

# GENOTYPIZACE ŠVESTKY DOMÁCÍ (*PRUNUS DOMESTICA* L.) POMOCÍ SSR MARKERŮ V PRAXI

Metodika

Kamila Pluhařová a kol.

2024



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

**Autorský kolektiv:**

Ing. Kamila Pluhařová<sup>1</sup>, RNDr. Radek Čmejla, Ph.D.<sup>1</sup>, prof. Dr. Ing. Boris Krška<sup>1</sup>,  
Ing. Pavel Voráček<sup>2</sup>, RNDr. Jana Čmejlová, Ph.D.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOCNÁŘSKÝ HOLOVOUSY s.r.o.,  
Holovousy 129, 508 01 Hořice

<sup>2</sup> FYTOS, Ing. Pavel Voráček, Radčická 1107/86, 301 00 Plzeň

**Odborný oponent:** Ing. Tomáš Kiss, Ph.D., Ústav ovocnictví, Zahradnická fakulta, Mendelova  
univerzita v Brně

**Oponent za státní správu:** MVDr. Kateřina Staňková, Ústřední kontrolní a zkušební ústav  
zemědělský

**Autoři fotografií a obrázkových schémat:**

RNDr. Jana Čmejlová, Ph.D., Ing. Michaela Marklová, Ondřej Nosek, Mgr. Liliia Pavliuk,  
Ph.D., Ing. Jiří Sedlák, Ph.D.

**Genotypizace švestky domácí (*Prunus domestica* L.) pomocí SSR markerů  
v praxi**

Metodika je výsledkem řešení výzkumného projektu Národní agentury pro zemědělský výzkum  
(NAZV) Ministerstva zemědělství České republiky č. QK22010268: Vývoj systémů pro  
genotypování ovocných plodin a jejich implementace do praxe.

© VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOCNÁŘSKÝ HOLOVOUSY s.r.o.,  
Holovousy 129, 508 01 Holovousy

**ISBN 978-80-88669-02-9 (online, pdf)**

<https://doi.org/10.60615/reb7-8p71>



# OBSAH

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Anotace</b> .....   | <b>4</b>  |
| <b>1. Úvod</b> .....   | <b>5</b>  |
| <b>2. Cíl metodiky</b> .....   | <b>7</b>  |
| <b>3. Vlastní popis metodiky</b> .....   | <b>8</b>  |
| 3.1 <i>Popis metodiky – Úvod</i> .....   | 8         |
| 3.2 <i>Materiál a metody</i> .....   | 10        |
| 3.2.1 Odběr vzorků, přeprava vzorků.....   | 10        |
| 3.2.2 Příprava DNA.....  | 10        |
| 3.2.2.1 Homogenizace rostlinného materiálu.....  | 10        |
| 3.2.2.2 Izolace genomové DNA.....  | 11        |
| 3.2.3 Sestavení PCR reakce.....  | 13        |
| 3.2.4 Fragmentační analýza.....  | 16        |
| 3.2.5 Vyhodnocení a interpretace dat.....  | 17        |
| 3.2.5.1 Očekávané výsledky.....  | 17        |
| 3.2.5.2 Možné problémy při analýze dat („Troubleshooting“)......   | 21        |
| 3.2.5.2.1 Alely lišící se pouze o 1 nukleotid.....   | 21        |
| 3.2.5.2.2 „Stuttering“ alel.....   | 22        |
| 3.2.5.2.3 Prosvícení signálu pocházejícího z jiné fluorescenční barvy.....   | 25        |
| 3.2.5.2.4 Nízký signál alely.....  | 27        |
| 3.2.5.2.5 Mutace v SSR markerech u odrůd.....  | 27        |
| 3.2.5.2.6 Zdroj chyb v pre-analytické a analytické fázi.....   | 29        |
| <b>4. Srovnání novosti postupů</b> .....   | <b>30</b> |
| <b>5. Popis uplatnění metodiky</b> .....   | <b>30</b> |
| 5.1 <i>Tvorba referenční databáze pro účely ověřování a identifikace odrůd</i> .....   | 30        |
| 5.1.1 Referenční databáze pro pěstitelskou praxi v České republice.....  | 31        |
| 5.1.2 Referenční databáze pro účely uznávacího řízení.....   | 31        |
| 5.1.3 Referenční databáze pro sbírkové účely.....  | 31        |
| 5.2 <i>Prověření produkčního řetězce výroby výpěstků</i> .....   | 32        |
| <b>6. Ekonomické aspekty</b> .....   | <b>33</b> |
| 6.1 <i>Ověření pravosti odrůdy před výsadbou – kalkulace ztrát na hektar při výsadbě špatné odrůdy z pohledu pěstitele</i> .....   | 33        |
| 6.2 <i>Prvek zajištění kvality ve výrobních podnicích (školkách) – kalkulace ztrát při výrobě špatné odrůdy potřebné k osázení jednoho hektaru sadu z pohledu školkaře</i> ..... | 34        |
| 6.3 <i>Ověřování dodržování licenčních podmínek – kalkulace ztrát při neuplatnění licenčních poplatků</i> .....  | 35        |
| 6.4 <i>Ověřování odrůd při prodloužení jejich registrace u Národního odrůdového úřadu – kalkulace nákladů</i> .....  | 35        |
| 6.5 <i>Shrnutí</i> .....   | 36        |
| <b>7. Seznam použité související literatury</b> .....  | <b>37</b> |
| <b>8. Seznam publikací, které předcházely metodice</b> .....   | <b>38</b> |
| <b>Příloha – Charakteristika referenčních odrůd</b> .....  | <b>40</b> |
| <b>Příloha – Osvědčení o uznání metodiky</b> .....   | <b>48</b> |

## ANOTACE

Švestka domácí (syn. slivoň švestka; *Prunus domestica* L.) patří nejen v České republice mezi velmi významné zemědělské plodiny, je pěstována po celém světě zejména v mírném klimatickém pásu. Předpokládá se, že po celém světě existuje více než šest tisíc odrůd švestek a slív a mnoho šlechtitelských programů se stále zaměřuje na produkci nových, kvalitnějších odrůd. V České republice bylo Národním odrůdovým úřadem Ústředního kontrolního a zkušebního ústavu zemědělského v roce 2024 ve Státní odrůdové knize zapsáno 55 odrůd, na trhu je však dostupná i řada dalších odrůd. Správné určení jejich identity je potřebné na všech úrovních produkce rostlinného materiálu, zvláště jedná-li se o práci s certifikovaným materiálem. Ověřování odrůd je také nezbytné pro kontrolu deklarované odrůdové pravosti, např. při uznávacím řízení nových odrůd, prodlužování jejich registrace nebo při kontrolní činnosti. Rozlišení jednotlivých odrůd pomocí fenotypového a fenologického hodnocení, které se standardně provádí, je nejen časově náročné, ale také obtížné a v některých případech, vzhledem k počtu existujících odrůd, dokonce nemožné. V dnešní době se proto pro určení identity odrůd využívá i mnohem rychlejší a velmi přesné určování odrůdy/genotypu pomocí molekulárních markerů (genotypování). Pro genotypování švestky domácí byla vyvinuta sada PlumSSR, která pomocí fragmentační analýzy detekuje 8 SSR (simple sequence repeats, krátké tandemové repetice) markerů v jediné reakci. Metodika poskytuje podrobný návod pro genotypizaci švestky domácí pomocí těchto markerů a předkládá možnosti jejího využití v praxi.

## 1. ÚVOD

Švestka domácí (syn. slivoň švestka; *Prunus domestica* L.) je zemědělsky významný hexaploidní druh ovoce ( $2n = 6x = 48$ ) pěstovaný po celém světě kromě některých regionů Afriky ([CABI compendium](#)). V České republice je švestka domácí druhou nejvýznamnější ovocnou dřevinou po jabloních a je pěstována na rozloze přibližně 2000 ha s roční sklizní z produkčních sadů pohybující se okolo 8000 t ([sklizen-ovoce-2023](#)). Produkuje chutné, nutričně významné plody, které mají rozsáhlé využití. Konzumují se v čerstvém nebo sušeném stavu, popřípadě ve zpracované formě (povidla, kompoty, destiláty aj.). Plody švestky domácí jsou velmi rozmanité a celý druh je proto rozdělen do několika pomologických podskupin, nicméně hranice mezi nimi je téměř nemožné přesně definovat (Faust, 1999). Existují různé klasifikace švestky domácí, např. podle Cullen, 1995 se mezi poddruhy švestky domácí řadí:

- pravé švestky (*Prunus domestica* L. subsp. *domestica*),
- slívy (*Prunus domestica* L. subsp. *insititia*),
- pološvestky (*Prunus domestica* L. subsp. *intermedia*),
- renklódy (*Prunus domestica* L. subsp. *italica*),
- blumy (*Prunus domestica* L. subsp. *pomariorum*),
- modré renklódy (*Prunus domestica* L. subsp. *prisca*),
- mirabelky (*Prunus domestica* L. subsp. *syriaca*).

Podle Hegi, 1925 se kulturní odrůdy rozlišují pomologicky podle vzrůstnosti a habitu stromu a znaků a vlastností plodů a dělí se na:

- subspecies *insititia* – slívy:
  - varieta *juliana* – vlastní slívy
  - varieta *pomariorum* – špendlíky
  - varieta *cerea* – mirabelky
- subspecies *italica* – renklódy:
  - varieta *claudiana* – kulaté renklódy
  - varieta *ovoidea* – vejčité renklódy
- subspecies *oeconomica* – švestky:
  - varieta *subrotunda* – kulovité švestky
  - varieta *oxycarpa* – oválné švestky
  - varieta *mammilaris* – datlovky a pološvestky
  - varieta *prunauliana* – pravé švestky.

Pro jednodušší pochopení a začlenění v kolekci na základě hlavních pomologických znaků slivoň byla tato klasifikace modifikována a byly do ní zahrnuty i pomologicky blízké druhy, vykazující však odlišný počet sad chromozómů:

- hexaploidní druhy ( $n = 8, 6n = 48$ ):
  - vlastní slívy, mirabelky, špendlíky (*Prunus domestica* L. subsp. *insititia*)
  - renklódy (*Prunus domestica* L. subsp. *italica*)
  - pravé švestky a pološvestky (*Prunus domestica* L. subsp. *oeconomica*)
- diploidní druhy ( $n = 8, 2n = 16$ ):
  - slivoň japonská (čínská, vrbová) – (*P. salicina* Lindl., syn. *triflora*)
  - myrobalán drobnoplodý – (*P. cerasifera* Ehrh., subsp. *microcarpa*, *P. divaricata*)
  - myrobalán velkoplodý – (*P. cerasifera* Ehrh., subsp. *macrocarpa vera*)

- myrobalán velkoplodý hybridní – (*P. cerasifera* Ehrh., subsp. *macrocarpa hybrida*)
- myrobalán velkoplodý – taurický – (*P. cerasifera* Ehrh., subsp. *macrocarpa taurica*)

Určení či potvrzení identity má u všech ovocných stromů zásadní význam, neboť vysázené sady jsou nemalou investicí a bývají obhospodařovány několik desítek let. Správné určení odrůdy je tedy významné na všech úrovních rostlinné produkce. Zvláštního významu nabývá zejména při práci s certifikovaným materiálem – např. u certifikačního orgánu (Národní odrůdový úřad Ústředního kontrolního a zkušebního ústavu zemědělského, NOÚ ÚKZÚZ), kde dochází k registraci nových odrůd, udílení ochrany práv k odrůdám či k prodlužování registrace odrůd; producentů a prodejců rozmnožovacího materiálu (školky, roubové množárny); pěstitelů; dovozců plodů a také šlechtitelů, kteří mají zájem o ochranu práv u jejich vyšlechtěných odrůd, které jim zabezpečují příjmy z licenčních poplatků. V současnosti je v České republice zapsáno ve Státní odrůdové knize 55 odrůd *P. domestica* L. ([Odrůdová kniha 2024](#)), na trh jsou však dodávány i další odrůdy.

Zkoušení odrůd pro udělení ochrany práv v České republice probíhá sledováním odrůd po dosažení plodnosti klasickým způsobem (tzv. DUS testy), kdy jsou odrůdy fenotypově a fenologicky hodnoceny alespoň dva roky. Sleduje se převážně odlišnost od stávajících obecně známých odrůd, uniformita testovaného materiálu a stálost znaků mezi jednotlivými lety testování. Hodnocení je nutné provádět opakovaně, aby se minimalizovaly externí vlivy na fenotypový projev posuzovaného materiálu, jež by mohly znaky odrůdy ovlivnit, např. extrémní počasí, choroby nebo škůdci. Zároveň závisí na zkušenostech hodnotitele. Prodlužování registrace je rychlejší, ale přesto je nutné sledovaný materiál hodnotit alespoň jednu sezónu.

Velkou pomocí při určování odrůd u rostlinného materiálu mohou být molekulárně genetické metody, které sice nepodávají informace o uniformitě a stálosti registrovaného materiálu, ale v případě porovnávání materiálu s dříve registrovanými odrůdami (tj. vyloučení mutací/klonů dosavadních odrůd) či při identifikaci biologického materiálu jsou velmi přesné a rychlé. Jedná se o tzv. genotypizaci, kdy je prováděna analýza molekulárních markerů na úrovni genomové DNA. Její výhody jsou nesporné - je k ní potřeba pouze malé množství vstupního materiálu, např. list nebo výhon, analýzu lze provádět celoročně bez ohledu na stáří testovaného materiálu a jeho schopnost plodit ovoce. Zároveň je velmi rychlá, v případě potřeby je možné výsledky dodat v řádu několika hodin. Proto je genotypizace při ověřování materiálu nebo při prodlužování registrace schopná zcela nahradit fenotypické/fenologické testování.

Pro rutinní genotypování švestky domácí je vhodné využívat mikrosatelitní neboli SSR markery (Simple Sequence Repeat), které tvoří opakující se sekvence 2–8 nukleotidů. Pro genotypování se nejčastěji využívají SSR markery s repeticí 2 nukleotidů, které vykazují u jednotlivých odrůd různě dlouhé alely. SSR markery jsou vysoce informativní, multialelické a analyticky dobře hodnotitelné (Vieira, 2016). Jelikož je švestka domácí hexaploidní organismus ( $2n = 6x = 48$ ), nejsou pro její analýzu příliš vhodné modernější genotypovací techniky analyzující jednonukleotidové polymorfizmy (vysokokapacitní sekvenování) (Zhebentyayeva, 2019). Délky alel PCR amplifikovaných SSR markerů se vyhodnocují fragmentační analýzou nejčastěji pomocí kapilární elektroforézy, která je schopná rozlišit

fragmenty s rozdílem 1 nukleotidu a zároveň umožňuje multiplexování několika markerů do jedné reakce, což velmi významně snižuje cenu genotypizace.

SSR markery jsou využívány pro genotypování švestky domácí již delší dobu (např. Xuan (2011), Sehic (2015), Makovics-Zsohár (2017), Pop (2018), Urrestarazu (2018), Abdallah (2019), Manco (2019) nebo Gasi (2020)), žádná z těchto publikací však neumožňuje identifikaci odrůdy v jediné reakci. Kromě těchto publikací doporučilo mezinárodní uskupení The European Cooperative Programme for Plant Genetic Resources (ECPGR; [www.ecpgr.cgiar.org](http://www.ecpgr.cgiar.org)) pro genotypování švestky domácí sadu 9 SSR markerů amplifikovaných v 9 nezávislých amplifikačních (PCR) reakcích a analyzovaných v 9 fragmentačních analýzách (Nybom, 2020). Z důvodu velmi odlišných podmínek PCR amplifikace těchto SSR markerů a možného vzniku nespecifit při PCR sami autoři nedoporučují multiplexování těchto markerů, to však velmi prodražuje analýzu. Proto byla vytvořena genotypizační sada PlumSSR obsahující 8 SSR markerů, které jsou amplifikovány a analyzovány v jediné PCR reakci, respektive fragmentační analýze. Pro tuto sadu byly vybrány SSR markery vykazující vysokou heterogenitu a relativně snadnou zhodnotitelnost výstupů fragmentační analýzy na kapilárním genetickém analyzátoru. Vybraná sada SSR markerů byla ověřena na genofondových sbírkách VŠÚO a NOÚ ÚKZÚZ obsahujících 250 unikátních genotypů.

Metodika poskytuje ucelený návod pro genotypizaci hexaploidní švestky domácí v praxi, od odběru vzorků až po samotné vyhodnocení analýz. Popisuje taktéž výhody provádění genotypování pro jednotlivé články produkčního řetězce švestky domácí. Rovněž porovnává použitou metodu s dosavadním stavem techniky v oboru genotypování a uvádí její výhody. Nepopisuje však analýzu diploidních druhů slivoní, i když lze tuto sadu použít i pro verifikaci např. japonské slívy (*P. salicina* Lindl.).

## 2. CÍL METODIKY

V dnešní době dochází na území České republiky k určování odrůd slivoní pomocí zdlouhavého porovnávání fenotypových a fenologických znaků, které není možné provádět u výpěstků v juvenilním stádiu či v kterémkoliv ročním období. Cílem této metodiky je zavedení laboratorního postupu genotypizace švestky domácí do praxe, kde je využívána genomová DNA rostliny a na jejím základě se určuje genetický profil SSR markerů unikátní pro danou odrůdu. Metodika poskytuje ucelený návod, jak zavést metodu do praxe tak, aby bylo dosaženo validních výsledků. Je tedy určena jak pro laboratoře molekulární biologie, tak i pro uživatele využívající výsledky ověřování odrůd ve své praxi, kdy se může jednat např. o:

- vzájemné porovnání vzorků, kdy se určuje pouze vzájemná (ne)shoda vzorků;
- identifikaci vzorků pomocí porovnání vzorku s referenční databází;
- ověřování (určování) rodičů křížení.

Metodika není primárně určena pro vzájemné odlišení jednotlivých mutací/klonů odrůd, ani pro určování diploidních druhů slivoní. Tematicky navazuje na již vydané metodiky pro genotypování meruňky obecné (*Prunus armeniaca* L.) (Nekvindová, 2021) a jabloně domácí (*Malus domestica* Borkh.) (Pluhařová, 2023).

### 3. VLASTNÍ POPIS METODIKY

#### 3.1 Popis metodiky – Úvod

Laboratorní část metodiky předpokládá znalost základních principů práce v laboratoři molekulární biologie a specifické zkušenosti zahrnující provádění fragmentační analýzy pomocí kapilárního genetického analyzátoru, vyhodnocování dat a jejich interpretace. Postup byl optimalizován pro konkrétní vybavení laboratoře a pro konkrétní reagentie, uživatel si proto bude muset metodu verifikovat na svém pracovišti a i pro tento účel jsou v metodice uvedeny referenční odrůdy švestky domácí, včetně relativní velikosti alel jednotlivých SSR markerů.

Pro genotypizaci švestky domácí byla využita genotypizační sada PlumSSR, která pro stanovení genetického profilu využívá 8 SSR markerů (Tabulka 1), které se analyzují najednou v jediné multiplexní PCR reakci a následně fragmentační analýze. Alelická kombinace těchto SSR markerů je unikátní pro každou odrůdu. Vzhledem k tomu, že u hexaploidní švestky domácí nebyly dosud popsány SSR markery vyvinuté přímo pro tento organizmus, s výhodou se používají markery identifikované v blízké příbuzných diploidních druzích rodu *Prunus*, jako jsou meruňka obecná (*Prunus armeniaca* L.), třešeň ptačí (*Prunus avium* L.), broskvoň obecná (*Prunus persica* (L.) Batsch), slivoň vrbová, často označovaná jako japonská bluma (*P. salicina* Lindl.) či další. Vybrané markery vykazují vysokou heterogenitu a jejich výstupy z fragmentační analýzy jsou dobře hodnotitelné, což je u hexaploidní švestky domácí zejména důležité. Jeden z vybraných mikrosatelitů (PacA33) je zároveň SSR markerem doporučeným uskupením The European Cooperative Programme for Plant Genetic Resources (ECPGR) (Nybom, 2020). Porovnáním alelických profilů jednotlivých SSR markerů je pak možné určit shodu mezi vzorky, případně lze profil porovnat s databází referenčních genotypů. U organizmů s vyšší ploidií než 2 je obtížné stanovit pravděpodobnost náhodné shody dvou nepříbuzných vzorků, jelikož se některé alely mohou vyskytovat v jednom genomu opakovaně, jsou však započítávány pouze jednou. Testovaná kolekce 250 odrůd však vykazovala v 8 analyzovaných markerech velmi vysokou heterogenitu a průměrně téměř 36 alel/genotyp, tj. 4,5 alely/SSR marker, a umožnila odlišení jednotlivých odrůd.



**Tabulka 1.** Charakteristika SSR markerů použitých pro genotypizaci švestky domácí.

| Marker <sup>1/</sup> | Organismus,<br>ve kterém byl<br>marker<br>identifikován | Referenční<br>sekvence<br>v databázi<br>GenBank | Pozice v genomu<br><i>P. salicina</i> Lindl. <sup>2/</sup> | Citace            | Forward primer <sup>3/</sup>                         | Reverse primer <sup>3/</sup>    |
|----------------------|---|---|--|-------------------|--|---------------------------------|
| CPPCT033_a           | <i>P. persica</i> L.<br>Batsch                          | -<br>(sekvenace ve<br>VŠÚO)                     | Chr7 (23002294 až<br>23002474)                             | Aranzana,<br>2002 | <b>GTGAATTCAGCAAACCTAGAAACAAAC</b>                   | <b>GCTTTGAAGTGGGTTTGATAATAG</b> |
| CPSCT042             | <i>P. salicina</i><br>Lindl.                            | AY426226  | Chr7 (23392510 až<br>23391914)                             | Mneja,<br>2004    | TGGCTCAAAAGCTCGTAGTG                                 | CCAACCTTTCGTTTCGTCTC            |
| UDP98-412            | <i>P. persica</i> (L.)<br>Batsch                        | BV079712.1                                      | Chr6 (31448043 až<br>31448381)                             | Testolin,<br>2000 | F1: AGGGGAAGTTTCTGCTGCAC<br>F2: AGAGGAAGCTGCTGCTGCAC | GCTGAAGACGACGATGATGA            |
| CPSCT005             | <i>P. salicina</i><br>Lindl.                            | AY426193  | Chr4 (1562294 až<br>1562734)                               | Mneja,<br>2004    | CTGCAAGCACTGTGGATCTC                                 | CCCATATTCCCAACCCATTA            |
| EMPAS02              | <i>P. avium</i> L.                                      | AY526619.1                                      | Chr3 (2203720 až<br>2204029)                               | Vaughan,<br>2004  | CTACTTCCATGATTGCCTCAC                                | AACATCCAGAACATCAACACAC          |
| AMPA100              | <i>P. armeniaca</i> L.                                  | AY377905  | Chr6 (4181890 až<br>4181677)                               | Hagen,<br>2004    | TGTTTAGTTGAGGGTAACTTTGG                              | CCCTTCCTTTTCTGTGTCTCAC          |
| CPSCT039             | <i>P. salicina</i><br>Lindl.                            | AY426224  | Chr4 (31942259 až<br>31941653)                             | Mneja,<br>2004    | GCCGCARCTCGTAAGGAATA                                 | TCCACYGTTGATTACCCTTC            |
| PacA33 <sup>4/</sup> | <i>P. armeniaca</i> L.                                  | BQ134649.1                                      | Chr8 (25768660 až<br>25769009)                             | Decroocq,<br>2003 | TCAGTCTCATCCTGCATACA                                 | CATGTGGCTCAAGGATCAAA            |

1/ Koncovka názvu markeru „\_a“ znamená, že byly pro amplifikaci použity primery navržené v jiné než originální pozici, tj. délka alely amplifikované původními primery se liší od délky téže alely amplifikované podle této metodiky. Jedná se však o amplifikaci téhož polymorfního místa genomu.

2/ Genom *Prunus salicina* Lindl., odrůda 'Sanyueli', verze genomu v2.0 (Liu, 2020, analýza na [www.rosaceae.com](http://www.rosaceae.com)).

3/ V některých případech je sekvence odlišná od původně publikovaných primerů – změna nukleotidu je uvedena tučně. V případě, kdy se jedná o změnu pouze několika nukleotidů, byla sekvence přizpůsobena sekvenci příslušné oblasti u švestky domácí z důvodu lepší amplifikace alel. Pokud je tučně uveden celý primer, byla navržena zcela nová sekvence primeru z důvodu prodloužení amplifikované oblasti.

4/ SSR marker doporučený ECPGR.

Kritické body, na které je při provádění metodiky třeba zvláště dbát:

- Dodržování zásad dekontaminace a hygieny doporučených pro laboratoře molekulární biologie pro vyloučení možných kontaminací.
- Dodržování všech zásad správné laboratorní praxe v laboratoři molekulární biologie.

## **3.2 Materiál a metody**

Vlastní postup genotypování lze rozdělit do tří fází:

1. Pre-analytická fáze – odběry vzorků a jejich příjem do laboratoře, uchování do doby analýzy.
2. Analytická fáze – zpracování vzorků v laboratoři, homogenizace, izolace DNA, sestavení PCR reakce, vlastní fragmentační analýza.
3. Post-analytická fáze – vyhodnocení a interpretace nálezů, vytvoření finální podoby výsledku.

### **3.2.1 Odběr vzorků, přeprava vzorků**

Vstupním materiálem pro genotypování je genomová DNA, kterou je možné získat izolací z různých částí rostliny. Pro rutinní analýzy je vhodné používat ve vegetační době listy, popřípadě lýko, ze kterého lze DNA izolovat celoročně. Metodika nebyla testována pro jiné druhy pletiva švestky domácí (např. plody) či produkty obsahující švestky (povidla, marmelády, kompoty aj.).

Pro samotný odběr se doporučuje odebrat vždy 2 nezávislé vzorky z jednoho stromu, tj. 2 listy nebo 2 výhony, ideálně dvouleté. Odebrané vzorky je vhodné skladovat v plastovém sáčku v chladu (v období vysokých teplot je vhodné pro transport materiálu použít chladicí vložky) a dopravit je v co nejkratším čase do laboratoře. Podle typu analýz se zpracovává buď jeden list (např. při ověřování konkrétního materiálu), nebo dva listy nezávisle (např. při tvorbě referenční databáze).

Po příjmu vzorků do laboratoře se vzorky uchovávají v chladničce, kdy je vhodné DNA izolovat co nejdříve, nebo se vzorky (listy) šokově zamrazí v tekutém dusíku a skladují se až do doby izolace DNA v mrazicím boxu při teplotě  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Při této teplotě je vzorky možné skladovat bez ztráty kvality minimálně 1 rok.

### **3.2.2 Příprava DNA**

Příprava DNA se provádí ve dvou základních krocích:

1. Homogenizace rostlinného materiálu
2. Izolace genomové DNA

#### **3.2.2.1 Homogenizace rostlinného materiálu**

Homogenizaci neboli nadrcení rostlinného materiálu lze provést v třecí misce v tekutém dusíku. Tento postup je vhodný pro všechny typy vstupního materiálu a je zcela ideální pro izolaci DNA z lýka, které se škrábe z výhonu pomocí sterilního skalpelu po odstranění kůry. Rostlinný materiál se v třecí misce homogenizuje na jemný prášek, který je nutné okamžitě použít pro izolaci DNA.

Pro izolaci DNA z listů se mohou použít i mechanické homogenizátory, které slouží k rychlejší homogenizaci většího počtu vzorků, např. homogenizátor TissueLyser II (Qiagen),

který rozrušuje rostlinné pletivo pomocí vysokorychlostního protřepávání vzorku s ocelovými kuličkami.

#### Doporučený postup homogenizace s využitím homogenizátoru TissueLyser II (Qiagen):

1. Cca 100 mg rostlinného pletiva se přenese do 2ml zkumavky a přidá se sterilní kulička z nerezové oceli o průměru 5 mm.
2. Zkumavky s rostlinným materiálem se nechají vytemperovat na  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  v suchém ledu.
3. Zkumavky s pletivem se vloží do předem vychlazených adaptérů ( $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) přístroje TissueLyser II, kde probíhá vlastní homogenizace po dobu 2 min s frekvencí 30 Hz.
4. Po provedené homogenizaci se odstraní ocelová kulička a bezprostředně se pokračuje izolací genomové DNA podle návodu výrobce používaného DNA izolačního kitu.

Správně provedená homogenizace je klíčovým předpokladem pro efektivní izolaci DNA!

#### **3.2.2.2 Izolace genomové DNA**

Metodika je validována s využitím komerčně dodávaného DNA izolačního kitu Exgene Plant SV mini (GeneAll Biotechnology, Co., Ltd.; k.č. 117-152; dodává Bohemia Genetics s.r.o) kolonového typu. Základní charakteristiky kitu shrnuje Tabulka 2. Postupuje se podle návodu výrobce.

**Tabulka 2.** Charakteristika DNA izolačního kitu Exgene Plant SV mini (GeneAll).

| Parametr                            | Specifikace                  |
|-------------------------------------|------------------------------|
| Typ izolace                         | Kolonová                     |
| Maximální množství výchozího vzorku | ~ 100 mg rostlinného pletiva |
| Trvání izolace                      | ~ 40 min                     |
| Maximální objem kolony              | ~ 700 $\mu\text{l}$          |
| Minimální eluční objem              | 30 $\mu\text{l}$             |
| Maximální vazebná kapacita          | ~ 50 $\mu\text{g}$           |
| Typický výtěžek DNA                 | 4–40 $\mu\text{g}$           |

#### ***Použité přístroje, nástroje, spotřební plast, reagentie***

- Souprava pro izolaci genomové DNA Exgene Plant SV mini (GeneAll Biotechnology)
- Stolní centrifuga s rotorem pro 2ml zkumavky, minimálně 13 000 RPM
- Vyhřívavý blok pro 2ml zkumavky s možností nastavení  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$
- Vortex
- Sada laboratorních pipet pro objemy do 1 ml
- Skalpelové čepelky na jedno použití, násadka skalpelu pro přípravu lýka pro homogenizaci
- Sterilní špachtličky
- Sterilní zkumavky 1,5ml a 2ml, stojánky na zkumavky
- Filtrované špičky
- Ethanol 96–100%, p.a. nebo molecular biology grade
- Dekontaminační sprej (např. Desprej, Descosept), ROTI Nucleic Acid-free sprej

### **Pracovní postup**

- Detailní postup izolace DNA a další informace jsou uvedeny v doprovodné brožuře výrobce.
- Izolace DNA probíhá v prostorách k tomu určených v rámci laboratoře molekulární biologie (pre-PCR area) v souladu s principy správné laboratorní praxe.
- Před prací je nutné seznámit se s obsluhou jednotlivých přístrojů a bezpečným zacházením s používanými reagensy.
- Před prvním použitím izolačního kitu je nutné přidat ethanol (96% – absolutní) k pufrům BD a CW podle údajů uvedených na lahvičce. Po přidání se na lahvičkách čitelně vyznačí, že byl ethanol přidán.
- Zkontrolujte před zahájením vlastní izolace dostupnost ledu.
- Před začátkem práce zapněte vyhřívaný blok a nastavte teplotu na 65 °C.
- Před začátkem vlastní izolace zkontrolujte, zda v pufrách (zejména v pufru PL) nejsou sraženiny. Pokud ano, umístěte lahvičky s pufrů na vyhřívaný blok a rozpust'te jejich obsah při 65 °C.
- Všechny centrifugační kroky se provádějí při pokojové teplotě při otáčkách 13 000 až 14 000 RPM.
- Pro izolaci DNA se používají špičky s filtrem.
- Jako kontrolu kvality přípravy DNA a ověření čistoty reagensů používaných pro izolaci lze doporučit tzv. extrakční kontrolu. K sérii paralelně izolovaných vzorků se provede kontrolní izolace, ale bez použití vstupního rostlinného materiálu. Tímto způsobem se testuje případná kontaminace použitých reagensů pro izolaci DNA.

\*\*\*\*\*

1. Standardně se cca 100 mg dobře zhomogenizovaného vzorku přenesou sterilní špachtličkou do 2ml zkumavky. V případě použití homogenizátoru se z 2ml zkumavky s homogenizovaným materiálem vyjme kulička z nerezové oceli.
2. Přidá se 400 µl pufru PL a 3 µl roztoku RNasy A (100 mg/ml). Provede se intenzivní zvortexování.
3. Pokud se zpracovává pouze jeden vzorek, pokračuje se následným krokem. Pokud se zpracovává větší množství vzorků, nechají se již připravené vzorky v PL pufru s RNasou A inkubovat při pokojové teplotě do okamžiku, než jsou všechny vzorky převedeny do PL pufru s RNasou A podle bodů 1–3. Pak se pokračuje následujícím krokem č. 4.
4. Vzorky se inkubují 15 minut při 65 °C ve vyhřívaném bloku, každých 5 minut se provede krátké zvortexování.
5. K homogenátu se přidá 140 µl pufru PD. Vzorky se zvortexují a inkubují se 5 minut na ledu.
6. Homogenát se přenesou pomocí tenké kovové špachtličky nebo 1ml špičky s filtrem s uštíženou špičkou na EzSep filtr (modrá barva) a centrifuguje se 2 minuty.
7. Proteklý lyzát se opatrně bez narušení pelety přenesou špičkou s filtrem do nové 1,5ml zkumavky; typicky se jedná o 420 µl lyzátu.

8. K lyzátu se přidá pufr BD v množství 1,5násobku objemu lyzátu (k 420  $\mu$ l lyzátu se přidá 630  $\mu$ l); roztoky je nutné okamžitě promíchat otáčením zkumavky nebo propipetováním.
9. 700  $\mu$ l směsi z kroku 8 se přenese špičkou s filtrem na zelené SV kolony se sběrnou zkumavkou. Centrifuguje se 1 minutu. Proteklá tekutina se vyleje, hrany sběrné zkumavky se otrou čistou buničitou vatou. SV kolona se opět vsune do sběrné zkumavky.
10. Na kolonu se nanese špičkou s filtrem zbytek lyzátu. Centrifuguje se 1 minutu. Proteklá tekutina se vyleje, hrany sběrné zkumavky se otrou čistou buničitou vatou. SV kolona se opět vsune do sběrné zkumavky.
11. Na SV kolonu se přidá 700  $\mu$ l pufru CW, centrifuguje se 1 minutu. Proteklá tekutina se vyleje, hrany sběrné zkumavky se otrou čistou buničitou vatou. SV kolona se opět vsune do sběrné zkumavky.
12. Na SV kolonu se přidá 300  $\mu$ l pufru CW, centrifuguje se 1 minutu. Proteklá tekutina se vyleje, hrany sběrné zkumavky se otrou čistou buničitou vatou. SV kolona se opět vsune do sběrné zkumavky. Centrifuguje se 1 minutu, aby se zcela odstranil CW pufr z filtru. Po stočení se SV kolona opatrně vsune do čisté 1,5ml zkumavky.
13. Na SV kolonu se přidá 100  $\mu$ l pufru AE. Nechá se inkubovat 5 minut při pokojové teplotě, poté se stáčí 1 minutu.
14. Orientační určení čistoty a množství izolované DNA se provádí spektrometricky při vlnových délkách 260 nm (kvantita) a 280 nm (čistota jako poměr naměřených hodnot při vlnových délkách 260/280 nm). Izolovaná DNA by měla mít ideálně čistotu vyšší než 1,8. Pokud je čistota nižší, nelze vyloučit negativní dopad na prováděné analýzy.
15. Eluovanou DNA je možné použít pro další aplikace, nebo zamrazit při teplotě  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  nebo nižší.

### **3.2.3 Sestavení PCR reakce**

Použitá genotypizační sada PlumSSR obsahuje 17 primerů (pro marker UDP98-412 jsou používány dva „forward“ primery) a umožňuje současnou amplifikaci 8 SSR markerů v jedné PCR reakci. Fluorescenční značení a koncentrace primerů ve výsledné reakci jsou uvedeny níže v Tabulce 3, která zároveň uvádí i návod k přípravě tzv. premixu primerů, jehož použití se doporučuje pro analýzu většího množství vzorků. Je vhodné premix nejdříve ověřit na vzorcích DNA referenčních odrůd. PCR reakce byla optimalizována s využitím cyklieru C1000 (Bio-Rad) a níže uvedených reagensií. Uživatelé si budou muset postup verifikovat a popřípadě upravit pro své laboratorní podmínky.

#### ***Použité přístroje, nástroje, spotřební plast, reagensie***

- PCR box
- Minispin centrifuga
- Vortex
- PCR cykler
- Sada laboratorních pipet pro objemy do 1 ml
- Filtrované špičky
- Sterilní zkumavky 1,5ml, stojánky na zkumavky

- PCR zkumavky 0,2ml s víčky, stojánek
- Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix (k.č. F548L, Thermo Fisher Scientific)

### ***Pracovní postup***

- Příprava PCR reakce probíhá v prostorách k tomu určených v rámci laboratoře molekulární biologie (PCR area) s využitím PCR boxů a v souladu s principy správné laboratorní praxe.
- Pro pipetování se používají špičky s filtrem.
- Všechny PCR reagenty se před zahájením práce vyjmou z mrazničky a nechají se roztát při pokojové teplotě. Před použitím je vhodné PCR komponenty promíchat krátkým vortexováním a dle potřeby stočit na minicentrifuze.
- Používá se izolovaná DNA o koncentraci 10 ng/μl.
- Pro zajištění validity výsledků je vhodné jako kontroly použít již ověřené odrůdy/genotypy. Pro rutinní praxi byly jako reference vybrány z odrůd vedených v roce 2024 ve Státní odrůdové knize ÚKZÚZ následující odrůdy hexaploidních slivoní:

'Althanova Renklóda'

'Auerbacher'

'Carpatin'

'Čačanská Lepotica'

'Mirabelka Nancyská'

'Valjevka'

'Wazonova Renklóda'

'Zimmerova'

\*\*\*\*\*

1. Do stojánku se připraví 1,5ml zkumavka, do které se dle počtu reakcí připraví adekvátní množství PlumSSR premixu primerů (Tabulka 3).

**Tabulka 3.** Rozpis pro přípravu PlumSSR premixu primerů na 100 PCR analýz. Podbarvení odpovídá použitému fluoroforu pro značení primerů: modře: 6-FAM; zeleně: VIC; žlutě: NED; červeně: PET.

| Primer           | Zásobní koncentrace (μM) | Finální koncentrace (μM) | Na 100 reakcí (μl) |
|------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------|
| FAM-CPPCT033_a-F | 100                      | 0,350                    | 3,5                |
| CPPCT033_a-R     | 100                      | 0,350                    | 3,5                |
| FAM-CPSCT042-F   | 100                      | 0,200                    | 2                  |
| CPSCT042-R       | 100                      | 0,200                    | 2                  |
| UDP98-412-F1     | 100                      | 0,175                    | 1,75               |
| UDP98-412-F2     | 100                      | 0,175                    | 1,75               |
| VIC-UDP98-412-R  | 100                      | 0,175                    | 1,75               |
| VIC-CPSCT005-F   | 100                      | 0,180                    | 1,8                |
| CPSCT005-R       | 100                      | 0,180                    | 1,8                |
| NED-EMPaS02-F    | 100                      | 0,180                    | 1,8                |
| EMPaS02-R        | 100                      | 0,180                    | 1,8                |
| NED-AMPA100-F    | 100                      | 0,350                    | 3,5                |
| AMPA100-R        | 100                      | 0,350                    | 3,5                |
| PET-CPSCT039-F   | 100                      | 0,200                    | 2                  |
| CPSCT039-R       | 100                      | 0,200                    | 2                  |
| PET-PacA33-F     | 100                      | 0,250                    | 2,5                |
| PacA33-R         | 100                      | 0,250                    | 2,5                |
| H <sub>2</sub> O |                          |                          | 60,55              |
| <b>Celkem</b>    |                          |                          | <b>100</b>         |

2. Připravený premix primerů se krátce zvertexuje a poté se krátce centrifuguje.
3. Do stojánku se připraví 1,5ml zkumavka, do které se dle počtu reakcí připraví adekvátní množství PCR PlumSSR mastermixu (Tabulka 4).

**Tabulka 4.** Rozpis pro PCR PlumSSR mastermix určený pro genotypizaci švestky domácí.

| Složka                                     | Na 1 vzorek |
|--|-------------|
| PCR voda                                   | 2 μl        |
| PlumSSR premix primerů                     | 1 μl        |
| Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix | 5 μl        |
| <b>Celkem</b>                              | <b>8 μl</b> |

4. Připravený mastermix se krátce zvertexuje a poté se krátce centrifuguje.
5. Do stojánku se připraví potřebný počet 0,2ml PCR zkumavek včetně zkumavek pro ověření referenční odrůdy a další případné kontroly (např. kontrola bez přidané DNA, extrakční kontrola).
6. Mastermix se rozpipetuje do 0,2ml PCR zkumavek po 8 μl.
7. K mastermixu se postupně připipetují 2 μl izolované DNA o koncentraci 10 ng/μl a provede se PCR amplifikace. Podmínky PCR byly optimalizovány pro cykler C1000 (Bio-Rad)

s následujícími parametry amplifikace: 98 °C/1 min; 25x (98 °C/10 s, 58 °C/10 s, 72 °C/20 s); 72 °C/30 s.

8. PCR produkty se přímo použijí pro fragmentační analýzu, nebo je možné je uchovávat při teplotě nižší než –18 °C ve tmě po dobu minimálně jednoho roku.

### 3.2.4 Fragmentační analýza

Fragmentační analýza založená na principu kapilární elektroforézy slouží k separaci fragmentů DNA na základě jejich velikosti s přesností na jeden nukleotid. Pro účely této metodiky byla optimalizována s využitím níže uvedených reagensů a genetického analyzátoru ABI PRISM 3500 (ThermoFischer Scientific). Uživatelé si budou muset postup verifikovat pro své laboratorní podmínky a vybavení.

#### *Použité přístroje, nástroje, spotřební plast, reagensie*

1. Minispin centrifuga
2. Sada laboratorních pipet pro objemy do 1 ml
3. Špičky bez filtru
4. Sterilní zkumavky 1,5ml, stojánky na zkumavky
5. 0,2ml 96-jamková destička pro genetický analyzátor ABI PRISM 3500 a septum pro její uzavření (obojí ThermoFischer Scientific)
6. Velikostní standard GeneScan™ 600 LIZ™ dye Size Standard v2.0 (ThermoFischer Scientific)
7. Hi-Di™ formamid (ThermoFischer Scientific)
8. LifeEco Thermal Cykler s blokem 96 × 0,2 ml (BIOER Technology)
9. Genetický analyzátor ABI PRISM 3500 s pufrem POP-7™ (ThermoFischer Scientific)

#### *Pracovní postup*

- Příprava pro fragmentační analýzu probíhá v prostorách k tomu určených v rámci laboratoře molekulární biologie (post-PCR area) v souladu s principy správné laboratorní praxe.
- Pro pipetování se používají špičky bez filtru.
- Do stojánku se připraví 1,5ml zkumavka, do které se dle počtu reakcí připraví adekvátní množství směsi Hi-Di formamidu a velikostního standardu (Tabulka 5). Roztoky je nutné promíchat propipetováním či převrácením uzavřené zkumavky, jelikož se vortexováním hůře mísí, v případě potřeby následuje krátká centrifugace.

**Tabulka 5.** Rozpis směsi pro fragmentační analýzu.

| Složka                         | Na 1 vzorek    |
|--------------------------------|----------------|
| Hi-Di Formamid                 | 15 µl          |
| 600 LIZ dye Size Standard v2.0 | 0,5 µl         |
| <b>Celkem</b>                  | <b>15,5 µl</b> |

- Směs se rozpipetuje do 96jamkové destičky pro genetický analyzátor po 15 µl.
- Ke směsi se postupně pipetuje 1 µl PCR produktu a poté se destička uzavře septem.



- Vzorky v 96jamkové destičce jsou denaturovány 2 min při 95 °C v PCR cyklu.
- Fragmentační analýza probíhá v genetickém analyzátoru ABI PRISM 3500 (ThermoFischer Scientific) s využitím standardních protokolů pro fragmentační analýzu.

### 3.2.5 Vyhodnocení a interpretace dat

V tomto kroku se vyhodnocují výsledky a na základě všech dostupných informací se provádí jejich interpretace. Pokud je u hexaploidní švestky domácí identifikováno méně alel než předpokládaná ploidie, tj. 6, nelze spolehlivě určit, která alela se vyskytuje v kolika kopiích. Pro genotypizaci se však určuje pouze sestava přítomných alel, nikoliv počet kopií určité alely.

#### 3.2.5.1 Očekávané výsledky

Pro analýzu dat byl využit software GeneMapper v5.0 (ThermoFisher Scientific), který na základě velikostního standardu vyhodnocuje relativní délku jednotlivých PCR fragmentů v nukleotidech. V Tabulce 6 jsou uvedeny rozmezí délky alel a délky pozorovaných alel pro každý SSR marker. Výsledkem genotypizace je sada alel, která je unikátní pro každý jednotlivý genotyp švestky domácí. Vyhodnocení pak probíhá na základě porovnání sady alel analyzovaného vzorku s jinými vzorky, případně s referenční databází dle typu analýzy.

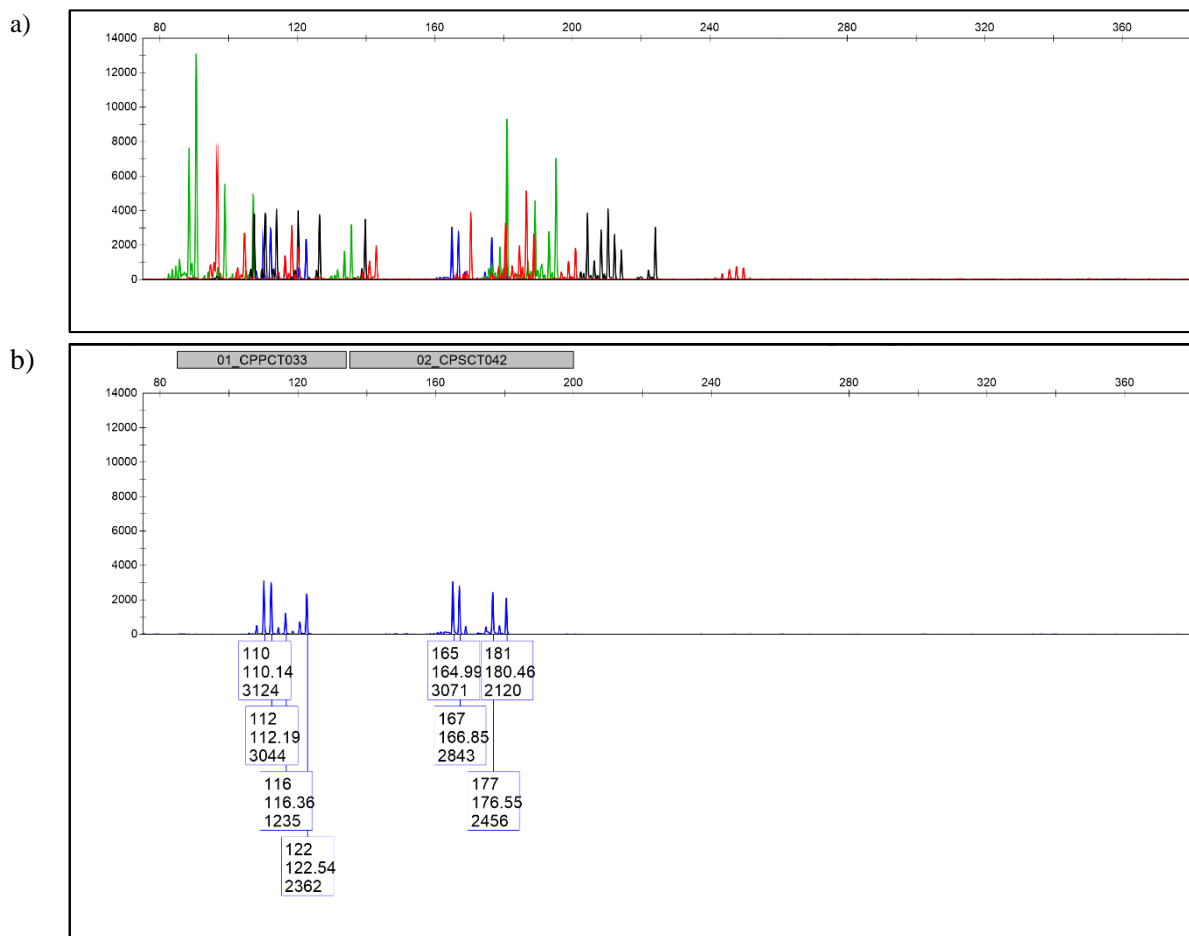
**Tabulka 6.** Matrice pro vyhodnocování - fluorescenční značení a očekávané velikosti alel.

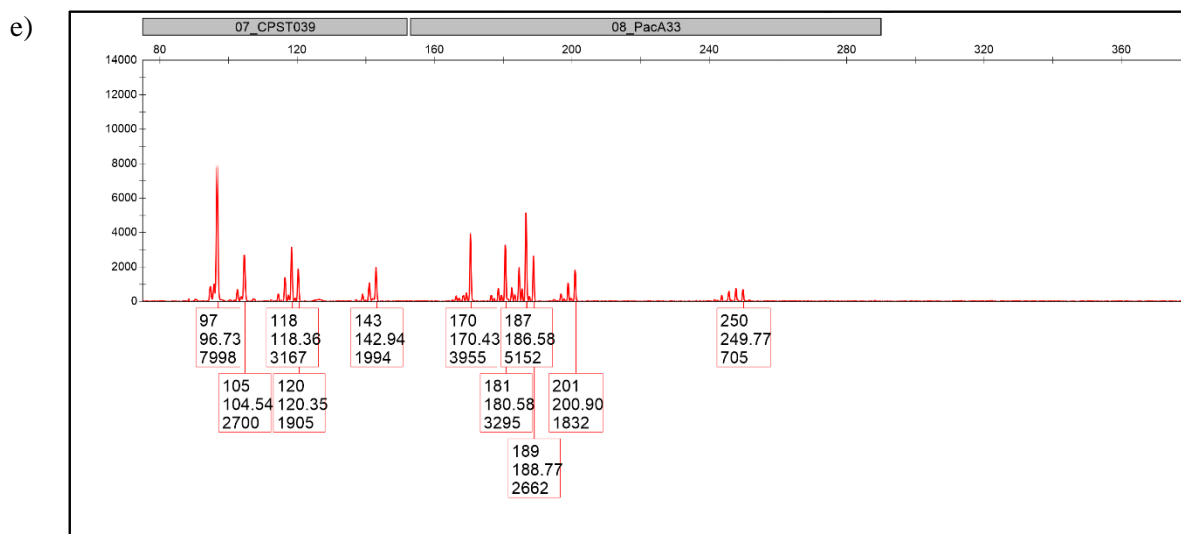
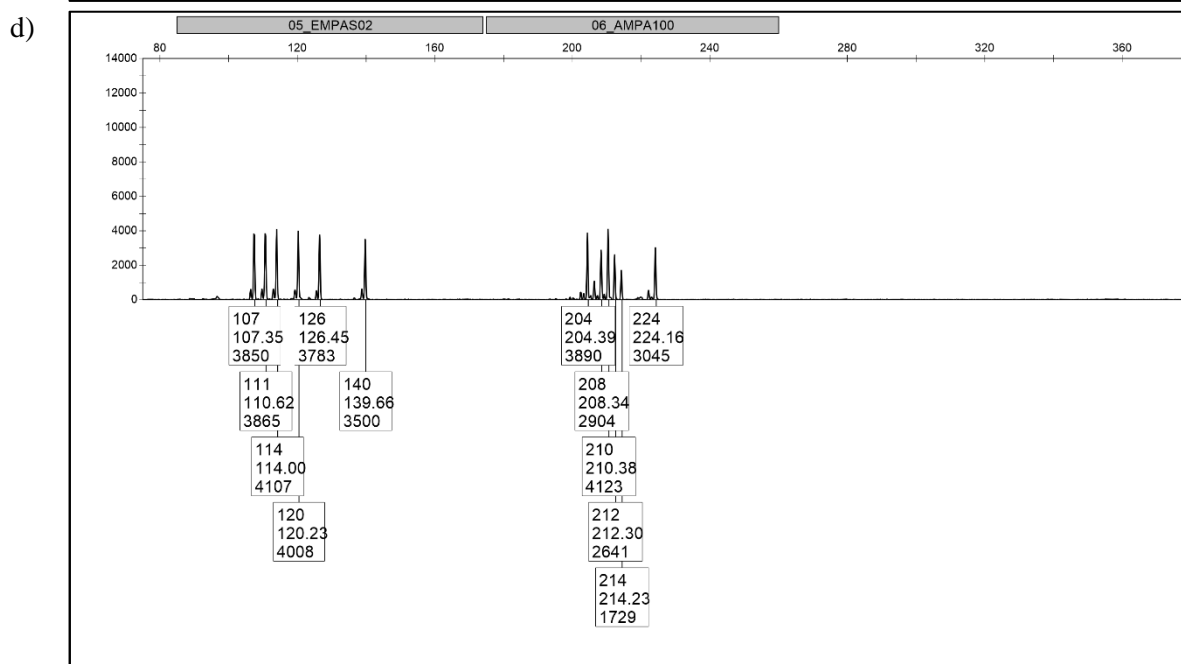
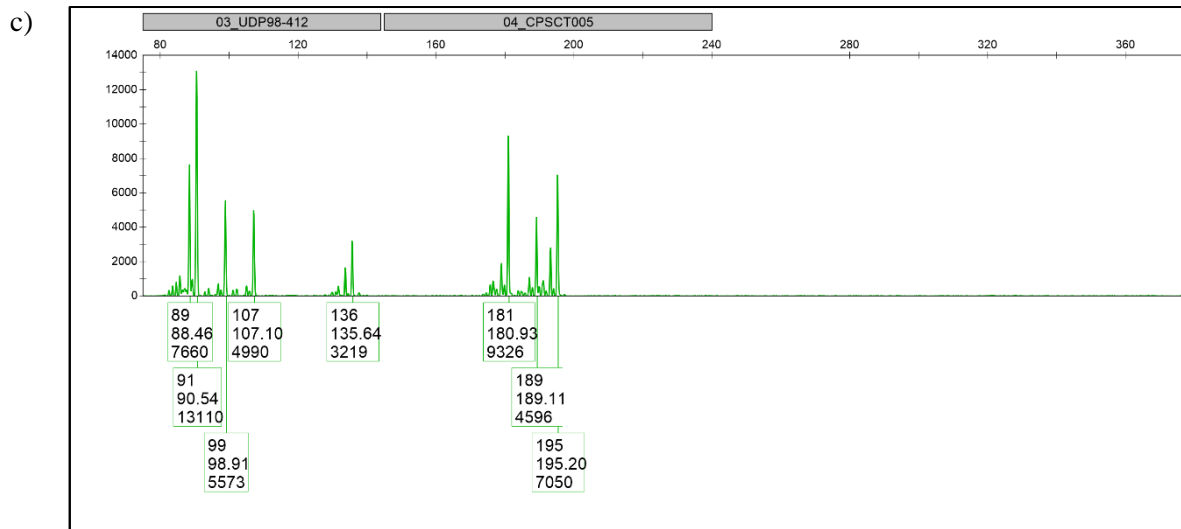
| Marker     | Značení/kanál | Rozmezí délky alel (nt) | Identifikované alely  |
|------------|---------------|-------------------------|---|
| CPPCT033_a | 6-FAM         | 95-129                  | 95, 97, 100, 102, 104, 106, 110, 112, 114, 116, 118, 120, 122, 124, 126, 129  |
| CPSCT042   | 6-FAM         | 157-183                 | 157, 159, 161, 163, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 173, 174, 175, 177, 179, 180, 181, 182, 183  |
| UDP98-412  | VIC           | 87-140                  | 87, 89, 91, 93, 94, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109, 112, 114, 116, 118, 122, 124, 126, 128, 132, 134, 136, 138, 140  |
| CPSCT005   | VIC           | 157-209                 | 157, 173, 175, 177, 179, 181, 183, 185, 187, 189, 191, 193, 195, 197, 199, 201, 203, 205, 207, 209  |
| EMPaS02    | NED           | 107-151                 | 107, 111, 112, 114, 117, 119, 120, 122, 123, 124, 126, 130, 133, 137, 140, 151  |
| AMPA100    | NED           | 198-242                 | 198, 200, 202, 204, 206, 208, 210, 212, 214, 216, 218, 220, 224, 240, 242   |
| CPSCT039   | PET           | 89-145                  | 89, 91, 93, 95, 97, 99, 103, 105, 106, 108, 110, 112, 114, 116, 118, 120, 122, 124, 126, 128, 133, 135, 137, 139, 141, 143, 145   |
| PacA33     | PET           | 166-254                 | 166, 168, 170, 172, 174, 176, 178, 181, 183, 185, 187, 189, 191, 193, 197, 199, 201, 203, 205, 207, 209, 211, 213, 215, 221, 223, 225, 228, 231, 233, 235, 237, 240, 244, 246, 248, 250, 252, 254 |

V každém běhu fragmentační analýzy je také vhodné analyzovat několik tzv. referenčních odrůd, které slouží jako kontrola, neboť obsahují známou sadu alel jednotlivých SSR markerů. Jsou tedy vhodné i k validaci výsledků při přenosu metody na jiné pracoviště nebo při mezilaboratorním porovnávání, jelikož relativní délka jednotlivých PCR fragmentů se může lišit od reálné délky sekvence v závislosti např. na fluorescenčním značení, použitých reagentech, přístrojích či podmínkách kapilární elektroforézy.

Jako kontroly jsou vhodné ověřené odrůdy/genotypy, jejichž seznam je uveden v kapitole 3.2.3. Příklad grafického zobrazení výsledku je znázorněn ve formě elektroforeogramů na Obrázku 1a–e pro referenční odrůdu 'Čačanská Lepotica', a to jednak jako překryv všech kanálů a jednak jako jednotlivé barevné kanály. Délky alel jednotlivých SSR markerů všech referenčních odrůd jsou uvedeny v Tabulce 7.

**Obrázek 1a–e.** Ukázka fragmentační analýzy u referenční odrůdy 'Čačanská Lepotica'. a) překryv všech barevných kanálů, b) modrý kanál – 6-FAM, c) zelený kanál – VIC, d) žlutý kanál – NED, e) červený kanál – PET. Šedivé obdélníčky u jednotlivých barevných kanálů vymezují jednotlivé markery, čísla v rámečcích pak označují název alely, relativní velikost alely a výšku signálu.





**Tabulka 7.** Přehled alel jednotlivých SSR markerů u referenčních odrůd.

|                      | CPPCT033_a | CPSCT042 | UDP98-412 | CPSCT005 | EMPaS02 | AMPA100               | CPSCT039             | PacA33                |
|----------------------|------------|----------|-----------|----------|---------|-----------------------|----------------------|-----------------------|
| 'Althanova renklóda' | 106 122    | 161      | 91        | 173 207  | 107 140 | 200 212               | 91 110               | 170 252               |
|                      | 112        | 173      | 99        | 181      | 114     | 202                   | 97 120 <sup>1/</sup> | 178                   |
|                      | 120        | 177      | 105       | 195      | 120     | 204                   | 105                  | 191                   |
| 'Auerbacher'         | 106 120    | 163 177  | 87 101    | 173 191  | 107 130 | 204 214               | 91 110               | 168 185               |
|                      | 112        | 169 179  | 91 105    | 177 195  | 114 140 | 210 216               | 97                   | 170 197               |
|                      | 118        | 173      | 95 109    | 189 197  | 120     | 212                   | 105                  | 181 199               |
| 'Carpatin'           | 112 122    | 169 177  | 91 101    | 179 201  | 107 120 | 200 212               | 91 139               | 170 201               |
|                      | 118        | 173      | 95 109    | 181      | 111 140 | 204 214               | 97                   | 181                   |
|                      | 120        | 175      | 99 136    | 185      | 112     | 210                   | 120                  | 183                   |
| 'Čačanská lepotica'  | 110 122    | 165 181  | 89 107    | 181      | 107 120 | 204 212               | 97 120               | 170 189               |
|                      | 112        | 167      | 91 136    | 189      | 111 126 | 208 214               | 105 143              | 181 201               |
|                      | 116        | 177      | 99        | 195      | 114 140 | 210 224               | 118                  | 187 250               |
| 'Mirabelka Nancyská' | 95 116     | 157 177  | 87 116    | 177 207  | 107 140 | 200 206               | 93 112               | 170 205               |
|                      | 112 118    | 171 180  | 91        | 181      | 114     | 202 208               | 95 118               | 178 213               |
|                      | 114 120    | 173      | 105       | 197      | 130     | 204 212               | 97                   | 181 235               |
| 'Valjevka'           | 112 122    | 167      | 89 101    | 177 189  | 107 126 | 204 216               | 91 143               | 168 207               |
|                      | 116        | 173      | 91 109    | 181 195  | 111 130 | 210 240 <sup>2/</sup> | 97                   | 187 250               |
|                      | 120        | 175      | 95        | 183      | 123     | 212                   | 105                  | 189                   |
| 'Wazonova Renklóda'  | 97 120     | 159 170  | 91        | 173 207  | 111 140 | 200 240               | 91 112               | 170 240 <sup>3/</sup> |
|                      | 106 122    | 161 173  | 99        | 177      | 114     | 210                   | 97                   | 181                   |
|                      | 112 129    | 169 177  | 105       | 193      | 120     | 212                   | 105                  | 197                   |
| 'Zimmerova'          | 102 122    | 163      | 87 109    | 173 195  | 107 130 | 202 210               | 89 128               | 168 201               |
|                      | 112        | 173      | 93 136    | 177 197  | 111 140 | 204 214               | 97                   | 170 207               |
|                      | 120        | 177      | 95        | 189      | 114     | 208 216               | 106                  | 181                   |

1/ U některých vzorků této odrůdy může být přítomna navíc alela 122.

2/ U některých vzorků této odrůdy může být místo alely 240 přítomna alela 242.

3/ U některých vzorků této odrůdy může být místo alely 240 přítomna alela 228.

### 3.2.5.2 Možné problémy při analýze dat („Troubleshootings“)

Software GeneMapper vyhodnocuje data z fragmentačních analýz automaticky, vyžaduje však kontrolu odborného pracovníka, neboť není zcela bezchybný, zejména pro polyploidní organizmy. V některých případech může dojít k nevyhodnocení určité alely či k vyhodnocení nesprávné alely, např. z důvodu výrazného „stutteringu“ (kratší varianty dané alely, která vzniká chybovostí DNA polymerázy) či prosvícení signálu pocházejícího z jiné fluorescenční barvy, a to zejména v případech, kdy dojde ke kumulaci více alel stejné délky téhož markeru a tudíž velmi vysokému signálu dané alely. Možný je také výskyt dříve nepozorovaných alel, v tomto případě se doporučuje ověření této alely simplexovou PCR reakcí a fragmentační analýzou (všechny alely publikované v této metodice pro jednotlivé SSR markery byly simplexovou analýzou ověřeny).

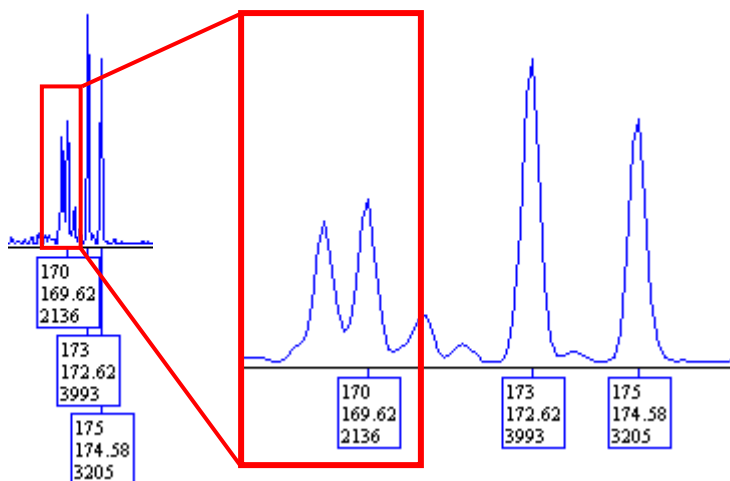
Kontrolu je vhodné provádět v softwaru GeneMapper nezávisle dvěma osobami, zvláště jedná-li se o doposud neznámý genotyp. V případech, kdy analýzou dochází pouze k ověření známého (dříve analyzovaného) genotypu, postačuje zpravidla kontrola jedné osoby v kombinaci s porovnáním s předešlými výsledky. Pokud dojde k problémům s vyhodnocením (např. kumulace výrazně stutterujících alel lišících se o 2 nukleotidy v jednom genotypu), je třeba dané alely porovnat s jinými genetickými profily, kde jsou grafické výstupy jednotlivých alel jednoznačné. V následujícím textu jsou uvedeny nejčastější příklady problematicky vyhodnotitelných alel, kterým je vhodné věnovat zvýšenou pozornost.

#### 3.2.5.2.1 Alely lišící se pouze o 1 nukleotid

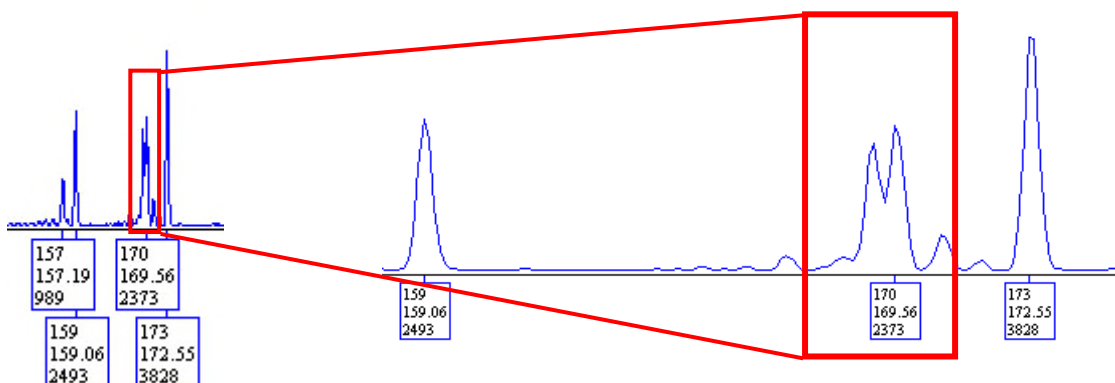
Možnou komplikací při vyhodnocování profilů slivoní jsou alely lišící se délkou pouze o 1 nukleotid. Ty byly pozorovány u markerů CPSCT042, EMPAS02 a CPSCT039. Ve většině pozorovaných případů současného výskytu těchto alel v jednom genotypu jsou tyto alely bez problémů vyhodnotitelné, pokud jsou takzvané „biny“ (rozmezí délek konkrétní alely) pro přiřazení analyzovaného fragmentu k jednotlivým alelám pečlivě nastaveny. Přesto se však v některých případech může stát, že software GeneMapper nedokáže tyto sousedící alely správně vyhodnotit, např. se jejich vrcholky nacházejí natolik blízko, že je software nerozpozná jako dvě alely. V těchto případech často vzniká jediný, avšak výrazně širší vrcholek, který je v horní části rozdvojený (např. CPSCT042 – alely 169 a 170, Obr. 2a–b). V případě jakýchkoliv pochybností o počtu a druhu alel se doporučuje danou oblast si přiblížit, aby obě alely byly snadno odlišitelné a bylo zřejmé, kterou z alel je třeba doplnit. V ideálním případě lze chybějící alelu doplnit manuálně již v grafickém výstupu softwaru GeneMapper, případně je nutné tuto alelu ručně doplnit ve výstupu po exportu dat.

**Obrázek 2a-b:** Marker CPSCT042 – ukázka obtížně separovatelných alel 169 a 170.

a) Odrůda 'Oullinská' s relativně dobře separovanými alelami.



b) Odrůda 'Opal' s hůře separovanými alelami.



### 3.2.5.2.2 „Stuttering“ alel

Další komplikací při vyhodnocování dat je tzv. vysoký „stuttering“ u některých alel. Stuttering obvykle vzniká z důvodu skluzu DNA polymerázy při PCR reakci po nukleotidové repetici zpravidla o délce 1–2 báze. Ke skluzu dochází z důvodu dočasného oddělení komplexu DNA polymerázy a nově syntetizovaného DNA vlákna od templátové DNA, kdy se v repetitivních oblastech může DNA polymeráza opětovně připojit k templátové DNA v poloze o jedno nebo dvě opakování před nebo častěji za místem, kde se odpojila. Nejvyšší signál zpravidla vykazuje přesná kopie alely, kratší a delší fragmenty lišící se o násobek délky repetice pak vykazují signál slabší. Obvykle se stutter zvyšuje s počtem opakování repetice (tj. obvykle s délkou alely). Před některými alelami se může vyskytnout i více vrcholků stutteru, zpravidla mají vrcholky stutteru s kratší délkou nižší signál než stutter s delší délkou (tj. signál postupně narůstá). V případě výskytu stutteru za alelou byl pozorován pouze vrcholek s minimální výškou. Také vysoký signál u alely (např. proto, že se vyskytuje ve více kopiích) může při

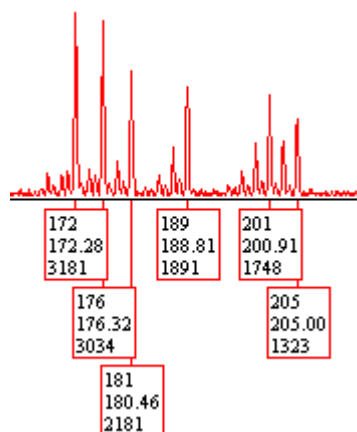
vyhodnocování opticky zvýšit stutter před danou alelou, proto je vhodné vždy zvolit správné měřítko u intenzity signálu pro vizualizaci alel (viz také následující kapitola). Stutter u jednotlivých analyzovaných SSR markerů uvádí Tabulka 8, pro ilustraci jsou příklady nejkratší, středně dlouhé a nejdělsí stutterující alely markeru PacA33 (marker s nejvyšším počtem alel a nejvyšším pozorovaným stutterem) uvedeny na Obrázku 3a-c. Podoba stutterů jednotlivých alel všech markerů a jejich kombinací by přesahovala rámec této metodiky, bude však součástí plánované publikace, kterou tak bude možné při vyhodnocování fragmentačních analýz použít.

**Tabulka 8.** Stuttering analyzovaných SSR markerů.

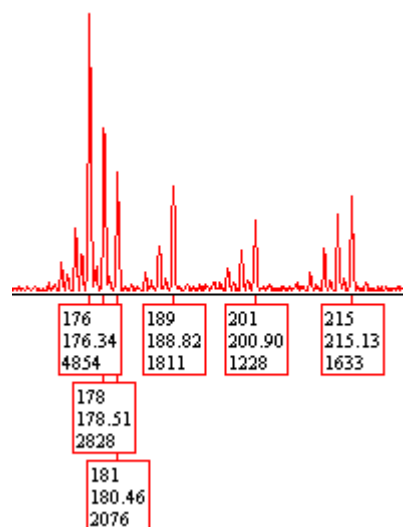
| Marker    | Značení/kanál | Alely vykazující stutter   | Rozsah stutteru   |
|-----------|---------------|--|---|
| CPPCT033  | 6-FAM         | 110, 112, 114, 116, 118, 120, 122, 124, 126, 129   | Minimální až 1/2 hlavního vrcholu alely   |
| CPSCT042  | 6-FAM         | 175, 177, 179, 180, 181, 182, 183  | Minimální až 1/5 hlavního vrcholu alely   |
| UDP98-412 | VIC           | 109, 112, 114, 116, 118, 122, 124, 126, 128, 132, 134, 136, 138, 140   | Minimální až 1/2 hlavního vrcholu alely   |
| CPSCT005  | VIC           | 181, 183, 185, 187, 189, 191, 193, 195, 197, 199, 201, 203, 205, 207, 209  | Minimální až 2/5 hlavního vrcholu alely   |
| EMPaS02   | NED           | -  | Všechny alely bez stutteru  |
| AMPA100   | NED           | 208, 210, 212, 214, 216, 218, 220, 224, 240, 242   | Minimální až 1/2 hlavního vrcholu alely   |
| CPSCT039  | PET           | 108, 110, 112, 114, 116, 118, 120, 122, 124, 126, 128, 133, 135, 137, 139, 141, 143, 145   | Minimální až 1/2 hlavního vrcholu alely   |
| PacA33    | PET           | 181, 183, 185, 187, 189, 191, 193, 197, 199, 201, 203, 205, 207, 209, 211, 213, 215, 221, 223, 225, 228, 231, 233, 235, 237, 240, 244, 246, 248, 250, 252, 254 | Minimální až vícenásobný stutter ve výšce hlavního vrcholu alely, popřípadě může i poslední vrchol stutteru mírně přesáhnout příslušnou alelu |

**Obrázek 3a-c:** Příklady nejkratší, středně dlouhé a nejdelší stutterující alely markeru PacA33.

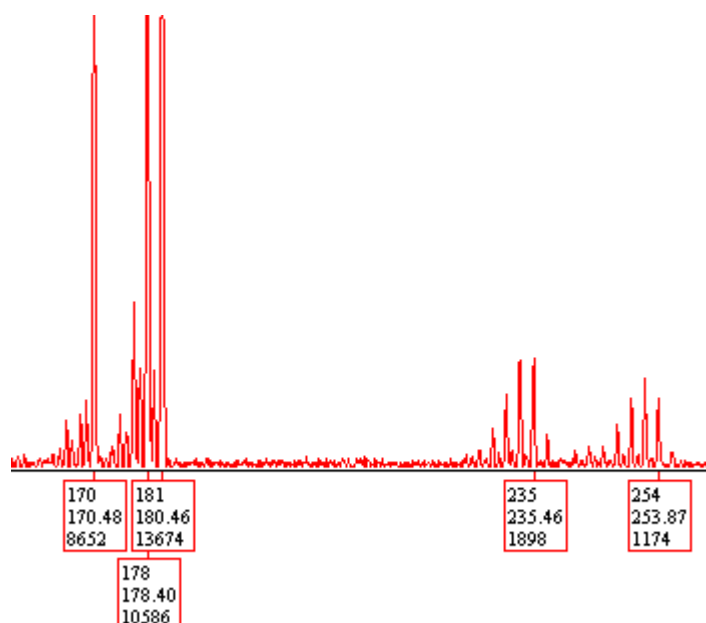
a) Alela 181 se stutterem do výšky cca 1/5 hlavního vrcholu alely – odrůda 'Švestka Raná'.



b) Alela 215 se stutterem do výšky cca 4/5 hlavního vrcholu alely – odrůda 'Carská'.



c) Alela 254 se stutterem přesahujícím hlavní vrchol alely a nízkým vrcholkem stutteru za hlavním vrcholem alely – odrůda 'Zelená Renklóda'.





V případech, kdy dojde k překryvu více „stutterujících“ alel či překryvu alely bez stutteru se stutterem jiné alely, je třeba počítat s tím, že se signály alely i stutteru delší alely sčítají. V případě nejistoty, zda se jedná o stutter či další alelu, se doporučuje porovnat grafický výstup z fragmentační analýzy s odrůdou obsahující danou alelu izolovaně, tedy bez alel, které by interferovaly svým stutterem s analyzovanou alelou.

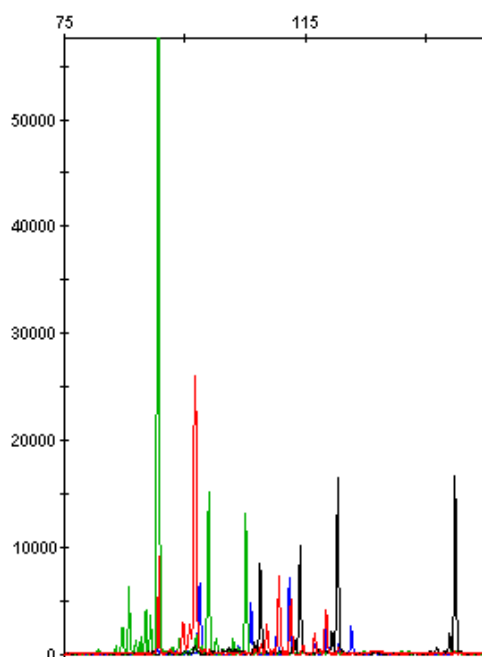
V případě použití jiné DNA polymerázy je také možné zaznamenat stutter o 1 nukleotid delší, než je přesná délka dané alely, který vzniká sklonem některých DNA polymeráz přidávat k 3' konci amplifikované sekvence jeden nukleotid navíc. Je proto vhodné pro fragmentační analýzu používat DNA polymerázy, které tuto tendenci nevykazují či jen ve velmi malé míře, jako např. DNA polymeráza obsažená v reagentii Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix.

#### 3.2.5.2.3 *Prosvícení signálu pocházejícího z jiné fluorescenční barvy*

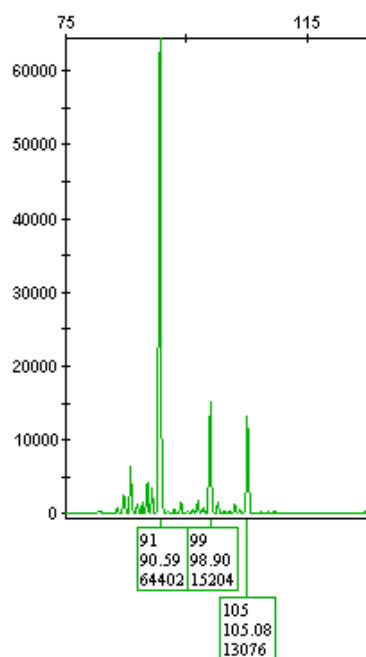
Genotypizační sada PlumSSR slouží, jak již bylo zmíněno výše, ke genotypizaci hexaploidní švestky domácí. Může se u ní vyskytovat až šest různých alel, nebo se některá z alel může vyskytovat v jednom genotypu i vícekrát. Podmínky PCR reakce byly zvoleny tak, aby všech šest alel vykazovalo dostatečně vysoký signál a byly tak zachyceny všechny alely. Při vícenásobném výskytu stejné alely dochází ke zvýšení signálu (někdy až do velmi vysokých hodnot) oproti alelám, které se vyskytují ve vzorku pouze jednou. Hodně vysoký signál zpravidla nebrání správnému vyhodnocení vzorku, může však dojít k tzv. prosvícení signálu z jedné fluorescenční barvy do druhé a při vyhodnocování je třeba obezřetnost a kontrola více barevných kanálů najednou, aby nebylo prosvícení omylem vyhodnoceno jako alela. Vrcholy vzniklé prosvícením mívají často jiný tvar a šířku, než je obvyklé u alel. Při výskytu atypického tvaru vrcholu se proto doporučuje kontrola ostatních barevných kanálů. Například ve výstupu fragmentační analýzy odrůdy 'Montforská' (Obrázek 4a) byl pozorován velmi vysoký signál v zeleném kanálu (VIC). Díky velmi pravděpodobné kumulaci více alel markeru UDP98-412 o délce 91 nukleotidů dosáhl vrchol této alely signálu 64 400 relativních fluorescenčních jednotek (RFU) (zbylé dvě pozorované alely ve stejném kanálu měly výšku pouze 13 076 RFU, respektive 15 204 RFU) (Obrázek 4b). U takto vysokého signálu může dojít k „prosvícení“ do jiného kanálu, v tomto případě došlo k prosvícení do červeného kanálu (PET; Obrázek 4c). Vrchol vzniklý prosvícením je oproti ostatním vrcholům, prezentujícím alely markeru CPSCT039 značeného PET, nápadně úzký a bez stutteru. Překryvem červeného a zeleného kanálu se lze ujistit, že se tento atypický vrchol nachází přesně pod zelenou alelou 91 (Obrázek 4d).

**Obrázek 4a–d:** Prosvícení signálu zeleného kanálu do kanálu červeného u odrůdy 'Montforská'.

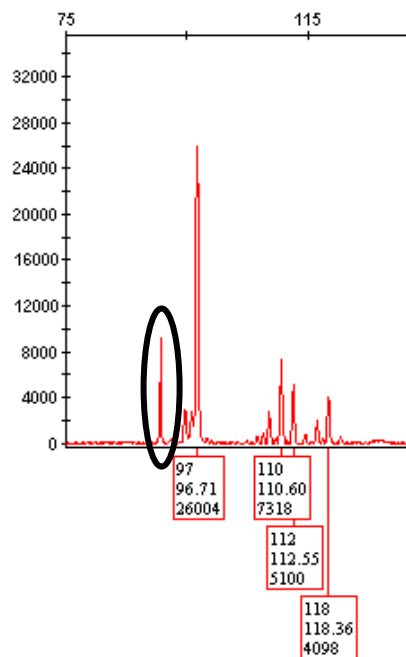
a) Překryv všech barevných kanálů.



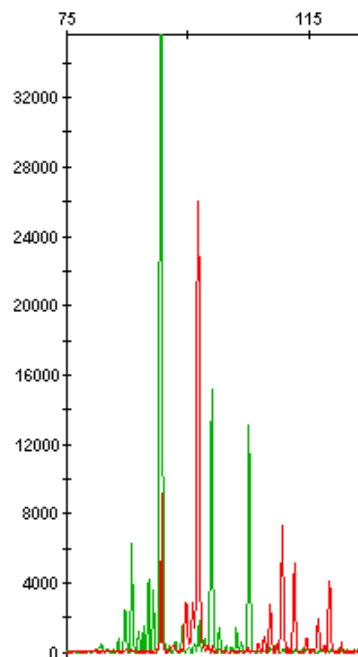
b) Zelený kanál fragmentační analýzy.



c) Červený kanál fragmentační analýzy. V černém oválu je vrchol vzniklý prosvícením ze zeleného kanálu.



d) Překryv zeleného a červeného kanálu.

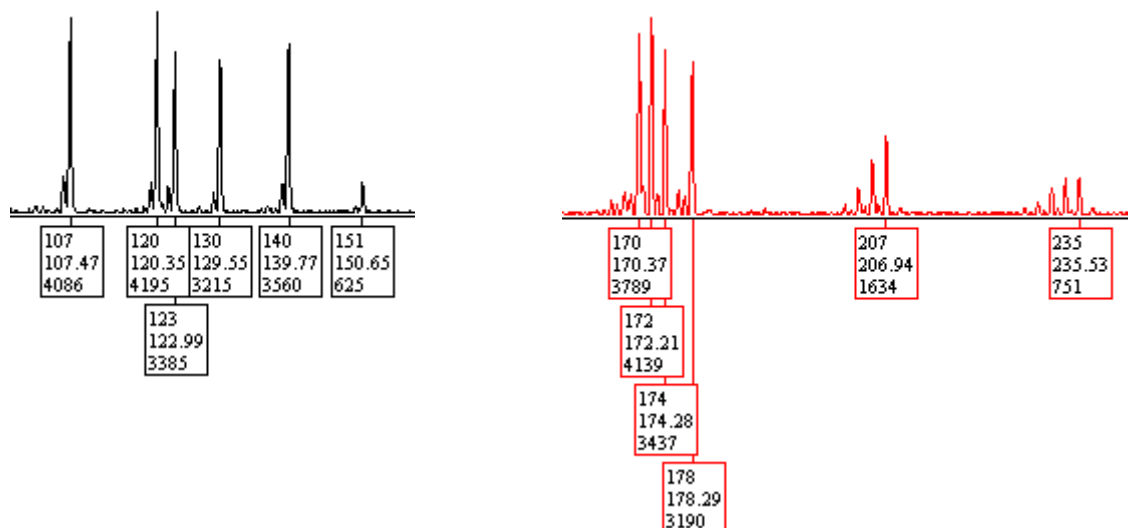


#### 3.2.5.2.4 Nízký signál alely

Problematické jsou také alely, které vykazují nízký signál oproti ostatním alelám, zejména ty se signálem srovnatelným se stutterem okolních alel nebo nižším, které je možné přehlédnout. Jedná se o alelu 157 markeru CPSCT042; alely 94, 95, 175 markeru UDP98-412 a alely 122 a 151 markeru EMPAS02, příklad je uveden na Obrázku 5a. Nízký signál těchto alel může být dán např. hůře amplifikovatelnou sekvencí alely, popřípadě výskytem mutací v sekvenci, na kterou nasedá primer. V případě víceplodných organismů jsou však tyto mutace poměrně obtížně odhalitelné. Doporučuje se proto hodnotit vzorky s dostatečně vysokým signálem, aby nemohly být hůře amplifikovatelné alely opominuty. Také alely vykazující vysoký stutter mívají nižší signál a je třeba hodnotit vzorky s dostatečně vysokým signálem, aby mohla být příslušná alela spolehlivě identifikována (Obrázek 5b).

**Obrázek 5a–b:** Příklady alel s nízkým signálem v porovnání s ostatními alelami.

- a) EMPAS02 – odrůda 'Tegera' - alela 151 - pokles signálu nestutterující alely.      b) PacA33 – odrůda 'Qing Guo' - alely 207 a 235 - pokles signálu u alel s vícenásobným stutterem.

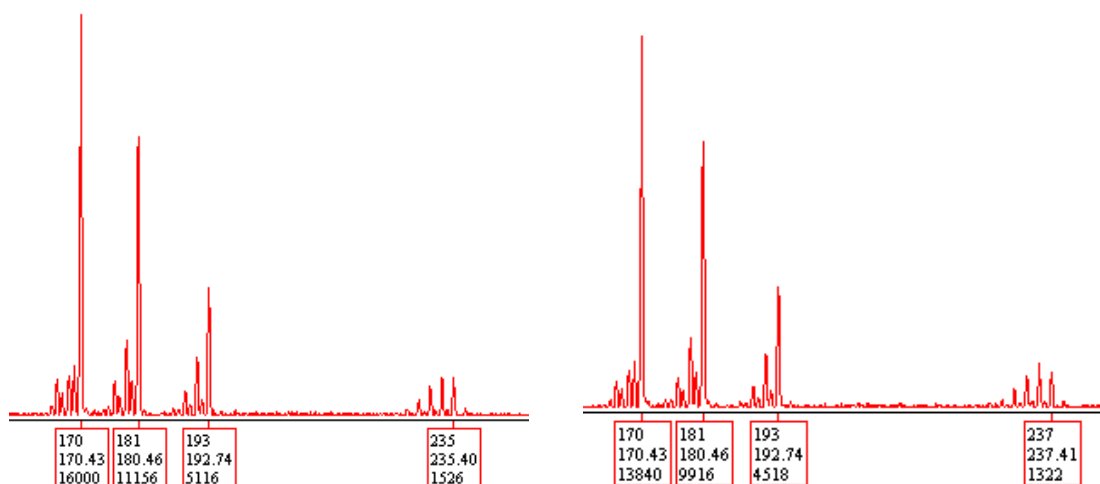


#### 3.2.5.2.5 Mutace v SSR markerech u odrůd

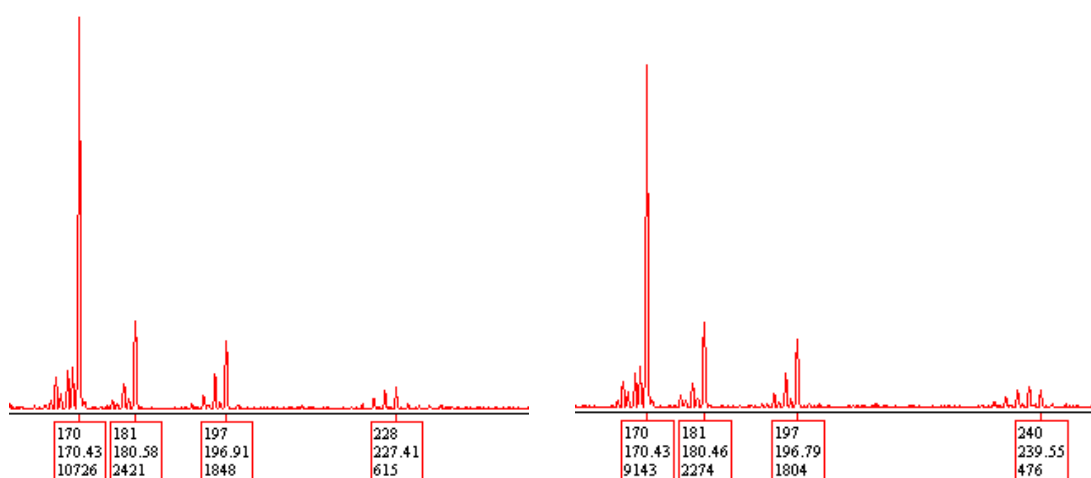
U některých odrůd pocházejících z různých zdrojů byl pozorován stejný soubor alel všech markerů kromě jediné alely. V těchto případech docházelo obvykle k posunu určité alely, kdy původní alela ze spektra vymizela. Většinou se jednalo o posun alely o dva nukleotidy (pravděpodobně díky skluzu polymerázy) (viz Obrázek 6a), byla však pozorována i odrůda, u které došlo k větší změně délky (Obrázek 6b). V některých případech se vzorky stejné odrůdy lišily přítomností jedné alely navíc, kdy tato nová alela byla o 2 nukleotidy kratší, popřípadě delší než dříve pozorovaná alela (Obrázek 6c). V těchto případech lze na vzorky nahlížet jako na mutace téže odrůdy (viz též Tabulka 7). Mutace (nejen) v SSR markerech v rámci vegetativně množených odrůd rostlin jsou poměrně běžným jevem, byly popsány např. i u hrušni (Queiroz, 2019) či révy vinné (Gonçalves, 2013).

**Obrázek 6a–c:** Ukázka různých typů mutace v SSR markerech.

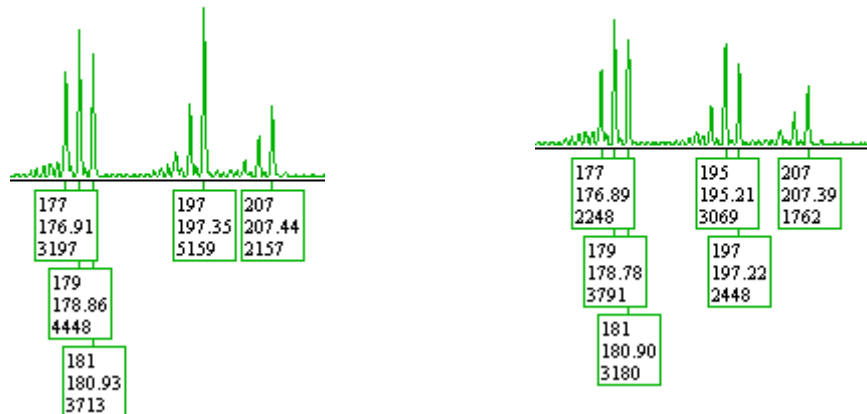
- a) PacA33 – změna alely o 2 nukleotidy – odrůda 'Oullinská' ze dvou různých zdrojů – vlevo s alelou 235, vpravo s alelou 237, ostatní analyzované markery měly všechny alely shodné.



- b) PacA33 – změna alely o více nukleotidů – odrůda 'Wazonova' ze dvou různých zdrojů – vlevo s alelou 228, vpravo s alelou 240, ostatní analyzované markery měly všechny alely shodné.



- c) UDP98-412 – výskyt nové alely - odrůda 'Hanita' ze dvou různých zdrojů – vlevo pouze s alelou 197, vpravo s alelami 195 a 197, ostatní analyzované markery měly všechny alely shodné.



### 3.2.5.2.6 Zdroj chyb v pre-analytické a analytické fázi

Stejně jako u všech běžně prováděných analýz, i v celém postupu genotypizace je třeba věnovat pozornost tomu, zda při celém procesu analýzy, od odběru po následné zpracování a vyhodnocení, nedošlo k chybě. Může se jednat o chyby, které nelze odhalit při analýze elektroforeogramů, jako jsou například chybné odběry vzorků či záměna vzorků při manipulaci se vzorky (zamrazování pletiva, izolace DNA, aj.). Pro odhalení těchto chyb se proto doporučuje provádět analýzu dvou nezávisle odebraných vzorků, které by měly ve výsledku mít stejný genetický profil.

Taktéž může dojít k chybám, které jsou patrné ze samotného elektroforeogramu, kdy je u více markerů (ne však nutně u všech) pozorováno více než 6 alel. V takových případech se jedná například o kontaminace vzorků nebo neúmyslné smíchání více vzorků dohromady při analýzách z více listů či výhonů, kdy mohlo například dojít k naroubování více odrůd na jednu podnož, prorůstání podnože či odběru vzorků ze dvou sousedních stromů, které měly propletené větve. Rovněž mohlo dojít ke smísení vzorků v laboratoři. Opět je nutné analýzu opakovat a identifikovat krok, ve kterém došlo ke smísení vzorků.

#### 4. SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ

V České republice doposud nebyla možnost genotypizace švestky domácí dostupná a pro identifikaci/porovnávání odrůd se v současnosti využívají pouze fenologické a fenotypové deskriptory, které je potřeba hodnotit v sadě více vegetačních sezón. Zároveň je určování odrůd tímto postupem velmi závislé na zkušenostech hodnotitele a může být zatíženo subjektivní chybou. Naopak genotypizace slivoní probíhající v laboratoři je rychlá a spolehlivá metoda, kterou lze využít během celého roku, proto zavedení této metodiky do praxe představuje kvalitativní posun na celonárodní úrovni pro všechny potenciální uživatele.

V minulosti bylo publikováno několik studií, které využívaly SSR markery pro charakterizaci švestky domácí (příklady uvedeny výše v kapitole 1. Úvod). Mezinárodní uskupení The European Cooperative Programme for Plant Genetic Resources (ECPGR; [www.ecpgr.cgiar.org](http://www.ecpgr.cgiar.org)) doporučilo pro genotypizaci švestky domácí 9 SSR markerů, některé z nich jsou však poměrně obtížně hodnotitelné z důvodu vysokého stutteru a častého překryvu stutterujících alel. Navíc je doporučeno amplifikovat tyto SSR markery v jednotlivých PCR reakcích, protože se podmínky pro amplifikaci jednotlivých SSR markerů značně liší (např. teploty nasedání primerů při PCR se pohybují v rozmezí od 46 do 60 °C; Nybom, 2020), což vylučuje využití multiplexování. Jelikož analyzovat jeden genotyp v 9 samostatných analýzách je značně pracné, komplikované na sestavení výsledného genetického profilu i finančně nákladné, byla na pracovišti VŠÚO genotypizace švestky domácí fragmentační analýzou inovována. Vzhledem k obvyklému délkovému rozmezí alel SSR markerů cca 100 až 250 nukleotidů bylo možné multiplexovat do jedné reakce 8 SSR markerů – vždy kratší a delší SSR marker pro jedno ze čtyř fluorescenčních značení pro běžně používané genetické analyzátoři, pátá barva je rezervována pro velikostní marker. Osm SSR markerů se ukázalo jako zcela dostačující počet, neboť analýza dalších SSR markerů pro genotypování nezvýšila rozlišovací schopnost navržené sady PlumSSR. Při výběru SSR markerů byl kladen důraz převážně na účinnou amplifikaci a snadnou hodnotitelnost markeru, přičemž tyto markery musely zároveň vykazovat i vynikající rozlišovací schopnosti (heterogenitu). Také byl hodnocen jejich potenciál pro multiplexování (délka alel, podmínky PCR reakce) a na základě sekvencí ze švestky domácí byly upraveny primery, popřípadě navrženy zcela nové, aby mohla být naplněna hlavní výhoda navrženého genotypizačního systému, tedy analýza v jediné reakci. Ta představuje nejlevnější řešení pro stanovení genotypu a zároveň minimalizuje možnou chybovost, ke které může dojít při kompletaci výsledků více analýz.

#### 5. POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY

Níže uvedené příklady uplatnění metodiky pro genotypizaci švestky domácí jsou pouze ilustrační a v žádném případě nejsou vyčerpávající.

##### *5.1 Tvorba referenční databáze pro účely ověřování a identifikace odrůd*

Ověřování a identifikace odrůd jsou příklady uplatnění, pro které je nutné mít vytvořenu referenční databázi odrůd, s kterou je možné porovnávat genetické profily testovaných vzorků. Ověřování dává odpověď na otázku, zda jsou testované vzorky shodné mezi sebou, popřípadě se známou referenční odrůdou. Pro identifikaci neznámé odrůdy je nezbytná databáze

alelických sestav SSR markerů použitých pro genotypizaci, která byla získána z co nejrozsáhlejší kolekce ověřených odrůd. Dle účelu lze tedy vytvářet různé typy referenčních databází.

### **5.1.1 Referenční databáze pro pěstitelskou praxi v České republice**

Pro pěstitelskou praxi je vhodná databáze genotypů nejčastěji pěstovaných odrůd, kdy byly podle šetření ÚKZÚZ v posledních 25 letech nejčastěji vysazovány odrůdy 'Stanley', 'Čačanská Lepotica', 'Gabrovská', 'Kulinaria' ('Toptaste'), 'Haganta', 'Domáci Velkoplodá', 'Tophit', 'Jojo', 'President', 'Čačanska Rodna', 'Topend Plus', 'Hanita', 'Valjevka', 'Elena', 'Valor' a 'Durancia'. Nově se v posledních deseti letech prosazují odrůdy, jako jsou např. 'Amers', 'Haroma' či 'Topking'. Referenční databáze pro pěstitelskou praxi však může být vytvořena „na míru“, např. bude obsahovat pouze odrůdy pěstované/množené v určitém podniku.

### **5.1.2 Referenční databáze pro účely uznávacího řízení**

Národní odrůdový úřad (NOÚ) Ústředního kontrolního a zkušebního ústavu zemědělského jako státní orgán zajišťuje registraci nových odrůd, udělování ochranných práv k odrůdám, vedení Státní odrůdové knihy, vydávání seznamu chráněných odrůd, vydávání přehledů nových odrůd a certifikaci rozmnožovacího materiálu ovocných druhů. Ve své činnosti se v principu zabývá třemi typy zkoušek:

1. zkoušení nových odrůd, kde se sleduje odlišnost od stávajících registrovaných či chráněných odrůd, uniformita odrůdy a stálost znaků mezi jednotlivými lety hodnocení (tzv. DUS testy)
2. testování případné shody odrůd
3. ověřování odrůd při prodlužování registrace

Metodika genotypizace švestky domácí může být uplatněna jak na začátku odrůdových zkoušek pro účely registrace či udělení ochranných práv, kdy může být zkoumáno, zda se jedná o novou odrůdu, nebo mutaci/klon známé odrůdy, tak zejména při ověřování odrůd při prodlužování registrace. V rámci vývoje této metodiky byla mimo jiné provedena i analýza referenčního souboru švestky domácí udržovaného v NOÚ, kdy bylo celkem ověřeno 84 zde udržovaných odrůd/genotypů. Alelické sestavy analyzovaných SSR markerů jednotlivých odrůd má NOÚ k dispozici a předpokládá zavedení metodiky genotypizace švestky domácí do své praxe.

Metodiku mohou také využít šlechtitelé švestky domácí, kterým umožňuje na základě znalosti genetického profilu jejich odrůd jednoduše kontrolovat, zda všechny články výrobního řetězce stromků dodržují licenční podmínky jejich pěstování.

### **5.1.3 Referenční databáze pro sbírkové účely**

Česká legislativa ukládá (zejména zákony č. 368/1992 Sb. a 148/2003 Sb.) a upravuje základní podmínky pro shromažďování, hodnocení, dokumentaci, konzervaci a využívání genetických zdrojů rostlin a mikroorganismů, které jsou důležité pro výživu a zemědělství v rámci Akčního plánu konzervace a využívání genetických zdrojů. Mezi tyto komodity patří i švestka domácí, která je uchovávána v genofondové sbírce udržované ve VÝZKUMNÉM A

ŠLECHTITELSKÉM ÚSTAVU OVOCNÁŘSKÉM HOLOVOUSY, s.r.o. Informace o udržovaných odrůdách jsou vedeny v databázi [GRIN Czech](#), kterou spravuje Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.

Genofondy nabývají na důležitosti zejména v poslední době s uplatňováním evropské agendy „Green Deal“, která je zaměřena mimo jiné na snížení spotřeby hnojiv a prostředků na ochranu rostlin, neboť jednou z možností může být cílené šlechtění odrůd s požadovanými vlastnostmi. Genofondy totiž shromažďují i staré a krajové odrůdy švestky domácí, které mohou být zajímavým zdrojem znaků pro moderní šlechtitelské programy, jako jsou např. zvýšení odolnosti odrůd vůči chorobám nebo (a)biotickým faktorům. Genetická analýza těchto odrůd umožňuje identifikaci potenciálních duplicit či synonym v genofondových sbírkách. Vhodná je i pro ověřování jejich původu, kdy je schopná potvrdit či vyvrátit příbuznost jednotlivých odrůd.

Znalost co největšího množství genetických profilů odrůd umožňuje i další aplikace, např. identifikaci neznámých odrůd ze starých výsadeb, alejí či zámeckých zahrad v rámci zkoumání kulturního dědictví na území naší republiky.

## **5.2 Prověření produkčního řetězce výroby výpěstků**

Genotypizaci švestky domácí je možné s výhodou uplatnit i ve školkařské praxi pro kontrolu výroby výpěstků, neboť se pro přípravu stromků používá vegetativní rozmnožovací materiál (očka, rouby), geneticky se tedy jedná o stejný organizmus. Produkční řetězec zahrnuje z pohledu možného uplatnění genotypování několik stupňů výroby, obvykle se jedná o:

- Registrovaná, resp. chráněná odrůda NOÚ
- Šlechtitel jako primární zdroj odrůdy
- Matečnice v technické izolaci jako zdroj zdravého rozmnožovacího materiálu
- Prostorové izoláty jako hlavní zdroj rozmnožovacího materiálu pro výrobu stromků
- Příprava stromků (očkování, roubování) a jejich dopěstování pro prodej
- Prodej

V celém produkčním řetězci je naprosto zásadní zajistit, aby bylo v každém kroku nakládáno pouze s materiálem požadované odrůdy a nedošlo k záměně. Pro kontrolu těchto klíčových bodů je pak možné s výhodou využít předkládanou metodiku, v ideálním případě by mělo testování zahrnovat:

- 1) Zavedení unikátního značení konkrétních stromů, které se používají jako zdroj rozmnožovacího materiálu ve výrobním procesu.
- 2) Vytvoření referenční databáze genetických profilů konkrétních stromů používaných jako primární zdroj rozmnožovacího materiálu (matečnice), pokud je má výrobní podnik k dispozici. Případné ověření zdroje rozmnožovacího materiálu u subdodavatele nebo šlechtitele.
- 3) Ověření pravosti odrůdy s využitím referenční databáze genetických profilů při NOÚ.
- 4) Vytvoření a průběžná aktualizace genetických profilů všech stromů používaných pro výrobu rozmnožovacího materiálu/stromků (prostorové izoláty).



- 5) Vytvoření referenční databáze odrůd pěstovaných/množených v daném podniku.
- 6) Namátková kontrola prodáváných výpěstků a jejich srovnání s referenční databází. Cílená kontrola v případě podezření na záměnu.

Vytvoření vnitropodnikové databáze genetických profilů všech stromů používaných jako zdroj rozmnožovacího materiálu a kontrola jejich odrůdové pravosti jsou z hlediska managementu kvality velmi důležité kroky, i když mohou být finančně náročné. Vzhledem k dlouhověkosti stromů je však možné získané informace používat v dlouhém časovém období, protože genetický profil se s věkem nemění. Množství vzorků pro namátkovou kontrolu stromků určených k prodeji je pak individuální a závisí na toku materiálu výrobním podnikem. Pro zlevnění a zrychlení provedení analýz lze využít i možnost přípravy směsného vzorku (ze 2 až 3 stromů) při očekávání stejného genetického profilu (např. stejná šarže výpěstků).

V minimalistickém provedení lze provádět pouze krok 6) a získaný genetický profil porovnat pouze s danou referenční odrůdou. V případě nálezu diskrepance však nebude zřejmé, v jakém kroku výrobního procesu k chybě došlo. Následně je třeba analyzovat i jednotlivé rozmnožovací materiály, dokud není záměna identifikována.

## 6. EKONOMICKÉ ASPEKTY

Na ekonomické přínosy této metodiky je možné nahlížet z různých pohledů, a to v závislosti na jejím použití.

### 6.1 *Ověření pravosti odrůdy před výsadbou – kalkulace ztrát na hektar při výsadbě špatné odrůdy z pohledu pěstitele*

V České republice rostlo v roce 2023 v produkčních sadech na ploše 1 876 ha celkem 1 083 495 ks slivoní, které poskytly výnos 5 415 tun švestek ([ČSÚ](#), [MZe ČR](#)). Rok 2023 byl ale významně ovlivněn jarními mrazy, nedostatečným opylením, suchem a houbovými chorobami. 5 415 tun odpovídá pouze 57 % pětiletého průměru ([MZe ČR](#)). Průměrný výnos jednoho stromu tak byl pouze 5 kg švestek (oproti tomu v roce 2022 byla tato hodnota téměř dvojnásobná, a to 9,4 kg). Mezi roky 2017–2023 se průměrný výnos jednoho stromu pohyboval v rozmezí 4,6–13,7 kg (průměr 7,9 kg, medián 8,2 kg) ([ČSÚ](#)). Po přepočtu byl v roce 2023 jeden hektar osázen průměrně 578 stromy. Průměrný výnos z jednoho hektaru se pak mezi lety 2017–2023 pohyboval v rozmezí 2 658–7 919 kg. Průměrná výkupní cena pro zemědělské výrobce za 1 kg švestek byla v roce 2023 na základě údajů týdenních cen 22,4 Kč (viz pravidelné [Zprávy o trhu ovoce SZIF](#)).

Při uvažovaném nulovém výnosu kvůli nevhodně osázenému sadu (např. nevhodné klimatické podmínky, výsadba špatné opylovací odrůdy u cizosprašných odrůd...) tak dochází k průměrné ztrátě výnosů z prodeje cca 105 000 Kč/ha/rok, přičemž osázení sadu jinou odrůdou lze zpravidla rozpoznat až po třech letech, kdy začíná plodit. Ztráta z produkce tak může teoreticky být až 315 000 Kč/ha/3 roky, ve skutečnosti však bude aktuální ztráta v prvních třech letech o něco nižší, neboť mladý sad nebude ještě dosahovat průměrných publikovaných výnosů na hektar. Část ztráty se však přenesení do následujících let, kdy nově osázený sad bude plodit méně, než by plodil o tři roky starší sad. K nulovému výnosu nemusí dojít, pokud mohou

být případné plody jiné odrůdy prodány, např. alespoň k průmyslovému zpracování. Kromě ušlého zisku však vznikly i náklady výsadbou nesprávné odrůdy (pořízení stromků, náklady na výsadbu) a udržováním celého sadu až do okamžiku, kdy bude nesprávně vysazená odrůda rozpoznána. Tyto náklady budou vždy velmi individuální. Pro orientaci jsou zde uvedeny výše dotace na restrukturalizaci ovocných sadů v režimu ekologického zemědělství pro rok 2024 ([SZIF](#)):

- i) 334 000 Kč/ha nově vysázeného ovocného sadu uznanou sadbou ušlechtilých odrůd ovocných stromů broskvoní, hrušní, jabloní, meruněk, slivoní (kromě myrobalánu), třešni nebo višni s minimálním počtem životaschopných jedinců – stromů 800 ks/ha;
- ii) 193 000 Kč/ha nově vysázeného ovocného sadu uznanou sadbou ušlechtilých odrůd ovocných stromů broskvoní, hrušní, jabloní, meruněk, slivoní (kromě myrobalánu), třešni nebo višni s minimálním počtem životaschopných jedinců – stromů 400 ks/ha.

Další náklady pak bude potřeba vynaložit na likvidaci nevhodně osázeného sadu, pokud se nechťená odrůda ukáže dlouhodobě nerentabilní vzhledem k místním podmínkám. Ty budou opět individuální a celkové náklady (ušlý zisk + náklady na obnovu sadu) mohou dosáhnout statisícových částek na hektar.

## **6.2 Prvek zajištění kvality ve výrobních podnicích (školkách) – kalkulace ztrát při výrobě špatné odrůdy potřebné k osázení jednoho hektaru sadu z pohledu školkaře**

Při uvažování možných ztrát školkařů je brán v potaz pouze materiál vyrobený na zakázku, jelikož při produkci špatné odrůdy pro maloobchod lze zpravidla výpěstky prodat pod správným názvem. Škody z prodeje pod nesprávným názvem nejsou v této metodice uvažovány.

Náklady na vytvoření školkařského výpěstku se budou značně lišit mezi jednotlivými podniky a kromě nákladů na vytvoření a udržování výpěstku mohou zahrnovat i cenu podnože (řádově nižší desítky Kč/ks), oček roubované odrůdy (cca 5–25 Kč/očko) a popřípadě roubu (25–50 Kč/roub), ceny bez DPH. Ceny zpravidla závisí na odrůdě, kdy mohou být vyžadovány také licenční poplatky, nebo na odebraném množství. Při úvaze, že náklady na vytvoření jednoho stromku pro velkoobchod jsou cca 50–100 Kč/ks, tak při výrobě 500 ks stromků přibližně potřebných k osázení 1 hektaru budou ztráty při výrobě cca 25 000 – 50 000 Kč. K tomu je však potřeba připočítat prodejní cenu materiálu, která nebude realizována. Cena stromků pak bude opět velmi individuální, jelikož je ovlivňována množstvím odebraných stromků, tvarem stromků (špičák–korunka, zákrsek–čtvrtkmen–polokmen–vysokokmen) či odrůdou. Ceny se pak orientačně mohou pohybovat v rozmezí od cca 100 Kč/ks (špičáky) po 400 Kč/ks (vysokokmeny) bez DPH. To by znamenalo další ztráty při neprodání 500 ks ve výši cca 50 000 až 200 000 Kč.

V případě školkařů tak může dojít ke ztrátám při výrobě 500 stromků nesprávné odrůdy potřebných pro osázení 1 hektaru přibližně 75 000 až 250 000 Kč.

### **6.3 Ověřování dodržování licenčních podmínek – kalkulace ztrát při neuplatnění licenčních poplatků**

Právně chráněné odrůdy jsou zatíženy licenčními poplatky a prodávají se na základě smlouvy. Licenční poplatky slouží k pokrytí nákladů šlechtitelů při tvorbě nových odrůd a zároveň jsou jejich ziskem. Část licenčních poplatků připadá také školkařům a dalším článkům výrobního a prodejního řetězce. Cena licence je připočítávána k prodaným očkům licencované odrůdy (cca 5–12 Kč/očko, obvykle dle počtu odebraných oček, odrůdy a šlechtitele) a také k prodávaným stromkům (obvykle 20–30 Kč, opět v závislosti na počtu odebraných stromků, odrůdě či šlechtiteli). Při neoprávněném prodeji oček licencovaných odrůd bez licenčního poplatku tak vzniká škoda ve výši 2 500 až 6 000 Kč na osázený hektar (500 stromků) a při neoprávněném prodeji stromků bez licenčního poplatku pak vzniká škoda 10 000 – 15 000 Kč/ha. Tato škoda se dělí mezi šlechtitele a školkaře, případně další články výrobního a prodejního řetězce. Zakoupení licencované odrůdy přináší i přes vyšší pořizovací cenu stromků pěstitelům přínos, neboť se jedná o moderní odrůdy s vylepšenými vlastnostmi oproti dříve vzniklým odrůdám. Celý produkční řetězec by tak měl mít zájem na tom, aby u licencovaných odrůd byla pravost ověřena. Z odrůd zapsaných v roce 2024 ve Státní odrůdové knize patří k licencovaným odrůdám 'Dwarf', 'Hololepa', 'Kamir', 'Samera', 'Simona' či 'Stáňa' ([Odrůdová kniha 2024](#)).

### **6.4 Ověřování odrůd při prodloužení jejich registrace u Národního odrůdového úřadu – kalkulace nákladů**

Vyhláška Ministerstva zemědělství č. 221/2002 Sb., Příloha 2 stanovuje sazebník náhrad nákladů za odborné a zkušební úkony zahrnující zkoušky odlišnosti, uniformity a stálosti (tzv. DUS testy), které vykonává v působnosti ÚKZÚZ. U slivoně byly stanoveny ve výši 3 850 Kč/rok, kdy při registraci odrůdy trvají tyto zkoušky obvykle 2–3 roky (Ehrenbergerová, 2014), jedná se tedy o 7 700–11 550 Kč. Při prodlužování registrace může být tato doba kratší, ale vždy je třeba počítat alespoň s ročním poplatkem za testování. V případě podezření, že je přihlašovaný materiál pouze mutací již uznané odrůdy, popřípadě shodný s již uznanou odrůdou (klon), může genotypování tuto domněnku potvrdit, nebo vyvrátit. V případě potvrzení tohoto podezření již není třeba DUS testy provádět. V případě prodlužování registrace odrůdy lze jednoznačně a velmi rychle potvrdit shodu s dříve registrovanou odrůdou a DUS testy mohou být zcela vynechány.

## 6.5 *Shrnutí*

Oproti výše vyčísleným nákladům stojí náklady na genotypování kalkulované pro spotřební materiál a chemikálie (bez úvahy mzdových nákladů a odpisů přístrojového vybavení, které tvoří také velmi podstatnou část nákladů). U izolace DNA z jednoho vzorku jsou průměrné náklady chemikálií a laboratorního materiálu cca 100 Kč/vzorek. Náklady na multiplexní PCR a fragmentační analýzy lze vyčíslit pro 8 SSR markerů v 1 multiplexní reakci na přibližně 200 Kč. K ceně je potřeba připočítat i náklady na současnou analýzu laboratorních kontrol a provoz kapilárního genetického analyzátoru. Pokud laboratoř nevlastní kapilární genetický analyzátor, může za úplatu v řádu stovek Kč využít služeb fragmentační analýzy u řady firem/organizací, které tuto službu nabízejí.

Náklady jsou kalkulovány pro rok 2024 a při neustále se zvyšujících cenách vstupních materiálů a chemikálií je třeba počítat s jejich nárůstem. Ve výsledku se bude celková cena analýzy odvíjet od počtu analyzovaných vzorků, záleží velmi často na požadavcích zákazníka, kolik vzorků považuje za vhodné analyzovat. Analýzu lze při předpokladu testování identické odrůdy zlevnit i spojením 2–3 vzorků do jedné analýzy, kdy lze ještě garantovat zjištění přítomnosti více genotypů. V souhrnu lze však předpokládat, že se výsledná cena za analýzu bude pohybovat v řádu nižších tisíců Kč a měla by být levnější než DUS testy. Při porovnání možných ztrát/nákladů vyčíslených výše je tak zřejmé, že ve všech uvedených příkladech využití této metodiky lze očekávat jednoznačný finanční přínos pro jejího uživatele.

## 7. SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY

- Abdallah, D., Baraket, G., Perez, V., Ben Mustapha, S., Salhi-Hannachi, A., Hormaza, J.I. (2019) Analysis of Self-Incompatibility and Genetic Diversity in Diploid and Hexaploid Plum Genotypes. *Front. Plant Sci.* 10:896. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00896>.
- Aranzana, M.J., Garcia-Mas, J., Carbó, J., Arús, P. (2002) Development and variability analysis of microsatellite markers in peach. *Plant Breeding*, 121, 1, 87-92. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0523.2002.00656.x>.
- Cullen, J. et al. (1995) *The European Garden Flora. Volume IV.* Cambridge University Press, Cambridge.
- Cmejlova, J., Rejlova M, Paprstein, F, Cmejla R. (2021) A new one-tube reaction kit for the SSR genotyping of apple (*Malus × domestica* Borkh.), *Plant Science*, 303, 110768. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2020.110768>.
- Decroocq, V., Favé, M., Hagen, L., Bordenave, L., Decroocq, S. (2003) Development and transferability of apricot and grape EST microsatellite markers across taxa. *Theor Appl Genet* 106: 912-922. <https://doi.org/10.1007/s00122-002-1158-z>.
- Ehrenbergerová J. (2014) ODRŮDY, OSIVO A SADBA. Brno: Mendelova univerzita v Brně, 105 s. ISBN 978-80-7509-003-4. [Mendelu-ODRŮDY, OSIVO A SADBA](https://doi.org/10.1007/9780470650752.ch4).
- Faust, M., Surányi, D. Origin and dissemination of plums. (1999) *Hortic. Rev.* 23, 179–231. <https://doi.org/10.1002/9780470650752.ch4>.
- Gonçalves, E., Carrasquinho, I., St. Aubyn, A., Martins, A. (2013) Broad-sense heritability in mixed models for grapevine initial selection trials. *Euphytica*, 189, 379–391. <https://doi.org/10.1007/s10681-012-0787-9>.
- Hagen, L.S., Chaïb, J., Fady, B., Decroocq, V., Bouchet, J.P. et al. (2004) Genomic and cDNA microsatellites from apricot (*Prunus armeniaca* L.). *Molecular Ecology Notes*, 4, 742-745. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2004.00802.x>.
- Hegi, G. *Illustrierte Flora von Mitteleuropa.* (1925) München. In: Vávra, M. et al. (1965) *Malá pomologie III, švestky a třešně.* Státní zemědělské nakladatelství, Praha
- Liu, C., Feng, C., Peng, W., Hao, J., Wang, J., Pan, J., He, Y. (2020) Chromosome-level draft genome of a diploid plum (*Prunus salicina*), *GigaScience*, 9, 12, gaa130. <https://doi.org/10.1093/gigascience/giaa130>.
- Makovics-Zsuhár, N., Tóth, M., Surányi, D., Kovács, S., Hegedűs, A., & Halász, J. (2017) Simple Sequence Repeat Markers Reveal Hungarian Plum (*Prunus domestica* L.) Germplasm as a Valuable Gene Resource. *HortScience*, 52(12), 1655-1660. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI12406-17>.
- Manco, R., Basile, B., Capuozzo, C., Scognamiglio, P., Forlani, M., Rao, R., Corrado, G. (2019) Molecular and Phenotypic Diversity of Traditional European Plum (*Prunus domestica* L.) Germplasm of Southern Italy. *Sustainability*. <https://doi.org/10.3390/su11154112>.
- Mnejja, M., Garcia-Mas, J., Howad, W., Badenes, M., Arús, 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. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2004.00603.x>.
- Nekvindová, V., Žďárská, I., Suran, P., Krška, B., Čmejlová, J. (2021) Metodika identifikace odrůd meruňky obecné (*Prunus armeniaca* L.) pomocí SSR markerů. *Certifikovaná metodika*. [Metodika identifikace odrůd meruňky obecné pomocí SSR markerů](https://doi.org/10.1007/9780470650752.ch4).

- Nybom, H., Giovannini, D., Ordidge, M., Hjeltnes, S.H., Grahić, J., Gaši, F. (2020) ECPGR recommended SSR loci for analyses of European plum (*Prunus domestica*) collections, *Genetic Resources*, 1(1), 40–48. <https://doi.org/10.46265/genresj.2020.1.40-48>.
- Pop, R., Hârța, M., Szabo, K., Zănescu, M., Sisea, C., Catana, C., Pamfil, D. (2017) Genetic Diversity and Population Structure of Plum Accessions from a Romanian Germplasm Collection Assessed by Simple Sequence Repeat (SSR) Markers. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*. 46. 90-96. <https://doi.org/10.15835/nbha46110884>.
- Queiroz, Á., Bagoin Guimarães, J., Sánchez, C., Simões, F., Maia de Sousa, R., Viegas, W., Veloso, M.M. (2019) Genetic diversity and structure of the Portuguese pear (*Pyrus communis* L.) germplasm. *Sustainability*, 11(19), 5340. <https://doi.org/10.3390/su11195340>.
- Sehic, J., Nybom, H., Hjeltnes, S.H., Gaši, F. (2015) Genetic diversity and structure of Nordic plum germplasm preserved ex situ and on-farm, *Scientia Horticulturae*, 190, 195-202. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.03.034>.
- 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. <https://doi.org/10.1139/g00-010>.
- Urrestarazu, J., Errea, P., Miranda, C., Santesteban, L.G., Pina, A. (2018) Genetic diversity of Spanish *Prunus domestica* L. germplasm reveals a complex genetic structure underlying. *PLoS ONE*13(4): e0195591. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195591>.
- 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. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2004.00673.x>.
- Vieira, M.L., Santini, L., Diniz, A.L. et al. (2016) Microsatellite markers: what they mean and why they are so useful. *Genet Mol Biol* 39(3), 312-328. <https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2016-0027>.
- Xuan, H., Ding, Y., Spann, D., Möller, O., Büchele, M., Neumüller, M. (2011) Microsatellite Markers (SSR) as a Tool to Assist in Identification of European Plum (*Prunus domestica*). *Acta Horticulturae*. *Acta Horticulturae*. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2011.918.88>.
- Zhebentyayeva, T., Shankar, V., Scorza, R. et al. (2019) Genetic characterization of worldwide *Prunus domestica* (plum) germplasm using sequence-based genotyping. *Hortic Res* 6. 12. <https://doi.org/10.1038/s41438-018-0090-6>.

## 8. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE

- Cmejlova, J., Rejlova M, Paprstein, F, Cmejla R. (2021) A new one-tube reaction kit for the SSR genotyping of apple (*Malus × domestica* Borkh.), *Plant Science*, 303, 110768. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2020.110768>.
- Krška, B. (2023) Návrh core kolekce slivoní s ohledem na pomologické třídy a odolnost k virové šarce švestek ppv, *VPO* 29(1): 28–34,. [VPO-29\\_1\\_23\\_Krska.pdf \(vpovsuo.cz\)](https://vpo.vpovsuo.cz/VPO-29_1_23_Krska.pdf).

- Nekvindová, V., Žďárská, I., Suran, P., Krška, B., Čmejlová, J. (2021) Metodika identifikace odrůd meruňky obecné (*Prunus armeniaca* L.) pomocí SSR markerů. Certifikovaná metodika. [Metodika identifikace odrůd meruňky obecné pomocí SSR markerů.](#)
- Pluhařová, K., Čmejlová, J., Krška, B., Voráček, P., Čmejla, R. (2023) Genotypizace jabloně domácí (*Malus × domestica* Borkh.) pomocí SSR markerů v praxi. Certifikovaná metodika. [Pluharova Metodika-Genotypizace jablone SSR markery 2023.pdf \(vsuo.cz\).](#)

## PŘÍLOHA – CHARAKTERISTIKA REFERENČNÍCH ODRŮD

### 'ALTHANOVA RENKLÓDA'

|                      |   |
|----------------------|---|
| Typ růstu stromu:    | bujný, tvoří řídké, široce kulovité koruny  |
| Doba kvetení:        | středně raná, cizosprašná odrůda, vhodnými opylovači jsou 'Zelená renklóda', 'Oullinská' a 'Vlaška', sama je dobrým opylovačem  |
| Zralost:             | středně raná, v polovině srpna  |
| Plodnost:            | pravidelná, poměrně raná  |
| Plod:                | středně velký až velký, kulovitěho tvaru, základní barva je zelenožlutá, krycí červená až fialově hnědá, povrch je ojíněný, dužnina nažloutlá, chuti sladké, mírně nakyslé, velmi dobré a aromatické, je odlučitelná od pecky |
| Odolnost k chorobám: | plody náchylnější k monilióze   |
| Poznámka:            | upřednostňuje teplé oblasti, ale je dobře adaptovaná i na vyšší polohy  |



#### Alely odrůdy 'Althanova Renklóda'

| SSR marker | CPPCT033_a | CPSCT042 | UDP98-412 | CPSCT005 | EMPaS02 | AMPA100 | CPSCT039             | PacA33  |
|------------|------------|----------|-----------|----------|---------|---------|----------------------|---------|
| Délka      | 106 122    | 161      | 91        | 173 207  | 107 140 | 200 212 | 91 110               | 170 252 |
| alel       | 112        | 173      | 99        | 181      | 114     | 202     | 97 120 <sup>1)</sup> | 178     |
|            | 120        | 177      | 105       | 195      | 120     | 204     | 105                  | 191     |

1) V některých vzorcích může být přítomna navíc alela 122



## 'AUERBACHER'

|                      |   |
|----------------------|---|
| Typ růstu stromu:    | bujný   |
| Doba kvetení:        | středně raná, samosprašná, silně kvete  |
| Zralost:             | střední až pozdní   |
| Plodnost:            | pravidelná, raný nástup do plodnosti  |
| Plod:                | středně velký až větší, oválného tvaru, fialově modrá základní barva slupky, krycí je načervenalá, ojíňený povrch, dužnina plodu zelenožlutá, pevná, šťavnatá, odlučitelná od pecky |
| Odolnost k chorobám: | tolerantní k virové šarce švestek   |
| Poznámka:            | odrůda byla často používána v křížení německého šlechtitele prof. Jakoba, odrůda má výborné pekařské hodnoty  |



Alely odrůdy 'Auerbacher'

| SSR marker | CPPCT033_a | CPSCT042 | UDP98-412 | CPSCT005 | EMPaS02 | AMPA100 | CPSCT039 | PacA33  |
|------------|------------|----------|-----------|----------|---------|---------|----------|---------|
| Délka alel | 106 120    | 163 177  | 87 101    | 173 191  | 107 130 | 204 214 | 91 110   | 168 185 |
|            | 112        | 169 179  | 91 105    | 177 195  | 114 140 | 210 216 | 97       | 170 197 |
|            | 118        | 173      | 95 109    | 189 197  | 120     | 212     | 105      | 181 199 |

## 'CARPATIN'

|                      |   |
|----------------------|---|
| Typ růstu stromu:    | vzpřímený, bujně rostoucí   |
| Doba kvetení:        | velmi pozdní, cizosprašná odrůda, opylovači nejsou dostatečně prověřeni   |
| Zralost:             | středně raná  |
| Plodnost:            | středně plodná, pravidelná  |
| Plod:                | velký až velmi velký, oválný, mírně nesouměrný, slupka fialovomodrá, ojíňená, dužnina je žlutozelená, středně tuhá až tuhá, navinule sladká, mírně aromatická, dobře odlučitelná od pecky |
| Odolnost k chorobám: | citlivá na monilii plodů, tolerantní k šarce švestek  |
| Poznámka:            | velmi plastická odrůda, průměrné až dobré chuti, vhodnější do teplých poloh, kde vyzrává do dobré chuti   |



### Alely odrůdy 'Carpatin'

| SSR marker | CPPCT033_a | CPSCT042 | UDP98-412 | CPSCT005 | EMPaS02 | AMPA100 | CPSCT039 | PacA33  |
|------------|------------|----------|-----------|----------|---------|---------|----------|---------|
| Délka alel | 112 122    | 169 177  | 91 101    | 179 201  | 107 120 | 200 212 | 91 139   | 170 201 |
|            | 118        | 173      | 95 109    | 181      | 111 140 | 204 214 | 97       | 181     |
|            | 120        | 175      | 99 136    | 185      | 112     | 210     | 120      | 183     |

## 'ČAČANSKÁ LEPOTICA'

|                      |   |
|----------------------|---|
| Typ růstu stromu:    | středně bujný, vzpřímeně rostoucí   |
| Doba kvetení:        | raná až středně raná, samosprašná odrůda  |
| Zralost:             | středně raná  |
| Plodnost:            | velmi raná, pravidelná  |
| Plod:                | velký, oválného tvaru, slupka tmavě modrá, silně ožíněná, žlutě zelená dužnina dobré, aromatické chuti, plně odlučitelná od pecky |
| Odolnost k chorobám: | tolerantní vůči šarce   |
| Poznámka:            | velmi plastická odrůda, vhodná do všech oblastí, s průměrnou kvalitou plodů   |



Alely odrůdy 'Čačanská Lepotica'

| SSR marker | CPPCT033_a | CPSCT042 | UDP98-412 | CPSCT005 | EMPaS02 | AMPA100 | CPSCT039 | PacA33  |
|------------|------------|----------|-----------|----------|---------|---------|----------|---------|
| Délka alel | 110 122    | 165 181  | 89 107    | 181      | 107 120 | 204 212 | 97 120   | 170 189 |
|            | 112        | 167      | 91 136    | 189      | 111 126 | 208 214 | 105 143  | 181 201 |
|            | 116        | 177      | 99        | 195      | 114 140 | 210 224 | 118      | 187 250 |

## 'MIRABELKA NANCYSKÁ'

|                      |   |
|----------------------|---|
| Typ růstu stromu:    | středně bujný   |
| Doba kvetení:        | středně pozdně až pozdně, je vysoce samosprašná   |
| Zralost:             | středně raná až pozdní  |
| Plodnost:            | hojná, pravidelná   |
| Plod:                | malý, kulovitý, slupka žlutá s nápadným tečkovitým líčkem, ojíňená, dužnina je žlutá, velmi sladká s aromatickou chutí, plně odlučitelná od pecky |
| Odolnost k chorobám: | středně trpí monilií, tolerantní k šarce švestek  |
| Poznámka:            | větší nároky na stanoviště, lépe v teplých oblastech, vhodná na přímý konzum, kompoty, i k sušení   |



Alely odrůdy 'Mirabelka Nancyská'

| SSR marker | CPPCT033_a | CPSCT042 | UDP98-412 | CPSCT005 | EMPaS02 | AMPA100 | CPSCT039 | PacA33  |
|------------|------------|----------|-----------|----------|---------|---------|----------|---------|
| Délka alel | 95 116     | 157 177  | 87 116    | 177 207  | 107 140 | 200 206 | 93 112   | 170 205 |
|            | 112 118    | 171 180  | 91        | 181      | 114     | 202 208 | 95 118   | 178 213 |
|            | 114 120    | 173      | 105       | 197      | 130     | 204 212 | 97       | 181 235 |

## 'VALJEVKA'

|                      |  |
|----------------------|--|
| Typ růstu stromu:    | středně bujný, široce rozložitý  |
| Doba kvetení:        | pozdní, samosprašná odrůda   |
| Zralost:             | pozdní   |
| Plodnost:            | vysoká, pravidelná, nastupuje brzy   |
| Plod:                | středně velký až velký, protáhle vejčitého tvaru, tmavě modrá, ojíňená slupka, dužnina žlutě zelená, s tmavě modrou slupkou s ojíňením, chuť je sladce navinulá a aromatická, odlučitelná od pecky |
| Odolnost k chorobám: | netrpí příliš monilií, k šarce švestek tolerantní  |
| Poznámka:            | vhodná do všech oblastí, díky své samosprašnosti je spolehlivou odrůdou zejména v letech se špatným počasím  |



### Alely odrůdy 'Valjevka'

| SSR marker | CPPCT033_a | CPSCT042 | UDP98-412 | CPSCT005 | EMPaS02 | AMPA100               | CPSCT039 | PacA33  |
|------------|------------|----------|-----------|----------|---------|-----------------------|----------|---------|
| Délka alel | 112 122    | 167      | 89 101    | 177 189  | 107 126 | 204 216               | 91 143   | 168 207 |
|            | 116        | 173      | 91 109    | 181 195  | 111 130 | 210 240 <sup>1)</sup> | 97       | 187 250 |
|            | 120        | 175      | 95        | 183      | 123     | 212                   | 105      | 189     |

1) V některých vzorcích místo alely 240 přítomna alela 242

## 'WAZONOVA RENKLÓDA'

|                      |  |
|----------------------|--|
| Typ růstu stromu:    | středně bujný až bujný   |
| Doba kvetení:        | raná až střední, samosprašná odrůda  |
| Zralost:             | pozdní   |
| Plodnost:            | velká, pravidelná, středně brzká až pozdnější  |
| Plod:                | středně velký až velký, kulovitý, slupka je žlutá, někdy se slabým líčkem, dužnina je žlutá, měkká, velmi sladké chuti, odlučitelná od pecky |
| Odolnost k chorobám: | tolerantní až středně odolná k šarce švestek   |
| Poznámka:            | do středně teplých oblastí, pro přímý konzum i zpracování, náročnější na pravidelný a přísný řez   |



**Alely odrůdy 'Wazonova Renklóda'**

| SSR marker | CPPCT033_a | CPSCT042 | UDP98-412 | CPSCT005 | EMPaS02 | AMPA100 | CPSCT039 | PacA33                |
|------------|------------|----------|-----------|----------|---------|---------|----------|-----------------------|
| Délka alel | 97 120     | 159 170  | 91        | 173 207  | 111 140 | 200 240 | 91 112   | 170 240 <sup>1)</sup> |
|            | 106 122    | 161 173  | 99        | 177      | 114     | 210     | 97       | 181                   |
|            | 112 129    | 169 177  | 105       | 193      | 120     | 212     | 105      | 197                   |

1) V některých vzorcích místo alely 240 přítomna alela 228

## 'ZIMMEROVA'

|                      |  |
|----------------------|--|
| Typ růstu stromu:    | střední až slabší růst   |
| Doba kvetení:        | středně raná, jen částečně samosprašná odrůda, vhodnými opylovači jsou 'Anna Späth', 'Čačanská Raná', 'Ruth Gerstetter', 'Stanley' a 'Wangenheimova'           |
| Zralost:             | středně raná   |
| Plodnost:            | pravidelná, vysoká, brzy vstupuje do plodnosti   |
| Plod:                | středně velký plod, oválně vejčitého tvaru, slupka červenavě až tmavě modrá, ojíňená, zlatozelená dužnina se sladce navinulou chutí, plně odlučitelná od pecky |
| Odolnost k chorobám: | náchylná k monilióze i šarce švestek   |
| Poznámka:            | nenáročná na stanoviště, plody poskytuje chutnější z teplejších oblastí  |



### Alely odrůdy 'Zimmerova'

| SSR marker | CPPCT033_a | CPSCT042 | UDP98-412 | CPSCT005 | EMPaS02 | AMPA100 | CPSCT039 | PacA33  |
|------------|------------|----------|-----------|----------|---------|---------|----------|---------|
| Délka alel | 102 122    | 163      | 87 109    | 173 195  | 107 130 | 202 210 | 89 128   | 168 201 |
|            | 112        | 173      | 93 136    | 177 197  | 111 140 | 204 214 | 97       | 170 207 |
|            | 120        | 177      | 95        | 189      | 114     | 208 216 | 106      | 181     |

# PŘÍLOHA – OSVĚDČENÍ O UZNÁNÍ METODIKY

  
Ústřední kontrolní  
a zkušební ústav zemědělský  
Držitel certifikátu ISO 9001

Hroznová 2  
603 00 Brno

www.ukzuz.cz  
ID DS: ugbaiq7

IČO: 00020338  
DIČ: CZ00020338

v y d á v á

## OSVĚDČENÍ UKZUZ 195676/2024

o uznání metodiky v souladu s podmínkami Metodiky hodnocení výzkumných organizací a programů 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: **Genotypizace švestky domácí (*Prunus domestica* L.) pomocí SSR markerů v praxi**

Autor/autoři: **Ing. Kamila Pluhařová; RNDr. Radek Čmejla, Ph.D.;  
Prof. Dr. Ing. Boris Krška; Ing. Pavel Voráček;  
RNDr. Jana Čmejlová, Ph.D.**

Název organizace/cí: **VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOCNÁŘSKÝ HOLOVOUSY s.r.o.;**  
FYTOS

Místo vydání: **Holovousy**  
Rok vydání: **2024**

Metodika byla vypracována v rámci výzkumného projektu NAZV č. QK22010268 „Vývoj systémů pro genotypování ovocných plodin a jejich implementace do praxe“.

Brno 18. 11. 2024

|   |  |
|---|--|
| Dokument je podepsán elektronickým podpisem |  |
| Podpisující:                                | Ing. Daniel Jurečka                            |
| Organizace:                                 | Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský |
| Sériové č. cert.:                           | 23490181                                       |
| Vydavatel cert.:                            | PostSignum Qualified CA 4                      |
| Datum a čas:                                | 18.11.2024 08:39:56                            |
| Dávod:                                      |  |
| Místo:                                      |  |

Ing. Daniel Jurečka  
ředitel ústavu

.....  
podpis/elektronický podpis  
zástupce odborného útvaru státní správy

Souhlas ředitele Odboru precizního zemědělství, výzkumu a vzdělávání MZe ČR:

V ..... dne .....

**Ing. Jan Adamec**



.....  
podpis/elektronický podpis  
ředitele/ředitelky  
Odboru precizního zemědělství,  
výzkumu a vzdělávání



## **Genotypizace švestky domácí (*Prunus domestica* L.) pomocí SSR markerů v praxi**

**Vydal:**

VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOCNÁŘSKÝ HOLOVOUSY s.r.o.  
Holovousy 129, 508 01 Holovousy

**1. vydání, 2024**

**ISBN 978-80-88669-02-9**

<https://doi.org/10.60615/reb7-8p71> (online, pdf)