

Mendelova univerzita v Brně



**Zahradnická
fakulta**

**Využití molekulárních markerů při šlechtění
kanadských borůvek**

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce
Mgr. Jana Raddová, Ph.D.

Vypracoval
Petr Hynek

Lednice 2015



ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Petr Hynek

Studijní program: Zahradnické technologie

Obor: Zahradnictví

Vedoucí práce: Mgr. Jana Raddová, Ph.D.

Název práce: **Využití molekulárních markerů při šlechtění kanadských borůvek**

Zásady pro vypracování:

1. Cílem práce bude vytvořit přehled nejnovějších poznatků při studiu kanadských borůvek (*Vaccinium corymbosum*) pomocí molekulárních metod.
2. Bude třeba prostudovat literaturu týkající se šlechtění kanadských borůvek (*Vaccinium corymbosum*) a literaturu týkající se molekulárních metod při analýzách rostlinné DNA (včetně izolací rostlinné DNA). Při zpracování tématu bude třeba prostudovat literaturu týkající se molekulárních markerů při analýzách rostlinné DNA.
3. V závěru práce bude vypracován přehled poznatků o metodách založených na PCR a dále jejich použití při studiu kanadských borůvek (*Vaccinium corymbosum*). Bude zohledněno, jak tyto poznatky lze využít ve šlechtění tohoto druhu.

Rozsah práce: 30

Literatura:

1. Badenes ML, Garcés A, Romero C, Romero M, Clavé J, Rovira M, Llácer G (2003) Genetic diversity of introduced and local Spanish persimmon cultivars revealed by RAPD markers. *Genet Res Crop Evol* 50:579–585
2. Giongo L, Ieri F, Vrhovsek U, Grisenti M, Eccher M and Mattivi F. (2006b.) Characterization of *Vaccinium* cultivars: horticultural and antioxidant profile. *Acta Hort.* 715:147–151.
3. Giongo L, Vendramin E, Quarta R, Dettori MT, Verde I and Bergamini A (2006) Use of RAPD analysis to characterize *Vaccinium* accessions. *Acta Hort.* 715:153–156
4. Kałużna M, Puławska J, Meszka B (2013) A new bacterial disease on blueberry (*Vaccinium Corymbosum*) caused by *Pseudomonas* spp. *J of Plant Protect Research* 53, No. 1: 32-36
5. Palmieri L, Saviane A, Sordo M, Grando MS and Giongo L (2009) Blueberry: germplasm characterization and food traceability by the use of molecular markers. *Acta Hort. (ISHS)* 810:167-172

Datum zadání: prosinec 2013

Datum odevzdání: duben 2015

Petr Hynek
Autor práce

Mgr. Jana Raddová, Ph.D.
Vedoucí práce

Mgr. Miroslav Baránek, Ph.D.
Vedoucí ústavu

doc. Ing. Robert Pokluda, Ph.D.
Děkan ZF MENDELU

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma **Využití molekulárních markerů při šlechtění kanadských borůvek** vypracoval samostatně a použil jen pramenů, které cituji a uvádím v příloženém soupisu literatury.

Souhlasím, aby práce byla uložena v knihovně Zahradnické fakulty Mendelovy univerzity v Brně a zpřístupněna ke studijním účelům.

V Lednici, dne.....

Podpis autora

HYNEK, Petr. *Využití molekulárních markerů při šlechtění kanadských borůvek.*

Bakalářská práce. 2015. Mendelova univerzita v Brně. Zahradnická Fakulta. Lednice.

Vedoucí práce Mgr. Jana Raddová, Ph.D.

Poděkování

Rád bych poděkoval vedoucímu mé bakalářské práce Mgr. Janě Raddové, Ph.D. za věnovaný čas, trpělivost a rady při konzultacích.

Obsah

1. ÚVOD	- 7 -
2. CÍL PRÁCE	- 8 -
3. LITERÁRNÍ PŘEHLED	- 9 -
3.1 Vaccinium corymbosum L.	- 9 -
3.1.1 Názvosloví.....	- 9 -
3.2.2 Charakteristika rostlin	- 10 -
3.1.3 Původ a rozšíření	- 10 -
3.1.4 Obsahové látky	- 11 -
3.1.5 Agrotechnika	- 14 -
3.1.6 Množení kanadských borůvek	- 16 -
3.1.7 Světová produkce	- 17 -
3.1.8 Škůdci a choroby	- 19 -
3.2 Molekulární metody	- 23 -
3.2.1 Izolace DNA	- 24 -
3.2.2 Metody izolace DNA z rostlin.....	- 24 -
3.2.3 Stanovení koncentrace a čistoty DNA.....	- 25 -
3.2.4 PCR.....	- 27 -
3.2.5 Metody PCR	- 29 -
3.2.6 NGS, genomové a cDNA databáze	- 32 -
3.2.7 Využití molekulárních markerů.....	- 35 -
4. VLASTNÍ KOMENTÁŘ	- 38 -
5. ZÁVĚR	- 41 -
6. SOUHRN, RESUME, KLÍČOVÁ SLOVA	- 42 -
7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	- 43 -

1. ÚVOD

V současné době se u lidí stále více upevňuje vztah mezi potravinami a zdravím. Lidé si stále více všímají vlivu konzumované stravy na funkčnost organismu a to nejen díky výsledkům vědeckých výzkumů.

Rostoucí znalosti o nutričních hodnotách zdravé přírodní stravy vedou k vyšší poptávce po takových potravinách, především po ovoci a zelenině. Mezi drobné ovoce, které si získává stále větší oblibu, patří i tzv. kanadské borůvky (*Vaccinium corymbosum* L.). Jejich popularita je v ČR daleko menší než např. v Severní Americe. Je to dáno především tím, že rozhraní Kanady a USA je jejich původním stanovištěm. V českých lesích se tradičně sbírají plody Brusnice borůvky (*Vaccinium myrtillus* L., dále jen lesní borůvka), její sběr je ale povolen jen pro vlastní spotřebu a komerční pěstování zde neexistuje. Kanadské borůvky si právem na českém trhu získávají své místo, i když pěstitelské plochy jsou zatím velmi malé (několik ha). Produkce plodů z jednoho keře, popř. produkce vztažená na jednotku plochy, je ovšem daleko vyšší než u lesní borůvky. V našich klimatických podmínkách lze vhodným výběrem kultivarů rozložit sklizeň plodů na 3 měsíce.

Šlechtění kanadských borůvek probíhá od začátku 20. století. První odrůdy byly vybrány z volně rostoucích rostlin a postupně se křížily klasickými šlechtitelskými metodami. Rozvoj vědy a především molekulární genetiky v posledních desetiletích umožnil „číst“ sekvence nukleových kyselin a hledat jednotlivé geny kódující genetickou informaci. Díky molekulárním datům dochází také ke změnám v systematice i názvosloví velkého množství rostlin. V této práci popisují několik, v současné době používaných, molekulárních markerů.

Snahy dnešních šlechtitelů jsou směřovány především na větší odolnost vůči biotickým a abiotickým vlivům, ale můžou se zaměřit i na požitek člověka při konzumaci produktu jejich výzkumné práce. „Správně“ modrá barva nebo výraznější křupnutí při prokousnutí slupky mohou borůvky posunout v žebříčku oblíbenosti mnohem výše.

Vzhledem k použití pouze 2 tabulek a 1 obrázku, jsou tyto materiály součástí textové části kapitoly Literární přehled.

2. CÍL PRÁCE

Cílem práce bylo vytvořit přehled nejnovějších poznatků při studiu kanadských borůvek (*Vaccinium corymbosum* L.) pomocí molekulárních metod. Byla prostudována literatura týkající se šlechtění kanadských borůvek a literatura týkající se molekulárních metod při analýzách rostlinné DNA (včetně izolací rostlinné DNA). Byla také sledována problematika týkající se molekulárních markerů při analýzách rostlinné DNA.

V závěru práce byl vypracován přehled poznatků o metodách založených na PCR a dále jejich použití při studiu kanadských borůvek. Bylo zohledněno, jak tyto poznatky lze využít ve šlechtění tohoto druhu.

3. LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 *Vaccinium corymbosum* L.

Říše:	<i>Plantae</i> - rostliny
Podříše:	<i>Tracheobionta</i> - cévnaté rostliny
Oddělení:	<i>Magnoliophyta</i> - krytosemenné
Třída:	<i>Rosopsida</i> - vyšší dvouděložné
Řád:	<i>Ericales</i> - vřesovcotvaré
Čeleď:	<i>Ericaceae</i> - vřesovcovité
Podčeleď:	<i>Vaccinioideae</i> - brusnicové
Rod:	<i>Vaccinium spp</i> - brusnice
Druh:	<i>Vaccinium corymbosum</i> Linnaeus, 1753

3.1.1 Názvosloví

Vaccinium corymbosum L., česky Brusnice chocholičnatá, je někdy označována jako borůvka zahradní, americká, velkoplodá, ale nejčastěji jako borůvka kanadská. Oficiální rodové jméno Brusnice se používá, pouze pokud se v textu vyskytuje společně více druhů rodu *Vaccinium spp*. Většinou se však v odborných i jiných textech, týkajících se problematiky druhu *Vaccinium corymbosum*, používá označení kanadská borůvka, popř. pouze borůvka (tato označení budou proto používána dále v textu). V anglicky mluvících zemích se lze setkat s názvy *northern highbush blueberry*, *blue huckleberry*, *tall huckleberry*, *swamp huckleberry*, *high blueberry* a *swamp blueberry* (GOUGH, 1994).

V současné době má vedoucí postavení na světovém trhu v produkci rostlin i množství kultivarů Fall Creek Farm & Nursery, Inc. Tato školka začala používat pro borůvky rozdělení na *high chill*, *mid chill*, *low chill* a *no chill highbush blueberry* (vysoce, středně, málo mrazuvzdorné a neodolné mrazu). Toto rozdělení v sobě zahrnuje klimatické nároky a vhodnou zeměpisnou polohu pro pěstování (citován elektronický zdroj, dále jen EZ, 1).

3.2.2 Charakteristika rostlin

Kanadské borůvky tvoří vzpřímené i rozložené keře o výšce až 3 m (DOLEJŠÍ *et al.*, 1991) a šířce asi 2 m. Listy jsou opadavé, 3 – 8 cm dlouhé, vejčité nebo kopinaté, krátce řapíkaté, střídavé, celokrajné (BÄRTELS, 2011), obvykle tmavě zelené a na podzim oranžové až karmínově červené. Květenství jsou hroznovitá, květy oboupohlavné, pětičetné, bílé, narůžovělé až růžové. Květy jsou samosprašné, z důvodu většího počtu semen a větší velikosti plodů je vhodné použít k opylování jiný kultivar. Kvetení probíhá v našich podmínkách od začátku května do 10. června (WOLFF a THROLL-KELLER, 2008). Vyzrálé mnohosemenné plody tmavě modré až černé barvy rostou v hroznech a dozrávají dle kultivarů od července do října. Plody na rostlině nedozrávají najednou, ale v průběhu několika týdnů. Nelze je tedy sklízet jednorázově. Cizosprašnost může mít pozitivní vliv na velikost bobulí, počet semen a dobu zrání (EHLENFELDT, 2001). Na Novém Zélandu byl vyšlechtěn kultivar 'Hortblue Petite', který v této oblasti ročně 2-3 krát kvete a 2 krát plodí (SCALZO *et al.*, 2009a).

3.1.3 Původ a rozšíření

Původním stanovištěm borůvky je Severní Amerika. Borůvky sbírali v lesích a na rašeliništích místní domorodci, od kterých je v průběhu 17. století získali evropští kolonizátoři a nakonec se borůvky staly důležitou plodinou v americké historii. Pomohly tak i navázat pozitivní vztahy mezi domorodci a kolonizátory a staly se základní přísadou do čaje vojáků během občanské války.

O zdomácnění a rozvoj pěstování kanadské borůvky se na začátku 20. století zasloužila především Elizabeth C. White (nar. 1871), která se snažila rozšířit pěstování borůvek v obci Whitesbog v New Jersey (USA). V roce 1911 si přečetla publikaci USDA (Ministerstvo zemědělství USA, dále jen USDA) s názvem *Experiments in Blueberry Culture*. Po přečtení se spolu se svým otcem rozhodli kontaktovat autora (Dr. Frederick V. Coville) a nabídli mu spolupráci. V roce 1916 již sklízeli a prodávali první bobule.

White zaměstnala lidi, kteří v okolních lesích hledali vhodné keře k množení, např. bobule musely mít velikost minimálně 5/8 " (cca 16 mm). Odměnou jim byly 2 dolary za keř a také možnost svým jménem keř pojmenovat. Takže Jim Adams pojmenoval kultivar 'Adams', Ralph Harding kultivar 'Harding', Theodore Dunphy kultivar 'Dunphy', Sam Lemmon kultivar 'Sam' a konečně Rube Leek of Chatsworth

kultivar nejdříve 'Rube'. Coville však usoudil, že je to moc obyčejné jméno pro tak aristokratický keř a pojmenoval ho 'Rubel'. Kultivar 'Rubel' se stal základním kamenem při šlechtění kanadských borůvek. Jelikož úspěšnost množení při řízkování byla jen 10%, bylo vybráno pouze 6 kultivarů, které se zdály být vhodné pro komerční pěstování. Původním základem pěstování kanadských borůvek se staly kultivary: 'Rubel', 'Harding', 'Sam', 'Grover', 'Adams' a 'Dunfee' (EZ, 2).

Více než 75% z aktuální borůvkové výměry je osázeno kultivary 'Bluecrop', 'Jersey', 'Weymouth', 'Croatan', 'BlueRay', 'Rubel' a 'Berkeley', které vznikly šlechtěním původního kultivaru 'Rubel' (MAINLAND, 1998).

Dalšími významnými šlechtiteli byli George Darrow (kultivar 'Darrow') a Arlen Draper (kultivar 'Draper') z USDA a Paul Lyrene z University of Florida. K 20. dubnu 2015 existuje 293 popsáných kultivarů, patentově jich je chráněno 36 a 40 jich je v testování (EZ, 3).

Do Evropy byly rostliny dovezeny v průběhu 20. století a na jeho konci se již komerčně pěstovaly především v Německu, Rakousku a Polsku. Po „otevření hranic“ se od roku 1990 začaly dostávat kvalitní a výnosné kultivary i na pulty zahradnických prodejen v ČR a tím i na zahrádky drobných pěstitelů. Zatímco ve světě jsou plantáže s borůvkami běžné (USA, Kanada, Chile, Argentina, Německo, Polsko, Čína, Austrálie, Nový Zéland), v ČR se začaly menší produkční plochy pomalu zakládat až od roku 2005.

3.1.4 Obsahové látky

Šťáva z čerstvých plodů je čirá oproti modré barvě z plodů Brusnice borůvky (*Vaccinium myrtillus* L.). Bobule mají znamenitou chuť i aroma, zároveň jejich biologická hodnota je vysoká (Tab. 1). Obsahují především cukry, pektiny, vlákninu, organické kyseliny, vitamíny, minerální látky jako draslík, železo, fosfor, mangan, vápník, hořčík a sodík (DOLEJŠÍ *et al.*, 1991). Dále jsou v plodech i listech zastoupeny fenolické látky v množství cca 1870 mg/kg (GIONGO *et al.*, 2006) s antioxidační aktivitou (KALT *et al.*, 2003), látky zvyšující obranyschopnost organismu, popř. látky potlačující průjemová onemocnění. Konzumace plodů částečně pomáhá při léčbě cukrovky, dny, revmatismu, poruch paměti, rakoviny, srdečních chorob a problémech se zrakem (SHI *et al.*, 2008). Antioxidační aktivita zůstává zachována i u výrobků z borůvek po průmyslovém zpracování (PAPRŠTEIN *et al.*, 2009b; SCHMIDT *et al.*, 2005). Listy borůvek mají velice podobné pozitivní účinky na lidský organismus jako

plody. Antibakteriální aktivita látek obsažených v listech je dokonce vyšší než v plodech (SILVA *et al.*, 2013). Čaj ze sušených listů je vhodný jak při střevních a žaludečních potížích, tak i za účelem mírného snížení obsahu cholesterolu a cukru v krvi. Má také příznivý vliv na funkci ledvin a močových cest s močopudným účinkem při vyšším zadržování vody v organismu. Při vnější aplikaci mohou výrobky z borůvek zmírnit projevy lupénky a jiných kožních nemocí (RICHTER, 1998).

Tab. 1: Průměrné nutriční hodnoty ve 100 g čerstvých plodů kanadských borůvek

	komerčně pěstované	volně (divoce) rostoucí	jednotka
Voda	84,21	85,48	g
Energie	239(57)	255(61)	kJ (kcal)
Bílkoviny	0,74	1,22	g
Tuky	0,33	0,76	g
Cukry	9,96	6,46	g
- sacharóza	0,11	0,01	g
- glukóza	4,88	3,1	g
- fruktóza	4,97	3,35	g
- škrob	0,03	0	g
Vláknina	2,4	2,6	g
Minerály:			
Vápník, Ca	6	13	mg
Železo, Fe	0,28	0,37	mg
Hořčík, Mg	6	7	mg
Fosfor, P	12	29	mg
Draslík, K	77	75	mg
Sodík, Na	1	6	mg
Zinek, Zn	0,16	0,2	mg
Měď, Cu	0,057	0,03	mg
Mangan, Mn	0,336	2	mg
Vitamíny:			
A	3	8	μg
C	9,7	18,3	mg
B1 - Thiamin	0,037	0,067	mg
B2 - Riboflavin	0,041	0,414	mg
B3 - Niacin	0,418	0,597	mg
B6 - Pyridoxal	0,052	0,026	mg
B9 - Kys. listová	6	33	μg
E - Tokoferol	0,57	1,69	mg
K1 - Fylochinon	19,3	17,2	μg

Zdroj: National Nutrient Database, United States Department of Agriculture (EZ, 4)

Komerčně pěstované rostliny: Basic Report: 09050, Blueberries, raw

Volně (divoce) rostoucí rostliny: Basic Report: 35155, Blueberries, wild, raw

3.1.5 Agrotechnika

- **Klimatické a půdní podmínky**

Z klimatologického hlediska jsou borůvky v našich podmínkách plně mrazuvzdorné, a to i při pěstování v nádobách na terasách a balkónech (některé kultivary vydrží i mráz $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$). S rostoucí otužilostí rostlin pozitivně koreluje obsah glukózy a fruktózy v pletivech rostlin (LEE *et al.*, 2013). Produkční rostliny potřebují dostatek světla, rostliny rostoucí ve stínu produkují menší počet výhonů, květů a plodů (KIM *et al.*, 2011). Jako vhodné lokality pro pěstování se v ČR nabízejí podhorské oblasti s kyselou půdní reakcí a dostatkem srážek (PAPRŠTEIN *et al.*, 2009a).

Oproti většině pěstovaných ovocných druhů vyžaduje kanadská borůvka odlišné půdní podmínky, a to především kyselou půdní reakci, s hodnotami pH od 3,8 do 4,5 (DOLEJŠÍ *et al.*, 1991), popř. od 3,5 do 4,5 (PAPRŠTEIN *et al.*, 2009a). Nízkého pH se dá docílit pěstováním rostlin v bílé rašelině nebo zarýváním síry – nejméně 6 měsíců před výsadbou do běžné zahradní zeminy s vysokým organickým podílem. Takto lze snížit pH půdy, např. z 6 na 5 při dávkování $0,1 - 0,3\text{ kg/m}^2$ (SPIERS a BRASWELL, 1992). Dle studie Zhao-Sen Xie a Xiao-Chun Wu (2009) se jako optimální pěstební substrát jeví směs rašeliny, zahradní zeminy a písku (perlitu) v poměru 2 : 1 : 1.

V oblastech, kde je přirozené pH půdy vyšší než 6, dále pak v zasolených či příliš suchých půdách, nemusí pěstování přinášet očekávané výsledky (HART *et al.*, 2006). Při dodržení nízkého pH roste s vyšším podílem organické hmoty v půdě i výška rostlin a listová plocha, a to řádově o desítky procent (XIE a WU, 2009).

- **Výsadba a její údržba během roku**

Při komerčním pěstování se borůvky sází do řádků 1 m od sebe. Řádky jsou široké 2 – 3 (4) m. Potřeba rostlin při výsadbě je cca 3000-3500 ks/ha. Šířka řádků se odvíjí od plánovaného způsobu ošetřování a sklizně rostlin včetně vyžínání meziřadí mechanizací. Při zakládání plantáže musí být každý řádek v šíři 1 m a hloubce asi 30 – 50 cm vysypán směsí rašeliny, zahradní půdy a písku. Po zasazení rostlin na podzim, popř. na jaře, se povrch půdy zakryje černou netkanou textilií nebo je možné vytvořit asi 10 cm vysoký hrůbek z borovicové kůry. Vhodné je instalovat kapkovou závlahu. Použití velkokapacitních plošných postřikovačů zvyšuje možnost poškození rostlin včetně plodů, napadení patogeny a podporuje nežádoucí růst rostlin v meziřadí.

Při zimním řezu se, kromě poškozených částí rostlin, odstraňují jen 5 a více let staré výhony, což zároveň stačí k zajištění dostatečné vzdušnosti rostlin. Borůvky v případě nutnosti snesou i seřezání tzv. na pařez.

Ke sklizni plodů se na velkých plantážích používají za traktorem tažené sklízecí (harvestory, např. Korvan 930 Berry Harvester) nebo multifunkční nosiče nářadí. Pro ruční sklizeň se používají elektrické nebo pneumatické vibrační pistole. Použití ručního nářadí je ekonomické pouze na menších plochách. Hlavními faktory ovlivňujícími posklizňové úpravy plodů je nadměrné měknutí a výskyt posklizňových onemocnění, spojených s patogenem *Botrytis cinerea* (LAMBERT, 1990). Měknutí ovoce je spojeno s biochemickou modifikací polymerů buněčné stěny (CANTU *et al.*, 2008). Aplikace CaCl_2 na sklizené plody zvyšuje jejich odolnost vůči fyzickému poškození a snižuje ztrátu hmotnosti při skladování (HANSON *et al.*, 1993; ANGELETTI *et al.*, 2010).

• Důležitost základních živin pro rostliny

Půdní biologická aktivita a množství antioxidantů v listech je asi o 70% vyšší při hnojení organickým hnojivem, než s hnojivem anorganickým. Vyšší biologická aktivita půdy jako důsledek organického hnojení indukuje přítomnost dalších mikroorganismů a efekt antibiomy snižuje schopnost plísní šířit se po celé rhizosféře (RAVIV, 2008). Menší obsah plísní pravděpodobně souvisí i s vyšší antioxidační aktivitou, která funguje jako obranný mechanismus k prevenci či odolnosti vůči rostlinnému patogenu (HAIN *et al.*, 1993; DIXON a PAIVA, 1995; BOUTIGNY *et al.*, 2008). Rychle rozpustná průmyslová hnojiva (např. síran amonný), díky své vysoké rozpustnosti, inhibují mikrobiální aktivitu půdy a mykorrhizní kolonizaci. Postižení rostlin plísníovými chorobami rodu *Fusarium spp.* je rychlejší při použití průmyslových hnojiv (O'DONNELL *et al.*, 2001; SCAGEL, 2005).

Dusík se nejčastěji aplikuje právě ve formě síranu amonného, který zároveň snižuje pH půdy. Nejvíce dusíku potřebuje rostlina v prvních měsících vegetačního období, tedy v dubnu až červnu. S blížícím se koncem sezóny je potřeba jeho dávky snižovat, jelikož příliš bujně rostoucí výhony nemusí před příchodem zimy dostatečně vyzrát. Navíc nadbytečný dusík může potlačit vývoj květních pupenů.

Vzhledem k obvyklému složení běžně průmyslově vyráběných hnojiv, není deficit draslíku příliš obvyklý. Projevil by se spáleninami po obvodu listů, vytahováním a kroucením listů či nekrotickými skvrnami. Obsah draslíku má též přímou souvislost s úrodou - během dozrávání se ho v plodech koncentruje poměrně velké množství, což

může v letech s vysokou úrodou způsobit nedostatek tohoto prvku v rostlinách.

Nedostatek fosforu se projevuje zakrslými výhony s temně purpurově zelenými malými listy. Tento jev je ale spíše výjimečný. Pokud se deficit fosforu přeci jen vyskytne, pak tedy především na začátku jara, během nízkých teplot a vyššího zamokření půdy.

Nedostatek železa se projevuje charakteristickou chlorózou - listy žloutnou a objevuje se zelené žilkování. Hlavní příčinou nedostatku železa bývá příliš vysoká hodnota pH půdy. Rostlina není v takovém případě schopna železo přijímat.

Potřeba nízkých hodnot pH půdy by mohlo navodit dojem, že borůvky nesnesou vápenaté kationty v půdě. Vápník je ale důležitou živinou. Vápenaté kationty zvyšují stabilitu buněčných stěn, která zlepšuje pevnost slupky plodů, prodlužuje skladovatelnost a omezuje ztrátu hmotnosti výparem (ANGELETTI *et al.*, 2010). Jelikož rostliny díky nízké hodnotě pH špatně přijímají vápník z půdy, je účinná především foliární aplikace vápenatých hnojiv v období jednoho měsíce po odkvětu (STÜCKRATH *et al.*, 2008).

Nedostatek bóru se projevuje odumíráním vrcholků výhonů, chlorotickou skvrnitostí listů v okolí zaschlých vrcholků a může též způsobit sníženou odolnost rostlin během mrazů.

Chybějící zinek může způsobit krátká internodia a malé listy. Nejmladší listy se při nedostatku zinku barví do žluta a ohýbají se vzhůru podél středního žebrování.

Příznakem nedostatku mědi může být žloutnutí mladých listů mezi žilkami nebo v horším případě zasychání konců výhonů (HART *et al.*, 2006).

3.1.6 Množení kanadských borůvek

K množení borůvek lze použít množení bylinnými řízků a technika *in vitro*. Generativní množení se používá jen při šlechtění rostlin.

Při množení bylinnými řízků se jako stimulátor osvědčil lihový (96 %) roztok IBA o koncentraci 2500 ppm. Báze řízků se máčí ve stimulátoru několik sekund. Po zaschnutí se dále ještě moří fungicidem. Takto ošetřené řízků se vysadí do množárny s teplotou 21 °C (PAPRŠTEIN *et al.*, 2009b). Doba zakořenění řízků v substrátu je cca 4-6 týdnů (WALTER, 2011).

In vitro množení je technologicky daleko složitější a finančně nákladnější oproti řízkování. Výhodami této metody jsou její celoroční využitelnost a vysoký multiplikační koeficient. V období dormance se z rostlin odebírají výhony asi 30 cm

dlouhé, které se omyjí a dají rašit do nádoby s vodou na 2-3 týdny. Z narašených vegetačních vrcholových a postranních pupenů se ve sterilním prostředí vypreparují asi 1 cm dlouhé vrcholy (PAPRŠTEIN *et al.*, 2009b). Explantáty se umísťují na multiplikační pevné agarové medium (WPM nebo Anderson) s přidavkem fytohormonu zeatinu. Dle GAJDOŠOVÉ *et al.* (2005) je optimální koncentrace zeatinu 2 mg/l a hodnota pH = 5. Skupině okolo Zhang se osvědčilo upravené WPM medium s dvojnásobným obsahem KH_2PO_4 , o 25 % vyšším obsahem $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ a o 25 % nižším obsahem K_2SO_4 (ZHANG *et al.*, 2006). Největší českou firmou, která množí borůvky technikou *in vitro*, je Jan Holub s.r.o. Dle osobního sdělení pana Holuba, vyprodukuje tato firma v roce 2015 cca 300 000 nových rostlin.

3.1.7 Světová produkce

Celosvětové trendy ukazují, že státy Severní a Jižní Amerika zůstávají hlavními hráči na globálním trhu produkce borůvek. Severní Amerika zůstává zdaleka největším trhem se současným prostorem pro růst spotřeby na jednoho obyvatele borůvek čerstvých i průmyslově zpracovaných. Produkce se rozvíjí postupně v evropských a afrických pěstitelských oblastech. Zatímco Velká Británie je zde hlavním spotřebitelem, evropský pevninský trh představuje výrazný potenciál pro růst spotřeby. Asie je v současné době domovem nejrychleji rostoucích trhů ve světě, ale i když produkce borůvek v tomto regionu roste, poptávka spotřebitelů je i zde výrazně vyšší.

Díky velmi výraznému nárůstu se očekává v roce 2015 celosvětová produkce ve výši 635 000 t oproti 181 000 t v roce 2005 a 30 000 t v roce 1970. V Severní Americe se nachází 57% světových produkčních ploch (Jižní Amerika 23%, Evropa 11%, Asie a Austrálie 8%, Afrika 1%) a celková produkce tvoří dokonce 66% světové produkce (Jižní Amerika 21%, Evropa 11%, Asie, Austrálie a Afrika 2%). V čele produkce čerstvých plodů je Severní Amerika s 57%, avšak Jižní Amerika produkuje již 26% (Evropa 13%, Asie a Austrálie 3%). Vyšší procento na trhu čerstvých plodů v Jižní Americe je dáno především geograficky, kdy Chile a Argentina využívají své zeměpisné polohy a produkují plody v zimních měsících s možností exportu především do Evropy a Asie. V roce 2012 činil export 292 000 tun (o 13 % více než v roce 2011). Největšími exportéry jsou Kanada, Chile a USA, celkem se 73 % světového exportu (1).

Tab. 2: Produkční plochy v roce 2010 (ha)

S. Amerika	44 667	USA	26 800
		Kanada	17 867
J. Amerika	17 820	Chile	13 061
		Argentina	3 848
		Uruguay	749
		Brazílie	122
Evropa	8 505	Polsko	3 159
		Německo	2 147
		Španělsko	1 053
		Nizozemí	478
		Francie	360
		Itálie	275
		Velká	
		Británie	271
		Portugalsko	194
		Lit., Lot., Est.	136
		Ukrajina	77
		Rumunsko	53
		Rakousko	51
		Švédsko	36
		Dánsko	24
		Švýcarsko	22
		Irsko	14
Asie	4 510	Čína	3 501
		Japonsko	903
		Jižní Korea	73
		Indie	32
Austrálie a Oc.	1 208	Austrálie	620
		Nový Zéland	587
Afrika	727	JAR	454
		Maroko	182

Zdroj: Trends In World Blueberry Production (EZ, 5).

3.1.8 Škůdci a choroby

- **Škůdci:**

Nedostatečně oplocené výsadby mohou ohrozit zajíci a vysoká zvěř – okusují výhonky a květní pupeny. Dozrávající ovoce láká také ptactvo. Kořenový systém borůvek mohou napadat různí hlodavci. Výskyt těchto škůdců lze eliminovat požitím plotů, sítí a v případě ochrany kořenového systému je možné použití jemnějších kovových pletiv.

- **Škůdci z Třídy: Hmyz (*Insecta*)**

Bejломorka klikvová – *Dasineuria oxycoccana* Johnson, 1899

Jarnice ovocná – *Orthosia gothica* Linnaeus, 1758

Jarnice šedá – *Orthosia opima* Hübner, 1809

Obaleč bojínkový – *Aphelia paleana* Hübner, 1793

Obaleč borůvkový – *Acleris variegana* Denis et Schiffermüller, 1775

Obaleč hlohový – *Archips crataeganus* Hübner, 1799

Obaleč jeřábový – *Orthotaenia undulana* Denis et Schiffermüller, 1775

Obaleč kalinový – *Aphelia viburnana* Denis et Schiffermüller, 1775

Obaleč semenáčkový – *Argyrotaenia ljunghiana* Thunberg, 1797

Obaleč zimolezový – *Adoxophyes orana* Fischer, 1834

Štítěnka čárkovitá – *Lepidosaphes ulmi* Linnaeus, 1758

Štítěnka zhoubná – *Quadraspidiotus perniciosus* Comstock, 1881

Tmavoskvvrnák zhoubný – *Erannis defoliaria* Clerck, 1759 (Kúdela et al., 2012)

- **Choroby způsobené bakteriemi a houbami** (převzato z :

PREPARED BY PESTICIDE RISK REDUCTION PROGRAM, 2011)

Alternariová hniloba ovoce, angl. *Alternaria fruit rot* (*Alternaria alternata*, *Alternaria tenuissima*).

Hniloba plodů a skvrnitost listů způsobené *Alternaria spp.* je obvykle problémem během chladných, vlhkých období, kdy může dojít k infekci plodů, které měknou, a na povrchu se tvoří chlupaté nazelenalé mycelium. Listové skvrny jsou malé (1-5 mm), světle hnědé až šedé s hnědo - červeným okrajem. Patogen přezimuje na

povrchu půdy nebo na větvích. Spory tvořené v infikovaných tkáních jsou snadno šířitelné větrem. Projevy choroby lze snížit včasnou sklizní a zchlazením plodů ihned po sklizni.

Antraknóza borůvek, angl. *Blueberry anthracnose* (*Colletotrichum acutatum*, *Colletotrichum gloeosporoides*).

Antraknóza borůvek je nejzávažnější chorobou borůvek poškozující plody. Bobule infikované antraknózou jsou neprodejně. Infekce je charakteristická oranžovou barvou a propadlou dužninou plodu a rozvíjí se za teplého, vlhkého počasí a při závlaze postřikovači. Houba přezimuje v infikovaných větvích a na jaře jsou spory rozšiřovány především do květů, kde dochází k další infekci. K eliminaci nákazy je zapotřebí správný řez rostlin zabezpečující dobrou cirkulaci vzduchu. Po sklizni se plody musí rychle zchladit a je třeba se vyhnout pohybu nevyčištěných přepravek a jiných obalů, popř. sklízecí mechanizace mezi jednotlivými pěstebními plochami.

Bakteriální nádorovitost, angl. *Crown gall* (*Agrobacterium tumefaciens*).

Nemoc způsobující tmavě hnědé, drsné hálky na kořenech i větvích borůvek. Při napadení větví se výše položené listy zbarvují do červena. Bakterie může být v půdě už před výsadbou. Do rostlin se dostává poraněními místy a vyvolává tvorbu hálek. Hálky zdřevnatí a následně se z nich olupují vnější vrstvy, s nimiž se bakterie dostává zpět do půdy. Patogen má velmi široké spektrum hostitelů. Jako antagonistické bioagens lze použít *Agrobacterium radiobacter*, která může zabránit infekci, avšak pouze použije-li se na řízky nebo kořeny rostlin před tím, než jsou zasazeny v zamořených půdách.

Bakteriální spála borůvky, angl. *Bacterial blight/canker* (*Pseudomonas syringae* pv. *syringae*).

Pseudomonas syringae pv. *syringae* může způsobit značné hospodářské škody u nových výsadeb. Rozsáhlé poškození vede k bakteriálním lézím na kosterních větvích a odumření mladých rostlin. Ve spojení s jarními mrazíky poškozuje i poupata. První příznaky se objevují po zimě jako vodou nasáklé léze, které mohou mít velikost několik milimetrů, ale také mohou pokrývat celou větev. Nejčastěji bývají napadeny rok staré výhony. Patogen přezimuje na nemocných větvích a šíří se během chladného, deštivého počasí na jaře a na podzim, k infekci dochází skrze poraněnou tkáň nebo přes přirozené otvory, např. listové jizvy. Ochranou je odstraňování napadaného dřeva a nehnojení dusíkem od začátku července.

Botryosphaeriová spála borůvky, angl. *Botryosphaeria stem blight* (*Botryosphaeria dothidea*).

Botryosphaeriová spála borůvky má podobné příznaky jako Fytoftorová kořenová hniloba. Botryosphaeriová spála borůvky se vyskytuje u starších výsadeb, zatímco Fytoftorová kořenová hniloba je častější u mladých sazenic v kontejnerech. K napadení houbou může dojít kdykoliv. Houba *B. dothidea* způsobuje vadnutí a odumírání listů i jednotlivých výhonů.

Diaportová korová nekróza borůvky, angl. *Phomopsis twig blight* – (anam. *Phomopsis vaccinii*, teleom. *Diaporthe vaccinii*).

Houba může infikovat mladé větve, ale do rostliny vstupuje ránami ve starším dřevě. Infikované větve šednou, zplošťují se a odumírají; na listech se tvoří malé skvrny s hnědo-modrým okrajem a později bílým středem. Plody praskají a na povrchu je houba charakteristická bílo-šedou krupičkou. Houba přezimuje v infikovaných větvích a rozšiřuje se za deště konidiemi. Onemocnění se vyskytuje na jaře a počátkem léta a bývá často šířeno společně se sadbou. K většímu rozvoji přispívá deštivé počasí, tuhá a suchá zima.

Fytoftorová kořenová hniloba, angl. *Phytophthora root rot* (*Phytophthora cinnamomi*, *Phytophthora parasitica* a další).

Primárně je napadán kořenový systém rostlin. Napadené kořeny jsou křehké a mají okrovou barvu. Přitom během několika dnů dochází ke zhoustnutí adventivního vlášení v oblasti kořenového krčku. Listy žloutnou a jednotlivé letorosty (nejprve mladší) postupně vadnou až uvadnou a následně odumřou celé rostliny. U napadených rostlin jsou listy ráno svěšené, a to i když mají rostliny dostatek vláhy. V místě kořenového krčku se lýko barví do hněda, což lze snadno zjistit odloupenutím borky. Pokud je rostlina napadena, je ji nutno vykopat a zlikvidovat. Hlavní příčinou choroby je obvykle dlouhodobé oslabení rostliny, vodní stres, přemokření, nedostatek živin a nadbytek dusíku (TOMICZEK, 2005) a vyšší teplota (20-32 °C). Čerstvá borová kůra, použitá k mulčování, obsahuje četné fungicidní látky efektivně blokující šíření původce choroby. (HOLUB, 2002)

Moniliniová hniloba, angl. *Mummy berry* (*Monilinia vaccinii-corymbosi*).

Objevuje se na květech, následně houba roste uvnitř plodu. Listy a výhony mají pomalejší růst. Mumifikované plody mění barvu, vysychají a opadávají. Houba

přezimuje v půdě, z níž na jaře vyrůstají apotecia, tvarem připomínající „trumpety“. Primární infekce probíhá prostřednictvím z apotecií uvolňovaných askospor, které napadají mladé vegetativní i květné pupeny. V infikovaných tkáních se poté tvoří konidie a následně dochází k sekundární infekci. Konidie se šíří větrem a pomocí opylujícího hmyzu. Choroba se rozšiřuje spíše za vlhkého počasí a při teplotě 10-14 °C.

Plíseň šedá, angl. *Botrytis blight – gray mold (Botritis cinerea Pers., 1794)*.

Plíseň šedá má široké hostitelské spektrum. U borůvek napadá především květy, plody a listy. Infikované květy hnědnou a vadnou, listy mění barvu na hnědou až hnědo-modrou, plody se scvrkávají. Houba přezimuje jako mycelium nebo sklerocium v napadených částech rostlin a šíří se na jaře především za vlhkého a větrného počasí do květů, kde nastává primární infekce. Na plody se infekce rozšiřuje během zrání. Napadené plody mohou kontaminovat zdravé plody při sklizni nebo skladování. Riziko rozšíření infekce lze snížit dobrou cirkulací vzduchu v porostu a rychlým zchlazením sklizených plodů.

- **Viry a fytoplasma** (převzato z: SCHILDER a MILES, 2008)

Leaf mottle (*Blueberry leaf mottle virus, BLMV*) – infikovaný pyl mohou přenášet včely, přenos viru je možný i řízky.

Listy mají po napadení mramorovaný vzor, jsou menší, světlejší a mají rozetový růst.

Necrotic ringspot (*Tabacco ringspot virus, TRSV*) – vektorem jsou hád'átka (*Xiphinema americanum*).

Po napadení jsou listy deformované, propadlé nebo zvlněné, okraje listů jakoby otrhané. Skvrny na listech jsou červené nebo nekrotické, mohou se propadat a pak vznikají v listech díry.

Red ringspot (*Blueberry red ringspot virus, BRRV*) – přenos je většinou přes infikované řízky.

Infikované rostliny se poznají podle červených skvrn nebo kruhů na zelených letorostech začátkem léta. V průběhu léta se objevují červené až fialové skvrny na starších listech a postupují na mladší.

Scorch (*Blueberry scorch virus*, BScV) – vektorem jsou mšice.

Dochází k náhlému odumření květů a listů v průběhu kvetení, následně i konců výhonů. Onemocnění může připomínat poškození jarními mrazíky.

Shock (*Blueberry shock virus*, BShV) – vektorem jsou včely.

Symptomy jsou velmi podobné Scorch, ale výhony neodumřou a v průběhu léta opět raší.

Shoestring (*Blueberry shoestring virus*, BSSV) – vektorem jsou mšice (*Illinoia pepperi*).

Nejspolehlivějšími symptomy jsou červené pruhy na letorostech a rok starých výhonech. Květy mohou vykazovat růžové nebo rudé pruhy. Ovoce zůstává načervenalé a nemodrá.

Stunt (*Blueberry stunt phytoplasma*) – vektorem jsou plži a včely.

Dochází k opadávání listů, odumírání výhonů a ve většině případů smrti rostliny.

Tomato ringspot (*Tomato ringspot virus*, ToRSV) – vektorem jsou hlístice (*Xiphinema americanum*).

Způsobuje většinou kruhové skvrny o velikosti do 5 mm, které se mohou objevit i na větvích. Výhony odumírají, rostlina zakrňuje, až odumře úplně. Virus má široké spektrum hostitelů, včetně rajčat, jablek nebo malin.

3.2 Molekulární metody

Jelikož dochází k velkému rozmachu v pěstování borůvek, stále větší snahy vedou pěstitele k využívání správných postupů, kdy se pro pěstování vybírají a šlechtí rostliny s podobnými nebo lepšími hospodářsky využitelnými vlastnostmi. Ke zvýšení biologických hodnot rostlin lze využít na genetické úrovni molekulární markery. Molekulární marker je část DNA, která označuje a identifikuje přítomnost nějakého genu. Markerování je pak hledání markeru (signální sekvence), spojené s některým hospodářsky významným znakem.

Molekulární markery nejsou přímým nástrojem šlechtitelů rostlin, ale využívají se jako kontrolní a zkušební nástroj. Lze jimi identifikovat určitý gen, popřípadě více genů, odpovědný za určitý hospodářsky významný projev rostliny. Jejich použitím se podstatně zkracuje doba vyšlechtění nových kultivarů s požadovanými vlastnostmi, které by se jinak projevil až v určitém stupni zralosti.

V současné době velká část metod, používaných k molekulárně genetickým studiím rostlin, založena na principu fragmentačních analýz. Nejčastěji používané markery jsou založeny na polymerázové řetězové reakci, patří sem metody SSR, RAPD a AFLP. Metoda RFLP, která vedla k výraznému rozvoji DNA markerů na konci 20. století, je založena na hybridizaci DNA.

3.2.1 Izolace DNA

Pro práci s nukleovými kyselinami je potřeba je nejprve izolovat z rostlinného materiálu, nejčastěji z čerstvých listů. Odebraný rostlinný materiál se může ihned použít pro izolaci, nebo hluboce zmrazit a uchovávat při teplotě -70 °C; krátkodobě ho lze chladit na ledu. Při odebrání vzorku v externích podmínkách obvykle hrozí vadnutí a degradace strukturních látek vlivem oddělení od rostlin a venkovní teploty, popř. dalších klimatických vlivů. Rostlinný materiál se následně homogenizuje. Při většině metod se používá rozdrcení pletiva v třecí misce v tekutém dusíku. Při nedostupnosti tekutého dusíku lze použít i jiné mechanické nástroje, např. malý homogenizátor přímo v mikrocentrifugační zkumavce (EDWARDS *et al.*, 1991) nebo homogenizační mlýn.

DNA byla poprvé izolována v roce 1869 F. Miescherem (DAHLM, 2008).

3.2.2 Metody izolace DNA z rostlin

Klasické metody izolace DNA

Využívá se rozdílné rozpustnosti DNA v rozdílných roztocích. Jsou vhodné pro extrakci vysokomolekulární DNA.

Některé používané metody jsou např.:

- Izolace rostlinné DNA pomocí CTAB (WILLIAMS *et al.*, 1990). Pro kanadské borůvky se používá upravený protokol pro izolaci DNA z *Cactaceae* (TEL - ZUR *et al.*, 1999).
- Izolace rostlinné DNA pomocí CTAB s přidáním PVP
- SDS extrakce (EDWARDS *et al.*, 1991)

Adsorbční metody

DNA se váže na křemičité membráně za účasti chaotropních látek. Lze získat větší množství menších částí nebo menší množství vysokomolekulární DNA (KITNER, 2012). Jedná se o metody, při kterých se v dnešní době využívá komerčně prodávaných kitů, i s přesně popsány protokoly. Nejvíce rozšířené kity pro izolaci DNA z rostlinných pletiv jsou např.:

- Invisorb Spin Plant Mini Kit - množství vzorku nad 100 mg, výtěžek 5 - 35 µg.
- Invisorb Spin Plant Midi Kit - množství vzorku nad 500 mg, výtěžek nad 140 µg.
- DNeasy Plant Mini Kit (fa QIAGEN).

Metody využívající neporézní magnetické nosiče

Magnetické nosiče umožňují separaci látek z reakční směsi bez použití filtrace nebo centrifugace, což velice usnadňuje a urychluje samotnou separaci látek (HORÁK *et al.*, 2007). Skládají se z magnetického jádra se superparamagnetickými vlastnostmi (magnetické vlastnosti se projevují jen za přítomnosti vnějšího magnetického pole), polymerní vrstvy a organických skupin, jako ramen s funkční molekulou (ligandem). Jako ligand se používá karboxylová skupina, která reaguje s dusíkatými bázemi DNA (HORÁK a BENEDYK, 2004). Místo karboxylové skupiny lze použít i aminoskupinu $-NH_2$ (RAHMAN a ELAISSARI, 2011). DNA lze tímto způsobem izolovat z komplexních vzorků obsahující inhibitory PCR v kvalitě vhodné pro PCR a restriční analýzu (RITTICH *et al.*, 2006; TROJÁNEK, 2013).

Specificky připravené magnetické částice se smíchají se vzorkem obsahujícím DNA, která se časem naváže na magnetické nosiče. Celý komplex se pak magneticky oddělí od zbytku vzorku. Po promytí od nečistot jsou molekuly DNA použitelné pro další práci (ERENSMEIER, 2006).

3.2.3 Stanovení koncentrace a čistoty DNA

Spektrofotometrické stanovení

Používá se pro vzorky dostatečně čisté, významně nekontaminované. NK absorbují nejvíce UV záření v oblasti vlnové délky světla okolo 260 nm, proteiny mají maximum absorbce v oblasti okolo 280 nm. Stupeň čistoty NK se stanoví z poměru absorbce při 260 nm a 280 nm. Výsledná hodnota by se měla pohybovat

v rozmezí 1,8 - 2,0 . Nižší hodnoty charakterizují kontaminaci proteiny, vyšší hodnoty jsou způsobeny přítomností organických látek, např. fenolem nebo chloroformem (KÁŠ *et al.*, 2005).

Fluorescenční stanovení

- **Měření na fluorometru pomocí kitu**, např. PicoGreen (Invitrogen)

Jedná se o vysoce citlivou metodu, kdy se PicoGreen váže na dsDNA a umožňuje stanovení i znečištěné DNA.

Elektroforetické stanovení

Princip elektroforézy je založen na skutečnosti, že NK jsou v neutrálním prostředí polyanionty. S rostoucí molekulovou velikostí (počtem nukleotidů) roste i náboj NK, je však zachován jejich poměr mezi nábojem a molekulovou hmotností, což umožňuje rozdělení NK ve vhodném roztoku na základě jejich velikosti. Elektroforéza se tedy provádí s využitím vhodných nosičů. Osvědčily se agaróza a polyakrylamid.

Typy elektroforézy:

- **Horizontální elektroforéza v agarózovém gelu** – jako nosič se používá agaróza, která se získává z některých druhů mořských řas. Agaróza je lineární polysacharid, složený převážně z D-galaktózy a 3,6-anhydro-L-galaktózy. Elektroforéza na agaróze má nižší separační schopnost, většinou do rozdílu 5 bp.
- **Vertikální elektroforéza v polyakrylamidovém gelu** – nosičem je polyakrylamid, vznikající polymerací akrylamidu. Tento typ elektroforézy je přesnější, jeho rozlišovací schopnost je až 0,2 % (agaróza MetaPhor od výrobce BMA Products má rozlišení do rozdílu 2 bp). Nevýhodou je vysoká toxicita akrylamidu a látek vznikajících při výrobě polyakrylamidu.
- **Kapilární elektroforéza** – nosným médiem je vodný elektrolyt nebo specifický gel v kapiláře. Tato metoda se objevila koncem 20. století jako vylepšení výše uvedených metod. Při průchodu kapilárou dochází k rozdělení fragmentů dle velikosti a jejich detekci pomocí laserového paprsku.

3.2.4 PCR

Polymerázová řetězová reakce (z angl. *Polymerase Chain Reaction*, dále jen PCR), je metoda rychlého a snadného zmnožení úseku DNA, založena na principu replikace nukleových kyselin v prostředí *in vitro* (MULLIS *et al.*, 1986). PCR slouží k vytvoření až mnoha milionů exaktních kopií vzorového fragmentu DNA, o maximální délce 10 tisíc nukleotidů, v některých případech bylo dosaženo délky až 40 tisíc (TELLIER *et al.*, 2003), což umožňuje provést analýzu DNA i z velmi malého vzorku. Teoreticky stačí i jediná molekula DNA, praktické je však použití více molekul, kdy se násobně zvyšuje výtěžek reakce a zkracuje čas.

PCR probíhá v termocykleru, což je zařízení schopné pracovat tak, že během několika sekund zvýší nebo naopak sníží teplotu o několik desítek stupňů Celsia. Tzv. ramping u termocykleru je jeho základním parametrem a označuje míru změny teploty za jednu sekundu. Jednotlivé kroky PCR se opakují. Při ideálních podmínkách se každým opakováním zdvojnásobuje množství základní složky. Krátkodobě lze výsledný produkt PCR skladovat při 4 – 15 °C. Metody se využívá nejenom k vědeckým potřebám, ale například i ke kontrole potravin, pro zjišťování GMO a geneticky modifikovaných složek. Výsledkem PCR je obrovské množství kopií původní sekvence DNA. Metoda je tak citlivá, že dokáže odhalit i jedinou molekulu DNA ve vzorku (LIVAK a SCHMITTGEN, 2001).

Základní složky PCR směsi:

- **2 primery** - úseky DNA, které se mají namnožit (amplifikovat) musí být ohraničeny na začátku a na konci tzv. primery. Primery jsou krátké oligonukleotidy o známé sekvenci a délce obvykle do 25 bází. Jsou komplementární ke každému 3' konci obou řetězců původní dvoušroubovice DNA a navazuje na ně tvorba nového řetězce pomocí DNA polymerázy ve směru 5' → 3' (BARÁNEK *et al.*, 2006; BROWN, 2010). Primery nesmí být navzájem komplementární, aby nedošlo k tvorbě dimerů a sekundárních struktur (CHEN a JANES, 2002).
- **DNA polymeráza** - k syntéze nového vlákna DNA se používá nejčastěji termostabilní DNA dependentní DNA polymeráza, zkráceně DNA polymeráza. První izolovaný enzym DNA POLYMERASA I byl izolován z bakterie *Escherichia coli* (tzv. Klenowův fragment) Má optimální funkční teplotu 37,5 °C. Při vysokých teplotách je nestabilní, tudíž vyžaduje přidávání do každého cyklu. V současnosti je

nejvíce používaná DNA polymeráza izolovaná z bakterie *Thermus aquaticus*, odtud označení *Taq* polymeráza (CHIEN *et al.*, 1976). *Taq* polymeráza má optimální funkční teplotu 75 °C a zůstává aktivní i po denaturaci (LAWYER, 1993). Nemusí se tedy přidávat do každého cyklu (SAIKI, 1988), poločas inaktivace je při 95 °C cca 40 minut. Je aktivní pouze ve směru 5'→3' a nemůže tedy opravovat změny vzniklé při replikaci (BERMINGHAM a LUETTICH, 2003). Lze samozřejmě použít i jiné teplotně stabilní DNA polymerázy, např. *Pwo* a *Pfu* polymerasy izolované z bakterií rodu *Pyrococcus*, které mají i exonukleázovou aktivitu; fungují tedy i ve směru 3'→5'. Produkují několikanásobně přesnější produkty ve srovnání s *Taq* polymerázou. Mají však menší schopnost syntetizovat delší úseky DNA (KRÁLOVÁ *et al.*, 2001; TROJÁNEK, 2013). V roce 2009 byla v souvislosti s kanadskými borůvkami použita *HotStart Taq* polymeráza (PALMIERI, 2009).

- **Roztok pufru** - pufr udržuje stabilní pH a obsahuje chemické látky důležité pro správnou funkci DNA polymerázy.
- **dNTPs** - 3-deoxynukleotid-5-trifosfáty (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) jsou látky, z nichž je pomocí DNA polymerázy syntetizován nový řetězec DNA. Optimální koncentrace je 200 µMol; toleranční rozpětí je 20 – 400 µMol. Vysoká koncentrace dNTP (od 4 mMol a výše) působí inhibičně, protože vyvazuje hořčnaté ionty (TROJÁNEK, 2013).
- **Kationty Mg^{2+} , K^{+}** - jsou nezbytné pro aktivitu DNA polymerázy. Obvyklá koncentrace je 1,5 mMol.
- **Původní (templátová) DNA**

Jednotlivé kroky PCR:

- **Denaturace DNA** - zahřátí DNA po dobu 20-30 s na teplotu 90-95 °C. Teplota tání DNA u *Vaccinium corymbosum* je 85,5 °C (PALMIERI *et al.*, 2009; TEL-ZUR *et al.*, 1999). Dochází k disociaci 2 řetězců šroubovice DNA přerušením vazeb vodíkových můstků. Výsledkem je „rozpletení“ dvoušroubovice a vznik dvou samostatných jednořetězcových molekul DNA.
- **Teplotní hybridizace (Annealing step)** - teplota se sníží na 50-65 °C na 20 s a více. Teplota musí být o 3 - 5 °C nižší než je teplota tání primerů. Teplota a čas jsou v této fázi rozhodující. Jsou závislé na koncentraci, délce primerů a zastoupení jednotlivých bází v primerech. Při nízké teplotě může dojít k hybridizaci primeru s místy

s neúplnou komplementaritou, za vzniku nežádoucích produktů. Naopak při vyšší teplotě k hybridizaci primerů s templátovou DNA vůbec nedochází.

- **Syntéza** (extenze) – prodloužení nového řetězce DNA. V této fázi dochází k samotné syntéze DNA, kdy vlákno, komplementární k původní molekule DNA, přirůstá ve směru 5' → 3'. Teplota závisí na použité DNA polymeráze. Při použití Taq polymerázy je ideální teplota 72 °C. Doba syntézy je závislá na délce syntetizovaného řetězce, teplotě, struktuře a koncentraci původní DNA a použité DNA polymeráze. S rostoucím počtem cyklů roste exponenciálně počet produktů z PCR, dle vzorce:

$$N = n \times (1 + E)^C$$

N – konečné množství produktu n – počáteční množství cílové sekvence

E – účinnost amplifikace C – počet použitých PCR cyklů

3.2.5 Metody PCR

RAPD

Polymorfismus délky náhodně amplifikovaných fragmentů DNA (z angl. *Random Amplified Polymorphic DNA*, dále jen RAPD) je obdobou PCR (ELLSWORTH, 1993), kdy ovšem není třeba znát sekvenci DNA. Používá se jen jeden primer, který se může navázat na více místech v genomu díky tomu, že je to krátký oligonukleotid (10 – 15 bází). Pravděpodobnost kombinace komplementárních bází je u kratšího oligonukleotidu daleko větší než u delšího; na druhou stranu jeho zacílení na konkrétní úsek DNA je složitější.

Taktéž opakování metody a reprodukovatelnost výsledků není jednoduché. Velmi záleží na správných podmínkách reakce, kterými jsou teplota a čas v jednotlivých fázích (denaturace, hybridizace, amplifikace) a také záleží na použitém primeru.

Doporučuje se, aby obsah GC tvořil ve struktuře DNA alespoň 40 % (BARÁNEK *et al.*, 2006). Obsah 50-60 % zvyšuje výnos reakce (RASMUSEN a REED, 1992). Optimální teplotou při hybridizaci je pro většinu primerů teplota 36 °C. Výsledkem RAPD je velká variabilita velikosti zmnožené DNA (HILTON, 1997) a

vzniká celé spektrum nestejně silných fragmentů (BIELAWSKI *et al.*, 1995).

V RAPD profilu se většinou vyskytuje 3-15 různých produktů, které pravděpodobně pochází z různých genetických lokusů a jejich velikost je obvykle 400 – 2000 bp. Většina RAPD markerů vykazuje dominantně-recesivní charakter. Určitý fragment DNA je tedy u určitých jedinců amplifikován a u některých ne. Nízká teplota při hybridizaci vede k možnosti vytváření sekundárních struktur na jednovláknové DNA, a to i blízko možných míst pro hybridizaci primeru. Sekundární struktura pak může inhibovat proces hybridizace na tomto místě.

Jako RAPD polymorfismus můžou být tedy detekovány mutace, stabilizující sekundární strukturu DNA. Někdy se u RAPD reakce za stejných podmínek objevují nové a tedy nereprodukovatelné produkty; obvykle však mají malou intenzitu. Pokud tyto produkty v analýze ignorujeme, reprodukovatelnost výsledků (produkty se silnou intenzitou) nemusí být narušena.

RAPD může sloužit jako doplňková metoda k metodě SSR (BARÁNEK *et al.*, 2006). Možné samostatné využití nabízí metoda v identifikaci příbuznosti a evoluce jednotlivých druhů (KAMBHAMPATI *et al.*, 1992) a dalších populačně-genetické charakteristiky (BARÁNEK *et al.*, 2006). RAPD je vhodná pro identifikaci borůvkových kultivarů (GAJDOŠOVÁ *et al.*, 2005).

AFLP

Metoda polymorfismu délky amplifikovaných fragmentů (z angl. *Amplified Fragments Length Polymorphism*, dále jen AFLP) je metodou, která umožňuje charakterizaci kompletní genomové DNA (VOS *et al.*, 1995). Multilokusová analýza AFLP má mnohem vyšší schopnost rozlišení polymorfismu alel než metoda RFLP (BARKER *et al.*, 1999) a je tedy velmi vhodnou technikou pro studium genetické variability na úrovni druhů nebo populací u široké škály organismů (LIU *et al.* 1998; WANG *et al.* 2004).

Umožňuje rychle vygenerovat velké množství polymorfních markerů i u druhů, o nichž nemáme jedinou předchozí genetickou informaci. Technika AFLP kombinuje výhody PCR a štěpení restriční endonukleázou pro získání specifických selektovaných restričních fragmentů celkové DNA jakéhokoli jedince, tedy napříč genomem, a to při zachování vysoké míry opakovatelnosti pokusu. AFLP marker lze využít při studiu hybridizace, introgrese, definice klonů, polyploidů, stanovení genotypu, určování

paternity díky variabilitě a vysoké míře reprodukovatelnosti výsledků. Nevýhodou metody je vyšší finanční náročnost metody a komplikovanější protokol (6).

SSR

Mikrosatelity (z angl. *Simple Sequence Repeat*, dále jen *SSR*), jsou oblasti v DNA, tvořené krátkými úseky mono- až hexanukleotidů, např. $(AT)_n$, které se opakují. Jednotlivé opakující se sekvence se označují jako jednotky repetice (ROSYPAL, 2001). V celkové délce je počet opakování repetice obvykle do 100 bp. Mikrosatelity se dle svého složení dělí na:

- **dokonalé** – opakující se sekvence tvoří souvislou řadu a není přerušena jinou bází.
- **nedokonalé** – obsahují několik bází, které narušují pravidelný motiv.
- **složené** – tvořeny dvěma nebo více různými jednotkami repetice

(OLIVIERA *et al.*, 2006).

Důležitými parametry mikrosatelitů jsou: typ a délka opakující se sekvence, složení nukleotidů a celkový počet opakování sekvencí (BEDNÁŘ *et al.*, 1999).

Molekulárně-genetická metoda SSR (TAUTZ, 1989) je založena na PCR. Využívá rovnoměrného rozmístění mikrosatelitů v genomu a rozdílného počtu opakování jednotek repetice, které způsobuje vysokou míru polymorfismu mezi jednotlivými genotypy. Použité primery jsou navrhovány z konzervativních sekvencí v blízkosti s mikrosatelitním lokusem. Jejich délka je většinou okolo 20 bp. Pro dosažení výsledné T_t okolo 60 °C by se měl obsah C a G pohybovat okolo 50 %.

Primery nesmí být navzájem komplementární, aby nedošlo k narušení průběhu PCR. Obvykle se navrhuje tak, aby se snadno detekovaly produkty amplifikace o délce 100 – 300 bp. Ve výsledných produktech je amplifikován i příslušný mikrosatelit. SSR markery jsou, díky svým vlastnostem a snadné detekci, v současné době velmi často využívány (BARÁNEK *et al.*, 2006).

Mikrosatelitní lokusy jsou v rámci odrůdy velmi stálé a vysoce polymorfní mezi odrůdami. Je možné sestavit pro každou odrůdu typické fingerprinty, které se mezi jednotlivými odrůdami liší. V případě dostatečného množství dat pak lze za pomoci SSR markerů identifikovat odrůdu i kultivar u neznámého vzorku. Na webových stránkách Genome Database for Vaccinium (EZ, 7) je volně k dispozici 13 757 sekvencí, získaných pomocí SSR markerů.

REAL-TIME PCR

Amplifikace DNA v reálném čase (z angl. *Real-Time* PCR) je metoda umožňující současné provádění amplifikace DNA a detekce výsledných amplikonů v jedné zkumavce, pomocí světelného signálu z fluoroforů (WATSON et al., 2004). Fluorofory jsou molekuly, schopné v excitovaném stavu emitovat fluorescenci. Většinou jde o polyaromatické nebo heterocyklické uhlovodíky. Navazují se buď přímo na vznikající amplikony nebo jsou jimi značeny tzv. "hybridizační sondy". Hybridizační sondy jsou krátké sekvence nukleotidů. Fluorofory jsou značeny nukleotidy na 3'- nebo 5'- koncích sond.

Využitím fluoroforů je možné dynamicky posuzovat aktuální průběh syntézy amplikonu, aniž by došlo k zásahu do vlastního průběhu amplifikace. Možnost sledovat nabývání amplikonů v každém cyklu má za následek označení této techniky jako "amplifikace DNA v reálném čase" nebo též "amplifikace v reálném čase". Za ekvivalentní lze považovat i termíny "homogenní PCR" nebo "kinetická PCR" (EZ, 8). Skutečnost sledovat akumulaci amplikonů v reálném čase uděluje metodě PCR další významný analytický parametr, který dovoluje kvantifikaci matrice nukleové kyseliny, vložené za začátku do reakce, tedy původně izolované z buněk, tkání nebo orgánů. Tím se PCR v reálném čase odlišuje od konvenční PCR, která v běžném provedení pouze kvalitativně sleduje přítomnost nebo absenci výsledného PCR produktu v obarvených elektroforetických gelech (BUSTIN, 2004).

Pro amplifikaci RNA, ve které je v prvním kroku zařazena zpětná transkripce, platí termín "RT-PCR".

3.2.6 NGS, genomové a cDNA databáze

Sekvencování nové generace (z angl. Next generation sequencing, dále jen NGS) je neustále se vyvíjející univerzální technologií, která se uplatňuje v různých oblastech. Principem je urychlení procesu sekvencování. Produkuje se mnohem více dat, než při použití dříve používaných technologií, navíc s výrazně nižšími náklady. V roce 2009 zpřístupnila International Nucleotide Sequence Database Collaboration (INSDC) veřejnosti archivní zdroj dat Sequence Read Archive (SRA), pro data sekvencování nové generace (KODAMA et al., 2012).

Před několika lety bylo pomocí technologie 454-GS FLX Titanium Sequencing zdokumentováno více než 600 000 sekvencí transkriptomu *Vaccinium corymbosum*

(ROWLAND *et al.*, 2012a).

Technologie NGS, konkrétně Roche 454 a Illumina GAIIx, je používána také v projektu sekvencování genomu kanadské borůvky, který vede Dr. A. Brown (dále jen Brown) na North Carolina State University. Brown předpokládá, že výsledná délka genomu bude cca 500 – 608 Mb, kódujících více než 25 000 genů (DIE a ROWLAND, 2013), což je několikanásobně víc než je např. u jahod (SHULAEV *et al.*, 2011).

Rozvoj bioinformačních technologií je velmi důležitý pro správu dat a generování transkripčních profilů. On-line přístupné databáze expresních profilů nabízí možnost pro integraci dat ve spojení s fyziologickými podmínkami. Integrace decentralizovaných dat prostřednictvím internetu usnadňuje spolupráci mezi geograficky izolovanými skupinami výzkumných pracovníků a poskytuje přístup k datům společného zájmu.

Webové stránky Genome Database for *Vaccinium* (EZ, 7) jsou vyvíjeny k integraci genomických, genetických a pěstitelských dat rodu *Vaccinium spp.*

cDNA (z angl. Complementary DNA, dále jen cDNA) je DNA vzniklá zpětným přepisem (reverzní transkripcí) z RNA do DNA. Nachází využití např. v cDNA databázích a slouží ke hledání nových genů a jejich klonování. Databáze obsahuje veškeré informace obsažené v genomu (geny a nekódující sekvence) a je možné ji vytvořit pro všechny živé živočichy i rostliny.

Z cDNA lze odvodit EST sekvence (z angl. *Expressed Sequence Tags*, dále jen EST), což je krátká DNA sekvence (okolo 300 - 1000 bp), která reprezentuje geny exprimované ve tkáních. EST sekvence jsou specifické pro typ zdrojového pletiva (listy, květy, kořeny, plody, pyl), nebo v závislosti na odpovědi vůči vnějším vlivům, patogenům, hormonům, stresu apod. (EZ, 9)

První EST sekvence borůvek byly k dispozici před dvanácti lety. Přestože genomický výzkum je v čeledi *Ericaceae* stále poměrně nový, významný pokrok byl učiněn v posledních několika letech (ROWLAND *et al.*, 2012b). Většina EST sekvencí bylo vytvořeno v letech 2003 – 2010. Veřejně dostupné sekvence během tohoto časového rámce byly z cDNA databází vytvořených z poupat v různých fázích dormance.

Databáze EST byly nedávno rozšířeny o sekvence rostlin reagujících na jiné abiotické stresové faktory (minerály v půdě) a také o sekvence z dalších druhů tkání, včetně kořenů a plodů v různých fázích vývoje. V březnu 2013 bylo v databázi NCBI uloženo více než 22.400 borůvkových EST sekvencí, což borůvky (*Vaccinium spp.*)

řadilo celkově na 131. místo mezi rostlinami obecně a na 1. místo v čeledi *Ericaceae*.

Počáteční identifikace kolekce genů aktivovaných při chladu bylo možné zjistit díky několika programům, financovaných Ministerstvem zemědělství USA (United States Department of Agriculture, dále jen USDA). Následujícím projektem bylo vytvoření dvou databází s cílem pochopit mechanismy toxicity a odolnosti vůči Al^{3+} kationtům. Databáze byly vytvořeny za použití dvou kontrastních genotypů „Brigitta“ - Al^{3+} resistantní a „Bluegold“ - Al^{3+} sensitivní (INOSTROZA-BLANCHETEAU, 2011). Mimo volně dostupných knihoven existují i projekty, jejichž výsledky nejsou veřejné (BUCK *et al.*, 2012).

Přestože EST databáze jsou platným a spolehlivým zdrojem dat genové exprese, mají svá omezení. Hlavní nevýhodou je, že zastoupení hojnějších transkriptů je v knihovnách častější, zatímco slabě exprimované geny může být těžké určit. K vyrovnání mezi vyšší a nižší frekvencí transkriptu slouží tzv. Supresivní subtraktivní hybridizace (z angl. *Suppression Subtractive Hybridization*, dále jen SSH), což je metoda, potlačující PCR efekt. Má uplatnění při selektivní amplifikaci cílové a zároveň snižuje amplifikaci necílové cDNA (DIATCHENKO *et al.*, 1999). Rozšíření této metody vedlo k tvorbě cDNA databází zaměřených na identifikaci možných genů regulujících abiotický stres nebo patogenní interakce.

S cílem doplnit svou studii ohledně chladového stresu se rozhodli NAIK *et al.* (2007) vytvořit první SSH databázi pro borůvky (*Vaccinium spp.*). Při své práci použil květní pupeny *Vaccinium corymbosum* kultivaru 'Bluecrop'. SSH metoda byla následně použita i pro studium Antraknózy borůvek, která má velký ekonomický dopad při napadení rostlin ve velkovýrobě (MILHOLLAND, 1995). Jako odolný byl použit kultivar 'Elliott' a jako sensitivní kultivar 'Jersey'. 34 sekvencí z původní databáze bylo při pokusech odlišně exprimováno u odolného genotypu a následně poskytly důkazy o aktivní reakci ve zralých plodech vůči patogenu (MILES *et al.*, 2011).

Stále se rozšiřující databáze sekvencí nukleových kyselin jsou dostupné on-line, např. na webových stránkách National Center for Biotechnology Information US National Library of Medicine (dále jen NCBI; EZ, 10), nebo USDA (EZ, 11).

3.2.7 Využití molekulárních markerů

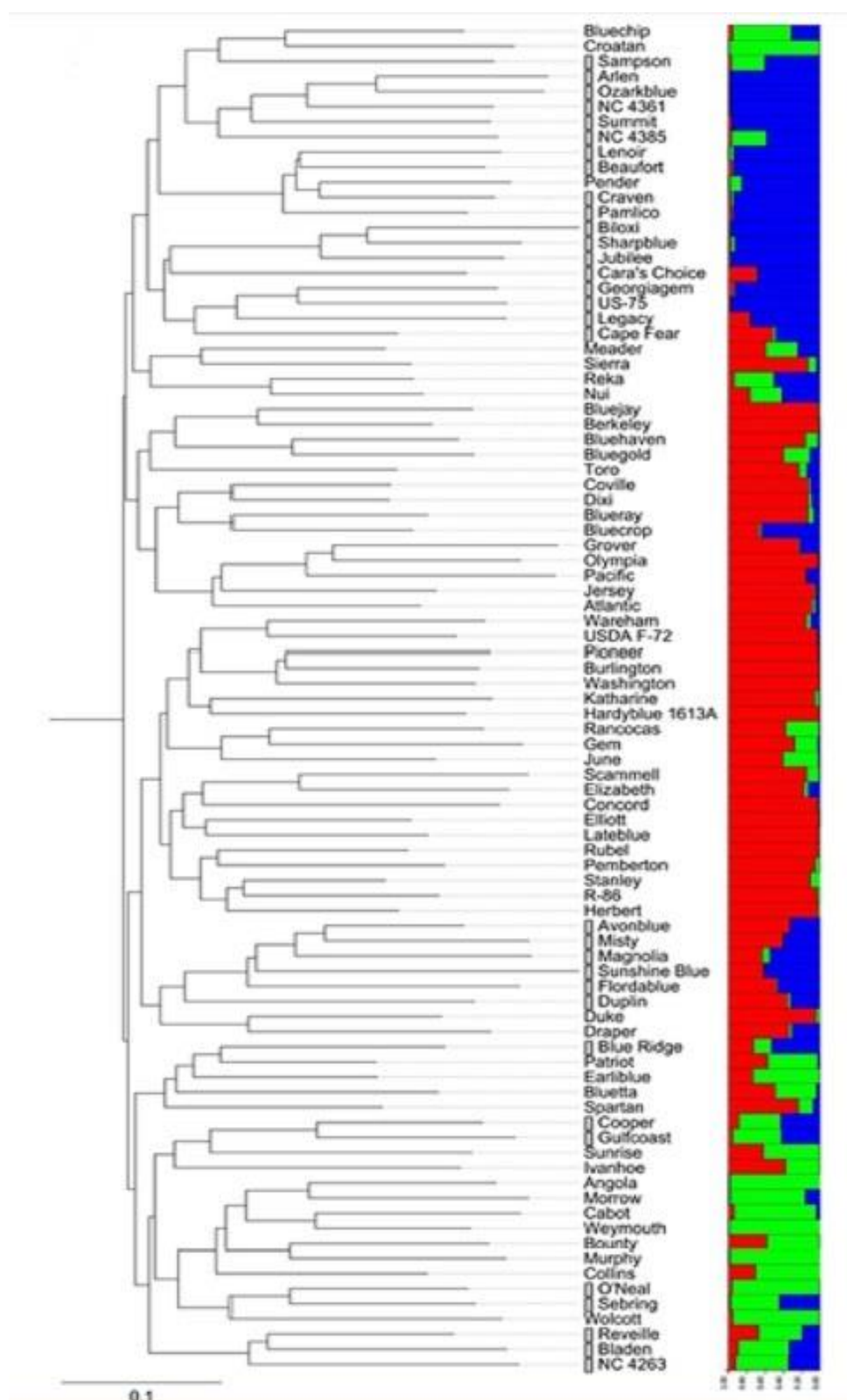
Molekulární markery mají v současné době význam především v mapování genomu jednotlivých rostlinných druhů a tvorbě dendrogramů genetických příbuzností. Velmi často jsou příčinou změn v původní systematice. Mohou být také využity ve šlechtění na hospodářsky významné vlastnosti, např. rezistence vůči chorobám a ke stresu.

S využitím RAPD markerů Badenes *et al.* (2003) zjistili při své práci velké množství nesrovnalostí v označování jednotlivých kultivarů tomelu. Někdy měl jeden kultivar více jmen, jindy zase bylo jedno jméno použito pro více kultivarů (BADENES *et al.*, 2003). RAPD použili také Frotscher *et al.* (2014) při identifikaci stolních odrůd révy vinné (FROTSCHER *et al.*, 2014).

V Turecku se využívá molekulárních markerů, konkrétně SSR, při studiu rezistence meruněk vůči viru šarky švestky (*Plum pox virus, PPV*). Turecko produkuje z celosvětové produkce 15 – 20 % čerstvých a 65 – 80 % sušených meruněk (EZ, 12). PPV by tedy mohl v této lokalitě napáchat velké hospodářské škody (ULUBAŞ SERÇE *et al.*, 2015).

V roce 2005 publikoval Boches (BOCHES, 2005) 30 SSR markerů vhodných pro použití u kanadských borůvek. Tyto markery následně při PCR amplifikovali Palmieri *et al.* (2009) ve svém experimentu. Dobré amplifikační výsledky získal u 13 z nich. Cílem Palmieriho skupiny byla možnost správné identifikace kultivarů v produkčních školkách a také možnost zjištění borůvek v různých produktech na současném trhu potravin, jako jsou např.: jogurt, dětská výživa, džus a sušenky (PALMIERI *et al.*, 2009).

SSR metoda byla také použita v jiném případě. K níže uvedenému dendrogramu (Obr. 1) bylo použito 42 SSR markerů. Patrný je vliv kultivaru 'Weymouth' jako jednoho z rodičů pro šlechtění kultivarů odolných vůči chorobám (BIAN *et al.*, 2014).



Obr. 1: Dendrogram za použití 42 SSR markerů (převzato z BIAN *et al.*, 2014).

Real-Time PCR umožňuje snadnou identifikaci druhů ve zpracovaných potravinách (PEANO *et al.*, 2004). Stejně tak je možné identifikovat i větší škůdce, například *Rhagoletis mendax*, a to ve všech jeho stádiích (BURGHER-MACLELLAN *et al.*, 2009). Larvy tohoto hmyzu z čeledi vrtulovitých (*Tephritidae*), jsou špatně identifikovatelné a napadají plody Brusnice úzkolisté (*Vaccinium angustifolium*).

V roce 2011 byly na borůvkách kultivaru 'Nelson', rostoucích na komerčním poli v centrální oblasti Polska, pozorovány na listech chorobné skvrny, popsané jako červenohnědé až hnědé a nepravidelné. Jejich průměr byl 0,3 - 0,5 cm a často splývaly. PCR s použitím primerů Ps-pro a Ps-rev, specifických pro *Pseudomonas* spp., potvrdila, že původce choroby izolovaný z napadených listů, patří do tohoto rodu (KAŁUŻNA *et al.*, 2013).

4. VLASTNÍ KOMENTÁŘ

V popsaných molekulárních metodách jsou patrné některé rozdíly a možnosti jejich využití. SSR markery s kodominantním charakterem mohou být porovnávány mezi různými výzkumnými pracovišti díky tomu, že každý lokus je definován danou primerovou sekvencí. Tyto markery tvoří základ genomové databáze kanadských borůvek, podporované Plants for Human Health Institute, North Carolina State University, Washington State University a USDA. Databáze již byly využity při studiích ohledně chladového stresu nebo antraknózy borůvek. U metody RAPD je sice krátký čas potřebný k jejich zavedení v laboratoři (Baránek *et al.*, 2006), má však horší opakovatelnost a reprodukovatelnost výsledků i v rámci jednoho pracoviště. AFLP metoda dává přesné a opakovatelné výsledky, je však finančně i časově náročnější než ostatní metody.

Molekulární metody jsou ve světě stále populárnější. Již došlo a stále dochází především k tvorbě dendrogramů příbuznosti kultivarů, odrůd a druhů, kdy se využívá RAPD a SSR metod (LEVI a ROWLAND, 1997; BIAN *et al.*, 2014). Díky získaným datům dochází ke změnám v názvosloví a celkové systematice druhů rostlin i živočichů (BADENES *et al.*, 2003). Real-Time PCR je schopná detekovat větší rostlinné škůdce (BURGHER-MACLELLAN *et al.*, 2009) nebo analyzovat potraviny na přítomnost či nepřítomnost jednotlivých druhů rostlin. Pomocí PCR metod lze identifikovat viry.

Pořízení technického vybavení pro metody molekulárních markerů není pro české šlechtitele levnou záležitostí. Světově významné šlechtění probíhá ve velkých školkách, popř. v různých projektech univerzit a výzkumných ústavů, kde je technické vybavení dostupné. V USA je zřejmá i podpora ze strany místního Ministerstva zemědělství (USDA), která trvá prakticky od dob domestikace kanadských borůvek.

Nejedná se o přímé šlechtitelské techniky, molekulární metody mají spíše analyzační a kontrolní funkci. Přínosem molekulárních metod je především úspora času. Rostliny nemusí být při šlechtění dopěstovány do stadia, kdy se hospodářsky významný znak projeví. Pomocí molekulárních markerů se dá určit, zda si nově vyšlechtěné kultivary nebo odrůdy zachovaly po rodičích konkrétní cílové vlastnosti ještě dříve, než dojde k jejich projevu.

Jelikož ale celkový genom je značně velký, bude i nalezení jednotlivých významných genů časově náročné. S rostoucími znalostmi genů poroste i popularita využívání molekulárních metod.

Oblasti výzkumu borůvek, kterým se výzkumníci v současné době věnují, je zmírňování choroby způsobované houbou *Monilinia vaccinii-corymbosi* a hnilob plodů, prevence praskání plodů a vytváření genetických nástrojů pro zlepšování borůvek, jako je zmenšení jizvy na plodech, větší odolnost vůči chladu, zvýšení tolerance k vyššímu pH půdy, pozdější nástup kvetení nebo větší pevnost a odolnost plodů po sklizni. Šlechtění nových kultivarů pro plantážní pěstování se zaměřuje mimo jiné na snížení počtu sběrů, což by umožnilo jednorázovou sklizeň. Světlejší zelená, popř. žlutá nebo červená barva listů může vést ke zvýšení atraktivnosti při využití borůvek i jako okrasných rostlin v zahradách (SCALZO et al., 2009b). Samozřejmostí jsou ještě větší velikost bobulí a plodnost keřů. S rostoucím povědomím a zájmem lidí o nutričně kvalitní a zdravou stravu, jsou snahy šlechtitelů borůvek orientovány i na vyšší antioxidační kapacitu (např. obsah antokyanů), obdobně jako v práci Mellidou *et al.* (2014), kteří ve své práci využili molekulární markery při šlechtění jablek s vyšší koncentrací vitamínu C (MELLIDOU *et al.*, 2014).

Dle Brazeltona (2013) roste světová produkce kanadských borůvek v posledních letech přibližně o 20 % každé 2 roky. Tato skutečnost pravděpodobně může zvýšit zacílení šlechtitelů směrem k tomuto druhu.

Pěstování kanadských borůvek není v ČR zdaleka tak rozšířené jako v místech jejich původního rozšíření, Severní Americe, natož pak šlechtění (o opaku mám k dispozici jen neověřené, možná spíše tajné, informace). Největší komerční plocha pro produkci plodů je u nás farma pana Hustého z Provodova, s rozlohou 2 ha. Obecně lze říci, že pěstování drobného ovoce je u nás v útlumu, oproti např. sousednímu Polsku, kde se zemědělská výroba rozvíjí a komerční plochy osázené kanadskými borůvkami přesahují 3 000 ha.

Jelikož je u nás komerční prodej sbíraných lesních borůvek legislativně omezen, je zde velký potenciál pro produkci kanadských borůvek. Při výsadbě 3 000 – 3 500 ks rostlin na jeden ha a produkci 3 – 5 kg plodů z jednoho keře vychází celková roční sklizeň okolo 10 tun/ha.

Množení rostlin se u nás věnuje ve větším měřítku jen firma Jan Holub s.r.o. I když velká část jejich produkce směřuje do zahraničí, nestačí pokrýt rostoucí poptávku.

Molekulární metody spojené se šlechtěním kanadských borůvek u nás rozvinuté nijak nejsou. Ve světovém měřítku se tyto metody využívají stále častěji a metodiky použití jsou stále propracovanější. V současné době záleží spíše na rozluštění celého genomu kanadské borůvky a na identifikaci jednotlivých významných genů. V ČR lze

doporučit využití molekulárních metod spíše pro významnější hospodářské komodity, jako jsou jablka, meruňky, švestky a réva vinná.

5. ZÁVĚR

Cílem práce bylo prostudování literatury týkající se šlechtění kanadských borůvek a literatura zabývající se molekulárními metodami při analýze rostlinné DNA. Jelikož v České republice šlechtění tohoto druhu neprobíhá, jednalo se spíše o studium zahraniční literatury. Díky molekulárním metodám mají šlechtitelé kvalitní nástroje pro kontrolu produktů svého snažení. Rod *Vaccinium* má, doposud jako jeden z mála, databázi genetických dat centralizovanou do jednoho místa. Prostřednictvím webových stránek jsou tyto data přístupná výzkumným pracovníkům, ale i široké veřejnosti.

Přínos SSR a RAPD metod je především při tvorbě dendrogramů genetické příslušnosti různých taxonomických jednotek, metodu AFLP lze využít při studiu hybridizace, introgrese nebo definice klonů. Závěry SSR analýz mohou být snadno ověřeny na jiných pracovištích a tvoří základ centrální genomové databáze. AFLP a RAPD metody mají výsledky hůře reprodukovatelné, jsou ale časově snadno zaveditelné v laboratoři.

I když druh *Vaccinium corymbosum* dosud nepatří mezi přední světové ovocné komodity, popsané metody a techniky mají své uplatnění v praxi. Molekulární metody ve spojení s tímto druhem již byly využity při studiu možností potlačení abiotického a biotického stresu rostlin. Budoucí zaměření světových šlechtitelů kanadských borůvek bude směřovat těmito směry:

- mrazuvzdornost
- rezistentnost proti chorobám a škůdcům
- odolnost vyšším hodnotám pH
- atraktivita rostlin pro domácí pěstování
- větší velikost a množství plodů
- světlejší barva plodů
- lepší chuť a vyšší obsah nutričních látek
- delší skladovatelnost plodů
- menší jizva.

6. SOUHRN, RESUME, KLÍČOVÁ SLOVA

Využití molekulárních markerů při šlechtění kanadských borůvek.

Tato práce se zabývá nejnovějšími poznatky při šlechtění kanadských borůvek. Je zde zpracován přehled v současné době používaných PCR metod, příklady jejich využití v minulosti a možné budoucí uplatnění při studiu druhu *Vaccinium corymbosum* L. Bylo sledováno uplatnění molekulárních metod využívaných při analýze rostlinné DNA u tohoto rostlinného druhu. Byly zde popsány molekulární metody a jejich výsledky sloužící pro identifikace a odlišení jednotlivých odrůd, diagnostiku patogenů a sledování a tvorbu molekulárních markerů. Tyto markery mohou být spojeny s hospodářsky významnými vlastnostmi tohoto druhu.

Klíčová slova: borůvka, šlechtění, PCR, marker.

The use of molecular markers in breeding of Highbush Blueberries.

This thesis deals with the latest findings in breeding highbush blueberries. There is prepared an overview of currently used PCR techniques, examples of their use in the past and possible future use in the study of the species *Vaccinium corymbosum* L. It was observed the application of molecular methods used in the analysis of plant DNA in this plant species. There is a description of molecular methods and their results used for the identification and differentiation of the varieties, monitoring and diagnosis of pathogens and the formation of molecular markers. These markers can be associated with economically important properties of this species.

Keywords: blueberry, breeding, PCR, marker.

7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Tištěné zdroje

ANGELETTI, P., H. CASTAGNASSO, E. MICELI, O. L. TERMINIELLO, A. CONCELLÓN, A. CHAVES a A. R. VICENTE. Effect of preharvest calcium applications on postharvest quality, softening and cell wall degradation of two blueberry (*Vaccinium corymbosum*) varieties. *Postharvest biology and technology*, 2010, 58(2), 98-103.

BADENES, M. L., A. GARCÉS, C. ROMERO, M. ROMERO, J. CLAVÉ, M. ROVIRA A G. LLÁCER. Genetic diversity of introduced and local Spanish persimmon cultivars revealed by RAPD markers. *Genet Res Crop Evol*, 2003, 50:579–585.

BARÁNEK, Miroslav, Kateřina MORAVCOVÁ a Miroslav PIDRA. *Biotechnologie v zahradnictví: návody pro praktická laboratorní cvičení*. 1. vyd. V Brně: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2006, 45 s. ISBN 80-7157-937-8.

BARKER, Jacqueline H., Michaela MATTHES, Gillian M. ARNOLD, Keith J. EDWARDS, Inger ÅHMAN, Stig LARSSON a Angela KARP. Characterisation of genetic diversity in potential biomass willows (*Salix* spp.) by RAPD and AFLP analyses. *Genome*, 1999, 42:173-183.

BÄRTELS, Andreas. *Dřeviny od A do Z: 1500 stromů a keřů*. Vyd. 1. Praha: Knižní klub, 2011, 287 s. ISBN 978-80-242-2717-7.

BEDNÁŘ, J., VYHNÁLEK, T., JEDLIČKOVÁ, D. *Cvičení z genetiky rostlin*. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 1999, 122-132 s. ISBN 80-7157-388-4.

BERMINGHAM, N. a K. LUETTICH. Polymerase chain reaction and its applications. *Current Diagnostic Pathology*, 2003, roč. 9, s. 159-164.

BIAN, Y., J. BALLINGTON, A. RAJA, C. BROUWER, R. REID, M. BURKE, X. WANG, L. J. ROWLAND, N. V. BASSIL a A. BROWN. Patterns of simple sequence repeats in cultivated blueberries (*Vaccinium* section *Cyanococcus* spp.) and their use in revealing genetic diversity and population structure. *Molecular Breeding*, 2014, 34(2):675-689.

BIELAWSKI, J., K. NOACK a D. PUMO. Reproducible amplification of RAPD markers from vertebrate DNA. *Biotechniques*, 1995,18 (5): 856-860.

BOCHES, P., *Microsatellite Marker Development and Molecular Characterization in Highbush Blueberry (Vaccinium corymbosum L.) and Vaccinium Species*. Master of Science Thesis. Oregon State University. 2005.

BRAZELTON, C. *World Blueberry Acreage and Production*. Folsom. CA: North American Blueberry Council, 2013.

BROWN, T. A. *Gene Cloning and DNA Analysis: An Introduction*. 6. vyd. [s. l.] : Wiley-Blackwell, 2010.

BUCK, E. J., J. SCALZO, C. WIEDOW, R. HURST, A. C. ALLAN, T. K. MCGHIE, V. NAHLA, N. V. BASSIL a L. J. ROWLAND. Progress in Blueberry Research in New Zealand, *Int. J. Fruit Science*, 2012, 12: 304-315.

BURGHER-MACLELLAN, K. L., S. GAUL, K. MACKENZIE a C. VINCENT. The use of real-time PCR to identify blueberry maggot (Diptera: Tephritidae, *Rhagoletis mendax*) from other *Rhagoletis* species and in lowbush blueberry fruit (*Vaccinium angustifolium*). *Acta Horticulturae*, 2009, (ISHS) 810:265-274.

BUSTIN, S. A. *A-Z of Quantitative PCR*. International University Line, La Lolla, USA, 2004, ISBN: 0-9636817-8-8.

CANTU, D., A. R. VICENTE, J. M. LABAVITCH, A. B. BENNETT a A. L. T. POWELL. Strangers in the matrix: plant cell wall and pathogen susceptibility. *Trends Plant Science*, 2008, 13, 610–617.

DAHLM, R. Discovering DNA: Friedrich Miescher and the early years of nucleic acid research. *Human Genetics*, 2008, Vol. 122(6), p. 565-581.

DIATCHENKO, L., S. LUKYANOV, Y. F. LAU a P. D. SIEBERT. Suppression subtractive hybridization: a versatile method for identifying differentially expressed genes. *Methods Enzymol*, 1999, 303:349-380.

DIE J. V. a L. J. ROWLAND. Advent of genomics in blueberry. *Mol. Breeding*, 2013, 32, 493–504.

DIXON, R. a PAIVA, N., 1995. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell*, 1085–1097.

DOLEJŠÍ, Antonín, Vladimír KOTT a Lubomír ŠENK. *Méně známé ovoce*. Vyd. 1. Praha: Zemědělské nakladatelství Brázda, 1991, 149 s., 16 s. obr. příloh. Zahrádka. ISBN 80-209-0188-4.

EDWARDS, K., C. JOHNSTONE a C. THOMPSON. A simple and rapid method for the preparation of genomic plant DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Res*, 1991, 19: 1349.

EHLLENFELDT M. K. Self- and cross-fertility in recently released highbush blueberry cultivars. *HortScience*, 2001, 36:133–135.

ELLSWORTH, D. L., K. D. RITTENHOUSE a R. L. HONEYCUTT. Artifactual variation in randomly amplified polymorphic DNA banding patterns. *BioTechniques*, 1993, 14:214-217.

ERENSMEIER, S. Magnetic particles for the separation and purification of nucleic acids. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, roč. 73, č. 3, s. 495-504. ISSN 0175-7598.

FROTSCHER, J., NOCENTINI, M., RUEHL, E. a BITZ, O. 2014. Quality control: identification of table grape cultivars using rapid markers. *Acta Horticulturae*. (ISHS) 1048:193-196.

GAJDOŠOVÁ, A., M. G. OSTROLUCKÁ, a G. LIBIAKOVÁ. Characterization of in vitro-obtained clones of selected *Vaccinium sp.* and cultivars using RAPD analysis. In COST 863 EUROBERRY, WG2, Quality assurance of planting material. First meeting, 23-25 June, 2005, Leiden, The Netherlands: p. 16.

GIONGO, L., F. IERI, U. VRHOVSEK, M. GRISENTI, F. MATTIVI a M. ECCHER. Characterization of *vaccinium* cultivars: horticultural and antioxidant profile. *Acta Horticulturae*, 2006, (ISHS) 715:147-152.

GOUGH, Robert Edward. The highbush blueberry and its management. *Psychology Press*, 1994, p. 3. ISBN 978-1-56022-021-3.

HAIN, R., H. J. REIF, E. KRAUSE, R. LANGEBARTELS, H. KINDL, B. VORNAM, W. WIESE, E. SCHMELZER, P. H. SCHREIER a R. H. STÖCKER. Disease resistance results from foreign phytoalexin expression in a novel plant. *Nature*, 1993, 361, 153–156.

HANSEN, J., A. LACIS, R. RUEDY, M. SATO A H. WILSON. How sensitive is the world's climate? *Natl. Geog. Soc. Res. Exploration*, 1993, 9, 142-158.

HART, J., B. STRIK, L. WHITE a W. YANG. Nutrient management for blueberries in Oregon. 2006. Oregon State University. Ext. Serv. Pub. EM 8918.

HILTON, A. C., J. G. BANKS a C. W. PENN. Optimization of RAPD for fingerprinting Salmonella. *Applied Microbiology*, 1997, 24: 243-248.

HOLUB, Jan. Vadnutí azalek a rododendronů způsobené houbami rodu Phytophthora. Profi Press, 2002.

HORÁK, D. a N. BENEDYK. Magnetic poly (glycidyl methacrylate) microspheres prepared by dispersion polymerization in the presence of electrostatically stabilized ferrofluids. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*. 2004, roč. 2, č. 22, s. 5827-5837.

HORÁK, D., B. RITTICH a A. ŠPANOVÁ. Carboxyl-functionalized magnetic microparticle carrier for isolation and identification of DNA in dairy products. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 2007, roč. 311, č. 1, s. 249-254. ISSN 03048853.

CHEN, B. Y. a B. W. JANES. *PCR cloning protocols*. 3. vyd. Totowa, N. J: Humana Press, 2002, 439 s. ISBN 15-925-9177-9.

CHIEN, A., D. B. EDGAR a J. M. TRELA. *J. Bact.*, 1976, 127, 1550-1557.

INOSTROZA-BLANCHETEAU, C., F. AQUEA, M. REYES-DÍAZ, M. ALBERDI a P. ARCE-JOHNSON. Identification of aluminum-regulated genes by cDNA-AFLP analysis of roots in two contrasting genotypes of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.). *Mol Biotechnol.*, 2011, 49: pp. 32-41.

KALT, W., C. LAWAND, D. A. J. RYAN, J. E. MCDONALD, H. DONNER a C. F. FORNEY. Oxygen radical absorbing capacity, anthocyanin and phenolic content of

highbush blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.) during ripening and storage. *J Am Soc Hort Sci.* 2003;128(6):917–923.

KALUŽNA, M., J. PUŁAWSKA a B. MESZKA. A new bacterial disease on bluberry (*Vaccinium corymbosum*) caused by *Pseudomonas Spp.* *Journal of plant protection research*, 2013, 53.1: 32-36.

KAMBHAMPATI, S., W. BLACK a K. RAI. Random amplified polymorphic DNA of mosquito species and populations (*Diptera, Culicidae*) – techniques, statistical analysis, and applications. *Journal of medical entomology*, 1992, 29 (6): 939-945.

KÁŠ, J., M. KODÍČEK a O. VALENTOVÁ. *Laboratorní techniky biochemie*. 1. vyd. Praha: VŠCHT, 2005, 258 s. ISBN 80-708-0586-2.

KIM, S. J., D. J. YU, T. C. KIM a H. J. LEE. Growth and photosynthetic characteristics of blueberry (*Vaccinium corymbosum* cv. 'Bluecrop') under various shade levels. *Scientia Horticulturae*, 2011, 129(3), 486-492.

KITNER, M. Molekulární markery využívané při studiu variability rostlin. 2012. Projekt CZ.1.07/1.1.00/14.0016 Vzdělávání středoškolských pedagogů a studentů středních škol jako nástroj ke zvyšování kvality výuky přírodovědných předmětů. Katedra botaniky Přírodovědecké fakulty UP. Olomouc.

KRÁLOVÁ, B., L. FUKAL, P. RAUCH a T. RUML. *Bioanalytické metody*. 3. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2001, 254 s. ISBN 80-708-0449-1.

KODAMA, Y., M. SHUMWAY, a R. LEINONEN. The sequence read archive: explosive growth of sequencing data. *Nucleic Acids Research*, 2012, 40 (Database issue), D54–D56.

KÚDELA, Václav, František KOCOUREK a Martin BÁRNET. *České a anglické názvy chorob a škůdců rostlin: Czech and English names of plant diseases and pests*. 1. vyd. Praha: Profi Press, 2012, 272 s. ISBN 978-80-905080-4-0.

LAMBERT, D. H. *Effects of Pruning Method on the Incidence of Mummy Berry and Other Lowbush Blueberry Diseases*. 1990. The University of Maine. 3 pp.

LAWYER, F., S. STOFFEL, R. SAIKI, S. CHANG, P. LANDRE, R. ABRAMSON a D. GELFAND. High-Level Expression, Purification, and Enzymatic Characterization of

Full-Length *Thermus aquaticus* DNA Polymerase and a Truncated form Deficient in 5' to 3' Exonuclease Activity. *P.C.R. Methods Appl.*, 1993, 2, 275.

LEE, J. I., D. J. YU, J. H. LEE, S. J. KIM a H.J. LEE. Comparison of mid-Winter cold-hardiness and soluble sugars contents in the shoots of 21 highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum*) cultivars. *Journal of horticultural science & biotechnology*, 2013, 88(6), 727-734.

LEVI, A. a L. J. ROWLAND. Identifying blueberry cultivars and evaluating their genetic relationships using Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) and Simple Sequence Repeat- (SSR-) anchored primers. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 1997, 122(1): 74-78.

LIU, Z. J., A. NICHOLS, P. LI AND a R. A. DUNHAM. Inheritance and usefulness of AFLP markers in channel catfish (*Ictalurus punctatus*), blue catfish (*I. furcatus*) and their F1, F2 and backcross hybrids. *Mol. Gen. Genet.*, 1998, 258: 260–268.

LIVAK, K. J. a T. D. SCHMITTGEN: *Methods*, 25, 402 (2001).

MAINLAND, C. M. Frederick Coville's pioneering contributions to blueberry culture and breeding. In: Cline, W. O. and J. R. Ballington (eds) *Proceedings of the 8th North American blueberry Research and extension workers conference*. 1998. North Carolina State University, Raleigh, Wilmington, North Carolina, pp. 74 – 79.

MELLIDOU, I., J. KEULEMANS, M. W. DAVEY, D. CHAGNÉ, S. E. GARDINER a W. LAING. Nutritionally-enhanced apples: markers for molecular breeding for fruit vitamin c concentrations in apple. *Acta Horticulturae*, 2014, (ISHS) 1048:163-170.

MILHOLLAND, R.D. Anthracnose fruit rot (ripe rot) In: Caruso, F.L. a D. C. Ramsdell, editors. *Compendium of Blueberry and Cranberry Diseases*. St. Paul, MN, USA: APS Press, *The American Phytopathological Society*; 1995. p. 17.

MILES, T. D., B. DAY a A. C. SCHILDER. Identification of differentially expressed genes in a resistant versus a susceptible blueberry cultivar after infection by *Colletotrichum acutatum*. *Molecular Plant Pathology*, 2011,12: 463–477.

MULLIS, K., F. FALLONA, S. SCHARF, R. SAIKI, G. HORN a H. ERLICH. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 1986, v. 51, 263-265 s. ISSN 1943-4456.

NAIK, D., A. L. DHANARAJ, R. ARORA a L. J. ROWLAND. Identification of genes associated with cold acclimation in blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) using a subtractive hybridization approach. *Plant Science*, 2007, 173: pp. 213-222.

O'DONNELL, A.G., M. SEASMAN, A. MACRAE, I. WAITE a J. T. DAVIES. Plants and fertilisers as drivers of change in microbial community structure and function in soils. *Plant Soil*, 2001, 232, 135–145.

OLIVIERA, E. J., J. G. PADUA, M. I. ZUCCHI, R. VENCovsky, M. L. VIEIRA. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology*, 2006, č. 29 (2), 294-307 s. ISSN 1415- 4757.

PALMIERI, L., A. SAVIANE, M. SORDO, M. S. GRANDO a L. GIONGO. Blueberry: germplasm characterization and food traceability by the use of molecular markers. *Acta Horticulturae*, 2009, (ISHS) 810:167-172.

PAPRŠTEIN, F., J. LUDVÍKOVÁ a J. SEDLÁK. Evaluation of a germplasm collection of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) in the Czech republic . *Acta Horticulturae*, 2009a, (ISHS) 810:97-102.

PAPRŠTEIN, František a kol.. *Technologie pěstování kanadské borůvky (Vaccinium corymbosum L.)*. Holovousy: Výzkumný a šlechtitelský ústav ovocnářský, 2009b, 33 s. ISBN 978-80-87030-09-7.

PEANO, C., C. SAMSON, L. PALMIERI, M. GULLI a N. MARMIROLI. Qualitative and quantitative evaluation of the genomic DNA extracted from GMO and non GMO foodstuffs with four different extraction methods. *J. Agr. Food Chem.*, 2004, 52:6962–6968.

PREPARED BY PESTICIDE RISK REDUCTION PROGRAM. *Crop profile for highbush blueberry in Canada, 2011*. Pest Management Centre. Ottawa: Agriculture and Agri-Food Canada, 2012. ISBN 9781100200774.

RAHMAN, M. M. a A. ELAISSARI. Temperature and magnetic dual responsive microparticles for DNA separation. *Separation and Purification Technology*. 2011, roč. 81, č. 3, s. 286-294. ISSN 13835866.

RASMUSSEN, R. a G. REED. Optimizing Rapid Cycle DNA Amplification Reactions. *The Rapid Cyclist*, 1992, Spring: 1-5.

RAVIV, M. The use of compost in growing media as suppressive agent against soil-borne diseases. *Acta Horticulturae*, 2008 779, 39–50.

RICHTER, Johan. *Léčení ovocem a zeleninou : lékárna ze zahrady*. Bratislava: Eko-konzult, 1998. 185 s. ISBN 80-88809-45-2 (brož.).

RITTICH, B., A. ŠPANOVÁ, D. HORÁK, M. J. BENEŠ, L. KLESNILOVÁ, K. PETROVÁ a A. RYBNÍKÁŘ. Isolation of microbial DNA by newly designed magnetic particles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2006, roč. 52, č. 2, s. 143-148. ISSN 09277765.

ROSYPAL, Stanislav. *Terminologie Molekulární Biologie: české Odborné Termíny a Anglické Ekvivalenty* 1. vyd. Brno. 2001.

ROWLAND, L. J., N. ALKHAROUF, O. DARWISH, E. L. OGDEN, J. J. POLASHOCK, N. V. BASSIL a D. MAIN. Generation and analysis of blueberry transcriptome sequences from leaves, developing fruit, and flower buds from cold acclimation through deacclimation. *BMC Plant Biology*, 2012a, 12, 46.

ROWLAND, L.J., D.J. BELL, N. ALKHAROUF, N. V. BASSIL, F. A. DRUMMOND, L. BEERS, E. J. BUCK, C. E. FINN, J. GRAHAM, S. MCCALLUM, J. F. HANCOCK, J. J. POLASHOCK, J. W. OLMSTEAD a D. MAIN. Generating genomic tools for blueberry improvement. *Int J Fruit Sci*, 2012b, 12: pp. 276-287.

SAIKI, R. K., D. H. GELFAND, S. STOFFEL, S. J. SCHARF, R. HIGUCHI, G. T. HORN, K. B. MULLIS a H. A. ERLICH. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 1988, 239(4839): 487–491.

SCAGEL, C.F. Inoculation with ericoid mycorrhizal fungi alters fertilizer use of highbush blueberry cultivars. *HortScience*, 2005, 40, 786–794.

SCALZO, J., S. MILLER, C. EDWARDS a P. ALSPA. 'Hortblue Onyx' and 'Hortblue Petite': Two new ornamental blueberries from New Zealand. *Acta Horticulturae*, 2009a, (ISHS) 810:153-156.

SCALZO, J., S. DIERKING, W. DIERKING, S. MILLER, C. EDWARDS a P. ALSPACH. 'Hortblue Poppins': NEW CULTIVAR FOR THE HOME GARDEN. *Acta Horticulturae*. 2009b.(ISHS) 810:157-162

SHI, J., Z. PAN, T. H. MCHUGH, D. WOOD, E. HIRSCHBERG a D. OLSON. Drying and quality characteristics of fresh and sugar-infused blueberries dried with infrared radiation heating. *LWT - Food Science and Technology*, 2008, 41, 1962-1972.

SCHILDER, A.M a T. D. MILES. Virus and viruslike diseases of blueberry. Michigan blueberry facts, *Extension Bulletin E-3048*, 2008. Michigan State University, East Lansing, Michigan.

SCHMIDT, B. M., J. W. ERDMANN jr. a M. A. LILA. Effects of Food Processing on Blueberry Antiproliferation and Antioxidant Activity. *Journal of Food Science*, 2005, 70(6): 389–394.

SILVA, S., E. M. COSTA, M. F. PEREIRA, M. R. COSTA a M. E. PINTADO. Evaluation of the antimicrobial activity of aqueous extracts from dry *Vaccinium corymbosum* extracts upon food microorganism. *Food Control*, 2013, 34(2), 645-650.

SHULAEV V., D. J. SARGENT, R. N. CROWHURST, T. C. MOCKLER, O. FOLKERTS a A. L. DELCHER. The genome of woodland strawberry (*Fragaria vesca*). *Nat. Genet.*, 2011, 43 109–116.

SPIERS, J.M. a J. H. BRASWELL. Soil-applied sulfur effects elemental leaf content and growth of 'Tifblue' rabbiteye. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 1992, 117:230-233.

STÜCKRATH, R., R. QUEVEDO, L. de la FUENTE, A. y HERNÁNDEZ, V SEPÚLVEDA. Effect of foliar application of calcium on the quality of blueberry fruits. *Journal of Plant Nutrition*, 2008, 31(7): 1299-1312

TAUTZ, D. Hypervariability of simple sequences. *Current Opinion in Genetics and Developement*, 1989, 4, 1193-9.

TELLIER, R., J. BUKH, a S. U. EMERSON. Long PCR amplification of large fragments of viral genomes: a technical overview. *Methods Mol Biol.*, 2003, roč. 226, s. 167-72.

TEL-ZUR, N., S. ABBO, D. MYLABOSKI a Y. MIZRAHI. Modified CTAB procedure for DNA isolation from epiphytic cacti of the genus *Hylocereus* and *Selenicereus* (Cactaceae). *Plant Molecular Biology Reporter*, September 1999, vol. 17, no. 3, p. 249-254.

TOMICZEK, Christian. *Atlas chorob a škůdců okrasných dřevin*. Biocont Laboratory, 2005.

TROJÁNEK, Z. *Izolace DNA z rostlinných tkání pro použití v polymerázové řetězové reakci*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2013. 84 s. Vedoucí diplomové práce doc. Ing. Bohuslav Rittich, CSc.

ULUBAŞ SERÇE, C., M. GAZEL, K. ÇAĞLAYAN, B. M. ASMA a M. L. BADENES. Screening for resistance to *plum pox virus* in some local turkish apricot cultivars and their crosses by molecular markers. *Acta Horticulturae*, 2015, (ISHS) 1063:123-128.

VOS, P., R. HOGERS, M. BLEEKER, M. REIJANS, T. VAN DE LEE, M. HORNES, A. FRIJTERS, A., J. POT, J. PELEMAN, M. KUIPER a M. ZABEAU. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.*, 1995, 11, 4407–4414.

WALTER, Vilém. *Rozmnožování okrasných stromů a keřů*. Vyd. 3. Praha: Brázda, 2011, 310 s. ISBN 978-80-209-0385-3.

WANG, Z. Y., K. H. TSOI A K. H. CHU. Applications of AFLP technology in genetic and phylogenetic analysis of penaeid shrimp. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2004, 32, 399–407.

WATSON, J. D., T. A. BAKER, S. P. BELL, A. GANN, M. LEVINE a R. LOSICK. *Molecular Biology of the Gene*. San Francisco. Benjamin Cummings. 2004. ISBN 0-321-22368-3 .

WILLIAMS, J.G.K, A. R. KUBELIK, K. J. LIVAK, J. A. RAFASKI a S. V. TINGEY. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids. Res.*, 1990, 18:6531-653.

WOLFF, Jürgen a Angelika THROLL-KELLER. *Encyklopedie zahradních rostlin: moje krásná zahrada*. Praha: Fortuna Libri, 2008, 289 s. ISBN 978-80-7321-375-6.

XIE, Z.S., a X. C. WU. Studies on substrates for blueberry cultivation. *Acta Horticulturae*, 2009, 810, 513-520.

ZHAO-SEN XIE a XIAO-CHUN WU. Studies on substrates for blueberry cultivation. *Acta Horticulturae*, 2009, (ISHS) 810:513-520.

ZHANG, Z., H. LIU, L. WU a Y. LI. Technical system of blueberry micropropagation in China. *Acta Horticulturae*, 2006 (ISHS) 715:421-426.

Elektronické zdroje

1. FreshFruitPortal.com. *Blueberries of the World 2014*. International special edition. Editor Camila Gutiérrez. [online]. [cit. 2015-04-20]. Dostupné z: http://www.freshfruitportal.com/wp-content/uploads/2013/12/blueberries_of_the_world_2014.pdf.
2. Whitesbog Preservation Trust. *Blueberry Cultivation*. [online]. [cit. 2015-04-20]. Dostupné z: <http://www.whitesbog.org/whitesbog-history/blueberry-cultivation>
3. Community Plant Variety Office. [online]. [cit. 2015-04-20]. Dostupné z: <http://www.cpvo.europa.eu/main/en/home>
4. National Nutrient Database. United States Department of Agriculture. [online]. [cit. 2015-04-20]. Dostupné z: www.nal.usda.gov
5. Growing Produce. *Trends in World blueberry Production*. Posted by: Paul Rusnak. 2012. [online]. [cit. 2015-04-20]. Dostupné z: <http://www.growingproduce.com/fruits/berries/trends-in-world-blueberry-production/>
6. Praktikum fyziologie rostlin. *Kultivace in vitro*. Univerzita Karlova. Katedra experimentální biologie rostlin. Praha. [online]. [cit. 2015-04-20]. Dostupné z: http://kfrserver.natur.cuni.cz/lide/edmunz/praktika_fr/mb130p13/navody/11_invitro.pdf

- 7 Plants for Human Health Institute. *Genome database for Vaccinium*. North Carolina State University a Washington State University. [online]. [cit. 2015-04-20]. Dostupné z: www.vaccinium.org
- 8 Základy farmakogenomiky. Metodiky stanovení genových polymorfismů. Farmaceutická fakulta. Veterinární a farmaceutická univerzita v Brně. [online]. [cit. 2015-04-20]. Dostupné z: <http://farmakogenomika.cz/index.php?kapitola=9&podkapm=95>
- 9 *Mutageneze in vitro*. Oddělení molekulární biologie CRH. Univerzita Palackého. Olomouc. 2010. [online]. [cit. 2015-04-20]. Dostupné z: <http://www.molbio.upol.cz/stranky/vyuka/cgi/3.pdf>
- 10 National Center for Biotechnology Information. U.S. National Library of Medicine. Bethesda, MD. [online]. [cit. 2015-04-20]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- 11 Agricultural Research Service. United States Department of Agriculture. Washington DC. [online]. [cit. 2015-04-20]. Dostupné z: <https://www.ars.usda.gov>
- 12 FAO 2012. FAO statistical database. 2012. [online]. [cit. 2015-04-20]. Dostupné z: <http://apps.fao.org/page/collections?subset=agriculture>