

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra genetiky a šlechtění



**Česká zemědělská
univerzita v Praze**

**Identifikace odrůd peckovin pomocí mikrosatelitních
markerů**

Bakalářská práce

**Monika Vandová
Rostlinná produkce**

Ing. Petr Sedlák, Ph.D.

© 2021 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Identifikace odrůd peckovin pomocí mikrosatelitních markerů" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 1. 4. 2021

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Petru Sedlákoví, Ph.D. za cenné rady, které mi při psaní mé bakalářské práce trpělivě poskytoval, Ing. Daniele Čílové a Mgr. Martině Melounové, Ph.D. za pomoc s pokusy v Laboratoři genetických analýz. Dále bych ráda poděkovala Ing. Vladimíře Sedlákové, Ph.D. za pomoc při tvorbě multiplexů.

Identifikace odrůd peckovin pomocí mikrosatelitních markerů

Souhrn

Cílem teoretické části bakalářské práce bylo popsat obecnou charakteristiku třešní a meruněk, problematiku identifikace odrůd peckovin (*Prunus* L.) a metody DNA analýzy mikrosatelitními markery. Z literární rešerše vyplývá, že se problematika mikrosatelitních markerů studuje dostatečně, ale molekulární techniky nejsou zákonem schváleny pro identifikaci a schvalování odrůd. Identifikace kultivarů je založena na morfologických vlastnostech, ačkoli obecně DNA markery umožňují přesnější identifikaci genotypů rostlin, a tak jsou také využitelné pro charakterizaci ovocných stromů. Literární zdroje jsou v tomto ohledu velmi bohaté, mikrosatelitní markery se při studiu rostlin využívají již od počátku 90. let 20. století a je dostupné obsáhlé množství studií. Obecně byly zhodnoceny studie mikrosatelitních markerů použitých k identifikaci rodu *Prunus*.

Cílem experimentální části práce bylo zjistit možnost mezidruhové přenositelnosti SSR markerů. SSR markery využívané k charakterizaci *Prunus avium* byly použity pro identifikaci odrůd *Prunus armeniaca*. Sada markerů tvořila 11 mikrosatelitů vyvinutých pro *Prunus persica* a *Prunus avium*, jejichž amplifikační produkty byly použity ke studiu identifikace 19 klonů *Prunus armeniaca* a 2 *Prunus avium*. Výsledky získané fragmentační analýzou byly zpracovány programem DARwin 6.0 do příbuzenského dendogramu a statisticky vyhodnoceny programem GenAlEx 6.5, který poskytl informace o klonové identitě vzorků a frekvenci alel populací v jednotlivých lokusech. Statistickým vyhodnocením byla hypotéza práce potvrzena. Sada 11 mikrosatelitních markerů identifikovala 30 rozdílných alel u vzorků *Prunus avium* a výsledky analýzy umožnily vyhodnotit genetickou variabilitu odrůd *Prunus armeniaca*. Mikrosatelitní markery byly zhodnoceny z hlediska vhodnosti pro identifikaci odrůd *Prunus armeniaca*. Nejvyšší alelickou variabilitu vykazovaly markery UDP98-412 (8 alel), PS12A02L (7 alel) a EMPaS05 (6 alel). Za nejméně vhodné markery pak lze považovat EMPaS10L a PceGA34L se 3 identifikovanými alelami. Obecně lze potvrdit, že kombinace 11 daných mikrosatelitů byla pro identifikaci dostačující.

Klíčová slova: *Prunus*, DNA analýza, SSR primery, mikrosatelitní lokusy

Identification of Stone Fruit Varieties Using Microsatellite Markers

Summary

The theoretical part of the thesis aims to describe the general characteristics of cherries and apricots, the stone fruit varieties (*Prunus* L.) identification and DNA analysis methods using microsatellite markers. The literature search shows that the issue of microsatellite markers is sufficiently studied, but molecular techniques are not approved by law for the identification and varieties approval. The identification of cultivars is based on morphological features, although DNA markers, in general, allow more accurate identification of plant genotypes, thus are also useful for the characterization of fruit trees. Literary sources are comprehensive, microsatellite markers have been used in the study of plants since the early 1990s, and a large number of studies is available. In general, studies of microsatellite markers used to identify the genus *Prunus* have been evaluated.

The experimental part aims to determine the possibility of interspecific transferability of SSR markers. The SSR markers used to characterize *Prunus avium* were used to identify *Prunus armeniaca* varieties. The marker set consisted of 11 microsatellites developed for *Prunus persica* and *Prunus avium*, whose amplification products were used to study the identify 19 *Prunus armeniaca* and 2 *Prunus avium* clones. The results obtained by fragment analysis were processed by DARwin 6.0 into the kinship dendrogram and statistically evaluated by the GenAlEx 6.5 program, which provided clonal identity information of samples and the frequency of alleles in populations. The hypothesis of the work was confirmed by statistical evaluation. A set of 11 microsatellite markers identified 30 different alleles in *Prunus avium* samples, and the results of the analysis made it possible to evaluate the genetic variability of *Prunus armeniaca* varieties. Microsatellite markers were evaluated for suitability for the identification of *Prunus armeniaca* varieties. The markers UDP98-412 (8 alleles), PS12A02L (7 alleles) and EMPaS05 (6 alleles) showed the highest allelic variability. EMPaS10L and PceGA34L with 3 identified alleles can be considered the least suitable. In general, it was confirmed that the combination of 11 used microsatellites was sufficient for identification.

Keywords: *Prunus*, DNA analysis, SSR primers, mikrosatellite loci

Obsah

1 Úvod	8
2 Vědecká hypotéza a cíle práce	9
2.1 Vědecká hypotéza.....	9
2.2 Cíle práce	9
3 Literární rešerše.....	10
3.1 Rod Prunus	10
3.2 Prunus avium.....	10
3.2.1 Taxonomické zařazení	10
3.2.2 Historie	10
3.2.3 Charakteristika	11
3.2.4 Odrůdy	11
3.2.5 Pěstování.....	11
3.2.6 Produkce a využití	12
3.3 Prunus armeniaca	13
3.3.1 Taxonomické zařazení	13
3.3.2 Historie	13
3.3.3 Charakteristika	13
3.3.4 Odrůdy	14
3.3.5 Pěstování.....	14
3.3.6 Produkce a využití	15
3.4 Současný stav identifikace odrůd	16
3.4.1 UPOV směrnice pro identifikaci odrůd peckovin	16
3.4.2 Odrůdová pravost.....	17
3.5 Genetické markery.....	18
3.5.1 Techniky založené na restriční analýze a hybridizaci	19
3.5.2 Techniky založené na amplifikaci pomocí PCR.....	19
Mikrosatelitní markery	19
3.6 Systémy studia variability pomocí SSR u peckovin.....	21
4 Metodika	22
4.1 Materiál.....	22
4.1.1 Rostlinný materiál.....	22
4.1.2 Primery	22
4.2 Metody.....	24
4.2.1 Izolace DNA	24
4.2.2 Hodnocení kvality DNA	25
4.2.3 Singleplex PCR.....	25

4.2.4	Agarózová elektroforéza	25
4.2.5	Multiplex PCR	26
4.2.6	Kapilární elektroforéza	27
4.3	Zpracování dat	27
5	Výsledky	28
5.1	Spektrofotometrie	28
5.2	Výsledky optimalizace	28
5.3	Kapilární elektroforéza a statistické vyhodnocení.....	29
6	Diskuze	35
7	Závěr.....	38
8	Literatura.....	39
9	Internetové zdroje	44

1 Úvod

Rod *Prunus* zahrnuje více než 400 druhů keřů a stromů z čeledi růžovité (*Rosaceae*). Má řadu ekonomicky důležitých zástupců, jako broskvoně, meruňky, třešně a švestky. Mnoho druhů navíc bujně kvete a je pěstováno jako okrasné rostliny.

Meruňka si získává stále větší zájem spotřebitelů díky své nutriční a pomologické hodnotě. Plody jsou bohaté na vitamíny a minerály, obsahují například beta karoten, vitamín C nebo vitamín B. Jsou také zdrojem draslíku a železa, které přispívají ke správné činnosti cév a srdce. Meruňky však bývají náchylné na choroby (především šarka švestky virového původu) a úroda je často ohrožena jarními mrazíky. Každoroční výnosy tedy během let značně kolísají. V roce 2018 byla světová produkce meruněk o 895 024 tun nižší než v roce 2017 (FAO 2019).

Třešně jsou významné především díky své chuti a značnému obsahu fenolických sloučenin, které mají antioxidační účinky. Konzumace jak čerstvých plodů, tak šťávy snižuje krevní tlak a zvyšuje množství hemoglobinu v krvi. Plody však brzy po sklizni podléhají zkáze a vzhledem k omezené trvanlivosti dochází velmi často k tomu, že se na trh nedostávají ve vyhovující kvalitě. Světová produkce třešní byla v roce 2019 2 595 812 tun (FAO 2019).

Metody identifikace odrůd peckovin jsou u nás úředně limitovány pouze na vegetační zkoušky, které sice dosahují požadovaných výsledků, ale trvají zpravidla dvě vegetační období. Pokud by došlo k akceptování metod molekulární biologie, mohly by být využívány stejně jako vegetační zkoušky a celý proces identifikace významně urychlily. Strukturu populací na genetické úrovni lze společně s variabilitou určit pomocí DNA markerů, nukleotidových sekvencí, které umožňují zkoumat úroveň polymorfismu mezi dvěma jedinci. Jedním z typů DNA markerů jsou markery mikrosatelitní, kterými se zabývá i tato bakalářská práce. Zdárně se již několik let využívají při identifikaci jedinců. Dle Koreckého et al. (2017) je při jejich použití, na rozdíl od jiných molekulárních markerů, detekovaný polymorfismus obvykle vyšší.

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

2.1 Vědecká hypotéza

Mikrosatelitní markery, využívány pro charakterizaci genetické variability třešní, je taktéž možné využít pro identifikaci odrůd meruněk.

2.2 Cíle práce

Cílem teoretické části této práce je vypracovat ucelenou literární rešerši zaměřenou obecnou charakteristiku třešní a meruněk, problematiku identifikace odrůd peckovin (*Prunus* L.) a metody DNA analýzy se zaměřením na DNA mikrosatelitní.

Cílem experimentální části je izolovat DNA pomocí extrakčního kitu ze vzorků odebraného rostlinného materiálu a aplikovat panel mikrosatelitních markerů na vybrané izolované vzorky meruněk a třešní. Výsledky analýzy vyhodnotit z hlediska počtu zjištěných alel na odrůdy třešní a z pohledu převoditelnosti analýzy na hodnocení variability genotypů meruněk.

3 Literární rešerše

3.1 Rod *Prunus*

Rod *Prunus* L. zahrnuje ekonomicky důležité druhy jako třešně (*Prunus avium* L.), višně (*Prunus cerasus* L.), broskvoně (*Prunus persica* Batsch.), meruňky (*Prunus armeniaca* L.), mandloně (*Prunus amygdalus* Batsch.), švestky (*Prunus domestica* L.) a slivoň myrobalán (*Prunus cerasifera* Ehrh.). Patří do čeledi růžovité (*Rosaceae*), která se v mírných podnebných oblastech řadí ke třetí nejvíce agronomicky významné čeledi rostlin (Dirlewanger et al. 2002).

3.2 *Prunus avium*

3.2.1 Taxonomické zařazení

Říše: rostliny (*Plantae*)

Podříše: cévnaté rostliny (*Tracheobionta*)

Oddělení: krytosemenné (*Magnoliophyta*)

Třída: vyšší dvouděložné rostliny (*Rosopsida*)

Řád: růžotvaré (*Rosales*)

Čeleď: růžovité (*Rosaceae*)

Rod: slivoň (*Prunus*)

Druh: třešeň obecná (*Prunus avium*)

(Kutina 1991).

3.2.2 Historie

Třešeň obecná má společně s višní obecnou původ ve střední Evropě a v oblastech kolem Černého a Kaspického moře (Simmonds & Preedy 2016). Jiné historické zdroje tvrdí, že je do Evropy přivezli Římané z Malé Asie začátkem našeho letopočtu. Plané formy třešně se v Evropě nejvíce nacházely ve Švýcarsku a v jižních oblastech bývalé Ruské federace, ve Španělsku, Itálii a jižní Evropě (Výzkumný a šlechtitelský ústav ovocnářský Holovousy 2015). První archeologické důkazy existence pochází z pecek nalezených v jeskyních v různých částech Evropy a jsou datovány do pátého až čtvrtého tisíciletí před naším letopočtem (Simmonds & Preedy 2016).

3.2.3 Charakteristika

Třešeň vyrůstá v mohutný strom, většinou se širokou, rozložitou a vysokou korunou. Rašící listy jsou z počátku načervenalé a na dotyk lepkavé. Listová čepel je podlouhlá, někdy opakvejitého tvaru s delším protáhlým hrotem na konci, se sotva pozorovatelným trnem. Listy mají délku od 10 do 50 cm. Květy jsou sestavené do jednoduchého okolíku a jasně bílé, rozlišujeme na nich zelené kališní lístky a bílé korunní plátky (Bakša & Smatana 1990).

Peckovice jsou kulovité a lysé s nasládlou dužninou. Velikost plodů závisí na odrůdě, stanovišti, intenzitě pěstování i velikosti násady: 10 plodů váží 30 až 90 g (Ferkl 1958).

3.2.4 Odrůdy

Z pomologického hlediska se odrůdy třešně dělí podle tuhosti dužniny, barvy a tvaru plodu na:

- Srdcovky (měkká dužnina, tenká slupka, červený až černý plod, většinou zrají raně)
 - Polochrupky (polotuhá dužnina)
 - Tmavé chrupky (tuhá dužnina, pevná slupka, plody světle červené až černé, jsou pozdě zrající)
 - Pestré chrupky (žlutá až červená barva plodu)
 - Světlé chrupky (žlutá barva plodu)
- (Richter 2004).

Ke dni 15. 6. 2020 je ve Státní odrůdové knize České republiky zapsáno 31 plodových odrůd a 6 podnoží třešně (ÚKZÚZ 2020).

3.2.5 Pěstování

Půdní druh spolu s množstvím vláhy hraje důležitou roli pro kvantitu a kvalitu sklizně. Obecně se doporučují hlinitopísčité půdy, vyhovují i půdy šterkovité, se zvětralým podkladem, pokud nejsou příliš suché (Boček 2015). Třešním se daří i v polohách značně vysokých, pokud jde o polohy chráněné a s vhodnou půdou. Ve vyšších polohách jsou třešně méně napadány vrtulí třešňovou, bývají ovšem více ohroženy praskáním plodů a namrzáním dřeva (Kutina 1991).

Třešně jsou diploidní s osmi páry chromozomů a cizosprašné (Dvořák 1978). Vykazují gametofytickou autoinkompatibilitu, celkem běžný genetický mechanismus, který znemožňuje samooplození (Sharma et al. 2017).

Pro úspěšné pěstování je tedy nutné zvolit kombinaci schopnou vzájemného oplození. Odrůdy lze rozdělit podle období kvetení na rané, středně rané, středně pozdní a pozdní. Délka doby kvetení se odvíjí od povětrnostních podmínek a během let se může lišit (Vávra 2018). V současné době se u nás i v zahraničí objevují i odrůdy samosprašné jako Halka nebo Lapins. Při výsadbě je nutné pamatovat na kombinování odrůd, které kvetou současně a vzájemně se i oplodňují (Jan 2011). Odrůdami, které se vzájemně neoplodňují, jsou například: Velká černá chrupka × Napoleonova, Napoleonova × Františkova, Lyonská × Ramon Oliva. Pro výsadbu se proto volí aspoň tři odrůdy různých intersterilních skupin (Boček 2015).

Zralé plody jsou šťavnaté, aromatické a méně tuhé. Vyhovující dobu zralosti lze nejlépe určit podle jejich typické barvy (Jan 2011). Koncem května začínáme česat některé rané odrůdy, pozdně zrající chrupky se se dobírají až v polovině července, ve vyšších polohách se může sklizeň prodloužit (Sus & Blažek 2002). Třešně jsou řazeny do tzv. třešňových týdnů podle období dozrávání. Dozráváním Rychlice německé začíná první třešňový týden od konce května do poloviny června. Období končí v 8. - 9. třešňovém týdnu, kdy dozrává Morela pozdní (Bakša & Smatana 1990).

3.2.6 Produkce a využití

Třešně jsou velmi oblíbené ovoce zejména pro své chuťové vlastnosti, ranost, a vzhledem k výsledkům nedávných výzkumů mají díky obsahu nejrůznějších pozitivně působících látek dobrý potenciál zaujmout i z hlediska zdravé výživy (Radičević et al. 2016).

Produkce a spotřeba třešní v poslední době vzrostla díky povědomí spotřebitelů o jejich přínosech pro zdraví, protože jsou bohaté na polyfenoly (zejména antokyany a kyseliny hydroxycinnamové). Za posledních 16 let se celosvětová produkce zvýšila ze 1,9 na 2,3 milionu tun. Hlavními producenty jsou převážně Turecko, USA a Írán (Blando & Oomah 2019). Kromě konzumace kultivovaných poddruhů lidmi jsou také jedním z nejdůležitějších evropských listnatých stromů, s cenným a masivním dřevem (Welk et al. 2016), které je využíváno při soustružnictví, výrobě nábytku, parketových podlah a obkládání (Licea-Moreno et al. 2019).

3.3 *Prunus armeniaca*

3.3.1 Taxonomické zařazení

Říše: rostliny (*Plantae*)

Podříše: cévnaté rostliny (*Tracheobionta*)

Oddělení: krytosemenné (*Magnoliophyta*)

Třída: vyšší dvouděložné rostliny (*Rosopsida*)

Řád: růžotvaré (*Rosales*)

Čeleď: růžovité (*Rosaceae*)

Rod: slivoň (*Prunus*)

Druh: meruňka obecná (*Prunus armeniaca*)

(Kutina 1991).

3.3.2 Historie

Čína a střední Asie - od Tien-šan po Kašmír - jsou dvě primární centra domestikace meruňkových kultivarů. Blízký východ (Írán, Kavkaz a Turecko) a region Korezmu jsou považovány za sekundární centra původu. Předpokládá se tedy, že některé dnešní kultivary pocházejí přímo z primárních center, zatímco ostatní možná vznikly hybridizací genotypů ze sekundárních center (Pedryc et al. 2009). Meruňky se na počátku našeho letopočtu dostaly do Řecka, kde byly známé jako „arménské jablko“. O pěstování v západní Evropě jsou první zmínky okolo roku 800; ve státech střední Evropy až ve 14. století (Hladík 1966).

3.3.3 Charakteristika

Meruňka roste jako keř veliký 1-2 m nebo vytváří až 10 m vysoké stromy. Ve střeoevropských podmínkách rostou průměrně 20 let (Cifranič 1987). Pro meruňky je typická načervenalá až šedohnědá kůra s načervenalými listy. Listy jsou jednoduché, střídavé, ostře špičaté, lysé a s řapíky dlouhými 2-4 cm. Květy jsou jednotlivé, růžové až bílé s tmavě červenými kališními lístky (Simmonds & Preedy 2016). Plodem je peckovice, kterou tvoří slupka, dužnina a pecka (Bažant 2004). Plod je tvarově rozmanitý, od plodů kulovitých přes vejčité až kulovitě smáčklé. Barva bývá žlutě oranžová, někdy zelenavě žlutá nebo bělavá s narůžovělými nebo načervenalými líčky (Vávra 1963).

3.3.4 Odrůdy

Dle Hladíka (1966) byly kulturní odrůdy řazeny k různým botanickým druhům. V Mandžusku, Koreji, Mongolsku a na Dálném východě patřily kulturní odrůdy k meruňce mandžuské *Prunus mandshurica* (Maxim.) Koehne, sibiřské *Prunus sibirica* L., korejské nebo li ansu *Prunus ansu* (Maxim.) Kostina a japonské *Prunus mume* Siebold. Kromě toho byly také známé odrůdy vzniklé křížením meruňky sibiřské, mandžuské a obecné. Až na menší množství odrůd v pomologických sbírkách se dnes pěstované odrůdy meruněk řadí pouze ke druhu *Prunus armeniaca* (Dvořák 1978). Meruňky se pomologicky třídí podle několika hledisek, nejvíce systému dělení je podle tvaru a barvy ovoce, nebo tvaru pecky a chuti jádra (Hladík 1966).

Ke dni 15. 6. 2020 je ve Státní odrůdové knize České republiky zapsáno 29 plodových odrůd a 6 odnoží meruněk (ÚKZÚZ 2020).

3.3.5 Pěstování

Meruňky mají vcelku vysoké nároky na půdní podmínky, nejvíce vhodné jsou půdy lehčí až středně těžké s obsahem jílovitých částic maximálně 40 %, humózní, záhřevné, dobře propustné s dostatečným množstvím vápníků a zejména pak draslíku, na který je dost náročná. Sušší půdy jsou vhodnější než vlhké (Boček 2015). Vegetační období meruňky je značně krátké, patří mezi druhy méně přizpůsobivé k podmínkám vnějšího prostředí a náročné na vyšší teploty (Sus 2003). Dle Bočka (2015) jsou optimální podmínky pro pěstování v oblastech 200–250 m. n. m. s roční průměrnou teplotou nad 8,5 °C. Meruňce nejvíce vyhovuje terén svahovitý s jihozápadní expozicí, důležitá je ale ochrana před severními a severovýchodními větry. Mírné proudění vzduchu je ale žádoucí, aby byl odváděn studený vzduch a koruny lépe osychaly (prevence houbových chorob).

Meruňka obecná je diploidní druh s osmi páry chromozomů (Pedryc et al. 2009). Pěstované odrůdy jsou většinou samosprašné, některé novější odrůdy jsou částečně samosprašné nebo i cizosprašné. Do částečně cizosprašných se řadí například odrůdy Paviot, Růžová raná, Veecot, Lejuna a mezi cizosprašné odrůdy Velká raná, Riland, Orangered. Dobrymi opylovači jsou odrůdy Maďarská a Velkopavlovická (Boček 2015).

Meruňka kvete velmi časně, kdy nízké teploty omezují let včel, které zajišťují opylování. Je proto tedy nutné v sadu rovnoměrně rozmístit včelstva (Hladík 1966). Odrůdy se dělí podle doby zrání na rané, středně zrající a pozdní. Doba sklizně se prodlouží až na 5 týdnů doplněním současného sortimentu registrovaných odrůd zahraničními velmi ranými a pozdními odrůdami (Bažant 2004).

3.3.6 Produkce a využití

Přibližně 20 % veškeré produkce meruněk se konzumuje v čerstvém stavu, zbytek se zpracovává sušením, kompotováním, zmražením, výrobou džemů, džusů nebo pyré (Siddiq et al. 2012). V některých zemích se z plodů vyrábí alkoholický šumivý nápoj (Bažant 2004).

Meruňka se pěstuje převážně ve Středomoří a v mírných oblastech, včetně zemí bývalého Sovětského svazu, Íránu, Číny, Japonska, Jižní Afriky a Spojených států. Nejvýznamnějšími producenty za 20 let (od roku 1994 do roku 2014) jsou Turecko s 10 miliony tun, následované Íránem (přibližně 6 milionů tun) a Uzbekistánem (přibližně 4 miliony tun). Tím se Asie stala hlavní oblastí produkující meruňky s více než 50 % celosvětové produkce, následována Evropou s 27 % a Afrikou s 14 % (Moustafa & Cross 2019).

3.4 Současný stav identifikace odrůd

Dle zákona 219/2003 Sb. je odrůda soubor rostlin náležející k nejnižšímu stupni botanického třídění, který je možné vymezit projevem znaků vyplývajících z určitého genotypu nebo kombinace genotypů, odlišitelný od každého jiného souboru rostlin projevem nejméně jednoho z těchto znaků a považovaný za jednotku rozmnožovatelnou beze změny.

Základní podmínkou pro uznávání a uvádění do oběhu rozmnožovacího materiálu ovocných odrůd je jejich registrace (ÚKZÚZ 2021). Kladné výsledky zkoušek důležitých hospodářských vlastností (výnos, odolnost k chorobám apod.) byly až do roku 1996 podmínkou pro povolení odrůd. Ačkoliv tento systém dokázal poskytnout téměř kompletní informace o nových odrůdách, byl časově a finančně nákladný (Jan 2008). Dnes probíhá registrace odrůdy podle zákona č. 219/2003 Sb. o uvádění do oběhu osiva a sadby pěstovaných rostlin a o změně některých zákonů (zákon o oběhu osiva a sadby) ze dne 25. června 2003. Odrůdy se registrují na základě zkoušek odlišnosti, uniformity a stálosti.

Aby byly nové odrůdy způsobilé k registraci, měly by být od všech dříve registrovaných odrůd odlišné alespoň v jednom morfologickém znaku a měly by mít dostatečnou uniformitu a stabilitu svých inherentních znaků. Kritéria odlišnosti, uniformity a stálosti se souhrnně hodnotí na poli nebo ve skleníku během dvou nezávislých růstových cyklů (Jamali et al. 2020).

V České republice zajišťuje zkoušky na svých pracovištích ÚKZÚZ. Na základě dvojstranných smluv mohou být prováděny i zkušebními úřady jiných států (ÚKZÚZ 2020).

3.4.1 UPOV směrnice pro identifikaci odrůd peckovin

Mezinárodní unie pro ochranu nových odrůd rostlin (UPOV) je mezivládní organizace se sídlem v Ženevě. Byla založena v roce 1961 Mezinárodní úmluvou o ochraně nových odrůd rostlin. Organizace se zabývá právní ochranou nových odrůd zemědělských plodin. Jejím cílem je podporovat rozvoj nových odrůd rostlin ve prospěch společnosti. Pro Českou republiku vstoupila Úmluva v platnost dne 24. listopadu 2002.

UPOV vydává směrnice, které jsou v členských zemích závazné ústavům odrůdového zkušebnictví (v České republice ÚKZÚZ). U třešní se jedná o směrnici TF/35/7 z roku 2006 a u meruněk TG/70/4 z roku 2007. Tyto směrnice obsahují přesné pokyny pro testování odlišnosti, uniformity a stability u nových odrůd. Jedná se o testování přibližně 40 morfologických znaků, které zahrnují například velikost plodu, barvu dužniny nebo období

začátku kvetení. Toto testování se provádí ve dvou vegetačních cyklech, takže je pro rychlou identifikaci odrůd značně nedostačující.

3.4.2 Odrůdová pravost

Odrůdová kvalita vzniká během šlechtění zvýšením frekvence požadovaných genů, kódujících nejen adaptabilitu odrůdy, ale i kvalitu produktů nebo odolnost k chorobám a škůdcům. Během množení osiva může docházet ke genetickým příměsím jiné odrůdy nebo druhu a tím i ke snížení odrůdové kvality (Ehrenbergerová 2014).

Šlechtitelé se v důsledku intenzivního šlechtění většinou zaměřují pouze na některé vlastnosti. Z toho důvodu dochází u zemědělských plodin k zužování genetické variability. Morfologické znaky v minulosti používané při hodnocení pravosti už nejsou pro určení genetické variability dostačující (Jozová et al. 2020). V posledních letech dochází k rychlému vývoji různých metod identifikace a vzájemného rozlišování odrůd u zemědělských plodin. Hlavním důvodem jsou obchodní aktivity s osivem a sadbou mezi specializovanými společnostmi. Během obchodování hrozí problémy spjaté s právní a obchodní ochranou zboží. Rychlé a spolehlivé určení odrůd je podmiňováno odlišností odrůd v hospodářsky významných vlastnostech. V zájmu výrobců osiva i sadby, pěstitelů, nákupu, zpracovatelského průmyslu, vnitřního a zahraničního obchodu je tedy klíčové používat správně zvolené a určené odrůdy (Bradová & Sýkorová 2006).

Pro usnadnění správy referenčních sbírek a zajištění efektivního srovnání je možné použití molekulárních technik, jako nástroje k testování odrůd, ještě před zahájením vegetačních pokusů. V rámci testování odlišnosti, uniformity a stálosti se pro některé plodiny vytváří praktické příklady identifikace těch nejpodobnějších odrůd pomocí molekulárních technik. Ty zajišťují, že nedojde k narušení stávajících určujících standardů, zda je odrůda považována za jasně odlišnou. V těchto případech se kandidátská odrůda pěstuje společně s těmi nejpodobnějšími, aby se potvrdil morfologický rozdíl. Tento způsob umožňuje snížení počtu odrůd v pokusech, což dělá test nákladově efektivnější, protože šetří čas a zdroje (Wallace 2017).

Molekulární markery pak mohou být vhodným nástrojem k upřesnění genetické diverzity, protože jsou schopny detekovat DNA polymorfismus mezi jednotlivými odrůdami. Vzájemné spojení morfologických znaků a molekulárních markerů je tak vhodným nástrojem pro výběr vhodných genotypů a udržení dostatečné genetické diverzity (Jozová et al. 2020).

3.5 Genetické markery

Markery jsou využívány k identifikaci a rozlišení odrůd již od počátku zemědělství. Mohou být fenotypové nebo genetické povahy. Fenotypové vlastnosti bývají ovlivňovány zejména prostředím a genetickými faktory, genetické markery jsou stabilní. Jakmile nejsou markery založené na DNA ovlivňovány prostředím, stává se z nich silný nástroj pro sekvenování nebo studium toku genů (Licea-Moreno et al. 2019).

Kumar et al. (2009) klasifikuje genetické markery do tří kategorií

1. Morfologické
2. Biochemické
3. DNA molekulární markery
 - a) Markery založené na restriční analýze a hybridizaci
 - b) Markery založené na amplifikaci pomocí PCR

Morfologické markery lze snadno sledovat, ale mohou být velmi jednoduše ovlivněny prostředím. Jejich počet je omezený a některé (např. barva květu) se objevují až později ve vývoji rostlin, což znemožňuje jejich včasné hodnocení. Kromě toho může daný morfologický marker pleiotropním působením genu ovlivnit další morfologické markery. Užitečnost je také omezena jejich limitovaným počtem (Andersen & Lübberstedt 2003).

Biochemické markery detekují polymorfismy na úrovni proteinu. Tyto proteiny jsou produkovány jako výsledek genové exprese a lze je oddělit elektroforézou k identifikaci alel. Nejčastěji používanými proteinovými markery jsou izoenzymy, které jsou odlišnými formami stejného enzymu. Proteinové markery odhalují rozdíly v genové sekvenci a fungují jako kodominantní markery (Kumar 1999). Jejich omezený počet u jakýchkoliv druhů plodin a skutečnost, že podléhají posttranslačním úpravám, často omezuje jejich použití (Staub et al. 1996).

DNA markery jsou fragmentem DNA signalizující mutace nebo variace. Lze je použít k detekci polymorfismu mezi alelami genu pro konkrétní sekvenci DNA nebo různé genotypy. Tyto fragmenty jsou spojeny s určitým umístěním v genomu a mohou být detekovány pomocí molekulárních technologií (Lateef 2015). Dostupnost DNA markerů je příležitostí pro vyhodnocování rostlinné diverzity (Pedryc et al. 2009).

3.5.1 Techniky založené na restrikční analýze a hybridizaci

RFLP – polymorfismus délky restrikčních fragmentů

RFLP markery se používaly hlavně v 80. a 90. letech minulého století. Detekované polymorfismy jsou výsledkem změn v nukleotidových sekvencích v rozpoznávacích místech restrikčních enzymů nebo v důsledku mutací několika nukleotidů, které vedou ke zjevnému posunu ve velikosti fragmentu. Hlavními výhodami jsou kodominance, vysoká reprodukovatelnost a vysoká lokusová specificita (Lateef 2015). Pomocí RFLP studovali Vicente et al. (1998) variabilitu kultivarů meruněk. Gerlach & Stösser (1997) využili tuto metodu pro determinaci třešňových kultivarů.

3.5.2 Techniky založené na amplifikaci pomocí PCR

RAPD – náhodná amplifikace polymorfni DNA

Technologie RAPD využívá krátké syntetické oligonukleotidy náhodných sekvencí jako primery k amplifikaci genomové DNA při nízkých teplotách během annealingu PCR. Amplifikační produkty se obvykle oddělí na agarózových gelech a obarví ethidiumbromidem (Bardakci 2001). Gogorcena & Parfitt (1994) použili RAPD pro detekci polymorfismu u meruněk.

AFLP – délkový polymorfismus amplifikovaných fragmentů

AFLP jsou RFLP markery vizualizované selektivní PCR amplifikací restrikčních fragmentů DNA. Takový marker je multi-lokusová markerová technika, která kombinuje techniky selektivní PCR amplifikace restrikčního a fragmentového restrikčního štěpení a je možné jej aplikovat do DNA jakéhokoli původu (Lateef 2015). AFLP markery jsou dobře reprodukovatelné a vysoce polymorfni, ale náklady při využívání bývají vysoké (Najafzadeh et al. 2015). Struss et al. (2001) a Tavaud et al. (2001) analyzovali genetickou diverzitu mezi kultivary třešní. Geuna et al. (2003) identifikovali kultivary meruněk.

Mikrosatelitní markery

Mikrosatelity, taktéž nazývány jako jednoduché opakující se sekvence (SSR - simple sequence repeats) jsou všudypřítomnou skupinou jednoduchých opakujících se sekvencí DNA (Bhargava & Fuentes 2010). Skládají se z tandemových opakování 1–6 oligonukleotidů (Wen-Hua et al. 2018) ale je známo, že se tyto sekvence mohou u jednotlivců v počtu opakování lišit (Schlötterer 2000).

Nacházejí se v celé délce genomu, častěji však v nekódujících oblastech (Goulão & Oliveira 2001). SSR vykazují vysoký stupeň polymorfismu alel a vyskytují se jak v eukaryotickém, tak v prokaryotickém genomu (Bhargava & Fuentes 2010).

Hlavní nevýhodou je jejich izolace *de novo*, a to především u prvně zkoumaných organismů, protože se mikrosatelity obvykle vyskytují v nekódujících oblastech s častějším výskytem substituce nukleotidů (Zane et al. 2002). Mikrosatelitní markery vyžadují předchozí znalost genomových sekvencí organismu, aby bylo možné navrhnout specifické primery (Najafzadeh et al. 2015), nicméně oblasti přilehlé k mikrosatelitům jsou obvykle unikátní, takže lze velmi jednoduše navrhnout i odpovídající primery, díky kterým je možné jednotlivé mikrosatelity vyhledávat a amplifikovat (Goulão & Oliveira 2001).

Díky své hojnosti, multialelické povaze a vysokému polymorfismu poskytují účinné a přesné prostředky pro detekci genetického polymorfismu mezi ovocnými druhy (Najafzadeh et al. 2015). SSR markery byly užitečné při integraci genetických, fyzikálních a sekvenčně založených fyzických map u rostlinných druhů a současně poskytly šlechtitelům a genetikům účinný nástroj pro propojení fenotypových a genotypových variací (Varshney et al. 2005).

V eukaryotických genomech vykazují mikrosatelity specifické obohacení taxonu. MSDB (Microsatellite Database) je sbírka >650 milionů SSR od 6 893 druhů, včetně bakterií, archaeí, hub, rostlin a zvířat. Tato databáze je zdaleka nejúplnějším zdrojem pro přístup a analýzu dat SSR více druhů (Avvaru et al. 2017).

3.6 Systémy studia variability pomocí SSR u peckovin

Identifikace SSR v genových sekvencích rostlinných druhů byla provedena již na počátku 90. let minulého století Morgantem & Olivierim (1993). Jejich výzkum na přítomnost a hojnost dinukleotidových a trinukleotidových opakování v sekvenci DNA odhalil, že jsou takové mikrostelity velmi časté a široce distribuované. V té době byl však k dispozici pouze omezený objem sekvenčních dat pro analýzu SSR (Varshney et al. 2005).

SSR makery byly navrženy pro různé druhy v důsledku ekonomického významu rodu *Prunus*. Downey & Iezzoni (2000) uvádějí použití primerů určených speciálně pro střečku pozdní (*Prunus serotina* Ehrh.). Vaughan & Russell (2004) vyvinuli první SSR markery z divoké třešně. Najafzadeh et al. (2015) identifikovali skupinu vysoce polymorfních mikrosatelitních markerů pro identifikaci višní.

První SSR primery speciálně navržené pro třešně z genomových knihoven odrůd „Napoleon“ a „Valerj Tschkalov“ byly získány Clarkem & Tobuttem (2003) a Strussem et al. (2003). SSR byly využity pro rozlišení genotypů a stanovení genetických vztahů mezi kultivary meruněk (Hormaza 2002; Pedryc et al. 2009; Akpinar et al. 2010). Hormaza (2002) odhalil rozdíly mezi skupinami severoamerických a evropských meruněk. Evropská skupina byla pak ještě dále rozdělena na španělskou a francouzskou podskupinu. Akpinar et al. (2010) zkoumali pomocí SSR genetické vztahy mezi tureckými a exotickými kultivary meruněk. Přílehlé sekvence DNA jsou mezidruhově dobře zachovány, což umožňuje využití stejných párů primerů u příbuzných druhů (Wünsch & Hormaza 2002; Aranzana et al. 2003; Rahemi et al. 2012).

4 Metodika

4.1 Materiál

4.1.1 Rostlinný materiál

Soubor rostlinných vzorků byl odebrán na konci září roku 2020 na Demonstračním a experimentálním pracovišti České zemědělské univerzity v Praze. Od každého zástupce byla odebrána sada listů. Při výběru byl kladen důraz na listy nevykazující známky poškození. Po odběru byly listy před samotnou izolací DNA uchovány v igelitových sáčcích.

Materiál známých odrůd byl označen: 1A (odrůda Adriana), 2A (odrůda Harogem) a 3A (odrůda Velkopavlovická).

Materiál neznámých odrůd byl označen: M1-M16.

Jejich rozmístění a vzdálenosti znázorňuje obrázek 1. Platnost toho schématu byla aktuální v době sběru. Během roku zaznamenal sad změny, k datu odevzdání této práce rozmístění neodpovídá. Stromy zastupující vzorky M3 a M7 byly pokáceny.

Pro analýzu byly dále použity standardy Katedry genetiky a šlechtění. Odrůda třešně Elza označena TE a *Prunus avium* neznámého původu označen T.



Obrázek 1: Schéma rozmístění a vzdálenosti jednotlivých stromů v sadu

4.1.2 Primery

Pro odlišení odrůd meruněk byly použity mikrosatelitní markery a jejich primery navržené pro identifikaci třešní BPPCT 034L, BPPCT 040L (Dirlewanger et al. 2002),

EMPaS02, EMPaS05, EMPaS06, EMPaS10L, EMPaS11, EMPaS12L (Vaughan & Russell 2004), PS12A02L, PceGA34L (Downey & Iezzoni 2000), UCD-CH11, UCD-CH12, UCD-CH31 (Struss et al. 2003). Mimo zmíněné publikace, které popisují a využívají dané primery poprvé, byly publikovány i další studie, využívající některé z těchto primerů (Sharma et al. 2015; Najafzadeh et al. 2016; Korecký et al. 2017; Licea-Moreno et al. 2019). Na základě testování u třešně (Schueler et al. 2003; Wunsch & Hormaza 2002) byl použit i primery UDP97-403L (Cipriani et al. 1999), UDP98-411L, UDP98-412 (Testolin et al. 2000) vyvinuty pro broskev. Seznam použitých primerů viz tabulka 1.

Tabulka 1: Použité primery

Primery	Sekvence primerů (5'-3')
BPPCT034L-F	CTA CCT GAA ATA AGC AGA GCC AT
BPPCT034L-R	GCT CGT AAG ATT GCT GGT AGC
BPPCT040L-F	ATG AGG ACG TGT CTG AAT GG
BPPCT040L-R	CCT TTA CGT TAC AGC TCG AAA GA
EMPaS02-F	CTA CTT CCA TGA TTG CCT CAC
EMPaS02-R	AAC ATC CAG AAC ATC AAC ACA C
EMPaS05-F	CAT GTG CTT TCT CTG CCC
EMPaS05-R	TCT TCT CAA GCA ATT CCC C
EMPaS06-F	AAG CGG AAA GCA CAG GTA G
EMPaS06-R	TTG CTA GCA TAG AAA AGA ATT GTA G
EMPaS10L-F	GCT AAT ATC AAA TCC CAG CTC TC
EMPaS10L-R	CTA CTG GCT TGT GTT GTG TG
EMPaS11-F	ACC ACT TTG AGG AAC TTG GG
EMPaS11-R	CTG CCTG GAA GAG CAA TAA C
EMPaS12L-F	TGT GCT AAT GCC AAA AAT ACC
EMPaS12L-R	GTG GAA GGC CAT ATT TTC GG
PceGA34L-F	GAA CAT GTG GTG TGC TGG TT
PceGA34L-R	CCC ACT TTC ATC AAA ACA GTG AG
PS12A02L-F	GCC ACC AAT GGT TCT TCC
PS12A02L-R	CAA CCA AAG CAC CAG ATG C
UCD-CH11-F	TGC TAT TAG CTT AAT GCC TCC C
UCD-CH11-R	ATG CTG ATG TCA TAA GGT GTG C
UCD-CH12-F	AGA CAA AGG GAT TCT GGG C
UCD-CH12-R	TTT CTG CCA CAA ACC TAA TGG
UCD-CH31-F	TCC GCT TCT CTG TGA GTG TG
UCD-CH31-R	CGA TAG TTT CCT TCC CAG ACC
UDP97-403L-F	CTG GCT TAC AAC TCG CAA GC
UDP97-403L-R	CTC ACA GAC TCG ACT CTT CAC TTC
UDP98-411L-F	AAG CCA TCC ACT CAG CAC TC
UDP98-411L-R	GCT GAT GAT GAC GAC GAT GAT G
UDP98-412-F	AGG GAA AGT TTC TGC TGC AC
UDP98-412-R	GCT GAA GAC GAC GAT GAT GA

4.2 Metody

4.2.1 Izolace DNA

Vzorky tkání o hmotnosti 100 mg byly odebrány z listů a homogenizovány skleněnou tyčinkou za pomoci tekutého N₂. Následně byla z těchto tkání vyizolována DNA pomocí komerčně dodávaného kitu pro izolaci DNA (Invisorb Spin Plant Mini Kit, Stratec Molecular). Souprava je dodávána s veškerým potřebným materiálem. Izolace probíhá v těchto krocích:

- K již připravenému vzorku materiálu homogenizovaného pomocí N₂ bylo do zkumavek přidáno 400 µl roztoku lyzačního pufru P, protřepáno na vortexu (Vortex TK3S, TerchnoKartell) a promícháno převrácením. Vzorky byly následně po dobu 30 minut inkubovány v termobloku při teplotě 65 °C. Během tohoto času bylo nutno zkumavky dvakrát promíchat na vortexu.
- Roztok byl přenesen do filtrační zkumavky, které byly centrifugovány po dobu 1 minuty při výkonu 11 000 otáček za minutu (Centrifuge 5420, Eppendorf). Poté byl odstraněn prefiltr, přidáno 200 µl vázacího pufru A a směs zvortexována.
- Roztok byl přenesen do vázací kolony a inkubován po dobu 1 minuty. Kolony byly poté centrifugovány po dobu 2 minut při výkonu 11 000 otáček za minutu. Vázací kolony byly přemístěny do nových zkumavek.
- Následně bylo přidáno 550 µl promývacího roztoku I a zkumavky 1 minutu centrifugovány při výkonu 11 000 otáček za minutu. Filtrát byl poté odstraněn a kolony umístěny do nových zkumavek.
- Do vázací kolony bylo nadále přidáno 550 µl promývacího roztoku II a po dobu 1 minuty byly centrifugovány při výkonu 11 000 otáček za minutu. Poté byl filtrát znovu odstraněn. Tento krok byl opakován ještě jednou. Kolony se na závěr centrifugovaly po dobu 4 minut při výkonu 11 000 otáček za minutu, aby došlo k odstranění zbývajícího ethanolu.
- Vázací kolony byly přemístěny do nových zkumavek, bylo přidáno 100 µl elučního roztoku předehřátého v termobloku na 65 °C a zkumavky inkubovány po dobu 3 minut. Kolony byly poté centrifugovány po dobu 1 minuty při výkonu 11 000 otáček za minutu. Výsledný eluát byl zachycen ve spodní zkumavce a připraven na další použití.

4.2.2 Hodnocení kvality DNA

Stanovení koncentrace a čistoty izolované DNA bylo provedeno na spektrofotometru (NanoPhotometer P300, Implen) po jeho kalibraci. Při kalibraci bylo proměřeno rozpouštědlo, ve kterém byla při samotné izolaci rozpuštěna DNA - eluční pufr.

Destilovanou vodou byla poté kyveta očištěna a pro měření jednotlivých vzorků napipetovány vždy 3 μl DNA. Na kyvetu bylo položeno očištěné víčko a vzorek následně proměřen. Kvantita DNA je vyjádřena v nanogramech obsažených v jednom mikrolitru ($\text{ng}/\mu\text{l}$). Společně s koncentrací DNA je dále uváděn poměr absorbance vlnových délek 260/280 nm a 230/260 nm, které udávají případné znečištění DNA proteiny. Pro následnou analýzu byla rostlinná DNA naředěna na koncentraci $5 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$.

4.2.3 Singleplex PCR

Použité primery byly dodány firmou Applied Biosystems a naředěny destilovanou vodou na koncentraci $10 \mu\text{M}$.

Optimalizovaná amplifikace jednotlivých mikrosatelitů probíhala v reakční směsi o konečném objemu 9 μl . Tato reakční směs obsahovala 5 ng DNA, 5 μl Multiplex PCR Master Mixu (QIAGEN) a 0,5 μl každého z páru primerů uvedených v tabulce 1. Směs byla poté doplněna vodou na 9 μl . Vlastní PCR proběhla v termocycleru (C1000™ Thermal Cycler, BioTech). Pro amplifikaci byl použit cyklus popsáný v tabulce 2.

Tabulka 2: PCR cyklus použitý pro amplifikaci

Predenaturace	95°C	10 minut	1 cyklus
Denaturace	94°C	30 sekund	35 cyklů
Annealing	60°C	90 sekund	
Prodlužování	72°C	1 minuta	
Závěrečné prodlužování	60°C	80 minut	1 cyklus

4.2.4 Agarózová elektroforéza

Pro kontrolu přítomnosti DNA byla použita gelová agarózová elektroforéza. 2% agarózový gel byl připraven ze 4 g agarózy, 200 ml 1xTBE (Sambrook et al. 1989) a nalit do připravené elektroforetické misky. Do misky byl umístěn hřeben, aby po ztuhnutí gelu vytvořil jamky. Elektroforetická cela byla naplněna 1,5 l TBE pufru.

Po ztuhnutí byla miska s gelem umístěna do elektroforetické vany s TBE pufrům a hřeben vytažen. Pro vizualizaci vzorků byl každý PCR produkt obarven 2 μ l nanášecí barvy (sacharóza, voda, bromfenolová a xylenolová modř). Po ztuhnutí gelu bylo do jamek napipetováno 10 μ l zabarveného PCR produktu a 10 μ l hmotnostního standardu. Velikost amplifikovaných fragmentů byla porovnána s hmotnostním standardem GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Scientific), umístěným vždy do první a poslední jamky každého hřebenu.

K elektroforetické vaně byl poté připojen zdroj stejnosměrného proudu tak, aby DNA putovala k anodě s napětím 5 V/cm. Elektroforéza běžela 30 minut, poté byl gel umístěn na UV transiluminátor Gel Doc XR (Bio Rad). Po zjištění výsledků bylo vybráno 11 primerů pro následnou fragmentační analýzu.

4.2.5 Multiplex PCR

Z 11 vybraných primerů byly sestaveny 2 komplementární multiplexy tak, aby se nepřekrývaly fragmenty stejného fluorescenčního barviva. Každá směs multiplexní PCR se skládala z 5 ng DNA, 5 μ l Multiplex PCR Master Mixu (QIAGEN) a určitého množství primerů (tabulky 3 a 4).

Tabulka 3: Množství primerů, jejich zbarvení a rozsah alel v multiplexu 1

Multiplex 1			
Primer	Množství v reakci	Fluorofor	Rozsah alel
BPPCT 034L	0,4 μ M	PET	320-354
UCD-CH11	0,32 μ M	PET	103-154
BPPCT 040L	0,24 μ M	6-FAM	154-168
EMPaS06	0,32 μ M	NED	199-225
UDP98-412	0,32 μ M	VIC	99-200
EMPaS10L	0,24 μ M	VIC	255-277

Tabulka 4: Množství primerů, jejich zbarvení a rozsah alel v multiplexu 2

Multiplex 2			
Primer	Množství v reakci	Fluorofor	Rozsah alel
UDP98-411L	0,32 μ M	PET	265-284
EMPaS02	0,24 μ M	6-FAM	121-140
PS12A02L	0,32 μ M	NED	154-184
PceGA34L	0,32 μ M	NED	233-272
EMPaS05	0,4 μ M	VIC	161-199

Vlastní PCR proběhla v termocyleru (C1000™ Thermal Cycler, BioTech). Pro amplifikaci byl použit stejný cyklus, jako při singleplex PCR (tabulka 2).

4.2.6 Kapilární elektroforéza

Po ukončení Multiplex PCR reakce byl odebrán 1 µl PCR produktu, naředěn v poměru 1:19 v deionizované vodě a promíchán pipetou. Z každého naředěného vzorku byl poté odebrán 1 µl a smíchán a 12 µl Hi-Di formamidu (Life Technologies) a 0,2 µl hmotnostního standardu GeneScan-600Liz (Life Technologies). Takto připravené vzorky byly denaturovány při 95°C 5 min. v termocyleru (C1000™ Thermal Cycler, BioTech). Jednotlivé fragmenty byly poté separovány v genetickém analyzáru ABI PRISM 310 (Life Technologies). Separace probíhala v kapiláře dlouhé 36 cm. Doba nástřiku byla 5 s při napětí 12 kV. Separace probíhala 24 minut při napětí 15 kV. Přístroj byl kalibrován barevnou sadou DS-33 Matrix Standard Kit (Applied Biosystems).

Po dokončení genetické analýzy byl panem doc. Ing. Miroslavem Jursíkem, Ph.D. poskytnut plánec sadu Demonstračního a experimentálního pracoviště ČZU společně s informacemi o odrůdové příslušnosti většiny využitých stromů. Od doby odběru proběhly v sadu určité změny a některé stromy byly pokáceny, čímž nebylo ani zpětně možné zjistit odrůdu u vzorků M3 a M7. Před výsadbou nebyly zdokumentovány ani odrůdy M1 a M8, proto zůstaly všechny výše uvedené vzorky při statistickém zpracování označené jako neznámé.

4.3 Zpracování dat

Výsledné velikosti alel získané z kapilární elektroforézy byly vyhodnoceny pomocí softwaru GeneMapper 4.1 (Life Technologies, USA), kterým byly vytvořeny chromatogramy jednotlivých zkoumaných fragmentů. Pomocí programu DARwin 6.0 (Perrier & Jacquemoud-Collet 2006) byla provedena shlukovací analýza pro hodnocení podobnosti alelických profilů u studovaných vzorků. Za využití velikostí jednotlivých alel byly získány příbuzenské dendrogramy. Programem GenAlEx 6.5 (Peakall & Smouse 2012) byly identifikovány klony a vyhodnoceny frekvence alel v populacích meruněk a třešní.

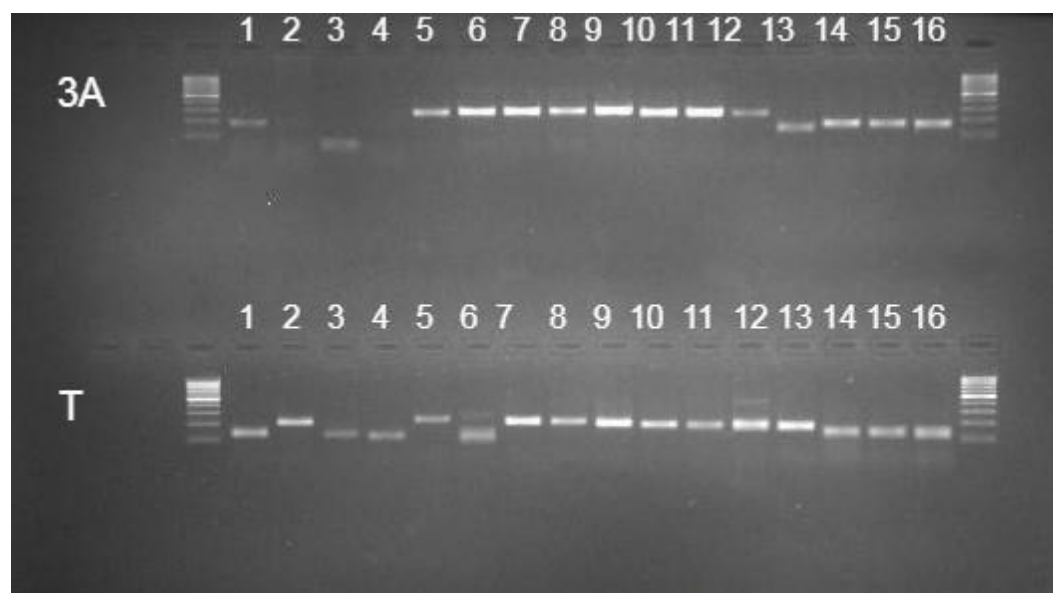
5 Výsledky

5.1 Spektrofotometrie

Každý ze vzorků vyizolované DNA byl hodnocen pomocí spektrofotometrie. Proměřením vzorku o množství 3 μl byly zjištěny hodnoty koncentrace a znečištění. Množství DNA získané při izolaci se pohybovalo v rozmezí 36,5 - 126 $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$. Vzhledem k těmto rozdílům byly všechny vzorky naředěny na objem 50 μl a koncentraci 5 $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$.

5.2 Výsledky optimalizace

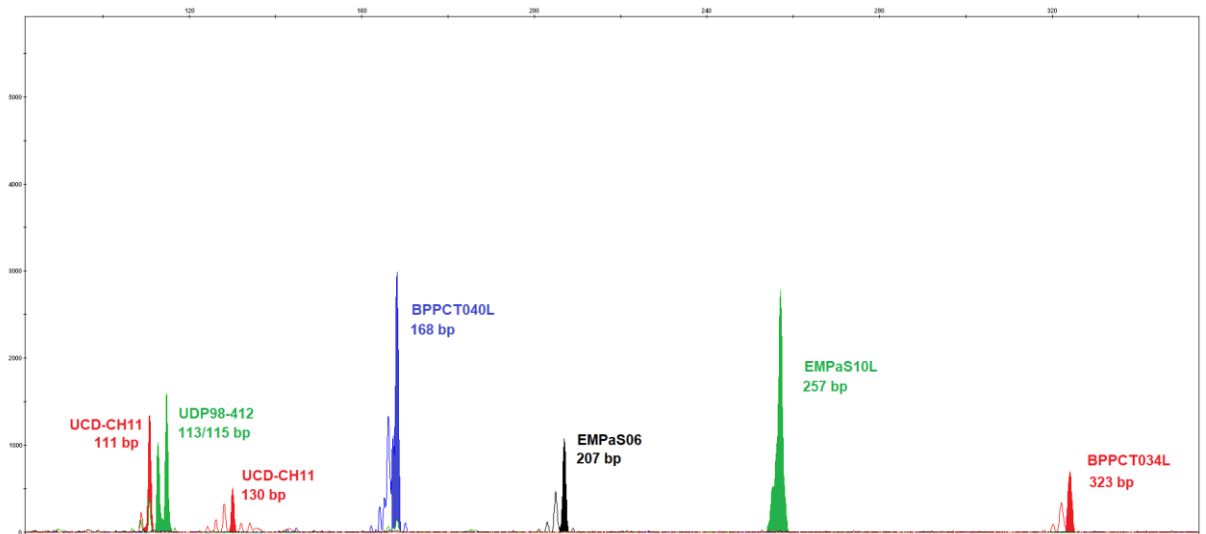
Výsledky agarózové elektroforézy prokázaly, že jsou u vzorku třešně všechny primery dobře čitelné. U odrůd meruněk byly intenzity signálu rozdílné. Z původního množství 16 primerů bylo pro další analýzu vybráno pouze 11. Pro multiplex PCR bylo potřeba, aby byly primery komplementární a fragmenty stejného fluorescenčního barviva se nepřekrývaly.



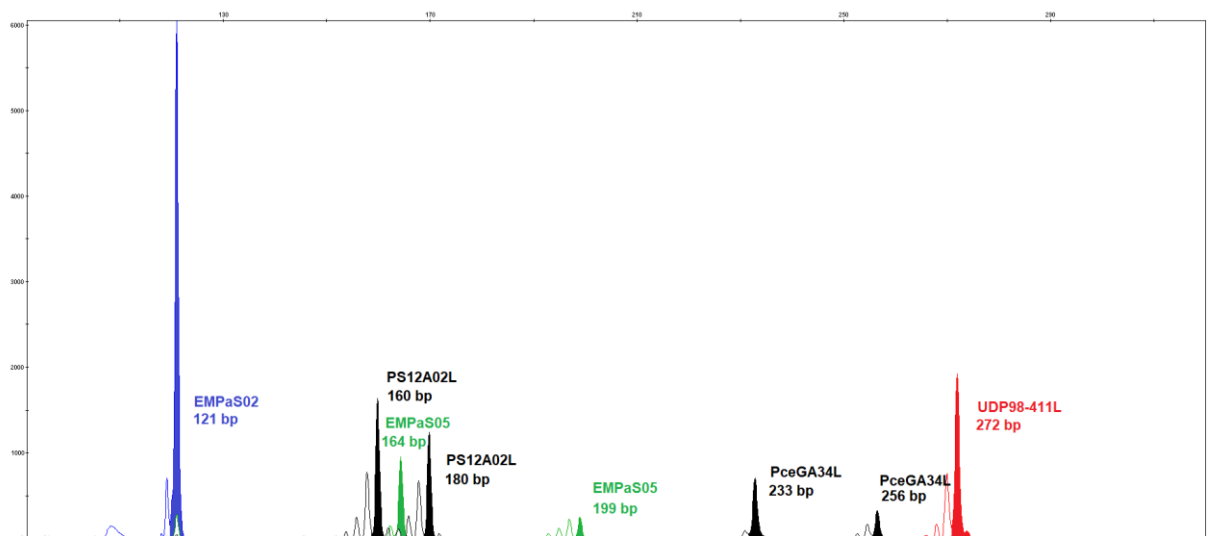
Obrázek 2: Vzorový elektroforeogram vzorků 3A a T. 1 - PceGA34L, 2 - EMPaS05, 3 - BPPCT 034L, 4 - EMPaS11, 5 - EMPaS12L, 6 - EMPaS02, 7 - BPPCT 040L, 8 - EMPaS06, 9 - UCD-CH31, 10 - EMPaS10L, 11 - UDP98-411L, 12 - UCD-CH12, 13 - UCD-CH11, 14 - PS12A02L, 15 - UDP97-403L, 16 - UDP98-412.

5.3 Kapilární elektroforéza a statistické vyhodnocení

Fragmentační analýzou multiplexů 1 a 2 byly pomocí softwaru GeneMapper 4.1 vytvořeny chromatogramy jednotlivých zkoumaných fragmentů. Na tomto základě byl získán souhrn dat o analyzovaných lokusech a velikosti jednotlivých alel. Vzorové chromatogramy jsou znázorněny na obrázcích 3 a 4. Velikosti analyzovaných alel pomocí použitých SSR markerů jsou uvedeny v tabulce 5.



Obrázek 3: Chromatogram multiplexu 1 u odrůdy Harogem (2A)

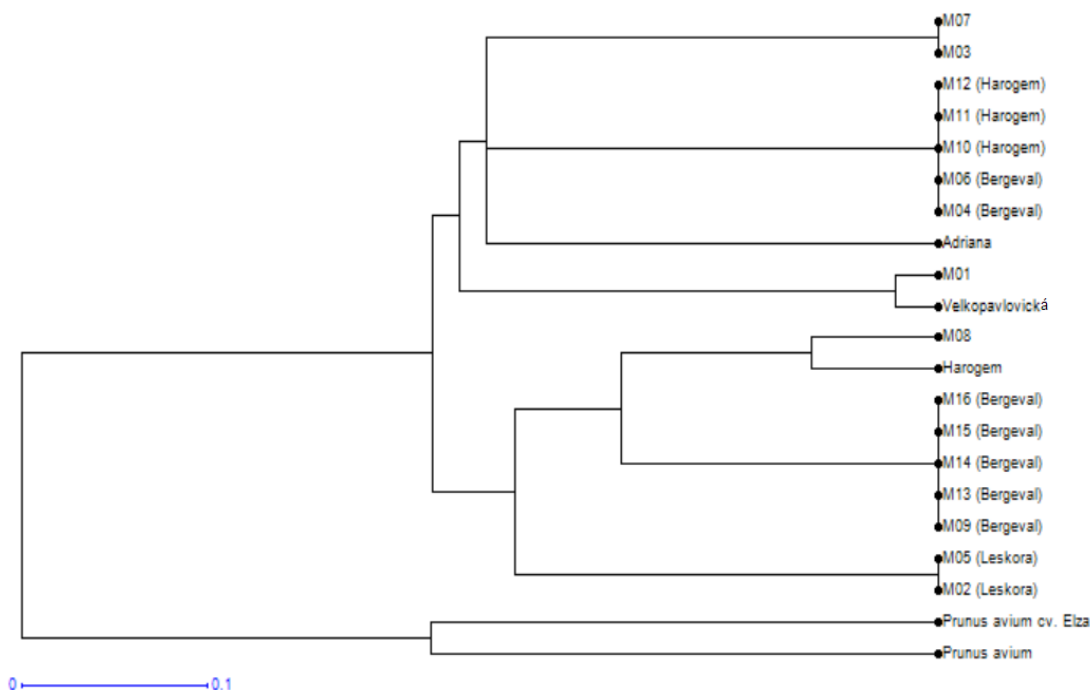


Obrázek 4: Chromatogram multiplexu 2 u odrůdy Harogem (2A)

Tabulka 5: Velikost alel zjištěných fragmentační analýzou, homozygotní alely tučně odlišeny

	UDP98-412	EMPaS10L	UCD-CH11	BPPCT 034L	EMPaS06	BPPCT 040L	UDP98-411L	EMPaS02	PS12A02L	PceGA34L	EMPaS05
1A	99/103	255/255	103/130	323/350	201/225	158/162	272/284	121/125	154/184	233/272	164/177
2A	113/115	257/257	111/130	323/323	207/207	168/168	272/272	121/121	160/180	233/256	164/199
3A	83/115	255/257	111/130	323/331	201/201	158/158	272/272	121/121	170/170	233/233	164/183
M01	83/115	255/257	111/128	323/331	201/201	158/158	272/272	121/121	170/170	233/233	164/183
M02	105/107	257/260	103/111	315/323	201/207	148/168	268/284	121/121	178/190	233/272	164/164
M03	103/111	255/257	103/136	323/323	201/207	158/158	272/292	121/139	166/190	233/233	164/166
M04	103/105	255/255	103/111	303/315	201/213	158/158	272/284	121/121	154/190	233/233	164/175
M05	105/107	257/260	103/111	315/323	201/207	148/168	268/284	121/121	178/190	233/272	164/164
M06	103/105	255/255	103/111	303/315	201/213	158/158	272/284	121/121	154/190	233/233	164/175
M07	103/111	255/257	103/136	323/323	201/207	158/158	272/292	121/139	166/190	233/233	164/166
M08	111/115	257/257	111/130	323/323	201/207	158/168	272/272	121/121	160/170	233/256	164/199
M09	105/115	257/257	103/130	303/323	207/213	158/168	272/284	121/121	160/190	233/272	164/199
M10	103/105	255/255	103/111	303/315	201/213	158/158	272/284	121/121	154/190	233/233	164/175
M11	103/105	255/255	103/111	303/315	201/213	158/158	272/284	121/121	154/190	233/233	164/175
M12	103/105	255/255	103/111	303/315	201/213	158/158	272/284	121/121	154/190	233/233	164/175
M13	105/115	257/257	103/130	303/323	207/213	158/168	272/284	121/121	160/190	233/272	164/199
M14	105/115	257/257	103/130	303/323	207/213	158/168	272/284	121/121	160/190	233/272	164/199
M15	105/115	257/257	103/130	303/323	207/213	158/168	272/284	121/121	160/190	233/272	164/199
M16	105/115	257/257	103/130	303/323	207/213	158/168	272/284	121/121	160/190	233/272	164/199
T	119/119	277/277	148/154	320/354	199/203	154/160	265/270	140/140	169/179	248/261	160/162
TE	117/119	277/291	148/154	350/352	203/215	160/168	265/265	135/144	163/165	240/248	160/162

V programu DARwin 6.0 byla provedena shlukovací analýza. Příbuzenský dendrogram byl vytvořen UPGMA analýzou na základě velikostí alel detekovaných molekulárními markery z tabulky 5.



Obrázek 5: Dendrogram genetické podobnosti vzorků meruněk a třešní

S využitím programu GenAlEx 6.5 byly identifikovány 4 soubory klonů (tabulka 6) po 5 a 2 jedincích. Tato skutečnost potvrzuje výsledky z obrázku 5. Oba dva tyto systémy tedy lze použít rovnocenně. Zároveň byla tímto programem vypočítána frekvence výskytu alel (tabulky 7 a 8). Frekvence výskytu představuje zastoupení jednotlivých alel v testovaném souboru vzorků. U meruněk bylo celkem identifikováno 52 alel (3-8 v lokusu), u třešní pak 30 (2-4 v lokusu). Jako nejvíce informativní se obecně jevil lokus PS12A02L, u kterého bylo celkem identifikováno 11 rozdílných alel.

Stejně jako v tabulce 6 byl soubor rozdělen na dvě populace - M (meruňky) a T (třešeň). Populace meruněk zahrnovala 19 jedinců a populace třešní jedince 2.

Tabulka 6: Předpokládáné klony založené na opakujících se multilokusových genotypech

Vzorek	Populace	Genotyp	Množství
M12 (Harogem)	M	103105255255103111303315201213158158272284121121154190233233164175g	5
M11 (Harogem)	M	103105255255103111303315201213158158272284121121154190233233164175g	
M10 (Harogem)	M	103105255255103111303315201213158158272284121121154190233233164175g	
M06 (Bergeval)	M	103105255255103111303315201213158158272284121121154190233233164175g	
M04 (Bergeval)	M	103105255255103111303315201213158158272284121121154190233233164175g	
M07	M	103111255257103136323323201207158158272292121139166190233233164166g	2
M03	M	103111255257103136323323201207158158272292121139166190233233164166g	
M05 (Leskora)	M	105107257260103111315323201207148168268284121121178190233272164164g	2
M02 (Leskora)	M	105107257260103111315323201207148168268284121121178190233272164164g	
M16 (Bergeval)	M	105115257257103130303323207213158168272284121121160190233272164199g	5
M15 (Bergeval)	M	105115257257103130303323207213158168272284121121160190233272164199g	
M14 (Bergeval)	M	105115257257103130303323207213158168272284121121160190233272164199g	
M13 (Bergeval)	M	105115257257103130303323207213158168272284121121160190233272164199g	
M09 (Bergeval)	M	105115257257103130303323207213158168272284121121160190233272164199g	
Adriana	M	99103255255103130323350201225158162272284121125154184233272164177g	1
Harogem	M	113115257257111130323323207207168168272272121121160170233256164199g	1
Velkopavlovická	M	83115255257111130323331201201158158272272121121170170233233164183g	1
M01	M	83115255257111128323331201201158158272272121121170170233233164183g	1
M08	M	111115257257111130323323201207158168272272121121160170233256164199g	1
<i>Prunus avium</i>	T	119119277277148154320354199203154160265270140140169179248261160162g	1
<i>Prunus avium</i> cv. Elza	T	117119277291148154350352203215160168265265135144163165240248160162g	1

Tabulka 7: Frekvence alel v multiplexu 1

Multiplex 1			
Marker	Velikost alely	Frekvence alely v populaci	
		M (19)	T (2)
UDP98-412	83	0.053	0.000
	99	0.026	0.000
	103	0.211	0.000
	105	0.316	0.000
	107	0.053	0.000
	111	0.079	0.000
	113	0.026	0.000
	115	0.237	0.000
	117	0.000	0.250
	119	0.000	0.750
EMPaS10L	255	0.421	0.000
	257	0.526	0.000
	260	0.053	0.000
	277	0.000	0.750
	291	0.000	0.250
UCD-CH11	103	0.395	0.000
	111	0.289	0.000
	128	0.026	0.000
	130	0.237	0.000
	136	0.053	0.000
	148	0.000	0.500
	154	0.000	0.500
BPPCT 034L	303	0.263	0.000
	315	0.184	0.000
	320	0.000	0.250
	323	0.474	0.000
	331	0.053	0.000
	350	0.026	0.250
	352	0.000	0.250
	354	0.000	0.250
EMPaS06	199	0.000	0.250
	201	0.395	0.000
	203	0.000	0.500
	207	0.316	0.000
	213	0.263	0.000
	215	0.000	0.250
	225	0.026	0.000
BPPCT 040L	148	0.053	0.000
	154	0.000	0.250
	158	0.658	0.000
	160	0.000	0.500
	162	0.026	0.000
	168	0.263	0.250

Tabulka 8: Frekvence alel v multiplexu 2

Multiplex 2			
Marker	Velikost alely	Frekvence alely	
		M (19)	T (2)
PceGA34L	233	0.737	0.000
	240	0.000	0.250
	248	0.000	0.500
	256	0.053	0.000
	261	0.000	0.250
	272	0.211	0.000
EMPaS05	160	0.000	0.500
	162	0.000	0.500
	164	0.553	0.000
	166	0.053	0.000
	175	0.132	0.000
	177	0.026	0.000
	183	0.053	0.000
	199	0.184	0.000
EMPaS02	121	0.921	0.000
	125	0.026	0.000
	135	0.000	0.250
	139	0.053	0.000
	140	0.000	0.500
	144	0.000	0.250
PS12A02L	154	0.158	0.000
	160	0.184	0.000
	163	0.000	0.250
	165	0.000	0.250
	166	0.053	0.000
	169	0.000	0.250
	170	0.158	0.000
	178	0.053	0.000
	179	0.000	0.250
	184	0.026	0.000
	190	0.368	0.000
UDP98-411L	265	0.000	0.750
	268	0.053	0.000
	270	0.000	0.250
	272	0.553	0.000
	284	0.342	0.000
	292	0.053	0.000

6 Diskuze

DNA rostlinného materiálu byla izolována ze zmražených listů komerčně dodávaným kitem Invisorb Spin Plant Mini Kit (Stratec Molecular). Kity představují při extrakci DNA časovou úsporu, protože již obsahují potřebné chemikálie, zkumavky a kolony, ale jejich pořizovací cena bývá vysoká. I přes tento fakt a dostupnost jiných metod izolace byly extrakční kity při identifikaci odrůd rodu *Prunus* hojně využívány (Depypere et al. 2009; Stanys et al. 2012; Korecký et al. 2017).

Mikrosatelitní markery jsou díky své kodominanci a vysokému polymorfismu využívány při identifikaci klonů a odrůd roslin (Struss et al. 2003; Kacar et al. 2005; Schueler et al. 2003; Licea-Moreno et al. 2019). Po optimalizaci agarózovou elektroforézou bylo z pokusu vynecháno 5 mikrosatelitů (EMPaS11, EMPaS12L, UCD-CH12, UCD-CH31, UDP97-403L). Najafzadeh et al. (2016) použili při identifikaci *Prunus avium* primer UCD-CH31, který vykazoval jedno z nejmenších množství identifikovaných alel a nejnižší genetickou diverzitu.

K identifikaci odrůd rodu *Prunus* bylo v této práci využito 9 mikrosatelitních primerů publikovaných pro amplifikaci DNA *Prunus avium* v roce 2000 Downeym & Iezzoniem (PS12A02L, PceGA34L), v roce 2002 Dirlewangerem et al. (BPPCT034L, BPPCT040L), v roce 2003 Strussem et al. (UCD-CH11) a v roce 2004 Vaughanem & Russelem (EMPaS02, EMPaS05, EMPaS06, EMPaS10L). Byly použity i 2 primery navržené pro *Prunus persica* v roce 2000 Testolinem et al. (UDP98-411L, UDP98-412). Všechny tyto primery amplifikovaly 2 zkušební vzorky *Prunus avium* a 19 vzorků *Prunus armeniaca*. Studie mezidruhové přenositelnosti u markerů ovocných druhů jsou zaměřovány spíše na *Prunus persica* (Dirlewanger et al. 2002; Wunsch & Hormaza 2002), která je druhem s největším množstvím sekvenovaných a klonovaných mikrosatelitních markerů (Cipriani et al. 1999; Testolin et al. 2000; Aranzana et al. 2002) v rámci rodu *Prunus* z důvodu relativně krátkého juvenilního období a vzhledem ke svému komerčnímu významu (Struss et al. 2003).

Použité množství 11 mikrosatelitů k identifikaci 19 zástupců *Prunus armeniaca* v sadu Demonstračního a experimentálního pracoviště se jeví jako dostačující. U 19 sledovaných jedinců bylo získáno celkem 52 alel (3-8 alel na lokus). Dle dostupné literatury stačilo k identifikaci více genotypů i nižší množství markerů. Wunsch & Hormaza (2002) identifikovali 72 genotypů *Prunus avium* pomocí 9 párů primerů původně vyvinutých v *Prunus persica*. Výsledky dokázaly, že jsou mikrosatelity mezi těmito druhy vysoce

konzervovány, což umožňuje použití stejných primerů SSR k detekci genotypů u příbuzných druhů.

Hormaza (2002) identifikoval 48 genotypů *Prunus armeniaca* z odlišných geografických oblastí pomocí 20 párů SRR primerů vyvinutých u odlišných druhů *Prunus* (19 z *Prunus persica*, 1 z *Prunus avium*). Těchto 20 primerů produkovalo polymorfní opakovatelné amplifikační vzory se všemi 48 studovanými genotypy. Ve 20 lokusech bylo celkem detekováno 82 alel.

Primer UDP98-412 izolovaný z *Prunus persica* měl v naší práci větší informativní charakter u *Prunus armeniaca*. Dokázal identifikovat celkem 8 alel. S ohledem na výrazně menší množství vzorku *Prunus avium* to lze přisuzovat i faktu, že jsou *Prunus armeniaca* a *Prunus persica* fylogeneticky bližší. Kacar et al. (2005) identifikovali odrůdy *Prunus avium* primery izolovanými z *Prunus cerasus* a *Prunus persica*. Primery izolované z *Prunus cerasus* měly nejinformativnější charakter a dokázaly identifikovat téměř o polovinu více alel než primery pro *Prunus persica*. Tyto výsledky jsou taktéž přisuzovány odlišným pozicím těchto druhů ve fylogenezi rodu.

Z výsledků je patrné, že mikrosatelitní markery mají dobrou diskriminační schopnost. Při porovnání vzorků obou analýz byla zjištěna shoda u většiny genotypů s minimálními odchylkami v párech bází. Tyto odchylky mohly být způsobeny při opakujících cyklech během PCR reakce, kdy došlo ke sklouznutí DNA polymerázy a vzniku odlišného počtu opakujícího se motivu mikrosatelitu. Rozsahy a frekvence alel byly u obou druhů rozdílné s výjimkou shody alely 350 v lokusu BPPCT 034L a alely 168 v lokusu BPPCT 040L.

Všechny primery byly polymorfní, u všech vzorků pak pouze UCD-CH11. Jedním z nejvíce polymorfních a variabilních lokusů byl PS12A02L. U třešně detekoval celkem 4 alely, což je největší množství ze všech lokusů. U meruněk se se 7 alelami řadí mezi druhý nejvíce variabilní. PS12A02L byl již dříve v několika studiích sledován jako nejinformativnější (Downey & Iezzoni 2000; Wünsch & Hormaza 2004; Turkoglu et al. 2010).

Příbuzenský dendrogram byl vytvořen v programu DARwin 6.0 shlukovací analýzou UPGMA (Unweighted Pair – Group Method Arithmetic Averages), která byla použita i v jiných studiích identifikace odrůd SSR markery (Struss et al. 2003; Kacar et al. 2005; Najafzadeh et al. 2016). Programem GenAlEx 6.5 byla získána data o klonové identitě vzorků, která se jednoznačně shodovala s výsledky z DARwin 6.0. V rámci vytvořených skupin byly jednotlivé odrůdy porovnány. Vzorky M04, M06 a M10-12 byly společně zařazeny do skupiny klonů, ačkoliv se dle poskytnutého identifikačního plánu řadí k odrůdám Bergeval a Harogem. Standardní odrůdy 1A-3A (Adriana, Harogem,

Velkopavlovická) byly odebírány ze stromů s certifikačním štítkem, které byly vysázeny v roce 2019. Odběry se vždy uskutečňovaly ze 2 nezávislých stromů a výsledky byly pokaždé totožné. Není tedy možné, že by byla odrůda 2A Harogem špatně určena, ale přesto je dle výsledného dendrogramu fylogeneticky velmi vzdálená od Harogemů M10-M12. U zbývajících odrůd Bergeval M09 a M13-M16 byla klonová identita potvrzena. Všechny výše uvedené stromy byly vysázeny ve stejném roce a je tedy možné, že došlo k záměně odrůdového materiálu již v ovocné školce, ze které byly distribuovány. Potencionální příčinou by mohla být i záměna stromků při výsadbě. Nicméně fakt, že jsou odrůdy vzájemně genotypově velmi vzdálené, podporuje spíše pochybení ze strany distribuce. Zpětně už tedy odrůdu nelze dohledat a jediným zdrojem o genetickém pozadí a příbuznosti vzorků je vytvořený dendrogram. Sad na Demonstračním a experimentálním pracovišti ČZU však není šlechtitelský, ale produkční. U produkčních sadů nehraje při prodeji název odrůdy významnou roli, takže se většinou neudává. Záměna odrůd není v tomto případě závažným problémem.

Zjištěné výsledky jasně ukazují, že fenologická a morfologická identifikace *Prunus armeniaca* je velmi problematická. UPOV směrnice pro identifikaci představují nejméně 40 znaků sledovaných během dvou vegetačních období. Molekulární metody identifikace by měly v budoucnu představovat nezbytný standard při kontrole odrůdové pravosti odpovědnými orgány státní administrativy. Tento systém by představoval výraznou časovou a finanční úsporu. Bylo by také možné bezproblémově ověřovat pravost prodávaných odrůd.

7 Závěr

- V této práci bylo zjištěno, že se SSR markery běžně vnitrodruhově převádějí a identifikace odrůd probíhá bezproblémově. V rámci rodu *Prunus* je ovšem vhodnější využití fylogeneticky bližších druhů, jako například *Prunus avium* a *Prunus cerasus* nebo *Prunus armeniaca* a *Prunus persica*. Při analýze jsou lokusy více polymorfnní a zjištěné množství alel vyšší.
- Byla potvrzena hypotéza, že mikrosatelitní markery využívány pro charakterizaci genetické variability *Prunus avium* lze taktéž využít pro identifikaci odrůd *Prunus armeniaca*. Celkové množství 11 SSR markerů bylo schopno identifikovat 19 zástupců *Prunus armeniaca*. Markery prokázaly schopnost relativně vysokého polymorfismu a mnohotného alelismu. Díky těmto vlastnostem představují velmi přesný a účinný nástroj pro detekci mezidruhového polymorfismu a identifikaci odrůd, nejenom u ovocných druhů.
- V případě našeho výzkumu bylo množství 11 SSR markerů dostačující pro identifikaci 19 zástupců *Prunus armeniaca*, kteří byli i značně fylogeneticky odlišní. Mezidruhové použití SSR markerů na *Prunus armeniaca* však momentálně není příliš prostudováno, proto bych do budoucna doporučovala větší zaměření na tuto problematiku. V případě širšího okruhu dostupných studií, by poté bylo v praxi mnohem jednodušší zjistit, které markery je vhodné použít pro konkrétní odrůdy nebo regionální populace odrůd.
- Bylo zjištěno, že identifikace odrůd představuje opravdový problém. V České republice jsou zkoušky odrůdové pravosti prováděny na základě směrnic organizace UPOV, které obsahují přesné pokyny a sledované morfologické znaky pro každou konkrétní plodinu během dvouletého vegetačního cyklu. Tyto zkoušky jsou ovšem pro rychlou identifikaci nedostačující. SSR markery představují slibnou budoucnost molekulární identifikace, která zatím není zákonem schválena. Umožnily by taktéž vyřešení problematiky záměny odrůd při distribuci, se kterou jsme se setkali i ve výsledcích této práce.

8 Literatura

Akpinar AE, Koçal H, Ergül A, Kazan K, Selli ME, Bakır M, Aslantaş S, Kaymak S, Saribaş R. 2010. SSR-based molecular analysis of economically important Turkish apricot cultivars. *Genetics and Molecular Research* **9**:324–332.

Andersen JR, Lübberstedt T. 2003. Functional Markers in Plants. *Trends in Plant Science* **8**: 554-560.

Aranzana MJ, Garcia-Mas J, Carbo J, Arus P. 2002. Development and variability analysis of microsatellite markers in peach. *Plant Breeding* **121**:87–92.

Aranzana MJ, Pineda A, Cosson P, Dirlenwanger E, Ascasibar J, Cipriani G, Ryder CD, Testolin R, Abbott A, King GJ, Iezzoni AF, Arús P. 2003. A set of simple-sequence repeat (SSR) covering the *Prunus* genome. *Theoretical and Applied Genetics* **106**:819-825.

Avvaru KA, Sexena S, Sowpati TD, Mishra KR. 2017. MSDB: A Comprehensive Database of Simple Sequence Repeats. *Genome Biology and Evolution* **9**:1797–1802.

Bakša J, Smatana L. 1990. Třešně a višně na zahrádce. Státní zemědělské nakladatelství, Praha. ISBN 80-209-0158-2.

Bardakci F. 2001. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Markers. *Turkish Journal of Biology* **25**:185-196.

Bažant Z. 2004. Pěstujeme meruňky 1. vyd. Grada Publishing, Praha. Česká zahrada. ISBN 80-247-0873-6.

Bhargava A, Fuentes FF. 2010. Mutational Dynamics of Microsatellites. *Molecular Biotechnology* **44**:250-266.

Blando F, Oomah DB. 2019. Sweet and sour cherries: origin, distribution, nutritional composition and health benefits. *Trends in Food Science and Technology* **86**:517-529.

Boček S. 2015. Extenzivní ovocnictví. Mendelova univerzita, Brno. ISBN 978-80-7509-275-5.

Bradová J, Sýkorová S. 2006. Optimalizace metod elektroforézy proteinů pro identifikaci odrůd ječmene (*Hordeum vulgare* L.). Výzkumný ústav rostlinné výroby, Praha. ISBN 80-86555-97-6

Cifranič P. 1987. Marhule 1.vyd. Příroda, Bratislava.

Cipriani G, Lot G, Huang WG, Marrazzo MT, Peterlunger E, Testolin R. 1999. AC/GT and AG/CT microsatellite repeats in peach [*Prunus persica* (L) Batsch]: isolation, characterisation and cross-species amplification in *Prunus*. *Theoretical and Applied Genetics* **99**:65-72.

Clarke JB, Tobutt KR. 2003. Development and characterization of polymorphic microsatellites from *Prunus avium* 'Napoleon'. *Molecular Ecology Resources* **3**:578-580.

Depypere L, Chaerle P, Breyne P, Mijnsbrugge KV, Goethebeur P. 2009. A combined morphometric and AFLP based diversity study challenges the taxonomy of the European members of the complex *Prunus* L. section *Prunus*. *Plant Systematics and Evolution* **279**:219-231.

Dirlewanger E, Cosson P, Tavaud M, Aranzana MJ, 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.

Downey SL, Iezzoni AF. 2000. Polymorphic DNA markers in black cherry (*Prunus serotina*) are identified using sequences from sweet cherry, peach, and sour cherry. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **125**:76–80.

Dvořák A. 1978. Atlas odrůd ovoce. Státní zemědělské nakladatelství, Praha.

Ehrenbergerová J. 2014. Odrůdy, osivo a sadba. Mendelova univerzita, Brno. ISBN 978-80-7509-003-4.

Ferkl F. 1958. Třešně, višně a sladkovišně. Nakladatelství Československé akademie věd, Praha.

Gaulão L, Oliveira CM. 2001. Molecular characterisation of cultivars of apple (*Malus x domestica* Borkh.) using microsatellite (SSR and ISSR) markers. *Euphytica* **122**:81-89.

Gerlach HK, Stösser R. 1997. Patterns of random amplified polymorphic DNAs for sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivar identification. *Angewandte Botanik* **71**:212-218.

Geuna F, Toschi M, Bassi D. 2003. The use of AFLP markers for cultivar identification in apricot. *Plant Breeding*. **122**:526–531.

Gogorcena Y, Parfitt DE. 1994. Evaluation of RAPD marker consistency for detection of polymorphism in apricot. *Scientia Horticulturae* **59**:163–167.

Hladík F. 1966. Meruňky, broskve, mandle, ořechy vlašské a lískové. Státní zemědělské nakladatelství, Praha.

Hormaza JI. 2002. Molecular characterisation and similarity relationships among apricot (*Prunus armeniaca* L.) genotypes using simple sequence repeats. *Theoretical and Applied Genetics* **104**:321-328.

Jamali HS, Cockram J, Hickey TL. 2020. Is Plant Variety Registration Keeping Pace with Speed Breeding Techniques? *Euphytica* **213**:131.

Jan T. 2011. Peckoviny: přes 160 barevných fotografií a popisů odrůd peckovin. Baštan, Olomouc. ISBN 978-80-87091-18-0.

Jozová E, Stará M, Horáček J, Ludvíková M, Čurn V. 2020. Metodika pro genotypizaci genetických zdrojů máku setého (*Papaver somniferum* L.) pomocí SSR a IRAP markerů. Jihočeská univerzita, České Budějovice. ISBN 978-80-7394-826-9.

- Kacar YA, Iezzoni A, Cetiner S. 2005. Sweet cherry cultivar identification by using SSR markers. *Journal of Biological Sciences* **5**:616-619.
- Korecký J, Bílý J, Sedlák P, Lstibůrek M. 2017. Innovative multiplex and its evaluation for effective genotyping of wild cherry. *Silva Fennica* **51**:1-9.
- Kumar LS. 1999. DNA Markers in Plant Improvement: An Overview. *Biotechnology Advances* **17**:143-182.
- Kumar P, Gupta VK, Misra AK, Modi DR, Pandey BK. 2009. Potential of Molecular Markers in Plant Biotechnology. *Plant Omics Journal* **2**:141-162.
- Kutina J. 1991. *Pomologický atlas I*. Brázda, Praha. ISBN 80-209-0089-6.
- Lateef DD. 2015. DNA Marker Technologies in Plants and Applications for Crop Improvements. *Journal of Biosciences and Medicines* **3**:7-18.
- Licea-Moreno RL, Quintana J, Contreras A, Gomez L. 2019. Using SSR markers from *Prunus* genus for wild cherry genotyping. *Genetics and Biodiversity Journal* **3**:1-10.
- Morgante M, Olivieri AM. 1993. PCR-Amplified Microsatellites as Markers in Plant Genetics. *The Plant Journal* **3**:175-182.
- Moustafa K, Cross J. 2019. Production, pomological and nutraceutical properties of apricot. *Journal of Food Science and technology* **59**:12-23.
- Najafzadeh R, Arzani K, Bouzari N, Saei A. 2016. Genetic Variation and Identification of Promising Sour Cherries Inferred from Microsatellite Markers. *Russian Journal of Genetics* **52**:64-73.
- Peakall R, Smouse PE. 2012. GenALEX 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics* **28**:2537–2539.
- Pedryc A, Ruthner S, Hermán R, Krska B, Hegedus A, Halász J. 2009. Genetic diversity of apricot revealed by a set of SSR markers from linkage group G1. *Scientia Horticulturae* **121**:19-26.
- Radičević S, Cerović R, Nikolić D, Đorđević M. 2016. The effect of genotype and temperature on pollen tube growth and fertilization in sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Euphytica* **209**:121–136.
- Rahemi A, Fatahi R, Ebadi A, Taghavi T, Hassani D, Gradziel T, Foltá K, Chaparro J. 2012. Genetic diversity of some wild almonds and related *Prunus* species revealed by SSR and EST-SSR molecular markers. *Plant Systematics and Evolution* **298**:173-192.
- Richter M. 2004. *Malý obrazový atlas odrůd ovoce 3*. Slivoně, třešně, višně, méně známé druhy ovoce. TG Tisk, Lanškroun. ISBN 80-903487-2-6.

Sambrook J, Fritschi EF, Maniatis T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Sharma K, Xuan H, Sedlák P. 2015. Assessment of genetic diversity of Czech sweet cherry cultivars using microsatellite markers. *Biochemical Systematics and Ecology* **63**:6-12.

Sharma K, Korecký J, Soldateschi EDP, Sedlák P. 2017. S-Genotype Diversity in Wild Cherry Populations in the Czech Republic. *Scientia Agriculture Bohemica* **48**:92-97.

Schlötterer CH. 2000. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma* **109**:365-371.

Schueler S, Tusch A, Schuster M, Ziegenhagen B. 2003. Characterization of microsatellites in wild and sweet cherry (*Prunus avium* L.) – markers for individual identification and reproductive processes. *Genome* **46**:95-102.

Siddiq M, Butt MS, Greiby I. 2012. Apricots Production, Processing and Nutrition. Pages 385-396 in Sinha NK, Sidhu JS, Barta J, Wu JSB, Cano MP. Handbook of Fruits and Fruit Processing, Second Edition. Wiley-Blackwell, Ames. ISBN 978-1-118-35253-3.

Simmonds MSJ, Preedy VR. 2016. Nutritional composition of fruit cultivars. Academic Press, San Diego, CA, USA. ISBN 978-0-12-408117-8.

Stanys V, Frercks B, Šikšnianiene JB, Stepulaitiene I, Gelvonauskiene D, Staniene G, Česlovas Bobinas Č. 2012. Identification of sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars using AFLP and SSR markers. *Zemdirbyste Agriculture* **4**:437-444.

Staub JE, Serquen FC, Gupta M. 1996. Genetic Markers, Map Construction, and Their Application in Plant Breeding. *Horticultural Science* **31**:729-741.

Struss D, Boritzki M, Glozer K, Southwick SM. 2001. Detection of genetic diversity among populations of sweet cherry (*Prunus avium* L.) by AFLPs. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology* **76**:362-367.

Struss D, Ahmad R, Southwick SM, Boritzki D. 2003. Analysis of Sweet Cherry (*Prunus avium* L.) Cultivars Using SSR and AFLP Markers. *Journal of the American Society and Horticultural Science* **128**:904-909.

Sus J, Blažek J. 2002 *Obrazový atlas peckovin 1: odrůdy slivoní, třešní a višní*. Nakladatelství KVĚT, Praha. ISBN 80-85362-44-9.

Sus J. 2003. *Obrazový atlas peckovin 2 (rozšíření o další druhy ovoce)*. Nakladatelství KVĚT, Praha. ISBN 80-85362-47-3.

Tavaud M, Zanetto A, Santi F, Dirlewanger E. 2001. Structuration of genetic diversity in cultivated and wild cherry trees using AFLP markers. *Acta Horticulturae* **546**:263–269.

Testolin R, Marrazzo T, Cipriani G, Quarta R, Verde I, Dettori MT, 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.

- Turkoglu Z, Bilgener S, Ercisli S, Bakir M, Koc A, Akbulut M, Gercekcioglu R, Gunes M, Esitken A. 2010. Simple sequence repeat-based assessment of genetic relationships among *Prunus* rootstocks. *Genetics and Molecular Research* **9**:2156-2165.
- Varshney RK, Graner A, Sorrells ME. 2005. Genic Microsatellite Markers in Plants: Features and Applications. *Trends in Biotechnology* **23**:48-55.
- Vaughan SP, Russell K. 2004. Characterization of novel microsatellites and development of multiplex PCR for large-scale population studies in wild cherry, *Prunus avium*. *Molecular Ecology Notes* **4**:429-431.
- Vávra M. 1963. Komora meruněk, broskví a hroznů. Krajské nakladatelství, Brno. ISBN 47-011-63.
- Vávra R. 2018. Pěstování třešní v zakrytých výsadbách. Výzkumný a šlechtitelský ústav ovocnářský Holovousy s.r.o., Holovousy. ISBN 978-80-87030-66-0.
- Vicente MC, Truco MJ, Egea J, Burgos L, Arús P. 1998. RFLP variability in apricot (*Prunus armeniaca* L.). *Plant Breeding* **177**:153-158.
- Welk E, Rigo D, Caudullo G. 2016. *Prunus avium* in Europe: distribution, habitat, usage and threats. Pages 140-141 in San-Miguel-Ayanz J, de Rigo D, Caudullo G, Houston Durrant T, Mauri A, editors. *European Atlas of Forest Tree Species*. Publication office of European Union, Luxembourg.
- Wen-Hua Q, Xue-Mei J, Chao-Chao Y, Wan-Qing Z, Guo-Sheng X, Bi-Song X, Cai-Quan Z. 2018. Distribution Patterns and Variation Analysis of Simple Sequence Repeats in Different Genomic Regions of Bovine Genomes. *Scientific Reports* **8**:1-13.
- Wünsch A, Hormaza JI. 2002. Molecular characterisation of sweet cherry (*Prunus avium* L.) genotypes using peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] SSR sequences. *Heredity* **89**:56-63.
- Wünsch A, Hormaza JI. 2004. Molecular evaluation of genetic diversity and S-allele composition of local Spanish sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars. *Genetic Resources and Crop Evolution* **51**:635-641.
- Zane L, Bargelloni L, Paternello T. 2002. Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology* **11**:1-16.

9 Internetové zdroje

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2019. FAO statistical database. Available from: <http://www.fao.org.infozdroje.czu.cz/> (accessed February 2021).

Jan T. 2008. Ovocnářská zkušební stanice Želešice. Available from: <https://www.zahradaweb.cz/ovocnarska-zkusebni-stanice-zelesice/> (accessed November 2020).

Perrier X, Jacquemoud-Collet JP. 2006. DARwin software. Available from: <https://darwin.cirad.fr/> (accessed January 2021).

ÚKZÚZ. 2020. Seznam odrůd zapsaných ve Státní odrůdové knize ke dni 15. června 2020. Available from: <http://eagri.cz/public/web/ukzuz/portal/odrudy/informace-o-odrudach/odrudy-registrovane-v-cr/seznam-odrudy/> (accessed October 2020).

ÚKZÚZ. 2021. Informace k registraci odrůdy. Available from: http://eagri.cz/public/web/file/263273/InformaceREG_012021.pdf (accessed January 2021).

Výzkumný a šlechtitelský ústav ovocnářský Holovousy. 2015. Metodické listy OPVK. Původ a vznik ovocných plodin. Výzkumný a šlechtitelský ústav ovocnářský, Holovousy. Available from: https://www.vsuo.cz/images/FILES/VzdelavaciModuly/Zakladky/A22_Puvod_a_vznik_ovocnych_plodin.pdf (accessed November 2020).

Wallace M. 2017. DUS Testing and Molecular Techniques: a view from the UK Plant Breeder's Rights Office. European seed. Available from: <https://european-seed.com/2017/09/dus-testing-molecular-techniques-view-uk-plant-breeders-rights-office/> (accessed January 2021).

Zákon č. 219/2003 Sb. o uvádění do oběhu osiva a sadby pěstovaných rostlin a o změně některých zákonů (zákon o oběhu osiva a sadby). 2003. Available from: <http://eagri.cz/public/web/ukzuz/portal/osivo-a-sadba/legislativa/legislativa-cr/x2011-03-25.html> (accessed January 2021).