

GENOTYPIZACE HRUŠNĚ OBECNÉ (*PYRUS COMMUNIS* L.) POMOCÍ SSR MARKERŮ V PRAXI

Metodika

Ivona Žďárská a kol.

2025



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



Název

Genotypizace hrušně obecné (*Pyrus communis* L.) pomocí SSR markerů v praxi

Autoři

Ing. Ivona Žďárská, Ph.D.¹, RNDr. Jana Čmejlová, Ph.D.¹, prof. Dr. Ing. Boris Krška¹, Ing. Pavel Voráček², RNDr. Radek Čmejla, Ph.D.¹

¹ Holovousy 129, 508 01 Hořice

² 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

Mgr. Jitka Klempová, Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský

Zdroj fotografií odrůd

VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOCNÁŘSKÝ HOLOVOUSY s.r.o.
(Obrazová příloha, odrůdy 'Clappova', 'Williamsova')

Archiv SEMPRA PRAHA a.s. (Obrazová příloha, odrůdy 'Amfora', 'Bohemica', 'Boscova lahvice', 'Dicolor', 'Konference', 'Lucasova')

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: 978-80-88669-04-3 (online, pdf)

DOI: <https://doi.org/10.60615/7h2d-g956>





OBSAH

OBSAH	3
1 ÚVOD	4
2 CÍL METODIKY	6
3 VLASTNÍ POPIS METODIKY	7
3.1 <i>Popis metodiky – úvod</i>	7
3.2 <i>Materiál a metody</i>	8
3.2.1 Odběr vzorků	9
3.2.2 Izolace genomové DNA	9
3.2.3 PCR reakce	10
3.2.4 Fragmentační analýza	12
3.2.5 Vyhodnocení a interpretace dat	13
3.2.5.1 Očekávané výsledky	13
3.2.5.2 Možné problémy při analýze dat („Troubleshooting“)	24
4 SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ	36
5 POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY	37
6 EKONOMICKÉ ASPEKTY	38
7 SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY	42
8 SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE	43
PŘÍLOHA – CHARAKTERISTIKA REFERENČNÍCH ODRŮD	44
PŘÍLOHA – OSVĚDČENÍ O UZNÁNÍ METODIKY	52

ANOTACE

Hrušeň obecná (*Pyrus communis* L.) je nejrozšířenějším druhem hrušně pěstovaným v Evropě; je ceněná pro svou šťavnatou dužinu, aromatickou chuť a dlouhou skladovatelnost plodů. Zároveň existuje široké spektrum odrůd s rozmanitými vlastnostmi. Ověřování a potvrzení identity odrůd hrušní je zásadním prvkem rostlinné produkce, zejména v kontextu dlouhověkových výsadeb, certifikace a ochrany šlechtitelských práv. Standardizované zkoušky odlišnosti, uniformity a stálosti (DUS testy) založené na fenotypickém hodnocení jsou časově náročné a ovlivnitelné vnějšími faktory, zatímco molekulárně genetické metody představují moderní, rychlý a vysoce spolehlivý nástroj pro odlišení odrůd. Tzv. SSR markery umožňují přesné rozlišení odrůd nezávisle na věku či plodnosti rostliny a nacházejí uplatnění při registraci, prodlužování práv i ověřování pravosti rozmnožovacího materiálu. V rámci této metodiky je popsána nově navržená sada 17 SSR markerů pokrývajících všech 17 chromozomů, kdy jsou všechny SSR markery amplifikovány a detekovány v jedné reakci. Tato metodika poskytuje reprodukovatelné výsledky a je klíčovým nástrojem při šlechtění, ochraně odrůd a genetické identifikaci hrušně obecné.

1 ÚVOD

Hrušeň (*Pyrus* spp.) patří mezi jeden z nejvýznamnějších ovocných druhů na světě. Je ceněná zejména pro svou chuť, výživovou hodnotu i variabilitu. S globální produkcí přesahující 26,5 milionů tun v roce 2023 zaujímá hrušeň dvanáctou příčku mezi nejpěstovanějším ovocem, přičemž dominantním producentem je Čína, která vytváří cca 80 % celosvětové produkce, za ní je Evropa s 10 % a Americký kontinent s 6 % (Statista, [Celosvětová produkce ovoce; FAOSTAT](#)). Obliba hrušek se promítá i do intenzivního šlechtitelského úsilí, které odráží regionální preference konzumního využití – od měkkých, šťavnatých, aromatických evropských odrůd po křupavé asijské odrůdy se zrnitou dužninou (Silva et al. 2014). Rod *Pyrus*, patřící do čeledi *Rosaceae*, zahrnuje přes 20 druhů, které se dělí do dvou hlavních skupin: západní – evropská skupina (patří sem např. *P. communis*) typická pro Evropu a Středomoří, a východní – asijská skupina (patří sem např. *P. pyrifolia*, *P. ussuriensis*, *P. bretschneideri*) známá z Číny, Japonska a Koreje (Fischer 2009; Li et al. 2022). Tyto skupiny se vyvíjely odděleně z různých center genetické diverzity a vykazují značné morfologické i genetické rozdíly (Silva et al. 2012). Genom rodu *Pyrus* tvoří 17 různých chromozomů ($n = 17$) a většina kultivovaných hrušní je diploidní ($2n = 34$), i když existují i polyploidní kultivary, kdy například odrůda 'Lucasova' je triploid.

Celosvětově existuje více než 3 000 odrůd hrušní (Elzebroek a Wind 2008) a jejich šlechtění pokračuje v reakci na měnící se pěstitelské i spotřebitelské požadavky. Správná identifikace odrůd ovocných dřevin je zásadní ve všech fázích rostlinné produkce – od šlechtění, registrace a certifikace až po distribuci sadbového materiálu. Obzvláště důležitá je u dlouhověkových výsadeb, které představují významnou investici a bývají obhospodařovány desítky let. V České republice probíhá zkoušení odrůd klasickým způsobem prostřednictvím tzv. DUS testů (Distinctness, Uniformity, Stability), kde se odrůdy fenotypicky a fenologicky hodnotí alespoň dvě vegetační sezóny. Sleduje se zejména jejich odlišnost od obecně známých



odrůd, uniformita a stálost znaků v průběhu let, přičemž hodnocení závisí nejen na zkušenosti posuzovatele, ale i na vlivu vnějších faktorů, jako jsou počasí, choroby či škůdci. Při prodlužování registrace je proces rychlejší, avšak stále vyžaduje sledování po minimálně jedno vegetační období.

Molekulárně genetické metody, zejména genotypizace pomocí mikrosatelitních SSR markerů (Simple Sequence Repeats), představují moderní a vysoce spolehlivý nástroj pro ověření odrůdové identity biologického materiálu. Vzhledem k vysoké morfologické variabilitě a historickým nepřesnostem v označování hrušňových odrůd je molekulární analýza jedinou metodou schopnou přesně odlišit geneticky identické či příbuzné genotypy. SSR markery tvořené krátkými tandemově opakovanými sekvencemi DNA jsou vysoce polymorfní, kodominantní a multialelické. Jejich amplifikace pomocí PCR je snadná, reprodukovatelnost vysoká a pokud se použije multiplexování, lze v jedné reakci analyzovat více markerů současně. Fragmenty získané amplifikací se nejčastěji analyzují kapilární elektroforézou, která umožňuje rozlišení alel s rozdílem jediného nukleotidu.

V oblasti ovocnářství jsou SSR markery klíčovým nástrojem pro genotypizaci odrůd, sledování původu, správu genových bank, šlechtění i ochranu práv k odrůdám. Genotypizace hrušní umožňuje přesné ověření identity rozmnožovacího materiálu již v rané fázi – bez nutnosti čekat na plodnost – čímž výrazně zvyšuje efektivitu a právní jistotu certifikačního procesu. V rámci činností Národního odrůdového úřadu (NOÚ ÚKZÚZ) lze genotypové profily využít nejen při registraci nových odrůd (odhalení mutací již existujících odrůd), ale také při prodlužování práv a ověřování původu dovezeného materiálu. Školky, pěstitelé i producenti sadbového materiálu mohou díky genotypizaci zajistit autenticitu kultivarů, což zvyšuje jejich důvěryhodnost na trhu. Při sporech o odrůdovou pravost představují SSR analýzy objektivní důkaz o genetické shodě či odlišnosti materiálu. Díky celoroční dostupnosti metody, rychlému vyhodnocení a schopnosti identifikace na úrovni jedinečného genotypu se molekulárně genetická identifikace hrušní stává nepostradatelným nástrojem řízení kvality i právní ochrany v moderním ovocnářství.

Tato metodika popisuje nově vyvinutou genotypizační sadu SSR markerů určenou k identifikaci genotypů hrušně obecné (*Pyrus communis*). V rámci molekulárně genetické identifikace hrušní představuje významný pokrok oproti dosud používanému protokolu doporučenému v rámci konsorcia ECPGR – The European Cooperative Programme for Plant Genetic Resources i oproti protokolu USPGR (Uniform Standards for the Protection of Plant Genetic Resources, mezinárodní standardy, které se používají k ochraně a správě genetických zdrojů rostlin, včetně ovocných plodin). V původní verzi ECPGR (Evans et al. 2009) bylo amplifikováno 17 SSR markerů, kdy bylo 12 z nich amplifikováno v 3 multiplexech po 4 SSR markerech, zbylé pak byly analyzovány jednotlivě. Později byla tato sada zrevidována pouze na 12 SSR markerů původně amplifikovaných v multiplexech (Evans et al. 2015). Všechny ECPGR markery obsahovaly dinukleotidovou repetici. Zurn et al. (2020) později vyvinul sadu 10 SSR markerů s 2- až 8-nukleotidovou repeticí, kterou lze amplifikovat v jediné reakci (označovanou jako USPGR). V řadě parametrů byla při testování na stejné kolekci 152 odrůd srovnatelná s ECPGR sadou 12 SSR markerů, měla však nižší očekávanou heterozygotnost (0,6 pro USPGR vs 0,81 pro ECPGR). Důvodem pro vývoj nové sady popsané v této metodice bylo zvýšení rozlišovací schopnosti při genotypování, neboť dříve používané sady vykazovaly

odrůdy se shodným genotypem, popřípadě lišící se v jediném SSR markeru. Vzhledem k neustále probíhajícímu šlechtění nových a nových odrůd, ve kterých se opakovaně využívají tytéž elitní odrůdy hrušní, je třeba zvýšit rozlišovací schopnost genotypizační sady pro hrušně a snížit tak pravděpodobnost náhodné shody mezi dvěma odlišnými vzorky. Nově vyvinutá sada SSR markerů pokrývá všech 17 chromozomů rodu *Pyrus*, které byly vybrány tak, aby vykazovaly co nejvyšší heterozygotnost. Zároveň je genotypizace prováděna v jediné multiplexní PCR reakci, což zajišťuje zásadní časovou, finanční i personální úsporu. Nová metoda je optimalizována pro rutinní laboratorní použití, s jednoduchým postupem a minimalizovaným rizikem technických chyb. Při analýze genofondové sbírky VŠÚO tvořené 230 diploidními odrůdami s unikátním genotypem vykazovala sada pravděpodobnost shody dvou neidentických vzorků $4,9 \times 10^{-23}$, což svědčí o její velmi vysoké diskriminační schopnosti. Díky spolehlivé interpretaci výsledků, snadné standardizaci a možnosti adaptace laboratořemi provádějícími akreditované metody je sada vhodná pro praktické využití v registračních, šlechtitelských i certifikačních procesech, kde může výrazně zvýšit efektivitu a přesnost hodnocení odrůdové identity.

Ačkoli byla nově vyvinutá SSR genotypizační sada primárně koncipována pro hrušeň obecnou (*Pyrus communis*), její komplexní pokrytí všech 17 chromozomů a vysoká polymorfnost markerů umožňují její rozšířené využití i u asijských druhů hrušní. Nicméně, použití této sady u asijských druhů naráží na technická a interpretační omezení. Vzhledem k výrazné genetické vzdálenosti mezi východními a západními hrušněmi mohou některé markery generovat nespecifické lokusy (tzv. „non-specific bands“), nebo nulové alely, což může být na jednu stranu považováno jako typické pro východní hrušně, na druhou stranu to může vést k chybné interpretaci genotypu (Evans et al. 2009). V těchto případech je nutné výsledky pečlivě validovat, případně doplnit o markery vyvinuté speciálně pro danou genetickou skupinu.

2 CÍL METODIKY

Určování odrůd hrušní na území České republiky dosud probíhá převážně klasickým způsobem založeným na porovnávání fenotypových a fenologických znaků. U dlouhověkových dřevin, jako jsou hrušně, může tento proces trvat i několik let. Navíc tento přístup nelze realizovat při určování odrůdy u mladých stromků, které ještě nevstoupily do plodného věku. Moderní alternativou je genotypizace, laboratorní metoda, která na základě analýzy genomové DNA stanoví genetický profil pomocí SSR markerů – jedinečný identifikační znak každé odrůdy.

Vyvinutá metodika genotypizace hrušní je koncipována jako praktický návod pro snadné zavedení této metody do běžné laboratorní nebo pěstitelské praxe. Její hlavní výhodou je nízká finanční náročnost a široká použitelnost. Zaměřuje se na dva klíčové okruhy uživatelů: laboratoře molekulární biologie, kterým nabízí podrobný a validovaný postup provedení genotypizace; a uživatele výsledků, jako jsou šlechtitelé nebo pěstitelé, kterým přináší konkrétní praktické využití výsledků této analýzy.

V rámci praktické aplikace lze metodiku využít k porovnávání vzorků bez nutnosti předchozí znalosti jejich odrůdové identity, k identifikaci neznámých odrůd na základě referenční databáze genetických profilů, a k ověřování rodičovského původu u kříženců. Tato metodika není navržena pro odlišení jednotlivých klonů nebo mutací v rámci jedné odrůdy, lze ji použít pouze pro základní identifikaci mutace již uznané odrůdy. Ačkoliv tato metodika je primárně navržena pro identifikaci hrušně obecné (*Pyrus communis*), je možné i její využití při identifikaci asijských hrušní (*Pyrus pyrifolia* nebo *Pyrus bretschneideri*), v tomto případě je však nutné vzít na vědomí možnost absence amplifikace některých markerů, případně výskyt nulových alel. Tematicky navazuje na již vydané metodiky pro genotypování meruňky obecné (*Prunus armeniaca* L.) (Nekvindová, 2021), jabloně domácí (*Malus domestica* Borkh.) (Pluhařová, 2023) a švestky domácí (*Prunus domestica* L.) (Pluhařová, 2024).

3 VLASTNÍ POPIS METODIKY

3.1 Popis metodiky – úvod

Pro úspěšné provedení analýzy se předpokládá znalost základních principů práce v laboratoři molekulární biologie a zkušenosti s prováděním fragmentační analýzy pomocí kapilárního genetického analyzátoru, stejně jako schopnost vyhodnocovat a interpretovat získaná data. Postup byl optimalizován pro konkrétní laboratorní vybavení a reagentie, proto je nezbytné, aby si každý uživatel ověřil její funkčnost na svém pracovišti. Pro tento účel metodika obsahuje referenční odrůdy hrušní, včetně relativní velikosti alel jednotlivých použitých SSR markerů, které slouží jako kontrola při interpretaci výsledků.

Pro genotypizaci hrušně obecné byla využita nově sestavená genotypizační sada, kterou lze použít pro spolehlivé genotypování diploidních i triploidních hrušní. Pro stanovení genetického profilu se využívá 17 SSR markerů (Tabulka 1), které jsou amplifikovány v jediné multiplexní PCR reakci a následně vyhodnoceny pomocí fragmentační analýzy. Alelická kombinace těchto SSR markerů je pro každý genotyp unikátní. Z těchto 17 markerů jsou čtyři markery ponechány na základě původního doporučení mezinárodního uskupení ECPGR, a to markery NZ05g8, CH01d09, CH05c06 a GD96 (Evans et al. 2009). Markery TsuENH003, NB109a, NB106a, NB105a, NH021a byly navrženy přímo pro hrušně (Yamamoto et al. 2002, Nishitani et al. 2009), markery CH02f06, CH05e06, CH05a05, CH04e05, CH01h10, CH02b03b, CH05d03, CH02d11 byly původně vyvinuty u jabloní, přičemž některé z nich již byly využity pro genotypování hrušní (Sehic et al. 2012, Urrestarazu et al. 2015, Pavlenko et al. 2022). Původní zdroje všech využitých markerů jsou uvedeny v Tabulce 1. Hlavními charakteristikami kvality vybraných SSR markerů jsou: počet alel, očekávaná heterozygotnost (H_e , H -expected), pozorovaná heterozygotnost (H_o , H -observed), míra informativnosti genetického markeru (PIC, Polymorphism Information Content) a počet efektivních alel. Statistické vyhodnocení kvalitativních znaků vybraných SSR markerů bylo provedeno analýzou 230 identifikovaných unikátních diploidních genotypů hrušně obecné (Tabulka 1) a jejich funkčnost byla ověřena rovněž na 35 unikátních triploidních genotypech.

Porovnáním profilů vybraných SSR markerů u jednotlivých genotypů je možné určit shodu mezi vzorky, případně lze profil porovnat s databází referenčních odrůd/genotypů.

Pravděpodobnost náhodné identity dvou nepříbuzných vzorků této sady SSR markerů je pro diploidní hrušně $4,9 \times 10^{-23}$, což odpovídá používaným soupravám pro identifikaci člověka obsahujícím rovněž 17 SSR markerů (Green, 2013).

Tabulka 1. Charakteristika markerů použitých pro genotypizaci hrušní na základě analýzy 230 identifikovaných unikátních **diploidních** genotypů. LG – vazebná skupina/chromozóm, An – počet alel, Ho – heterozygotnost pozorovaná, He – heterozygotnost očekávaná, PIC – informační obsah polymorfismu, Ae – počet efektivních alel. Koncovka názvu markeru „_a“ znamená, že byl pro amplifikaci použit alespoň jeden primer navržený v jiné než originální pozici, tj. délka alely amplifikované původními primery se liší od délky téže alely amplifikované podle této metodiky. Jedná se však o amplifikaci téhož polymorfního místa genomu.

Marker	LG	An	Ho	He	PIC	Ae	Motiv	Primární zdroj SSR markeru
TsuENH003_a	1	13	0,822	0,830	0,81	5,897	(TC) _n	Nishitani et al. 2009
CH02f06_a	2	20	0,917	0,837	0,817	6,147	(TG) _n (AG) _n	Liebhard et al. 2002
NB109a_a	3	23	0,839	0,841	0,824	6,293	(AG) _n	Yamamoto et al. 2002
NZ05g8_a	4	8	0,796	0,785	0,751	4,643	(GA) _n	Guildford et al. 1997
CH05e06_a	5	26	0,909	0,876	0,865	8,094	(AG) _n	Liebhard et al. 2002
CH05a05_a	6	16	0,783	0,745	0,709	3,915	(AG) _n	Liebhard et al. 2002
CH04e05_a	7	23	0,848	0,805	0,784	5,129	(GA) _n	Liebhard et al. 2002
CH01h10_a	8	15	0,778	0,794	0,771	4,859	(TC) _n	Liebhard et al. 2002
NB106a_a	9	20	0,796	0,785	0,763	4,652	(AG) _n	Yamamoto et al. 2002
CH02b03b_a	10	16	0,865	0,844	0,825	6,402	(TC) _n	Liebhard et al. 2002
NB105a_a	11	15	0,883	0,840	0,823	6,243	(AG) _n AT(AG) _n	Yamamoto et al. 2002
CH01d09_a	12	24	0,935	0,882	0,871	8,448	(GA) _n	Liebhard et al. 2002
NH021a_a	13	16	0,904	0,858	0,846	7,061	(AG) _n	Yamamoto et al. 2002
CH05d03	14	19	0,922	0,879	0,867	8,275	(AG) _n	Liebhard et al. 2002
CH02d11_a	15	23	0,73	0,768	0,743	4,308	(AG) _n	Gianfranceschi et al. 1998
CH05c06	16	13	0,752	0,729	0,695	3,69	(TC) _n	Liebhard et al. 2002
GD96_a	17	15	0,904	0,877	0,865	8,135	(TC) _n	Hokanson et al. 1998

3.2 Materiál a metody

Pro získání přesných výsledků je potřebné dodržet postup genotypování, který je rozdělen do tří hlavních fází:

1. Pre-analytická fáze

Tato úvodní fáze zahrnuje veškeré kroky před samotnou analýzou. Patří sem odběr vzorků, jejich příjem do laboratoře a správné uchování až do okamžiku zpracování.

2. Analytická fáze

Jde o klíčovou laboratorní část, kde probíhá zpracování vzorků. To zahrnuje jejich homogenizaci, izolaci DNA a následně sestavení PCR reakce pro amplifikaci genetického materiálu. Celý proces je zakončen vlastní fragmentační analýzou.

3. Post-analytická fáze

Závěrečná fáze se zaměřuje na vyhodnocení a interpretaci získaných dat z fragmentační analýzy. Je vytvořen finální protokol s interpretací výsledků, který slouží jako konečný výstup.

3.2.1 Odběr vzorků

Pro genotypování hrušní se jako vstupní materiál používá **genomová DNA**, která se izoluje z rostlinných pletiv. Pro rutinní analýzu je ideální odebírat dvouleté výhony, z kterých je možné izolovat lýko v průběhu celé vegetační sezóny, případně listy, pokud nejsou výhony k dispozici (např. u malých semenáčků). Doporučuje se odebrat vždy **dva nezávislé vzorky** z jednoho stromu, například dva dvouleté výhony nebo dva listy. Odebrané vzorky je třeba co nejdříve doručit do laboratoře. Podle typu analýzy se zpracuje buď jeden vzorek (např. při ověřování identity), nebo oba nezávisle (např. při tvorbě databáze). V laboratoři se DNA izoluje bez zbytečného odkladu, případně se vzorky dočasně uloží v chladničce, nebo se **šokově zamrazí v tekutém dusíku** a uskladní v mrazicím boxu při -80 °C, kde si uchovají kvalitu minimálně jeden rok.

3.2.2 Izolace genomové DNA

Následující popsany postup izolace DNA byl použit pro účely validace této metodiky. Genomovou DNA je však možné izolovat jakýmkoli způsobem za předpokladu získání DNA odpovídající kvality.

Nejdříve se vstupní rostlinný materiál pro izolaci DNA homogenizuje, tedy rozdrtí, nejčastěji pomocí třecí misky a tekutého dusíku, což je vhodná metoda pro všechny typy vzorků včetně lýka. Alternativně lze pro listy použít i mechanické homogenizátory, jako je například TissueLyser II (Qiagen). Ten rychle zpracuje větší množství vzorků pomocí vysokorychlostního protřepávání rostlinného pletiva s ocelovými kuličkami. Při tomto postupu se 2ml zkumavky se zmrzlým vzorkem a 5mm kuličkou vloží do vymraženého adaptéru přístroje a homogenizuje se po dobu 2 minut s frekvencí 30 Hz. Získaný jemný prášek se pak bezodkladně použije pro izolaci DNA.

DNA byla extrahována s využitím komerčně dodávaného DNA izolačního kitu Exgene Plant SV mini (GeneAll Biotechnology, Co., Ltd.) na bázi kolon, postupovalo se podle návodu výrobce.

1. Standardně se cca 100 mg dobře zhomogenizovaného vzorku přenese sterilní špachtličkou do 2ml zkumavky.
2. Přidá se 400 µl pufru PL a 3 µl roztoku RNázy A (100 mg/ml). Provede se intenzivní zvortexování. (Pozn.: Při zpracovávání většího množství vzorků je možné přichystat si potřebný objem roztoku PL a RNázy A dopředu a ke vzorku již přidávat 403 µl směsi.)
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. 5.
4. Vzorky se inkubují 15 minut při 65 °C ve vyhřívaném bloku, každých 5 minut se provede zvortexování.

5. K homogenátu se přidá 140 μ l 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 ustříženou špičkou na EzSep filtr (modrá barva) a centrifuguje se 2 minuty při otáčkách 13 000 až 14 000 RPM.
7. Proteklý lyzát se opatrně bez narušení pelety přenese špičkou s filtrem do nové 1,5ml zkumavky; typicky se jedná o 420 μ l lyzátu.
8. K lyzátu se přidá pufr BD v množství 1,5násobku objemu lyzátu (k 420 μ l lyzátu se přidá 630 μ l); roztoky je nutné okamžitě promíchat otáčením zkumavky nebo propipetováním.
9. 700 μ l směsi z kroku 7 se přenese špičkou s filtrem na zelené SV kolony se sběrnou zkumavkou. Centrifuguje se 1 minutu při otáčkách 13 000 až 14 000 RPM. Proteklá tekutina se vyleje, hrany sběrné zkumavky se oťrou buničitou vatou. SV kolona se opět vsune do sběrné zkumavky.
10. Na kolonu se nanese špičkou s filtrem zbytek lyzátu. Centrifuguje se 1 minutu při otáčkách 13 000 až 14 000 RPM. Proteklá tekutina se vyleje, hrany sběrné zkumavky se oťrou buničitou vatou. SV kolona se opět vsune do sběrné zkumavky.
11. Na SV kolonu se přidá 700 μ l pufru CW, centrifuguje se 1 minutu při otáčkách 13 000 až 14 000 RPM. Proteklá tekutina se vyleje, hrany sběrné zkumavky se oťrou buničitou vatou. SV kolona se opět vsune do sběrné zkumavky.
12. Na SV kolonu se přidá 300 μ l pufru CW, centrifuguje se 1 minutu při otáčkách 13 000 až 14 000 RPM. Proteklá tekutina se vyleje, hrany sběrné zkumavky se oťrou buničitou vatou. SV kolona se opět vsune do sběrné zkumavky. Centrifuguje se 1 minutu při otáčkách 13 000 až 14 000 RPM, 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 μ l pufru AE. Nechá se inkubovat 5 minut při pokojové teplotě, poté se stáčí 1 minutu.
14. Orientační určení čistoty a množství izolované DNA se provádí spektrometricky při vlnových délkách 260 nm (kvantita) a 280 nm (čistota jako poměr naměřených hodnot při vlnových délkách 260/280 nm). Izolovaná DNA by měla mít čistotu přibližně 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 PCR reakce

DNA izolovaná postupem popsáním v předchozí kapitole se používá jako vstupní materiál pro PCR reakci. PCR reakce probíhá jako multiplexní za použití všech 34 primerů, což umožňuje současnou amplifikaci 17 SSR markerů v jedné reakci. Sekvence některých primerů byly převzaty z literatury, některé primery byly nově navrženy, aby měly příslušné amplifikované fragmenty SSR markerů odpovídající délku a bylo je možné analyzovat všechny najednou. Fluorescenční značení a koncentrace primerů ve výsledné reakci jsou uvedeny níže v Tabulce 2, 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 doporučených referenčních odrůd. Pro účely metodiky byla PCR reakce optimalizována s využitím cyklieru C1000 (Bio-Rad) a níže uvedených reagentů. Uživatelé si budou muset postup verifikovat a popřípadě upravit pro své laboratorní podmínky.

Tabulka 2 Rozpis pro přípravu PcSSR-17in1 premixu primerů na 100 PCR analýz. Podbarvení odpovídá použitému fluoroforu pro značení primerů: modře: 6-FAM; zeleně: VIC; žlutě: NED; červeně: PET. Číselně označené primery jsou převzaty z literatury, koncovka názvu markeru „_a“ v primeru znamená, že tyto primery byly navrženy v jiné než originální pozici, tj. je změněna pouze délka amplifikované oblasti, avšak jedná se o totéž polymorfni místo genomu.

PcSSR-17in1 PmxII	Sekvence primeru	Zásobní konc. (uM)	Finální konc. (uM)	Na 100 rcí (ul)
PET TsuENH003_a_F	TTGGGTGCGGTCTTTCTTTC	100	0,1900	1,9
TsuENH003_a_R	GTAATCGCATCTCCGTGTTG	100	0,1900	1,9
VIC_CH02f06_a_F	GTAATTCTTCCATCTTAGCCTAC	100	0,4000	4
CH02f06_a_R	CAGTTACCTAGCTAGTACTATTG	100	0,4000	4
PET_NB109a_a_F	CGATCTTGGGGTGCTTGTTAT	100	0,3000	3
NB109a_R ¹⁾	AGAGGGACCATTGTGTTATTGTAT	100	0,3000	3
FAM_NZ05g8_a_F	GATGTCTCTGAGGAACTTGTG	100	0,2200	2,2
NZ05g8_a_R	GGATCAATGCACTGAATGAAACG	100	0,2200	2,2
NED_CH05e06_a_F	GCACTGGAACCTTTCTGGACG	100	0,1200	1,2
CH05e06_a_R	GAAATTCTCAAGGTCAAACGGC	100	0,1200	1,2
FAM_CH05a05_a_F	GAGAGTTGGTGGTATTGGTG	100	0,2300	2,3
CH05a05_a_R	AGCTCAAAAACCAAAAAGACGG	100	0,2300	2,3
CH04e05_a_F ²⁾	GAGAAGGCTAACAGAAATGTGG	100	0,1800	1,8
VIC_CH04e05_a_R ²⁾	GCCTTTGTAATCATGGCTCC	100	0,1800	1,8
VIC_CH01h10_a_F ²⁾	GCAAAGATAGGTAGATATATGCCA	100	0,2000	2
CH01h10_a_R ²⁾	AAGGAGGGGATTGTTTGTGCA	100	0,2000	2
FAM_NB106a_a_F	GGACCACAAAGCACAATTAAGC	100	0,2600	2,6
NB106a_a_R	CACTTCCTGTCCATGAGAAAG	100	0,2600	2,6
FAM_CH02b03b_a_F	GTATAAGATACAAAAACCCTACAC	100	0,7000	7
CH02b03b_a_R	TAGAATTTGAATCAGACATGTTTGG	100	0,7000	7
PET_NB105a_F ¹⁾	AAACAACCGACTGAGCAACATC	100	0,2000	2
NB105a_a_R	GCTTGCTTCCTTACTCTTGTTG	100	0,2000	2
NED_CH01d09_F ³⁾	GCCATCTGAACAGAATGTGC	100	0,1500	1,5
CH01d09_a_R	CAAGGGTGACCAAGAATCAAAG	100	0,1500	1,5
PET_NH021a_a_F	CGGACAAGATTTAGCTTCGG	100	0,2800	2,8
NH021a_a_R	GAAAGAGCAGGGTAAGATAAAAAG	100	0,2800	2,8
FAM_CH05d03_F ³⁾	TACCTGAAAAGAGGAAGCCCT	100	0,2600	2,6
CH05d03_R ³⁾	TCATTCCTTCTCACATCCACT	100	0,2600	2,6
VIC_CH02d11_a_F	AGCATCCAGAGCAACMGC	100	0,1800	1,8
CH02d11_a_R	GTCGAGTGTTCTAGTGCAC	100	0,1800	1,8
NED_CH05c06_F ³⁾	ATTGGAACCTCTCCGTATTGTGC	100	0,1300	1,3
CH05c06_R ³⁾	ATCAACAGTAGTGGTAGCCGGT	100	0,1300	1,3
NED_GD96_a_F	CTATTGAAGATAAGCAAGTCCG	100	0,4300	4,3
GD96_a_R	CTCTATGGTTCTCAGATTAGATTG	100	0,4300	4,3
H2O				11,4
		Suma	100	

¹⁾ Yamamoto et al. (2002); ²⁾ Cmejlova et al. (2021); ³⁾ Liebhard et al. (2002)

Pracovní postup

Nejdříve se izolovaná DNA u všech vzorků naředí na 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 odrůdy diploidních hrušní:

'Amfora'

'Bohemica'

'Boscova lahvice'

'Clappova'

'Dicolor'

'Konference'

'Williamsova'

A jedna odrůda triploidní hrušně:

'Lucasova'

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 zkumavka, do které se dle počtu reakcí připraví adekvátní množství PcSSR-17in1 premixu primerů (Tabulka 2).
3. Připravený premix primerů se krátce zvortexuje a poté se krátce centrifuguje.
4. Do stojánku se připraví 1,5ml mikrozkušavka, do které se dle počtu reakcí připraví adekvátní množství PCR PcSSR17in1 mastermixu (Tabulka 3).

Tabulka 3. Rozpis pro PCR PcSSR17in1 mastermix určený pro genotypizaci hrušní.

Složka	Na 1 vzorek
PCR voda	2 μl
PcSSR17in1 premix	1 μl
Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix	5 μl
Celkem	8 μl

5. Připravený mastermix se krátce vortexuje a krátce se centrifuguje.
6. Mastermix se rozpipetuje do 0,2ml PCR zkumavek po 8 μl.
7. K mastermixu se postupně pipetují 2 μl izolované DNA o koncentraci 10 ng/μl.
8. Podmínky PCR byly optimalizovány pro cykler C1000 (Bio-Rad) s následujícími parametry: 98 °C/1 min; 24x (98 °C/10 s; 58 °C/10 s; 72 °C/30 s); 72 °C/30 s; 8 °C/hold.
9. 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, založená na principu kapilární elektroforézy, se používá k přesné separaci fragmentů DNA na základě jejich velikosti, a to s rozlišením až na jeden nukleotid. Pro účely této metodiky byla metoda optimalizována pro použití s genetickým analyzátozem ABI PRISM 3500 (ThermoFischer Scientific) a uvedenými činidly, uživatelé si proto musí

ověřit a případně přizpůsobit celý postup svým specifickým laboratorním podmínkám a vybavení.

Pracovní postup

1. Do stojánku se připraví 1,5ml zkumavka, do které se dle počtu reakcí připraví adekvátní množství směsi Hi-Di™ formamidu a velikostního standardu GeneScan™ 600 LIZ™ dye Size Standard v2.0 (obojí ThermoFischer Scientific) (Tabulka 4). Roztoky je nutné promíchat propipetováním či převrácením uzavřené zkumavky, jelikož se vortexováním hůře mísí, v případě potřeby následuje krátká centrifugace.

Tabulka 4. Rozpis směsi pro fragmentační analýzu.

Složka	Na 1 vzorek
Hi-Di Formamid	15 µl
600 LIZ dye Size Standard v2.0	0,25 µl
Celkem	15,25 µl

2. Směs se rozpipetuje do 96jamkové destičky pro genetický analyzátor ABI PRISM 3500 (ThermoFischer Scientific) po 15 µl.
3. Ke směsi se postupně pipetuje 1 µl PCR produktu a poté se destička uzavře septem.
4. Vzorky v 96jamkové destičce jsou denaturovány 2 min při 95 °C v PCR cykleru LifeEco Thermal Cykler s blokem 96 × 0,2 ml (BIOER Technology).
5. Fragmentační analýza probíhá v genetickém analyzátoru ABI PRISM 3500 s pufrem POP-7™ (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 alely jak u diploidních, tak i u triploidních odrůd hrušní. Pokud jsou u triploidních odrůd zjištěny jen dvě alely, nelze spolehlivě určit, která z alel se vyskytuje ve více kopiích – v těchto případech jsou uváděny pouze 2 alely.

3.2.5.1 Očekávané výsledky

Pro analýzu dat se používá software GeneMapper v5.0 (ThermoFisher Scientific), který na základě velikostního standardu vyhodnocuje relativní délku jednotlivých PCR fragmentů v nukleotidech. V Tabulce 5 jsou uvedeny rozmezí délky jednotlivých alel pro každý SSR marker. Výsledkem je sada alel, která je unikátní pro každý jednotlivý genotyp hrušně. Vyhodnocení pak probíhá na základě porovnání sady alel analyzovaného vzorku s jinými vzorky, případně s referenční databází dle typu analýzy.

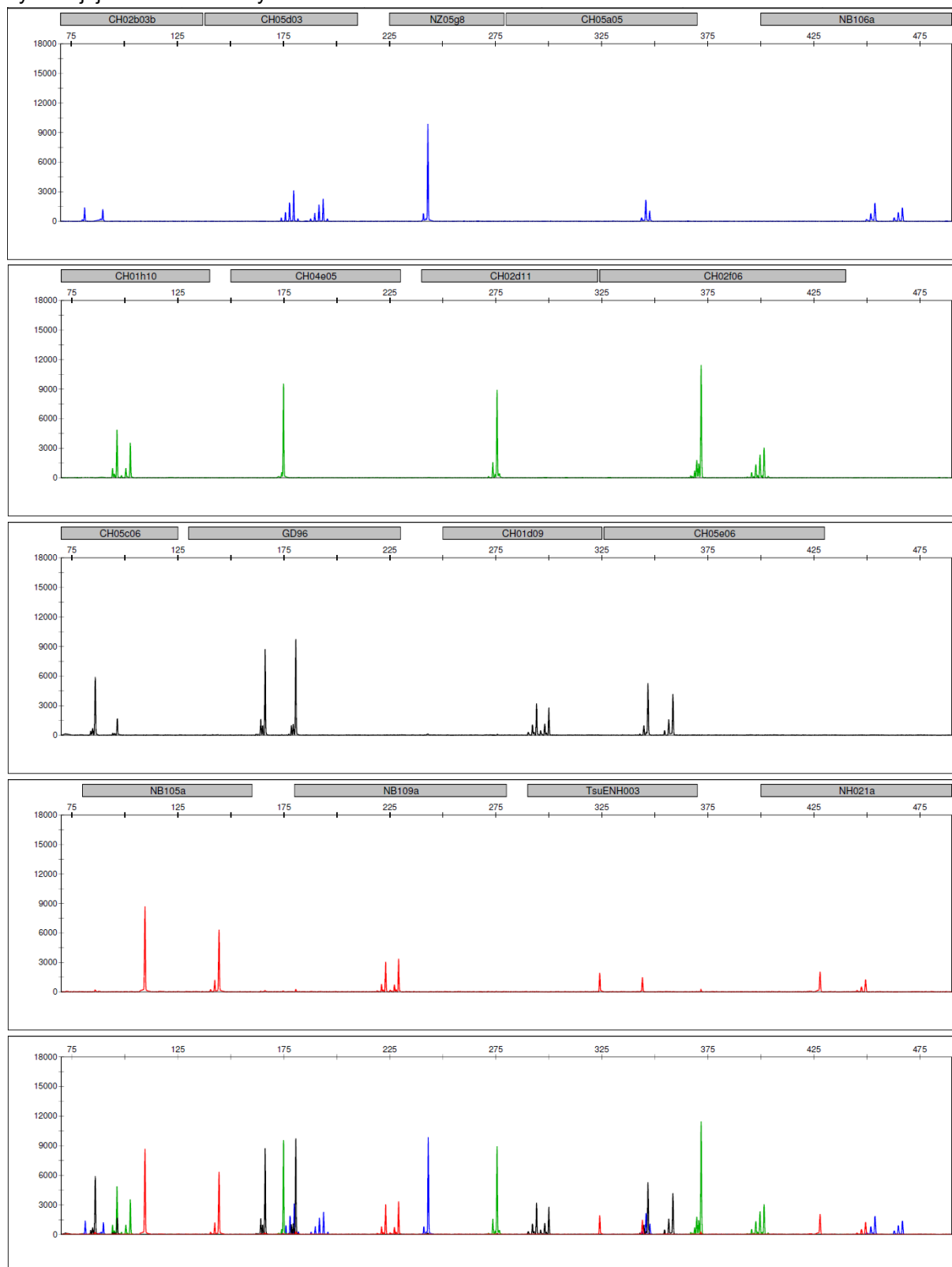
Tabulka 5. Matrice pro vyhodnocování. Kombinace markerů, fluorescenčního značení a očekávaných velikostí alel. V posledním sloupci je uveden celkový počet pozorovaných alel u **diploidních i triploidních odrůd**.

Marker	Značení/kanál	Délka alel	Celkový počet pozorovaných alel
TsuENH003_a	PET	318–346	15
CH02f06_a	VIC	358–413	20
NB109a_a	PET	196–278	26
NZ05g8_a	6-FAM	241–272	9
CH05e06_a	NED	343–409	27
CH05a05_a	6-FAM	304–358	17
CH04e05_a	VIC	175–222	24
CH01h10_a	VIC	85–125	15
NB106a_a	6-FAM	423–506	23
CH02b03b_a	6-FAM	81–127	17
NB105a_a	PET	110–146	16
CH01d09_a	NED	269–320	26
NH021a_a	PET	428–463	20
CH05d03	6-FAM	142–194	19
CH02d11_a	VIC	254–303	23
CH05c06	NED	82–119	13
GD96_a	NED	151–207	16

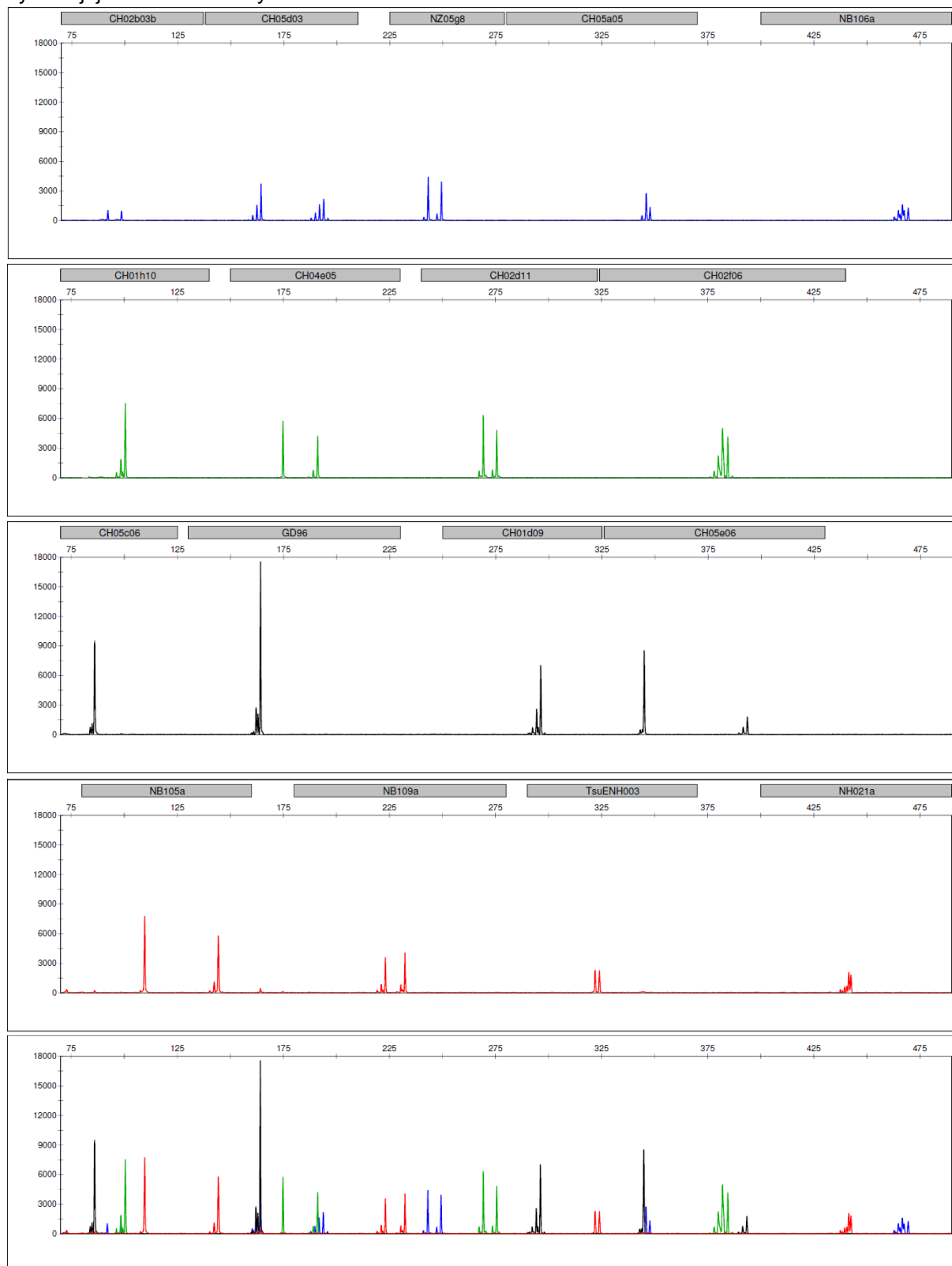
Pro spolehlivé výsledky se doporučuje do každého běhu fragmentační analýzy zařadit tzv. referenční odrůdy. Tyto odrůdy slouží jako důležitá kontrola se známou sadou alel jednotlivých SSR markerů a využívají se k validaci výsledků při mezilaboratorním porovnávání nebo při přenosu metody do jiné laboratoře. Délka PCR fragmentů se totiž může mírně lišit od skutečné délky DNA sekvence v závislosti na faktorech, jako jsou použité fluorescenční značení, reagentie nebo nastavení přístroje.

Jako kontroly byly vybrány odrůdy: 'Amfora', 'Bohemica', 'Boscova lahvice', 'Clappova', 'Dicolor', 'Konference', 'Lucasova' a 'Williamsova'. Tyto odrůdy jsou v České republice všeobecně známé a hojně pěstované. Grafické výsledky jsou znázorněny ve formě elektroforeogramů na Obrázcích 1 až 8, délky alel jednotlivých SSR markerů kontrolních odrůd jsou uvedeny v Tabulce 6.

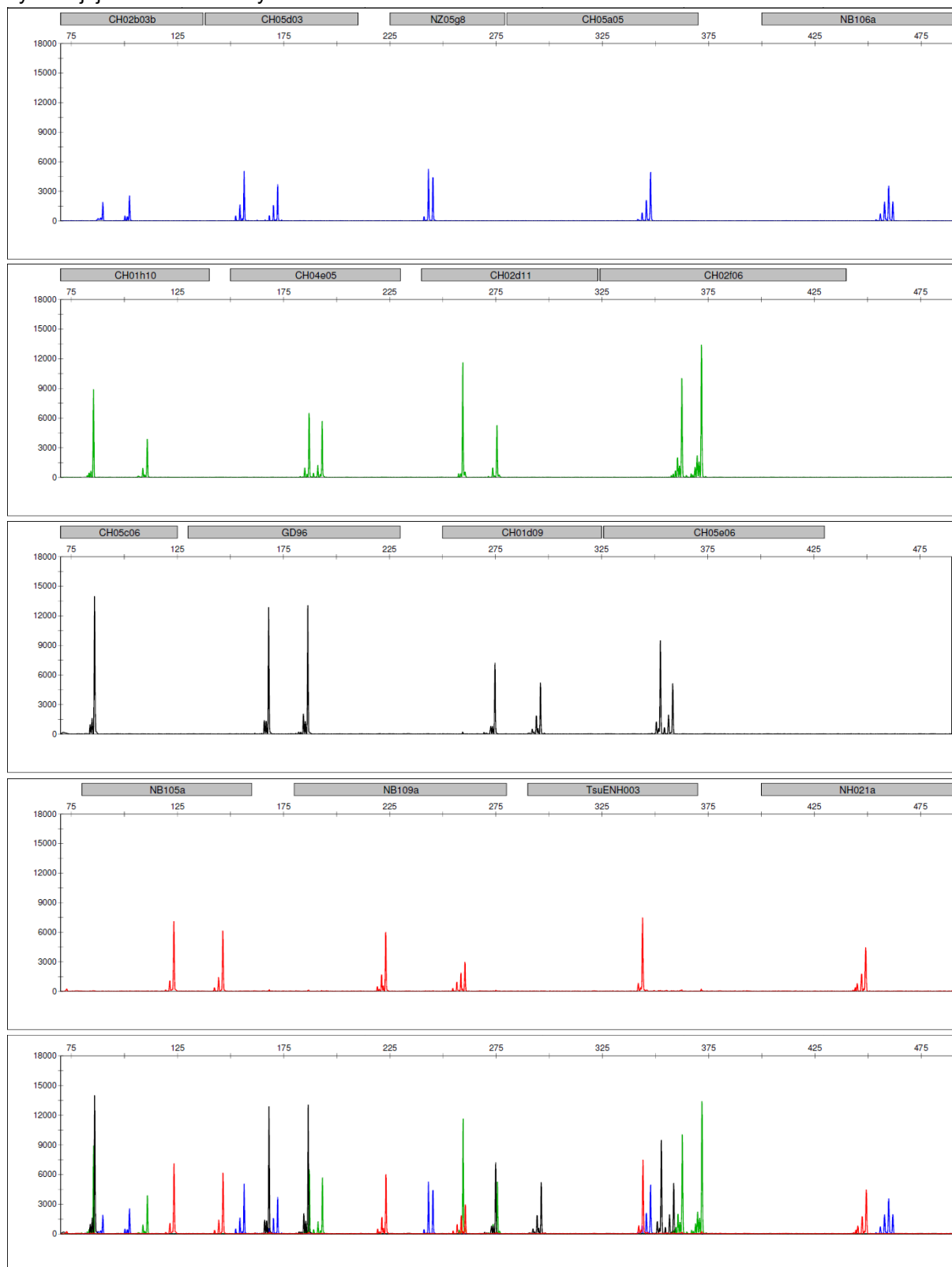
Obrázek 1. Elektroforeogram pro referenční odrůdu 'Amfora'. Jednotlivé panely odshora dolů: modrý kanál – značení 6-FAM; zelený kanál – značení VIC; černý kanál – značení NED; červený kanál – značení PET; překryv všech barevných kanálů. Šedivé obdélníčky u zobrazených barevných kanálů vymezují jednotlivé markery.



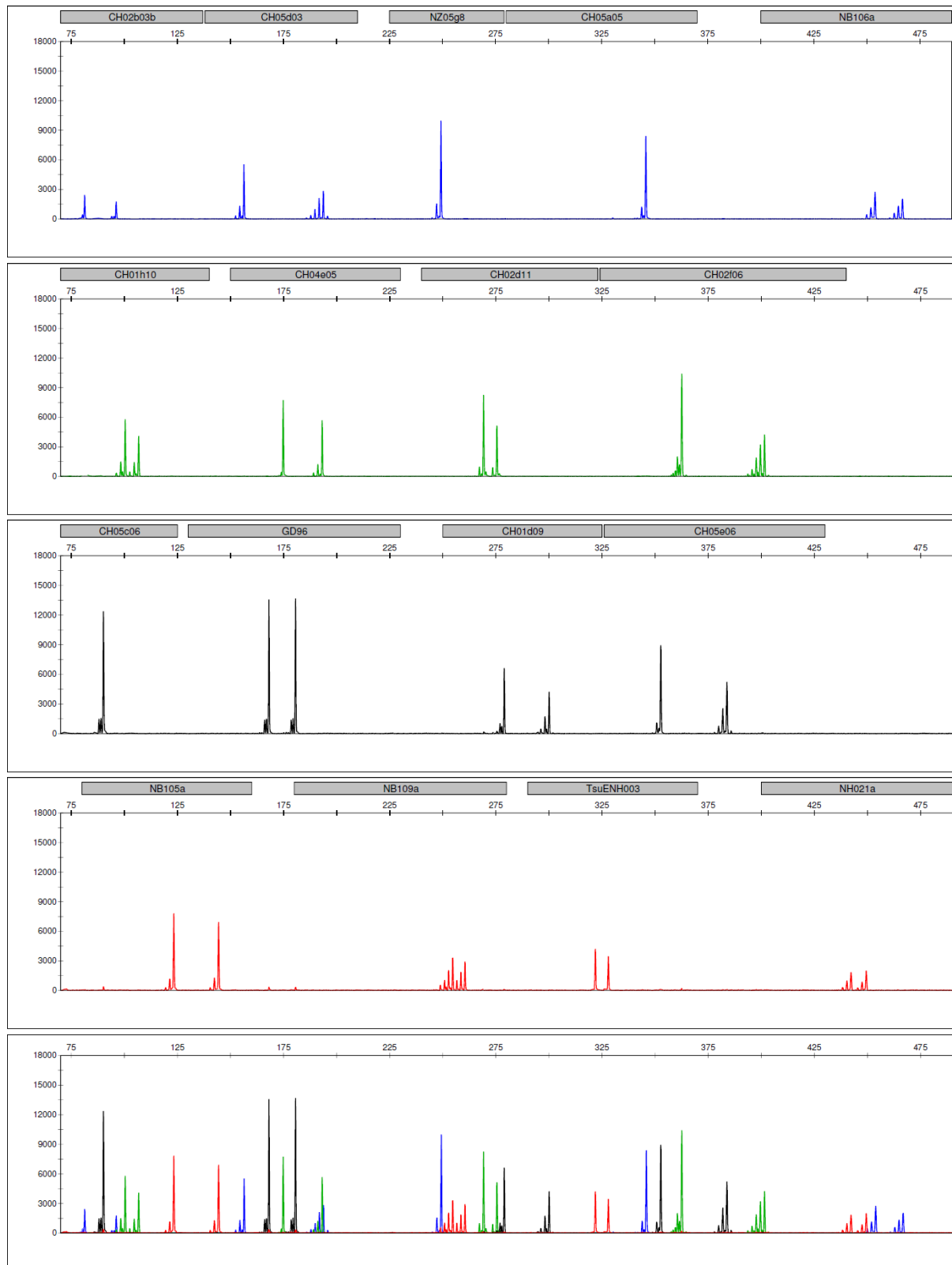
Obrázek 2. Elektroforeogram pro referenční odrůdu '**Bohemica**': Jednotlivé panely odshora dolů: modrý kanál – značení 6-FAM; zelený kanál – značení VIC; černý kanál – značení NED; červený kanál – značení PET; překryv všech barevných kanálů. Šedivé obdélníčky u zobrazených barevných kanálů vymezují jednotlivé markery.



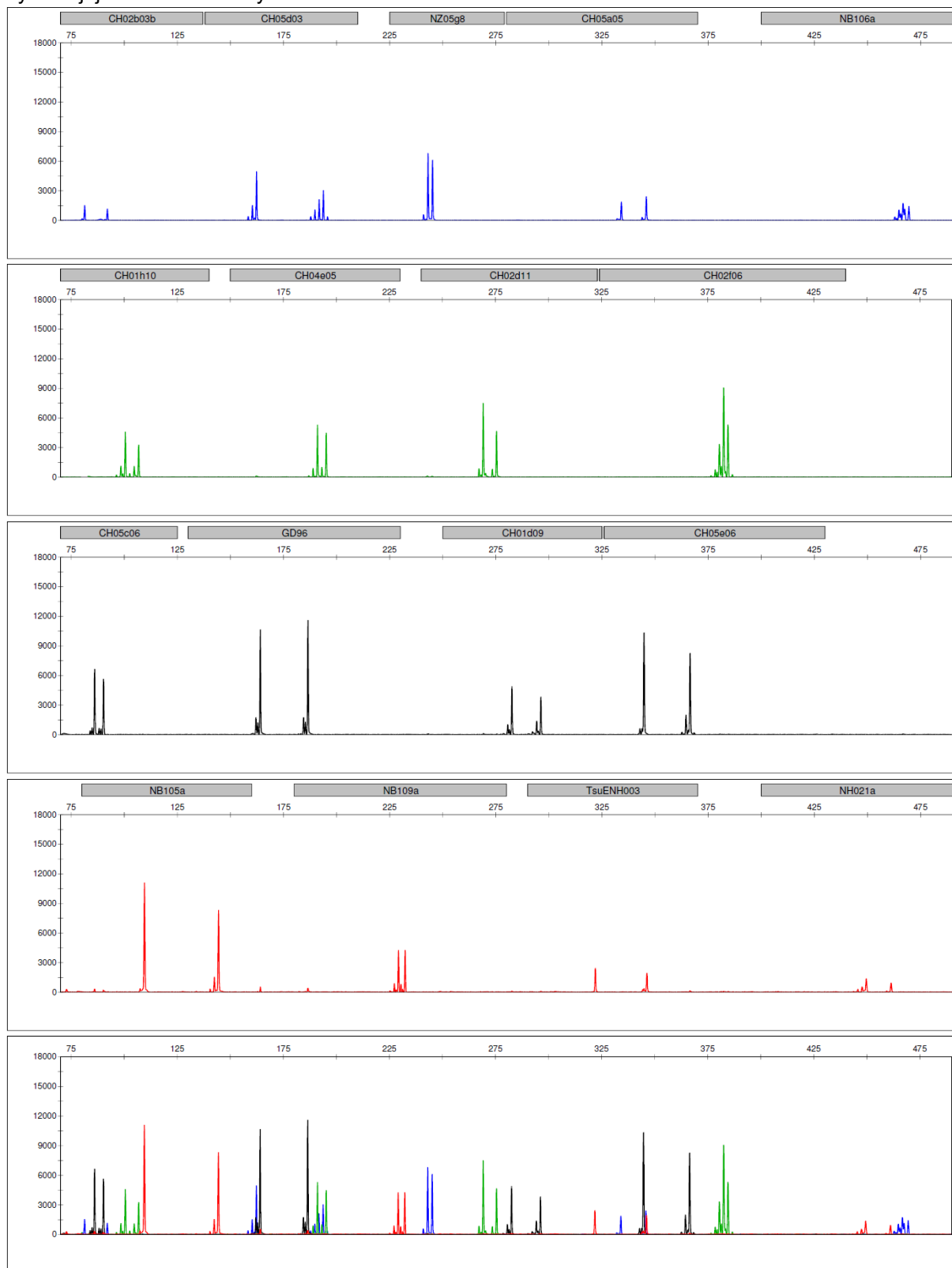
Obrázek 3. Elektroforeogram pro referenční odrůdu '**Boscova lahvice**': Jednotlivé panely odshora dolů: modrý kanál – značení 6-FAM; zelený kanál – značení VIC; černý kanál – značení NED; červený kanál – značení PET; překryv všech barevných kanálů. Šedivé obdélníčky u zobrazených barevných kanálů vymezují jednotlivé markery.



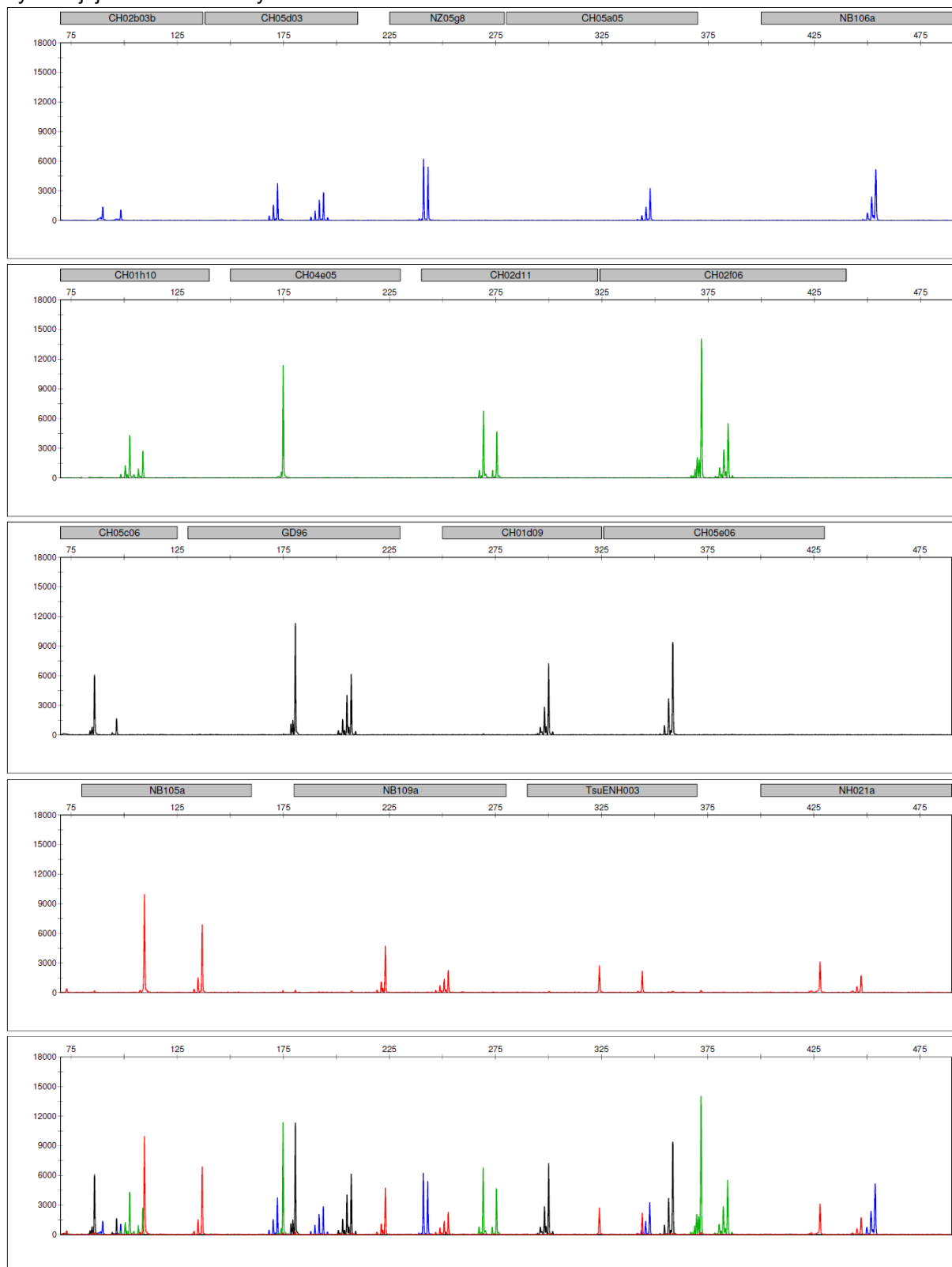
Obrázek 4. Elektroforeogram pro referenční odrůdu '**Clappova**': Jednotlivé panely odshora dolů: modrý kanál – značení 6-FAM; zelený kanál – značení VIC; černý kanál – značení NED; červený kanál – značení PET; překryv všech barevných kanálů. Šedivé obdélníčky u zobrazených barevných kanálů vymezují jednotlivé markery.



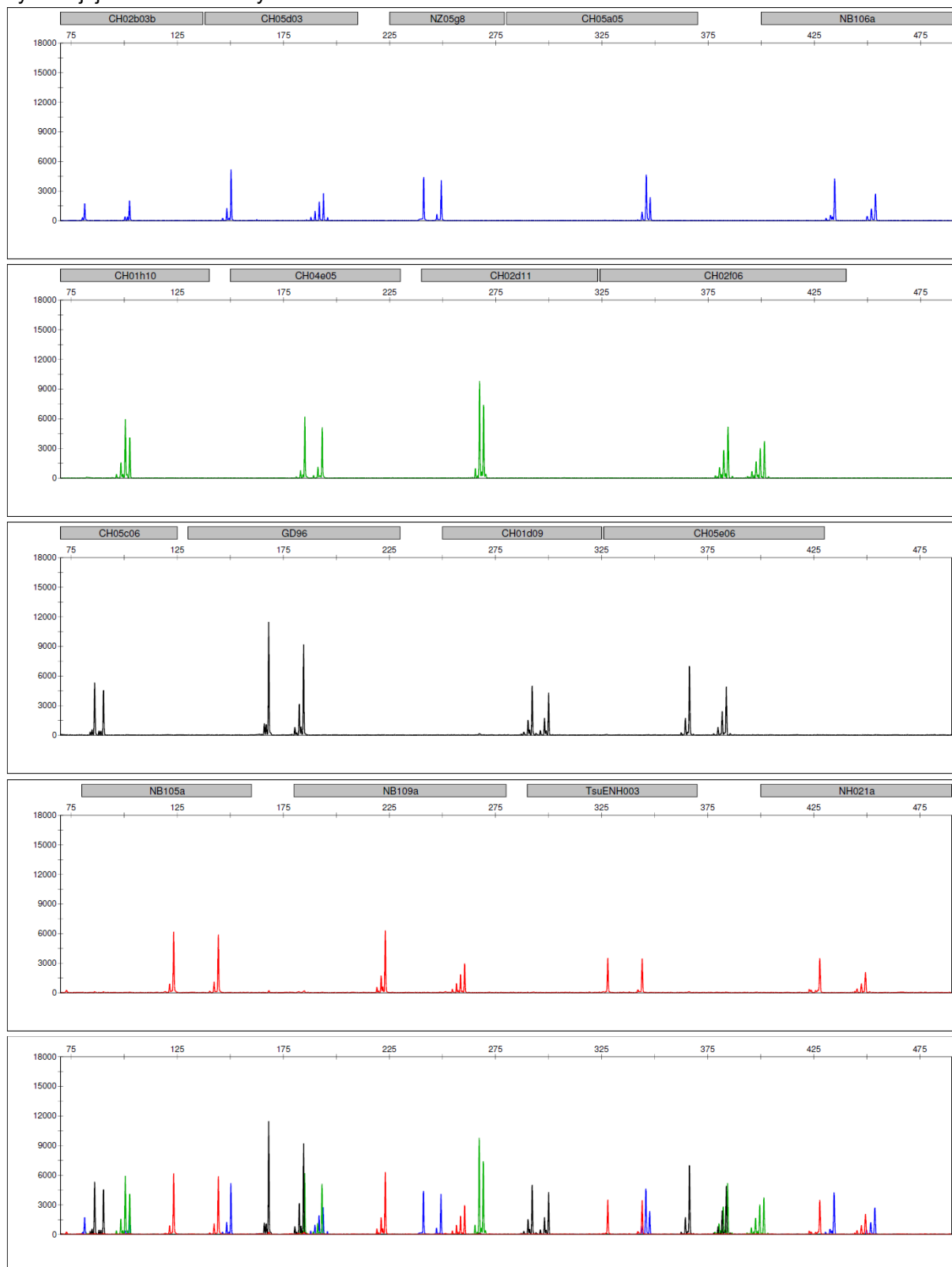
Obrázek 5. Elektroforeogram pro referenční odrůdu '**Dicolor**': Jednotlivé panely odshora dolů: modrý kanál – značení 6-FAM; zelený kanál – značení VIC; černý kanál – značení NED; červený kanál – značení PET; překryv všech barevných kanálů. Šedivé obdélníčky u zobrazených barevných kanálů vymezují jednotlivé markery.



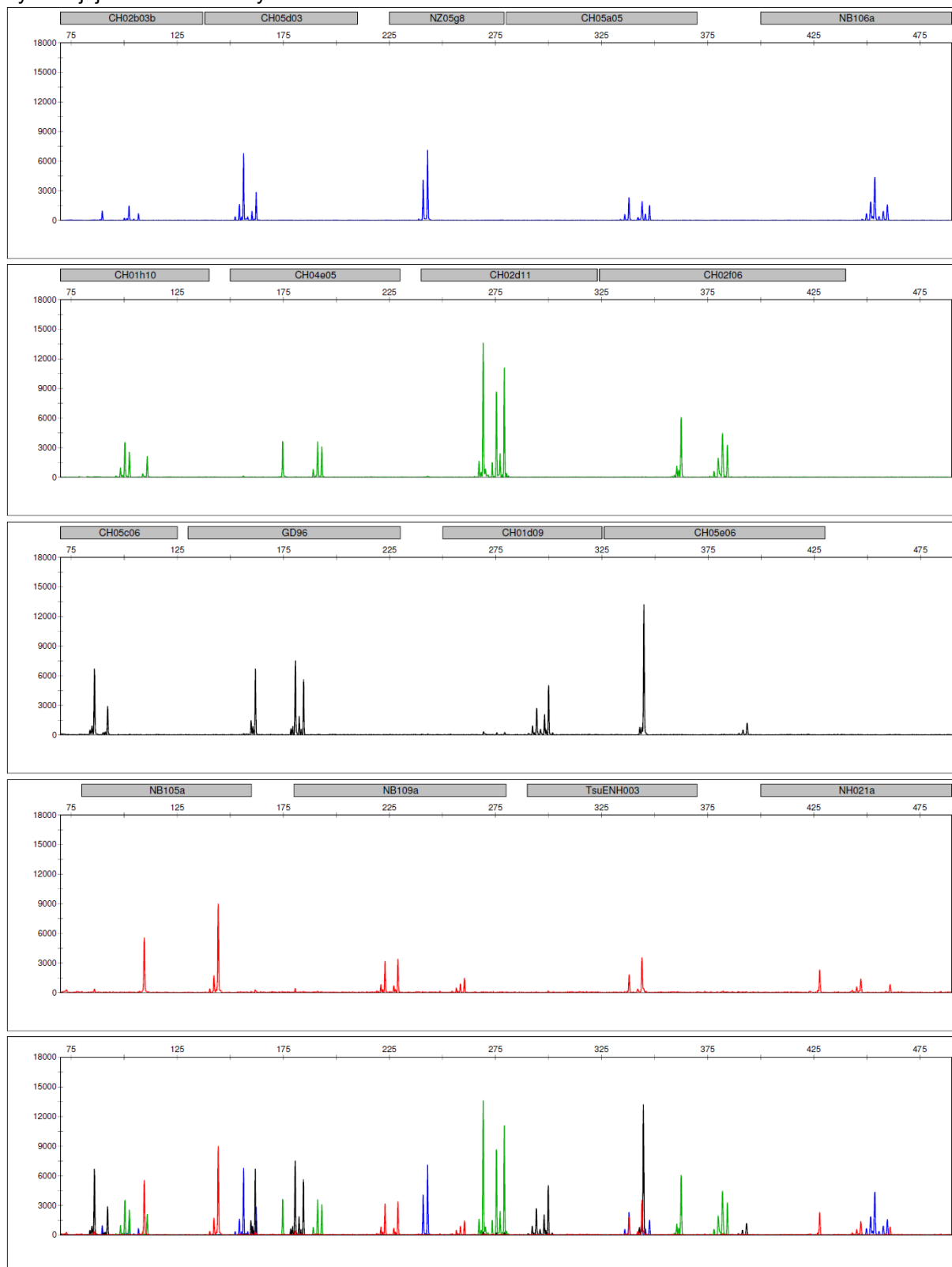
Obrázek 6. Elektroforeogram pro referenční odrůdu '**Konference**': Jednotlivé panely odshora dolů: modrý kanál – značení 6-FAM; zelený kanál – značení VIC; černý kanál – značení NED; červený kanál – značení PET; překryv všech barevných kanálů. Šedivé obdélníčky u zobrazených barevných kanálů vymezují jednotlivé markery.



Obrázek 7. Elektroforeogram pro referenční odrůdu 'Williamsova': Jednotlivé panely odshora dolů: modrý kanál – značení 6-FAM; zelený kanál – značení VIC; černý kanál – značení NED; červený kanál – značení PET; překryv všech barevných kanálů. Šedivé obdélníčky u zobrazených barevných kanálů vymezují jednotlivé markery.



Obrázek 8. Elektroforeogram pro referenční odrůdu 'Lucasova': Jednotlivé panely odshora dolů: modrý kanál – značení 6-FAM; zelený kanál – značení VIC; černý kanál – značení NED; červený kanál – značení PET; překryv všech barevných kanálů. Šedivé obdélníčky u zobrazených barevných kanálů vymezují jednotlivé markery.





Tabulka 6. Relativní velikosti alel jednotlivých markerů u referenčních odrůd. Odrůda 'Lucasova' je triploidní. V případě výskytu dvou alel u triploidních odrůd nelze spolehlivě určit, která z alel je přítomna ve dvou kopiích, proto jsou u některých SSR markerů uvedeny pouze dvě hodnoty.

SSR Marker	'Amfora'	'Bohemica'	'Boscova lahvice'	'Clappova'	'Dicolor'	'Konference'	'Williamsova'	'Lucasova' (triploid)
CH02b03b_a	81 90	92 98	90 102	81 96	81 92	90 98	81 102	90 102 107
CH05d03	180 194	164 194	156 172	156 194	162 194	172 194	150 194	156 162
CH05a05_a	346 348	346 348	348 348	346 346	334 346	348 348	346 348	338 344 348
NZ05g8_a	243 243	243 249	243 245	249 249	243 245	241 243	241 249	241 243
NB106a_a	454 467	467 470	460 462	454 467	467 470	454 454	435 454	454 460
CH01h10_a	96 102	100 100	85 111	100 107	100 107	102 109	100 102	100 102 111
CH04e05_a	175 175	175 191	187 193	175 193	191 195	175 175	185 193	175 191 193
CH02d11_a	275 275	269 275	259 275	269 275	269 275	269 275	267 269	269 275 279
CH02f06_a	372 401	382 385	362 372	362 401	382 385	372 385	385 401	362 382 385
CH05c06	86 96	86 86	86 86	90 90	86 90	86 96	86 90	86 92
GD96_a	166 180	164 164	168 187	168 180	164 187	180 207	168 185	162 180 185
CH01d09_a	294 300	296 296	275 296	279 300	282 296	300 300	292 300	294 300
CH05e06_a	347 359	345 393	353 359	353 384	345 366	359 359	366 384	345 393
NB105a_a	110 144	110 144	123 146	123 144	110 144	110 137	123 144	110 144
NB109a_a	223 229	223 232	223 261	255 261	229 232	223 253	223 261	223 229 261
TsuENH003_a	324 344	322 324	344 344	322 328	322 346	324 344	328 344	338 344
NH021a_a	428 449	441 442	449 449	442 449	449 461	428 447	428 449	428 447 461

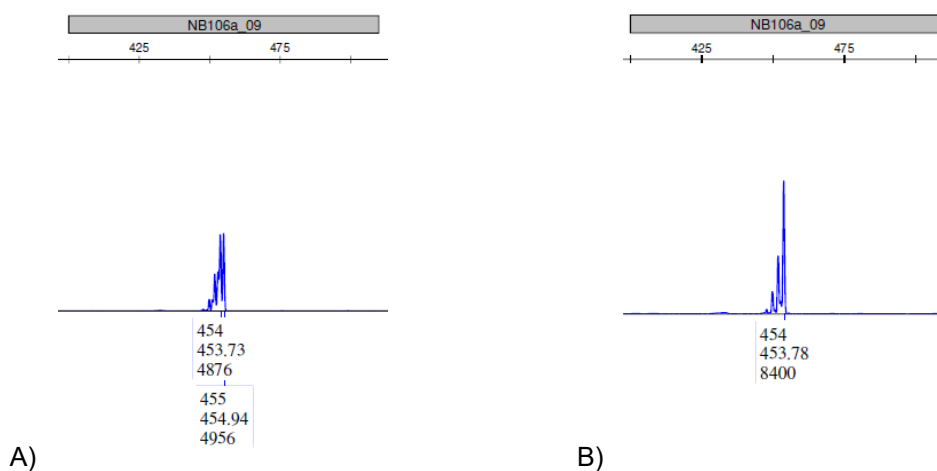
3.2.5.2 Možné problémy při analýze dat („Troubleshooting“)

Grafické výstupy fragmentačních analýz jsou zpravidla dobře hodnotitelné a většinou jsou automaticky vyhodnoceny softwarem GeneMapper správně. V některých případech však může dojít k nevyhodnocení určité alely či k vyhodnocení nesprávné alely, např. z důvodu vyššího pozadí či výrazného „stuttering“ (kratší varianty dané alely, které vznikají chybovostí DNA polymerázy), případně z důvodu malé vzdálenosti mezi dvěma alelami, proto je potřebná kontrola, nejlépe dvou analytiků. V následujícím textu jsou uvedeny nejčastější příklady problematicky vyhodnotitelných alel, kterým je vhodné věnovat zvýšenou pozornost.

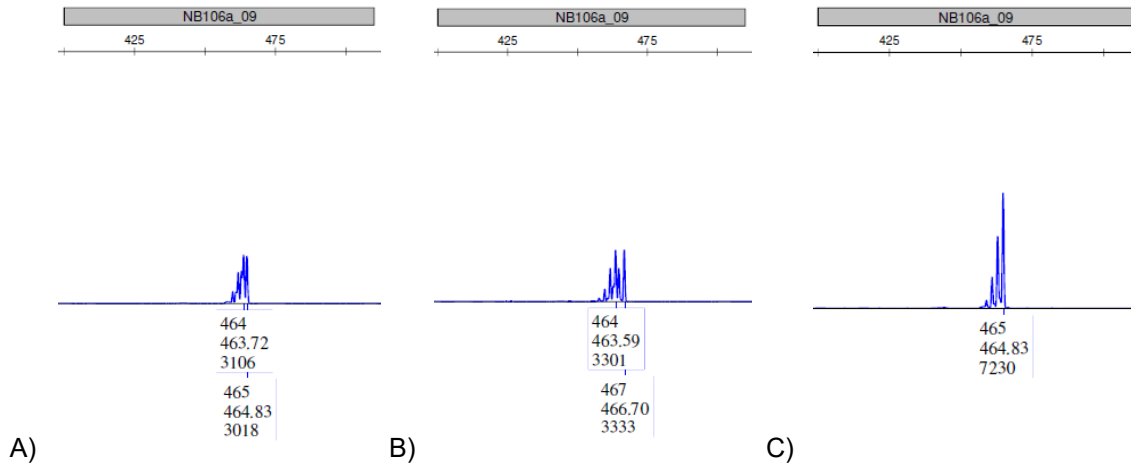
1) Alely lišící se pouze o 1 nukleotid

Problémem při vyhodnocování mohou být alely lišící se pouze o jeden nukleotid. Jejich výskyt je ojedinělý, ale u některých markerů se mohou objevit častěji. Tyto alely mohou být snadno přehlédnuté a často u nich také dochází k nesprávnému automatickému vyhodnocení pomocí softwaru. Tyto alely se vyskytují u markerů NB106a_a – alelické kombinace 454/455 (Obrázek 9) a 464/465 (Obrázek 10), CH04e05_a – alelická kombinace 201/202 (Obrázek 11) a NH021a_a – alelické kombinace 441/442 (Obrázek 12) a 444/445 (Obrázek 13).

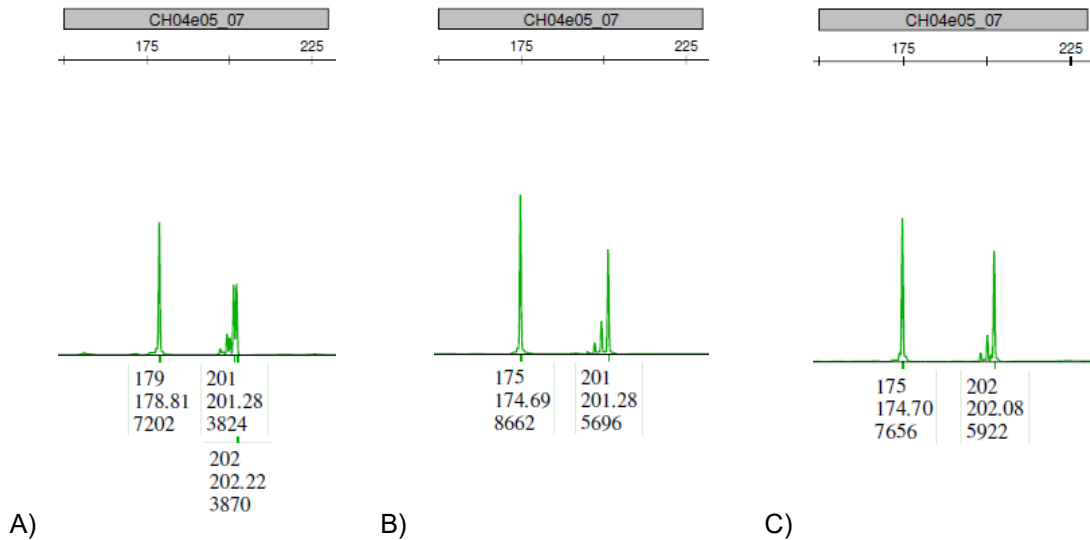
Obrázek 9. Alely 454 a 455 markeru NB106a_a na chromozómu 9. (A) Alely 454 a 455 se liší o 1 nukleotid. Alela 455 patří mezi vzácné a mimo kombinaci s alelou 454 nebyla pozorována. (B) Samotná alela 454.



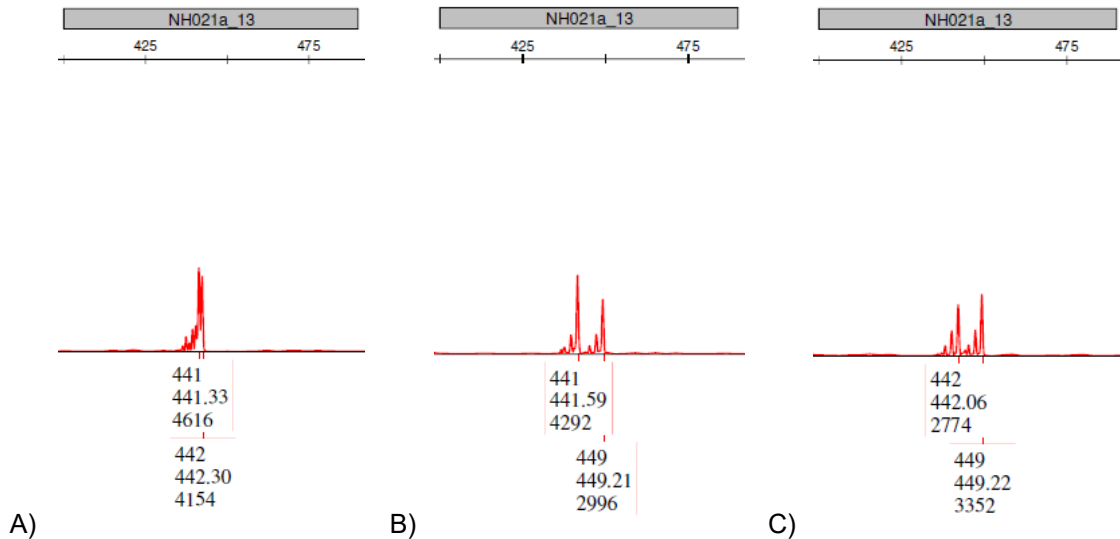
Obrázek 10. Alely 464 a 465 markeru NB106a_a na chromozómu 9. (A) Alely 464 a 465 se liší o 1 nukleotid. (B) Alela 464 v kombinaci s alelou 467. (C) Samotná alela 465.



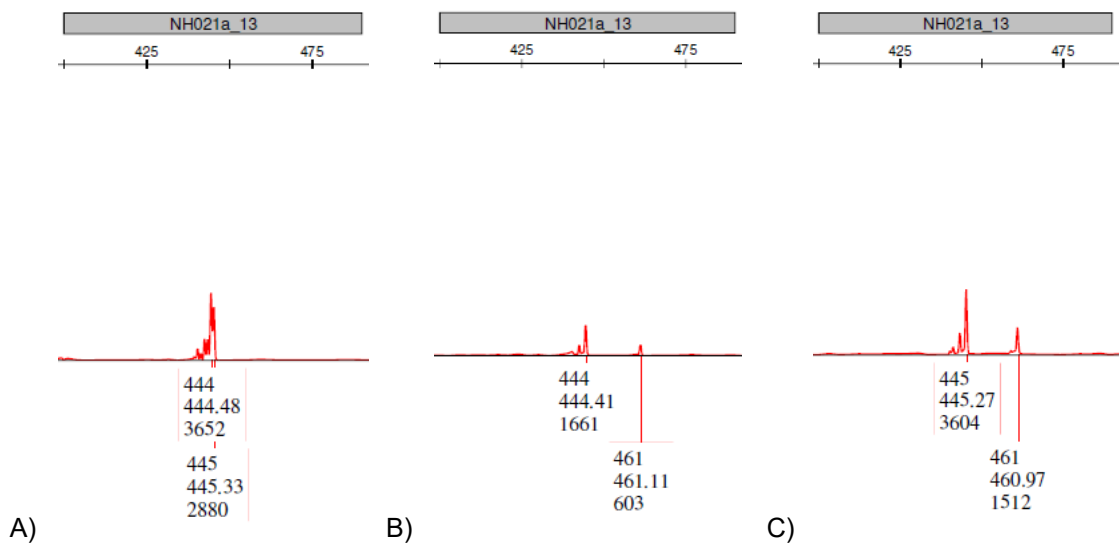
Obrázek 11. Alely 201 a 202 markeru CH04e05_a na chromozómu 7. (A) Alely 201 a 202 u triploidního vzorku lišící se o 1 nukleotid. (B) Alela 201 v kombinaci s alelou 175. (C) Alela 202 v kombinaci s alelou 175.



Obrázek 12. Alely 441 a 442 markeru NH021a_a na chromozómu 13. (A) Alely 441 a 442 se liší o 1 nukleotid. (B) Alela 441 v kombinaci s alelou 449. (C) Alela 442 v kombinaci s alelou 449.



Obrázek 13. Alely 444 a 445 markeru NH021a_a na chromozómu 13. (A) Alely 444 a 445 liší se o 1 nukleotid. (B) Alela 444 v kombinaci s alelou 461. (C) Alela 445 v kombinaci s alelou 461.



2) „Stuttering“

Stuttering je jev, při kterém se na elektroforeogramu, kromě hlavního vrcholu odpovídajícímu správné alele, objeví v jeho těsné blízkosti také menší vedlejší vrcholy (tzv. stutter peaks), které jsou typicky o jednu nebo více jednotek repetice kratší, popřípadě delší než hlavní fragment. Ty vznikají u mikrosatelitů při PCR během replikace těchto opakujících se úseků, když dojde k tzv. skluzu DNA polymerázy. Při skluzu polymeráza buď "přeskočí" jednu nebo více opakovacích jednotek, což vede ke zkrácení amplifikovaného produktu, nebo se naopak vzácněji "zasekne" a vytvoří delší produkt. Výsledkem jsou fragmenty o mírně odlišné délce, které pak při fragmentační analýze vytvoří tyto vedlejší vrcholy. V ojedinělých případech je také možné zaznamenat fragment o jeden nukleotid delší než hlavní vrchol, který je způsoben tendencí DNA polymerázy přidávat k 3' konci amplifikované sekvence jeden nukleotid navíc.

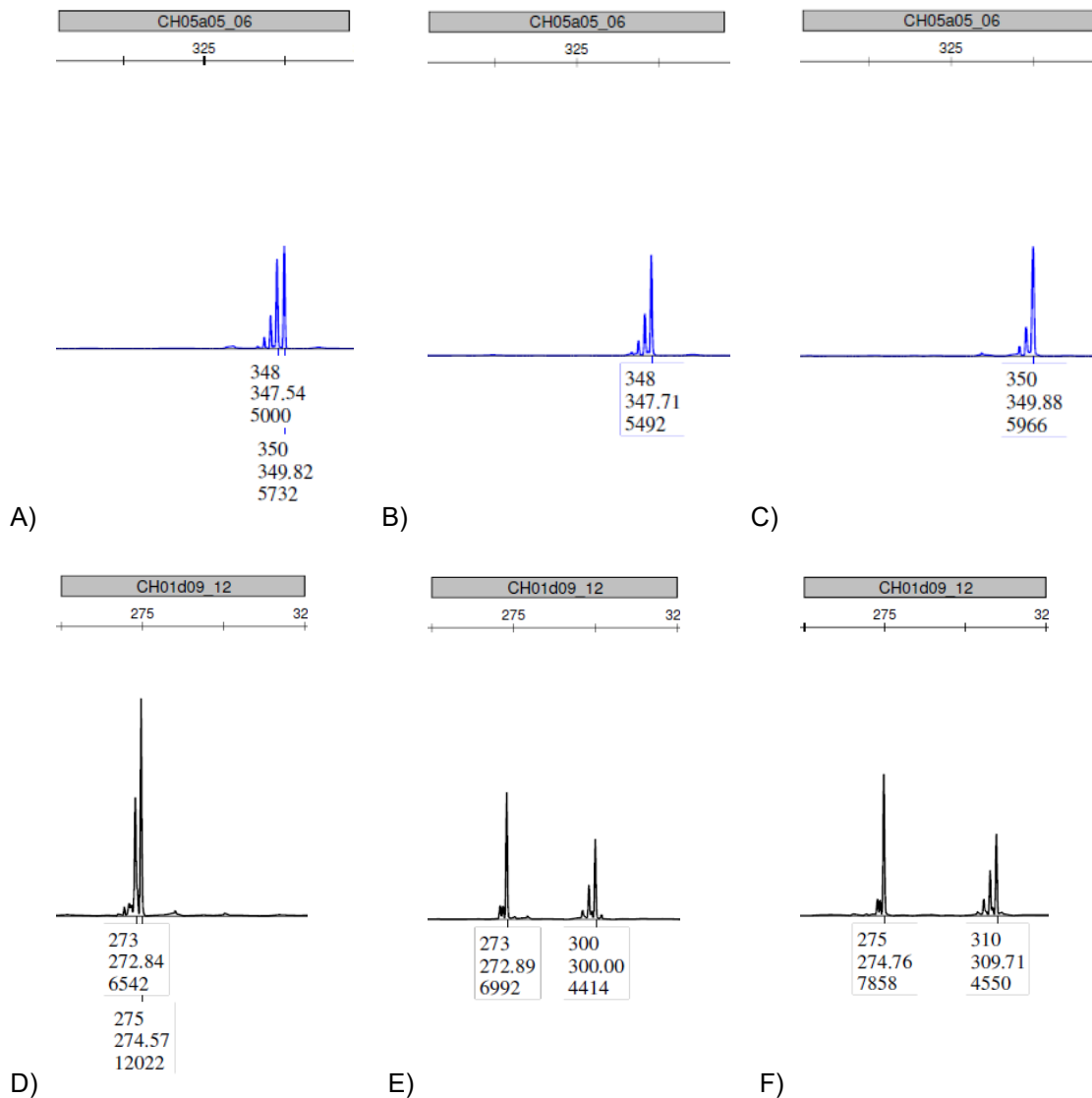


Z tohoto důvodu je vhodné pro fragmentační analýzu použít DNA polymerázu, která tuto vlastnost nevykazuje, nebo jen ve velmi malé míře, např. DNA polymerázu obsaženou v reagentii Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix.

Z výše uvedených důvodů může stuttering zkomplikovat interpretaci výsledků. Při automatizovaném vyhodnocování dat může software tyto vedlejší vrcholky detekovat a chybně je vyhodnotit jako samostatné alely, zejména pokud je jejich výška nad nastaveným prahem pro vyhodnocování vrcholů. To může vést k chybné genotypizaci, například k záměně homozygotního profilu za heterozygotní. Nastat může i opačná situace, kdy software vyhodnotí kratší vrchol za stutter i přesto, že se jedná o alelu. Správné nastavení softwaru a manuální kontrola jsou proto klíčové pro rozlišení skutečných alel od vedlejších stutterových vrcholů. Vizualně lze tyto stutterové vrcholky odlišit na základě jejich nižší výšky (jsou nižší než hlavní vrchol a mají tendenci se snižovat se vzrůstající vzdáleností od reálné délky alely) a předvídatelné pozice (vždy o definovaný počet nukleotidů kratší/delší než hlavní vrchol). V případě jakýchkoli nejasností je potřebné porovnat vzhled alel i u jiných vzorků.

Obrázek 14 zobrazuje příklady alel, které mohou být chybně zaměněny za stutter, neboť kratší alela je nižší než následná delší alela. Další podobné alely jsou uvedeny v Tabulce 7. Příklady silně stutterujících alel jsou uvedeny na Obrázku 15. Další obdobně silně stutterující alely, které by mohly být v určitých kombinacích hůře hodnotitelné, jsou alely 394, 397, 400, 401 a 413 u markeru CH02f06_a, alely 370 a 399 u markeru CH05e06_a a alely 255, 257 a 261 u markeru NB109a_a. Překryv kratší alely a stutteru u delší alely (příklad Obrázek 16) může také komplikovat vyhodnocování.

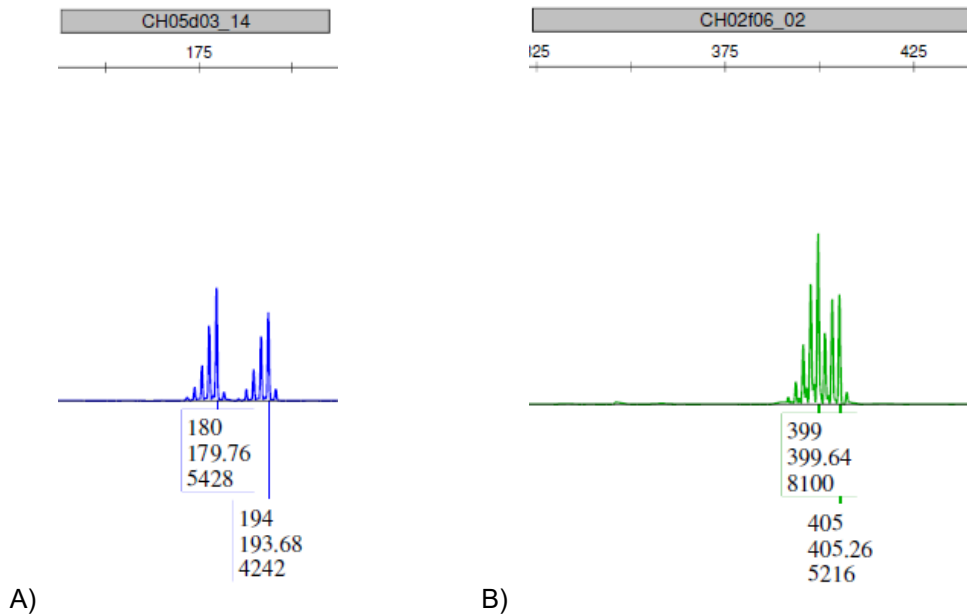
Obrázek 14. Příklad alel, kde kratší alela je nižší než alela delší a může být chybně zaměněna za stutter. (A) Alely 348/350 u markeru CH05a05_a. (B) Vzhled alely 348 v jiném alelickém uspořádání. (C) Vzhled alely 350 v jiném alelickém uspořádání. (D) Alely 273/275 u markeru CH01d09_a. (E) Vzhled alely 273 v jiném alelickém uspořádání. (F) Vzhled alely 275 v jiném alelickém uspořádání.



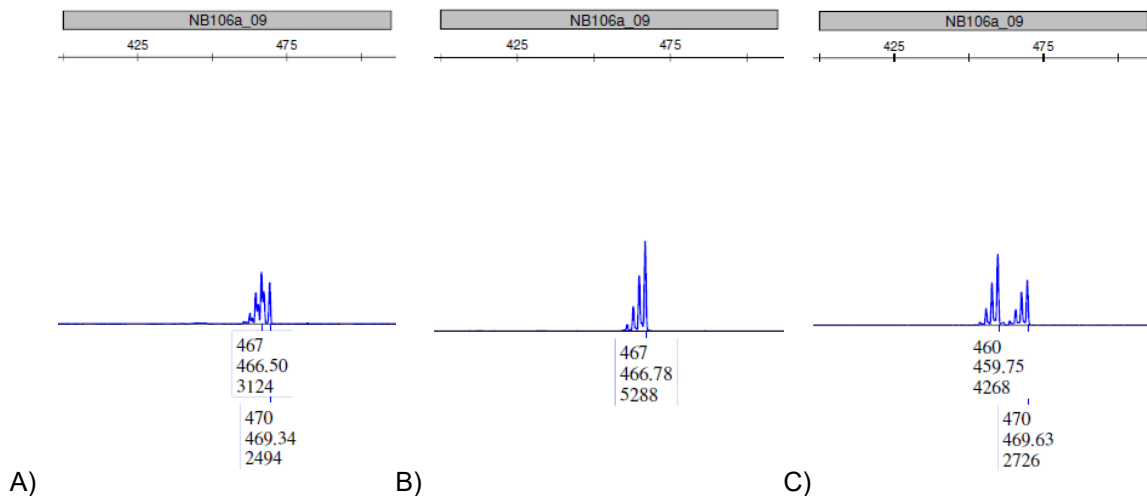
Tabulka 7. Alely, které mohou být chybně zaměněny za stutter v dané alelické kombinaci

Marker	Značení/kanál	Kombinace alel
CH05a05_a	6-FAM	244/246
NZ05g8_a	6-FAM	241/243, 247/249
CH01h10_a	VIC	100/103
CH04e05_a	VIC	191/193
CH02d11_a	VIC	267/269, 277/279
GD96_a	NED	162/164, 166/168, 178/180, 185/187
CH05e06_a	NED	343/345
NB105a_a	PET	121/123
TsuENH003_a	PET	320/322, 342/344
NH021a_a	PET	442/444

Obrázek 15. Příklady silně stutterujících alel. (A) Alely 180 a 194 u markeru CH05d03. (B) Alely 399 a 405 u markeru CH02f06_a.



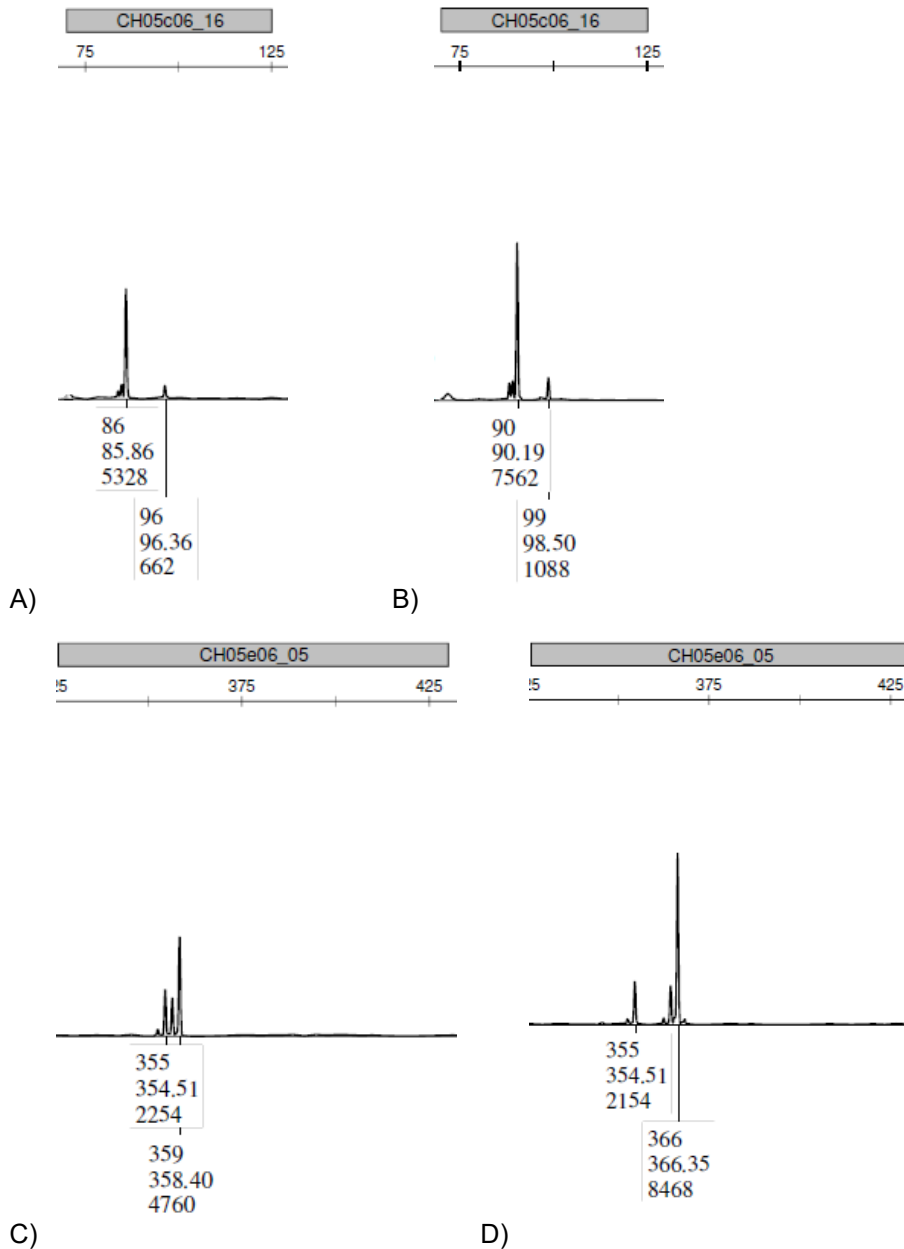
Obrázek 16. Delší stutterující alela 470 zasahuje stutterem do kratší alely 467. (A) Alely 467/470. (B) Alela 467 v jiném alelickém uspořádání. (C) Alela 470 v jiném alelickém uspořádání.



3) Nízký signál alely

Problematické pro hodnocení jsou rovněž alely, které vykazují nízký signál oproti ostatním alelám a které je možné přehlédnout. Jedná se například o marker CH05c06 a alely 96 a 99 nebo marker CH05e06_a a alelu 355 (Obrázek 17). Nízký signál těchto alel může být způsoben např. hůře amplifikovatelnou sekvencí alely, popřípadě výskytem mutací v sekvenci, na kterou nasedá primer. Doporučuje se proto hodnotit vzorky s dostatečně vysokým signálem, aby nemohly být hůře amplifikovatelné alely opominuty.

Obrázek 17. Příklady alel s nízkým signálem. (A) Alela 96 markeru CH05c06 v porovnání s alelou 86. (B) Alela 99 markeru CH05c06 v porovnání s alelou 90. (C) Alela 355 markeru CH05e06_a v porovnání s alelou 359. (D) Alela 355 v porovnání s alelou 366.

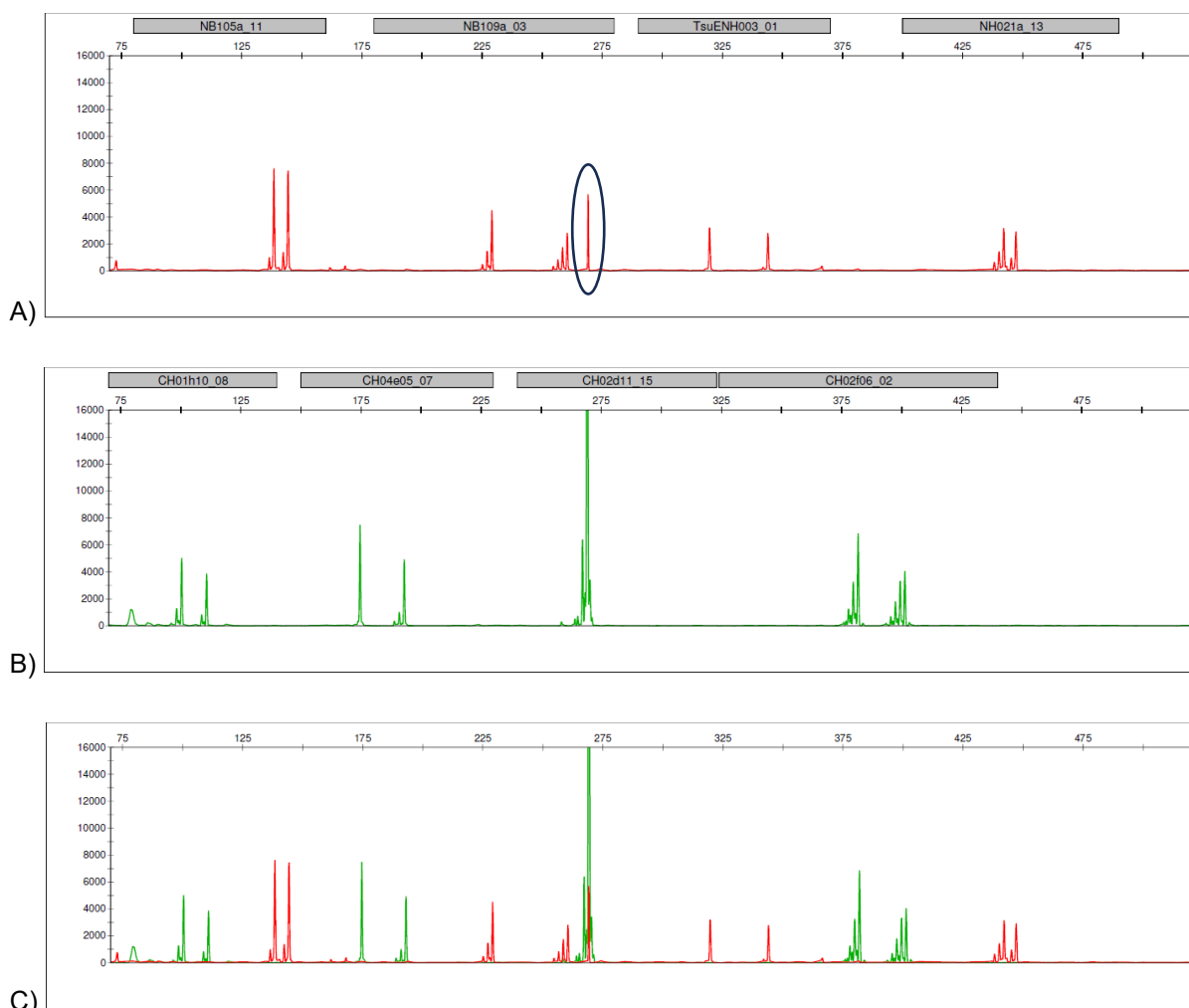


4) Prosvícení signálu pocházejícího z jiného detekčního kanálu

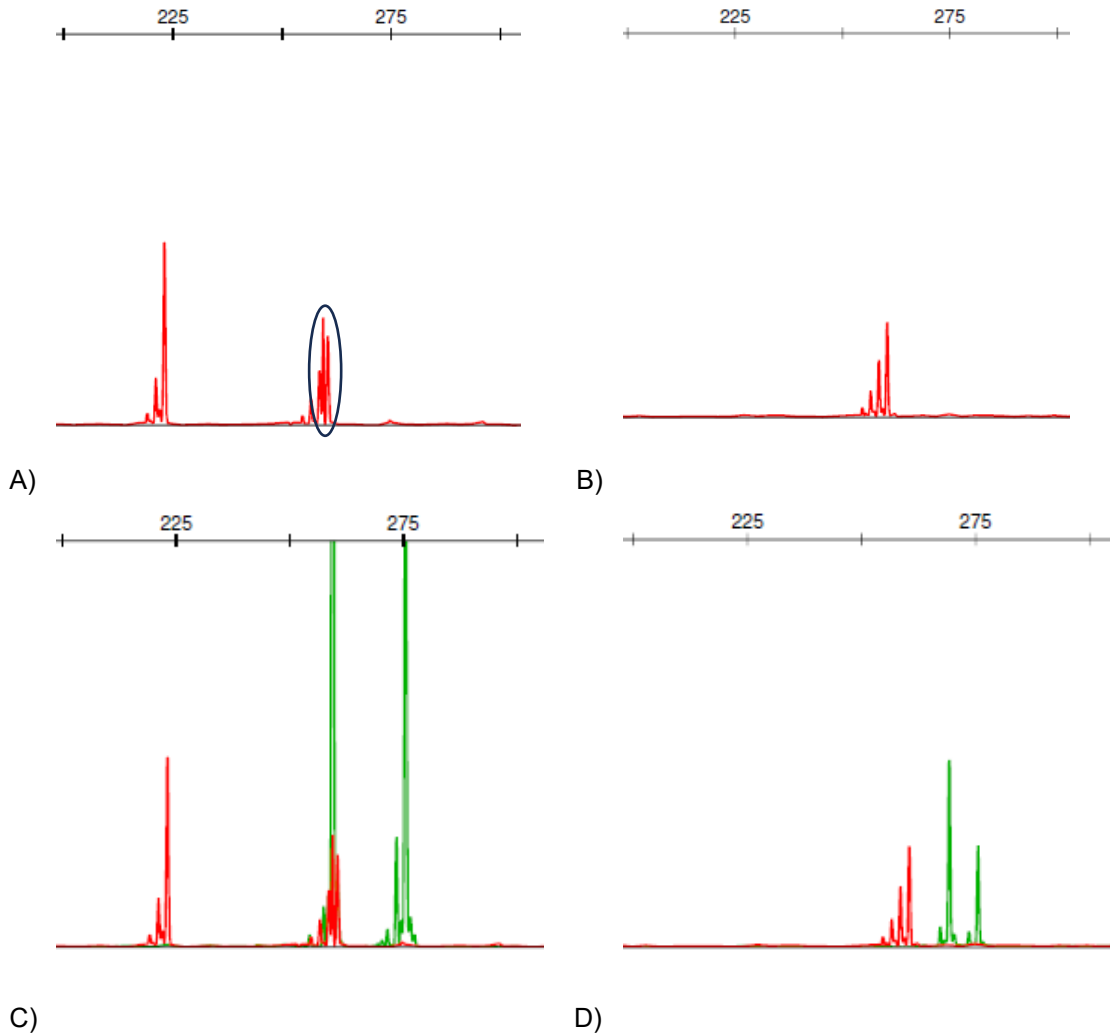
Prosvícení signálu představuje další významnou výzvu při interpretaci výsledků fragmentační analýzy. Tento jev nastává, protože emisní spektra fluorescenčních barviv používaných k značení DNA fragmentů se částečně překrývají. Když laser excituje barviva, detektor může kromě signálu jedné barvy zachytit i část signálu z jiného barviva. To se typicky projeví jako slabší, chybný signál v barevném kanálu, do kterého nepatří. Moderní genetické analyzátoři sice tento problém řeší pomocí matematické korekce a předchozí kalibrace, avšak při nadměrně silném signálu (tzv. pull-up peaks) může dojít k saturaci detektoru. V takovém

případě selže i korekční matice a výsledkem je chybný přenos signálu mezi barevnými kanály, což vyžaduje pečlivou vizuální kontrolu. U hrušní se toto výrazné zesílení fluorescenčního signálu, často do extrémně vysokých hodnot, objevuje především v zeleném kanálu (fluorofor VIC) u markeru CH02d11_a, což vede k prosvícení do červeného kanálu (fluorofor PET). Prosvícený signál se dá obvykle snadno rozpoznat, protože má atypický tvar a šířku ve srovnání s pravými alelami a nachází se mimo známé délky alel (Obrázek 18). V některých případech se však může stát, že k prosvícení kanálu dojde i přímo v alele se stutterem, což může interpretaci značně komplikovat (Obrázek 19). V případě pochybností je proto nezbytné zkontrolovat danou oblast u více barevných kanálů a ověřit, zda atypický vrchol v jednom kanálu přesně odpovídá velmi silnému signálu v kanálu jiném.

Obrázek 18. Prosvícení signálu zeleného kanálu do kanálu červeného. (A) Červený kanál fragmentační analýzy. V černém oválu je vrchol vzniklý prosvícením ze zeleného kanálu. (B) Zelený kanál fragmentační analýzy a alela 269 markeru CH02d11_a s velmi vysokým signálem nad detekčním limitem detektoru. (C) Překryv zeleného a červeného kanálu.



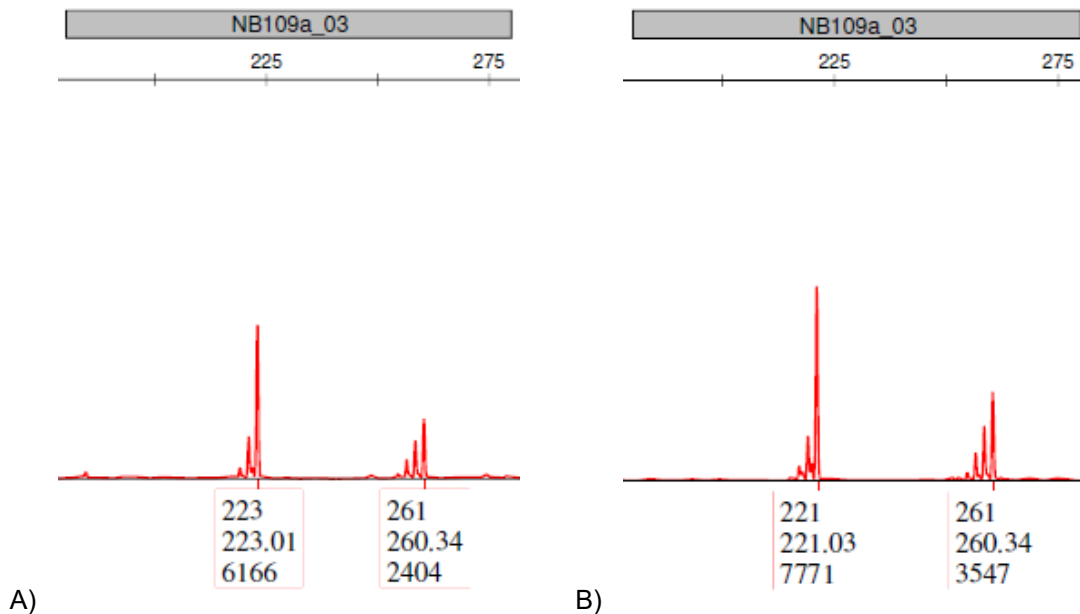
Obrázek 19. Prosvícení signálu zeleného kanálu do stutteru alely 261 markeru NB109a_a v červeném kanálu. (A) Alela 261 markeru NB109a_a s prosvíceným signálem zeleného kanálu. V černém oválu je vrchol vzniklý prosvícením ze zeleného kanálu. (B) Alela 261 markeru NB109a_a bez prosvíceného signálu zeleného kanálu. (C) Překryv zeleného a červeného kanálu, kdy alela 259 markeru CH02d11_a s velmi vysokým signálem na horní hranici detekovatelnosti zasahuje do alely 261 markeru NB109a_a a způsobuje prosvícení signálu. (D) Alely markerů NB109a_a a CH02d11_a, které se vzájemně neovlivňují.



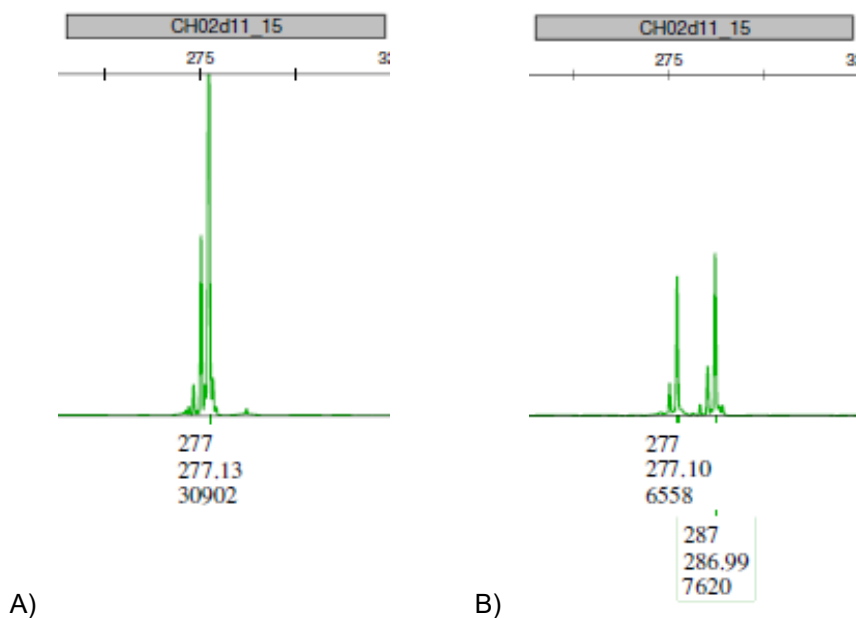
5) Mutace v SSR markerech u odrůd

U některých odrůd pocházejících z různých zdrojů byl pozorován stejný soubor alel všech markerů kromě jediné alely. V těchto případech docházelo obvykle k posunu určité alely, kdy původní alela ze spektra vymizela. Většinou se jednalo o posun alely o dva až čtyři nukleotidy (pravděpodobně díky skluzu polymerázy) (Obrázek 20), byla však pozorována i odrůda, u které došlo k větší změně délky, a to až o 10 nukleotidů (Obrázek 21). V některých případech se vzorky stejné odrůdy lišily přítomností jedné alely navíc (Obrázek 22). Ve všech 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 a u hrušní byly popsány již dříve (Queiroz et al. 2019), u jiných druhů byly popsány např. u révy vinné (Gonçalves et al. 2013).

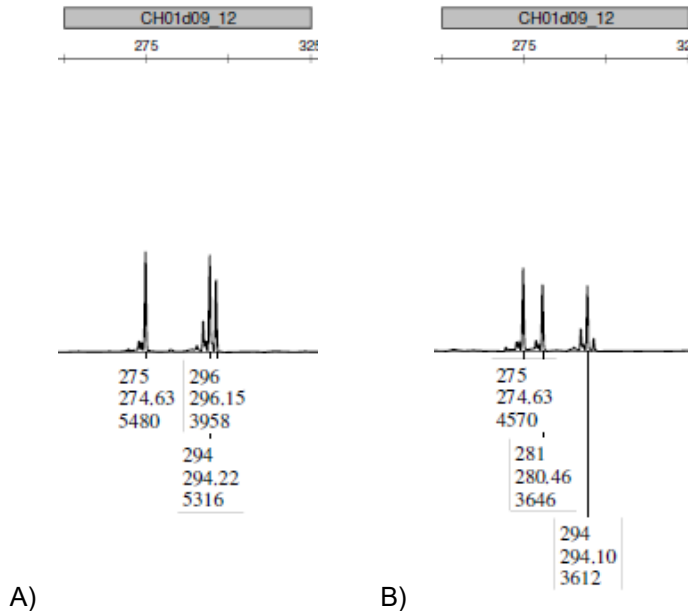
Obrázek 20. Marker NB109a_a – změna alely o 2 nukleotidy – odrůda 'Untoasa de Georgiu' ze dvou různých zdrojů, (A) s alelou 223, (B) s alelou 221, ostatní analyzované markery měly všechny alely shodné.



Obrázek 21. Marker CH02d11_a – změna alely o 10 nukleotidů – odrůda 'Zakrslá zvonková' ze dvou různých zdrojů, (A) s alelou 277, (B) s alelami 277 a 287, ostatní analyzované markery měly všechny alely shodné.



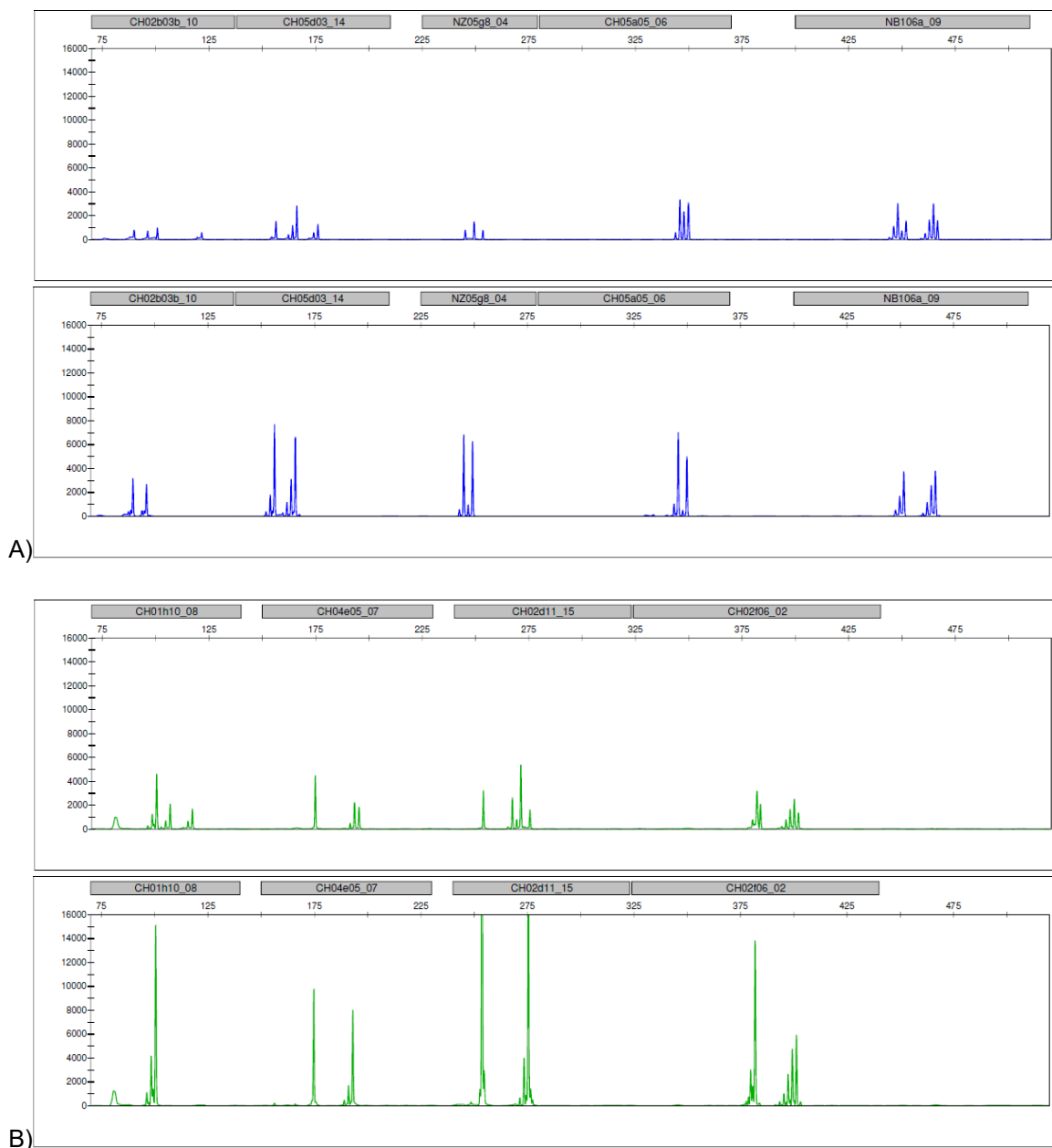
Obrázek 22. Marker CH01d09_a – výskyt nové alely – triploidní odrůda 'Zelinka chlumecká' ze dvou různých zdrojů, (A) s alelou 296 (kromě alel 275 a 294), (B) s alelou 281 (kromě alel 275 a 294), ostatní analyzované markery měly všechny alely shodné.

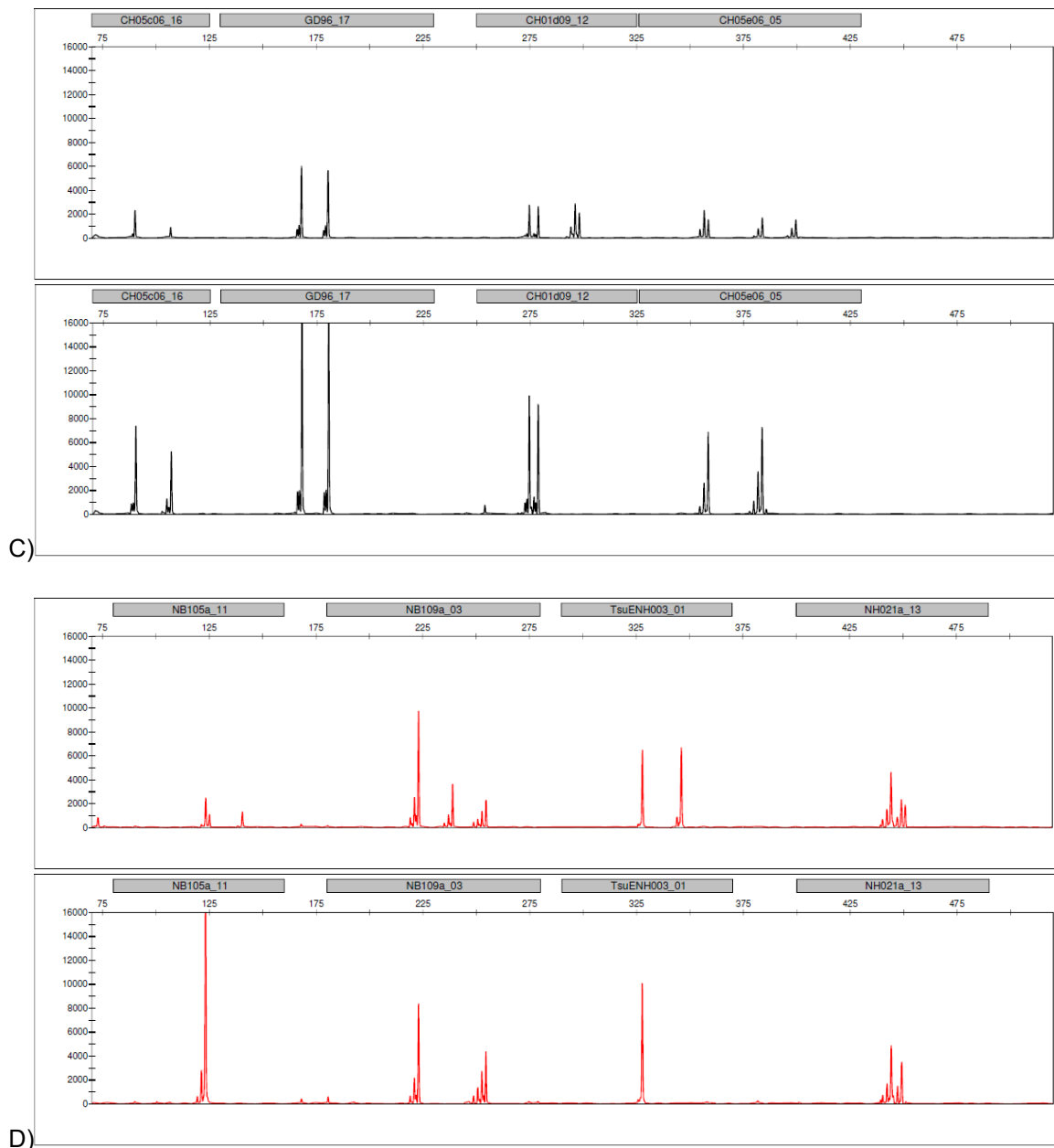


6) Chyby v pre-analytické a analytické fázi

Pro náležitě vyhodnocení výsledků fragmentační analýzy je nezbytné věnovat pozornost i chybám, které mohly vzniknout již v pre-analytické a analytické fázi a rovněž mohou vést k nesprávné interpretaci. Některé chyby, jako je záměna vzorků při jejich odběru nebo manipulaci v laboratoři, nelze odhalit pouhou analýzou elektroforeogramů. Pro jejich detekci je ideální analyzovat dva nezávisle odebrané vzorky téže odrůdy, které by měly mít identický genetický profil. Naopak kontaminace vzorků, například při odběru listů z propletených větví sousedních stromů, případně z prorostlé podnože, nebo laboratorní chyby při míchání vzorků jsou často viditelné na samotném elektroforeogramu. Místo očekávaných dvou nebo tří alel pro diploidní, respektive triploidní genotyp, se může objevit vícečetný, například tetraploidní profil (Obrázek 23). Takový výsledek vždy indikuje směsný vzorek a vyžaduje opakování analýzy a identifikaci kroku, ve kterém došlo ke smísení vzorků, aby se vyloučila další chyba a zajistila se spolehlivost genotypizace.

Obrázek 23. Příklad tetraploidního profilu, kdy došlo ke smíchání dvou vzorků v průběhu analýzy – u každého kanálu horní panel zobrazuje směsný vzorek odrůdy 'Moldavskaja ranaja' a druhého neznámého genotypu, dolní panel genetický profil odrůdy 'Moldavskaja ranaja'. (A) Modrý kanál (6-FAM). (B) zelený kanál (VIC), (C) černý kanál (NED), (D) červený kanál (PET).





4 SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ

Předkládaná metodika komplexně zpracovává problematiku identifikace odrůd hrušní pomocí molekulárních markerů typu SSR. Zahrnuje popis standardizovaných metodických a analytických postupů od odběru vzorku, přes jeho uchování, zpracování, postupy molekulární detekce a vyhodnocení.

V České republice se doposud pro identifikaci hrušní primárně využívaly fenotypové a fenologické deskriptory, což je metoda závislá na zkušenostech hodnotitele a může být zatížena subjektivní chybou. Zavedení spolehlivé a rychlé laboratorní genotypizace, využitelné po celý rok, tak představuje zásadní kvalitativní posun. Evropský kooperativní program pro rostlinné genetické zdroje (ECPGR) doporučil pro genotypizaci hrušní sadu 17 SSR markerů, které se

amplifikovaly ve 3 oddělených multiplexech po 4 SSR markerech, ostatním byla přiřazena nižší priorita a byly analyzovány jednotlivě (Evans et al. 2009). Později byla tato sada zredukována na 12 SSR markerů analyzovaných ve třech multiplexech (Evans et al. 2015). Analýza ve více reakcích je však pracný a časově náročný postup, který zvyšuje finanční náklady i riziko chybovosti, proto je moderním přístupem provádět genotypování v jediné reakci. Tento postup zvolil již Zurn et al. (2020), který však v sadě USPGR použil pouze 10 SSR markerů, z nich většina měla delší než 2-nukleotidovou repetici. Delší repetice SSR markeru mají své výhody, jako například vyšší stabilita a nepřítomnost stutteru, ovšem za cenu nižší heterozygotnosti (Testolin et al. 2022). Jak je zřejmé z publikace o vývoji USPGR, některé odrůdy v rámci souboru 152 odrůd byly rozlišovány na základě jediného markeru, což při odhadovaném počtu více jak 3000 celosvětově existujících odrůd, které často vznikají křížením úzké sady rodičů, může přinášet problémy s nízkou rozlišovací schopností této sady. S cílem zefektivnit tento proces jsme proto navrhli vlastní, optimalizovanou sadu 17 SSR markerů, které se vyznačují účinnou amplifikací, vysokou heterogenitou a snadnou hodnotitelností. Tato sada umožňuje amplifikaci v jediné multiplexní reakci, což minimalizuje chybovost spojenou s kompletací dat z více reakcí, snižuje finanční náklady a zároveň zachovává vynikající rozlišovací schopnost pro spolehlivé odlišení jednotlivých odrůd. Její pravděpodobnost náhodné shody vypočtená po analýze 230 odrůd je pro diploidní hrušně $4,9 \times 10^{-23}$, což odpovídá používaným soupravám pro identifikaci člověka obsahujícím rovněž 17 SSR markerů (Green, 2013)

5 POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY

Tvorba referenční databáze pro účely ověřování a identifikace odrůd hrušní představuje klíčový krok v moderním ovocnářství. Deklarace odrůdy má význam nejen pěstitelský, ale i obchodní, legislativní a kulturní. Genotypizace založená na analýze DNA pomocí SSR markerů umožňuje jednoznačné rozlišení genotypů nezávisle na fenotypu a je aplikovatelná ve všech fázích produkčního cyklu. Pro identifikaci je nezbytné mít k dispozici databázi alelických sestav získaných z co nejširší kolekce ověřených odrůd hrušní.

Referenční databáze může být vytvářena i pro konkrétní účel. Pro pěstitelskou praxi je vhodné sestavit databázi genotypů nejčastěji pěstovaných odrůd, která by byla přizpůsobena konkrétnímu podniku a mohla by obsahovat pouze odrůdy, které jsou v daném provozu pěstovány či množeny.

Genotypizaci může využít také Národní odrůdový úřad (NOÚ) pro účely uznávacího řízení při zkoušení nových odrůd (zařadit analýzy před nebo po DUS testech), testování shody odrůd a ověřování při prodlužování registrace. Databáze SSR profilů odrůd udržovaných v NOÚ je využitelná k ověření pravosti, identifikaci mutací či klonů odrůd, se kterými jsou přihlašované materiály shodné, a k podpoře šlechtitelských práv.

Významná je také databáze pro sbírkové účely. Hrušeň obecná je součástí genofondových sbírek uchovávaných ve VÝZKUMNÉM A ŠLECHTITELSKÉM ÚSTAVU OVOCNÁŘSKÉM HOLOVOUSY s.r.o., přičemž informace o odrůdách jsou uvedeny v databázi [GRIN Czech](#). Genetická analýza starých a krajových odrůd umožňuje identifikaci duplicit a synonym, ověření původu odrůd a rovněž jejich využití v šlechtitelských programech

zaměřených na odolnost vůči chorobám, suchu či mrazovému poškození. Znalost genetických profilů je cenná i pro identifikaci odrůd ze starých výsadeb, alejí či historických zahrad, kde se často vytrácí povědomí o původu stromů. Genotypizace tak představuje nástroj pro jejich charakterizaci, dokumentaci a ochranu kulturního dědictví.

Genotypizace hrušní najde uplatnění i ve školkařské praxi, kde se používá vegetativní rozmnožování. Produkční řetězec zahrnuje velmi často registrovanou nebo chráněnou odrůdu v podobě matečnice v izolaci a následně prostorovém izolátu, dalším krokem je příprava stromků (očkování, roubování) a následuje prodej. Při kontrole pravosti odrůdy lze využít následující postup: unikátní označení stromů používaných jako zdroj rozmnožovacího materiálu (matečnic), vytvoření databáze genetických profilů všech matečnic, ověření pravosti pomocí databáze NOÚ, stanovení genetických profilů stromů v izolátech včetně porovnání s profily matečnic a namátkovou kontrolu výpěstků. V případě zjištění nesouladu je nutné analyzovat jednotlivé články výrobního procesu. Pro snížení nákladů lze využít směsné vzorky z několika málo stromků stejné šarže.

V souhrnu, metodika genotypizace hrušní má široké uplatnění napříč různými sektory. Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský a Národní odrůdový ústav ji mohou využít pro kontrolu novosti přihlašovaného materiálu a ověření shody při prodlužování registrace. Ovocnářská unie ČR ji může zavést pro rutinní ověřování pravosti prodáváného či množeného materiálu. Šlechtitelé ji aplikují pro ověřování rodičovského původu nových odrůd, může jim zaručit i výběr licenčních poplatků. Školkaři s její pomocí mohou kontrolovat všechny kroky produkce stromků. Pěstitelé ji využijí pro kontrolu pravosti sazeného materiálu, čímž předejdou ekonomickým ztrátám. Státní zemědělská a potravinářská inspekce (SZPI) a Česká obchodní inspekce (ČOI) ji mohou využít při kontrole pravosti prodáváných plodů nebo produktů z nich. Celní správa ji uplatní při ověřování deklarovaného zboží při dovozu a vývozu. Instituce spravující genofondy ji využívají při obnově výsadeb a přenosu genotypů. Obce, spolky a správy chráněných území ji mohou využít při identifikaci starých a krajových odrůd v krajině.

6 EKONOMICKÉ ASPEKTY

Ekonomické přínosy genotypizace hrušní lze posuzovat z několika úhlů pohledu, především však z hlediska minimalizace ztrát spojených se záměnou odrůd. V textu se vychází ze statistických údajů pro Českou republiku za rok 2024 ([ÚKZÚZ](#), [SZIF](#))

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

V České republice se v roce 2024 pěstovaly hrušně v produkčních sadech na ploše 643 ha, které poskytly výnos 5 603 tun hrušek. Rok 2024 byl ale významně ovlivněn teplým jarním počasím následovaným jarními mrazy, které způsobily poškození květů a plůdků. U hrušní konečnou sklizeň pozitivně ovlivnil dostatek srážek, dlouhý teplý podzim a partenokarpický vývoj plodů u odrůdy Konference. 5 603 tun však odpovídá pouze 77 % pětiletého průměru sklizně tohoto druhu. Průměrný výnos na hektar byl 8,71 tun. Průměrná výkupní cena hrušek první jakosti se pohybovala kolem 28,50 Kč/kg.

Při uvažovaném nulovém výnosu kvůli nevhodně osázenému sadu (např. nevhodné klimatické podmínky, výsadba špatné opylovací odrůdy atd.) tak dochází k průměrné ztrátě výnosů z prodeje cca 248 235 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 744 705 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, např. alespoň k průmyslovému zpracování. Kromě ušlého zisku však vzniknou i náklady s 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 dotací na restrukturalizaci ovocných sadů v režimu ekologického zemědělství pro rok 2025:

- 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 výdaje 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.

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

Ztráty školkařských podniků lze rozdělit do dvou hlavních kategorií:

- i) náklady na vytvoření školkařského výpěstku a
- ii) ušlý zisk v případě, že se nepodaří špatně vyrobený materiál prodat.

Vzhledem k tomu, že značná část stromků určité odrůdy je produkována na zakázku, není v této metodice uvažována produkce nesprávné odrůdy pro maloobchod, jelikož výpěstky lze zpravidla nabídnout pod správným názvem.

Náklady na vytvoření školkařského výpěstku se výrazně liší mezi jednotlivými podniky. Kromě nákladů na pěstování a údržbu zahrnují i cenu podnože (obvykle v řádu nižších desítek Kč/ks), oček roubované odrůdy (cca 5–10 Kč/očko) či roubu (cca 25–50 Kč/roub), přičemž ceny závisejí na konkrétní odrůdě, požadovaném množství a případných licenčních poplatcích.

Množství stromků potřebných na osázení 1 ha hrušňového sadu je cca 800 ks (záleží na sponu a intenzitě pěstování). Při orientačním odhadu nákladů na výrobu jednoho stromku pro velkoobchod ve výši 80–100 Kč/ks činí ztráty při výrobě 800 stromků potřebných k osázení 1 hektaru přibližně 64 000–80 000 Kč.

K tomu je nutné připočítat i ušlý zisk z neuskutečněného prodeje. Cena stromků se pohybuje v závislosti na jejich tvaru (např. špičák, korunka, zákrsek, čtvrtkmen, polokmen,

vysokokmen) a odrůdě v rozmezí od cca 100 Kč/ks (špičáky) až po 400 Kč/ks (vysokokmeny) bez DPH. Celkové ztráty při neprodání 800 kusů tak mohou dosáhnout dalších 80 000 až 320 000 Kč.

V souhrnu tedy může školkař utrpět ztrátu ve výši přibližně 120 000 až 400 000 Kč při výrobě nesprávné odrůdy pro plochu jednoho hektaru.

Ověřování dodržování licenčních podmínek – kalkulace ztrát při neuplatnění licenčních poplatků

Chráněné odrůdy jsou prodávány na základě smlouvy a dohody 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 2–5 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 stromků bez licence tak může vzniknout škoda až 60 000 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. Moderní licencované odrůdy také mívají produkční výhody (např. vyšší výnos, rezistence apod.). 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.

Ověřování odrůd při registraci a jejím prodlužování 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 hrušní ve výši 4 428 Kč/rok (rok 2025). DUS testy při registraci nové odrůdy obvykle trvají 2–3 roky (Ehrenbergerová, 2014), jedná se tedy o 8 856 – 13 284 Kč. Při prodlužování registrace může být tato doba kratší, je však třeba počítat s alespoň 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.



Ověřování odrůd pomocí molekulárních metod – kalkulace nákladů

Oproti výše uvedeným ztrátám, které mohou při záměně odrůdy nastat, 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 150 Kč/vzorek. Náklady na multiplexní PCR a fragmentační analýzy lze vyčíslit pro 17 SSR markerů na přibližně 300 Kč, a to za předpokladu provedení analýzy ve výše uvedeném multiplexním uspořádání. K ceně je potřeba připočítat i náklady na současnou analýzu laboratorních kontrol a provoz kapilárního genetického analyzátoru. Pokud laboratoř nevlastní kapilární genetický analyzátor, může za úplatu v řádu stovek Kč využít služeb provedení 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 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 výsledná 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](#)
- Elzebroek, T., Wind, K. (2008). Guide to cultivated plants. CABI. ISBN 978-1-84593-356-2
- Evans, K.M., Fernández-Fernández, F., Govan, C. (2009) Harmonising fingerprinting protocols to allow comparisons between germplasm collections – Pyrus. *Acta Horticulturae* 814, 103–106. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2009.814.14>
- Evans, K.M., Fernández-Fernández, F., Bassil, N., Nyberg, A. & Postman, J. (2015). Comparison of accessions from the uk and us national pear germplasm collections with a standardized set of microsatellite markers. *Acta Horticulturae* 1094, 41-46. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2015.1094.2>
- Fischer, M. (2009) Pear breeding. In: Breeding Plantation TreeCrops: Temperate Species (Jain, S.M. and Priyadarshan, P.M., eds), str. 135–160, Springer. DOI 10.1007/978-0-387-71203-1
- Gianfranceschi, L., Seglias, N., Tarchini, R., Komjanc, M., & Gessler, C. (1998) Simple sequence repeats for the genetic analysis of apple. *Theoretical and Applied Genetics* 96(8), 1069–1076. <https://doi.org/10.1007/s001220050846>
- 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>
- Green RL, Lagacé RE, Oldroyd NJ, et al. (2013) Developmental validation of the AmpFℓSTR® 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)
- Li, J., Zhang, M., Li, X., et al. (2022). Pear genetics: Recent advances, new prospects, and a roadmap for the future. *Horticulture Research*, 9, uhab040. <https://doi.org/10.1093/hr/uhab040>
- 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)

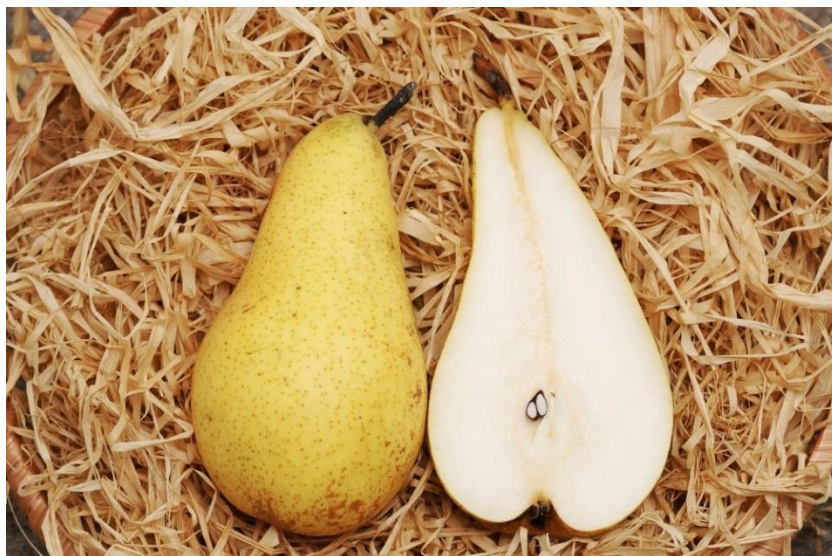
- Nishitani, C., Terakami, S., Sawamura, Y., Takada, N., Yamamoto, T. (2009). Development of novel EST-SSR markers derived from Japanese pear (*Pyrus pyrifolia*). *Breeding Science*, 59(4), 391–400. <https://doi.org/10.1270/jsbbs.59.391>
- Pavlenko, A., Pikunova, A., Dolzhikova, M., Dolmatov, E. (2022). Using microsatellite markers to study the pear (*Pyrus*) germplasm from the VNIISPK collection. *BIO Web of Conferences* 47, 03001. <https://doi.org/10.1051/bioconf/20224703001>
- Queiroz, Á., Bagoin Guimarães, J., Sánchez, C., et al. (2019) Genetic diversity and structure of the Portuguese pear (*Pyrus communis* L.) germplasm. *Sustainability*, 11(19), 5340. <https://doi.org/10.3390/su11195340>
- Sehic, J., Garkava-Gustavsson, L., Fernández-Fernández, F., Nybom, H. (2012) Genetic diversity in a collection of European pear (*Pyrus communis*) cultivars determined with SSR markers chosen by ECPGR. *Scientia Horticulturae* 145, 39–45. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2012.07.023>
- Silva GJ, Souza TM, Barbieri RL, Costa de Oliveira A (2014) Origin, Domestication, and Dispersing of Pear (*Pyrus* spp.). *Advances in Agriculture*, 541097. <https://doi.org/10.1155/2014/541097>
- Testolin, R., Messina, R., Cipriani, G., De Mori, G. (2022) SSR-based DNA fingerprinting of fruit crops. *Crop Science*, 63(2), 390–459. <https://doi.org/10.1002/csc2.20896>
- Urrestarazu, J., Royo, J. B., Santesteban, L. G., Miranda, C. (2015) Evaluating the influence of the microsatellite marker set on the genetic structure inferred in *Pyrus communis* L. *PLoS ONE* 10(9), e0138417. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138417>
- Yamamoto, T., Kimura, T., Shoda, M., et al. (2002). Genetic linkage maps constructed by using an interspecific cross between Japanese and European pears. *Theoretical and Applied Genetics* 106(1), 9–18. <https://doi.org/10.1007/s00122-002-0966-5>
- Zurn, J., Nyberg, A., Montanari, S., Postman, J., Neale, D. & Bassil, N. (2020). A new SSR fingerprinting set and its comparison to existing SSR-and SNP-based genotyping platforms to manage *Pyrus* germplasm resources. *Tree Genetics & Genomes*. 16. 72. [10.1007/s11295-020-01467-7](https://doi.org/10.1007/s11295-020-01467-7)

8 SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE

- Nekvindová, V., Žďárská, I., Suran, P., Krška, B., Čmejlová, J. (2021) Metodika identifikace odrůd meruňky obecné (*Prunus armeniaca* L.) pomocí SSR markerů. Certifikovaná metodika. [Zdroj](#)
- Pluhařová, K., Čmejlová, J., Krška, B., Voráček, P., Čmejla, R. (2023) Genotypizace jabloně domácí (*Malus × domestica* Borkh.) pomocí SSR markerů v praxi. Certifikovaná metodika. [Zdroj](#)
- Pluhařová, K., Čmejla, R., Krška, B., Voráček, P., Čmejlová, J. (2024) Genotypizace švestky domácí (*Prunus domestica* L.) pomocí SSR markerů v praxi. Certifikovaná metodika. [Zdroj](#)

PŘÍLOHA – CHARAKTERISTIKA REFERENČNÍCH ODRŮD

'AMFORA'



- Typ růstu stromu:** Střední růst, tvoří mírně rozložené koruny. Dobře obrůstá krátkým plodonosným dřevem.
- Doba kvetení:** Středně raná.
- Zralost:** Sklízí se začátkem října, dozrává do poloviny listopadu, vydrží do prosince, v chladírně do února.
- Plodnost:** Raná, pravidelná, spolehlivá.
- Plod:** Středně velký až velký, protáhlý, kuželovitého tvaru, základní barva zelená, která přechází do žluté. Chuť je sladká. Dužnina je bílo-žlutá, křehká, šťavnatá.
- Odolnost k chorobám:** K nízkým teplotám je odolná, ke strupovitosti je rovněž velmi odolná.
- Poznámka:** Středně náročná odrůda na polohu i půdu, dává dobré výsledky tržně kvalitních plodů v teplých i středních polohách.

Alely odrůdy 'Amfora'

SSR Mark er	CH02b03b _a	CH05d 03	CH05a05 _a	NZ05g8 _a	NB106a _a	CH01h10 _a	CH04e05 _a	CH02d11 _a	CH02f06 _a	CH05c 06	GD96 _a	CH01d09 _a	CH05e06 _a	NB105a _a	NB109a _a	TsuENH003 _a	NH021a _a
Alely	81	180	346	243	454	96	175	275	372	86	166	294	347	110	223	324	428
	90	194	348	243	467	102	175	275	401	96	180	300	359	144	229	344	449



'BOHEMICA'



- Typ růstu stromu:** Středně bujný, později slabší.
Doba kvetení: Středně raná.
Zralost: Sklizňová od poloviny října, konzumní od ledna, vydrží do května.
Plodnost: Raná, vysoká, pravidelná.
Plod: Střední, vydutě lahvicovitý tvar, slabě nesouměrný, základní barva zelenožlutá. Dužnina je žlutobílá, jemné konzistence, středně šťavnatá, sladká.
Odolnost k chorobám: Odolná ke strupovitosti a k nízkým teplotám, rezistentní ke spále růžokvětých.
Poznámka: Pro pěstování jí vyhovují především teplejší polohy, ale i střední a vyšší polohy s výživnými půdami.

Alely odrůdy 'Bohemica'

SSR Mark er	CH02b03b _a	CH05d 03	CH05a05 _a	NZ05g8 _a	NB106a _a	CH01h10 _a	CH04e05 _a	CH02d11 _a	CH02f06 _a	CH05c 06	GD96_ a	CH01d09 _a	CH05e06 _a	NB105a _a	NB109a _a	TsuENH003 _a	NH021a _a
Alely	92	164	346	243	467	100	175	269	382	86	164	296	345	110	223	322	441
	98	194	348	249	470	100	191	275	385	86	164	296	393	144	232	324	442



'BOSCOVA LAHVICE'



- Typ růstu stromu:** Středně bujný až bujný.
- Doba kvetení:** Středně pozdní.
- Zralost:** Od poloviny září do konce září, konzumně zraje začátkem října, skladovatelnost do konce října.
- Plodnost:** Středně pozdní, vysoká, pravidelná.
- Plod:** Velký, dlouhý, lahvicovitý tvar, základní barva žlutá bez krycí barvy s jemnou rzivostí. Dužnina je žlutobílá, jemné máslovité konzistence, středně šťavnatá, velmi sladce navinulá, dobrá.
- Odolnost k chorobám:** Citlivá k napadení strupovitostí, k nízkým teplotám a vlhkému stanovišti.
- Poznámka:** Vhodná do středních a teplých poloh, afinita s kdouloněmi není dobrá.

Alely odrůdy 'Boscova lahvice'

SSR Mark er	CH02b03b _a	CH05d 03	CH05a05 _a	NZ05g8 _a	NB106a _a	CH01h10 _a	CH04e05 _a	CH02d11 _a	CH02f06 _a	CH05c 06	GD96 a	CH01d09 _a	CH05e06 _a	NB105a _a	NB109a _a	TsuENH003 _a	NH021a _a
Alely	90	156	348	243	460	85	187	259	362	86	168	275	353	123	223	344	449
	102	172	348	245	462	111	193	275	372	86	187	296	359	146	261	344	449

'CLAPPOVA'



- Typ růstu stromu:** Slabý až středně bujný, plodí na krátkém dřevě ve shlucích.
- Doba kvetení:** Středně pozdní.
- Zralost:** Druhá polovina srpna, konzumně začátkem září.
- Plodnost:** Raná, vysoká, pravidelná.
- Plod:** Středně velký, kuželovitý, pravidelný tvar, základní barva zelenožlutá se středně výrazným červeným žíháním. Dužnina je žlutobílá, jemné konzistence, měkká, sladká, šťavnatá, aromatická, dobrá.
- Odolnost k chorobám:** Citlivá k napadení strupovitostí.
- Poznámka:** Vhodná do teplých a středních pěstitelských oblastí, na pěstování nenáročná odrůda.

Alely odrůdy 'Clappova'

SSR Mark er	CH02b03b _a	CH05d 03	CH05a05 _a	NZ05g8 _a	NB106a _a	CH01h10 _a	CH04e05 _a	CH02d11 _a	CH02f06 _a	CH05c 06	GD96 _a	CH01d09 _a	CH05e06 _a	NB105a _a	NB109a _a	TsuENH003 _a	NH021a _a
Alely	81	156	346	249	454	100	175	269	362	90	168	279	353	123	255	322	442
	96	194	346	249	467	107	193	275	401	90	180	300	384	144	261	328	449



'DICOLOR'



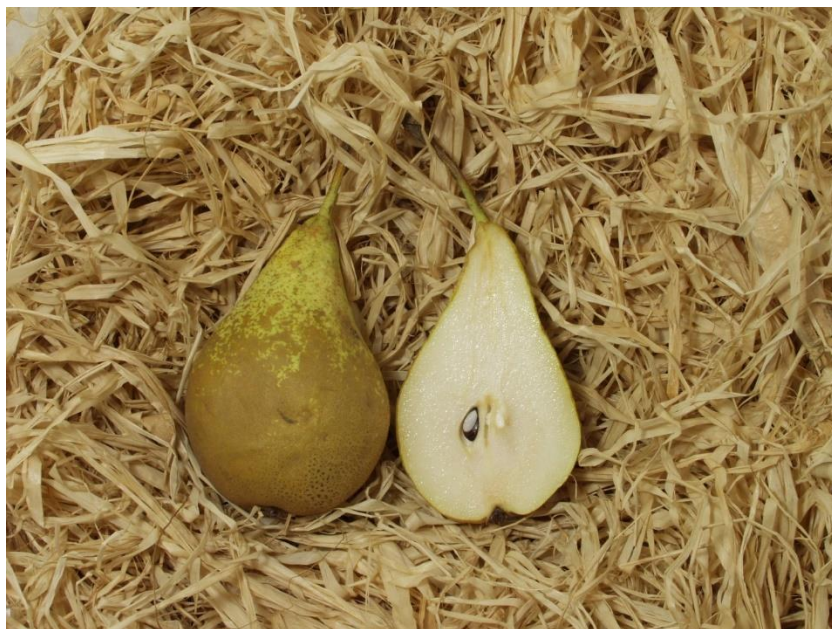
- Typ růstu stromu:** Středně bujný, později slabý. Plodí na krátkém dřevě.
- Doba kvetení:** Pozdní.
- Zralost:** Začátkem října, konzumní v listopadu, vydrží do února.
- Plodnost:** Raná, vysoká, pravidelná.
- Plod:** Středně velký, kuželovitého souměrného tvaru, základní barva žlutá, krycí červené líčko na polovině povrchu plodů. Dužnina je bílá, jemné konzistence, středně šťavnatá, velmi sladká, aromatická, dobrá.
- Odolnost k chorobám:** Vysoká odolnost proti napadení strupovitostí.
- Poznámka:** Odolná vůči zimním mrazům, vhodná do všech oblastí, na pěstování středně až méně náročná odrůda.

Alely odrůdy 'Dicolor'

SSR Marker	CH02b03b _a	CH05d 03	CH05a05 _a	NZ05g8 _a	NB106a _a	CH01h10 _a	CH04e05 _a	CH02d11 _a	CH02f06 _a	CH05c 06	GD96_ a	CH01d09 _a	CH05e06 _a	NB105a _a	NB109a _a	TsuENH003 _a	NH021a _a
Alely	81	162	334	243	467	100	191	269	382	86	164	282	345	110	229	322	449
	92	194	346	245	470	107	195	275	385	90	187	296	366	144	232	346	461



'KONFERENCE'



- Typ růstu stromu:** Středně bujný až slabý. Plodí na krátkém dřevě ve shlucích.
- Doba kvetení:** Středně pozdní.
- Zralost:** Druhá polovina září až konec září, konzumní v říjnu, vydrží do počátku až poloviny listopadu, v chladničce 4 měsíce.
- Plodnost:** Středně pozdní, vysoká, pravidelná.
- Plod:** Střední až velký, rovný kuželovitý tvar, základní barva zelenožlutá, krycí barva chybí. Dužnina je bílá, jemné konzistence, středně šťavnatá, sladká, dobrá.
- Odolnost k chorobám:** Vysoká odolnost proti napadení strupovitostí.
- Poznámka:** Středně odolná vůči mrazům ve dřevě, středně až méně odolná k jarním mrazíkům, vhodná do všech oblastí pěstování, odrůda k mezištepování na kdouloňové podnože.

Alely odrůdy 'Konference'

SSR Marker	CH02b03b _a	CH05d 03	CH05a05 _a	NZ05g8 _a	NB106a _a	CH01h10 _a	CH04e05 _a	CH02d11 _a	CH02f06 _a	CH05c 06	GD96 _a	CH01d09 _a	CH05e06 _a	NB105a _a	NB109a _a	TsuENH003 _a	NH021a _a
Alely	90	172	348	241	454	102	175	269	372	86	180	300	359	110	223	324	428
	98	194	348	243	454	109	175	275	385	96	207	300	359	137	253	344	447



'LUCASOVA'



- Typ růstu stromu:** Středně bujný až bujný, plodí na krátkém dřevě.
- Doba kvetení:** Pozdní.
- Zralost:** Polovina října, konzumní v listopadu, skladovatelná do února.
- Plodnost:** Raná, hojná, pravidelná.
- Plod:** Střední až velký, vypouklého neboli baňatého tvaru, základní barva zelenožlutá se slabým červeným líčkem. Dužnina je bílá, jemné konzistence, více šťavnatá, sladce navinulá, měkká, máslovitá.
- Odolnost k chorobám:** Citlivá k napadení strupovitostí.
- Poznámka:** Středně odolná vůči zimním mrazům, středně až méně odolná k jarním mrazíkům, vhodná do teplých a středních oblastí, na pěstování náročná odrůda, afinita s kdouloněmi je dobrá.

Alely odrůdy 'Lucasova'

SSR Mark er	CH02b03b _a	CH05d 03	CH05a05 _a	NZ05g8 _a	NB106a _a	CH01h10 _a	CH04e05 _a	CH02d11 _a	CH02f06 _a	CH05c 06	GD96 _a	CH01d09 _a	CH05e06 _a	NB105a _a	NB109a _a	TsuENH003 _a	NH021a _a
Alely	90	156	338	241	454	100	175	269	362	86	162	294	345	110	223	338	428
	102	162	344	243	460	102	191	275	382	92	180	300	393	144	229	344	447
	107		348			111	193	279	385		185				261		461



'WILLIAMSOVA'



- Typ růstu stromu:** Středně bujný až slabší.
Doba kvetení: Středně pozdní.
Zralost: Konec srpna až začátkem září, vydrží do konce září.
Plodnost: Raná, hojná, pravidelná.
Plod: Velký, baňatý, často nesouměrného tvaru, základní barva žlutá se středně výrazným červeným žíháním. Dužnina je bílá, jemné konzistence, středně šťavnatá, sladká, velmi aromatická zvláště při přezrání.
Odolnost k chorobám: Citlivá k napadení strupovitostí.
Poznámka: Středně odolná vůči zimním mrazům, odolná k jarním mrazíkům, vhodná do teplých a středních oblastí, na pěstování náročná odrůda. S podnožemi kdouloní špatně srůstá.

Alely odrůdy 'Williamsova'

SSR Mark er	CH02b03b _a	CH05d 03	CH05a05 _a	NZ05g8 _a	NB106a _a	CH01h10 _a	CH04e05 _a	CH02d11 _a	CH02f06 _a	CH05c 06	GD96 _a	CH01d09 _a	CH05e06 _a	NB105a _a	NB109a _a	TsuENH003 _a	NH021a _a
Alely	81	150	346	241	435	100	185	267	385	86	168	292	366	123	223	328	428
	102	194	348	249	454	102	193	269	401	90	185	300	384	144	261	344	449



v y d á v á

OSVĚDČENÍ

UKZUZ 182918/2025

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 hrušně obecné (*Pyrus communis* L.) pomocí SSR markerů v praxi**

Autor/autoři: Ing. Ivona Žďárská, Ph.D., 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, 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 7. 11. 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 hrušně obecné (*Pyrus communis* L.) pomocí SSR markerů v praxi

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

1. vydání, 2025

Grafická úprava obálky: ŽAKET, Praha

ISBN: 978-80-88669-04-3 (online, pdf)

DOI: <https://doi.org/10.60615/7h2d-g956>

