypově byla pevnost plodu hodnocena na základě devítibodové klasifikační stupnice, kdy 1 odpovídá měkkým plodům, 5 znamená průměrnou pevnost a 9 odpovídá velmi pevným plodům. Průměrná pevnost odrůd s genotypem T/T byla 4,5, odrůdy s genotypem A/T měly průměrnou hmotnost 5,1 a odrůdy s genotypem A/A pak 6,9. Homozygotní sestava alel A/A je tedy určující pro plody třešní s vysokou pevností, homozygotní sestava T/T a heterozygotní sestava A/T jsou určující pro plody třešní s nízkou, respektive nižší pevností (viz Obr. 1 a Obr. 2).

Nárokovaná kombinace primerů je vhodná pro současnou analýzu výše uvedených alelických kombinací jednotlivých markerů příslušných šlechtitelských znaků, jako jsou barva plodu, doba zrání, hmotnost a pevnost plodu u třešně ptačí. Ve výhodném provedení technického řešení jsou PCR amplikony všech příslušných alel detekovány pomocí specifických SBE primerů, které mají vždy pro konkrétní marker odlišnou délku, aby je bylo možné identifikovat pomocí SBE analýzy.

Prvním krokem pro stanovení alel markerů příslušných důležitých šlechtitelských znaků třešní (barva plodu, doba zrání, hmotnost a pevnost plodu) je izolace genomové DNA, následuje nejprve PCR s využitím PCR primerů pro amplifikaci konkrétních fragmentů, které obsahují analyzované SNP markery příslušných důležitých šlechtitelských znaků, a poté je provedena SBE reakce s využitím detekčních SBE primerů. PCR amplifikace všech pěti úseků i detekční SBE reakce probíhají vždy pro všechny markery najednou v jedné reakci. Vzhledem k přítomnosti pouze fluorescenčně značených ddNTP v detekční SBE reakci dochází k prodloužení každého detekčního primeru o jediný nukleotid – primery jsou navrženy tak, aby přidaným nukleotidem byl detekovaný SNP. Pomocí této metody je získána směs různě dlouhých fragmentů ukončených různými fluorescenčně značenými ddNTP, která je následně analyzována pomocí kapilárního genetického analyzátoru.

Příklady provedení technického řešení jsou zde uvedeny pouze pro ilustraci a žádným způsobem neomezuji rozsah této přihlášky, která je vymezena připojeným nárokem a podrobně popsána v popisu technického řešení. Odborník v oboru bude schopen učinit různé modifikace použitého způsobu PCR, uvedených primerů, včetně způsobu zvýšení či snížení jejich teploty tání modifikací chemické struktury a délky, aniž by došlo ke snížení specificity detekce jednotlivých alel markerů příslušných důležitých šlechtitelských znaků třešní (barva plodu, doba zrání, hmotnost a pevnost plodu). Také je možné změnit délku a typ nekomplementární extenze SBE primerů, aniž by došlo k odklonu od této přihlášky.

### Objasnění výkresů

Obr. 1: A) Sekvence amplifikované oblasti (SEQ ID NO. 19), která obsahuje SNP marker nacházející se v oblasti genu *PavMyb10* asociovaný s in/del lokusem pro barvu a místa nasedání PCR primerů a SBE primerů. Vyznačené sekvence reprezentují místa nasedání jednotlivých primerů s uvedením jejich SEQ ID NO. (SEQ ID NO. 3 je v reverzní orientaci). Vyznačený SNP marker zastoupený tyminem (T) reprezentuje pestrou a červenou alelu. B) Sekvence amplifikované oblasti (SEQ ID NO. 20), která obsahuje SNP marker nacházející se v oblasti genu *PavMyb10* asociovaný s in/del lokusem pro barvu a místa nasedání PCR primerů a SBE primerů. Vyznačené sekvence reprezentují místa nasedání jednotlivých primerů s uvedením jejich SEQ ID NO. (SEQ ID NO. 3 a SEQ ID NO. 5 jsou v reverzní orientaci). Vyznačený SNP marker zastoupený guaninem (G) reprezentuje žlutou alelu. C) Sekvence amplifikované oblasti (SEQ ID NO. 21), která obsahuje SNP marker G/C v pozici chr3\_23939472 asociovaný s barvou třešní a místa nasedání PCR primerů a SBE primerů. Vyznačené sekvence reprezentují místa nasedání jednotlivých primerů s uvedením jejich SEQ ID NO. (SEQ ID NO. 7 a SEQ ID NO. 8 jsou v reverzní orientaci). Vyznačený SNP marker reprezentuje v sekvenci písmeno S, které podle názvosloví IUPAC zastupuje nukleotidy G a C. D) Alternativní sekvence amplifikované oblasti (SEQ ID NO. 22), která obsahuje SNP marker G/C v pozici chr3\_23939472 asociovaný s barvou a místa nasedání PCR primerů a SBE primerů. Vyznačené sekvence reprezentují místa nasedání

jednotlivých primerů s uvedením jejich SEQ ID NO. (SEQ ID NO. 7 a SEQ ID NO. 9 jsou v reverzní orientaci). Vyznačený SNP marker reprezentuje v sekvenci písmeno S, které podle názvosloví IUPAC zastupuje nukleotidy G a C. E) Sekvence amplifikované oblasti (SEQ ID NO. 23), která obsahuje SNP marker A/G v pozici chr4\_16353619 asociovaný se znakem doba zrání a místa nasedání PCR primerů a SBE primerů. Vyznačené sekvence reprezentují místa nasedání jednotlivých primerů s uvedením jejich SEQ ID NO. (SEQ ID NO. 11 je v reverzní orientaci). Vyznačený SNP marker reprezentuje v sekvenci písmeno R, které podle názvosloví IUPAC zastupuje nukleotidy A a G. F) Sekvence amplifikované oblasti (SEQ ID NO. 24), která obsahuje SNP marker A/G v pozici chr2\_29787028 asociovaný se znakem hmotnost plodu a místa nasedání PCR primerů a SBE primerů. Vyznačené sekvence reprezentují místa nasedání jednotlivých primerů s uvedením jejich SEQ ID NO. (SEQ ID NO. 14 je v reverzní orientaci). Vyznačený SNP marker reprezentuje v sekvenci písmeno R, které podle názvosloví IUPAC zastupuje nukleotidy A a G. G) Sekvence amplifikované oblasti (SEQ ID NO. 25), která obsahuje SNP marker A/T v pozici chr4\_16000421 asociovaný se znakem pevnost plodu a místa nasedání PCR primerů a SBE primerů. Vyznačené sekvence reprezentují místa nasedání jednotlivých primerů s uvedením jejich SEQ ID NO. (SEQ ID NO. 17 a SEQ ID NO. 18 jsou v reverzní orientaci). Vyznačený SNP marker reprezentuje v sekvenci písmeno W, které podle názvosloví IUPAC zastupuje nukleotidy A a T.

Obr. 2: Příklady vyhodnocené SBE analýzy. Barevné rámečky vymezují oblasti pro jednotlivé alely SNP markerů důležitých šlechtitelských znaků u třešně ptačí. Primery použité pro analýzu markerů u znaků barva plodu v pozici SNP chr3\_23939472, žlutá alela v pozici *PavMyb10* (in/del marker) a rovněž pevnost plodu byly v reverzní orientaci, avšak vyhodnocení příslušných nukleotidů je u všech znaků ve forwardové orientaci, aby byly výsledky jednotné s publikovanou literaturou. A) Jedinec s heterozygotní sestavou ve všech SNP markerech s genotypem G/T pro marker znaku barva třešně v pozici *PavMyb10* a C/G pro marker znaku barva třešně v pozici chr3\_23939472, tato kombinace určuje červenou barvu plodů u třešně, genotyp A/G pro marker znaku doba zrání v pozici chr4\_16353619 je určující pro časněji zrající třešně, genotyp A/G pro marker znaku hmotnost plodu v pozici chr2\_29787028 je určující pro plody s vyšší hmotností, genotyp A/T pro marker znaku pevnost plodu v pozici chr4\_16000421 je určující pro plody s nižší pevností; B) Jedinec s homozygotní sestavou ve všech SNP markerech s genotypem T/T pro marker znaku barva třešně v pozici *PavMyb10* a C/C pro marker znaku barva třešně v pozici chr3\_23939472, což je určující pro červenou barvu plodu, genotyp G/G pro marker znaku doba zrání v pozici chr4\_16353619 je určující pro pozdně zrající třešně, genotyp G/G pro marker znaku hmotnost plodu v pozici chr2\_29787028 je určující pro plody s nízkou hmotností, genotyp A/A pro marker znaku pevnost plodu v pozici chr4\_16000421 je určující pro plody s vysokou pevností; C) Jedinec s homozygotní sestavou ve všech SNP markerech s genotypem T/T pro marker znaku barva třešně v pozici *PavMyb10* a G/G pro marker znaku barva třešně v pozici chr3\_23939472, což je určující pro pestrou barvu plodu u třešně, genotyp A/A pro marker znaku doba zrání v pozici chr4\_16353619 je určující pro časně zrající třešně, genotyp A/A pro marker znaku hmotnost plodu v pozici chr2\_29787028 je určující pro plody s vysokou hmotností, genotyp T/T pro marker znaku pevnost plodu v pozici chr4\_16000421 je určující pro plody s nízkou pevností; D) Jedinec s genotypem G/G pro marker znaku barva třešně v pozici *PavMyb10* a C/C pro marker znaku barva třešně v pozici chr3\_23939472, což je určující pro žlutou barvu plodu u třešně, případně marker znaku barva třešně v pozici chr3\_23939472 u žlutých třešní může zcela chybět (obrázek E), genotyp G/G pro marker znaku doba zrání v pozici chr4\_16353619 je určující pro pozdně zrající třešně, genotyp A/G pro marker znaku hmotnost plodu v pozici chr2\_29787028 je určující pro plody s vyšší hmotností, genotyp A/A pro marker znaku pevnost plodu v pozici chr4\_16000421 je určující pro plody s vysokou pevností.

50

Příklady uskutečnění technického řešení

## Příklad 1: Návrh sekvencí primerů

5 Na základě známých sekvencí oblastí s místy výskytu diagnostických SNP pro detekci markerů důležitých šlechtitelských znaků u třešně ptačí (*Prunus avium* L.), konkrétně barvy plodu, doby zrání, hmotnosti a pevnosti plodu, které byly získány pomocí celogenomového sekvenování (Holušová et al. 2023), byly prostřednictvím softwaru Geneious Prime (Biomatters Ltd.) navrženy sekvence jednotlivých primerů. Nejprve byla provedena analýza sekvencí získaných celogenomovým sekvenováním cca 300 různých genotypů třešní z důvodu identifikace dalších možných polymorfismů v této oblasti, které by mohly interferovat s vlastní PCR či detekcí SNP. Pro návrh primerů nacházejících se v oblasti genu *PavMyb10* byly využity sekvence publikované Shirasawa et al. (2017) pro pestrou/červenou alelu a sekvence publikované Liu et al. (2023) pro žlutou alelu. Forward PCR primer pro detekci tohoto markeru byl vždy specifický pro příslušnou alelu, reverse PCR primer byl koncipován jako společný pro obě alely. Pro navržení PCR i SBE primerů byly vybrány co nejkonzervovanější úseky, aby bylo minimalizováno potenciální snížení účinnosti celého systému. Specifické primery pro metodu SBE vždy obsahují na svém 3' konci sekvenci, která končí těsně před diagnostickým SNP markerem, a na druhé straně primeru může být připojena nekomplementární extenze tvořená sledem určitých nukleotidů. Díky této extenzi je možné primer prodloužit na požadovanou délku tak, aby bylo možné jednotlivé fragmenty pro různé SNP rozlišit na základě délky jako při fragmentační analýze.

Pro analýzu znaku barva plodu byly vybrány dva lokusy. Detekční SBE primery pro lokus v oblasti genu *PavMyb10* byly navrženy v místě zlomu inserce/delece. Byly navrženy dva SBE primery, pro žlutou a pro pestrou/červenou alelu zvlášť. Pro žlutou alelu byly navrženy primery s výslednou délkou 24 nukleotidů a pro červenou alelu byly navrženy primery s výslednou délkou 20 nukleotidů, přičemž primer pro červenou alelu neobsahoval extenzi a v případě primeru pro žlutou alelu představovala extenze sled šesti tyminů (T<sub>6</sub>). Pro detekci SNP markeru v pozici chr3\_23939472 asociovaného s druhým lokusem pro barvu byly navrženy dva SBE primery, a to z toho důvodu, že v této oblasti je více jednonukleotidových polymorfismů a bylo potřeba obsáhnout všechny alely. Tyto primery byly navrženy na výslednou délku 33 a 34 nukleotidů včetně nekomplementární extenze, přičemž v případě primeru s délkou 33 nukleotidů představovala extenze sled šesti adeninů (A<sub>6</sub>) a v případě primeru s délkou 34 nukleotidů představovala extenze sled osmi adeninů (A<sub>8</sub>). SBE primer pro detekci SNP markeru v pozici chr4\_16353619 pro znak doba zrání byl navržen s výslednou délkou 35 nukleotidů, přičemž nekomplementární extenze představovala sled šesti tyminů (T<sub>6</sub>). SBE primer pro detekční SNP marker v pozici chr2\_29787028 pro znak hmotnost plodu byl navržen na výslednou délku 43 nukleotidů, přičemž nekomplementární extenze představovala sled patnácti adeninů (A<sub>15</sub>) a SBE primer pro detekční SNP marker v pozici chr4\_16000421 pro znak pevnost plodu byl navržen na výslednou délku 41 nukleotidů, přičemž nekomplementární extenze představovala sled osmi cytosinů (C<sub>8</sub>). Délky extenzí bylo třeba stanovit experimentálně a byly vyvinuty pro analýzu v POP7 polymeru na kapilárním genetickém analyzátoru ABI PRISM 3500 (obojí Thermo Fisher Scientific). Použitá délka SBE primerů zcela nekoresponduje s velikostí detekovaného fragmentu, jak bylo předem očekáváno podle návodu výrobce kitu pro SBE (Thermo Fisher Scientific), a to zejména u kratších délek primerů. Příslušnost jednotlivých vrcholů k danému markeru byla ověřena v reakcích obsahujících primery pro pouze jediný marker. Při použití jiného polymeru je třeba patřičně upravit délku extenzí, aby byly jednotlivé markery od sebe odlišitelné a jasně identifikovatelné.

50 Pro identifikaci obou alel diagnostického in/del markeru v oblasti genu *PavMyb10* pro detekci znaku barva plodu byly navrženy následující primery:

indelMyb10.1-PCR-F – pestrá/červená alela:

GAATAATAATTAATCACAAAAGACTATGCAC (SEQ ID NO. 1),

55 indelMyb10.1-PCR-F – žlutá alela: GAGGCAAAGAAGAAGGAAGAG (SEQ ID NO. 2),



indelMyb10.1-PCR-R – CTGCCAAAGACAATAGAAGAGAG (SEQ ID NO. 3),  
indelMyb10.1-SBE – pestrá/červená alela (v orientaci forward):  
CTGCAGGTTGGCACCATTAC (SEQ ID NO. 4),  
indelMyb10.1-SBE – žlutá alela (v orientaci reverse): TTTTTTCCAGGAGGCAGTCCAGCA  
5 (SEQ ID NO. 5).

Pro identifikaci obou alel diagnostického SNP markeru v pozici chr3\_23939472 pro detekci znaku barva plodu byly navrhnuty následující primery:

10 chr3\_23939472-PCR-F: CCTCCCATTGGGTTTTGCC (SEQ ID NO. 6),  
chr3\_23939472-PCR-R: AAATTAGAGATAGGAAGAGGAACTG (SEQ ID NO. 7),  
chr3\_23939472-SBE 1 (v orientaci reverse):  
AAAAAAAAACAAATCATCATCCAAAACCTTGAGAGA (SEQ ID NO. 8),  
chr3\_23939472-SBE 2 (v orientaci reverse):  
15 AAAAAACCAAATTATCATCCAAAACCTTAGGAGA (SEQ ID NO. 9).

Pro identifikaci obou alel diagnostického SNP markeru v pozici chr4\_16353619 pro detekci znaku doba zrání byly navrhnuty následující primery:

20 chr4\_16353619-PCR-F: GATTGTCTTGTCGTTTAGGGTG (SEQ ID NO. 10),  
chr4\_16353619-PCR-R: TTTGTTTTTGCCGATAGGTTCC (SEQ ID NO. 11),  
chr4\_16353619-SBE (v orientaci forward):  
TTTTTTTTTTATTTGAGATCACGATCACAGTTAAT (SEQ ID NO. 12).

25 Pro identifikaci obou alel diagnostického SNP markeru v pozici chr2\_29787028 pro detekci znaku hmotnost plodu byly navrhnuty následující primery:

chr2\_29787028-PCR-F: GCCTCTGTTGTCAAAGAATGAG (SEQ ID NO. 13),  
chr2\_29787028-PCR-R: AAGCATATGGGTTTGGGATGC (SEQ ID NO. 14),  
chr2\_29787028-SBE (v orientaci forward):  
30 AAAAAAAAAAAAAAAAAAGCATTGTATTGGGATCAAATATACA (SEQ ID NO. 15).

Pro identifikaci obou alel diagnostického SNP markeru v pozici chr4\_16000421 pro detekci znaku pevnost plodu byly navrhnuty následující primery:

35 chr4\_16000421-PCR-F: CCGCCATTTTTGAATTTTTGGGTC (SEQ ID NO. 16),  
chr4\_16000421-PCR-R: TCAACTACGTGTATTTGGTTTCGAA (SEQ ID NO. 17),  
chr4\_16000421-SBE (v orientaci reverse):  
CCCCCCCCTTGATGTTTTACATAGAATACATTGTGATTTAT (SEQ ID NO. 18).

Nasedání jednotlivých primerů na příslušné sekvence je uvedeno na Obr. 1.

40

Příklad 2: Detekce alel SNP markerů důležitých šlechtitelských znaků u třešně ptačí (*Prunus avium* L.) metodou SBE:

Nejdříve byla z lýka různých genotypů třešně ptačí (*Prunus avium* L.) izolována celková DNA pomocí soupravy Exgene Plant SV mini (GeneAll Biotechnology) dle návodu výrobce. DNA byla před amplifikací genomových úseků s požadovanými SNP naředěna na koncentraci 10 ng/μl. Takto připravená DNA (1 μl) byla použita jako templát pro PCR reakci s následujícími reakčními složkami (uvedeny výsledné koncentrace primerů): 10 μl qPCR 2× Blue Master Mix (Top-Bio); 1 μl premix primerů: 350nM indelMyb10.1-PCR-F – pestrá/červená alela (SEQ ID NO. 1), 150nM indelMyb10.1-PCR-F – žlutá alela (SEQ ID NO. 2), 250nM indelMyb10.1-PCR-R (SEQ ID NO. 3), 350nM chr3\_23939472-PCR-F (SEQ ID NO. 6), 350nM chr3\_23939472-PCR-R (SEQ ID NO. 7), 150nM chr4\_16353619-PCR-F (SEQ ID NO. 10), 150nM chr4\_16353619-PCR-R (SEQ ID NO. 11), 200nM chr2\_29787028-PCR-F (SEQ ID NO. 13), 200nM chr2\_29787028-PCR-R (SEQ ID NO. 14), 250nM chr4\_16000421-PCR-F (SEQ ID NO. 16), 250nM chr4\_16000421-PCR-R (SEQ ID NO. 17); reakce byla doplněna do 20 μl vodou. Amplifikace fragmentů probíhala  
55

v cyklieru C1000 (Biorad) s nastaveným teplotním profilem: úvodní denaturace 94 °C/5 minut; amplifikace ve 40 cyklech: 94 °C/30 s, 58 °C/30 s, 72 °C/30 s; závěrečná extenze 72 °C/5 minut.

Amplifikované fragmenty byly purifikovány pomocí HT ExoSAP-IT™ High-Throughput PCR Product Cleanup (Thermo Fisher Scientific) tak, že k 5 µl PCR produktu byly přidány 2 µl ExoSAP-IT™. Takto připravená směs byla 20 minut inkubována v termocyklieru C1000 při 37 °C a poté 20 minut při 80 °C (inaktivace enzymů). Purifikované amplifikované fragmenty (1 µl) byly poté použity jako templát pro SBE reakci s následujícími reakčními složkami (uvedeny výsledné koncentrace primerů): 5 µl SnapShot Multiplex Ready Reaction Mix (Thermo Fisher Scientific); 1 µl premix primerů: 600nM indelMyb10.1-SBE – pestrá/červená alela (SEQ ID NO. 4), 300nM indelMyb10.1-SBE – žlutá alela (SEQ ID NO. 5), 500nM chr3\_23939472-SBE 1 (SEQ ID NO. 8), 500nM chr3\_23939472-SBE 2 (SEQ ID NO. 9), 400nM chr4\_16353619-SBE (SEQ ID NO. 12), 150nM chr2\_29787028-SBE (SEQ ID NO. 15), 250nM chr4\_16000421-SBE (SEQ ID NO. 18); reakce byla doplněna do 10 µl vodou. Reakce probíhala v termocyklieru C1000 s nastaveným teplotním profilem: amplifikace v 4 cyklech: 96 °C/10 s, 50 °C/5 s, 60 °C/30 s. Po dokončení reakce byly opět amplifikované fragmenty purifikovány, kdy byl do každé zkumavky, ve které bylo 10 µl produktu z detekční SBE reakce, přidán 1 µl enzymu SAP (Thermo Fisher Scientific). Takto připravená směs byla v termocyklieru inkubována 1 hodinu při 37 °C a poté 15 minut při 75 °C. Následně byly vzorky připraveny pro analýzu pomocí genetického analyzátoru tak, že byl nejdříve připraven mix 9 µl Hi-Di formamidu a 0,2 µl velikostního standardu GeneScan 120 LIZ dye (obojí Thermo Fisher Scientific) a k němu byl přidán vždy 1 µl analyzovaného vzorku. Připravené vzorky byly před samotnou analýzou denaturovány 5 minut při 95 °C v termocyklieru C1000. SBE analýza byla prováděna na genetickém analyzátoru ABI PRISM 3500 dle doporučení výrobce (Thermo Fisher Scientific).

Výsledek SBE analýzy byl vyhodnocen pomocí softwaru GeneMapper v5.0 (Thermo Fisher Scientific). Výstupem je elektroforeogram obsahující vrcholy v barvě konkrétního nukleotidu v místě SNP a zároveň jsou tyto vrcholy rozděleny na základě délky (Obr. 2). Elektroforeogramy jednotlivých odrůd byly vyhodnoceny podle následujícího klíče. V případě markeru indelMyb10.1 nukleotid G charakterizuje žlutou alelu a nukleotid T charakterizuje pestrou či červenou alelu, která je dominantní. Homozygotní sestava alel G/G je určující výhradně pro žlutou barvu plodů, homozygotní sestava T/T a heterozygotní sestava G/T podmiňují červenou a pestrou barvu. V případě markeru chr3\_23939472 predikuje homozygotní sestava alel G/G pestrou barvu, alelické sestavy G/C a C/C se vyskytují u třešní s červenou a žlutou barvou plodů, případně může tento marker u třešní se žlutými plody chybět. U markeru chr4\_16353619 jsou homozygotní sestava alel A/A a heterozygotní sestava A/G určující pro časně, respektive časněji zrající třešně, kdy odrůdy s genotypem A/A zrají v průměru 11,9 dní po referenční odrůdě Kišinevskaja a odrůdy s genotypem A/G průměrně 18,4 dne po ní. Homozygotní sestava alel G/G je určující pro pozdně zrající třešně, kdy odrůdy s tímto genotypem zrají v průměru 29,4 dne po vybrané referenční odrůdě. V případě markeru chr2\_29787028 homozygotní sestava alel A/A a heterozygotní sestava A/G predikují u třešní plody s vysokou, respektive vyšší hmotností, kdy odrůdy s genotypem A/A mají průměrnou hmotnost plodu 6,9 g a odrůdy s genotypem A/G průměrně 5,7 g. Homozygotní sestava alel G/G je určující pro plody s nízkou hmotností, kdy odrůdy s tímto genotypem měly průměrnou hmotnost plodu 4,4 g. V případě markeru chr4\_16000421 homozygotní sestava alel T/T a heterozygotní sestava A/T jsou charakteristické pro plody třešní s nízkou, respektive nižší pevností, kdy odrůdy s genotypem T/T mají pevnost plodu průměrně 4,5 a odrůdy s genotypem A/T průměrně 5,1 na devítibodové škále hodnocení. Homozygotní sestava alel A/A je určující pro plody s vysokou pevností, kdy odrůdy s tímto genotypem měly pevnost plodu průměrně 6,9.

#### Průmyslová využitelnost

Nárokovanou sadu primerů pro detekci markerů důležitých šlechtitelských znaků u třešně ptačí (*Prunus avium* L.), konkrétně barvy plodu, doby zrání, hmotnosti a pevnosti plodu, je možné použít pro molekulárními markery asistovanou selekci třešní křížených pro tyto šlechtitelské znaky, a to

již ve stádiu několikátýdenních semenáčů. Bez použití molekulárních markerů by bylo možné tyto významné hospodářské znaky hodnotit až po nástupu semenáčů do plodnosti, tj. po 5 až 6 letech. Takto raná selekce tedy zefektivňuje šlechtitelský proces a přináší nemalé finanční úspory díky tomu, že šetří práci, materiál i prostory nezbytné pro pěstování semenáčů vzniklých z těchto křížení. Metoda SBE umožňuje velmi rychlou analýzu několika SNP markerů důležitých znaků najednou, a to u velkého počtu vzorků. Zároveň tato sada umožňuje detekci obou alel výše uvedených SNP markerů, a tím identifikaci a odlišení homozygotů a heterozygotů, což je výhodné pro proces dalšího křížení. Současná analýza všech 5 SNP markerů v jediné reakci přináší další úspory jak finanční, tak časové díky tomu, že není nutné provádět analýzu pro každý znak zvlášť.

#### Seznam sekvencí

– sekvence primerů a jednotlivých amplifikovaných oblastí jsou shodné se sekvencemi současně podaného elektronického souboru dle standardu WIPO ST.26 připojeného k této přihlášce

<SEQ ID NO. 1: indelMyb10.1-PCR-F\_blush/red allele; DNA; *Prunus avium* L.; genomic DNA>  
GAATAATAATTAATCACAAAAGACTATGCAC

<SEQ ID NO. 2: indelMyb10.1-PCR-F\_yellow allele; DNA; *Prunus avium* L.; genomic DNA>  
GAGGCAAAGAAGAAGGAAGAG

<SEQ ID NO. 3: indelMyb10.1-PCR-R; DNA; *Prunus avium* L.; genomic DNA>  
CTGCCAAAGACAATAGAAGAGAG

<SEQ ID NO. 4: indelMyb10.1-SBE\_blush/red allele; DNA; *Prunus avium* L.; other DNA>  
CTGCAGGTTGGCACCATTAC

<SEQ ID NO. 5: indelMyb10.1-SBE\_yellow allele; DNA; *Prunus avium* L.; other DNA>  
TTTTTCCAGGAGGCAGTCCAGCA

<SEQ ID NO. 6: chr3\_23939472-PCR-F; DNA; *Prunus avium* L.; genomic DNA>  
CCTCCATTGGGTTTTGCC

<SEQ ID NO. 7: chr3\_23939472-PCR-R; DNA; *Prunus avium* L.; genomic DNA>  
AAATTAGAGATAGGAAGAGGAACTG

<SEQ ID NO. 8: chr3\_23939472-SBE 1; DNA; *Prunus avium* L.; other DNA>  
AAAAAAACAAATCATCATCCAAAACCTTGAGAGA

<SEQ ID NO. 9: chr3\_23939472-SBE 2; DNA; *Prunus avium* L.; other DNA>  
AAAAAACCAAATTATCATCCAAAACCTTAGGAGA

<SEQ ID NO. 10: chr4\_16353619-PCR-F; DNA; *Prunus avium* L.; genomic DNA>  
GATTGTCTTGTCGTTTAGGGTG

<SEQ ID NO. 11: chr4\_16353619-PCR-R; DNA; *Prunus avium* L.; genomic DNA>  
TTTGTTTTTGCCGATAGGTTCC

<SEQ ID NO. 12: chr4\_16353619-SBE; DNA; *Prunus avium* L.; other DNA>  
TTTTTTTTTATTTGAGATCACGATCACAGTTAAT

<SEQ ID NO. 13: chr2\_29787028-PCR-F; DNA; *Prunus avium* L.; genomic DNA>  
GCCTCTGTTGTCAAAGAATGAG

- <SEQ ID NO. 14: chr2\_29787028-PCR-R; DNA; *Prunus avium* L.; genomic DNA>  
AAGCATATGGGTTTGGGATGC
- 5 <SEQ ID NO. 15: chr2\_29787028-SBE; DNA; *Prunus avium* L.; other DNA>  
AAAAAAAAAAAAAAAAAGCATTTGTATTGGGATCAAAATATACA
- <SEQ ID NO. 16: chr4\_16000421-PCR-F; DNA; *Prunus avium* L.; genomic DNA>  
CCGCCATTTTTGAATTTTTGGGTC
- 10 <SEQ ID NO. 17: chr4\_16000421-PCR-R; DNA; *Prunus avium* L.; genomic DNA>  
TCAACTACGTGTATTTGGTTTCGAA
- <SEQ ID NO. 18: chr4\_16000421-SBE; DNA; *Prunus avium* L.; other DNA>  
15 CCCCCCCTTGATGTTTTACATAGAATACATTGTGATTTAT
- <SEQ ID NO. 19: amplified region contains marker indelMyb10.1 blush/red allele; DNA; *Prunus avium* L.; genomic DNA>
- 20 GAATAATAATTAATCACAAAAGACTATGCACTCTTCCTCAACTGCTTTGTCCTATTGT  
TCTTGGATTTTTTTAGTTAGTTTGATTGAAACCAATCTAGTTTTTCAACTAGACTATT  
GATATCCTTTGATATTAACACAGATAATTTTCATTTAGACACTTGAGTTAATAACTGAG  
TCTTTTTCTGCAGTTGGCACCATTACTTTTATTCCTTGGCAGGCCTCCTGGTCTTCA  
25 TGCTTTTCTTCTGGCAGCGACTCTCAATGCAATAATCATCTCTCTTCTATTGTCTTTG  
GCAG
- <SEQ ID NO. 20: amplified region contains marker indelMyb10.1 yellow allele; DNA; *Prunus avium* L.; genomic DNA>
- 30 GAGGCAAAGAAGAAGGAAGAGTTGAAGGAGAAGTTTGATGGACTCTGCAAGGTTGT  
GAAGGATGTTTTGGGTGACAGAGTGGAGAAGGTTGTGGTGTCTGACCGTCTGACCGT  
GCTGGACTGCCTCCTGGTCTTCATGCTTTTCTTCTGGCAGCGACTCTCAATGCAATA  
ATCATCTCTTCTATTGTCTTTGGCAG
- 35 <SEQ ID NO. 21: amplified region contains marker chr3\_23939472 and primer chr3\_23939472-  
SBE 1; DNA; *Prunus avium* L.; genomic DNA>
- 40 CCTCCCATTGGGTTTTGCCTTTCCCTCTTCTTGACCTAAGTCCCGAGCACCAAAGAGC  
TCCCTAGAATCTTGACTAGAAAGTCTCATATTTTATTACCAATAACAATTGGGACAA  
AAAATAAASTCTCTCAAGTTTTGGATGATGATTTGGTTGATAAAAATTTAACAGTTCC  
TCTCCTATCTCTAATTT
- <SEQ ID NO. 22: amplified region contains marker chr3\_23939472 and primer chr3\_23939472-  
SBE 2; DNA; *Prunus avium* L.; genomic DNA>
- 45 CCTCCCATTGGGTTTTGCCTTTCTTCTTCTTGACCTAATTCCTAAGCACCAAAGAGCT  
CCCTTGAATCTTGACCAGAAAGTCTTAGATTTCACTACTAATAACAATTGGGACAAA  
AAATAAASTCTCCTAAGTTTTGGATGATAATTTGGTTGATAACATTTAACAGTTCT  
50 CTTCTATCTCTAATTT
- <SEQ ID NO. 23: amplified region contains marker chr4\_16353619; DNA; *Prunus avium* L.;  
genomic DNA>
- 55 GATTGTCTTGTCGTTTAGGGTGATTTAATATATAAAAAGACTAGATTATGAAAGACATATT  
TTCTACTATTTGTTTTATTTGAGATCACGATCACAGTTAATRATACCCACACATGTTT

TTTGGTATATGTCACGTCAACTTGTGGAGTATACCTGCATAGGAACCTATCGGCCAA  
AAACAAA

5 <SEQ ID NO. 24: amplified region contains marker chr2\_29787028; DNA; *Prunus avium* L.;  
genomic DNA>

GCCTCTGTTGTCAAAGAATGAGTCAACAATGTGTACGAAACTTAAGAAAAAATKCC  
TAATATTGCCAACCTGGAATCATGTATTTTAGTTGGAGTGAAGCATGAGCAAAGCAT  
GTTTCTAYGAGAGTAACATCTCAGCATTTGTATTGGGATCAAATATACARAAGCTT  
10 GTCTGGTTGCATCCCAAACCCATATGCTT

<SEQ ID NO. 25: amplified region contains marker chr4\_16000421; DNA; *Prunus avium* L.;  
genomic DNA>

15 CCGCCATTTTTGAATTTTTGGGTCAAGAAACAAACATTACAAAGAAAATTCTCGAGG  
AATATTTACACCAWATAAATCACAATGTATTCTATGAAAACATCAATTGGAAAATT  
TCGAAACCAAATACACGTAGTTGA

Seznam použité literatury

20

Cai L, Quero-García J, Barreneche T et al. (2019). A fruit firmness QTL identified on linkage  
group 4 in sweet cherry (*Prunus avium* L.) is associated with domesticated and bred  
germplasm. *Sci Rep.* 9:5008.

25

Calle A, Wunsch A. (2020a). Multiple-population QTL mapping of maturity and fruit-quality traits  
reveals LG4 region as a breeding target in sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Hortic Res.* 7: 1–  
13.

30

Calle A, Balas F, Cai L et al. (2020b). Fruit size and firmness QTL alleles of breeding interest  
identified in a sweet cherry ‘Ambrunés’ × ‘sweetheart’ population. *Mol Breed.* 40:86.

Calle A, Serradilla MJ, Wünsch A. (2021). QTL mapping of phenolic compounds and fruit colour  
in sweet cherry using a 6+9K SNP array genetic map. *Sci Hortic.* 280: 109900.

35

Campoy JA, Le Dantec L, Barreneche T et al. (2015). New insights into fruit firmness and weight  
control in sweet cherry. *Plant Mol Biol Report.* 33:783–96.

40

Cmejla R, Zdarska I, Suran P et al. (2021). A new allelic discrimination real-time PCR assay for  
PavMYB10.1 genotyping to predict sweet cherry fruit colour: a comparison with the Pav-Rf-  
SSR assay. *J Hortic Sci Biotechnol.* 96: 260–269.

45

De Franceschi P, Stegmeir T, Cabrera A et al. (2013). Cell number regulator genes in *Prunus*  
provide candidate genes for the control of fruit size in sweet and sour cherry. *Mol Breed.*  
32(2): 311-326.

50

Dirlewanger E, Quero-García J, Le Dantec L et al. (2012). Comparison of the genetic determinism  
of two key phenological traits, flowering and maturity dates, in three *Prunus* species: peach,  
apricot and sweet cherry. *Hered.* 109: 280–292.

50

Edge-Garza DA, Rowland T, Sandefur P et al. (2014). Routine marker-assisted seedling selection  
focused on fruit quality improves breeding efficiency in three tree fruit programs. Program  
and Abstracts of 7th International Rosaceae Genomics Conference; 24–26 June; Seattle, USA,  
p 116.

- Holušová K, Čmejlová J, Suran P et al. (2023). High-resolution genome-wide association study of a large Czech collection of sweet cherry (*Prunus avium* L.) on fruit maturity and quality traits. *Hortic Res.* 10(1): uhac233.
- 5 Isuzugawa K, Shirasawa K, Kurosaka S et al. (2019). QTL analysis and candidate gene SNP for harvest day in sweet cherry (*Prunus avium* L.). In: Beppu K, Bessho H, Haji T et al., eds. VIII International Cherry Symposium. Vol. 1235. Int Soc Horticultural Science: Leuven 1, Belgium, 33–40.
- 10 Jin W, Wang H, Li M et al. (2016). The R2R3 MYB transcription factor PavMYB10.1 involves in anthocyanin biosynthesis and determines fruit skin colour in sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Plant Biotechnol J.* 14: 2120–2133.
- 15 Liu C, Qi X, Song L et al. (2023). Large-fragment deletion encompasses the R2R3 MYB transcription factor, PavMYB10.1, causes yellow fruits in sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Sci Hortic.* 309: 111648.
- Peace C. (2017). DNA-informed breeding of rosaceous crops: promises, progress and prospects. *Hortic Res.* 4: 17006.
- 20 Quero Garcia, J (2019). Cherry breeding in the world: current analysis and future perspectives. *Italus Hortus.* 26(1): 9–20 .
- 25 Quero-García J, Branchereau C, Barreneche T, Dirlewanger E (2022). DNA-informed breeding in sweet cherry: current advances and perspectives. *Italus Hortus.* 29: 14–37.
- 30 Quero-Garcia J, Fodor A, Reignier A et al. (2014). QTL detection of important agronomic traits for sweet cherry breeding. In: Ayala M, Zoffoli JP, Lang GA, eds. VI International Cherry Symposium. Vol. 1020. Int Soc Horticultural Science: Leuven 1, Belgium, 57–64.
- Rosyara UR, Bink MCAM, Weg E et al. (2013). Fruit size QTL identification and the prediction of parental QTL genotypes and breeding values in multiple pedigreed populations of sweet cherry. *Mol Breed.* 32: 875–887.
- 35 Sandefur P, Oraguzie N, Peace C. (2016). A DNA test for routine prediction in breeding of sweet cherry fruit color, Pav-R-f-SSR. *Mol Breed.* 36: 33.
- 40 Shirasawa K, Isuzugawa K, Ikenaga M et al. (2017). The genome sequence of sweet cherry (*Prunus avium*) for use in genomics-assisted breeding. *DNA Res.* 24(5): 499–508.
- Sooriyapathirana SS, Khan A, Sebolt AM et al. (2010). QTL analysis and candidate gene mapping for skin and flesh colour in sweet cherry fruit (*Prunus avium* L.). *Tree Genet Genomes* 6: 821–32.
- 45 Vanderzande S, Zheng P, Cai L et al. (2020). The cherry 6+9K SNP array: a cost-effective improvement to the cherry 6K SNP array for genetic studies. *Sci Rep.* 10: 7613.
- Wang J, Liu W, Zhu D et al.. (2020). Chromosome-scale genome assembly of sweet cherry (*Prunus avium* L.) cv. Tieton obtained using long-read and hi-C sequencing. *Hortic Res.* 7: 1–11.

## NÁROKY NA OCHRANU

1. Sada primerů pro současnou detekci alel SNP markerů šlechtitelských znaků u třešně  
ptačí, *Prunus avium* L., kterými jsou barva plodu, doba zrání, hmotnost a pevnost plodu, metodou  
5 SBE, **vyznačující se tím**, že obsahuje následující primery:

indelMyb10.1-PCR-F – pestrá/červená

alela: GAATAATAATTAATCACAAAAGACTATGCAC (SEQ ID NO. 1),

indelMyb10.1-PCR-F – žlutá alela: GAGGCAAAGAAGAAGGAAGAG (SEQ ID NO. 2),

indelMyb10.1-PCR-R – CTGCCAAAGACAATAGAAGAGAG (SEQ ID NO. 3),

10 indelMyb10.1-SBE – pestrá/červená alela (v orientaci

forward): CTGCAGGTTGGCACCATTAC (SEQ ID NO. 4),

indelMyb10.1-SBE – žlutá alela (v orientaci reverse): TTTTTTCCAGGAGGCAGTCCAGCA  
(SEQ ID NO. 5)

15 pro identifikaci obou alel diagnostického SNP markeru v oblasti genu *PavMyb10* pro detekci  
znaku barva plodu,

chr3\_23939472-PCR-F: CCTCCCATTGGGTTTTGCC (SEQ ID NO. 6),

chr3\_23939472-PCR-R: AAATTAGAGATAGGAAGAGGAACTG (SEQ ID NO. 7),

chr3\_23939472-SBE 1 (v orientaci

reverse): AAAAAAACAATCATCATCCAAAACCTTGAGAGA (SEQ ID NO. 8),

20 chr3\_23939472-SBE 2 (v orientaci

reverse): AAAAAACCAAATTATCATCCAAAACCTTAGGAGA (SEQ ID NO. 9)

pro identifikaci obou alel diagnostického SNP markeru v pozici chr3\_23939472 dle referenčního  
genomu Tieton v2.0 pro detekci znaku barva plodu,

chr4\_16353619-PCR-F: GATTGTCTTGTCGTTTAGGGTG (SEQ ID NO. 10),

25 chr4\_16353619-PCR-R: TTTGTTTTTGGCCGATAGGTTCC (SEQ ID NO. 11),

chr4\_16353619-SBE (v orientaci

forward): TTTTTTTTTTATTTGAGATCACGATCACAGTTAAT (SEQ ID NO. 12)

pro identifikaci obou alel diagnostického SNP markeru v pozici chr4\_16353619 dle referenčního  
genomu Tieton v2.0 pro detekci znaku doba zrání,

30 chr2\_29787028-PCR-F: GCCTCTGTTGTCAAAGAATGAG (SEQ ID NO. 13),

chr2\_29787028-PCR-R: AAGCATATGGGTTTGGGATGC (SEQ ID NO. 14),

chr2\_29787028-SBE (v orientaci

forward): AAAAAAAAAAAAAAAAAAGCATTGTATTGGGATCAAATATACA (SEQ  
ID NO. 15)

35 pro identifikaci obou alel diagnostického SNP markeru v pozici chr2\_29787028 dle referenčního  
genomu Tieton v2.0 pro detekci znaku hmotnost plodu,

chr4\_16000421-PCR-F: CCGCCATTTTTGAATTTTTGGGTC (SEQ ID NO. 16),

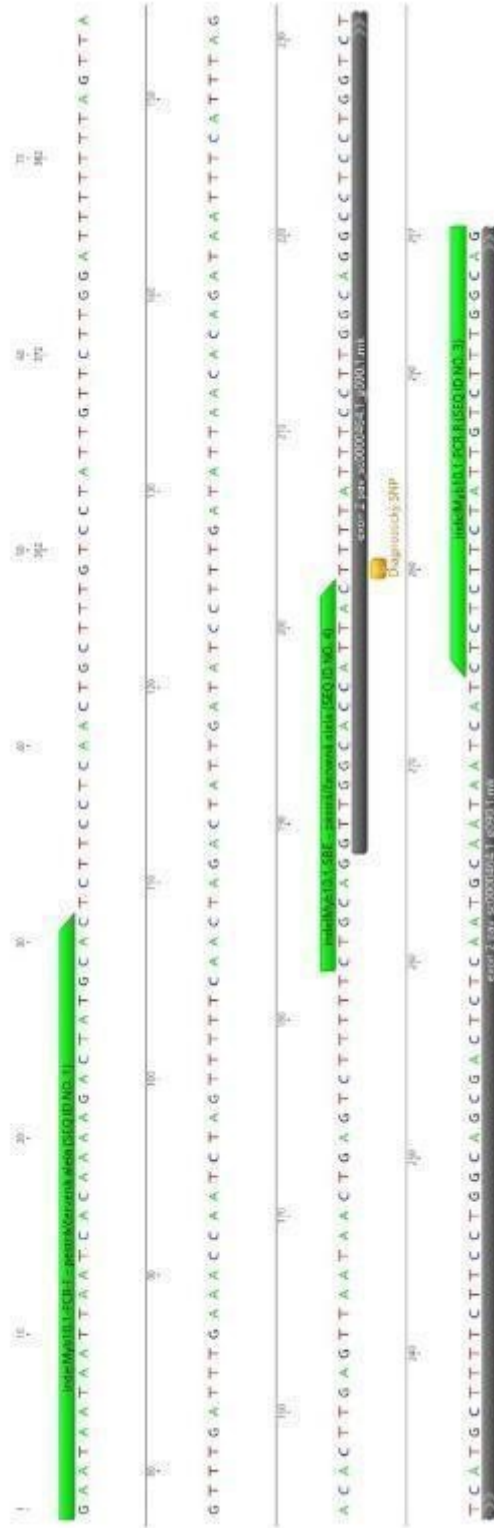
chr4\_16000421-PCR-R: TCAACTACGTGTATTTGGTTTCGAA (SEQ ID NO. 17),

chr4\_16000421-SBE (v orientaci

40 reverse): CCCCCCTTGATGTTTTACATAGAATACATTGTGATTTAT (SEQ ID NO. 18)

pro identifikaci obou alel diagnostického SNP markeru v pozici chr4\_16000421 dle referenčního  
genomu Tieton v2.0 pro detekci znaku pevnost plodu.

12 výkresů



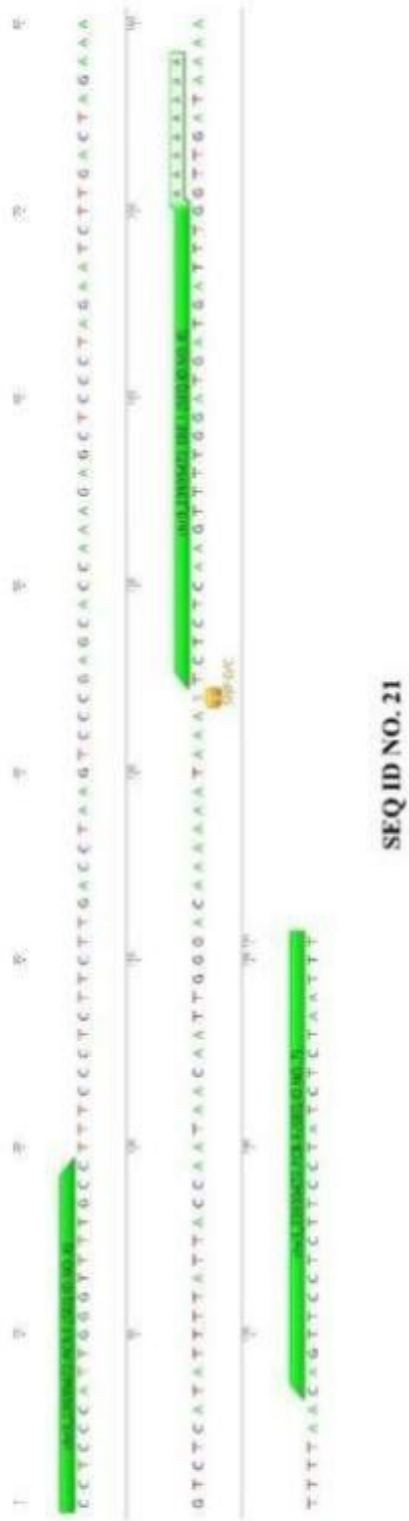
SEQ ID NO. 19

Obr. 1A)



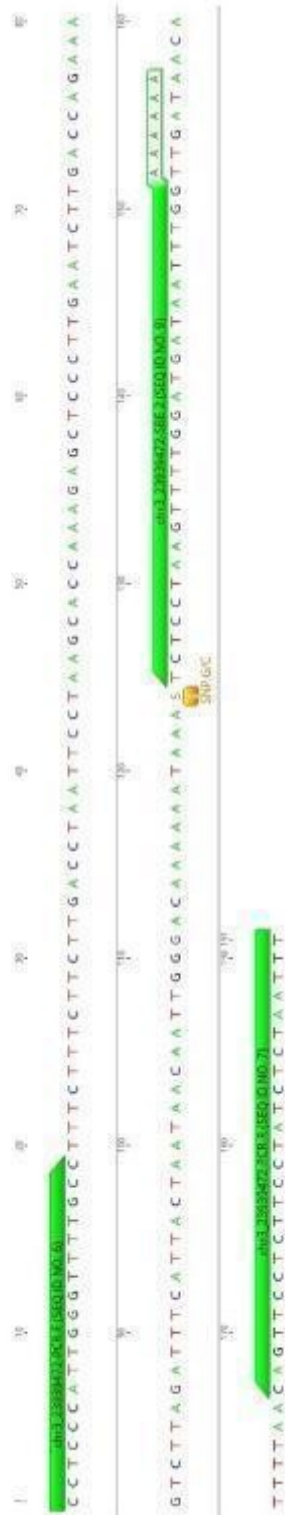


Obr. 1B)



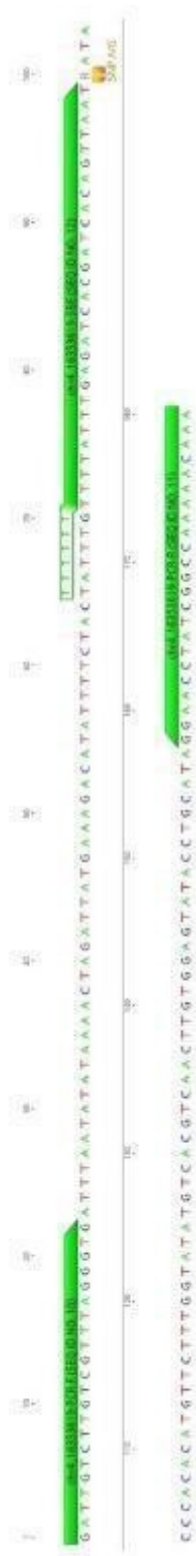
SEQ ID NO. 21

Obr. 1C)



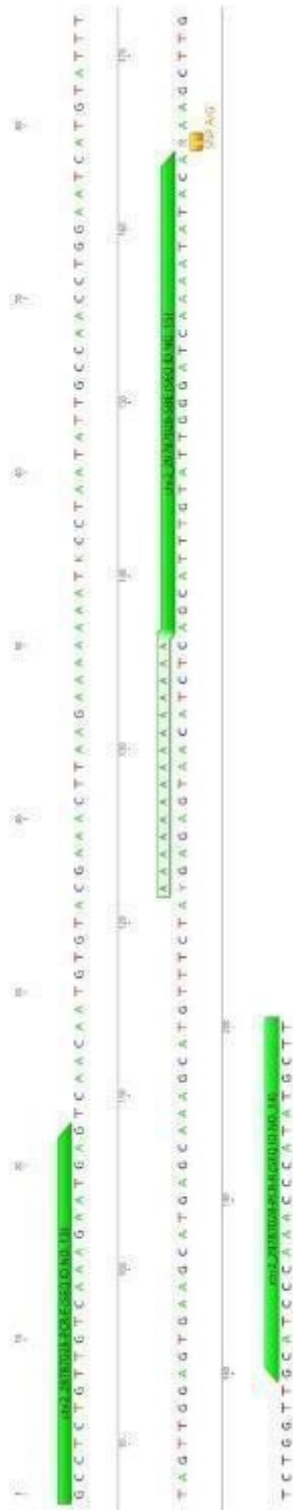
SEQ ID NO. 22

Obr. 1D)



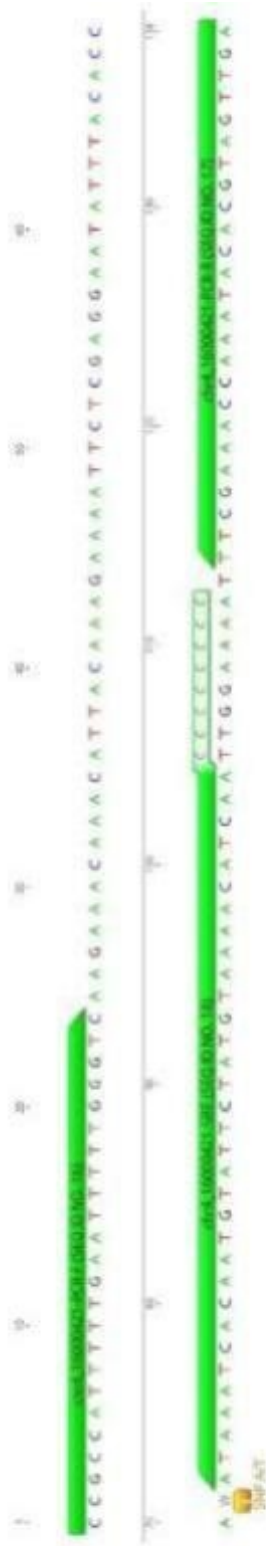
SEQ ID NO. 23

Obr. 1E)



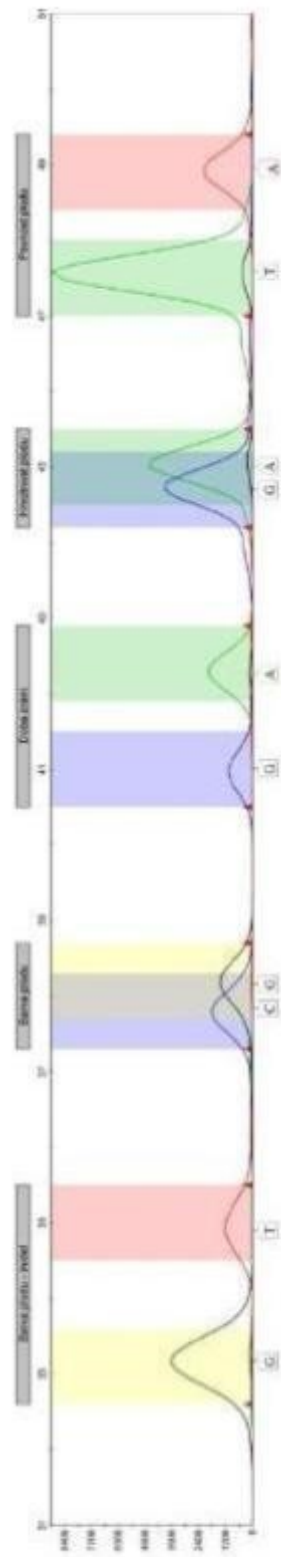
SEQ ID NO. 24

Obr. 1F)

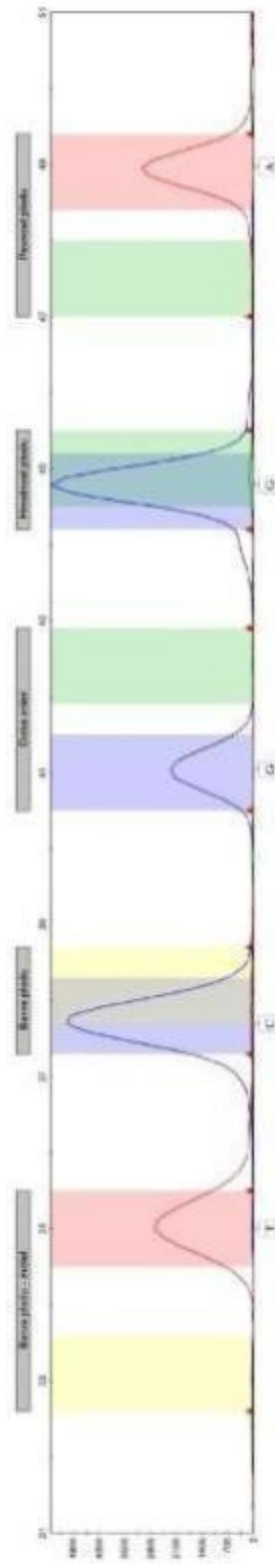


SEQ ID NO. 25

Obr. 1G)

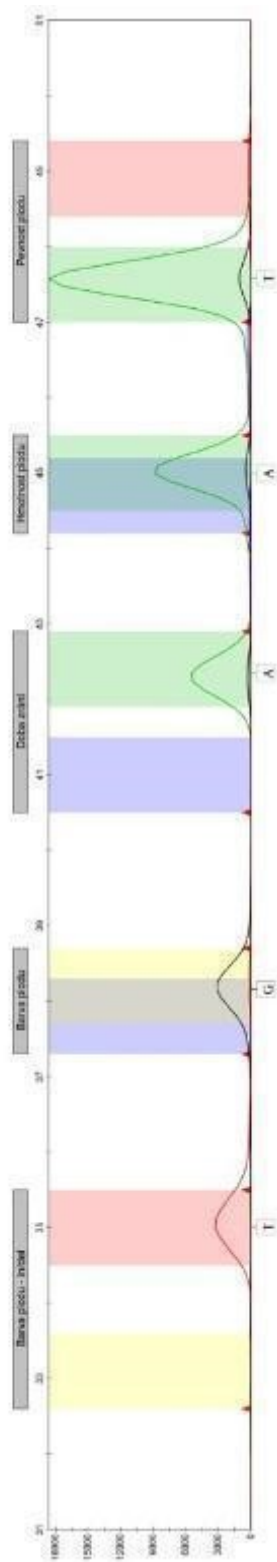


Obr. 2A)

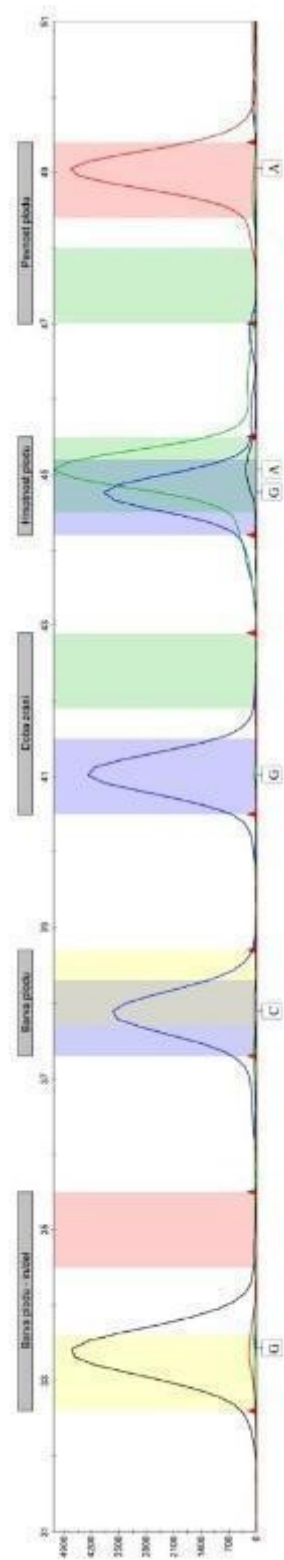


Obr. 2B)

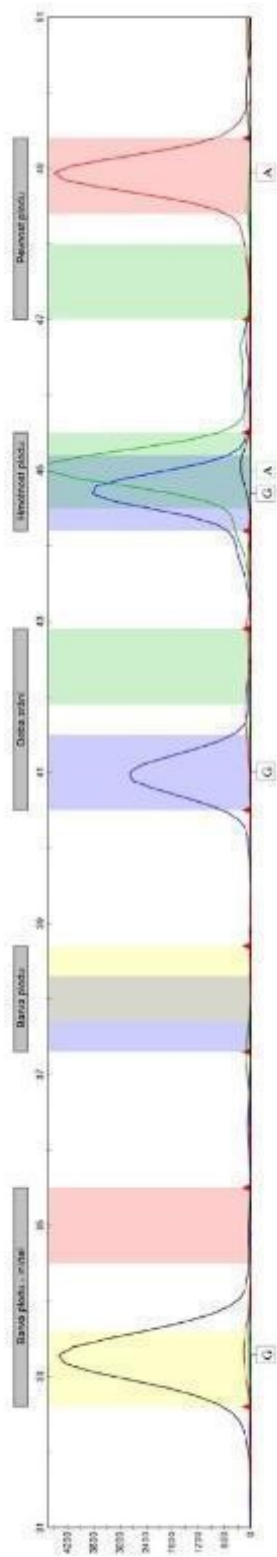




Obr. 2C)



Obr. 2D)



Obr. 2E)