

GENOTYPIZACE JABLONĚ DOMÁCÍ (*MALUS* × *DOMESTICA* BORKH.) POMOCÍ SSR MARKERŮ V PRAXI

Certifikovaná metodika

Kamila Pluhařová a kol.

2023



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

Autorský kolektiv:

Ing. Kamila Pluhařová¹, RNDr. Jana Čmejlová, Ph.D.¹, Prof. Dr. Ing. Boris Krška¹,
Ing. Pavel Voráček², RNDr. Radek Čmejla, Ph.D.¹

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

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

Kontakt na vedoucího autorského kolektivu:

radek.cmejla@vsuo.cz

Autoři fotografií a obrázkových schémat:

kolektiv autorů

Odborný oponent:

Ing. Josef Patzak, Ph.D.

Oponent ze státní správy:

MVDr. Kateřina Staňková

Název:

Genotypizace jabloně domácí (*Malus × domestica* Borkh.) pomocí SSR markerů v praxi

Dedikace:

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

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

ISBN 978-80-87030-90-5 (online; pdf)

<https://doi.org/10.60615/dnp4-0x57>



OBSAH

Anotace	5
1 Úvod	5
2 Cíl metodiky	7
3 Vlastní popis metodiky	7
3.1 Popis metodiky – Úvod	7
3.2 Materiál a metody	8
3.2.1 Odběr vzorků, přeprava vzorků	9
3.2.2 Příprava DNA	9
3.2.2.1 Homogenizace rostlinného materiálu	9
3.2.2.2 Izolace genomové DNA	10
3.2.3 Sestavení PCR reakce	13
3.2.4 Fragmentační analýza	16
3.2.5 Vyhodnocení a interpretace dat	17
3.2.5.1 Očekávané výsledky	17
3.2.5.2 Možné problémy při analýze dat („Troubleshootings“)	28
3.2.5.2.1 „Stuttering“	28
3.2.5.2.2 Alely lišící se pouze o 1 nukleotid	32
3.2.5.2.3 Zdroj chyb v pre-analytické a analytické fázi	34
3.3 Příklady využití metodiky pro genotypizaci jabloní	35
3.3.1 Tvorba referenční databáze pro účely ověřování a identifikace odrůd	35
3.3.1.1 Referenční databáze pro pěstitelskou praxi v České republice	35
3.3.1.2 Referenční databáze pro účely uznávacího řízení odrůd jabloní	36
3.3.1.3 Referenční databáze pro sbírkové účely	37
3.3.2 Prověření produkčního řetězce výroby jabloňových výpěstků	37
3.3.3 Ověřování odrůdové pravosti u plodů	38
4 Srovnání novosti postupů	39
5 Popis uplatnění certifikované metodiky	40

6	Ekonomické aspekty.....	41
6.1	Ověření pravosti odrůdy před výsadbou – kalkulace ztrát na hektar při výsadbě špatné odrůdy z pohledu pěstitele.....	41
6.2	Prvek zajištění kvality v systém managementu kvality ve výrobních podnicích (školkách) – kalkulace ztrát při výrobě špatné odrůdy potřebné k osázení jednoho hektaru sadu z pohledu školkaře.	42
6.3	Ověřování dodržování licenčních podmínek – kalkulace ztrát při neuplatnění licenčních poplatků.	42
6.4	Ověřování odrůd při prodloužení jejich registrace u Národního odrůdového úřadu (NOÚ) – kalkulace nákladů.	43
6.5	Shrnutí.....	43
7	Seznam použité související literatury.....	44
8	Seznam publikací, které předcházely metodice.....	45
9	Příloha – Charakteristika nejčastěji pěstovaných odrůd v České republice	46

ANOTACE

Jabloň domácí (*Malus × domestica* Borkh.) je významnou zemědělskou plodinou, která je pěstována po celém světě. Odhaduje se, že existuje více než 10 000 odrůd jabloní a mnoho šlechtitelských programů se stále zaměřuje na produkci nových kvalitnějších odrůd. Správné určení identity jednotlivých odrůd hraje důležitou roli ve všech úrovních produkce rostlinného materiálu, zvláště jedná-li se o práci s certifikovaným materiálem, a je nezbytné pro kontrolu deklarované odrůdové pravosti, např. při uznávacím řízení nových odrůd nebo při kontrolní činnosti. Rozlišení jednotlivých odrůd pomocí fenotypového a fenologického hodnocení, které se standardně provádí, může být jednak časově náročné, ale také obtížné a v některých případech, vzhledem k počtu existujících odrůd, dokonce nemožné. V dnešní době se proto přechází k určování odrůdy/genotypu (genotypování) pomocí molekulárních markerů molekulárně-biologickými metodami. Pro genotypování jabloní byla vyvinuta sada Ap17in1, která pomocí fragmentační analýzy detekuje 17 SSR (simple sequence repeats, krátké tandemové repetice) markerů v jedné reakci. Certifikovaná metodika poskytuje podrobný návod pro genotypizaci jabloní pomocí těchto markerů a předkládá její využití v praxi.

1 ÚVOD

Potvrzení identity odrůdy je důležité u všech zemědělských plodin, avšak zásadního významu nabývá u ovocných dřevin, kdy jsou s nemalou investicí vysázené sady obhospodařovány zpravidla několik desítek let. Správné určení odrůdy je tedy důležité na všech úrovních rostlinné produkce, kde se s certifikovaným materiálem pracuje – ať již se jedná o certifikační orgány při jeho registraci nebo prodlužování registrace, producenty a prodejce rozmnožovacího materiálu (školky, roubové množárny), pěstitele či dovozce plodů. Rovněž šlechtitelé mají eminentní zájem o ochranu práv k jimi vyšlechtěným odrůdám, která jim zabezpečují příjmy z licenčních poplatků, protože vyšlechtění nové odrůdy ovocných dřevin je velmi náročný a zdoluhavý proces, kdy od opylení po uznání odrůdy uběhne dvacet až třicet let. Z výše uvedených důvodů je tedy důležité správně posoudit identitu jednotlivých odrůd.

V České republice probíhá zkoušení odrůd klasickým způsobem, kdy je několik let prováděno fenotypové/fenologické hodnocení odrůdy, při kterém se sleduje např. odlišnost od stávajících obecně známých odrůd, uniformita v rámci odrůdy a stálost znaků mezi jednotlivými lety hodnocení (tzv. DUS testy) a další pěstitelsky významné znaky, což je však možné až po dosažení plodnosti. Aby bylo možné porovnat stálost odrůdy ve sledovaných znacích a minimalizovat možné ovlivnění zkoušení, např. různorodými povětrnostními podmínkami, chorobami nebo škůdci, probíhá hodnocení ve více letech a také závisí na zkušenosti hodnotitele. Při prodlužování registrace je již porovnávání rychlejší, avšak také zde je třeba materiál hodnotit alespoň jednu sezónu. Mnohem rychlejší a efektivnější posouzení shodnosti dvou biologických materiálů nabízejí molekulárně genetické analýzy, které při kvalitním provedení mohou identifikovat určitý biologický materiál s pravděpodobností

hraničící s jistotou. Pro tuto tzv. genotypizaci je třeba pouze malé množství materiálu, např. listů nebo lýka, je tedy možné ji provádět celoročně a výsledky jsou dostupné v případě potřeby během několika hodin. Genotypizaci je navíc možné provést bez požadavku na věk a plodnost posuzovaného materiálu. Ačkoliv genotypizace neumožňuje nahradit zkoušky uniformity a stálosti nově registrovaného materiálu, je schopná již před jejich zahájením odhalit možné mutace (klony) uznaných odrůd nebo případné duplicity. V případě ověřování materiálu nebo prodlužování registrace by genotypizace mohla zcela nahradit fenotypové/fenologické zkoušky.

Jabloň domácí (*Malus × domestica* Borkh.) je komerčně nejčastěji pěstovanou ovocnou dřevinou v České republice s cca 10,34 mil. stromů (údaj z roku 2022, <https://vdb.czso.cz>), v intenzivních výsadbách jabloní se každoročně vyprodukuje na 140 000 tun konzumních jablek. Téměř polovina sadů je však starší než 25 let (Český statistický úřad, 2017) a blíží se tedy ke konci své ekonomické rentability. Kromě obnovy stromů se tak dá očekávat i odrůdová obměna. V současnosti jsou v České republice hlavními pěstovanými odrůdami 'Golden Delicious', odrůdy ze skupiny 'Jonagold', 'Idared' a 'Gala'. Naopak odrůdy 'Gloster', 'Šampion' a 'Rubín' z českých sadů mizí a jsou nahrazovány kvalitnějšími odrůdami 'Braeburn' či 'Fuji'. Prosazuje se i řada českých rezistentních či odolných odrůd, jako např. 'Topaz', 'Rubinola' či 'Rozela' (Zdroj: [Ovocnářská unie ČR](#)).

U jabloně domácí bylo na konci minulého století na světě popsáno více než 10 000 různých odrůd (Janick, 1996) a nové neustále přibývají. Odlišit toto množství odrůd pouze na základě fenotypových/fenologických znaků je však prakticky nereálné, ne-li nemožné, proto se používají techniky založené na analýze DNA.

Z genetického hlediska je jabloň obvykle diploidní organizmus se základní sadou tvořenou 17 chromozomy, vyskytují se však relativně hojně i triploidní odrůdy a velmi vzácně tetraploidní. V současnosti jsou pro genotypizaci biologického materiálu nejčastěji používány mikrosatelitní neboli SSR markery (Simple Sequence Repeat), kdy jednotlivé odrůdy vykazují různě dlouhé alely příslušného markeru, zpravidla díky odlišnému počtu opakování krátké sekvence. Tyto markery jsou vysoce informativní, kodominantní, multialelické a experimentálně dobře reprodukovatelné, přičemž analýza je velmi rychlá, cenově přijatelná a interpretačně obvykle nenáročná (pro přehled viz např. Vieira, 2016).

Pro účely této metodiky byla využita genotypizační sada vyvinutá na pracovišti autorů (Cmejlova, 2021). Sada pokrývá všech 17 chromozomů a při analýze genofondové sbírky VŠÚO obsahující téměř 1 000 položek vykazovala pravděpodobnost shody dvou neidentických vzorků $1,7 \times 10^{-22}$. Souprava byla speciálně vyvinuta tak, aby proces genotypizace probíhal v jediné reakci. Toto uspořádání má praktické výhody: i) přináší maximální finanční, personální a časové úspory, aby mohla být implementována do rutinní praxe uživatelů bez zásadních dodatečných nákladů; ii) její použití v laboratoři je velmi jednoduché, takže jsou minimalizovány možné chyby v laboratorních procesech; a iii) poskytuje výsledky, které lze spolehlivě interpretovat. Tyto atributy umožňují jednoduchou standardizaci celého laboratorního postupu, takže metodiku lze výhodně adaptovat i laboratořemi provádějícími akreditované metody.

2 CÍL METODIKY

Určování odrůd jabloní dosud probíhá na území České republiky na základě porovnávání fenotypových/fenologických znaků, což může být v případě stromů proces trvající i několik let. Tento postup navíc neumožňuje věrohodné určení odrůdy u výpěstků v juvenilním věku. Genotypizace jabloní je laboratorní postup, kterým se stanoví z genomové DNA testované rostliny genetický profil SSR markerů, který je unikátní pro danou odrůdu. Cílem metodiky je poskytnout uživatelům ucelený návod, jak metodiku zavést do své rutinní praxe s minimálními náklady. Metodika je tak určena pro dva okruhy uživatelů – laboratoře molekulární biologie, kterým poskytuje návod JAK genotypizaci provést, aby byly získány validní výsledky, a uživatele těchto výsledků, kterým předkládá postupy praktického využití v jejich PRAXI. Tato praxe může zahrnovat minimálně následující analýzy:

- ▶ vzájemné porovnání vzorků bez potřeby znalosti odrůdy (tj. (ne)shoda dvou vzorků);
- ▶ porovnání neznámého vzorku s kolekcí referenčních odrůd (využití databáze genetických profilů referenčních odrůd, identifikace odrůdy);
- ▶ ověřování (určení) rodičů křížení.

Metodika není primárně určena pro vzájemné odlišení jednotlivých klonů/mutací odrůd, ale může být použita pro obecnou identifikaci mutace uznané odrůdy.

3 VLASTNÍ POPIS METODIKY

3.1 Popis metodiky – Úvod

Využití laboratorní části metodiky předpokládá znalost základních principů práce v laboratoři molekulární biologie a specifické zkušenosti s prováděním fragmentační analýzy pomocí kapilárního genetického analyzátoru, vyhodnocováním dat a jejich interpretací. Postup byl optimalizován pro konkrétní vybavení laboratoře a konkrétní reagentie, potenciální uživatel si bude muset metodu verifikovat na svém pracovišti; pro tento účel jsou v metodice uvedeny kontrolní odrůdy včetně velikosti alel jednotlivých použitých SSR markerů.

Pro genotypizaci jabloní se používá genotypizační sada, která byla detailně popsána v Cmejlova (2021) a lze ji použít pro věrohodné genotypování diploidních, triploidních i tetraploidních odrůd jabloní. Pro stanovení genetického profilu se využívá 17 SSR markerů (Tabulka 1), jejichž alelická kombinace je pro každou odrůdu specifická. Tato sada obsahuje 17 z 18 SSR markerů doporučených pro genotypizace jabloně domácí v současné odborné literatuře (Testolin, 2023); zároveň bylo 12 z nich již dříve doporučeno pro stejné použití mezinárodním uskupením The European Cooperative Programme for Plant Genetic Resources (ECPGR) (Fernandez, 2013). Porovnáním profilů je pak možné určit shodu mezi vzorky, případně lze profil porovnat s databází referenčních odrůd/genotypů. Pravděpodobnost náhodné identity dvou nepříbuzných vzorků této sady SSR markerů se pohybuje na úrovni souprav dříve používaných pro identifikaci člověka obsahujících 17 SSR markerů (Green, 2013).

Tabulka 1. Charakteristika markerů použitých pro genotypizaci jabloní. *: alely s frekvencí pod 5%; [E]: markery doporučené ECPGR; PI: pravděpodobnost náhodné identity dvou nepříbuzných vzorků; LG: linkage group, odpovídá chromozomu. Převzato z Cmejlova (2021), upraveno.

LG skupina	Marker	Počet alel	Vzácných alel*	Efektivních alel	Očekávaná heterozygotnost	Pozorovaná heterozygotnost	Pravděpodobnost výskytu nulové alely	Pravděpodobnost náhodné identity dvou nepříbuzných vzorků
LG1	Hi02c07 [E]	22	17	5,16	0,8063	0,8295	-0,013	0,0623
LG2	CH02c06	25	19	8,81	0,8865	0,8830	0,002	0,0236
LG3	GD12 [E]	22	17	2,74	0,6349	0,6443	-0,006	0,1557
LG4	NZ01a6	17	11	4,07	0,7541	0,7864	-0,018	0,0928
LG5	CH05f06	13	7	5,73	0,8255	0,8284	-0,002	0,0510
LG6	CH03d07	23	16	7,77	0,8713	0,8830	-0,006	0,0297
LG7	CH04e05 [E]	25	21	3,90	0,7438	0,7580	-0,008	0,0896
LG8	CH01h10 [E]	17	13	2,83	0,6466	0,6625	-0,010	0,1663
LG9	CH01f03b [E]	13	9	4,63	0,7840	0,8193	-0,020	0,0755
LG10	CH02c11 [E]	22	13	9,19	0,8912	0,8852	0,003	0,0217
LG11	CH02d08 [E]	19	13	6,11	0,8363	0,8398	-0,002	0,0446
LG12	CH01f02 [E]	22	16	7,64	0,8691	0,9023	-0,018	0,0299
LG13	GD147 [E]	15	10	5,26	0,8096	0,7989	0,006	0,0595
LG14	CH04c07 [E]	19	12	7,73	0,8707	0,8875	-0,009	0,0297
LG15	CH02c09 [E]	12	5	6,20	0,8388	0,8523	-0,007	0,0455
LG16	CH05e04	20	13	5,75	0,8260	0,8580	-0,018	0,0491
LG17	CH01h01 [E]	19	13	6,57	0,8477	0,8568	-0,005	0,0420
	Průměr:	19,1	13,2	5,89	0,8084	0,8221		$1,73 \times 10^{-22}$
	Celkem:	325	225		Celková heterozygotnost			Celková PI
		Z celku:		69,2%				

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

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

3.2 Materiál a metody

Vlastní postup dle metodiky lze rozdělit do tří fází:

- ▶ Odběry vzorků a jejich příjem do laboratoře, uchování do doby analýzy (Pre-analytická fáze).

- ▶ Zpracování vzorků v laboratoři, homogenizace, izolace DNA, sestavení PCR reakce, vlastní fragmentační analýza (Analytická fáze).
- ▶ Vyhodnocení a interpretace nálezů, vytvoření finální podoby výsledku (Post-analytická fáze).

3.2.1 Odběr vzorků, přeprava vzorků

Pro genotypování je vstupním materiálem genomová DNA, kterou lze izolovat z různých částí rostliny. Pro rutinní analýzu se doporučuje používat listy v období vegetace nebo lýko, které lze používat celoročně. Genomovou DNA lze též izolovat z plodů (slupka), případně i vysušených plodů (křížaly). Metodika nebyla testována pro další produkty obsahující jablka (mošty, džusy, pyré aj.).

Doporučuje se odebrat 2 nezávislé vzorky z jednoho stromu, tj. 2 listy nebo 2 výhony v případě izolace DNA z lýka. Dle typu požadované analýzy je zpracován buď jeden list (např. ověřování konkrétního materiálu), nebo nezávisle dva listy (např. *de novo* identifikace, tvorba referenční databáze). Odebrané části rostlin se vloží do plastového sáčku a vzorek se v co nejkratším čase dopraví do laboratoře. Po celou dobu převozu se vzorek uchovává v chladu, v období teplých dní lze pro převoz vzorků použít chladicí vložky.

Ze vzorků se po příjmu do laboratoře bez zbytečného odkladu izoluje DNA, případně lze materiál po dobu několika dní uchovávat v chladničce (nezbytná průběžná kontrola stavu materiálu), nebo se odebraný materiál ve zkumavkách šokově zamrazí v tekutém dusíku a uloží se do doby zpracování do mrazicího boxu při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Při této teplotě je možné vzorky skladovat bez ztráty kvality nejméně 1 rok.

3.2.2 Příprava DNA

Příprava DNA se provádí ve dvou základních krocích:

- ▶ Homogenizace primárního materiálu
- ▶ Izolace genomové DNA

3.2.2.1 Homogenizace rostlinného materiálu

Univerzální a spolehlivá metoda homogenizace je nadrcení rostlinného materiálu v třecí misce v tekutém dusíku. Tento postup se hodí pro všechny typy vstupního materiálu, ideální je pro následnou izolaci DNA z lýka, které se naškrábe pomocí sterilního skalpelu z výhonu po odstranění kůry, nebo ze slupky plodu či křížaly, které se nejdříve sterilním skalpelem nakrájí na co nejmenší kousky. Rostlinný materiál se homogenizuje v třecí misce na jemný prášek, který se bezprostředně použije jako vstupní materiál pro izolaci genomové DNA.

Pro izolaci DNA z listů lze využít i mechanické homogenizátory, které umožňují rychlejší zpracování většího počtu listů, např. homogenizátor TissueLyser II (Qiagen), který naruší biologický materiál pomocí vysokorychlostního protřepávání vzorku s ocelovými kuličkami.

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

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

Správně provedená homogenizace je klíčovým předpokladem pro efektivní izolaci DNA!

3.2.2.2 Izolace genomové DNA

Metodika je validována s využitím komerčně dodávaného DNA izolačního kitu Exgene Plant SV mini (GeneAll Biotechnology, Co., Ltd.; k.č. 117–152; dodává Bohemia Genetics s.r.o) na bázi kolon. Základní charakteristiky kitu shrnuje Tabulka 2. Postupuje se podle návodu výrobce. V rámci vývoje genotypizační soupravy byly testovány DNA izolační kity i od dalších výrobců s podobným výsledkem (DNeasy Plant Mini Kit, Qiagen; GeneJET Plant Genomic DNA Purification Kit, Thermo Fisher Scientific; NucleoSpin Plant II, Macherey-Nagel; GenElute Plant Genomic DNA Miniprep Kit, Merck).

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

Parametr	Specifikace
Typ izolace	Kolonová
Maximální množství výchozího vzorku	~ 100 mg rostlinného pletiva
Trvání izolace	~ 40 min
Maximální objem kolony	~ 700 μl
Minimální eluční objem	30 μl
Maximální vazebná kapacita	~ 50 μg
Typický výtěžek DNA	4–40 μg

Potřebné přístroje, nástroje, spotřební plast, reagensie

- Souprava pro izolaci genomové DNA **Exgene Plant SV mini** (GeneAll Biotechnology)
- Stolní centrifuga s rotorem pro 2 ml zkumavky, minimálně 13 000 RPM
- Vyhřívaný blok pro 2 ml zkumavky s možností nastavení $65\text{ }^{\circ}\text{C}$
- Vortex
- Sada laboratorních pipet pro objemy do 1 ml

- Skalpelové čepelky na jedno použití, násadka skalpelu pro přípravu lýka pro homogenizaci
- Sterilní špachtličky
- Sterilní zkumavky 1,5 ml a 2 ml, stojánky na zkumavky
- Filtrované špičky
- Ethanol 96–100%, p.a. nebo molecular biology grade
- Dekontaminační sprej (např. Desprej, Descosept), ROTI Nucleic Acid-free sprej

Pracovní postup

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

-
1. Standardně se cca 100 mg dobře zhomogenizovaného vzorku přenesou sterilní špachtličkou do 2ml zkumavky (200 mg při izolaci DNA ze slupky plodu). V případě použití homogenizátoru se ze 2ml zkumavky s homogenizovaným materiálem vyjme kulička z nerezové oceli.
 2. Přidá se 400 µl pufru PL (500 µl pufru PL v případě izolace DNA z křížaly) a 3 µl roztoku RNasy A (100 mg/ml). Provede se intenzivní zvortexování.

3. Pokud se zpracovává pouze jeden vzorek, pokračuje se následným krokem. Pokud se zpracovává větší množství vzorků, nechají se již připravené vzorky v PL pufru inkubovat při pokojové teplotě do okamžiku, než jsou všechny vzorky převedeny do PL pufru podle bodů 1–3. Pak se pokračuje následujícím krokem č. 4.
4. Vzorky se inkubují 15 minut při 65 °C ve vyhřívaném bloku, každých 5 minut se provede zvortexování.
5. K homogenátu se přidá 140 µl pufru PD. Vzorky se zvortexují a inkubují se 5 minut na ledu.
6. Homogenát se přenese pomocí tenké kovové špachtličky nebo 1ml špičky s filtrem s ustřiženou špičkou na EzSep filtr (modrá barva) a centrifuguje se 2 minuty.
7. Proteklý lyzát se opatrně bez narušení pelety přenese špičkou s filtrem do nové 1,5ml zkumavky; typicky se jedná o 420 µl lyzátu.
8. K lyzátu se přidá pufr BD v množství 1,5 násobku objemu lyzátu (k 420 µl lyzátu se přidá 630 µl); roztoky je nutné okamžitě promíchat otáčením zkumavky nebo propipetováním.
9. 700 µl směsi z kroku 7 se přenese špičkou s filtrem na zelené SV kolony se sběrnou zkumavkou. Centrifuguje se 1 minutu. Proteklá tekutina se vyleje, hrany sběrné zkumavky se otrou čistou buničitou vatou. SV kolona se opět vsune do sběrné zkumavky.
10. Na kolonu se nanese špičkou s filtrem zbytek lyzátu. Centrifuguje se 1 minutu. Proteklá tekutina se vyleje, hrany sběrné zkumavky se otrou čistou buničitou vatou. SV kolona se opět vsune do sběrné zkumavky.
11. Na SV kolonu se přidá 700 µl pufru CW, centrifuguje se 1 minutu. Proteklá tekutina se vyleje, hrany sběrné zkumavky se otrou čistou buničitou vatou. SV kolona se opět vsune do sběrné zkumavky.
12. Na SV kolonu se přidá 300 µl pufru CW, centrifuguje se 1 minutu. Proteklá tekutina se vyleje, hrany sběrné zkumavky se otrou čistou buničitou vatou. SV kolona se opět vsune do sběrné zkumavky. Centrifuguje se 1 minutu, aby se zcela odstranil CW pufr z filtru. Po stočení se SV kolona opatrně vsune do čisté 1,5ml zkumavky.
13. Na SV kolonu se přidá 100 µl pufru AE (30 µl pufru AE v případě izolace DNA ze slupky plodu či křížaly). Nechá se inkubovat 5 minut při pokojové teplotě, poté se stáčí 1 minutu (V případě izolace DNA ze slupky plodu či křížaly se eluát znovu nanese na SV kolonu, nechá se inkubovat 2 minuty při pokojové teplotě a poté se stáčí 1 minutu.).
14. Orientační určení čistoty a množství izolované DNA se provádí spektrometricky při vlnových délkách 260 nm (kvantita) a 280 nm (čistota jako poměr naměřených hodnot při vlnových délkách 260/280 nm). Izolovaná DNA by měla mít čistotu cca 1,8. Pokud je čistota nižší, nelze vyloučit negativní dopad na prováděné analýzy.
15. Eluovanou DNA je možné použít pro další aplikace nebo zamrazit v $\leq -18^{\circ}\text{C}$.

3.2.3 Sestavení PCR reakce

Použitá genotypizační sada obsahuje 37 primerů, které umožňují současnou amplifikaci 17 SSR markerů v jedné PCR (Ap17in1). Sekvence, fluorescenční značení a další charakteristiky primerů jsou uvedeny v původní publikaci (Cmejlova, 2021). Vzhledem ke značnému množství primerů se doporučuje alespoň u některých primerů vycházet ze zásobní koncentrace 200 μ M a před vlastní PCR je smíchat do Ap17in1 premixu (Tabulka 3) pro analýzu většího počtu vzorků namísto používání jednotlivých primerů. Ap17in1 premix se doporučuje nejprve ověřit na vzorcích DNA z kontrolních odrůd. PCR byla optimalizována s využitím níže uvedených reagensií a cykleru C1000 (Bio-Rad), uživatelé si budou muset postup verifikovat pro své laboratorní podmínky.

Potřebné přístroje, nástroje, spotřební plast, reagensie

- PCR box
- Minispin centrifuga
- Vortex
- PCR cykler
- Sada laboratorních pipet pro objemy do 1 ml
- Filtrované špičky
- Sterilní zkumavky 1,5 ml, stojánky na zkumavky
- PCR zkumavky 0,2 ml s víčky, stojánek
- Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix (k.č. F548L, Thermo Fisher Scientific)

Pracovní postup

- Příprava PCR reakce probíhá v prostorách k tomu určených v rámci laboratoře molekulární biologie (PCR area) s využitím PCR boxů a v souladu s principy správné laboratorní praxe.
- Pro pipetování se používají špičky s filtrem.
- Všechny PCR reagensie se před zahájením práce vyjmou z mrazničky a nechají se roztát při pokojové teplotě.
- Používá se izolovaná DNA o koncentraci 10 ng/ μ l.

Tabulka 3. Rozpis pro přípravu Ap17in1 premixu na 100 PCR analýz. Sekvence primerů jsou uvedeny v patentu č. 309548 a v původní publikaci (Cmejlova, 2021).

Ap17in1 premix	Zásobní koncentrace (μM)	Finální koncentrace (μM)	Na 100 reakcí (μl)
LG1 forward	200	0,6250	3,125
PET_LG1 reverse	200	0,6250	3,125
VIC_LG2 forward	100	0,7500	7,5
LG2 reverse	200	0,7500	3,75
VIC_LG3 forward	200	1,2500	6,25
LG3 reverse	200	0,6250	3,125
LG3 reverse	200	0,6250	3,125
NED_LG4 forward	200	0,2000	1
LG4 reverse	100	0,2000	2
NED_LG5 forward	100	0,3750	3,75
LG5 reverse	200	0,3750	1,875
6-FAM_LG6 forward	200	0,6000	3
LG6 reverse	200	0,6000	3
LG7 forward	100	0,3125	3,125
VIC_LG7 reverse	100	0,3125	3,125
VIC_LG8 forward	100	0,3125	3,125
LG8 reverse	100	0,3125	3,125
PET_LG9 forward	100	0,0855	0,855
LG9 reverse	100	0,0855	0,855
6-FAM_LG10 forward	200	0,9000	4,5
LG10 reverse	200	0,9000	4,5
6-FAM_LG11 forward	100	0,2500	2,5
LG11 reverse	200	0,2500	1,25
NED_LG12 forward	100	0,3000	3
LG12 reverse	100	0,2125	2,125
PET_LG13 forward	100	0,3125	3,125
LG13 reverse	100	0,3125	3,125
PET_LG14 forward	100	0,1875	1,875
LG14 reverse	100	0,1875	1,875
NED_LG15 forward	100	0,2500	2,5
LG15 reverse	200	0,2500	1,25
6-FAM_LG16 forward	100	0,1300	1,3
LG16-R5	100	0,1800	1,8
NED_LG17 forward	100	0,1800	1,8
NED_LG17 forward	200	0,1800	0,9
LG17 reverse	200	0,3000	1,5
H2O			2,24
Celkem			100

- Před použitím je vhodné PCR komponenty promíchat krátkým vortexováním a dle potřeby stočit na minicentrifuze.
- Pro zajištění validity výsledků je vhodné jako kontroly použít již ověřené odrůdy/genotypy. ECPGR doporučuje zařadit následující odrůdy do každého běhu:
 - *Malus × domestica* Borkh.
 - 'Golden Delicious'
 - 'Fiesta'
 - 'Prima'
 - 'Worcesterská Parména'
 - 'Michelin' (Cider)
 - 'Malling 9' (Podnož M9)
 - *Malus floribunda* 821
 - *Malus robusta* 5

Tyto odrůdy jsou dostupné v Institut national de recherche pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement (INRA, Francie).

- Pro rutinní praxi byly jako kontroly vybrány následující odrůdy *Malus × domestica* Borkh., které zahrnují odrůdy nejčastěji pěstované v České republice (viz statistiky [ČSÚ](#)):
 - 'Golden Delicious'
 - 'Idared'
 - 'Jonagold'/'Jonagored'
 - 'Šampion'
 - 'Gala'
 - 'Red delicious'
 - 'Braeburn'
 - 'Fuji'

-
1. V PCR boxu se do stojánku připraví potřebný počet 0,2ml PCR zkumavek včetně zkumavek pro ověřené kontrolní odrůdy a další případné kontroly (např. kontrola bez přidané DNA, extrakční kontrola).
 2. Do stojánku se připraví 1,5ml mikrozkušavka, do které se dle počtu reakcí připraví adekvátní množství PCR mastermixu (Tabulka 4).

Tabulka 4. Rozpis pro PCR Ap17in1 mastermix určený pro genotypizaci jabloní.

Složka	Na 1 vzorek
PCR voda	2 μ l
Ap17in1 premix	1 μ l
Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix	5 μ l
Celkem	8 μl

3. Připravený mastermix se krátce vortexuje a krátce se centrifuguje.
4. Mastermix se rozpipetuje do 0,2ml PCR zkumavek po 8 μ l.
5. K mastermixu se postupně pipetují 2 μ l izolované DNA o koncentraci 10 ng/ μ l.
6. Podmínky PCR byly optimalizovány pro cykler C1000 (Bio-Rad) s následujícími parametry: 98 °C/30 s; 24x (98 °C/10 s; 58 °C/10 s; 72 °C/15 s); 72 °C/15 s; 8 °C/hold. Pro vzorky izolované ze slupky jablka či z křížaly je vhodné přidat 3 PCR cykly.
 - PCR produkty se přímo použijí pro fragmentační analýzu, nebo je možné je uchovávat při teplotě ≤ -18 °C ve tmě po dobu minimálně jednoho roku.

3.2.4 Fragmentační analýza

Fragmentační analýza fungující na principu kapilární elektroforézy slouží k separaci fragmentů DNA na základě jejich velikosti. Pro účely této metodiky byla optimalizována s využitím níže uvedených reagensů a genetického analyzátoru AB 3500 (ThermoFischer Scientific), uživatelé si budou muset postup verifikovat pro své laboratorní podmínky.

Potřebné přístroje, nástroje, spotřební plast, reagensie

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

Pracovní postup

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

Tabulka 5. Rozpis směsi pro fragmentační analýzu.

Složka	Na 1 vzorek
Hi-Di Formamid	15 μ l
600 LIZ dye Size Standard v2.0	0,5 μ l
Celkem	15,5 μl

- Směs se rozpipetuje do 96-jamkové destičky po 15 μ l.
- Ke směsi se postupně pipetuje 1 μ l PCR produktu a poté se destička uzavře septem.
- Vzorky v 96-jamkové destičce jsou denaturovány 2 min při 95 °C v PCR cyklu.
- Fragmentační analýza probíhá na genetickém analyzátoru AB 3500 (ThermoFischer Scientific) s využitím standardních protokolů pro fragmentační analýzu.

3.2.5 Vyhodnocení a interpretace dat

V této fázi se vyhodnocují výsledky a na základě všech dostupných informací se provádí jejich interpretace. Uvedeným postupem je možné spolehlivě detekovat všechny alely u diploidních, triploidních i tetraploidních odrůd. Pokud je u polyploidních odrůd méně alel než zjištěná ploidie, nelze spolehlivě určit, které alely se vyskytují ve více kopiích.

3.2.5.1 Očekávané výsledky

Pro analýzu dat se používá software GeneMapper v5.0 (ThermoFischer Scientific), který na základě velikostního standardu vyhodnocuje relativní délku jednotlivých PCR fragmentů v nukleotidech. Délku fragmentů je možné vyhodnotit s přesností 1 nukleotid. V Tabulce 6 jsou uvedeny rozmezí délky jednotlivých alel pro každý SSR marker. Výsledkem je sada alel, která je unikátní pro každý jednotlivý genotyp jabloně. Vyhodnocení pak probíhá na základě porovnání sady alel analyzovaného vzorku s jinými vzorky, případně s referenční databází dle typu analýzy.

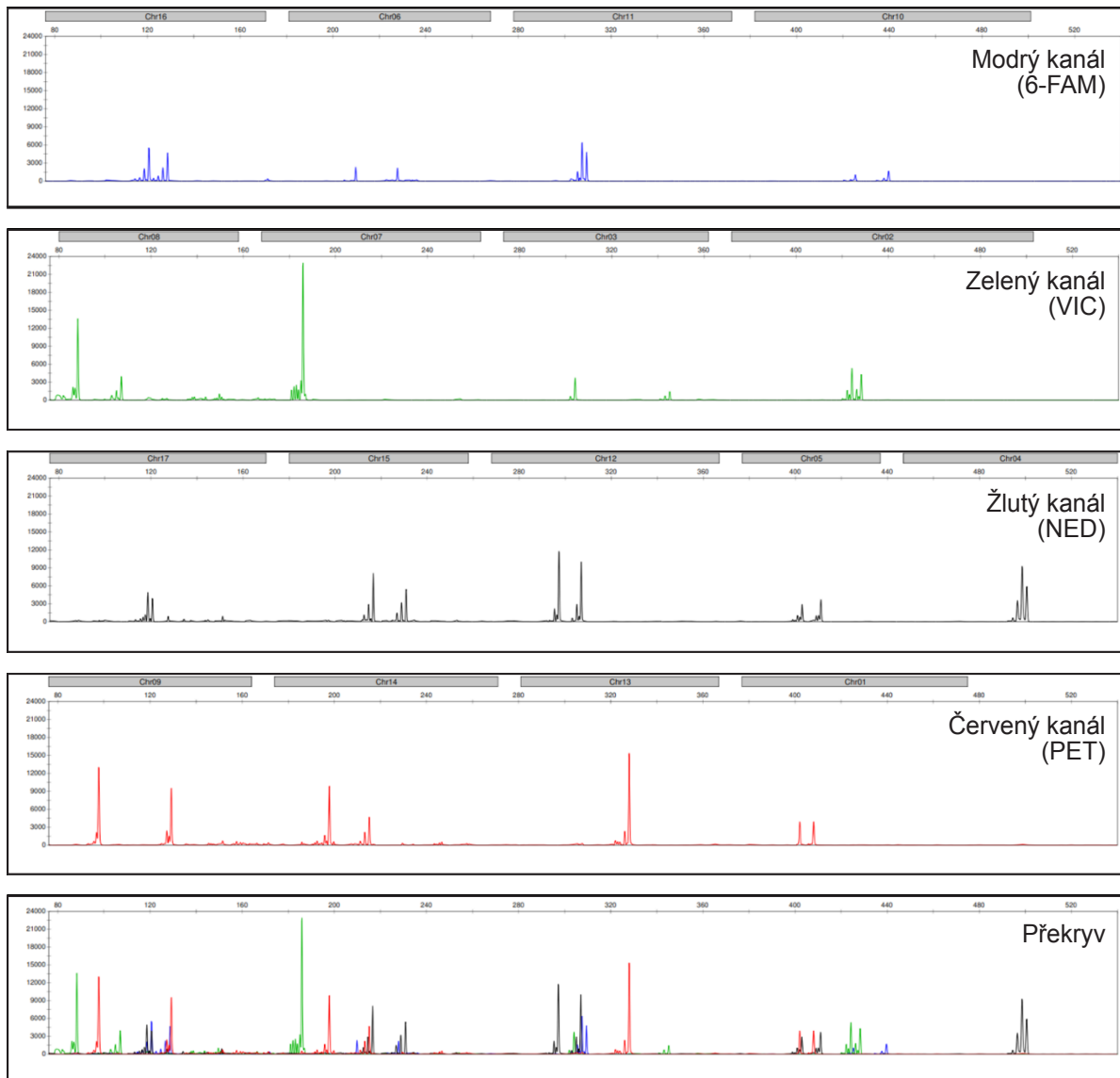
Tabulka 6. Matrice pro vyhodnocování. Kombinace markerů, fluorescenčního značení a očekávaných velikostí alel. LG: linkage group, odpovídá chromozomu.

LG skupina	Marker	Délka alel	Značení/ kanál
LG1	Hi02c07	398–448	PET
LG2	CH02c06	390–466	VIC
LG3	GD12	294–349	VIC
LG4	NZ01a6	455–510	NED
LG5	CH05f06	393–419	NED
LG6	CH03d07	191–250	6-FAM
LG7	CH04e05	185–247	VIC
LG8	CH01h10	83–135	VIC
LG9	CH01f03b	98–141	PET
LG10	CH02c11	411–470	6-FAM
LG11	CH02d08	289–342	6-FAM
LG12	CH01f02	289–350	NED
LG13	GD147	314–352	PET
LG14	CH04c07	198–243	PET
LG15	CH02c09	206–230	NED
LG16	CH05e04	106–156	6-FAM
LG17	CH01h01	89–144	NED

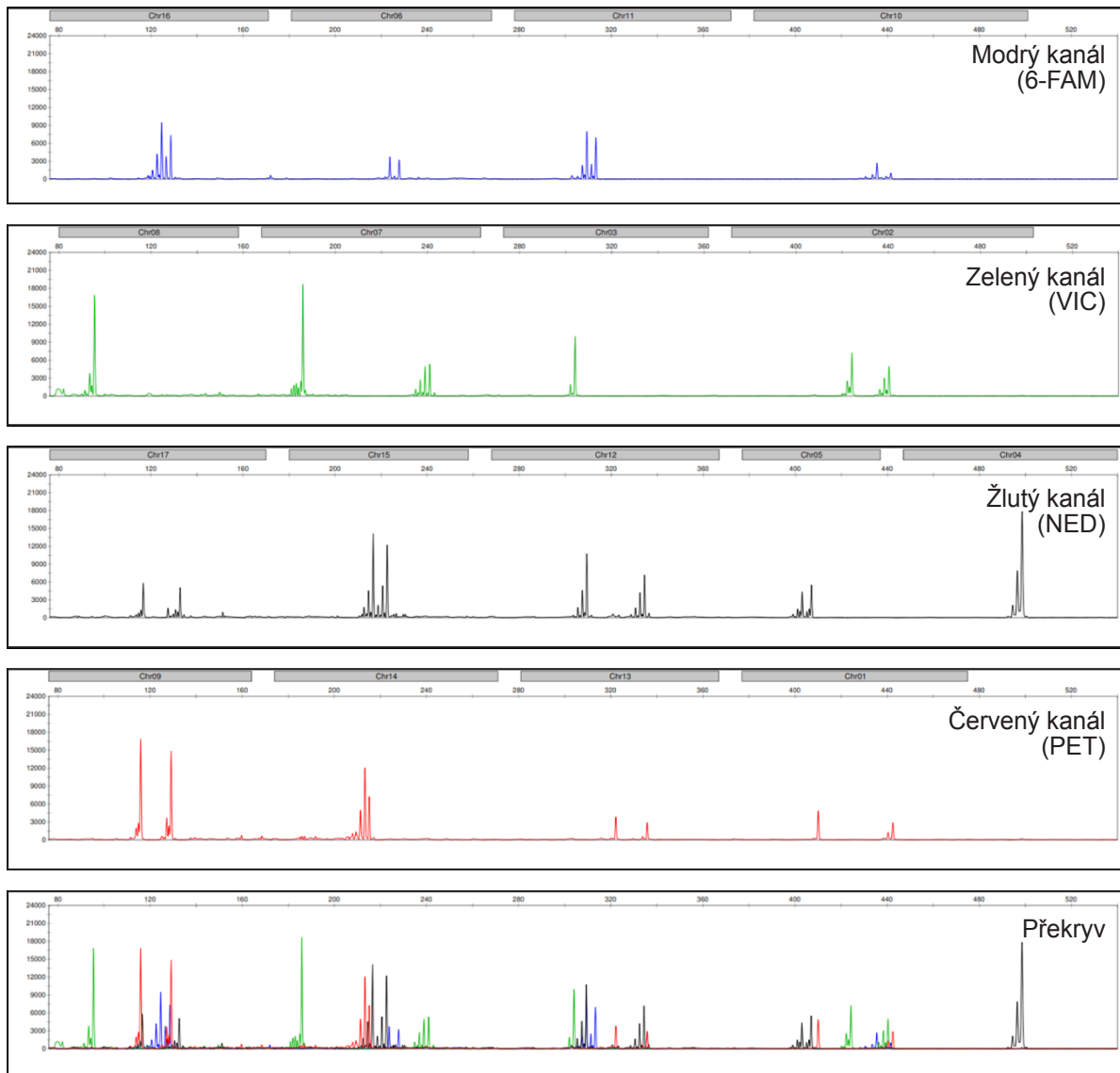
Do každého běhu fragmentační analýzy je také vhodné zařadit několik tzv. referenčních odrůd, které slouží jako kontrola. Tyto referenční odrůdy se známou sadou alel jednotlivých SSR markerů jsou také vhodné k validaci výsledků při přenosu metody do jiné laboratoře nebo při mezilaboratorním porovnávání, protože relativní délka jednotlivých PCR fragmentů se může lišit od délky reálné sekvence (relativní délka je ovlivněna nejen reálnou délkou sekvence, ale také např. fluorescenčním značením, použitými reagensy, přístroji či podmínkami kapilární elektroforézy).

Jako kontroly jsou vhodné ověřené odrůdy/genotypy, které doporučuje ECPGR, nebo odrůdy, které jsou běžně používány pro rutinní praxi, jejich seznam je uveden v kapitole 3.2.3. Grafické výsledky jsou znázorněny ve formě elektroforeogramů na Obrázcích 1 až 8, délky alel jednotlivých SSR markerů kontrolních odrůd jsou uvedeny v Tabulce 7.

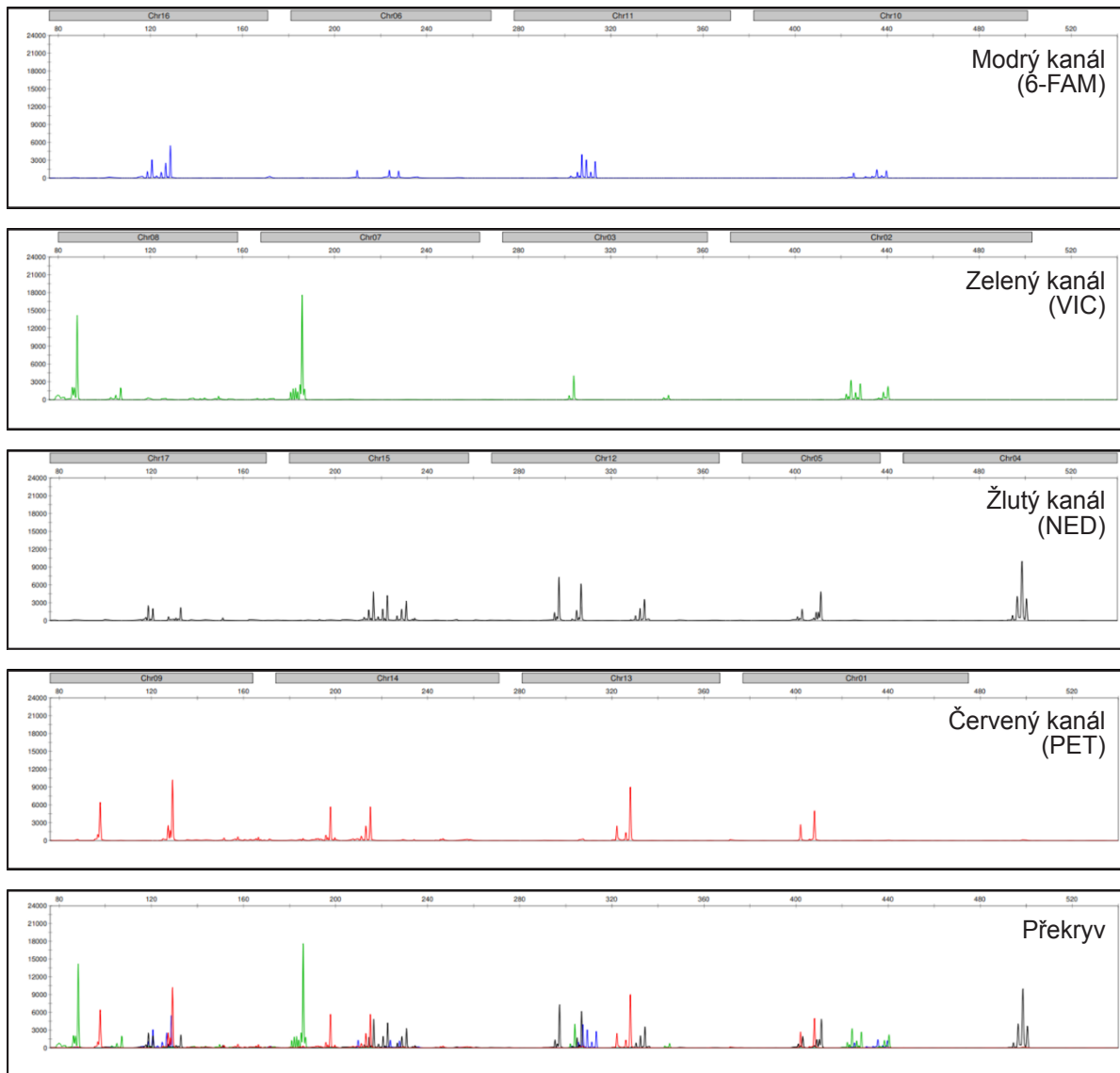
Obrázek 1. Referenční odrůda 'Golden Delicious'.



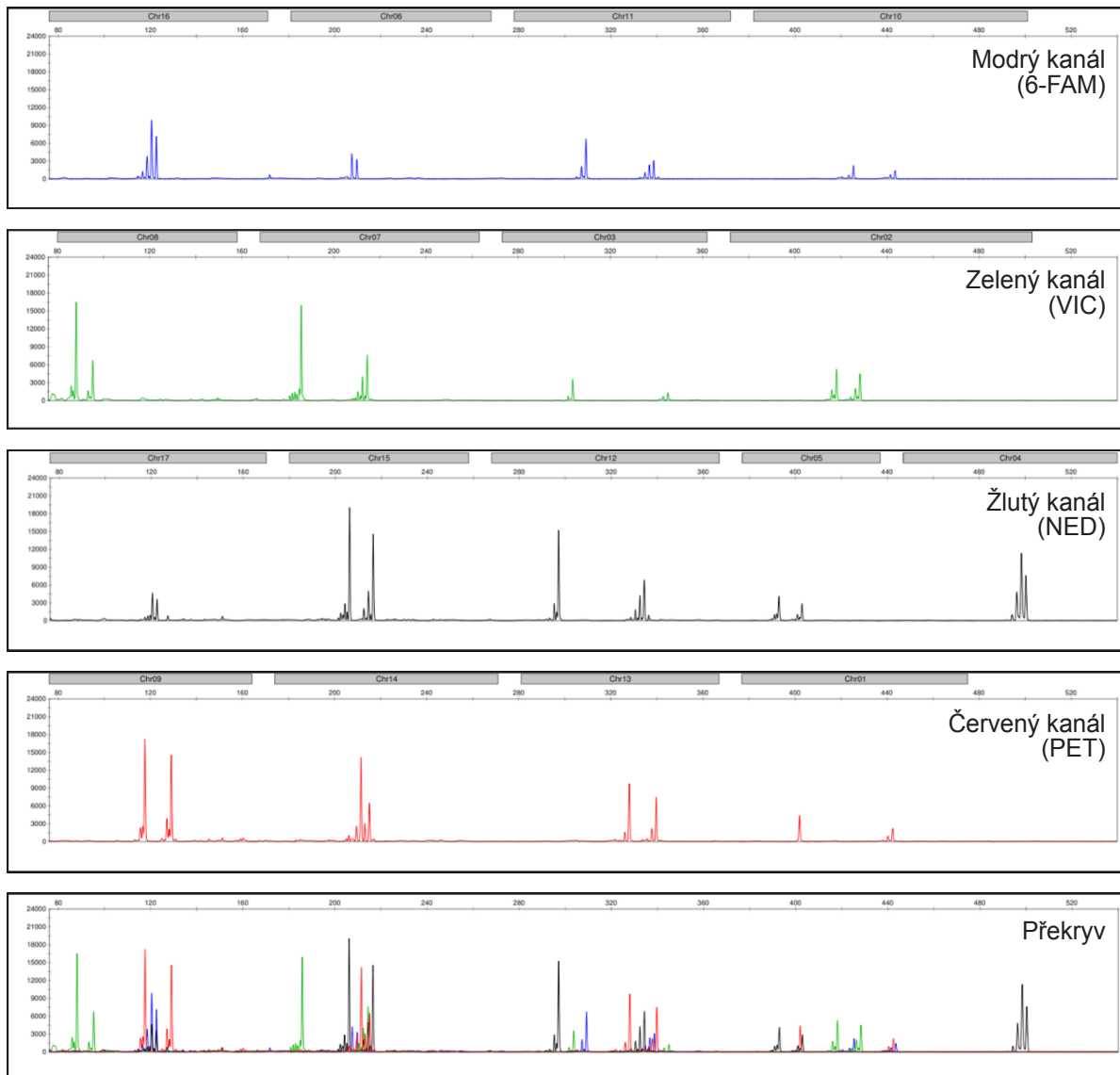
Obrázek 2. Referenční odrůda 'Idared'.



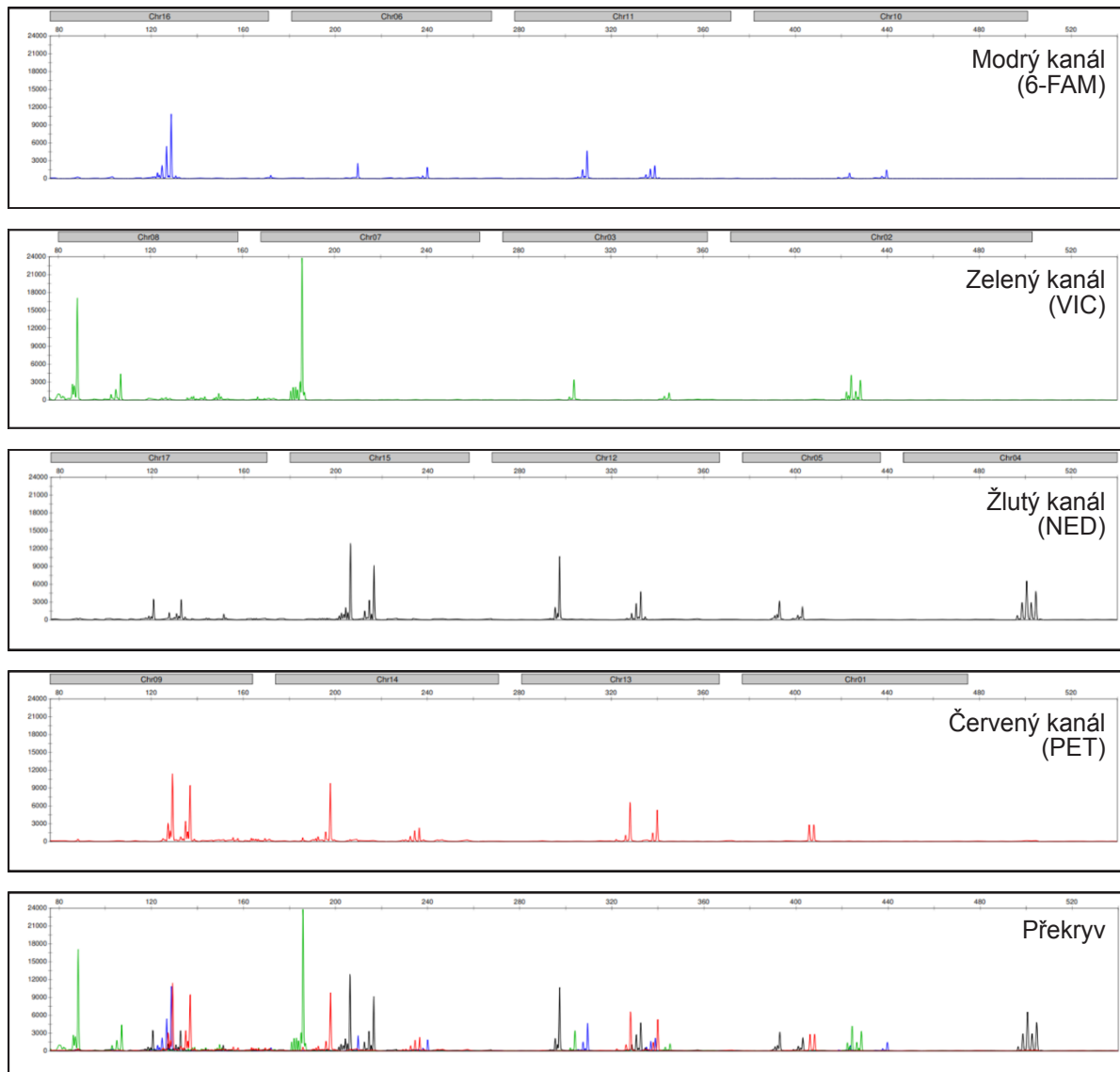
Obrázek 3. Referenční odrůda 'Jonagold' (triploid).



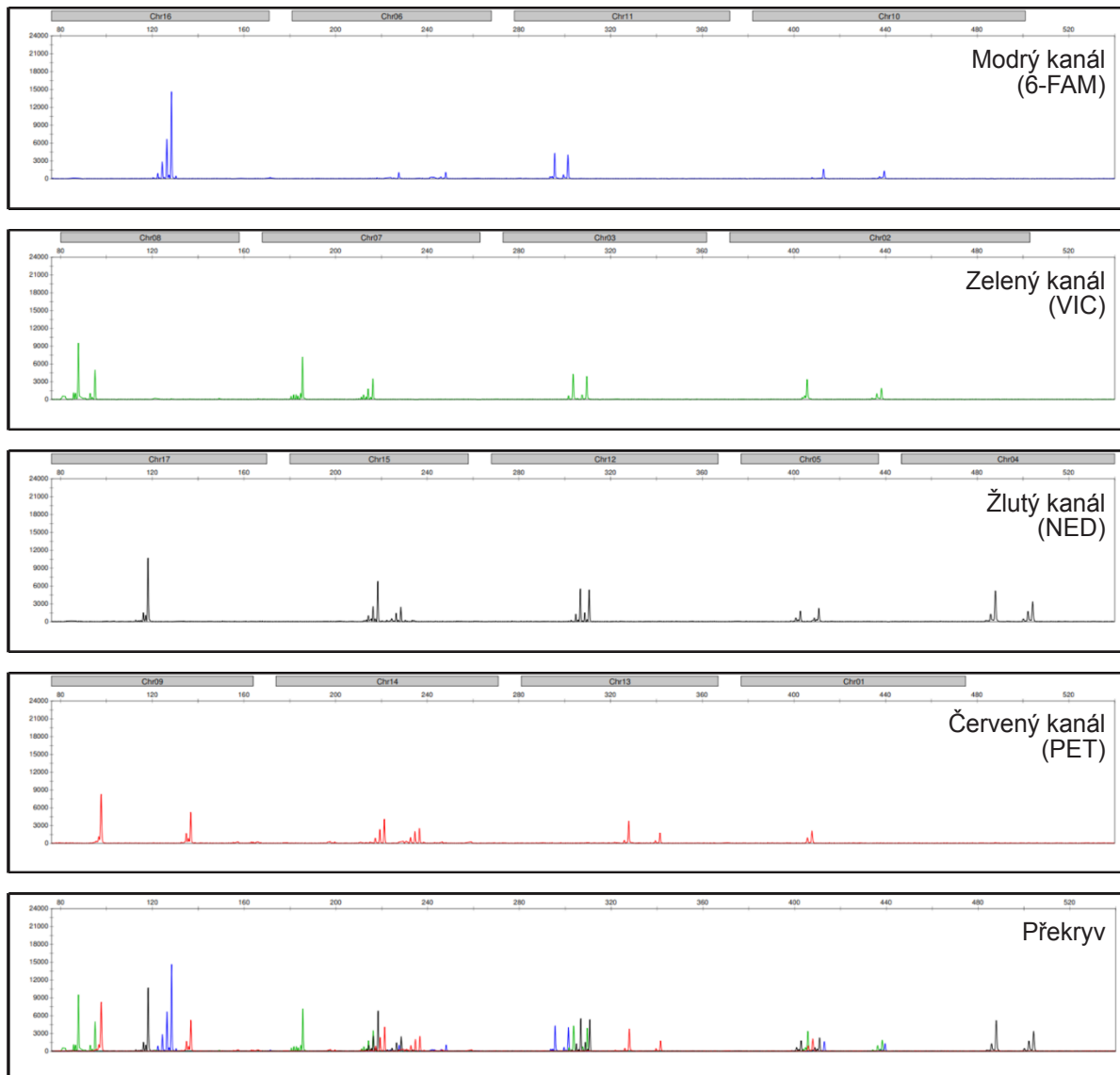
Obrázek 4. Referenční odrůda 'Šampion'.



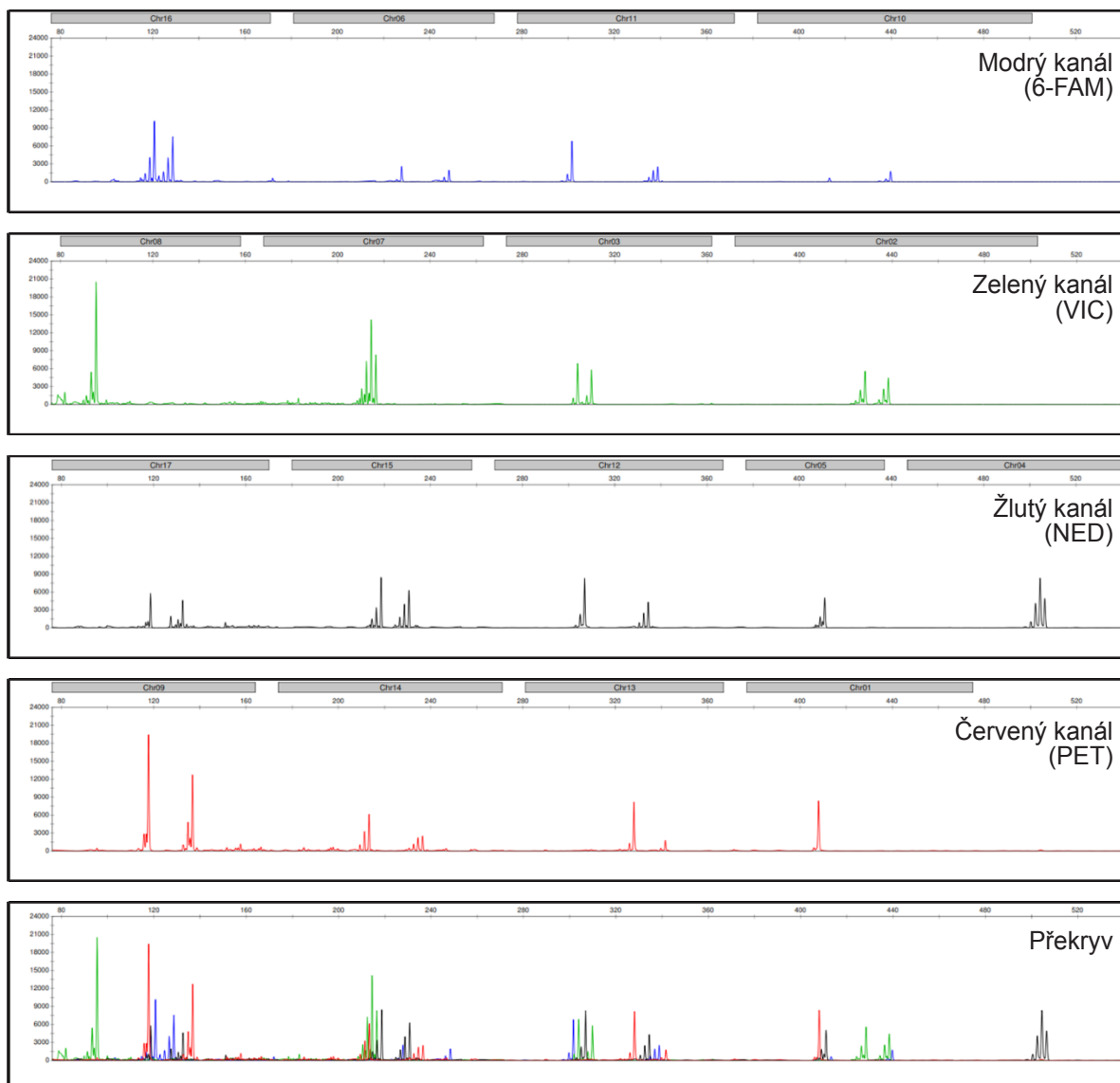
Obrázek 5. Referenční odrůda 'Gala'.



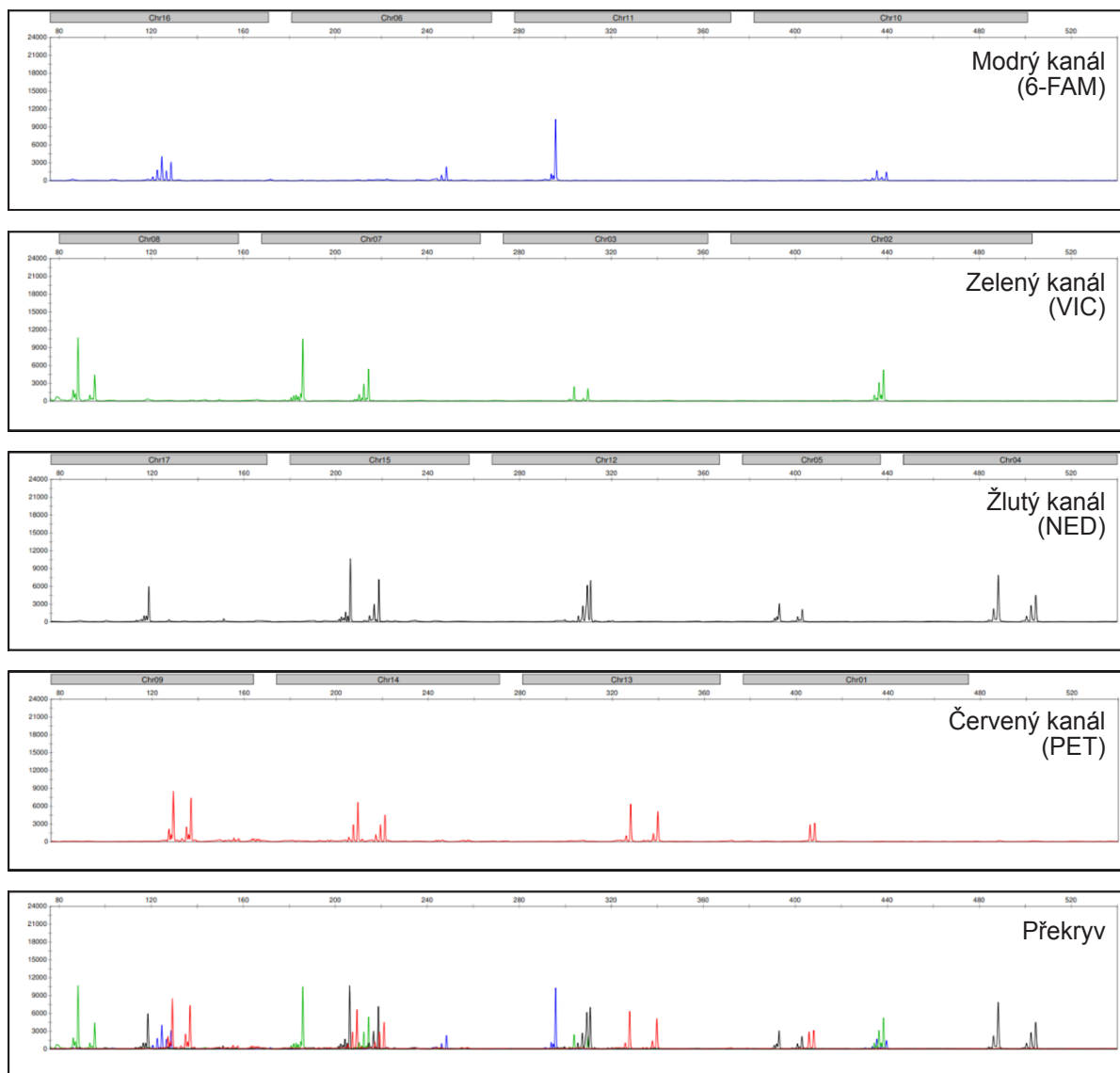
Obrázek 6. Referenční odrůda 'Red Delicious'.



Obrázek 7. Referenční odrůda 'Braeburn'.



Obrázek 8. Referenční odrůda 'Fuji'.



Tabulka 7. Relativní velikosti alel jednotlivých markerů u referenčních odrůd. Odrůdy 'Golden Delicious', 'Idared', 'Šampion', 'Gala', 'Red Delicious', 'Braeburn' a 'Fuji' jsou diploidní, odrůda 'Jonagold' je triploidní. U triploidních odrůd nelze spolehlivě určit, která alele je přítomna ve dvou kopiích.

SSR Marker	Golden Delicious	Idared	Jonagold (triploid)	Šampion	Gala	Red Delicious	Braeburn	Fuji
Hi02c07	402	410	402	402	406	406	408	406
	408	442	408	442	408	408	408	408
	–	–	–	–	–	–	–	–
CH02c06	424	424	424	418	424	405	428	438
	428	440	428	428	428	438	438	438
	–	–	440	–	–	–	–	–
GD12	303	303	303	303	303	303	303	303
	345	303	345	345	345	309	309	309
	–	–	–	–	–	–	–	–
NZ01a6	498	498	498	498	500	488	504	488
	500	498	500	500	504	504	506	504
	–	–	–	–	–	–	–	–
CH05f06	403	403	403	393	393	403	411	393
	411	407	411	403	403	411	411	403
	–	–	–	–	–	–	–	–
CH03d07	209	223	209	207	209	227	227	248
	227	227	223	209	240	248	248	248
	–	–	227	–	–	–	–	–
CH04e05	185	185	185	185	185	185	214	185
	185	240	185	214	185	216	216	214
	–	–	185	–	–	–	–	–
CH01h10	87	95	87	87	87	87	95	87
	106	95	106	95	106	95	95	95
	–	–	–	–	–	–	–	–
CH01f03b	98	116	98	118	129	98	118	129
	129	129	129	129	137	137	137	137
	–	–	–	–	–	–	–	–
CH02c11	425	435	425	425	423	413	413	435
	439	441	435	443	439	439	439	439
	–	–	439	–	–	–	–	–
CH02d08	307	309	307	309	309	295	301	295
	309	313	309	339	339	301	339	295
	–	–	313	–	–	–	–	–
CH01f02	297	309	297	297	297	307	307	309
	307	335	307	335	333	311	335	311
	–	–	335	–	–	–	–	–
GD147	328	322	322	328	328	328	328	328
	328	336	328	340	340	342	342	340
	–	–	–	–	–	–	–	–
CH04c07	198	213	198	212	198	221	213	210
	215	215	215	215	237	237	237	221
	–	–	–	–	–	–	–	–
CH02c09	216	216	216	206	206	218	218	206
	230	222	222	216	216	228	230	218
	–	–	230	–	–	–	–	–
CH05e04	120	124	120	120	128	128	120	124
	128	128	128	122	128	128	128	128
	–	–	–	–	–	–	–	–
CH01h01	118	116	118	120	120	118	118	118
	120	132	120	122	132	118	132	118
	–	–	132	–	–	–	–	–

3.2.5.2 Možné problémy při analýze dat („Troubleshootings“)

Software GeneMapper vyhodnocuje data z fragmentačních analýz automaticky a ve většině případů správně, vyžaduje však kontrolu, neboť není zcela bezchybný. V některých případech může dojít k nevyhodnocení určité alely či k vyhodnocení nesprávné alely, např. z důvodu vyššího pozadí či výrazného „stutteringu“ (kratší varianty dané alely, které vznikají chybovostí DNA polymerázy). Kontrolu je vhodné provádět v softwaru GeneMapper nezávisle dvěma osobami, zvláště jedná-li se o doposud neznámý genotyp. V případech, kdy analýzou dochází pouze k ověření známého (dříve analyzovaného) genotypu, postačuje zpravidla kontrola jedné osoby v kombinaci s porovnáním s předešlými výsledky.

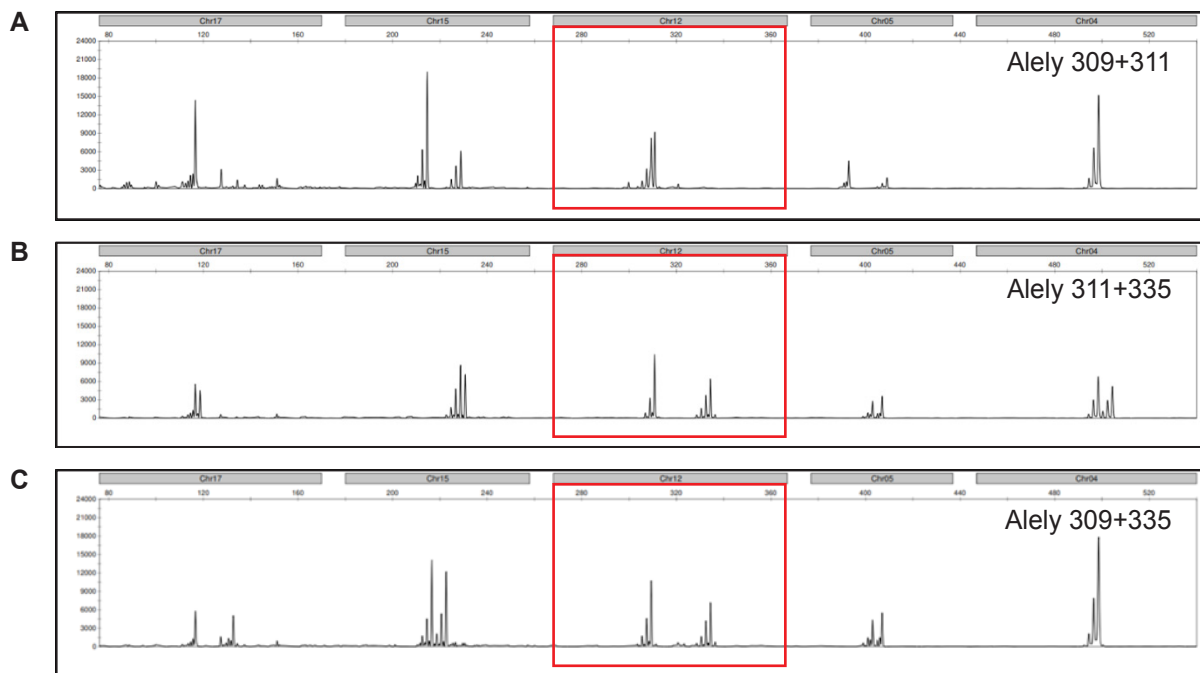
Pokud dojde k problémům s vyhodnocením, je potřeba dané alely porovnat s jinými genetickými profily, kde jsou grafické výstupy jednotlivých alel jednoznačné (tzn. v jiné kombinaci alel s větším délkovým odstupem mezi nimi). V následujícím textu jsou uvedeny nejčastější příklady problematicky vyhodnotitelných alel, kterým je vhodné věnovat zvýšenou pozornost.

3.2.5.2.1 „Stuttering“

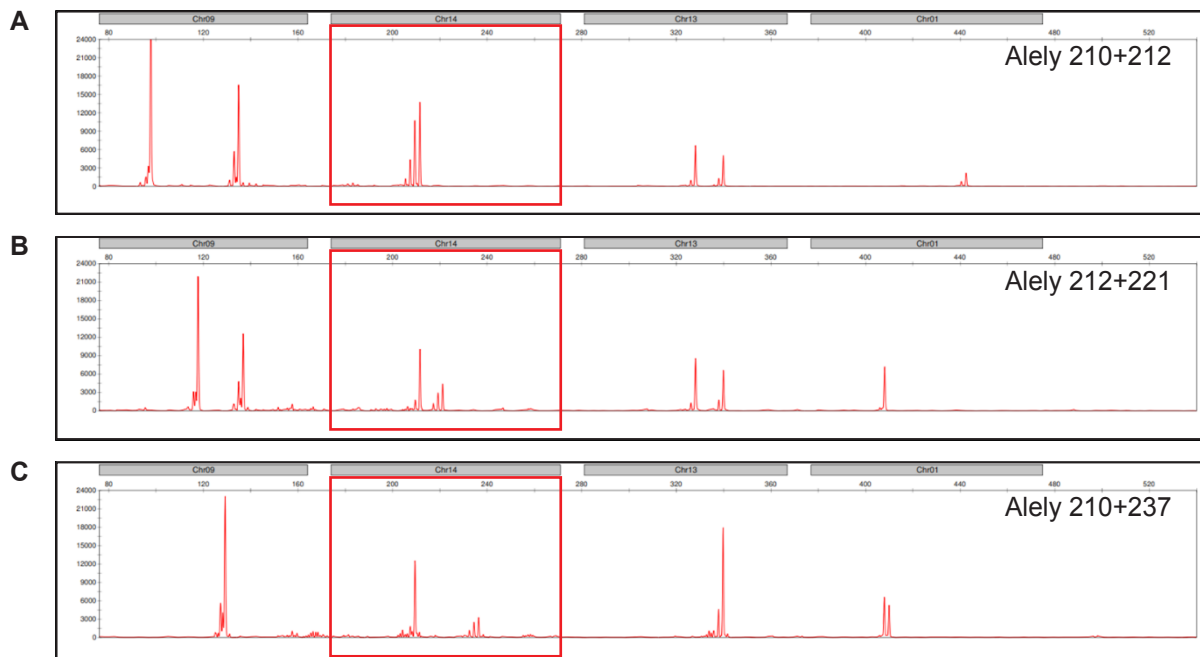
Nejčastější komplikací při vyhodnocování dat je vysoký tzv. „stuttering“ u některých alel. K stutteringu obvykle dochází z důvodu skluzu DNA polymerázy při PCR reakci po nukleotidové repetici zpravidla o délce 1–2 báze. Skluz je dán dočasným oddělením komplexu DNA polymerázy a nově syntetizovaného DNA vlákna od templátové DNA, kdy se v oblastech s repetitivními sekvencemi může polymeráza opětovně spojit s templátovým řetězcem v poloze o jedno nebo dvě opakování před nebo za místem (častější), kde se odpojila. Nejvýraznějším vrcholem zpravidla bývá přesná kopie alely, kratší nebo delší fragmenty lišící se o násobek délky repetice pak vykazují slabší signál. Problematictější vyhodnocení pak může nastat, když dojde k překryvu dvou nebo více „stutterujících“ alel, popřípadě výskytu alely bez stutteru, jejíž velikost se překrývá se se stutterem jiné alely. Na níže uvedených obrázcích jsou uvedeny příklady kombinací alel, které mohou být problematické pro správné vyhodnocení (Obrázky 9–15).

V ojedinělých případech je také možné zaznamenat stutter o jeden nukleotid delší než je přesná kopie dané alely, který může být způsoben tendencí DNA polymerázy přidávat k 3' konci amplifikované sekvence jeden dATP navíc. Z tohoto důvodu je vhodné pro fragmentační analýzu použít DNA polymerázu, která tuto tendenci nevykazuje, nebo jen ve velmi malé míře, např. DNA polymerázu obsaženou v reagentii Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix.

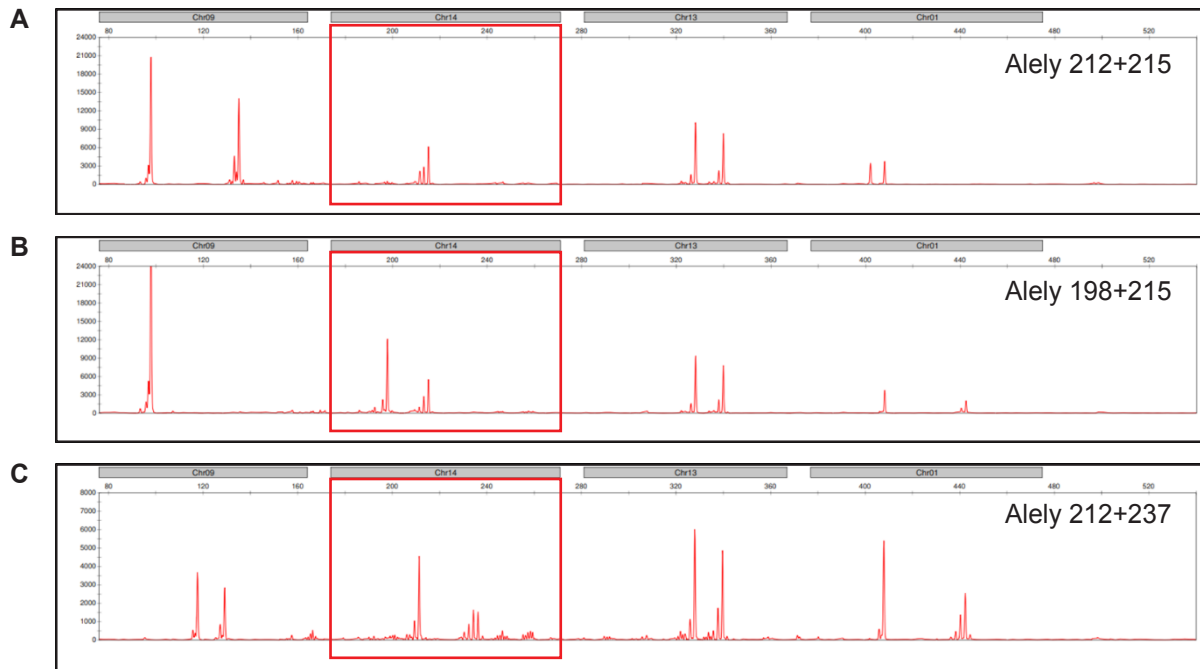
Obrázek 9. Kombinace alel 309 a 311 u markeru CH01f02 ve vazbové skupině chromozomu 12. (A) Alela 309 vypadá jako velmi vysoký stutter alely 311. (B) Alela 311 v kombinaci s alelou 335, kde je vidět, že alela 311 má obvykle nižší stutter. (C) Alela 309 v kombinaci s alelou 335.



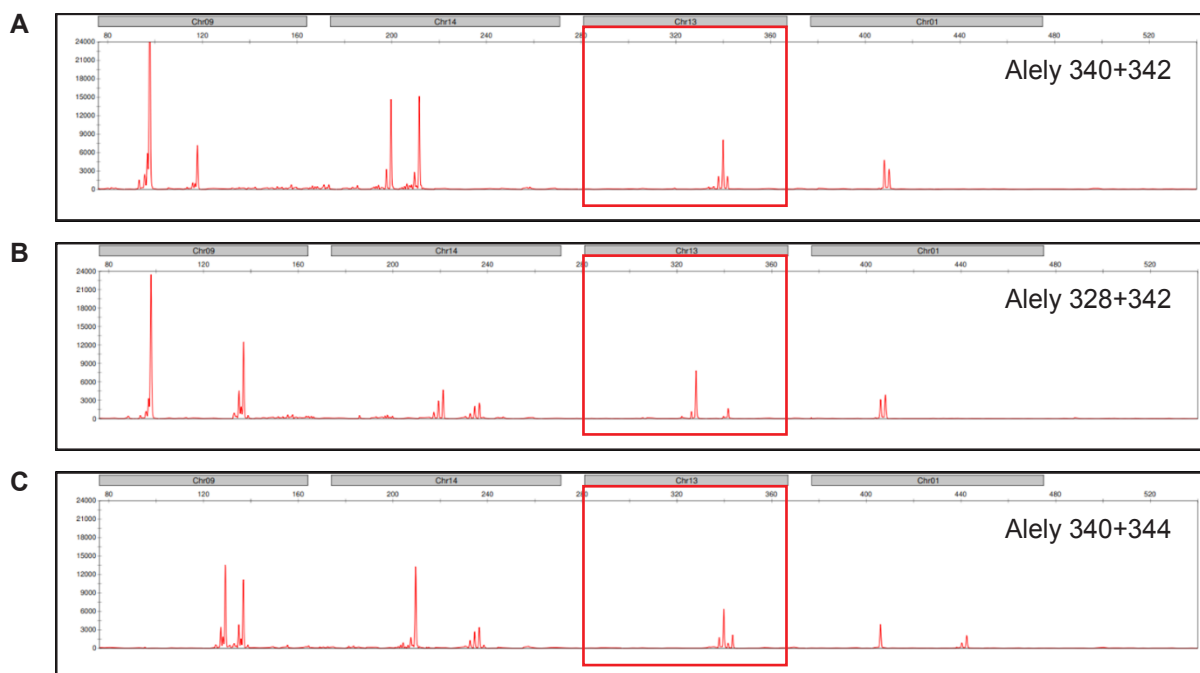
Obrázek 10. Kombinace alel 210 a 212 u markeru CH04c07 ve vazbové skupině chromozomu 14. (A) Alela 210 vypadá jako vysoký stutter alely 212. (B) Alela 212 v kombinaci s alelou 221, kde je vidět, že samostatná alela 212 vykazuje nízký stutter. (C) Alela 210 v kombinaci s alelou 237.



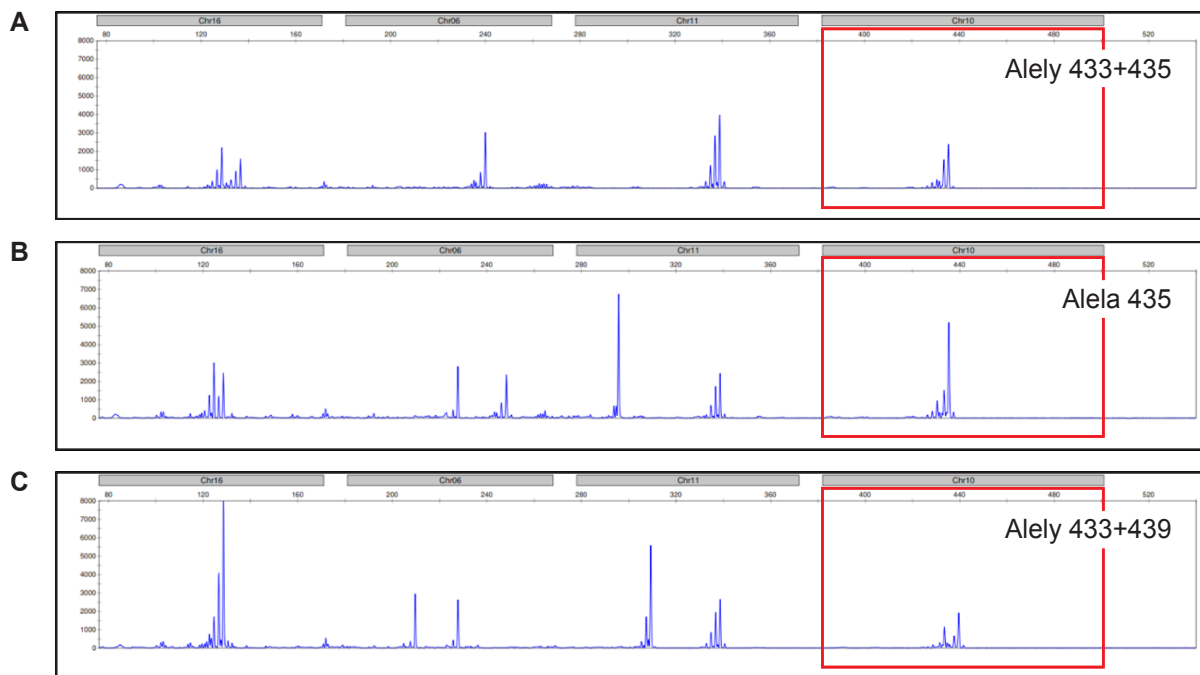
Obrázek 11. Nízký signál alely 212 markeru CH04c07 ve vazbové skupině chromozomu 14. (A) Alela 212 mimikuje stutter alely 215. (B) Alela 215 v kombinaci s alelou 198, kde alela 215 vykazuje oproti obrázku A nižší stutter v pozici o dvě repetice kratší než přesná kopie. (C) Alela 212 v kombinaci s alelou 237.



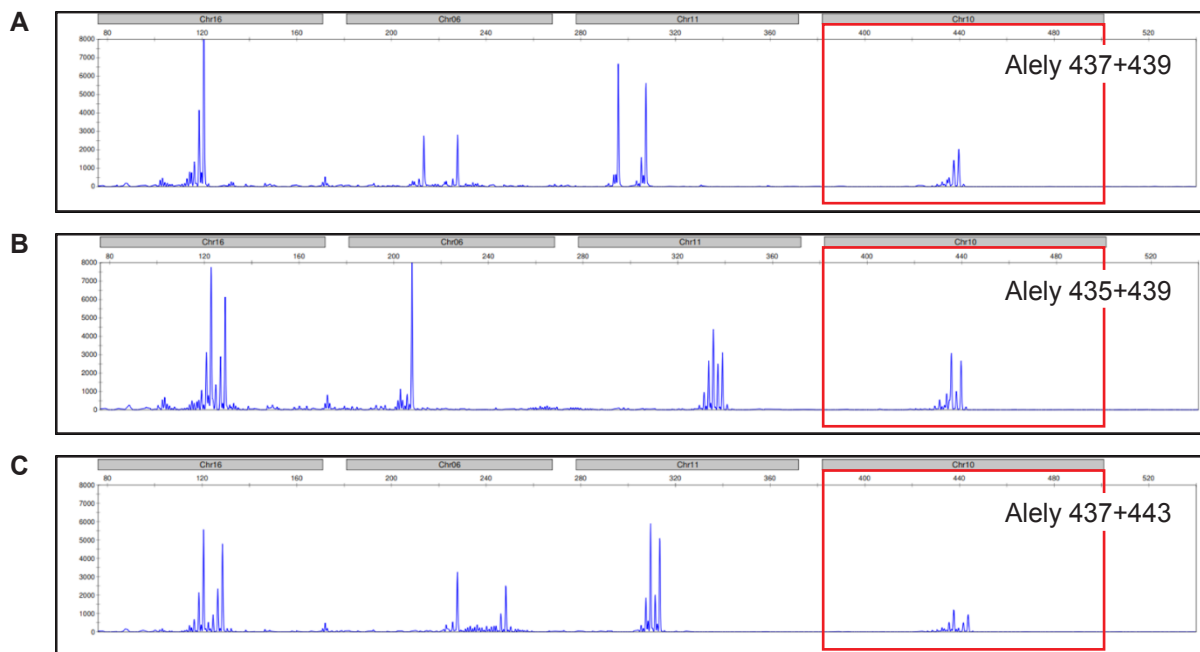
Obrázek 12. Nízký signál alely 342 markeru GD147 ve vazbové skupině chromozomu 13. (A) Alela 342 vykazuje nízký signál oproti alele 340 a mohla by se tak jevit pouze jako delší stutter alely 340. (B) Alela 342 v kombinaci s alelou 328, kde je vidět, že se opravdu jedná o alelu s nižším signálem. (C) Alela 340 v kombinaci s alelou 344, která vykazuje taktéž nižší signál.



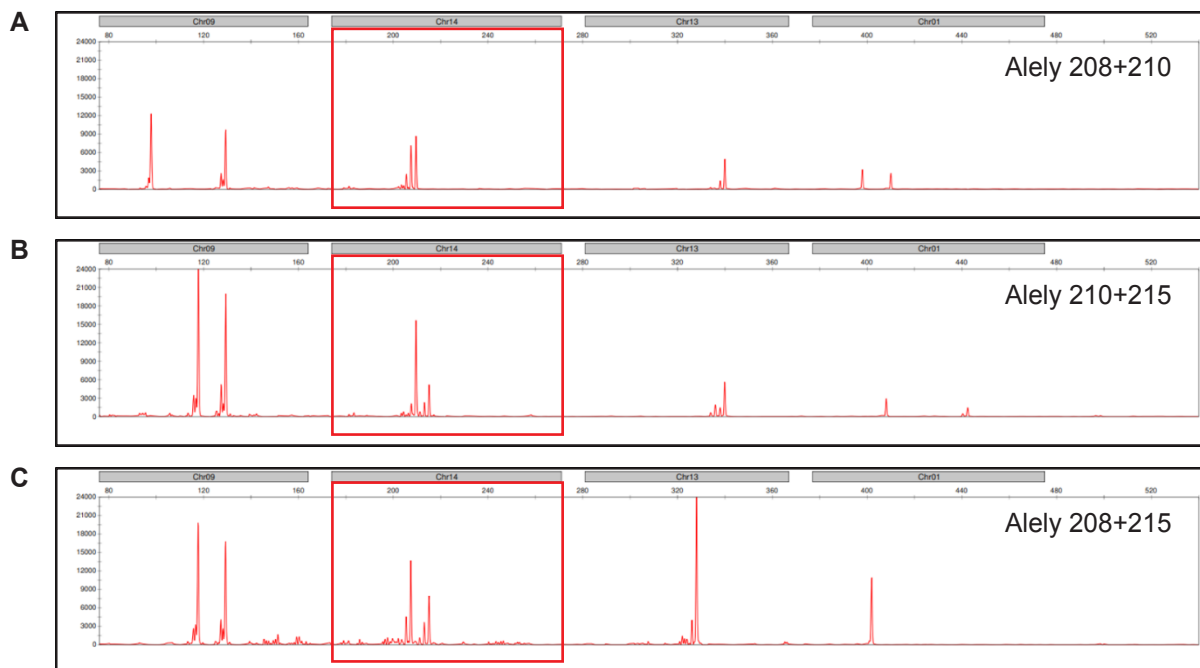
Obrázek 13. Kombinace alel 433 a 435 markeru CH02c11 ve vazbové skupině chromozomu 10. (A) Alela 433 je skryta ve stutteru alely 435. (B) Alela 435 s nižším stutterem než na obrázku A. (C) Alela 433 v kombinaci s alelou 439.



Obrázek 14. Kombinace alel 437 a 439 markeru CH02c11 ve vazbové skupině chromozomu 10. (A) Alela 437 je skryta ve stutteru alely 439. (B) Alela 439 v kombinaci s alelou 435, kde vykazuje nižší stutter než na obrázku A. (C) Alela 437 v kombinaci s alelou 443.



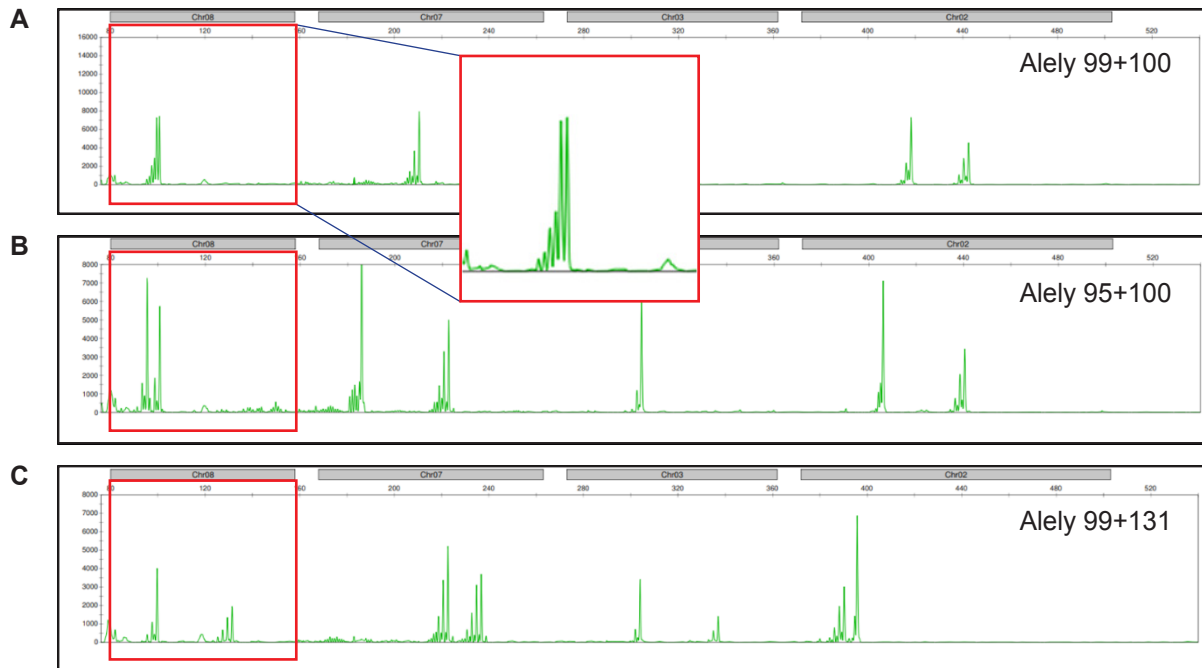
Obrázek 15. Kombinace alel 208 a 210 markeru CH04c07 ve vazbové skupině chromozomu 14. (A) Alela 208 mimikuje vysoký stutter alely 210. (B) Alela 210 v kombinaci s alelou 215, kde vykazuje nižší stutter než na obrázku A. (C) Alela 208 v kombinaci s alelou 215.



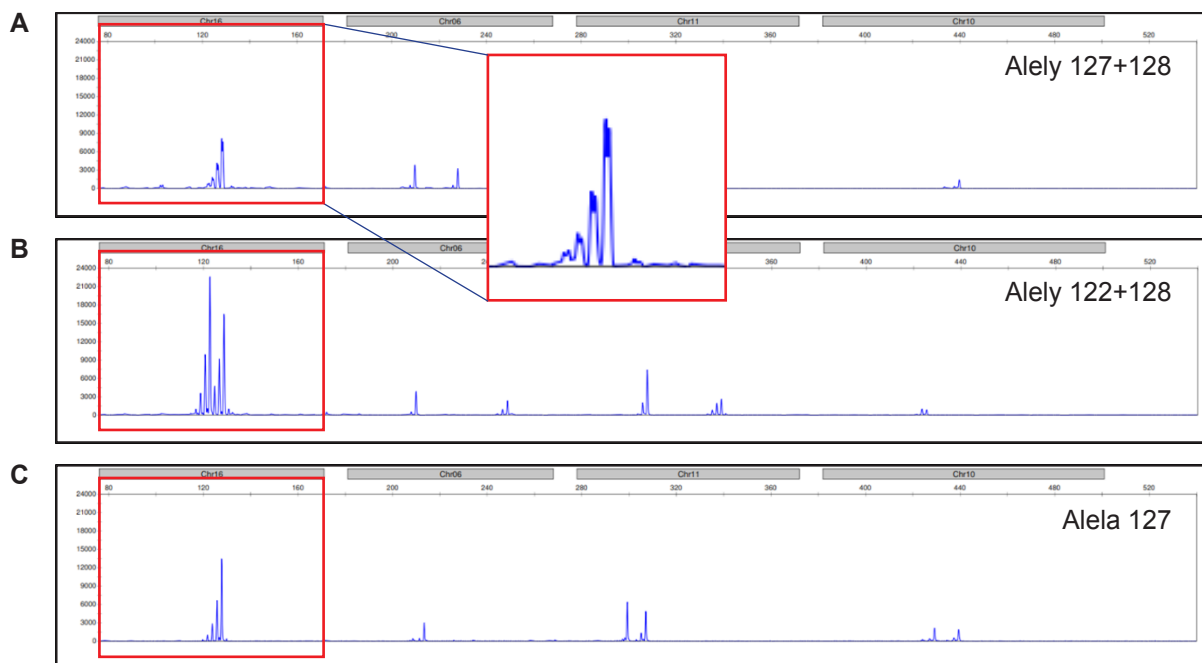
3.2.5.2.2 Alely lišící se pouze o 1 nukleotid

Dalším problémem mohou být alely lišící se pouze o jeden nukleotid. Sice se vyskytují pouze v ojedinělých případech, ale lze je snadno přehlédnout (Obrázky 16 a 17). V případě pochybností se doporučuje danou oblast přiblížit, takže obě alely jsou snadno odlišitelné.

Obrázek 16. Alely 99 a 100 markeru CH01h10 ve vazbové skupině chromozomu 8. (A) Alely 99 a 100 liší se pouze o 1 nukleotid. (B) Alely 95 a 100. (C) Alely 99 a 131.



Obrázek 17. Alely 127 a 128 markeru CH05e04 ve vazbové skupině chromozomu 16. (A) Alely 127 a 128 liší se pouze o 1 nukleotid. (B) Alely 122 a 128. (C) Alela 127.

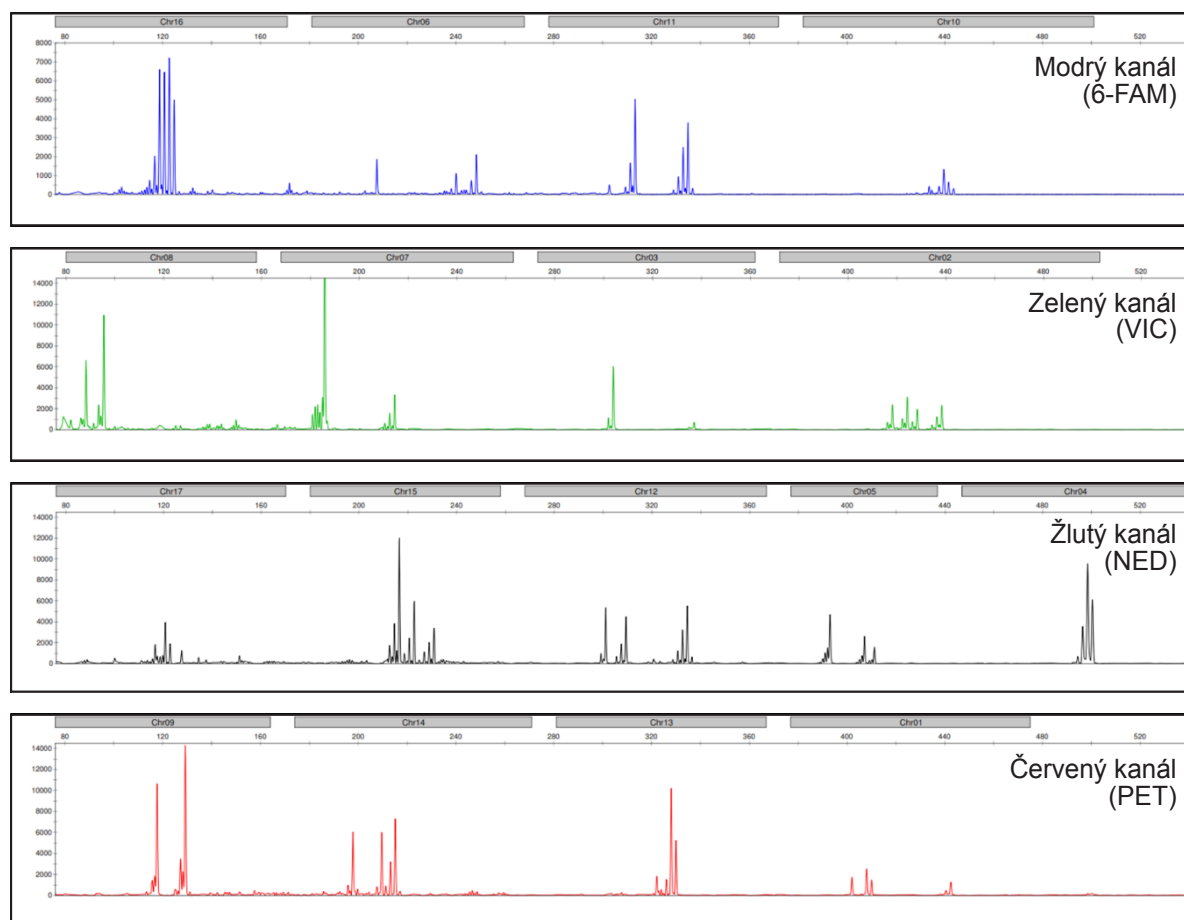


3.2.5.2.3 Zdroj chyb v pre-analytické a analytické fázi

Při hodnocení výsledků je také třeba brát do úvahy, že k případné chybě mohlo dojít již v pre-analytické nebo analytické fázi. V takových případech se jedná například o chybný odběr vzorků nebo o záměnu vzorků při manipulaci se vzorky (zamrazování pleťiva, izolace DNA, aj.), což při samotné analýze elektroforeogramů není patrné a chybu je možno odhalit pouze při porovnávání výsledků jednotlivých genotypů z různých odběrů. Pro odhalení této chyby se proto doporučuje provádět analýzu dvou nezávisle odebraných vzorků, které musí mít ve výsledku stejný genetický profil.

Naopak v případech kontaminace nebo neúmyslného smíchání více vzorků dohromady při analýze více listů či lýka z více výhonů (například propletené větve sousedních stromů v sadu, naroubování více odrůd na jeden strom, prorůstání podnože) jsou chyby často patrné již ze samostatného elektroforeogramu, neboť vznikají víceploidní profily. Ve většině případů vznikají tetraploidní profily, a to po smíchání dvou diploidních vzorků (Obrázek 18). Tetraploidní jabloně sice existují, ale zastupují tak velmi nízké procento všech známých kultivarů, že je vhodné tetraploidní nález vždy ověřit, ideálně provést nový odběr vzorku. Pentaploidní a hexaploidní profily vždy indikují směsný vzorek.

Obrázek 18. Příklad tetraploidního profilu, kdy došlo ke smíchání odrůd 'Rubimeg' a 'Delén'.



3.3 Příklady využití metodiky pro genotypizaci jabloní

Níže uvedené příklady využití metodiky pro genotypizaci jabloní jsou pouze ilustrační a v žádném případě nejsou vyčerpávající.

3.3.1 Tvorba referenční databáze pro účely ověřování a identifikace odrůd

Ověřování a identifikace odrůd jsou příklady aplikací, pro které je nutné mít vytvořenu referenční databázi odrůd, s kterou je možné srovnávat získané genetické profily testovaných vzorků. Zatímco při ověřování se zpravidla odpovídá na otázku, zda jsou testované vzorky shodné se známou referenční odrůdou, pro identifikaci neznámé odrůdy musí být k dispozici co nejrozsáhlejší kolekce ověřených odrůd. Dle účelu lze tedy vytvářet různé typy referenčních databází.

3.3.1.1 Referenční databáze pro pěstitelskou praxi v České republice

Pro pěstitelskou praxi je vhodná databáze nejčastěji pěstovaných odrůd. Dle šetření Českého statistického úřadu z roku 2017 (ČSÚ, 2017) byly ve věku 5–14 let nejčastěji pěstovány následující odrůdy (Tabulka 8):

Tabulka 8. Nejčastěji pěstované odrůdy v České republice ve věku 5–14 let k roku 2017.

	Plocha sadů celkem [ha]	V tom podle stáří stromů [ha]			
		0–4 roky	5–14 let	15–24 let	25 a více let
Jabloně celkem	10 487,01	1 769,61	2 194,69	2 059,74	4 463,01
V tom skupiny odrůd:					
Golden Delicious	2 065,52	256,87	639,52	239,87	929,26
Idared	1 786,40	128,3	161,84	474,9	1 021,35
Jonagold/Jonagored	724,84	195,95	330,77	169,09	29,04
Shampion	560,65	114,86	78,77	178,29	188,73
Gala	339,64	111,26	200,62	25,67	2,09
Red Delicious	160,21	4,07	5,48	6,21	144,45
Braeburn	136,95	88,04	20,98	27,91	-
Elstar	41,88	-	2,3	33,72	5,86
Boskoop Rouge	29,16	0,16	11,43	1,86	15,71
Pinova	16,34	-	7,27	9,05	-
Fuji	13,3	0,26	6,03	7,01	-
Cox Orange	13,17	-	0,16	1,12	11,89
Granny Smith	11,88	-	1,24	5,02	5,61
Ostatní	4 587,07	869,81	728,28	880,02	2 109,00

Postupně také dochází k obměně sadů a rozšiřují se moderní odrůdy, jako jsou např. 'Opál', 'Rubín', 'Meteor', 'Antopa', 'Artiga' či 'Rubelit'. Moderní také začínají být sloupcovité odrůdy, např. 'Rumba', 'Lambada', 'Slendera' či 'Cumulus'. V České republice jsou v prodeji také velice populární konzumní jablka nově vyšlechtěných odrůd dovezená

ze zahraničí např. 'Cripps Pink' (známá pod obchodním názvem Pink Lady) nebo 'Crimson Snow'. Genetické profily referenčních odrůd jsou uvedeny v kapitole 3.2.5.1 v Tabulce 7 a lze je využít pro ověření nejčastěji pěstovaných odrůd.

Jak bylo již zmíněno, u některých odrůd existuje mnoho mutací (klonů) (Tabulka 9), které však není možné pomocí této metodiky odlišit. Identifikaci klonů je nutné řešit na úrovni sekvencí celého genomu, typické polymorfizmy pro jednotlivé mutace však dosud nebyly popsány.

Tabulka 9. Příklady odrůd a jejich nejznámějších mutací (klonů).

Odrůda	Nejznámější mutace
Rubín	Dark Rubín, Rubín Spur, Gold Bohemia, Bohemia, Red Bohemia
Gala	Galaval, Royal Gala, Galaxy, Gala Must , Baygent, Fendeca, Brookfield
Golden Delicious	Golden Reinders, Golden Parsi, Golden Smoothe
Melrose	Melrouge, Melrouse Beaumont
Fuji	Fuji BC 2, Fuji Nagafu 2, Aki-Fu 1, Kiku
James Grieve	James Grieve Super Kompakt, James Grieve Red, James Grieve Double Red
Red Delicious	Top Red, Ace Delicious, Red Cap
Jonagold	Jonica, King Jonagold, Jonagored, Red Jonaprince, Marnika,
Boskoopské	Boskoopské červené, Rode Boskoop Verheul

3.3.1.2 Referenční databáze pro účely uznávacího řízení odrůd jabloní

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

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

Metodika genotypizace jabloní může být uplatněna jak na začátku odrůdových zkoušek pro účely registrace či ochranných práv, zda se jedná o novou odrůdu nebo mutaci známe odrůdy, tak zejména při ověřování odrůd při prodlužování registrace. V rámci uplatnění metodiky byla provedena prvotní analýza referenčního souboru NOÚ – celkem bylo ověřeno 335 odrůd/genotypů, z nichž 41 (12 %) odrůd bylo triploidních, ostatní byly diploidní (88 %). Detailní genetické profily odrůd má NOÚ k dispozici a předpokládá zavedení metodiky genotypizace jabloní do své praxe.

Metodiku mohou také využít šlechtitelé jabloní, kterým umožňuje na základě znalosti genetického profilu jejich odrůd jednoduše kontrolovat, zda pěstitelé dodržují licenční podmínky jejich pěstování.

3.3.1.3 Referenční databáze pro sbírkové účely

Česká legislativa ukládá (zejména zákony č. 368/1992 Sb. a 148/2003 Sb.) a upravuje základní podmínky pro shromažďování, hodnocení, dokumentaci, konzervaci a využívání genetických zdrojů rostlin a mikroorganismů, které jsou důležité pro výživu a zemědělství v rámci Akčního plánu konzervace a využívání genetických zdrojů. Mezi tyto komodity patří i ovocné druhy včetně jabloní, které jsou uchovávány v genofondových sbírkách, a informace o nich, jakožto i o dalších ovocných druzích jsou vedeny v databázi [GRIN Czech](#), kterou spravuje Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.

Genofondy nabývají na důležitosti zejména v poslední době s uplatňováním evropské agendy tzv. „Green Deal“ s cílem snížit spotřebu hnojiv a prostředků na ochranu rostlin, neboť jednou z možností může být cílené šlechtění odrůd s požadovanými vlastnostmi. Genofondy totiž shromažďují původní odrůdy, staré a krajové odrůdy, či nekulturní druhy jabloní, které mohou být zajímavým zdrojem znaků pro moderní šlechtitelské programy, jako jsou např. zvýšení odolnosti odrůd vůči chorobám nebo (a)biotickým faktorům.

Aby bylo možné s genofondovými položkami pracovat, je nezbytné je kromě fenotypových/fenologických znaků charakterizovat také geneticky, aby mohl být jejich potenciál zcela využit (v rámci předcházející studie byla předkládaná metodika využita pro charakterizaci části genofondové sbírky jabloní VŠÚO; Cmejlova, 2021). Znalost co největšího množství genetických profilů odrůd umožňuje i další aplikace, např. identifikaci neznámých odrůd ze starých výsadeb, alejí či zámeckých zahrad v rámci zkoumání kulturního dědictví na území naší republiky.

3.3.2 Prověření produkčního řetězce výroby jabloňových výpěstků

Postupy genotypizace jabloní lze s výhodou uplatnit ve školkařské praxi pro kontrolu výroby jabloňových výpěstků, neboť pro jejich přípravu se používá vegetativní rozmnožovací materiál – očka, rouby, takže geneticky se stále jedná o stejný organizmus. Produkční řetězec výroby jabloňových výpěstků zahrnuje několik kroků a využívá rozmnožovací materiál několika stupňů kvality, který mají školkaři k dispozici ať již ve svém vlastnictví, nebo formou subdodávky. Jedná se zpravidla o:

- ▶ Registrovaná, resp. chráněná odrůda NOÚ
 - ▶ Šlechtitel jako primární zdroj odrůdy
 - ▶ Matečnice v technické izolaci jako zdroj zdravého rozmnožovacího materiálu
 - ▶ Prostorové izoláty jako hlavní zdroj rozmnožovacího materiálu pro výpěstky
 - ▶ Příprava finálních výpěstků (očkování, roubování)
 - ▶ Prodej

V průběhu produkčního řetězce je tak nutné zajistit, aby v každém kroku došlo k přenosu rozmnožovacího materiálu požadované odrůdy a nedošlo k záměně. Pro kontrolu těchto klíčových bodů je pak možné s výhodou využít předkládanou metodiku, která

byla exemplárně zavedena do praxe ve dvou výrobních podnicích. V obecné rovině lze doporučit následující postup:

- 1) Předpokladem pro využití metodiky v praxi je zavedení unikátního značení konkrétních stromů, které se používají jako zdroj rozmnožovacího materiálu ve výrobním procesu.
- 2) Výhodou je zavedení řízené dokumentace pro evidenci toku rozmnožovacího materiálu výrobním podnikem, aby bylo v případě problému možné dohledat konkrétní strom(y) a šarži výpěstků, u kterých došlo k záměně, a včas a rychle identifikovat příčinu případných problémů.
- 3) Vytvoření referenční databáze genetických profilů konkrétních stromů používaných jako primární zdroj rozmnožovacího materiálu (matečnice), pokud je má výrobní podnik k dispozici. Případné ověření zdroje u subdodavatele nebo šlechtitele.
- 4) Ověření pravosti odrůdy s využitím referenční databáze genetických profilů při NOÚ.
- 5) Vytvoření a průběžná aktualizace genetických profilů všech stromů používaných pro výrobu rozmnožovacího materiálu/stromků (prostorové izoláty).
- 6) Vytvoření referenční databáze odrůd pěstovaných/množených v daném podniku.
- 7) Namátková kontrola prodávaných výpěstků a jejich srovnání s referenční databází. Cílená kontrola v případě podezření na záměnu.

Finančně nejnákladnějším (dle počtu udržovaných odrůd) může být vytvoření vnitropodnikové databáze. Vzhledem k dlouhověkosti stromů však bude možné získané informace používat v dlouhém časovém období, protože genetický profil se s věkem nemění. Množství vzorků pro namátkovou kontrolu stromků určených k prodeji pak lze již modifikovat podle odrůdové skladby a množství prodávaného sortimentu (experimentálně ověřováno cca 10 % finální produkce). Pro zlevnění a zrychlení provedení analýz lze využít i možnost přípravy směšného vzorku (ze 3 až 4 stromů) při očekávání stejného genetického profilu (např. stejná šarže výpěstků). U otestovaných stromů/výpěstků lze pak deklarovat genetické ověření odrůdy.

V minimalistickém provedení lze provádět pouze krok 7) u vybraných odrůd a provést srovnání pouze s danou referenční odrůdou. V případě nálezu diskrepance však nebude zřejmé, v jakém kroku výrobního procesu k chybě došlo.

3.3.3 Ověřování odrůdové pravosti u plodů

Standardně se genotypování provádí ve vegetačním období z listů, případně z lýka v době dormance. Izolace DNA z těchto částí rostlin je u jabloní bezproblémová, což umožňuje standardizaci celé metody. Předkládaná metodika však umožňuje provést genotypizaci a ověřování odrůd i z čerstvých nebo sušených plodů (křížaly) a lze ji tak využít pro kontrolu odrůdové pravosti v postprodukčních procesech v případě, kdy je odrůda deklarována např. při vyskladňování, při prodeji v obchodě nebo u odrůdových výrobků. Postup byl ověřen na čerstvých plodech a křížalách zakoupených v obchodě, které byly deklarovány jako odrůda 'Opál'.

Metodika tak může být využita i dozorovými orgány, do jejichž kompetence spadá ochrana spotřebitelů, jako např. Česká obchodní inspekce (ČOI), Státní zemědělská a potravinářská inspekce (SZPI) nebo Celní správa.

4 SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ

V České republice nebyla doposud možnost genotypizace jabloní k dispozici a k odlišování odrůd se používají standardní fenologické/fenotypové deskriptory. Jejich použití je však vázáno na dlouhodobější sledování a *ad hoc* určování odrůd, ať již podle habitu stromů nebo plodů, je extrémně závislé na zkušenosti posuzovatele a může být zatíženo subjektivní chybou. Naproti tomu genotypizace jabloní dle této metodiky je spolehlivá, přesná, využitelná po celý rok a výsledky lze v případě potřeby získat během několika hodin. Zavedení této metodiky do praxe tak představuje nový kvalitativní skok na celonárodní úrovni pro všechny potenciální uživatele.

Poznámka k novosti postupu vlastního procesu genotypizace

Pro jabloně byla popsána celá řada SSR markerů (např. Guilford, 1997; Hokanson, 1998; Liebhard, 2002; Silfverberg-Dilworth, 2006 a mnoho dalších), pro porovnatelnost genotypizačních dat mezi jednotlivými laboratořemi však mezinárodně uznávaný Evropský kooperativní program pro rostlinné genetické zdroje (The European Cooperative Programme for Plant Genetic Resources, [ECPGR](#)) doporučil jako standardizovaný protokol fragmentační analýzu 12 SSR markerů (Fernandez, 2013), přestože při použití těchto 12 SSR markerů byla již dříve při analýze 2 162 odrůd jabloní pěstovaných v genofondu 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/nežádoucí duplicity 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). Od té doby byla provedena řada dalších genotypizačních studií, nicméně nejvýznamnější je práce Urrestarazu a kol. (2016), v které bylo analyzováno více než 2 400 odrůd jabloní z celé Evropy. Pro snížení pravděpodobnosti náhodné shody mezi odlišnými odrůdami zde byla genotypizační sada markerů doporučených ECPGR rozšířena na 16 SSR markerů pocházejících z 15 různých chromozómů jabloně. Analýza probíhala ve 4 multiplexech, což bylo velmi pracné a finančně náročné.

Na základě výše uvedených dat byla na pracovišti VŠÚO genotypizace jabloní fragmentační analýzou inovována: i) bylo použito 17 SSR markerů, přičemž každý pocházel z jiného chromozómu pro další účinné zvýšení schopnosti diskriminace jednotlivých odrůd (obsahuje i markery doporučené ECPGR); ii) byla navržena taková sada primerů, aby mohla amplifikace probíhat v jediné reakci s cílem snížit cenu analýz a omezit chybovost při provádění analýz; iii) byla zachována zpětná kompatibilita s výsledky získanými původními postupy; iv) genotypizační sada vykazovala pravděpodobnost shody dvou neidentických vzorků $1,7 \times 10^{-22}$. Genotypizace jabloní s využitím jediné reakce je celosvětově

zcela unikátní a byla zmíněna i v nedávno publikovaném obsáhlém review o genotypizaci pomocí SSR markerů u ovocných plodin (Testolin, 2023).

5 POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY

V ovocnářství je určení identity vegetativně množeného rozmnožovacího materiálu hlavním faktorem pro kontrolu odrůdové pravosti a následnou certifikaci sadby. Spolehlivé metody identifikace jsou důležité pro zkušební a certifikační orgány, producenty a prodejce rozmnožovacího materiálu (školky, roubové množárny), majitele sadů, ale také pro dodavatele a prodejce jablek a produktů z nich (např. křížaly), u kterých je deklarována odrůda. Z tohoto okruhu se rekrutují i potenciální uživatelé této metodiky:

- ▶ Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Národní odrůdový úřad využije tuto metodiku pro kontrolu novosti přihlašovaného materiálu a shody s původním materiálem v případě prodlužování registrace odrůdy.
- ▶ Ovocnářská unie ČR může metodiku zavést pro rutinní ověřování odrůdové pravosti prodávaného či množeného materiálu.
- ▶ Pěstitelé mohou metodiku zavést do své pěstitelské praxe pro ověřování odrůdové pravosti sazeného materiálu do ovocného sadu.
- ▶ Šlechtitelé mohou ověřovat rodičovský původ nových odrůd.
- ▶ Státní zemědělská a potravinářská inspekce a Česká obchodní inspekce může díky metodice ověřovat odrůdovou pravost u prodávaných plodů nebo produktů z nich.
- ▶ Celní správa může ověřovat dovážené a vyvážené deklarované zboží.

O využití metodiky genotypizace jabloní však projeví zájem i další zájemci:

- ▶ Instituce a společnosti udržující genofondové sbírky jabloní mohou metodiku využít ve své praxi, např. pro ověřování úspěšnosti přenosu odrůdy/genotypu z jednoho místa na jiné, např. z důvodu stáří výsadby a její obnovy.
- ▶ S rozšiřováním péče o krajinu roste zájem i o staré a krajové odrůdy jabloní, ať už se jedná o novou výsadbu, nebo o objevování a udržování starých sadů, alejí či solitérních stromů. Vzhledem k dlouhověkosti stromů se však většinou vytrácí povědomí o jejich historii a původu, a protože se zpravidla jedná o velmi staré nebo lokální odrůdy, bývá velmi obtížné tyto odrůdy určit podle fenotypových/fenologických znaků. Metodiku genotypizace jabloní lze tak využít pro charakterizaci těchto stromů, které v jistém smyslu představují naše kulturní dědictví, o které se starají např. občanské spolky, obce či správy národních parků.

6 EKONOMICKÉ ASPEKTY

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

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

V České republice bylo v roce 2022 vysazeno v produkčních sadech na ploše 7 011 ha celkem 10 340 000 stromů jabloní, které poskytly výnos 131 353 tun ovoce (ČSÚ). Po přepočtu byl jeden hektar průměrně osázen 1 475 stromy. Jeden strom v tomto roce vyprodukoval průměrně 12,7 kg jablek, z jednoho hektaru pak byl průměrný výnos 18 732,5 kg. Průměrná výkupní cena 1 kg jablek byla v roce 2022 na základě údajů Agrární komory/Českého statistického úřadu 13,075 Kč (přehledně uvedeno např. zde [TV Nova](#), týdenní vývoj cen lze nalézt na stránkách Státního zemědělského intervenčního fondu (SZIF), cena se liší i v závislosti na odrůdě (viz pravidelné [Zprávy o trhu ovoce SZIF](#)). Při uvažovaném nulovém výnosu kvůli nevhodně osázenému sadu tak dochází k průměrné ztrátě výnosů z prodeje cca 245 000 Kč/ha/rok, přičemž osázení sadu jinou odrůdou lze zpravidla rozpoznat až po třech letech, kdy začíná plodit. Ztráta z produkce tak může teoreticky být až 750 000 Kč/ha/3 roky, ve skutečnosti však bude o něco nižší, neboť mladý sad nebude ještě dosahovat průměrných publikovaných výnosů na hektar (průměrné stáří jabloně v českých sadech spadá do skupiny stromů 15–24 let, ČSÚ). Další náklady však přináší výsadba nesprávné odrůdy (pořízení stromků, náklady na jejich výsadbu) a udržování celého sadu až do rozpoznání nesprávnosti vysazené odrůdy. Tyto náklady budou velmi individuální, pro orientaci uvádíme informace k výši dotace na restrukturalizaci ovocných sadů v režimu ekologického zemědělství pro rok 2023 (SZIF): výše dotace do 50% skutečně vynaložených uznatelných nákladů souvisejících s předmětem dotace, maximálně však:

- i) do 240 000 Kč/ha nově vysázeného ovocného sadu uznanou sadbou jabloní, hrušní, meruněk, broskvoní (nektarinek), slivoní (kromě myrobalánu), třešní nebo višní s minimálním počtem životaschopných jedinců stromů 800 ks/ha, tedy náklady na založení 1 ha sadu dosahují cca 480 000 Kč;
- ii) do 120 000 Kč/ha nově vysázeného ovocného sadu uznanou sadbou jabloní, hrušní, meruněk, broskvoní (nektarinek), slivoní (kromě myrobalánu), třešní nebo višní s minimálním počtem životaschopných jedinců stromů 400 ks/ha, tedy náklady na založení 1 ha sadu dosahují cca 240 000 Kč.

Další náklady pak přinese likvidace nevhodně osázeného sadu (např. odrůdou nevhodnou pro klimatické podmínky daného sadu, nerezistentní odrůdou při záměru ekologické produkce ovoce apod.), tyto náklady pak budou opět individuální.

Je tak zřejmé, že celkové škody při nesprávné výsadbě ovocného sadu mohou snadno dosáhnout milionových částek na hektar, pokud je třeba nevhodnou výsadbu zlikvidovat a plochu znovu osázet.

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

Ztráty školkařů je možné rozdělit na dvě části – i) náklady na vytvoření školkařského výpěstku a ii) ušlý zisk, pokud se nepodaří špatně vyrobený materiál prodat (obvykle je velké množství stromů určité odrůdy produkováno na zakázku, produkce špatné odrůdy pro maloobchod není uvažována, neboť výpěstky lze zpravidla prodat pod správným názvem). Náklady na vytvoření školkařského výpěstku se budou značně lišit mezi jednotlivými podniky a mohou kromě nákladů na vytvoření a udržování výpěstku zahrnovat i cenu podnože (řádově nižší desítky Kč/ks, očka roubované odrůdy (obvykle cca v rozmezí 5–10 Kč/očko), popřípadě roubu (cca 25–50 Kč dle odrůdy), a to v závislosti na odrůdě, kdy mohou být vyžadovány licenční poplatky, případně na odebraném množství. Pokud budeme uvažovat náklady na vytvoření jednoho stromku pro velkoobchod ve výši cca 50 Kč/ks, pak by byly ztráty při výrobě 1 475 ks stromků průměrně potřebných k osázení 1 hektaru ve výši 147 500 Kč. K tomu je však třeba připočítat prodejní cenu výpěstků, která nebude realizována. Cena stromků bude opět velmi individuální a bude ji ovlivňovat odebrané množství stromků, tvar stromku (špičák-korunka, zákrsek-čtvrtkmen-polo-kmen-vysokokmen) či odrůda. Ceny se pak mohou orientačně pohybovat od cca 80 Kč/ks (špičáky) po 400 Kč/ks bez DPH v případě vysokokmenů, to by znamenalo další ztrátu při neprodání 1 475 ks ve výši 118 000 až 590 000 Kč. V případě školkařů tak může dojít při výrobě stromků nesprávné odrůdy, které jsou potřebné pro osázení 1 hektaru, ke ztrátě ve výši cca 275 000–725 000 Kč.

6.3 Ověřování dodržování licenčních podmínek – kalkulace ztrát při neuplatnění licenčních poplatků.

Chráněné odrůdy jsou prodávány na základě smlouvy a dohodě na licenčních poplatcích, které mají pokrýt náklady šlechtitelů na tvorbu nové odrůdy a být i jejich ziskem, část poplatku pak připadá i školkařům či dalším článkům výrobního a prodejního řetězce. Cena licence je připočítávána jak k prodáváním očkům licencované odrůdy (cca 2–4 Kč/očko, obvykle v závislosti na počtu odebraných oček, odrůdě nebo šlechtiteli), tak k prodáváním stromkům (obvykle 10–75 Kč, opět v závislosti na počtu odebraných stromků, odrůdě či šlechtiteli). Při neoprávněném prodeji oček licencovaných odrůd bez licenčního poplatku tak vzniká škoda ve výši cca 4 000–8 000 Kč na osázený hektar (2 000 stromků), při neoprávněném prodeji stromků bez licence pak vzniká škoda 20 000–150 000 Kč/ha. Tato škoda se dělí mezi šlechtitele a školkaře, kterému by část licenčního poplatku měla za namnožení dané odrůdy připadnout. Zakoupení licencované odrůdy vytváří přes vyšší pořizovací cenu stromků přínos i pěstitelům, neboť výkupní cena jablek licencovaných odrůd bývá obvykle vyšší než u odrůd bez licence, totéž se týká i prodejců, kteří licencované odrůdy prodávají obvykle dražší. Celý produkční řetězec (od šlechtitele až po prodejce) tak má zájem na tom, aby u licencovaných odrůd byla ověřena pravost a nebyly pěstovány bez zaplacení licenčních poplatků, tedy levněji.

Zvláštní kapitolu pak tvoří tak zvané klubové odrůdy, jejichž produkce je vysoce ceněna a významně omezena, když je povolováno pěstování a množení dané odrůdy pouze

za velmi přísných podmínek. Z českých odrůd k nim patří např. odrůda Opal® vyšlechtěná v [Ústavu experimentální botaniky](#) Akademie věd České republiky. Odměnou za vyšší pořizovací náklady u klubových odrůd je pak cca o 20–30 % vyšší zisk pro pěstitele a zpravidla i zajištěný odbyt pro produkci. V těchto případech by ztráty z neoprávněného pěstování byly ještě vyšší.

6.4 Ověřování odrůd při prodloužení jejich registrace u Národního odrůdového úřadu (NOÚ) – kalkulace nákladů.

Vyhláška Ministerstva zemědělství č. 221/2002 Sb., Příloha 2, kterou se stanovuje sazebník náhrad nákladů za odborné a zkušební úkony vykonávané v působnosti ÚKZÚZ, v současné době uvádí roční náklady za odrůdu – zkoušky odlišnosti, uniformity a stálosti (tzv. DUS testy) u jabloní ve výši 3 850 Kč/rok. Zkoušky odlišnosti, uniformity a stálosti při registraci nové odrůdy obvykle trvají 2–3 roky (Ehrenbergerová, 2014), při prodloužování registrace pak mohou být kratší, je však třeba počítat s alespoň ročním poplatkem za testování. Náklady tak představují 7 700–11 550 Kč (rok 2023).

6.5 Shrnutí

Oproti těmto vyčísleným nákladům stojí náklady na genotypování kalkulované pro spotřební materiál a chemikálie. Tyto ceny neuvažují mzdové náklady ani odpisy přístrojového vybavení, které tvoří také velmi podstatnou část nákladů, navíc je ve výsledné ceně třeba zohlednit i současnou analýzu potřebných kontrol. U izolace DNA z jednoho vzorku jsou průměrné náklady chemikálií a laboratorního plastu 95 Kč/vzorek, náklady následné multiplexní PCR a fragmentační analýzy lze vyčíslit pro 17 SSR markerů na přibližně 200 Kč, a to za předpokladu provedení analýzy ve výše uvedeném multiplexním uspořádání. Pokud laboratoř nevlastní kapilární genetických analyzátor, je třeba připočítat i náklady fragmentační analýzy, kterou nabízí za úplaty řada organizací/firem v řádu stovek Kč. V případě provádění analýz mimo VŠÚO je třeba zohlednit, že sada primerů pro toto genotypování je chráněna patentem č. 309 548 (vlastník VŠÚO), která může být poskytnuta na základě licence i dalším zájemcům. Náklady jsou kalkulovány pro rok 2023, při neustále se zvyšujících cenách vstupních materiálů a chemikálií je třeba počítat s jejich nárůstem. Ve výsledku se bude celková cena analýzy odvíjet od počtu analyzovaných vzorků, záleží velmi často na požadavcích zákazníka, kolik vzorků považuje za vhodné analyzovat. Analýzu lze při předpokladu uniformního původu vzorků zlevnit i spojením 3–4 vzorků do jedné analýzy, kdy lze ještě garantovat zjištění přítomnosti více genotypů, a to bez navýšení ceny za analýzu. V souhrnu lze však předpokládat, že se cena za analýzu bude pohybovat v řádu nižších tisíců Kč. Při porovnání možných ztrát/nákladů vyčíslených výše je tak zřejmé, že ve všech uvedených příkladech využití této metodiky lze očekávat jednoznačný finanční přínos pro jejího uživatele.

7 SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY

- Cmejlova J, Rejlova M, Paprstein F, Cmejla R. (2021) A new one-tube reaction kit for the SSR genotyping of apple (*Malus × domestica* Borkh.). *Plant Science* 303, 110768. DOI: [10.1016/j.plantsci.2020.110768](https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2020.110768)
- Ehrenbergerová J. (2014) ODRŮDY, OSIVO A SADBA. Brno: Mendelova univerzita v Brně, 105 s. ISBN 978-80-7509-003-4. [Link](#)
- Fingerprinting the National Apple & Pear Collections, Research Project Final Report, 2010, [Link](#)
- Fernandez FF (2013) 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 26-27
- Green RL, Lagacé RE, Oldroyd NJ, Hennessy LK, Mulero JJ. (2013) Developmental validation of the AmpF ℓ STR ® NGM SElect ™ PCR Amplification Kit: A next-generation STR multiplex with the SE33 locus, *Forensic Sci. Int. Genet.* 7, 41-51. DOI: [10.1016/j.fsigen.2012.05.012](https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2012.05.012)
- Guilford P, Prakash S, Zhu JM, et al. (1997) Microsatellites in *Malus X domestica* (apple): abundance, polymorphism and cultivar identification. *Theor Appl Genet* 94(2), 249–254. DOI: [10.1007/s001220050407](https://doi.org/10.1007/s001220050407)
- Hokanson SC, Szewc-McFadden AK, Lamboy WF et al. (1998) Microsatellite (SSR) markers reveal genetic identities, genetic diversity and relationships in a *Malus x domestica* Borkh. core subset collection. *Theor Appl Genet* 97, 671-683. DOI: [10.1007/s001220050943](https://doi.org/10.1007/s001220050943)
- Janick J, Moore JN. Fruit breeding. Volume I: Tree and Tropical Fruits. New York: Wiley (1996)
- Liebhart R, Gianfranceschi L, Koller B et al. (2002) Development and characterisation of 140 new microsatellites in apple (*Malus × domestica* Borkh.). *Mol Breed* 10(4), 217–241. DOI: [10.1023/A:1020525906332](https://doi.org/10.1023/A:1020525906332)
- Silverberg-Dilworth E, Matasci CL, van de Weg WE et al. (2006) Microsatellite markers spanning the apple (*Malus × domestica* Borkh.) genome *Tree Genet Genomes* 2, 202–224. DOI: [10.1007/s11295-006-0045-1](https://doi.org/10.1007/s11295-006-0045-1)
- Testolin R, Messina R, Cipriani G, De Mori G. (2023) SSR-based DNA fingerprinting of fruit crops. *Crop Science* 63, 390-459. DOI: [10.1002/csc2.20896](https://doi.org/10.1002/csc2.20896)
- Urrestarazu J, Denancé C, Ravon E et al. (2016) 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* 16(1), 130. DOI: [10.1186/s12870-016-0818-0](https://doi.org/10.1186/s12870-016-0818-0)
- Vieira ML, Santini L, Diniz AL et al. (2016) Microsatellite markers: what they mean and why they are so useful. *Genet Mol Biol* 39(3), 312-328. DOI: [10.1590/1678-4685-GMB-2016-0027](https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2016-0027)

8 SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE

Patent č. 309548: Sada pro stanovení genotypu jabloně domácí (Malus x domestica Borkh.), 2023. [Úřad průmyslového vlastnictví](#)

Cmejlova J, Rejlova M, Paprstein F, Cmejla R. (2021) A new one-tube reaction kit for the SSR genotyping of apple (*Malus × domestica* Borkh.) *Plant Science* 303:110768 DOI: [10.1016/j.plantsci.2020.110768](https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2020.110768)

Cmejla R, Cmejlova J, Rejlova M, Paprstein F. (2019) Screening of an apple germplasm collection by a newly developed Ap17in1 SSR Genotyping Kit. [Poster](#) at XV EUCARPIA Fruit Breeding and Genetics Symposium in Prague.

9 PŘÍLOHA – CHARAKTERISTIKA NEJČASTĚJI PĚSTOVANÝCH ODRŮD V ČESKÉ REPUBLICCE



Plod odrůdy 'Golden Delicious'

'GOLDEN DELICIOUS'

Typ růstu stromu:	středně bujný
Doba kvetení:	středně pozdní
Zralost:	konec září, začátek října (standard)
Plodnost:	raná, vysoká, pravidelná
Plod:	střední až velký, protáhle kulovitý tvar, základní barva světle žlutá se slabě viditelným červeným líčkem; Dužnina je nažloutlá, jemné konzistence, středně šťavnatá, sladká, dobrá.
Odolnost k chorobám:	středně odolná na virózy, velmi citlivá na strupovitost, málo citlivá k padlí.
Poznámka:	středně odolná vůči zimním mrazům, odolná k jarním mrazíkům, vhodná do teplých oblastí, na pěstování středně náročná odrůda.

Alely odrůdy 'Golden Delicious'. LG: linkage group, odpovídá chromozomu.

SSR Marker	HI02c07 LG1	CH02c06 LG2	GD12 LG3	NZ01a6 LG4	CH05f06 LG5	CH03d07 LG6	CH04e05 LG7	CH01h10 LG8	CH01f03b LG9	CH02c11 LG10	CH02d08 LG11	CH01f02 LG12	GD147 LG13	CH04c07 LG14	CH02c09 LG15	CH05e04 LG16	CH01h01 LG17
'Golden Delicious'	402	424	303	498	403	209	185	87	98	425	307	297	328	198	216	120	118
	408	428	345	500	411	227	185	106	129	439	309	307	328	215	230	128	120



Plod odrůdy 'Idared'

'IDARED'

Typ růstu stromu:	slabý až středně bujný
Doba kvetení:	středně raná
Zralost:	začátek až polovina října, 10 dní po odrůdě 'Golden Delicious'
Plodnost:	raná, vysoká, pravidelná
Plod:	střední až velký, ploše kulovitý tvar, základní barva nazele-nalá, žlutá s jasně červeným líčkem. Dužnina je bílá, chruplavé konzistence, středně šťavnatá, navinulá, jen velmi málo aroma-tická, průměrná chuť.
Odolnost k chorobám:	citlivá na erwinii, velmi citlivá na strupovitost, velmi citlivá k padlí.
Poznámka:	středně odolná vůči zimním mrazům, středně odolná k jarním mrazíkům, vhodná do středních oblastí, na pěstování náročná odrůda.

Alely odrůdy 'Idared'. LG: linkage group, odpovídá chromozomu.

SSR Marker	HI02c07 LG1	CH02c06 LG2	GD12 LG3	NZ01a6 LG4	CH05f06 LG5	CH03d07 LG6	CH04e05 LG7	CH01h10 LG8	CH01f03b LG9	CH02c11 LG10	CH02d08 LG11	CH01f02 LG12	GD147 LG13	CH04c07 LG14	CH02c09 LG15	CH05e04 LG16	CH01h01 LG17
'Idared'	410	424	303	498	403	223	185	95	116	435	309	309	322	213	216	124	116
	442	440	303	498	407	227	240	95	129	441	313	335	336	215	222	128	132



Plod odrůdy 'Jonagold'

'JONAGOLD/JONAGORED'

Typ růstu stromu:	bujný
Doba kvetení:	středně pozdní
Zralost:	konec září, téměř shodná s odrůdou 'Golden Delicious'
Plodnost:	dobrá, pravidelná
Plod:	střední až velký, kulovitě kuželovitý tvar, základní barva zeleno-žlutá s tmavším červeným žiháním. Dužnina je nažloutlá, jemné konzistence, šťavnatá, chuť slabě navinulá, výborná.
Odolnost k chorobám:	středně citlivá na strupovitost, velmi citlivá k padlí, citlivá na bakteriální rakovinu.
Poznámka:	velmi citlivá vůči zimním mrazům i jarním mrazíkům, vhodná do teplých oblastí, náročná na stanoviště a pěstování.

Alely odrůdy 'Jonagold'. LG: linkage group, odpovídá chromozomu.

SSR Marker	Hj02c07 LG1	CH02c06 LG2	GD12 LG3	NZ01a6 LG4	CH05f06 LG5	CH03a07 LG6	CH04e05 LG7	CH01h10 LG8	CH01f03b LG9	CH02c11 LG10	CH02a08 LG11	CH01f02 LG12	GD147 LG13	CH04c07 LG14	CH02c09 LG15	CH05e04 LG16	CH01h01 LG17
	402	424	303	498	403	209	185	87	98	425	307	297	322	198	216	120	118
'Jonagold'	NA	428	NA	NA	NA	223	185	NA	NA	435	309	307	NA	NA	222	NA	120
	408	440	345	500	411	227	185	106	129	439	313	335	328	215	230	128	132



Plod odrůdy 'Šampion'

'ŠAMPION'

Typ růstu stromu:	středně bujný
Doba kvetení:	středně pozdní
Zralost:	druhá polovina září až konec září, 3–5 dní před odrůdou 'Golden Delicious'
Plodnost:	raná, vysoká, pravidelná
Plod:	střední až velký, kulovitý tvar, základní barva zelenožlutá se středně výrazným červeným žiháním. Dužnina je krémová až žlutobílá, jemné konzistence, středně šťavnatá, sladce navinulá, aromatická, dobrá.
Odolnost k chorobám:	středně citlivá na gumovitost, středně citlivá na strupovitost, padlím netrpí.
Poznámka:	středně odolná vůči zimním mrazům, středně až méně odolná k jarním mrazíkům, vhodná do teplých a středních oblastí, na pěstování středně náročná odrůda.

Alely odrůdy 'Šampion'. LG: linkage group, odpovídá chromozomu.

SSR Marker	HI02c07 LG1	CH02c06 LG2	GD12 LG3	NZ01a6 LG4	CH05f06 LG5	CH03d07 LG6	CH04e05 LG7	CH01h10 LG8	CH01f03b LG9	CH02c11 LG10	CH02d08 LG11	CH01f02 LG12	GD147 LG13	CH04c07 LG14	CH02c09 LG15	CH05e04 LG16	CH01h01 LG17
'Šampion'	402	418	303	498	393	207	185	87	118	425	309	297	328	212	206	120	120
	442	428	345	500	403	209	214	95	129	443	339	335	340	215	216	122	122



Plod odrůdy 'Gala'

'GALA'

Typ růstu stromu:	středně bujný až slabší
Doba kvetení:	středně pozdní
Zralost:	konec srpna až začátek září, 30 dní před odrůdou 'Golden Delicious'
Plodnost:	raná, vysoká, pravidelná
Plod:	menší až střední, kulovitý tvar, základní barva zelenavě-žlutá s viditelným červeným líčkem (20-90 % povrchu dle mutací). Dužnina je nažloutlá, jemně chruplavé konzistence, velmi pevná, šťavnatá, sladká, dobrá.
Odolnost k chorobám:	citlivá na bakteriální rakovinu, velmi citlivá na strupovitost, středně citlivá k padlí.
Poznámka:	středně odolná vůči zimním mrazům, středně odolná k jarním mrazíkům, vhodná do teplých a středních oblastí.

Alely odrůdy 'Gala'. LG: linkage group, odpovídá chromozomu.

SSR Marker	HI02c07 LG1	CH02c06 LG2	GD12 LG3	NZ01a6 LG4	CH05f06 LG5	CH03d07 LG6	CH04e05 LG7	CH01h10 LG8	CH01f03b LG9	CH02c11 LG10	CH02d08 LG11	CH01f02 LG12	GD147 LG13	CH04c07 LG14	CH02c09 LG15	CH05e04 LG16	CH01h01 LG17
'Gala'	406	424	303	500	393	209	185	87	129	423	309	297	328	198	206	128	120
	408	428	345	504	403	240	185	106	137	439	339	333	340	237	216	128	132



Plod odrůdy 'Red Delicious'

'RED DELICIOUS'

Typ růstu stromu:	bujný
Doba kvetení:	středně pozdní
Zralost:	začátek až polovina října, 7–10 dní po odrůdě 'Golden Delicious'
Plodnost:	začíná později, pravidelná
Plod:	střední až velký, kuželovitý tvar s pravidelnými žebry, základní barva světle žlutá překrytá tmavě červenou barvou s fialovým ožiněním. Dužnina je nažloutlá, zrnitá, křehká, středně šťavnatá, sladká až velmi sladká.
Odolnost k chorobám:	středně odolná na virózy, velmi citlivá na strupovitost, padlím netrpí.
Poznámka:	středně odolná vůči zimním mrazům, citlivá k jarním mrazíkům, vhodná do teplých oblastí, na pěstování středně náročná odrůda.

Alely odrůdy 'Red Delicious'. LG: linkage group, odpovídá chromozomu.

SSR Marker	HI02c07 LG1	CH02c06 LG2	GD12 LG3	NZ01a6 LG4	CH05f06 LG5	CH03d07 LG6	CH04e05 LG7	CH01h10 LG8	CH01f03b LG9	CH02c11 LG10	CH02d08 LG11	CH01f02 LG12	GD147 LG13	CH04c07 LG14	CH02c09 LG15	CH05e04 LG16	CH01h01 LG17
'Red Delicious'	406	405	303	488	403	227	185	87	98	413	295	307	328	221	218	128	118
	408	438	309	504	411	248	216	95	137	439	301	311	342	237	228	128	118



Plod odrůdy 'Braeburn'

'BRAEBURN'

Typ růstu stromu:	středně bujný až slabší
Doba kvetení:	středně pozdní
Zralost:	začátek polovina října až konec října, 14 dní po odrůdě 'Golden Delicious'
Plodnost:	zpočátku menší, střední až velká, pravidelná
Plod:	střední až velký, protáhle kulovitý tvar, základní barva žlutozelená se středně červeně rozmytým žiháním (30-70% povrchu dle mutací). Dužnina je nažloutlá, velmi pevné konzistence, šťavnatá, sladká, dobrá, aromatická.
Odolnost k chorobám:	citlivá na bakteriální rakovinu a na virózy, středně citlivá na strupovitost, citlivá k padlí.
Poznámka:	vhodná do teplých oblastí, na pěstování velmi náročná odrůda.

Alely odrůdy 'Braeburn'. LG: linkage group, odpovídá chromozomu.

SSR Marker	HI02c07 LG1	CH02c06 LG2	GD12 LG3	NZ01a6 LG4	CH05f06 LG5	CH03d07 LG6	CH04e05 LG7	CH01h10 LG8	CH01f03b LG9	CH02c11 LG10	CH02d08 LG11	CH01f02 LG12	GD147 LG13	CH04c07 LG14	CH02c09 LG15	CH05e04 LG16	CH01h01 LG17
'Braeburn'	408	428	303	504	411	227	214	95	118	413	301	307	328	213	218	120	118
	408	438	309	506	411	248	216	95	137	439	339	335	342	237	230	128	132



Plod odrůdy 'Fuji'.

'FUJI'

Typ růstu stromu:	bujný
Doba kvetení:	středně pozdní
Zralost:	koncem října, 14–21 dní po odrůdě 'Golden Delicious'
Plodnost:	dobrá, může být i střídavá, vysoká
Plod:	střední až velký, protáhle kulovitý tvar, mírně žebertatý, základní barva světle zelená, krycí barva červená, ve formě žíhané. Dužnina je krémová, velmi pevné konzistence, velmi šťavnatá, sladká, dobrá.
Odolnost k chorobám:	citlivá na bakteriální rakovinu, citlivá na sklovitost, citlivá na strupovitost, padlím netrpí.
Poznámka:	vhodná do teplých oblastí, na pěstování náročná odrůda.

Alely odrůdy 'Fuji'. LG: linkage group, odpovídá chromozomu.

SSR Marker	HI02c07 LG1	CH02c06 LG2	GD12 LG3	NZ01a6 LG4	CH05f06 LG5	CH03d07 LG6	CH04e05 LG7	CH01h10 LG8	CH01f03b LG9	CH02c11 LG10	CH02d08 LG11	CH01f02 LG12	GD147 LG13	CH04c07 LG14	CH02c09 LG15	CH05e04 LG16	CH01h01 LG17
'Fuji'	406	438	303	488	393	248	185	87	129	435	295	309	328	210	206	124	118
	408	438	309	504	403	248	214	95	137	439	295	311	340	221	218	128	118



v y d á v á

OSVĚDČENÍ

UKZUZ 145569/2023

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

Název metodiky: **Genotypizace jabloně domácí (*Malus × domestica* Borkh.) pomocí SSR markerů v praxi**

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

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

Místo vydání: **Holovousy**

Rok vydání: **2023**

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

Brno 30. 8. 2023

Ing. Daniel Jurečka

ředitel ústavu

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

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

V dne

Mgr. Jan Radoš

Digitální podpis: 05.09.2023 16:37

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

**Genotypizace jabloně domácí (*Malus × domestica* Borkh.)
pomocí SSR markerů v praxi**

Vydal:

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

Holovousy 129, 508 01 Holovousy

1. vydání, 2023

Grafická úprava:

ŽAKET, Praha

ISBN 978-80-87030-90-5 (online; pdf)

<https://doi.org/10.60615/dnp4-0x57>