

GENOTYPIZACE TŘEŠNĚ PTAČÍ (*PRUNUS AVIUM* L.) POMOCÍ SSR MARKERŮ V PRAXI

Metodika

Jana Čmejlová a kol.

2025



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



Název

Genotypizace třešně ptačí (*Prunus avium* L.) pomocí SSR markerů v praxi

Autoři

RNDr. Jana Čmejlová, Ph.D.¹, Mgr. Kateřina Holušová², Ph.D., prof. Dr. Ing. Boris Krška¹,
Ing. Pavel Voráček³, Mgr. Jan Bartoš, Ph.D.², RNDr. Radek Čmejla, Ph.D.¹

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

² Ústav experimentální botaniky AV ČR, v. v. i., Rozvojová 263, 165 00 Praha 6, Lysolaje

³ FYTOS, Ing. Pavel Voráček, Radčická 1107/86, 301 00 Plzeň

Zástupce autorského kolektivu

RNDr. Radek Čmejla, Ph.D.: radek.cmejla@vsuo.cz

Odborný oponent

RNDr. Markéta Bohunická, Ph.D., Přírodovědecká fakulta, Univerzita Hradec Králové

Oponent za státní správu

MVDr. Kateřina Staňková, Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský

Zdroj fotografií odrůd

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

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.

Poznámka: Metodika neprošla jazykovou korekturou.

Poděkování: Poděkování patří všem pracovníkům Národního odrůdového úřadu Ústředního kontrolního a zkušebního ústavu zemědělského za pomoc při vzniku této metodiky a její revizi.

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

ISBN: 978-80-88669-10-4 (online, pdf)

<https://doi.org/10.60615/g8h5-5e24>





OBSAH

Anotace	4
1. Úvod	5
2. Cíl metodiky	7
3. Vlastní popis metodiky	7
3.1 Popis metodiky – Úvod	7
3.2 Materiál a metody	9
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	12
3.2.4 Fragmentační analýza	14
3.2.5 Vyhodnocení a interpretace dat	15
3.2.5.1 Očekávané výsledky	15
3.2.5.2 Možné problémy při analýze dat („Troubleshooting“)	19
3.2.5.2.1 Alely lišící se pouze o 1 nukleotid	19
3.2.5.2.2 „Stuttering“ alel	20
3.2.5.2.3 Nízký signál alely	21
3.2.5.2.4 Mutace v SSR markerech u odrůd	22
3.2.5.2.5 Zdroj chyb v pre-analytické a analytické fázi	25
4. Srovnání novosti postupů	26
5. Popis uplatnění metodiky	26
5.1 Tvorba referenční databáze pro účely ověřování a identifikace odrůd	26
5.1.1 Referenční databáze pro pěstitelskou praxi v České republice	26
5.1.2 Referenční databáze pro účely uznávacího řízení	27
5.1.3 Referenční databáze pro sbírkové účely	27
5.2 Prověření produkčního řetězce výroby výpěstků	28
6. Ekonomické aspekty	29
6.1 Ověření pravosti odrůdy před výsadbou – kalkulace ztrát na hektar při výsadbě špatné odrůdy z pohledu pěstitele	29
6.2 Prvek zajištění kvality ve výrobních podnicích (školkách) – kalkulace ztrát při výrobě špatné odrůdy potřebné k osázení jednoho hektaru sadu z pohledu školkaře	30
6.3 Ověřování dodržování licenčních podmínek – kalkulace ztrát při neuplatnění licenčních poplatků	30
6.4 Ověřování odrůd při registraci a při prodloužení jejich registrace u Národního odrůdového úřadu – kalkulace nákladů	30
6.5 Shrnutí	31
7. Seznam použité související literatury	31
8. Seznam publikací, které předcházely metodice	32
Příloha – Charakteristika referenčních odrůd	34
Příloha – Osvědčení o uznání metodiky	42



ANOTACE

Třešeň ptačí (*Prunus avium* L.) produkuje jedny z nejraněji dozrávajících plodů v mírném klimatickém pásu, což z ní dělá oblíbenou volbu mezi konzumenty. Odhaduje se, že na světě existují nižší tisíce odrůd třešně ptačí a šlechtitelské programy nepřetržitě usilují o vývoj nových, kvalitnějších kultivarů. V České republice bylo ve Státní odrůdové knize vydávané Národním odrůdovým úřadem Ústředního kontrolního a zkušebního ústavu zemědělského (ÚKZÚZ) k 15.6.2025 evidováno 25 odrůd a 5 podnoží, na trhu je však dostupná i řada dalších odrůd; jen na stánkách ÚKZÚZ je jich registrováno 75. Možnost ověření správné identity je zásadní na všech úrovních produkce rostlinného materiálu, zejména pokud se jedná o práci s certifikovaným materiálem. Ověřování odrůd se také uplatňuje při kontrole deklarované odrůdové pravosti, např. při uznávacím řízení nových odrůd, prodlužování jejich registrace nebo při kontrolní činnosti. Standardně prováděné rozlišení jednotlivých odrůd pomocí fenotypového a fenologického hodnocení je časově náročné a obtížné, v některých případech, vzhledem k počtu existujících odrůd, dokonce nemožné. V dnešní době se proto pro určení identity odrůd využívá i mnohem rychlejší a velmi přesné určování odrůdy/genotypu pomocí molekulárních markerů (genotypování). Pro genotypování třešně ptačí byla vyvinuta sada PavSSR, která pomocí fragmentační analýzy detekuje 16 SSR (simple sequence repeats, krátké tandemové repetice) markerů v jediné reakci. Metodika poskytuje podrobný protokol genotypizace třešně ptačí pomocí těchto markerů a předkládá možnosti jejího využití v praxi.

1. ÚVOD

Třešeň ptačí (*Prunus avium* L.) je zemědělsky velmi významný druh ovoce pěstovaný zejména v mírném klimatickém pásu, popřípadě ve vhodných podmínkách subtropického pásu. Ročně bývá vyprodukováno více než 2 miliony tun tohoto ovoce; největším producentem je Turecko, následované USA, Íránem a Chile ([Producenti třešní](#)). I v České republice jsou třešně hojně pěstovány, tříletý průměr jejich sklizně za roky 2021-2023 činil 1 413 tun ([ÚKZÚZ-Sklizeň ovoce](#)). Jejich produkce však často bývá narušena pozdními a jarními mrazy, i to je důvod, proč bylo v roce 2024 sklizeno pouze 307 tun tohoto ovoce. Plody třešní u nás patří mezi první dozrávající ovoce, jsou velmi chutné a nutričně bohaté. Konzumují se zpravidla v čerstvém stavu, menší část je zpracovávána v potravinářském průmyslu.

Přestože je v České republice ve Státní odrůdové knize k 15.6.2025 zapsáno pro komerční pěstování pouze 25 odrůd třešně ptačí, registrováno je v ČR 75 odrůd a předpokládá se, že po celém světě existují tisíce odrůd tohoto rostlinného druhu. Jen v genofondových sbírkách USA jich je deponováno více než 800 ([GRIN-Global](#)). Tyto odrůdy se mezi sebou liší mnoha vlastnostmi, kromě kvality plodů jsou u jednotlivých odrůd agronomicky důležité zejména samosprašnost/cizosprašnost s nezbytností výsadby vhodného opylovacího partnera, doba zrání (v České době třešně dozrávají zpravidla v průběhu 8 tzv. třešňových týdnů) či kvetení (z důvodu pozdních jarních mrazů jsou žádoucí zejména pozdně kvetoucí odrůdy).

V rostlinné výrobě má odrůdová identita zásadní význam zejména u ovocných stromů, neboť vysazené sady jsou nemalou investicí a bývají obhospodařovány několik desítek let. Správné určení odrůdy je tedy nezbytné na všech úrovních rostlinné produkce, od producentů a prodejců rozmnožovacího materiálu (školky, roubové množárny) až po pěstitele. Zvláštního významu nabývá odrůdová pravost zejména při práci s licencovaným materiálem, kdy u Národního odrůdového úřadu Ústředního kontrolního a zkušebního ústavu zemědělského (NOÚ ÚKZÚZ) probíhá registrace nových odrůd a udílení ochrany práv k odrůdám či k prodlužování registrace odrůd. V neposlední řadě je důležitá i pro šlechtitele, kteří mají zájem o ochranu práv u jimi vyšlechtěných odrůd, které jim zabezpečují příjmy z licenčních poplatků.

Zkoušení odrůd přihlášených k ochraně práv v České republice probíhá jejich sledováním po dosažení plodnosti tzv. DUS testy (z anglického Distinctness, Uniformity and Stability, tj. Rozlišitelnost, Rovnoměrnost a Stabilita), kdy jsou odrůdy fenotypově a fenologicky hodnoceny alespoň dva roky. Jak již název testu napovídá, sleduje se převážně odlišnost od stávajících obecně známých odrůd, uniformita testovaného materiálu a stálost znaků mezi jednotlivými lety testování (Ehrenbergerová, 2014). Hodnocení je nezbytné provádět opakovaně, aby se minimalizovaly externí vlivy na fenotypový projev posuzovaného materiálu, jež by mohly znaky odrůdy ovlivnit, např. extrémní počasí, choroby nebo škůdci. Prodlužování registrace je rychlejší, ale přesto je nutné sledovaný materiál hodnotit alespoň jednu sezónu. Hodnocení by měl vždy provádět zkušený hodnotitel.

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

Pro rutinní genotypování třešně ptačí je možné využít mikrosatelitní neboli SSR markery (Simple Sequence Repeat), které jsou tvořeny opakujícími se sekvencemi 2–8

nukleotidů. U rostlin se pro genotypování nejčastěji využívají vysoce heterogenní SSR markery s repeticí 2 nukleotidů, které vykazují u jednotlivých odrůd různé dlouhé alely (Testolin et al., 2023). SSR markery jsou vysoce informativní, multialelické a analyticky dobře hodnotitelné (Vieira, 2016). Délky alel SSR markerů amplifikovaných při polymerázové řetězové reakci se vyhodnocují fragmentační analýzou nejčastěji pomocí kapilární elektroforézy, která je schopná odlišit fragmenty s rozdílem 1 nukleotidu. Díky odlišné velikosti PCR fragmentů a jejich různému fluorescenčnímu značení umožňuje kapilární elektroforéza zároveň multiplexování několika markerů do jedné reakce, což velmi významně zefektivňuje celý proces a snižuje cenu genotypizace.

Třešň ptačí je diploidní organizmus, jehož haploidní genom tvoří 8 chromozómů. Mezinárodní uskupení The European Cooperative Programme for Plant Genetic Resources (ECPGR; www.ecpgr.cgiar.org) pro genotypování třešně ptačí doporučilo sadu 16 SSR markerů amplifikovaných v 16 nezávislých amplifikačních reakcích a analyzovaných v 16 fragmentačních analýzách (Clarke a Tobbut, 2009). V rámci projektu Collaborative action for updating, documenting and communicating the cherry patrimonial richness in EU (EU.CHERRY, [EU.CHERRY Report](#), souhrnné výsledky publikovány v Barreneche et al., 2021) byla tato sada z důvodu nízké rozlišovací schopnosti inovována – z původních 16 SSR markerů jich bylo zachováno 11 a bylo přidáno 7 nových SSR markerů. Mezi nově analyzované SSR markery však byly zařazeny i dva markery používané při šlechtění pro selekci semenáčů s vysokou pravděpodobností nesoucích velké plody (Rosyara et al. 2013) a jeden asociovaný s barvou dužniny (Sandefur et al. 2016). Vybraných 18 SSR markerů bylo amplifikováno ve dvou multiplexních PCR reakcích a následně analyzováno na kapilárním genetickém analyzátoru. I přes lepší výběr a větší počet analyzovaných SSR markerů se však nepodařilo odlišit všechny genotypy – z 324 vzorků z genofondových sbírek z celého světa mělo unikátní genotyp pouze 192, zatímco 132 vzorků sdílelo svůj genotyp ve všech analyzovaných lokusech s alespoň jedním dalším vzorkem. Jak sami autoři uvádějí, příčin těchto shod může být více: 1) některé vzorky jsou udržovány v genofondových kolekcích pod různými názvy; 2) mohlo dojít k chybám při odběru/zpracování některých vzorků; 3) počet dříve neuváděných třešňových synonym může být mnohem vyšší, než se předpokládalo. Důvodem genotypové shody je pravděpodobně kombinace všech těchto příčin, přesto byly do jedné genotypové skupiny zařazeny i takové odrůdy, jako jsou fenotypově odlišitelné odrůdy ‘Van’ a ‘Ferrovia’. Autoři závěrečné zprávy projektu EU.CHERRY sami uvádějí, že může být nutné provést další genotypování, aby byly zcela objasněny některé případy shody ([EU.CHERRY Report](#)). Autoři této metodiky jako další možnou příčinu uvádějí relativně nízkou heterogenitu použitých SSR markerů – 5 z 15 SSR markerů, které jsou ve zprávě statisticky zhodnoceny, vykazuje pozorovanou heterozygotnost nižší než 0,6 (tj. 40 % vzorků vykazuje v daném SSR markeru pouze 1 alelu); další 4 markery nižší než 0,7. Nízká rozlišovací schopnost celé sady navíc může být problematická v případě rostlinného druhu, u kterého může docházet k samosprašení. Navíc je třeba brát v potaz, že nově zařazené SSR markery rutinně používané v mnoha šlechtitelských stanicích pro selekci velkoplodých hybridů s červenými plody budou postupně ztrácet heterozygotnost a pro nově přihlašované odrůdy nebudou informativní.

Proto byla v rámci této metodiky vyvinuta genotypizační sada PavSSR obsahující 16 SSR markerů (vždy 2 z jednoho chromozomu, 12 SSR markerů bylo nově vyvinuto autory metodiky, 4 byly převzaty z jiných studií), které jsou amplifikovány a analyzovány v jediné PCR reakci, respektive fragmentační analýze, což zrychlí a zlevní určování odrůd třešně ptačí a zároveň se sníží možná chybovost. Pro tuto sadu byly vybrány SSR markery vykazující vysokou heterogenitu a snadnou hodnotitelnost výstupů fragmentační analýzy na kapilárním genetickém analyzátoru. Vybraná sada SSR markerů byla ověřena na genofondových sbírkách VŠÚO a NOÚ UKZÚZ obsahujících 312 unikátních genotypů.

Metodika poskytuje ucelený návod pro genotypizaci třešně ptačí v praxi, od odběru vzorků až po vyhodnocení analýz. Popisuje rovněž výhody provádění genotypování pro jednotlivé články produkčního řetězce třešně ptačí. V neposlední řadě porovnává použitou metodu s dosavadním stavem techniky v oboru genotypování a uvádí její výhody.

2. CÍL METODIKY

V dnešní době jsou v České republice určovány odrůdy třešní pomocí zdlouhavého porovnávání fenotypových a fenologických znaků, které není možné provádět u dosud neplodících výpěstků či v kterémkoliv ročním období. Cílem této metodiky je zavedení laboratorního postupu genotypizace třešně ptačí pomocí SSR markerů do praxe tak, aby bylo dosahováno validních výsledků. Je tedy určena jak pro laboratoře molekulární biologie, tak i pro uživatele využívající výsledky ověřování odrůd ve své praxi, kdy se může jednat např. o:

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

Tato metodika není určena pro vzájemné odlišení jednotlivých mutací/klonů odrůd. Tematicky navazuje na již vydané metodiky pro genotypování meruňky obecné (*Prunus armeniaca* L.) (Nekvindová, 2021), jabloně domácí (*Malus domestica* Borkh.) (Pluhařová, 2023), švestky domácí (*Prunus domestica* L.) (Pluhařová, 2023) a hrušně obecné (*Pyrus communis* L.) (Žďárská, 2025).

3. VLASTNÍ POPIS METODIKY

3.1 Popis metodiky – Úvod

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

Pro genotypizaci třešně ptačí byla využita genotypizační sada PavSSR, která pro stanovení genetického profilu využívá 16 SSR markerů (Tabulka 1), které se analyzují najednou v jediné multiplexní PCR reakci a následné fragmentační analýze. Alelická kombinace těchto SSR markerů je unikátní pro každou odrůdu. Vybrané markery vykazují vysokou heterogenitu a jejich výstupy z fragmentační analýzy jsou velmi dobře hodnotitelné. Dva z vybraných mikrosatelitů (BPPCT037 a CPPCT006) jsou zároveň SSR markery doporučenými uskupením The European Cooperative Programme for Plant Genetic Resources (ECPGR) (Clarke and Tobutt, 2009, [EU-CHERRY Report](#)). Porovnáním alelických profilů jednotlivých SSR markerů je pak možné určit shodu mezi vzorky, případně lze profil porovnat s databází referenčních genotypů. Testovaná kolekce 312 unikátních genotypů vykazovala v 16 analyzovaných SSR markerech velmi vysokou heterogenitu s pravděpodobností náhodné shody mezi dvěma nepříbuznými jedinci $1,18 \times 10^{-19}$ a umožnila tak bezpečné odlišení jednotlivých odrůd.



Tabulka 1. Charakteristika SSR markerů použitých pro genotypizaci třešně ptačí.

Marker	Délka repetice	Pozice v genomu <i>P. avium</i> L., var. Tieton ^{1/}	Citace	Forward primer	Reverse primer
BPPCT037 ^{2/}	2 nt	Chr5_27 719 351	Dirlewanger et al., 2002	CATGGAAGAGGATCAAGTGC	CTTGAAGGTAGTGCCAAAGC
EMPA005	2 nt	Chr1_15 964 446	Clarke and Tobutt, 2003	TGGGTTTGAGCAATATGCAACTG	CACCAATACACATGCACACGTAT
Pav_chr4_217	2 nt	Chr4_3 209 217	Cmejlova et al., v přípravě	AAGGTGGTGGTGGTATCCTG	CCACTTGTCACTCACTCCAC
Pav_chr6_505	2 nt	Chr6_3 361 505	Cmejlova et al., v přípravě	AAGAGGTGGAGAGGCATTCC	AACCATAGGAAGCCAAGCGC
Pav_chr1_073	2 nt	Chr1_52 114 073	Cmejlova et al., v přípravě	GTAAAACTCCTGTGACCCAAATGT	GGCGGTATACAGAGAAGGCT
Pav_chr3_706	2 nt	Chr3_21 366 706	Cmejlova et al., v přípravě	CTTGCTTGCTTTTCCTGTGTGA	GCCTCGCAATCAGATAGCAG
Pav_chr5_144	2 nt	Chr5_32 811 144	Cmejlova et al., v přípravě	AGCCACTTGAAACCACATACGT	CACACAGGCACACAATCACAG
Pav_chr2_274	2 nt	Chr2_44 310 274	Cmejlova et al., v přípravě	ATTAAGTAACTTTTGGGTTGGGTAAC	GTTATAACTTACATACATAACCGACC
UCD-CH11	2 nt	Chr2_39 157 058	Struss et al., 2003	TGMTATTAGCTTAATGCCTCCC ^{3/}	ATGCTGATGTCATAAGGTGTGC
Pav_chr4_499	6 nt	Chr4_275 499	Cmejlova et al., v přípravě	TAACGGAATTGGAGCAAAGGGAA	CAAACAATGACCCACCTCCTG
Pav_chr3_002	2 nt	Chr3_24 943 002	Cmejlova et al., v přípravě	CCCAACTATTTATCCCATTGGCA	GACGAACGAAGGTACCATGC
Pav_chr8_438	2 nt	Chr8_25 182 438	Cmejlova et al., v přípravě	TGGCTCCAAAACAGAATGTGGAA	CTAGCTGCTGTCGTATCCCT
Pav_chr6_178	2 nt	Chr6_10 235 178	Cmejlova et al., v přípravě	AGGAAAGCTCACAATCAAGGGT	TATTCCACAAACACACACAACCC
CPPCT006 ^{2/}	2 nt	Chr8_26 370 288	Dirlewanger et al., 2002	AATTAAGTCCAACAGCTCCA	ATGGTTGCTTAATTCAATGG
Pav_chr7_798	2 nt	Chr7_12 815 798	Cmejlova et al., v přípravě	GGGGCGTTGTTCTATAGGCT	CAACTCTCACGTCGAAATGCC
Pav_chr7_867	2 nt	Chr7_23 682 867	Cmejlova et al., v přípravě	CCAACTAGGCTTCGGATTGC	ACCCGAAAGTTCCCATGACTC

1/ [Prunus avium Tieton Genome v2.0 Assembly & Annotation | GDR](#), Wang et al., 2020, uvedena pozice začátku repetice

2/ SSR marker doporučený ECPGR

3/ Primer degenerován na základě sekvencí pozorovaných v jednotlivých odrůdách

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

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

3.2 *Materiál a metody*

Vlastní postup genotypování lze rozdělit do tří fází:

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

3.2.1 **Odběr vzorků, přeprava vzorků**

Vstupním materiálem pro genotypování je genomová DNA, kterou je možné získat izolací z různých částí rostliny. Pro rutinní analýzy je ideální používat lýko, ze kterého lze DNA izolovat celoročně. Použitelné jsou i další části živých rostlin, metodika však nebyla testována pro produkty obsahující zpracované třešně (marmelády, kompoty aj.).

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

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

3.2.2 **Příprava DNA**

Příprava DNA se provádí ve dvou základních krocích:

1. Homogenizace rostlinného materiálu
2. Izolace genomové DNA

3.2.2.1 *Homogenizace rostlinného materiálu*

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

Pro izolaci DNA z listů se mohou použít i mechanické homogenizátory, které slouží k rychlejší homogenizaci většího počtu vzorků, např. homogenizátor TissueLyser II (Qiagen), který rozrušuje rostlinné pletivo pomocí vysokorychlostního protřepávání vzorku s ocelovými kuličkami.

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

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

Vhodnost postupu je nutné ověřit/modifikovat pro každý rostlinný druh a typ pletiva. Správně provedená homogenizace je klíčovým předpokladem pro efektivní izolaci DNA!

3.2.2.2 Izolace genomové DNA

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

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

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

Použité přístroje, nástroje, spotřební plast, reagentie

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

Pracovní postup

- Detailní postup izolace DNA a další informace jsou uvedeny v doprovodné brožuře výrobce.
- Izolace DNA probíhá v prostorách k tomu určených v rámci laboratoře molekulární biologie (pre-PCR area) v souladu s principy správné laboratorní praxe.



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

1. Standardně se cca 100 mg dobře zhomogenizovaného vzorku přenesou sterilní špachtličkou do 2ml zkumavky. V případě použití homogenizátoru se z 2ml zkumavky s homogenizovaným materiálem vyjme kulička z nerezové oceli.
2. Přidá se 400 µl pufru PL a 3 µl roztoku RNasy A (100 mg/ml). Provede se intenzivní zvortexování.
3. Pokud se zpracovává pouze jeden vzorek, pokračuje se následným krokem. Pokud se zpracovává větší množství vzorků, nechají se již připravené vzorky v PL pufru s RNasou A inkubovat při pokojové teplotě do okamžiku, než jsou všechny vzorky převedeny do PL pufru s RNasou A podle bodů 1–3. Pak se pokračuje následujícím krokem č. 4.
4. Vzorky se inkubují 15 minut při 65 °C ve vyhřívaném bloku, každých 5 minut se provede krátké zvortexování.
5. K homogenátu se přidá 140 µl pufru PD. Vzorky se zvortexují a inkubují se 5 minut na ledu.
6. Homogenát se přenesou pomocí tenké kovové špachtličky nebo 1ml špičky s filtrem s ustřiženou špičkou na EzSep filtr (modrá barva) a centrifuguje se 2 minuty.
7. Proteklý lyzát se opatrně bez narušení pelety přenesou špičkou s filtrem do nové 1,5ml zkumavky; typicky se jedná o 420 µl lyzátu.
8. K lyzátu se přidá pufr BD v množství 1,5násobku objemu lyzátu (k 420 µl lyzátu se přidá 630 µl); roztoky je nutné okamžitě promíchat otáčením zkumavky nebo propipetováním.
9. 700 µl směsi z kroku 8 se přenesou špičkou s filtrem na zelené SV kolony se sběrnou zkumavkou. Centrifuguje se 1 minutu. Proteklá tekutina se vyleje, hrany sběrné zkumavky se otřou 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 otřou 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 otřou 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 otřou 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. Nechá se inkubovat 5 minut při pokojové teplotě, poté se stáčí 1 minutu.
14. Orientační určení čistoty a množství izolované DNA se provádí spektrometricky při vlnových délkách 260 nm (kvantita) a 280 nm (čistota jako poměr naměřených hodnot při vlnových délkách 260/280 nm). Izolovaná DNA by měla mít ideálně čistotu vyšší než 1,8. Pokud je čistota nižší, nelze vyloučit negativní dopad na prováděné analýzy.
15. Eluovanou DNA je možné použít pro další aplikace, nebo zamrazit při teplotě -18°C nebo nižší.

3.2.3 Sestavení PCR reakce

Použitá genotypizační sada PavSSR obsahuje 32 primerů a umožňuje současnou amplifikaci 16 SSR markerů v jedné PCR reakci. Fluorescenční značení a koncentrace primerů ve výsledné reakci jsou uvedeny níže v Tabulce 3, která zároveň uvádí i návod k přípravě tzv. premixu primerů, jehož použití se doporučuje pro analýzu většího množství vzorků. Je vhodné premix nejdříve ověřit na vzorcích DNA referenčních odrůd. PCR reakce byla optimalizována s využitím cykleru C1000 (Bio-Rad) a níže uvedených reagentů. Uživatelé si budou muset postup verifikovat a popřípadě upravit pro své laboratorní podmínky.

Použité přístroje, nástroje, spotřební plast, reagentie

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

Pracovní postup

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

'Burlat'
'Early Korvik'
'Justyna'
'Kasandra'
'Kordia'
'Rivan'
'Tamara'
'Těchlovan'

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

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

Primer	Zásobní koncentrace (μ M)	Finální koncentrace (μ M)	Na 100 reakcí (μ l)
FAM-BPPCT037-F	100	0,28	2,8
BPPCT037-R	100	0,28	2,8
FAM-EMPA005-F	100	0,27	2,7
EMPA005-R	100	0,27	2,7
FAM-Pav_chr4_217-F	100	0,09	0,9
Pav_chr4_217-R	100	0,09	0,9
Pav_chr6_505-F	100	0,18	1,8
FAM-Pav_chr6_505-R	100	0,18	1,8
Pav_chr1_073-F	100	0,65	6,5
VIC-Pav_chr1_073-R	100	0,65	6,5
VIC-Pav_chr3_706-F	100	0,12	1,2
Pav_chr3_706-R	100	0,12	1,2
VIC-Pav_chr5_144-F	100	0,16	1,6
Pav_chr5_144-R	100	0,16	1,6
VIC-Pav_chr2_274-F	100	0,44	4,4
Pav_chr2_274-R	100	0,44	4,4
NED-UCD-CH11-F	100	0,4	4
UCD-CH11-R	100	0,4	4
NED-Pav_chr4_499-F	100	0,09	0,9
Pav_chr4_499-R	100	0,09	0,9
NED-Pav_chr3_002-F	100	0,13	1,3
Pav_chr3_002-R	100	0,13	1,3
NED-Pav_chr8_438-F	100	0,09	0,9
Pav_chr8_438-R	100	0,09	0,9
PET-Pav_chr6_178-F	100	0,12	1,2
Pav_chr6_178-R	100	0,12	1,2
PET-CPPCT006-F	100	0,5	5
CPPCT006-R	100	0,5	5
PET-Pav_chr7_798-F	100	0,12	1,2

Pav chr7 798-R	100	0,12	1,2
PET-Pav chr7 867-F	100	0,095	0,95
Pav chr7 867-R	100	0,095	0,95
H ₂ O			25,3
Celkem			100

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

Tabulka 4. Rozpis pro PCR PavSSR mastermix určený pro genotypizaci třešně ptačí.

Složka	Na 1 vzorek
PCR voda	2 µl
PavSSR premix primerů	1 µl
Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix	5 µl
Celkem	8 µl

4. Připravený mastermix se krátce zvortexuje a poté se krátce centrifuguje.
5. Do stojánku se připraví potřebný počet 0,2ml PCR zkumavek včetně zkumavek pro ověření referenční odrůdy a další případné kontroly (např. kontrola bez přidané DNA, extrakční kontrola).
6. Mastermix se rozpipetuje do 0,2ml PCR zkumavek po 8 µl.
7. K mastermixu se postupně připipetují 2 µl izolované DNA o koncentraci 10 ng/µl a provede se PCR amplifikace. Podmínky PCR byly optimalizovány pro cykler C1000 (Bio-Rad) s následujícími parametry amplifikace: 98 °C/1 min; 25x (98 °C/10 s, 60 °C/15 s, 72 °C/30 s); 72 °C/30 s.
8. PCR produkty se přímo použijí pro fragmentační analýzu, nebo je možné je uchovávat při teplotě nižší než –18 °C ve tmě po dobu minimálně jednoho roku.

3.2.4 Fragmentační analýza

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

Použité přístroje, nástroje, spotřební plast, reagensie

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

Pracovní postup

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

Tabulka 5. Rozpis směsi pro fragmentační analýzu.

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

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

3.2.5 Vyhodnocení a interpretace dat

V tomto kroku se vyhodnocují výsledky a na základě všech dostupných informací se provádí jejich interpretace.

3.2.5.1 Očekávané výsledky

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

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

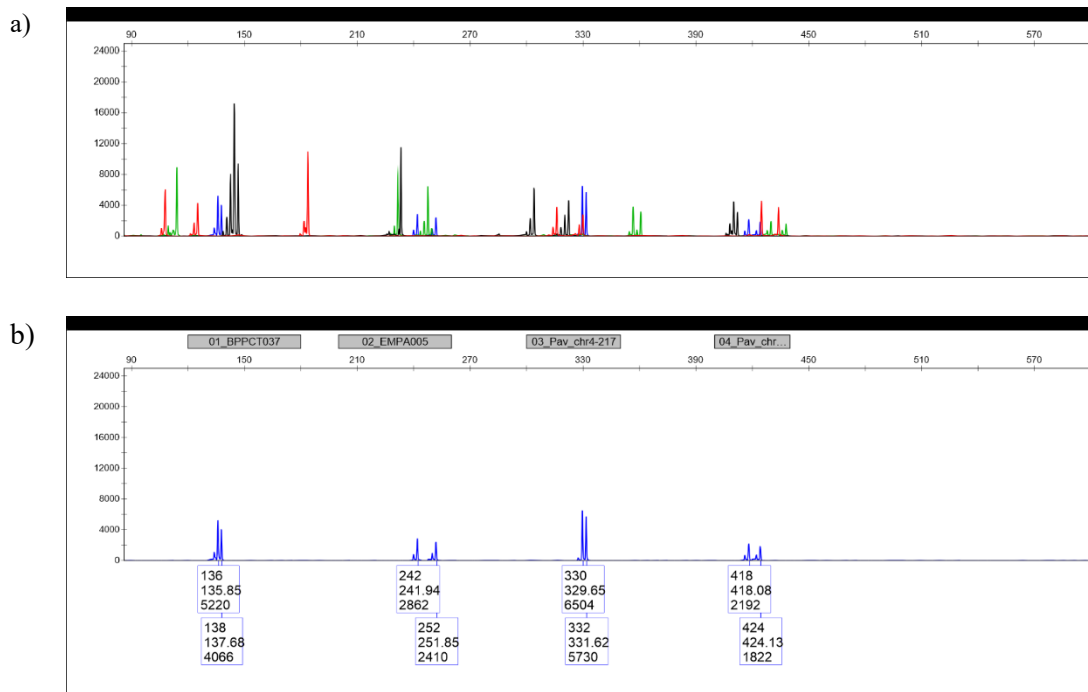
Marker	Značení/kanál	Rozmezí délky alel (nt)	Identifikované alely
BPPCT037	6-FAM	132-166	132, 136, 138, 142, 146, 148, 150, 154, 158, 162, 166
EMPA005	6-FAM	212-254	212, 229, 234, 237, 240, 242, 244, 250, 252, 254
Pav_chr4_217	6-FAM	313-340	313, 326, 330, 332, 340
Pav_chr6_505	6-FAM	406-436	406, 408, 412, 416, 418, 424, 426, 430, 436
Pav_chr1_073	VIC	114-136	114, 116, 118, 120, 124, 126, 128, 130, 132, 134, 136
Pav_chr3_706	VIC	218-248	218, 226, 228, 230, 232, 234, 236, 238, 240, 242, 244, 246, 248
Pav_chr5_144	VIC	332-365	332, 349, 351, 353, 355, 357, 359, 361, 363, 365
Pav_chr2_274	VIC	406-440	406, 416, 418, 424, 426, 428, 430, 432, 434, 438, 440
UCD-CH11	NED	131-155	131, 133, 135, 137, 141, 145, 147, 149, 151, 153, 155
Pav_chr4_499	NED	227-246	227, 233, 239, 246

Marker	Značení/kanál	Rozmezí délky alel (nt)	Identifikované alely
Pav_chr3_002	NED	300-324	300, 302, 304, 306, 308, 310, 312, 314, 316, 318, 320, 322, 324
Pav_chr8_438	NED	386-418	386, 394, 396, 401, 408, 410, 412, 416, 418
Pav_chr6_178	PET	108-131	108, 114, 116, 118, 120, 122, 123, 125, 129, 131
CPPCT006	PET	176-202	176, 180, 182, 184, 186, 196, 198, 200, 202
Pav_chr7_798	PET	329-361	310, 316, 318, 320, 322, 324, 326, 328, 330, 332, 334, 413
Pav_chr7_867	PET	425-462	425, 434, 440, 442, 446, 450, 458, 460, 462

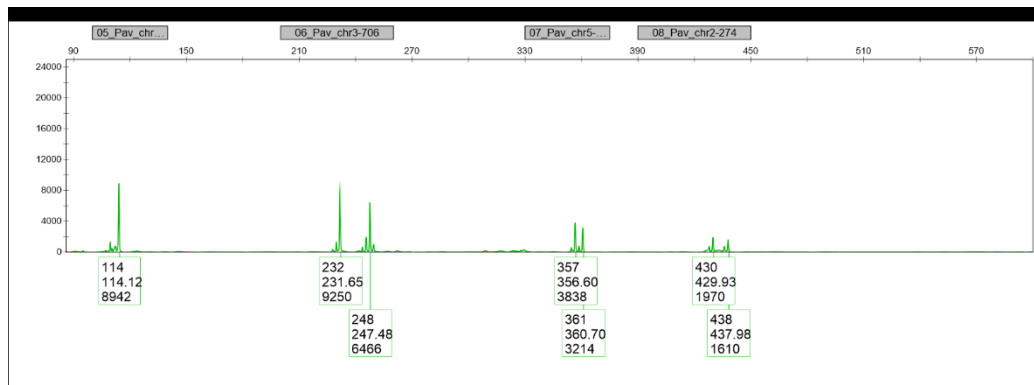
V každém běhu fragmentační analýzy je také vhodné analyzovat několik tzv. referenčních odrůd, které slouží jako kontrola, neboť obsahují známou sadu alel jednotlivých SSR markerů. Jsou tedy vhodné i k validaci výsledků při přenosu metody na jiné pracoviště nebo při mezilaboratorním porovnávání, jelikož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

Příklad grafického zobrazení výsledku je znázorněn ve formě elektroforeogramů na Obrázku 1a–e pro referenční odrůdu 'Tamara'. Jako kontroly jsou vhodné ověřené odrůdy/genotypy, jejichž seznam je uveden v kapitole 3.2.3, délky alel jednotlivých SSR markerů u těchto referenčních odrůd jsou uvedeny v Tabulce 7.

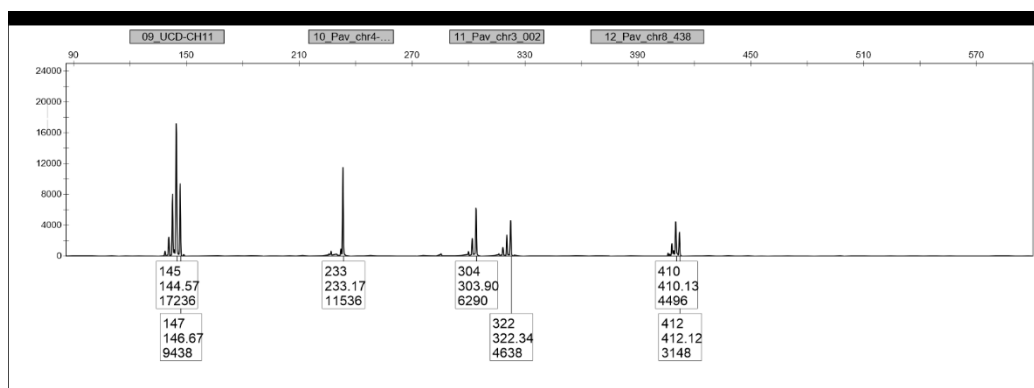
Obrázek 1a–e. Ukázka fragmentační analýzy u referenční odrůdy 'Tamara'. a) překryv všech barevných kanálů, b) modrý kanál – 6-FAM, c) zelený kanál – VIC, d) žlutý kanál – NED, e) červený kanál – PET. Šedivé obdélníčky u jednotlivých barevných kanálů vymezují jednotlivé markery, čísla v rámečcích pak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



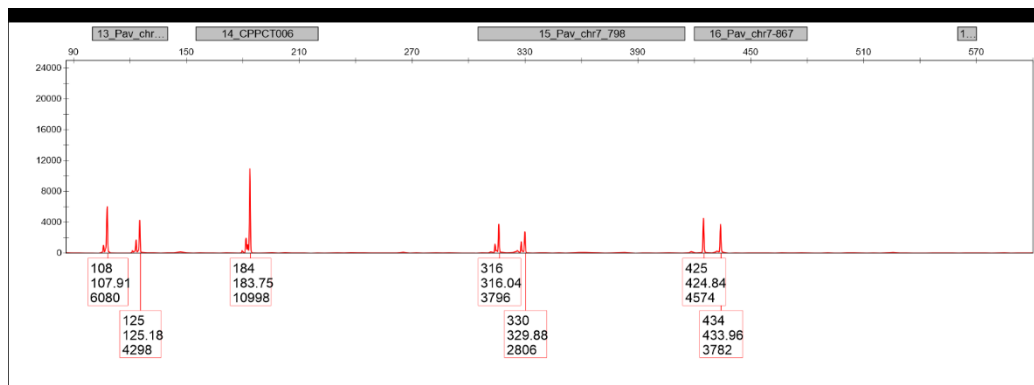
c)



d)



e)





VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOCNÁŘSKÝ
HOLOVOUSY s.r.o. se sídlem č.p. 129, 508 01 Holovousy
Laboratorní komplement, Laboratoř molekulární biologie

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

	BPPCT037	EMPA005	Pav_chr4_217	Pav_chr6_505	Pav_chr1_073	Pav_chr3_706	Pav_chr5_144	Pav_chr2_274
'Burlat'	136 138	240 252	332 332	424 424	120 124	232 238	353 359	426 428
'Early Korvik'	132 142	252 252	330 340	416 424	114 130	230 232	351 363	426 428
'Justyna'	138 142	252 252	330 340	424 424	128 130	238 248	351 357	416 438
'Kasandra'	136 142	252 252	330 332	418 424	120 128	232 238	353 357	428 430
'Kordia'	136 142	252 252	330 340	406 424	120 130	230 238	351 359	416 428
'Rivan'	142 142	252 252	332 340	418 426	118 128	230 248	353 361	424 426
'Tamara'	136 138	242 252	330 332	418 424	114 114	232 248	357 361	430 438
'Těchlovan'	138 142	252 252	313 330	406 418	114 120	230 234	351 357	416 430

	UCD-CH11	Pav_chr4_499	Pav_chr3_002	Pav_chr8_438	Pav_chr6_178	CPPCT006	Pav_chr7_798	Pav_chr7_867
'Burlat'	147 151	233 246	316 320	410 412	108 116	184 184	310 320	440 458
'Early Korvik'	141 151	233 239	308 314	410 416	116 129	184 200	318 330	343 440
'Justyna'	145 145	227 233	308 322	410 412	108 108	184 184	318 330	434 440
'Kasandra'	145 151	246 246	314 320	410 410	116 120	184 184	310 332	434 458
'Kordia'	145 151	233 246	304 308	410 412	108 116	184 184	310 318	440 460
'Rivan'	141 145	227 233	304 322	386 408	120 123	184 196	310 316	425 446
'Tamara'	145 147	233 233	304 322	410 412	108 125	184 184	316 330	425 434
'Těchlovan'	145 151	227 246	302 308	410 412	108 116	184 184	318 332	434 460

3.2.5.2 Možné problémy při analýze dat („Troubleshooting“)

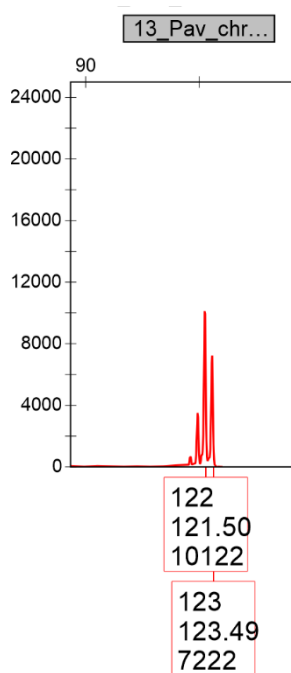
Software GeneMapper vyhodnocuje data z fragmentační analýzy automaticky, vyžaduje však kontrolu odborného pracovníka, neboť není zcela bezchybný. V některých případech může dojít k nevyhodnocení určité alely či k vyhodnocení nesprávné alely, např. z důvodu výrazného „stutteringu“ (kratší varianty dané alely, která vzniká chybovostí DNA polymerázy). Možný je také výskyt dříve nepozorovaných alel, v tomto případě se doporučuje ověření této alely simplexovou PCR reakcí a fragmentační analýzou (všechny alely publikované v této metodice pro jednotlivé SSR markery byly simplexovou analýzou ověřeny).

Kontrolu je vhodné provádět v softwaru GeneMapper nezávisle dvěma osobami, zejména když se jedná 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 nejasnostem při vyhodnocování (např. kumulace výrazně stutterujících alel lišících se o 2 nukleotidy v jednom genotypu, nebo chimérizmus), je třeba dané alely porovnat s jinými genetickými profily, pro které jsou grafické výstupy jednotlivých alel jednoznačné. V následujícím textu jsou uvedeny nejčastější příklady problematiky vyhodnotitelných alel, kterým je vhodné věnovat zvýšenou pozornost.

3.2.5.2.1 Alely lišící se pouze o 1 nukleotid

Alely se sekvencí lišící se o jediný nukleotid nebyly pozorovány, nelze však vyloučit, že by se v nově analyzovaných genotypech mohly vyskytnout. U SSR markeru Pav_chr6_178 jsou sice popsány alely 122 a 123, označení alel však vzniká zaokrouhlováním délky alely identifikované v genetickém analyzátoru. Ve skutečnosti se liší téměř o 2 nukleotidy a jsou tedy snadno rozlišitelné, jak je patrné z Obrázku 2.

Obrázek 2: Marker Pav_chr6_178 – ukázka alel 122 a 123 v jednom genotypu. Alela 122 má relativní velikost 121,5 nukleotidu, zatímco alela 123 má velikost relativní velikost 123,49, ve skutečnosti se tedy tyto alely lišily při analýze na kapilárním genetickém analyzátoru o 1,99 nukleotidu.

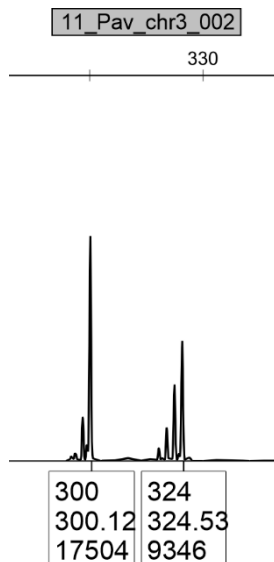


3.2.5.2.2 „Stuttering“ alel

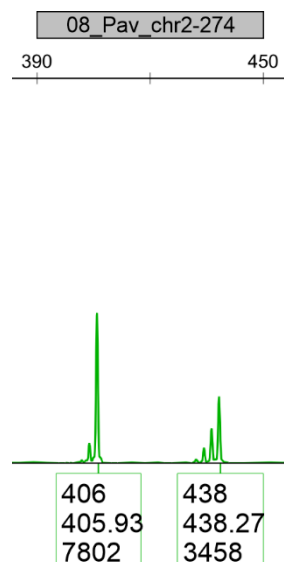
Významnou komplikací při vyhodnocování dat může být vysoký tzv. „stuttering“ u některých alel. Stuttering obvykle vzniká z důvodu skluzu DNA polymerázy při PCR reakci po nukleotidové repetici zpravidla o délce 1–2 báze, markery s delší jednotkou repetice stutter obvykle nevykazují. SSR markery použité v této metodice obsahují v naprosté většině případů dinukleotidovou repetici, pouze Pav_chr4_499 vzniká opakováním 6 nukleotidů. Ke skluzu dochází z důvodu přechodného odpoutání komplexu DNA polymerázy a nově syntetizovaného DNA vlákna od templátové DNA, kdy se v repetitivních oblastech může DNA polymeráza opětovně připojit k templátové DNA v pozici o jedno nebo dvě opakování před nebo častěji za místem, kde se odpojila. Nejvyšší signál zpravidla vykazuje přesná kopie alely, kratší a delší fragmenty lišící se o násobek délky repetice pak vykazují signál slabší. V případě velmi vysokého opakování však může mít přesná kopie alely i nižší signál než stutter. Obvykle se stutter zvyšuje s počtem opakování repetice. Před některými alelami se může vyskytnout i více vrcholů stutteru, většinou mají vrcholky stutteru s kratší délkou nižší signál než stutter s delší délkou (tj. signál postupně narůstá). V případě výskytu stutteru za alelou byl pozorován pouze vrcholek s minimální výškou. Obrázek 3 ukazuje příklady stutterujících alel.

Obrázek 3a-c: Příklady stutterujících alel různých SSR markerů.

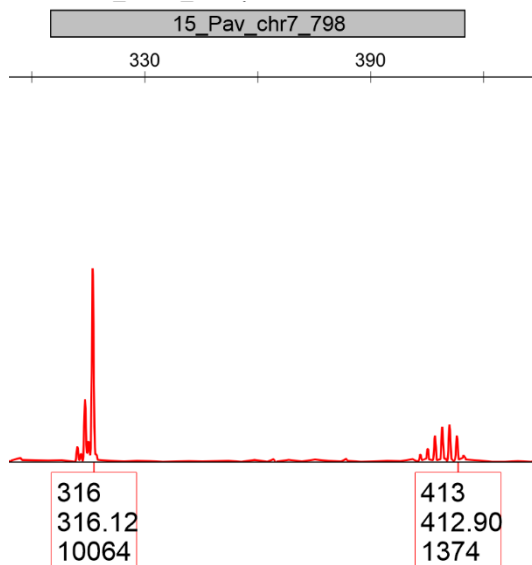
- a) Alela 300 SSR markeru Pav_chr3_003 vykazuje velmi nízký stutter, zatímco u alely 324 přesahuje vrchol stutteru o 2 nt kratšího polovinu výšky hlavního vrcholu alely.



- b) Alela 406 SSR markeru Pav_chr2_274 vykazuje velmi nízký stutter, zatímco u alely 438 dosahuje vrchol stutteru o 2 nt kratšího zhruba do poloviny výšky hlavního vrcholu alely.



- c) Alela 316 SSR markeru Pav_chr7_798 se stutterem dosahujícím cca do 1/3 výšky alely a alela 413 s několikanásobným stutterem přesahujícím hlavní vrchol.



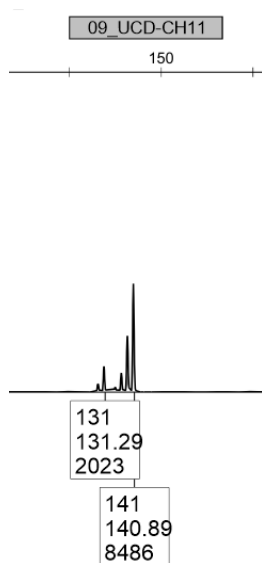
V případech, kdy dojde k překryvu „stutterujících“ alel či překryvu alely bez stutteru se stutterem jiné alely, je třeba počítat s tím, že se signály alely i stutteru delší alely sčítají. V případě nejistoty, zda se jedná o stutter či další alelu, se doporučuje porovnat grafický výstup z fragmentační analýzy s odrudou obsahující danou alelu izolovaně, tedy bez alel, které by interferovaly svým stutterem s analyzovanou alelou. Všechny pozorované kombinace alel všech analyzovaných SSR markerů však byly bezproblémově vyhodnotitelné.

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

3.2.5.2.3 Nízký signál alely

Problematické mohou být také alely, které vykazují nízký signál oproti ostatním alelám. V případě této metodiky je s nízkým signálem amplifikována alela 131 SSR markeru UCD-CH11, příklad je uveden na Obrázku 4. Nízký signál alel může být dán např. hůře amplifikovatelnou sekvencí alely, popřípadě výskytem mutací v sekvenci, na kterou nasedá primer. V případě tohoto SSR markeru byla identifikována mutace v místě nasedání forwardového primeru u alely 131, proto byl tento primer degenerován. Úpravou sekvence primeru byl signál této alely zvýšen, přesto však zůstal výrazně nižší než u ostatních alel tohoto SSR markeru. Doporučuje se proto hodnotit vzorky s dostatečně vysokým signálem, aby nemohly být hůře amplifikovatelné alely opominuty. Také alely vykazující vysoký stutter mívají nižší signál (např. alela 413 SSR markeru Pav_chr7_798) a je třeba hodnotit vzorky s dostatečně vysokým signálem, aby mohla být příslušná alela spolehlivě identifikována (viz Obrázek 3c výše).

Obrázek 4: Alela 131 SSR markeru UCD-CH11 s nízkým signálem oproti ostatním alelám.

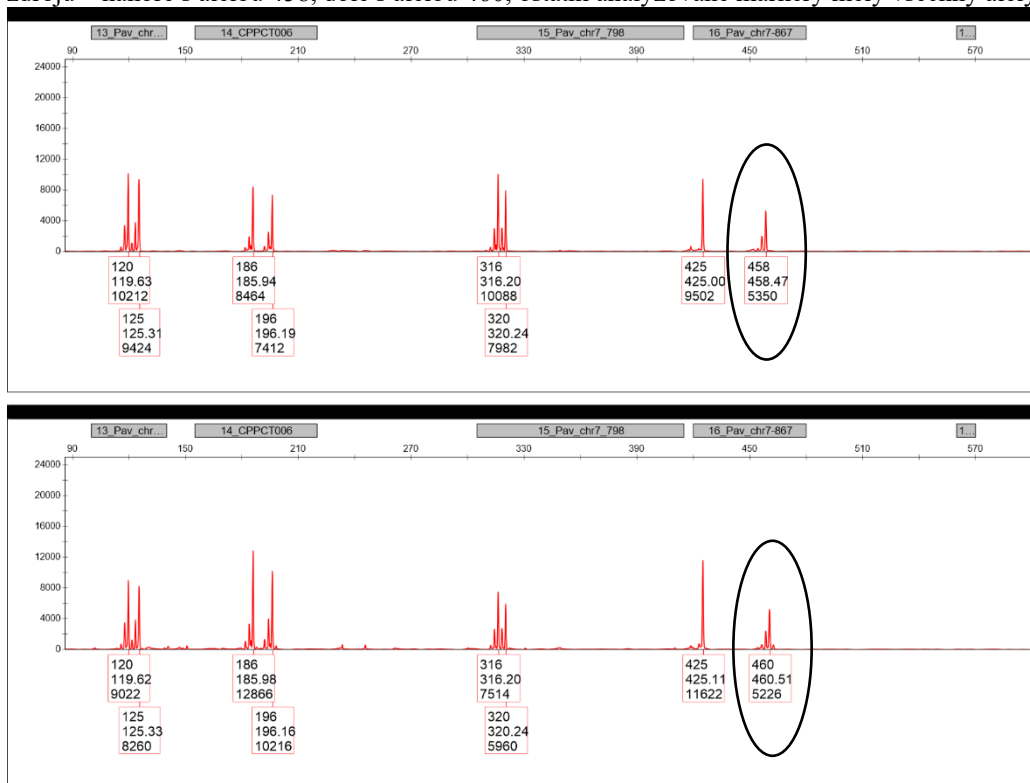


3.2.5.2.4 *Mutace v SSR markerech u odrůd*

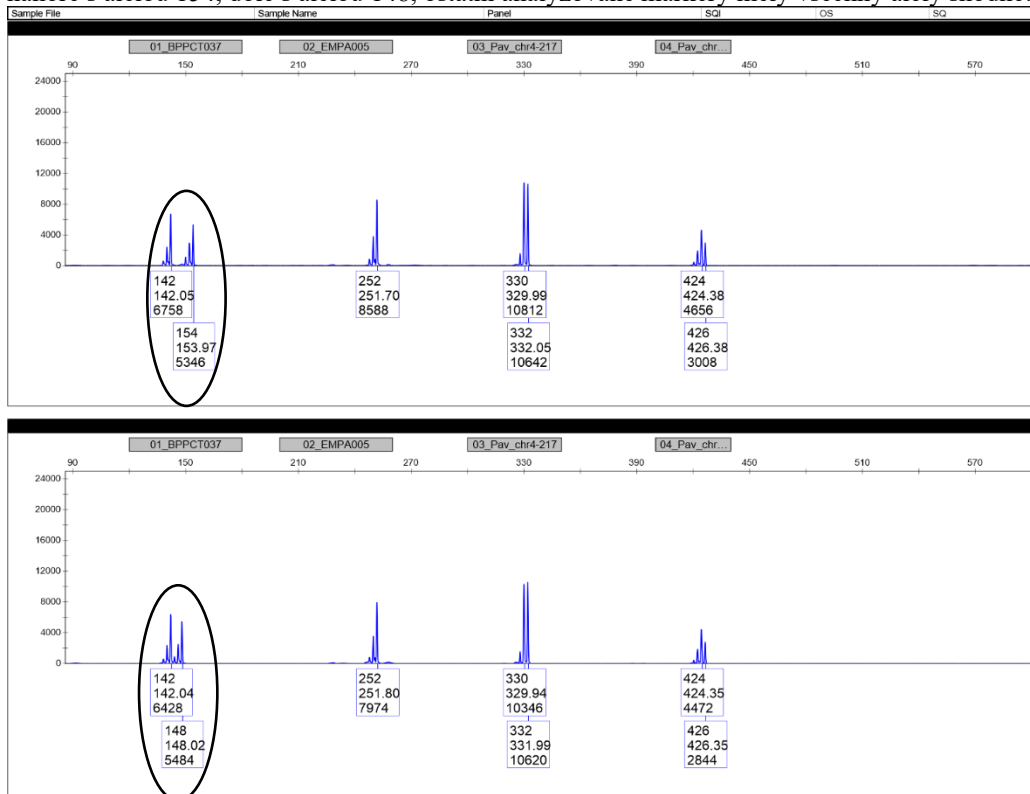
U některých odrůd pocházejících z různých zdrojů byl pozorován stejný soubor alel všech markerů kromě jediné alely. V těchto případech docházelo obvykle k posunu určité alely, kdy původní alela ze spektra vymizela. Většinou se jednalo o posun alely o dva nukleotidy (pravděpodobně díky skluzu polymerázy) (viz Obrázek 5a), byla však pozorována i odrůda, u které došlo k větší změně délky (Obrázek 5b). V některých případech se vzorky stejné odrůdy lišily přítomností jedné alely navíc, kdy tato nová alela byla o 2 nukleotidy kratší, popřípadě delší než dříve pozorovaná alela (Obrázek 5c). V těchto případech lze na vzorky nahlížet jako na mutace téže odrůdy. Mutace (nejen) v SSR markerech v rámci vegetativně množených odrůd rostlin jsou poměrně běžným jevem, byly popsány např. i u hrušní (Queiroz, 2019), révy vinné (Gonçalves, 2013) či slivoní (Čmejlová, 2025).

Obrázek 5a–c: Ukázka různých typů mutace v SSR markerech.

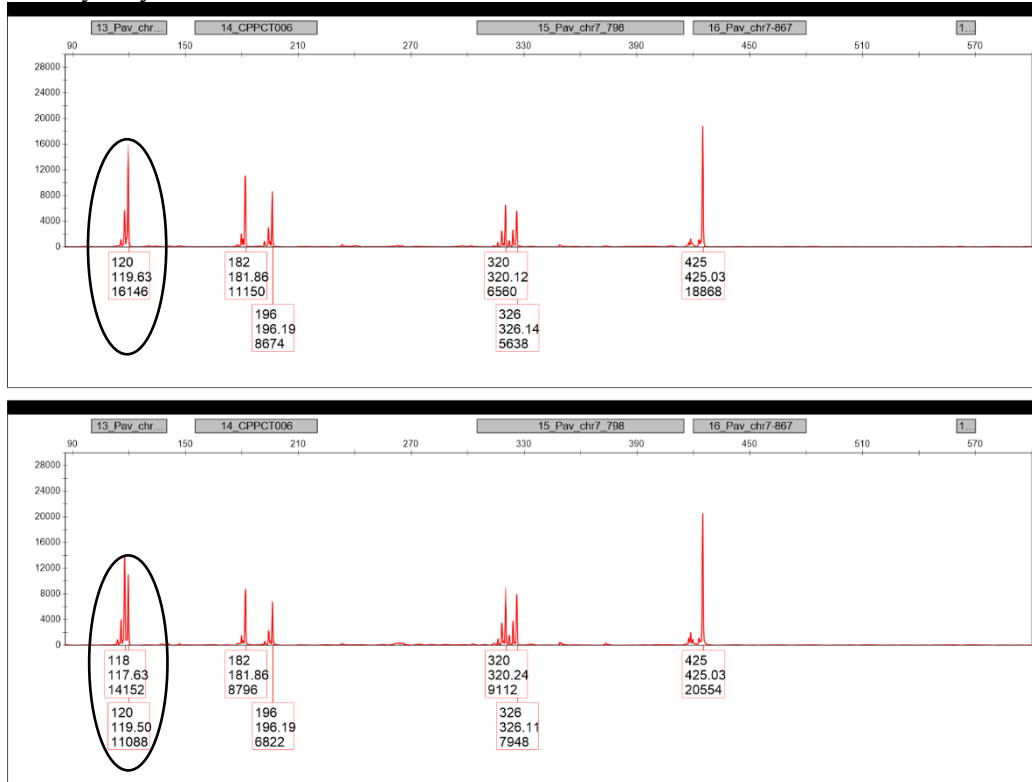
- a) Pav_chr7_867 – změna alely o 2 nukleotidy (černé ovály) – odrůda 'Valerij Tschkalov' ze dvou různých zdrojů – nahore s alelou 458, dole s alelou 460, ostatní analyzované markery měly všechny alely shodné.



- b) BPPCT037 – změna alely o více nukleotidů (černé ovály) – odrůda 'Magda' ze dvou různých zdrojů – nahore s alelou 154, dole s alelou 148, ostatní analyzované markery měly všechny alely shodné.

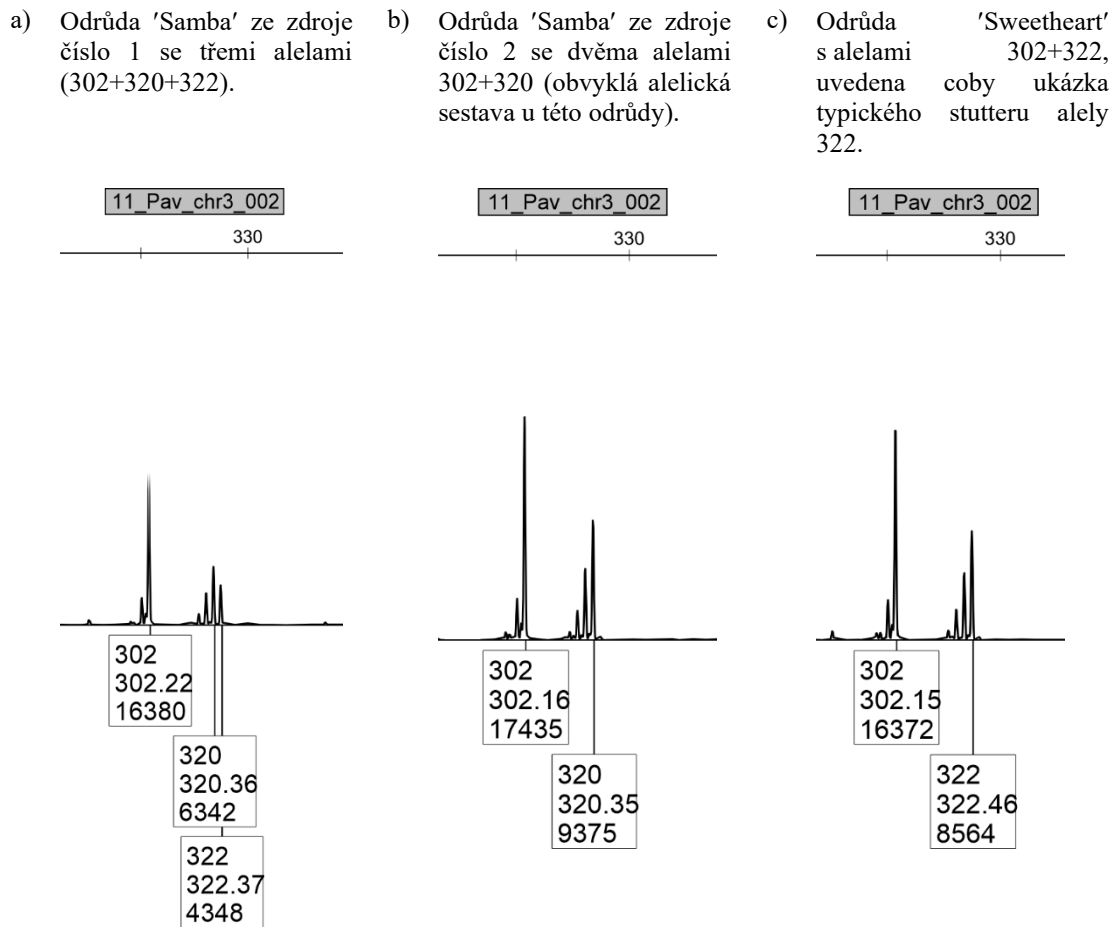


- c) UDP98-412 – výskyt nové alely (černé ovály) - odrůda 'Winklerova' ze dvou různých zdrojů – nahoře homozygot pouze s alelou 120, dole heterozygot s alelami 118 a 120, ostatní analyzované markery měly všechny alely shodné.



Ve vzácných případech lze pozorovat i chimérizmus, kdy jeden ze vzorků téže odrůdy je v určitém markeru triploidní, jak bylo pozorováno například u odrůdy 'Samba'. Princip vzniku chimérizmu je stejný jako u výše uvedených mutací, jen došlo k této mutaci pouze v části rostliny a vzorek odebraný pro analýzu DNA obsahoval jak původní, nemutovanou DNA, tak mutovanou DNA. Ukázka chimérizmu je na obrázku 6a-c.

Obrázek 6a–c: Příklad chimérizmu u SSR markeru Pav_chr3_002.



3.2.5.2.5 Zdroj chyb v pre-analytické a analytické fázi

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

Taktéž může dojít k chybám, které jsou patrné ze samotného elektroforeogramu, kdy je u více markerů (ne však nutně u všech) pozorováno více než 2 alely. V takových případech se jedná například o kontaminace vzorků nebo neúmyslné smíchání více vzorků dohromady při analýzách z více listů či výhonů, kdy mohlo například dojít k naroubování více odrůd na jednu podnož, prorůstání podnože či odběru vzorků ze dvou sousedních stromů, které měly propletené větve. Rovněž mohlo dojít ke smísení vzorků v laboratoři. Opět je nutné analýzu opakovat a identifikovat krok, ve kterém došlo ke smísení vzorků.

4. SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ

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

Mezinárodní uskupení The European Cooperative Programme for Plant Genetic Resources (ECPGR; www.ecpgr.cgiar.org) doporučilo pro genotypizaci třešně ptačí jednotlivě analyzovaných 16 SSR markerů (Clarker and Tobutt, 2009), některé z nich však vykazovaly nízkou heterogenitu, a proto byla tato sada během projektu EU.cherry inovována. Z původní sady bylo ponecháno pouze 11 SSR markerů a bylo přidáno 7 dalších SSR markerů ([EU.CHERRY Final Activity Report final web 27 09 2019.docx](#)). Tři z nově přidávaných SSR markerů jsou však v současnosti hojně využívány pro molekulárními markery asistovanou selekci semenáčů třešní při šlechtění a u nově vyšlechtěných odrůd tak budou ztrácet heterogenitu. Z tohoto důvodu se jejich zařazení mezi genotypizační SSR markery nejeví jako příliš šťastné. Sada 18 SSR markerů vyvinutá v projektu EU.Cherry je analyzována ve dvou multiplexech. I přes použití většího počtu SSR markerů a jejich vyšší heterogenitu se však stále nepodařilo některé odrůdy odlišit.

V rámci této metodiky byla vyvinuta sada 16 SSR markerů, která umožňuje analyzovat genotypy třešně ptačí v jediné reakci. Dvanáct zahrnutých SSR markerů bylo získáno díky použití celogenomových sekvencí 235 odrůd pocházejících z celého světa (Čmejlová, v přípravě). Ty byly doplněny dříve známými kvalitními SSR markery známými z literatury tak, aby výsledná genotypizační sada obsahovala z každého třešňového chromozomu 2 SSR markery. Vyvinutá metoda představuje nejlevnější řešení pro stanovení genotypu a zároveň minimalizuje možnou chybovost, ke které může dojít při kompletaci výsledků více analýz. Zároveň má velmi nízkou pravděpodobnost náhodné shody mezi dvěma různými odrůdami (řádově 10^{-19}).

5. POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY

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

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

Ověřování a identifikace odrůd jsou příklady uplatnění, pro které je nutné mít vytvořenu referenční databázi odrůd, s kterou je možné porovnávat genetické profily testovaných vzorků. Ověřování dává odpověď na otázku, zda jsou testované vzorky shodné mezi sebou, popřípadě se známou referenční odrůdou. Pro identifikaci neznámé odrůdy je nezbytná databáze alelických sestav SSR markerů použitých pro genotypizaci, která byla získána z co nejrozsáhlejší kolekce ověřených odrůd. Dle účelu lze tedy vytvářet různé typy referenčních databází.

5.1.1 Referenční databáze pro pěstitelskou praxi v České republice

Pro pěstitelskou praxi je vhodná databáze genotypů nejčastěji pěstovaných odrůd, jako jsou například 'Burlat', 'Kordia', 'Regina', 'Tamara', 'Sam', 'Lapins', 'Stella' či 'Summit'.

Referenční databáze pro pěstitelskou praxi však může být vytvořena „na míru“, např. bude obsahovat pouze odrůdy pěstované/množené v určitém podniku.

5.1.2 Referenční databáze pro účely uznávacího řízení

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

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

Metodika genotypizace třešně ptačí může být uplatněna jak na začátku odrůdových zkoušek pro účely registrace či udělení ochranných práv, kdy může být zkoumáno, zda se jedná o novou odrůdu, nebo mutaci/klon známé odrůdy, tak zejména při ověřování odrůd při prodlužování registrace. V rámci vývoje této metodiky byla mimo jiné provedena i analýza referenčního souboru třešně ptačí udržívaného v NOÚ, kdy bylo celkem ověřeno 92 zde udržívaných odrůd/genotypů. Alelické sestavy analyzovaných SSR markerů jednotlivých odrůd má NOÚ k dispozici a předpokládá zavedení metodiky genotypizace třešně ptačí do své praxe.

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

5.1.3 Referenční databáze pro sbírkové účely

Česká legislativa ukládá (zejména zákony č. 368/1992 Sb. a 148/2003 Sb.) a upravuje základní podmínky pro shromažďování, hodnocení, dokumentaci, konzervaci a využívání genetických zdrojů rostlin a mikroorganismů, které jsou důležité pro výživu a zemědělství v rámci Akčního plánu konzervace a využívání genetických zdrojů. Mezi tyto komodity patří i třešně ptačí, která je uchovávána v genofondové sbírce udržívané ve VÝZKUMNÉM A ŠLECHTITELSKÉM ÚSTAVU OVOCNÁŘSKÉM HOLOVOUSY, s.r.o. Informace o udržívaných odrůdách jsou vedeny v databázi [GRIN Czech](#), kterou spravuje Národní centrum zemědělského a potravinářského výzkumu, v.v.i.

Genofondy nabývají na důležitosti zejména v poslední době s uplatňováním evropské agendy „Green Deal“, která je zaměřena mimo jiné na snížení spotřeby hnojiv a prostředků na ochranu rostlin, neboť jednou z možností může být cílené šlechtění odrůd s požadovanými vlastnostmi. Genofondy totiž shromažďují i staré a krajové odrůdy třešně ptačí, které mohou být zajímavým zdrojem znaků pro moderní šlechtitelské programy, jako jsou např. zvýšení odolnosti odrůd vůči chorobám nebo (a)biotickým faktorům. Genetická analýza těchto odrůd umožňuje identifikaci potenciálních duplicit či synonym v genofondových sbírkách. Vhodná je i pro ověřování jejich původu, kdy je schopná potvrdit či vyvrátit příbuznost jednotlivých odrůd. Znalost co největšího množství genetických profilů odrůd umožňuje i další aplikace, např. identifikaci neznámých odrůd ze starých výsadeb, alejí či zámeckých zahrad v rámci zkoumání kulturního dědictví na území naší republiky.

5.2 *Prověření produkčního řetězce výroby výpěstků*

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

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

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

- 1) Zavedení unikátního značení konkrétních stromů, které se používají jako zdroj rozmnožovacího materiálu ve výrobním procesu.
- 2) Vytvoření referenční databáze genetických profilů konkrétních stromů používaných jako primární zdroj rozmnožovacího materiálu (matečnice), pokud je má výrobní podnik k dispozici. Případné ověření zdroje rozmnožovacího materiálu u subdodavatele nebo šlechtitele.
- 3) Ověření pravosti odrůdy s využitím referenční databáze genetických profilů při NOÚ.
- 4) Vytvoření a průběžná aktualizace genetických profilů všech stromů používaných pro výrobu rozmnožovacího materiálu/stromků (prostorové izoláty).
- 5) Vytvoření referenční databáze odrůd pěstovaných/množených v daném podniku.
- 6) Namátková kontrola prodáváných výpěstků a jejich srovnání s referenční databází. Cílená kontrola v případě podezření na záměnu.

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

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

6. EKONOMICKÉ ASPEKTY

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

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

V České republice bylo v letech 2020-2024 na produkční ploše 863,6 ha pěstováno průměrně 516 ks třešní, které poskytly průměrný pětiletý výnos 1176,8 tun třešní (všechna data čerpána z [CZSO-výnosy třešní](#)). Rok 2024 byl ale významně ovlivněn jarními mrazy, a proto bylo sklizeno pouze 307 tun (26 % pětiletého průměru). Průměrný výnos jednoho stromu tak byl pouze 0,59 kg třešní (oproti tomu v roce 2023 byla tato hodnota téměř pětinasobná, a to 2,8 kg). Mezi roky 2020–2024 se průměrný výnos jednoho stromu pohyboval v rozmezí 0,59-3,67 kg (průměr 2,29 kg, medián 2,67 kg) ([ČSÚ](#)). Po přepočtu byl jeden hektar osázen průměrně 600 stromy. Výnos z jednoho hektaru se pak mezi lety 2020–2024 pohyboval v rozmezí 0,37-2,14 tun/ha (průměr 1,36 t/ha), údaje za rok 2025 nebyly v době vydání metodiky k dispozici. Průměrná výkupní cena pro zemědělské výrobce za 1 kg třešní byla v roce 2023 na základě údajů týdenních cen 71,08 Kč/kg, za rok 2024 pak 85,37 Kč/kg a v roce 2025 se zvýšila na 92,45 Kč/kg, všechny ceny jsou uváděny bez DPH a dopravy (viz pravidelné [Zprávy o trhu ovoce SZIF](#)).

Při uvažovaném nulovém výnosu kvůli nevhodně osázenému sadu (např. nevhodné klimatické podmínky, výsadba špatné opylovací odrůdy u cizosprašných odrůd...) tak dochází k průměrné ztrátě výnosů z prodeje cca 126 700 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 380 000 Kč/ha/3 roky, ve skutečnosti však bude aktuální ztráta v prvních třech letech o něco nižší, neboť mladý sad nebude ještě dosahovat průměrných publikovaných výnosů na hektar. Část ztráty se však přenesle do následujících let, kdy nově osázený sad bude plodit méně, než by plodil o tři roky starší sad. K nulovému výnosu nemusí dojít, pokud mohou být případné plody jiné odrůdy prodány. Kromě ušlého zisku však vznikly i náklady výsadbou nesprávné odrůdy (pořízení stromků, náklady na výsadbu) a udržováním celého sadu až do okamžiku, kdy bude nesprávně vysazená odrůda rozpoznána. Tyto náklady budou vždy velmi individuální. Pro orientaci jsou zde uvedeny výše dotace na pro rok 2025 ([Dotace2025](#)):

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

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

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

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

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

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

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

Právně chráněné odrůdy jsou zatíženy licenčními poplatky a prodávají se na základě smlouvy. Licenční poplatky slouží k pokrytí nákladů šlechtitelů při tvorbě nových odrůd a zároveň jsou jejich ziskem. Část licenčních poplatků připadá také školkařům a dalším článkům výrobního a prodejního řetězce. Cena licence je připočítávána k prodaným očkům licencované odrůdy (cca 5–12 Kč/očko, obvykle dle počtu odebraných oček, odrůdy a šlechtitele) a také k prodávaným stromkům (obvykle 20–30 Kč, opět v závislosti na počtu odebraných stromků, odrůdě či šlechtiteli). Při neoprávněném prodeji oček licencovaných odrůd bez licenčního poplatku tak vzniká škoda ve výši 2 500 až 6 000 Kč na osázený hektar (500 stromků) a při neoprávněném prodeji stromků bez licenčního poplatku pak vzniká škoda 10 000 – 15 000 Kč/ha. Tato škoda se dělí mezi šlechtitele a školkaře, případně další články výrobního a prodejního řetězce. Zakoupení licencované odrůdy přináší i přes vyšší pořizovací cenu stromků pěstitelům přínos, neboť se jedná o moderní odrůdy s vylepšenými vlastnostmi oproti dříve vzniklým odrůdám. Celý produkční řetězec by tak měl mít zájem na tom, aby u licencovaných odrůd byla pravost ověřena. K licencovaným odrůdám třešní patří například 'Tamara', 'Kassandra', 'Emily', 'Irena', 'Felicita' či 'Fabiola' ([Odrůdová kniha 2025](#)).

6.4 Ověřování odrůd při registraci a při prodloužení jejich registrace u Národního odrůdového úřadu – kalkulace nákladů

Vyhláška Ministerstva zemědělství č. 221/2002 Sb., Příloha 2 stanovuje sazebník náhrad nákladů za odborné a zkušební úkony zahrnující zkoušky odlišnosti, uniformity a stálosti (tzv. DUS testy), které vykonává v působnosti ÚKZÚZ. U třešně ptačí byly stanoveny

ve výši 4 428 Kč/rok, kdy při registraci odrůdy trvají tyto zkoušky obvykle 2–3 roky (Ehrenbergerová, 2014), jedná se tedy o 8 856 – 13 284 Kč. Při prodlužování registrace může být tato doba kratší, ale vždy je třeba počítat alespoň s ročním poplatkem za testování. V případě podezření, že je přihlašovaný materiál pouze mutací již uznané odrůdy, popřípadě shodný s již uznanou odrůdou (klon), může genotypování tuto domněnku potvrdit, nebo vyvrátit. V případě potvrzení tohoto podezření již není třeba DUS testy provádět. V případě prodlužování registrace odrůdy lze jednoznačně a velmi rychle potvrdit shodu s dříve registrovanou odrůdou a DUS testy mohou být zcela vynechány.

6.5 Shrnutí

Oproti výše vyčísleným nákladům stojí náklady na genotypování kalkulované pro spotřební materiál a chemikálie (bez úvahy mzdových nákladů a odpisů přístrojového vybavení, které tvoří také velmi podstatnou část nákladů). U izolace DNA z jednoho vzorku jsou průměrné náklady chemikálií a laboratorního materiálu cca 120 Kč/vzorek. Náklady na multiplexní PCR a fragmentační analýzy lze vyčíslit pro 16 SSR markerů v 1 multiplexní reakci na přibližně 300 Kč. K ceně je potřeba připočíst i náklady na současnou analýzu laboratorních kontrol a provoz kapilárního genetického analyzátoru. Pokud laboratoř nevlastní kapilární genetický analyzátor, může za úplatu v řádu stovek Kč využít služeb fragmentační analýzy u řady firem/organizací, které tuto službu nabízejí.

Náklady jsou kalkulovány pro rok 2025 a při neustále se zvyšujících cenách vstupních materiálů a chemikálií je třeba počítat s jejich nárůstem. Ve výsledku se bude celková cena analýzy odvíjet od počtu analyzovaných vzorků, záleží velmi často na požadavcích zákazníka, kolik vzorků považuje za vhodné analyzovat. Analýzu lze při předpokladu testování identické odrůdy zlevnit i spojením 2–3 vzorků do jedné analýzy, kdy lze ještě garantovat zjištění přítomnosti více genotypů. V souhrnu lze však předpokládat, že se výsledná cena za analýzu bude pohybovat v řádu nižších tisíců Kč a měla by být levnější než DUS testy. Při porovnání možných ztrát/nákladů vyčíslených výše je tak zřejmé, že ve všech uvedených příkladech využití této metodiky lze očekávat jednoznačný finanční přínos pro jejího uživatele.

7. SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY

- Barreneche, T., Cárcamo de la Concepción, M., Blouin-Delmas, M., Ordidge, M., Nybom, H., Laciš, G., Feldmane, D., Sedlak, J., Meland, M., Kaldmäe, H., et al. (2021) SSR-Based Analysis of Genetic Diversity and Structure of Sweet Cherry (*Prunus avium* L.) from 19 Countries in Europe. *Plants*, 10, 1983. <https://doi.org/10.3390/plants10101983>.
- Clark, J. B., Tobutt, K. R. (2009). A standard set of accessions, microsatellites and genotypes for harmonising the fingerprinting of cherry collections for the ECPGR. *Acta Horticulturae*, 814, 615–618. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2009.814.104>.
- Čmejlová, J., Pluhařová, K., Krška, B., Čmejla, R. (2025) A New Set of SSR Markers Combined in One Reaction for Efficient Genotyping of the Hexaploid European Plum (*Prunus domestica* L.). *Plants*, 14, 2281. <https://doi.org/10.3390/plants14152281>.
- Dirlewanger, E., Cosson, P., Tavaud-Pirra, M., Aranzana, M., Poizat, C., Zanetto, A., Arús, P., Laigret, F. (2002). Development of microsatellite markers in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] and use in genetic diversity analysis in peach and sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 105, 127–138. <https://doi.org/10.1007/s00122-002-0867-7>.

- Ehrenbergerová J. (2014) ODRŮDY, OSIVO A SADBA. Brno: Mendelova univerzita v Brně, 105 s. ISBN 978-80-7509-003-4. [Mendelu-ODRŮDY, OSIVO A SADBA.](#)
- Gonçalves, E., Carrasquinho, I., St. Aubyn, A., Martins, A. (2013) Broad-sense heritability in mixed models for grapevine initial selection trials. *Euphytica*, 189, 379–391. <https://doi.org/10.1007/s10681-012-0787-9>.
- Nekvindová, V., Žďárská, I., Suran, P., Krška, B., Čmejlová, J. (2021) Metodika identifikace odrůd meruňky obecné (*Prunus armeniaca* L.) pomocí SSR markerů. Certifikovaná metodika. ISBN 978-80-87030-84-4. [Metodika identifikace odrůd meruňky obecné pomocí SSR markerů.](#)
- Pluhařová, K., Čmejla, R., Krška, B., Voráček, P. a Čmejlová, J. (2024) Genotypizace švestky domácí (*Prunus domestica* L.) pomocí SSR markerů v praxi. ISBN 978-80-88669-02-9. DOI 10.60615/reb7-8p71. [Pluhařová Metodika-genotypizace-švestky-domácí_2024.pdf.](#)
- Pluhařová, K., Čmejlová, J., Krška, B., Voráček, P., Čmejla, R. (2023) Genotypizace jabloně domácí (*Malus × domestica* Borkh.) pomocí SSR markerů v praxi. ISBN 978-80-87030-90-5. DOI 10.60615/DNP4-0X57. [Pluharova Metodika-Genotypizace jablone SSR markery 2023.pdf.](#)
- Rosyara U. R., Bink M. C. A. M., van de Weg, E. et al. (2013) Fruit size QTL identification and the prediction of parental QTL genotypes and breeding values in multiple pedigreed populations of sweet cherry. *Mol Breed*, 32: 875–87. <https://doi.org/10.1007/s11032-013-9916-y>.
- Sandefur, P., Oraguzie, N., Peace C. (2016) A DNA test for routine prediction in breeding of sweet cherry fruit color, Pav-Rf-SSR. *Mol Breed*, 36: 33. <https://doi.org/10.1007/s11032-016-0458-y>.
- Queiroz, Á., Bagoian Guimarães, J., Sánchez, C., Simões, F., Maia de Sousa, R., Viegas, W., Veloso, M.M. (2019) Genetic diversity and structure of the Portuguese pear (*Pyrus communis* L.) germplasm. *Sustainability*, 11(19), 5340. <https://doi.org/10.3390/su11195340>.
- Struss, D., Ahmad, R., Southwick, S. M., Boritzki M. (2003) Analysis of Sweet Cherry (*Prunus avium* L.) Cultivars Using SSR and AFLP Markers. *Journal of the American Society for Horticultural Science*; 128(6):904-909. <https://doi.org/10.21273/JASHS.128.6.0904>.
- Testolin, R., Messina, R., Cipriani, G., De Mori, G. (2023) SSR-based DNA fingerprinting of fruit crops. *Crop Sci*, 63, 390–459. <https://doi.org/10.1002/csc2.20896>.
- Vieira, M. L., Santini, L., Diniz, A. L., de Freitas Munhoz, C. (2016) Microsatellite markers: what they mean and why they are so useful. *Genet Mol Biol*, 39(3), 312-328. <https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2016-0027>.

8. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE

- Čmejlová, J., Rejlová M., Paprštejn, F., Čmejla R. (2021) A new one-tube reaction kit for the SSR genotyping of apple (*Malus × domestica* Borkh.), *Plant Science*, 303, 110768. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2020.110768>.



- Čmejlová, J., Pluhařová, K., Krška, B., Čmejla, R. (2025) A New Set of SSR Markers Combined in One Reaction for Efficient Genotyping of the Hexaploid European Plum (*Prunus domestica* L.). *Plants*, 14, 2281. <https://doi.org/10.3390/plants14152281>.
- Nekvindová, V., Žďárská, I., Suran, P., Krška, B., Čmejlová, J. (2021) Metodika identifikace odrůd meruňky obecné (*Prunus armeniaca* L.) pomocí SSR markerů. Certifikovaná metodika. [Metodika identifikace odrůd meruňky obecné pomocí SSR markerů](#).
- Pluhařová, K., Čmejlová, J., Krška, B., Voráček, P., Čmejla, R. (2023) Genotypizace jabloně domácí (*Malus × domestica* Borkh.) pomocí SSR markerů v praxi. Certifikovaná metodika. [Pluharova Metodika-Genotypizace jablone SSR markery](#).
- Pluhařová, K., Čmejla, R., Krška, B., Voráček, P., Čmejlová, J. (2024) Genotypizace švestky domácí (*Prunus domestica* L.) pomocí SSR markerů v praxi. Metodika. [Pluhařová Metodika-genotypizace-švestky-domácí](#).
- Žďárská, I., Čmejlová, J., Krška, B., Voráček, P., Čmejla, R. (2025) Genotypizace hrušně obecné (*Pyrus communis* L.) pomocí SSR markerů v praxi. Metodika, in press.

PŘÍLOHA – CHARAKTERISTIKA REFERENČNÍCH ODRŮD

'Burlat'

Typ růstu stromu:	velké, široce rozložené koruny
Doba kvetení:	kvete středně raně, je dobrý opylovačem
Zralost:	jednotné zrání ve 2. třesňovém týdnu
Plodnost:	pravidelný a dobrý výnos
Plod:	velký, tvar je srdčitý k člence zakulacený, chuť je dobrá, při deštích plody praskají
Odolnost:	netrpí vrtulí, není náchylný k monilii
Poznámka:	vhodný spíše do sušších oblastí, na ranou odrůdu je chuť velmi dobrý, spolehlivě plodí, je cizosprašný



SSR marker	BPPCT037	EMPA005	Pav_chr4_217	Pav_chr6_505
Délka alel	136 138	240 252	332 332	424 424

SSR marker	Pav_chr1_073	Pav_chr3_706	Pav_chr5_144	Pav_chr2_274
Délka alel	120 124	232 238	353 359	426 428

SSR marker	UCD-CH11	Pav_chr4_499	Pav_chr3_002	Pav_chr8_438
Délka alel	147 151	233 246	316 320	410 412

SSR marker	Pav_chr6_178	CPPCT006	Pav_chr7_798	Pav_chr7_867
Délka alel	108 116	184 184	310 320	440 458

'Early Korvik'

Typ růstu stromu:	středně silný, vzpřímený růst
Doba kvetení:	středně pozdní
Zralost:	4. třesňový týden
Plodnost:	velmi vysoká, brzká
Plod:	mírně srdčitý, pevná dužnina, navinule sladká, velmi dobrá
Odolnost:	k praskání plodů středně odolný, odolný k jarním mrazům
Poznámka:	vysoká plodnost, kvalitní chrupka, vhodná do všech pěstitelských oblastí



SSR marker	BPPCT037	EMPA005	Pav_chr4_217	Pav_chr6_505
Délka alel	132 142	252 252	330 340	416 424

SSR marker	Pav_chr1_073	Pav_chr3_706	Pav_chr5_144	Pav_chr2_274
Délka alel	114 130	230 232	351 363	426 428

SSR marker	UCD-CH11	Pav_chr4_499	Pav_chr3_002	Pav_chr8_438
Délka alel	141 151	233 239	308 314	410 416

SSR marker	Pav_chr6_178	CPPCT006	Pav_chr7_798	Pav_chr7_867
Délka alel	116 129	184 200	318 330	434 440

'Justyna'

Typ růstu stromu:	středně silný, rozložitý až mírně převislý
Doba kvetení	středně pozdní
Zralost:	5.-6. týden
Plodnost:	raná, velmi vysoká
Plod:	široce kulovitý tvar, dužnina je velmi pevná, navinule sladká, šťavnatá, velmi dobrá
Odolnost:	střední odolnost k praskání i poškození květů
Poznámka:	pozdní chrupka s kvalitními plody a raným vstupem do plodnosti a pravidelnou plodností



SSR marker	BPPCT037		EMPA005		Pav_chr4_217		Pav_chr6_505	
Délka alel	138	142	252	252	330	340	424	424

SSR marker	Pav_chr1_073		Pav_chr3_706		Pav_chr5_144		Pav_chr2_274	
Délka alel	128	130	238	248	351	357	416	438

SSR marker	UCD-CH11		Pav_chr4_499		Pav_chr3_002		Pav_chr8_438	
Délka alel	145	145	227	233	308	322	410	412

SSR marker	Pav_chr6_178		CPPCT006		Pav_chr7_798		Pav_chr7_867	
Délka alel	108	108	184	184	318	330	434	440

'Kasandra'

Typ růstu stromu:	středně silný růst, vzpřímený habitus
Doba kvetení:	raná
Zralost:	přelom 2.-3.týdne
Plodnost:	raná, vysoká
Plod:	široce kulovitý tvar, dužnina středně pevná, sladce navinulá chuť, velmi dobrá
Odolnost:	citlivá k praskání plodů na úrovni odrůdy Burlat
Poznámka:	velmi kvalitní raná polochrupka, pravidelně plodná



SSR marker	BPPCT037		EMPA005		Pav_chr4_217		Pav_chr6_505	
Délka alel	136	142	252	252	330	332	418	424
SSR marker	Pav_chr1_073		Pav_chr3_706		Pav_chr5_144		Pav_chr2_274	
Délka alel	120	128	232	238	353	357	428	430
SSR marker	UCD-CH11		Pav_chr4_499		Pav_chr3_002		Pav_chr8_438	
Délka alel	145	151	246	246	314	320	410	410
SSR marker	Pav_chr6_178		CPPCT006		Pav_chr7_798		Pav_chr7_867	
Délka alel	116	120	184	184	310	332	434	458

'Kordia'

Typ růstu stromu:	silný růst, později oslabuje
Doba kvetení:	pozdní
Zralost:	5. týden
Plodnost:	vysoká, raný nástup do plodnosti
Plod:	srdčitý tvar, tmavě červená barva, dužnina je pevná, sladká, velmi dobrá
Odolnost:	odolná k praskání plodů, citlivá na jarní mrazíky v době kvetení
Poznámka:	středně zrající chrupka, s velmi kvalitními plody, odolná k praskání, nevýhodou je citlivost na mráz



SSR marker	BPPCT037		EMPA005		Pav_chr4_217		Pav_chr6_505	
Délka alel	136	142	252	252	330	340	406	424

SSR marker	Pav_chr1_073		Pav_chr3_706		Pav_chr5_144		Pav_chr2_274	
Délka alel	120	130	230	238	351	359	416	428

SSR marker	UCD-CH11		Pav_chr4_499		Pav_chr3_002		Pav_chr8_438	
Délka alel	145	151	233	246	304	308	410	412

SSR marker	Pav_chr6_178		CPPCT006		Pav_chr7_798		Pav_chr7_867	
Délka alel	108	116	184	184	310	318	440	460

'Rivan'

Typ růstu stromu:	středně bujný až silný, tvoří kulovitou, řídkou korunu
Doba kvetení:	raná
Zralost:	velmi raná (1. třesňový týden, konec května)
Plodnost:	středně brzká, střední až vysoká, pravidelná
Plod:	středně velký, srdcovitý, souměrný
Odolnost:	vysoká odolnost květů i dřeva proti mrazu a odolnost proti monilióze, plody odolné k praskání
Poznámka:	nenáročná, vhodná do všech oblastí pěstování třešní, včetně chladnějších poloh, pro velmi rané zrání



SSR marker	BPPCT037		EMPA005		Pav_chr4_217		Pav_chr6_505	
Délka alel	142	142	252	252	332	340	418	426

SSR marker	Pav_chr1_073		Pav_chr3_706		Pav_chr5_144		Pav_chr2_274	
Délka alel	118	128	230	248	353	361	424	426

SSR marker	UCD-CH11		Pav_chr4_499		Pav_chr3_002		Pav_chr8_438	
Délka alel	141	145	227	233	304	322	386	408

SSR marker	Pav_chr6_178		CPPCT006		Pav_chr7_798		Pav_chr7_867	
Délka alel	120	123	184	196	310	316	425	446

'Tamara'

Typ růstu stromu:	středně silný, vzpřímený
Doba kvetení:	středně raná
Zralost:	5.- 6. třesňový týden
Plodnost:	velmi vysoká, raný nástup
Plod:	široce kulovitý, velmi velký, dužnina je pevná, sladká až velmi sladká
Odolnost:	střední vůči moniliové hnilobě, citlivá na praskání plodů
Poznámka:	střední až pozdní velmi kvalitní chrupka, velmi dobré chuti



SSR marker	BPPCT037		EMPA005		Pav_chr4_217		Pav_chr6_505	
Délka alel	136	138	242	252	330	332	418	424

SSR marker	Pav_chr1_073		Pav_chr3_706		Pav_chr5_144		Pav_chr2_274	
Délka alel	114	114	232	248	357	361	430	438

SSR marker	UCD-CH11		Pav_chr4_499		Pav_chr3_002		Pav_chr8_438	
Délka alel	145	147	233	233	304	322	410	412

SSR marker	Pav_chr6_178		CPPCT006		Pav_chr7_798		Pav_chr7_867	
Délka alel	108	125	184	184	316	330	425	434

'Těchlovan'

Typ růstu stromu:	silný, později střední
Doba kvetení:	středně pozdní
Zralost:	4. týden, asi 8 dní před Kordií
Plodnost:	středně vysoká, raná nástup
Plod:	kulovité, tmavě červené, navinule sladké, velmi dobré chuti
Odolnost:	citlivá na praskání plodů, středně k moniliovému úžehu
Poznámka:	středně pozdní chrupka, citlivá na praskání, velmi dobré chutě



SSR marker	BPPCT037		EMPA005		Pav_chr4_217		Pav_chr6_505	
Délka alel	138	142	252	252	313	330	406	418

SSR marker	Pav_chr1_073		Pav_chr3_706		Pav_chr5_144		Pav_chr2_274	
Délka alel	114	120	230	234	351	357	416	430

SSR marker	UCD-CH11		Pav_chr4_499		Pav_chr3_002		Pav_chr8_438	
Délka alel	145	151	227	246	302	308	410	412

SSR marker	Pav_chr6_178		CPPCT006		Pav_chr7_798		Pav_chr7_867	
Délka alel	108	116	184	184	318	332	434	460



v y d á v á

OSVĚDČENÍ

UKZUZ 197759/2025

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 třešně ptačí (*Prunus avium* L.) pomocí SSR markerů v praxi**

Autoři: **RNDr. Jana Čmejlová, Ph.D., Mgr. Kateřina Holušová, Ph.D., prof. Dr. Ing. Boris Krška, Ing. Pavel Voráček, Mgr. Jan Bartoš, Ph.D., RNDr. Radek Čmejla, Ph.D.**

Název organizací: **VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOCNÁŘSKÝ HOLOVOUSY s.r.o., Ústav experimentální botaniky AV ČR, v.v.i., FYTOS, Ing. Pavel Voráček**

Místo vydání: **Holovousy**

Rok vydání: **2025**

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

Brno 5. 12. 2025

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

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

Genotypizace třešně ptačí (*Prunus avium* L.) pomocí SSR markerů v praxi

Vydal:

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

1. vydání, 2025

ISBN: 978-80-88669-10-4 (online, pdf)

<https://doi.org/10.60615/g8h5-5e24>