

*C12Q 1/6895* (2018.01)

*C12Q 1/6858* (2018.01)

*C12N 15/11* (2006.01)

(19)  
ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2019-473**  
 (22) Přihlášeno: **19.07.2019**  
 (40) Zveřejněno: **27.01.2021**  
**(Věstník č. 4/2021)**  
 (47) Uděleno: **22.02.2023**  
 (24) Oznámení o udělení ve věstníku: **05.04.2023**  
**(Věstník č. 14/2023)**

(56) Relevantní dokumenty:

GenBank: ASM211411v1, *Malus domestica* cultivar Golden Delicious, Daccord, N., et al: High-quality de novo assembly of the apple genome and methylome dynamics of early fruit development, Nat. Genet. 49 (7), 1099-1106 (2017), ISSN: 1061-4036. E-ISSN: 1546-1718; GenBank: CM007867.1, *Malus domestica* cultivar Golden Delicious isolate X9273 #13 chromosome 1, whole genome shotgun sequence, 3.5.2017, identical to NC\_041789.  
 KR 20150117326.

(73) Majitel patentů:

VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV  
 OVOCNÁŘSKÝ HOLOVOUSY s.r.o., Holovousy,  
 CZ

(72) Původce:

RNDr. Jana Čmejlová, Ph.D., Vitiněves, CZ  
 RNDr. Radek Čmejla, Ph.D., Vitiněves, CZ

(54) Název vynálezu:

**Sada pro stanovení genotypu jabloně  
 domácí (*Malus x domestica* Borkh.)**

(57) Anotace:

Sada primerů pro stanovení genotypu jabloně *Malus x domestica* Borkh v jediné reakci metodou fragmentační analýzy, která obsahuje primery, jejichž sekvence jsou uvedeny na obr. 1.

SEQ ID NO. 1: TCTACAACAAAATACCCAAATACACC  
 SEQ ID NO. 2: CTATGGATCCCGATGAAAGG  
 SEQ ID NO. 3: AGTTTCGTAAGAGAACCTTGATCTC  
 SEQ ID NO. 4: ATCCACTACTAAGAACCTACCGTTC  
 SEQ ID NO. 5: TTCTTCTATGAAACGGTGATAAAGC  
 SEQ ID NO. 6: GAAATGAGGGCTTCCTGGAG  
 SEQ ID NO. 7: ATCCCTGGCGAGAAAAGC  
 SEQ ID NO. 8: CTGGTATGGTCTCGGAGCAG  
 SEQ ID NO. 9: TAGATCCGGTCACTCCCACT  
 SEQ ID NO. 10: AACACCCCAATCAACAGAAAGA  
 SEQ ID NO. 11: TTGTAATGTAATTCAAATCAATGC  
 SEQ ID NO. 12: TTGAGAAAATGGGGCTCTC  
 SEQ ID NO. 13: GAGAAGGCTAACAGAAAATGTTG  
 SEQ ID NO. 14: GCCTTTGTAAJCAATGGCTCC  
 SEQ ID NO. 15: GCAAAGATGGTATGATATAGCCA  
 SEQ ID NO. 16: AAGGAGGGATGTTGTGCA  
 SEQ ID NO. 17: AAAACCTTAGCCCAACGGGAG  
 SEQ ID NO. 18: ACTTCCATCGGGCTCCAC  
 SEQ ID NO. 19: CTGAGGATATATTTGTTCTCCG  
 SEQ ID NO. 20: GAACACATTTATAGAAAAGGAGC  
 SEQ ID NO. 21: GCTTCCAAAATGGCGTAC  
 SEQ ID NO. 22: ATATTGACATTTGTCATGAGAGC  
 SEQ ID NO. 23: GAGAAGAACAACAAGAGAGAGC  
 SEQ ID NO. 24: GAATATAGGATGCGACGATGG  
 SEQ ID NO. 25: CAGTGTACCCGCAAAATATC  
 SEQ ID NO. 26: GATCGGAAGGGGAAAGACTC  
 SEQ ID NO. 27: AGGAGGCTGGTATCTTGTG  
 SEQ ID NO. 28: CCTCATGCTCCACTAAC  
 SEQ ID NO. 29: CAACCTTGTCAACCTTCATTTGAA  
 SEQ ID NO. 30: AGGATGACCTTGAGATTTGATGC  
 SEQ ID NO. 31: TTGAACTTGACCGCAACACCA  
 SEQ ID NO. 32: AATGAGTAAGGATAGTCAAGG  
 SEQ ID NO. 33: GAAGACATTCAGTGGAGG  
 SEQ ID NO. 34: TTATGAGTGGGTTGAGAAGG

## Sada pro stanovení genotypu jabloně domácí (*Malus x domestica* Borkh.)

### Oblast techniky

5

Řešení se týká sady primerů pro stanovení genotypu jabloně domácí (*Malus x domestica* Borkh.) v jediné reakci metodou fragmentační analýzy a způsobů jejího použití pro odlišení jednotlivých genetických variant jabloní.

10

### Dosavadní stav techniky

Jabloň domácí (*Malus x domestica* Borkh.) je velmi důležitou zemědělskou komoditou, která patří mezi 20 nejproduktivnějších plodin na světě měřeno výnosem v tunách. Je pěstována převážně v oblastech mírného pásu na severní i jižní polokouli. Největším světovým pěstitelem je Čína, největším exportérem pak Polsko. Na konci minulého století bylo na světě popsáno více než 10 000 různých odrůd (Janick J, 1996) a nové neustále přibývají z důvodu snahy vylepšit současné odrůdy, ať už z hlediska zvyšování rezistence k nejčastějším jablečným patogenům, nebo z hlediska zlepšování jakosti plodů a ekonomiky jejich pěstování a skladování.

20

Jabloň domácí patří mezi cizosprašné rostliny, po opylení tedy vzniká hybridní genetický materiál nesoucí DNA pocházející od obou rodičů. Oproti tomu jsou odrůdy jabloní udržovány a množeny vegetativně roubováním, popřípadě očkováním na vhodné podnože, takže genetická informace je při tomto způsobu množení odrůd zachovávána beze změny a odpovídá původnímu zdrojovému organismu. Jednotlivé odrůdy lze tak jednoznačně charakterizovat na úrovni DNA tzv. genotypizací. Znalost příslušných genotypů je pak možné využít např. pro ověřování pravosti odrůd jabloní, sledování segregace v potomstvu, stanovení rodičovské příbuznosti, fylogenetické studie aj.

30

Genom jabloně domácí byl poprvé publikován v roce 2010 (Velasco R, 2010) a poté byl resekvenován na dvojitěm haploidu v roce 2017 (Daccord N, 2017), kdy došlo ke zpřesnění jeho sekvence a celkové délky (přibližně 650 Mbp). Díky těmto pracím bylo zjištěno, že genom jabloně je značně složitý, a to z důvodu poměrně nedávné částečné duplikace genomu, kdy z původních 9 chromozómů vzniklo nyní 17 chromozómů základní sady. V dřívějších dobách navíc došlo k rozsahově menším duplikacím některých částí genomu. Z tohoto důvodu se velké úseky sekvencí vyskytují na různých místech genomu, což velmi komplikuje molekulárně genetickou analýzu genomu jabloně. Další komplikací může být nestejný počet sad chromozómů vyskytující se u různých odrůd. Většina odrůd jabloně je diploidních, přibližně 10 % však tvoří triploidní odrůdy, vzácně se vyskytují dokonce i tetraploidní odrůdy (Janick J, 1996).

40

Pro charakterizaci jednotlivých odrůd nebo hybridů lze s výhodou využít genotypování pomocí SSR markerů (simple sequence repeats), kdy se využívá délkového polymorfismu jednotlivých alel, který lze jednoduše detekovat metodou fragmentační analýzy (obecné pojednání o SSR markerech a jejich použití pro genotypizaci u rostlin lze nalézt např. ve Vieira ML, 2016). Metoda fragmentační analýzy sestává z kroků: 1) izolace DNA testovaného organismu; 2) specifická PCR pro jednotlivé SSR markery a 3) stanovení délky příslušných ampliconů, nejčastěji a nejpřesněji pomocí kapilární elektroforézy.

45

Pro jabloně byla nalezena řada SSR markerů vhodných pro genotypizaci, popřípadě jiné účely, ale z důvodu srovnatelnosti výsledků mezi jednotlivými pracovišti je vhodné používat standardizovanou sadu. První sada využívala 12 SSR markerů amplifikovaných ve třech multiplexech, kdy byly v každém multiplexu analyzovány 4 SSR markery, avšak při použití těchto 12 SSR markerů byla při analýze 2162 odrůd jabloní pěstovaných v East Malling Research (Velká Británie) identifikována řada odrůd se shodným genotypem. Část z nich tvořily známé klony a shoda genotypů u nich byla očekávána, u dalších se mohlo jednat o neznámé/nezádoucí duplicity

55

- v genofondu, ale též o náhodnou shodu v daných SSR markerech bez ohledu na příbuznost. Autoři proto doporučili pečlivé fenotypické porovnání a dodatečnou analýzu dalších SSR markerů pro odlišení těchto odrůd (Fingerprinting the National Apple & Pear Collections, Research Project Final Report, 2010; Fernandez F, 2013). I přes nedostatky uvedené výše byla sada těchto 12 SSR markerů a postup jejich identifikace schváleny Evropským kooperativním programem pro rostlinné genetické zdroje (ECPGR; [www.ecpgr.cgiar.org/working-groups/maluspyrus](http://www.ecpgr.cgiar.org/working-groups/maluspyrus)) jako standardizovaný protokol pro identifikaci jabloní pro srovnatelnost výsledků mezi jednotlivými pracovišti.
- V další studii proběhlé na jabloních byla pro snížení pravděpodobnosti náhodné shody mezi odlišnými odrůdami tato sada rozšířena na 16 SSR markerů (Urrestarazu J, 2016), takže došlo k řádovému snížení možnosti genetické shody mezi odlišnými vzorky. Nevýhody této sady jsou však následující: 1) Sada 16 SSR markerů byla analyzována ve čtyřech multiplexech, kdy byly v každém multiplexu analyzovány 4 SSR markery. Pro charakterizaci jednoho vzorku je tak nutné provést čtyři nezávislé analýzy, což analýzu značně prodražuje, zvyšuje se časová náročnost i pracnost celého postupu i pravděpodobnost vzniku chyby. 2) V sadě 16 SSR markerů jsou dva (Hi02c07; CH-Vf1), které se nacházejí na stejném chromozomu 1. Pro vyloučení vlivu vazby mezi jednotlivými markery je však vhodnější, aby každý marker pocházel z jiného chromozomu. 3) Sada 16 SSR markerů tak pokrývá pouze 15 chromozomů z celkových 17. Pro další snížení pravděpodobnosti náhodné shody mezi odlišnými vzorky by proto bylo výhodné použít sadu 17 SSR markerů, z nichž každý pochází z jiného chromozomu, a pro omezení nákladů, pracnosti a možnosti vzniku chyb by bylo výhodné provádět analýzu všech 17 SSR markerů v jediné reakci.

#### 25 Podstata vynálezu

Nedostatky dle současného stavu techniky – nevyužívání markerů, které by ležely každý na jiném chromozomu – odstraňuje sada primerů pro stanovení genotypu jabloně domácí (*Malus x domestica* Borkh.) v jediné reakci metodou fragmentační analýzy podle technického řešení, jehož podstata spočívá v tom, že byl vypuštěn druhý marker z chromozomu 1 (CH-Vf1) a nově byly zařazeny markery NZ01a6 pro chromozom 4 a CH05e04 pro chromozom 16; ostatní markery doporučené ECPGR byly zachovány pro zajištění zpětné kompatibility výsledků.

Nedostatky dle současného stavu techniky – zejména nezbytnost provádět čtyři nezávislé analýzy pro charakterizaci každého vzorku a s tím související finanční a časová náročnost, pracnost a potenciálně vyšší chybovost – odstraňuje sada primerů pro stanovení genotypu jabloně (*Malus x domestica* Borkh.) v jediné reakci metodou fragmentační analýzy podle technického řešení, jehož podstata spočívá v tom, že obsahuje primery, jejichž sekvence jsou:

- 40 SEQ ID NO. 1: TCTACAACAAAATACCCAATACACC  
 SEQ ID NO. 2: CTAAGCATCCCGATTGAAAGG  
 SEQ ID NO. 3: AGTTTCGTAAGAGAACCTTGATCTC  
 SEQ ID NO. 4: ATCCACTTACTAAGAACTACCGTTG  
 SEQ ID NO. 5: TTCTTCTATGAACGGTGATAAAGC  
 45 SEQ ID NO. 6: GAATGTGAGGCGTTCCTGAG  
 SEQ ID NO. 7: ATTCCCTGGCGAGAAAAGC  
 SEQ ID NO. 8: CTTGGTAGGTGTCGGAGCAG  
 SEQ ID NO. 9: TAGATCCGGTCACTCTCCACT  
 SEQ ID NO. 10: AACACCCCATCAATCAGAAAGA  
 50 SEQ ID NO. 11: TGTGAAATGTAATTCAAATCAATGC  
 SEQ ID NO. 12: TTGAGAAAATGGGGCTTCTG  
 SEQ ID NO. 13: GAGAAGGCTAACAGAAATGTGG  
 SEQ ID NO. 14: GCCTTTGTAATCATGGCTCC  
 SEQ ID NO. 15: GCAAAGATAGGTAGATATATGCCA  
 55 SEQ ID NO. 16: AAGGAGGGATTGTTTGTGCA

- SEQ ID NO. 17: AAAACCCTAGCCCCACGGAG  
 SEQ ID NO. 18: ACTCTCCATCGGGCTCCAC  
 SEQ ID NO. 19: CTGAGGTATTATTTTGTCTGCG  
 SEQ ID NO. 20: GAAACACATTTATAGAAAAAGGAGC  
 5 SEQ ID NO. 21: GCTCTTCCAAAATGGCGTAC  
 SEQ ID NO. 22: ATATTTGACATTGGTCATGAGACG  
 SEQ ID NO. 23: GAGAAGAACAACAACAGAGAACG  
 SEQ ID NO. 24: GAAATAGGGTAGCAGCAGATGG  
 SEQ ID NO. 25: CAGTGTTACCCGCCAAATATC  
 10 SEQ ID NO. 26: GATCGGAAGGCGAAAGACTC  
 SEQ ID NO. 27: AGGAAGGCTGGTTATCTTGTG  
 SEQ ID NO. 28: CCCTCATGCCCTCCACTAAC  
 SEQ ID NO. 29: CAACTTTGCTAACCTCTCATTGAA  
 SEQ ID NO. 30: AGGATGACCTTGAGATTGATGC  
 15 SEQ ID NO. 31: TTGAACTTCGACCGCAACACCA  
 SEQ ID NO. 32: ACATGGWTAAGGCATAGTCAGG  
 SEQ ID NO. 33: GAAAGACTTGCAGTGGGAGC  
 SEQ ID NO. 34: TTAGGAGTGGGTTTGAGAAGG,
- 20 přičemž pro PCR amplifikaci markeru Hi02c07 obsahuje sada primery, z nichž jeden je vhodně fluorescenčně označen pro současnou detekci všech markerů v průběhu fragmentační analýzy, a jejichž sekvence jsou:
- SEQ ID NO. 1: TCTACAACAAAATACCCAATACACC  
 25 SEQ ID NO. 2: CTAAGCATCCCGATTGAAAGG,
- přičemž pro PCR amplifikaci markeru CH02c06 obsahuje sada primery, z nichž jeden je vhodně fluorescenčně označen pro současnou detekci všech markerů v průběhu fragmentační analýzy, a jejichž sekvence jsou:
- 30 SEQ ID NO. 3: AGTTTCGTAAGAGAACCTTGATCTC  
 SEQ ID NO. 4: ATCCACTTACTAAGAAGTACCGTTG,
- přičemž pro PCR amplifikaci markeru GD12 obsahuje sada primery, z nichž jeden je vhodně fluorescenčně označen pro současnou detekci všech markerů v průběhu fragmentační analýzy, a jejichž sekvence jsou:
- 35 SEQ ID NO. 5: TTCTTCTATGAACGGTGATAAAGC  
 SEQ ID NO. 6: GAATGTGAGGCGTTCCTGAG,
- 40 přičemž pro PCR amplifikaci markeru NZ01a6 obsahuje sada primery, z nichž jeden je vhodně fluorescenčně označen pro současnou detekci všech markerů v průběhu fragmentační analýzy, a jejichž sekvence jsou:
- 45 SEQ ID NO. 7: ATTCCCTGGCGAGAAAAGC  
 SEQ ID NO. 8: CTTGGTAGGTGTCCGAGCAG,
- přičemž pro PCR amplifikaci markeru CH05f06 obsahuje sada primery, z nichž jeden je vhodně fluorescenčně označen pro současnou detekci všech markerů v průběhu fragmentační analýzy, a jejichž sekvence jsou:
- 50 SEQ ID NO. 9: TAGATCCGGTCACTCTCCACT  
 SEQ ID NO. 10: AACACCCCATCAATCAGAAAAGA,

příčemž pro PCR amplifikaci markeru CH03d07 obsahuje sada primery, z nichž jeden je vhodně fluorescenčně označen pro současnou detekci všech markerů v průběhu fragmentační analýzy, a jejichž sekvence jsou:

- 5 SEQ ID NO. 11: TGTGAAATGTAATTCAAATCAATGC  
SEQ ID NO. 12: TTGAGAAAATGGGGCTTCTG,

příčemž pro PCR amplifikaci markeru CH04e05 obsahuje sada primery, z nichž jeden je vhodně fluorescenčně označen pro současnou detekci všech markerů v průběhu fragmentační analýzy, a jejichž sekvence jsou:

- 10 SEQ ID NO. 13: GAGAAGGCTAACAGAAATGTGG  
SEQ ID NO. 14: GCCTTTGTAATCATGGCTCC,

15 příčemž pro PCR amplifikaci markeru CH01h10 obsahuje sada primery, z nichž jeden je vhodně fluorescenčně označen pro současnou detekci všech markerů v průběhu fragmentační analýzy, a jejichž sekvence jsou:

- 20 SEQ ID NO. 15: GCAAAGATAGGTAGATATATGCCA  
SEQ ID NO. 16: AAGGAGGGATTGTTTGTGCA,

příčemž pro PCR amplifikaci markeru CH01f03b obsahuje sada primery, z nichž jeden je vhodně fluorescenčně označen pro současnou detekci všech markerů v průběhu fragmentační analýzy, a jejichž sekvence jsou:

- 25 SEQ ID NO. 17: AAAACCCTAGCCCCACGGAG  
SEQ ID NO. 18: ACTCTCCATCGGGCTCCAC,

příčemž pro PCR amplifikaci markeru CH02c11 obsahuje sada primery, z nichž jeden je vhodně fluorescenčně označen pro současnou detekci všech markerů v průběhu fragmentační analýzy, a jejichž sekvence jsou:

- 30 SEQ ID NO. 19: CTGAGGTATTATTTTGTCTGCG  
SEQ ID NO. 20: GAAACACATTTATAGAAAAAGGAGC,

35 příčemž pro PCR amplifikaci markeru CH02d08 obsahuje sada primery, z nichž jeden je vhodně fluorescenčně označen pro současnou detekci všech markerů v průběhu fragmentační analýzy, a jejichž sekvence jsou:

- 40 SEQ ID NO. 21: GCTCTTCCAAAATGGCGTAC  
SEQ ID NO. 22: ATATTTGACATTGGTCATGAGACG,

příčemž pro PCR amplifikaci markeru CH01f02 obsahuje sada primery, z nichž jeden je vhodně fluorescenčně označen pro současnou detekci všech markerů v průběhu fragmentační analýzy, a jejichž sekvence jsou:

- 45 SEQ ID NO. 23: GAGAAGAACAACAACAGAGAACG  
SEQ ID NO. 24: GAAATAGGGTAGCAGCAGATGG,

50 příčemž pro PCR amplifikaci markeru GD147 obsahuje sada primery, z nichž jeden je vhodně fluorescenčně označen pro současnou detekci všech markerů v průběhu fragmentační analýzy, a jejichž sekvence jsou:

- 55 SEQ ID NO. 25: CAGTGTTACCCGCCAAATATC  
SEQ ID NO. 26: GATCGGAAGGCGAAAGACTC,

příčemž pro PCR amplifikaci markeru CH04c07 obsahuje sada primery, z nichž jeden je vhodně fluorescenčně označen pro současnou detekci všech markerů v průběhu fragmentační analýzy, a jejichž sekvence jsou:

5

SEQ ID NO. 27: AGGAAGGCTGGTTATCTTGTG  
SEQ ID NO. 28: CCCTCATGCCCTCCACTAAC,

příčemž pro PCR amplifikaci markeru CH02c09 obsahuje sada primery, z nichž jeden je vhodně fluorescenčně označen pro současnou detekci všech markerů v průběhu fragmentační analýzy, a jejichž sekvence jsou:

10

SEQ ID NO. 29: CAACTTTGCTAACCTCTCATTGAA  
SEQ ID NO. 30: AGGATGACCTTGAGATTGATGC,

15

příčemž pro PCR amplifikaci markeru CH05e04 obsahuje sada primery, z nichž jeden je vhodně fluorescenčně označen pro současnou detekci všech markerů v průběhu fragmentační analýzy, a jejichž sekvence jsou:

20

SEQ ID NO. 31: TTGAACTTCGACCGCAACACCA  
SEQ ID NO. 32: ACATGGWTAAGGCATAGTCAGG,

příčemž pro PCR amplifikaci markeru CH01h01 obsahuje sada primery, z nichž jeden je vhodně fluorescenčně označen pro současnou detekci všech markerů v průběhu fragmentační analýzy, a jejichž sekvence jsou:

25

SEQ ID NO. 33: GAAAGACTTGCAGTGGGAGC  
SEQ ID NO. 34: TTTAGGAGTGGTTTGAGAAGG.

Výše uvedené primery SEQ ID NO. 9, SEQ ID NO. 15 a SEQ ID NO. 33 vykazují homologii vyšší než 90 % k primerům z Liebhard R, 2002. V tomto dokumentu však autoři neuvažovali použít primery k vytvoření systému pro současnou detekci všech markerů v jediné reakci; výše uvedené primery pro amplifikaci příslušných SSR markerů byly navíc použity v kombinaci s jinými párovými primery než v citovaném dokumentu; a míra shody výše citovaných primerů s primery dle tohoto vynálezu je koincidence, neboť ve všech případech je příslušná genomická oblast výhodná pro návrh primerů pro amplifikaci příslušného markeru.

35

Výše uvedené kombinace primerů pro amplifikaci jednotlivých SSR markerů jsou vhodné pro současnou nebo individuální analýzu výše uvedených markerů u jabloně domácí (*Malus x domestica* Borkh.) metodou fragmentační analýzy. Ve výhodném provedení technického řešení jsou PCR amplikony příslušných SSR markerů detekovány pomocí kapilární elektroforézy s tím, že každý amplikon je fluorescenčně označen. Fluorescenční označení amplikonů je zajištěno použitím fluorescenčně značeného primeru v PCR reakci tak, aby bylo možné amplikon identifikovat. V ještě výhodnějším provedení technického řešení jsou amplikony označeny pomocí odlišných fluoroforů pro jednotlivé SSR markery v takové kombinaci, která umožňuje současnou detekci a jednoznačnou identifikaci všech 17 SSR markerů v jedné reakci.

40

45

Návrh sady primerů podle technického řešení pro stanovení genotypu jabloně domácí (*Malus x domestica* Borkh.) byl proveden v několika krocích: 1) analýza sekvencí použitých SSR markerů, zejména s ohledem na výše uvedené duplikace genomu jabloně; 2) optimalizace kombinace délek amplikonů a fluorescenčního značení fragmentů, která by umožňovala současnou detekci všech 17 SSR markerů v jedné reakci; 3) návrh primerů pro detekci jednotlivých SSR markerů; 4) optimalizace PCR podmínek.

50



Prvním krokem pro stanovení genotypu jabloně domácí (*Malus x domestica* Borkh.) je izolace genomové DNA, následuje PCR s využitím sady primerů pro specifickou amplifikaci výše uvedených SSR markerů a stanovení délky ampliconů pomocí fragmentační analýzy využívající kapilární elektroforézu. Finálním krokem je vyhodnocení přítomnosti jednotlivých alel pro každý SSR marker.

Příklady provedení vynálezu jsou zde uvedeny pouze pro ilustraci a žádným způsobem neomezují rozsah této přihlášky, která je vymezena připojeným nárokem a podrobně popsána v popisu vynálezu. Odborník v oboru bude schopen učinit různé modifikace použitého způsobu PCR, uvedených primerů a fluorescenčního označení primerů tak, aby nedošlo ke snížení specifity PCR detekce jednotlivých SSR markerů. Odborník v oboru bude schopen též snížit počet současně detekovaných SSR markerů v jedné reakci, případně vytvořit nové kombinace detekovaných SSR markerů pomocí uvedených primerů v jedné reakci.

15

#### Příklady uskutečnění vynálezu

##### Příklad 1: Návrh sekvencí primerů

Do kolekce SSR markerů byly přidány markery pro chromozom 4 (NZ01a6; Guilford P, 1997) a chromozom 16 (CH05e04; Liebhard R, 2002), neboť jsou velmi polymorfni, a tak vhodné pro účely genotypování.

Pro detekci všech 17 SSR markerů v jedné reakci byly navrženy nové primery pro PCR amplifikaci jednotlivých SSR markerů tak, aby celý systém fungoval ve své komplexnosti a amplifikované fragmenty měly správnou délku umožňující jejich jednoznačnou identifikaci pomocí fragmentační analýzy.

Sekvence jednotlivých SSR markerů a jejich okolí byly získány z referenčního genomu jabloně domácí *Malus x domestica* Borkh., odrůda Golden Delicious, Annotation Version 102; Genome Reference Number: ASM211411v1.

Na základě homologií k dalším chromozomálním oblastem jabloně byly jednotlivé SSR markery rozděleny do zamýšlených velikostních pásem amplifikovaných produktů v kombinaci s příslušnými fluorofory tak, aby bylo možné provést specifickou amplifikaci a detekci všech 17 SSR markerů v jedné reakci.

Primery byly navrženy pomocí programu Vector NTI Advance. Při navrhování primerů pro multiplexovou PCR analýzu byly zohledněny následující požadavky: 1) vysoká specifita primerů eliminující necílené amplifikace z důvodu parciální duplikace genomu jabloně; 2) obdobná teplota tání všech primerů; 3) eliminace tvorby dimerů mezi jednotlivými primery.

Přehled sekvencí primerů, jejich nasedání na referenční sekvence a očekávané velikosti ampliconů pro jednotlivé SSR markery pro příslušné chromozomy ukazuje tabulka 1.

45

Tabulka 1. Souhrnné informace o použitých primerech

Chromozom	SSR marker	Velikostní pásmo (bp)	SEQ ID NO.	Referenční sekvence v GenBank (pozice)	Sekvence 5'-3' (dle IUPAC: W zastupuje A nebo T)
1	Hi02c07 <sup>a)</sup>	400-450	SEQ ID NO. 1	NC_041789.1 (17459006-17458982)	TCTACAACAAAATACCCAATAC ACC
			SEQ ID NO. 2	NC_041789.1 (17458607-17458627)	CTAAGCATCCCGATTGAAAGG
2	CH02c06 <sup>b)</sup>	400-450	SEQ ID NO. 3	NC_041790.1 (20117320-20117296)	AGTTTCGTAAGAGAACCCTTGAT CTC
			SEQ ID NO. 4	NC_041790.1 (20116893-20116917)	ATCCACTTACTAAGAACTACCG TTG
3	GD12 <sup>c)</sup>	300-350	SEQ ID NO. 5	NC_041791.1 (16692908-16692931)	TTCTTCTATGAACGGTGATAAA GC
			SEQ ID NO. 6	NC_041791.1 (16693215-16693196)	GAATGTGAGGCGTTCCTGAG
4	NZ01a6 <sup>d)</sup>	450-500	SEQ ID NO. 7	NC_041792.1 (29399658-29399640)	ATTCCCTGGCGAGAAAAGC
			SEQ ID NO. 8	NC_041792.1 (29399158-29399177)	CTTGGTAGGTGTCTGGAGCAG
5	CH05f06 <sup>b)</sup>	400-450	SEQ ID NO. 9	NC_041793.1 (22373048-22373028)	TAGATCCGGTCACTCTCCACT
			SEQ ID NO. 10	NC_041793.1 (22372640-22372661)	AACACCCCATCAATCAGAAAG A
6	CH03d0 <sup>7)</sup>	200-250	SEQ ID NO. 11	NC_041794.1 (8113628-8113604)	TGTGAAATGTAATTCAAATCAA TGC



Chromozom	SSR marker	Velikostní pásmo (bp)	SEQ ID NO.	Referenční sekvence v GenBank (pozice)	Sekvence 5'-3' (dle IUPAC: W zastupuje A nebo T)
7	CH04e05 <sup>b)</sup>	200-250	SEQ ID NO. 13	NC_041795.1 (17314831-17314902)	GAGAAGGCTAACAGAAATGTGG
			SEQ ID NO. 14	NC_041795.1 (17315070-17315051)	GCCTTTGTAATCATGGCTCC
8	CH01h10 <sup>b)</sup>	100-150	SEQ ID NO. 15	NC_041796.1 (27444006-27444029)	GCAAAGATAGGTAGATATATGCCA
			SEQ ID NO. 16	NC_041796.1 (27444098-27444079)	AAGGAGGGATTGTTTGTGCA
9	CH01f03b <sup>b)</sup>	100-150	SEQ ID NO. 17	NC_041797.1 (9725625-9725644)	AAAACCCTAGCCCCACGGAG
			SEQ ID NO. 18	NC_041797.1 (9725755-9725737)	ACTCTCCATCGGGCTCCAC
10	CH02c11 <sup>b)</sup>	400-450	SEQ ID NO. 19	NC_041796.1 (24261652-24261675)	CTGAGGTATTATTTGTTTCTGCG
			SEQ ID NO. 20	NC_041796.1 (24262091-24262067)	GAAACACATTTATAGAAAAGGAGC
11	CH02d08 <sup>b)</sup>	300-350	SEQ ID NO. 21	NC_041799.1 (9734418-9734437)	GCTCTTCCAAAATGGCGTAC
			SEQ ID NO. 22	NC_041799.1 (9734728-9734705)	ATATTTGACATTGGTCATGAGACG
12	CH01f02 <sup>b)</sup>	300-350	SEQ ID NO. 23	NC_041800.1 (23630441-23630416)	GAGAAGAACAACAACAGAGAACG
			SEQ ID NO. 24	NC_041800.1 (23630139-23630160)	GAAATAGGGTAGCAGCAGATGG
13	GD147 <sup>c)</sup>	300-350	SEQ ID NO. 25	NC_041801.1 (8149400-8149420)	CAGTGTTACCCGCCAAATATC
			SEQ ID NO. 26	NC_041801.1 (8149730-8149711)	GATCGGAAGGCGAAAGACTC
14	CH04c07 <sup>b)</sup>	200-250	SEQ ID NO. 27	NC_041802.1 (24205365-24205385)	AGGAAGGCTGGTTATCTTGTG
			SEQ ID NO. 28	NC_041802.1 (24205581-24205562)	CCCTCATGCCCTCCACTAAC
15	CH02c09 <sup>b)</sup>	200-250	SEQ ID NO. 29	NC_041803.1 (50159446-50159469)	CAACTTGTAACTCTCATTGAA
			SEQ ID NO. 30	NC_041803.1 (50159680-50159659)	AGGATGACCTTGAGATTGATGC
16	CH05e04 <sup>b)</sup>	100-150	SEQ ID NO. 31	NC_041804.1 (4351657-4351678)	TTGAACTTCGACCGCAACACCA
			SEQ ID NO. 32	Pro A: NC_041804.1 (4351789-4351768) Pro T: vlastní sekvence	ACATGGWTAAGGCATAGTCAGG
17	CH01h01 <sup>b)</sup>	100-150	SEQ ID NO. 33	NC_041805.1 (6601284-6601365)	GAAAGACTTGCAGTGGGAGC
			SEQ ID NO. 34	NC_041805.1 (6601260-6601281)	TTTAGGAGTGGGTTTGAGAAGG

SSR markery popsány v: a) Silverberg-Dilworth E, 2006; b) Liebhard R, 2002; c) Hokanson SC, 1998; d) Guilford P, 1997

Příklad 2: Stanovení genotypu jabloně domácí (*Malus x domestica* Borkh.)

- 5 Pro amplifikaci SSR markerů byla použita DNA izolovaná z listů jabloně domácí (*Malus x domestica* Borkh.) soupravou Exgene Plant SV (GeneAll) podle návodu výrobce. Připravená DNA byla použita jako templát pro PCR reakci s následujícími reakčními podmínkami: 2 µl DNA (10 ng/ml); 5 µl Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix (ThermoFisher Scientific), primery v koncentracích a fluorescenčně označené dle Tabulky 2, PCR voda do celkového objemu 10 µl.

10

Tabulka 2. Koncentrace a fluorescenční značení použitých primerů

Primer SEQ ID NO.	Fluorescenční značení	Výsledná koncentrace nM
SEQ ID NO. 1	-	625
SEQ ID NO. 2	PET	625
SEQ ID NO. 3	VIC	750
SEQ ID NO. 4	-	750
SEQ ID NO. 5	VIC	625
SEQ ID NO. 6	-	625
SEQ ID NO. 7	NED	250
SEQ ID NO. 8	-	250
SEQ ID NO. 9	NED	375
SEQ ID NO. 10	-	375
SEQ ID NO. 11	FAM	500
SEQ ID NO. 12	-	500
SEQ ID NO. 13	-	312,5
SEQ ID NO. 14	VIC	312,5
SEQ ID NO. 15	VIC	312,5
SEQ ID NO. 16	-	312,5
SEQ ID NO. 17	PET	87,5
SEQ ID NO. 18	-	87,5
SEQ ID NO. 19	FAM	750
SEQ ID NO. 20	-	750
SEQ ID NO. 21	FAM	250
SEQ ID NO. 22	-	250
SEQ ID NO. 23	NED	212,5
SEQ ID NO. 24	-	212,5
SEQ ID NO. 25	PET	312,5
SEQ ID NO. 26	-	312,5
SEQ ID NO. 27	PET	187,5
SEQ ID NO. 28	-	187,5
SEQ ID NO. 29	NED	250
SEQ ID NO. 30	-	250
SEQ ID NO. 31	FAM	187,5
SEQ ID NO. 32	-	187,5
SEQ ID NO. 33	NED	162,5
SEQ ID NO. 34	-	162,5

5

PCR amplifikace probíhala v PCR cyklieru C1000 (Biorad) s následujícím teplotním profilem: 98 °C/30 s; cyklování: 23x (98 °C/10 s, 58 °C/10 s, 72 °C/15 s); závěrečná extenze 72 °C/15 s.

10 Fragmentační analýza ampliconů byla provedena s využitím genetického analyzátoru AB3500 (ThermoFisher Scientific), vyhodnocení bylo provedeno pomocí GeneMapper® Software 5 (ThermoFisher Scientific).

Výsledkem je získání spektra alel pro každý SSR marker, které je unikátní pro danou genetickou variantu jabloně.

15

Příklad 3: Ověření shodnosti dvou odrůd jabloně domácí (*Malus x domestica* Borkh.)

Bylo provedeno porovnání dvou neznámých vzorků jabloně domácí (*Malus x domestica* Borkh.) s cílem zjistit, zda se jedná o stejnou odrůdu.

20

Z listů obou vzorků byla provedena izolace DNA soupravou Exgene Plant SV (GeneAll) podle návodu výrobce. Připravená DNA byla použita jako templát pro PCR reakci s následujícími

reakčními podmínkami: 2 µl DNA (10 ng/ml); 5 µl Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix (ThermoFisher Scientific), primery v koncentracích a fluorescenčně označené dle tabulky 2 v příkladu 2, PCR voda do celkového objemu 10 µl.

- 5 PCR amplifikace probíhala v PCR cyklu C1000 (Biorad) s následujícím teplotním profilem: 98 °C/30 s; cyklování: 23x (98 °C/10 s, 58 °C/10 s, 72 °C/15 s); závěrečná extenze 72 °C/15 s.

Fragmentační analýza ampliconů byla provedena s využitím genetického analyzátoru AB3500 (ThermoFisher Scientific), vyhodnocení bylo provedeno pomocí GeneMapper® Software 5  
10 (ThermoFisher Scientific).

Na základě porovnání spektra alel příslušných SSR markerů u obou vzorků jabloní bylo zjištěno, že oba vzorky vykazují stejné alely ve všech SSR markerech a jsou tedy geneticky shodné – oba vzorky jsou tedy stejná odrůda jabloně.

15

Příklad 4: Ověření identity odrůdy jabloně domácí (*Malus x domestica* Borkh.)

Bylo provedeno ověření identity neznámých vzorků jabloně domácí (*Malus x domestica* Borkh.), o kterých se majitel domníval, že se jedná o odrůdy „Fragrance“ a „Golden Delicious“.

20

Z listů obou vzorků byla provedena izolace DNA soupravou Exgene Plant SV (GeneAll) podle návodu výrobce. Přípravená DNA byla použita jako templát pro PCR reakci s následujícími reakčními podmínkami: 2 µl DNA (10 ng/ml); 5 µl Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix (ThermoFisher Scientific), primery v koncentracích a fluorescenčně označené dle tabulky 2  
25 v příkladu 2, PCR voda do celkového objemu 10 µl.

PCR amplifikace probíhala v PCR cyklu C1000 (Biorad) s následujícím teplotním profilem: 98 °C/30 s; cyklování: 23x (98 °C/10 s, 58 °C/10 s, 72 °C/15 s); závěrečná extenze 72 °C/15 s.

30 Fragmentační analýza ampliconů byla provedena s využitím genetického analyzátoru AB3500 (ThermoFisher Scientific), vyhodnocení bylo provedeno pomocí GeneMapper® Software 5 (ThermoFisher Scientific).

Na základě porovnání spektra alel příslušných SSR markerů s databází referenčních odrůd bylo zjištěno, že vzorek označený jako odrůda „Fragrance“ neodpovídá referenční odrůdě „Fragrance“ uchovávané v genofondech jabloní přihlašovatele; naopak vzorek označený jako „Golden Delicious“ vykazoval spektrum alel, které bylo identické s referenční odrůdou „Golden Delicious“.

35

Příklad 5: Určení neznámé odrůdy jabloně domácí (*Malus x domestica* Borkh.)

40

Bylo provedeno určení odrůdy u neznámého vzorku jabloně domácí (*Malus x domestica* Borkh.), u které nebyly známy další informace.

Z listů neznámého vzorku byla provedena izolace DNA soupravou Exgene Plant SV (GeneAll) podle návodu výrobce. Přípravená DNA byla použita jako templát pro PCR reakci s následujícími reakčními podmínkami: 2 µl DNA (10 ng/ml); 5 µl Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix (ThermoFisher Scientific), primery v koncentracích a fluorescenčně označené dle tabulky 2  
45 v příkladu 2, PCR voda do celkového objemu 10 µl.

50 PCR amplifikace probíhala v PCR cyklu C1000 (Biorad) s následujícím teplotním profilem: 98 °C/30 s; cyklování: 23x (98 °C/10 s, 58 °C/10 s, 72 °C/15 s); závěrečná extenze 72 °C/15 s.

Fragmentační analýza ampliconů byla provedena s využitím genetického analyzátoru AB3500 (ThermoFisher Scientific), vyhodnocení bylo provedeno pomocí GeneMapper® Software 5  
55 (ThermoFisher Scientific).

Na základě porovnání spektra alel příslušných SSR markerů s databází referenčních odrůd bylo zjištěno, že neznámý vzorek vykazoval spektrum alel, které bylo identické s referenční odrůdou „Boskoopské“.

5

#### Průmyslová využitelnost

Nově navržené primery byly optimalizovány pro stanovení genotypu jabloně domácí (*Malus x domestica* Borkh.) v jediné reakci metodou fragmentační analýzy s využitím 17 SSR markerů. Rozšířená sada SSR markerů a nová sada primerů oproti dosavadnímu stavu techniky zpřesňují, zrychlují a zlevňují genotypování jabloní, které je využitelné jak pro ověřování pravosti odrůd jabloní (např. ověřování školkařského materiálu, prověřování identity registrovaných odrůd jabloní, testování odrůdové pravosti prodávaných jablek), tak pro vědecké účely (např. cílené šlechtění).

15

#### Seznam použité literatury

Daccord N, Celton JM, Linsmith G, Becker C, Choisine N, Schijlen E, van de Geest H, Bianco L, Micheletti D, Velasco R, Di Pierro EA, Gouzy J, Rees DJG, Guérif P, Muranty H, Durel CE, Laurens F, Lespinasse Y, Gaillard S, Aubourg S, Quesneville H, Weigel D, van de Weg E, Troggio M, Bucher E. High-quality de novo assembly of the apple genome and methylome dynamics of early fruit development. *Nature Genetics* (2017) 49, 1099-1106.

25

Fingerprinting the National Apple & Pear Collections, Research Project Final Report, 2010, <http://sciencesearch.defra.gov.uk/Default.aspx?Menu=Menu&Module=More&Location=None&Completed=0&ProjectID=15150>.

Fernandez FF. Common set of ECPGR SSR markers for *Malus* characterization. In: Lateur M., Ordidge M., Engels J. and Lipman E. Report of a Working Group on *Malus/Pyrus*. Fourth Meeting, 7-9 March 2012, Weggis, Switzerland. Biodiversity International, Rome, Italy (2013) 26-27.

Guilford P, Prakash S, Zhu JM, Rikkerink E, Gardiner S, Bassett H, Forster R. Microsatellites in *Malus X domestica* (apple): abundance, polymorphism and cultivar identification. *Theoretical and Applied Genetics* (1997) 94(2), 249-254.

35

Hokanson SC, Szewc-McFadden AK, Lamboy WF, McFerson JR. Microsatellite (SSR) markers reveal genetic identities, genetic diversity and relationships in a *Malus x domestica* Borkh. core subset collection. *Theor Appl Genet.* (1998) 97, 671-83.

40

Janick J, Moore JN. Fruit breeding. Volume I: Tree and Tropical Fruits. New York: Wiley (1996).

Liebhard R, Gianfranceschi L, Koller B, Ryder CD, Tarchini R, van de Weg E, Gessler C. Development and characterisation of 140 new microsatellites in apple (*Malus x domestica* Borkh.). *Mol Breed.* (2002) 10(4):217-41.

45

Silfverberg-Dilworth E, Matasci CL, van de Weg WE, van Kaauwen MPW, Walser M, Kodde LP, Soglio V, Gianfranceschi L, Durel CE, Costa F, Yamamoto T, Koller B, Gessler C, Patocchi A. Microsatellite markers spanning the apple (*Malus x domestica* Borkh.) genome. *Tree Genet Genomes.* (2006) 2, 202-24.

50

Urrestarazu J, Denancé C, Ravon E, Guyader A, Guisnel R, Feugey L, Poncet C, Lateur M, Houben P, Ordidge M, Fernandez-Fernandez F, Evans KM, Paprstein F, Sedlak J, Nybom H, Garkava-Gustavsson L, Miranda C, Gassmann J, Kellerhals M, Suprun I, Pikunova AV, Krasova NG,

55

- Torutaeva E, Dondini L, Tartarini S, Laurens F, Durel CE. Analysis of the genetic diversity and structure across a wide range of germplasm reveals prominent gene flow in apple at the European level. *BMC Plant Biol.* (2016) 16(1):130. Velasco R, Zharkikh A, Affourtit J, Dhingra A, Cestaro A, Kalyanaraman A, Fontana P, Bhatnagar SK, Troggio M, Pruss D, Salvi S, Pindo M, Baldi P, Castelletti S, Cavaiuolo M, Coppola G, Costa F, Cova V, Dal Ri A, Goremykin V, Komjanc M, Longhi S, Magnago P, Malacarne G, Malnoy M, Micheletti D, Moretto M, Perazzolli M, Siammour A, Vezzulli S, Zini E, Eldredge G, Fitzgerald LM, Gutin N, Lanchbury J, Macalma T, Mitchell JT, Reid J, Wardell B, Kodira C, Chen Z, Desany B, Niazi F, Palmer M, Koepke T, Jiwan D, Schaeffer S, Krishnan V, Wu C, Chu VT, King ST, Vick J, Tao Q, Mraz A, Stormo A, Stormo K, Bogden R, Ederle D, Stella A, Vecchiotti A, Kater MM, Masiero S, Lasserre P, Lespinasse Y, Allan AC, Bus V, Chagné D, Crowhurst RN, Gleave AP, Lavezzo E, Fawcett JA, Proost S, Rouzé P, Sterck L, Toppo S, Lazzari B, Hellens RP, Durel CE, Gutin A, Bumgarner RE, Gardiner SE, Skolnick M, Egholm M, Van de Peer Y, Salamini F, Viola R. The genome of the domesticated apple (*Malus × domestica* Borkh.). *Nat. Genet.* (2010) 42, 833-839.
- Vieira ML, Santini L, Diniz AL, Munhoz Cde F. Microsatellite markers: what they mean and why they are so useful. *Genet Mol Biol.* (2016) 39(3):312-28.

## PATENTOVÉ NÁROKY

1. Sada primerů pro stanovení genotypu jabloně *Malus x domestica* Borkh. v jediné reakci metodou fragmentační analýzy, **vyznačující se tím**, že obsahuje primery, jejichž sekvence jsou:

5 SEQ ID NO. 1: TCTACAACAAAATACCCAATACACC

SEQ ID NO. 2: CTAAGCATCCCGATTGAAAGG

SEQ ID NO. 3: AGTTTCGTAAGAGAACCTTGATCTC

SEQ ID NO. 4: ATCCACTTACTAAGAACTACCGTTG

SEQ ID NO. 5: TTCTTCTATGAACGGTGATAAAGC

10 SEQ ID NO. 6: GAATGTGAGGCGTTCCTGAG

SEQ ID NO. 7: ATTCCCTGGCGAGAAAAGC

SEQ ID NO. 8: CTTGGTAGGTGTCGGAGCAG

SEQ ID NO. 9: TAGATCCGGTCACTCTCCACT

SEQ ID NO. 10: AACACCCCATCAATCAGAAAGA

15 SEQ ID NO. 11: TGTGAAATGTAATTCAAATCAATGC

SEQ ID NO. 12: TTGAGAAAATGGGGCTTCTG

SEQ ID NO. 13: GAGAAGGCTAACAGAAATGTGG

SEQ ID NO. 14: GCCTTTGTAATCATGGCTCC

SEQ ID NO. 15: GCAAAGATAGGTAGATATATGCCA

20 SEQ ID NO. 16: AAGGAGGGATTGTTTGTGCA

SEQ ID NO. 17: AAAACCCTAGCCCCACGGAG

SEQ ID NO. 18: ACTCTCCATCGGGCTCCAC

SEQ ID NO. 19: CTGAGGTATTATTTGTTTCTGCG

SEQ ID NO. 20: GAAACACATTTATAGAAAAAGGAGC

25 SEQ ID NO. 21: GCTCTTCCAAAATGGCGTAC

SEQ ID NO. 22: ATATTTGACATTGGTCATGAGACG

SEQ ID NO. 23: GAGAAGAACAACAACAGAGAACG

SEQ ID NO. 24: GAAATAGGGTAGCAGCAGATGG

SEQ ID NO. 25: CAGTGTTACCCGCCAAATATC

30 SEQ ID NO. 26: GATCGGAAGGCGAAAGACTC

SEQ ID NO. 27: AGGAAGGCTGGTTATCTTGTG

SEQ ID NO. 28: CCCTCATGCCCTCCACTAAC

SEQ ID NO. 29: CAACTTTGCTAACCTCTCATTGAA

SEQ ID NO. 30: AGGATGACCTTGAGATTGATGC

35 SEQ ID NO. 31: TTGAACTTCGACCGCAACACCA

SEQ ID NO. 32: ACATGGWTAAGGCATAGTCAGG

SEQ ID NO. 33: GAAAGACTTGCAGTGGGAGC

SEQ ID NO. 34: TTTAGGAGTGGGTTTGAGAAGG,

přičemž pro PCR amplifikaci markeru Hi02c07 obsahuje sada primery, z nichž jeden je vhodně fluorescenčně označen pro současnou detekci všech markerů v průběhu fragmentační analýzy, a jejichž sekvence jsou:

40 SEQ ID NO. 1: TCTACAACAAAATACCCAATACACC

SEQ ID NO. 2: CTAAGCATCCCGATTGAAAGG,

přičemž pro PCR amplifikaci markeru CH02c06 obsahuje sada primery, z nichž jeden je vhodně fluorescenčně označen pro současnou detekci všech markerů v průběhu fragmentační analýzy, a jejichž sekvence jsou:

45 SEQ ID NO. 3: AGTTTCGTAAGAGAACCTTGATCTC

SEQ ID NO. 4: ATCCACTTACTAAGAACTACCGTTG,

přičemž pro PCR amplifikaci markeru GD12 obsahuje sada primery, z nichž jeden je vhodně

50 fluorescenčně označen pro současnou detekci všech markerů v průběhu fragmentační analýzy, a jejichž sekvence jsou:

SEQ ID NO. 5: TTCTTCTATGAACGGTGATAAAGC

SEQ ID NO. 6: GAATGTGAGGCGTTCCTGAG,



přičemž pro PCR amplifikaci markeru NZ01a6 obsahuje sada primery, z nichž jeden je vhodně fluorescenčně označen pro současnou detekci všech markerů v průběhu fragmentační analýzy, a jejichž sekvence jsou:

SEQ ID NO. 7: ATCCCTGGCGAGAAAAGC

5 SEQ ID NO. 8: CTTGGTAGGTGTCGGAGCAG,

přičemž pro PCR amplifikaci markeru CH05f06 obsahuje sada primery, z nichž jeden je vhodně fluorescenčně označen pro současnou detekci všech markerů v průběhu fragmentační analýzy, a jejichž sekvence jsou:

SEQ ID NO. 9: TAGATCCGGTCACTCTCCACT

10 SEQ ID NO. 10: AACACCCCATCAATCAGAAAGA,

přičemž pro PCR amplifikaci markeru CH03d07 obsahuje sada primery, z nichž jeden je vhodně fluorescenčně označen pro současnou detekci všech markerů v průběhu fragmentační analýzy, a jejichž sekvence jsou:

SEQ ID NO. 11: TGTGAAATGTAATTCAAATCAATGC

15 SEQ ID NO. 12: TTGAGAAAATGGGGCTTCTG,

přičemž pro PCR amplifikaci markeru CH04e05 obsahuje sada primery, z nichž jeden je vhodně fluorescenčně označen pro současnou detekci všech markerů v průběhu fragmentační analýzy, a jejichž sekvence jsou:

SEQ ID NO. 13: GAGAAGGCTAACAGAAATGTGG

20 SEQ ID NO. 14: GCCTTTGTAATCATGGCTCC,

přičemž pro PCR amplifikaci markeru CH01h10 obsahuje sada primery, z nichž jeden je vhodně fluorescenčně označen pro současnou detekci všech markerů v průběhu fragmentační analýzy, a jejichž sekvence jsou:

SEQ ID NO. 15: GCAAAGATAGGTAGATATATGCCA

25 SEQ ID NO. 16: AAGGAGGGATTGTTTGTGCA,

přičemž pro PCR amplifikaci markeru CH01f03b obsahuje sada primery, z nichž jeden je vhodně fluorescenčně označen pro současnou detekci všech markerů v průběhu fragmentační analýzy, a jejichž sekvence jsou:

SEQ ID NO. 17: AAAACCCTAGCCCCACGGAG

30 SEQ ID NO. 18: ACTCTCCATCGGGCTCCAC,

přičemž pro PCR amplifikaci markeru CH02c11 obsahuje sada primery, z nichž jeden je vhodně fluorescenčně označen pro současnou detekci všech markerů v průběhu fragmentační analýzy, a jejichž sekvence jsou:

SEQ ID NO. 19: CTGAGGTATTATTTGTTTCTGCG

35 SEQ ID NO. 20: GAAACACATTTATAGAAAAAGGAGC,

přičemž pro PCR amplifikaci markeru CH02d08 obsahuje sada primery, z nichž jeden je vhodně fluorescenčně označen pro současnou detekci všech markerů v průběhu fragmentační analýzy, a jejichž sekvence jsou:

SEQ ID NO. 21: GCTCTTCCAAAATGGCGTAC

40 SEQ ID NO. 22: ATATTTGACATTGGTCATGAGACG,

přičemž pro PCR amplifikaci markeru CH01f02 obsahuje sada primery, z nichž jeden je vhodně fluorescenčně označen pro současnou detekci všech markerů v průběhu fragmentační analýzy, a jejichž sekvence jsou:

SEQ ID NO. 23: GAGAAGAACAACAACAGAGAACG

45 SEQ ID NO. 24: GAAATAGGGTAGCAGCAGATGG,

přičemž pro PCR amplifikaci markeru GD147 obsahuje sada primery, z nichž jeden je vhodně fluorescenčně označen pro současnou detekci všech markerů v průběhu fragmentační analýzy, a jejichž sekvence jsou:

SEQ ID NO. 25: CAGTGTTACCCGCCAAATATC

50 SEQ ID NO. 26: GATCGGAAGGCGAAAGACTC,

přičemž pro PCR amplifikaci markeru CH04c07 obsahuje sada primery, z nichž jeden je vhodně fluorescenčně označen pro současnou detekci všech markerů v průběhu fragmentační analýzy, a jejichž sekvence jsou:

SEQ ID NO. 27: AGGAAGGCTGGTTATCTTGTG



SEQ ID NO. 28: CCCTCATGCCCTCCACTAAC,  
přičemž pro PCR amplifikaci markeru CH02c09 obsahuje sada primery, z nichž jeden je vhodně  
fluorescenčně označen pro současnou detekci všech markerů v průběhu fragmentační analýzy, a  
jejichž sekvence jsou:

5 SEQ ID NO. 29: CAACTTTGCTAACCTCTCATTGAA

SEQ ID NO. 30: AGGATGACCTTGAGATTGATGC,  
přičemž pro PCR amplifikaci markeru CH05e04 obsahuje sada primery, z nichž jeden je vhodně  
fluorescenčně označen pro současnou detekci všech markerů v průběhu fragmentační analýzy, a  
jejichž sekvence jsou:

10 SEQ ID NO. 31: TTGAACTTCGACCGCAACACCA

SEQ ID NO. 32: ACATGGWTAAGGCATAGTCAGG,

přičemž pro PCR amplifikaci markeru CH01h01 obsahuje sada primery, z nichž jeden je vhodně  
fluorescenčně označen pro současnou detekci všech markerů v průběhu fragmentační analýzy, a  
jejichž sekvence jsou:

15 SEQ ID NO. 33: GAAAGACTTGCAGTGGGAGC

SEQ ID NO. 34: TTTAGGAGTGGGTTTGAGAAGG.