

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Diplomová práce**

**Olomouc 2023**

**Monika Balažíková**

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Přírodovědecká fakulta**

**Katedra buněčné biologie a genetiky**



**Mikrosatelitová identifikace vybraných kultivarů brusnice  
chocholičnaté (*Vaccinium corymbosum*)**

**Diplomová práce**

**Bc. Monika Balažiková**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

**Olomouc 2023**

**Vedoucí práce: RNDr. Petr Nádvorník, Ph.D.**

# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta  
Akademický rok: 2021/2022

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Bc. Monika BALAŽÍKOVÁ  
Osobní číslo: R210610  
Studijní program: N0511A030046 Molekulární a buněčná biologie  
Téma práce: Mikrosatelitová identifikace vybraných kultivarů brusnice chocholičnaté (*Vaccinium corymbosum*).  
Zadávající katedra: Katedra buněčné biologie a genetiky

### Zásady pro vypracování

1. Shromáždění dostupných literárních zdrojů.
2. Vypracování rešerše na téma diplomové práce –brusnice chocholičnatá a její kultivary, odlišení kultivarů molekulárními technikami s důrazem na mikrosatelity.
3. PCR amplifikace mikrosatelitových lokusů na DNA vybraných kultivarů brusnice chocholičnaté a výběr vhodných mikrosatelitů pro potvrzení identity těchto kultivarů.

Rozsah pracovní zprávy:  
Rozsah grafických prací:  
Forma zpracování diplomové práce: tištěná

### Seznam doporučené literatury:

1. Rowland, L.J., Mehra, S., Dhanaraj, A.L., Ogden, E.L., Slovin, J.P. (2003): Development of EST-PCR markers for DNA fingerprinting and genetic relationship studies in blueberry (*Vaccinium* section *Cyanococcus*). *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 128: 682–690.
2. Boches, P., Bassil, N.V., Rowland, L. (2005): Microsatellite markers for *Vaccinium* from EST and genomic libraries. *Molecular Ecology Notes*, 5: 657–660.
3. Bassil, N.V. (2012): Microsatellite Markers: Valuable in *Vaccinium* L. *International Journal of Fruit Science*, 12: 288–293.
4. Akagi, I., Hirahara, T., Kunitake, K., Osada, R., Sugita, W., Utoyama, H. (2010): Method for discriminating blueberry cultivar. Patent JP2010094070A.
5. Bian, Y., Ballington, J., Raja, A., Brouwer, C., Reid, R., Burke, M., Wang, X., Rowland, L.J., Bassil, N., Brown, A. (2014): Patterns of simple sequence repeats in cultivated blueberries (*Vaccinium* section *Cyanococcus* spp.) and their use in revealing genetic diversity and population structure. *Molecular Breeding*, 34: 675–689.
6. Basil, N., Bidani, A., Hummer, K., Rowland, L.J., Olmstead, J., Lyrene, P., Richards, C. (2018): Assessing genetic diversity of wild southeastern North American *Vaccinium* species using microsatellite markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 65: 939–950.
7. Basil, N., Bidani, A., Nyberg, A., Hummer, K., Rowland, L.J. (2020): Microsatellite markers confirm identity of blueberry (*Vaccinium* spp.) plants in the USDA-ARS National Clonal Germplasm Repository collection. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 67: 393–409.

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Petr Nádvořík, Ph.D.  
Katedra buněčné biologie a genetiky

Datum zadání diplomové práce: 4. listopadu 2021  
Termín odevzdání diplomové práce: 31. července 2023

L.S.

---

doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.  
děkan

---

prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.  
vedoucí katedry

V Olomouci dne 4. listopadu 2021

## **Bibliografické údaje**

**Jméno a příjmení autora:** Bc. Monika Balažíková

**Název práce:** Mikrosatelitová identifikace vybraných kultivarů brusnice chocholičnaté (*Vaccinium corymbosum*)

**Typ práce:** Diplomová

**Pracoviště:** Katedra buněčné biologie a genetiky, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci

**Vedoucí práce:** RNDr. Petr Nádvorník, Ph.D.

**Rok obhajoby práce:** 2023

### **Souhrn:**

V mé diplomové práci jsem se věnovala mikrosatelitním markerům, které slouží pro identifikaci kultivarů brusnice chocholičnaté (*Vaccinium corymbosum*) a jejich kříženců.

V teoretické části mé práce jsem se zabývala rodem *Vaccinium* se zaměřením na druh brusnice chocholičnatá a její kultivary. Dále jsem se věnovala charakteristice systémů mikrosatelitních markerů pro identifikaci kultivarů brusnice chocholičnaté.

V experimentální části jsem se zabývala 2 mikrosatelitními systémy pro identifikaci kultivarů brusnice chocholičnaté. Jeden systém obsahuje 9 polymorfních mikrosatelitních lokusů a druhý systém zahrnuje 11 polymorfních mikrosatelitních lokusů. Oba systémy byly již jejich autory testovány a podle nich přinášely spolehlivě hodnotitelné produkty bez artefaktů. Po mém testování jsem vybrala 7 mikrosatelitů, které měly dobře hodnotitelné produkty. Testovala jsem DNA celkem 53 rostlin, mělo se jednat o 32 různých kultivarů brusnice chocholičnaté a jejich kříženců. Díky známým genotypům vybraných 7 mikrosatelitních lokusů se mi povedlo určit kultivary brusnice chocholičnaté celkem u 36 testovaných rostlin. Pouze u 22 rostlin jsem však ověřila, že původní název kultivaru opravdu odpovídá jeho genetickému profilu.

**Klíčová slova:** brusnice chocholičnatá, *Vaccinium corymbosum*, kultivar, mikrosatelit, DNA, PCR amplifikace, genetické markery

**Počet stran:** 65

**Počet příloh:** 0

**Jazyk:** Český

## **Bibliographical identification**

**Author's first name and surname:** Bc. Monika Balažiková

**Title:** Microsatellite identification of selected cultivars of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum*)

**Type of thesis:** Master's

**Department:** Department of Cell Biology and Genetics, Faculty of Science, Palacký University, Olomouc

**Supervisor:** RNDr. Petr Nádvorník, Ph.D.

**The year of presentation:** 2023

### **Summary:**

In my Master's thesis, I focused on microsatellite markers, which are used for the identification of highbush blueberry cultivars.

The theoretical part of this thesis, it is focused on the genus *Vaccinium*. There are based mainly on cultivars of specie *Vaccinium corymbosum*. It is also focused on characteristics of microsatellite marker systems for the identification of highbush blueberry cultivars.

In the experimental part of the thesis, it is based on two microsatellite systems which are used for the identification of highbush blueberry cultivars. One of them includes nine polymorphic microsatellite loci and the second one includes eleven polymorphic microsatellite loci. I have selected seven microsatellites which offered useful PCR product without artifacts. I have tested DNA of 53 plants which should have included 32 cultivars of highbush blueberries. I determined cultivars of highbush blueberries in 36 of tested plants. However, I have discovered that only 22 of tested plants correspond with their genetic profile.

**Keywords:** highbush blueberry, *Vaccinium corymbosum*, cultivar, microsatellite, DNA, PCR amplification, genetic markers

**Number of pages:** 65

**Number of appendices:** 0

**Language:** Czech

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením RNDr. Petra Nádvorníka, Ph.D. s použitím uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci dne 31. 7. 2023

Monika Balažiková

Srdečně děkuji vedoucímu mé diplomové práce RNDr. Petru Nádvorníkovi, Ph.D. za jeho vstřícnost, trpělivost, rady, poskytnuté materiály a odborné vedení po celou dobu zpracovávání teoretické a experimentální části mé diplomové práce. A ráda bych také poděkovala své rodině a přátelům za podporu během celého studia.



## **Obsah**

<b>1 Úvod .....</b>	<b>1</b>
<b>2 Cíle práce .....</b>	<b>2</b>
<b>3 Literární přehled.....</b>	<b>3</b>
3.1 Rod Vaccinium.....	3
3.1.1 Brusnice chocholičnatá.....	5
3.1.2 Vybrané kultivary brusnice chocholičnaté .....	7
3.2 Mikrosatelity .....	9
3.2.1 Využití mikrosatelitů .....	11
3.3 Systémy pro identifikaci kultivarů brusnice chocholičnaté .....	12
3.3.1 Mikrosatelitní systémy pro identifikaci kultivarů highbush blueberries .....	13
<b>4 Materiál a metody .....</b>	<b>20</b>
4.1 Biologický materiál.....	20
4.2 Seznam použitých chemikálií .....	20
4.3 Seznam použitých roztoků a jejich příprava .....	21
4.4 Seznam použitých laboratorních přístrojů .....	24
4.5 Izolace DNA.....	24
4.6 PCR amplifikace DNA kultivarů brusnice chocholičnaté .....	26
4.7 Amplifikované mikrosatelitní lokusy na DNA kultivarů brusnice chocholičnaté .....	27
4.8 Elektroforetická separace PCR produktů .....	27
<b>5 Výsledky.....</b>	<b>31</b>
<b>6 Diskuze.....</b>	<b>41</b>
<b>7 Závěr .....</b>	<b>47</b>
<b>8 Literatura .....</b>	<b>48</b>
<b>9 Patenty .....</b>	<b>54</b>

## **Seznam obrázků**

**Obrázek 1:** Kvetoucí keř brusnice chocholičnaté (odrůda 'Patriot') (Foto: Daderot).

**Obrázek 2:** Plod brusnice chocholičnaté (Foto: Darkone).

**Obrázek 3:** Elektroforeticky separované produkty PCR amplifikace mikrosatelitního lokusu CA169.

**Obrázek 4:** Elektroforeticky separované produkty PCR amplifikace mikrosatelitního lokusu NA398.

**Obrázek 5:** Elektroforeticky separované produkty PCR amplifikace mikrosatelitního lokusu NA961.

**Obrázek 6:** Brusnice chocholičnatá odrůda 'Reka' v obchodním řetězci OBI (Foto: autorka).

**Obrázek 7:** Brusnice chocholičnatá odrůda 'Pink Berry' v obchodním řetězci OBI (Foto: autorka).

## Seznam tabulek

**Tabulka 1:** Vybrané sekce a druhy rodu *Vaccinium* (Vander Kloet, 1983; upraveno podle Song *et* Hancock, 2011; Retamales *et* Hancock, 2012).

**Tabulka 2:** Charakteristika 9 mikrosatelitních lokusů, které Boches (2005) navrhl jako nejvhodnější pro určení genotypů kultivarů především brusnice chocholičnaté.

**Tabulka 3:** Charakteristika 11 polymorfních mikrosatelitních lokusů, které Akagi *et al.* (2010) použili k identifikaci kultivarů především highbush blueberries.

**Tabulka 4:** Charakteristika 12 mikrosatelitních markerů vybraných k identifikaci kultivarů highbush blueberries (především brusnice chocholičnaté).

**Tabulka 5:** Složení PCR reakční směsi pro 6 a 53 vzorků.

**Tabulka 6:** Teplotní a časový profil PCR reakce.

**Tabulka 7:** Mikrosatelitní markery amplifikované pomocí metody PCR na DNA celkem 53 vzorků pocházejících z listů nebo pupenů kultivarů brusnice chocholičnaté a jejich kříženců.

**Tabulka 8:** Seznam kultivarů z jejichž rostlinného materiálu jsem izolovala DNA a koncentrace této DNA v jednotlivých vzorcích.

**Tabulka 9:** 20 mikrosatelitních lokusů, čas elektroforetické separace a teploty *annealingu*.

**Tabulka 10:** Mnou zjištěné genotypy (tedy velikosti alel v bp) 7 mikrosatelitních lokusů u 22 kultivarů brusnice chocholičnaté, které se ve většině případů shodují s genotypy těchto kultivarů, které uvádí Boches (2005).

**Tabulka 11:** Zjištěné genotypy 7 mikrosatelitních lokusů u 14 špatně kultivarově určených jedinců druhu brusnice chocholičnaté.

**Tabulka 12:** 7 kultivarů vykazujících odlišnosti mezi mnou experimentálně zjištěnými genotypy a genotypy, které uvádí Boches (2005).

# 1 Úvod

Brusnice chocholičnatá (*Vaccinium corymbosum*) patří do čeledi vřesovcovitých (Ericaceae), rodu *Vaccinium* a sekce *Cyanococcus*. Pěstitelé je nazývají kanadskou borůvkou a je velmi oblíbená kvůli svým plodům nazývaným borůvky. Tyto plody se využívají v potravinářství a mají také potenciál pro farmakologii, protože obsahují řadu účinných látek s pozitivními účinky na lidské zdraví. Jejich antioxidační kapacita je jedna z nejvyšších mezi čerstvým ovocem a zeleninou.

Existuje spousta kultivarů brusnice chocholičnaté a mimo jiné se k jejich identifikaci využívají mikrosatelitní markery. Existuje několik systémů na odlišení kultivarů brusnice chocholičnaté a jejich mezidruhových kříženců za použití mikrosatelitních markerů. Každý systém obsahuje polymorfní mikrosatelitní lokusy, které by měly přinášet dobře hodnotitelný produkt bez artefaktů, aby byla možná snadná identifikace kultivarů.

Tato práce by měla otestovat oba mikrosatelitní systémy na několika desítkách kultivarů brusnice chocholičnaté a jejich kříženců, které jsou běžně dostupné v prodejní síti v ČR.

## **2 Cíle práce**

1. Shromáždění dostupných literárních zdrojů.
2. Vypracování rešerše na téma diplomové práce - brusnice chocholičnatá a její kultivary, odlišení kultivarů molekulárními technikami s důrazem na mikrosatelity.
3. PCR amplifikace mikrosatelitových lokusů na DNA vybraných kultivarů brusnice chocholičnaté a výběr vhodných mikrosatelitů pro potvrzení identity těchto kultivarů.

## 3 Literární přehled

### 3.1 Rod *Vaccinium*

Rod *Vaccinium* (neboli brusnice - což ale není jednotné rodové jméno, existují totiž například i druhy tohoto rodu s českým rodovým jménem vlochyně a klikva) patří do čeledi Ericaceae (vřesovcovité), je to čeleď dvouděložných rostlin zahrnující byliny i dřeviny. Do rodu *Vaccinium* však patří jen keře a tento rod zahrnuje přibližně 450 druhů rozšířených hlavně na severní polokouli (Song *et* Hancock, 2011).

Rod *Vaccinium* obsahuje několik hospodářsky významných druhů pro potravinářství a potenciál je také pro farmakologii, plody totiž obsahují řadu účinných látek příznivě působících na lidské zdraví. Nejvýznamnější sekce a druhy rodu *Vaccinium* jsou uvedeny v tabulce 1.

**Tabulka 1:** Vybrané sekce a druhy rodu *Vaccinium* (Vander Kloet, 1983; upraveno podle Song *et* Hancock, 2011; Retamales *et* Hancock, 2012).

Sekce	Druh	Český název	Ploidie (x = 12)
Cyanococcus	<i>V. angustifolium</i> Ait.	Brusnice úzkolistá	4x
	<i>V. ashei</i> Reade (syn. <i>V. virgatum</i> Ait.)	Brusnice prutovitá	6x
	<i>V. constablaei</i> Gray	Brusnice Constableova	6x
	<i>V. corymbosum</i> L.	Brusnice chocholičnatá	2x, 4x
	<i>V. darrowii</i> Camp	Brusnice Darrowova	2x
	<i>V. fuscatum</i> Ait.		2x
	<i>V. pallidum</i> Ait.		2x, 4x
	<i>V. myrsinites</i> L.		4x
	<i>V. myrtilloides</i> Michx.		2x
	<i>V. tenellum</i> Ait.		2x
	<i>V. elliotii</i> Chapm.	Brusnice Elliottova	2x
Myrtillus	<i>V. myrtillus</i> L.	Brusnice borůvka	2x
Oxycoccus	<i>V. oxycoccus</i> L.	Klikva bahenní	2x, 4x, 5x, 6x
	<i>V. macrocarpon</i> Ait.	Brusnice (klikva) velkoplodá	2x
<i>Vaccinium</i>	<i>V. uliginosum</i> L.	Vlochyně bahenní	2x, 4x, 6x
<i>Vitis-Idaea</i>	<i>V. vitis-idaea</i> L.	Brusnice brusinka	2x

V anglofonních zemích se v pěstitelské typologii rozlišuje 6 hlavních hospodářsky významných skupin. Z toho 2 skupiny jsou cranberries (*V. macrocarpon* neboli klikva velkoplodá) a lingonberries (*V. vitis-idaea* neboli brusnice brusinka) (Song *et* Hancock, 2011), což jsou keře menšího vzrůstu (do cca 15 cm) s červenými plody, těmi se však tato práce zabývat nebude (Polashock *et* Vorsa, 2002). Zde jsou popsány 4 zbývající hospodářsky významné skupiny, do kterých patří z většiny druhy s vyšším vzrůstem (do cca 3 m) původem ze Severní Ameriky, a to (Brevis *et al.*, 2008; Bassil *et al.*, 2020):

- Highbush blueberries - ty se dále dělí na southern highbush blueberries (SH) a northern highbush blueberries (NH), je to skupina, kterou tvoří především kultivary druhu *V. corymbosum*, u southern highbush blueberries jsou kultivary obvykle přikříženy s *V. darrowii*.
- Rabbiteye blueberries (RE) - jsou to kultivary pocházející z hexaploidního druhu *V. virgatum* (také nazývaného *V. ashei*), které byly nalezeny ve volné přírodě či vyšlechtěny.
- Lowbush blueberries (LW) - kultivary tetraploidního druhu *V. angustifolium*, v některé literatuře zahrnuje také kultivary diploidního druhu *V. myrtillus* (Bassil *et al.*, 2020) a diploidního druhu *V. myrtilloides* (Song *et* Hancock, 2011). Kultivary byly získány nejčastěji výběrem vhodných rostlin z rostlin vyskytujících se ve volné přírodě.
- Half-high blueberries (HH) - hybridní kultivary vzniklé křížením northern highbush blueberries a lowbush blueberries.

Druhy patřící do sekce *Cyanococcus* se přirozeně vyskytují pouze ve východní, severní a střední části Severní Ameriky (Song *et* Hancock, 2011). Kultivary z northern highbush blueberries, southern highbush blueberries a rabbiteye blueberries byly domestikovány jako první rostliny z rodu *Vaccinium*, a to ve Spojených státech amerických (Bassil *et al.*, 2020).

Nejvýznamnějšími v rámci komerční produkce i hobby zahradnictví jsou kultivary brusnice chocholičnaté (Paprštein *et al.*, 2009; Song *et* Hancock, 2011). Severní Amerika (Spojené státy americké a Kanada) zůstává hlavním světovým pěstitelům brusnice chocholičnaté, a tedy i producentem plodů, ale produkce v Jižní Americe (Chile a Argentina), v Evropě, Austrálii a na Novém Zélandě také není zanedbatelná a stále roste (Galletta *et* Ballington, 1996; Rowland *et al.*, 2011).

### 3.1.1 Brusnice chocholičnatá

Brusnice chocholičnatá (*Vaccinium corymbosum*), pěstители nazývána kanadskou borůvkou, je keř patřící do rodu *Vaccinium* sekce *Cyanococcus* (obrázek 1). Ať už pod českým názvem kanadská borůvka či pod anglofonním názvem highbush blueberry existují i kultivary nejen čistě druhu *V. corymbosum*, ale také například kultivary, kde jsou k základnímu druhu přikřížené druhy jiné, jako například *V. angustifolium*. Problém je v nejednotnosti pojmenování, autoři odborné literatury se mnohdy v používání jednotlivých názvů, jako i například highbush blueberry, rozcházejí. (Butkus *et* Pliszka, 1993; Danihelka, 2012; Ulloa, 2017).

Keře brusnice chocholičnaté dorůstají výšky 1,5–3 m. Plody jsou kulovité bobule velikosti 0,4–1,2 cm nejčastěji modré barvy nazývané borůvky (obrázek 2) (Hejný *et al.*, 1990; Bärtels, 2011). Oblíbené jsou díky své chuti a příznivým účinkům na lidské zdraví.



**Obrázek 1:** Kvetoucí keř brusnice chocholičnaté (odrůda 'Patriot') (Foto: Daderot).





**Obrázek 2:** Plod brusnice chocholičnaté (Foto: Darkone).

Borůvky obsahují vlákninu, vitamín C, vitamín E, vitamín K, hořčík a polyfenolické látky. Mají vysokou antioxidační kapacitu díky obsahu právě zmíněných vitamínů C a E a polyfenolickým sloučeninám (Skupień, 2006; Wu *et al.*, 2018). Antioxidační kapacita borůvek stejně jako celkový obsah polyfenolických látek se však během doby zrání snižuje (Casterejón *et al.*, 2008).

Konkrétně borůvky fungují například jako prevence proti ateroskleróze, protože snižují oxidační stres s regulují akumulaci cholesterolu a hospodaření s ním (Rimando *et al.*, 2004; Neto, 2007; Wu *et al.*, 2018). Dalším příznivým účinkem borůvek je, že dovedou inhibovat bakterii *Staphylococcus aureus*. Jedním z patogenů nejčastěji způsobujícím nozokomiální infekce je právě *S. aureus*, který může také způsobovat otravy z tepelně neupraveného jídla. Obvykle se pro léčbu infekcí vyvolaných bakteriemi druhu *S. aureus* využívají antibiotika, nejčastěji meticilin. Inhibiční testy byly provedeny na kmenech rezistentních na antibiotikum meticilin (MRSA) i na kmenech bakterií bez rezistence. Extrakty z borůvek dokázaly inhibovat všechny testované kmeny bakterie *S. aureus* (Silva *et al.*, 2015). Borůvky jsou také velmi účinné při léčbě průjmu. Mezi nejčastější původce průjmu patří *Escherichia coli* a *Klebsiella pneumoniae*. Studie prováděné na vysoce adherentních kmenech těchto bakterií schopných vytvářet biofilmy potvrdily, že extrakty z borůvek mají antiadhezivní a antibiofilmovou aktivitu, nejspíše díky tomu, že některé látky z extraktu jsou schopny inhibovat životně důležité enzymy bakterií (Gupta *et al.*, 2007; Howell *et al.*, 2010; Gato *et al.*, 2020; Sahoo *et al.*, 2020).

### 3.1.2 Vybrané kultivary brusnice chocholičnaté

Začátkem 20. století se začaly domestikovat první odrůdy northern highbush blueberries, southern highbush blueberries a rabbiteye blueberries. Původně šlo o výběr vhodných rostlin v přírodě, ty byly přesazeny do pěstitelských zařízení, kde mohly být otestovány a osvědčený rostlinný materiál byl dále rozmnožován, případně křížen s dalším vhodným rostlinným materiálem. Toto byl prvotní způsob zakládání nových kultivarů jednotlivých druhů ve Spojených státech amerických, konkrétně například v New Hampshire, New Jersey a na Floridě (Song *et* Hancock, 2011; Bassil *et al.*, 2020).

Množení kultivarů se provádí vegetativně nebo generativně. Generativní způsob rozmnožování se používá výhradně při šlechtění nových odrůd. Vegetativní způsob rozmnožování se provádí prostřednictvím bylinných řízků (bylinný řízek je výhon rostliny odebrán i s tzv. patkou, což je část staršího dřeva). Často se také používají *in vitro* kultury, kdy se používají dormantní výhony, které musí být odebrány v období dormance (leden až březen). Spodní část výhonu se uřízne a vloží do nádoby s vodou, kde se nechá rašit. Z vrcholových a postranních pupenů se vypreparují vrcholy (není vhodné ale použít pupeny výlučně květů, protože ty obsahují především základ květů), z těchto buněk se pak založí *in vitro* kultury (Paprštein *et al.*, 2009; Retamales *et* Hancock, 2012).

Zde jsou uvedeny některé z nejprodávanějších a nejčastěji pěstovaných kultivarů brusnice chocholičnaté:

Odrůda 'Aurora' je patentovaná odrůda pod číslem USPP15185P3 řazená dle pěstitelů k northern highbush blueberries (dále jen NH). Vznikla křížením mateřské rostliny odrůdy 'Brigitta Blue' a otcovské rostliny odrůdy 'Elliott' (Boches, 2005). Jedná se o pozdně zrající odrůdu, zraje koncem srpna až začátkem září. Plodí velmi hojně, má tedy velké výnosy a velmi kvalitní plody - 'Aurora' má lepší hodnocení chuti a pevnosti plodů, než je tomu u parentální odrůdy 'Elliott' (Hancock, 2004a).

Odrůda 'Berkeley' řadící se k NH vznikla křížením mateřské rostliny odrůdy 'Stanley' a otcovské rostliny, která vznikla křížením odrůd 'Jersey' a 'Pioneer' (Boches, 2005). Keře mohou dorůst nadprůměrných výšek a rovněž i plody jsou velké velikosti, ty jsou však v porovnání s plody ostatních odrůd náchylné k hnilobě (Strikt *et* Moore, 2014).

Odrůda 'Bluejay' vznikla křížením mateřské rostliny odrůdy 'Berkeley' a otcovské rostliny, která vznikla křížením 'Pioneer' a 'Taylor'. Dle pěstitelské typologie se řadí k NH (Boches, 2005). Rostliny tohoto kultivaru jsou velmi rychle rostoucí, středního až vysokého vzrůstu. Plody lze sklízet při menším počtu sběrů, protože vydrží na rostlině dlouho bez ztráty kvality (Strikt *et* Moore, 2014).

Odrůda 'Chandler' oblíbená NH vznikla křížením, kdy mateřská rostlina byla odrůdy 'Darrow' (Boches, 2005). Rostliny jsou pozdně zrající a v porovnání s jinými odrůdami jsou poměrně citlivé na bakterie rodu *Pseudomonas*, a to hlavně, když je vysoká vlhkost vzduchu nebo jsou časté deště (Strikt *et* Moore, 2014).

Odrůda 'Darrow' vznikla křížením, kdy otcovská rostlina byla odrůdy 'Bluecrop'. Dle pěstitelské typologie se řadí k NH (Boches, 2005). Keře jsou velmi vysokého vzrůstu a mají velké plody se sladkou, ale lehce nakyslou chutí (Strikt *et* Moore, 2014).

Odrůda 'Draper' je patentovaná odrůda pod číslem USPP15103P2, která se řadí k NH. Vznikla křížením, kdy jedním z rodičů byla rostlina odrůdy 'Duke'. Genofond odrůdy 'Draper' však obsahuje i malé (< 5%) genetické příměsi jiných druhů rodu *Vaccinium* sekce *Cyanococcus*, konkrétně *V. darrowii*, *V. ashei* a *V. tenellum* (Boches, 2005). Jedná se o raně zrající odrůdu vysokého vzrůstu, zraje koncem června nebo začátkem července. Plody jsou kvalitní a mohou se skladovat velmi dlouhou dobu (Hancock, 2004b). Mladé rostliny se musí poměrně často prořezávat, protože mají tendenci tvořit příliš mnoho nových větví (Strikt *et* Moore, 2014).

Odrůda 'Earliblue' vznikla křížením mateřské rostliny odrůdy 'Stanley' a otcovské rostliny odrůdy 'Weymouth'. Dle pěstitelské typologie se řadí k NH (Boches, 2005). Keře jsou střední velikosti. Plody dozrávají brzy, jsou středně velké až velké, odolné proti praskání (Strikt *et* Moore, 2014).

Odrůda 'Liberty' vznikla křížením mateřské rostliny odrůdy 'Brigitta Blue' a otcovské rostliny odrůdy 'Elliot'. Dle pěstitelské typologie se řadí k NH (Boches, 2005). Keře této odrůdy jsou vysokého vzrůstu a vyžadují časté prořezávání. Ve vysokých teplotách, které tomuto kultivaru nesvědčí, mohou rostliny tvořit jen velmi malé plody (Strikt *et* Moore, 2014).

Odrůda 'Meader' vznikla křížením rostliny mateřské odrůdy 'Earliblue' a otcovské rostliny odrůdy 'Bluecrop'. Dle pěstitelské typologie se řadí k NH (Boches, 2005).

Odrůda 'Northland', která je řazena k NH, vznikla křížením rostliny odrůdy 'Berkeley' a nekultivarové rostliny (Boches, 2005). Je to středně zrající odrůda, zraje

tedy v polovině července. Rostliny jsou velmi vysokého vzrůstu a plody mají sladkou chuť (Strikt *et* Moore, 2014).

Odrůda 'Olympia', která se řadí k southern highbush blueberries (SH), vznikla křížením mateřské rostliny odrůdy 'Pioneer' a otcovské rostliny odrůdy 'Harding' (Boches, 2005). Keře jsou střední velikosti se středně velkými plody výborné chuti (Strikt *et* Moore, 2014).

Odrůda 'Patriot' oblíbená NH vznikla křížením, kdy otcovská rostlina byla odrůdy 'Earliblue'. Dle pěstitelské typologie se řadí k NH (Boches, 2005). Keře jsou středního vzrůstu, odolné proti mrazu, ale oproti ostatním odrůdám poměrně citlivé na druhy bakterií rodu *Pseudomonas*, které způsobují hnědnutí listů. Plody tohoto kultivaru mají kyselou chuť (Strikt *et* Moore, 2014).

Odrůda 'Rubel' vznikla výběrem z populací nacházejících se ve volné přírodě. Dle pěstitelské typologie se řadí k NH (Boches, 2005). Je to keř malého, maximálně středního vzrůstu a má obvykle malé plody (Strikt *et* Moore, 2014).

Odrůda 'Sierra' je řazena k SH (Boches, 2005). Je to odrůda primárně brusnice chocholičnaté, ale s genetickou příměsí i jiných druhů - *V. darrowii*, *V. ashei*, *V. constablaei* a *V. angustifolium* (Song *et* Hancock, 2011).

## 3.2 Mikrosatelity

V genomech organismů existuje jedinečná DNA a opakující se, tedy repetitivní sekvence. Repetitivní sekvence jsou znásobené určité motivy DNA. Jsou to sekvence především v nekódujících oblastech a jejich význam je spojen s regulační funkcí například u transkripce, replikace či rekombinace. Repetice mohou být v tandemovém opakování (několikrát bezprostředně za sebou) nebo rozptýlené (ty jsou roztroušeny po celém genomu). Mezi rozptýlené repetice patří transpozony a retrotranspozony. Tandemově opakované, tedy VNTR (variable number of tandem repeats), se dělí dle délky opakujícího se DNA motivu na satelity, minisatelity a mikrosatelity (Ramel, 1997; Jurka *et al.*, 2007; Pospíšilová *et al.*, 2013).

Mikrosatelity, nazývané STRs (z anglického short tandem repeats) nebo také SSRs (single sequence repeats), česky krátké tandemové repetice, jsou opakující se motivy DNA. Délka těchto motivů, které tvoří mikrosatelit, je 1–6 bp (Ramel, 1997; Moxon *et* Wills, 1999; Holton, 2001; Oliveira, 2006; Kalie *et al.*, 2011; Caihua *et al.*, 2013; Madesis *et al.*, 2013). Většinou se však vyskytují motivy o délce 2–4 bp (Ramel,

1997). Obecně platí, že dinukleotidové repetitivní jednotky se vyskytují nejčastěji ze všech a je tomu tak i u člověka (v lidském genomu se vyskytují dinukleotidové repetice v průměru každých 30 kbp) (Kulh *et Caskey*, 1993). Distribuce mikrosatelitů v rostlinných genomech je různá. U *Arabidopsis thaliana* (huseníčku) tvoří 0,85 % jaderného genomu a například u *Zea mays* (kukuřice), *Triticum aestivum* (pšenice) a *Oryza sativa* (rýže) 1,5–7,5 % (Crollius *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2004; Reddy *et al.*, 2012). Tyto tandemově opakované motivy DNA jsou v genomu ohraničeny jedinečnými úseky DNA, které lze použít jako vzor pro navržení sekvence párů primerů, a ty následně slouží k PCR amplifikaci cílového mikrosatelitního lokusu (Weber *et May*, 1989). Vyhledávání mikrosatelitů a návrh primerů *de novo* je však drahý a časově náročný proces. Bohužel je však mnohdy nezbytný, protože se mikrosatelity nejčastěji nacházejí v nedódujících oblastech, kde je vyšší míra substitucí nukleotidů, z tohoto důvodu je navrhování univerzálních primerů pro více druhů problematické. Není tomu tak ale vždy, např. u ryb, želv a kytovců jsou některé mikrosatelitní lokusy ohraničeny vysoce konzervativní DNA bez substitucí nukleotidů, je tedy možné provádět *cross-species* PCR amplifikaci (Zane *et al.*, 2002; Sqierrrel *et al.*, 2003).

Mechanismus vzniku mikrosatelitů zatím není s určitostí znám, ale existují 3 nejpravděpodobnější varianty, a to nerovnoměrný crossing-over (Huang *et al.*, 2002), retroranspoziční mechanismus (Nadir *et al.*, 1996) nebo sklouznutí DNA polymerázy při replikaci (tzv. replication slippage) (Leclercq, 2010; Pospíšilová *et al.*, 2013). Sklouznutí DNA polymerázy je považováno za hlavní mutační mechanismus probíhající u mikrosatelitů (Pospíšilová *et al.*, 2013).

Expanze opakování mikrosatelitů může v lidském genomu vést k různým onemocněním, například k Huntingtonově chorobě či některým typům svalové dystrofie. Huntingtonova choroba je autozomálně dominantní neurodegenerativní onemocnění způsobené zmnožením trinukleotidu CAG v *HD* genu (zkratka pochází z anglického názvu Huntington disease) nad 36 opakování (Ramel, 1997; Nussbaum *et al.*, 2004). Dalším onemocněním je již zmíněná svalová dystrofie, konkrétně myotonická dystrofie I. i II. typu. je to autozomálně dominantní onemocnění, které postihuje svalstvo a způsobuje svalovou slabost, atrofii a myotonii. Toto onemocnění je způsobeno zmnožením repetice CCGT určitého genu na 3. chromozomu. Zdravý člověk má kolem 30 opakování této repetice, nemocný může mít až 11 000 opakování. Přesný

počet repetice, který zapříčiní vznik této choroby, však zatím není znám (Finsterer, 2002; Day *et al.*, 2003; Hill *et al.*, 2012; Meola *et al.*, 2015).

### 3.2.1 Využití mikrosatelitů

Mikrosatelity mají vysokou mutační rychlost ( $10^{-2}$  až  $10^{-6}$  /lokus/generace), jsou hypervariabilní a mají kodominantní charakter (což znamená, že mohou být detekováni i heterozygoti) (Li *et al.*, 2002; Lian *et al.*, 2006). Tyto výhody jim zajistily využití jakožto genetických markerů při populačních studiích, k určení paternity či identifikaci konkrétních jedinců.

Poměrně hojně využívané je také určování rodičovství pomocí mikrosatelitních markerů, například Buteler *et al.* (2002) zkoumali možnosti určení paternity u hexaploidních rostlin povíjnice batátové, známé též jako sladká brambora, za použití mikrosatelitních markerů. Vybrány byly pouze 2 mikrosatelitní lokusy a paternita se určovala u dvou experimentálních populací se známými rodiči. Pomocí pravděpodobnostních metod a vyloučení otcovství bylo správně alokováno v první experimentální populaci 23 % potomků a v druhé experimentální populaci 88 % potomků. Příčinou větší chybovosti v určování paternity v první experimentální populaci bylo především to, že byly použity pouze 2 mikrosatelitní lokusy. Navíc měl jeden z použitých mikrosatelitních lokusů velmi nízkou diverzitu alel. I tak ale tento experiment ukázal, že při správném výběru mikrosatelitních lokusů, lze i s jejich malým počtem určit otcovství s poměrně vysokou přesností.

De la Rosa *et al.* (2004) určovali rodičovství rostlin olivovníku v rámci španělského šlechtitelského programu. Za použití osmi mikrosatelitních markerů (z nichž 4 měly velmi dobrou vypovídací hodnotu kvůli vysokému počtu alel) se rozlišovalo 23 kultivarů oliv. Použití mikrosatelitů v tomto případě poskytlo zajímavé výsledky. I když byla testovaná semena vydávána za čisté kultivary se známými rodiči, ukázalo se, že poměrně málo testovaných rostlin, které vyrostly z těchto semen, bylo opravdu předpokládaným kultivarem. Díky mikrosatelitové identifikaci se dokázal poměrně přesně určit i genetický materiál nekorespondující s potenciálními rodiči. V 48 % případů jím byl nejčastěji pěstovaný kultivar olivovníku ve Španělsku (spousta rostlin měla však nejen jednu, ale i několik genetických příměsí, které se odlišovaly od předpokládaného kultivaru). Kromě spolehlivých testů paternity lze tedy pomocí mikrosatelitních markerů spolehlivě určit i jednotlivé odrůdy.

Další využití spočívá v individualizaci. Například v USA existuje databáze CODIS, která slouží pro identifikaci osob pomocí SSRs. V původní databázi CODIS, tzv. Original CODIS Core loci bylo používáno 13 mikrosatelitních lokusů na autozomech plus 14. kódující *Amelogenin*, což je gen nacházející se na gonozomech a amplifikace jeho sekvence umožňuje určit pohlaví z DNA vzorku neznámého člověka. Později se databáze CODIS rozšířila na 20 mikrosatelitních lokusů na autozomech plus *Amelogenin* (Hares, 2015). I v Evropě existuje podobná databáze nazývaná European standard set (ESS), která měla původně 7 mikrosatelitních lokusů (všechny shodné s mikrosatelitními lokusy databáze CODIS), postupně se však také rozrostla. V roce 2009 došlo k rozšíření ESS o dalších 5 mikrosatelitních lokusů. Celkem ESS tedy tvoří 12 mikrosatelitních lokusů, ale komerčně vyráběné STR kity, které jsou běžně používány obsahují ještě 3 mikrosatelitní lokusy navíc - všech 15 mikrosatelitních lokusů je shodných s mikrosatelitními lokusy databáze CODIS, což umožňuje porovnávání mezi databázemi (Butler, 2006; Shewale *et Liu*, 2013; Guo, 2014; Hares, 2015). Významným odvětvím využívajícím mikrosatelity je také určování paternity, kdy SSRs umožňují s vysokou pravděpodobností určit otce nebo jej vyloučit (Csete *et al.*, 2005).

### **3.3 Systémy pro identifikaci kultivarů brusnice chocholičnaté**

K identifikaci je možné použít různé metody, jednou z možností je sekvenování genomu (to se však příliš často nevyužívá) (Song *et Hancock*, 2011). Mnohem častější a levnější je využití genetických markerů. Jednou z prvních používaných metod byla RAPD (random amplification of polymorphic DNA), při této metodě nejsou podmínky PCR reakce přísné a jsou využívány krátké primery. Dochází k nespecifickému nasedání primerů na genomickou DNA, nevýhodou je tedy nereprodukovatelnost. Později však vznikly tzv. SCAR markery (sequence characterized amplified region), které řeší nedostatky metody RAPD. SCAR markery jsou založené na klonování a sekvenování vybraných RAPD markerů ke kterým jsou pak navrženy delší primery s větší specifitou ke konkrétnímu místu, na které mají nasedat (Li *et Park*, 2012; Cho *et al.*, 2017; Kang-Hee *et al.*, 2018). Dále se využívá kupříkladu metoda RFLP (restriction fragment length polymorphism), tato metoda dokáže rozlišit vzorky DNA pocházející od různých jedinců na základě rozdílné délky restriční endonukleázou štěpených fragmentů DNA (Haghighi *et Hancock*, 1992). K identifikaci kultivarů lze také využít detekci SNP (single nucleotide polymorphism) (Young, 2019). V této práci se však

budu zabývat identifikací kultivarů brusnice chocholičnaté a jejích kříženců pomocí markerů založených na variabilitě počtu kopií určitých motivů nacházejících se v DNA - SSRs (simple sequence sequence repeats) (Bassil *et al.*, 2020). V odborné literatuře jsem našla 3 systémy sloužící k identifikaci kultivarů především brusnice chocholičnaté (Boches, 2005; Hinrichsen *et al.*, 2008; Akagi *et al.*, 2010). Není k nim však mnoho informací a bohužel nejsou, až na nějaké výjimky (Boches, 2005), dohledatelné genotypy mikrosatelitních lokusů.

### **3.3.1 Mikrosatelitní systémy pro identifikaci kultivarů highbush blueberries**

Systém pro identifikaci kultivarů highbush blueberries (především brusnice chocholičnaté) za použití SSRs (Boches 2005; Boches *et al.*, 2005; Boches *et al.*, 2006):

Boches (2005) zkoumal 1305 sekvencí z EST knihovny a 136 sekvencí z genomické knihovny obohacené o SSRs. Sekvence z genomické knihovny pocházely od kultivaru brusnice chocholičnaté 'Bluecrop'. Jeho cílem bylo nalézt sadu použitelných mikrosatelitů, dle kterých by se daly studovat vztahy mezi vzdáleně či blíže příbuznými druhy rodu *Vaccinium* a také by se tato sada mikrosatelitů dala využít i přímo k vnitrodruhovým studiím, například k identifikaci kultivarů brusnice chocholičnaté.

Boches (2005) v DNA sekvencích našel celkem 153 mikrosatelitních lokusů. Navrhl 94 párů primerů k většině z těchto mikrosatelitních lokusů. Tyto páry primerů testoval na 12 vzorcích různých genotypů pocházejících z rodu *Vaccinium*, aby zjistil polymorfismus u jednotlivých mikrosatelitních lokusů. Tyto primery využil ke screeningu většího počtu odrůd, při kterém byly vyřazeny ty primery, které nepřinášely spolehlivý produkt. Dále se prováděla *cross-species* PCR amplifikace. Bylo určeno, které mikrosatelitní lokusy se hodí na mezidruhové a které na vnitrodruhové studie. Boches *et al.* (2005) vybrali 30 mikrosatelitních lokusů s dostatečnou diverzitou alel. Boches *et al.* (2006) následně výběr zúžili na 28 mikrosatelitních lokusů a testovali je na 71 vzorcích rostlinného materiálu pocházejícího z rostlin rodu *Vaccinium*, většina rostlinného materiálu pocházela z odrůd druhu brusnice chocholičnaté, ale protože se uvažovalo o přikřížování mnoha odrůd brusnice chocholičnaté také s jinými druhy, například *V. angustifolium* a *V. darrowii*, byly kultivary těchto druhů také přidány k testovaným vzorkům rostlinného materiálu. Byl sestaven systém pro identifikaci kultivarů highbush blueberries za pomoci SSRs. Páry primerů k těmto mikrosatelitním



lokusům přinášejí podle autorů dobře hodnotitelné produkty (Boches, 2005; Boches *et al.*, 2006). Všechny sekvence těchto mikrosatelitních lokusů jsou uvedeny v databázi GenBank. Nicméně Boches (2005) vybral 9 mikrosatelitů, které určil jako nejvhodnější pro využití i v jiných laboratořích, předpokládá se totiž jejich vysoká spolehlivost díky spolehlivosti PCR reakce i v odlišných podmínkách. Těmito mikrosatelity jsou CA23F, CA94F, CA169F, CA190R, CA787F, CA855F, NA398, NA961 a VCC\_I8 (tabulka 2) (Boches, 2005).

**Tabulka 2:** Charakteristika 9 mikrosatelitních lokusů, které Boches (2005) navrhl jako nejvhodnější pro určení genotypů kultivarů především brusnice chocholičnaté. V prvním sloupci jsou uvedeny lokusy s accesion number (podle databáze GenBank), sekvence primerů, motivy repetice a počet alel (Boches, 2005).

Lokus (Acc. No.)	Sekvence primerů (5'→3')	Motiv repetice	Počet alel
<b>CA23F</b> (CF810543)	F: GAGAGGGTTTCGAGGAGGAG R: GTTTAGAAACGGGACTGTGAGACG	AGA	2
<b>CA94F</b> (CF811011)	F: CACCCATTTACGGAATCTC R: GTTTACTTGGTCGGGTGTTGTCTC	AG	7
<b>CA169F</b> (CF811071)	F: TAGTGGAGGGTTTTGCTTGG R: GTTTATCGAAGCGAAGGTCAAAGA	GAT	5
<b>CA190R</b> (CF811085)	F: TTATGCTTGCCATGGTGGTA R: TTGCGAAGGGACCTAGTAGC	TGC	3
<b>CA787F</b> (CF810934)	F: TCCTCGTTCTCTCCCTCTCA R: GTTTCGCTGAAGTTGGAGTCCTT	GAA	5
<b>CA855F</b> (CF811000)	F: CGCGTGAAAAACGACCTAAT R: GTTTACTCGATCCCTCCACCTG	GA/CGA	10
<b>NA398</b> (CF811369)	F: TCCTTGCTCCAGTCCTATGC R: GTTTCCTTCCACTCCAAGATGC	AAAT	5
<b>NA961</b> (CF811674)	F: TCAGACATGATTGGGGAGGT R: GTTTGGAATAATAGAGGCGGTGGA	TAC	6
<b>VCC_I8</b> (AY762679)	F: TTCAGCATTCAATCCATCCA R: GTTTCTCTTCTCCAATCTCTTTTCCA	TG	4

Systém pro identifikaci kultivarů highbush blueberries za použití SSRs (Akagi *et al.*, 2010):

Akagi *et al.* (2010) zkonstruovali systém pro identifikaci kultivarů především highbush blueberries. Mezi vzorky testovaného rostlinného materiálu se však nacházely i některé kultivary rabbiteye blueberries a lowbush blueberries, ty však ve velmi malém počtu oproti hlavním zkoumaným highbush blueberries. Rostlinným materiálem použitým k experimentům byly především listy rostlin. Později však Akagi *et al.* (2010) zkoušeli izolovat DNA i ze slupek plodů, semen a dalších částí rostlin, tato DNA byla taktéž podrobena PCR amplifikaci a přinesla stejné výsledky jako tomu bylo s DNA izolovanou z listů rostlin. K izolaci DNA a identifikaci kultivaru využili listy, semena, plody či květy (plody však obsahují velké množství cukrů a inhibičních produktů, proto je potřeba do vzorku pro izolaci DNA přidat například i semena).

Tento systém obsahuje 11 mikrosatelitních lokusů, které jsou popsány v tabulce 3, Akagi *et al.* (2010) však neuvádějí ve své publikaci počet alel jednotlivých mikrosatelitních lokusů, z tohoto důvodu nejsou v tabulce uvedeny. Šest mikrosatelitních lokusů vybrali z původních 30 mikrosatelitních lokusů dle Boches *et al.* (2005) a tyto sekvence lze nalézt podle accession number v databázi GenBank. Těmito mikrosatelitními markery jsou Vacc.01 (= VCC\_J9), Vacc.03 (= VCC\_J5), Vacc.04 (= VCC\_K4), Vacc.05 (= VCC\_J3), Vacc.06 (= VCC\_I2) a Vacc.09 (= VCC\_S10) - v závorkách jsou uvedeny názvy mikrosatelitních lokusů dle Boches *et al.* (2005). Akagi *et al.* (2010) však použili k PCR amplifikaci těchto 6 mikrosatelitních lokusů jiné páry primerů než použili Boches *et al.* (2005). Dalších 5 mikrosatelitních lokusů nejspíše Akagi *et al.* (2010) našli sami nebo je získali z jiného zdroje, sekvence těchto mikrosatelitních lokusů v databázi GenBank nejsou zaznamenány.

Žádný z 11 mikrosatelitních lokusů se však neshoduje s 9 vybranými mikrosatelitními lokusy, které Boches (2005) určil díky jejich spolehlivému produktu a robustnosti jako nejvhodnější pro použití i v jiných laboratořích.

**Tabulka 3:** Charakteristika 11 polymorfních mikrosatelitních lokusů, které Akagi *et al.* (2010) použili k identifikaci kultivarů především highbush blueberries. V prvním sloupci jsou lokusy a pokud bylo uvedeno autory, tak i accession number (podle databáze GenBank), sekvence primerů a motiv repetice (Boches, 2005; Akagi *et al.*, 2010).

<b>Lokus (Acc. No.)</b>	<b>Sekvence primerů (5'→3')</b>	<b>Motiv repetice</b>
<b>Vacc.01</b> (= VCC_J9) (AY762683)	F: GACATGTCTTCAGAGTTCTCCTC R: GCGTGAGGGCACAAAGCTCT	GT/GA
<b>Vacc.03</b> (= VCC_J5) (AY762682)	F: GAGAAGTAGAGTTTAGAAGCTCTAGAATTCA R: TCTCCAACCCAGTAATTAAGCCCA	CT
<b>Vacc.04</b> (= VCC_K4) (AY762684)	F: TTTCATTACTGCTATCGCCACTCCT R: GTCTGGGATAAATACAAACCCAGTTAGA	CT
<b>Vacc.05</b> (= VCC_J3) (AY762681)	F: GTCATGACCAGTAATCAAACCGCGT R: AACTAGCTAGTGGAAACAACCGGGTT	GAA
<b>Vacc.06</b> (= VCC_I2) (AY762678)	F: GTGTCAGAGGGGCACATTCATG R: CGGCTCGTTTGCAGCCTAGT	CT
<b>Vacc.09</b> (= VCC_S10) (AY762685)	F: CCTTCCTGCNTGAAGAGAAAAATTGCA R: TGAAACCCCTGAAATCGTACTCTCT	CT/CA
<b>Vac.17</b> (neuvedeno)	F: GTTGAAAAGTTCGTTTTGGTCCCTCCT R: CTCCGCTGTGTTGCTTTTGGATTTTAGA	CT
<b>Vacc.19</b> (neuvedeno)	F: GGTACAAAACCCTCGAACAGAATCTCA R: GTGTATAACAGAAGACTGCTTTGCTGGA	CTT
<b>Vacc.22</b> (neuvedeno)	F: CACATTCACTCACCATGTTGCAACG R: GTTTGAGATTTGACCATGCCTTCTGATGT	CT
<b>Vacc.23</b> (neuvedeno)	F: CAACGCATTTACACCATCCGGTAAGA R: GTTCAAGTCAACACAGACCCCATCT	GA
<b>Vacc.24</b> (neuvedeno)	F: CAAAGGGATAGCTCAAAGGGTCTTTTCA R: GAATTTTGCCTTCGTCCGCAGATATGA	CT

System pro identifikaci kultivarů highbush blueberries (především brusnice chocholičnaté) za použití SSRs (Hinrichsen *et al.*, 2008):

Hinrichsen *et al.* (2008) viděli problém ve stále se zvyšující poptávce po kultivarech brusnice chocholičnaté a pěstování v jiných zemích, než je jejich přirozený výskyt. Snaha co nejvíce urychlit množení rostlin a zároveň vyvážet co nejvíce kultivarů ve stejnou dobu vedla totiž velmi často k záměně pojmenování kultivarů. Proto se Hinrichsen *et al.* (2008) pokusili vytvořit systém na identifikaci kultivarů především brusnice chocholičnaté. Tento systém tvoří vybrané mikrosatelity z již známých mikrosatelitů, které v genomu brusnice chocholičnaté objevil Boches (2005) a jsou již zaregistrovány v databázi GenBank.

Vybraných mikrosatelitů je 12 (tabulka 3). Všech těchto 12 mikrosatelitů i s jejich páry primerů je zahrnuto v původních 30 mikrosatelitních lokusech sloužících k identifikaci dle Boches *et al.* (2005). Jeden z mikrosatelitů, které Hinrichsen *et al.* (2008) vybrali se pak shoduje s jedním z devíti mikrosatelitních markerů zmíněných v systému pro identifikaci především brusnice chocholičnaté dle Boches (2005), jedná se o mikrosatelit CA-855. Čtyři mikrosatelitní lokusy se shodují s mikrosatelity v systému pro identifikaci dle Akagi *et al.* (2010) jedná se o mikrosatelity Vacc.01 (= VCC\_J9), Vacc.03 (= VCC\_J5), Vacc.04 (= VCC\_K4), Vacc.06 (= VCC\_I2).

Těchto 12 mikrosatelitních markerů zahrnutých do systému pro identifikaci bylo použito k identifikaci rostlinného materiálu 75 kultivarů především brusnice chocholičnaté. Každý z mikrosatelitů byl vysoce informativní, celkem těchto 12 mikrosatelitů produkovalo 230 alel. Mikrosatelitní marker NA-1040 byl jeden z nejpolymorfnějších, podle Hinrichsen *et al.* (2008) byl snadno hodnotitelný a v genotypch 75 testovaných kultivarů bylo na tomto mikrosatelitu objeveno 20 alel.

Ačkoliv Hinrichsen *et al.* (2008) vybrali k identifikaci kultivarů 12 mikrosatelitních markerů, pro identifikaci většiny kultivarů nebylo zapotřebí použití všech těchto SSRs. Po experimentech bylo zjištěno, že k identifikaci mnoha kultivarů především brusnice chocholičnaté stačí pouze 2 mikrosatelitní markery NA-1040 a CA-421, což jsou mikrosatelity poskytující nejpolymorfnější produkt. V případě nejistoty byly do hodnocení identifikace kultivarů přidány další mikrosatelity, a to postupně CA-344, dále VCC-H9 nebo CA-794. Jen zřídka bylo potřeba použít další mikrosatelity.

V tabulce 4 je uveden počet alel u jednotlivých mikrosatelitních lokusů zjištěných Hinrichsenem *et al.* (2008). Počet alel, které uvedl Boches (2005) u těchto mikrosatelitních lokusů se však liší.

**Tabulka 4:** Charakteristika 12 mikrosatelitních markerů vybraných k identifikaci kultivarů highbush blueberries (především brusnice chocholičnaté). V prvním sloupci jsou uvedeny lokusy s accession number (podle databáze GenBank), sekvence primerů, motivy repetice (Boches, 2005) a počet alel (Hinrichsen *et al.*, 2008).

Lokus (Acc. No)	Sekvence primerů (5'→3')	Motiv repetice	Počet alel
<b>CA-344</b> (CF810639)	F: TTACCAAAACGCCTCTCCAC R: GTTCTTCCTTACGCCCTGAAAT	GCG	9
<b>CA-421</b> (CF810704)	F: TCAAATTCAAAGCTCAAAATCAA R: GTTAAAGGATGATCCCGAAGCTCT	CT	22
<b>CA-794</b> (CF810941)	F: CGGTTGTCCCACTTCATCTT R: GTTGAATTTGGCTTCGGATTC	GA	16
<b>CA-855**</b> (CF811000)	F: CGCGTGAAAAACGACCTAAT R: GTTACTCGATCCCTCCACCTG	GA/CGA	20
<b>NA-41</b> (CF811380)	F: TTCCTTTAGTCGCGTCATCA R: GTTAAAGGTCGCTACGAGACTCCA	CT	14
<b>NA-741</b> (CF811540)	F: GCCGTCGCCTAGTTGTTG R: GTTTGATTTTGGGGTTAAGTTTGC	TC	25
<b>NA-1040</b> (CF811165)	F: GCAACTCCCAGACTTTCTCC R: GTTTAGTCAGCAGGGTGCACAA	TC	20
<b>VCC-H9</b> (AY762677)	F: TCCGAGCCATTTAGTGTCAA R: GTTTACAAAAACCAAAAGCCATGC	CT	19
<b>VCC-I2*</b> (AY762678)	F: AGGCGTTTTTGAGGCTAACA R: TAAAAGTTCGGCTCGTTTGC	CT	12
<b>VCC-J5*</b> (AY762682)	F: CCCCACGGTCTTGATCTTA R: GTTTCCTCTCTCCAACCCAGT	TC	24
<b>VCC-J9*</b> (AY762683)	F: GCGAAGAACTCCGTCAAAA R: GTGAGGGCACAAAGCTCTC	TG/GA	18
<b>VCC-K4*</b> (AY762684)	F: CCTCCACCCCACTTTCATTA R: GCACACAGGTCCAGTTTTTG	TC	23

Poznámka: \* - mikrosatelitní lokusy shodující se s mikrosatelitními lokusy systému pro identifikaci dle Akagi *et al.* (2010); \*\* - mikrosatelitní lokus shodující se s jedním z 9 mikrosatelitních lokusů v rámci systému pro identifikaci dle Boches (2005).

## 4 Materiál a metody

### 4.1 Biologický materiál

Biologický materiál pro testování pocházel z 53 rostlin, mělo se jednat o 32 různých kultivarů brusnice chocholičnaté (*Vaccinium corymbosum*) a jejich kříženců. Z rostlin byly odebrány listy, popř. pupeny, které byly skladovány v mrazničce při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  dokud nedošlo k izolaci DNA. Z odebraných vzorků rostlinného materiálu jsem vyizolovala DNA. V případě, že se izolace nepovedla na první pokus, bylo provedeno nové odebrání biologického materiálu a izolaci DNA jsem provedla znovu. Vyizolovaná DNA byla rozpuštěna v TE pufru. Následně jsem změřila koncentraci této DNA pomocí přístroje Nanodrop. Poté byla naředěna tak, aby se koncentrace pohybovala v rozmezí  $5\text{--}10\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ .

### 4.2 Seznam použitých chemikálií

- 3-methakryloxypropyltrimethoxysilan (Serva)
- Akrylamid (Sigma)
- *aTaq* DNA polymeráza ( $5\text{ U}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ ), M1241 (Promega)
- Bromfenolová modř (Serva)
- Cetyltrimethylammonium bromid (CTAB) (Roth)
- Deionizovaná voda
- Dihydrát ethylendiaminotetraoctanu sodného ( $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) (Lachner)
- dNTPs ( $100\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $400\text{ }\mu\text{l}$  každého), U1240 (Promega)
- Dusičnan stříbrný (Sigma)
- Ethanol - 96% roztok (Lihovar Vrbátky)
- Formaldehyd (Lachner)
- Formamid (Lachner)
- Hydroxid sodný (Lachner)
- Chlorid draselný (Lachner)
- Chlorid sodný (Lachner)
- Chloroform (Lachner)
- Isoamylalkohol (IAA) (Lachner)
- Kyselina boritá (Lachner)

- Kyselina dusičná - 65% roztok (Lachner)
- Kyselina octová (Lachner)
- Močovina (Lachner)
- N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin (TEMED) (AppliChem)
- N,N'-metylenbisakrylamid (AppliChem)
- Octan sodný (Lachema)
- Peroxodisíran amonný (Lachner)
- Polyvinylpyrrolidon 40 (PVP 40) (Fluka)
- Tekutý dusík (Linde)
- Tekuté stěrače Rain Off (Sheron)
- Thiosíran sodný (Lachema)
- Trishydroxymethylaminomethan (Tris) (AppliChem)
- Triton X-100 (AppliChem)
- Uhličitan sodný (Lachner)
- Xylenová modř (Xylencyanol FF) (AppliChem)
- $\beta$ -merkptoethanol (Serva)

### 4.3 Seznam použitých roztoků a jejich příprava

- Akrylamid, 6% zásobní roztok:
  - 420 g močoviny
  - 484 ml deionizované vody
  - 50 ml 10x TBE
  - 150 ml 40% zásobního roztoku akrylamidu:N,N'-methylbisakrylamidu 19:1
  - všechny složky rozpustit, zfiltrvat a uložit do chladničky v tmavé láhvi
- Chloroform:IAA, 24:1:
  - 192 ml chloroformu
  - 8 ml isoamylalkoholu
- CTAB extrakční pufr:
  - 5 g CTAB
  - 25 ml Tris o koncentraci  $1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ , pH 8,0
  - 10 ml  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  o koncentraci  $0,5 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ , pH 8,0
  - 20,45 g NaCl



- 2,5 g PVP 40
- objem doplnit do 250 ml deionizovanou vodou
- před použitím přidat ke 2 ml CTAB extrakčního pufru 30  $\mu$ l  $\beta$ -merkaptoethanolu
- Dusičnan stříbrný, 0,1% roztok:
  - 0,8 g  $\text{AgNO}_3$
  - 800 ml deionizované vody
  - před použitím přidat 1,2 ml formaldehydu
- Fix/stop roztok:
  - 80 ml ledové kyseliny octové
  - 800 ml deionizované vody
- Hydroxid sodný o koncentraci  $1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 
  - 40 g hydroxidu sodného
  - doplnit deionizovanou vodou na 1 l
- Kyselina dusičná, 1% roztok:
  - 12 ml 65% kyseliny dusičné
  - 800 ml deionizované vody
- $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ,  $0,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  zásobní roztok:
  - 186,12 g dihydrátu ethylendiaminotetraoctanu sodného  $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$
  - rozpustit v 800 ml deionizované vody
  - upravit pH na hodnotu 8,0 pomocí pevného NaOH
  - objem doplnit deionizovanou vodou na 1 l
- Nanášecí pufr pro elektroforézu v PAA gelu:
  - 25 ml deionizované vody
  - 100 ml formamidu
  - 0,125 g bromfenolové modře
  - 0,125 g xylenové modře
  - po smíchání chemikálií uchovat výsledný pufr v chladničce
- Octan sodný,  $3 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 
  - 81,65 g octanu sodného
  - rozpustit ve 200 ml deionizované vody
  - pH upravit pomocí ledové kyseliny octové na hodnotu 5,2

- Peroxodisíran amonný, 10% roztok:
  - 1 g peroxodisíranu amonného
  - rozpustit v 10 ml deionizované vody
  - uchovávat v chladničce
- Polyakrylamidový gel, 6% roztok:
  - 60 ml 6% zásobního roztoku akrylamidu:N,N'-methylbisakrylamidu 19:1
  - 400 µl 10% roztoku peroxodisíranu amonného (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>
  - 40 µl N,N,N',N'-tetramethylethyldiaminu
- Reakční pufr pro PCR, 10x:
  - 80 ml deionizované vody
  - 1,211 g trishydroxymethylaminomethanu
  - pH upravit pomocí HCl na hodnotu 9,0
  - 3,73 g KCl
  - 1 ml Triton X-100
  - pH upravit na hodnotu 9,0 přidáním HCl a doplnit deionizovanou vodou do 100 ml
- Roztok 3-methakryloxypropyltrimethoxysilanu:
  - 1 ml 0,5% kyseliny octové v 96% ethanolu
  - 3 µl 3-methakryloxypropyltrimethoxysilanu
- TBE pufr, 10x zásobní roztok:
  - 55 g kyseliny borité
  - 108 g trishydroxymethylaminomethanu
  - 40 ml roztoku Na<sub>2</sub>EDTA 0,5 mol·l<sup>-1</sup>, pH 8,0
  - doplnit deionizovanou vodou do 1 l
- TE pufr:
  - 1 ml Tris o koncentraci 1 mol·l<sup>-1</sup>, pH 8,0
  - 0,2 ml Na<sub>2</sub>EDTA o koncentraci 0,5 mol·l<sup>-1</sup>
  - doplnit do deionizovanou vodou do 100 ml
- Vývojka:
  - 24 g uhličitanu sodného
  - 800 ml deionizované vody
  - uložit do chladničky

- před použitím přidat 1,2 ml formaldehydu a 160 µl 1% roztoku thiosíranu sodného ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ )

#### **4.4 Seznam použitých laboratorních přístrojů**

- Chlazená centrifuga 5810 R (Eppendorf)
- Elektroforetický zdroj EV232 (Consort)
- Kombinovaná chladnička (Whirlpool)
- Laboratorní váhy Mark S622 (BEL Engineering)
- Magnetická míchačka MR Hei-Combi (Heidolph)
- Mikropipety Finnpiette - 0,5 až 10 µl (osmikanálová) a 0,3 µl až 1 ml (Thermo Labsystems)
- Mikropipety Nichipet EX 0,5 µl až 1 ml (Nichiryo)
- Minicentrifuga Prism mini (Labnet International)
- Minicentrifuga CLE CSQSP (Clever Scientific)
- Negatoskop NEGA 1 (Maneko)
- pH metr pH 210 (Hanna Instruments)
- Sekvenační elektroforetická komůrka S2 (Whatman Biometra)
- Spektrofotometr NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific)
- Sušárna CAT 8050 (Contherm)
- Termocykler GenePro (BIOER Technology)
- Termocykler PTC 100-96 VHB (MJ Research)
- Termocykler XP Thermal Cyclor (BIOER Technology)
- Třepačka Orbit 1900 (Labnet International)
- Ultracentrifuga Biofuge pico (Heraeus)
- Vodní lázeň SUB6 (Grant)
- Vortex mixer (Labnet International)
- Vyhřívavý blok (Labnet International)
- Výrobník deionizované a ultračisté vody typ 02 (AquaOsmotic)
- Výrobník ledu Ice Flaker (Brema IceMakers)

#### **4.5 Izolace DNA**

Požadavky: na izolaci jednoho vzorku bylo potřeba mít na 4 °C vychlazenou jednu třecí misku s tloučkem, nechat si předeřhřát vodní lázeň s deionizovanou vodou na

70 °C a dále si popsat 4 2ml zkumavky - v návodu jsou postupně zmiňovány jako zkumavky A, B, C, D.

1. Nejdříve připravit CTAB extrakční pufr s těsně před izolací přidaným  $\beta$ -merkaptoethanolem - na každý vzorek byly potřeba 2 ml CTAB extrakčního pufru a 30  $\mu$ l  $\beta$ -merkaptoethanolu.
2. Navážít 500 mg listů (popř. pupenů) kultivarů brusnice chocholičnaté.
3. Do předchlazené porcelánové třecí misky vložit navážené listy (pupy).
4. Listy zalít zhruba 20–30 ml tekutého dusíku a rozdrtit tloučkem na jemný prášek.
5. Do třecí misky k prášku z rostlinného materiálu přidat 2 ml CTAB extrakčního pufru s  $\beta$ -merkaptoethanolem a směs dále homogenizovat.
6. Homogenát přelít do 2ml mikrozkuavky A.
7. Mikrozkuavku s homogenní směsí pečlivě zvortexovat, poté inkubovat hodinu a půl ve vodní lázni při 70 °C a co 10 minut mikrozkuavku vytáhnout, zvortexovat a vrátit do vodní lázně.
8. Po inkubaci homogenát zcentrifugovat po dobu 10 minut při 13 000 g.
9. Přepipetovat supernatant do mikrozkuavky B.
10. Do mikrozkuavky B přidat 1 ml roztoku směsi chloroform:IAA v poměru 24:1, vortexovat dokud se fáze nepromísí a dále centrifugovat 5 minut při 13 000 g.
11. Vrchní vodnou fázi odpipetovat do mikrozkuavky C, do které opět přidat 1 ml roztoku směsi chloroform:IAA v poměru 24:1, opět vortexovat dokud se obě fáze nepromísí a centrifugovat 5 minut při 13 000 g.
12. Do nové mikrozkuavky přepipetovat supernatant, přidat 100  $\mu$ l roztoku octanu sodného a zbytek objemu mikrozkuavky doplnit izopropylalkoholem.
13. Převrácením promíchat. Dát zkumavky do mrazáku (–20 °C) na 30 minut.
14. Centrifugovat 20 minut při 15 000 g ve vychlazené centrifuze na 4 °C.
15. Supernatant odlít, mikrozkuavku osušit o ubrousek.
16. Poté do mikrozkuavky přidat 1 ml 70% ethanolu, převrácením promíchat.
17. Centrifugovat 10 minut při 15 000 g ve vychlazené centrifuze na 4 °C.
18. Opatrně slít supernatant.
19. Vysušit v termobloku 2 h při 55 °C.

20. K peletu přidat 1 ml TE pufru a zkumavky nechat ještě 1 h v termobloku při teplotě 55 °C. Zkumavky každých 15 minut zvortexovat.
21. Změřit koncentraci vyizolované DNA pomocí spektrofotometru NanoDrop.
22. Podle naměřené koncentrace naředit vyizolovanou DNA tak, aby byla v rozmezí 5–10  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ .
23. Vzorke uchovat při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

## 4.6 PCR amplifikace DNA kultivarů brusnice chocholičnaté

Izolovala jsem DNA celkem 53 vzorků rostlinného materiálu, respektive kultivarů brusnice chocholičnaté a jejích kříženců. Mělo se jednat o 32 různých kultivarů. V první fázi jsem vybrala 6 vzorků DNA na optimalizaci PCR a elektroforézy. Po zoptimalizování těchto parametrů pro všech 20 párů primerů jsem prováděla reakce se všemi 53 vzorky DNA rostlinného materiálu.

1. Rozmrazit všechny složky PCR směsi a poté je zvortexovat a zcentrifugovat.
2. Do 1,5ml mikrozkuavky napipetovat jednotlivé složky podle tabulky 5 a poté PCR směs pečlivě zvortexovat a zcentrifugovat.

**Tabulka 5:** Složení PCR reakční směsi pro 6 a 53 vzorků.

Složka PCR směsi	Koncentrace zásobního roztoku	Objem složek pro 6 vzorků [ $\mu\text{l}$ ]	Objem složek pro 53 vzorků [ $\mu\text{l}$ ]
Deionizovaná voda	-	44,4	392,2
Reakční pufr	10x	6,7	59,2
Roztok $\text{MgCl}_2$	25 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$	4,0	35,3
Roztok dNTPs	20 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$	0,7	6,2
Primer R	10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	3,3	29,2
Primer F	10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	3,3	29,2
<i>aTaq</i> DNA polymeráza	5 $\text{U}\cdot\mu\text{l}^{-1}$	1,0	8,8

3. Osmikanálovou pipetou napipetovat po 1  $\mu\text{l}$  DNA všech 6 vzorků vybraných pro optimalizaci do 6 předem popsáných PCR mikrozkuavek (v případě genotypizace přidat 1  $\mu\text{l}$  genomické DNA 53 jedinců do 53 předem popsáných PCR zkumavek). Poté připipetovat do jednotlivých PCR mikrozkuavek ke genomické DNA 9  $\mu\text{l}$  připravené PCR směsi.

4. PCR mikrozkušavky s napipetovanými vzorky důkladně uzavřít, vložit do termocykleru a nastavit teplotní program podle Tabulky 6. Základní teplotou *annealingu*, která byla použita u všech vzorků během prvního testování, byla 55 °C (tabulka 6). Během dalšího testování byla tato teplota optimalizována a u některých vzorků zvýšena.

**Tabulka 6:** Teplotní a časový profil PCR reakce.

Krok PCR	Teplota [°C]	Doba trvání	Počet cyklů
Úvodní denaturace	94	5 min	1
Denaturace	94	30 s	35
<i>Annealing</i>	55	30 s	
Elongace	72	30 s	
Finální elongace	72	7 min	1

## 4.7 Amplifikované mikrosatelitní lokusy na DNA kultivarů brusnice chocholičnaté

Celkově bylo k PCR amplifikaci použito 20 párů primerů. Seznam použitých mikrosatelitních lokusů a literární zdroje, ve kterých byly nalezeny, jsou uvedeny v tabulce 7.

**Tabulka 7:** Mikrosatelitní markery amplifikované pomocí metody PCR na DNA celkem 53 vzorků pocházejících z listů nebo pupenů kultivarů brusnice chocholičnaté a jejích kříženců.

Mikrosatelitní lokusy	Literární zdroje
CA23F, CA94F, CA169F, CA190R, CA787F, CA855F, NA398, NA961 a VCC_I8	Boches, 2005
Vacc.01, Vacc.03, Vacc.04, Vacc.05, Vacc.06, Vacc.09, Vacc.17, Vacc.19, Vacc.22, Vacc.23 a Vacc.24	Akagi <i>et al.</i> , 2010

## 4.8 Elektroforetická separace PCR produktů

Pro separaci PCR produktů byl přichystán 6% polyakrylamidový gel za denaturujících podmínek, který byl nalit mezi velké sklo s rozměry 330 × 420 mm a malé sklo s rozměry 330 × 390 mm, tloušťka gelu byla 0,4 mm. PCR produkty byly následně rozseparovány ve vyhřívané sekvenační elektroforetické komůrce S2 (Whatman Biometra) a po separaci byly vizualizovány dusičnanem stříbrným.

### Ošetření skel:

1. Plochu velkého skla, která bude v kontaktu s gelem, 2x opláchnout deionizovanou vodou a za pomoci papírových ubrousků osušit.
2. Na vyčištěnou plochu velkého skla nanést přípravek odpuzující vodu (RainOff) a rozetřít ho pečlivě po celé ploše pomocí úzkého proužku (cca 1 cm) papírového ubrousku. Po zaschnutí přípravku (cca 2 min) tuto ošetřenou plochu 2× omýt deionizovanou vodou a osušit papírovými ubrousky.
3. Plochu malého skla, která bude v kontaktu s gelem, 2x opláchnout deionizovanou vodou, osušit za pomoci papírových ubrousků a následně 2x opláchnout 96% ethanolem a opět osušit papírovými ubrousky.
4. Malé sklo přemístit do digestoře na polystyrenovou desku a na omytou plochu nanést roztok obsahující 3  $\mu$ l 3-methakryloxypropyltrimethoxysilanu rozpuštěného v 1 ml roztoku 0,5% kyseliny octové v 96% ethanolu a rozetřít ho dobře po celé ploše pomocí úzkého proužku papírového ubrousku.
5. Po zaschnutí (cca po 2 min) omýt malé sklo 4× ethanolem a osušit papírovými ubrousky.
6. Položit velké sklo ošetřenou plochou nahoru do digestoře na druhou polystyrenovou desku a k jeho okrajům umístit dva spacery. Malé sklo v ruce otočit, položit ošetřenou plochou dolů na velké sklo, zarovnat spacery podél hran skel a přirazit malé sklo ke gumičkám spaceru. V místě spacerů z každé strany sepnout 2 malými klipsami.

### Příprava 6% roztoku polyakrylamidového gelu:

1. V digestoři do odměrného válce nalít 60 ml pracovního roztoku akrylamidu : N,N'-methylenbisakrylamidu a následně přelít do kádinky.
2. Mikropipetou k roztoku přidat 400  $\mu$ l 10% roztoku peroxidisíranu amonného a 40  $\mu$ l N,N,N',N'-tetramethylethylendiaminu.
3. Směs opatrně promíchat.
4. Za současného poklepávání na sklo nalívat roztok polyakrylamidového gelu z kádinky mezi skla.
5. Hřebínek zasunout rovnou stranou do prostoru mezi skly do hloubky cca 7 mm od okraje malého skla a obě skla v místě hřebínku sepnout 4–5 velkými klipsami.

6. Zbytek roztoku v kádince přelít do odpadní nádoby a připravený gel nechat tuhnout alespoň po dobu jedné hodiny.

#### Elektroforetická separace

1. Po ztuhnutí gelu všechny klipsy sundat, skla omýt a kartáčem jemně odstranit zbytky gelu v místě hřebínku.
2. Z malého skla vodu setřít pomocí gumové stěrky, popř. sklo osušit papírovými ubrousky.
3. Skla s gelem umístit do sekvenační komůrky hřebínkem nahoru a malým sklem směrem k sobě.
4. Poté připevnit skla pomocí šroubů ke komůrce a utáhnout také šroub na odtok pufru. Do horního (katodového) a dolního (anodového) prostoru komůrky nalít 0,5x TBE pufr.
5. Vyjmout hřebínek a vzniklý prostor mezi skly vyčistit plastovou stěrkou, tak aby nebyl poškozen gel, a vypláchnout pomocí injekční stříkačky, aby v tomto prostoru nebyly žádné zbytky gelu a vzduchové bublinky.
6. Horní a dolní prostor komůrky uzavřít a připojit ke zdroji stejnosměrného elektrického proudu - katodu připojit nahoru a anodu dolů.
7. Nastavit napětí na 3 000 V, proud na 150 mA, výkon na 90 W a nechat 30 minut nahřívat gel.
8. Během nahřívání gelu ke každému z PCR produktů připipetovat 5  $\mu$ l nanášejícího pufru a 3 minuty před koncem nahřívání vložit vzorky do termocykleru a nechat je 3 minuty denaturovat.
9. Mezitím si připravit nádobu s ledem a po uplynutí času denaturace ihned umístit vzorky na led.
10. Po 30 min nahřívání gelu zastavit zdroj elektrického napětí, odpojit elektrody a opět pomocí plastové stěrky a injekční stříkačky vyčistit prostor mezi skly od zbytků gelu a vzduchových bublinek.
11. Do gelu cca 1 mm hluboko vsunout hřebínek (dávat si pozor, aby nebyl ulomen ani ohnut žádný ze zoubků hřebíku).
12. Do prostoru mezi zoubky hřebínku nanést osmikanálovou pipetou po 2  $\mu$ l každého vzorku. Mezi opakováními promývat špičky v 0,5x TBE pufru, který byl nalit do horního (katodového) prostoru, a poté je otřít o papírový ubrousek.



13. Horní prostor komůrky opět uzavřít, připojit elektroforetickou aparaturu ke zdroji elektrického napětí, výkon změnit na 70 W a nechat vzorky separovat po dobu 90 minut (či jinou dobu podle mikrosatelitního lokusu, jehož produkty jsou separovány).
14. V době separace vzorků připravit roztoky pro vizualizaci gelu (viz seznam použitých roztoků a jejich příprava: vývojka, fix/stop roztok, kyselina dusičná (1%) a dusičnan stříbrný (0,1%).
15. Po dokončení elektroforetické separace vypnout a odpojit zdroj elektrického napětí, mírně uvolnit šroub na odtok pufru z horního prostoru a poté uvolnit šrouby upevňující skla s gelem k aparatuře.
16. Skla s gelem přenést z komůrky na vodorovnou plastovou podložku, opatrně vyjmout oba spacery (nejlépe ne za gumu) a pomocí čepele nože od sebe skla opatrně oddělit.

#### Vizualizace gelu

1. První fotomisku (určenou pro fix/stop roztok a roztok kyseliny dusičné) umístit na třepačku a přenést do ní malé sklo s gelem tak, aby byl gel na vrchní ploše skla.
2. Misku zalít fix stop roztokem a nechat působit 20 minut (takto se v případě potřeby může gel ponechat až do druhého dne).
3. Po uplynutí 20 minut fix/stop roztok slít zpět do baňky a sklo s gelem v misce promýt 3× po dvou minutách deionizovanou vodou.
4. Fotomisku s gelem opět položit na třepačku, zalít 1% roztokem kyseliny dusičné a nechat působit přesně 4 minuty.
5. Při čase, kdy je sklo s gelem v roztoku kyseliny dusičné přidat 1200 µl formaldehydu k 0,1% roztoku dusičnanu stříbrného.
6. Po uplynutí doby 4 minut roztok kyseliny dusičné vylít do odpadu a promýt sklo s gelem v misce 4× po dvou minutách deionizovanou vodou.
7. Sklo s gelem vložit do další fotomisky a následně zalít roztokem dusičnanu stříbrného.
8. Zapnout třepačku a nechat sklo s gelem ve fotomisce takto 30 minut.
9. Těsně před uplynutím 30 minut naplnit třetí fotomisku deionizovanou vodou a přidat k vychlazené vývojce 1200 µl formaldehydu a 160 µl 1% roztoku thiosíranu sodného.

10. Po 30 minutách působení roztoku dusičnanu stříbrného na gel slít tento roztok zpět do zásobní lahve (tento roztok se může použít 5x, než je třeba připravit nový) a sklo s gelem ponořit na 5 sekund do třetí fotomisky naplněné vodou.
11. Přemístit sklo s gelem do čtvrté fotomisky na vývojku umístěné na třepače a zalít sklo s gelem vývojkou.
12. Jakmile začne gel tmavnout a PCR produkty se zbarví, tak gel zalít fix/stop roztokem a zastavit tím jeho barvení.
13. Po ukončení výronu CO<sub>2</sub> vylít roztok do odpadu a gel přemístit do třetí fotomisky s připravenou deonizovanou vodou.
14. Takto ponechat sklo s gelem cca 2 minuty.
15. Sklo s gelem v místě spaceru osušit papírovým ubrouskem, popsat, okapat a umístit do sušárny.
16. Po hodině sušení gel vyndat (použít chňapky), nechat vychladnout, vyhodnotit na negatoskopu a naskenovat do počítače.
17. Sklo s vyhodnoceným a naskenovaným gelem ponořit do 1 mol·l<sup>-1</sup> roztoku hydroxidu sodného.
18. Poté sklo očistit kartáčem a omýt deonizovanou vodou se saponátem.

## 5 Výsledky

V experimentální části svojí diplomové práce jsem izolovala DNA celkem z 53 vzorků rostlinného materiálu, který měl pocházet z 32 různých kultivarů brusnice chocholičnaté a jejich kříženců. Tímto rostlinným materiálem byly ve většině případů listy, popřípadě pupeny. Rostliny pocházely od různých prodejců. Z některých rostlin musely být vzorky rostlinného materiálu odebírány 2x, protože první izolace byla provedena z rostlinného materiálu (konkrétně listů) odebraného v září a v mnoha listech již došlo k senescenčním změnám, viditelně měly nižší podíl chlorofylu a byly vidět žluté a červenofialové skvrny a zřejmě tato barviva a související degradační procesy buď poškodily DNA nebo fungovaly jako inhibitory pro PCR. Proto další rok na jaře bylo nutné uskutečnit odběr rostlinného materiálu asi třetiny testovaných rostlin znovu. Protože se odběr uskutečnil na přelomu zimy a jara, kdy rostliny nejsou ještě olistěné, použily se na reizolaci DNA z těchto rostlin pupeny. Konkrétní kultivary a koncentrace jejich vyizolované DNA jsou uvedeny v tabulce 8.

Rostliny, ze kterých byla izolována DNA, jsou v tabulce 8 uvedeny pod názvy kultivarů, o které se mělo podle prodejců jednat. Pro potřebu rozlišení několika rostlin stejného kultivaru byly označeny ještě dovětkem, a to buď číselným (1, 2, 3) nebo slovním přívlaskem (např. mladší, starší atd). V závorkách některých rostlin jsou dále uvedeny bližší informace o tom, odkud rostlina pocházela.

**Tabulka 8:** Seznam kultivarů z jejichž rostlinného materiálu jsem izolovala DNA a koncentrace této DNA v jednotlivých vzorcích.

Kultivar	Koncentrace DNA [ng/μl]	Kultivar	Koncentrace DNA [ng/μl]
'Atlantic'	196,0	'Grover' starší	102,0
'Aurora'	170,0	'Heerma' střed	50,0
'Berkeley'	80,0	'Heerma' východ	209,8
'Bluecrop' 1	42,0	'Heerma' západ	51,0
'Bluecrop' 2 (Litomyšl)	8,5	'Herbert'	38,7
'Bluecrop' 3 (LIDL)	3,2	'Hort blue'	281,2
'Bluejay' východ	44,0	'Ivanhoe' mladší (Litomyšl)	111,7
'Bluejay' západ	33,0	'Ivanhoe' starší (Litomyšl)	80,5
'Blueray' mladší (Litomyšl)	186,5	'Jersey'	64,1
'Blueray' starší (Litomyšl)	201,0	'Legacy' mladší	34,4
'Bluetta'	227,0	'Legacy' starší	119,4
'Brigitta Blue' jih	80,0	'Liberty'	57,0
'Brigitta Blue' sever	41,0	'Meader'	91,0
'Brigitta Blue' západ	45,3	'Northland'	61,0
'Chandler' mladší (LIDL)	4,9	'O'Neal' jih	50,6
'Chandler' starší	54,0	'O'Neal' sever	38,9
'Coville' mladší (Spomyšl)	65,0	'O'Neal' východ	49,8
'Coville' starší	110,0	'Patriot' mladší (Litomyšl)	6,8
'Darrow' 1	79,5	'Patriot' starší	63,0
'Darrow' 2 (LIDL)	3,9	'Pioneer' mladší	39,6
'Darrow' 3	127,0	'Pioneer' starší	77,5
'Draper'	226,0	'Rubel'	63,5
'Duke'	93,0	'Sierra'	73,0
'Earliblue' jih	85,0	'Spartan'	64,0
'Earliblue' sever	97,0	'Toro' mladší (LIDL)	8,4
'Elliott'	91,0	'Toro' starší	130,0
'Grover' mladší (Spomyšl)	88,0		

Po izolaci DNA z 53 vzorků rostlinného materiálu pocházejících z 32 kultivarů brusnice chocholičnaté a jejich kříženců jsem DNA naředila tak, aby její koncentrace byla v rozmezí 5 až 10 μg·ml<sup>-1</sup>. Následně jsem na této DNA provedla PCR amplifikaci 20 mikrosatelitních lokusů, které jsou charakterizovány v tabulce č. 2 a č. 3. Páry primerů pro amplifikaci pocházejí ze 2 systémů pro identifikaci. Autorem jednoho systému je Boches (2005) a tento systém obsahuje 9 mikrosatelitních lokusů, a to CA23F, CA94F, CA169F, CA190R, CA787F, CA855F, NA398, NA961 a VCC\_I8.

Autory druhého systému jsou Akagi *et al.* (2010) a tento systém obsahuje 11 mikrosatelitních lokusů, a to Vacc.01, Vacc.03, Vacc.04, Vacc.05, Vacc.06, Vacc.09, Vacc.17, Vacc.19, Vacc.22, Vacc.23 a Vacc.24.

Nejdříve jsem provedla PCR amplifikaci všech 20 mikrosatelitních lokusů na 6 vzorcích DNA pocházejících z rostlinného materiálu 6 kultivarů brusnice chocholičnaté při teplotě *annealingu* 50 a 55 °C. Následovala optimalizace teplot pro jednotlivé mikrosatelitní markery. Ve většině případů byly produkty mikrosatelitních lokusů v gelu příliš silné. Proto byla teplota *annealingu* zvýšena (tabulka 9).

**Tabulka 9:** 20 mikrosatelitních lokusů, čas elektroforetické separace a teploty *annealingu*.

Lokus	Čas separace [min]	Teplota <i>annealingu</i> [°C]	Lokus	Čas separace [min]	Teplota <i>annealingu</i> [°C]
CA23F	120	67	Vacc.03	140	65
CA94F	240	62	Vacc.04	90	63
CA169F	90	56	Vacc.05	90	68
CA190R	210	65	Vacc.06	90	69
CA787F	240	64	Vacc.09	90	55
CA855	180	66	Vacc.17	90	66
NA398	120	65	Vacc.19	90	67
NA961	150	63	Vacc.22	90	60
VCC_I8	90	61	Vacc.23	90	68
Vacc.01	90	65	Vacc.24	90	55

K identifikaci kultivarů brusnice chocholičnaté jsem nakonec použila pouze 7 mikrosatelitních lokusů ze systému pro identifikaci dle Boches (2005). PCR produkty přinášely dobře hodnotitelný výsledek v gelu. Zjistila jsem genotypy zmíněných 7 mikrosatelitních lokusů u všech 53 vzorků DNA pocházejících z rostlinného materiálu celkem 32 různých kultivarů brusnice chocholičnaté. Tyto genotypy jsem srovnala s genotypy těchto mikrosatelitních lokusů u konkrétních kultivarů brusnice chocholičnaté, které uvedl ve své publikaci Boches (2005). V tabulce 10 je uvedeno 22 kultivarů. Jsou to pouze ty, u kterých jsem prokázala díky srovnání genetických profilů, že byly prodávány pod správným názvem.

**Tabulka 10:** Mnou zjištěné genotypy (tedy velikosti alel v bp) 7 mikrosatelitních lokusů u 22 kultivarů brusnice chocholičnaté, které se ve většině případů shodují s genotypy těchto kultivarů, které uvádí Boches (2005).

Odrůdy/lokus	CA23F	CA169F	CA190R	CA787F	NA398	NA961	VCC_I8
'Aurora'	155/158	109/112/121	240/243	291/297	211/232	186/192/195	113/119
'Berkeley'	155/158	109/112/115/121	240/243/246	291/297/300	211/225/232	189/192	117
'Bluecrop' 2	155/158	109/115	240	288/291/300/302	211/232	189/192/195	117
'Bluejay' východ	<u>155/158</u>	115/121	240/243/246	291/297	225/232/236	192	119
'Bluejay' západ	155/158	115/121	240/243/246	291/297	225/232/236	192	119
'Blueray' mladší	155/158	109/112/115	240/243/246	291/297	211/232	186/192/ <u>195</u>	117/119
'Chandler' starší	155/158	109/115/121/127	240	288/291	211/232	189/192/195	113/117
'Darrow' 3	155/158	109/115/127	243	297	211/228/232	192	117/119
'Draper'	155	109/112/115	240/243/246	291/297/300	225/232/236	186/189/192	113
'Duke'	155/158	112/115	240/246	291/300	225/232	186/189/192	119
'Earliblue' jih	155/158	112/115/121	240/243	291/297	211/225/232	189/192	117/119
'Elliott'	155/158	109/115/121/127	243/246	291/297	211/232	186/192	113/117
'Herbert'	155/158	109/115	240/243	288/291/297	211/225/232	190/193	117/119
'Legacy' mladší	155	109/115	240/243/246	291/297	211/228/232	189?/192	119

Odrůdy/lokus	CA23F	CA169F	CA190R	CA787F	NA398	NA961	VCC_I8
'Liberty'	155/158	109/112/121	240	291/297	211/232	186/192/195	113
'Meader'	155/158	109/112/115	240/243	288/291/297	225/232	189/192	115/117/ <u>132</u>
'Northland'	155/158	109/112/115	240/246	288/291/297	211/225/231/232	189/192	117
'Patriot' mladší	<b>155</b> /158	112/115/121	240/243	291/297	211/225/228/232	192	117/119
'Rubel'	155/ <b>158</b>	109/115	240/243	291/297	211/232	<b>186?</b> /192	117/119
'Sierra'	155/158	109/112	243/246	291/297	211/225/232	189/192	111/117/119/ <u>121</u>
'Spartan'	155/158	109/112/121	240	288/291/297	211/225/232	193/196	117/119
'Toro' starší	155/158	109/115/121	240	291/297/302	211/232	189/192/195	117/119

Poznámka: ? - přítomnost dané alely není jistá; **tučně** - extra alela, kterou Boches (2005) u daného mikrosatelitního lokusu neuvádí, ale při mých experimentech se amplifikovala; podtržené - při mých experimentech nedošlo k amplifikaci alely/lokusu i když Boches (2005) uvádí, že se u daného mikrosatelitního lokusu vyskytovat měla.

V tabulce 10 je uvedeno pouze 7 mikrosatelitních lokusů dle Boches (2005). 2 zbylé mikrosatelitní lokusy podle Boches (2005) nejsou v tabulce 10 uvedeny. Jedná se o mikrosatelitní lokusy CA94F a CA855F, které nepřinášely v gelu dobře hodnotitelný produkt. Po amplifikaci mikrosatelitního lokusu CA855 nebylo možné přesně určit velikosti alel, protože se mnohdy lišily jen o jeden nukleotid. Dalším problémem mikrosatelitního lokusu CA855 bylo, že po jeho amplifikaci se u některých kultivarů nevyskytovaly alely, které Boches (2005) u daného kultivaru uváděl. Z těchto důvodů nejsou mikrosatelitní lokusy CA94F a CA855F zahrnuty v tabulce 10. Podobně tomu bylo u systému pro identifikaci kultivarů především brusnice chocholičnaté podle Akagi *et al.* (2010). Tento systém obsahuje 11 mikrosatelitních lokusů, z nichž k 5 mikrosatelitním lokusům uvedl Boches (2005) genotypy nejrozšířenějších kultivarů brusnice chocholičnaté. Jedná se o mikrosatelitní lokusy Vacc.01 (= VCC\_J9), Vacc.03 (= VCC\_J5), Vacc.04 (= VCC\_K4), Vacc.05 (= VCC\_J3) a Vacc.06 (= VCC\_I2), v závorkách jsou uvedeny názvy mikrosatelitních lokusů, které užívá Boches (2005). Genotypy těchto mikrosatelitních lokusů podle Boches (2005) se však ve většině případů neshodovaly s mými experimentálně zjištěnými genotypy. Amplifikace mikrosatelitních lokusů dle Akagi *et al.* (2010) přinesla často extra alely, které nebyly uvedeny mezi genotypy těchto mikrosatelitních lokusů v publikaci od Boches (2005). Jedním z nejpravděpodobnějších důvodů může být to, že Akagi *et al.* (2010) a Boches (2005) použili k amplifikaci mikrosatelitních lokusů rozdílné páry primerů.

Zmíněných 53 vzorků rostlinného materiálu odrůd brusnice chocholičnaté a jejich kříženců mohou rozdělit na základě svých výsledků do 4 skupin:

1. Rostliny, u nichž jsem ověřila, že názvy zcela odpovídají genetickému profilu, který uvádí Boches (2005), popř. existuje jen malá odchylka, nejčastěji u jednoho ze 7 mikrosatelitních lokusů.
2. Rostliny, které byly prodávány pod názvy, které neodpovídaly genotypům, které uvádí Boches (2005), ale povedlo se mi identifikovat jejich kultivary.
3. Rostliny, které byly prodávány pod názvy, které neodpovídaly genotypům, které uvádí Boches (2005) a nepovedlo se mi je přiřadit ke kultivaru, protože Boches uvádí genotypy pouze k 69 kultivarům brusnice chocholičnaté.
4. Rostliny, u kterých jsem nedokázala určit zda jsou to opravdu kultivary pod jejichž názvy jsou prodávány, a to z důvodu toho, že genotypy těchto kultivarů Boches (2005) neuvádí, nebylo tedy možné srovnání s genotypy mnou zjištěnými.

Do 1. skupiny patří 22 vzorků, u nichž jsem prokázala, že byly prodávány pod správným názvem kultivaru. U 15 kultivarů brusnice chocholičnaté jsem prokázala úplnou shodu mezi genotypy 7 mikrosatelitních lokusů zjištěnými Boches (2005) a mnou experimentálně zjištěnými genotypy těchto 7 mikrosatelitních lokusů. U 6 kultivarů brusnice chocholičnaté byla prokázána shoda mezi genotypy 6 mikrosatelitních lokusů zjištěnými Boches (2005) a mnou experimentálně zjištěnými genotypy těchto 6 mikrosatelitních lokusů (ze 7). U kultivaru brusnice chocholičnaté 'Rubel' jsem prokázala shodu s 5 genotypy mikrosatelitních lokusů (ze 7), které uvedl Boches (2005).

Do 2. skupiny patří 14 kultivarů, které byly prodávány pod nesprávnými názvy, ale podařilo se mi je identifikovat. Identifikace probíhala nejdříve za pomoci mikrosatelitních lokusů CA855F (Boches, 2005) a Vacc.03 (Akagi *et al.*, 2010). U těchto mikrosatelitních lokusů sice po jejich amplifikaci nebylo možno určit genotypy kvůli velkému množství alel lišících se ve velikosti mnohdy pouze o jeden nukleotid, ale právě proto bylo vhodné tyto mikrosatelity použít díky velké variabilitě alel jako srovnávací "čárový kód". Jednotlivé kultivary brusnice chocholičnaté totiž přinášely specifické produkty o velkém množství alel. Tyto "čárové kódy" pomohly porovnat kultivary mezi sebou a odhalily shody mezi vzorky DNA, které údajně měly pocházet z rostlinného materiálu jiných kultivarů brusnice chocholičnaté. Vzorky DNA pocházející z rostlinného materiálu brusnice chocholičnaté, které měl shodné alely mikrosatelitních lokusů CA855F a Vacc.03 byly porovnávány i za pomoci 7 mikrosatelitních markerů, které jsem vybrala jako vhodné pro identifikaci kultivarů brusnice chocholičnaté. U mnoha vzorků DNA se ukázalo, že opravdu nejsou těmi kultivary, za které byly vydávány. Takto se mi povedlo identifikovat 14 z již dříve zmíněných špatně pojmenovaných kultivarů brusnice chocholičnaté (tabulka 11).

Do 3. skupiny se řadí 10 kultivarů, u kterých jsem prokázala, že jsou prodávány pod nesprávnými názvy, ale nepodařilo se mi nalézt žádné analogy mezi mnou experimentálně zjištěnými genotypy a genotypy 69 kultivarů, které uvedl Boches (2005).

Do 4. skupiny patří 7 kultivarů, u kterých nebylo možné určit, zda se jejich názvy kultivarů shodují s genetickým profilem daných kultivarů. Boches (2005) totiž neuvádí ve své publikaci genotypy mikrosatelitních lokusů pro ani jednu z těchto tří odrůd ('Brigitta', 'Hortblue Petite' a 'Heerma').

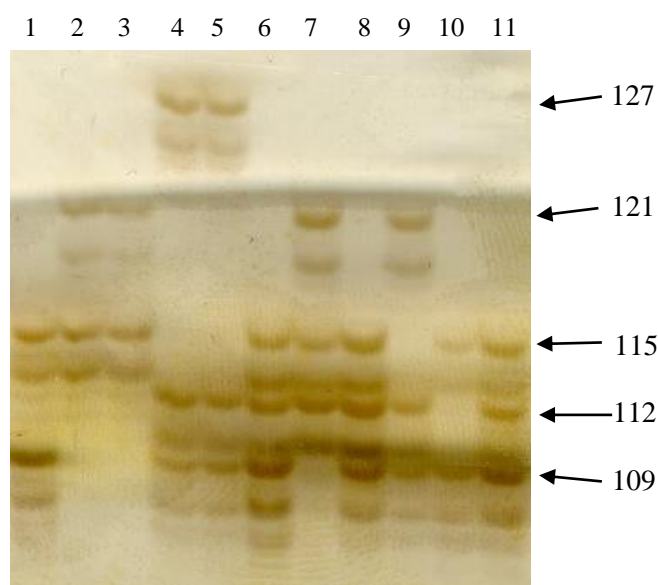


**Tabulka 11:** Zjištěné genotypy 7 mikrosatelitních lokusů u 14 špatně kultivarově určených jedinců druhu brusnice chocholičnaté. V prvním sloupci jsou uvedeny názvy kultivarů brusnice chocholičnaté, pod kterými byly rostliny, z nichž pocházela DNA, prodávány. Ve druhém sloupci jsou uvedeny názvy kultivarů, kterým odpovídá mnou zjištěný genetický profil.

Předpokládaný/é kultivar/y	Skutečný kultivar	CA23F	CA169F	CA190R	CA787F	NA398	NA961	VCC_I8
'Darrow' 2	'Elliott'	155/158	109/115/121/127	243/246	291/297	211/232	186/192	113/117
'Chandler' mladší 'Toro' 2 'Bluecrop' 3	'Sierra'	155/158	109/112	243/246	291/297	211/225/232	189/192	111/117/119/ <u>121</u>
'Earliblue' sever 'Jersey'	'Bluecrop'	155/158	109/115	240	288/291/300/302	211/232	189/192/195	117
'Blueray' starší 'Brigitta' sever 'Coville' starší 'Grover' starší	'Bluejay'	155/158	115/121	240/243/246	291/297	225/232/236	192	119
'Pioneer' starší	'Rubel'	155/ <b>158</b>	109/115	240/243	291/297	211/232	<b>186?</b> /192	117/119
'O'Neal' sever 'O'Neal' jih 'O'Neal' východ	'Olympia'	155/161	112/115/121	240/243	291/297	211/282/232	189/192	113/119

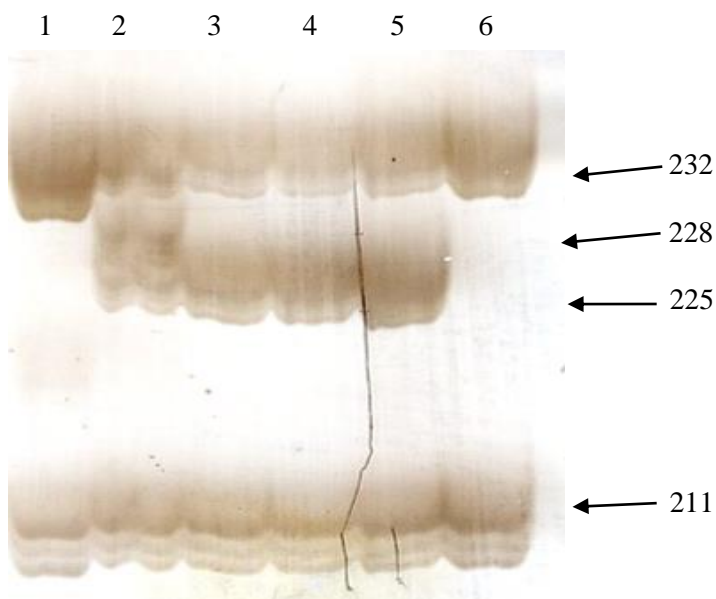
Poznámka: ? - přítomnost dané alely není jistá; **tučně** - extra alela, kterou Boches (2005) u daného mikrosatelitního lokusu neuvádí, ale při mých experimentech se amplifikovala; podtržené - při mých experimentech nedošlo k amplifikaci alely/lokusu i když Boches (2005) uvádí, že se u daného mikrosatelitního lokusu vyskytovat měla.

Pro identifikaci kultivarů brusnice chocholičnaté jsem použila mikrosatelitní lokusy CA23F, CA169F, CA190R, CA787F, NA398, NA961 a VCC\_I8 (Boches, 2005). Pro hodnocení mikrosatelitů je důležité určení optimálních podmínek PCR amplifikace (například stanovení vhodné teploty *annealingu*) (tabulka 9), dále doba elektroforetické separace (tabulka 9) a také výsledný obraz v gelu (obrázek 3, 4 a 5). Páry primerů k těmto 7 mikrosatelitním lokusům přinesly v gelu dobře hodnotitelné produkty a zároveň nevytvářely nespecifické produkty, které by znemožňovaly hodnocení, tedy určení genotypů těchto mikrosatelitních lokusů.



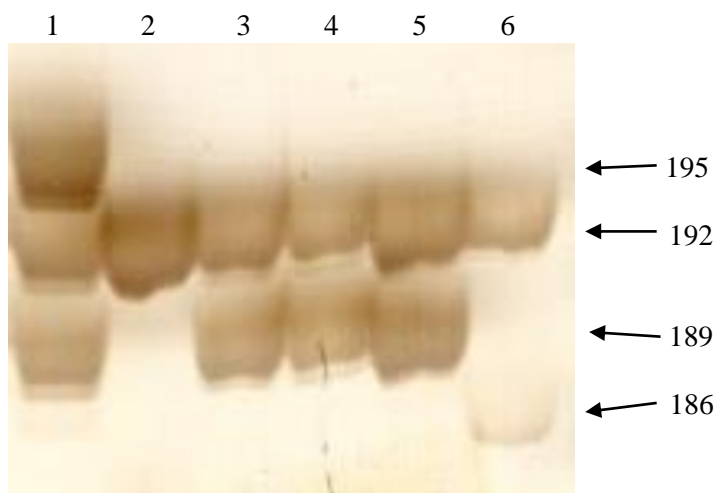
**Obrázek 3:** Elektroforeticky separované produkty PCR amplifikace mikrosatelitního lokusu CA169.

Čísla 1–11 označují kultivary: 1 - 'Rubel', 2 a 3 - 'Bluejay', 4–7 - neurčeno, 8 - 'Draper', 9 - 'Aurora', 10 - 'Bluecrop', 11 - neurčeno. Šipkami jsou vyznačeny alely daného mikrosatelitního lokusu. Teplota *annealingu* byla 56 °C a čas elektroforetické separace byl 90 minut.



**Obrázek 4:** Elektroforeticky separované produkty PCR amplifikace mikrosatelitního lokusu NA398.

Čísla 1–8 označují kultivary: 1 - 'Bluecrop', 2 - 'Patriot', 3–5 - 'Sierra', 6 - 'Elliott'. Šípkami jsou vyznačeny alely daného mikrosatelitního lokusu. Teplota *annealingu* byla 65 °C a čas elektroforetické separace byl 120 minut.



**Obrázek 5:** Elektroforeticky separované produkty PCR amplifikace mikrosatelitního lokusu NA961.

Čísla 1–6 označují kultivary: 1 - 'Bluecrop', 2 - 'Patriot', 3–5 - 'Sierra', 6 - 'Elliott'. Šípkami jsou vyznačeny alely daného mikrosatelitního lokusu. Teplota *annealingu* byla 63 °C a čas elektroforetické separace byl 150 minut.

## 6 Diskuze

V experimentální části mé diplomové práce jsem použila pro identifikaci kultivarů brusnice chocholičnaté a jejích kříženců dvěma systémy, a to první dle Boches (2005) a druhý dle Akagi *et al.* (2010). Oba tyto systémy jsou založeny na amplifikaci polymorfních mikrosatelitních lokusů a jsou na sobě nezávislé.

Systém k identifikaci, který navrhnul Boches (2005) obsahuje 9 mikrosatelitních lokusů, které Boches (2005) vybral jako vhodné pro použití i v podmínkách jiných laboratoří. Těmito mikrosatelity jsou CA23F, CA94F, CA169F, CA190R, CA787F, CA855F, NA398, NA961 a VCC\_I8. Výhodou tohoto systému je to, že u 69 kultivarů především brusnice chocholičnaté k těmto mikrosatelitním lokusům Boches (2005) uvedl genotypy. Tyto genotypy mi sloužily pro srovnání s genetickým profilem kultivarů mnou testovaných rostlin.

Ačkoliv Boches (2005) uvedl, že produkty 9 mikrosatelitů by měly být spolehlivé a snadno hodnotitelné. V mých experimentech některé z těchto mikrosatelitů však nebyly vhodné pro určení genotypů kultivarů. Konkrétně mikrosatelitní lokusy CA855F a CA94F, které po amplifikaci nepřinášely dobře hodnotitelný produkt. U mikrosatelitního lokusu CA855 nebylo možné přesně určit velikosti alel, protože se mnohdy lišily jen o jeden nukleotid. Navíc se po amplifikaci daného mikrosatelitního lokusu u některých kultivarů nevyskytovaly alely, které Boches (2005) u daného kultivaru uváděl. U zbývajících 7 mikrosatelitních lokusů byl však produkt dobře hodnotitelný a odpovídal genotypům uváděným Boches (2005).

Určila jsem genetické profily 7 mikrosatelitních lokusů u všech vzorků DNA pocházejících z 53 rostlin brusnice chocholičnaté a jejích kříženců a díky genetickým profilům, které uvedl Boches (2005) se mi povedlo přiřadit 36 rostlin ke kultivarům. Většina genotypů, které uvádí Boches (2005), odpovídala mnou zjištěným genotypům testovaných kultivarů brusnice chocholičnaté a jejích kříženců. Ne všechny mnou testované odrůdy však odpovídaly svým genetickým profilem genotypům, které uvedl Boches (2005) (tabulka 12).

**Tabulka 12:** 7 kultivarů vykazujících odlišnosti mezi mnou experimentálně zjištěnými genotypy a genotypy, které uvádí Boches (2005).

Odrůda	Nekompatibilita s Boches (2005)
'Bluejay' východ	CA23F - žádný produkt
'Blueray' mladší	NA961 - chybějící alela
'Legacy' mladší	NA961 - nejasná amplifikace jedné alely
'Meader'	VCC_I8 - chybějící alela
'Patriot' mladší	CA23F - extra alela
'Rubel'	CA23F - extra alela NA961 - nejasná amplifikace jedné extra alely
'Sierra'	VCC_I8 - chybějící alela

Důvodů, proč některé mnou určené genotypy neodpovídaly genotypům v publikaci od Boches (2005), mohlo být několik. Extra alela mohla například vzniknout potenciální kontaminací při izolaci DNA, kdy jsem do vzorku vnesla i část DNA z jiného kultivaru, a to způsobilo vytvoření extra alely ve výsledném genetickém profilu u nějakého z mikrosatelitních lokusů. To, že by se DNA vzorku kontaminovala pouze určitou částí cizorodé DNA, která by obsahovala pouze jednu neodpovídající alelu k jedinému mikrosatelitu, je však vysoce nepravděpodobné. Důvodem toho, že se ve výsledném genetickém profilu nenacházela některá z alel, která tam podle genetického profilu, který uvádí Boches (2005) měla být, mohlo být poškození DNA v místě mikrosatelitního lokusu, kde se alela nacházela.

Také je možné, že Boches (2005) udělal chybu při vyhodnocení některých mikrosatelitních lokusů a uvedl pak chybné genotypy. Jelikož je Boches (2005) jediný, kdo uvádí genotypy mikrosatelitních lokusů u kultivarů brusnice chocholičnaté, není možné je srovnat s jinými literárními zdroji a ověřit tak jejich správnost. Nejpravděpodobnějším důvodem nesrovnalostí mezi genotypy je však mutace v místě daného mikrosatelitního lokusu. Mutační rychlost mikrosatelitů je totiž poměrně vysoká ( $10^{-2}$  až  $10^{-6}$  /lokus/generace) (Li *et al.*, 2002; Lian *et al.*, 2006), je proto možné, že množением kultivarů přes rostlinné explantáty, kde tento pro buňku stresující postup může znamenat například oxidační stres, tedy zvýšenou koncentraci ROS (reaktivních forem kyslíku), a ta vede ke vzniku mutací, kde se nachází většina mikrosatelitů (Ramel, 1997; Nečas, 2006; Jurka *et al.*, 2007; Paprštein *et al.*, 2009; Pospíšilová *et al.*,

2013). Fenotypově odrůda tedy vykazuje vlastnosti a morfologické znaky, které mít má, při testování genetických markerů se však mohou vyskytnout nesrovnalosti.

Jak již bylo zmíněno, produkty mikrosatelitního lokusu CA855F nebylo možné spolehlivě vyhodnotit, ale jak uvádím ve výsledcích, sloužily produkty tohoto mikrosatelitního lokusu jako určité "čárové kódy" pro srovnání kultivarů brusnice chocholičnaté mezi sebou. Tyto "čárové kódy" byly použity jako podpůrný prostředek při identifikaci kultivarů, které byly původně prodávány pod chybným názvem.

System, který navrhli Akagi *et al.* (2010) obsahoval 11 mikrosatelitních lokusů. Z těchto 11 mikrosatelitních lokusů se jich 6 nachází mezi původními 30 mikrosatelitními lokusy dle Boches *et al.* (2005). Mikrosatelitní markery z tohoto systému jsou Vacc.01 (= VCC\_J9), Vacc.03 (= VCC\_J5), Vacc.04 (= VCC\_K4), Vacc.06 (= VCC\_I2), Vacc.09 (= VCC\_S10), Vacc.17, Vacc.19, Vacc.22, Vacc.23 a Vacc.24 - v závorkách jsou uvedeny názvy mikrosatelitních lokusů dle Boches *et al.* (2005). Tyto mikrosatelitní lokusy měly spolehlivý produkt, ale nevýhodou je, že Akagi *et al.* (2010) neuvádějí k mikrosatelitním lokusům genotypy.

Boches (2005) však ve své publikaci uvedl genotypy mikrosatelitních lokusů Vacc.01 (= VCC\_J9), Vacc.03 (= VCC\_J5), Vacc.04 (= VCC\_K4), Vacc.06 (= VCC\_I2), a to k 69 kultivarům především brusnice chocholičnaté. Boches (2005) však k těmto mikrosatelitním lokusům použil jiné páry primerů, nejspíš z tohoto důvodu se tedy genotypy těchto mikrosatelitních lokusů neshodují s mnou zjištěnými genetickými profily kultivarů především brusnice chocholičnaté. Nejčastěji se v mnou zjištěných genotypech nacházely extra alely (obvykle 1 nebo 2 alely v jednom mikrosatelitním lokusu), které Boches (2005) ve svých genetických profilech neuváděl. Některé mikrosatelity vykazovaly však vysoký polymorfismus a díky tomu mohly být jejich produkty použity opět jako určité "čárové kódy" pro porovnání kultivarů mezi sebou. Mikrosatelit, který měl vysoký polymorfismus a zároveň přinášel velmi spolehlivý produkt u všech testovaných kultivarů byl Vacc.03, ten byl tedy použit jako podpůrný prostředek při identifikaci kultivarů brusnice chocholičnaté a jejich kříženců.

Testovala jsem celkem 53 vzorků DNA izolovaných z 53 rostlin, což mělo být celkem 32 kultivarů brusnice chocholičnaté a jejich kříženců. U 24 odrůd jsem díky známým genotypům mikrosatelitních lokusů, které uvedl Boches (2005) zjistila, že jedinci s jejichž vzorky DNA jsem pracovala, nepatří ke kultivarům, pod jejichž názvy byly prodávány.

V celém dodavatelsko-odběratelském řetězci mohou snadno nastat chyby a kultivary mohou být zaměněny. Může se stát, že už množitelská firma použije nesprávně určený rostlinný materiál. Hinrichsen *et al.* (2008) také uvádějí, že problémem může být stále rostoucí poptávka v zemích mimo přirozený výskyt brusnice chocholičnaté, tedy mimo Severní Ameriku. Snaha co nejvíce urychlit množení rostlin a zároveň vyvážit co nejvíce kultivarů ve stejnou dobu vedlo velmi často k záměně pojmenování kultivarů. Hinrichsen *et al.* (2008) uvádějí jako příklad Chile, kam se asi před dvěma desetiletími začaly ve velkém dovážet kultivary brusnice chocholičnaté a docházelo k poměrně častým záměnám v pojmenování jednotlivých odrůd. Je možné, že toto je případ u mnou testovaných 3 rostlin, které byly prodávány pod názvem 'O'Neal' a byly získány ze 2 různých zdrojů. Prokázala jsem, že všechny 3 rostliny mají v rámci amplifikovaných mikrosatelitních lokusů stejný genetický profil, tudíž se jedná o stejnou odrůdu, ale tento genetický profil neodpovídá genetickému profilu odrůdy 'O'Neal', který uvedl Boches (2005). Genetický profil však odpovídá odrůdě 'Olympia'. Je tedy možné, že už při dovozu tohoto kultivaru do Evropy došlo k záměně pojmenování, a to, co je v ČR považováno za odrůdu 'O'Neal' je ve skutečnosti 'Olympia'. Tato odrůda není a nebyla v posledních nejméně 10 letech v nabídce prodeje v ČR.

Dost často mohou být kultivary zaměněny také v rámci prodeje. V rámci distribuce a skladování mohou zaměstnanci snadno zaměnit štítky s pojmenováním odrůd. Příklady toho, jak jsou odrůdy v obchodech značeny jsou zachyceny na obrázku 6 a 7.



**Obrázek č. 6:** Brusnice chocholičnatá odrůda 'Reka' v obchodním řetězci OBI (Foto: autorka).



**Obrázek č. 7:** Brusnice chocholičnatá odrůda 'Pink Berry' v obchodním řetězci OBI (Foto: autorka).

Na obrázku 6 je štítek s názvem odrůdy připevněn přímo na rostlinu pomocí provázku nebo gumičky. Na první pohled neexistuje riziko záměny, ale v případě přetržení provázku může dojít k nevratné ztrátě informace, kterou štítek obsahuje. Další způsob značení je vidět na obrázku 7. Štítek s názvem odrůdy je navlečený na plastovou tyčku zapíchnutou do květináče. Jednou z možností ztráty informace je odpadnutí tohoto štítku z plastové tyčky (jak je vidět na obrázku 7 - v květináči na pravé straně chybí štítek). Další častý problém, který mohou způsobit zaměstnanci i zákazníci, je přehození cedulek mezi květináči s rostlinami jiných kultivarů. Toto se může stát už při transportu rostlin, při neopatrném zacházení, kdy cedulky z květináčů vypadnou. V tomto případě však může pomoci etiketa s názvem odrůdy nalepená přímo na květináči, jak lze vidět na obrázku 7.

Má práce byla první prací, která se zabývala srovnáním mikrosatelitních systémů pro identifikaci kultivarů brusnice chocholičnaté a jejích kříženců v ČR. Testovala jsem 9 párů primerů ze systému dle Boches (2005) a 11 párů primerů ze systému dle Akagi *et al.* (2010). Pro určení genotypů ke kultivarům, které jsem testovala, jsem však použila pouze 7 mikrosatelitních lokusů. U těchto mikrosatelitů jsem mohla spolehlivě vyhodnotit genetický profil a taky ho srovnat s již známými genotypy (Boches, 2005). Bylo by ale vhodné rozšířit seznam kultivarů se známými genotypy k těmto



mikrosatelitním markerům, který momentálně obsahuje genotypy pouze k 69 kultivarům brusnice chocholičnaté a jejím křížencům. Rovněž by bylo vhodné získat genotypy ke všem 11 mikrosatelitním lokusům od Akagi *et al.* (2010).

Dále bych doporučovala využití i třetího systému pro identifikaci kultivarů především brusnice chocholičnaté dle Hinrichsena *et al.* (2008), který obsahuje 12 mikrosatelitních lokusů - CA-344, CA-421, CA-794, CA-855, NA-41, NA-741, NA-1040, VCC-H9, VCC-I2, VCC-J5, VCC-J9 a VCC-K4. Tento systém má výhodu v tom, že tyto mikrosatelitní lokusy jsou výběrem ze 30 mikrosatelitních lokusů původně použitými Boches *et al.* (2005) a Boches (2005) k nim uvedl genotypy opět pro 69 kultivarů brusnice chocholičnaté. Jeden z mikrosatelitů byl však součástí i systému 9 mikrosatelitních markerů dle Boches (2005), který jsem použila ve své práci, a to mikrosatelit CA-855. Produkty amplifikace tohoto lokusu však byly obtížně hodnotitelné. Nebylo možné přesně určit velikosti alel, protože se mnohdy lišily jen o jeden nukleotid. Navíc se po amplifikaci daného mikrosatelitního lokusu u některých kultivarů nevyskytovaly alely, které Boches (2005) u daného kultivaru uváděl. Z těchto důvodů jsem tento mikrosatelit pro určení genotypů kultivarů nepoužila a doporučila bych zkusit znovu zoptimalizovat podmínky PCR a zkontrolovat správnost genotypů, které uvedl Boches (2005).

Do budoucna by bylo také vhodné do patentů kultivarů brusnice chocholičnaté kromě morfologie uvést i genetickou charakteristiku daných kultivarů. Kdyby se v patentech nacházela například genetická charakteristika v rámci mikrosatelitů, daly by se pak kultivary jasně identifikovat. U problematických odrůd by se daly použít také další systémy pro identifikaci, například SCAR markery, u kterých se používá k amplifikaci různých oblastí genomu systém párů primerů, výsledkem je pak soubor produktů - určitý vzor, který je specifický pro každou odrůdu (Kang-Hee *et al.*, 2018). V rámci pěstitelství je také třeba srovnávat u jednotlivých kultivarů i morfologii, dobu dozrávání a další charakteristiky, které mohou pomoci ke správnému určení.

## 7 Závěr

V rámci své diplomové práce jsem metodou PCR amplifikace otestovala celkem 20 párů primerů. Jednalo se o 2 mikrosatelitní systémy pro identifikaci kultivarů brusnice chocholičnaté a jejích kříženců. Jeden systém obsahoval 9 polymorfních mikrosatelitních lokusů (CA23F, CA94F, CA169F, CA190R, CA787F, CA855F, NA398, NA961 a VCC\_I8) a druhý systém zahrnoval 11 polymorfních mikrosatelitních lokusů (Vacc.01, Vacc.03, Vacc.04, Vacc.05, Vacc.06, Vacc.09, Vacc.17, Vacc.19, Vacc.22, Vacc.23 a Vacc.24).

Po mém testování jsem vybrala 7 mikrosatelitů, které měly dobře hodnotitelné produkty. Testovala jsem DNA celkem 53 rostlin, mělo se jednat o 32 různých kultivarů brusnice chocholičnaté a jejích kříženců. Díky známým genotypům vybraných 7 mikrosatelitních lokusů se mi povedlo určit kultivary brusnice chocholičnaté celkem u 36 testovaných rostlin. Pouze u 22 rostlin jsem však ověřila, že původní název kultivaru opravdu odpovídá jeho genetickému profilu.

Prokázala jsem, že velké množství kultivarů brusnice chocholičnaté je prodáváno pod nesprávnými názvy. K záměně pojmenování rostlin může snadno dojít v dodavatelsko-odběratelském řetězci, při neopatrném zacházení během transportu a prodeje nebo přímo v množitelské firmě, kde se mohly vzorky kultivarů zaměnit nebo se k založení kultury použije již nesprávně určený rostlinný materiál.

Do budoucna by bylo vhodné systémy, se kterými jsem pracovala, otestovat na všech dostupných kultivarech a vytvořit obsáhlejší seznam genotypů. Potenciál by také mohl mít třetí nalezený mikrosatelitní systém na identifikaci brusnice chocholičnaté obsahující 12 mikrosatelitních lokusů. Tento systém jsem však netestovala. Dále by se dala identifikace kultivarů zpřesnit a sjednotit tím, že by se v patentech kultivarů kromě morfologického popisu uváděla i genetická charakteristika, využít by se mohly například právě mikrosatelitní markery.

## 8 Literatura

Bärtels A. (2011): Dřeviny od A do Z. Knižní klub, Praha.

Bassil N., Bidani A., Nyberg A., Hummer K., Rowland L. J. (2020): Microsatellite markers confirm identity of blueberry (*Vaccinium* spp.) plants in the USDA-ARS National Clonal Germplasm Repository collection. *Genetic Resources and Crop Evolution* 67: 393–409.

Boches P. (2005): Microsatellite marker development and molecular characterization in highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) and *Vaccinium* species. Disertační práce. Navštíveno na: [https://ir.library.oregonstate.edu/concern/graduate\\_thesis\\_or\\_dissertations/4f16c609k](https://ir.library.oregonstate.edu/concern/graduate_thesis_or_dissertations/4f16c609k), dne 10. 3. 2023.

Boches P. S., Bassil N. V., Rowland L. J. (2005): Microsatellite markers for *Vaccinium* from EST and genomic libraries. *Molecular Ecology Notes* 5: 657–660.

Boches P., Bassil N. V., Rowland, L. J. (2006): Genetic diversity in the highbush blueberry evaluated with microsatellite markers, *Journal of the American Society for Horticultural Science* 131: 674–686.

Brevis P. A., Bassil N. V., Ballington J. R., Hancock J. F. (2008): Impact of wide hybridization on highbush blueberry breeding. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 133: 427–437.

Buteler M. I., LaBonte D. R., Jarret R. L., Macchiavelli R. E. (2002): Microsatellite-based paternity analysis in polyploid sweetpotato. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 127: 392–396.

Butkus V., Pliszka K. (1993): The highbush blueberry – a new cultivated species. *Acta Horticulturae* 346: 81–86.

Butler J. M. (2006): Genetics and genomics of core short tandem repeat loci used in human identity testing. *Journal of Forensic Sciences* 51: 253-65.

Caihua G., Xiaodong R. S., Mason A., Jiana L., Wei W., Meili X., Donghui F. (2013). Revisiting an important component of plant genomes: microsatellites. *Functional Plant Biology* 40: 645–661.

- Casterejón A. D. R., Eichholz I., Rohn S., Kroh L. W., Huyskens-Keil (2008): Phenolic profile and antioxidant activity of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) during fruit maturation and ripening. *Food Chemistry* 109: 564–572.
- Cho K. H., Park S. J., Kim S. J., Kim S. H., Lee H. C., Kim M. Y., Chun, J. A. (2017): Blueberry cultivar identification using random amplified polymorphic DNA and sequence-characterized amplified region markers. *Horticultural Science* 52: 1483–1489.
- Crollius H. R., Jaillon O., Dasilva C., Ozouf-Costaz C., Fizames C., Fischer C., Bouneau L., Billault A., Quetier F., Saurin W., Bernot A., Weissenbach J. (2000): Characterization and repeat analysis of the compact genome of the freshwater pufferfish *Tetraodon nigroviridis*. *Genome Research* 10: 939–949.
- Csete K., Beer Z., Varga T. (2005): Prenatal and newborn paternity testing with DNA analysis. *Forensic Science International* 147: 57–60.
- Danihelka J., Chrtěk J. Jr., Kaplan Z. (2012): Seznam cévnatých rostlin květeny České republiky. *Preslia* 84: 647–811.
- Day J. W., Ricker K., Jacobsen J. F., Rasmussen L. J., Dick K. A., Kress W., Schneider C., Koch M. C., Beilman G. J., Harrison A. R., Dalton J. C., Ranum L. P. W. (2003): Myotonic dystrophy type 2 - Molecular, diagnostic and clinical spectrum. *Neurology* 60: 657–664.
- Finsterer J. (2002): Myotonic dystrophy type 2. *European Journal of Neurology* 5: 441–447.
- Galletta G. J., Ballington J. R. (1996): Chapter 1: Blueberries, cranberries, and lingonberries. In: Janick J., J. N. Moore (ed.): *Fruit Breeding. Vine and Small Fruits Crops*. John Wiley and Sons, New York 2: 1–107.
- Gato E., Rosalowska A., Martínez-Guituán M., Lores M., Bou G., Pérez A. (2020): Anti-adhesive activity of a *Vaccinium corymbosum* polyphenolic extract targeting intestinal colonization by *Klebsiella pneumoniae*. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 132: 110885.
- Guo F., Shen H., Tian H., Jin P., Jiang X. (2014): Development of a 24-locus multiplex system to incorporate the core loci in the Combined DNA Index System (CODIS) and the European Standard Set (ESS). *Forensic Science International: Genetics* 8: 44–54.

- Gupta K., Chou M. Y., Howell A., Wobbe C., Grady R., Stapleton A. E. (2007): Cranberry products inhibit adherence of P-Fimbriated *Escherichia coli* to primary cultured bladder and vaginal epithelial cells. *The Journal of Urology* 177: 2357–2360.
- Haghighi K., Hancock J. F. (1992): DNA restriction fragment length variability in genomes of highbush blueberry. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 27: 44–47.
- Hares D. R. (2015): Selection and implementation of expanded CODIS core loci in the United States. *Forensic Science International: Genetics* 17: 33–34.
- Hejny S., Slavík B., Hroudá L., Skalický V. (1990): *Květena České republiky 2*. Academia, Praha.
- Hill J. A., Olson E. N. (2012): *Muscle – Fundamental Biology and Mechanisms of Disease*. Academic Press.
- Hinrichsen P., Castro M. H., Ravest G., Rojas G., Méndez M. A., Bassil N., Schick C. E. M. (2008): Minimal microsatellite marker panel for fingerprinting blueberry cultivars. *Acta Horticulturae* 810: 173–180.
- Holton T. A. (2001): Plant genotyping by analysis of microsatellites. In: Henry R. J. (ed.): *Plant genotyping: the DNA fingerprinting of plants*. CABI, Wallingford.
- Howell A. B., Botto H., Combescure C., Blanc-Potard A. B., Gausa L., Matsumoto T., Tenke P., Sotto A., Lavigne J. P. (2010): Dosage effect on uropathogenic *Escherichia coli* anti-adhesion activity in urine following consumption of cranberry powder standardized for proanthocyanidin content: a multicentric randomized double blind study. *BMC Infectious Diseases* 10: 94.
- Huang Q. Y., Xu F. H., Shen H., Deng H. Y., Liu Y. J., Liu Y. Z., Li J. L., Recker R. R., Deng H. W. (2002): Mutation patterns at dinucleotide microsatellite loci in humans. *The American Journal of Human Genetics* 70: 625–34.
- Jurka J., Kapitonov V., Kohany O., Jurka M. V. (2007): Repetitive sequences in complex genomes: structure and evolution. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 8: 241–259.
- Kalia R. K., Rai M. K., Kalia S., Singh R., Dhawan A. K. (2011): Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. *Euphytica* 177: 309–334.

- Kuhl D. P. A., Caskey C. T. (1993): Trinucleotide repeats and genome variation. *Current Opinion in Genetics and Development* 3: 404–407.
- Leclercq S., Rivals E., Jarne P. (2010): DNA slippage occurs at microsatellite loci without minimal threshold length in humans: a comparative genomic approach. *Genome Biology and Evolution* 2: 325–335.
- Li G., Park Y.-J. (2012): SCAR markers for discriminating species of two genera of medical plants, *Liriope* and *Ophiopogon*. *Genetics and Molecular Research* 11: 2987–2996.
- Li Y., Korol A. B., Fahima T., Beiles A., Nevo E. (2002): Microsatellites: genomic distribution, putative functions, and mutational mechanisms: a review. *Molecular Ecology* 11: 2453–2465.
- Li Y., Korol A. B., Fahima T., Nevo E. (2004): Microsatellites within genes: Structure, function, and evolution. *Molecular Biology and Evolution* 21: 991–1007.
- Lian Ch. L., Wadud A., Geng Q., Shimatani K., Hogetsu T. (2006): An improved technique for isolating codominant compound microsatellite markers. *Journal of Plant Research* 119: 415–417.
- Madesis P., Ganopoulos I., TsaftarisStella A., Kantartzi K. (2013): *Microsatellites: Methods and Protocols*. Humana Press, New York.
- Meola G., Cardani R. (2015): Myotonic Dystrophy Type 2: An update on clinical aspects, genetic and pathomolecular mechanism. *Journal of Neuromuscular Diseases* 2: 59–71.
- Moxon E. R., Wills Ch. (1999): DNA microsatellites: Agents of evolution? *Scientific American* 280: 94–99.
- Nadir E., Margalit H., Gallily T., Ben-Sasson S. A. (1996): Microsatellite spreading in the human genome: evolutionary mechanisms and structural implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93: 6470–6475.
- Nečas E. (2006): *Obecná patologická fyziologie*. Karolinum, Praha.
- Neto C. C. (2007): Cranberry and blueberry: Evidence for protective effects against cancer and vascular diseases. *Molecular Nutrition & Food Research* 51: 652–664.

- Nussbaum R. L., McInnes R. R., Willard H. F. (2004): *Klinická genetika* (6. vydání). Triton.
- Oliveira, E. J., Pádua, J. G., Zucchi, M. I., Vencovsky, R. (2006): Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology* 29: 294-307.
- Paprštein F. *et al.* (2009): Technologie pěstování kanadské borůvky (*Vaccinium corymbosum* L.). Výzkumný a šlechtitelský ústav ovocnářský, Holovousy.
- Polashock J. *et* Vorsa N. (2002): Cranberry transformation and regeneration. In: Khachatourians G. G., McHughen A., Scorza R., Nip W. K., Hui Y. H. (Eds.) *Transgenic plants and crops*. Marcel Dekker, New York.
- Pospíšilová Š., Dvořáková D., Mayer J. (2013): *Molekulární hematologie*. Praha: Galén.
- Ramel C. (1997): Mini- and microsatellites. *Environmental Health Perspectives* 105: 781–789.
- Retamales J. B. *et* Hancock J. F. (2012): *Blueberries*. CABI, Wallingford.
- Reddy R. N., Madhusudhana R., Mohan S. M., Chakravarthi D. V. N., Seetharama N. (2012): Characterization, development and mapping of Unigene-derived microsatellite markers in sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]. *Molecular Breeding* 29: 543–564.
- Rimando A. M., Kalt W., Magee J. B., Dewey J., Ballington J. R. (2004): Resveratrol, pterostilbene, and piceatannol in *Vaccinium* berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 4713–4719.
- Rosa R., James C. M., Tobutt K. R. (2004): Using microsatellites for paternity testing in olive progenies. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 39: 351–354.
- Rowland L. J., Hancock J. F., Bassil N. V. (2011): Blueberry. In: Folta K., Kole C. (Eds.) *Genetics, genomics, and breeding of berries*. Science Publishers, Enfield.
- Sahoo D., Nayak M., Jena A., Bhattacharyay D., Pandey M. (2020): *Vaccinium corymbosum* L. derived phytochemicals against diarrhea. *Journal of Pharmaceutical Research International* 32: 105–108.
- Shewale J. G., Liu R. H. (2013): *Forensic DNA analysis: current practices and emerging technologies*. CRC Press, Boca Raton.

- Silva S., Costa E. M., Costa M. R., Pereira M. F., Pereira J. O., Soares J. C., Pintado M. M. (2015): Aqueous extracts of *Vaccinium corymbosum* as inhibitors of *Staphylococcus aureus*. *Food Control* 51: 314–320.
- Skupień K. (2006): Chemical composition of selected cultivars of highbush blueberry fruit (*Vaccinium corymbosum* L.). *Folia Horticulturae* 18: 47–56.
- Song G.-Q., Hancock J. F. (2011): *Vaccinium*. In: Kole C. (Ed.): *Wild crop relatives: genomic and breeding resources temperate fruits*. Springer Science & Business Media, Berlin.
- Strik B. C., Finn C. E., Moore P. P. (2014): *Blueberry Cultivars for the Pacific Northwest*. PNW 656. Corvallis, Oregon: Oregon State University. Extension service.
- Ulloa C. U. *et al.* (2017): An integrated assessment of the vascular plant species of the Americas. *Science* 358: 1614–1617.
- Vander Kloet, S. P. (1983): The taxonomy of *Vaccinium* § *Oxycoccus*. *Rhodora* 85: 1–43.
- Weber J. L., May P. E. (1989): Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *The American Journal of Human Genetics* 44: 388–396.
- Wu X., Wang T. T. Y., Prior R. L., Pehrsson P. R. (2018): Prevention of Atherosclerosis by Berries: The Case of Blueberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 66: 9172–9188.
- Young E. (2019): Fruit Quality Evaluation of a Mapping Population and Single Nucleotide Polymorphic (SNP) Marker Discovery in Blueberry (*Vaccinium*) Species. *Disertační práce*. Navštíveno na: <https://repository.lib.ncsu.edu/bitstream/handle/1840.20/37426/etd.pdf?sequence=1>, dne: 10. 6. 2023.
- Zane L., Bargelloni L., Patamello T. (2002): Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology* 11: 1–16.



## **9 Patenty**

Akagi I., Hirahara T., Kunitake K., Osada R., Sugita W., Utoyama H (2010): Method for discriminating blueberry cultivar. JP2010094070A.

Hancock J. F. (2003a): United States Plant Patent. Blueberry plant denominated 'Aurora'. USPP15185P3.

Hancock J. F. (2003b): United States Plant Patent. Blueberry plant denominated 'Draper'. USPP15103P2.

Kang-Hee Ch., Seo-Jun P., Se-Hee K., Han-Chan L., Dae-Hyun K. (2018): SCAR marker for identification of blueberries and use thereof. KR20180049711A.