



**VÚRV**

Výzkumný ústav  
rostlinné výroby

## METODIKA PRO PRAXI

### Metodika identifikace odrůd máků (*Papaver somniferum* L.) splňujících parametry cechovní normy „Český modrý mák“ pomocí mikrosatelitních markerů

Doc. RNDr. Jaroslava Ovesná, CSc., Ing. Jakub Vašek, Ph.D.,  
Ing. Pavel Svoboda, Ph.D., Doc. Dr. Ing. Pavel Vejl





**Metodika identifikace odrůd máků (*Papaver somniferum* L.)  
splňujících parametry cechovní normy „Český modrý mák“  
pomocí mikrosatelitních markerů**

*Schválená metodika pro praxi*

**Doc. RNDr. Jaroslava Ovesná, CSc.**

**Ing. Jakub Vašek, Ph.D.**

**Ing. Pavel Svoboda, Ph.D.**

**Doc. Dr. Ing. Pavel Vejl**

© Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Praha, 2020

© Česká zemědělská univerzita v Praze

ISBN 978-80-7427-318-6

**Dedikace:** Metodika byla vypracována pracovníky týmu Molekulární genetiky VÚRV, v.v.i. (50%) a ČZU v Praze (50%). Vznikla za finanční podpory MZe ČR a je výstupem řešení projektu: MZE QK1720263 - **Diagnostické metody pro laboratorní kontrolu pravosti máku setého (2017-2019)** a výzkumného záměru MZE RO0418

| <b>Autoři</b>                     | <b>Podíl</b> | <b>Kontakt na autory</b> |
|-----------------------------------|--------------|--------------------------|
| Doc. RNDr. Jaroslava Ovesná, CSc. | 20 %         | ovesna@vurv.cz           |
| Ing. Jakub Vašek, Ph.D.           | 40 %         | vasek@af.czu.cz          |
| Ing. Pavel Svoboda, Ph.D.         | 30 %         | pavel.svoboda@vurv.cz    |
| Doc. Dr. Ing. Pavel Vejl          | 10 %         | vejl@af.czu.cz           |

**Autor fotografií:** Pavel Svoboda

#### **Oponenti:**

doc., RNDr. Alena Španová, CSc, Masarykova Univerzita v Brně

Mgr. Stanislav Malý, PhD., ÚKZUZ, Brno

#### **Certifikace**

Metodika byla schválena odborem vědy, výzkumu a vzdělávání MZe pod č.j. UKZUZ 017284/2020 dne 28.1.2020.

Ministerstvo zemědělství doporučuje tuto metodiku pro využití v praxi.

## **Abstrakt:**

Předmětem metodiky je postup pro určení potravinářských odrůd máku setého pěstovaných v ČR pro trh podle parametrů české cechovní normy „Český modrý mák“. Metodika je založena na analýze délkového polymorfismu sady mikrosatelitů (SSR - Simple Sequence Repeats). Postup je využitelný zkušebními laboratořemi v praxi pro kontrolu pravosti odrůd. Rovněž je možné metodiku využít pro skríníng komodit ve spotřební síti. Metodika umožňuje, pomocí navrženého postupu, odlišit potravinářské odrůdy máku setého od jiných genotypů a odrůd. Sada generuje DNA profily, které jsou typické pro jednotlivé odrůdy. Podstatou postupu je amplifikace úseků genomu obsahující dané mikrosatelitní lokusy při použití specifických, fluorescenčně značených primerů a následná analýza délky produktů PCR. Metodika nově přináší unikátní soubor diagnostických SSR markerů, postup hodnocení a interpretace výsledků.

**Klíčová slova:** Český modrý mák, kontrola pravosti, DNA profily, délkový polymorfismus

## **Abstract:**

The purpose of this methodology is the procedure for the determination of poppy food varieties cultivated in the Czech Republic for the market according to the parameters of the Czech Guild Standard “Czech Blue Poppy”. The methodology is based on the analysis of microsatellites (SSR - Simple Sequence Repeats) length polymorphism. The procedure can be used by testing laboratories in practice to determine the authenticity of poppy varieties cultivated in the Czech Republic. The methodology is applicable for commodity screening on the market. The procedure allows using the proposed protocol to distinguish food varieties of poppy from other genotypes and varieties. The set of SSR markers generates unambiguous DNA profiles that are typical for each variety. The principle of the procedure is to amplify regions of the genome containing given microsatellite loci using specific, fluorescently labeled primers and subsequent analysis of the length of PCR products. The methodology newly introduces a unique set of diagnostic SSR markers, evaluation procedure and interpretation of results.

**Key words:** Czech blue poppy, authenticity verification, DNA profiles, length polymorphism

# OBSAH

|      |                                                                       |    |
|------|-----------------------------------------------------------------------|----|
| 1    | CÍL METODIKY.....                                                     | 1  |
| 2    | VLASTNÍ POPIS METODIKY .....                                          | 1  |
| 2.1  | Význam máku setého.....                                               | 1  |
| 2.2  | Délkový polymorfismus mikrosatelitů .....                             | 2  |
| 2.3  | Příprava laboratorního vzorku.....                                    | 3  |
| 2.4  | Izolace DNA máku.....                                                 | 4  |
| 2.5  | Analýza kvality a kvantity DNA.....                                   | 4  |
| 2.6  | Kontrola kvality DNA .....                                            | 5  |
| 2.7  | Amplifikace cílové sekvence mikrosatelitu .....                       | 6  |
| 2.8  | Separace fragmentů .....                                              | 7  |
| 2.9  | Vyhodnocení elektroforetogramů .....                                  | 8  |
| 2.10 | Potřebné technické vybavení a činidla .....                           | 8  |
| 3    | Srovnání novosti postupů oproti předcházejícímu stavu .....           | 11 |
| 4    | Popis uplatnění Certifikované metodiky .....                          | 11 |
| 5    | Ekonomické aspekty .....                                              | 11 |
| 6    | Seznam použité související literatury .....                           | 12 |
| 7    | Seznam publikací, které předcházely metodice a byly publikovány ..... | 13 |
| 8    | Přílohy:.....                                                         | 14 |

# 1 CÍL METODIKY

Cílem předložené metodiky je představit pro uživatele postup, kterým lze jednoznačně odlišit jednotlivé odrůdy máku (*P. somniferum* L.), které jsou pěstovány na území ČR a to s využitím znalostí o polymorfismu DNA v mikrosatelitních oblastech genomu. Postup lze použít pro identifikaci odrůd, pro posouzení variability nebo kontrolu šlechtitelského procesu. Taktéž ho lze aplikovat na komoditu na trhu ke zjištění/vyloučení přítomnosti jiných genotypů. Uživatel je seznámen s principy metody, laboratorním postupem i hodnocením výsledků.

## 2 VLASTNÍ POPIS METODIKY

### 2.1 Význam máku setého

Mák je jednoletá bylina, která se dnes využívá v potravinářském a farmaceutickém průmyslu. Patří do čeledi *Papaveraceae* a má řadu příbuzných druhů. Je zdrojem řady cenných alkaloidů zjm. opiátů, které se využívají pro farmaceutickou výrobu. Ve středomoří a na blízkém východě se mák pěstuje po tisíciletí, kam se rozšířil ze své domoviny ve východní a střední Asii.

Mák se tradičně pěstuje i v ČR a dnes je lukrativním exportním artiklem (Vašák, 2008), i když jeho pěstování je v mnoha zemích zakázáno. Také v ČR je pěstování máku regulováno, a to zákonem o návykových látkách č. 167/1998 Sb. - platný od 1. 1. 1999 - je stanovena ohlašovací povinnost osob pěstujících mák a konopí. V případě máku pro osoby pěstující mák setý na celkové ploše větší než 100 m<sup>2</sup>.

V osevních plochách dochází k oscilaci velikosti ploch. V marketingovém roce 2008/09 došlo ke snížení ploch osetých mákem na 18,4 tis. ha, v marketingovém roce 2012/13 došlo ke zvýšení. Díky růstu cen máku v roce 2017/18 vzrostly také pěstební plochy na 32,6 tis. ha. V marketingovém roce 2018/19 se předpokládá pokles osevních ploch na 26,6 tis. ha. Celková produkce semene máku se předběžně odhaduje na 13,8 tis. t při průměrném výnosu 0,52 t/ha (Liška, 2018).

Nejpopulárnější je tzv. modrý mák, který má zaručovat kulinářské a chuťové vlastnosti semen. Také se podařilo vyšlechtit celou řadu zajímavých, především bělosemenných odrůd pod názvy Sokol, Racek, Orel nebo odrůdu s okrovou barvou semene Redy. Z odrůd českého modrého máku jsou pěstované např. Orfeus (2009), Orbis (2012), Aplaus (2014), Opex (2015), Onyx (2016).

Semena těchto tzv. potravinářských máků, tj. máků s nízkým obsahem alkaloidů se využívají v potravinářství, také se z nich lisuje olej pro potravinářské, kosmetické i technické použití. Makovina pak bývá zdrojem opiových alkaloidů. Mák setý jich může obsahovat více než 40 odlišných typů. Proto

je třeba uvést i využití tzv. vysokoobsahových máků využívaných i pro nelegální výrobu drog. Ve světě se mák, resp. makovina používá pro výrobu léčiv na bázi opiových alkaloidů (Liscombe a Facchini, 2008; Labanca et al., 2018). Cenné alkaloidy (morfin, kodein, papaverin aj.) se staly významnou surovinou k výrobě léků. Vzhledem k tomu, že tyto alkaloidy se získávají z makoviny, semena jsou pro farmaceutický průmysl nevýznamná. Po určitých úpravách však mohou být využity v potravinářství a představují problém pro domácí výrobu. Chuťově jsou nekvalitní a mnohdy obsahují nadlimitní množství alkaloidů.

V současné chvíli se musí řídit složení komodity a výrobků na trhu v ČR Českou cechovní normou „Český modrý mák“. Ta dovoluje využívat semena jednoleté formy máku setého modrosemenného (*Papaver somniferum* L.), olejného typu, získávaná z potravinářských odrůd registrovaných v ČR (aktuálně zapsaných ve Státní odrůdové knize), a navíc odrůd Major, Opal, Gerlach, Orfeus, které nejsou vyjmenované ve Státní odrůdové knize [http://eagri.cz/public/web/file/625876/\\_32018\\_02.pdf](http://eagri.cz/public/web/file/625876/_32018_02.pdf).

To znamená, že na trhu se mohou objevit pouze máky a výrobky z nich, které obsahují uvedené odrůdy. Proto jsme se zaměřili na vývoj postupu, pomocí kterého lze odrůdy identifikovat.

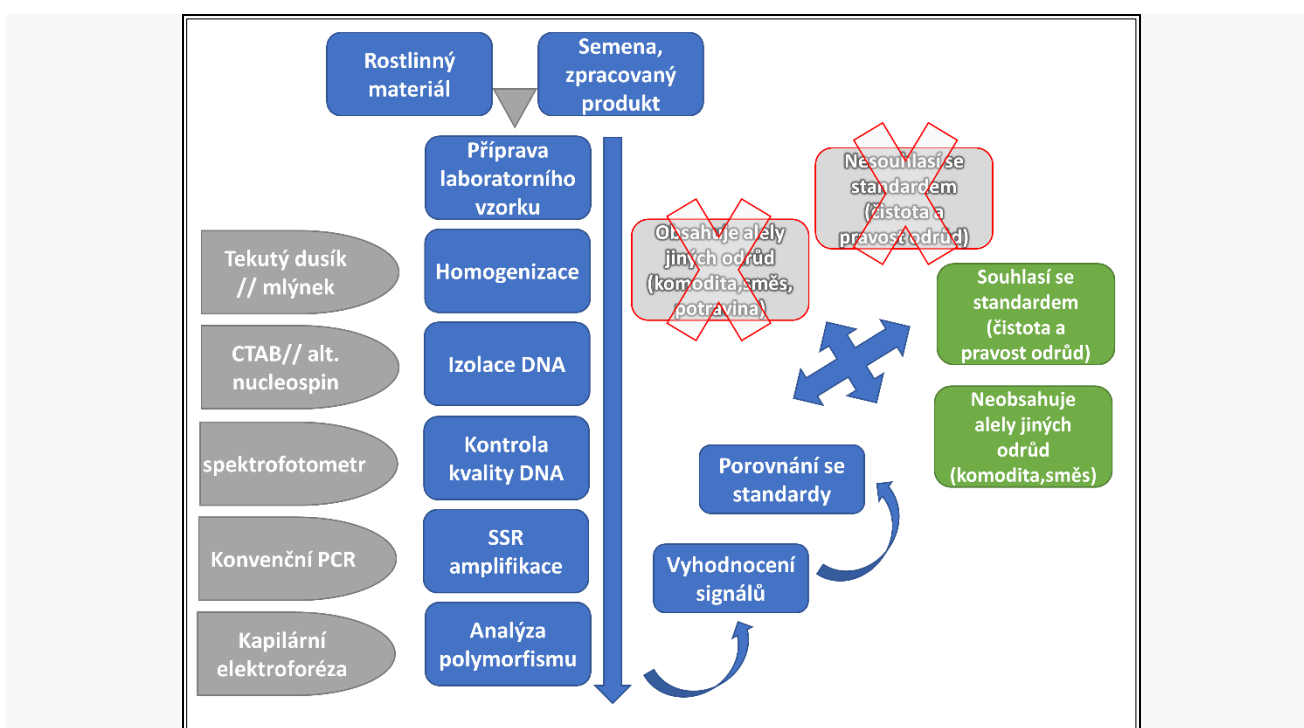
## 2.2 Délkový polymorfismus mikrosatelitů

Jakýkoliv organismus lze určit na základě souboru jeho morfologických charakteristik, souboru metabolitů a fyziologických parametrů. Bylo jednoznačně prokázáno, že pro ověření identity jakéhokoliv organismu jsou vhodné postupy založené na analýze polymorfismu nukleových kyselin (Böhme et al., 2019). Postupy musí být jasně popsány, musí být opakovatelné, robustní a specifické.

V současné době se využívají postupy založené na analýze délkového polymorfismu úseků nekódujících sekvencí i genů (mikrosatelity – SSR, AFLP), bodové mutace a krátké mutace in/del (SNP) případně polymorfismus delších úseků (sekvenování podle Sangerova nebo NGS). Zvýše uvedených postupů byla pro rozlišení rostlinných materiálů vybrána metoda analýzy krátkých opakujících se sekvencí (mikrosatelitů – SSR). Tato metoda je přesná, opakovatelná a dostatečně robustní. Analýza probíhá v běžné kapilární elektroforéze, která je dostupná v kontrolních laboratořích (Jamali et al., 2019). Alternativu v dnešní době představuje sekvenování příští generace (Next Generation Sequencing - NGS), které vyžaduje nový přístroj, zvýšené nároky na obsluhu, má řadu kroků a je třeba bioinformatických analýz. Zatím se využívá pro identifikaci bakteriálních kontaminantů ve vzorcích (Nyborn, 2004; Čurná a Žaludová 2007),

Vzhledem k vlastnostem jednotlivých metod a nároků na jejich aplikaci (technické vybavení, zkušenost personálu) a interpretaci byla zvolena metoda využívající délkového polymorfismu krátkých opakujících se sekvencí tzv. mikrosatelitů (SSR z angl. simple sequence repeats).

Mikrosatelit je úsek DNA, ve kterém se některé DNA motivy v délce od 2 do 13 párů bází opakují až 50 krát. Genomy eukaryontů jsou na obsah takovýchto repetitivních DNA sekvencí bohaté (Morgante a Olivieri, 1993; Kejnovsky et al., 2009; Garrido-Cardenas et al., 2018). Mikrosatelitních lokusů se ve eukaryotním genomu vyskytují tisíce a dobře odrážejí genetickou odlišnost (Brinkmann et al., 1998). Tyto sekvence mají nejvýznamnější dopad na velikost genomu (Cermak et al., 2008). Pro charakterizaci délkového polymorfismu mikrosatelitů DNA se obvykle využívá jejich amplifikace (namnožení úseků DNA) během PCR reakce s využitím unikátních sekvencí oligonukleotidů (primerů). Takto je možné získat dostatečné množství amplikonů (kopií sekvence nukleotidů) pro jednotlivé SSR lokusy, které jsou následně separovány podle své délky a vizualizovány. Základní schéma analýzy Obr. 1). Využití postupu bylo popsáno u řady rostlinných druhů (Varschney et al., 2005; Korir et al., 2013).



Obr. 1 Základní schéma postupu analýzy máku a interpretace výsledků

## 2.3 Příprava laboratorního vzorku

Pro analýzu lze použít rostlinný materiál z jednotlivých rostlin nebo směsný vzorek, tj. souhrnný vzorek připravený z dílčích vzorků. Není předmětem této metodiky uvádět způsob vzorkování a přípravu směsného vzorku. Laboratorní vzorek, musí být pro zkoušky do laboratoře předán tak, aby nedošlo k případnému ovlivnění výsledků zkoušek nevhodným zacházením se vzorkem při skladování a dopravě.

Z laboratorního vzorku je v laboratoři po homogenizaci a dělení připraven analytický vzorek, jehož hmotnost je minimálně 100 – 200 mg.

## 2.4 Izolace DNA máku

Pro izolaci nukleových kyselin je všeobecně k dispozici škála metod, kde je prvním krokem rozrušení (lyze) buněk rostlinných pletiv. Pro rozrušení rostlinných buněk máku s buněčnou stěnou musí být použita nějaká forma mechanické síly, např. drcení pletiva zmrazeného tekutým dusíkem v třecí misce. DNA lze izolovat z jakéhokoliv pletiva rostliny máku. DNA lze izolovat i z makových semen nebo mletého produktu s využitím obdobných postupů.

Během izolace je nutné vzorek homogenizovat, rozrušit buněčné stěny a odstranit i polysacharidy extrakcí cetyl trimetyl amonium bromidem (CTAB). Látky rozpustné v organických rozpouštědlech se odstraní směsí chloroform:izoamyl alkohol. DNA se pak precipituje etanolem v přítomnosti jednomocného kationtu. S nukleovými kyselinami se srážejí i soli, které je potřeba odmyt 75% etanolem. Purifikovaná DNA je po vysušení rozpuštěna ve vodě nebo v TE pufru.

## 2.5 Analýza kvality a kvantity DNA

Pracovní postup analýzy DNA (složení roztoků, reagentie a činidla, přístrojové vybavení je uvedeno v části II.10)

|                                                                                                                                                                                          |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| • navážit 100 – 200 mg homogenizovaného vzorku do 2 ml mikrozkušavky                                                                                                                     |
| • přidat 400 µl sterilované deionizované vody, ihned po přidání jednotlivé vzorky jemně promíchat sterilní kličkou a ponechat 5 min. rehydratovat                                        |
| • přidat 1,3 ml předehřátého na 65°C CTAB extrakčního pufru a protřepat (vibrační třepačka)                                                                                              |
| • přidat 10 µl RNázy A a opatrně promíchat. Inkubovat 30 min. při teplotě 65°C v blokové lázni za stálého opatrného míchání (nebo každých 10 min. promíchat převrácením mikrozkušavky)   |
| • přidat 10 µl roztoku proteinázy K, jemně promíchat a nechat inkubovat 30 min. při teplotě 65°C za stálého opatrného míchání (nebo každých 10 min. promíchat převrácením mikrozkušavky) |
| • centrifugace v odstředivce 10 min. při 12000 ot./min.                                                                                                                                  |
| • přenést po cca 600 µl supernatantu do 2 nových 2 ml mikrozkušavek, přidat totožný objem směsi chloroform : isoamylalkohol = 24 : 1 a cca. 1 minutu silně třepat                        |
| • centrifugace v odstředivce 15 min. při 12000 ot./min. Přenést horní (vodnou) fázi do nové 2ml mikrozkušavky                                                                            |
| • přidat 2 objemy CTAB precipitačního pufru                                                                                                                                              |
| • inkubace 60 min. při laboratorní teplotě bez jakéhokoli míchání                                                                                                                        |
| • centrifugace v odstředivce 15 min. při 12000 ot./min.                                                                                                                                  |

|                                                                                                                                                       |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| • pipetou odstranit supernatant (popř. opatrně vylít) – pelet nemusí být viditelný                                                                    |
| • rozpustit precipitovanou DNA přidáním 450 µl roztoku NaCl a opatrně pipetou promíchat (nebo převrácením mikrozkušavky)                              |
| • přidat 450 µl směsi chloroform : isoamylalkohol = 24 : 1 a cca. 1 min. důkladně míchat (třepat rukou)                                               |
| • centrifugace v odstředivce 20 min. při 12000 ot./min.                                                                                               |
| • přenést horní vodní fázi do nové 1,5 ml mikrozkušavky                                                                                               |
| • přidat 0,6 objemu isopropan-2-olu, jemně promíchat převrácením mikrozkušavky a nechat inkubovat 20 min. při laboratorní teplotě                     |
| • centrifugace v odstředivce 15 min. při 12000 ot./min.                                                                                               |
| • odstranit supernatant                                                                                                                               |
| • přidat 500 µl roztoku ethanolu a několikrát převrácením mikrozkušavky promíchat (toto je nejdůležitější krok dokončující kompletní odstranění CTAB) |
| • centrifugace v odstředivce 10 min. při 12000 ot./min.                                                                                               |
| • odstranit supernatant opatrnou dekantací roztoku                                                                                                    |
| • vysušit pelet DNA při laboratorní teplotě (cca.30min.) a znovu rozpouštět ve 100 µl TE pro PCR při teplotě 4°C min. 24hodin.                        |

## 2.6 Kontrola kvality DNA

Kvalita izolované DNA, která je pro další analýzy klíčová, se stanovuje separací na agarózovém gelu (fragmentace a hrubý odhad kvantity) a spektrofotometricky (kvantita, kvalita, zastoupení interferujících látek).

Pracovní postup kontroly kvality DNA (složení roztoků, reagentie a činidla, přístrojové vybavení je uvedeno v části II.10).

### Gelová elektroforéza DNA

Podle počtu vzorků se připraví navážka agarózy. Pro objem 70 ml 1xTAE je navážka agarózy 0,56 g a objem přidaného ethidium bromidu 0,7 µl.

|                                                                                                                                                                                                                                          |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| • na analytických vahách se naváží na váženec potřebné množství agarózy                                                                                                                                                                  |
| • navážená agaróza se převede do Erlenmayerovy baňky a zalije se potřebným objemem 1 x TAE pufru a v mikrovlnné troubě se roztok přivede k varu                                                                                          |
| • baňka se postaví na elektromagnetickou míchačku a vloží se do ní míchadélko. Když teplota roztoku v baňce klesne na cca 60°C, přidá se k roztoku agarózy požadovaný objem ethidium bromidu a roztok se nechá ještě cca 1 minutu míchat |
| • tekutý roztok agarózy se nalije do formy na gel ve které je hřebínek a nechá se vychladnout                                                                                                                                            |
| • po vychladnutí a ztuhnutí gelu se opatrně vyjme hřebínek, v gelu zůstanou jamky pro nanášení vzorků                                                                                                                                    |

Vzorky se na připravený gel nanesou podle následujícího pracovního postupu:

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• z roztoku izolované DNA se odebere 1 µl, přenese se do nové mikrozkušavky a přidá se 7 µl sterilní deionizované vody a 3 µl 6 x koncentrovaného nanášecí pufr (Loading Dye Solution), celkový objem je 11 µl.</li> </ul>                                                                                                                                                                                                      |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• připravený elektroforetický gel se vloží do elektroforetické vany a převrství se (cca 5 mm) 1 x TAE pufrem</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• do první a poslední dráhy se nanese 6 µl délkového standardu lambda HIND III a do dalších drah se nanáší vždy 11 µl každého vzorku</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• elektroforéza probíhá cca 60 – 90 minut při 30 V</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• po ukončení elektroforézy se gel vizualizuje pomocí UV záření ve fotodokumentačním zařízení. Srovnáním pozice DNA s pozicí délkového standardu je pak určen stupeň degradace DNA.</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                  |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• Koncentrace DNA vzorku je měřena spektrofotometrem. Optimální koncentrace pro další analýzy je 50 ng/µl. Vyšší koncentrace DNA se ředí TE pufrem. Čistota izolované DNA z hlediska kontaminace bílkovinami se získá změřením poměru absorbancí při vlnových délkách 260 a 280 nm (A260/A280), při které mají absorpční maximum bílkoviny. Hodnota tohoto poměru je optimální, pokud se pohybuje v rozmezí 1,7-1,9.</li> </ul> |

Vzorky DNA jsou naředěny H<sub>2</sub>O na pracovní koncentraci 10 ng/µl a použity pro další analýzy.

## 2.7 Amplifikace cílové sekvence mikrosatelitu

Cílová sekvence (SSR) se amplifikuje ze specifického lokusu genomu analyzovaného materiálu pomocí fluorescenčně značených primerů a *Taq* polymerázy v cyklické reakci (Tabulka 2). Obvykle se připraví reakční směs sestávající z tzv. mastermixu a cílové DNA.

Mastermix pro SSR reakci je připraven z chemikálií, které jsou uvedeny níže. Celkově je připraveno množství, které odpovídá předpokládanému počtu analyzovaných vzorků. Při výpočtu příslušných objemů je potřeba počítat také s malou rezervou na ztráty při pipetování. Po smíchání všech složek je mastermix rozpipetován v objemu 9 µl do tenkostěnných mikrozkušavek a do každé z nich je posléze přidán 1 µl roztoku genomické DNA analyzované odrůdy (koncentrace 10 ng /µl). Složení reakční směsi (Tabulka 1).

**Tabulka 1** Složení reakční směsi pro amplifikaci specifických SSR amplikonů

| Komponenta                                                  | Objem (µl) |
|-------------------------------------------------------------|------------|
| Pár SSR primerů (2µM)                                       | 1,0        |
| 2x Multiplex PCR Master Mix (Qiagen Multiplex PCR Plus Kit) | 5,0        |
| templátová DNA (10ng/ul)                                    | 1,0        |
| RNase-Free H <sub>2</sub> O                                 | 3,0        |
| Celkový objem                                               | 10,0       |

Mikrozkušavky jsou po naplnění reakční směsí protřepány a centrifugovány. Poté jsou umístěny například do termocykleru Veriti™ Thermal Cycler nebo jakéhokoliv ekvivalentního přístroje. PCR reakce sestává z následujících kroků (Tabulka 2):

**Tabulka 2:** Teplotní profil a trvání jednotlivých kroků amplifikační reakce

| Krok:                  | Teplota (°C)                                | Čas (s)                |
|------------------------|---------------------------------------------|------------------------|
| 1. Aktivace polymerázy | 95                                          | 600                    |
| 2. Amplifikace         |                                             |                        |
| - Denaturace           | 94                                          | 30                     |
| - Nasedání             | Uvedeno v tab. 3 pro jednotlivé SSR primery | 90                     |
| - Prodlužování         | 72                                          | 60                     |
| Opakuje se 35 x        |                                             |                        |
| Dokončení amplifikace  | 60                                          | 4800                   |
| Uskladnění             | 4/-20                                       | Přes noc/do zpracování |

Seznam fluorescenčně značených primerů je uveden v Tab.3.

**Tabulka 3:** Přehled analyzovaných SSR lokusů, sekvence primerů specifických pro jednotlivé lokusy, teplota nasedání primerů ( $T_A$ ), velikost klonovaných alel (D)

| Název markeru    | Sekvence forward primeru a použitý fluorofor  | Sekvence reverse primeru                  | Velikost klonovaných alel D (bp)                       | * $T_A$ °C |
|------------------|-----------------------------------------------|-------------------------------------------|--------------------------------------------------------|------------|
| <b>OPEST026</b>  | 6FAM*-CGT GAG AAG<br>CTA GAA CAG AAA GA       | TCG TTC ACT GAG TTC<br>TGA TAT GA         | 105, 109, 115, 118,<br>121, 127, 139, 142,<br>145, 148 | 60°C       |
| <b>OPEST048c</b> | VIC*-GGG TTC TTT<br>TGT TCT ACT TCT TTC<br>TT | AAG GTG TCG GTG<br>CCC AGC                | 175, 185, 186, 189,<br>192, 195, 198, 201,<br>204      | 60°C       |
| <b>OPEST051c</b> | NED*-TCA ATA CCC<br>ACA AAA GGA GGA           | gtt tct tTC AAG ACA<br>AAG AAA CCA AGC CA | 147, 153, 156, 159,<br>162                             | 60°C       |
| <b>OPEST061</b>  | PET*-AGT AAA ACG<br>ATC CGT ACC TAC<br>CTG A  | CGT TTT TCT ACA<br>GGG TTG ATT TCT GA     | 191, 221, 224, 227,<br>230, 233, 236                   | 60°C       |
| <b>OPEST099</b>  | VIC*-CGC CAC CAC<br>ATA TTT CTC TG            | GGT TGT CGG CAT<br>AGA AGG AA             | 262, 264, 269, 273,<br>276, 282, 284, 285,<br>288      | 60°C       |
| <b>OPEST102b</b> | 6FAM*-CAC CAA ATC<br>TCA TTG CCT GA           | CCC TAA TCG GAT<br>GGA TCA AA             | 184, 187, 192, 194,<br>195, 197, 200, 203,<br>206      | 60°C       |
| <b>OPEST106</b>  | 6FAM*-TAG TGG TTG<br>CTC GTA GCG TC           | TCA CGG TTC TTC TAT<br>CAT GGT G          | 166, 167, 173, 182,<br>185, 188, 191                   | 60°C       |

\* - použitý fluorofor (6FAM: 6-karboxyfluorescein; VIC<sup>TM</sup>; NED<sup>TM</sup>, PET<sup>TM</sup>)

## 2.8 Separace fragmentů

### Analýza PCR produktů kapilární elektroforézou

Při studiu mikrosatelitních oblastí genomu máku je analyzováno celkem 7 lokusů. Produkty amplifikace jsou separovány elektroforeticky metodou kapilární elektroforézy například na přístroji ABI PRISM 3530 (Applied Biosystems) pro stanovení jejich délky.

### Příprava vzorků pro fragmentační analýzu:

Před separací v kapilární elektroforéze je třeba vzorky denaturovat. Do mikrodestičky se do každé jamky napipetují níže uvedené komponenty (Tabulka 4).

**Tabulka 4:** Složení denaturační směsi pro analýzu vzorků v kapilární elektroforéze

| Komponenty reakční směsi     | Objem (μl) |
|------------------------------|------------|
| Formamid                     | 10         |
| LIZ500 Size Standard         | 0,5        |
| PCR produkty, každý o objemu | 1,0        |

Produkty PCR označené odlišnou fluorescenční značkou nebo označené totožným fluoroforem, ale s nepřekrývající se oblastí amplifikace, mohou být pipetovány do shodné zkumavky, podle tab. 3. Vzorky se před analýzou denaturují inkubací 7 minut při teplotě 94 °C a následně rychlým zchlazením na teplotu 4°C.

### Analýza PCR produktů v přístroji ABI PRISM 3530

Jako interní velikostní standard se používá LIZ 500. Vzorky pro analýzu jsou připravovány do jamek destiček (určených pro použití v přístroji ABI PRISM 3530).

Přístroj je pro fragmentační analýzu připraven podle návodu výrobce, jeho popis není předmětem této metodiky. Kapilára naplněna odpovídajícím polymerem dle návodu výrobce a přístroj je nastaven na analýzu fragmentů. Záznamy se zapisují v paměti řídicího počítače.

## **2.9 Vyhodnocení elektroforetogramů**

Profily SSR markerů, resp. délky amplifikovaných úseků v počtu bází, se zaznamenávají během analýzy v PC. Po analýze se zkontroluje kvalita signálů (min. výška stanovena pro individuální lokusy podle popisu výrobce). Po kontrole se vyhodnocují profily pomocí specializovaného programu GeneMapper v 4.0. nebo ekvivalentním programem. Výsledkem analýzy jsou údaje o velikosti jednotlivých fragmentů udávané v párech bází. Primární data se dále převádějí do binární matice a statisticky se zpracovávají pro odhad diverzity vhodným programem (DARwin, PCA). Pro hodnocení odrůdové deklarace se ztotožňují profily vzorku s profily známých standardů (referenčních odrůd).

## **2.10 Potřebné technické vybavení a činidla**

- Analytická váha
- Fotodokumentační zařízení
- Elektromagnetické míchadlo
- Eppendorf Thermomixer
- Erlenmayerova baňka, 500 ml
- Hřebínek do elektroforetické vany a forma na gel pro elfo
- Centrifuga s minimálně 12000 otáčkami/min
- Chladnička laboratorní
- Parní sterilizátor

- Magnetická míchačka
- Mikropipety
- Mikrovlnná trouba
- Mrazicí box (-20°C, -80°C)
- Odměrný válec, 500 ml
- Ochranné gumové rukavice bez pudru
- PCR destičky vč. víček či folie
- pH-metr
- Skleněné háčky na zachycení DNA
- Stolní minicentrifuga
- Spektrofotometr
- Špičky na automatické pipety
- Termocykler pro PCR Veriti™ Thermal Cycler
- Třecí misky a tloučky
- Váženky
- Vibrační třepačka
- Zařízení na horizontální elektroforézu
- Zdroj k elektroforézám
- 0,2 ml sterilní zkumavky
- 1,5 a 2 ml sterilní zkumavky
- 6 x nanášecí pufr (Loading Dye Solution)
- Přístroj na kapilární elektroforézu ABI3530 (Applied Biosystems) a program na vyhodnocení dat GeneMapper

**Pro izolaci DNA jsou potřebné následující roztoky a činidla:**

- tekutý dusík

❖ CTAB EXTRAČNÍ PUFR

|                                                                            |
|----------------------------------------------------------------------------|
| 10 g CTAB                                                                  |
| 41g NaCl                                                                   |
| 7,875 g Tris- HCl                                                          |
| 3,75 g Na <sub>2</sub> EDTA                                                |
| vše se doplní do objemu 500 ml H <sub>2</sub> O, pH roztoku se upraví na 8 |

❖ CTAB PRECIPITAČNÍ PUFR:

|                                                                            |
|----------------------------------------------------------------------------|
| 2,5 g CTAB                                                                 |
| 1,25 g NaCl                                                                |
| vše se doplní do objemu 500 ml H <sub>2</sub> O, pH roztoku se upraví na 8 |

- 1,2 M NaCl:  
7 g NaCl se rozpustí v 100 ml deionizované vody
- 20 mg/ml Proteinase K:  
20 mg Proteinase K se rozpustí v 1 ml sterilní deionizované vody.
- 10 mg/ml RNase A:  
10 mg RNase A se rozpustí v 1 ml sterilní deionizované vody
- směs chloroform: isoamylalkohol (24:1)
- 99 % roztok isopropanolu - vymražený
- 70 % roztok etanolu

❖ TE PUFR:

|                  |                             |
|------------------|-----------------------------|
| 10 mM Tris       | 2,5 ml 1M roztok o pH 8,0   |
| 1 mM EDTA        | 0,5 ml 0,5M roztok o pH 8,0 |
| H <sub>2</sub> O | Do 250 ml                   |

**Pro elektroforetickou kontrolu kvality DNA na agarózovém gelu jsou potřebné následující roztoky a činidla:**

- Agaróza
- Ethidium bromid (10 mg/ml)
- Loading buffer
- Velikostní standard lambda HIND III

❖ 1 x TAE PUFR

|                                    |               |
|------------------------------------|---------------|
| TRIS báze (s) 4,8 g                | 0,48% roztoku |
| ledová CH <sub>3</sub> COOH 1,5 ML | 0,5M          |
| EDTA (pH = 8.0) 2,0 ml             | 1mM roztok    |
| H <sub>2</sub> O                   | Do 1000 ml    |

**Pro provedení PCR amplifikace jsou potřebné následující roztoky a činidla:**

- Syntetické oligonukleotidy - primery specifické pro daný druh rostliny (viz Tabulka č. 3)
- dNTP
- Tth polymeráza vč. pufru a MgCl<sub>2</sub> (Biotools)
- Ultra Pure H<sub>2</sub>O pro PCR
- Formamid
- LIZ500 délkový standard

### 3 Srovnání novosti postupů oproti předcházejícímu stavu

V této metodice je prezentován nový soubor SSR markerů, který umožňuje odlišit odrůdy máku setého (*Papaver somniferum* L.) používaných pro produkty podle cechovní normy „Český modrý mák“ od dalších genotypů, odrůd a variet. Byl nově sestaven soubor SSR markerů, který na rozdíl od předchozích, má dostatečnou informační hodnotu (Příloha 1 a 2).

Byla provedena verifikace i mezilaboratorní validace postupu a prověřena robustnost, opakovatelnost postupů. Analýza mikrosatelitů je díky svým analytickým parametrům vhodná pro rutinní využití, což potvrzují i některé předcházející publikace Jones et al., (1997), které sledovaly reprodukovatelnost metod založených na DNA markerech. Díky zařazení standardů (referenčních genotypů) lze jednoznačně identifikovat jednotlivé alely daných lokusů při testech na odlišných pracovištích a strojích. Analýza mikrosatelitů se používá rutinně ve forenzní diagnostice (Gilmore et al., 2003; Štambuk et al., 2007), ověřování původu zvířat (Marikar a MUSTAFA, 2014; Saberivand et al., 2011; Schulz et al., 2010) a je doporučena i pro hodnocení odrůdové pravosti rostlin (Iqbal et al., 2010; Iqbal et al., 2013; McGregor et al. 2000, Corrado, 2016, Zhao et al., 2019; Ovesná et al. 2014; Vašek et al. 2019).

Předložená metodika přináší rychlý a validovaný postup upravený pro hodnocení pravosti odrůd českého modrého máku, lze ji využít i pro hodnocení genetických zdrojů a šlechtitelských materiálů.

Je možné ji využívat v běžných laboratořích, a to jak v akreditovaném systému po verifikaci v laboratoři, tak pro výzkumné a vývojové účely.

### 4 Popis uplatnění Certifikované metodiky

Metodika představuje soubor postupů (izolace DNA, stanovení parametrů kvality DNA, soubor specifických SSR markerů, popis amplifikace a hodnocení výsledku), jejichž pomocí lze určovat příslušnost materiálů k českým modrým mákům. Výstupem analýzy vybraných SSR lokusů je určení přítomnosti specifických alel, které jsou rozhodující pro určení, zda hodnocený vzorek máku byl získán z odrůd českého modrého máku.

Uživatelé metodiky mohou být orgány státní správy (ÚKZÚZ, SZPI), kontrolní a privátní laboratoře v ČR, taktéž pěstitelé máku a jeho zpracovatelé, kteří je využijí prostřednictvím akreditovaných laboratoří.

### 5 Ekonomické aspekty

Pracovní postup zahrnuje extrakci DNA, PCR reakce a následnou fragmentační analýzu produktů. Časově a pracovně náročná je extrakce DNA použitím CTAB metody, která je však levnější

než extrakce použitím komerčních souprav. PCR pro každý jednotlivý SSR markér trvá cca 3 hodiny. Při použití jedné destičky o 96 jamkách jsou k dispozici hrubá data za 24 hod. Odborně náročnou částí je vyhodnocení výsledků, které zahrnuje identifikaci produktů amplifikace programem GeneMapper 4.0 a následné porovnání velikostí amplifikovaných fragmentů s referenčními vzorky. Doporučená cena analýzy jednoho vzorku samostatně zahrnující osobní náklady, režijní náklady, náklady na výcvik pracovníků a akreditaci, (včetně izolace DNA, PCR analýzy v přístroji ABI PRISM 3530). Ceny analýz jsou ovlivněny cenami chemikálií a počtem vzorků v jedné sérii.

Pro zavedení metodiky do praxe je třeba počítat s náklady na verifikaci metody na daném pracovišti. Je třeba analyzovat alespoň 5 standardních vzorků (referenčních standardů pro hodnocení SSR lokus) a to v deseti nezávislých opakováních (technické replikáty).

Uplatnění metodiky je významné pro obchodní sektor i pěstitele (export, uplatnění na trhu v ČR) a ochrání i spotřebitele před nákupem falšovaných produktů.

## 6 Seznam použité související literatury

- BÖHME, K., CALO-MATA, P., BARROS-VELÁZQUEZ, J. a ORTEA, I. (2019). Review of Recent DNA-Based Methods for Main Food-Authentication Topics. *J. Agric. Food Chem.* 67:3854-3864.
- BRINKMANN B., JUNGE A., MEYER E. a WIEGAND P. (1998). Population genetic diversity in relation to microsatellite heterogeneity. *Hum Mutat.* 11:135–144.
- CERMAK T., KUBAT Z., HOBZA R., KOBLIZKOVA A., WIDMER A. a MACAS J. (2008). Survey of repetitive sequences in *Silene latifolia* with respect to their distribution on sex chromosomes. *Chromosome Res.* 16:961–976.
- CORRADO, G. (2016). Advances in DNA typing in the agro-food supply chain. *Trends in Food Science & Technology*, 52:80-89.
- ČURN V. a ŽALUDOVÁ E. (2007). Fingerprinting of Oilseed Rape Cultivars. In: Gupta S. (ed.): *Rapeseed Breeding. (Advances in Botanical Research, Volume 45)*. Elsevier Publ., pp. 155-179.
- GARRIDO-CARDENAS, J. A., MESA-VALLE, C. a MANZANO-AGUGLIARO, F. (2018). Trends in plant research using molecular markers, *Planta*, 247:543-557.
- GILMORE S., PEAKALL R. a ROBERTSON J. (2003). Short tandem repeat (STR) DNA markers are hypervariable and informative in *Cannabis sativa*: implications for forensic investigations. *Forensic Science International*, 131: 65-74.
- IQBAL, A., SADAQAT, H. A., KHAN, A. S. a AMJAD, M. (2010). Identification of sunflower (*Helianthus annuus*, Asteraceae) hybrids using simple-sequence repeat markers. *Genet. Mol. Res.* 10:102-106.
- IQUEBAL, M. A., ARORA, V., VERMA, N., RAI, A. a KUMAR, D. (2013). First whole genome based microsatellite DNA marker database of tomato for mapping and variety identification. *BMC plant biology*, 13:197.
- JAMALI, S. H., COCKRAM, J. a HICKEY, L. T. (2019). Insights into deployment of DNA markers in plant variety protection and registration. *Theor Appl. Genet.*, 132:1911 – 125
- JONES, C. J., EDWARDS, K. J., CASTAGLIONE, S., WINFIELD, M. O., SALA, F., VAN DE WIEL, C., ... a BRETTSCHEIDER, R. (1997). Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories. *Mol. Breeding*, 3:381-390.

- KEJNOVSKY E., HOBZA R., KUBAT Z., CERMAK T. a VYSKOT B. (2009). The role of repetitive DNA in structure and evolution of sex chromosomes in plants. *Heredity*, 102:533–541.
- KORIR, N. K., HAN, J., SHANGGUAN, L., WANG, C., KAYESH, E., ZHANG, Y. a FANG, J. (2013). Plant variety and cultivar identification: advances and prospects. *Critical Rev. Biotechnol.* 33:111-125.
- LABANCA F., OVESNÁ J. a MILLELA L. (2018): *Papaver somniferum* L. taxonomy, uses and new insight in poppy alkaloid pathways *Phytochem. Rev.* 17:853-871.
- LISCOMBE, D. K. a FACCHINI, P. J. (2008): Evolutionary and cellular webs in benzyloisoquinoline alkaloid biosynthesis. *Current Opinion Biotechnol.* 19:173-180.
- LIŠKA M. (2018): Situační a výhledová zpráva: olejniny. Vyd. Ministerstvo zemědělství ČR, 2018, eagri.cz
- MARIKAR, F. M. a MUSTAFA, M. M. (2014). Usefulness of short sequence repeat markers in goat genetic diversity studies on the Asian and African continents. *Turkish Journal of veterinary and animal sciences*, 38:606-611.
- MCGREGOR, C. E., LAMBERT, C. A., GREYLING, M. M., LOUW, J. H. a WARNICH, L. (2000). A comparative assessment of DNA fingerprinting techniques (RAPD, ISSR, AFLP and SSR) in tetraploid potato (*Solanum tuberosum* L.) germplasm. *Euphytica*, 113:135-144.
- MORGANTE, M. a OLIVIERI, A. M. (1993). PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *The Plant Journal*, 3:175-182.
- NYBORN, H. (2004). Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants, *Molecular Ecology*, 13:1145 – 1157.
- SABERIVAND, A., JAVANMARD, A. a SAFDARI, M. (2011). Parentage verification and identity test of Ghezel sheep using microsatellite markers. *African Journal of Biotechnology*, 10:5815-5819.
- SCHULZ, U., TUPAC-YUPANQUI, I., MARTÍNEZ, A., MÉNDEZ, S., DELGADO, J. V., GÓMEZ, M., ... a CAÑÓN, J. (2010). The Canarian camel: a traditional dromedary population. *Diversity*, 2:561-571.
- ŠTAMBUK, S., SUTLOVIĆ, D., BAKARIĆ, P., PETRIČEVIĆ, S. a ANĐELINOVIĆ, Š. (2007). Forensic botany: potential usefulness of microsatellite-based genotyping of Croatian olive (*Olea europaea* L.) in forensic casework. *Croatian medical journal*, 48:556.
- VARSHNEY, R. K., GRANER A. a SORRELLS M. E. (2005). Genic microsatellite markers in plants: features and applications. Elsevier - *TRENDS in Biotechnology*, 23:45-55.
- VAŠÁK, J. (2008): Mák a hořčice jako národní speciality. 56:35 - 38.
- ZHAO, Y., WANG, Y., WANG, L. a ZHANG, D. (2019). Molecular identification of mung bean accessions (*Vigna radiata* L.) from Northeast China using capillary electrophoresis with fluorescence-labeled SSR markers. *Food and Energy Security*, e182.

## 7 Seznam publikací, které předcházely metodice a byly publikovány

- OVESNÁ J., LEIŠOVÁ-SVOBODOVÁ L. a KUČERA L. (2014): Microsatellite analysis indicates the specific genetic basis of Czech bolting garlic. *Czech Journal of Genetics and plant Breeding*, 50:226-234.
- LABANCA F., OVESNÁ J. a MILLELA L. (2018) (2018): *Papaver somniferum* L. taxonomy, uses and new insight in poppy alkaloid pathways *Phytochem. Rev.* 17:853-871.
- VÁŠEK J., ČÍLOVÁ D., MELOUNOVÁ M., SVOBODA P., VEJL P., ŠTIKAROVÁ R., VOSTRÝ L., KUČTOVÁ P. a OVESNÁ J. (2019). New EST-SSR markers for individual genotyping of opium poppy cultivars (*Papaver somniferum* L.). *Plants* (under review).

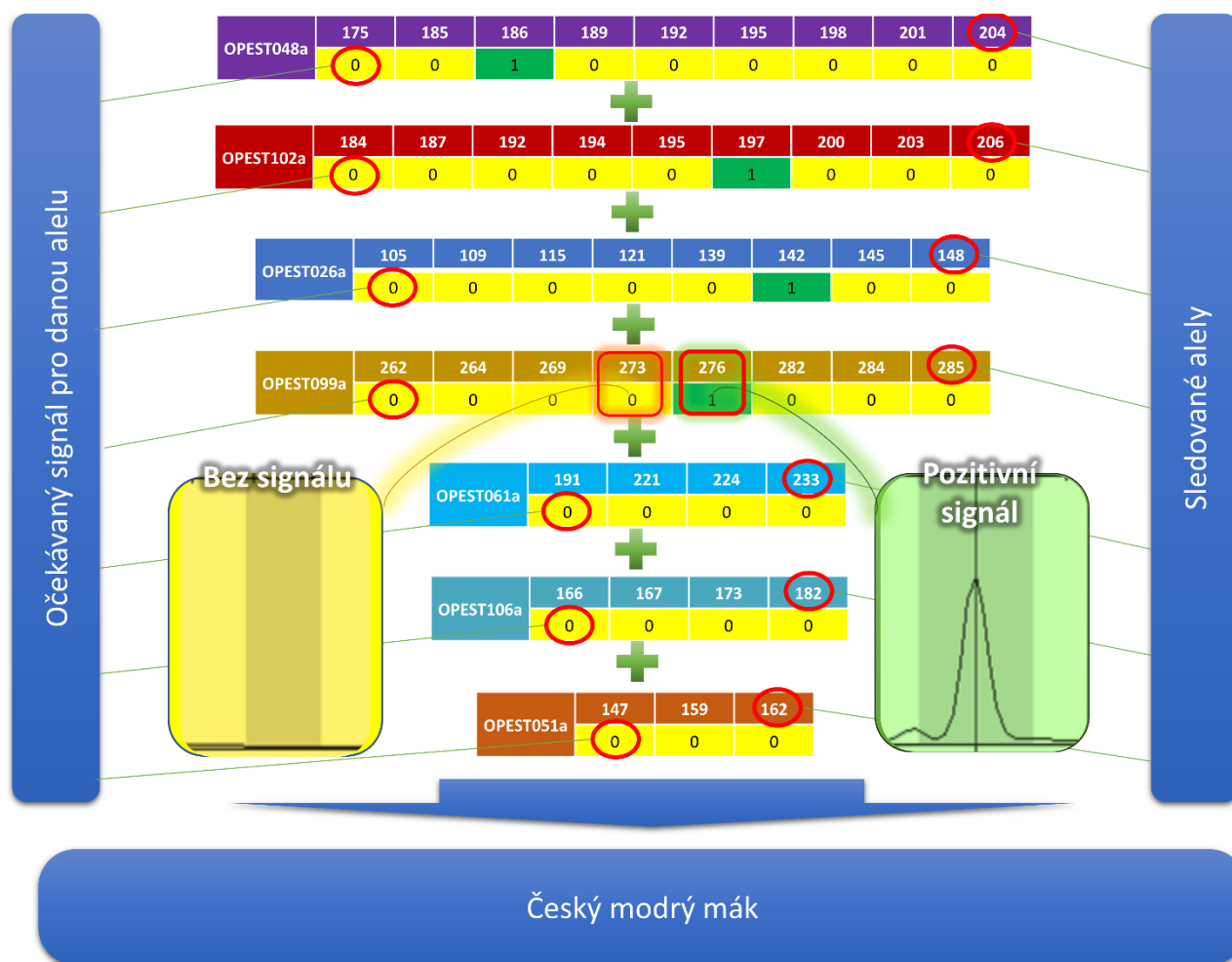
## 8 Přílohy:

**Příloha 1** - Příklad analýz českých a zahraničních odrůd máku setého pomocí doporučených SSR markerů. Aktualizované tabulky včetně SSR profilů, aktuálně zařazovaných odrůd a doporučení budou k datu ukončení řešení projektu umístěny na stránky referenční laboratoře VÚRV, v.v.vi.

| Název odrůdy | Zbarvení semen | Původ | SSR lokusy    |              |               |              |               |              |               |              |              |              |
|--------------|----------------|-------|---------------|--------------|---------------|--------------|---------------|--------------|---------------|--------------|--------------|--------------|
|              |                |       | OPEST048c_186 | OPEST099_276 | OPEST102b_197 | OPEST026_142 | OPEST051c_153 | OPEST026_145 | OPEST048c_189 | OPEST099_285 | OPEST106_182 | OPEST061_233 |
| OPAL*        | modré          | SVK   | 1             | 1            | 1             | 1            | 1             | 0            | 0             | 0            | 0            | 0            |
| BERGAM*      | modré          | SVK   | 1             | 1            | 1             | 1            | 1             | 0            | 0             | 0            | 0            | 0            |
| ORBIS*       | modré          | CZE   | 1             | 1            | 1             | 1            | 1             | 0            | 0             | 0            | 0            | 0            |
| OPEX*        | modré          | CZE   | 1             | 1            | 1             | 1            | 1             | 0            | 0             | 0            | 0            | 0            |
| ONYX*        | modré          | CZE   | 1             | 1            | 1             | 1            | 1             | 0            | 0             | 0            | 0            | 0            |
| APLAUS*      | modré          | CZE   | 1             | 1            | 1             | 1            | 1             | 0            | 0             | 0            | 0            | 0            |
| GERLACH*     | modré          | CS    | 1             | 1            | 1             | 1            | 1             | 0            | 0             | 0            | 0            | 0            |
| MARATON*     | modré          | SVK   | 1             | 1            | 1             | 1            | 1             | 0            | 0             | 0            | 0            | 0            |
| ORFEUS*      | modré          | CZE   | 1             | 1            | 1             | 1            | 1             | 0            | 0             | 0            | 0            | 0            |
| MAJOR*       | modré          | SVK   | 1             | 1            | 1             | 1            | 0             | 0            | 0             | 0            | 0            | 0            |
| KÉK DUNA     | modré          | HUN   | 1             | 1            | 1             | 1            | 1             | 0            | 0             | 0            | 1            | 1            |
| ROSEMARIE    | modré          | NL    | 1             | 1            | 1             | 0            | 1             | 0            | 0             | 0            | 1            | 0            |
| MARIANNE     | šedé           | NL    | 1             | 1            | 1             | 0            | 1             | 1            | 0             | 0            | 1            | 0            |
| LAZUR        | modré          | PL    | 1             | 1            | 1             | 0            | 1             | 1            | 0             | 1            | 0            | 0            |
| MALSAR       | šedé           | SVK   | 1             | 1            | 1             | 0            | 0             | 0            | 0             | 0            | 0            | 1            |
| ALBÍN        | bílé           | CZE   | 0             | 1            | 1             | 1            | 0             | 0            | 0             | 0            | 0            | 0            |
| TATRANSKÝ    | bílé           | SVK   | 1             | 0            | 1             | 1            | 0             | 0            | 0             | 1            | 0            | 0            |
| AKVAREL      | bílé           | CZE   | 0             | 0            | 1             | 1            | 1             | 1            | 1             | 1            | 0            | 0            |
| FLORIAN      | šedé           | AUT   | 1             | 0            | 0             | 0            | 1             | 0            | 0             | 1            | 0            | 0            |
| REDY         | hnědé          | CZE   | 0             | 0            | 1             | 0            | 1             | 0            | 1             | 1            | 0            | 0            |
| ZENO         | modré          | AUT   | 1             | 1            | 0             | 0            | 0             | 0            | 0             | 0            | 0            | 0            |
| SOKOL        | bílé           | CZE   | 0             | 0            | 0             | 0            | 1             | 1            | 1             | 1            | 0            | 0            |
| POSTOMI      | modré          | HUN   | 0             | 0            | 1             | 0            | 0             | 0            | 0             | 0            | 0            | 0            |
| KOSMOSZ      | šedé           | AUT   | 1             | 0            | 0             | 0            | 0             | 0            | 0             | 1            | 0            | 0            |
| AMETISZT     | modré          | HUN   | 0             | 1            | 0             | 0            | 0             | 0            | 0             | 0            | 0            | 0            |
| BUDDHA       | modré          | HUN   | 0             | 0            | 1             | 0            | 0             | 0            | 0             | 1            | 0            | 0            |
| KORNEUBURGER | bílé           | AUT   | 0             | 0            | 1             | 0            | 0             | 0            | 0             | 1            | 0            | 0            |
| RACEK        | bílé           | CZE   | 0             | 0            | 0             | 0            | 1             | 1            | 1             | 0            | 0            | 0            |
| OREL         | bílé           | CZE   | 0             | 0            | 0             | 0            | 1             | 1            | 1             | 1            | 0            | 0            |

\*Odrůdy splňující parametry české cechovní normy pro označení český modrý mák

**Příloha 2** – postup pro odlišení odrůd českého modrého máku od ostatních odrůd na základě použitých markerů



|        |                                   |      |
|--------|-----------------------------------|------|
| Autoři | Doc. RNDr. Jaroslava Ovesná, CSc. | 20 % |
|        | Ing. Jakub Vašek, Ph.D.           | 40 % |
|        | Ing. Pavel Svoboda, Ph.D.         | 30 % |
|        | Doc. Dr. Ing. Pavel Vejl          | 10 % |

**Název: Metodika identifikace odrůd máků (*Papaver somniferum* L.) splňujících parametry cechovní normy „Český modrý mák“ pomocí mikrosatelitních markerů**

Vydavatel: Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.  
Drnovská 507, 161 06 Praha 6 – Ruzyně

Tisk: PowerPrint Praha

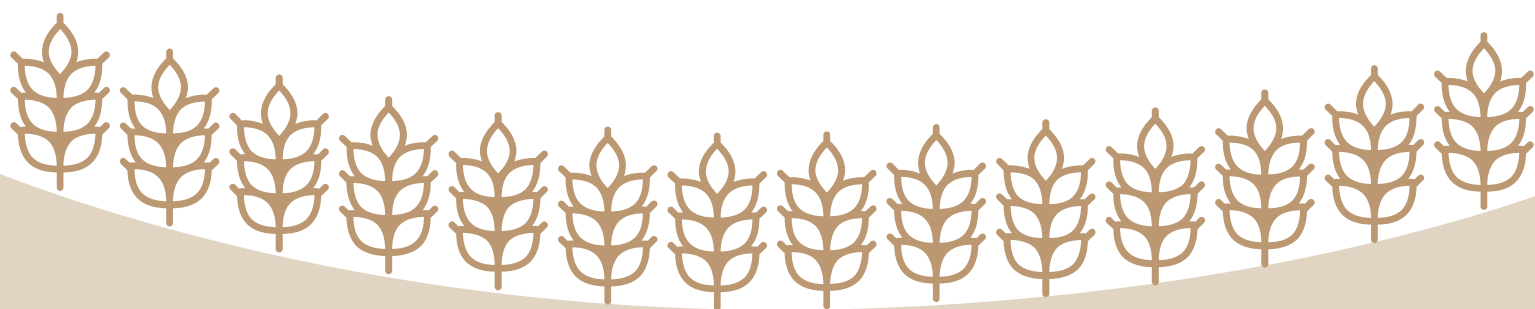
Vydáno v roce: 2020

Kontakt na autory: [ovesna@vurv.cz](mailto:ovesna@vurv.cz)  
[vasek@af.czu.cz](mailto:vasek@af.czu.cz)  
[pavel.svoboda@vurv.cz](mailto:pavel.svoboda@vurv.cz)  
[vejl@af.czu.cz](mailto:vejl@af.czu.cz)

© Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Praha, 2020

ISBN 978-80-7427-318-6





**VÚRV**  
Výzkumný ústav  
rostlinné výroby

Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.,  
Drnovská 507/73, 161 06 Praha 6 - Ruzyně

ISBN: 978-80-7427-318-6