

METODIKA IDENTIFIKACE ODRŮD MERUŇKY OBECNÉ (*PRUNUS ARMENIACA* L.) POMOCÍ SSR MARKERŮ

Veronika Nekvindová a kol.

CERTIFIKOVANÁ METODIKA



VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOCNÁŘSKÝ HOLOVOUSY, S.R.O.

**Metodika identifikace odrůd
meruňky obecné (*Prunus armeniaca* L.)
pomocí SSR markerů**

Veronika Nekvindová a kol.



**CERTIFIKOVANÁ METODIKA
2021**

Autoři: Ing. Veronika Nekvindová, Ph.D., Ing. Ivona Žďárská, Ing. Pavol Suran,
prof. Dr. Ing. Boris Krška, RNDr. Jana Čmejlová, Ph.D.

VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOCNÁŘSKÝ
HOLOVOUSY s.r.o.

Název: Metodika identifikace odrůd meruňky obecné (*Prunus armeniaca* L.)
pomocí SSR markerů

Vydal: VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOCNÁŘSKÝ
HOLOVOUSY s.r.o.
Holovousy 129, 50801 Holovousy

Vyšlo v roce: 2021

Oponenti: doc. Dr. Ing. Pavel Vejl
Česká zemědělská univerzita v Praze, Fakulta agrobiologie, potravinových
a přírodních zdrojů, Katedra genetiky a šlechtění
Mgr. Iva Křížková, Ph.D.
Ministerstvo zemědělství České republiky, Sekce zemědělství
a potravinářství, Odbor environmentální a ekologické zemědělství, Oddělení
obnovitelných zdrojů energie a environmentálních strategií

Vydáno bez jazykové úpravy

Publikace je realizačním výstupem projektu TAČR TJ02000071 – Využití genetických markerů pro
ověření odrůdové identity meruněk.

Publikace byla certifikována MZE-47289/2021

© VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOCNÁŘSKÝ HOLOVOUSY s.r.o., 2021
www.vsuo.cz

ISBN 978-80-87030-84-4

OBSAH

ANOTACE	5
ANNOTATION	5
1. ÚVOD	7
2. CÍL METODIKY	11
3. VLASTNÍ POPIS METODIKY	11
3.1. Vývoj sady 19 SSR markerů pro identifikaci odrodních meruněk	11
3.2. Postup analýzy	14
3.2.1 Příprava vzorků rostlinného materiálu	15
3.2.2 Izolace DNA	15
3.2.3 PCR a fragmentační analýza	16
3.2.4 Stanovení genotypu meruňky obecné (<i>Prunus armeniaca</i> L.)	19
3.3. Příklady vyhodnocení potenciálně problematických výsledků	23
3.3.1 Vysoký stuttering alel markeru BPPCT039_a	23
3.3.2 Automatické nerozpoznání některých kombinací alel markeru CPST039	24
3.3.3 Alely lišící se o 1 nukleotid	25
3.4. Výskyt nulových alel	27
3.5. Využití genotypizační sady k ověření původu odrůd a analýze rodokmenů	27
4. SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ	33
5. POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY	34
6. EKONOMICKÉ ASPEKTY	35
7. SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY	37
8. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE	39
9. PŘÍLOHA	40

ANOTACE

Meruňka obecná (*Prunus armeniaca* L.) patří mezi jeden z nejoblíbenějších ovocných druhů. Na celém světě existují již tisíce odrůd a každý rok jsou registrovány další nově vyšlechtěné odrůdy. Jen v České republice je každoročně vyprodukováno a prodáno 120–240 tisíc kusů stromků různých odrůd meruněk, jejichž odrůdovou pravost je třeba zaručit. Klasický způsob ověření pravosti odrůdy založený často na několikaletém fenologickém/fenotypovém hodnocení může být značně zjednodušen a urychlen využitím molekulárních metod. V současné době jsou nejpoužívanějšími markery pro genotypizaci tzv. SSR markery (Simple Sequence Repeats), fungující na principu délkové odlišnosti sekvencí mezi jednotlivými odrůdami. Předkládaná metodika zahrnuje podrobné informace o přípravě vzorků pro analýzy, určení identity odrůd meruněk pomocí ověřené sady 19 SSR markerů metodou fragmentační analýzy na kapilárním genetickém analyzátoru a validaci metody na referenčních odrůdách. Metodika je doplněna o přesný fenologicko-pomologický popis vybraných referenčních odrůd, který doplňuje identifikaci odrůd pomocí SSR markerů a slouží k dalšímu potvrzení jejich identity, aby byla umožněna mezilaboratorní přenositelnost metody. Tato metodika byla vytvořena pro potřeby externího aplikačního garanta – Ústředního kontrolního a zkušebního ústavu zemědělského (ÚKZÚZ) jako certifikačního orgánu odrůd meruněk, dále odborné veřejnosti zabývající se šlechtěním, množením a prodejem odrůd meruněk a rovněž široké veřejnosti, kterou tato problematika zajímá.

ANNOTATION

Apricot (*Prunus armeniaca* L.) is one of the most popular fruit species. Thousands of cultivars are already available worldwide, and newly bred cultivars are registered every year. About 120–240 thousands of apricot trees of various cultivars are produced and sold every year in the Czech Republic alone, and their varietal authenticity must be therefore guaranteed. A classical method of cultivar verification that usually relies on several years of phenological/phenotypic evaluations can be greatly simplified and accelerated using molecular methods. So-called SSR (Simple Sequence Repeats) markers are currently the most used markers for genotyping based on particular sequence length differences between cultivars. The presented methodology includes detailed information concerning a sample preparation for the analysis, determination of apricot cultivar identity using a validated set of 19 SSR markers by the use of a fragment analysis

carried out in a capillary genetic analyzer, and validation of the method using reference cultivars. The methodology is supplemented with an accurate phenological-pomological description of selected reference cultivars that complements the identification of cultivars using SSR markers, and thus serves as another tool for a cultivar identity confirmation to allow an inter-laboratory transfer of the method. This methodology was developed for an external application guarantor – the Central Institute for Supervising and Testing in Agriculture (ÚKZÚZ), an official body for a certification of apricot cultivars; for professionals dealing with breeding, propagation and a sale of apricot cultivars; and for the general public interested in this topic.

1. ÚVOD

Meruňka obecná (*Prunus armeniaca* L.) pochází z východní a střední Asie. Do Evropy se dostala přes Arménii počátkem letopočtu, do Česka se rozšířila z Itálie přes Slovinsko, Štýrsko a Rakousy. Roční světová produkce tohoto peckového ovoce čtyři miliony tun potvrzuje, že je velmi oblíbeným předmětem zájmu konzumentů. Přestože se hlavní pěstitelské oblasti meruňek nacházejí v zemích Středního východu (Turecko, Irán) a ve Spojených státech (Kalifornie) – v oblastech s mírnou zimou vzhledem ke své potřebě dormance a vysoké citlivosti k jarním mrazům, i v České republice se meruňky těší velké oblibě. V roce 2017 se zde sklídilo přes čtyři tisíce tun, v roce 2018 dokonce více než dvojnásobek a po jabloních, slivoních a třešních jsou meruňky čtvrtým nejčastěji pěstovaným tuzemským ovocným druhem (Buchtová, 2020).

Meruňka obecná je zástupce rodu *Prunus*, sekce *Armeniaca*, kde jsou zařazeny i další druhy meruňek - meruňka japonská (*P. mume* Sieb. et Zucc.), meruňka tibetská (*P. holosericea*) nebo meruňka sibiřská (*P. sibirica* L.). Vzhledem k tomu, že jsou tyto druhy významným zdrojem šlechtitelsky cenných vlastností, bylo často realizováno mezidruhové křížení jako úspěšný nástroj k překonání některých pěstitelských nedostatků.

Fenotypová rozmanitost meruňky obecné s typickými znaky pro určité území vedla mnoho autorů ke sledování meruňkových genotypů v různých oblastech jejich výskytu. Popis hlavních ekologicko-geografických skupin a zohlednění ekologické adaptace jsou velmi důležitou informací pro šlechtitelskou práci. Kostina (1969 a 1972) vymezila 4 hlavní ekologicko-geografické skupiny: skupina Džungarsko-Zailijská, skupina Středoasijská, skupina Iranokavkazská a skupina Evropská. Dále jsou popsány tři základní genetická centra původu meruňek dle Vavilova (1926): čínské centrum (pohoří severovýchodní, střední a západní Číny), středoasijské centrum (pohoří Tien-Shan přes Hindu Kush po Kashmir) a centrum Blízkého Východu (pohoří západně od Kaspického moře včetně Kavkazu a pohoří Gruzie, Ázerbájdžánu, Arménie, Turecka a Severního Iránu). Rozšíření teorie skupin podle Vavilova a Kostiny, kteří sledovali evoluci souborů podobných kultivarů nacházejících se v odlišných a ekologicko-geograficky izolovaných oblastech, přináší Bailey a Hough (1975). Jejich ekologicko-geografické skupiny meruňek jsou doplněné o skupiny čínských odrůd: severočínskou, tibetskou, severovýchodně – čínskou a západočínskou. Dále, jak se více rozšiřoval rod *P. armeniaca*, rozšířili někteří další autoři tyto skupiny na 6 resp. 8 a dokonce i na 13 lokálních podskupin.

S ohledem na aktuální poptávku po čerstvých plodech je u odrůd nového či moderního sortimentu kladen větší důraz na atraktivnost plodů, pevnost dužniny, velikost plodů a delší možnost skladování při zachování kvality plodů. Tyto vlastnosti se v tradičním evropském sortimentu dříve nevyskytovaly. Proto byl v některých zemích již v 60. letech zahájen šlechtitelský program se začleněním meruněk z mnoha různých eko-geografických skupin pro získání rozmanitých odrůd, a to jak po stránce pomologických znaků, tak i s důrazem na vlastnosti, jako jsou mrazuodolnost, délka dormance, nebo naopak menší náročnost na chlad, rezistence k šarce švestek, moniliové hnilobě nebo samosprašnost. Lze tedy konstatovat, že v rodokmenech moderních odrůd je zahrnuto různou měrou mnoho genotypů z předložených eko-geografických skupin a díky interspecifické hybridizaci i jiné botanické druhy rodu *Prunus* jako např. *P. mandshurica* či *P. sibirica*. To vše samozřejmě zvyšuje genetickou rozmanitost odrůd meruněk a ve svém důsledku komplikuje jejich molekulárně genetickou analýzu.

V dnešní době již existují na celém světě tisíce odrůd meruněk. Kostina (1931, 1976) ve své práci shromáždila kolekci téměř osmi set odrůd meruněk, Paunovič (1988) uvádí, že ve více jak 13 zemích Evropy, Turecku a Izraeli existuje 1398 (včetně duplikací) odrůd meruněk a Smykov (1989) ve své studii tvrdí, že je shromážděno okolo 1800 odrůd a forem meruněk v kolekcích ze SSSR a 30 dalších států, situovaných na stanicích ve střední Asii, Turkmenistánu, na Krymu, v Taškentu, Jerevanu a Kišiněvě. Z toho bylo jen v roce 2020 v České republice zaregistrováno pro uvádění do oběhu 35 odrůd a s úředně uznaným popisem vedeno 27 odrůd (Seznam odrůd, 2020). Legislativa České republiky tedy zajišťuje pravost pro 62 odrůd, nicméně na našem území je pěstováno a množeno mnohem více odrůd meruněk. Např. jenom v genofondových sbírkách Mendelovy univerzity je evidováno 375 položek *Prunus armeniaca* var. *armeniaca* (Databáze genetických zdrojů rostlin). Od roku 2013 je v České republice každoročně vyprodukováno a prodáno 120–240 tisíc kusů stromků různých odrůd meruněk (Kozderová, 2020). Tyto odrůdy se liší mnoha vlastnostmi, ať již se jedná o odolnost vůči chorobám, vhodnost pěstování v různých lokalitách, cizosprašnost/samosprašnost, vlastnosti plodů nejen z hlediska zpracování a další charakteristiky. Z tohoto důvodu pěstitelé věnují pečlivou pozornost výběru odrůdy, kterou chtějí vysadit ve svých zahradách či sadech, a právem vyžadují při nákupu nových stromků deklaraci odrůdové pravosti, která je zárukou požadovaných hospodářských vlastností. Identita vegetativně množeného materiálu je důležitá zejména v ovocnářství, jelikož se jedná o takzvané trvalé kultury. Metody identifikace a vzájemného rozlišování odrůd významných zemědělských plodin se v posledních letech vyvíjejí v rychlém tempu (Hu et al., 2018; Li et al., 2018). Souvisí to s obchodními

aktivitami specializovaných firem, prodejem množného materiálu i se šlechtitelskou praxí. S obchodováním jsou vždy spojeny problémy související s právní a obchodní ochranou zboží. Ochrana práv, která se váže na určitý rostlinný genotyp, resp. odrůdu, se na různých úrovních týká ochrany autorských práv jak samotného majitele odrůdy, tak i dalších subjektů, kteří s odrůdou manipulují na základě licenčních smluv. Identifikační systémy jsou nezbytné pro schvalovací orgán, producenty stromků (školkaře) a majitele sadů a vymezují odpovědnost producentů v různých fázích dodavatelského řetězce.

Odrůda může být identifikována na základě vlastností, které jsou popsány při její registraci. Podmínkami pro registraci nové odrůdy je zjištění, že je odlišná od dříve registrovaných odrůd, vykazuje uniformní a stálé znaky, nese název vyhovující požadavkům dle zákona č. 408/2000 Sb., o ochraně práv k odrůdám rostlin a dále musí splňovat podmínky dle zákona č. 219/2003 Sb. o oběhu osiva a sadbě pěstovaných rostlin, ve znění pozdějších předpisů. Musí mít také zajištěné udržovací šlechtění. Pro registraci nové odrůdy ovoce se proto provádí takzvané zkoušky odlišnosti, uniformity a stálosti (DUS testy) podle mezinárodně harmonizovaných zkušebních technických protokolů CPVO (Povolná, 2019). Pouze při splnění všech výše uvedených požadavků je nová odrůda registrována a může být identifikována. Tento klasický způsob ověření pravosti odrůdy je založený na několikaletém fenologickém a pomologickém subjektivním hodnocení s pomocí schválených deskriptorů pro konkrétní ovocný druh. Toto hodnocení však může být ovlivněné např. různorodými povětrnostními podmínkami, lidským faktorem nebo škůdci. Odlišnost odrůd je zpravidla posuzována vzhledem ke kolekci standardních odrůd v odrůdové zkušebně. Udržování této kolekce je však značně prostorově, materiálně i personálně náročné. Kolekce také nemusí obsahovat všechny známé odrůdy.

Mnohem rychlejší určení identity jednotlivých odrůd může nabídnout molekulárně genetická analýza pomocí SSR markerů (simple sequence repeat), která se již u řady rostlinných i živočišných druhů stala spolehlivým a dostupným nástrojem genotypizace. SSR markery jsou tvořeny krátkými tandemově se opakujícími sekvencemi lišícími se svojí délkou mezi jednotlivými odrůdami (Schlötterer, 2004). Podstatou genotypizace pomocí těchto genetických markerů je kombinace délek jednotlivých alel vybraných SSR markerů, kdy vzniká genetický profil unikátní pro určitý genotyp. Mezi důležité znaky SSR markerů pro genotypizaci patří přiměřený délkový polymorfismus, výskyt markeru v jediném lokusu genomu, v ideálním případě nevyskytující se tzv. nulové alely, které se používajícími primery neamplifikují, a v kontextu více markerů je důležitá i jejich pozice v genomu, aby dva používané SSR markery nebyly ve vazbě (Saito et al., 2004). Čím více analyzovaných lokusů a čím variabilnější SSR markery jsou, tím je jedinečnější

výsledný profil SSR markerů a menší pravděpodobnost náhodné shody dvou organismů. Její minimalizace je pak hlavním požadavkem při genotypizaci. Použitím SSR markerů není obvykle možné rozlišení klonů, i když mohly být dříve uznány za samostatné odrůdy (např. 'Velkopavlovická', 'Maďarská', 'Sabinovská', 'Bohutická', popřípadě 'Nikitskij Krasnoščekij').

SSR markery jsou analyzovány tak zvanou fragmentační analýzou. Příslušné sekvence jsou pomocí specifických primerů nejprve amplifikovány polymerázovou řetězovou reakcí (PCR) a produkty amplifikace jsou elektroforeticky rozděleny podle velikosti. S výhodou jsou pro PCR reakci využity fluorescenčně značené primery a reakční produkty jsou analyzovány na kapilárním genetickém analyzátoru se schopností odlišit fragmenty lišící se o jediný nukleotid. Běžně rozšířené kapilární genetické analyzátory jsou schopny současně detekovat pět barevných spekter. Proto mohou být primery označeny 4 různými fluorescenčními barvami a pátá barva je určena pro velikostní marker nezbytný pro určení velikosti analyzovaných fragmentů. Nejmodernější kapilární genetické analyzátory pak rozpoznávají dokonce 6 různých fluorescenčních barev. V klasickém uspořádání jsou obvykle v jedné reakci analyzovány 4 SSR markery značené 4 různými fluorescenčními barvami. V případě SSR lokusů s výraznými velikostními odlišnostmi je však možné v jedné reakci analyzovat i několik lokusů značených stejnou fluorescenční barvou, což identifikaci genotypu značně zlevňuje a zrychluje.

Jen profil tvořený vysoce heterogenními markery (zpravidla se používá 12 až 20 SSR markerů) bude vykazovat velmi nízkou pravděpodobnost náhodné shody mezi dvěma nepříbuznými odrůdami, a bude tak unikátní pro danou odrůdu. Proto je třeba věnovat výběru vhodných SSR markerů velkou pozornost, aby bylo možné jednoznačně rozlišit všechny známé/registrované odrůdy. Při použití kvalitní sady SSR markerů lze pak prostým porovnáním genetického profilu referenčního stromu dané odrůdy s genetickým profilem testovaného vzorku potvrdit, nebo vyvrátit genetickou shodu obou materiálů s pravděpodobností hraničící s jistotou. Výsledky mohou být dostupné v řádu několika málo hodin od doručení vzorku do laboratoře, což značně zrychlí celou identifikaci.

2. CÍL METODIKY

Cílem této metodiky je zavedení nového detekčního systému pro určení identity odrůd meruňky obecné (*Prunus armeniaca* L.) pomocí genetických markerů. Vyvinutá unikátní sada 19 SSR markerů umožňuje stanovení genotypu meruněk ve dvou multiplexech. Nedílnou součástí metodiky je uvedení genetických profilů referenčních odrůd, jejichž pravost byla deklarovaná pomocí klasických metod, které umožňují mezilaboratorní přenos metody i výsledků. Metodika je doplněna o přesný fenologicko-pomologický popis těchto referenčních odrůd, který doplňuje identifikaci odrůd pomocí SSR markerů a slouží k dalšímu potvrzení jejich identity, aby byla zaručena jistota analýzy referenční odrůdy. Zavedení této metody zjednoduší, zrychlí a zpřesní proces ověření odrůdové pravosti meruněk, umožní identifikaci neznámých vzorků odrůd meruněk a zkvalitní šlechtitelský proces. Tato metodika je určena pro kontrolní a certifikační účely Ústředního kontrolního a zkušebního ústavu zemědělského (ÚKZÚZ) a dalším subjektům z řad šlechtitelů a pěstitelů meruněk a prodejcům množného materiálu.

3. VLASTNÍ POPIS METODIKY

3.1. Vývoj sady 19 SSR markerů pro identifikaci odrůd meruněk

Vlastnímu vývoji metodiky pro identifikaci odrůd meruněk předcházela pečlivý výběr SSR markerů vhodných pro genotypizaci této ovocné plodiny, kdy bylo prověřeno 48 publikovaných SSR markerů pocházejících jak z meruňky obecné, tak z blízké příbuzných druhů *Prunus salicina*, respektive *Prunus persica* L. Z analyzovaných 48 SSR markerů bylo nakonec vybráno 19 vysoce kvalitních SSR markerů „rovnoměrně“ rozmístěných v genomu (2 SSR markery z každého chromozomu doplněné 3 dalšími velmi kvalitními markery pro snížení pravděpodobnosti identity dvou nepříbuzných jedinců). Hlavními kritérii pro výběr SSR markerů byly počet alel, očekávaná heterozygotnost (H_e , H-expected, dle vzorce $H_e = 1 - \sum p_i^2$, kde p_i je frekvence výskytu jednotlivých alel daného markeru), pozorovaná heterozygotnost (H_o , H-observed, procento heterozygotů v analyzovaném souboru), počet vzácných alel s výskytem pod 5 % (Hokanson, 2001), počet efektivních alel (A_e ; dle vzorce: $A_e = 1/(1 - H_e)$) a pravděpodobnost nulových alel (r , dle vzorce $r = (H_e - H_o)/(1 + H_e)$ (Brookfield, 1996)). Tato kritéria byla použita přesto, že hodnocený soubor genotypů nepředstavuje klasickou populaci vzniklou panmixií, pro

kteřou byly tyto vzorce vyvinuty. Neexistují však lepší kritéria pro hodnocení kvality SSR markerů pro genotypizaci odrůd či plemen určitého organismu a tyto hodnocené parametry, včetně příslušných vzorců pro jejich výpočet, jsou pro tento účel běžně používány.

Kvalita vybraných SSR markerů byla prověřena na 521 vzorcích, naprostá většina analýz proběhla v duplikátech/vzorcích stejných odrůd pocházejících z různých lokalit. Statistické vyhodnocení jak jednotlivých markerů (Tabulka 1), tak sady jako celku bylo provedeno analýzou 154 identifikovaných unikátních genotypů.

Vybrané SSR markery byly z důvodu ceny za genotypizaci uspořádány do dvou multiplexů. To bylo umožněno díky navržení a optimalizaci nových primerů pro amplifikaci publikovaných SSR markerů, kdy jsou pomocí těchto nově navržených primerů amplifikovány delší úseky oproti PCR s publikovanými primery. Tím bylo umožněno multiplexování více SSR markerů značených stejnou fluorescenční barvou v jedné reakci. SSR markery s alespoň jedním nově navrženým primerem oproti publikovaným sekvencím primerů jsou označeny koncovkou „_a“. Všechny použité SSR markery mají délku opakující se sekvence 2 nukleotidy.

Tabulka 1: Statistické vyhodnocení 19 SSR markerů na 154 unikátních genotypech

SSR marker	LG	Počet alel	He	Ho	Počet vzácných alel	Počet efektivních alel	Pravděpodobnost nulových alel	Zdroj
96P10_SP6_a	1	18	0,842	0,786	12	6,334	0,031	Soriano et al. (2012)
ssrPaCITA7_a	1	15	0,816	0,786	9	5,443	0,017	Lopes et al. (2002)
ssrPaCITA17_a	1	18	0,818	0,721	12	5,492	0,053	Lopes et al. (2002)
UDAp-410	1	10	0,825	0,838	5	5,707	-0,007	Messina et al. (2004)
CPSCT021_a	2	12	0,742	0,747	7	3,875	-0,003	Mnejja et al. (2004)
ssrPaCITA19	2	16	0,756	0,766	12	4,091	-0,006	Lopes et al. (2002)
BPPCT039_a	3	16	0,840	0,779	11	6,244	0,033	Dirlewanger et al. (2002)
ssrPaCITA10	3	16	0,778	0,675	11	4,504	0,058	Lopes et al. (2002)
CPSCT039_a	4	14	0,853	0,786	7	6,796	0,036	Mnejja et al. (2004)
UDP97-402_a	4	13	0,828	0,747	6	5,804	0,044	Cipriani et al. (1999)
AMPA105_a	5	17	0,810	0,812	11	5,270	-0,001	Hagen et al. (2004)
CPDCT028	5	14	0,742	0,760	10	3,870	-0,010	Mnejja et al. (2005)
AMPA100_a	6	12	0,790	0,727	8	4,759	0,035	Hagen et al. (2004)
Pchems5_a	6	17	0,752	0,682	12	4,038	0,040	Sosinski et al. (2000)
CPPCT022_a	7	19	0,885	0,922	12	8,710	-0,020	Aranzana et al. (2002)
UDAp-407_a	7	9	0,758	0,779	4	4,128	-0,012	Messina et al. (2004)
CPPCT006	8	11	0,808	0,740	4	5,214	0,038	Aranzana et al. (2002)
PacA33_a	8	14	0,723	0,708	10	3,613	0,009	Decroocq et al. (2003)
UDP98-412_a	?	12	0,832	0,831	7	5,942	0,000	Testolin et al. (2000)

LG=chromozom; He=očekávaná heterozygotnost; Ho=pozorovaná heterozygotnost.

Celkem bylo u 19 použitých SSR markerů identifikováno 273 různých alel, průměrný počet alel na marker byl 14,37 alely. Nejméně alel bylo nalezeno u markeru UDAp-407_a, a to 9. Nejvíce alel (19) měl marker CPPCT022_a. Očekávaná

heterozygotnost byla pro jednotlivé SSR markery vypočtena v rozmezí od 0,723 (PacA33_a) do 0,882 (96P10_SP6_a), pozorovaná heterozygotnost od 0,675 (ssrPaCITA10) do 0,922 (CPPCT022_a). Z identifikovaných alel bylo 170 vzácných, tj. s výskytem méně než 5 % ze všech alel příslušného markeru. Počet efektivních alel se pohyboval od 3,613 (PacA33_a) do 8,710 (CPPCT022_a). Pravděpodobnost nulových alel byla od -0,02 (CPPCT022_a) do 0,058 (ssrPaCITA10). Jediným markerem s přímo potvrzeným výskytem nulových alel byl ssrPaCITA17_a, který se nepodařilo naamplifikovat u genotypu 'Odeta'. Pomocí analýz rodokmenů bylo zjištěno, že nulová alela se vyskytuje i u markeru Pchcms5 (viz dále). Genetickou změnu zodpovědnou za příslušnou nulovou alelu se však přes značné úsilí nepodařilo identifikovat, pravděpodobně tedy dochází v místě tohoto markeru k rozsáhlejší inzerci/deleci.

Co se týče celé sady, celková očekávaná heterozygotnost byla 0,802 a celková pozorovaná heterozygotnost byla 0,772. Pravděpodobnost shody dvou nepříbuzných jedinců byla vypočtena $7,38 \times 10^{-24}$ pro celou sadu 19 SSR markerů, pro samostatný multiplex A pak činila $1,79 \times 10^{-13}$ a samostatný multiplex B $4,13 \times 10^{-11}$. Vyvinutá sada pro genotypizaci meruněk je tak velmi kvalitní s velmi nízkou pravděpodobností shody dvou nepříbuzných jedinců.

Jak již bylo uvedeno výše, pomocí SSR markerů nelze obvykle rozlišit klony a jejich identifikaci bude třeba provádět i nadále podle fenotypu. V našich analýzách vykazovaly stejný genotyp například odrůdy 'Velkopavlovická', 'Maďarská', 'Sabinovská', 'Bohutická' a 'Nikitskij Krasnoščekij', které patří do stejného sortotypu. Potvrzena byla i klonalita odrůd 'Rakovského' a 'Kráska'. Tyto odrůdy se nepodařilo rozlišit ani pomocí dalších 17 analyzovaných SSR markerů. Možným řešením pro identifikaci těchto odrůd by bylo celogenomové sekvenování, které by určilo rozdíly v sekvenci mezi těmito shodnými genotypy, případně by potvrdilo jejich shodu. Identifikované délkové změny sekvence by pak mohly být dodatečně zařazeny do této sady SSR markerů.

3.2. Postup analýzy

V této metodice je popsán postup identifikace odrůd meruněk pomocí vyvinuté sady 19 SSR markerů sestávající z několika kroků: příprava vzorků rostlinného materiálu, izolace DNA, 2 nezávislé PCR reakce využívající sady primerů vybraných SSR markerů pro specifickou amplifikaci, stanovení délky ampliconů pomocí fragmentační analýzy využívající kapilární elektroforézu, vyhodnocení přítomnosti jednotlivých alel pro každý SSR marker a vlastní stanovení genotypu meruňky obecné.

3.2.1 Příprava vzorků rostlinného materiálu

Pro ověření odrůdové identity meruněk je třeba správně připravit vzorek rostlinného materiálu. V případě meruněk je k izolaci genomové DNA třeba pouze malé množství materiálu, např. mladé listy nebo jednoleté až dvouleté výhony, což umožňuje provádět analýzy celoročně. Při podezření na možnou heterogenitu rostlinného materiálu (naroubování více odrůd na jeden strom, podrůstání podnože) je vhodné odebrat více vzorků z různých oblastí téže rostliny, které budou analyzovány jednotlivě. Přibližně 100 mg mladých listů, mražených suchým ledem, je homogenizováno ve 2 ml zkumavkách společně se dvěma kovovými kuličkami o průměru 7 mm pomocí oscilačního mlýnu MM 400 dle návodu výrobce (Fisher Scientific). V případě výhonů je lýko nashromážděné v třecí misce, mražené tekutým dusíkem, utřeno na jemný prášek a pomocí sterilní špachtle přibližně 100 mg přeneseno do 2 ml centrifugační zkumavky.

3.2.2 Izolace DNA

Celková genomická DNA je izolována jakýmkoliv způsobem umožňujícím dosáhnout níže uvedených parametrů DNA (čistota, koncentrace), v následujícím postupu je uvedena izolace dle návodu Exgene Plant SV mini kit (GeneAll).

K 100 mg homogenizovanému materiálu je přidáno 400 μ l lyzačního pufru se 4 μ l roztoku RNasy A (100 mg/ml). Každý vzorek je ihned intenzivně homogenizován pomocí vibrační třepačky, následně inkubován při 65 °C po dobu 15 minut a každých 5 minut je opakovaně homogenizován. Poté je k homogenátu přidáno 140 μ l pufru PD, vše je opět homogenizováno a inkubováno 5 minut na ledu. Homogenát je přenesen sterilní špachtlí na EzSep filtrační kolonku a centrifugován 2 minuty. Proteklý lyzát je opatrně bez narušení pelety přenesen do sterilní 1,5 ml zkumavky, kam je přidán vázací pufr v 1,5násobku objemu lyzátu. Roztoky je nutné okamžitě promíchat. Směs je přenesena na SV filtrační kolonku a postupně všechna přefiltrována centrifugací trvající 1 minutu. Proteklá tekutina je odstraněna. Na SV filtrační kolonku je nanášeno 700 μ l promývacího pufru a centrifuguje se 1 minutu. Proteklá tekutina je odstraněna. Na SV filtrační kolonku je nanášeno 300 μ l promývacího pufru a centrifuguje se 1 minutu. Proteklá tekutina je opět odstraněna. Poté se centrifuguje 1 minutu, aby byl zcela odstraněn promývací pufr z filtru kolonky. Následně je SV filtrační kolonka vsunuta do čisté sterilní 1,5 ml mikrozkušavky. Na kolonku je přidáno 100 μ l elučního pufru, inkubuje se 5 minut při pokojové teplotě, poté se centrifuguje 1 minutu.

Koncentrace [ng/μl] a čistota (poměr naměřených hodnot při vlnových délkách 260/280 nm) získané DNA jsou měřeny spektrofotometricky (NanoDrop Lite, ThermoFisher Scientific). Čistota by měla být alespoň 1,8 a koncentrace je upravena na 10 ng/μl sterilní PCR H₂O. Purifikovanou DNA je možné pro další analýzy krátkodobě uchovat při 4 °C nebo dlouhodobě uchovávat při -20 °C nebo -80 °C.

3.2.3 PCR a fragmentační analýza

PCR amplifikace fragmentů genomické DNA za použití 38 primerů (Thermo Fisher Scientific) probíhá ve dvou multiplexech A a B. V obou případech je PCR reakce realizována v objemu 10 μl a reakční směs obsahuje 5 μl Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific), 1 μl Premixu multiplexu A nebo B, 2 μl vody a 2 μl genomické DNA o koncentraci 10 ng/μl. PCR reakce je prováděna v PCR termocykleru C1000 (Bio-Rad) s následujícím teplotním profilem: počáteční denaturace 1 min při 98 °C následovaná 23 amplifikačními cykly (denaturace 10 s při 98 °C, hybridizace primerů 10 s při 52 °C, elongace 20 s při 72 °C) a závěrečnou polymerací 30 s při 72 °C. V Tabulce 2 je uvedeno složení Premixu multiplexu A, respektive B a ke každému markeru sekvence primerů pro jeho amplifikaci, včetně fluorescenčního značení, koncentrace a velikosti amplifikovaných alel jednotlivých markerů. Tabulka 2 obsahuje i vzdálenosti mezi sousedícími markery značenými stejnou fluorescenční barvou, kdy minimální mezerou je 47 nukleotidů, aby bylo umožněno jednoznačné přiřazení identifikovaných vrcholů.

Pro fragmentační analýzu je smíchán 1 μl PCR produktu s 0,5 μl velikostního standardu GeneScan™ 600 LIZ™ dye Size Standard v2.0 a 15 μl Hi-Di™ formamidu (obojí ThermoFisher Scientific). Vzorky jsou denaturovány 2 min při 95 °C, fragmentační analýza fluorescenčně značených ampliconů je prováděna na genetickém analyzátoru ABI PRISM 3500 (ThermoFisher Scientific).

Tabulka 2: Premixy multiplexů pro genotypizaci meruněk

Multiplex A									
SSR marker	LG	Forward primer	Reverse primer	Koncentrace primerů (μM), každý primer	Značení primeru	Nejkratší alela [nt]	Nejdelší alela [nt]	Rozdíl mezi velikostními pásmy [nt]	
CPPCT006	8	AATTAACCTCCAACAGCTCCA	ATGGTTGCTTAATTCAATGG	0,19	6-FAM	171	202	148	
ssrPaCITA7_a	1	CTTTTGTGCCTCAGCTTCCCAACAC	TTCTCGGAGTTCTCGCTGG	0,14	6-FAM	350	397		
UDP98-412_a	?	AGGGGAAGTTTMTGCTGCAC	GCTGAAGACGACGATGATGA	0,13	VIC	82	117	152	
AMPA105_a	5	GCAACCCACCACCAACCATAC	CTCCCTACCCCTCTGTATCTC	0,085	VIC	269	344		
ssrPaCITA19	2	GACAAATACAATCAAGAAGTGTCGC	GAACAGCTAGCCCTTTGTCATAC	0,13	NED	99	154	74 141	
CPPCT022_a	7	TTCAATTAGCTAGAGAGAATTATTG	ATGGACAAGAAGCAAGTAGTTTG	0,80	NED	228	277		
UDP97-402_a	4	TGCAATAAATAGCATAAAAAGGAAG	TGGAGAAGGTGGGTACTTG	0,25	NED	418	445		
UDAp-410	1	TTGTTGACAAGAAGAAAAACAAAGC	CAACGGTTGGTTTCAGAAG	0,2	PET	120	151	156 55	
Pchms5_a	6	CGCCCATGACAAACTTA	ATCGCTCTTACAATCTACACAG	0,7	PET	307	400		
BPPCT039_a	3	TACCGGCTTGATCTCGCCT	GACCTTCCTCTACAGCTTCC	0,24	PET	455	490		

LG =chromozom, ?-dle literatury se tento marker předpokládá na šestém chromozomu (LG6), nicméně nám se nepodařilo přesně zamapovat, nt=mukleotid, M v sekvenci primeru zastupuje A/C, nejkratší a nejdelší alely jsou alely pozorované v souboru 154 unikátních genotypů

Multiplex B								
SSR marker	LG	Forward primer	Reverse primer	Koncentrace primerů (μM, každý primer)	Značení primeru	Nejkratší alela [nt]	Nejdélší alela [nt]	Rozdíl mezi velikostními pásmy [nt]
CPST039_a	4	GCCGCAACTCGTAAGGAATA	TCCACCTTTGATTACCCCTTC	0,11	6-FAM	95	127	134
PacA33_a	8	TCAGTCTCATCTCGCATACG	GTGACAAAGCCCGTAATCC	0,18	6-FAM	261	303	
ssrPaCITA17_a	1	TTGTGCAATATTACATGAGAG	GGAGTCTATAATAAATGGTTGCGC	0,35	6-FAM	350	428	47
AMPA100_a	6	TGTTTAGTTGAGGGTAACTTTGG	TTCTGTCTCACTGACTCACTTG	0,17	VIC	183	209	118
UDAp-407_a	7	TTCTGCTACTACAAATCGTGTCTC	TTTGCCCCAGTTTCACCC	0,12	VIC	327	365	
ssrPaCITA10	3	GGTGAGGTCTGTGCTGAATATGCCA	CGATTAAAGAAATAAGAAAAAGAGC	0,18	NED	142	183	68
96P10_SP6_a	1	TTCACAGAGAGCGCAGCAAAC	GATGGGTTTGAAAATGGAGAAAA	0,17	NED	251	358	
CPDCT028	5	TGAACGTTCACCTCCTTCAC	ACCACCACCAATACCACCAT	0,29	PET	151	201	78
CPST021_a	2	GCCACTTCGGCTAAAAGAGA	AGTCCCCGTTTGTGTTTTG	0,17	PET	279	314	

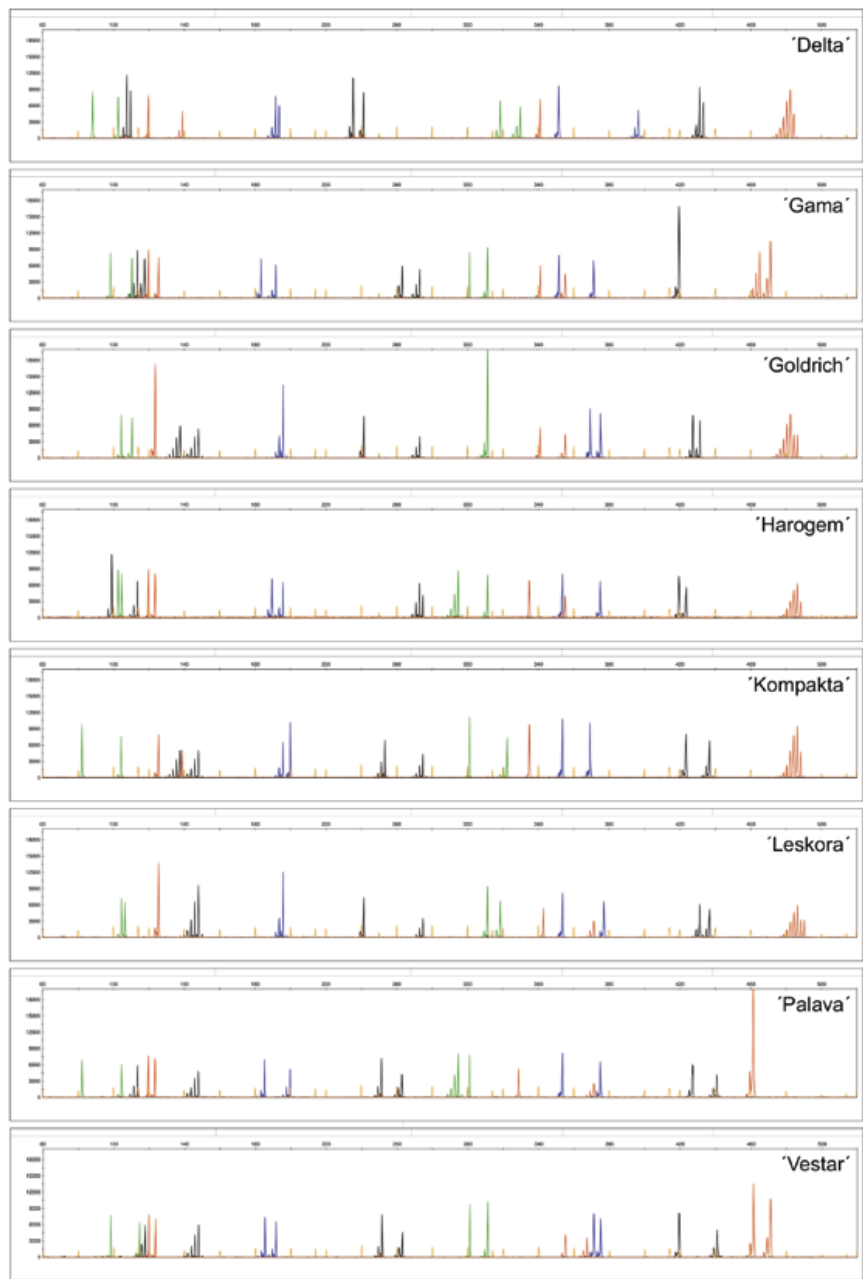
LG=chromozom, nt=nukleotid, nejkratší a nejdélší alely jsou alely pozorované v souboru 154 unikátních genotypů

3.2.4 Stanovení genotypu meruňky obecné (*Prunus armeniaca* L.)

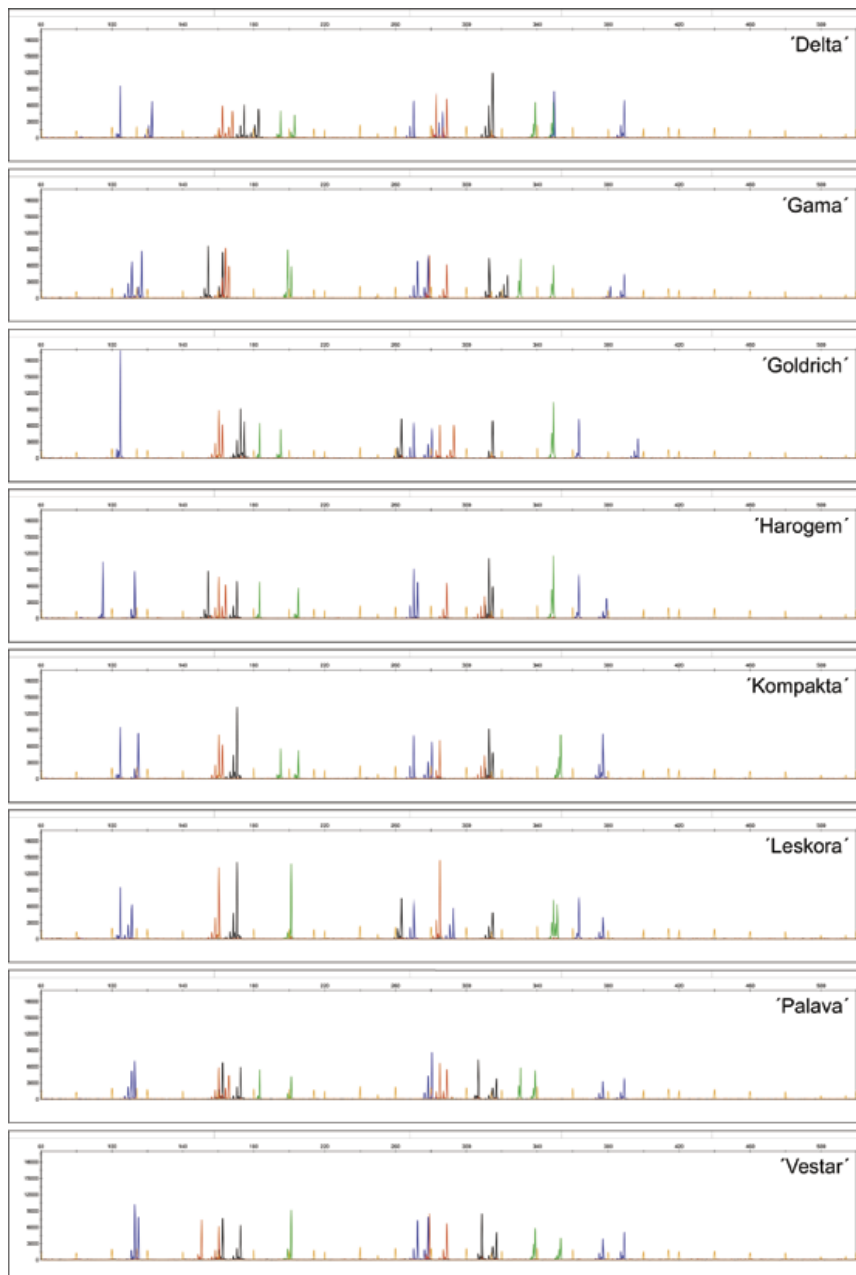
Fragmentační analýzy jsou analyzovány softwarem GeneMapper v5.0 (ThermoFisher Scientific), který je schopen vyhodnotit délky jednotlivých fragmentů v nukleotidech. Výsledkem je spektrum alel pro každý SSR marker, toto spektrum je unikátní pro danou genetickou variantu meruňky. Na základě porovnání spektra alel příslušných SSR markerů u analyzovaných vzorků s referenční databází dojde k vyhodnocení.

Je známo, že velikost analyzovaných PCR fragmentů vyhodnocená při kapilární elektroforéze závisí kromě skutečné délky sekvence i na sekvenčních vlastnostech amplifikovaného fragmentu, použitém fluorescenčním značení, použitých reagentiích a přístroji a podmínkách elektroforézy (viz např. www.thermofisher.com). Může se tedy lišit od délek zjištěných na základě reálné sekvence. Z důvodu někdy i poměrně velkých rozdílů je vhodné systém při použití v jiné laboratoři vždy ověřit na referenčních odrůdách se známým profilem použitých SSR markerů. Jako kontroly pro provádění fragmentačních analýz a pro mezilaboratorní porovnání byly vybrány odrůdy vykazující nejčastěji se vyskytující alely jednotlivých markerů a kombinace alel, které nejsou často analyzačním softwarem GeneMapper správně vyhodnocovány. Konkrétně byly vybrány odrůdy 'Delta', 'Gama', 'Goldrich', 'Harogem', 'Kompakta', 'Leskora', 'Palava' a 'Vestar' pocházející ze sbírek certifikačního orgánu ÚKZÚZ, kdy tři z nich jsou navíc zapsané ve Státní odrůdové knize. Grafické výstupy kapilární elektroforézy ve formě elektroforeogramů pro tyto referenční odrůdy jsou uvedeny na Obrázcích 1 (multiplex A) a 2 (multiplex B). Délka alel jednotlivých markerů u kontrolních odrůd je uvedena v Tabulce 3.

Obrázek 1: Referenční odrůdy - Multiplex A



Obrázek 2: Referenční odrůdy - Multiplex B



Tabulka 3: Velikost alel jednotlivých markerů u referenčních odrůd

Odrůda SSR marker	Delta	Gama	Goldrich	Harogem	Kompakta	Leskora	Palava	Vestar
01_CPPCT006	192	184	196	190	196	196	186	186
	194	192	196	196	200	196	200	192
02_ssrPaCITA7_a	352	352	369	354	354	354	354	371
	397	371	375	375	369	377	375	375
03_UDP98-412_a	88	98	105	103	82	105	82	98
	103	111	111	105	105	107	105	115
04_AMPA105_a	319	301	311	295	301	311	295	301
	330	311	311	311	322	319	301	311
05_ssrPaCITA19	108	114	138	99	138	148	114	118
	110	118	148	114	148	148	148	148
06_CPPCT022_a	236	263	242	273	254	242	252	252
	242	273	273	275	275	275	263	263
07_UDP97-402_a	431	420	428	420	424	431	428	420
	434	420	431	424	437	437	441	441
08_UDAp-410	120	120	124	120	126	126	120	120
	139	126	124	124	139	126	124	124
09_Pchcms5_a	341	341	341	335	335	343	329	355
	341	355	355	355	335	371	371	367
10_BPPCT039_a	483	465	483	486	486	486	461	461
	485	471	486	488	488	490	461	471
11_CPSCT039_a	105	111	105	95	105	105	111	113
	123	117	105	113	115	111	113	115
12_PacA33_a	270	272	270	270	270	270	281	272
	287	278	281	272	281	293	281	278
13_AMPA100_a	195	199	183	183	195	201	183	201
	203	201	195	205	205	201	201	201
14_UDAp-407_a	339	331	349	349	353	349	331	339
	349	349	349	349	353	351	339	353
15_ssrPaCITA10	175	154	173	154	171	171	163	163
	183	163	175	171	171	171	173	173
16_96P10_SP6_a	315	313	263	313	313	263	307	309
	315	323	315	315	315	315	317	317
17_CPDCT028	162	164	160	160	160	160	160	151
	168	166	162	164	162	160	166	160
18_CPSCT021_a	283	279	285	289	285	285	285	279
	289	289	293	310	310	285	289	289
19_ssrPaCITA17_a	350	381	363	363	377	363	377	377
	389	389	397	379	377	377	389	389

V případě výskytu fragmentů nepřiraditelných k jednotlivým SSR markerům na základě známých délek je doporučováno tento fragment identifikovat PCR amplifikací s páry primerů pro jednotlivé SSR markery, případně kombinacemi primerů z různých

markerů, v obou případech by měl být v páru zařazen primer značený příslušnou fluorescenční barvou. Totožnost fragmentu je následně ověřena sekvenováním.

PCR produkty určené k sekvenování jsou amplifikované za stejných podmínek, jaké jsou uvedeny pro PCR fragmentační analýzy, jen se 40 cyklů opakování. Tyto PCR produkty je třeba nejprve ověřit elektroforeticky v 3% agarózovém gelu. Pro vizualizaci produktů pod UV světlem pomocí transiluminátoru je gel obarven SafeView™ (Applied Biological Materials Inc.). Jako molekulární velikostní standard pro určení velikosti amplifikovaného produktu je použit GeneRuler Low Range DNA Ladder, ready-to-use (Thermo Fisher Scientific). Amplifikované fragmenty daného SSR markeru jsou z gelu vyříznuty a purifikovány pomocí izolačního kitu WizPrep™ Gel/PCR Purification Mini Kit (WizbioSolutions). Eluovaná DNA je sekvenována kitem Gerbera Sequencing Kit v3.1 (SEQme) dle návodu výrobce na genetickém analyzátoru ABI PRISM 3500 (Thermo Fisher Scientific). Sekvence je následně ověřena v databázi NCBI.

V případě výskytu genotypů se stejným genetickým profilem (u kterých nicméně shodný genetický profil není předpokládán) se může jednat buď o blízce příbuzné jedince, zejména možné klony, které není možné pomocí této genetické analýzy rozlišit, nebo o záměnu materiálu. V takovém případě je vhodné výsledky genetické analýzy zopakovat a doplnit o fenotypové hodnocení genotypu.

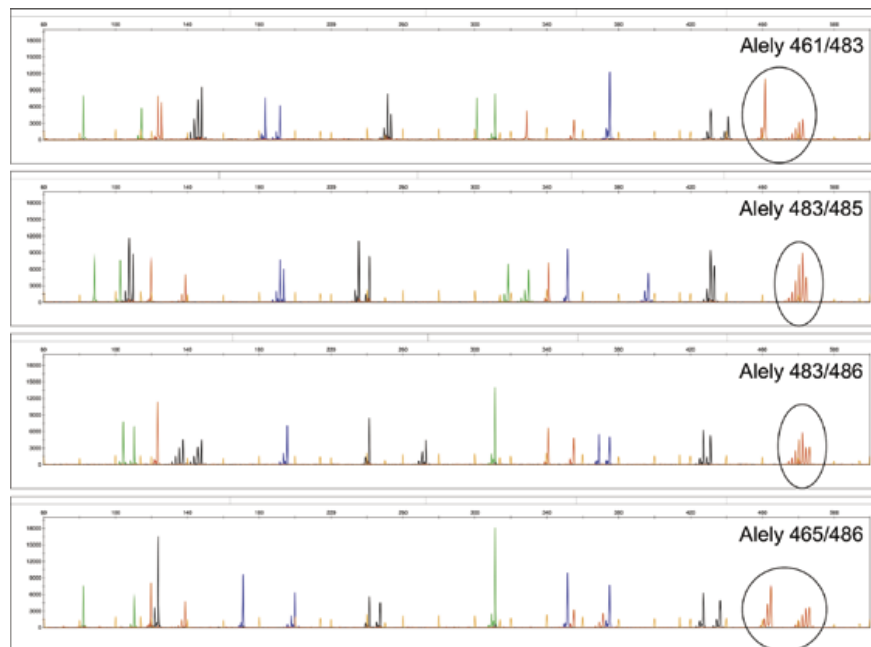
3.3. Příklady vyhodnocení potenciálně problematických výsledků

Grafické výstupy fragmentačních analýz jsou zpravidla dobře hodnotitelné a v naprosté většině jsou automaticky vyhodnoceny softwarem GeneMapper správně. V případě popisované sady 19 SSR markerů určených pro identifikaci odrůd meruněk je však třeba věnovat pozornost vyhodnocení některých markerů.

3.3.1 Vysoký stuttering alel markeru BPPCT039_a

Dlouhé alely markeru BPPCT039_a (nejdelší červený marker v multiplexu A), které vykazují vysoký stuttering, mohou být nesprávně hodnocené jako homozygotní kombinace alel tohoto markeru, případně jako 3 alely (viz Obrázek 3). Nicméně v porovnání s dalšími odrůdami obsahujícími příslušné alely v kombinaci s jinou alelou lze správný výstup analýzy tohoto markeru bez obtíží identifikovat.

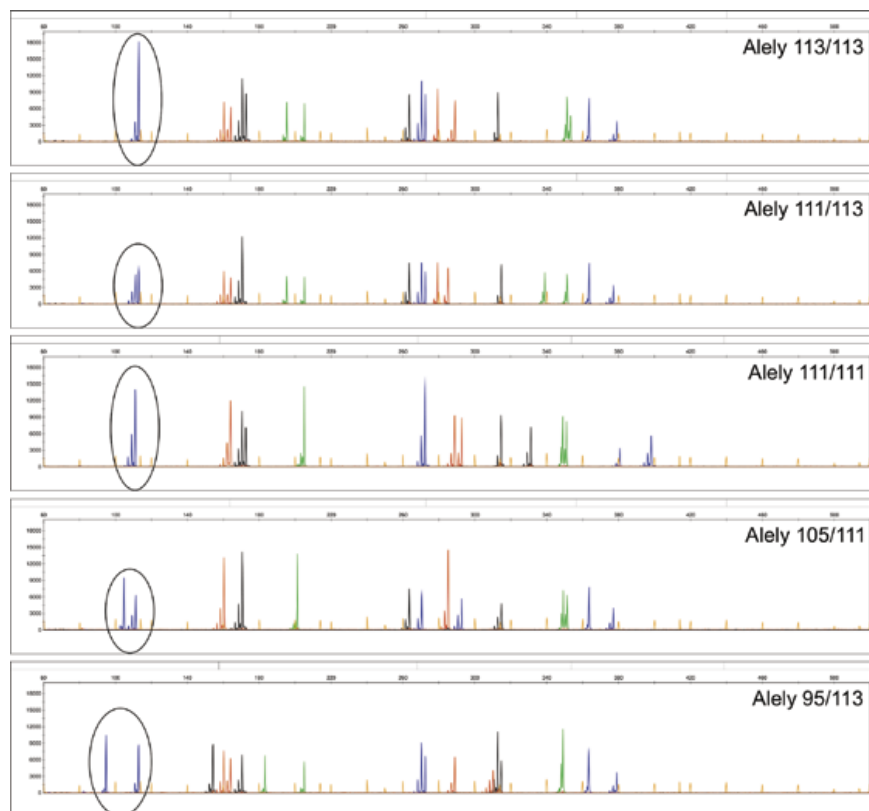
Obrázek 3: Vysoký stuttering dlouhých alel markeru BPPCT039 (nejdelší červený marker)



3.3.2 Automatické nerozpoznání některých kombinací alel markeru CPSCT039

V některých případech může docházet i k automatickému nerozpoznání některých alel nejkratšího modrého markeru CPSCT039_a v multiplexu B (v případě existence některých alel lišících se o 2 nukleotidy v jedné odrůdě, viz Obrázek 4). I zde při pohledu na ostatní genotypy s jinou kombinací těchto alel není problém správný výstup analýzy určit.

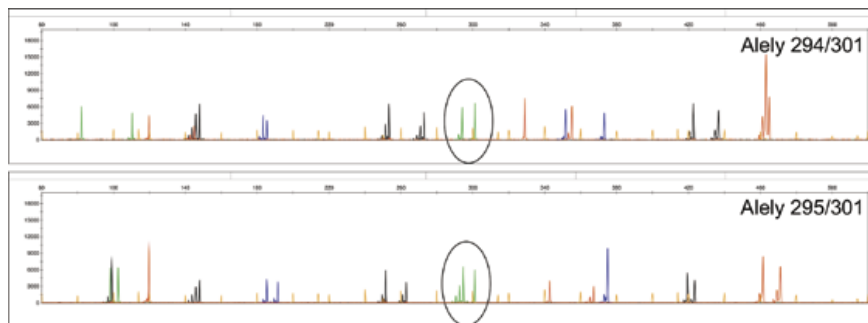
Obrázek 4: Automatické nerozpoznání některých kombinací alel markeru CPST039 (nejkratší modrý marker)



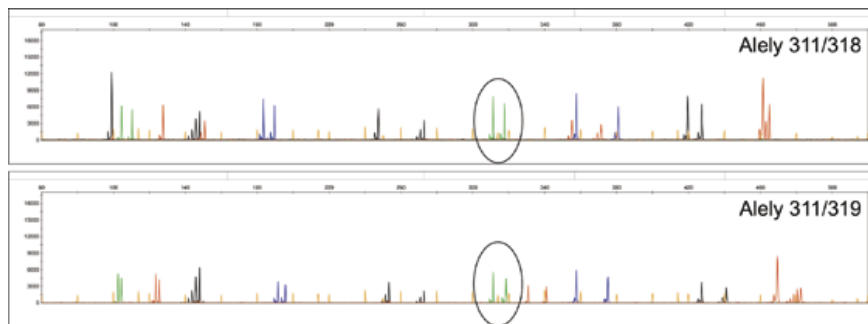
3.3.3 Alely lišící se o 1 nukleotid

Naprostá většina identifikovaných alel se liší od sousedící alely téhož markeru o 2 nukleotidy, jelikož byly markery s častým výskytem alel lišících se o 1 nukleotid při výběru markerů cíleně eliminovány. Při analýze všech genotypů se však i přesto ve vzácných případech vyskytly alely lišící se o 1 nukleotid. Při správném nastavení binů v programu GeneMapper však není problém tyto alely rozlišit. Alely lišící se o 1 nukleotid byly pozorovány u markerů AMPA100, AMPA105 (viz Obrázek 5a a 5b), BPPCT039 (viz Obrázek 6), ssrPaCITA17 a UDP97-402.

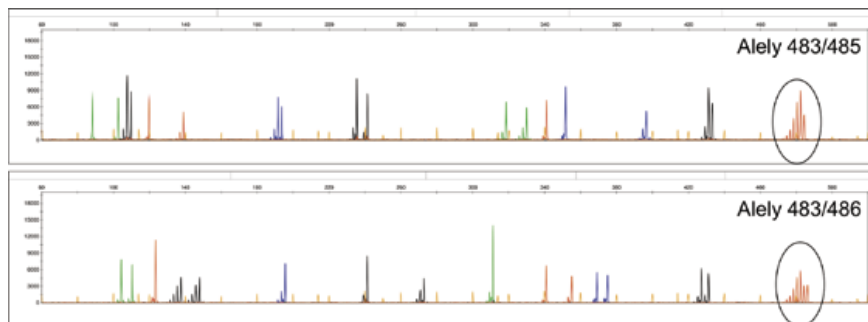
Obrázek 5a: Alely markeru AMPA105 (dlouhý zelený marker) lišící se o jeden nukleotid a zároveň i typem stutteru



Obrázek 5b: Alely markeru AMPA105 (dlouhý zelený marker) lišící se o jeden nukleotid



Obrázek 6: Alely markeru BPPCT039 (nejdelší červený marker) lišící se o jeden nukleotid

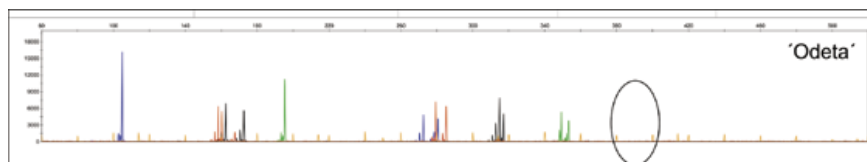


3.4. Výskyt nulových alel

Ikdyž bylo při návrhu genotypizační sady SSR markerů základní snahou eliminovat nulové alely, byly po vyhodnocení celého souboru vzorků použitých při vývoji sady odhaleny markery s výskytem nulových alel - *ssrPaCITA17_a* a *Pchcms5_a*. Přímým důkazem výskytu alespoň jedné nulové alely je identifikace vzorku, u kterého se daný marker vůbec neamplifikuje (při použití patřičných kontrol), jak je patrné u markeru *ssrPaCITA17_a* u genotypu 'Odetá' (Obrázek 7). Dalším způsobem odhalení výskytu alespoň jedné nulové alely u daného markeru je analýza rodokmenů (viz dále), touto analýzou byl potvrzen výskyt nulové alely u markerů *ssrPaCITA17_a* a *Pchcms5_a*. Identifikace možného výskytu nulových alel výpočtem pravděpodobnosti výskytu nulových alel je méně spolehlivá a závisí zejména na počtu analyzovaných genotypů, jejich příbuznosti i frekvenci výskytu nulové alely v populaci.

U obou výše uvedených markerů byly navrženy páry primerů v širším okolí daného markeru a u genotypů s identifikovanými nulovými alelami byla provedena PCR. V případě úspěšné amplifikace byl vzniklý fragment osekvenován (u odrůdy 'Odetá' k amplifikaci nedošlo). Analýza sekvence však neodhalila amplifikaci druhé alely. Genetickou změnu zodpovědnou za příslušnou nulovou alelu se tak ani v jednom případě nepodařilo identifikovat, pravděpodobně dochází v místě tohoto markeru k rozsáhlejší inzerci/deleci, nebo je tato oblast velmi mutována.

Obrázek 7: Potvrzení výskytu nulové alely SSR markeru *ssrPaCITA17* – u genotypu 'Odetá' není marker vůbec amplifikován



3.5. Využití genotypizační sady k ověření původu odrůd a analýze rodokmenů

Vyvinutá genotypizační sada SSR markerů umožňuje ověření pravosti jednotlivých odrůd a analýzu příbuzenských vztahů na základě patřičné shody alel. Jednotlivé genotypy mohou být identifikovány porovnáním s referenční databází, může však být provedeno

i ověření původu genotypu porovnáním získaného spektra alel se známými rodiči, případně lze možného rodiče na základě alel i vytipovat. Na Obrázku 8 a 9 je uvedena ukázka rodokmenu pro odrůdy 'Bergarouge' a 'Etela', které odpovídají genetickým analýzám.

SSR markery jsou uvedeny v pořadí podle multiplexů, jednotlivých barev a velikostí produktů tak, jak jsou hodnoceny při fragmentační analýze (Multiplex A: 6-FAM, VIC, NED, PET (vždy od nejkratšího markeru po nejdelší); Multiplex B: 6-FAM, VIC, NED, PET (vždy od nejkratšího markeru po nejdelší), jako poslední je uveden marker *ssrPaCITA17_a* (6-FAM, nejdelší marker).

Obrázek 8: Rodokmen odrůdy 'Bergarouge' vzniklé křížením odrůd 'Bergeron' a 'Orange Red', který odpovídá očekávání

<u>Matka</u> Bergeron					<u>Otec</u> Orange Red	
LG8 (CPPCT006)	184	196			171	200
LG1 (<i>ssrPaCITA7_a</i>)	375	375			354	377
LG6 (UDP98-412_a)	111	115			103	105
LG5 (AMPA105_a)	301	334			295	319
LG2 (<i>ssrPaCITA19</i>)	148	148			99	150
LG7 (CPPCT022_a)	254	254			275	275
LG4 (UDP97-402_a)	441	441			437	441
LG1 (UDAp-410)	120	145			124	128
LG6 (Pchcms5_a)	335	355			355	371
LG3 (BPPCT039_a)	465	486			461	465
LG4 (CPST039_a)	113	113			95	113
LG8 (PacA33_a)	270	272			272	272
LG6 (AMPA100_a)	183	195			195	205
LG7 (UDAp-407_a)	351	353			349	351
LG3 (<i>ssrPaCITA10</i>)	173	173			154	171
LG1 (96P10_SP6_a)	313	331			263	313
LG5 (CPDCT028)	160	166			160	164
LG2 (CPST021_a)	289	289			279	285
LG1 (<i>ssrPaCITA17_a</i>)	379	381			363	377

Obrázek 9: Příklad možného rodokmenu odrůdy ‘Etela’ vzniklé samosprášením odrůdy ‘Harogem’ – u modře vyznačených alel byla u odrůdy ‘Etela’ začleněna stejná alela z vajíčka i pylového zrna, u různých alel téhož markeru odrůdy ‘Etela’ nelze rozhodnout, zda pocházejí z vajíčka, nebo z pylového zrna, proto je uvedený rodokmen pouze příkladem možného vzniku této odrůdy. Samosprášení odrůdy ‘Harogem’ je v tomto případě potvrzeno.

	<u>Matka</u> Harogem			<u>Etela</u>			<u>Otec</u> Harogem	
LG8 (CPPCT006)	190	196		190	190		190	196
LG1 (ssrPaCITA7_a)	354	375		354	375		354	375
LG6 (UDP98-412_a)	103	105		103	103		103	105
LG5 (AMPA105_a)	295	311		295	311		295	311
LG2 (ssrPaCITA19)	99	114		99	114		99	114
LG7 (CPPCT022_a)	273	275		273	275		273	275
LG4 (UDP97-402_a)	420	424		420	424		420	424
LG1 (UDAp-410)	120	124		120	124		120	124
LG6 (Pchcms5_a)	335	355		355	355		335	355
LG3 (BPPCT039_a)	486	488		486	486		486	488
LG4 (CPSCT039_a)	95	113		95	113		95	113
LG8 (PacA33_a)	270	272		270	272		270	272
LG6 (AMPA100_a)	183	205		205	205		183	205
LG7 (UDAp-407_a)	349	349		349	349		349	349
LG3 (ssrPaCITA10)	154	171		154	154		154	171
LG1 (96P10_SP6_a)	313	315		313	315		313	315
LG5 (CPDCT028)	160	164		160	160		160	164
LG2 (CPSCT021_a)	289	310		289	310		289	310
LG1 (ssrPaCITA17_a)	363	379		379	379		363	379

U některých odrůd však analýza rodokmenu neodpovídala předpokladu. Příkladem je odrůda ‘Strepet’, jejíž rodokmen je na Obrázku 10. U této odrůdy nebyla coby rodič potvrzena popisovaná matka, odrůda ‘Vynoslivýj’, ale pouze otec, odrůda ‘Šalah’. Vzhledem k tomu, že pravost odrůdy ‘Vynoslivýj’ byla potvrzena na základě jiného křížení, lze očekávat nesrovnalost spíše u odrůdy ‘Strepet’. U odrůd s neodpovídajícím genotypem podle rodokmenu je obecně vhodné získat tuto odrůdu z jiného zdroje a ověřit její genotyp. Samozřejmostí je shoda jejího fenotypu s originálním popisem odrůdy. Až poté je možné rozhodnout, zda sporná odrůda vznikla křížením jiných rodičů, nebo zda došlo k záměně analyzovaného vzorku sporné odrůdy v sadu (v laboratoři ověřeno v duplikátech).

Obrázek 10: Rodokmen odrůdy 'Strepet', která měla vzniknout křížením odrůd 'Vynoslivýj' a 'Šalah' – odrůda 'Vynoslivýj' však nebyla potvrzena jako matka, přestože se její genotyp jeví podle rodokmenu odrůdy 'Volšebnýj' jako správný a i fenotypově odpovídá tato odrůda předpokladu.

Matka Vynoslivýj			Strepet		Otec Šalah	
LG8 (CPPCT006)	186	186	188	196	194	196
LG1 (ssrPaCITA7_a)	352	375	371	375	352	375
LG6 (UDP98-412_a)	111	115	82	103	103	111
LG5 (AMPA105_a)	301	334	301	336	301	319
LG2 (ssrPaCITA19)	103	148	110	148	110	114
LG7 (CPPCT022_a)	232	254	234	248	234	275
LG4 (UDP97-402_a)	441	441	441	441	426	441
LG1 (UDAp-410)	120	124	126	145	120	145
LG6 (Pchcms5_a)	329	355	329	379	379	379
LG3 (BPPCT039_a)	463	465	461	465	465	465
LG4 (CPSCT039_a)	121	123	113	113	113	125
LG8 (PacA33_a)	272	281	272	293	272	293
LG6 (AMPA100_a)	183	209	187	187	187	195
LG7 (UDAp-407_a)	331	349	349	353	349	353
LG3 (ssrPaCITA10)	154	173	154	173	154	154
LG1 (96P10_SP6_a)	313	341	265	303	303	313
LG5 (CPDCT028)	160	199	166	199	166	199
LG2 (CPSCT021_a)	283	289	285	291	289	291
LG1 (ssrPaCITA17_a)	371	379	379	381	371	381

Analýza rodokmenů však může sloužit i k identifikaci výskytu nulových alel – viz Obrázek 11 (pro ssrPaCITA17_a) a Obrázek 12 (pro Pchcms5_a). V obou případech 18 zbylých markerů odpovídá předpokládanému rodiči, v markeru s identifikovanou nulovou alelou však nikoliv. Rodič s nulovou alelou se jeví v daném markeru jako homozygot, potomek však od něj zdědil nulovou alelu a je analyzován také jako homozygot, vyhodnocená je však pouze alela druhého rodiče.

Obrázek 11: Rodokmen genotypu NJA19xAlfred odpovídá danému křížení až na marker *ssrPaCITA17_a*, který je u obou odrůd homozygotní, avšak oba genotypy obsahují různou alelu. Potomek tedy pravděpodobně zdědil nulovou alelu po genotypu 'NJA19'. Odrůda 'Alfred' nebyla pro analýzy k dispozici.

Matka						Otec		
NJA19			NJA19xAlfred			Alfred		
LG8 (CPPCT006)	196	196		194	196		194	?
LG1 (ssrPaCITA7_a)	381	387		375	381		375	?
LG6 (UDP98-412_a)	111	111		103	111		103	?
LG5 (AMPA105_a)	295	311		295	322		322	?
LG2 (ssrPaCITA19)	99	114		99	114		99 nebo 114	?
LG7 (CPPCT022_a)	242	275		273	275		273	?
LG4 (UDP97-402_a)	424	431		420	431		420	?
LG1 (UDAp-410)	128	139		139	151		151	?
LG6 (Pchcms5_a)	335	355		335	355		335 nebo 355	?
LG3 (BPPCT039_a)	473	488		486	488		486	?
LG4 (CPSTCT039_a)	105	111		105	113		113	?
LG8 (PacA33_a)	270	270		270	281		281	?
LG6 (AMPA100_a)	183	205		205	205		205	?
LG7 (UDAp-407_a)	349	349		349	349		349	?
LG3 (ssrPaCITA10)	169	171		167	171		167	?
LG1 (96P10_SP6_a)	307	315		263	315		263	?
LG5 (CPDCT028)	162	164		160	164		160	?
LG2 (CPSTCT021_a)	299	310		289	299		289	?
LG1 (ssrPaCITA17_a)	389	389		350	350		350	?

Obrázek 12: Rodokmen odrůdy 'Telma' odpovídá danému křížení až na marker Pchcms5_a, který je u obou odrůd homozygotní, avšak oba genotypy obsahují různou alelu. Potomek tedy pravděpodobně zdědil nulovou alelu po genotypu 'Harlayne'. Otec je v tomto případě neznámý, odrůda vznikla volným sprášením.

Matka						Otec		
Harlayne			Telma			?		
LG8 (CPPCT006)	196	196	196	198		198	?	?
LG1 (ssrPaCITA7_a)	375	375	375	375		375	?	?
LG6 (UDP98-412_a)	103	103	103	105		105	?	?
LG5 (AMPA105_a)	311	311	309	311		309	?	?
LG2 (ssrPaCITA19)	148	148	108	148		108	?	?
LG7 (CPPCT022_a)	236	273	236	273		236 nebo 273	?	?
LG4 (UDP97-402_a)	428	428	428	431		431	?	?
LG1 (UDAp-410)	126	139	126	143		143	?	?
LG6 (Pchcms5_a)	355	355	341	341		341	?	?
LG3 (BPPCT039_a)	465	486	471	486		471	?	?
LG4 (CPSC039_a)	105	117	105	113		113	?	?
LG8 (PacA33_a)	281	281	278	281		278	?	?
LG6 (AMPA100_a)	183	201	183	195		195	?	?
LG7 (UDAp-407_a)	331	349	331	349		331 nebo 349	?	?
LG3 (ssrPaCITA10)	171	173	163	173		163	?	?
LG1 (96P10_SP6_a)	263	313	313	323		323	?	?
LG5 (CPDCT028)	160	160	151	160		151	?	?
LG2 (CPSC021_a)	285	289	279	285		279	?	?
LG1 (ssrPaCITA17_a)	363	377	363	389		389	?	?

Výskyt nulových alel při použití vybrané sady SSR markerů nemá vliv na identifikaci odrůd merunek, nicméně může znamenat značnou komplikaci při analýze příbuzenských vztahů. V případě potomka s nulovou alelu určitého markeru může dojít k nesprávnému vyřazení rodiče z příbuzenské analýzy, proto je základní snahou při navrhování primerů pro amplifikaci SSR markerů vyvarování se výskytu nulových alel, případně jsou navrženy nové primery schopné amplifikovat původně nulovou alelu. Nesprávné výsledky příbuzenských analýz lze eliminovat požadavkem, aby k vyloučení rodiče došlo pouze v případě neshody ve více lokusech, nebo vyvarováním se rozhodnutí o vyloučení příbuzenského vztahu rodič-potomek pouze na základě homozygotních markerů (Dakin a Avise, 2004).

4. SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ

Předkládaná metodika komplexně zpracovává problematiku identifikace odrůd meruněk genetickými markery. Zahrnuje popis standardizovaných metodických a analytických postupů od odběru vzorku, přes jeho uchování, zpracování, postupy molekulární detekce a vyhodnocení.

Novost postupu spočívá v zavedení velmi efektivní metody pro jednoznačné a rychlé určení pravosti odrůd meruněk. V kombinaci s v současnosti používaným klasickým fenologicko – pomologickým hodnocením dojde ke značnému zpřesnění, zjednodušení a zrychlení identifikace odrůd meruněk, což je jedním z hlavních faktorů registrace odrůdy, certifikace výsadbového materiálu a následné správné distribuce množených stromů. V současné době není v ČR k dispozici dostupná metodika zabývající se touto problematikou a ani napříč evropskými státy prozatím nevznikly standardizované protokoly pro detekci odrůd meruněk pomocí SSR markerů. Většina dosud zveřejněných informací týkajících se identifikace odrůd pomocí genetických markerů je jen dílčí a rozptýlená ve vědeckých publikacích. V nedávné době provedená a dosud největší analýza genetické diverzity, původu a šíření druhu *Prunus armeniaca* L. celosvětové kolekce meruněk pomocí 25 SSR markerů verifikovala původ a genetickou diverzitu meruňky v centrální Asii a Číně (Bourguiba et al., 2020), neumožnila však vysoké multiplexování SSR markerů v jedné reakci, neboť pro jejich amplifikaci používala původně publikované primery s typickou velikostí amplifikovaných alel 100-250 nukleotidů. V této metodice popsaná analýza 19 SSR markerů pouze ve dvou multiplexních reakcích je tak při genotypizaci meruněk velkým přínosem ať již z hlediska finančních nákladů, nižší pracnosti, časové náročnosti nebo možné chybovosti při stanovení genotypu meruňky. Nicméně studie Bourguiba et al. potvrdila i námi pozorovaný trend a spolehlivost použití vybraných SSR markerů k identifikaci odrůd.

5. POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY

Vzhledem k jednoznačnému a rychlému určení pravosti odrůd meruněk ve dvou reakcích je tato metodika vhodná ke spolehlivému určení identity odrůdy. Může být použita při každém provádění klasického fenologicko-pomologického hodnocení, které se využívá v certifikačním procesu výsadbového materiálu a při šlechtitelské práci, pro potvrzení výsledků. V některých případech (např. prodlužování registrace odrůdy) může fenologicko-pomologické hodnocení zcela nahradit. Tato metodika je vhodná také pro školkaře k ověření identity jimi produkováného a prodáváného materiálu, v tomto případě se předpokládá využití formou analýz na zakázku. Její aplikace může být rovněž přínosem pro pěstitele při podezření na záměnu materiálu. Metodika může také pomoci vyjasnit příbuzenské vztahy mezi jednotlivými odrůdami. Bez molekulárních analýz je třeba veškerý množený a šlechtěný materiál posuzovat na základě odlišností vzhledem ke kolekci standardních odrůd v odrůdové zkušebně. Udržování této kolekce je však značně prostorově, materiálně i personálně náročné. Kolekce také nemusí a fakticky ani nemůže obsahovat všechny známé odrůdy.

Vzhledem k výše uvedenému je tato metodika určena zejména certifikačnímu orgánu ÚKZÚZ k zpřesnění procesu certifikace a šlechtitelům pro rutinní testování genotypu vyšlechtěných hybridů a ověření jejich původu. Případné využití se nabízí i pro pěstitele meruněk v případech ověření pěstovaných odrůd či obchodníky v případech prodeje a další distribuce odrůd.

6. EKONOMICKÉ ASPEKTY

V ovocnářství je identita množného a vysazovaného materiálu velmi důležitá, jelikož se jedná o takzvané trvalé kultury. Při výsadbě nesprávné odrůdy v produkčním sadu a identifikaci chyby po 3 letech dojde u meruněk s průměrným výnosem 2,2 t/ha a výkupní cenou 30 Kč/kg meruněk ke ztrátě majitele 198 000 Kč/ha za toto období. Ceny a výnosy jsou orientační a závislé na odrůdě, jsou uvedeny dle Zpráv o trhu ovoce SZIF. Kromě těchto ztrát má nesprávné označení odrůdy nezanedbatelný ekonomický dopad na pěstitele v podobě potřeby nově osázet sad, což vyjde u peckovin zhruba na 300 000 Kč/ha. Majitel sadu pak může požadovat náhradu na prodejci stromků, je proto zájmem všech producentů pracovat s ověřeným materiálem. Dále mohou genotypizaci využít i šlechtitelé, kterým náleží licenční poplatky. Při jejich orientační výši 15-20 Kč/stromek dojde při neoprávněném namnožení a prodeji 1000 kusů stromků ke ztrátě majitele práv 15 000-20 000 Kč. V případě zjištění neoprávněného pěstování licencované odrůdy kontrolou hrozí pěstiteli, eventuálně množiteli, další sankce vyplývající z licenčních smluv.

Časově, prostorově, materiálně i personálně náročný klasický způsob ověření pravosti odrůdy založený na několikaletém fenologickém a pomologickém subjektivním hodnocení může pomoci zrychlit a zefektivnit metoda určení identity jednotlivých odrůd meruněk pomocí ověřené sady SSR markerů a vytvořeného souboru referenčních odrůd včetně jejich genetických profilů. Zavedení této metodiky do praxe zjednoduší a zpřesní proces identifikace neznámých odrůd meruněk, umožní ověření původu šlechtěného hybridního materiálu a může pomoci vyjasnit příbuzenské vztahy mezi jednotlivými odrůdami. Pro tuto analýzu je třeba pouze malé množství materiálu, např. list nebo lýko, a je tedy možné ji provádět celoročně. Výsledky jsou dostupné v řádu několika málo hodin, což značně zrychlí celou identifikaci. Navíc i cenově může být molekulárně genetická analýza velmi zajímavou alternativou ke klasickým ověřovacím zkouškám, kdy za rok zkoušek DUS je účtováno 3500 Kč. Výsledná cena genotypizace se předpokládá nižší, jelikož cena materiálu pro jednu analýzu SSR markery vychází na 340 Kč (90 Kč izolace 1 vzorku DNA, 250 Kč provedení fragmentační analýzy podle této metodiky – 2 multiplexní reakce na 1 vzorek). Uvedená částka však neuvažuje personální náklady, amortizaci přístrojů a podobně, které tvoří také velmi podstatnou část nákladů, navíc je třeba zohlednit i současnou analýzu potřebných kontrol. Výsledná cena proto bude záviset na počtu současně analyzovaných vzorků a bude tak stanovována individuálně, přesto by v celkové ceně fragmentační analýza měla být levnější než DUS testy. V neposlední řadě

mezi výhody molekulární analýzy patří možnost ji provést během několika hodin již od stádia semenáče. Pro klasické hodnocení je třeba mít rok k dispozici plodící materiál, protože posouzení vlastností plodů patří mezi základní hodnotící kritéria.

V námi předkládané metodice bylo díky výrazným velikostním odlišnostem mezi jednotlivými SSR markery možné celou analýzu zredukovat na dvě reakce, což fragmentační analýzu výrazně zrychluje a zlevňuje (cca o 150 Kč jen u materiálu, nejvyšší položkou jsou však ostatní náklady typu osobní náklady, amortizace,...). V klasickém uspořádání analýz SSR markerů jsou totiž v jednom multiplexu analyzovány 4 SSR markery značené 4 různými fluorescenčními barvami, tudíž pro stanovení identity jedné odrůdy pomocí 19 SSR markerů v klasickém uspořádání by bylo potřeba vyhodnotit 5 analýz.

Tato metodika podrobně popisuje postup identifikace jednotlivých odrůd meruněk pomocí SSR markerů včetně použitých reagentů, lze však předpokládat, že někteří uživatelé metodiky budou chtít raději využít již předmíchaných sad primerů pro fragmentační analýzu. Výnos z prodeje těchto sad pak bude příjmem pro VŠÚO Holovousy. Předpokládá se cena v rozmezí 13 000 až 15 000 Kč za ověřenou předmíchanou sadu primerů včetně kontrolních DNA 8 referenčních odrůd, vystačující pro analýzu 100 vzorků DNA.

Další příjem může laboratoř generovat prováděním analýz pomocí SSR markerů formou služby pro externí zákazníky. Cena za analýzu bude stanovena se zohledněním všech faktorů, které ovlivňují náklady na provedení testu, tedy včetně práce, energie a amortizace využívaných přístrojů, a na základě aktuálního zájmu ze strany zákazníků.

7. SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY

- Aranzana, M. J., Garcia-Mas, J., Carbo, J., Arus, P. (2002): Development and variability analysis of microsatellite markers in peach. *Plant Breeding* 121: 87-92.
- Bailey, C. H., Hough, L. F. (1975): Apricots. In: Janick J, Moore JN (eds) *Advances in Fruit Breeding*. Purdue University Press, West Lafayette, Indiana USA.
- Bourguiba, H., Scotti, I., Sauvage, Ch., Zhebentyayeva, T., Ledbetter, C., Krška, B., Remay, A., D'Onofrio, C., Iketani, H., Christen, D., Krichen, L., Trifi-Farah, N., Liu, W., Roch, G., Audergon, J. M. (2020): Genetic structure of a worldwide germplasm collection of *Prunus armeniaca* L. reveals three major diffusion routes for varieties coming from the species' centre of origin. *Front. Plant Sci.* 11: 638.
- Brookfield, J. F. (1996): A simple new method for estimating null allele frequency from heterozygote deficiency. *Molecular Ecology* 5: 453-455.
- Buchtová, I. (2020): Situační a výhledová zpráva. *Ovoce*. 91 stran. ISBN 978-80-7434-526-5. Dostupné online: http://eagri.cz/public/web/file/643716/SVZ_Ovoce_12_2019.pdf
- Cipriani, G., Lot, G., Huang, W. G., Marrazzo, M. T., Peterlunger, E., Testolin, R. (1999): AC/GT and AG/CT microsatellite repeats in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch]: isolation, characterization and cross-species amplification in *Prunus*. *Theoretical and Applied Genetics* 99: 65-72.
- Dakin, E. E., Avise, J. C. (2004): Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredity* 93: 504-509.
- Databáze genetických zdrojů rostlin. Dostupné online: <https://grinczech.vurv.cz/gringlobal/search.aspx>
- Decroocq, V., Favé, M. G., Hagen, L., Bordenave, L., Decroocq, S. (2003): Development and transferability of apricot and grape EST microsatellite markers across taxa. *Theoretical and Applied Genetics* 106: 912-922.
- Dirlewanger, E., Cosson, P., Tavaud, M., Aranza, M. J., Poizat, C., Zanetto, A., Arús, P., Laigret, F. (2002): Development of microsatellite markers in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] and their use in genetic diversity analysis in peach and sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 105: 127-138.
- Hagen, L. S., Chaib, J., Fady, B., Decroocq, V., Bouchet, P., Lambert, P., Audergon, J. M. (2004): Genomics and cDNA microsatellites from apricot (*Prunus armeniaca* L.). *Molecular Ecology Notes* 4: 742-745.

- Hokanson, S. C., Lamboy, W. F., Szewc-McFadden, A. K., McFerson, J. R. (2001): Microsatellite (SSR) variation in a collection of *Malus* (apple) species and hybrids. *Euphytica* 118: 281-294.
- Hu, X., Zheng, P., Ni, B., Miao, X., Zhao, Z., Li, M. (2018): Population genetic diversity and structure analysis of wild apricot (*Prunus armeniaca* L.) revealed by SSR markers in the Tien-Shan mountains of China. *Pakistan Journal of Botany* 50(2): 609-615.
- Kostina, K. F. (1931): Kultura abrikosa v Ferganskoj doline. Trudi po prikl. Botan. Gen. Selec. tom. III, XXV, 4.
- Kostina, K. F. (1969): The use of varietal resources of apricots for breeding. Trud. Nikit. Bot. Sad. 40: 45–63.
- Kostina, K. F. (1972): Introdukcija i selekcija abrikosa. Selskochozjajstvennaja biologija, Tom VII, No.1, Kolos Moskva: 86-91.
- Kostina, K. F. (1977) Apricot Breeding under conditions of USSR South. *Acta Hort.* 85/1:190-194.
- Kozderová, V. (2020): Situační a výhledová zpráva. Květiny a okrasné rostliny. 53 stran. ISBN 978-80-7434-517-3. Dostupné online: http://eagri.cz/public/web/file/648278/SVZ_KVOKR_12_2019.pdf
- Li, M., Zheng, P., Ni, B., Hu, X., Miao, X., Zhao, Z. (2018): Genetic diversity analysis of apricot cultivars grown in China based on SSR markers. *Eur J Hort Sci*, 83(1): 18-27.
- Lopes, M. S., Sefc, K. M., Laimer, M., Da Camara Machado, A. (2002): Identification of microsatellite loci in apricot. *Molecular Ecology Notes* 2: 24-26.
- Messina, R., Lain, O., Marrazzo, M. T., Cipriani, G., Testolin, R. (2004): New set of microsatellite loci isolated in apricot. *Molecular Ecology Notes* 4: 432-434.
- Mnejja, M., Garcia-Mas, J., Howad, W., Badenes, M. L., Arus, P. (2004): Simple-sequence repeat (SSR) markers of Japanese plum (*Prunus salicina* Lindl.) are highly polymorphic and transferable to peach and almond. *Molecular Ecology Notes* 4: 163-166.
- Paunović, S. A. (1988): Apricot Germplasm, Breeding, Selection, Rootstock and Environmental. *Acta Horticulturae* 209: 13-28.
- Povolná, A. (2019): Metodika zkoušek odlišnosti, uniformity a stálosti. 21 stran. Online dostupné online: http://eagri.cz/public/web/file/630860/Metodika_ZOUS1_obecna_cast_5_vyd_final.pdf
- Saito, M., Konda, M., Vrinten, P., Nakamura, K., Nakamura, T. (2004): Molecular comparison of waxy null alleles in common wheat and identification of a unique null allele. *Theoretical and Applied Genetics*, 108 (7): 1205-1211.

- Schlötterer, C. (2004): The evolution of molecular markers – just a matter of fashion? *Nature Reviews Genetics* 5(1): 63-69.
- Seznam odrůd zapsaných ve Státní odrůdové knize ke dni 15. června 2020: Věstník Ústředního kontrolního a zkušebního ústavu zemědělského. Řada Národní odrůdový úřad XIX: 3. Dostupné online: http://eagri.cz/public/web/file/656937/_32020.pdf
- Smykov, V. K. (1989): *Abrikos*. VO Agropromizdat. 239 stran. ISBN 5-10-001370-2.
- Soriano, J. M., Domingo, M. L., Zuriaga, E., Romero, C., Zhebentyayeva, T., Abbott, A. G., Badenes, M. L. (2012): Identification of simple sequence repeat markers tightly linked to plum pox virus resistance in apricot. *Molecular Breeding* 30: 1017-1026.
- Sosinski, B., Gannavarapu, M., Hager, L. D., Beck, L. E., King, G. J., Ryder, C. D., Rajapakse, S., Baird, W. V., Ballard, R. E., Abbott, A. G. (2000) Characterization of microsatellite markers in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch]. *Theoretical and Applied Genetics* 101: 421-428.
- Testolin, R., Marrazzo, T., Cipriani, G., Quarta, R., Verde, I., Dettori, M. T., Pancaldi, M., Sansavini S. (2000): Microsatellite DNA in Peach (*Prunus persica* L. Batsch) and its use in fingerprinting and testing the genetic origin of cultivars. *Genome* 43: 512-520.
- Vavilov, N. I. (1926). Studies on the origin of cultivated plants. Inst. Bot. Appl. et d'Amélior. des Plantes. State Press, Leningrad. (In Russian and English).
- Zpráva o trhu ovoce. Ročník XXV., čtrnáctideník 15.1.2021. Dostupné online: https://www.szif.cz/cs/CmDocument?rid=%2Fapa_anon%2Fcs%2Fzpravy%2Ftis%2Fzpravy_o_trhu%2F06%2F1610979442696.pdf

8. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE

- Nekvindová, V., Žďárská, I., Čmejlová, J. (2020): Využití genetických markerů pro ověření odrůdové identity meruněk. *Úroda, vědecká příloha časopisu* 12: 85–92. ISSN 0139-6013.
- Žďárská, I., Nekvindová, V. (2020): Ověřování odrůdové identity meruněk. *Zahradnictví* 19 (12): 41–42. ISSN 1213-7596.

9. PŘÍLOHA

DELTA

- Typ růstu stromu:* růst bujný, rozložitá koruna s dlouhými větvemi
- Doba kvetení:* raná odrůda
- Zralost:* 10 dnů před odrůdou 'Velkopavlovická'
- Plodnost:* brzká, velká a pravidelná
- Plod:* střední až velký, srdčitý až mírně válcovitý, povrch slabě hrbolkovitý, základní barva světle oranžová, matná, s červeným líčkem ve formě jednotlivých skvrn. Dužnina je sytě oranžová, jemná, měkká, šťavnatá s příjemně navinulou dobrou chutí a odlučitelná od pecky.
- Odolnost k chorobám:* střední vůči napadení houbovými chorobami. Tolerantní na šarku.
- Poznámka:* střední až vysoká odolnost proti pozdním jarním mrazům, lze ji však pěstovat ve všech polohách, půdy vyžaduje úrodné. Odrůda je oblíbená především na malých zahrádkách, vhodná pro přímý konzum i konzervářské zpracování.



GAMA

- Typ růstu stromu:* růst bujný s rozložitou, středně hustou korunou
- Doba kvetení:* středně raná odrůda
- Zralost:* téměř současná s odrůdou 'Velkopavlovická'
- Plodnost:* brzká, střední a pravidelná
- Plod:* velký, kuželovitý až protáhlý tvar plodu, mírně hrbolatý povrch se slabě plstnatou pevnou slupkou, základní barva oranžová s větším červeným líčkem a tečkami. Dužnina je oranžová, středně tuhá až tuhá, dobré, sladce navinulé, aromatické chuti, málo šťavnatá, hůře odlučitelná od pecky.
- Odolnost k chorobám:* střední vůči houbovým chorobám
- Poznámka:* vysoká odolnost proti pozdním jarním mrazům, středně náročná na polohu pěstování, půdy vyžaduje úrodné a dobře zásobené vláhou. Plody jsou vhodné především pro přímý konzum.



GOLDRICH

- Typ růstu stromu:* středně silný až silný, vzpřímený
Doba kvetení: raná odrůda, částečně samosprašná
Zralost: 5-7 dní před odrůdou 'Velkopavlovická'
Plodnost: raná, vysoká a pravidelná
Plod: velmi velký, oválného tvaru, základní barva žlutooranžová s hladkou slupkou. Dužnina je oranžová, s dobrou odlučitelností od pecky a dobrou chutí.
Odolnost k chorobám: citlivější vůči moniliové hnilobě, tolerantní k šarce
Poznámka: vysoká mrazuodolnost. Velmi vhodná odrůda pro intenzivní systémy pěstování i do okrajových oblastí pěstování meruněk.



HAROGEM

- Typ růstu stromu:* středně silný až silný, otevřená a řídká koruna
- Doba kvetení:* pozdní odrůda
- Zralost:* 8 dní po odrůdě 'Velkopavlovická'
- Plodnost:* vysoká až velmi vysoká a pravidelná, při přeplození nutná probírka plodů
- Plod:* střední, kuželovitý, základní barva oranžová se zářivě červeným velkým líčkem, slupka slabě hrbolkovitá. Dužnina je tuhá, oranžová, středně šťavnatá, s dobrou odlučitelností od pecky. Chuť je navinule sladká, aromatická, velmi dobrá.
- Odolnost k chorobám:* vůči houbovým chorobám středně odolná ve dřevě, v pupenech a květech velmi odolná
- Poznámka:* stromy vyžadují použití intenzivních pěstitelských technologií. Vhodná odrůda do všech oblastí vhodných k pěstování meruněk, včetně okrajových oblastí s chráněným stanovištěm. Plody vhodné pro přímý konzum i konzervářské zpracování.



KOMPAKTA

<i>Typ růstu stromu:</i>	středně silný, kompaktní habitus
<i>Doba kvetení:</i>	středně raná odrůda, samosprašná
<i>Zralost:</i>	2 dny před odrůdou 'Velkopavlovická'
<i>Plodnost:</i>	raná, vysoká, pravidelná
<i>Plod:</i>	malý až střední, kulovitý tvar plodu, základní barva světle oranžová se slabě viditelným červeným líčkem. Dužnina je oranžová, měkká, středně šťavnatá, sladká, dobrá. Odlučitelnost od pecky dobrá.
<i>Odolnost k chorobám:</i>	střední vůči moniliové hnilobě
<i>Poznámka:</i>	vysoce odolná vůči mrazům, vhodná do okrajových oblastí pěstování meruněk, nenáročná odrůda



LESKORA

- Typ růstu stromu:* středně vzrůstný s vznosně vzpřímenou, středně hustou korunou
- Doba kvetení:* velmi raná odrůda, částečně cizosprašná
- Zralost:* 16 dní před odrůdou 'Velkopavlovická'
- Plodnost:* raná, pravidelná, vyšší než u odrůdy 'Velkopavlovická', v letech s nadměrnou násadou plodů vyžaduje probírku
- Plod:* středně velký, mírně oválného tvaru, základní barva slupky je oranžová s jasným červeným líčkem. Dužnina je oranžová, středně tuhá, ale šťavnatá, velmi dobré, typicky meruňkové, aromatické chuti. Odlučitelnost od pecky dobrá.
- Odolnost k chorobám:* květní pupeny jsou mrazuodolnější než u odrůdy 'Velkopavlovická', středně odolná ke gnomonii a monilii
- Poznámka:* plody určeny především pro přímý konzum, méně vhodná ke kompotování



PALAVA

- Typ růstu stromu:* bujný s mírně otevřenou korunou
Doba kvetení: středně raná odrůda, samosprašná
Zralost: 5 dnů před odrůdou 'Velkopavlovická'
Plodnost: raná, vysoká, pravidelná
Plod: střední, válcovitý tvar plodu, základní barva oranžová se světle červeným líčkem. Dužnina je oranžová, pevná, navinule sladká, aromatická, dobrá. Odlučitelnost od pecky dobrá.
Odolnost k chorobám: střední vůči houbovým chorobám i proti mrazu v květu
Poznámka: středně náročná na polohu, půdy vyžaduje úrodné a dobře zásobené vláhou, plody dobré konzervářské kvality



VESTAR

- Typ růstu stromu:* méně vzrůstný s vzdušnými a řidšími korunami, vzpřímeného habitu
- Doba kvetení:* středně raná odrůda, současně s 'Velkopavlovickou'
- Zralost:* 5 dnů po odrůdě 'Velkopavlovická'
- Plodnost:* středně raná, plodný potenciál odrůdy vysoký
- Plod:* středně velký až velký, srdcovitý tvar plodu se zaobleným vrcholem, středně hluboký šev rozděluje plod na dvě souměrné poloviny. Základní barva světle oranžová s celistvým bledě červeným líčkem na slunečné straně. Dužnina je oranžová, tuhá, středně šťavnatá, velmi dobré aromatické chuti. V nepříznivých letech je dužnina částečně přilnavá k pece.
- Odolnost k chorobám:* mimořádná náchylnost na houbové choroby nebyla zjištěna, patří k mrazuodolnějším odrůdám
- Poznámka:* hodí se do všech poloh na pěstování meruněk, nemá speciální nároky na agrotechniku a stanoviště, vhodná především pro přímý konzum



Ministerstvo zemědělství, odbor zemědělských komodit, Těšnov 65/17, Praha 1, 110 00

v y d á v á

OSVĚDČENÍ

(MZE-47289/2021)

o uznání metodiky v souladu s podmínkami Metodiky hodnocení výzkumných organizací a účelové podpory výzkumu, vývoje a inovací, schválené usnesením vlády dne 8. února 2017, číslo 107 a její samostatné přílohy č. 4 schválené usnesením vlády dne 29. listopadu 2017 č. 837.

Název metodiky: **Metodika identifikace odrůd meruňky obecné (*Prunus armeniaca* L.) pomocí SSR markerů**

Autoři: **Veronika Nekvindová a kol.**

Název organizace: **VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOCNÁŘSKÝ HOLOVOUSY s.r.o.**

Místo vydání: **VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOCNÁŘSKÝ HOLOVOUSY s.r.o.**

Rok vydání: **2021**

ISBN: **978-80-87030-84-4**

Metodika byla vypracována v rámci výzkumného projektu TAČR č. TJ02000071 – Využití genetických markerů pro ověření odrůdové identity meruněk

V Praze dne: 12. 8. 2021

Jméno zástupce odborného útvaru státní správy:

Funkce zástupce odborného útvaru státní správy:

Ing. Miroslava Czetmayer Ehrlichová

ředitelka odboru zemědělských komodit




Podpis zástupce odborného útvaru
státní správy

Souhlas ředitele Odboru vědy, výzkumu a vzdělávání MZe:

V Praze dne: 16. 9. 2021


Mgr. Jan Radoš

Metodika identifikace odrůd meruňky obecné (*Prunus armeniaca* L.) pomocí SSR markerů

Autoři: Ing. Veronika Nekvindová, Ph.D., Ing. Ivona Žďárská, Ing. Pavol Suran,
prof. Dr. Ing. Boris Krška, RNDr. Jana Čmejlová, Ph.D.

Vydal: VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOCNÁŘSKÝ HOLOVOUSY s.r.o.

Grafická úprava, sazba a tisk: ŽAKET – KARTOGRAFICKÉ VYDAVATELSTVÍ A TISKÁRNA

ISBN 978-80-87030-84-4



ISBN 978-80-87030-84-4



VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOCNÁŘSKÝ HOLOVOUSY, S. R. O.

© 2021