

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2018

Kristýna Hanuláková

[Sem zadejte text.]

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Molekulární a cytologická charakterizace
položek genové banky banánovníku
(*Musa* spp.)**

Bakalářská práce

Kristýna Hanuláková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2018

Vedoucí práce: Mgr. Pavla Christelová, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně v průběhu bakalářského studia pod vedením Mgr. Pavly Christelové, Ph.D. s použitím uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci dne

.....

SOUHRN

Tématem předložené bakalářské práce je molekulární a cytologická charakterizace položek genové banky banánovníků. Obsahem teoretické části je literární rešerše o morfologii, taxonomii a významu plodiny. V dalších kapitolách se práce zabývá genomem banánovníku, jeho genetickou diverzitou a šlechtěním nových odrůd. V návaznosti na to je popsán proces uchování genetické diverzity pomocí genových bank, ve kterých musí být jednotlivé položky správně charakterizovány. Ke správné klasifikaci položek slouží moderní molekulární metody, přičemž je blíže popsána metoda genotypování pomocí SSR markerů.

V praktické části bylo pomocí SSR genotypovací platformy analyzováno 158 položek z genové banky Bioversity International *Musa* Germplasm Transit Centre (ITC). Na základě výsledků analýzy z UPGMA byl sestaven dendrogram, kde bylo sledováno klastrování jednotlivých položek. Pomocí cytologické analýzy (měření ploidie průtokovou cytometrií) a molekulární analýzy (genotypování pomocí SSR markerů) byla potvrzena předchozí správná klasifikace u 68 % položek. Zbývajících 32 % bylo identifikováno jako problematické položky, kde se jednalo buď o nesouhlasnou ploidii (9 položek), mylnou klasifikaci, záměnu nebo položky vytvářející nové klastry ve vazbě s jinými (12 položek) klastry. Navíc, u tří položek, které byly dříve nedostatečně popsány, přinesla provedená analýza přesnější informace o jejich předpokládaném zařazení.

Problematické položky jsou genovou bankou vyřazeny z distribuce a probíhá další ověřování a kroky k nápravě nedostatků v charakterizaci a nakládání s jednotlivými položkami. Provedené analýzy jsou tak cenným nástrojem pro zefektivnění činnosti genové banky banánovníku, jako i cenným nástrojem pro standardizovanou charakterizaci genofondu banánovníku, sloužící širší vědecké a šlechtitelské komunitě zabývající se banánovníkem.

SUMMARY

The topic of this bachelor thesis is the molecular and cytogenetic characterization of the banana gene bank items. The content of the theoretical part is a literary research about morphology, taxonomy and importance of the crop. In the next chapters thesis deals with banana genome, genetic diversity and breeding of new varieties. This is followed by the process of genetic diversity conservation using gene banks in which individual items must be properly characterized. Modern molecular methods are used for the correct classification of items, where the method of SSR genotyping is closer described.

In the practical part, 158 items from the Bioversity International *Musa* Germplasm Transit Center (ITC) were analyzed by SSR genotyping platform. Dendrogram was compiled on base the results of the UPGMA analysis and there was clustering of individual items was monitored. Cytological analysis (flow cytometry ploidy measurement) and molecular analysis (SSR genotyping) confirmed the previous correct classification for 68 % of items. The remaining 32 % were identified as problematic items where either disagreeable ploidy (9 items), erroneous classification, substitution or item creating new clusters in relation to other clusters (12 items) were identified. In addition, for the three items that were previously insufficiently described the analysis carried out gave more precise information about their predicted classification.

Problem items are discarded by the gene bank and further validation and steps are taken to correct deficiencies in the characterization and handling of individual items. The analyzes performed are thus a valuable tool for streamlining the banana gene bank activity, as well as a valuable tool for the standardized characterization of the banana genofond serving the broader scientific and breeding community dealing with banana trees.

PODĚKOVÁNÍ

Moc ráda bych poděkovala mé vedoucí Mgr. Pavle Christelové, Ph.D. za odborné rady, za její trpělivost a všechnen strávený čas, který mi věnovala při vedení a opravách bakalářské práce a také za profesionální a zároveň přátelský přístup. Dále bych chtěla poděkovat paním laborantkám, které mi poskytly řadu praktických informací a celému pracovnímu kolektivu v Ústavu experimentální botaniky AV ČR za příjemné pracovní prostředí.

Obsah

SEZNAM ZKRATEK	VIII
SEZNAM OBRÁZKŮ	IX
SEZNAM TABULEK	IX
1 ÚVOD	1
2 CÍLE PRÁCE	2
3 LITERÁRNÍ PŘEHLED	3
3.1 OBECNÁ CHARAKTERISTIKA BANÁNOVNÍKU.....	3
3.1.1 Morfologie	3
3.1.2 Význam plodiny	5
3.1.3 Taxonomie	6
3.2 GENOM BANÁNOVNÍKU	10
3.3 GENETICKÁ DIVERZITA BANÁNOVNÍKU A ŠLECHTĚNÍ NOVÝCH ODRŮD.....	11
3.4 UCHOVÁNÍ GENETICKÉ DIVERZITY	13
3.5 MODERNÍ MOLEKULÁRNÍ METODY PRO GENOTYPOVÁNÍ.....	15
3.6 VYUŽITÍ SSR U MUSACEAE.....	20
4 MATERIÁL A METODY	23
4.1 ROSTLINNÝ MATERIÁL.....	23
4.2 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE, SOUPRAVY A ROZTOKY	23
4.2.1 Použité chemikálie.....	23
4.2.2 Použité soupravy.....	24
4.2.3 Použité roztoky a jejich příprava	24
4.3 SEZNAM POUŽITÝCH PŘÍSTROJŮ A ZAŘÍZENÍ	25
4.4 SOFTWARE.....	25
4.5 METODIKA.....	25
4.5.1 Měření stupně ploidie	25
4.5.2 Izolace DNA	26
4.5.3 Gelová elektroforéza.....	26
4.5.4 PCR amplifikace.....	26
4.5.5 Purifikace PCR produktů.....	27
4.5.6 Příprava vzorků na fragmentační analýzu	28

4.5.7	Fragmentační analýza a vyhodnocení.....	28
5	VÝSLEDKY A DISKUSE.....	29
5.1	OVĚŘENÍ PLOIDIE.....	29
5.2	ŘEDĚNÍ DNA.....	30
5.3	SSR ANALÝZA.....	31
5.3.1	Potenciálně nové klastry.....	31
5.3.2	Položky dříve nedostatečně klasifikované.....	32
5.3.3	Problematické položky.....	32
6	ZÁVĚR.....	38
7	POUŽITÁ LITERATURA.....	39
8	PŘÍLOHY.....	48

Seznam zkratek

A	Adenin
AFLP	Amplified fragment length polymorphism
BAC	Bacterial artificial chromosome
Bp	Base pair
C	Cytosin
EAHB	East African Highland bananas
G	Guanin
GIS	Geografický informační systém
INIBAP	International Network for the Improvement of Banana and Plantain
IRD	Institut de recherche pour le développement
ITC	International Transit Centre
LTR	Long terminal repeat
Mbp	Megabase pair
MGIS	<i>Musa</i> germplasm information system
MGC	<i>Musa</i> genotyping centre
PCR	Polymerase chain reaction
RAPD	Random amplification of polymorphic DNA
RFLP	Restriction fragment length polymorphism
SNP	Single-nucleotide polymorphism
SSR	Simple sequence repeat
T	Tymin
TR1	Tropical race 1

Seznam obrázků

Obrázek 1: Morfologie rostliny banánovníku (převzato s úpravami z https://www.istockphoto.com/photos/banana-tree)	3
Obrázek 2: Schématické znázornění taxonomického členění čeledi <i>Musaceae</i>	7
Obrázek 3: Schématické znázornění šlechtění triploidních druhů.	12
Obrázek 4: Schématické zobrazení metody založené na mikrosatelitových repeticích (převzato s úpravami z Agarwal <i>et al.</i> , 2008).....	19
Obrázek 5: Elektroforetická analýza vybraných vzorků izolované genomové dna použité pro ssr genotypování.....	30
Obrázek 6: Dendrogram sestavený z core subsetu rozdělený do 13 klastrů (převzato od Christelová <i>et al.</i> , 2017).	31
Obrázek 7: Výsledný dendrogram obsahující nově analyzované položky a klastry odpovídající „core subsetu“ – zmenšená verze (plná verze přiložena na CD jako PDF soubor).	37

Seznam tabulek

Tabulka 1: Porovnání vybraných aspektů nejčastěji používaných molekulárních markerů.	16
Tabulka 2: Klastrování jednotlivých skupin čeledi <i>Musaceae</i> (převzato s úpravami od Christelová <i>et al.</i> , 2017).	22
Tabulka 3: 19 testovaných ssr markerů (převzato s úpravami od Christelová <i>et al.</i> , 2011).	27
Tabulka 4: Analyzované položky čeledi <i>Musaceae</i> lišící se od očekávané ploidie.....	30
Tabulka 5: Analyzované položky, které byly po všech provedených analýzách vyhodnoceny jako problematické.	33

1 Úvod

První zmínky o banánovníku pocházejí už z roku 600 př. n. l. Jedná se o vytrvalou bylinu z čeledi *Musaceae* pocházející z jihovýchodní Asie, odkud se postupně rozšířila do dalších tropických oblastí světa. Zahrnuje řadu planých druhů, a především také lokálně i celosvětově významné jedlé kultivary. Kvůli svým plodům, ale například i listům je nepostradatelnou plodinou pro mnoho obyvatel zejména afrických států a ekonomika těchto zemí je na nich zcela závislá. Je proto velmi důležité bojovat proti ohrožení produkce banánovníku a snažit se o ochranu stávajícího genofondu, který dává naději na vyšlechtění odolnějších odrůd.

Jedlé druhy banánovníku jsou vegetativně se množící rostliny, což představuje problém pro efektivní šlechtění vylepšených odrůd. Nicméně, existuje poměrně široká genetická diverzita zejména mezi planými druhy, které jsou často nositeli žádoucích a pro šlechtění výhodných charakteristik. Společně s moderními šlechtitelskými postupy, tak lze docílit vzniku nových, vylepšených odrůd. Je ovšem nezbytné, dobře charakterizovat výchozí rodičovské druhy a efektivně uchovat a chránit dostupný genofond banánovníku. V dnešní době jsou k tomu využívány moderní molekulární metody, které umožňují jednotlivé kultivary lépe charakterizovat a pomáhají je tak správně klasifikovat. Správně klasifikované položky jsou následně zařazovány do genových bank, které primárně slouží k zachování genetické diverzity banánovníku.

Předložená bakalářská práce si klade za cíl pomoci správné charakterizaci položek genové banky a přispět tak k objasnění genetické diverzity banánovníků, s využitím metody genotypování pomocí SSR markerů.

2 Cíle práce

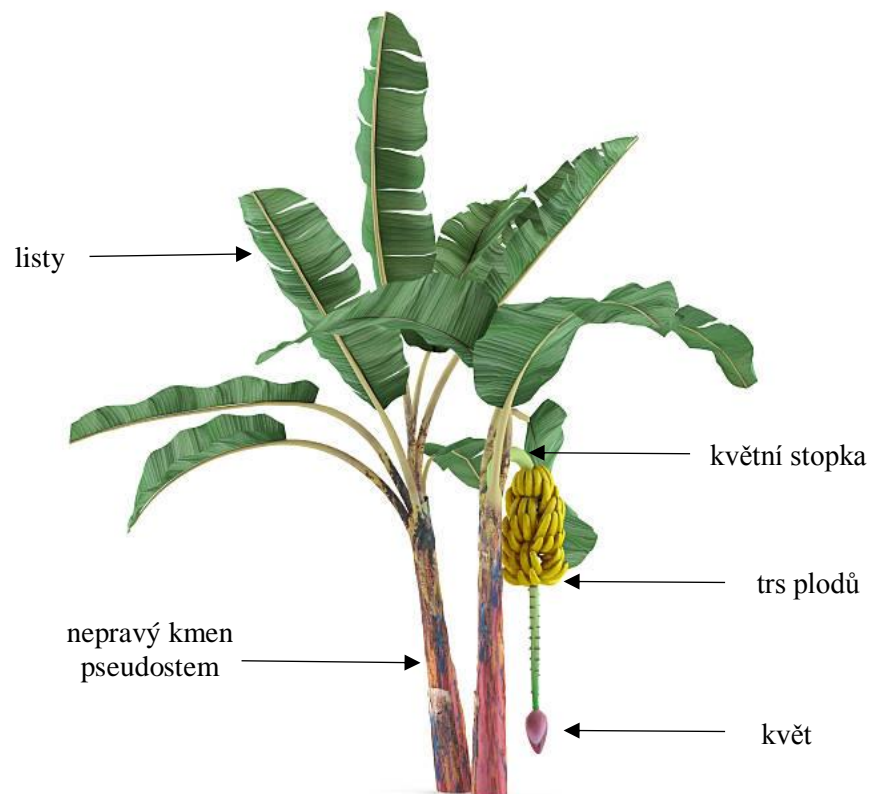
- 1) Vypracovat literární přehled o banánovníku, genetické diverzitě rodu *Musa* a molekulární charakterizaci položek genové banky banánovníku.
- 2) Systematicky charakterizovat 2 zásilky z genové banky banánovníku (ITC kolekce) určení ke genotypování pomocí SSR markerů v rámci projektu MŠMT LG15017.
- 3) Identifikovat problematické položky v analyzovaném souboru rostlin.
- 4) Doplnit nové poznatky o genetické diverzitě v rámci rodu *Musa*.

3 Literární přehled

3.1 Obecná charakteristika banánovníku

3.1.1 Morfologie

Banánovník je stromu podobná vytrvalá bylina, která se primárně začala pěstovat v jihovýchodní Asii a Papui Nové Guinei, odkud se postupně rozšířila do dalších tropických a subtropických oblastí (Robinson, 1996). Rostlina se skládá ze zkráceného podzemního stonku neboli „cormu“, který nese rozvíjející se výhonky, kořenový systém, pseudostem, listy a květenství nesoucí květy a následně plody (Stover *et* Simmonds, 1987).



Obrázek 1: Morfologie rostliny banánovníku (převzato s úpravami z <https://www.istockphoto.com/photos/banana-tree>)

Pseudostem je nepravý kmen skládající se z pevně zavinutých překrývajících se listů. Tento kmen může podle odrůdy dosahovat různé výšky. Například u kultivovaných odrůd 2 až 8 m a u některých planých druhů 10 až 15 m. Jedná se o kompaktní listové pláště, které rostou přímo z vrcholu „cormu“ a podpírají stonek nesoucí květenství. Listové pláště jsou

kruhové a nejprve zcela uzavírají stonk, ale později jsou odděleny růstem nových listů, které byly uzavřené v rámci pseudostemu (Stover *et* Simmonds, 1987).

Listy dosahují plné velikosti až po 6 měsících. První lístky produkované z centrálního meristému rozvíjejícího se stonku jsou šupiny, následované úzkými mečovitými listy ohraničenými postupně se rozšiřující laminou. Listové pláště jsou těsně zabalené, zprvu kruhové, kompletně uzavírající meristém, ale později se okraje listů otevírají růstem nových z centra pseudostemu. Distální konec prodlužujících se listových plášťů se uzavře do úzkého řapíku, který rozděluje čepel na dvě poloviny. Zralá lamina dosahuje velikosti v rozmezí od 1,5 m do 2,8 m (Robinson, 1996). Řapík je u většiny odrůd banánovníků různě zbarvený. V kultivarech druhu *Musa acuminata* dominuje červené až purpurové zbarvení řapíku. Naopak u druhu *M. balbisiana* jsou řapíky většinou zelené. Největší listy jsou ty, které vznikají před květem. Mladý list roste více méně vertikálně, s postupným vývojem klesá a ve stáří uvadá. Rozložení listů na rostlině umožňuje získat maximum světla pro fotosyntézu (Karamura *et* Karamura, 1995).

V nížinných tropických oblastech je kvetení iniciováno po vzniku 30–40 listů. Dochází k tomu na vrcholu „cormu“, stonk se začíná prodlužovat, klasovité květenství prorůstá středem nepravého kmene a objevuje se za 7–10 měsíců po vyrašení odnože mezi listovými pochvami na tlustém ohýbajícím se stonku (Valíček *et al.*, 2002). Květy jsou uspořádány v uzlových klastrech, přičemž každý klastr vzniká na šikmé příčné koruně, které jsou pokryty velkými téměř vejčitými a obvykle purpurově červenými listeny (Purseglove, 1975). Květenství je bisexuálně uspořádané, běžně má 12–20 nodů, přičemž bazální nody květenství nesou samičí květy a distální část květy samčí. Květy jsou nepravidelné, zygomorfní.

Banánovník se rozmnožuje vegetativně pomocí výhonů, ale plané druhy se mohou rozmnožovat také semeny. Rostliny banánovníku jsou monokarpické, což znamená, že mají ve svém životě pouze jedno reprodukční období, na jehož konci odumírají (Stover *et* Simmonds, 1987). Poté co předchozí rostlina vytvoří plody a odumře, objeví se tzv. „sucker“ (výhon), který se vyvíjí z postranních pupenů oddenku a vyrůstá poblíž mateřské rostliny. Zpočátku mají výhony pouze listové pláště buď bez střední žilnatiny nebo listové čepele. Takovéto výhony jsou označovány jako „pepper suckers.“ Některé výhony, tzv. „sword suckers“ mohou dále růst až do dospělé podoby a během růstu postupně vytvářet listovou žilnatinu i čepel. Jako „follower“ nebo „ratoon suckers“ jsou označovány ty, které nahrazují

mateřskou rostlinu. Plody nevytvářející, ale pouze pokračující v životním cyklu jsou „maiden suckers“ (panenské výhony). „Water suckers“ taktéž vznikají z postranních pupenů, ale jejich spojení s oddenkou je velmi slabé (Simmonds, 1966)

Plod je podlouhlá bobule, zpočátku malá, hranatá, zelená, s tvorbou dužiny se postupně barva mění nejčastěji na typicky žlutou, řidčeji s odstíny oranžové, červené až fialově purpurové. Plody jedlých odrůd jsou partenokarpické, tedy bezsemenné a otáčejí se směrem vzhůru. Celé plodenství tvoří trs, upořádaný v patrech, nejčastěji visící směrem dolů (Valíček, 2002).

3.1.2 Význam plodiny

Ekonomika mnoha zemí je částečně nebo úplně závislá na pěstování, prodeji/obchodu, zpracování a spotřebě banánového ovoce nebo odvozených výrobků (Karamura *et* Karamura, 1995). Malou část obchodu tvoří sušené banány, banánové pyré pro kojeneckou výživu nebo banánová mouka. Banány a „plantains“ hrají významnou roli ve výživě, blahobytu a kulturním životě milionů lidí. Jedním z kulturních přínosů je například rozmanité využití v kulinářství. Avšak nedostatek kyselosti v banánech znesnadňuje jejich uchování a z důvodu celoroční dostupnosti čerstvého ovoce je skladování považováno za zbytečné (Robinson, 1996).

Banány jsou konzumované především tepelně neupravené jako dezertní ovoce, protože po dozrání jsou sladké a snadno stravitelné. „Plantains“ banány jsou škrobovitější, před konzumací se buď vaří, smaží nebo pečou, a mohou být konzumovány zralé i nezralé. V oblasti rovníkového pásu Afriky představují banány hlavní zdroj příjmů mnoha farmářů a tvoří základní životně důležitou potravinu. Jejich spotřeba zde činí 400–600 kg na osobu za rok. Pěstují se zde hlavně odrůdy vhodné pro vaření například škrobovitě kaše „matooke.“ V Ugandě a Tanzanii se „cooking“ banány využívají na výrobu nutričně výživného piva „mbidde“ (Doležel *et* Nyine, 2015).

Kromě plodů mají řadu využití i veliké listy, významné pro životní prostředí. Například v Ugandě jsou listy používány jako krmivo pro zvířata, na zabalení jídla před tepelným zpracováním a v banánových zahradách jsou nejlevnějším zdrojem materiálu pro mulčování. Listy jsou také využívány při výrobě látek a lan (Karamura *et* Karamura, 1995).

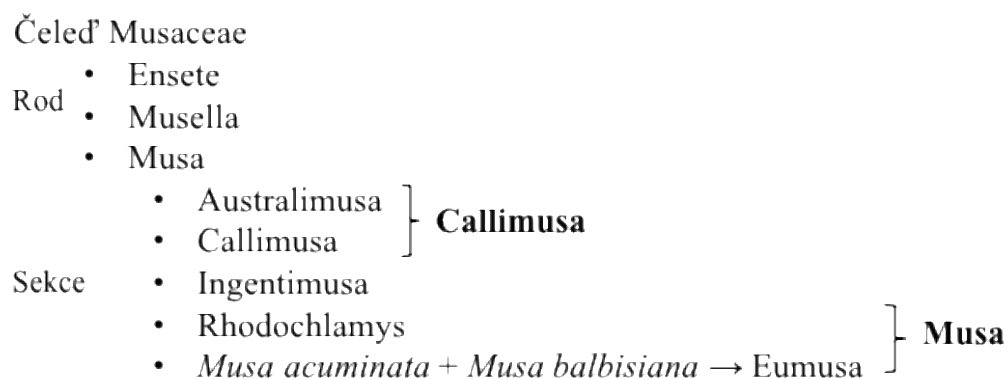
Pseudostem *M. textilis* se používá na výrobu papíru pro filtry a bankovky (Doležel *et Nyine*, 2015).

3.1.3 Taxonomie

Čeled' *Musaceae* neboli banánovníkovité, se systematicky řadí do říše *Plantae*, oddělení *Magnoliophyta*, třída *Liliopsida*, řád *Zingiberales* (www.biolib.cz). Tato čeled' zahrnuje rody *Ensete*, *Musella* a *Musa*. Rod *Ensete*, zahrnující 7–8 druhů, tvoří monokarpické rostliny, které nenesou jedlé ovoce. Nicméně rostliny z tohoto druhu mají mnoho jiných využití, například vlákna z nepravého kmene se využívají na výrobu lan, rohoží a košíků. Listy se využívají k podávání, balení potravin, krmení zvířat, jako stavební materiál a k vystlání jam, které slouží k výrobě fermentovaného škrobu z dužiny (Deckers *et al.*, 2001).

Dnes používaný systém klasifikace je založen na práci Simmondse a Shepherdova (1955), kteří na základě hodnocení 15 morfologických znaků stanovovali relativní podíl dvou planých rodičovských druhů *Musa acuminata* Colla (A genom) a *Musa balbisiana* Colla (B genom), na složení genomu daného kultivaru. Dále se ke správné klasifikaci používá ploidie, která udává počet homologních sad chromozomů. Podle této klasifikace patří do rodu *Musa* taxonomicky podřízené sekce *Eumusa* a *Rhodochlamys* se základním chromozomovým číslem 11, dále *Australimusa* a *Callimusa* se základním chromozomovým číslem 10, včetně druhu *M. beccarii* ($n = 9$), spadající také do sekce *Callimusa*. Argent (1976) vytvořil pro jediný druh *M. ingens* pátou sekci *Ingentimusa* se základním chromozomovým číslem 7. V roce 2013 byly sekce *Australimusa* a *Callimusa* sloučeny do společné sekce *Callimusa* a nově vznikla sekce *Musa* slučující původní představitele sekcí *Eumusa* a *Rhodochlamys* (Häkkinen, 2013; obrázek 2).

Sekce *Australimusa* zahrnuje mimo jiné druhy *M. textilis* a *Fe'i* banánovníky rostoucí v Pacifiku, plodící také jedlé ovoce. Druh *M. coccinea* ze sekce *Callimusa* a druhy ze sekce *Rhodochlamys* nemají velký ekonomický význam, ale jsou ceněny jako okrasné rostliny. Sekce *Ingentimusa* byla vytvořena pouze pro *M. ingens* rostoucí ve vyšších polohách Papui Nové Guinei (Argent, 1976). *Eumusa* je největší a geograficky nejrozšířenější sekcí rodu, zahrnující většinu jedlých banánů.



Obrázek 2: Schématické znázornění taxonomického členění čeledi *Musaceae*.

Druh *M. acuminata* má původ v Malajsii a vyvinul se do komplexu diploidních (AA) poddruhů, které představují: *banksii*, *burmannica*, *burmannicoides*, *errans*, *malaccensis*, *microcarpa*, *siamea*, *truncata* a *zebrina*. Druh *M. balbisiana* pochází z Indie, ale i přes širokou morfologickou variabilitu zde není zaznamenána klasifikace poddruhů. Intra- a interspecifickou hybridizací těchto dvou předků vznikly dnešní jedlé odrůdy banánovníku, vyskytující se v různých stupních ploidie, diploidi ($2n = 2x = 22$), triploidi ($2n = 3x = 33$), tetraploidi ($2n = 4x = 44$) a v různých genomových konstitucích. Do skupiny banánovníku s genomem AAA patří kultivary Cavendish, Gross Michel, Red, Ambon, Ibota, Orotava, Rio a banánovníky východoafrické vysočiny (Lujugira/Mutika). Mezi skupinu banánovníků s genomem AAB patří podskupiny Iholena, Maoli-Popo‘ulu, Laknau, Mysore, Plantain, Pome, Silk, Pisang Nangka a Pisang Rajah. Podskupiny Bluggoe, Monthan, Ney Mannan, Saba, Pelipita, Klue Teparod či Pisang Awak pak představují triploidní banánovníky s genomovou konstitucí ABB (Daniells *et al.*, 2001). Dále budou v textu blíže charakterizovány odrůdy ekonomicky významné a hojně distribuované.

Cavendish je triploidní bezsemenná odrůda, odvozená pravděpodobně od druhu *M. acuminata banksii* a *M. acuminata malaccensis* (Perrier *et al.*, 2009). Je jednou z nejvíce pěstovaných a nejrozšířenějších odrůd. Představuje 95 % všech komerčně prodávaných banánů (FAOSTAT, 2018) neboť produkuje velké trsy s více plody, které při dozrávání žloutnou a získávají sladkou chuť. Zejména je ale tato odrůda rezistentní vůči houbovému patogenu *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, jehož tropická rasa 1 (TR1) představuje jednu z nejvážnějších hrozeb pro komerční pěstování banánovníku v Latinské Americe – tzv. panamskou nemoc. Kultivary Cavendish můžeme morfologicky rozlišit na základě jejich

výšky, od rostlin nejnižšího vzrůstu, Dwarf Cavendish, po nejvyšší Giant Cavendish (Menon, 2016).

Plody z odrůdy Gros Michel na začátku 20. století dominovaly světovému obchodu s banány. V 50. letech byla ovšem produkce zcela zničena z důvodu náchylnosti této odrůdy vůči panamské nemoci. Nahradila ji odolná odrůda Cavendish, od které se liší zelenou nebo světle růžovou barvou pseudostemu ve srovnání s červenou barvou u odrůdy Cavendish. Odrůda Gros Michel je převážně pěstována ve východní Africe, ve vyšších nadmořských výškách a je zde známa jako Bogoya. V Tanzanii je známá pod jménem Kijoge, Enjoge, Musa malaya a Ndizi (Mgenzi, 2004).

Banány východoafrické vysočiny (EAHB) patřící do podskupiny Lujugira/Mutika jsou známé také jako Matooke banány. Jejich původ je odvozen od *M. acuminata banksii* a *M. acuminata zebrina* (Perrier *et al.*, 2009). Tato odrůda je pěstována v nadmořské výšce 900–2000 m, převážně v oblasti východoafrické náhorní plošiny (Uganda, Rwanda, Burundi), kde má velice důležitou ekologickou a ekonomickou roli a zabezpečuje potravu pro místní obyvatele. Rozmanitost EAHB se odhaduje na 80 až 150 různých kultivarů (Karamura *et al.*, 2012).

Plantain banány s genomem AAB vznikly křížením druhů *M. acuminata* (poddruh *banksii*; Perrier *et al.*, 2009) a *M. balbisiana*. Tato odrůda je velmi důležitá, neboť představuje potravu pro miliony lidí v západní, centrální i jižní Africe a Latinské Americe a tvoří 23 % světové banánové produkce. Plody Plantain banánovníků jsou dlouhé, úzké, špičaté, zůstávají i po dozrání stále škrobovitě a konzumují se po uvaření, proto také bývají označovány jako „cooking bananas“ (Menon, 2016). Na základě morfologické charakteristiky květů a banánových trsů rozlišujeme 4 typy Plantain banánovníků: French, French horn, False horn a True horn (Karamura *et al.*, 2012).

Odrůda Silk (AAB) je velmi rozšířený kultivar sladkých banánů a je charakteristická specifickou sladkokyselou jablka připomínající chutí plodů. Zralé plody mají tenkou slupku a snadno se oddělují od trsu. Náchylnost k chorobám způsobených *Fusarium* vedla ke snížení pěstování této odrůdy (Menon, 2016).

Odrůda Pome (AAB) je často zaměňována se Silk banány, neboť plody mají stejnou sladkokyselou chuť připomínající jablka, nicméně se liší stavbou květu. Tato odrůda je právě kvůli chuti oblíbená v Indii a Brazílii (Menon, 2016).

Podskupina Iholena (AAB) byla domestikována v oblasti Pacifiku, proto jsou také tyto banánovníky známé jako Pacifické plantainy. Přesto, že jsou v dnešní době v měřítku celosvětové produkce jen velmi málo zastoupeny, na Havaji jsou to nejběžněji pěstované banány. Pro Iholena banánovníky je typická fialová nebo měděná barva spodní strany nových rozvíjejících se listů a žluto-oranžová barva ovoce způsobena vysokým obsahem karotenoidů (Ploetz *et al.*, 2007).

Pisang Awak (ABB) tvoří v Thajsku 70 % všech pěstovaných banánů. V případě opylení tvoří semena, ale pokud k opylení nedojde, produkuje bezsemenné plody. Tato odrůda je velmi odolná proti suchu, ale náchylná k panamské nemoci (TR1; Ploetz *et al.*, 2007).

Bluggoe (ABB) plodí velké plody na dlouhých stopkách, vyznačující se výbornou chutí. Různé kultivary se od sebe liší postavením, velikostí trsu a typem slupky (Ploetz *et al.*, 2007).

Odrůda Saba, široce rozšířena na souostroví Filipín, s genomem ABB byla dříve klasifikována jako BBB. Samčí květy jsou konzumovány jako zelenina (De Langhe, 2010).

Indie je největším centrem diverzity pro odrůdu Monthan, vyznačující se charakteristickým oválným tvarem ovoce (Ploetz *et al.*, 2007).

U všech triploidních kultivarů s genomovým složením ABB se jako nejpravděpodobnější donor genomu A uvádí *M. acuminata* ssp. *banksii*. U kultivaru Pisang Awak není rodičovský podíl poddruhů natolik jasný a uvádí se navíc také poddruh *malaccensis* (Perrier *et al.*, 2009).

3.2 Genom banánovníku

Jednou ze základních charakteristik druhu je velikost jaderného genomu. Jaderný genom banánovníku je poměrně malý, 1C ~ 600 Mbp (Doležel *et al.* 1994; Bartoš *et al.*, 2005; Čížková *et al.* 2013). Předchozí studie ukázaly, že zhruba 55 % genomu je tvořeno různými typy retroelementů (Hřibová *et al.*, 2007). Retroelementy jsou repetitivní DNA sekvence a jako takové jsou považovány za jedinečný zdroj molekulárních markerů pro analýzu genetické diverzity a rozlišení mezi úzce příbuznými druhy a podruhy.

Karyotyp, který je charakterizován počtem a morfologií chromozomů, je další důležitou charakteristikou druhu. Jaderný genom banánovníku je tvořen morfologicky velmi podobnými chromozomy o velikosti 1–2 μm , což znesnadňuje cytogenetické studie, které byly navíc brzděny nedostatkem vhodných cytogenetických markerů (Bartoš *et al.*, 2005). Podařilo se cytogeneticky zamapovat 45S rDNA a 5S rDNA lokus u několika druhů (Osuji *et al.*, 1997; Doleželová *et al.*, 1998; Bartoš *et al.*, 2005), také několik dlouhých terminálních repetitiv (LTR; Balint-Kurti *et al.*, 2000), tandemové repetice (Čížková *et al.*, 2013) a jeden BAC klon (Hřibová *et al.*, 2008).

Bartoš *et al.* (2005) rozšířil dostupné znalosti o jaderném obsahu DNA v rámci jednotlivých sekcí. Metoda průtokové cytometrie ukázala, že 2C jaderný obsah DNA zástupců sekce Eumusa ($x = 11$) se pohybuje v rozmezí 1,130–1,377 pg, u sekce Rhodochlamys ($x = 11$) pak mezi 1,191–1,299 pg. Druhy náležící k sekci Australimusa ($x = 10$) měly 2C jaderný obsah DNA mezi 1,435 a 1,547 pg. Zástupce sekce Callimusa ($x = 9, 10$), *M. beccarii*, měl nejvyšší změřený 2C jaderný obsah DNA 1,561 pg.

Většina genomových sekvencí má funkční význam, proto se vědci snaží o sekvenování celého genomu. Znalost genomu umožňuje například šlechtěním rostlin zvýšit jejich rezistenci proti škůdcům a chorobám. D'Hont *et al.* (2012) a Martin *et al.* (2016) provedli studie, které měly za cíl zlepšit znalosti genomu banánovníku. Pomocí moderních sekvenačních metod a bioinformatických nástrojů, sestavili značnou část sekvence genomu *M. acuminata*, konkrétně kultivaru DH-Pahang, přičemž velikost tohoto genomu je odhadována na 523 Mbp. Do scaffoldů se podařilo seskládat 86 % odhadované celkové velikosti genomu, což odpovídá 450,7 Mbp. Pomocí genetických markerů seřadili 376 scaffoldů do 11 pseudomolekul, představujících 11 chromozomů *M. acuminata*. V těchto chromozomech je lokalizováno 34 629 genů z celkových 35 276. Martin *et al.* (2016) také

snížili původní velikost celkové assembly o 21,5 Mb, ve srovnání s údaji uváděnými v první studii (D'Hont *et al.*, 2012). Toto snížení velikosti je způsobeno zejména přesnějším skládáním některých repetitivních úseků, identifikaci částí původně neskládaných oblastí (zejména rDNA) a jejich zařazením do celkové sekvence genomu.

První celogenomová sekvenční data byla již publikována také pro druhy *M. balbisiana* (Davey *et al.*, 2013) a *M. itinerans* (Wu *et al.*, 2016).

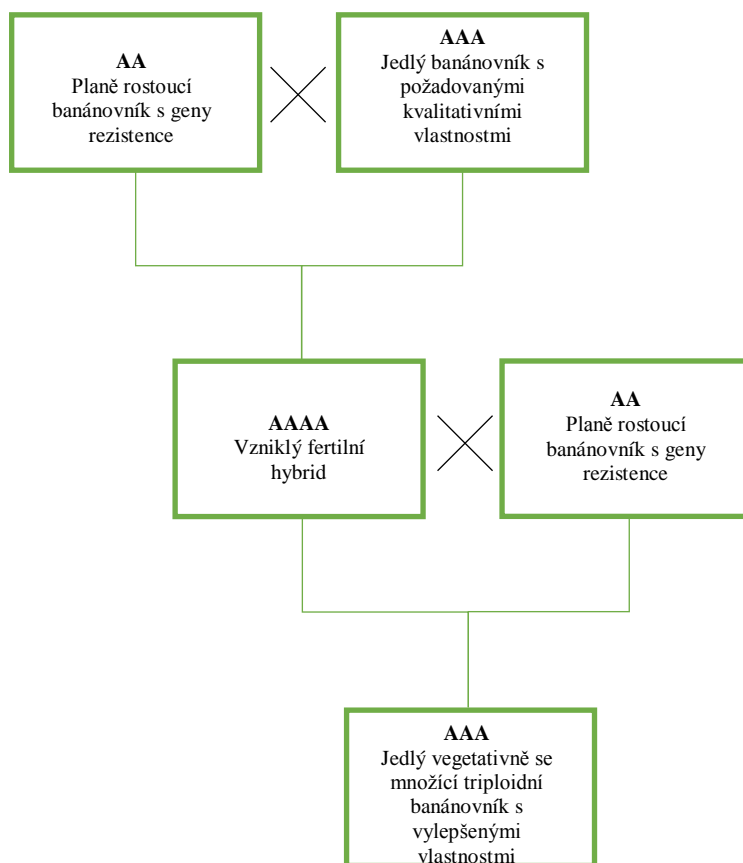
3.3 Genetická diverzita banánovníku a šlechtění nových odrůd

Přesto, že se zvyšuje dostupnost sekvenčních a molekulárních dat, a tudíž jsme schopni blíže porozumět struktuře a evoluci genomu banánovníku, šlechtění odolnějších odrůd zůstává poměrně komplikované. Fakt, že je banánovník partenokarpická rostlina a většinou jako triploidní jedlý druh také sterilní, komplikuje použití tradičních šlechtitelských a selekčních postupů, které jsou jinak běžně aplikované u ostatních plodin. Z tohoto důvodu je důležité zaměřit se také na studium diverzity banánovníku a prozkoumání potenciálních genových zdrojů v široké populaci planě rostoucích i v genových bankách uchovávaných rostlin. Právě z nich lze totiž získat zdroj potenciálně vhodných vlastností, použitelných při šlechtění nových odrůd s vylepšenými charakteristikami (Manzo-Sánchez *et al.*, 2015).

K podrobnému zmapování rozmanitosti a genetické diverzity rostlin slouží biotechnologické techniky a DNA markery. Kombinace genomů A a B u banánovníku definuje agronomické atributy, jakou jsou výnos, odolnost vůči biotickým faktorům, kvalita ovoce a kvalita celých hybridních rostlin. Navíc znalosti genetické rozmanitosti a genetických vztahů mezi planými a kultivovanými druhy pomohou vyvinout nové metody pro šlechtění a dlouhodobé ochranné strategie (Oselebe *et Tenkouano*, 2009).

Ochrana rostlin je velice důležitá z toho důvodu, že při pěstování klonů dochází k rychlému šíření chorob (např. zmíněné panamské choroby) a tím ke ztrátě úrody. Použití fungicidů není dobrým dlouhodobým řešením, neboť zamořují půdu a znečišťují prostředí. Naděje na ochranu banánovníků, se ale naskýtá ve šlechtění rezistentních odrůd.

Ve šlechtění banánovníků rozlišujeme tradiční a nové přístupy. Postupy tradičního šlechtění zahrnují minimálně dva kroky křížení a tím kombinují výhodné vlastnosti rodičovských druhů. Výchozím bodem je tedy výběr vhodných rodičů, kterými jsou jednak jedlý banánovník s požadovanými kvalitativními charakteristikami plodů (většinou triploid) a diploidní planě rostoucí banánovník jako nositel rezistence či lepších vlastností z hlediska odolnosti vůči faktorům prostředí. Nicméně z důvodu vysoké sterility triploidních jedinců je velmi obtížné z křížení semena získat. Z celého trsu banánů je získáno jen několik málo semen, které jsou schopny vyklíčit. V prvním kroku je potřeba zkřížit diploidní druh (např. často používaný kultivar *M. acuminata* Calcutta 4; genom AA) s jedlým triploidním klonem (např. AAA), přičemž vznikne tetraploidní jedinec s jednou sadou chromozomů od diploida a třemi sadami od triploida. V dalším kroku je vzniklý fertillní tetraploidní hybrid křížen s diploidem za vzniku triploida s vylepšenými vlastnostmi (obrázek 3).



Obrázek 3: Schématické znázornění šlechtění triploidních druhů.

Další možností, jak vyšlechtit triploidní klony tradiční metodou je hybridizace tetraploidního rodiče s diploidním druhem nesoucím žádané vlastnosti. Hybridizaci však

v tomto případě předchází získání tetraploidního druhu zdvojením genetické informace druhu diploidního (Hřibová, 2016).

Prvním krokem v nových přístupech šlechtění je ověření požadované ploidie hybridního klonu banánovníku, k čemuž se nejčastěji využívá průtoková cytometrie. Dále je potřeba ověřit, zda vzniklí hybridi budou odolní vůči chorobám, škůdcům, stresu a zda budou plodit dostatečné množství plodů. Zjištění těchto vlastností vyžaduje spoustu času, proto se pomalu začínají prosazovat molekulární metody, které by umožnily ověřit tyto vlastnosti už v rané fázi vývoje rostliny (Hřibová, 2016).

K tomu, aby mohli šlechtitelé pokračovat nebo pokročit ve šlechtění nových odolnějších odrůd banánovníku, je velmi podstatné dobře charakterizovat dosud dostupné zdroje genetické rozmanitosti, které by mohly být pro šlechtění využitelné. K těmto účelům slouží genové banky, které mimo jiné pomáhají mapovat a uchovat genetickou diverzitu druhu.

3.4 Uchování genetické diverzity

U divokých a domestikovaných příbuzných kulturních rostlin existuje velká genetická rozmanitost, avšak většina této rozmanitosti se nenachází v aktivních šlechtitelských programech, ale v genových bankách. Genové banky jsou repositáři pro plané a domestikované druhy (Harlan *et de Wet*, 1971). Mají za úkol shromažďovat, dokumentovat a uchovávat jednotlivé položky reprezentující diverzitu daného druhu. Například projekt Svalbard Global Seed Vault je největším bezpečným uložištěm semen na světě nacházejícím se v permafrostu 1 300 km severně od arktického kruhu (Foyer *et al.*, 2016).

V současnosti existují genové banky pro mnoho rostlinných druhů (např. obilniny, luskoviny, píce, zeleninu, olejniny, aromatické a léčivé rostliny a květiny), včetně banánovníku. Bioversity International *Musa* Germplasm Transit Centre (ITC) je genová banka založena roku 1984 a obsahuje největší sbírku banánového genofondu na světě. Jejím úkolem je přispět k bezpečnému dlouhodobému zachování celého genofondu čeledi *Musaceae*. Ve sbírce, která je umístěna na Katolické Univerzitě v Lovani v Belgii (KU Leuven) je dosud více než 1 500 jedlých i planých druhů banánů. Tyto položky jsou

udržovány *in vitro* za pomalých růstových podmínek při teplotě 16 °C. Z důvodu bezpečnosti je stejný soubor vzorků uchován také tzv. kryokonzervací, tj. zmražením tekutým dusíkem při teplotě -196 °C. Tato metoda umožňuje neomezené uchování rostlinného materiálu. Zmrazená sbírka banánových položek je zduplikovaná a uložena v Institut de recherche pour le développement (IRD) v Montpellier ve Francii (<https://www.bioversityinternational.org/banana-genebank>).

Detailní informace o položkách uložených v genové bance i některých polních sbírkách banánovníku shrnuje *Musa* Germplasm Information System (MGIS). Poskytuje inventář *ex situ* kolekce rodu *Musa*, informace o taxonomii, agronomické produkci kultivarů v různém prostředí, molekulární charakterizaci, zdravotním stavu a původu. MGIS může také spolupracovat s geografickým informačním systémem (GIS). Díky tomuto spojení je možné konstruovat mapy znázorňující distribuci banánové diverzity (Kole, 2011).

Genové banky a informace o jednotlivých položkách v nich uložených, pomáhají udržet genetickou rozmanitost dostupných zdrojů a jsou velmi důležité při vytvoření účinné strategie pro šlechtění nových odrůd banánů. Hlavní cíle a prostředky pro zachování rozmanitosti rodu *Musa* byly formulovány v Globální konzervační strategii pro *Musa* (INIBAP 2016).

Všechny položky nacházející se v depozitáři musí být jednoznačně charakterizovány a kontrolovány, nesmí obsahovat žádné patogeny, jako bakterie, plísňe a viry. K zajištění takové kontroly materiálu v genové bance banánovníku (ITC kolekci) slouží tzv. virus-indexing, což je standardizovaný postup pro testování přítomnosti patogenů a jejich případnou eliminaci (De Clerck *et al.*, 2017) a je prováděn v Austrálii (Queensland Department of Agriculture and Fisheries, Brisbane) pod záštitou Bioversity International. Jednotlivé položky jsou dále charakterizovány na základě původu, morfologie a přesného genomového složení, pokud je známo (Hřibová *et al.*, 2016). Další ze základních charakteristik kultivarů banánovníku je stanovení stupně ploidie pomocí průtokové cytometrie, což je prováděno v rámci spolupráce mezi Bioversity International a Ústavem experimentální botaniky AV ČR, v.v.i. v Olomouci. Zde bylo také v roce 2011 založeno *Musa* Genotyping Centre (MGC), v němž jsou jednotlivé položky genové banky banánovníku prověřovány a rovněž jím prochází položky nově do ITC kolekce zaváděné. Součástí práce MGC je také charakterizace položek na úrovni DNA pomocí vybraných molekulárních markerů.

3.5 Moderní molekulární metody pro genotypování

Koncept genetických markerů se objevil již v 19. století, kdy Gregor Mendel ve svém experimentu použil genetické markery založené na fenotypu. Tyto genetické markery založené na fenotypu *Drosophily melanogaster* později vedly k zavedení teorie genetické vazby. Nicméně fenotypové genetické markery nebyly dokonalé a nesly s sebou řadu omezení. Proto byly vyvinuty obecnější a užitečnější přímé markery na bázi DNA, tzv. molekulární markery. Molekulární marker je definován jako konkrétní segment DNA, který reprezentuje rozdíly na úrovni genomu, je stabilní a detekovatelný ve všech tkáních bez ohledu na růst, diferenciaci, vývoj nebo obranný stav buňky, pleiotropickými a epistatickými účinky (Agarwal *et al.*, 2008).

V dnešní době se rutinně využívají především genetické nebo na DNA založené markerové techniky, jako je RFLP (polymorfismus délek restričních fragmentů), RAPD (náhodně amplifikovaná polymorfni DNA), SSR (jednoduché repetitivní sekvence) a AFLP (polymorfismus délek amplifikovaných fragmentů), SNPs (polymorfismus jednotlivých nukleotidů; Agarwal *et al.*, 2008). Na molekulárních markerech založená metoda by měla splňovat určitá kritéria: (1) poskytovat vysoce polymorfni markery rovnoměrně rozložené v celém genomu, (2) zajistit přiměřené rozlišení genetických rozdílů, (3) zajistit vysokou četnost a reprodukovatelnost markerů, (4) být jednoduchá, rychlá a levná (5) vystačit s malým množstvím vzorků pletiv a DNA, (6) mít případně vazbu na odlišné fenotypy (Agarwal *et al.*, 2008).

Techniky se vzájemně liší vzhledem k důležitým vlastnostem, jako je četnost výskytu v genomu, zjištěná úroveň polymorfismu, specifita, reprodukovatelnost, technické požadavky a náklady (tabulka 1).

Tabulka 1: Porovnání vybraných aspektů nejčastěji používaných molekulárních markerů.

	RFLP	RAPD	SSR	AFLP
Princip	hybridizace	PCR	PCR	PCR
Reprodukovatelnost	vysoká	nízká	střední	vysoká
Stupeň polymorfismu	střední	střední	střední	střední
Specifita lokusu	ano	ne	ne	ne
Technické požadavky	vysoké	nízké	střední	střední
Nároky na vstupní množství DNA [μg]	10	0,02	0,05	0,5–1

V posledních letech se objevila nová třída pokročilých technik, využívající mikročipy. Díky nim je možné studovat a profilovat celé genomy a také je vzájemně srovnávat mezi sebou (Lamy *et al.*, 2011).

Základní metody pro genotypování mohou být rozděleny do dvou kategorií:

1. Techniky založené na hybridizaci (RFLP)
2. Techniky založené na PCR (RAPD, AFLP, SSR, SNPs)

V metodě RFLP se využívá restriční endonukleázy, která naštěpí příslušný vzorek DNA na různě dlouhé fragmenty. Po elektroforetické separaci jsou DNA fragmenty pomocí southern blotu přeneseny na membránu a detekovány chemicky značenou DNA sondou, která hybridizuje s jedním nebo více fragmenty DNA. Metoda také umožňuje simultánní zobrazení mnoha vzorků. RFLP markery jsou přítomné v celém rostlinném genomu, vyznačují se vysokou heritabilitou a lokusovou specifitou. Také jsou relativně vysoce polymorfní, děděné kodominantně a vysoce reprodukovatelné. Tato technika není příliš používána, protože je časově náročná, zahrnuje nákladná a radioaktivní nebo toxická činidla a vyžaduje velké množství vysoce kvalitní genomové DNA (Williams, 1989).

Techniky založené na PCR mohou být dále rozděleny do dvou podkategorií:

1. Sekvenčně nescifické techniky (RAPD, AFLP)
2. Sekvenčně specifické metody založené na PCR (SSR, SNPs)

Základem metody RAPD je diferenciální PCR amplifikace genomové DNA, pomocí krátkých nespecifických 10-nukleotidových primerů. Primery buď amplifikují nebo neamplifikují segment DNA v závislosti na úseku, který je komplementární k sekvenci primerů. Například pokud dojde k mutaci v templátové DNA v úseku, který byl komplementární k sekvenci primerů, žádný PCR produkt nevznikne (Williams *et al.*, 1991). Tato metoda může být použita u všech druhů za použití univerzálních primerů, neboť nevyžaduje předchozí znalost analyzovaného genomu. Hlavní nevýhodou metody je, že reakční podmínky (koncentrace templátové DNA, koncentrace reakčních složek, podmínky PCR reakce), se v rámci různých laboratoří liší, proto mohou být odlišné i výsledky. Další nevýhodou je, že téměř všechny markery RAPD jsou dominantní a z toho důvodu nelze rozlišit heterozygotní od homozygotních jedinců (Bardakci, 2001).

AFLP metoda kombinuje prvky metody RFLP a PCR a umožňuje analyzovat polymorfismus v celkové genomové DNA bez předchozích znalostí DNA sekvence. V prvním kroku je DNA štěpena restrikcími enzymy na fragmenty, ke kterým jsou následně ligací připojeny oligonukleotidové adaptory. Při PCR reakci se využívají specifické AFLP-primery, pomocí kterých dochází k amplifikaci fragment-adaptor molekul. Páry primerů používané pro AFLP obvykle produkují 50 až 100 PCR produktů na jeden test. Nakonec jsou vzniklé fragmenty elektroforézou rozděleny podle délky (Paun *et al.*, 2012). Většina fragmentů AFLP odpovídá jedinečným pozicím na genomu, a proto může být využívána jako orientační body v genetickém a fyzickém mapování, při studiu procesů v populacích nebo k odlišení úzce příbuzných jedinců na úrovni poddruhů (Althoff *et al.*, 2007).

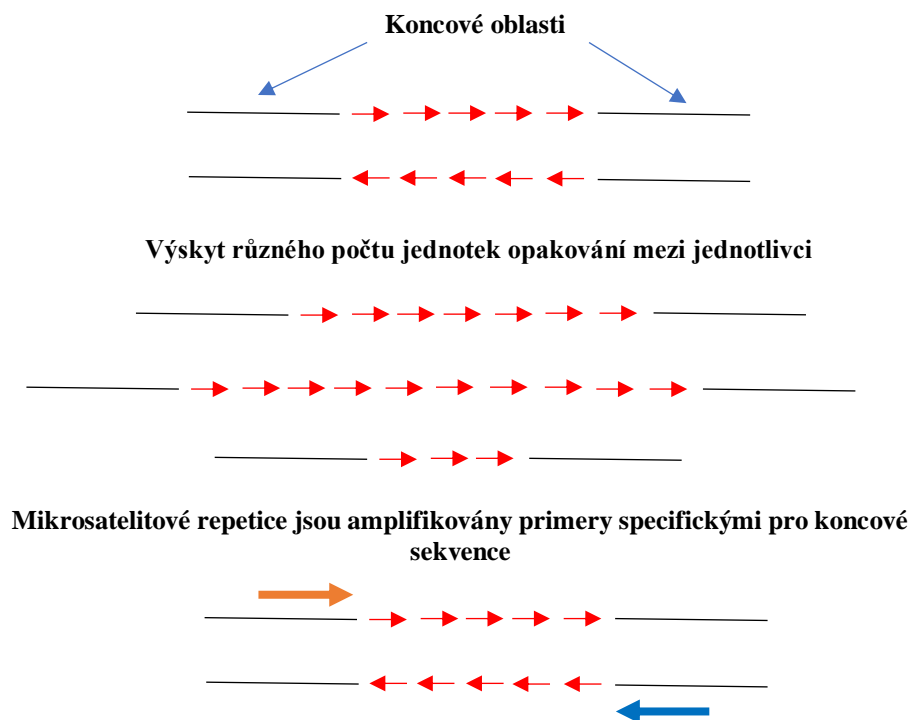
Při studiu genetické diverzity banánovníku se využívají všechny již zmíněné metody, avšak každá s sebou nese určitou nevýhodu. Proto byly navrženy sekvencně specifické molekulární markery jako jsou mikrosatelity neboli jednoduché repetitivní sekvence (SSR), které překonávají výše uvedené metody v mnoha aspektech (reprodukovatelnost, vysoká úroveň polymorfismu, kodominantnost, snadnost použití; Christelová *et al.*, 2011).

SSR jsou nekódující opakující se DNA oblasti tvořené tandemově opakujícími se motivy o délce 1–6 bp. Jsou přítomny v celém genomu jedince jak v kódujících, tak nekódujících oblastech. V oblastech genů, je ale jejich výskyt nižší, neboť podléhají mutacím, což by mohlo ohrozit genovou expresi. Jejich koncové oblasti jsou obvykle vysoce

konzervativní a jsou tudíž využívány pro navržení sekvenčně specifických primerů (obrázek 4). „V posledních letech bylo prokázáno, že mikrosatelity mají mnoho důležitých biologických funkcí, například regulaci organizaci chromatinu, metabolických procesů DNA, genové aktivity a struktury RNA“ (Ekué *et al.*, 2009). Tyto markery jsou hojně využívány v konzervační genetice, šlechtění rostlin, mapování genů, srovnávací genomice a fylogenetických studiích.

Polymorfismus pozorovaný u SSR je výsledkem změny v počtu tandemově opakovaných jednotek, způsobené zejména sklouznutím řetězce při replikaci DNA nebo chybami rekombinace (Schlotterer *et Tautz*, 1992). Sklouznutí v replikaci je pravděpodobnější než bodové mutace, mikrosatelitové lokusy mají tedy tendenci být hypervariabilní.

Dnes používané metody, využívající SSR markery pro detekci polymorfismu zahrnují dva hlavní kroky: (1) amplifikace cílové sekvence nesoucí polymorfismus, nejčastěji pomocí PCR metody, (2) detekce pomocí kapilární nebo gelové elektroforézy (Hayden *et al.*, 2008). Při PCR amplifikaci se používají buď neznačené páry primerů, jejichž PCR produkty jsou následně analyzovány na polyakrylamidových nebo agarózových gelech. Další možností je použití páru primerů s radioaktivním nebo fluorescenčním značením, což vylepšuje kapacitu a automatizaci (Wenz *et al.*, 1998). Avšak tato analýza může být až několikanásobně nákladnější než použití neznačeného primeru. Schuelke (2000) představil nový, jednodušší a levnější postup, ve kterém jsou použity tři primery pro amplifikaci definovaného mikrosatelitního lokusu: sekvenčně specifický přímý primer na 5'konci prodloužený o univerzální nukleotidovou sekvenci komplementární k univerzálnímu primeru M13, sekvenčně specifický reverzní primer M13 a univerzální fluorescenčně značený primer M13. Díky tomu, že je SSR analýza založená na PCR metodě, dojde při jedné reakci k amplifikaci velkého množství markerů a tím ke zvýšení množství informací, proto je za potřebí pouze malého množství DNA a v neposlední řadě dojde i ke snížení nákladů (Yamamoto *et al.*, 2002).



Obrázek 4: Schématické zobrazení metody založené na mikrosatelitových repeticích (převzato s úpravami z Agarwal *et al.*, 2008).

Jednotlivé nukleotidové variace (SNP) genomové sekvence jedinců vznikají záměnou jednoho nukleotidu a představují tak nejhojnější formu genetické variability. Jsou také široce používány jako molekulární markery distribuované v celém genomu jedince, ačkoli se jejich výskyt a distribuce může mezi druhy značně lišit. Například kukuřice má 1 SNP na 60–120 bp (Ching *et al.*, 2002), zatímco člověk 1 SNP na 1000 bp (Sachidanandam *et al.*, 2001). SNP markery jsou vhodné pro automatizaci, k rychlé identifikaci kultivarů a konstrukci vysoko-hustotních genetických map (Agarwal *et al.*, 2008).

Pro SNP genotypování bylo vyvinuto množství metod od starších až po ty dnes používané nejmodernější metody, jako například hybridizace na mikročipech. Genotypovací metody aplikované v celé řadě studií vyžadují dva hlavní kroky: (1) alelová diskriminace – určení typu báze přítomného v daném SNP lokusu, (2) detekce signálu (Twyman, 2005). SNP můžeme v genomu detekovat buď sekvenčně nespecificky, což je založeno na odlišné mobilitě DNA molekul lišící se o nukleotid nebo sekvenčně specificky, kdy alely můžeme rozlišit: alelově specifickou hybridizací, alelově specifickým prodlužováním primerů, alelově specifickou ligací oligonukleotidů, alelově specifickým invazivním štěpením (Crhák, 2007).

Následný signál může být detekován pomocí metod využívající fluorescenční značky, hmotnostní spektrometrii a metodou pyrosekvenování (Twyman, 2005).

3.6 Využití SSR u *Musaceae*

Molekulární markery jsou široce používanou metodou pro genotypování, neboť umožňují mapování genů, identifikaci odrůd a rozlišení mezi druhy už v raných fázích vývoje rostliny. Tato metoda může být také využita ke studiu variability genetického materiálu pěstovaných plodin, umožňuje provést srovnání mezi položkami v rámci sbírek a pomoci tak při jejich efektivním využití. Z těchto důvodů byly Lagodou *et al.* v roce 1998 vyvinuty mikrosatelitní markery pro čeleď *Musaceae* a navrženy primery pro 47 specifických lokusů. Crouch *et al.* (1998) se ve svém výzkumu také zaměřili na využití a vývoj SSR markerů u *Musaceae* a vyvinuli primery pro dalších 24 mikrosatelitních lokusů. V rámci další studie Crouch *et al.* (1998) provedl oligonukleotidový screening genomové knihovny *Musa acuminata*, přičemž bylo zjištěno, že většina SSR markerů vychází z dinukleotidových repetit (například GA, CT, GA). Trinukleotidové a tetranukleotidové repetice se u rodu *Musa* vyskytovaly s podstatně nižší frekvencí. Autoři obou studií dospěli k závěru, že mikrosatelity jsou spolehlivé markery pro genetickou analýzu a pro použití ve šlechtění nových odrůd. V následujících letech se další a další autoři (například Creste *et al.*, 2003; Miller *et al.*, 2010) zabývali charakterizací banánových kultivarů s použitím specifických mikrosatelitních lokusů. Hipollyte *et al.* (2012) určili nejpravděpodobnější diploidní předky některých dnes pěstovaných triploidních kultivarů (např. Cavendish, Gros Michel, Pome). Ke studiu použili stejnou SSR genotypovací platformu 22 markerů, která je používána ke genetické analýze a klasifikaci genofondu *Musa* v této práci. De Jesus *et al.* (2013) použili SSR lokusy jako kodominantní markery ke studiu populační struktury více jak 220 položek z Embrapa *ex situ* sbírky banánovníku. V rámci studie Kitavi *et al.* (2016) bylo 100 SSR markerů použito ke genotypování 90 fenotypově odlišných kultivarů banánovníků východoafrické vysočiny a byla zjišťována jejich genetická a morfologická rozmanitost, příbuznost s ostatními podskupinami *Musa* a změny velikosti EAHB populace v průběhu evoluce.

Využitím SSR markerů u *Musaceae* se také zabývala autorka Christelová *et al.* (2011), jejichž studie měla za cíl vytvořit a standardizovat protokol pro klasifikaci genofondu *Musa*. V této studii bylo na množině banánových genotypů testováno a optimalizováno využití 22 publikovaných SSR markerů (Lagoda *et al.*, 1998; Crouch *et*

al., 1998; Hippolyte *et al.*, 2010). Z původních 22 markerů bylo vybráno 19 pro jejich jasné reprodukovatelný amplifikační profil a popsany genotypovací systém představuje nový standard pro molekulární charakterizaci položek v genové bance banánovníku.

Tento projekt, který stále pokračuje a jehož součástí je i tato bakalářská práce, má za cíl s využitím SSR genotypovací platformy, postupně analyzovat a ověřit zařazení všech položek genové banky *Musa* ITC. Doposud se pomocí průtokové cytometrie (pro ověření ploidie) a SSR markerů podařilo analyzovat 660 položek z celkových více než 1500. Jednotlivé položky jsou klasifikovány na základě morfologických znaků, základního chromozomového čísla a na molekulární úrovni, což umožňuje například odhalit somatické mutace nebo identifikovat duplicitní a špatně zařazené položky. Všechny položky byly zařazeny do 13 klastrů (tabulka 2).

Výsledky molekulární charakterizace provedené v rámci tohoto projektu jsou zásadní pro řízení a zachování globální sbírky genetického materiálu u rodu *Musa* a poskytují podrobný obraz o genetické diverzitě banánovníku. Výsledky také představují pomyslný odrazový můstek pro další molekulární a morfologické analýzy dosud méně známých skupin.

Tabulka 2: Klastrování jednotlivých skupin čeledi *Musaceae* (převzato s úpravami od Christelová *et al.*, 2017).

Název skupiny	Číslo klastru
<i>M. acuminata</i> ssp. <i>burmannica</i>	I
AA cv. Pisang Jari Buaya	I
Rhodochlamys	II
<i>M. acuminata</i> ssp. <i>sumatrana</i>	III
<i>M. acuminata</i> ssp. <i>malaccensis</i>	III
AAA Ibota	III
AA cv. ISEA 1	III
Callimusa – Australimusa complex	IV
<i>M. schizocarpa</i>	V
<i>M. ornata</i>	VI
<i>M. itinerans</i>	n/a
ABB Klue Teparot	VII
<i>M. balbisiana</i>	VII
AAB Mysore	VIII
ABB P. Awak	VIII
AB Ney Poovan	VIII
AB Kunnan	VIII
AAB Silk	VIII
AAB Pome	IX
AA cv. P. Tongat	IX
AA cv. IndonTriNG	IX
AAA Red	IX
AAA Hetero (Ambon, Rio, Orotava)	IX
AAA Cavendish	IX
AA cv. African	IX
AAA Gros Michel	IX
AA cv. ISEA 2	IX
AAA Lakatan	IX
AAA Umg Bir	X
AAA Mutika/Lujugira	X
AA cv. P. Sapon	X
<i>M. acuminata</i> ssp. <i>zebrina</i>	X
AA cv. IndonTriPh	X
<i>M. acuminata</i> ssp. <i>microcarpa</i>	X
AxS	X
ABB P. Kepok	X
AB Raja Batu	X
AAB P. Raja(h)	X
AA cv. <i>banksii</i> sensu lato	XI
<i>M. acuminata</i> ssp. <i>banksii</i>	XI
AA cv. <i>banksii</i> derivatives	XI
ABB Saba	XII
ABB Bluggoe–Monthan	XII
AAB Maoli–Popo’ulu	XII
AAB Plantain–linked	XIII
AAB Plantain	XIII

4 Materiál a metody

4.1 Rostlinný materiál

Veškerý analyzovaný rostlinný materiál pocházel z International *Musa* Germplasm Transit Centre v Lovani (ITC kolekce). Jednotlivé položky banánovníků (čeleď *Musaceae*) byly doručeny jako *in vitro* zakořeněné rostliny, pro každou položku 4 až 5 rostlin. Každá takováto položka pocházející z genové banky byla označena ITC kódem a názvem položky (příloha 1).

4.2 Použité chemikálie, soupravy a roztoky

4.2.1 Použité chemikálie

- agaróza (VWR Life Science, kat. č. 232-731-8)
- bromfenolová modř (Sigma-Aldrich, kat. č. 263-653-2)
- DAPI (LifeTechnologies, kat. č. D21490)
- dNTP set 100 mmol·l⁻¹ (VWR Life Science, kat. č. 733-1364)
- dodecylsíran sodný (Sigma-Aldrich, kat. č. 436143-100G)
- ethidium bromid (Sigma-Aldrich, kat. č. 214-984-6)
- etylalkohol – 96 % roztok (Lach-Ner, s.r.o., 603-002-00-5)
- Formamide HiDi™ (ThermoFisher Scientific, kat. č. 4311320)
- glycerol – 99,9 % roztok (Sigma, kat. č. 200-289-5)
- hydrogenfosforečnan sodný dodekahydrát (Lachner, kat. č. 30061-AP0)
- kyselina boritá (Lach-Ner, s.r.o., kat. č. 005-007-00-2)
- kyselina citronová monohydrát (Lachner, kat. č. 10020-AP0)
- Lambda DNA 500 µg·ml⁻¹ (bioLabs, kat. č. N3011S)
- LIZ standard GeneScan™ 500 (ThermoFisher Scientific, kat. č. 4322682)
- octan sodný trihydrát 3 mol·l⁻¹ (Lachner, kat. č. 40122-AP0)
- 5' značené primery 6-FAM-M13, VIC-M13, NED-M13, PET-M13 (syntetizováno ThermoFisher Scientific, kat. č. 450006)
- *Taq* DNA polymeráza 5000 U·ml⁻¹ (New England BioLabs, kat. č. M0273X)
- *Taq* pufr – 10x Standard (New England BioLabs, kat. č. M0273X)
- Trizma® base (Sigma-Aldrich, kat. č. 201-064-4)
- Tween 20 (Sigma-Aldrich, kat. č. P9416)

- xylenecyanol (Sigma-Aldrich, kat č. 220-167-5)

4.2.2 Použité soupravy

- NucleoSpin® Plant II kit (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, kat. č. 740770.250)

4.2.3 Použité roztoky a jejich příprava

- OTTO I: 4,2 g $0,1\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ kyseliny citronové monohydrátu, 1 ml 0,5% Tween 20, doplnit do 200 ml destilovanou vodou. Filtrovat přes $0,22\mu\text{m}$ filtr. Uchovávat v lednici.
- OTTO II: 28,65 g $0,4\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ hydrogenfosforečnanu sodného dodekahydrátu doplnit asi do 150 ml destilované vody. Filtrovat přes $0,22\mu\text{m}$ filtr. Přidat 10 ml zásobního roztoku DAPI. Doplnit do 200 ml destilovanou vodou. Uchovávat v tmavé láhvi při pokojové teplotě.
- DAPI ($0,1\text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$): 5 mg DAPI rozpustíme v 50 ml destilované vody. Míchat asi 60 minut, filtrovat přes $0,2\mu\text{m}$ filtr. Skladovat ve tmě při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- 5x TBE (pH 8): 54 g $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris base, 27,5 g kyseliny borité, 20 ml $0,5\text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ EDTA rozpustit v 1 000 ml destilované vody.
- $1\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris base (pH 8): 12,11 g Tris base rozpustit v 80 ml destilované vody, pH upravovat koncentrovanou HCl.
- $0,5\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ EDTA (pH 8): 18,61 g chelatonu 3 dihydrátu rozpustit v 80 ml vody, pH během rozpouštění upravovat NaOH (asi 2 g na 100 ml), autoklávovat.
- 6x STOP C: 2 ml $0,5\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ EDTA, 1 ml 10% SDS, 5 mg 0,05% bromfenolové modři, 5 mg 0,05% xylenecanolu, 5 ml 0,85% glycerolu, doplnit do 10 ml destilovanou vodou.
- Ethidium bromid ($0,5\text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$): 5 mg ethidium bromidu rozpustit v 10 ml destilované vody. Skladovat ve tmě.

- Octan sodný trihydrát ($3 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, pH 5,2): 40,82 g rozpustit ve 100 ml destilované vody. pH upravovat koncentrovanou kyselinou octovou.

4.3 Seznam použitých přístrojů a zařízení

- centrifuga CR 4i (Jouan)
- elektroforetická komůrka OWL A6 (ThermoScientific)
- genetický DNA analyzátor 3730x1 (Applied Biosystems)
- gradientový termocycler C1000 Touch (Bio-Rad)
- homogenizátor MM 301 (Retsch)
- laboratorní váhy Vibra AJ (Shinko Denshi)
- laminární box LaminAir (ThermoScientific Holten)
- lyofilizátor Heto Dry Winner (Jouan)
- minicentrifuga PlateFuge (Benchmark Scientific)
- průtokový cytometr CyFlow Space (Sysmex-Partec)
- UV transluminator InGenius (Syngene)
- vodní lázeň J 18 Bain Univ (Jouan)
- vortex Genius 3 (IKA®)
- vortex Reax control (Heidolph)
- zdroj napětí EC 300XL (ThermoScientific)

4.4 Software

- GeneMarker® (Softgenetics, LLC, State College, PA, USA)
- GeneSnap V 7.07 (Syngene, Synoptics, Cambridge, Velká Británie)

4.5 Metodika

4.5.1 Měření stupně ploidie

Stupeň ploidie byl měřen metodou průtokové cytometrie pomocí průtokového cytometru Sysmex-Partec CyFlow Space u každé z pěti rostlinek všech analyzovaných položek. Zhruba 1cm segment z mladého listu banánovníků bylo nasekáno žiletkou ve skleněné Petriho misce s 500 μl roztoku Otto I. Vzniklý homogenát byl přefiltrován přes

nylonový filtr do kyvety. K suspenzi byly přidány jádra kuřecích erytrocytů (připravené podle Galbraith *et al.*, 1998) sloužící jako referenční standard. Po 30-minutové inkubaci při pokojové teplotě byl přidán 1 ml roztoku Otto II. Následovala analýza na průtokovém cytometru. Stupeň ploidie položek banánovníku byl stanoven na základě poměru pozic píků jader kuřecích erytrocytů a jader vzorků.

4.5.2 Izolace DNA

Po změření stupně ploidie byl rostlinný materiál lyofilizován a uchován pro případné další analýzy. V závislosti na výsledku měření ploidie u jednotlivých rostlin každé ITC položky, byla z lyofilizovaného pletiva izolována genomová DNA. Pokud všechny rostliny jedné položky vykazovaly stejnou ploidií, genomová DNA byla izolována ze všech rostlin najednou. Pokud se objevil rozdíl v ploidií v rámci rostlin stejného druhu, byla DNA izolována individuálně z každé z nich a jednotlivé rostliny byly analyzovány jako samostatné položky. Izolace DNA byla v obou případech provedena s použitím NucleoSpin Plant II kitu.

4.5.3 Gelová elektroforéza

Kvalita izolované genomové DNA byla ověřena pomocí gelové elektroforézy, pro kterou byl použit 1% agarózový gel.

4.5.4 PCR amplifikace

Pro daných 19 SSR lokusů byly navrženy forwardové SSR primery s 5'koncovým M13 prodloužením, umožňující amplifikaci lokusů pomocí univerzálních fluorescenčně značených primerů. Soubor 19 SSR markerů představující základní genotypovací platformu pro *Musa* shrnuje tabulka 3. Pro každou PCR reakci na 1 vzorek bylo připraveno 20 μ l reakční směsi v následujícím složení: 2 μ l reakčního pufru pro *Taq* polymerázu (NEB), 200 μ mol dNTPs, 0,08 μ mol specific forward primer s M13-extenzí, 0,06 μ mol fluorescenčně značený univerzální forward primer M13, 0,1 μ mol specifický reverse primer, 1 U *Taq* DNA polymerázy, 10 ng templátové genomové DNA na vzorek, sterilní redestilovanou vodu doplněnou do celkového objemu. PCR reakce probíhala za následujících podmínek: 5-minutová denaturace při 94 °C, následovaná 35 cykly: denaturace po dobu 45 s při teplotě 94 °C, annealing po dobu 1 minuty při teplotě odpovídající nasednutí specifických primerů,

prodlužování primerů 1 minutu při 72 °C, poslední 5-minutový krok finálního prodlužování při 72 °C.

Tabulka 3: 19 testovaných SSR markerů (převzato s úpravami od Christelová *et al.*, 2011).

Marker	Fluorofor	Motiv	Reference	Položka v genové bance	Teplota annealingu [°C]	Min velikost alely [bp]	Max velikost alely [bp]
mMaCIR01	6-FAM	(GA)20	Lagoda <i>et al.</i> (1998)	X87262	55	241	440
mMaCIR03	6-FAM	(GA)10	Lagoda <i>et al.</i> (1998)	X87263	55	111	147
mMaCIR07	NED	(GA)13	Lagoda <i>et al.</i> (1998)	X87258	53	136	195
mMaCIR08	VIC	(TC)6N24(TC)7	Lagoda <i>et al.</i> (1998)	X87264	55	229	283
mMaCIR13	PET	(GA)16N76(GA)8	Lagoda <i>et al.</i> (1998)	X90745	53	268	427
mMaCIR24	PET	(TC)7	Lagoda <i>et al.</i> (1998)	Z85972	48	240	291
mMaCIR39	VIC	(CA)5GATA(GA)5	Lagoda <i>et al.</i> (1998)	Z85970	52	329	390
mMaCIR40	6-FAM	(GA)13	Lagoda <i>et al.</i> (1998)	Z85977	54	169	247
mMaCIR45	6-FAM	(TA)4CA(CTCGA)4	Lagoda <i>et al.</i> (1998)	Z85968	57	274	318
mMaCIR150	VIC	(CA)10	Hippolyte <i>et al.</i> (2010)	AM950440	54	253	376
mMaCIR152	6-FAM	(CTT)18, (CT)17, (CA)6	Hippolyte <i>et al.</i> (2010)	AM950442	54	147	195
mMaCIR164	VIC	(AC)14	Hippolyte <i>et al.</i> (2010)	AM950454	55	256	458
mMaCIR196	NED	(TA)4, (TC)17, (TC)3	Hippolyte <i>et al.</i> (2010)	AM950462	55	163	201
mMaCIR214	NED	(AC)7	Hippolyte <i>et al.</i> (2010)	AM950480	53	115	238
mMaCIR231	NED	(TC)10	Hippolyte <i>et al.</i> (2010)	AM950497	55	236	286
mMaCIR260	PET	(TG)8	Hippolyte <i>et al.</i> (2010)	AM950515	55	204	264
mMaCIR264	6-FAM	(CT)17	Hippolyte <i>et al.</i> (2010)	AM950519	53	234	383
mMaCIR307	NED	(CA)6	Hippolyte <i>et al.</i> (2010)	AM950533	54	143	173
Ma-3-90	PET	(CT)11	Crouch <i>et al.</i> (1998)	n/a	53	147	191

4.5.5 Purifikace PCR produktů

Na přečištění 20 µl PCR produktu byl smícháním 3 µl octanu sodného (pH 5,2) s 70 µl 96% etanolu připraven purifikační roztok. Po přidání roztoku k produktům se obsah mikrotitračních destiček nechal při pokojové teplotě 15 minut srážet. Poté byly vzorky 30 minut centrifugovány při 4 200 rpm. Vzniklý supernatant byl slit a k peletu bylo přidáno 100 µl 70% etanolu. Vzorky byly za stejných podmínek opět centrifugovány. Dva předcházející kroky byly ještě jednou zopakovány. Po 15-minutové centrifugaci byl supernatant slit a vzorky byly pro odstranění reziduálního etanolu centrifugovány dnem vzhůru 30 sekund při 500 rpm. Dále byly vzorky 30 minut sušeny v laminárním boxu a poté sterilní redestilovanou vodou 2,5x naředěny vůči původnímu objemu. Takto přečištěné vzorky byly připraveny k další analýze anebo uchovány v mrazícím boxu.

4.5.6 Příprava vzorků na fragmentační analýzu

Po přečištění byly vzorky připraveny na elektroforetickou separaci v sekvenátoru. Na celkový objem 12 μl na jamku byl připraven roztok obsahující 0,2 μl LIZ standardu, 0,8 μl roztoku přečištěného PCR produktu a podle stupně multiplexu (současná separace produktů několika SSR markerů ve stejné reakci) byl objem doplněn Hi-Di formamidem. Poté byly vzorky 2 minuty denaturovány při 98 °C.

4.5.7 Fragmentační analýza a vyhodnocení

Za účelem snížení nákladů a zvýšení kapacity genotypové platformy byly používány čtyři různé fluorescenční značky (6-FAM, VIC, NED, PET), které umožnily čtyřnásobné multiplexování PCR produktů. Následná elektroforetická separace a detekce signálu byly prováděny pomocí automatického 96-kapilárního DNA analyzátoru. Výsledné údaje byly analyzovány pomocí GeneMarker® (Softgenetics, LLC, State College, PA, USA). Genotypová data byla převedena na binární data a analyzována jako záznam dominantního markeru, kde 1 znamenala přítomnost dané alely a 0 její absenci (Weising *et al.*, 2005). Data 157 analyzovaných položek byla sloučena s daty v „core subsetu“, který obsahuje položky dříve ověřené jako správně klasifikované, a tudíž správně klastrující položky (Christelová *et al.*, 2017). Získaná data byla použita pro generování matic genetické podobnosti na základě koeficientu genetické vzdálenosti Nei (Nei, 1973) v softwaru PowerMarker (Liu *et al.*, 2005). Pro následnou klastrovací analýzu byla použita metoda „unweighted pair-group“ s aritmetickým průměrem (UPGMA; Michener *et al.*, 1957). Dendrogramy byly sestaveny na základě výsledků analýzy UPGMA a vizualizovány ve formě stromu pomocí programu TreeView (Page, 1996). Ve výsledném dendrogramu byla sledována poloha všech analyzovaných položek a bylo vyhodnoceno, zda jednotlivé položky klastrují v souladu s očekáváním na základě klasifikace uvedené v databázi MGIS.

5 Výsledky a diskuse

Hlavním cílem této bakalářské práce, bylo systematicky charakterizovat dvě zásilky z genové banky banánovníku (ITC kolekce) určené ke genotypování pomocí SSR markerů v rámci projektu MŠMT LG15017, což představovalo celkem 158 položek (přílohy – tabulka 1).

5.1 Ověření ploidie

U všech položek byla stanovena ploidie pomocí průtokové cytometrie, přičemž u většiny položek byla očekávaná ploidie potvrzena. Jen 9 položek se od očekávané ploidie po změření lišilo (tabulka 4). Mezi tyto položky patří Kerua (ITC0827), klasifikována jako AAB triploid a položky Nzumoheli I (ITC0717) a Inarnibal (ITC1149) popsány jako triploid AAA. U všech tří položek byla naměřena hodnota odpovídající diploidnímu genomu. Položka IRFA 908 (ITC1268) v MGIS klasifikaci označena jako tetraploid, byla po změření opět určena jako triploid. V genové bance došlo nejspíše k mylnému označení položky. Položky Chuoi Nanh heo (ITC1408), Chuoi Com Lao (ITC1409), Dimaemamosi (ITC0920), Wambo (ITC0944) a SH-3764 (ITC1352) klasifikovány jako diploidi, byly změřeny jako triploid. U tří položek z celé zásilky, Katual no. 2, Kanara, Japaraka no. 2, byla naměřena jiná ploidie u všech pěti rostlin. Položka Katual no. 2 (ITC0786) obsahovala dvě rostlinky diploidní a tři triploidní. U zbylých dvou položek byla zjištěna mixoploidie. U položky Kanara (ITC0452) popsané jako triploid, dvě z pěti rostlinek vykazovaly mixoploidii, tzn. přítomnost jader o odlišném stupni ploidie v jedné rostlině, v tomto případě $5x + 6x$. Další tři rostlinky reprezentující tuto položku byly v souladu s očekáváním triploidní. Položka Japaraka no. 2 (ITC0605) vykazovala $2x + 4x$ mixoploidii u tří z pěti rostlinek a zbylé dvě byly diploidní nebo tetraploidní. Přítomnost mixoploidních rostlinek není artefaktem v důsledku akumulace buněk v G2 fázi buněčného cyklu, ale k polyploidizaci došlo vlivem dlouhodobého pěstování kultur *in vitro*, které přispívá ke vzniku somaklonální variability (Vuylsteke *et al.*, 1996). Tato variabilita může být způsobena například změnami v počtu chromozomů, bodovými mutacemi, somatickým crossing-overem, sesterskou výměnou chromatid, DNA amplifikací a metylací DNA. Všechny tyto procesy mohou vést také ke změně fenotypu pěstovaných rostlin (Krishna *et al.*, 2016).

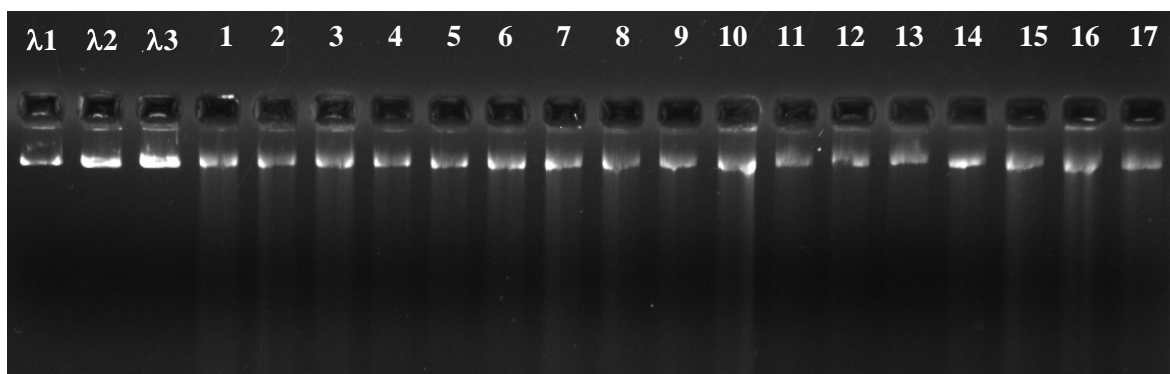
U většiny položek, kde ploidie souhlasila, poskytla tato analýza cenou zpětnou vazbu pro ověření správnosti údajů a aktualizaci databáze MGIS.

Tabulka 4: Analyzované položky čeledi *Musaceae* lišící se od očekávané ploidie.

ITC kód	Název položky	Klasifikace dle MGIS		
		Genomová konstituce	Očekávaná ploidie	Změřená ploidie
ITC 1408	Chuoí Nanh heo	AA	2x	3x
ITC 0827	Kerua	AAB	3x	2x
ITC 0717	Nzumoheli I	AAA	3x	2x
ITC 0920	Dimaemamosi	AA	2x	3x
ITC 0944	Wambo	AA	2x	3x
ITC 1352	SH-3764	AA	2x	3x
ITC 1409	Chuoí Com Lao	AB	2x	3x
ITC 1149	Inarnibal	AAA	3x	2x
ITC 1268	IRFA 908	AAAB	3x	3x

5.2 Ředění DNA

Kvalita izolované DNA byla zkontrolována podle výsledku z elektroforézy (obrázek 5) a následně podle koncentrace PCR produktů naředěna.



Obrázek 5: Elektroforetická analýza vybraných vzorků izolované genomové DNA použité pro SSR genotypování.

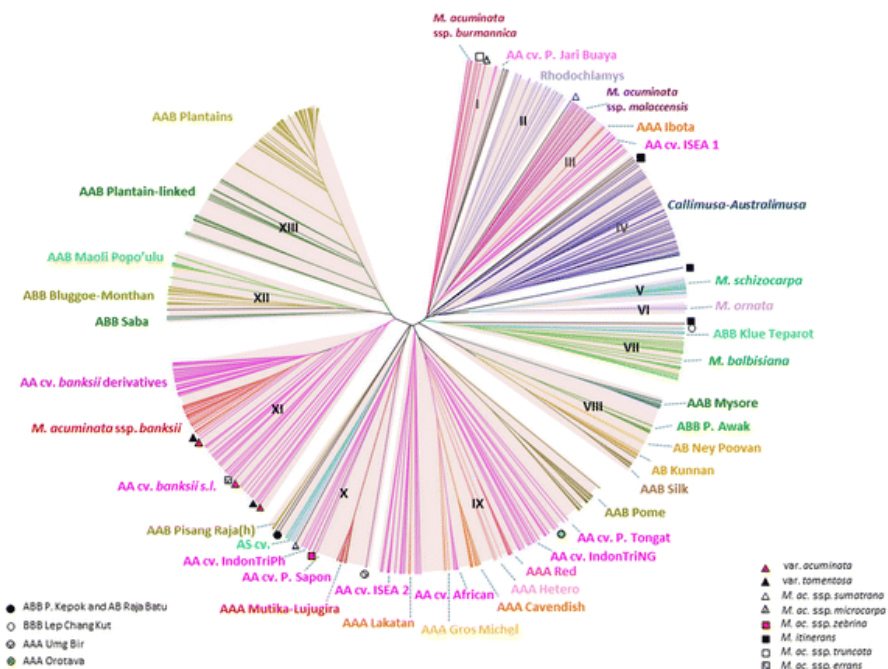
λ 1, λ 2, λ 3: standard (λ DNA, v množství 50 ng, 100 ng, 150 ng)

1–17: vzorky genomové DNA nanesené v množství 1 μ l

1 – ITC0591, 2 – ITC1396, 3 – ITC0003, 4 – ITC1382, 5 – ITC1405, 6 – ITC0345, 7 – ITC1299, 8 – ITC0881, 9 – ITC1043, 10 – ITC1323, 11 – ITC0532, 12 – ITC1352, 13 – ITC1143, 14 – ITC1340, 15 – ITC0399, 16 – ITC0219, 17 – ITC1448

5.3 SSR analýza

Následně byla provedena analýza pomocí SSR markerů, jejíž výsledky byly přidány do dendrogramu vytvořeného autorkou Christelovou *et al.* (2017) na základě morfologické klasifikace všech doposud analyzovaných položek (obrázek 6).



Obrázek 6: Dendrogram sestavený z core subsetu rozdělený do 13 klastřů (převzato od Christelová *et al.*, 2017).

Tento dendrogram, rozdělený do 13 klastřů obsahující 48 *Musa* skupin byl brán jako základ, do kterého bylo postupně přidáváno všech 158 položek. Po přidání vznikl nový dendrogram, ve kterém bylo sledováno umístění položek v jednotlivých klastrech v kontextu již dříve prověřených položek tvořící „core subset“. Na základě jejich zařazení do klastřů byly vyhodnoceny ty, které mohou být problematické. Z celkových 158 položek bylo 107 (68 %) vyhodnoceno jako neproblematických, správně klastřujících položek. Tedy většina klastrovala podle očekávání, ale byly identifikovány i takové, které se objevily v jiných klastrech nebo vytvořily novou podskupinu. Všechny problematické položky shrnuje tabulka 5.

5.3.1 Potenciálně nové klastry

Mezi položky, které se nezařadily do žádných již existujících klastřů, ale vytvořily novou podskupinu patří PITA 12 (ITC1203), TMP2x 1297-3 (ITC1292), PITA 5 (ITC1141),

PITA 8 (ITC1272), PITA 3 (ITC1200), IRFA 908 (ITC1268) a Nou (ITC1236) společně vytvářející nový klastř ve vazbě na AAB Plantain-linked. Položky 30456-3 BITA8 (ITC1811), FHIA-20 R1-1 (ITC1321) a FHIA-20 R1-6 (ITC1323) jsou tetraploidní hybridy, u nichž nemáme podrobnější informace o původu, ale mohou vytvářet základ nového klastř odvozeného od AAB Plantain-linked. U tetraploidních hybridních položek CRBP 38 (ITC1343) a CRBP 33 (ITC1340) také nejsou zjištěny podrobnější informace o jejich původu, ale mohou být základem nového klastř odvozeného od AAB Plantains.

5.3.2 Položky dříve nedostatečně klasifikované

U položek s nedostatečnou klasifikací nelze určit, zda se jedná o špatně popsanou položku, neboť chybí přesnější klasifikace. Mezi takovéto položky se zařadily Pisang Kenning (ITC1298), 75-19S (ITC0224) a IITA hybrid 2145/1320 (ITC 1448). Výsledky SSR analýzy v takovém případě slouží jako vodítko pro doplnění chybějících informací a po ověření fenotypu mohou mít významnou roli při správném taxonomickém zařazení těchto položek.

5.3.3 Problematické položky

Po SSR analýze byly identifikovány také položky, které byly chybně zařazené, ale nevytvořily novou podskupinu, takovýchto položek ze všech analyzovaných bylo celkem 36.

Tabulka 5: Analyzované položky, které byly po všech provedených analýzách vyhodnoceny jako problematické.

MGIS Classification (group, subgroup)				
ITC kód	Název položky	Genomová konstituce	Změřená ploidie	Klastrování
Potenciálně nové klastry				
ITC 1203	PITA 12	–	4x	
ITC 1141	PITA 5	–	4x	
ITC 1272	PITA 8	AAA	4x	
ITC 1200	PITA 3	–	4x	vytvářejí nový klastr ve vazbě na AAB Plantain-linked
ITC 1236	Nou	–	3x	
ITC 1268	IRFA 908	AAAB	3x	
ITC 1292	TMP2x 1297-3	–	2x	
ITC 1811	30456-3 (BITA8)	–	4x	
ITC 1321	FHIA-20 (R1-1)	AAAB	4x	vazba na AAB Plantain-linked klastr
ITC 1323	FHIA-20 (R1-6)	AAAB	4x	
ITC 1343	CRBP 38	AAAB	4x	mohou být základem nového klastru odvozeného od AAB Plantains
ITC 1340	CRBP 33	AAAB	4x	
Položky s dříve nedostatečnou nebo chybějící klasifikací				
ITC 1298	Pisang Kenning	–	3x	AAB Pisang Rajah
ITC 0224	75-19S	–	3x	AAB Plantain-linked
ITC 1448	IITA hybrid 2145/1320	–	2x	Rhodochlamys
Problematické položky				
ITC 1362	Chuai La Trang	AAB/Pisang Kelat	3x	AA cv. Pisang Jari Buaya
ITC 1408	Chuai Nanh heo	AA	3x	AAB Mysore
ITC 0827	Kerua	AAB	2x	AA cv. <i>banksii</i> derivatives
ITC 0427	Bandjim	AAA	3x	AA cv. <i>banksii</i> derivatives
ITC 0717	Nzumoheli I	AAA	2x	AA cv. African
ITC 1781	<i>Musa balbisiana</i>	<i>balbisiana</i>	3x	AAA Ibota
ITC 1400	Pisang Lilin	AA	3x	AAB Pome
ITC 1178	Buitenzorg	<i>acuminata/Zebrina</i>	4x	AA cv. ISEA 2
ITC 1303	NAM	AAA	3x	AAB Plantains
ITC 1363	Ngop Dui Duc	ABB/Bluggoe	3x	AAB Plantain-linked
ITC 0516	Eberedia Ukom	AAB/Plantain	2x	AA cv. <i>banksii s.l.</i>
ITC 0920	Dimaemamosi	AA	3x	AAB Plantain-linked
ITC 0944	Wambo	AA	3x	AAB Plantain-linked
ITC 1383	Chuai Mo Giang	ABB/Monthan	3x	AAB Plantain-linked
ITC 1382	Chuai Nam	ABB	3x	AAB Plantain-linked
ITC 1352	SH-3764	AA	3x	AAB Mysore
ITC 0878	Kundubu	AAB	3x	<i>M. schizocarpa</i>
ITC 1364	Ngop Cao	ABB/Monthan	3x	AAB Plantain-linked

Tabulka 5 – pokračování: Analyzované položky, které byly po všech provedených analýzách vyhodnoceny jako problematické.

MGIS Classification (group, subgroup)				
ITC kód	Název položky	Genomová konstituce	Změřená ploidie	Klastrování
Problematické položky				
ITC 1405	Chuoi Dai Loan	AAA/Cavendish	3x	AAB Plantain-linked
ITC 1143	Gia Hui	ABB/Pisang Awak	3x	AAB Plantains
ITC 1409	Chuoi Com Lao	AB	3x	AAB Maoli Popo'ulu
ITC 1785	Pitogo	ABB	3x	společně klastují ve vazbě na AAB Maoli Popo'ulu klastr
ITC 0787	Tukuru	ABB	3x	
ITC 1782	Mundo	BBB	–	
ITC 0541	<i>Musa acuminata</i>	<i>acuminata</i>	2x	Rhodochlamys
ITC 1814	25344-18_PITA 24	–	3x	AAB Pisang Rajah
ITC 1810	24408-S22 (BITA7)	–	3x	AA cv. Pisang Jari Buaya
ITC 1795	NARITA 18	AAA/Mutika/Lujugira	3x	AAA Cavendish
ITC 1462	Suu	AAA/Mutika/Lujugira	3x	AA cv.
ITC 1149	Inarnibal	AAA	2x	AA cv. ISEA 2
ITC 1807	NARITA 15	AAA/Mutika/Lujugira	3x	AA cv.
ITC 1426	Tay	ABB/Ney Mannan	4x	ABB Pisang Awak
ITC 1803	NARITA 19	AAA/Mutika/Lujugira	3x	AA cv. Pisang Jari Buaya
ITC 0790	Pink Striped	AA	4x	<i>M. schizocarpa</i>
ITC 1347	Pisang Serun 403	<i>acuminata/Malaccensis</i>	3x	AAA Mutika/Lujugira
ITC 0610	Tuu Gia	AA	2x	ABB Saba

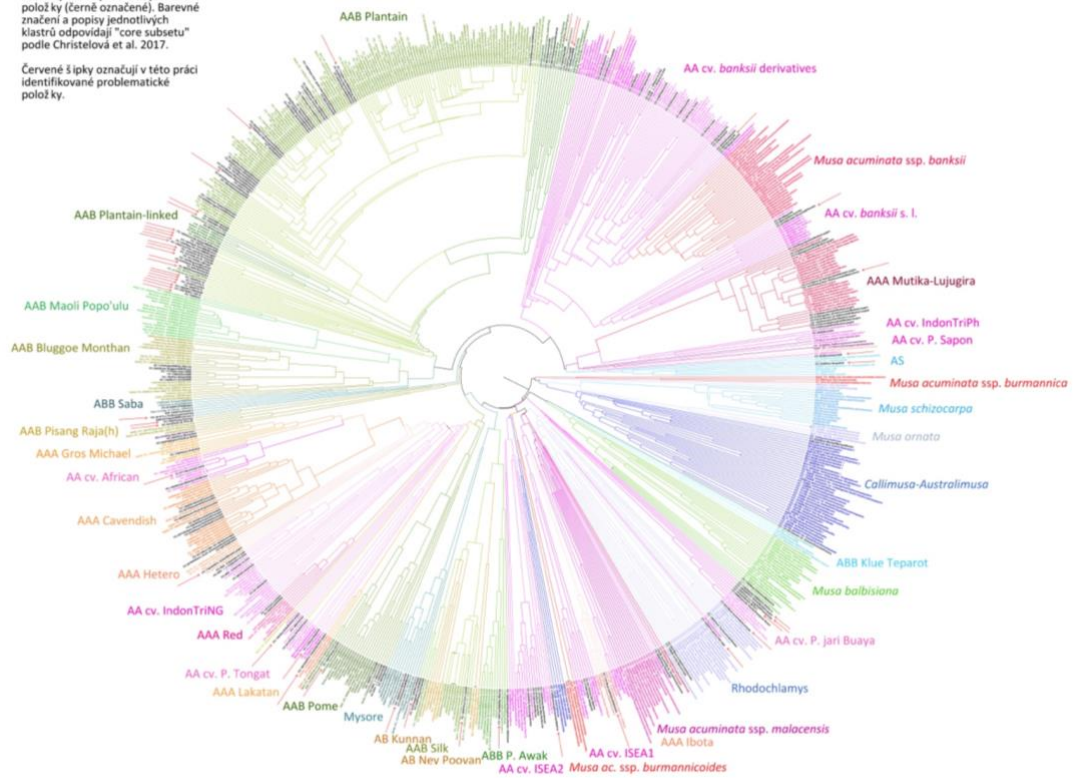
Položky Chuoi La Trang (ITC1362) značená jako AAB/Pisang Kelat a NARITA 19 (ITC1803) značená jako AAA/Mutika/Lujugira se společně zařadily do klastru AA cv. Pisang Jari Buaya, přestože by každá měla spadat jinam, jedná se tedy o mylnou klasifikaci. Neodpovídající ploidie byla zjištěna u položek Chuoi Nanh heo (ITC1408) a SH-3764 (ITC1352) klasifikovaných jako diploidní AA kultivar, které se ale v dendrogramu zařadily mezi skupinu triploidních AAB Mysore. Stejně tak položka Kerua (ITC0827) klasifikována jako triploidní AAB, se zařadila mezi AA cv. *banksii* derivatives, proto se u této i předchozích dvou položek opět jedná buď o mylnou klasifikaci, nebo záměnu v průběhu manipulace s *in vitro* kulturou v genové bance. Položka Bandjim (ITC0427) se také zařadila do klastru AA cv. *banksii* derivatives, přestože je klasifikována jako triploidní AAA kultivar. Další položka Nzumoheli I (ITC0717) původně klasifikována jako triploidní AAA, byla po změření ploidie identifikována jako diploid klastující k AA cv. African. Položka klasifikována jako *Musa balbisiana* (ITC1781) po analýze klastrovala do AAA Ibota, zde mohlo v genové bance dojít k záměně. Triploidní položka Pisang Lilin s diploidním AA

genomem klastrovala u AAB Pome, opět došlo k dřívější mylné klasifikaci nebo záměně. Tetraploidní položka Buitenzorg (ITC1178) je klasifikována jako *Musa acuminata* ssp. *zebrina*, ale v dendrogramu se zařadila mezi AA cv. ISEA 2. Položka NAM (ITC1303) klasifikována jako AAA se zařadila do klastru AAB/Plantains. Ngop Dui Duc (ITC1363) klastrovala k AAB Plantain-linked, přestože je klasifikována jako ABB/Bluggoe. Položka Eberedia Ukom (ITC0516) s genomem AAB Plantain, ale klasifikována jako diploid, klastrovala s AA cv. ISEA 2. Diploidní AA položky Dimaemamosi (ITC0920) a Wambo (ITC0944) byly po analýze určeny jako triploidní klastrující do AAB Plantain-linked. Triploidní položky, klasifikovány jako ABB/Monthan, Chuoi Mo Giang (ITC1383) a Ngop Cao (ITC1364), také klastrovaly do AAB Plantain-linked. Stejně tak položka Chuoi Nam (ITC1382), klasifikována jako ABB, klastrovala do AAB Plantain-linked. Položky Kendubu (ITC0878) s genomem klasifikovaným jako AAB a tetraploid Pink Striped (ITC0790), obě klastrovaly s *Musa schizocarpa*. Položka Chuoi Dai Loan (ITC1405) původně klasifikována jako AAA/Cavendish, klastrovala mezi AAB Plantain-linked. Genom položky Gia Hui (ITC1143) byl původně klasifikován jako triploidní ABB/Pisang Awak, ale po analýze se položka zařadila do klastru AAB/Plantains. Původně diploidní položka Chuoi Com Lao (ITC1409) byla po analýze určena jako triploidní, klastrující k AAB Maoli Popo'ulu. Diploidní AA položka Tuu Gia (ITC0610) klastrovala do skupiny s genomem ABB. Genom položky Mundo (ITC1782) byl klasifikován jako BBB, nicméně existence takového triploidního genomu doposud nebyla cytogeneticky prokázána. Další dvě položky Pitogo (ITC1785) a Tukuru (ITC0787) popsány jako ABB, klastrují společně s položkou Mundo ve vazbě na AAB Maoli Popo'ulu klastr, tudíž může jít o mylně klasifikované položky. Položka *Musa acuminata* (ITC0541) mylně klastruje s Rhodochlamys. Položka 25344-18_PITA 24 (ITC1814) by měla klastrovat s ostatními PITA hybridy, ale zařadila se do AAB Pisang Rajah klastru. Triploidní položka 24408-S22 BITA7 (ITC1810) klastrovala k AA cv. Pisang Jari Buaya. Tři položky NARITA 18 (ITC1795), 15 (ITC1807), 19 (ITC1803) se po analýze zařadily každá do jiného klastru, i přes to, že se jedná o hybridy odvozené od Mutika/Lujugira a měli by tedy klastrovat společně. Do klastru Mutika/Lujugira by měla spadat i položka Suu (ITC1462) s genomem AAA/Mutika/Lujugira, ale zařadila se k AA cv. klastru. Položka Inarnibal (ITC1149) byla původně popsána jako triploidní AAA, po analýze byla klasifikována jako diploid klastrující s AA cv. ISAE 2. Položka Tay (ITC1426) s genomem ABB/Ney Mannan mylně klastruje s ABB Pisang Awak. Triploidní položka Pisang Serun 403 (ITC1347) popsána jako *Musa acuminata* ssp. *malacensis*, klastrovala s AAA Mutika-Lujugira.

Z výše uvedených výsledků je zřejmé, že nejčastějšími problémy se kterými se genové banky potýkají jsou špatná nebo nedostatečná klasifikace položek (předpokládaná taxonomická informace se ukáže jako nesprávná) a také častá záměna již klasifikovaných položek (při konzervaci obdržely nesprávný štítek; Mason, 2015). Protože genové banky mají sloužit jako prověřený zdroj genetické diverzity, je velice důležité, aby obsahovaly jen důvěryhodné položky. Položky, které jsou analyzovány jako problematické, musí projít dalším kolem ověřování, tzv. field verification. Během tohoto procesu jsou rostliny opět vysazeny do půdy v přirozených klimatických podmínkách, kde je pozorován fenotyp a je hodnoceno, zda morfologické znaky odpovídají danému kultivaru, či nikoliv. Současně se také provádí opakované analýzy pomocí molekulárních markerů a cytologických testů. Po dobu testování je daná položka vyřazena z distribuce genovou bankou, aby bylo zamezeno šíření nespolehlivého materiálu (Chase *et al.*, 2016).

Výsledný dendrogram obsahující všechny v této práci analyzované položky (černě označené). Barevné značení a popisy jednotlivých klastrů odpovídají "core subsetu" podle Christelová et al. 2017.

Červené šipky označují v této práci identifikované problematické položky.



Obrázek 7: Výsledný dendrogram obsahující nově analyzované položky a klastry odpovídající „core subsetu“ – zmenšená verze (plná verze přiložena na CD jako PDF soubor).

6 Závěr

Hlavním cílem práce byla molekulární a cytologická charakterizace položek banánovníku ze sbírky *Musa* ITC pomocí molekulárních SSR markerů.

V rámci této práce byla u 158 položek měřena ploidie a provedena analýza genotypu pomocí SSR markerů, které jsou pro tyto účely standardizovanou metodou. Ze všech analyzovaných položek 68 % klastrovalo podle očekávání, tudíž se potvrdila dřívější správná klasifikace. Zbylých 32 % položek bylo identifikováno jako problematických. U devíti z nich, byla zjištěna nesouhlasná ploidie a u dvou zároveň i mixoploidie. Dalších dvanáct položek vytvořilo potencionální nové klastry ve vazbě na klastry již existující. U tří původně nedostatečně klasifikovaných položek přinesla analýza nové informace využitelné k jejich přesnějšimu zařazení a u 27 položek došlo pravděpodobně k mylné klasifikaci, chybě v označení nebo k záměně při manipulaci s položkou v genové bance.

Tato studie pomohla k přesnější charakterizaci a správné klasifikaci položek genové banky a identifikovala problematické položky, u nichž bude dočasně pozastavena distribuce a budou provedeny další analýzy včetně ověření fenotypu pro ověření správnosti jejich zařazení. Zde prezentované výsledky jsou tak cennou zpětnou vazbou pro zefektivnění činnosti genové banky banánovníku a zároveň důležitým zdrojem informací o genofondu banánovníku uchovávaném v této kolekci, která slouží celé vědecké a šlechtitelské komunitě zabývající se banánovníkem.

7 Použitá literatura

Agarwal M., Shrivastava N., Padh H. (2008): Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *Plant cell reports* 27: 617–631.

Argent G. C. G. (1976): The wild bananas of Papua New Guinea. Notes from the Royal Botanical Garden Edinburgh 35: 77–114.

Althoff D. M., Gitzendanner M. A., Segraves K. A. (2007): The utility of amplified fragment length polymorphisms in phylogenetics: a comparison of homology within and between genomes. *Systematic Biology* 56: 477–484.

Bardakci F. (2001): Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Turkish Journal of Biology* 25: 185–196.

Bartoš J., Alkhimova O., Doleželová M., De Langhe E., Doležel J. (2005): Nuclear genome size and genomic distribution of ribosomal DNA in *Musa* and *Ensete* (*Musaceae*): taxonomic implications. *Cytogenetic and Genome Research* 109: 50–57.

Creste S., Neto A. T., Silva S. D., Figueira A. (2003): Genetic characterization of banana cultivars (*Musa* spp.) from Brazil using microsatellite markers. *Euphytica* 132: 259–268.

Crhák T. (2007): Metody detekce jednonukleotidových polymorfismů (SNP). Bakalářská práce. Přírodovědecká fakulta, Masarykova Univerzita, Brno.

Čížková J., Hřibová E., Humplíková L., Christelová P., Suchánková P., Doležel J. (2013): Molecular Analysis and Genomic Organization of Major DNA Satellites in Banana (*Musa* spp.). *Plos One* 8 (1): e54808.

Daniells J., Jenny C., Karamura D., Tomekpe K. (2001): *Musalogue: Diversity in the genus Musa*. A catalogue of *Musa* germplasm. IPGRI, Rome.

Davey M. W., Gudimella R., Harikrishna J. A., Sin L. W., Khalid N., Keulamans J. (2013): A draft *Musa balbisiana* genome sequence for molecular genetics in polyploid, inter- and intra-specific *Musa* hybrids. *BMC Genom* 14: 683.

Deckers J., Tessera M., Alemu K., Abate T., Swennen R. L. (2001): Agriculture en Afrique tropicale. In: Raemaekers, R. H. (ed.): *Ensete*, *Ensete ventricosum*, pp. 638–643, DGCI, Bruxelles.

De Clerck C., Crew K., Van den houwe I., McMichael L., Berhal C., Lassois L., Haisam Jijakli M., Roux N., Thomas J., Massart S. (2017): Lessons learned from the virus indexing of *Musa* germplasm: insights from a multilyear collaboration. *Annals in Applied Biology* 171(1): 15–27.

De Langhe E., Vrydaghs L., de Maret P., Perrier X., Denham T. (2009): Why bananas matter: an introduction to the history of banana domestication. *Ethnobotany Research and Applications* 7: 165–178.

De Langhe E., Hřibová E., Carpentier S. C., Doležel J., Swennen R. (2010): Did backcrossing contribute to the origin of hybrid edible bananas? *Annals of Botany* 106 (6): 849–857.

D'Hont A., Denoeud F., Aury J. M., Baurens F. Ch., Carreel F., Garsmeur O., Noel B., Bocs S., Droc G., Rouard M., Da Silva C., Jabbari K., Cardi C., Poulain J., Souquet M., Labadie K., Jourda C., Lengellé J., Rodier-Goud M., Alberti A., Bernard M., Correa M., Ayyampalayam S., Mckain R. M., Leebens-Mack J., Burgess D., Freeling M., Mbéguié-A-Mbéguié D., Chabannes M., Wicker T., Panaud O., Barbosa J., Hřibová E., Heslop-Harrison P., Habas R., Rivallan R., Francois P., Poirion C., Kilian A., Burthia D., Jenny Ch., Bakry F., Brown S., Guignon V., Kema G., Dita M., Waalwijk C., Joseph S., Dievart A., Jaillon O., Leclercq J., Argout X., Lyons E., Almeida A., Jeridi M., Doležel J., Roux N., Risterucci A. M., Weissenbach J., Ruiz M., Glastmann J. Ch., Quétier F., Yahiaoui N., Wincker P. (2012): The banana (*Musa acuminata*) genome and the evolution of monocotyledonous plants. *Nature* 488 (7410): 213–217.

Doležel J., Doleželová M., Novák F. J. (1994): Flow cytometric estimation of nuclear DNA amount in diploid bananas (*Musa acuminata* and *Musa balbisiana*). *Biologia Plantarum* 36: 351–357.

Doležel J., Nyine M. (2015): Banánovník z východoafrické vysočiny. 1. Základní potravina pro miliony lidí. *Vesmír* 94: 2–4.

Doleželová M., Valárik M., Swennen R., Horry J. P., Doležel J. (1998): Physical mapping of the 18S-25S and 5S ribosomal RNA genes in diploid bananas. *Biologia Plantarum* 41: 497–505.

Ekulé M. R. M., Gailing O., Finkeldey R. (2009): Transferability of simple sequence repeat (SSR) markers developed in *Litchi chinensis* to *Blighia sapida* (*Sapindaceae*). *Plant Molecular Biology Reporter* 27: 570–574.

Foyer C. H., Lam H. M., Nguyen H. T., Siddique K. H., Varshney R. K., Colmer T. D., Cowling W., Bramley H., Mori T. A., Hodgson J. M., Cooper J. W., Miller A. J., Kunert K., Vorster J., Cullis C., Ozga J. A., Wahlqvist M. L., Liang Y., Shou H., Shi K., Yu J., Fodor N., Kaiser B. N., Wong F. L., Valliyodan B., Considine M. J. (2016): Neglecting legumes has compromised human health and sustainable food production. *Nature Plants* 2: 16112.

Galbraith D. W., Doležel J., Lambert G., Macas J. (1998): Nuclear DNA content and ploidy analyses in higher plants. In: Robinson J. P. (ed): *Current protocols in cytometry*, pp 7.6.1–7.6.22, Wiley, New York.

Harlan J., De Wet J. (1971): Toward a Rational Classification of Cultivated Plants. *Taxon* 20 (4), 509–517.

Hayden M. J., Nguyen T. M., Waterman A., Chalmers K. J. (2008) Multiplex-Ready PCR: A new method for multiplexed SSR and SNP genotyping. *BMC Genomics* 9: 80.

Häkkinen M. (2013): Reappraisal of sectional taxonomy in *Musa* (*Musaceae*). *Taxon* 62 (4): 809–813.

Hippolyte I., Bakry F., Seguin M., Gardes L., Rivallan R., Risterucci A. M., Jenny C., Perrier X., Carreel F., Argout X., Piffanelli P., Khan I. A., Miller R. N. G., Pappas G. J., Mbéguié-A-Mbéguié D., Matsumoto T., De Bernardinis V., Huttner E., Kilian A., Baurens F. C., D'Hont A., Cotel F., Courtois B., Glaszmann J. C. (2010): A saturated SSR/DArT linkage map of *Musa acuminata* addressing genome rearrangements among bananas. *BMC Plant Biology* 10: 65.

Hřibová E. (2016): Nové poznatky v genetice rostlin II. Charakterizace a konzervace genetické rozmanitosti banánovníku. *Živa* 6: 277–280.

Chase R., Sardos J., Ruas M., Van den houwe I., Roux N., Hřibová E., Doležel J. (2016): The field verification activity: a cooperative approach to the management of the global *Musa* in vitro collection at the International Transit Centre. *Acta Hort* 1114: 61–66.

Ching A. D. A., Caldwell K. S., Jung M., Dolan M., Smith O. S., Tingey S., Morgante M., Rafalski A. (2002): SNP frequency, haplotype structure and linkage disequilibrium in elite maize inbred lines. *BMC Genetics* 3: 19.

Christelová P., Valárik M., Hřibová E., Van den houwe I., Channelière S., Roux N., Doležel J. (2011): A platform for efficient genotyping in *Musa* using microsatellite markers. *AoB Plants – special issue: ‘Molecular technologies to improve vegetatively propagated banana and cassava’* 1–14.

Christelová P., De Langhe E., Hřibová E., Čížková J., Sardos J., Hušáková M., Van den houwe I., Sutanto A., Kay Kepler A., Swennen R., Roux N., Doležel J. (2017): Molecular and cytological characterization of the global *Musa* germplasm collection provides insights into the treasure of banana diversity. *Biodivers Conserv* 26: 801–824.

Karamura E. B., Karamura D. A. (1995): Banana morphology – part II: the aerial shoot. In: Gowen S. (ed.): *Bananas and plantains*. pp. 190–205, Springer Science, Dordrecht.

Karamura D. A., Karamura E. B., Tinzaara W. (2012): Banana Cultivar names, synonyms and their usage in Eastern Africa. pp. 6–7, Bioversity International, Uganda.

Kole Ch. (2011): Wild crop relatives: Genomic and breeding resources, pp. 100–101, Springer, Berlin.

Krishna H., Alizadeh M., Singh D., Singh U., Chauhan N., Eftekhari M., Sadh R. K. (2016): Somaclonal variations and their applications in horticultural crops improvement. *3 Biotech* 6: 54.

Lagoda P. J. L., Noyer J. L., Dambier D., Baurens F.C., Grapin A., Lanaud C. (1998): Sequence tagged microsatellite site (STMS) markers in the *Musaceae*. *Molecular Ecology* 7(5): 659–663.

Lamy P., Grove J., Wiuf C. (2011): A review of software for microarray genotyping. *Human Genomics* 5 (4): 304–309.

Liu, K., Muse, S. V. (2005): PowerMarker: integrated analysis environment for genetic marker data. *Bioinformatics* 21 (9): 2128–2129.

Manzo-Sánchez G., Buenrostro-Nava M. T., Guzmán-González S., Orozco-Santos M., Youssef M., Escobedo-Gracia Medrano R. M. (2015): Genetic Diversity in Bananas and Plantains (*Musa* spp.). In: Caliskan M., Cevahir Oz G., Kavakli H. I., Ozcan B. (eds.): *Molecular Approaches to Genetic Diversity*, pp. 93–111, InTech.

Mason A. S., Zhang J., Tollenaere R., Teuber P. V., Dalton-Morgan J., Hu L., Yan G. J., Edwards D., Redden R., Batley J. (2015): High-throughput genotyping for species identification and diversity assessment in germplasm collections. *Molecular Ecology Resources* 15 (5): 1091–1101.

Menon R. (2016): Banana: Genomics and Transgenic Approaches for Genetic Improvement. In: Mohandas, S., Ravishankar, K. V. (ed.): *Banana breeding* pp. 17–18, Springer Nature, Bangalore.

Mgenzi S. R. B., Mkulila I. S. (2004): Banana cultivar names, synonyms and their usage in Tanzania, (Lujugira-mutika subgroup), Presentation at ‘Workshop on Banana Synonyms in East Africa.’ 24–26th March.

Michener C. D., Sokal R. R. (1957): A quantitative approach to a problem of classification. *Evolution* 11 (2): 130–162.

Miller N. G. R., Passos A. N. M., Menezes N. P. N., Souza Jr. T. M., do Carmo Costa M. M., Rénnio Azevedo V. V., Amorim P. E., Pappas Jr. J. G., Ciampi Y. A. (2010): Characterization of novel microsatellite markers in *Musa acuminata* subsp. *burmannicoides*, var. Calcutta 4. *BMC Research notes* 3: 148.

Nei M. (1973): Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA* 70 (12): 3321–3323.

Oselebe H. O, Tenkouano A. (2009): A. Ploidy versus gender effects on inheritance of quantitative traits in *Musa* species. *Australian Journal of Crop Science* 3 (6): 367–373.

Osuji J. O., Crouch J., Harrison G., Heslop-Harrison J. S. (1998): Molecular cytogenetics of *Musa* species, cultivars and hybrids: location of 18S-5,8S-25S and 5S rDNA and telomere-like sequences. *Annals of Botany* 82: 243–248.

Page R. D. M. (1996): Treeview: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences* 12: 357–358.

Paun O., Schönswetter P. (2012): Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) - an invaluable fingerprinting technique for genomic, transcriptomic and epigenetic studies. *Methods in molecular biology* 862: 75–87.

Perrier X., Bakry F., Carreel F., Jenny Ch., Horry J. P., Lebot V., Hippolyte I. (2009): Combining biological approaches to shed light on the evolution of edible bananas. *Ethnobotany Research and Applications* 7: 199–216.

Ploetz R. C., Kepler A. K., Daniells J., Nelson S. C., (2007): Traditional trees of Pacific islands: their culture, environment, and use. In: Elevitch, C.R. (ed.): *Banana and plantain – an overview with emphasis on Pacific island cultivars*, pp. 21–22, Permanent Agriculture Resources, Holualoa.

Purseglove J. W. (1975): *Musaceae*. In: Tropical crops. Monocotyledons, pp. 343–384, Wiley, New York.

Robinson C. J. (1996): Distribution and importance. In: Crop production in horticulture: Bananas and Plantains, pp. 1–2, CAB International, Oxon.

Sachidanandam R., Weissman D., Schmidt S. C., Kakol J. M., Stein L. D., Marth G., Sherry S., Mullikin J. C., Mortimore B. J., Willey D. L. (2001): A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature* 409: 928–933.

Schlotterer C., Tautz D. (1992): Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucleic Acids Research* 20: 2211–2215.

Schuelke M. (2000): An economic method for the fluorescent labelling of PCR fragments. *Nature Biotechnology* 18: 233–234.

Simmonds N. W. (1966): Bananas. 2nd edn. Tropical Agriculture Series, pp. 512, Longmans, Harlow.

Simmonds N. W., Shepherd K. (1955): The taxonomy and origins of cultivated bananas. *Botanical Journal of the Linnean Society* 55: 302–312.

Stover R. H., Simmonds N. W. (1987): Bananas Third Edition. Longman Scientific & Technical, New York.

Twyman R. M. (2005): Single Nucleotide Polymorphism (SNP) Genotyping Techniques—An Overview. *Encyclopedia of Diagnostic Genomics and Proteomics*, pp. 1202–1206, University of York, York, U.K.

Valíček P. (2002): Užitkové rostliny tropů a subtropů. 2. upravené vydání. pp. 175–176, Academia, Praha.

Vuylsteke D. R., Swennen R. L., De Langhe E. A. (1996): Field Performance of Somaclonal Variants of Plantain (*Musa* spp., AAB Group). *Journal of the American Society for Horticultural Science* 121: 42–45.

Weising K., Nybom H., Wolff K., Kahl G. (2005): DNA fingerprinting in plants. Principles, methods, and applications, 2nd edn. Taylor & Francis, London.

Wenz H. M., Robertson J. M., Menchen S., Oaks F., Demorest D. M., Scheibler D., Rosenblum B. B., Wike C., Gilbert D. A., Efcavitch J. W. (1998): High-precision genotyping by denaturing capillary electrophoresis. *Genome Research* 3: 69–80.

Williams R. C. (1989): Restriction fragment length polymorphism. *American Journal of Physical Anthropology* 32: 159–184.

Williams J. G. K., Kubelik A. R., Livak K. J., Rafalski J. A., Tingey S. V. (1991): DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18: 6531–6535.

Wu W., Yang Y. L., He W. M., Rouard M., Li W. M., Xu M., Roux N., Ge X. J. (2016): Whole genome sequencing of a banana wild relative *Musa itinerans* provides insights into lineage-specific diversification of the *Musa* genus. *Scientific Reports* 6: 31586.

Yamamoto T., Kimura T., Shoda M., Imai T., Saito T., Sawamura Y., Kotobuki K., Hayashi T., Matsuta N. (2002): Genetic linkage maps constructed by using an interspecific cross between Japanese and European pears. *Theoretical and Applied Genetics* 106: 9–18.

BioLib. [online] [navštíveno 30.11.2017] Dostupné z: <https://www.biolib.cz/cz/taxon/id62420/>

Bioversity International. [online] [navštíveno 25.1.2018] Dostupné z: <https://www.bioversityinternational.org/banana-genebank>

Food and agriculture organization of the United Nations. [online] [navštíveno 1.3.2018]
Dostupné z: <http://www.fao.org/in-action/banana-varieties-resistant-to-fungus-are-identified-using-mutation-induction/en/> (1.3.2018)

8 Přílohy

Příloha 1: Seznam všech 158 analyzovaných položek z ITC kolekce.

Klasifikace dle MGIS			
ITC kód	Název položky	Genomová konstituce	Ploidie
ITC 1810	24408-S22 (BITA7)	–	3x
ITC 1259	Burro Cemsa	ABB	3x
ITC 0463	Mun	AAA	3x
ITC 1362	Chuoi La Trang	AAB/Pisang Kelat	3x
ITC 0403	Lai	AAA/Red	3x
ITC 1366	Chuoi Tay	<i>acuminata</i> /Siamea	2x
ITC 0605 (5)	Japaraka no.2	AA	2x
ITC 1408	Chuoi Nanh heo	AA	3x
ITC 1347	Pisang Serun 403	<i>acuminata</i> / <i>Malaccensis</i>	3x
ITC 0786 (1, 2)	Katual no.2	AA	2x
ITC 1455	Mshale Mlelembo	AA/Mshare	2x
ITC 1234	Mugus	AAB/Laknao	3x
ITC 0814	Bagul	AA	3x
ITC 0601	Hung Tu	AA	2x
ITC 0751	Banane Blanche	AAB/Plantain	3x
ITC 1803	NARITA 19	AAA/Mutika/Lujugira	3x
ITC 0515	Okoyo Ukom	AAB/Plantain	3x
ITC 1130	Corne Taype	AAB/Plantain	3x
ITC 1474	Padje	ABB/Ney Mannan	3x
ITC 1462	Suu	AAA/Mutika/Lujugira	3x
ITC 0478	Punti Poroy	AA	3x
ITC 0786 (3, 4, 5)	Katual no.2	AA	4x
ITC 1589	Simili Radjah	<i>acuminata x balbiana</i>	4x
ITC 0723	Gorolo	AAB/Mysore	3x
ITC 0827	Kerua	AAB	2x
ITC 0448	Pisang Keling	AAB	3x
ITC 0414	Pisang Sri	AAA/Orotava	3x
ITC 1795	NARITA 18	AAA/Mutika/Lujugira	3x
ITC 0637	Musa ornata	Oronata/Oronata	2x
ITC 1421	Com Lua	AAA	3x
ITC 0100	Moutouka 2	AAB/Plantain	3x
ITC 1368	Tien	AA	3x
ITC 0147	Naine de Nyangezi	AAA/Mutika/Lujugira	3x
ITC 1785	Pitogo	ABB	3x
ITC 0160	Ingarama	AAA/Mutika/Lujugira	3x
ITC 0833	Agu	AAB	3x
ITC 0807	Mah	AA	4x
ITC 0263	Highgate	AAA/Gros Michel	3x
ITC 0155	Ingumba y'Imbhire	AAA/Mutika/Lujugira	3x
ITC 1302	PA 12.03	AAAB	4x
ITC 0714	Kirun	AA/Sucrier	2x
ITC 0209	Bise Egome 2	AAB/Plantain	3x
ITC 0427	Bandjim	AAA	3x
ITC 0717	Nzumoheli I	AAA	2x
ITC 0835	Yeldem-banz	AA	3x
ITC 1403	Pisang Mas	AA/Sucrier	2x
ITC 0240	Oyoko Akpan	AAB/Plantain	3x

Příloha 1 – pokračování:

Klasifikace dle MGIS			
ITC kód	Název položky	Genomová konstituce	Ploidie
ITC 0787	Tukuru	ABB	3x
ITC 1203	PITA 12	–	4x
ITC 1781	Musa balbisiana	<i>balbisiana</i>	3x
ITC 1371	Chuoí Cau Man	AA/Sucrier	2x
ITC 0164	Rugondo	AAA/Mutika/Lujugira	3x
ITC 0308	Huwundu Vita	AA/Pisang/Jari Buaya	2x
ITC 0162	Nsira	AAA/Mutika/Lujugira	3x
ITC 0844	Kumbak	AAA	3x
ITC 1814	25344-18_PITA 24	–	3x
ITC 1400	Pisang Lilin	AA	3x
ITC 0785	Aivip	AA	2x
ITC 1178	Buitenzorg	<i>acuminata/Zebrina</i>	4x
ITC 1298	Pisang Kenning	–	3x
ITC 1784	Pearly Shell	AAA	3x
ITC 0452 (1, 2, 4)	Kanara	AAB	3x
ITC 1236	Nou	–	3x
ITC 0571	Mons Mari_GL1	AAA/Cavendish	3x
ITC 0129	Nguma	AAB/Plantain	3x
ITC 0579	Williams_South Johnstone	AAA/Cavendish	3x
ITC 1292	TMP2x 1297-3	–	2x
ITC 0411	Thong Dok Mak	AA	2x
ITC 1770	Kinamay Dalaga	AA	2x
ITC 1811	30456-3 (BITA8)	–	4x
ITC 0364	Silver Bluggoe	ABB/Blugoe	3x
ITC 1780	Musa balbisiana	<i>balbisiana</i>	2x
ITC 0452 (3, 5)	Kanara	AAB	5x + 6x
ITC 0605 (1, 2, 3)	Japaraka no.2	AA	2x + 4x
ITC 0695	Pisang Percet	AA	2x
ITC 1807	NARITA 15	AAA/Mutika/Lujugira	3x
ITC 0574	Robusta	AAA/Cavendish	3x
ITC 1141	PITA 5	–	4x
ITC 0548	Dwarf Parfitt	AAA/Cavendish	3x
ITC 1426	Tay	ABB/Ney Mannan	4x
ITC 0831	Rukumamb	AAB	6x
ITC 1275	Yangambi no.2	AAB/Silk	3x
ITC 0224	75-19S	–	3x
ITC 0636	Dominico 500	AAB/Plantain	3x
ITC 0605 (4)	Japaraka no.2	AA	4x
ITC 0161	Indemera y Imbihire	AAA/Mutika/Lujugira	3x
ITC 1047	Bosua	AAB/Plantain	3x
ITC 0149	Gashulie	AAA/Mutika/Lujugira	3x
ITC 1001	Bogia Mun	AA	2x
ITC 1768	Gubao	ABB	3x
ITC 1783	Paa Dalaga	ABB	–
ITC 1777	Saba Hapon	ABB	–
ITC 0790	Pink Striped	AA	4x
ITC 0591	Kasaska	AA	2x
ITC 1043	Ileli	AAB/Plantain	3x
ITC 1448	IITA hybrid 2145/1320	–	2x
ITC 1303	NAM	AAA	3x
ITC 0484	Gros Michel	AAA	3x

Příloha 1 – pokračování:

Klasifikace dle MGIS			
ITC kód	Název položky	Genomová konstituce	Ploidie
ITC 1363	Ngop Dui Duc	ABB/Bluggoe	3x
ITC 0691	Pisang Kapas	AAB/Laknao	3x
ITC 1396	False Horn	AAB/Plantain	3x
ITC 1323	FHIA-20 (R1-6)	AAAB	4x
ITC 0541	Musa acuminata	<i>acuminata</i>	2x
ITC 1453	Inananbo	AAA/Mutika/Lujugira	3x
ITC 0516	Eberedia Ukom	AAB/Plantain	2x
ITC 0874	Tumay	AAB	3x
ITC 1200	PITA 3	–	4x
ITC 1149	Inarnibal	AAA	2x
ITC 0920	Dimaemamosi	AA	3x
ITC 0003	Robusta (Poyo)	AAA/Cavendish	3x
ITC 0532	Khai (Kampengpeth)	AA	2x
ITC 0559	Curare Enano	AAB/Plantain	3x
ITC 0150	Inzirabahima	AAA/Mutika/Lujugira	3x
ITC 0594	Tapaupt	AA	2x
ITC 0944	Wambo	AA	3x
ITC 1328	GN 60A	AAA/Cavendish	3x
ITC 1383	Chuai Mo Giang	ABB/Monthan	3x
ITC 1272	PITA 8	AAA	4x
ITC 1382	Chuai Nam	ABB	3x
ITC 1352	SH-3764	AA	3x
ITC 1025	Halaemoemafi	AAB	3x
ITC 0163	Inyoya	AAA/Mutika/Lujugira	3x
ITC 0634	Hart??n Birracimo	AAB/Plantain	3x
ITC 0960	Red Ebanga	AAB/Plantain	3x
ITC 0878	Kundubu	AAB	3x
ITC 1364	Ngop Cao	ABB/Monthan	3x
ITC 1268	IRFA 908	AAAB	3x
ITC 1405	Chuai Dai Loan	AAA/Cavendish	3x
ITC 1143	Gia Hui	ABB/Pisang Awak	3x
ITC 0239	Ebare Egome	AAB/Plantain	3x
ITC 0225	Osabum	AAB/Plantain	3x
ITC 0635	Dominco Macho	AAB/Plantain	3x
ITC 0221	Nditu Ukom	AAB/Plantain	3x
ITC 0995	Gonub	AA	2x
ITC 1398	False Horn, green pseudostem	AAB/Plantain	3x
ITC 0345	Poyo	AAA/Cavendish	3x
ITC 1340	CRBP 33	AAAB	4x
ITC 0566	Dwarf Maricongo	AAB/Plantain	3x
ITC 0470	Posok	AA	2x
ITC 0710	IDN107	ABB/Saba	3x
ITC 0972	Morong Princesa	AA	2x
ITC 0799	Palakaur	AA	2x
ITC 1782	Mundo	BBB	–
ITC 1299	Msinyore	AAB/Plantain	3x
ITC 0919	Ivi Ivi	AA	2x
ITC 0471	Bebek	AA	2x
ITC 0845	Musa Maclayi	Maclayi/Maclayi	2x
ITC 0932	Gilasalasa	AA	2x
ITC 1409	Chuai Com Lao	AB	3x

Příloha 1 – pokračování:

Klasifikace dle MGIS			
ITC kód	Název položky	Genomová konstituce	Ploidie
ITC 0577	Williams (Bronze-free)	AAA/Cavendish	3x
ITC 0881	Sreake	AAB	3x
ITC 0219	Apem Pa	AAB/Plantain	3x
ITC 0365	Williams	AAA/Cavendish	3x
ITC 0482	Plantain Baja 1	AAB/Plantain	3x
ITC 1343	CRBP 38	AAAB	4x
ITC 0610	Tuu Gia	AA	2x