

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2021

Monika Balažíková

Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta

Katedra buněčné biologie a genetiky



Genetické markery pro identifikaci kultivarů brusnice chocholičnaté

(*Vaccinium corymbosum*)

Bakalářská práce

Monika Balažiková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2021

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

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Akademický rok: 2018/2019

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Monika BALAŽÍKOVÁ**
Osobní číslo: **R17779**
Studijní program: **B1501 Biologie**
Studijní obor: **Molekulární a buněčná biologie**
Téma práce: **Genetické markery pro identifikaci kultivarů brusnice chocholičnaté (*Vaccinium corymbosum*).**
Zadávací katedra: **Katedra buněčné biologie a genetiky**

Zásady pro vypracování

1. Shromáždění dostupných literárních zdrojů. 2. Vypracování rešerše na téma bakalářské práce – charakteristika druhu brusnice chocholičnatá s důrazem k pěstovaným kultivarům a DNA markerům (mikrosatelitům) vhodným k jejich identifikaci.

Rozsah pracovní zprávy:
Rozsah grafických prací:
Forma zpracování bakalářské 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. 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. 5. 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. 6. 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 bakalářské práce: **RNDr. Petr Nádvořík, Ph.D.**
Katedra buněčné biologie a genetiky

Datum zadání bakalářské práce: 12. října 2018
Termín odevzdání bakalářské práce: 31. července 2021

LS.

doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.
děkan

prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.
vedoucí katedry

V Olomouci dne 11. května 2021

Bibliografické údaje

Jméno a příjmení autora: Monika Balažiková

Název práce: Genetické markery pro identifikaci kultivarů brusnice chocholičnaté (*Vaccinium corymbosum*)

Typ práce: Bakalářská práce

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

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

Rok obhajoby práce: 2021

Souhrn:

V mé bakalářské práci rešeršního typu jsem charakterizovala druh brusnice chocholičnatá (*Vaccinium corymbosum*) a několik dalších významných druhů rodu *Vaccinium*, které jsou šlechtiteli často využívány ke křížení s brusnicí chocholičnatou. Popsala jsem také základy pěstování a pěstitelskou typologii kultivarů brusnice chocholičnaté. Především se ale v této práci zabývám charakteristikou mikrosatelitních markerů, které slouží pro identifikaci kultivarů druhů rodu *Vaccinium*, především kultivarů brusnice chocholičnaté.

Popsala jsem zde 2 systémy mikrosatelitních markerů pro identifikaci kultivarů. První systém vycházel původně z 49 mikrosatelitních lokusů, z nichž bylo vybráno 28 polymorfních mikrosatelitních lokusů a ty byly použity k úspěšné identifikaci 71 kultivarů několika druhů rodu *Vaccinium*. Z těchto 28 mikrosatelitů autoři vybrali 9 mikrosatelitních lokusů, které měly spolehlivě hodnotitelný produkt bez artefaktů, a proto mají univerzální využití v rámci různých laboratoří. Druhý systém zahrnuje 11 polymorfních mikrosatelitních lokusů, podle kterých se dokáží spolehlivě identifikovat kultivary druhů rodu *Vaccinium* sekce *Cyanococcus*, kam patří brusnice chocholičnatá.

Klíčová slova: brusnice chocholičnatá, *Vaccinium corymbosum*, mikrosatelit, DNA, *cross-species* PCR amplifikace, genetické markery

Počet stran: 51

Počet příloh: 0

Jazyk: Český

Bibliographical identification**Author's first name and surname:** Monika Balažíková**Title:** Genetic markers for the identification of cultivars of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum*)**Type of thesis:** Bachelor thesis**Department:** Department of Cell Biology and Genetics, Faculty of Science, Palacky University, Olomouc**Supervisor:** RNDr. Petr Nádvorník, Ph.D.**The year of presentation:** 2021**Summary:**

In my Bachelor thesis, there is characterized specie *Vaccinium corymbosum* and several types of species of genus *Vaccinium* which are most commonly crossed with this specie. The basics of breeding and cultivation typology of cultivars of *V. corymbosum* are there also described. However, primary aim of this thesis is description microsallite markers which can be used for identification of especially *V. corymbosum* cultivars.

There are covered two systems of microsatellite markers for identification of mainly *V. corymbosum* cultivars. The first system was based on forty nine microsatellite locuses. It was selected twenty eight polymorphic microsatellite locuses and these were used to successfully identification of seventy-one cultivars of *Vaccinium* species. It was selected only nine microsatellite locuses. These have offered useful product without artifacts and it is predicted possibility of its universal application within various laboratories. The second system includes eleven polymorphic microsatellite locuses which are useful for reliable identification cultivars of species of genus *Vaccinium* section *Cyanococcus*.

Keywords: highbush blueberry, *Vaccinium corymbosum*, microsatellite, DNA, cross-species PCR amplification, genetic markers**Number of pages:** 51**Number of appendices:** 0**Language:** Czech

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně v průběhu bakalářského studia pod vedením RNDr. Petra Nádvorníka, Ph.D. s použitím uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci dne:

.....

Monika Balažiková

Zde mi dovoluje srdečně poděkovat mému vedoucímu bakalářské práce RNDr. Petru Nádvorníkovi, Ph.D. za jeho vstřícnost, ochotný přístup a věcné rady po celou dobu zpracovávání mé bakalářské práce. A děkuji také své rodině a kamarádům za podporu během celého studia.

Obsah

1 Úvod	1
2 Cíle práce	2
3 Rod <i>Vaccinium</i>	3
3.1 Charakteristika vybraných druhů rodu <i>Vaccinium</i>	4
3.1.1 Brusnice chocholičnatá.....	4
3.1.2 Brusnice Darrowova	6
3.1.3 Brusnice úzkolistá	6
3.1.4 Vlochyně bahenní.....	7
3.1.5 Brusnice Constableova	7
3.1.6 Brusnice prutovitá	7
3.1.7 Brusnice borůvka.....	8
4 Taxonomie druhu brusnice chocholičnaté.....	9
4.1 Problematika vymezení druhu <i>Vaccinium corymbosum</i>	9
5 Antioxidační vlastnosti borůvek	10
6 Pěstování druhů rodu <i>Vaccinium</i>	12
6.1 Pěstitelská typologie.....	12
6.2 Základy pěstování a množení brusnice chocholičnaté	14
6.3 Nejčastěji pěstované kultivary brusnice chocholičnaté v České republice	15
7 Genetické markery pro identifikaci druhů rodu <i>Vaccinium</i>	17
7.1 RAPD	17
7.2 RFLP	18
7.3 SNP	18
7.4 SCAR	18
7.5 Mikrosatelity	19
7.5.1 Mikrosatelitní markery rodu <i>Vaccinium</i>	20
8 Závěr	33
9 Literatura	34
10 Patenty	42

1 Úvod

Brusnice chocholičnatá (*Vaccinium corymbosum*) patří do čeledi vřesovcovitých (Ericaceae), rodu *Vaccinium* a sekce *Cyanococcus*. Pěstuje se především pro své plody nazývané borůvky, které jsou velmi chutné a mají také pozitivní účinky na lidské zdraví, hlavně díky vysokému množství antioxidantů. Kromě brusnice chocholičnaté jsou významnými druhy pro pěstění a šlechtění také brusnice úzkolistá (*V. angustifolium*), brusnice prutovitá (*V. ashei*), brusnice Darrowova (*V. darrowii*), brusnice borůvka (*V. myrtillus*), vlohyně bahenní (*V. uliginosum*) a brusnice Constableova (*V. constablaei*) a také některé další druhy z jiných sekcí, kterými se ale v této práci zabývat nebudu. Existuje několik set odrůd brusnice chocholičnaté, některé jsou patentované. Na odlišení druhů rodu *Vaccinium* se mimo jiné používají mikrosatelitní markery. Pokud jsou nalezené mikrosatelity i v rámci druhu dostatečně polymorfní, je možné využít je přímo na odlišení jednotlivých odrůd. Tato práce by se měla věnovat mikrosatelitním markerům, které se dají použít na odlišení odrůd druhu brusnice chocholičnaté.

2 Cíle práce

1. Shromáždění dostupných literárních zdrojů.
2. Vypracování rešerše na téma bakalářské práce - charakteristika druhu brusnice chocholičnatá s důrazem k pěstovaným kultivarům a DNA markerům (mikrosatelitům) vhodným k jejich identifikaci

3 Rod *Vaccinium*

Vaccinium je rod dvouděložných rostlin, který náleží do čeledi vřesovcovitých (Ericaceae). Je to skupina s velmi složitou taxonomií zahrnující přibližně 450 druhů (Song *et* Hancock, 2011). Tyto druhy jsou členěny do 30 sekcí (Stevens, 1969) tento náhled na členění rodu *Vaccinium* je uváděn i v novější literatuře (např. Ballington, 2001; Vander Kloet *et* Dickinson, 2009). Vnitřní nomenklatura rodu *Vaccinium* ale není ustálená a různí autoři přichází s rozdílnými koncepty (Vander Kloet, 1980 *et* 1988; Uttall, 1986 *et* 1987; Galletta *et* Ballington, 1996). Rod *Vaccinium* má složitou taxonomii i z hlediska českého odborného názvosloví, protože pro tento rod je použito několik českých rodových jmen, nejčastěji brusnice, ale dále i klikva a vlochyně. V rámci rodu *Vaccinium* existuje několik hospodářsky využívaných druhů, nejvýznamnější sekce a druhy pro potravinářství a šlechtění jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1: Vybrané sekce a druhy rodu *Vaccinium* (upraveno podle Song *et* Hancock, 2011; Anonymous1, 2015)

Sekce	Druh	Český název	Ploidie (x = 12)
<i>Cyanococcus</i>	<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. elliottii</i> Chapm.	Brusnice Elliottova	2x
<i>Myrtillus</i>	<i>V. myrtillus</i> L.	Brusnice borůvka	2x
<i>Oxycoccus</i>	<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

Poznámka: Ait. = Aiton, Camp = Camp, Chapm. = Chapman, Gray = Gray, L. = Linnaeus, Michx. = Michaux

Některé z těchto druhů se pěstují ve spoustě odrůd, příkladem druhu s největším počtem odrůd je brusnice chocholičnatá (*Vaccinium corymbosum*), na kterou především je tato práce zaměřena. V současné době je několik druhů rodu *Vaccinium* pěstováno komerčně v zemědělské produkci i individuálně mnohými zájmovými zahrádkáři. Využití plodů je tedy v potravinářství a obecně známé jsou také jejich příznivé účinky na lidský organismus (Song *et* Hancock, 2011; Nile *et* Park, 2014; Anonymous6, 2016).

3.1 Charakteristika vybraných druhů rodu *Vaccinium*

V rámci rodu *Vaccinium* se pro pěstění a šlechtění využívá několik druhů, k nejznámějším patří brusnice chocholičnatá a její kříženci s několika dalšími druhy rodu *Vaccinium*, dále klikva velkoplodá (*V. macrocarpon*) a brusnice brusinka (*V. vitis-idaea*). V této kapitole je popsán druh brusnice chocholičnatá a druhy se kterými je nejčastěji křížena.

3.1.1 Brusnice chocholičnatá

Brusnice chocholičnatá (*Vaccinium corymbosum*) je vzpřímeně rostoucí opadavý keř (Grulich, 2020). V přírodě dorůstá nejčastěji výšky 2–3 m a roste v chladnějších oblastech (Nesom, 2001; Song *et* Hancock, 2011; Retamales *et* Hancock, 2012). Díky poměrně vysokému vzrůstu se pro tuto rostlinu užívá v anglofonních zemích obecné pojmenování highbush blueberry (Nesom *et* Davis, 2002). Kořeny rostou mělce, většinou jen do hloubky kolem 0,4 m a jsou závislé na mykorrhíze (Paprštein *et al.*, 2009; Retamales *et* Hancock, 2012). Větve jsou na průřezu hranaté nebo oblé a mají žlutozelenou, v zimě načervenalou barvu (Vander Kloet, 1988; Nesom *et* Davis, 2002; Grulich, 2020). Listy jsou jednoduché a rostou střídavě. Jsou krátce řapíkaté a čepel má tvar vejčitý nebo úzce až široce eliptický. Na lici jsou listy mírně voskovité, na rubu mají žilnatinu s minimem chloupků (Nesom *et* Davis, 2002; Grulich, 2020). Barva listů je nejčastěji zelená, na podzim oranžová až červená (Vander Kloet, 1988; Anonymous5). Existují ale i výjimky, například kultivar 'Cabernet Splash' (spontánní mutant odrůdy 'Toro'), jehož listy mají od vyrašení až po jejich opad barvu vínově červenou až do fialova (Catton, 2019).

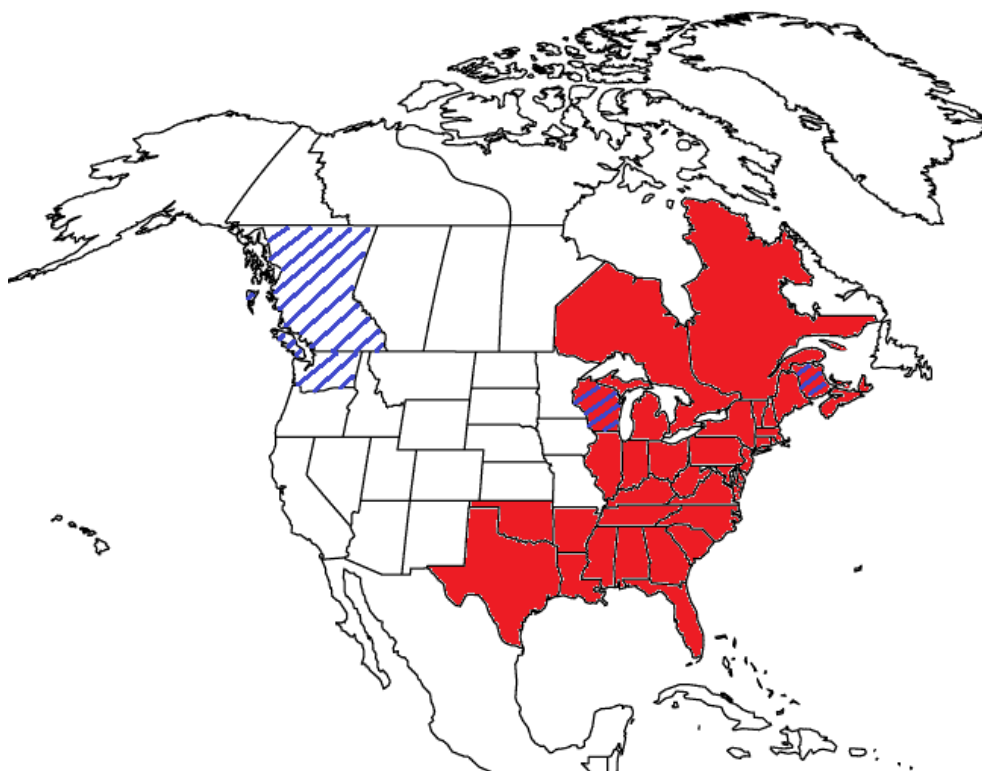
V hroznovitém květenství jsou uspořádány oboupohlavné květy podlouhle baňkovitého tvaru (Obr. 1). Mají dlouhou květní stopku a rozlišený kalich s korunou, které jsou srostlé. Kalich je zelený, pětičetný. Koruna je bílá, světle růžová nebo i růžová, má pět krátkých nazpět zahnutých cípů a je pětičetná (Hejný *et al.*, 1990; Grulich, 2020). Květ má 8 až 10 tyčinek a semeník je spodní (Hejný *et al.*, 1990). Rostliny jsou

cizosprašné, v případě potřeby však také samosprašné, to ale snižuje kvalitu jejich plodů (Paprštein *et al.*, 2009; Grulich, 2020). Na severní polokouli kvete v období od února do června (Nesom *et Davis*, 2002). V České republice obvykle v období od května do června (Anonymous4, 2017). Plodem jsou kulovité barvou obvykle sytě modré až modročerné bobule (Hejný *et al.*, 1990; Grulich, 2020). Tyto bobule jsou nazývány borůvky. Velikost bobulí je v průměru 0,4–1,2 cm. Dužina je světle zelená, nebarví a obsahuje spoustu drobných semen (Nesom, 2001; Grulich, 2020). Keř plodí v podmínkách České republiky obvykle od konce června až do září (popř. října) (Paprštein *et al.*, 2009; Anonymous4, 2017). Plody nedozrávají najednou, ale v období několika týdnů (Anonymous4, 2017; Anonymous5). Rostlina začíná kvést a plodit už v prvním roce života (Retamales *et Hancock*, 2012; Anonymous5).



Obrázek 1: Květy brusnice chocholičnaté (Foto: Anita Gould)

Brusnice chocholičnatá se přirozeně vyskytuje ve východní a severní části Severní Ameriky (Obr. 2) (Hancock *et Draper*, 1989). Vyskytuje se ve dvou ploidních stupních, a to diploidním a tetraploidním. Diploidní populace se vyskytuje přirozeně v severovýchodní části Severní Ameriky a tetraploidní populace se vyskytuje ve východní části Severní Ameriky, takže jejich výskyt se částečně překrývá, ale tetraploidní populace zasahuje jižněji než diploidní (Song *et Hancock*, 2011).



Obrázek 2: Mapa přirozeného výskytu brusnice chocholičnaté v Severní Americe (Nesom, 2001)

Poznámka: Červeně jsou označeny státy s přirozeným výskytem, modře šrafované jsou státy, kde začala být brusnice pěstována i mimo svůj přirozený výskyt pro komerční produkci

3.1.2 Brusnice Darrowova

Brusnice Darrowova (*V. darrowii*) je stálezelený keř, vyrůstající nejčastěji do výšky kolem 0,6 m (Vander Kloet, 1988), v anglofonních zemích se nazývá Darrow's blueberry. Přirozeně se vyskytuje v jihovýchodní části Severní Ameriky (Song *et* Hancock, 2011; Retamales *et* Hancock, 2012). Tvoří rozsáhlé porosty a vyhovují jí teplejší oblasti. Má modrozelené listy, květy jsou bílé, někdy s nádechem do růžova či červena. Plody jsou poměrně malé, pevné, obvykle jejich velikost nepřesahuje 1 cm. Mají světle modrou barvu a výhodou je, že se dají skladovat i v teple poměrně dlouhou dobu (Vander Kloet, 1988; Song *et* Hancock, 2011).

3.1.3 Brusnice úzkolistá

Brusnice úzkolistá (*V. angustifolium*) je opadavý nízký keř dorůstající 0,1 až 0,6 m. přirozeně se vyskytuje v severovýchodní části Severní Ameriky (Retamales *et* Hancock, 2012) a má toleranci vůči mrazu a vyššímu pH (Song *et* Hancock, 2011). Dokáže přežít teploty až pod $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Retamales *et* Hancock, 2012). Kvůli svému

nízkému vzrůstu se tento druh nazývá v anglofonních zemích lowbush blueberry. Listy jsou eliptické až úzce eliptické, barvou zelené až zelenomodré. Květy jsou bílé, někdy s růžovými pruhy. Bobule jsou modré, černé nebo velmi vzácně i bílé. Velikost plodů bývá většinou 3–9 mm a obecně bývají menší než plody brusnice chocholičnaté (Vander Kloet, 1988; Song *et* Hancock, 2011, Retamales *et* Hancock, 2012). Křížením kultivarů brusnice úzkolisté (lowbush blueberries) a kultivarů brusnice chocholičnaté (highbush blueberries) vznikají kultivary nazývané half-high blueberries, které mají dostatečně nízký vzrůst na to, aby byly v chladných oblastech chráněny sněhem před mrazem, ale zároveň mají tyto rostliny větší plody než brusnice úzkolistá (Retamales *et* Hancock, 2012).

3.1.4 Vlochyně bahenní

Vlochyně bahenní (*V. uliginosum*) se přirozeně vyskytuje hlavně v severnějších oblastech Severní Ameriky. Keře jsou opadavé a dorůstají výšky 0,1–0,7 m. Listy jsou tmavě zelené, květy mají barvu od růžové až do fialové a jsou odolné vůči mrazu. Kvést začíná začátkem července (Anonymous13; Vander Kloet, 1988; Song *et* Hancock, 2011). Plody jsou kulovité bobule modré barvy o velikosti v průměru 0,6–0,8 mm (Vander Kloet, 1988).

3.1.5 Brusnice Constableova

Brusnice Constableova (*V. constablaei*) se přirozeně vyskytuje v jihovýchodních oblastech Severní Ameriky. Keře jsou opadavé, dorůstají výšky 1 m a jsou odolné vůči mrazu. Začíná kvést již v červnu. Plody mají světle modrou barvu (Rowland *et al.*, 2005; Song *et* Hancock, 2011; Anonymous14).

3.1.6 Brusnice prutovitá

Brusnice prutovitá (*V. ashei*, někdy uváděna pod názvem *V. virgatum*) je 2,4 až 4,5 m vysoký opadavý keř, obecně nazývaný v anglofonních zemích rabbiteye blueberry (Anonymous2). Přirozeně roste v jihovýchodních částech Severní Ameriky, kde může dorůst až 6 metrů (Retamales *et* Hancock, 2012). Plody jsou velmi malé ve srovnání s plody brusnice chocholičnaté. Spolu s brusnicí Darrowovou jsou nejtolerantnějšími druhy vůči suchu a teplu a tyto vlastnosti se přenášejí i na hybridní potomstvo (Anonymous2, Erb *et al.*, 1988a *et* 1988b).



Obrázek 3: Brusnice prutovitá kultivar 'Maru' (Foto: Manuel Martin Vicente)

3.1.7 Brusnice borůvka

Brusnice borůvka (*V. myrtillus*) se vyskytuje v Evropě, Asii a v západní části Severní Ameriky. V České republice se vyskytuje vzácně v teplých oblastech, poměrně hojně ve středních polohách a hojně na horách. Je to opadavý keř, dorůstající maximálně 0,6 m. Květy vyrůstají z paždí listů a mají bílou nebo nazelenalou barvu s narůžovělým nádechem. Plodem jsou kulovité bobule, které jsou nejčastěji modročerné, výjimečně bělavé nebo červené (v době zralosti). Jsou velmi malé, o velikost v průměru 0,5–0,7 mm (jen velmi vzácně se dají nalézt bobule o velikosti až 1 cm) plody brusnice borůvky jsou obecně v průměru až 2x menší než plody brusnice chocholičnaté. Dužina borůvek je modrofialová a barví (Vander Kloet 1988; Hejný *et al.*, 1990; Hoskovec 2007).



Obrázek 4: Detail plodu brusnice borůvky (Foto: Ettore Balocchi)

4 Taxonomie druhu brusnice chocholičnaté

Brusnice chocholičnatá je v systému zařazena takto (Anonymous15, 2021):

Říše:	rostliny (Plantae)
Podříše:	cévnaté (Tracheobionta)
Oddělení:	krytosemenné (Magnoliophyta)
Třída:	vyšší dvouděložné (Rodopsida)
Řád:	vřesovcotvaré (Ericales)
Čeleď:	vřesovcovité (Ericaceae)
Podčeleď:	brusnicovité (Vaccinioideae)
Rod:	brusnice (<i>Vaccinium</i>)
Sekce:	<i>Cyanococcus</i>
Druh:	brusnice chocholičnatá (<i>Vaccinium corymbosum</i> Linnaeus)

4.1 Problematika vymezení druhu *Vaccinium corymbosum*

Brusnice chocholičnatá je pěstiteli nazývána kanadská borůvka. Toto lidové či zahradnické označení zahrnuje samotnou brusnici chocholičnatou i hybridní rostliny vzniklé křížením brusnice chocholičnaté s dalším druhem (popř. dalšími druhy) rodu *Vaccinium*. Velmi sporné je také užívání názvu highbush blueberry. Galletta *et* Ballington (1996) zahrnují do highbush blueberries například i druhy *V. ellioti* a *V. constablaei*. Vander Kloet (1980 *et* 1988) tímto názvem, a také přímo názvem *V. corymbosum*, pojmenovává kultivary vzniklé křížením *V. corymbosum* a jiných druhů rodu *Vaccinium*, a dokonce i velmi příbuzné druhy, jako je například *V. fuscatum* neboli black highbush blueberry. Vander Kloet (1980 *et* 1988) totiž nebyl schopen nalézt morfologické znaky, které by jasně odlišovaly tyto druhy, a tak je považoval za druh jeden. Ve šlechtitelské praxi bývá *V. corymbosum* nejčastěji křížena s druhy *V. angustifolium*, *V. ashei* (neboli *V. virgatum*), *V. constablaei*, *V. darowii*, *V. myrtillus* nebo *V. uliginosum* (Song *et* Hancock, 2011). Uttall (1986 *et* 1987) však užívá název *V. corymbosum* pouze pro tento druh. Rozdílné názory na užívání názvu *V. corymbosum* mohou někdy způsobit značné nejasnosti. Příkladem může být kultivar Sierra (Anonymous3). Tento kultivar je v Genome database for *Vaccinium* (GDV) uveden jako kultivar *V. corymbosum* a není u něj uvedena žádná zmínka o tom, že by se mělo jednat o hybrid (Anonymous3). Ve skutečnosti je ale Sierra komplexním hybridem pěti druhů, a to *V. corymbosum*, *V. darowii*, *V. ashei*, *V. constablaei* a *V. angustifolium* (Song *et* Hancock, 2011).

5 Antioxidační vlastnosti borůvek

Borůvky jsou ovoce oblíbené díky své výborné chuti, mají vysoký obsah vitamínů, minerálů a jsou jedním z nejbohatších zdrojů antioxidantů mezi čerstvým ovocem. Antioxidanty jsou látky, které jsou schopny inaktivovat volné radikály. Volný radikál je vysoce reaktivní atom nebo molekula, která obsahuje nepárový elektron ve vazebném orbitalu. Ne všechny vysoce reaktivní částice mají formu radikálu, termín volný radikál se však často používá jako souhrnné označení pro všechny vysoce reaktivní částice. Tyto látky jsou schopny poškozovat celé tkáně (Ledvina *et al.*, 2009).

Borůvky obsahují vitamín C, vitamín E a flavonoidy (patří mezi fenolické sloučeniny). Mají jednu z nejvyšších antioxidačních kapacit (Prior *et al.*, 1998). Tato antioxidační aktivita zůstává z větší části zachována i u potravinářských výrobků z borůvek po jejich zpracování (Schmidt *et al.*, 2005). Fungování těchto antioxidačních malých molekul je založeno na zreagování s volnými radikály a následné přeměně antioxidačních malých molekul na stabilní molekuly. Tyto molekuly mají však i přes jejich stabilitu radikálový charakter, ale jsou stabilní, protože každý antioxidant má konjugované dvojně vazby a elektrony z těchto pí-vazeb stabilizují nepárový elektron. Nepárový elektron se totiž může přesouvat po systému dvojných vazeb a čím víc možností přesunu má, tím je sloučenina stabilnější (Nečas, 2006).

Další již zmiňované důležité látky, které borůvky obsahují, jsou flavonoidy. Platí, že všechny druhy rodu *Vaccinium* tyto látky obsahují, jejich množství se však u každého druhu liší, rozdíly jsou dokonce i mezi jednotlivými kultivary. Existuje mnoho skupin flavonoidů, ve zralých borůvkách se nacházejí antokyany a flavonoly. Antokyany jsou pigmenty rozpustné ve vodě s rozmanitou barevností od oranžové po fialovou. Známými antokyany jsou kyanidin a malvidin, z nichž malvidin je nejzastoupenější antokyan v borůvkách. V plodech komerčně nejdůležitějšího druhu brusnice chocholičnaté se nachází větší množství antokyanů ve slupce než v dužině. Slupka má tedy vyšší antioxidační aktivitu (Burdulis *et al.*, 2009). Dalšími flavonoidy jsou flavonoly, převážně kvercetin a jeho deriváty. Ty tvoří nad 75 % obsahu flavonolů v borůvkách (Cho *et al.*, 2005).

Spousta skupin flavonoidů má nejen antioxidační, ale také antimikrobiální účinky, které by mohly být v budoucnu využity v potravinářském průmyslu nebo zdravotnictví. Tyto účinky jsou založené nejčastěji na destabilizaci cytoplazmatické membrány a inhibici mikrobiálních enzymů. Některé flavonoidy jsou však schopny zabránit i adhezi

patogenu k epitelu, což je předpokladem pro infekci velkého množství patogenů (Puupponen-Pimiä *et al.*, 2005).

Člověk však nedokáže absorbovat všechny flavonoidy. V provedené studii, která byla zaměřena konkrétně na antokyany, byly dobrovolníkům podávány borůvky, které obsahovaly 25 druhů antokyanů. Následně v krevním séru dobrovolníků jich bylo zjištěno 19. V další části bylo dokázáno, že obsah antokyanů v séru přímo koreluje se zvýšením antioxidační kapacity séra. Absorpce flavonoidů z borůvek je tedy dost vysoká na to, aby se antioxidační účinky projevíly na lidském organismu (Mazza *et al.*, 2002).

Díky svým antioxidačním účinkům, by měly být borůvky účinné i přímo v boji s konkrétními nemocemi, například s aterosklerózou, což potvrdily *in vivo* testy na myších. Jedné skupině myší byl po celých 20 týdnů přidáván do potravy lyofilizovaný borůvkový prášek. Právě tato skupina měla po dvaceti týdnech téměř zastavený růst plaků v tepnách, rozvoj aterosklerózy byl tedy značně zpomalen. Borůvky nejen, že obsahují antioxidanty samotné, ale také látky, které jsou schopny aktivovat antioxidační enzymy (Wu *et al.*, 2010).

6 Pěstování druhů rodu *Vaccinium*

Druhy rodu *Vaccinium* jsou v dnešní době hojně pěstovány kvůli chutným a zdravým plodům. Při pěstování se musí dodržovat určité podmínky, jako například kyselá půdní reakce (Paprštein *et al.*, 2009). V rámci rozdělení velkého množství kultivarů bylo vytvořeno v anglofonních zemích několik skupin, které obsahují pro pěstění nejvýznamnější kultivary druhů rodu *Vaccinium* (Anonymous6, 2016). V České republice se nejčastěji pěstují northern highbush blueberries pod názvem kanadské borůvky (Paprštein *et al.*, 2009).

6.1 Pěstitelská typologie

Z hlediska pěstitelské typologie se rozdělují v anglofonních zemích druhy rodu *Vaccinium* do několika skupin, a to highbush blueberries (ty se dále dělí na northern a southern), half-high blueberries, rabbiteye blueberries a lowbush blueberries, do těchto skupin patří druhy rodu *Vaccinium* sekce *Cyanococcus* - příklady kultivarů zařazených k těmto skupinám jsou uvedeny v tabulce 2. Dále jsou to skupiny cranberries a lingonberries (Anonymous6, 2016).

Highbush blueberries: jsou to kultivary druhu brusnice chocholičnaté, někdy zde bývají zařazováni také kříženci brusnice chocholičnaté a několika dalších druhů rodu *Vaccinium*, a to *V. angustifolium*, *V. ashei* (neboli *V. virgatum*), *V. constablaei*, *V. darowii*, *V. myrtillus* nebo *V. uliginosum* (Vander Kloet, 1980 *et* 1988; Song *et* Hancock, 2011). Počátkem 20. století Dr. Frederick Coville z Ministerstva zemědělství Spojených států amerických (USDA) jako první domestikoval brusnici chocholičnatou a zjistil, že pro svůj růst potřebuje kyselou půdní reakci a období dormance přes zimu (Coville, 1916). Prováděl také její vegetativní rozmnožování pomocí stonkových řízků (Coville, 1927). Po Dr. Covillovi následoval velký rozvoj křížení a šlechtění, o který se zasloužili například Dr. Arlen Draper, Dr. Sharpe a mnozí další. Pokud byla v přírodě nalezena rostlina s výhodnými vlastnostmi, byla kultivována, následně jí bylo přiděleno kultivarové jméno a dále pak tyto rostliny mohly být kříženy mezi sebou nebo s dalšími druhy rodu *Vaccinium* (Anonymous6, 2016). Brusnice chocholičnatá je v současné době hojně pěstována jak komerčně v zemědělské produkci plodů, tak mnohými zahrádkáři jako hobby. Je vyšlechtěna spousta kultivarů, které mohou splňovat různé požadavky (odolnost vůči houbovým chorobám, mrazuvzdornost, různou výšku atd.) (Song *et* Hancock, 2011). Pěstované rostliny mohou být vysoké 1–5 m (Vander Kloet, 1988). Vyšlechtěné kultivary nemají vždy jen vlastnosti výhodné pro pěstění, mnohdy jde jen

o neobvyklý vzhled rostliny, díky kterému se kultivar stane populárním - přirozená barva plodu brusnice chocholičnaté je od světle po tmavě modrou, ale v přírodě se vyskytují i mutantní rostliny s bílými a růžovými plody, kdy růžové bobule mají velký potenciál stát se velmi oblíbenými. Proto je například odrůda 'Pink Bonbons' vyšlechtěna tak, aby nesla právě plody růžové barvy (tento kultivar vznikl však i přikřížením *V. angustifolium*) (Luby, 2015).

Highbush blueberries se však ještě dělí na northern highbush blueberries a southern highbush blueberries.

Northern highbush blueberries: tyto kultivary vznikly v severní části Severní Ameriky, dále se dělí na nalezené v přírodě (wild), tradiční (historical) a moderní (modern). Jsou mrazuvzdorné a vyžadují období dormance, které je indukováno snížením okolní teploty. (Boches, 2005; Anonymous6, 2016).

Southern highbush blueberries: tyto rostliny jsou přizpůsobeny k růstu v oblastech s mírným klimatem, jako je jih USA. Většinou to bývají hybridní rostliny vzniklé křížením *V. corymbosum* například s *V. darrowii*. Mohou být pěstovány i v subtropických oblastech (Anonymous6, 2016). V takových oblastech se používá "evergreen" systém, při kterém rostliny nemají dormanci a jsou stálezelené. Pro tyto systémy jsou však vhodné jen některé kultivary, jako 'Avanti' a 'Kestrel' (Williamson *et al.*, 2019).

Half-high blueberries: křížením *V. corymbosum* a *V. angustifolium* vznikají kultivary nazývané half-high blueberries. Byly vyšlechtěny na severu USA, kde je velmi chladné klima. Rostliny jsou dost malé na to, aby je v zimě chránil sníh před větrem a nízkými teplotami a tím je zabráněno poškození rostlin (Anonymous6, 2016).

Rabbiteye blueberries: takto nazýván je druh *V. ashei*, pěstovaný především v jižní části Severní Ameriky. Borůvky mají tendenci mít silnou slupku. Mají vynikající adaptaci na letní horka a sucho. Některé kultivary, jako například 'Robeson', mají také toleranci k vyššímu pH (6,5+) (Retamales *et* Hancock, 2012; Anonymous6, 2016).

Lowbush blueberries: zahrnuje druh a kultivary *V. angustifolium* (Song *et* Hancock, 2011) a v některé literatuře zahrnuje také *V. myrtilloides* (Anonymous6, 2016). Většina odrůd byla získána z volné přírody. Borůvky mají menší průměr a byly pojmenovány jako tzv. divoké ("wild"), a to proto, že při jejich pěstění se spoléhá na divoce rostoucí porosty tvořené stovkami rostlin (Strik *et al.*, 2014; Anonymous6, 2016).

Dalšími skupinami jsou cranberries (*V. macrocarpon* neboli klikva velkoplodá) a lingonberries (*V. vitis-idaea* neboli brusnice brusinka) (Anonymous6, 2016). Tyto skupiny však nejsou předmětem této práce.

Další způsob, jak je možné rozdělit kultivary druhů rodu *Vaccinium*, je rozdělit je na raně zrající, středně zrající a pozdně zrající odrůdy. Toto rozdělení je pro pěstitele výhodné v rámci možnosti vybrat si odrůdy, které budou mít pro dané klimatické podmínky nejvyšší výnosy a umožňuje vybráním vhodných kultivarů rozvržení zrání úrody v čase od začátku léta až do začátku podzimu a tím prodloužit dobu sklizně (Paprštein *et al.*, 2009).

Tabulka 2: Příklady pěstovaných kultivarů jednotlivých skupin (Boches, 2005; Boches *et al.*, 2006; Retamales *et Hancock* 2012; Strik *et al.*, 2014; Williamson *et al.*, 2019; Anonymous7, 2021)

Skupiny pěstovaných kultivarů	Kultivary
Northern highbush blueberries	<u>moderní</u> : 'Aurora', 'Bluejay', 'Chandler', 'Darrow', 'Duke', 'Earliblue', 'Elliott', 'Liberty', 'Patriot', 'Spartan', 'Toro' <u>tradiční</u> : 'Berkeley', 'Bluecrop', 'Brigitta', 'Coville', 'Grover', 'Ivanhoe', 'Jersey', 'June', 'Lateblue', 'Pioneer', 'Rubel', 'Stanley' <u>přírodního původu</u> : 'Rubel', 'Grover'
Southern highbush blueberries	'Atlantic', 'Avanti', 'Bluecrisp', 'Emerald', 'Jewel', 'Kestrel', 'Misty', 'Ozarkblue', 'O'Neal', 'Sierra', 'Star'
Half-high blueberries	'Northblue', 'Northcountry', 'Northland', 'Northsky', 'Putte', 'St. Cloud',
Rabbiteye blueberries	'Brightwell', 'Climax', 'Maru', 'Oceanblue', 'Powderblue', 'Rahi', 'Robeson', 'Woodard'
Lowbush blueberries	'Blomidon', 'Brunswick', 'Burgundy'

Poznámka: vzhledem k tomu, že u některých odrůd se nejedná o patentované kultivary a nelze tedy hodnověrně dohledat jejich původ, můžou se ohledně rozdělení kultivarů vyskytovat rozporuplné údaje, například kultivar Northland - Retamales *et Hancock* (2012) uvádějí, že se jedná o kultivar half-high blueberry, ale Boches (2005) uvádí, že se jedná o kultivar northern highbush blueberry.

6.2 Základy pěstování a množení brusnice chocholičnaté

Rostliny jsou obvykle velmi odolné a nevyžadují téměř žádné insekticidy, herbicidy ani fungicidy (Pavlis *et Sciarappa*, 2005). Základem pro pěstování je kyselá půdní reakce, nejvhodnější je od pH 3,8 do pH 4,8, ale rostliny obecně dokáží přežít až v pH 5,8. Pak ale nedokáží plnohodnotně přijímat vodu a potřebné nutrienty (Dolejší *et al.*, 1991; Pavlis *et Sciarappa*, 2005; Paprštein *et al.*, 2009; Retamales *et Hancock*, 2012).

Místo na pěstování by mělo být slunné a půda písčité až písčitohlinitá, aby byla dobře provzdušněná a mohla odtékat přebytečná voda. Rostliny se sázejí do jam o hloubce přibližně 40 cm a jáma je následně naplněna promíchanou směsí neodkyselené rašeliny a kompostu. Důležitý je také dostatek vody a v prvních letech života i hnojivo, které obsahuje dostatek dusíku, například síran amonný. Rostliny mohou být samosprašné, ale snižuje to kvalitu plodů, proto je lepší sázet více odrůd kvetoucích ve stejnou dobu (Paprštein *et al.*, 2009; Retamales *et Hancock*, 2012). Rostliny začínají kvést a plodit už v prvním roce života. Pěstitelsky je ale výhodnější první 2–3 roky odstraňovat poupata, aby rostlina měla dost energie na tvorbu a růst výhonů. Měly by se také odstraňovat slabé a poléhavé výhony (Pavlis *et Sciarappa*, 2005; Retamales *et Hancock*, 2012; Anonymous5). Nebo je na rychlý nástup plodnosti doporučováno sázet dvou až tříleté rostliny s několika silnými výhony (Paprštein *et al.*, 2009). Rostliny také procházejí obdobím dormance, což je období klidu, omezení fyziologických procesů, které nastává při vystavení nízkým teplotám, obecně pod 7,2 °C. Jakmile se na jaře teplota zvýší, končí i období dormance a rostliny mají dost síly na růst nových pupenů (Stringer *et al.*, 2004). Kultivary southern highbush blueberries však období dormance nepotřebují (Williamson *et al.*, 2019).

Množení se provádí vegetativně nebo generativně. Generativní způsob rozmnožování se však používá jen při šlechtění nových odrůd. Vegetativní způsob rozmnožování - rozmnožování bylinnými řízků, se uskutečňuje tak, že je z rostliny odebrán dostatečně dlouhý výhon i s tzv. patkou (část staršího dřeva) a z tohoto výhonu se vypěstuje nová rostlina, která je klonem rostliny mateřské. V prvním roce je pouze jeden výhon a ten kvete, v letech následujících, po období dormance, naroste a začne kvést více výhonů. Této technice se podobá množení pomocí *in vitro* kultur, kdy se také používají bylinné řízků, ovšem s tím rozdílem, že pěstování probíhá v *in vitro* podmínkách. Z narašených postranních a vrcholových pupenů se připravuje vrchol, jehož buňky jsou vhodné pro založení kultur (Paprštein *et al.*, 2009; Retamales *et Hancock*, 2012).

6.3 Nejčastěji pěstované kultivary brusnice chocholičnaté v České republice

V klimatických podmínkách České republiky lze pěstovat všechny odrůdy northern highbush blueberries, které jsou uvedeny v tabulce 2, ze southern highbush blueberries pouze ty odrůdy, které odolávají zimním mrazům - 'Ozarkblue' a 'Star'.

Odrůdy half-high blueberries 'Northblue', 'Northcountry', 'Northland', 'Putte' prosperují v podmínkách České republiky velmi dobře. Z rabbiteye blueberries se zde pěstuje například odrůda 'Powderblue', ale obecně jsou v ČR pěstovány rabbiteye blueberries jen vzácně (kanadskeboruvky.eu, nazazvorce.cz, ekozahradnictvi.cz, zzoja.cz).

Zde budou popsány pouze některé světově rozšířené americké kultivary northern highbush blueberries, které jsou doporučeny pro pěstitele v České republice, a to kultivary 'Duke', 'Spartan', 'Bluecrop', 'Toro', 'Brigitta' a 'Elliott' (Paprštein *et al.*, 2009).

Odrůda 'Duke' vznikla křížením rostlinného materiálu odrůdy 'Ivanhoe', 'Earliblue' a dalších nekultivarových rostlin (Anonymous8). Tato odrůda je raně zrající - zraje koncem června. Je odolná proti mrazům. Plody jsou velké a mají světle modrou barvu (Paprštein *et al.*, 2009; Strik *et al.*, 2014).

Odrůda 'Spartan' vznikla křížením 'Earliblue' (matka) a jako otec byla použita nekultivarová rostlina (Anonymous9). Tato odrůda je raně zrající - zraje začátkem července. Keře jsou odolné vůči mrazu a mají velké plody (Paprštein *et al.*, 2009).

Odrůda 'Bluecrop' – matka vznikla křížením 'Jersey' x 'Pioneer' a otec vznikl křížením 'Stanley' x 'June' (Anonymous10). Je to nejrozšířenější odrůda, která má spolehlivé výnosy a dobrou odolnost před mrazem (Retamales *et Hancock*, 2012). Je to středně zrající odrůda - zraje v polovině července. Plody jsou středně velké až velké a mají vynikající chuť (Paprštein *et al.*, 2009).

Odrůda 'Toro' vznikla křížením 'Earliblue' (matka) a 'Ivanhoe' (otec) (Anonymous11). Je to středně zrající odrůda - začíná zrát ve druhé dekádě července. Dřevo je odolné vůči mrazu. Plody jsou středně velké až velké s velmi dobrou chutí (Paprštein *et al.*, 2009; Retamales *et Hancock*, 2012).

Odrůda 'Brigitta' vznikla z volného opylení odrůdy 'Lateblue'. Je to pozdně zrající odrůda - plody začínají zrát začátkem srpna. Plody jsou velké, pevné a mají dlouhou trvanlivost. Tato odrůda se obecně hodí pro oblasti s mírnějšími zimami (Retamales *et Hancock*, 2012). Dřevo je ale odolné vůči mrazu a poměrně silné (Paprštein *et al.*, 2009).

Odrůda 'Elliott' vznikla křížením odrůdy 'Burlington' (matka) a jako otec byla použita nekultivarová rostlina (Anonymous12). Je pozdně zrající - plody zrají začátkem srpna. Je to jedna z odrůd s nejdelsí dobou zrání. Plody jsou středně velké až velké a pevné. Dřevo je dobře odolné proti mrazu (Paprštein *et al.*, 2009; Retamales *et Hancock*, 2012).

Výše uvedený výběr odrůd jsou odrůdy americké, ale v podmínkách České republiky se také velmi dobře adaptovaly odrůdy vyšlechtěné ze severoamerického

materiálu v Austrálii a na Novém Zélandu, např. odrůda 'Reka' a 'Denise Blue'. Dále německé odrůdy, např. 'Goldtraube', 'Goldtraube23', 'Goldtraube53', 'Goldtraube71', 'Herma I', 'Herma II' a 'Record' (Anonymous16, 2008). Nejnovější skupinou odrůd, která se v České republice začíná pěstovat jsou odrůdy 'Aino', 'Alvar' a 'Jorma', které byly vyšlechtěny ve Finsku, proto se předpokládá jejich dobrá prosperita v klimatických podmínkách České republiky (Anonymous17).

7 Genetické markery pro identifikaci druhů rodu *Vaccinium*

Metody, které je možné využít pro stanovení variability genomu organismů, jsou například: metoda RAPD (random amplification od polymorphic DNA neboli náhodná amplifikace polymorfni DNA) (Williams *et al.*, 1990; Qu *et Hancock*, 1997; Song *et Hancock*, 2011; Retamales *et Hancock*, 2012) dále RFLP (restriction fragment length polymorphism neboli analýza polymorfismu délky restričních fragmentů) (Haghighi *et Hancock*, 1992), detekce SNP (single nucleotide polymorphism neboli jednonukleotidový polymorfismus) (Yamada, 2008; Jinki *et Seungin*, 2018), využití SCAR markerů (sequence characterized amplified region) (Kang-Hee *et al.*, 2018), přímo sekvenování genomu či fragmentů DNA (Dhanaraj *et al.*, 2004; Song *et Hancock*, 2011; Fajardo, 2013) a také využití mikrosatelitních markerů SSRs (single sequence repeats nebo označované také jako STRs - single tandem repeats) (Holton, 2001; Rowland *et al.*, 2003; Song *et Hancock*, 2011; Retamales *et Hancock*, 2012).

7.1 RAPD

Jednou z prvních metod, která byla používána ke zjištění genetické variability je RAPD (Williams *et al.*, 1990; Qu *et Hancock*, 1997). Je to rychlá technika, při níž se u polymerázové řetězové reakce (PCR) využívá jeden nebo několik krátkých primerů o libovolné sekvenci. Podmínky stringence nejsou přísné, a tak je zajištěno nasedání primerů i na oblasti DNA s neúplnou komplementaritou. Je vysoce pravděpodobné, že primery nasednou na obou řetězcích zkoumané DNA a vznikne několik míst na protilehlých řetězcích s nasednutými primery, která od sebe nejsou příliš vzdálená a primery směřují svými 3'-konci k sobě. Výsledkem je mnoho fragmentů s různou délkou, které se liší v závislosti na organismu, ze kterého genomová DNA pochází. Tato metoda má však nedostatky například v obtížné reprodukovatelnosti, v nedostatku shodných pravidel pro vyhodnocení rozdílů mezi vzorky, dále tím, že výstupem jsou

pouze dominantní markery a nelze odlišit homozygoty od heterozygotů (Šmarda *et al.*, 2005; Retamales *et Hancock*, 2012).

7.2 RFLP

Tato metoda využívá různé délky a počtu restričních fragmentů genomů (a to dokonce i jedinců stejného druhu). Principem je digesce PCR produktů (amplifikátů) restriční endonukleázou, která štěpí DNA pouze v cílovém místě specifickém pro každou restriční endonukleázu, a následná elektroforéza (Haghighi *et Hancock*, 1992; Šmarda *et al.*, 2005). Haghighi *et Hancock* (1992) stanovovali metodou RFLP délku fragmentů mimojaderné DNA u některých kultivarů northern highbush blueberries, vzorky obsahovaly mitochondriální a chloroplastovou DNA. Tyto restriční fragmenty byly použity na identifikaci kultivarů a objasnění dědičnosti chloroplastů a mitochondrií.

7.3 SNP

Jednonukleotidový polymorfismus je nejčastěji jednonukleotidová substituce, tedy záměna jednoho nukleotidu za jiný v sekvenci DNA. Může ale také docházet k deleci nebo inserci. Tyto mutace představují hlavní zdroj heterozygotnosti. Jednonukleotidové polymorfismy, stejně jako další genetické markery, jsou specifické pro členy populace, odrůd či dokonce druhů. Je tedy možné vybrat vhodné SNP markery, které jsou specifické i pro jednotlivé kultivary brusnice chocholičnaté (Yamada, 2008; Jinki *et Seungin*, 2018).

Jinki *et Seungin* (2018) stanovili SNP markery na identifikaci 84 kultivarů druhů rodu *Vaccinium*, největší počet testovaných kultivarů byly právě kultivary druhu brusnice chocholičnaté. K identifikaci jsou používány kity, které obsahují sady primerů. Jednotlivé primery obsahují substituce, delece nebo inserce specifické pro jednotlivé kultivary. Primer je navržen tak, aby se SNP nacházel na jeho 3'-konci, který by měl být plně komplementární k templátu. Pomocí PCR se amplifikují jen ty sekvence DNA, kde se nachází SNP, který je umístěný na daném primeru. Podle přítomnosti nebo nepřítomnosti produktu se určí, zda daná DNA obsahuje SNP či nikoliv.

7.4 SCAR

Tato metoda spočívá v použití RAPD nebo AFLP (amplification fragment length polymorphism) na genomických DNA organismů, dále následuje klonování a sekvenování vzniklých fragmentů. Jsou vybrány polymorfní fragmenty, ke kterým jsou navrženy vhodné primery pro SCAR markery. Je vytvořena vhodná kombinace primerů vytvářející dostatek fragmentů, které jsou v rámci testovaných organismů polymorfní

a podle těchto fragmentů je možné organismy identifikovat. Kang-Hee *et al.* (2018) vytvořili sady primerů pro SCAR markery, díky kterým se dají identifikovat odůrky druhů rodu *Vaccinium* sekce *Cyanococcus*.

7.5 Mikrosatelity

V eukaryotickém i prokaryotickém genomu se nachází množství různě dlouhých opakujících se motivů DNA neboli repetitivní DNA (repetice). Tyto úseky mohou být uspořádány buď těsně za sebou (tandemové repetice) nebo jsou rozptýleny po celém genomu (transpozony). Tandemové repetice se dělí na mikrosatelity, minisatelity a satelity (Pospíšilová *et al.*, 2013).

Mikrosatelity vznikají sklouznutím DNA-polymerázy při replikaci (tzv. replication slippage) (Pospíšilová *et al.*, 2013). Jednotlivé motivy (repetitivní sekvence) mikrosatelitů jsou dlouhé 1–6 bp (Field *et Wills*, 1998; Tóth *et al.*, 2000; Holton, 2001). Jsou využívány díky snadné reprodukovatelnosti experimentů, každý mikrosatelitní lokus je totiž jasně definován sekvencemi párů primerů. Další výhodou je jejich vysoký stupeň polymorfismu, který je vyšší, než je tomu například u fragmentů získaných metodou RFLP (Holton, 2001). Vysoký polymorfismus SSRs je způsobený vysokou mutační rychlostí. Řádově je to 10^{-2} až 10^{-4} /lokus/generace (Sia *et al.*, 2000), například Li (2002) uvádí však mutační rychlost 10^{-2} až 10^{-6} /lokus/generace. Frekvence výskytu mikrosatelitů v genomu rostlin a savců se odhaduje jako jeden mikrosatelit na 6–7 kb (Cardie *et al.*, 2000). Nejfrekventovanějšími mikrosatelity jsou dinukleotidové motivy jako (AC)_n, (AT)_n a (AG)_n (Tóth *et al.*, 2000; Bian *et al.*, 2014). Konkrétně v rostlinném genomu jsou nejčastěji dinukleotidové motivy repetice lokalizovány v nekódujících oblastech. Mikrosatelity se ale nacházejí také v kódujících oblastech, nejčastěji na tzv. 5'-konci nepřekládané oblasti (5' UTR - untranslated region), kde je lokalizováno nejvyšší procento všech trinukleotidových motivů repetice nacházejících se v genomu (Li *et al.*, 2002; Morgante *et al.*, 2002). Mikrosatelity jsou v současné době využívány například pro určení paternity díky jejich vysoké mutační rychlosti. Ta však není tak vysoká, aby se mikrosatelity nedaly využít i ke studiu celých populací a jejich příbuznosti (Oliveira *et al.*, 2006).

Nalezení mikrosatelitů a následný návrh sekvencí primerů je ale drahý a časově náročný proces (Maguire, 2001; Guerra-Sanz, 2004; Zima *et al.*, 2004). Obecně je většina mikrosatelitních lokusů identifikována z genomických knihoven s využitím oligonukleotidových sond (Maguire, 2001). Genomická DNA je nejdříve rozštěpena

restrikčními enzymy a následně jsou fragmenty ligovány do plazmidových vektorů. Proběhne transformace *E. coli* připravenými plazmidy a vznikne množství klonů. Dále proběhne sekvenování jen těch klonů, které hybridizují se značenými mikrosatelitními sondami (Maguire, 2001). Pro vyhledávání mikrosatelitů v kódujících oblastech se využívají EST knihovny. EST (expressed sequence tag) jsou sekvence DNA, kódující oblasti, které se účastní genové exprese organismu. Vznikají přepisem transkripčně aktivní mRNA pomocí reverzní transkriptázy do DNA, která je následně zaligována do plazmidů a jsou vytvořeny cDNA knihovny (Nicot *et al.*, 2004; Parkinson *et Blaxter*, 2009; Bassil, 2012). Existuje však i další levnější a méně náročná metoda hledání nových mikrosatelitních lokusů, a to *cross-species* PCR amplifikace. Při této metodě se používají specifické primery pro mikrosatelitní lokusy určitého druhu na druhu sledovaném. Tato metoda je relativně málo úspěšná a silně závisí na taxonomické vzdálenosti sledovaných druhů (Maguire, 2001; Boches, 2005). Protože exprimované sekvence jsou vysoce konzervativní, při hledání SSRs v EST zdrojích se očekává sice nižší stupeň polymorfismu, ale vyšší pravděpodobnost úspěchu metody *cross-species* PCR amplifikace, než je tomu u SSRs získaných z genomických knihoven (Cho *et al.*, 2000). Dalším principem vyhledávání mikrosatelitních lokusů je *in silico*, což spočívá ve vyhledávání mikrosatelitů v DNA databázích, kde se nacházejí již osekvenované úseky či celé genomy organismů (Fajardo, 2013).

Po nalezení SSRs a vytvoření primerů je však následná detekce délky polymorfismu u jednotlivých genomických DNA poměrně snadná. Pro amplifikaci mikrosatelitů se využívá PCR a následné dělení fragmentů podle jejich délky probíhá pomocí vertikální elektroforézy v polyakrylamidovém gelu, kapilární elektroforézy, horizontální elektroforézy v agarózovém gelu nebo sekvenováním (Marino *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 2003; Boches *et al.*, 2005; Zalapa *et al.*, 2012). Velkou výhodou je také fakt, že markery mají kodominantní charakter, a tak mohou být detekováni heterozygoti (Coburn *et al.*, 2002).

7.5.1 Mikrosatelitní markery rodu *Vaccinium*

Mikrosatelitní markery jsou mimo jiné používány při identifikaci kultivarů brusnice chocholičnaté. Boches *et al.* (2005) se ve své práci věnoval nalezení mikrosatelitních markerů, jejich testováním a následnou *cross-species* PCR amplifikaci. Dále na tuto práci navázali Boches *et al.* (2006), kteří vybrali 28 polymorfních mikrosatelitních lokusů a za pomoci jejich párů primerů vytvořili systém alel

mikrosatelitních lokusů pro identifikaci původně 71 kultivarů. Tyto 2 články rozšířil o některé informace Boches (2005). Nezávisle na tomto systému vytvořili Akagi *et al.* (2010) systém identifikace kultivarů druhů rodu *Vaccinium* sekce *Cyanococcus* pomocí sady 11 párů primerů 11 mikrosatelitních lokusů.

Vyhledávání mikrosatelitních markerů:

Boches *et al.* (2005) zkoumal celkem 1305 sekvencí z EST knihoven a 136 sekvencí z genomických knihoven obohacených o SSRs (dále jen genomické knihovny).

Zdroje z EST knihoven:

EST knihovny byly vytvořeny z cDNA knihoven rostlinného materiálu brusnice chocholičnaté kultivaru 'Bluecrop' pocházejícího z rostlin aklimatizovaných na chladné podnebí (CA - cold acclimated library) a z rostlin neaklimatizovaných (NA - nonacclimated) (Rowland *et al.*, 2003; Dhanaraj *et al.*, 2004).

Zdroje z genomických knihoven:

Celková genomická DNA kultivaru 'Bluecrop' byla nejdříve rozštěpena restrikčními enzymy a poté proběhla ligace tupých konců s linkery. Následovala hybridizace fragmentů DNA obsahujících mikrosatelity na mikrosatelitní oligonukleotidy značené biotinem, ty byly pak zachyceny na magnetických částicích potažených streptavidinem. Získané fragmenty byly amplifikovány pomocí PCR za použití sekvence linkeru jako primeru (Nunome, 2006). Dále byly PCR produkty ligovány do vektoru a vloženy do buněk *E. coli*. Plazmidy obsahující inzerty o velikosti 500–1000 bp byly izolovány z kolonií a inzerty byly z plazmidů amplifikovány pomocí primerů, které byly vytvořeny podle mnohočetného klonovacího místa (MCS - multiple cloning site neboli polylinker). Následovalo sekvenování inzerťů. Mikrosatelitní lokusy získané z těchto knihoven mají předponu VCC (*Vaccinium corymbosum* Corvallis, ve městě Corvallis v Oregonu jsou totiž vzorky rostlinných materiálů uchovávány) (Boches *et al.*, 2005).

Schopnost amplifikace a polymorfismus každého ze 49 páru nalezených primerů byly hodnoceny na genomické DNA 11 tetraploidních kultivarů brusnice chocholičnaté a jedné divoce rostoucí populaci brusnice chocholičnaté (PI 55880). Celkem tedy na 12 kultivarech. Charakteristika nalezených polymorfních mikrosatelitů je uvedena v tabulce 3 (Boches *et al.*, 2005).

Tabulka 3: Charakteristika 49 mikrosatelitních lokusů odvozených z DNA brusnice chocholičnaté odrůdy 'Bluecrop' a testovaných na 12 kultivarech brusnice chocholičnaté. Ve sloupcích jsou uvedeny lokusy s accession number (podle databáze GenBank), sekvence primerů, motivy repetice, počet alel a teplota nasedání primerů – annealing temperature (T_a) (Boches, 2005; Boches *et al.*, 2005).

Lokus (Acc. No.)	Sekvence primerů (5'→3')	Motiv repetice	Počet alel
CA23F * (CF810543)	F: GAGAGGGTTTCGAGGAGGAG R: GTTTAGAAACGGGACTGTGAGACG	AGA	2
CA25F (CF810562)	F: TGATGCCACAAGAAGAGAAGC R: GTTTAACAGAGAAACCTATCT	TG	ND
CA61F (CF810858)	F: AACAAGGTGATGGTGGGTTC R: GTTTATCCCCTGAGAGCATCGTC	TC	ND
CA94F * (CF811011)	<u>F: CACCCATTTACGGAATCTC</u> <u>R: GTTTACTTGGTCGGGTGTTGTCTC</u>	AG	7
CA112 * (CF810443)	F: TCCACCCACTTCACAGTTCA R: GTTTATTGGGAGGGAATTGGAAAC	AG	5
CA169F * (CF811071)	F: TAGTGGAGGGTTTTGCTTGG R: GTTTATCGAAGCGAAGGTCAAAGA	GAT	5
CA187F (CF810497)	F: TGCAGAGAGAGTGCGAAAAA R: TTTGCAGCTGATCTGGTTTG	GA	ND
CA190R * (CF811085)	<u>F: TTATGCTTGCCATGGTGGTA</u> <u>R: TTGCGAAGGGACCTAGTAGC</u>	TGC	3
CA208F (CF810514)	F: ATGACTACTACGGCGGTTGG R: GTTTTTATCATCTCCATCTCC	GAA	ND
CA214F (CF810521)	F: TTCCACAAACCCTGATCTC R: GTTTGCTGGAGATTTCCACCATTC	TC	ND
CA218F (CF810524)	F: GAAATCTCACGCACCACTCC R: GTTTACGACACGGATCTCAACGA	TC	ND
CA222F (CF810528)	F: GTCGAATCCTGGTCTTGCTC R: GTTTCTGGCCGTAACGCTTTAATC	TC	ND

Tabulka 3: Pokračování 1.

Lokus (Acc. No.)	Sekvence primerů (5'→3')	Motiv repetece	Počet alel
CA229F (CF810535)	F: CTCAAGCACTGGAACTTCTG R: GTTTAACAAGGTCTGGCTCCTCTT	AG	ND
CA236F * (CF810540)	F: GTTAAGCTTTTAGATGAGTTGATGG R: GTTTAACCAGTCCCAGACCCAAAT	TG	6
CA239F (CF810542)	F: GGTGTGGGTCCGCTATTGCT R: G1TTATTGCGTCCTCCGCAAGC	TC	ND
CA278F (CF810581)	F: GCACGAGCTCAAGGCTACTAA R: GTTTCCACCACACCCTTCCAATAG	CCA	ND
CA344F * (CF810639)	F: TTACCAAAAACGCCTCTCCAC R: GTTTCTTCCTTACGCCCTGAAAT	GCG	8
CA421F * (CF810704)	F: TCAAATTCAAAGCTCAAATCAA R: GTTTAAGGATGATCCCGAAGCTCT	CT	14
CA483F * (CF810754)	F: GTCTTCCTCAGGTTCCGGTTG R: GAACGGCTCCGAAGACAG	TC	9
CA518F (CF810777)	F: CCGCTTCTCAAAGCCTCTC R: GTTTCTTCCTCGATGGCAATGTTT	CAC	ND
CA642F * (CF810880)	F: TGCCAACCTCTGTTTAGGATGC R: GTTTATGCTGGAGCCAAAGAGAAA	CT	23
CA664F (CF810903)	F: GAAAGATCGGTCGTGGTGAT R: GT1TGAAGTCATCGCTGCAAACAA	AG	ND
CA787F * (CF810934)	F: TCCTCGTTCTCTCCCTCTCA R: GTTTCGCTGAAGTTGGAGTCCTT	GAA	5
CA794F * (CF810941)	F: CGGTTGTCCCACTTCATCTT R: GTTTGAATTTGGCTTCGGATTC	GA	10
CA855F * (CF811000)	F: CGCGTGAAAAACGACCTAAT R: GTTTACTCGATCCCTCCACCTG	GA/CGA	10

Tabulka 3: Pokračování 2.

Lokus (Acc. No.)	Sekvence primerů (5'→3')	Motiv repetice	Počet alel
CA1031F (CF810424)	F: TGGAGATCCCTAAGAGAGTGGA R: GTTTGGCTCGGCTCCTTATGTTA	CT	ND
NA41 * (CF811380)	F: TTCCTTTAGTCGCGTCATCA R: GTTTAAGGTCGCTACGAGACTCCA	CT	11
NA137 (CF811210)	F: GGAAGTTCGAACACACTGGTTT R: GTTTGAATGAACTCCAGCAAACG	GA	ND
NA172 (CF811241)	F: CCTCGTCCTCCTCTTCCTCT R: GTTTGACTTTGGAGAAGGCGAAG	CAT	ND
NA222 (CF811292)	F: TCCACATCTGGCAACGATTA R: GTTTAGAGCATGACCCATGAACATT	TG	ND
NA240 (CF811309)	F: TCTTCTCCAGCGTTCTCTCC R: GTTTAAAGCGAGGAGGTAGGGAAA	TC/TCT	ND
NA247 (CF811316)	F: CCACCATCATCTCCATCTCC R: GTTTGATTTTGGGAAGGGTTGAG	TC	ND
NA295 (CF811339)	F: GTGCCGGTCATGAGAACAA R: GTTGGCGATGATGAATGCGATCTA	GAA	ND
NA398 * (CF811369)	F: TCCTTGCTCCAGTCCTATGC R: GTTTCCTTCCACTCCAAGATGC	AAAT	5
NA741 * (CF811540)	F: GCCGTCGCCTAGTTGTTG R: GTTTGATTTTGGGGGTTAAGTTTGC	TC	14
NA800 * (CF811589)	F: CAATCCATTCCAAGCATGTG R: GTTCCCTAGACCAGTGCCACTTA	TC	31
NA824 * (CF811613)	F: AAATCGTTGGTTTGGCTCTG R: GTTTGGGCCGAAAAGAAATCGTAT	AG	8
NA961 * (CF811674)	F: TCAGACATGATTGGGGAGGT R: GTTTGGAATAATAGAGGCGGTGGA	TAC	6

Tabulka 3: Pokračování 3.

Lokus (Acc. No.)	Sekvence primerů (5'→3')	Motiv repetice	Počet alel
NA1040 * (CF811165)	F: GCAACTCCCAGACTTTCTCC R: GTTTAGTCAGCAGGGTGCACAA	TC	15
VCC_B3 (AY842445)	F: CCTTCGATCTTGTTCCCTTGC R: GTTTGATGCAATTGAGGTGGAGA	AG	P
VCC_H9 * (AY762677)	F: TCCGAGCCATTTAGTGTCAA R: GTTTACAAAAACCAAAAGCCATGC	CT	13
VCC_I2 * (AY762678)	F: AGGCGTTTTTGAGGCTAACA R: TAAAAGTTCGGCTCGTTTGC	CT	10
VCC_I8 * (AY762679)	F: TTCAGCATTCAATCCATCCA R: GTTCTCTTCTCCAATCTCTTTTCCA	TG	4
VCC_J1 * (AY762680)	F: CTCATGGGTTCCCATAGACAA R: TGCAGTGAGGCAAAAGATTG	CA	22
VCC_J3 * (AY762681)	F: TGATTACATTGCCAGGGTCA R: TGGAAACAACCGGGTTACAT	AAG	8
VCC_J5 * (AY762682)	F: CCCCAACGGTCTTGATCTTA R: GTTTCCTCTCTCCAACCCAGT	TC	12
VCC_J9 * (AY762683)	F: GCGAAGAACTTCCGTCAAAA R: GTGAGGGGCACAAAGCTCTC	TG/GA	10
VCC_K4 * (AY762684)	F: CCTCCACCCCACTTTCATTA R: GCACACAGGTCCAGTTTTTG	TC	14
VCC_S10 (AY762685)	F: ATTTGGTGTGAAACCCCTGA R: GTTTGCGGCTATATCCGTGTTTGT	CT	29

Poznámka: P – polymorfní mikrosatelitní lokus; ND – chybí údaj o polymorfismu mikrosatelitního lokusu (non determined); * - polymorfní mikrosatelitní lokusy, jejichž páry primerů byly použity pro identifikaci 71 odrůd highbush blueberries (viz str. 28 - systém pro identifikaci kultivarů highbush blueberries za použití SSRs) (Boches, 2005; Boches *et al.*, 2006); podtržené - páry primerů, které nebyly použity pro *cross-species* PCR amplifikaci (Boches, 2005; Boches *et al.*, 2005).

Testování primerů:

Celkem bylo zkoumáno 1305 sekvencí z EST knihoven a 136 sekvencí z genomických knihoven. Jedinečná DNA byla s vyšší četností zastoupena v EST knihovnách. 114 sekvencí z EST knihoven obsahovalo jedinečnou DNA a mikrosatelity (motiv repetice se opakoval více než 4x). V sekvencích z genomických knihoven bylo nalezeno 39 sekvencí obsahujících jedinečnou DNA a mikrosatelity (motiv repetice se opakoval více než 4x). Podle těchto sekvencí byly navrženy páry primerů, které byly následně testovány na 12 kultivarech brusnice chocholičnaté. 49 mikrosatelitních lokusů bylo popsáno v tabulce 3. Z těchto 49 párů primerů poskytlo 30 nejspolehlivější výsledky a polymorfní produkt mikrosatelitních lokusů, jejichž alely byly jasně odlišitelné (20 párů primerů navržených podle sekvencí z EST a 10 párů navržených podle sekvencí z genomických knihoven) (v tabulce 3 je u 29 z těchto mikrosatelitních lokusů uveden počet zjištěných alel). Mikrosatelitní lokusy obsahovaly dinukleotidové, trinukleotidové nebo v jednom případě tetranukleotidový motiv repetice. Mikrosatelity vykazovaly vysoký stupeň polymorfismu a počet alel na 29 mikrosatelitních lokusech se pohyboval od 2 do 31 (Boches, 2005).

Cross-species PCR amplifikace:

Boches *et al.* (2005) provedli *cross-species* PCR amplifikaci 44 (ze 49) párů primerů mikrosatelitních markerů (páry primerů uvedeny v tabulce 3) na 23 odrůdách zastupujících 12 druhů 9 sekcí rodu *Vaccinium*: *V. ovatum* (sekce *Pyxothamnus*), *V. bracteatum* (s. *Bracteata*), *V. vitis-idaea* (s. *Vitis-idaea*), *V. parvifolium* (s. *Myrtillus*), *V. crassifolium* (s. *Herpothamnus*), *V. macrocarpon* (s. *Oxycoccus*), *V. darrowii* (s. *Cyanococcus*), *V. tenellum* (s. *Cyanococcus*), *V. elliotii* (s. *Cyanococcus*), *V. corymbosum* (s. *Cyanococcus*), *V. arboreum* (s. *Batodendron*) a *V. oldhamii* (s. *Ciliata*). Pro každý druh byl k dispozici rostlinný materiál 2 odrůd, aby mohl být zjištěn polymorfismus i v rámci druhu, s výjimkou druhu *V. oldhamii* (k dispozici pouze 1 odrůda). Polymorfismus mikrosatelitních lokusů v genomické DNA *V. oldhamii* nemohl být tedy hodnocen v rámci tohoto druhu, ale pouze v porovnání s ostatními 11 druhy (Boches, 2005; Boches *et al.*, 2005).

Autoři provedli PCR amplifikace mikrosatelitních lokusů na genomické DNA výše zmíněných kultivarů a získali produkt v 78 % případů. Největší úspěšnost amplifikace byla na genomické DNA druhů pocházejících ze sekce *Cyanococcus*, u kterých se v průměru amplifikovalo kolem 90 % mikrosatelitních lokusů. Konkrétně

nejvyšší počet amplifikovaných mikrosatelitních lokusů, a to 95 %, měla genomická DNA druhu *V. corymbosum*. Naopak amplifikace nejnižšího počtu mikrosatelitních lokusů byla zaznamenána na genomické DNA druhů pocházejících ze sekce *Oxycoccus*, *Herpothamnus*, *Batodendron* a *Ciliata* (Boches, 2005; Boches *et al.*, 2005).

Mikrosatelitní lokusy se rozdělily v rámci každého ze 12 druhů do 4 skupin - SSRs, které se amplifikovaly, ale jejich velikost byla stejná jak v rámci druhu, tak mezi druhy, byly tedy monomorfní; SSRs polymorfní v rámci druhu, zkoumané SSRs jsou tedy různé velikosti v porovnání mezi jedinci, a to i v rámci jednoho druhu; SSRs, které jsou polymorfní, ale jen ve srovnání s jinými druhy; mikrosatelitní lokusy, které se u genomické DNA druhu neamplifikovaly (touto skupinou se dále zabývat nebudu). Dále budou vypsány některé mikrosatelitní lokusy podle těchto skupin, vždy se budou týkat *V. corymbosum* a většiny nebo všech 11 dalších druhů (Boches, 2005; Boches *et al.*, 2005).

Monomorfní mikrosatelity, např. CA208F, CA218F, CA222F a NA137, které jsou monomorfní ve většině případů mezidruhově, a i v rámci jednoho druhu nemají tedy v tomto případě žádnou vypovídající hodnotu (Boches, 2005).

Mikrosatelitní markery, které byly polymorfní v rámci druhu, vykazovaly nejvyšší stupeň polymorfismu ve srovnání s ostatními testovanými druhy rodu *Vaccinium*, u nichž se mikrosatelitní lokus také úspěšně amplifikoval. Tyto mikrosatelitní markery se doporučují především k vnitrodruhovým studiím populace a ke studiím druhů blízké příbuzných. Většinou se nehodí ke studiím vztahů mezi vzdáleně příbuznými druhy, a to právě z důvodu až tak vysokého polymorfismu, že už se těžko dají určit alely specifické pro daný druh/určitý taxon. U testovaných vzorků druhu *V. corymbosum* byly polymorfní v rámci druhu tyto mikrosatelitní lokusy: CA112F, CA169F, CA23F, CA25F, CA278F, CA344F, CA421F, CA483F, CA642F, CA787F, CA794F, CA855F, NA1040, NA247, NA398, NA741, NA800, NA824, VCC-H9, VCC-I2, VCC-J3, VCC-J5, VCC-J9, VCC-K4, VCC-S10 (Boches, 2005).

Mikrosatelity, které jsou polymorfní ve srovnání s dalšími druhy, jako např. NA172, NA961 a CA214, se nejvíce hodí na fylogenetické studie na úrovni druhů. Většina těchto lokusů vykazuje většinou jen malý stupeň polymorfismu v rámci druhu, ale naopak vyšší stupeň polymorfismu mezi druhy, navíc jsou alely v rámci druhu často jedinečné a dají se tak snadno odlišit od alel mikrosatelitního lokusu jiného druhu (Boches, 2005).

Předpokládá se, že těchto 44 testovaných mikrosatelitních lokusů by mohlo tvořit dobrý základ pro studium divokých populací druhů rodu *Vaccinium* či ku příkladu přímo k identifikaci kultivarů highbush blueberries (Boches, 2005).

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

Boches *et al.* (2006) provedli analýzu genetické diverzity highbush blueberries pomocí 28 párů primerů pro SSRs (označeny v tabulce 3), které navrhli Boches *et al.* (2005). Těchto 28 párů primerů bylo použito na 71 vzorků pocházejících z rostlinného materiálu rodu *Vaccinium*. Vzorky zahrnovaly genomickou DNA divoce rostoucích populací highbush blueberries, tradičních (historical) kultivarů northern highbush blueberries, moderních (modern) northern highbush blueberries, kultivarů southern highbush blueberries, kříženců mezi northern highbush blueberries a southern highbush blueberries, kultivaru half-high blueberry, pentaploidního hybridního kultivaru rodu *Vaccinium* a hybridní druh (*Vaccinium myrtilloides* hybrid).

Celkem bylo amplifikováno 627 alel pomocí použitých 28 párů primerů SSRs. 157 alel bylo specifických pro taxony - taxony se zde myslí skupiny kultivarů northern highbush blueberries; southern highbush blueberries a half-high blueberry; divoká populace highbush blueberries. Například u genomické DNA odrůd 'Grover', 'Bluejay', 'Rubel' a 'Draper' se amplifikovaly pomocí párů primerů SSRs alely specifické pro kultivary northern highbush blueberries, u odrůd 'Misty' a 'Ozarkblue' to byly alely specifické pro kultivary southern highbush blueberries/half-high blueberry (Boches, 2005). U odrůdy 'Northland', která je v tabulce 2 umístěna mezi kultivary half-high blueberries podle Retamalese a Hancocka (2012), se amplifikovala alela specifická pro northern highbush blueberries, Boches (2005) tedy uvádí 'Northland' jako kultivar northland highbush blueberry. I u známých a hojně pěstovaných kultivarů je tedy někdy původ nejasný a informace od různých autorů se liší.

Byly zjištěny asociace mezi konkrétními mikrosatelitními markery a vlastnostmi kultivarů. Mikrosatelitní lokus VCC_J5 o velikosti alely 272 bp a mikrosatelitní lokus CA169 o velikosti alely 136 bp se vyskytovaly v genomické DNA kultivarů southern highbush blueberries, které dokáží prosperovat i v oblastech s mírnými zimami. Alespoň jedna ze zmíněných alel se vyskytovala např. u kultivarů 'Emerald', 'Misty' a 'Star'. Zmíněné alely jsou asociovány s touto vlastností ale jen u kultivarů southern highbush

blueberries, například u kultivarů northern highbush blueberries, které přirozeně prosperují v oblastech s mírnými zimami tyto alely nalezeny nebyly (Boches, 2005).

9 z 28 párů primerů pro SSRs přinesly kvalitní produkt bez artefaktů, předpokládá se tedy jejich spolehlivý produkt i v podmínkách jiných laboratoří. Jsou to mikrosatelitní lokusy CA23F, CA94F, CA169F, CA190R, CA787F, CA855F, NA398, NA961 a VCC_I8 (Boches *et al.*, 2006).

Všechny mikrosatelitní lokusy byly testovány na všech 71 genomických DNA pocházejících z rostlinných materiálů rodu *Vaccinium* a pro každou odrůdu byl vytvořen jedinečný soubor alel mikrosatelitních lokusů specifických pro každou testovanou odrůdu (některé příklady jsou uvedeny v tabulce 4) (Boches, 2005).

V tabulce 4 je uvedeno 6 mikrosatelitních lokusů charakterizovaných velikostí alel nalezených v genomické DNA 7 kultivarů. V rámci tabulky 4 je možné těchto 7 kultivarů identifikovat již amplifikací jednoho vhodně zvoleného mikrosatelitního lokusu, což dokazuje vysokou rozlišovací schopnost mikrosatelitních markerů. V tabulce jsou také uvedeny zjištěné počty haplotypů pro jednotlivé mikrosatelitní lokusy, obecně lze předpokládat, že čím více haplotypů, tím je vyšší vypovídající hodnota tohoto mikrosatelitního lokusu v rámci identifikace jednotlivých kultivarů.

Tyto specifické soubory alel mikrosatelitních lokusů jsou sestaveny pro všech 69 odrůd (bylo zkoumáno 71 vzorků, ale u 2 bylo zjištěno, že jsou to klony odrůd 'Ivanhoe' a 'Coville', které byly také mezi testovanými vzorky). Tyto soubory alel specifické pro jednotlivé odrůdy mohou sloužit jako podklady pro vytvoření dendrogramů znázorňujících genetickou příbuznost jednotlivých kultivarů, konkrétně těchto 69 kultivarů bylo rozděleno do 3 hlavních jasně odlišitelných klastrů - kultivary southern highbush blueberries, northern highbush blueberries a smíšený klast (ten obsahoval divoce rostoucí populace highbush blueberries, některé kultivary southern highbush blueberries a některé northern highbush blueberries). Divoké populace v rámci klastru vytvořily několik shluků podle jejich zeměpisných původů. Dále může systém alel mikrosatelitních lokusů specifických pro odrůdy sloužit jako standardy k identifikaci neznámých rostlinných materiálů odrůd highbush blueberries (Boches, 2005; Boches *et al.*, 2006).

Tabulka 4: 6 vybraných mikrosatelitních lokusů, které jsou považovány za spolehlivé a snadno přenositelné i v rámci jiných laboratoří a velikosti jejich alel (v bp) specifické pro 7 uvedených kultivarů (Boches, 2005).

Mikrosatelitní lokusy	CA23F	CA94F	CA112F	CA169F	NA961	VCC_I8
Počet haplotypů	9	30	26	26	15	19
Odrůda 'Bluejay' (NHB)	155/158	374/384	142/144/146/148	115/121	192	119
Odrůda 'Jewel' (SHB)	155/164	374/384	142/146	109/112/115/136	189/192/195	113/119
Odrůda 'Misty' (SHB)	155	374/379/384/404	142/144	109/112/115/136	189/192	113/119
Odrůda 'Northland' (NHB/HH)	155/158	374/376/384	142/144/161	109/112/115	189/192	117
Odrůda 'Northsky' (HH)	155/158	374/376/384	142/147	112/115/121	186/188/193/195	111
Odrůda 'Rubel' (NHB)	155	374/376/384	142/144/149	109/115	192	117/119
Odrůda 'Star' (SHB)	155	374/376	142/171	112/115/136	189/192	113

Bylo zjištěno, že genetická diverzita je mezi divokými populacemi highbush blueberries velmi vysoká a je vysoká i při srovnání těchto populací a běžně pěstovaných kultivarů highbush blueberries. Genetická diverzita běžně pěstovaných kultivarů highbush blueberries je ale také poměrně vysoká, a to i přes fakt, že zakládajících kultivarů (jako je například 'Rubel' a 'Grover'), které byly použity pro šlechtění nových odrůd, bylo velmi omezené množství (Boches, 2005; Boches *et al.*, 2006).

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

Akagi *et al.* (2010) se zabývali vytvořením rychlého a jednoduchého systému identifikace kultivarů druhů rodu *Vaccinium* pomocí SSRs. Celkem bylo pro tento systém vybráno 11 mikrosatelitních markerů (tabulka 5) - 6 mikrosatelitních lokusů, které jsou registrovány v databázi GenBank a 5 nově objevených mikrosatelitních lokusů.

6 mikrosatelitních lokusů (označeny v tabulce 5), které Akagi *et al.* (2010) uvedli ve své práci se podle accession number shodují s mikrosatelitními lokusy autorů Boches *et al.* (2005) uvedenými v tabulce 4. Páry primerů k těmto lokusům se ale neshodují.

Těchto 11 mikrosatelitních lokusů bylo vyhodnoceno jako dostatečně polymorfní a se spolehlivými produkty. Jejich páry primerů byly tedy použity na kultivarech druhů patřících do sekce *Cyanococcus* rodu *Vaccinium*. Byly zahrnuty kultivary northern highbush blueberries (např. 'Bluejay', 'Chandler', 'Darrow', 'Duke', 'Earliblue', 'Patriot', 'Spartan', 'Toro', 'Berkeley', 'Bluecrop' a 'Lateblue'), southern highbush blueberries (např. 'Misty', 'Ozarkblue' a 'O'Neal'), rabbiteye blueberries (např. 'Powderblue' a 'Woodard') a také několik kultivarů lowbush blueberries. Cílem bylo shromáždit všechny amplifikované alely mikrosatelitních lokusů a sestavit podle nich systém, který by identifikoval každou odrůdu, která byla testována. Podle tohoto systému lze odlišit i blízké příbuzné odrůdy.

Princip spočívá v použití sady 11 párů primerů na templatové DNA určité odrůdy, proběhne PCR za stanovených podmínek a výsledkem budou fragmenty různých délek specifické pro odrůdy (obsažené v identifikačním systému) při použití daného páru primerů.

Tabulka 5: charakteristika 11 polymorfních mikrosatelitních lokusů určených k identifikaci kultivarů druhů rodu *Vaccinium* (Akagi *et al.*, 2010).
 Ve sloupcích jsou uvedeny lokusy s accession number (pokud je v publikaci uvedeno), sekvence primerů a motiv repetice.

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

Poznámka: * - mikrosatelitní lokusy shodné s lokusy v tabulce 3

8 Závěr

Ve své bakalářské práci rešeršního typu jsem se věnovala popisu brusnice chocholičnaté (*V. corymbosum*) a několika dalších druhů rodu *Vaccinium*, se kterými bývá brusnice chocholičnatá často křížena při šlechtění nových kultivarů. Popsala jsem také základy pro pěstění brusnice chocholičnaté. Hlavně jsem se však zaměřila na metody identifikace kultivarů druhů rodu *Vaccinium*, především kultivarů právě brusnice chocholičnaté. K této problematice existuje spousta přístupů, některé jsou již zastaralé (např. RAPD), jiné jsou finančně náročné (např. sekvenování). Vhodným systémem pro identifikaci je využití vybraných mikrosatelitních markerů, které na základě vysokého stupně polymorfismu mají vysokou vypovídající hodnotu.

Jako velmi perspektivní se jeví systém 28 polymorfních mikrosatelitních markerů, pomocí kterých bylo úspěšně identifikováno 71 kultivarů druhů rodu *Vaccinium*. Z 28 mikrosatelitů byl výběr zúžen až 9 mikrosatelitních markerů (CA23F, CA94F, CA169F, CA190R, CA787F, CA855F, NA398, NA961 a VCC_I8) s nejspolehlivějšími produkty bez artefaktů. Těchto 9 mikrosatelitů má tedy univerzální použití v rámci různých laboratoří. Druhý systém, který je možno použít pro identifikaci kultivarů druhů sekce *Cyanococcus* rodu *Vaccinium*, zahrnuje sadu primerů pro 11 mikrosatelitních lokusů (Vacc.01, Vacc.03, Vacc.04, Vacc.05, Vacc.06, Vacc.09, Vacc.17, Vacc.19, Vacc.22, Vacc.24 a Vacc.25).

Existuje tedy 20 mikrosatelitů, které jsou doporučené k identifikaci kultivarů a nabízejí potenciál pro studie jednotlivých odrůd brusnice chocholičnaté. Tyto systémy dokáží rozlišit desítky kultivarů, mají tedy vysokou rozlišovací schopnost. Bylo by vhodné otestovat unikátnost všech 20 mikrosatelitních lokusů. Systémy následně propojit a vytvořit tak ještě lepší systém pro identifikaci kultivarů druhů rodu *Vaccinium*, především tedy kultivarů brusnice chocholičnaté a jejich kříženců.

9 Literatura

Anonymous1 (2015): Názvy bobulovitých plodů v angličtině. JTP. Navštíveno na: <https://www.jtpunion.org/O-JTP/O-Jednote-tlumocniku-a%C2%A0prekladatelu/Sekce-JTP/Sekce-odborneho-prekladu-a-terminologie/Lexikograficky-koutek-Jiriho-Vedrala/Nazvy-bobulovitych-plodu-v-anglictine>, dne 24. 3. 2021.

Anonymous2: *Vaccinium ashei* (Rabbiteye blueberry). Gardenia. Navštíveno na: <https://www.gardenia.net/plant/vaccinium-ashei>, dne 5. 3. 2021.

Anonymous3: G-640, Sierra (cultivar) *Vaccinium corymbosum*. Genome database for *Vaccinium*. Navštíveno na: https://www.vaccinium.org/bio_data/957, dne 7. 2. 2021.

Anonymous4 (2017): *Vaccinium corymbosum* + odrůdy. Safró Milan Havlis. Navštíveno na: <https://www.havlis.cz/karta.php?kytkaid=2434>, dne: 12. 3. 2021.

Anonymous5: Borůvka chocholičnatá, Kanadská borůvka | *Vaccinium corymbosum*. ČESKÉ STAVBY.cz. Navštíveno na: <https://www.ceskestavby.cz/rostliny/boruvka.html>, dne: 14. 3. 2020.

Anonymous6 (2016): USDA *Vaccinium* Crop Vulnerability Statement 2016. Section 1: Blueberries. Small Fruit Crop Germplasm Committee. USDA National Clonal Germplasm Repository in Corvallis, Oregon.

Anonymous7 (2021): Blueberry. Gospodarstwo Szkółkarskie Cieplucha. Navštíveno na: https://www.cieplucha.com.pl/pliki/202012/en_offer_fruit_plants_spring_2021.pdf, dne 20. 6. 2021.

Anonymous8: Duke (cultivar) *Vaccinium corymbosum*. Genome database for *Vaccinium*. Navštíveno na: https://www.vaccinium.org/bio_data/995, dne: 5. 5. 2021.

Anonymous9: Spartan (cultivar) *Vaccinium corymbosum*. Genome database for *Vaccinium*. Navštíveno na: https://www.vaccinium.org/bio_data/959, dne 5. 5. 2021.

Anonymous10: Bluecrop (cultivar) *Vaccinium corymbosum*. Genome database for *Vaccinium*. Navštíveno na: https://www.vaccinium.org/bio_data/994, dne 5. 5. 2021.

Anonymous11: Toro (cultivar) *Vaccinium corymbosum*. Genome database for *Vaccinium*. Navštíveno na: https://www.vaccinium.org/bio_data/966, dne 5. 5. 2021.

Anonymous12: Elliott (cultivar) *Vaccinium corymbosum*. Genome database for *Vaccinium*. Navštíveno na: https://www.vaccinium.org/bio_data/901, dne 5. 5. 2021.

- Anonymous13: *Vaccinium uliginosum* L. United States Department of Agriculture. Navštíveno na: <https://plants.usda.gov/home/plantProfile?symbol=VAUL>, dne 4. 7. 2021.
- Anonymous14: *Vaccinium constablaei* - A.Gray. Plants For A Future. Navštíveno na: <https://pfaf.org/User/Plant.aspx?LatinName=Vaccinium+constablaei>, dne 4. 7. 2021.
- Anonymous15 (2021): *Vaccinium corymbosum* L., the Integrated Taxonomic Information System (ITIS). Navštíveno na: https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=23573#null, dne 10. 7. 2021.
- Anonymous16 (2008): Kulturheidelbeeren. Wikipedia. Navštíveno na: <https://de.wikipedia.org/wiki/Kulturheidelbeeren>, dne 20. 7. 2021.
- Anonymous17: Pensasmustikat. Navštíveno na: <http://tahvoset.fi/wp-content/uploads/2013/02/Mustikat.pdf>, dne 20. 7. 2021.
- Bassil N. V. (2012): Microsatellite Markers: Valuable in *Vaccinium* L. International Journal of Fruit Science 12: 288–293.
- Bian Y., Ballington J., Raja A., Brouwer C., Reid R., Burke M., Wang X., Rowland L. J. (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.
- Boches P. (2005): Microsatellite marker development and molecular characterization in highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) and *Vaccinium* species. Diplomová práce. Navštíveno na: https://ir.library.oregonstate.edu/concern/graduate_thesis_or_dissertations/4f16c609k, dne 7. 7. 2021.
- 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.
- Burdulis D., Sarkinas A., Jasutienė I., Stackevičienė E., Nikolajevs L., Janulis V. (2009): Comparative study of anthocyanin composition, antimicrobial and antioxidant activity in bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) and blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) fruits. Acta Poloniae Pharmaceutica 66: 399–408.

- Cardie L., Ramsay L., Milbourn D., Macaulay M., Marshall D., Waugh R. (2000): Computational and experimental characterization of physically clustered simple sequence repeats in plants. *Genetics* 156: 847–854.
- Cho M., Howard L., Prior R., Clark J. (2005): Flavonol glycosides and antioxidant capacity of various blackberry and blueberry genotypes determined by high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *Journal of Science and Food Agriculture* 85: 2149–2158.
- Cho Y. G., Ishii T., Temnykh S., Chen X., Lipovich L., McCouch S. R., Park W. D., Ayres N., Cartinhour S. (2000): Diversity of microsatellites derived from genomic libraries and GenBank sequences in rice (*Oryza sativa* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 100: 713-722.
- Coburn J. R., Temnykh S. V., Paul E. M., McCouch S. R. (2002): Design and application of microsatellite markers panels for semiautomated genotyping of rice. *Crop Science* 42: 2092–2099.
- Coville, F. V. (1916): The wild blueberry tamed. *National Geographic* 29: 535–546. In: Retamales J. B., Hancock J. F. (2012): *Blueberries*. CABI, Wallingford 2.
- Coville, F. V. (1927): Blueberry chromosomes. *Science* 66: 565–566. In: Retamales J. B., Hancock J. F. (2012): *Blueberries*. Wallingford, Oxfordshire, UK; Cambridge, MA 2.
- Dhanaraj A. L., Slovin J. P., Rowland L. J. (2004): Analysis of gene expression associated with cold acclimation in blueberry floral buds using expressed sequence tags. *Plant Science* 166: 863–872.
- Dolejší A., Kott V., Šenk L. (1991): *Méně známé ovoce*. Zemědělské nakladatelství Brázda, Praha.
- Erb W., Draper A. D., Schwartz H. J. (1988a): Methods of screening blueberry seedling populations for drought resistance. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 23: 312–314. In: Retamales J. B., Hancock J. F. (2012): *Blueberries*. CABI, Wallingford 92.
- Erb W., Draper A. D., Schwartz H. J. (1988b): Screening interspecific blueberry seedling populations for drought resistance. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 113: 599–604. In: Retamales J. B., Hancock J. F. (2012): *Blueberries*. CABI, Wallingford 92.

- Fajardo D., Senalik D., Ames M., Zhu H., Steffan S. A., Harbut R., Polashock J., Vorsa N., Gillespie E., Kron K., Zalapa J. E. (2013): Complete plastid genome sequence of *Vaccinium macrocarpon*: structure, gene content, and rearrangements revealed by next generation sequencing. *Tree Genetics & Genomes* 9: 489–498.
- Field D., Wills C. (1998): Long polymorphic microsatellites in simple organisms. *Proceeding of the Royal Society of London, Series B: Biological Sciences* 263: 209-215.
- 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.
- Grulich V. (2020): *Vaccinium corymbosum* L. – borůvka chocholičnatá / brusnica. *Botany.cz*. Navštíveno na: <https://botany.cz/cs/vaccinium-corymbosum/>, dne 3. 3. 2021.
- Guerra-Sanz, J. M. (2004): New SSR markers of *Phaseolus vulgaris* from sequence databases. *Plant Breeding* 123: 87-89.
- Hancock J. F., Draper A. D. (1989): Blueberry culture in North America. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 24: 551–556.
- Hejný S., Slavík B., Hrouda L., Skalický V. (1990): *Květena České republiky 2*. Academia, Praha.
- 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.
- Holton T. A. (2001): Plant genotyping by analysis of microsatellites. In: Henry R. J. (ed.): *Plant genotyping: the DNA fingerprinting of plants*. CABI, Wallingford 15–26.
- Hoskovec L. (2007): *Vaccinium myrtillus* L. – borůvka (brusnice borůvka) / brusnica čučoriedková. *Botany.cz*. Navštíveno na: <https://botany.cz/cs/vaccinium-myrtillus/>, dne 3. 3. 2021.
- Ledvina M., Stoklasová A., Cerman J. (2009): *Biochemie pro studující medicíny*. Karolinum, Praha.
- 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.

- Maguire T. L. (2001): Plant genotyping: the DNA fingerprinting of plants. In: Henry R. J. (2001): Producing and exploiting enriched microsatellite libraries. CABI, Wallingford, 193–209.
- Marino M. A., Turni L. A., Del Rio S. A., Williams P. E., Cregan P. B. (1995): The analysis of simple sequence repeat DNA in soybean by capillary gel electrophoresis. *Applied and Theoretical Electrophoresis* 5: 1–5.
- Mazza G., Kay C. D., Cottrell T., Holub B. J. (2002): Absorption of anthocyanins from blueberries and serum antioxidant status in human subjects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 7731–7737.
- Morgante M., Hanafey M., Powell W. (2002): Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes. *Nature Genetics* 30: 194–200.
- Nečas E. (2006): *Obecná patologická fyziologie*. Karolinum, Praha.
- Nesom G. (2001): Highbush blueberry *Vaccinium corymbosum* L. United states department of agriculture; Natural resources conservation service; national plant data; Plant guide. Navštíveno na: https://plants.usda.gov/plantguide/pdf/pg_vaco.pdf, dne 1. 3. 2021.
- Nesom G et Davis K. (2002): Highbush blueberry *Vaccinium corymbosum* L. United states department of agriculture; Natural resources conservation service; national plant data; Plant fact sheet. Navštíveno na: https://plants.usda.gov/factsheet/pdf/fs_vaco.pdf, dne 1. 3. 2021.
- Nicot N., Chiquet V., Gandon B. et al. (2004): Study of simple sequence repeat (SSR) markers from wheat expressed sequence tags (ESTs). *Theoretical and Applied Genetics* 109: 800–805.
- Nile S. H., Park S. W. (2014): Edible berries: Bioactive components and their effect on human health. *Nutrition* 30: 134–144.
- Nunome T., Negoro S., Miyatake K., Yamaguchi H., Fukuoka H. (2006): A protocol for the construction of microsatellite enriched genomic library. *Plant Molecular Biology Reporter* 24: 305–312.
- 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.

- Parkinson J., Blaxter M. (2009): Expressed Sequence Tags: An Overview. In: Parkinson J. (ed): Expressed Sequence Tags (ESTs). Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols). Humana Press, Totowa 533: 1–12.
- Papřstěin F. *et al.* (2009): Technologie pěstování kanadské borůvky (*Vaccinium corymbosum* L.). Výzkumný a šlechtitelský ústav ovocnářský, Holovousy.
- Pavlis G. *et Sciarappa* W. (2005): Blueberry Pest Management for Home Gardens. Rutgers New Jersey Agricultural Experiment Station. Navštíveno na: <https://njaes.rutgers.edu/pubs/publication.php?pid=fs106>, dne 28. 6. 2021.
- Pavlis G. *et Sciarappa* W. (2005): Establishing Blueberries in the Home Garden. Rutgers New Jersey Agricultural Experiment Station. Navštíveno na: <https://njaes.rutgers.edu/FS750/>, dne 28. 6. 2021.
- Pospíšilová Š., Dvořáková D., Mayer J. (2013): Molekulární hematologie. Praha: Galén 16–22.
- Prior R. L., Cao G., Martin A., Sofic E., McEwen J., O'Brien C., Lischner N., Ehlenfeldt M., Kalt W., Krewer G., Mainand C. M. (1998): Antioxidant capacity as influenced by total phenolic and anthocyanin content, maturity, and variety of *Vaccinium* species. Journal of Agricultural and Food Chemistry 46: 2686–2693.
- Puupponen-Pimiä R., Nohynek L., Alakomi H. L., Oksman-Caldentey K. M. (2005): Bioactive berry compounds-novel tools against human pathogens. Applied Microbiology and Biotechnology 67: 8–18.
- Qu L. *et Hancock* J. F. (1997): Randomly Amplified Polymorphic DNA- (RAPD-) based Genetic Linkage Map of Blueberry Derived from an Interspecific Cross between Diploid *Vaccinium darrowi* and Tetraploid *V. corymbosum*. Journal of the American Society for Horticultural Science 122: 69–73.
- Retamales J. B. *et Hancock* J. F. (2012): Blueberries. CABI, Wallingford.
- Rowland U., Mehra S., Dhanaraj A., 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.

- Rowland L. J., Ogden E. L., Ehlenfeldt M. K., B. Vinyard (2005): Cold hardiness, deacclimation kinetics, and bud development among 12 diverse blueberry (*Vaccinium* spp.) genotypes under field conditions. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 130: 508–514.
- Schmidt B. M., Erdman J. W., Lila M. A. (2005): Effect of food processing on blueberry antiproliferation and antioxidant activity. *Journal of Food Science* 70: 389–394.
- Sia E. A., Butler C. A., Dominska M., Greenwell P., Fox T. D., Petes T. D. (2000): Analysis of microsatellite mutations in the mitochondrial DNA of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97: 250–255.
- 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, Berlín 197–221.
- Stevens P. F. (1969): *Taxonomic studies in the Ericaceae*. The University of Edinburgh, Edinburgh, U.K. In: Ballington J. R. (2001): *Collection, Utilization, and Preservation of Genetic Resources in Vaccinium*. *American Society for Horticultural Science* 36: 206–213.
- 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.
- Stringer S. J., Marshall D.A., Sampson, B. J., Spiers, J. M. (2004): The effects of chill hour accumulation on hydrogen cyanamide efficacy in rabbiteye and southern highbush blueberry cultivars. *Small Fruit Review* 3: 339–347.
- Šmarda J., (2005): *Metody molekulární biologie*. Masarykova univerzita, Brno 55, 99.
- Tóth, G., Gáspári, Z., Jurka, J. (2000): Microsatellites in Different Eukaryotic Genomes: Survey and Analysis. *Genome Research* 10: 967–981.
- Uttal L. J. (1986): Updating the genus *Vaccinium* (Ericaceae) in West Virginia. *Castanea* 51: 197–201.
- Uttal L. J. (1987): The genus *Vaccinium* L. (Ericaceae) in Virginia. *Castanea* 52: 231–255.
- Vander Kloet S. P. (1980): The taxonomy of the highbush blueberry, *Vaccinium corymbosum*. *Canadian Journal of Botany* 58: 1187–1201.

- Vander Kloet S. P. (1988): The genus *Vaccinium* in North America. Agriculture Canada, Ottawa.
- Vander Kloet S. P. et Dickinson T. A. (2009): A subgeneric classification of the genus *Vaccinium* and the metamorphosis of *V.* section *Bracteata* Nakai: more terrestrial and less epiphytic in habit, more continental and less insular in distribution. *Journal of Plant Research* 122: 253–268.
- Wang D., Shi J., Carlson S. R., Cregan P. B., Ward R. W., Diers B. W. (2003): A Low-Cost, High-Throughput Polyacrylamide Gel Electrophoresis System for Genotyping with Microsatellite DNA Markers. *Crop Science* 43: 1828–1832.
- Williams J. G. K., Kubelik A. R., Livak K. J., Rafalski J. A., Tingey S. V. (1990): DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic acids research* 18: 6531–6535.
- Williamson J. G., Phillips D. A., Lyrene P. M., Munoz P. R. (2019): Southern Highbush Blueberry Cultivars from the University of Florida. Horticultural sciences department.
- Wu X., Kang J., Xie C., Burris R., Ferguson M. E., Badger T. M., Nagarajan S. (2010): Dietary blueberries attenuate atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice by upregulating antioxidant enzyme expression. *Journal of Nutrition* 140: 1628–1632.
- Yamada R. (2008): Primer: SNP-associated studies and what they can teach us. *Nature Reviews Rheumatology* 4: 210–217.
- Zalapa J. E., Cuevas H., Zhu H., Steffan S., Senalik D., Zeldin E., McCown B., Harbut R., Simon P. (2012): Using Next-generation Sequencing Approaches to Isolate Simple Sequence Repeat (SSR) Loci in the Plant Sciences. *American Journal of Botany* 99: 193–208.
- Zima J., Macholán M., Munclinger P., Piálek J. (2004): *Genetické metody v zoologii*. Karolinum, Praha.

10 Patenty

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

Catton, L. (2019): Plant patent named 'VacBri 1'. US PP30087 P3.

Jinki J. *et* Seungin L. (2018): Method and Kit for identifying variety of Blueberry using single nucleotide polymorphism markers. KR101826735B1.

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.

Luby J. (2015): Plant patent named 'MNPink1'. US PP25792 P2.