

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2012

Petra Zrůstová

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



**Analýza ITS oblastí u vybraných planých
zástupců rodu *Musa* a jejich využití pro
studium diverzity a fylogeneze**

Bakalářská práce

Petra Zrůstová

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie
Forma studia: Prezenční

Olomouc 2012

Vedoucí práce: Mgr. Eva Hřibová, PhD.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svoji bakalářskou práci vypracovala samostatně, s využitím informačních zdrojů, které jsou v práci citovány.

Olomouc 23. dubna 2012

Petra Zrůstová

(podpis)

Souhrn

Předkládaná bakalářská práce se zabývá studiem oblasti ITS1-5.8S-ITS2 u vybraných zástupců rodu *Musa* (čeleď *Musaceae*, řád *Zingiberales*). Oblast ITS1-5.8S-ITS2 (dále jen ITS) je součástí ribozomální DNA a představuje jeden z nejpoužívanějších molekulárních markerů ve fylogenetických analýzách. Díky variabilitě na úrovni sekvence DNA je vhodná k rozlišení blízkých příbuzných druhů nebo dokonce poddruhů.

Cílem teoretické části bakalářské práce bylo vypracování literární rešerše na zadané téma. Cílem praktické části bylo sekvenování ITS oblasti u 13 planých druhů rodu *Musa* a základní analýza sekvenčních dat. Získané nukleotidové sekvence byly editovány a bylo vytvořeno jejich mnohočetné přiřazení. Soubory mnohočetného přiřazení byly použity pro vytvoření tzv. konsensus sekvencí DNA a stanovení nukleotidové diverzity analyzované oblasti.

V rámci studovaného souboru druhů bylo zjištěno, že nejvíce heterogenní oblast ITS mezerníku je přítomna u druhu *Musa barionensis*. Tento planý diploidní druh obsahuje dva typy ITS, které jsou navíc divergované. Naopak nejvíce homogenní oblast ITS byla zjištěna u druhu *M. Monticola*.

Summary

Propounded bachelor's work deals with analysing ITS1-5.8S-ITS2 region of selected species of genus *Musa* (family *Musaceae*, order *Zingiberales*). ITS1-5.8S-ITS2 spacer of ribosomal RNA genes represents one of the most utilized molecular marker in phylogenetic analyses. Thanks to its sequential variability it is appropriate to distinguish closely related species or even subspecies.

The aim of theoretical part of bachelor's work was writing a literary introduction about assigned theme. The aim of practical part was sequencing of ITS region from 13 wild *Musa* species and basic analysis of sequencing data. Multiple alignments were prepared from edited sequences and used for creating consensus sequences. Multiple alignments were also used for estimation of nucleotide diversity of ITS region in individual analyzed accessions.

The highest sequence diversity within evaluated accessions was found out in *Musa barionensis*. This wild diploid species contains two types of ITS region, which are even diverged. On the other hand, the lowest nucleotide diversity, i.e. the highest homogeneity, was present in *M. Monticola*.

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat vedoucí své bakalářské práce Mgr. Evě Hřibové, PhD. za odborné vedení, vstřícnost a trpělivost.

OBSAH

1 ÚVOD	1
2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	2
2.1 Charakteristika banánovníků	2
2.1.1 Charakteristika banánovníků	2
2.1.2 Morfologie banánovníků	2
2.1.3 Taxonomická klasifikace	3
2.1.4 Ekonomický význam banánovníků	5
2.1.5 Diverzita banánovníků a problémy provázející charakterizaci diverzity	7
2.2 Molekulární fylogenetika	8
2.2.1 Molekulární fylogenetika	8
2.2.2 Molekulární markery nezávislé na sekvenci DNA	9
2.2.3 Molekulární markery založené na sekvenování	11
2.3 Využití ITS v molekulární fylogenetice rostlin	12
2.3.1 Struktura ribosomální DNA	12
2.3.2 Evoluce v koncertu	14
2.3.3 Divergentní paralogy ribosomální DNA	16
2.3.4 Využití ITS v molekulární fylogenetice rostlin	17
3 CÍLE PRÁCE	20
4 MATERIÁL A METODIKA	21
4.1 Materiál	21
4.1.1 Rostlinný materiál	21
4.1.2 Přístroje	22
4.1.3 Pufry a roztoky	23
4.1.4 Komerční kity	24
4.2 Metodika	24
4.2.1 Izolace genomové DNA	24
4.2.2 Stanovení kvality a koncentrace genomové DNA	25
4.2.3 PCR amplifikace oblasti ITS1-5.8S-ITS2	25
4.2.4 Příprava 2 YT média	26
4.2.5 Klonování DNA fragmentů	26
4.2.6 Purifikace PCR produktů a sekvenování DNA fragmentů	28

4.2.7 Analýza sekvenačních dat	28
5 VÝSLEDKY	29
5.1 Izolace genomové DNA a PCR amplifikace oblasti ITS1-5.8S-ITS2	29
5.2 Sekvenování a analýza sekvenčních dat	30
6 DISKUZE A ZÁVĚR	34
7 LITERATURA	36
8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	50

1 ÚVOD

Banánovníky (*Musa* spp.) jsou vytrvalé jednoděložné byliny rostoucí v tropických a subtropických oblastech. Rod *Musa* je společně s rody *Ensete* a *Musella* řazen do čeledi *Musaceae*. V rámci rodu *Musa* se běžně rozlišují čtyři sekce: Eumusa, Rhodochlamys, Australimusa a Callimusa. Nejvíce diversifikovaná je sekce Eumusa, která zahrnuje i většinu jedlých typů banánovníků. Klasifikace čeledi *Musaceae*, stejně jako rodu *Musa*, však není zcela objasněná. Pomocí molekulárních analýz došlo ke zpřesnění tradičního systému, který je založen především na morfologii a stupni ploidie banánovníků.

Většina jedlých typů banánovníků vznikla přirozenou intra- a interspecifickou hybridizací mezi dvěma diploidními fertálními druhy: *M. acuminata* (A genomu) a *M. balbisiana* (B genomu). Tito planí předchůdci jedlých banánovníků pochází z jihovýchodní Asie. Většina kultivovaných typů jsou sterilní, vegetativně se množící diploidní, triploidní nebo tetraploidní klony s různou kombinací A a B genomů.

Tradičním vývozním artiklem jsou sladké banány odrůdy 'Cavendish', na kterých je založena ekonomika mnoha zemí střední Ameriky. Téměř 90 % celkové světové produkce banánů je zdrojem potravy pro miliony lidí ve více než 130, převážně rozvojových zemí světa. Převážnou většinu pěstovaných typů představují škrobové banány, které se konzumují až po tepelné úpravě. Tyto tzv. „cooking bananas“ a plantainy nejsou určeny pro export, ale výhradně pro místní spotřebu.

Díky vegetativnímu množení jsou jedlé typy banánovníků náchylné k řadě onemocnění, které soustavně ohrožují banánovou produkci. K eliminaci patogenních organismů je používáno značné množství pesticidů, které zatěžuje životní prostředí a zvyšuje produkční náklady. Lepší znalost struktury genomu, původu a genetické diverzity banánovníků je důležitá pro šlechtění nových rezistentnějších forem. Genetický systém banánovníků je však poměrně neznámý a komplikovaný, a to zejména kvůli mezidruhové hybridizaci, strukturní heterozygotnosti a polyploidii banánovníků.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

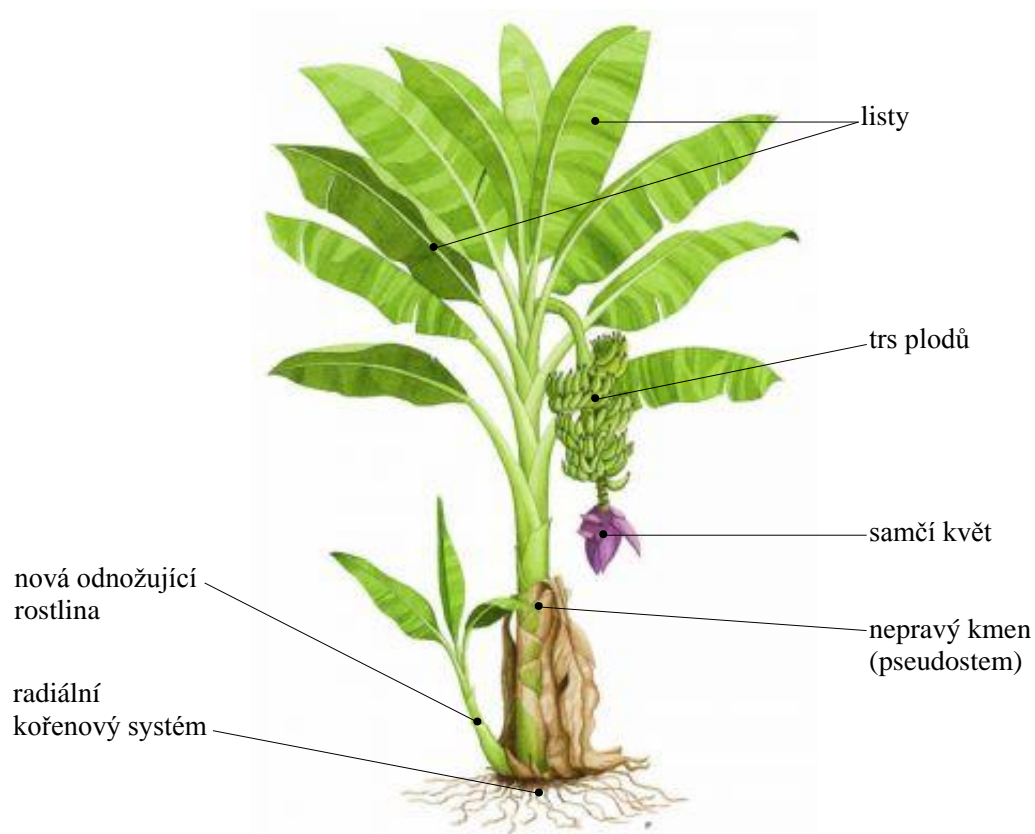
2.1 Charakteristika banánovníků

2.1.1 Charakteristika banánovníků

Banánovníky patří mezi jednoděložné byliny rostoucí zejména v subtropických a tropických oblastech. Jejich původním areálem výskytu je pravděpodobně jihovýchodní Asie, ze které se později rozšířily i do jiných částí světa. Plané druhy se rozmnožují semeny nebo vegetativně odnožemi, které zakořeňují v blízkosti mateřské rostliny. Největší ekonomický význam mají však bezsemenné parthenokarpické druhy banánovníku, které se množí výhradně odnožemi. Ačkoliv jsou plody banánovníků jednou z nejdůležitějších komerčních plodin na světě, odhaduje se, že 87% banánové produkce je určeno pouze pro lokální spotřebu (De Langhe a kol., 2009). Banány mohou být konzumovány syrové, vařené, pečené nebo sušené. Ze speciálních odrůd je možné vařit pivo („beer banana“) nebo připravovat víno a ocet. Listy banánovníků se používají k balení jídla a k pokrývání střech obydlí. Z některých odrůd se vyrábí lana a textilie. Díky svému impozantnímu vzhledu se některé druhy pěstují jako okrasné rostliny.

2.1.2 Morfologie banánovníků

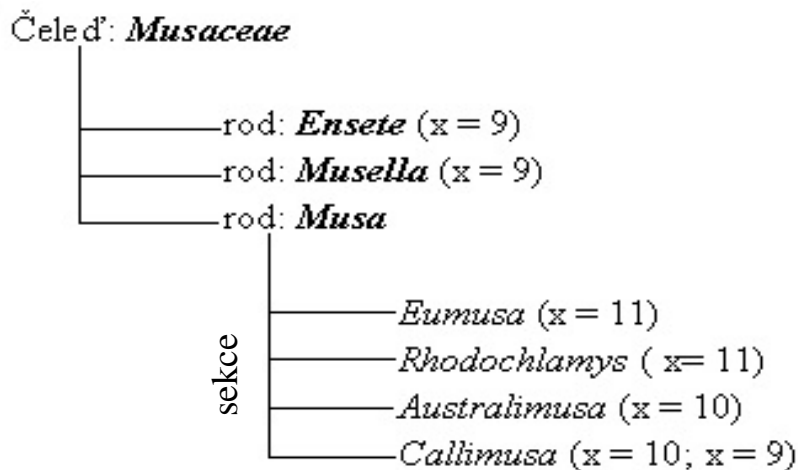
Banánovníky jsou víceleté vytrvalé byliny dosahující výšky nejčastěji kolem 3 m (Obr. 1). Některé planě rostoucí druhy jsou vysoké až 15 m. Stonek rostliny se nachází těsně pod povrchem půdy a funguje hlavně jako zásobní orgán. Základem rostliny je nepravý kmen (pseudostem), který je tvořen listovými pochvami. Listy vyrůstají z pseudostemu ve šroubovici a dosahují délky okolo 2,7 m a šířky až 60 cm. Řapíkaté listy jsou oválného až podlouhlého tvaru. Kořenový systém je radiální. Zygomorfni květy jsou nahloučeny ve vrcholičnatá terminální květenství. Spodní semeník je obklopen 5 tyčinkami a chráněn 5 srostlými a 1 volným okvětním lístkem. Plody (bobule) planých druhů obsahují množství černých tvrdých semen obklopených dužinou. Naopak jedlé druhy jsou bezsemenné. Plody banánovníků rostou v trsech, které dosahují váhy 20-40 kg.



Obr. 1: Morfologie banánovníku (převzato a upraveno z <http://old.iita.org>).

2.1.3 Taxonomická klasifikace

Čeleď *Musaceae* je řazena do následujícího systému: říše *Plantae* (rostliny), oddělení *Magnoliophyta* (krytosemenné), třída *Liliopsida* (jednoděložné), podtřída *Commelinidae*, řád *Zingiberales* (zázvorníkotvaré). Podtřída *Commelinidae* obsahuje kromě řádu *Zingiberales* i další ekonomicky významné řády jako jsou *Poales*, *Commelinales* a *Aracales*. Čeleď *Musaceae* se skládá z rodů *Musa*, *Ensete* a *Musella*. Tradiční klasifikace na úrovni druhů vychází z morfologické charakteristiky a základního chromozomového čísla.



Rod *Ensete* je sympatrický s rodem *Musa*. Zástupci rodu *Ensete* se vyskytují v Asii a také v oblastech tropické Afriky (De Langhe a kol., 2009). Rod obsahuje asi jen osm nebo devět druhů, přičemž nejdůležitějším je druh *Ensete ventricosum*, jehož podzemní stonk se v oblasti Etiopie konzumuje. Rod *Musella* je pravděpodobně monospecifický a představuje ho jediný endemický druh *M. lasiocarpa*, který se vyskytuje v horách jihovýchodní Asie. Ačkoliv byl v nedávné době zaznamenán další druh *M. splendida*, mnoho autorů považuje oba druhy za totožné.

Rod *Musa* obsahuje přibližně 50 druhů a to včetně všech jedlých typů banánovníku. Cheesman (1947) rozdělil rod *Musa* do 4 pomocných taxonomických skupin - sekcí: *Eumusa*, *Rhodochlamys*, *Australimusa* a *Callimusa*. *Eumusa* je nejpočetnější sekcí a zahrnuje převážnou většinu jedlých typů banánovníku, které vznikly přirozeným inter- a intraspecifickým křížením dvou planě rostoucích diploidních druhů: *M. acuminata* (A genom, $x = 11$) a *M. balbisiana* (B genom, $x = 11$) (Simmonds a Shepherd, 1955). Evoluce některých hybridů zahrnuje také křížení s druhem *M. schizocarpa* (S genom, $x = 11$) a s druhem *M. textilis* (T genom, sekce *Australimusa*, $x = 10$). Převážná většina jedlých typů banánovníku je triploidních ($2n = 3x = 33$). Existují však i diploidní jedlé typy ($2n = 2x = 22$) nebo tetraploidní klony ($2n = 4x = 44$).

Mezi jedlými typy banánovníku sekce *Eumusa* se obvykle rozlišují tzv. „Highland bananas“ a „dessert bananas“ (genom AAA), plantainy (genom AAB) a „cooking bananas“ (genom ABB), které se vyznačují vysokým obsahem škrobu. Hlavním exportním typem jsou sladké „dessert bananas“. Plantainy a „cooking bananas“ se konzumují především lokálně a to až po tepelné úpravě. Další významnou skupinou jedlých typů banánovníku jsou tzv. Fe'i

banány, které vznikly nezávisle na evoluci jedlých typů ze sekce *Eumusa*. Fe'i banány náleží do sekce *Australimusa* a jejich přesný původ není znám. Předpokládá se, že na jejich evoluci se podílely druhy *M. maclayi* a *M. lolodensis* (Simmonds 1956, Cheesman 1950, Jarret a kol., 1992). Vyskytují se v oblastech Mikronésie, západního Pacifiku a Francouzské Polynésie. Jsou známé především pro vysoký obsah provitaminu A a prekursorů karotenu. Fe'i banány se konzumují vařené, avšak jeden typ – kultivar 'Karat' se v oblastech Mikronésie konzumuje v syrovém stavu (Englbergera kol., 2006).

Tradiční klasifikace rodu *Musa* využívající morfo-taxonomická data a základní chromozomové číslo byla zpochybněna již Simmondem (1962) a Shepherdem (1999). Argent (1976) vznesl návrh na vytvoření další sekce *Ingentimusa* obsahující jediný druh *M. igens* ($x = 7$). V přírodě jsou časté hybridizace mezi jednotlivými druhy, které sdílejí podobný areál výskytu. A některé druhy, jako např. *M. beccarii* nebo další především nově popsané druhy (Häkkinen, 2004, 2005), je obtížné taxonomicky zařadit. Na základě RFLP analýzy Gawel a kol. (1992) navrhl sloučení sekcí *Eumusa* a *Rhodochlamys* a dále Gawel a Jarret (1995) navrhli spojení sekcí *Australimusa* a *Callimusa*. Ke stejným závěrům došel i Wong (2002) na základě AFLP analýzy. Také fylogenetická analýza ITS oblasti (Li a kol., 2010; Liu a kol., 2010; Hřibová a kol., 2011) potvrdila blízký příbuzenský vztah mezi sekcemi *Australimusa/Callimusa* a *Eumusa/Rhodochlamys*. Analýza nepodpořila monofyletičnost rodu *Musella*, který byl jako samostatný rod klasifikován hlavně na základě morfologie a naopak naznačila blízký příbuzenský vztah mezi rody *Musella* a *Ensete*. Systém čeledi *Musaceae* tak není ani dnes zcela vyřešen a správnost současné klasifikace je stále předmětem diskuze.

2.1.4 Ekonomický význam banánovníků

Jako základní zdroj potravy se banánovníky pěstují ve více než 130 zemích tropických a subtropických oblastí. Největším producentem banánů je Indie s roční produkcí 11 milionů tun (<http://www.nationmaster.com>), zatímco největšími exportéry jsou Ekvádor, Kostarika, Kolumbie a Filipíny. Celosvětově jsou banány po rýži, pšenici a kukuřici čtvrtou nejdůležitější plodinou. Zejména v rozvojových zemích Afriky představují důležité potravinové zabezpečení. Největší spotřeba banánů na osobu je v Ugandě (300 kg/rok).

Většina produkce je určena pouze pro lokální spotřebu a je vypěstována tamními drobnými zemědělci. Místní farmáři si však obvykle nemohou dovolit používání nákladných pesticidů, a o to více je jejich produkce náchylná k patogenům. V kombinaci s ne příliš úrodnou půdou tak výnosy v Africe neustále klesají (4 - 15 t/ha).

Banánovníky jsou jedny z prvních rostlinných druhů, které se začaly domestikovat. Díky klonální propagaci jsou pěstovaní zástupci citliví k různým houbovým, bakteriálním a virovým chorobám. Onemocnění „Panama disease“ způsobené houbou *Fusarium oxysporum fsp. cubense* patří k nejzávažnějším chorobám postihující banánovníky. Nemoc se poprvé objevila v Austrálii a rozšířila se téměř do všech regionů, kde se pěstují banány. Toto onemocnění zdevastovalo úrodu, v té době hlavní exportní variety sladkých banánů - ‘Gros Michel’ (AAA), která byla v 50. a 60. letech 20. století nahrazena rezistentnějším kultivarem ‘Cavendish’ (AAA). ‘Cavendish’ je dodnes hlavní exportním typem sladkých banánů.

Mezi další houbové choroby napadající banánové plantáže patří i dva druhy onemocnění zvané „Sigatoka“. Původcem onemocnění „Sigatoka“ jsou druhy *Mycosphaerella musicola* a *Mycosphaerella fijiensis*. Banánovníky postihuje však i celá řada bakteriálních a virových onemocnění a škůdců. Mezi bakteriální onemocnění patří choroba nazývaná „Moko“, jejímž původcem je bakterie *Pseudomonas solanacearum*. Nejzávažnějšími virovými chorobami jsou tzv. „Banana bunchy top virus“ a „Banana streak badnavirus“. Obecně rozšířenými parazity jsou háďátka nebo savý hmyz *Pentalonia nigronervosa*, přenášející onemocnění „bunchy top“ (Stover a Simmonds, 1987).

Nadměrné množství insekticidů používaných v intenzivním zemědělství sladkých typů určených pro vývoz značně zatěžuje životní prostředí. Šlechtění nových rezistentních kultivarů je však problematické kvůli polyploidii, vegetativnímu způsobu rozmnožování a partenokarpii banánovníku. Jistou překážkou ve šlechtění je také dosud nevyjasněná evoluce jedlých typů. Ukazuje se, že efektivní šlechtění banánovníku vyžaduje znalost evoluce a struktury jejich jaderného genomu (Doležel a Bartoš, 2005). Malá velikost chromozomů (1,5 – 3,5 μm) však znesnadňuje klasickou cytogenetickou analýzu (Isobe a Hashimoto, 1994; Osuji a kol., 1996). V zárodečné linii rodu *Musa* je nicméně obsaženo dostatek genetické diverzity, která má potenciál vyhovět nárokům kladených pěstiteli (Heslop-Harrison a Schwarzacher, 2007).

2.1.5 Diverzita banánovníků a problémy provázející charakterizaci diverzity

Předpokládaným centrem přirozené diverzity banánovníku je oblast JV Asie - Malajsie a Indonesie. Sub-saharská Afrika je považována za centrum sekundární diverzity. Sekundární diverzita zahrnuje rozmanitost nových forem odvozených z akumulace somatických mutací v kombinaci s lidskou selekcí.

Jak již bylo řečeno, na vzniku většiny jedlých typů banánovníku mají největší podíl druhy *M. acuminata* a *M. balbisiana*. *M. balbisiana* jsou statné rostliny, které disponují výhodnými agronomickými vlastnostmi, jako je rezistence k patogenům a schopnost snášet suché a chladné prostředí (Ude a kol., 2002). Představují tak cenný genetický zdroj pro šlechtění odolnějších forem banánovníku. Zatímco morfologická i genetická variabilita druhu *M. balbisiana* je relativně malá, druh *M. acuminata* se diverzifikoval do několika poddruhů. Fylogenetická analýza čeledi *Musaceae* ukázala, že zástupci *M. Balbisiana* (B genom) jsou samostatnou fylogenetickou skupinou (Hřibová a kol., 2011; Li a kol., 2010; Liu a kol., 2010; Wong a kol., 2002), která v rámci sekce *Eumusa* divergovala asi před 27,9 mil. lety (Christelová a kol., 2011). Oddělení druhů *M. balbisiana* a *M. acuminata* a jejich následný samostatný vývoj je zvláště zajímavý, vezmeme-li v úvahu jejich společnou roli při vzniku jedlých typů banánovníku (Christelová a kol., 2011).

Jak bylo uvedeno výše, k základním charakteristikám každého druhu patří morfotaxonomický popis a znalost ploidního stupně (počtu chromozomů). Pro stanovení ploidie zástupců čeledi *Musaceae* se hojně využívá průtoková cytometrie. Pomocí cytometrických metod je možné rychle a přesně zjistit nejen ploidní stav, ale také například velikost genomu. Ačkoliv jsou morfologický popis a průtoková cytometrie hlavními nástroji k určení genetické diverzity, tyto metody mají své limity. Pokud jsou rostliny studovány v odlišných přírodních regionech, zůstává otázkou, do jaké míry se na fenotypovém projevu podílí vliv vnějšího prostředí a na kolik je fenotyp ovlivněn geneticky. Proto se stále častěji pro analýzu genetické diverzity začíná využívat různých typů molekulárních markerů.

Jak již bylo řečeno, většina jedlých typů banánovníku jsou klonálně se množící bezsemenné rostliny, které jsou náchylné vůči široké škále patogenů a škůdců. Za účelem zachování genetické rozmanitosti banánovníků byla vytvořena genová banka se sídlem v Belgii (<http://www.crop-diversity.org/banana/>). Bioversity's International Transit Centre (ITC kolekce) uchovává přibližně 1300 položek rodu *Musa*. Původně byla genová banka – ITC kolekce, vytvořena pro uchování diverzity především jedlých typů banánovníku. V dnešní

době, se však rozšiřuje také o planě rostoucí druhy. ITC kolekce banánovníku tak představuje cennou sbírku, která je snadno přístupná všem výzkumným a šlechtitelským pracovištím. Vzhledem k vegetativnímu množení převážné většiny druhů, jsou v genové bance jednotlivé položky uchovávané jako *in vitro* rostlinky. To však přináší celou řadu komplikací. Především možnost záměny nebo smíchání jednotlivých položek při pasážování na nové živné medium.

Ke studiu genetické diverzity čeledi *Musaceae* byly použity rozmanité typy molekulárních a biochemických markerů. Anthocyaninová (Horry a Jay, 1988) a izozymová analýza (Jarret a Litz, 1986) v minulých letech poukázala na obrovskou rozmanitost druhů v rámci rodu *Musa*. Později se staly dostupnými molekulární markery jako RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), SSR (Simple Sequence Repeats), IRAP (Inter-retrotranspozon Amplified Polymorphism), DArT (Diverzity Arrays Technology), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) a RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism). Zejména SSR a DArT markery byly úspěšně použity ke studiu zárodečné linie a k určení příbuzenských vztahů mezi jednotlivými kultivary.

2.2 Molekulární fylogenetika

2.2.1 Molekulární fylogenetika

Molekulární fylogenetika představuje samostatný vědní obor, který se zabývá využitím molekulárních dat pro účely fylogenetiky a systematické biologie. V minulých letech byla populární zejména analýza biochemických markerů (izoenzymů a sekundárních metabolitů). Dnes se nejčastěji využívá DNA markerů, které jsou oproti izoenzymům více variabilní, poskytují informace o primární struktuře DNA a jsou nezávislé na podmínkách prostředí. DNA markery používané v molekulární fylogenetice by měly splňovat několik předpokladů – četné a rovnoměrné zastoupení v genomu, vysoký stupeň polymorfismu, experimentální nenáročnost a dobrá reprodukovatelnost výsledků.

Zatímco většina klasických znaků má spíše kvantitativní charakter, molekulární znaky mají téměř vždy charakter kvalitativní. Molekulární znaky se v praxi zjišťují pomocí přímých (sekvenování NK) nebo nepřímých (např. hodnocení přítomnosti restrikčních míst) metod. Nepřímé metody mají své přednosti v jednoduchosti, rychlosti a finanční nenáročnosti.

Sekvenování nám však umožňuje získat úplnou informaci, která je v DNA zapsána. S příchodem sekvenačních metod nové generace došlo navíc k výraznému zefektivnění celého procesu a snížení provozních nákladů.

2.2.2 Molekulární markery nezávislé na sekvenci DNA

Molekulární markery, které nevyžadují předchozí znalost sekvence DNA, jsou založeny na PCR reakci nebo na hybridizaci. Mezi DNA markery založené na hybridizaci patří jedny z prvních v praxi používaných DNA markerů – RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism). Genomová DNA je při tomto přístupu nejdříve štěpena restriční endonukleázou. Získané fragmenty, které mohou být vlivem mutací specifické pro studované jedince, jsou rozděleny pomocí elektroforézy a přeneseny na nylonovou membránu. Poloha fragmentů se detekuje hybridizací se značenou sondou (Southern, 1975, cit. Botstein a kol., 1980; Seibl a kol., 1990; Mansfield a kol., 1995). Nevýhodou metody je technická i časová náročnost a potřeba vysoké výchozí koncentrace DNA (~ 10 µg). Další, modernější technikou, která oproti RFLP analýze umožňuje automatizaci je tzv. DArT technologie (Diversity Arrays Technology; Jaccoud a kol., 2001). Jedná se o vysoce výkonnou metodu nezávislou na sekvenci, která je schopna objevit stovky polymorfních markerů během jednoho experimentu (Wenzl a kol., 2004). DArT detekuje hlavně dominantní markery, pocházející z jednonukleotidového polymorfismu restričních míst. K redukci komplexity genomové DNA a vytvoření genomové reprezentace je možné využít řadu přístupů, například štěpení DNA restričními enzymy. V tomto případě jsou ke vzniklým restričním místům připojeny adaptéry, které slouží jako cílová místa pro přisednutí komplementárních primerů. Sekvence ohraničené primery jsou následně amplifikovány PCR reakcí. DArT vychází z předpokladu, že vytvořená genomová reprezentace obsahuje dva typy fragmentů: konstantní a variabilní (polymorfní). Konstantní fragmenty se nachází u všech jedinců daného druhu, zatímco variabilní fragmenty (DArT markery) jsou přítomny jen u některých jedinců. Dalším krokem je vytvoření DNA knihovny, která pokrývá genetickou diverzitu zkoumaného druhu. DNA knihovna vzniká sloučením genomových reprezentací vybraných jedinců daného druhu, na které byla aplikována stejná metoda redukce komplexity jako na individuální vzorek DNA. Fragmenty DNA knihovny jsou klonovány v bakteriích *E. coli*. Jednotlivé klony jsou

přeneseny na mikročip, na kterém probíhá hybridizace s fluorescenčně značenou genomovou reprezentací.

Dalším typem DNA markerů hojně využívaných pro genotypování jsou markery založené na PCR reakci. Příkladem jsou vysoce polymorfní RAPD markery. Metodika RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA; Williams a kol., 1990) je velmi jednoduchá, získané výsledky jsou však obtížně reprodukovatelné a téměř neporovnatelné (Ellsworth a kol., 1993). V prvním kroku se komplexní DNA podrobí PCR reakci za použití náhodných dekanukleotidových primerů. Pravděpodobnost, že se v genomu ve vhodné vzdálenosti od sebe nachází homologní sekvence k použitému oligonukleotidu, je vysoká. Výsledkem je celá skupina amplifikovaných fragmentů, které se dále rozdělí elektroforézou.

Později vyvinutou alternativu metody RAPD představuje AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism; Vos a kol., 1995), která se vyznačuje vysoce polymorfním charakterem, spolehlivostí a snadnou reprodukovatelností. V prvním kroku se štěpí genomová DNA dvěma restrikcími enzymy (produkující kohézní konce), z nichž jeden štěpí DNA podstatně častěji. Na získané fragmenty se naligují adaptéry o známé sekvenci. Adaptéry slouží jako cílová místa pro přisednutí primerů a PCR amplifikaci. Pro redukci amplifikovaných fragmentů jsou primery používané pro amplifikaci prodlouženy vůči adaptéru o jednu až tři báze. Dochází tak k tzv. selektivní amplifikaci. V posledním kroku se fragmenty rozdělí gelovou elektroforézou. Kapacita a přesnost metody může být zvýšena použitím fluorescenčně značených primerů a kapilární elektroforézy. Jistou nevýhodou však zůstávají požadavky na kvalitu a relativně vysoké množství vstupní genomové DNA.

Výše zmíněné metody, kromě RFLP, využívají dominantní markery. Zástupcem kodominancí markerů založených na PCR jsou DNA markery odvozené od sekvencí mikrosatelitů – SSR (Simple Sequence Repeats). Mikrosatelity jsou krátké (1 - 6 bp) tandemově uspořádané repetitivní sekvence DNA. V počtu jednotek opakování těchto repetitiv v rámci jednoho lokusu existuje v populaci obvykle velký polymorfismus (Hippolyte a kol., 2012; Barkley a kol., 2006; Ma a kol., 2009; Billotte a kol., 2001), který je nejčastěji způsoben tzv. sklouznutím polymerázy při replikaci genomové DNA. K detekci těchto polymorfismů se využívá PCR amplifikace daného lokusu pomocí specifických primerů. Délka jednotlivých alel se ověřuje polyakrylamidovou elektroforézou anebo s využitím fluorescenčně značených primerů je možné použít kapilární elektroforézu.

Kromě sekvencí mikrosatelitů se pro studium genetické diverzity často používají i jiné typy repetitivních sekvencí – například retrotranspozony. Díky častým inzercím do genomu,

perzistenci, konzervované struktuře a vysokému počtu kopií jsou výhodnými molekulárními markery. Retrotranspozony se v genomu mohou šířit procesem retrotranspozice, který se skládá z transkripce, reverzní transkripce a inserce nové kopie do jiného místa genomu. Mezi metody využívající specifických integrací retrotranspozonů do genomu patří SSAP (Sequence-specific Amplified Polymorphism; Waugh a kol., 1997), IRAP (Inter-retrotranspon Amplified Polymorphism; Kalendar a Schulman, 2006), REMAP (Retrotranspon-microsatellite Amplified Polymorphism; Kalendar a kol., 2006) a RBIP (Retrotranspon-based Insertion Polymorphism; Flavell a kol., 1998).

2.2.3 Molekulární markery založené na sekvenování

Sekvenování je nejpřesnějším způsobem studia genetické informace, při kterém se určuje přesné pořadí nukleotidů v určitém úseku molekuly DNA a využívá tzv. SNP markerů (Single Nucleotide Polymorphism). Ve fylogenetických studiích rostlin jsou nejpoužívanějšími DNA sekvencemi chloroplastové a mitochondriální geny a krátký mezerník (ITS) oddělující ribozomální geny v 45S rDNA lokusu (viz. kapitola 2.3).

V dřívějších letech byla molekulární fylogenetika rostlin založena výlučně na analýze genů a mezerníků pocházejících z plastidů. Jedním z prvních sekvenovaných genů byl *rbcL* kódující velkou podjednotku enzymu rubisca (ribuloso-1,5-bisfosfát-karboxylasa/oxygenasa). Gen *rbcL* se nachází v cpDNA pouze v jedné kopii a není přerušován introny, což usnadňuje alignment sekvencí. Vyvíjí se pomalu konzervativní rychlostí a je vhodný k rekonstrukci fylogeneze na úrovni řádů a čeledí. Dalšími užitečnými chloroplastovými geny jsou *atpB*, *ndhF*, *matK*. K objasnění fylogenetických vztahů mezi rody *Musa* a *Ensete* byly použity například mezerníky a introny z oblasti *trnT* a *trnF* cpDNA (Bekele a Shigeta, 2011). Velký počet kopií organelové DNA v buňce usnadňuje PCR amplifikaci. Využití chloroplastových genů je však zatíženo zejména jejich uniparentální dědičností. Také hrozí nebezpečí přenosu chloroplastů z jednoho druhu do druhého intrograsí. Další nevýhodou je nízká evoluční rychlost organelové DNA ve srovnání s jadernými geny (Eyre-Walker a Gaut, 1997).

Vhodnou alternativu k oběma typům markerů představují jednokopiové geny („single copy“) a geny s malým počtem opakování („low-copy“). U „low-copy“ genů je však obtížné rozlišit ortology a paralogy. Ke správné fylogenetické analýze vede pouze porovnávání ortologních genů, které vznikly speciací. Naproti tomu paralogy vznikly genovou duplikací a

následnou divergencí. Využití více nezávislých genových sekvencí pro fylogenetickou analýzu se ukázalo být mnohem přesnější (Rokas a kol., 2003; Carling a Brumfield, 2007). Vyrůstající množství analyzovaných genů ve větším počtu evolučně vzdálenějších taxonů však představuje limity v oblasti dostupnosti vhodných markerů a narůstá i finanční náročnost metodiky.

Omezení spojená s nedostupností většího počtu jednokopiových markerů vhodných pro fylogenetické studie je možné překonat díky aplikaci nových masivně paralelních sekvenačních metod (např. Illumina, 454, SOLID, Helicos, SMRT; Degnan a Ochman, 2012; Galan a kol., 2010; Hudson, 2008; Vera a kol., 2008). Díky těmto metodám je možné získat a analyzovat velké množství (tisíce - desetitisíce) SNP markerů, a to i ve velkém souboru analyzovaných taxonů. Menší komplikací při aplikaci nových sekvenačních metod je pro některé laboratoře relativně vysoká cena jedné sekvenační reakce, avšak doba, za kterou je možné sekvenační data získat a množství získaných dat je nesrovnatelné s jinými experimentálními přístupy. V konečném důsledku je cena za osekvenovanou bázi nesrovnatelně nižší než cena „klasického“ Sangerova sekvenování. Přístupy využívající nové sekvenační technologie se tedy vyplatí použít pro studium diverzity a fylogeneze souborů většího počtu taxonů. Prudký vývoj v této oblasti naznačuje, že se v nedaleké době masivně paralelní sekvenování stane nejvyužívanějším nástrojem nejen pro analýzu genetické diverzity nebo fylogeneze.

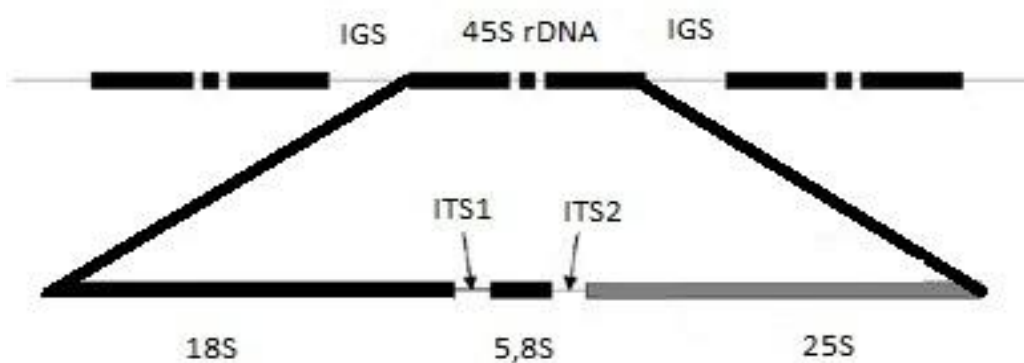
2.3 Využití ITS v molekulární fylogenetice rostlin

2.3.1 Struktura ribosomální DNA

Geny kódující rRNA jsou nejvíce konzervovanými a zároveň nejvíce používanými geny eukaryot. Redundance rRNA genů není překvapivá, uvážíme-li velký počet ribozomů přítomných v buňce. Geny kódující 45S rRNA jsou uspořádány tandemově za sebou ve stovkách až tisících kopiích. Jejich syntéza probíhá v oblastech organizátoru jadérka (NOR) a je katalyzována RNA-polymerázou I. Geny pro 5S rRNA nejsou u eukaryot umístěny v oblastech organizátoru jadérka. Místo toho se nachází na několika chromozomech, kde jsou přepisovány RNA-polymerázou III.

Jednotka 45S rDNA obsahuje u rostlin geny pro 18S, 5.8S a 25S rRNA, které jsou navzájem odděleny vnitřními transkribovanými mezerníky (internal transcribed spacer, ITS). Konkrétně mezi 18S a 5.8S rDNA se nachází ITS1 a mezi 5.8S a 25S rDNA se nachází ITS2 (Obr. 2). Pro evoluci rRNA genů je typický proces tzv. evoluce v koncertu (viz níže, kapitola 2.3.2.), která zajišťuje vysokou míru homogenity tohoto lokusu. Ačkoliv jsou geny pro rRNA velmi konzervované, mezigenové mezerníky se vyvíjejí poměrně rychle a jsou vystaveny nižšímu selekčnímu tlaku. Oba mezerníky jsou během zpracování primárního rRNA transkriptu vystřiženy. Ačkoliv ITS nejsou inkorporovány do výsledné molekuly rRNA, obsahují signály, které jsou nutné pro správné zpracování rRNA transkriptů. Celý proces ještě není detailně pochopen, ale jisté je, že významnou roli hraje skládání primárního rRNA transkriptu do příslušné sekundární struktury. Tato prostorová struktura je následně rozpoznána multiproteinovým enzymovým komplexem, který oba mezerníky vystřihne.

45S rDNA jednotky jsou navzájem odděleny dlouhými netranskribovanými mezerníky (intergenic spacer, IGS). Mezerníky IGS se vyvíjí nejrychleji a podstatná část jejich sekvence je tvořena různým počtem opakujících se subrepetic. Konzervovanou doménou IGS je oblast promotoru, od kterého začíná transkripce. Díky vysoké variabilitě na úrovni primární struktury DNA, a to i mezi blízce příbuznými druhy je IGS, respektive jeho části, vhodným molekulárním markerem pro taxonomická studia. Jistou nevýhodou použití IGS ve fylogenetice je jeho délka a struktura obsahující repetitivní jednotky, které znesnadňují sestavení celkové sekvence IGS oblasti a identifikaci úseků vhodných pro vývoj markerů.



Obr. 2: Struktura rDNA. Tandemově uspořádané transkripční jednotky 45S rDNA jsou odděleny mezigenovými mezerníky (IGS). Jednotka 45S rDNA se skládá z genů pro 18S, 5.8S a 25S rRNA. Mezerník ITS1 odděluje 18S a 5.8S geny a mezerník ITS2 odděluje 5.8S a 25S geny (převzato a upraveno z <http://www2.dijon.inra.fr>).

2.3.2 Evoluce v koncertu

Jak již bylo řečeno, ribozomální geny jsou nejznámějším příkladem multigenové rodiny podléhající evoluci v koncertu. Mezi předpokládané mechanismy odpovědné za evoluci v koncertu patří nestejnsměrný crossing-over a genová konverze (Dover, 1982; Baldwin a kol., 1995; Elder a Turner, 1995; Alvarez a Wendel 2003, Kovařík a kol., 2004). Mechanismus evoluce v koncertu byl poprvé navržen Brownem (1972), který studoval rRNA geny u žáby drápatky (*Xenopus*).

V genomu každého jedince jsou rRNA geny vysoce uniformní ve své sekvenci, ale tato sekvence se mezi různými jedinci liší. K homogenizaci genů dochází především prostřednictvím intrachromozomové rekombinace. Méně frekventovaná je interchromozomální genetická výměna, která je zprostředkována zejména genovou konverzí. Genová konverze představuje jednosměrný přenos úseku DNA mezi donorovým a recipientním genem a může probíhat i na nehomologních chromozomech. Nerovnoměrný crossing-over se odehrává zejména jako intrachromatidová rekombinace nebo jako

nereciproká výměna genetického materiálu mezi sesterskými chromatidami. K nerovnoměrnému crossing-overu dochází při párování dvou vzájemně komplementárních, ale přitom nehomologických úseků DNA. Celý proces vede k náhodnému zvýšení nebo snížení počtu repetitivních kopií na chromozomu.

Homogenizace rDNA lokusů tak může být vysvětlena prostřednictvím těchto procesů: vznikem mutace, šířením nové mutace prostřednictvím nerovnoměrné rekombinace a selekcí, která v genomu udržuje pouze funkční kopie genů. Proto mutace vznikající v nekódujících oblastech rDNA mají větší šanci přepsat sekvence ostatních genů. Naopak mutace vznikající v kódujících oblastech genů jsou pod selekčním tlakem rychle eliminovány. Jediným předpokladem homogenizace je, že rychlost nerovnoměrné rekombinace musí být vysoká ve srovnání s mutační rychlostí.

Sledovat dynamiku a rychlost homogenizace tandemově uspořádaných rRNA genů je možné specifickým označením jednoho z těchto genů. Jednotku rDNA lze označit, a tak monitorovat vytvořením malé mutace v nekódující oblasti (Ganley a Kobayashi, 2011) nebo pomocí selekčního markeru (Szostak a Wu, 1980; Petes, 1980). Bylo zjištěno, že duplikace a delece jednotek rDNA jsou velmi časté a odehrávají se podobnou rychlostí. U *Saccharomyces cerevisiae* byly v oblasti rDNA pozorovány rozsáhlé delece (Ganley a Kobayashi, 2011). Tyto delece se možná aktivně podílejí na homogenizaci a celý proces výrazně urychlují.

Model mechanismu evoluce v koncertu byl ve svých počátcích aplikován na vysvětlení vzniku a vývoje i ostatních genových rodin. Nicméně homogenizace členů genových rodin může být dosaženo také silnou purifikující selekcí bez účasti evoluce v koncertu. Podle současných představ mnohé genové rodiny, zejména ty, které kódují variabilní genové produkty, jsou předmětem tzv. „birth and death“ evoluce (Nei a Rooney, 2005). Tento evoluční model působí hlavně prostřednictvím přirozené selekce, která homogenizuje členy dané genové rodiny. Předmětem „birth and death“ evoluce jsou zejména genové rodiny imunitního systému, histonů a ubikvitinů. Podle tohoto modelu vznikají nové geny genovou duplikací, přičemž některé duplikované geny jsou v genomu udržovány po dlouhý čas, zatímco jiné jsou deletovány nebo degradují v pseudogeny. Duplikované geny mohou získat novou funkci. „Birth and death“ evoluce se tedy může podílet na vzniku nových funkčních genů, zatímco pod vlivem evoluce v koncertu jsou geny rapidně homogenizovány a jejich diferenciace je potlačena.

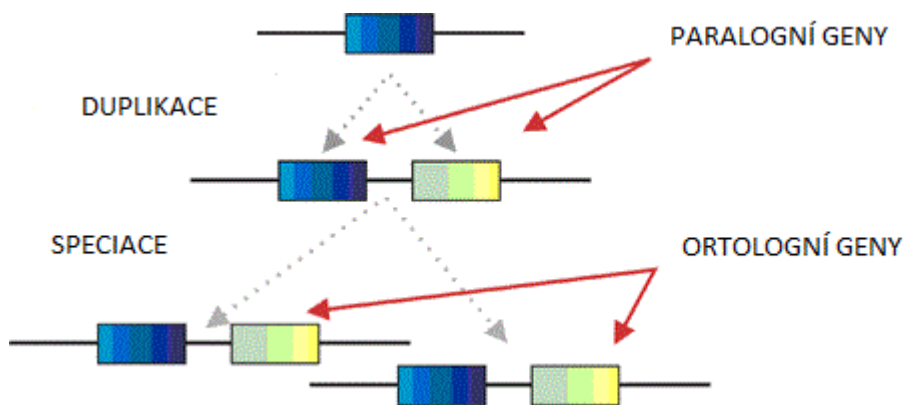
2.3.3 Divergentní paralogy ribozomální DNA

Mnohonásobné kopie rRNA genů mohou kromě funkčních ortologů obsahovat také paralogní sekvence vzniklé genovou duplikací (Obr. 3). Jak bylo nastíněno výše, předpokládá se, že následkem evoluce v koncertu dochází k rapidní homogenizaci rRNA genů. Ne vždy však homogenizace rDNA drží tempo s variabilitou, která je generována různými procesy na úrovni genomu. Více typů rRNA genů se v genomu může setkat procesy jako hybridizace nebo introgrese. Divergentní rRNA paralogy pak mohou ukrývat jak funkční kopie genů, tak pseudogeny nebo rekombinantní geny.

Pokud homogenizace není zcela dokončená, pak paralogní rRNA geny nesdílejí identické sekvence, ale naopak vykazují menší či větší stupeň polymorfismu. Geny kódující 18S a 25S rRNA jsou vystaveny selekci, která vede k zachování jejich konzervované sekvence. Nejvíce pozorovaného intragenomového polymorfismu se tedy nachází v nekódujících mezernících.

Značné množství intraindividuálního polymorfismu odhalila například molekulární analýza ITS oblasti v rodě *Cykas* (Xiao a kol., 2010) a v rodě *Mammillaria* (Harpke a Peterson, 2006). V rodě *Mammillaria* bylo u některých jedinců identifikováno pět i více typů ITS mezerníku. Navíc většina ITS mezerníků byla nefunkčních (pseudogeny). U cykasů je neúplná homogenizace pravděpodobně spojena s vysokým počtem jadérek. NORs rozptýlena na nehomologních chromozomech vedou ke zpomalení evoluce v koncertu. Rychlost homogenizace je také ovlivněna polohou jadérek na chromozomu (intersticiální nebo terminální). Intragenomová variabilita lokusů rDNA byla zjištěna i u dalších rostlin (Buckler a kol., 1997; Baker a kol., 2000; Mayol a Rosseló, 2001; Grimm a Denk, 2007; Zheng a kol., 2008).

V mnoha hybridech a allopolyploidech bylo pozorováno epigenetické umlčování rRNA genů jednoho z rodičů. Jaký je vztah mezi homogenizací rDNA lokusů a epigenetickým umlčováním neboli nukleolární dominancí zůstávalo po dlouhou dobu nejasné. Nyní se předpokládá, že vysoká úroveň epigenetického umlčování je spojena s minimální homogenizací rDNA lokusů. Naopak kompletní homogenizace rDNA souvisí s nepřítomností epigenetického umlčování (Dadejová a kol., 2007). Směr homogenizace může být mezi různými jedinci téhož druhu odlišný. Obousměrná homogenizace byla například pozorována u allopolyploidů rodu *Glycin* (Joly a kol., 2004) nebo *Gossypium* (Wendel a kol., 1995). Je pravděpodobné, že směr homogenizace je řízen epigenetickým imprintingem a je určen již u časných allopolyploidů.



Obr. 3: Vznik paralogních a ortologních genů. Paralogní geny prošly v průběhu evoluce jednou či několika duplikacemi, po kterých mohlo následovat rozrůznění jejich struktury a funkce. Ortologní geny vzniklé speciací jsou v genomu zastoupeny pouze v jedné kopii, která u všech zkoumaných organismů vykonává tutéž funkci (převzato a upraveno z <http://biol.lf1.cuni.cz>).

2.3.4 Využití ITS v molekulární fylogenetice rostlin

Jednou z nejpopulárnějších DNA sekvencí sloužící k určení fylogenetických vztahů je u rostlin vnitřní transkribovaný mezerník (ITS) rDNA lokusu. Oblast ITS1-5.8S-ITS2 byla poprvé v molekulární fylogenetice použita Baldwinem v roce 1992. ITS má několik jedinečných vlastností. Je to zejména dostupnost několika univerzálních nebo téměř univerzálních PCR primerů (White a kol., 1990). K navrhování primerů slouží konzervované sekvence ribozomálních genů. ITS se v genomu nachází v mnoha kopiích usnadňujících PCR amplifikaci, která je možná dokonce z herbářových položek. Také vhodná velikost regionu ITS1-5.8S-ITS2 (500 – 700 bp u krytosemenných rostlin) usnadňuje amplifikaci a umožňuje sekvenování bez nutnosti použití vnitřních primerů. Další výhodou je biparentální dědičnost ITS (ve srovnání s uniparentální dědičností organelové DNA).

Srovnání primárních sekvencí ITS je vhodné k fylogenetickým analýzám na úrovni druhů a rodů (Baldwin a kol., 1995; Feliner a Rosselló, 2007). Oproti genům nemá ITS mezerník

kodony a často obsahuje rozsáhlé indely. To může představovat problém při srovnávání sekvencí ITS mezi nepříbuznými organismy.

Jak bylo již uvedeno výše, sekundární struktura ITS mezerníků je důležitá pro správné zpracování rRNA transkriptů. Na rozdíl od ITS1 jsou prostorové struktury ITS2 a 5.8S rRNA v rámci rostlin vysoce konzervované. Mai a Coleman (1997) navrhli prostorovou strukturu ITS2, která je společná všem krytosemenným rostlinám a zeleným řasám. Tato konzervativní „four-finger struktura“ se skládá ze čtyř helixů (I - IV). Helix II je nejkratší a obsahuje pyrimidin-pyrimidinovou výdut'. Helix III je delší, obvykle se větví a obsahuje konzervovaný motiv TGGT v primární sekvenci. Nicméně ne všechny eukaryotické organismy mají stejný počet helixů a pouze helixy II a III jsou rozpoznatelné v zásadě u všech. Sekundární struktura ITS2 je konzervovaná mezi tak rozdílnými organismy jako jsou obratlovci a kvasinky nebo zelené řasy a vyšší rostliny. To naznačuje možnost využití ITS2 pro taxonomické analýzy i na vyšších úrovních než je druh či rod.

Nukleotidové báze tvořící vlásenky jsou tedy vystaveny evolučnímu omezení, které vede k zachování specifické sekundární struktury ITS2. Mutace, které vznikají v konzervovaných pozicích, jsou buď pod selekčním tlakem eliminovány, nebo jsou doprovázeny vznikem kompenzačních mutací v protilehlých pozicích. Tyto kompenzační mutace zachovávají párování bází v helixech a tedy i sekundární strukturu ITS2. Kompenzační párování bází však může vést k homoplázii a tím i k zastření fylogenetického signálu (Orchieng a kol., 2007; Álvarez a Wendel, 2003; Schlotterer a kol., 1994).

Navzdory evoluci v koncertu dochází u některých, především hybridních druhů, k mnohem složitější evoluci a heterogenizaci této oblasti, což omezuje obecnou využitelnost vnitřního přepisovaného mezerníku pro fylogenetické analýzy takovýchto taxonů (Álvarez a Wendel, 2003). Jak již bylo naznačeno, u hybridních druhů se může vyskytovat více typů ITS sekvence, a to především díky procesům spojených s hybridizací, polyploidizací a chromozomovou nebo genomovou duplikací. Evoluce rDNA lokusů v hybridech a zejména v allopolyploidech může být složitá a rodičovské sekvence rDNA mohou navzájem interagovat různými způsoby. Existují následující evoluční scénáře. U některých rostlin, jako je *Arabidopsis* (O' Kane a kol., 1996), *Brassica* (Bennet a kol., 1991) nebo *Silene* (Popp a Oxelman, 2001), rodičovské sekvence rDNA zůstávají v hybridech zachovány a vyvíjí se nezávisle bez vzájemné interakce. V tomto případě ITS sekvence mohou být velmi informativní a dokumentovat procesy hybridizace. V jiných případech rodičovské sekvence rDNA mezi sebou rekombinují a vznikají chimerické ITS, které se ve fylogenetických

analýzách chovají nevyzpytatelně. Třetí evoluční cestou je dominance jednoho typu rDNA, která může vést k neúplné nebo úplné homogenizaci rDNA lokusů.

Navíc, ne všechny kopie oblasti ITS1-5.8S-ITS2 zůstávají funkční. Některé degenerují a mění se v pseudogeny. Pseudogeny mohou představovat nefunkční kopie genů, které nepodléhají evolučním omezením a rychle akumulují mutace. Jejich zahrnutí do fylogenetických analýz může vést k chybnému výsledku fylogenetické analýzy - fylogenetickému stromu (Álvarez a Wendel, 2003; Mayol a Rosselló, 2001; Muir a kol., 2001). Pseudogeny mohou být „in silico“ identifikovány na základě obsahu GC bází, přítomnosti či nepřítomnosti konzervovaných motivů v sekvenci 5.8S rRNA genu a schopnosti ITS2 a 5.8S rRNA složit se do funkčních sekundárních struktur. Během PCR reakce může docházet k přednostní amplifikaci těchto pseudogenů, které díky vysokému obsahu AT bází snadněji denaturují (Wagner a kol., 1994; Harpke a Peterson, 2006). Tomu je možné zabránit modifikací PCR s přídavkem DMSO (dimethylsulfoxid). Ukazuje se však, že i ITS pseudogeny mohou být užitečnými ve fylogenetických analýzách (Orchieng a kol., 2007). Zejména mezi blízce příbuznými druhy, u kterých funkční rRNA geny představují omezený zdroj variability.

3 CÍLE PRÁCE

1. Izolace genomové DNA a PCR amplifikace úseku ITS1-5.8S-ITS2.
2. Klonování bakterií *E. coli* a pozitivní selekce transformantů.
3. PCR skríníng narostlých kolonií.
4. Sekvenování ITS oblasti u vybraných zástupců rodu *Musa*.
5. Analýza získaných DNA sekvencí a jejich mnohočetné přiřazení („multiple alignment“).

4 MATERIÁL A METODIKA

Praktická část předkládané bakalářské práce byla součástí rozsáhlého projektu zabývajícího se analýzou genetické diverzity čeledi *Musaceae*. Praktická část představovala analýzu ITS oblasti vybraných druhů čeledi *Musaceae*, které byly nově začleněny do genové banky. Cílem praktické části byly následující metody: izolace genomové DNA vybraných typů banánovníků; PCR amplifikace oblasti ITS1-5.8S-ITS2 ribozomální DNA pomocí specifických primerů; DNA klonování PCR produktů do elektrokompetentních bakterií; PCR amplifikace rekombinantních kolonií a příprava produktů pro sekvenování; sekvenování vybraných klonů a základní analýza dat včetně tzv. multiple alignmentu (mnohočetné přiřazení) získaných nukleotidových sekvencí.

4.1 Materiál

4.1.1 Rostlinný materiál

Všechny použité genotypy banánovníků (Tab. 1) byly získány z INIBAP Transit Centre (Katolická univerzita, Lovaň, Belgie) a náleží do rodu *Musa*. Pouze druh *M. yunnanensis* byl získán ze soukromé sbírky profesora Häkkinena, a proto nemá přidělen ITC kód. Rostliny byly zasazeny do půdy a pěstovány ve skleníku.

Tab. 1: Analyzované genotypy banánovníků

Jméno položky	ITC kód*	Ploidie	Velikost genomu 2C [pg]
<i>Musa</i> cf. <i>uranoscopos</i>	1532	2n = 2x	1,442
<i>M.</i> x <i>fennicae</i> (<i>M.</i> <i>siamensis</i> (male) x <i>M.</i> <i>rosea</i> (female))	1522	2n = 2x	1,261
<i>Musa monticola</i>	1528	2n = 2x	1,390
<i>Musa yunnanensis</i>	-	2n = 2x	1,240

Jméno položky	ITC kód*	Ploidie	Velikost genomu 2C [pg]
Musa rosea x ornata	1572	2n = 2x	1,270
Musa ornata	1570	2n = 2x	nezjištěna
Musa rosea (hybrid)	1598	2n = 2x	1,285
Musa campestris var. sarawakensis	1517	2n = 2x	1,417
Musa barioensis	1568	2n = 2x	1,480
Musa rosea	1591	2n = 2x	nezjištěna
Musa rosea x siamensis	1592	2n = 2x	1,279
Musa violascens	1514	2n = 2x	1,428
Musa viridis	1525	2n = 2x	nezjištěna

*ITC je kód položky v genové bance (tzv. ITC kolekce).

4.1.2 Přístroje

Centrifuga Juan CR4 i, Thermo Scientific, Waltham, USA

Centrifuga IEC Micromax RF, Thermo Scientific, Waltham, USA

PCR Termocycler PTC-200, MJ Research Inc., Massachusetts, USA

Horizontální vana a zdroj napětí pro elektroforézu MP-300 V, Major Science, Taiwan

UV Transiluminátor, InGenius Bio Imaging, Syngene, Cambridge, Velká Británie

Sekvenátor 3730 xl DNA Analyzer, Applied Biosystems, Kalifornie, USA

Cell Porator, Life Technologies, Kalifornie, USA

Termostat TCH 100, Laboratorní přístroje Praha, Česká republika

Třepačka C24 Incubator Shaker, New Brunswick Scientific, Edison, USA

Robotická stanice Biomek, Beckman Coulter, Danvers, USA

Homogenizační mlýn, RETSCH, Německo

Spektrofotometr NanoDrop, Thermo Scientific, Wilmington, USA

4.1.3 Pufry a roztoky

2 YT medium **na 1 l**

kaseinový enzym 16 g

kvasinkový extrakt 10 g

NaCl 5 g

agar 16 g

Antibiotikum kanamycin (zásobní roztok) **na 1 ml**

kanamycin 50 mg

5x TBE **na 1 l**

tris base 54 g

kyselina boritá 27,5 g

0,5 mol.l⁻¹ EDTA, pH 8 20 ml

sterilní redestilovaná H₂O doplnit do 1 l

SOC medium	na 1 l
tryptone	20 g
kvasinkový extrakt	5 g
NaCl	0,5 g
1M KCl	2,5 ml
10 mM MgCl ₂	1 g
20 mM glukosa	3,6 g
sterilní redestilovaná H ₂ O	doplnit do 1 l

4.1.4 Komerční kity

TOPO[®] XL PCR Cloning Kit, Invitrogen, Kalifornie, USA

Invisorb Spin Plant Mini Kit (250), Invitek, Berlín, Německo

Paramagnetické kuličky Agencourt AMPure XP a Agencourt Clean SEQ, Beckman Coulter, Danvers, USA

ExoSAP-IT[®], USB[®] Corporation, USA (Cleveland, Ohio)

BigDye[®] Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems, USA

4.2 Metodika

4.2.1 Izolace genomové DNA

Mladé svinuté listy banánovníků byly lyofilizovány a homogenizovány pomocí homogenizačního mlýna (RETSCH). Genomová DNA banánovníků byla následně izolována za použití komerčně dostupného kitu od firmy Invitek (Invisorb Spin Plant Mini Kit), podle přiloženého protokolu. Do mikrozkušavky s rostlinným materiálem bylo přidáno 500 µl lyzačního pufru a 20 µl proteinázy K. Lyzační směs se nechala inkubovat na vodní lázni při 65°C po 30 min. Poté byla směs přenesena na kolonku (Spin Filter) umístěnou ve sběrné

zkumavce a centrifugována (1 min, 12 000 rpm). Do filtrátu bylo přidáno 5 µl RNasyH (Promega, 10 mg/ml) a směs se nechala 15 min. inkubovat při pokojové teplotě. Do suspenze bylo přidáno 200 µl „binding“ pufru a suspenze byla přenesena na novou kolonku a inkubována 1 min při laboratorní teplotě. Suspenze byla poté centrifugována (1 min, 12 000 rpm). Po odstranění filtrátu byly kolonky s navázanou DNA umístěny zpět do sběrných zkumavek. Do kolonek bylo přidáno 550 µl promývacího pufru I. Zkumavky byly opět centrifugovány (1 min, 12 000 rpm) a po odstranění filtrátu byly kolonky dvakrát promyty 550 µl promývacího pufru II. Kolonky s navázanou DNA byly umístěny do čistých zkumavek a DNA byla uvolněna přidáním 50 µl elučního pufru předehřátého na 65°C a následnou centrifugací při 12 000 rpm po dobu 2 min.

4.2.2 Stanovení kvality a koncentrace genomové DNA

Kvalita získané genomové DNA byla ověřena gelovou elektroforézou v 1,5% agarózovém gelu: agaróza byla připravena v 0,5 x TBE pufru a produkty byly separovány při napětí 4,5 V.cm⁻¹ po dobu 40 min. Koncentrace přečištěných PCR produktů byla změřena pomocí spektrofotometru NanoDrop.

4.2.3 PCR amplifikace oblasti ITS1-5.8S-ITS2

Vyizolovaná genomová DNA byla použita jako templátová DNA pro PCR amplifikaci. Použití specifických primerů ITSL a ITS4 zajistilo selektivní amplifikaci oblasti ITS1-5.8S-ITS2. Reakce byla provedena v celkovém objemu 25 µl. Premix obsahoval 1x pufr (10 Mm Tris-HCl, 50 mM KCl, 0.1 % Triton® X-100) s 1,5 mM Mg²⁺, Taq polymerázu (1U/100 µl), 200 µmol/l dNTPs, 1 µmol/l primery ITSL a ITS4, deionizovanou vodu a 10 ng templátové DNA. PCR probíhala za následujících podmínek: počáteční denaturace 94°C/5 min, 30 cyklů (denaturace 94°C/50 s, nasednutí primerů 52°C/50 s, extenze 72°C/50 s), závěrečná extenze 72°C/5 min. Produkty PCR reakce byly nanoseny na 1,2% agarózový gel a ověřeny gelovou

elektroforézou. Poté byly PCR produkty přečištěny pomocí paramagnetických kuliček (AMPure XP).

4.2.4 Příprava 2 YT média

2 YT médium pro kultivaci transformovaných bakterií bylo připraveno podle návodu. Použité reagentie kromě agaru byly rozpuštěny v destilované vodě a vzniklý roztok byl doplněn na příslušný objem. Roztok byl nalit po 300 ml do autoklávovaných lahví s uzávěrem. Do každé lahve byl následně přidán agar (4,8 g na 300 ml roztoku). Lahve s médiem byly autoklávovány. Do vyautoklávovaných a částečně vychladlých lahví bylo napipetováno 300 μ l zásobního roztoku kanamycinu (15 mg kanamycinu na 300 ml média). Médium s kanamycinem bylo ve flow boxu rozlito na sterilní misky (typu „bioassay“).

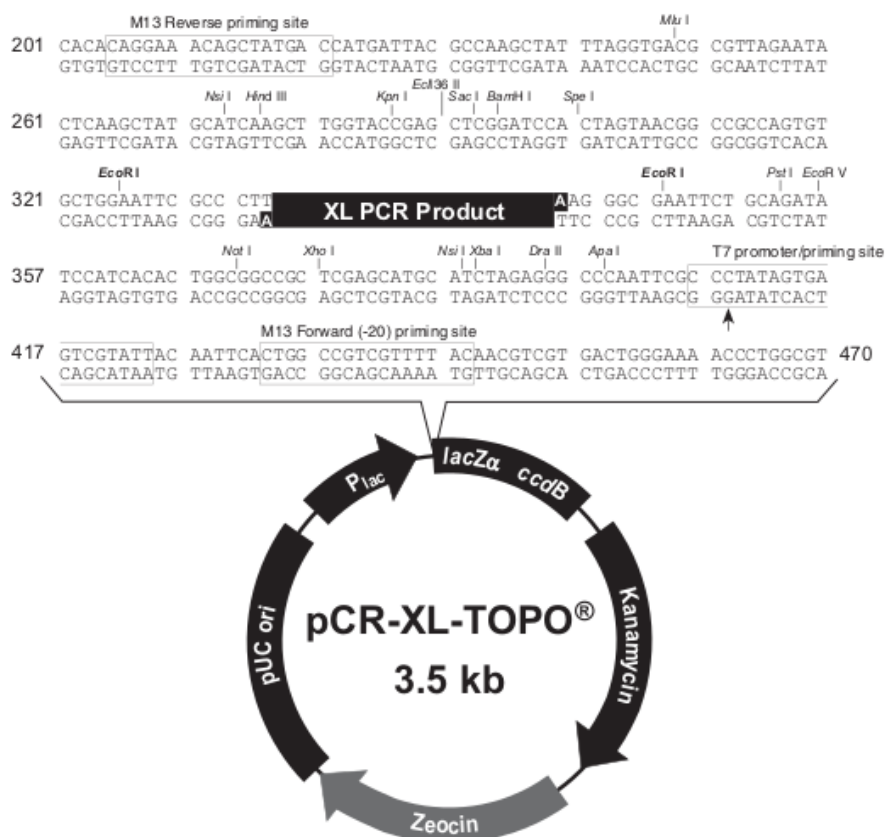
4.2.5 Klonování DNA fragmentů

Ke klonování amplifikovaného a přečištěného fragmentu ITS1-5.8S-ITS2 byl použit TOPO[®] XL PCR CloningKit (Invitrogen). Reakce proběhla za předepsaných podmínek. Do TOPO vektoru byl zaligován PCR produkt. Ligační směs vznikla smícháním 4 μ l PCR produktu (200 – 400 ng) a 0,3 μ l vektoru. Ligace probíhala za pokojové teploty po dobu 5 min. Poté bylo do reakční směsi přidáno 0,65 μ l tzv. StopSolution, která je součástí klonovacího kitu. TOPO vektor má délku ~3,5 kb a obsahuje gen rezistence proti antibiotiku kanamycinu (Obr. 4).

K transformaci buněk *E. coli* byla využita elektroporace. Pro jednu elektroporaci bylo použito 0,7 μ l ligační směsi a 15 μ l elektrokompetentních buněk *E. coli* (součást kitu). Po proběhnutí elektroporace byla transformační směs přenesena do 200 μ l SOC média předehřátého na 37°C a následně inkubována 1 hod při 37°C na třepačce (200 rpm). Přesně po 1 hod byly transformované buňky v SOC médiu rozetřeny sterilní hokejkou na předem připravené misky s 2 YT médium obsahujícím 0,05 mg/ml kanamycinu. Misky byly

inkubovány dnem vzhůru při 37°C přes noc v termostatu. Následující den byly dobře viditelné kolonie použity pro selekci rekombinantních klonů, vhodných pro sekvenování.

Rekombinantní kolonie (nesoucí inzert banánové DNA) byly identifikovány pomocí PCR reakce se specifickými primery M13F/M13R (M13F je 5' – GTA AAA CGA CGG CCA G – 3' a sekvence primeru M13R je 5' – CAG GAA ACA GCT ATG AC – 3'), které se nachází v polylinkeru TOPO vektoru (Obr. 4). PCR reakce byla provedena v objemu 20 µl. Premix obsahoval 1x pufr (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 0.1 % Triton® X-100) s 1,5 mM Mg²⁺, Taq-polymerázu (2U/100 µl), 200 µmol/l dNTPs, 1 µmol/l primery M13F a M13R a deionizovanou vodu. Jako templátová DNA byly použity jednotlivé kolonie – do PCR premixu byly přeneseny sterilní špičkou. PCR probíhala za podmínek: počáteční denaturace 95°C/5 min, 30 cyklů (denaturace 94°C/50 s, nasednutí primerů 55°C/50 s, extenze 72°C/50 s), závěrečná extenze 72°C/5 min. Produkty PCR reakce (~ 2µl) byly nanесeny multikanálovou pipetou na 1,2% agarózový gel a ověřeny gelovou elektroforézou. Gelová elektroforéza byla také využita k odhadu koncentrace PCR produktů.



Obr. 4: Schéma TOPO vektoru (převzato z <https://products.invitrogen.com>).

4.2.6 Purifikace PCR produktů a sekvenování DNA fragmentů

Produkt PCR reakce určený pro sekvenování byl přečištěn pomocí ExoSAP-IT (USB[®] Corporation). Reakce probíhala v celkovém objemu 7 μ l. K 3 μ l PCR produktu (200 – 400 ng) bylo přidáno 0,05 μ l enzymu exonukleáza I (Exo), 0,5 μ l enzymu alkalická fosfatáza (Sap) a 3,45 μ l pufru P⁺. Reakční směs byla inkubována na PCR cycleru 30 min/37°C a 5 min/96°C.

PCR produkty byly sekvenovány pomocí BigDye Terminator 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA). Pro přípravu vzorku na sekvenování byla použita PCR reakce, která proběhla v celkovém objemu 10 μ l. Premix obsahoval: 1,5 μ l 5x sekvenačního pufru (Applied Biosystems), 0,5 μ l BIG DYE roztoku (Applied Biosystems), 1 μ l primeru M13F nebo M13R (10 μ mol/l), 4 μ l deionizované vody a 3 μ l přečištěného PCR produktu. Reakce probíhala ve speciální 96-jamkové destičce od firmy ABI. Program PCR reakce byl následující: počáteční denaturace 98°C/5 min, 60 cyklů (denaturace 96°C/10 s, nasednutí primerů 50°C/5 s, extenze 60°C/4 min). Výsledné produkty byly purifikovány paramagnetickými kuličkami pomocí robota Biomek NX^P (Beckman Coulter).

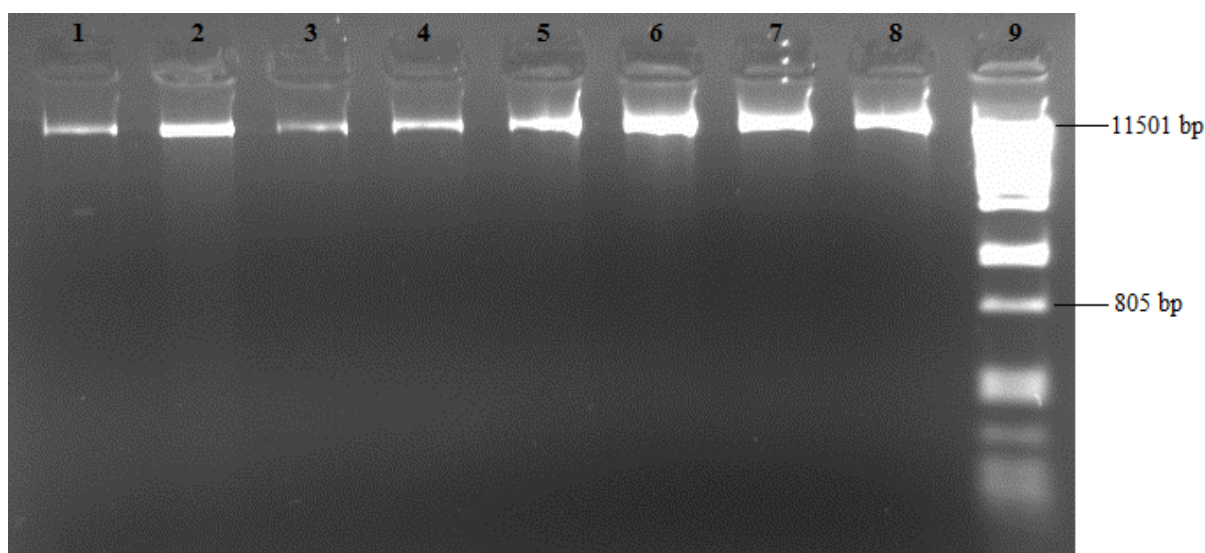
4.2.7 Analýza sekvenačních dat

Získaná sekvenační data byla byla nejdříve analyzována a editována pomocí programu DNA Baser v2 (<http://www.dnabaser.com>). Tento software byl využit především pro ověření kvality získaných sekvencí a následně pro tzv. oseknutí sekvencí DNA – odstranění nukleotidových sekvencí TOPO vektoru. Získané „osekané“ sekvence DNA byly následně použity pro mnohočetné přiřazení pomocí programu muscle (Edgar, 2004), který je součástí SeaView (Galtier a kol., 1996). Mnohočetné přiřazení bylo vytvořeno pro sekvence DNA specifické pro jednotlivé druhy a bylo uloženo ve formátu fasta. Soubory mnohočetného přiřazení byly následně použity pro vytvoření konsenzuálních sekvencí („consensus sequences“) pomocí programu WebLogo (Crooks a kol., 2004), který graficky znázorňuje konsenzuální sekvenci, včetně alternativních bází. Soubory mnohočetného přiřazení byly použity také pro stanovení nukleotidové diverzity oblasti ITS pomocí programu DnaSAM (Eckert a kol., 2010).

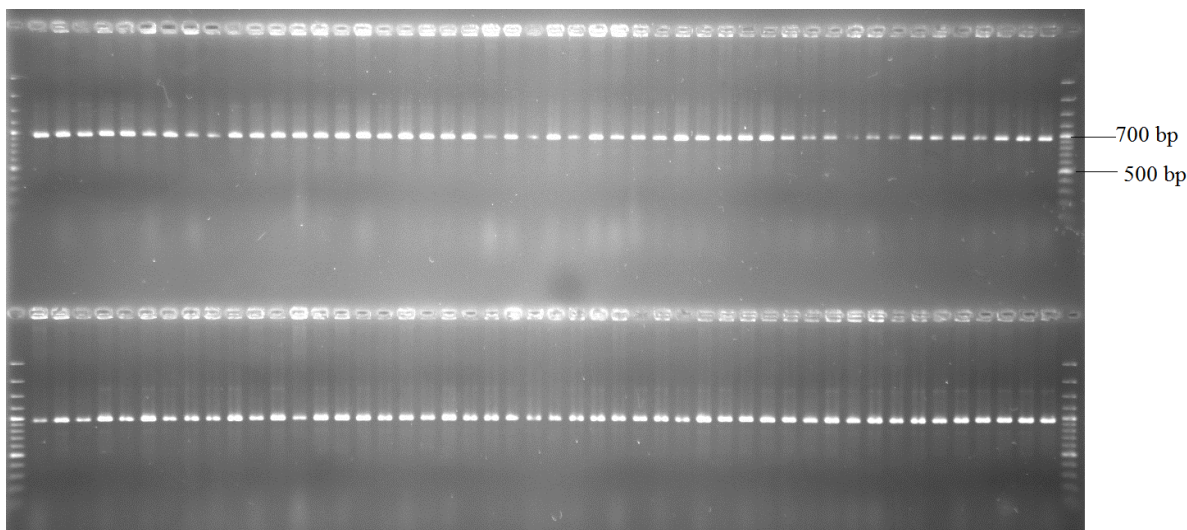
5 VÝSLEDKY

5.1 Izolace genomové DNA a PCR amplifikace oblasti ITS1-5.8S-ITS2

Genomová DNA (Obr. 5) byla izolována z 13 planých druhů rodu *Musa* s použitím komerčně dostupného kitu. Oblast ITS1-5.8S-ITS2 byla amplifikovaná pomocí specifických primerů ITSL a ITS4. Získané fragmenty o délce přibližně 700 bp byly zaligovány do TOPO vektoru a elektroporací vpraveny do buněk *E. coli*. Bakterie byly kultivovány na 2YT médiu s kanamycinem, který sloužil k pozitivní selekci transformantů. Narostlé kolonie byly podrobeny PCR screeningu s využitím specifických primerů M13F a M13R (Obr. 6).



Obr. 5: Vyizolovaná genomová DNA vybraných zástupců rodu *Musa*: 1. fág λ (50 ng) 2. fág λ (100 ng) 3. *M. monticola* ITC 1528 4. *M. ornata* ITC 1570 5. *M. yunnanensis* 6. *M. barioensis* ITC 1568 7. *M. rosea* ITC 1591 8. *M. viridis* ITC 1525 9. DNA-marker λ /PstI.



Obr. 6: PCR amplifikace kolonií bakterií s využitím specifických primerů M13F/M13R. Amplifikované fragmenty DNA mají délku přibližně 700 bp. V první a poslední jamce jsou standardy molekulové hmotnosti.

5.2 Sekvenování a analýza sekvenčních dat

Amplifikované ITS oblasti byly přečištěny a osekvenovány (viz. kapitola 4.2.6 - metodika). Pro každý studovaný druh bylo v prvním kroku sekvenováno minimálně 30 DNA klonů nesoucích ITS oblasti. Poté byly sekvence DNA editovány a bylo vytvořeno mnohočetné přiřazení pomocí programu muscle a graficky znázorněno programem SeaView. Pokud byly získané sekvence divergentní, byly ve druhém kroku sekvenovány další DNA klony nesoucí ITS oblasti. Celkové počty osekvenovaných klonů jsou uvedeny v tab. 2.

Mnohočetné přiřazení bylo následně použito jako vstupní soubor pro program WebLogo, který vytváří grafické znázornění konsenzuální sekvence DNA. Výhodou tohoto grafického výstupu je, že obsahuje také alternativní báze a výšky jednotlivých znázorněných nukleotidů odpovídají zastoupení nukleotidů v dané pozici. Na obr. 7 je znázorněna konsenzuální sekvence vysoce homogenní oblasti ITS1-5.8S-ITS2, která byla zjištěna u druhu *M. monticola*. Naopak v grafickém výstupu variabilnější ITS oblasti druhu *M. barionensis* jsou dobře viditelné veškeré nukleotidové pozice obsahující alternativní báze (Obr. 8).

Soubory mnohočetného přiřazení byly použity k dalším analýzám a základní charakterizaci získaných sekvenčních dat. Nukleotidová diverzita byla stanovena programem Dna SAM a

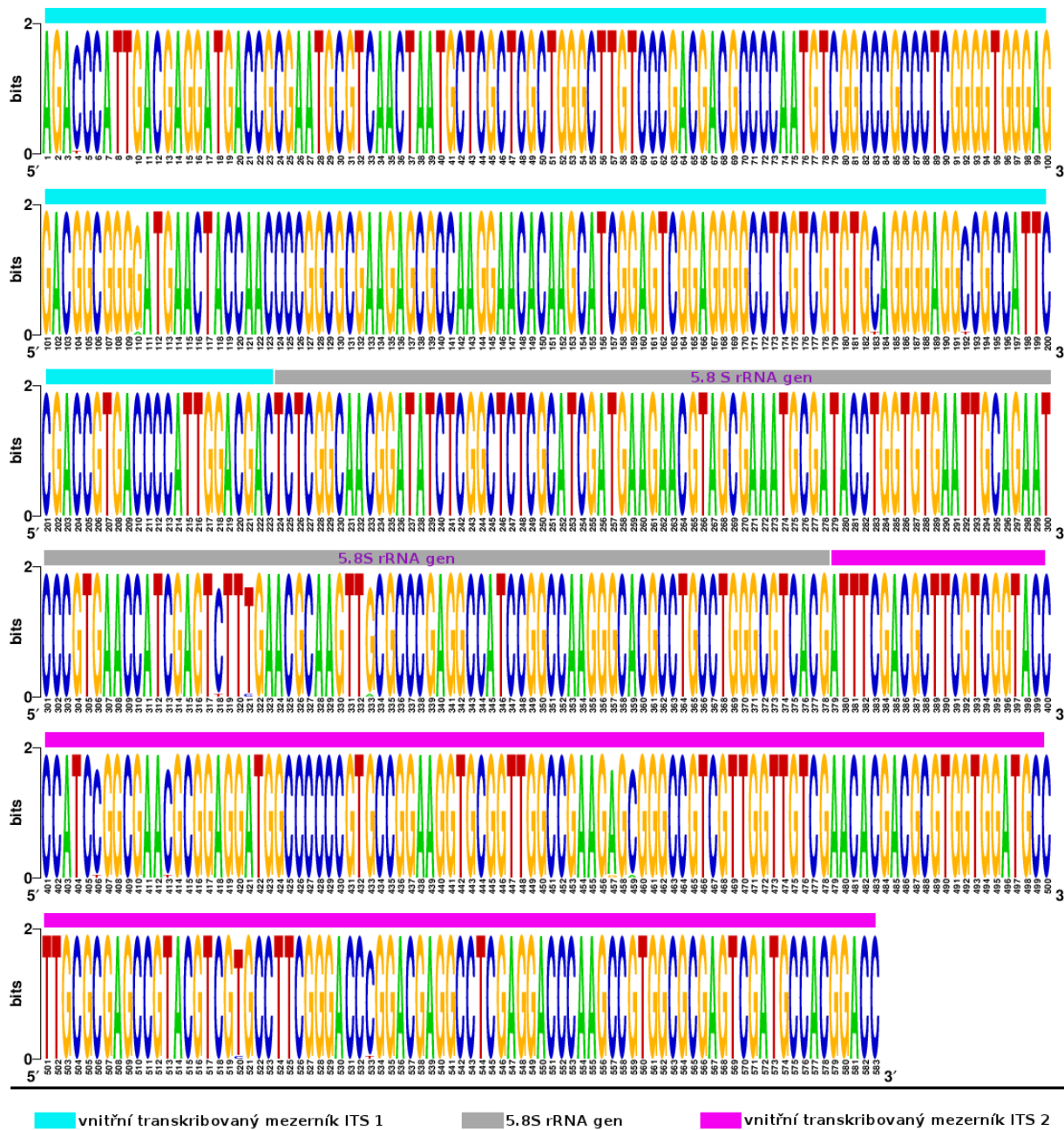
je uvedena v tab. 2. Z tabulky je patrné, že nukleotidová diverzita je vyšší u mezidruhových hybridů. Nejnižší nukleotidová diverzita – nejvyšší homogenita oblasti ITS byla zjištěna u druhu *M. monticola* ITC 1528 (Tab. 2, Obr. 7) a nejvyšší diverzitu v rámci oblasti ITS vykazuje druh *M. barionensis* ITC 1568 (Tab. 2, Obr. 8).

Tab. 2: Nukleotidová diverzita oblasti ITS studovaných zástupců rodu *Musa*

Jméno položky	ITC kód*	Počet osekvenovaných klonů	Nukleotidová diverzita θ_π
<i>Musa</i> cf. <i>uranoscopos</i>	1532	75	5,214
<i>M. x fennicae</i> (<i>M. siamensis</i> (male) x <i>M. rosea</i> (female))	1522	75	8,155
<i>Musa monticola</i>	1528	37	0,963
<i>Musa yunnanensis</i>	-	36	10,118
<i>Musa rosea x ornata</i>	1572	69	19,658
<i>Musa ornata</i>	1570	75	16,783
<i>Musa rosea</i> (hybrid)	1598	67	7,303
<i>Musa campestris</i> var. <i>sarawakensis</i>	1517	32	2,054
<i>Musa barionensis</i>	1568	55	20,506
<i>Musa rosea</i>	1591	68	15,215
<i>Musa rosea x siamensis</i>	1592	91	13,266
<i>Musa violascens</i>	1514	37	3,667
<i>Musa viridis</i>	1525	69	6,253

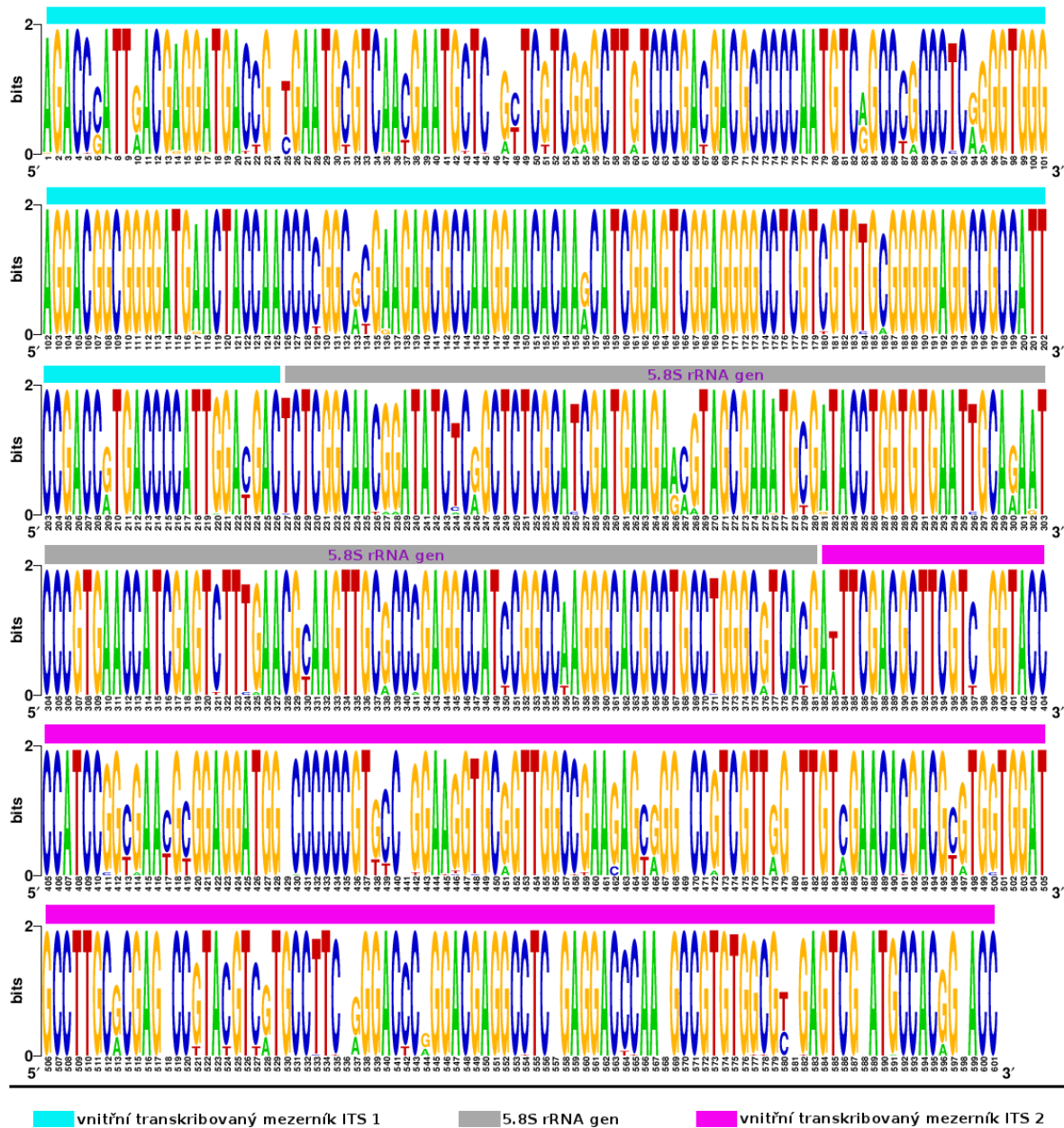
*ITC je kód položky v genové bance (tzv. ITC kolekce).

Konsensus - weblogo ITS oblasti *Musa monticola* (ITC 1528)



Obr. 7: Grafické znázornění konsenzuální sekvence vysoce homogenní oblasti ITS1-5.8S-ITS2. Velikost nukleotidu odpovídá jeho frekvenci v dané pozici. Čím více je nukleotid v dané pozici konzervovaný, tím větší písmeno ho znázorňuje.

Konsensus - weblogo ITS oblasti *Musa barionensis* (ITC 1568)



Obr. 8: Grafické znázornění konsenzuální sekvence variabilní oblasti ITS1-5.8S-ITS2. Velikost nukleotidu odpovídá jeho frekvenci v dané pozici. Čím více je nukleotidů v dané pozici konzervovaných, tím větší písmeno ho znázorňuje.

6 DISKUZE A ZÁVĚR

Předkládaná bakalářská práce se zabývá sekvenováním a analýzou ITS oblastí u 13 planých zástupců rodu *Musa*. Jak již bylo uvedeno v teoretické části, vnitřní transkribované mezerníky ITS1 a ITS2 jsou součástí lokusu ribozomální DNA, kde oddělují geny pro 18S, 5.8S a 25S rRNA. Konzervované geny kódující ribozomální RNA jsou vystaveny značnému selekčnímu tlaku a jsou tedy vhodné k fylogenetickým analýzám na vyšších taxonomických úrovních. Naproti tomu mezerníky ITS1 a ITS2 představují relativně rychle se vyvíjející úseky DNA, které jsou vyžitelné k fylogenetickým analýzám na úrovni druhů a poddruhů.

Oblast ITS1-5.8S-ITS2 je v genomu zastoupena v mnoha kopiích uspořádaných tandemově za sebou. Navíc ITS1-5.8S-ITS2 sekvence představuje relativně krátký úsek DNA, který je možné velmi snadno amplifikovat pomocí PCR se specifickými a často velmi konzervovanými primery. K odhalení potenciální intragenomové diverzity se doporučuje ITS oblasti klonovat v bakteriích a získané klony sekvenovat. Takovýto postup byl dodržen i v této bakalářské práci. Nejkratší délka ITS oblasti byla zjištěna u hybridního zástupce *Musa rosea* x *siamensis* ITC 1592 (534 bp). Většina druhů obsahuje ITS oblast dlouhou ~ 585 bp, což bylo zjištěno i v dřívějších studiích (Käss a Wink, 1997; Hříbová a kol., 2011; Sharma a kol., 2012). To odpovídá průměrné délce této oblasti u krytosemenných rostlin (500 – 700 bp; Baldwin a kol., 1995).

Získaný záznam nukleotidů byl použit pro mnohočetné přiřazení sekvencí, na jehož základě byla vytvořena konsensus sekvence zobrazující konzervované i variabilnější pozice. Konsensus sekvence sama o sobě neobsahuje informace o frekvenci nukleotidů ve variabilnějších pozicích. Byla tedy převedena do z mnoha ohledů výhodnější grafické podoby, ve které je velikost symbolu (nukleotidu) přímo úměrná jeho frekvenci v dané pozici.

Na základě výsledků mnohočetného přiřazení byla určena nukleotidová diverzita ITS oblasti u jednotlivých druhů. Nejnížší nukleotidová diverzita byla pozorována u druhů *M. monticola* a *M. campestris* var. *sarawakensis*. Naopak nejvyšší nukleotidová diverzita byla zjištěna u druhu *M. barioensis* a hybridu *M. rosea* x *ornata*. *M. barionensis* obsahuje dva typy ITS oblasti. Dva typy ITS oblasti naznačují heterozygotnost nebo případný hybridní charakter tohoto druhu a fakt, že jednotlivé typy ITS sekvence jsou ještě do značné míry divergované, podporuje skutečnost, že se jedná o planého pohlavně se množícího zástupce čeledi *Musaceae*. Obecně lze konstatovat, že vyšší nukleotidovou diverzitou ITS oblasti disponovali mezidruhová hybridní (např. *M. rosea* x *ornata*).

Ke studiu genetické diverzity rodu *Musa* byla navrhnutá celá řada molekulárních markerů. ITS oblast představuje jeden z nejpoužívanějších DNA markerů v rostlinných fylogenetických analýzách. Jak bylo nastíněno v teoretické části, studium ITS oblasti však může být provázeno řadou problémů. Nicméně při dodržení určitých opatření je možné komplikace z velké části eliminovat. Fylogenetická analýza čeledi *Musaceae* využívající ITS oblast (Li a kol., 2010; Liu a kol., 2010; Hřibová a kol., 2011) se ukázala jako spolehlivá metoda.

7 LITERATURA

Ainouche A., Bayer R. (1999) Phylogenetic relationships in *Lupinus* (*Fabaceae: Papilionoideae*) based on internal transcribed spacer sequences (ITS) of nucleolar ribosomal DNA – *American Journal of Botany* 86: 590-607

Álvarez I., Wendel J. (2003) Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference – *Molecular Phylogenetics and Evolution* 29: 417-434

Amorim EP., Vilarinhos AD., Cohen KO., Amorim V., Monte DC., Reis RV. (2009) Genetic diversity of karotenoid-rich ananas evaluated by Diversity Arrays Technology (DArT) – *Genetics and Molecular Biology* 32: 96-103

Argent GCG. (1976) The wild bananas of Papua New Guinea – *Notes of Royal Botanical Garden* 35: 77-114

Bailey CD., Carr TG., Harris SA., Hughes CE. (2003) Characterization of angiosperm nrDNA polymorphism, paralogy and pseudogenes – *Molecular Phylogenetics and Evolution* 29: 435-455

Baker WJ., Hedderson TA., Dransfield J. (2008) Molecular phylogenetics of subfamily *Calamoideae* (Palmae) based on nrDNA ITS and cpDNA rps16 intron sequence data – *Molecular Phylogenetics and Evolution* 14: 195-217

Baldwin BG. (1992) Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA in plants: an example from the compositae – *Molecular Phylogenetics and Evolution* 1: 3-16

Baldwin BG., Sanderson MJ., Porter JM., Campbell CS., Donoghue MJ. (1995) The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny – *Annals of the Missouri Botanical Garden* 82: 247-277

Balint - Kurti P., Clendennen S., Doleželová M., Valárik M., Doležel J., Beetham P., May G. (2000) Identification and chromosomal localization of the monkey retrotransposon in *Musa* spp. – *Molecular and General Genetics* 263: 908-915

- Barkley NA., Roose ML., Krueger RR., Federici CT. (2006) Assessing genetic diversity and population structure in a citrus germplasm collection utilizing simple sequence repeat markers (SSRs) – *Theoretical and Applied Genetics* 112: 1519-1531
- Bartos J., Alkhimova O., Dolezelová M., De Langhe E., Dolezel 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
- Bekele E., Shigeta M. (2011) Phylogenetic relationship between *Ensete* and *Musa* species as revealed by the *trnT trnF* region of cpDNA - *Genetical Resource of Crop Evolution* 58: 259-269
- Bennet RI., Smith AG. (1991) Use of a genomic clone for ribosomal RNA from *Brassica oleracea* in RFLP analyses of *Brassica* species – *Plant Molecular Biology* 16: 635-688
- Borisjuk N., Davidjuk Y., Kostishin S., Miroshnichenco G., Velasco R., Hemleben V., Volkov R. (1997) Structural analysis of rDNA in the genus *Nicotiana* – *Plant Molecular Biology* 35: 655-660
- Botstein D., White RL., Skolnick M., Davis RV. (1980) Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms – *American Journal of Human Genetics* 32:314-331
- Buckler ES., Ippolito A., Holtsford TP. (1997) The evolution of ribosomal DNA: divergent paralogues and phylogenetic implication – *Genetics* 145: 821-832
- Carling MD., Brumfield RT. (2007) Gene sampling strategies for multi-locus population estimates of genetic diversity – *PloS One* 2: e160
- Carson AR., Scherer SW. (2009) Identifying concerted evolution and gene conversion in mammalian gene pairs lasting over 100 million years – *BMC Evolutionary Biology* 9:156
- Catalán P., Kellogg EA., Olmstead RG. (1997) Phylogeny of Poaceae Subfamily Pooideae Based on Chloroplast *ndhF* Gene Sequences – *Molecular Phylogenetics and Evolution* 8: 150-166
- Clegg MT. (1993) Chloroplast gene sequences and the study of plant evolution – *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90: 363-367

- Coleman A. (2003) ITS2 is double-edged tool for eukaryote evolutionary comparisons – *TRENDS in Genetics* 19: 370-375
- Coleman A. (2007) Pan-eukaryote ITS2 homologies revealed by RNA secondary structure – *Nucleic Acids Research* 35: 3322-3329
- Coté C., Greer C., Peculis B. (2002) Dynamic conformational model for the role of ITS2 in pre-rRNA processing in yeast. – *RNA Society* 8: 786-797
- Crooks GE., Hon G., Chandonia JM., Brenner SE. (2004) WebLogo: A sequence logo generator - *Genome Research* 14: 1188-1190
- Curtis SE., Clegg MT. (1984) Molecular evolution of chloroplast DNA sequences – *Molecular Biology and Evolution* 1: 291-301
- Cvrčková F.: Úvod do praktické bioinformatiky, Academia, 2006
- Dadejová M., Lim Y., Součková-Skalická K., Matyášek R., Grandbastien M., Leitch A., Kovařík A. (2007) Transcription activity of rRNA genes correlates with a tendency towards intergenomic homogenization in *Nicotiana* allotetraploids – *New Phytologist* 174: 658-668
- Degnan PH., Ochman H. (2012) Illumina-based analysis of microbial community diversity – *The ISME Journal* 6: 183-94
- D'Hont A., Paget-Goy A., Escoute J., Carreel F. (1999) The interspecific genome structure of cultivated banana, *Musa* spp. revealed by genomic DNA in situ hybridization – *Theoretical and Applied Genetics* 100: 177-183
- Dixon MT., Hillis DM. (1993) Ribosomal RNA secondary structure: compensatory mutations and implications for phylogenetic analysis – *Molecular Biology and Evolution* 10: 256-267
- Doleželová M., Valárik M., Swennen R., Horry J., Doležel J. (1998) Physical mapping of the 18S-25S a 5S ribosomal RNA genes in diploid bananas – *Biologia Plantarum* 41: 497-505
- Dover G. (1982) Molecular drive: a cohesive mode of species evolution – *Nature* 299: 111-117
- Dubcovsky J., Dvorak J. (1995) Ribosomal RNA multigene loci: nomads of the Triticeae genomes – *Genetics* 140: 1367-1377

- Dubey S., Tripathi A., Singh S. (2010) ITS-RFLP fingerprinting and molecular marker for detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *Ciceris* – *Folia microbiologica* 55: 629-634
- Duran C., Appleby N., Edwards D., Batley J. (2009) Molecular genetic markers: discovery, applications, data storage and visualisation – *Current Bioinformatics* 4: 16-27
- Eckert AJ., Liechty JD., Tearse BR., Pande B., Neale DB. (2010) DnaSAM: Software to perform neutrality testing for large dataset with complex null models - *Molecular Ecology Resources* 10: 542-545
- Edgar RC. (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput – *Nucleic Acids Research* 32: 1792-1797
- Eickbush T., Eickbush D. (2007) Finely orchestrated movements: evolution of the ribosomal RNA genes – *Genetics* 175: 477-485
- Elder JF., Turner BJ. (1995) Concerted evolution of repetitive DNA sequences in eukaryotes – *The Quarterly Review of Biology* 70: 297-320
- Ellsworth DL., Rittenhouse KD., Honeycutt RL. (1993) Artifactual variation in randomly amplified polymorphic DNA banding patterns – *BioTechniques* 14: 214-227
- Englberger L., Schierle J., Aalbersberg W., Hofmann P., Humphries J., Huang A., Lorens A., Levendusky A., Daniells J., Marks GC., Fitzgerald MH. (2006) Carotenoid and vitamin content of *Karat* and other Micronesian banana cultivars – *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 57: 399-418
- Eyre-Walker A., Gaut BG. (1997) Correlated rates of synonymous site evolution across plant genomes - *Molecular Biology and Evolution* 14: 455-460
- Feliner G., Rosselló J. (2007) Better the devil you know? Guidelines for insightful utilization of nrDNA ITS in species-level evolutionary studies in plants – *Molecular Phylogenetics and Evolution* 44: 911-91
- Flavell AJ., Knox MR., Pearce SR., Ellis TH. (1998) Retrotransposon-based insertion polymorphisms (RBIP) for high throughput marker analysis – *The Plant Journal* 16: 643-50

- Galan M., Guivier E., Caraux G., Charbonnel N., Cosson JF. (2010) A 454 multiplex sequencing method for rapid and reliable genotyping of highly polymorphic genes in large-scale studies – BMC Genomics 11: 296
- Galtier N., Gouy M., Gautier C. (1996) SeaView and Phylo_win, two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny - Computer Applications in the Biosciences 12: 543-548.
- Ganley A., Kobayashi T. (2007) Highly efficient concerted evolution in the ribosomal DNA repeats: total rDNA repeat variation revealed by whole-genome shotgun sequence data – Genome Research 17: 184-191
- Ganley A., Kobayashi T. (2011) Monitoring the rate and dynamics of concerted evolution in the ribosomal DNA repeats of *Saccharomyces cerevisiae* using experimental evolution – Molecular Biology and Evolution 28: 2883-2891
- Gawel NJ., Jarret RL., Whittemore AP. (1992) Restriction fragment length polymorphism (RFLP) – based phylogenetic analyses of *Musa* – Theoretical and Applied Genetics 84: 286-290
- Gawel NJ., Jarret RL. (1995) Molecular markers, genetic diversity and systematics in *Musa* – Banana and Plantain, Longman, New York
- Gibert O., Dufour D., Giraldo A., Sánchez T., Reynes M., Pain JP., González A., Fernández A., Díaz A. (2009) Differentiation between cooking bananas and dessert bananas. 2. Thermal and functional characterization of cultivated Colombian *Musaceae* (*Musa* spp.) – Journal of Agricultural and Food Chemistry 57: 7857-7869
- Grimm GW., Denk T. (2007) ITS evolution in *Platanus* (*Platanaceae*): homoeologues, pseudogenes and ancient hybridization – Annals of Botany 101: 403-419
- Häkkinen M. (2004) *Musa voonii*, a new *Musa* species from northern Borneo and discussion of the section *Callimusa* in Borneo – Acta Phytotax Geobot 55: 79-88
- Häkkinen M. (2005) *Musa azizii*, a new *Musa* species (*Musaceae*) from northern Borneo - Acta Phytotax Geobot 56: 27-31

- Harpke D., Peterson A. (2006) Non-concerted ITS evolution in *Mammillaria* (*Cactaceae*) – *Molecular Phylogenetics and Evolution* 41: 579-593
- Heslop-Harrison J., Schwarzacher T. (2007) Domestication, genomics and future for banana – *Annals of Botany* 100: 1073-1084
- Hoffmann FG., Opazo JC., Storz JF. (2008) Rapid rates of lineage-specific gene duplication and deletion in the α -globin gene family – *Molecular Biology and Evolution* 25: 591-602
- Hippolyte I., Jenny C., Gardes L., Bakry F., Rivallan R., Pomies V., Cubry P., Risterucci AM., Perrier X. (2011) Foundation characteristics of edible *Musa* triploids revealed from allelic distribution of SSR markers – *Annals of Botany* 1-15
- Hřibová E., Čížková J., Christelová P., Taudien S., Langhe E., Doležel J. (2011) The ITS1-5.8S-ITS2 sequence region in the *Musaceae*: structure, diversity and use in molecular phylogeny – *PloS One* 6: e17863
- Hřibová E., Neumann P., Matsumoto T., Roux N., Macas J., Doležel J. (2010) Repetitive part of banana (*Musa acuminata*) genome investigated by low-depth 454 sequencing – *BMC Plant Biology* 10: 204
- Horry JP., Jay M. (1988) An evolution background of bananas as deduced from flavonoids diversification: identification of genetic diversity of the genus *Musa* – *International network for improvement of banana and plantain* 41-55
- Hudson ME. (2008) Sequencing breakthroughs for genomic ecology and evolutionary biology – *Molecular Ecology Resources* 8: 3-17
- Cheesman EE. (1947) Classification of the bananas – *Kew Bull* 2: 97-117
- Cheesman EE. (1950) Classification of the bananas. III. Critical notes on species – *Kew Bull* 5: 151-155
- Christelová P., Valárik M., Hřibová E., De Langhe E., Doležel J. (2011) A multi gene sequence-based phylogeny of the *Musaceae* (banana) family – *BMC Evolutionary Biology* 11: 103
- Imelfort M., Edwards D. (2009) De novo sequencing of plant genomes using second-generation technologies – *Briefings in Bioinformatics* 10: 609-618

- Isobe M, Hashimoto K. (1994) The chromosome count of nine taxa in *Musa* and its allied genus *Musella* - Bulletin of the Hiroshima Botanical Garden 15: 7-11
- Jaccoud D., Peng K., Feinstein D., Kilian A. (2001) Diversity Arrays: a solid state technology for sequence information independent genotyping – Nucleic Acids Research 29: 25
- James K., Schneider H., Ansell S., Evers M., Robba L., Kilian A. (2008) Diversity Arrays Technology (DArT) for pan-genomic evolutionary studies of non-model organisms – PloS One 3: 1682
- Jarret RL., Litz RE. (1986) Enzyme polymorphism in *Musa acuminata* Colla – Journal of Heredity 77: 183-186
- Jarret RL., Gawel N., Whittemore A., Sharrock S. (1992) RFLP-based phylogeny of *Musa* species in Papua New Guinea – Theoretical and Applied Genetics 84: 579-584
- Joly S., Rauscher JT., Sherman-Broyles SL., Brown AH., Doyle JJ. (2004) Evolutionary dynamics and preferential expression of homeologous 18S-5.8S-26S nuclear ribosomal genes in natural and artificial glycine allopolyploids – Molecular Biology and Evolution 21: 1409-1421
- Jeridi M., Bakry F., Escoute J., Fondi E., Carreel F., Ferchichi A., D'Hont A., Rodier-Goud M. (2011) Homoeologous chromosome pairing between the A and B genomes of *Musa* spp. revealed by genomic in situ hybridization – Annals of Botany 108: 975-981
- Joseph N., Krauskopf E., Vera M., Michot B. (1999) Ribosomal internal transcribed spacer 2 (ITS2) exhibits a common core of secondary structure in vertebrate and yeast – Nucleic Acids Research 27: 4533-4540
- Kalendar R., Schulman AH. (2006) IRAP and REMAP for retrotransposon-based genotyping and fingerprinting – Nature Protocols 1: 2478-84
- Käss E., Wink M. (1997) Phylogenetic relationships in the *Papilionoideae* (family *Leguminosae*) based on nucleotide sequences of cpDNA (*rbcL*) and ncDNA (ITS 1 and 2) – Molecular Phylogenetics and Evolution 8: 65-88
- Kilian B., Graner A. (2012) NGS technologies for analyzing germplasm diversity in genebanks – Briefings in Functional Genomics 11: 38-50

- Kopecký D., Bartoš J., Christelová P., Černoch V., Kilian A., Doležel J. (2011) Genomic constitution of *Festuca* x *Lolium* hybrids revealed by the DArTFest array – *Theoretical and Applied Genetics* 122: 355-363
- Kovařík A., Pires JC., Leitch AR., Lim KY., Sherwood AM., Matyasek R., Rocca J., Soltis DE., Soltis PS. (2004) Rapid concerted evolution of nuclear ribosomal DNA in two *Tragopogon* allopolyploids of recent and recurrent origin – *Genetics* 169: 931-944
- Kumar P., Gupta VK., Misra AK., Modi DR., Pandey BK. (2009) Potential of molecular markers in plant biotechnology – *Plant Omics Journal* 2: 141-162
- Langhe E., Vrydaghs L., Maret P., Perrier X., Denham T. (2009) Why bananas matter: an introduction to the history of banana domestication – *Ethnobotany Research and Applications* 7: 165-177
- Langhe E., Hřibová E., Carpentier S., Doležel J., Swennen R. (2010) Did back crossing contribute to the origin of hybrid edible bananas? – *Annals of Botany* 106: 849-857
- Li LF., Hakkinen M., Yuan YM., Hao G., Ge XJ. (2010) Molecular phylogeny and systematics of the banana family (*Musaceae*) inferred from multiple nuclear and chloroplast DNA fragments, with a special reference to the genus *Musa* – *Molecular Phylogenetics and Evolution* 57: 1-10
- Liao D. (1999) Concerted evolution: molecular mechanism and biological implications – *American Journal of Human Genetics* 64: 24-30
- Liao D., Pavelitz T., Kidd JR., Kidd KK., Weiner AM. (1997) Concerted evolution of tandemly repeated genes encoding human U2 snRNA (the RNU2 locus) involves rapid intrachromosomal homogenization and rare interchromosomal gene conversion – *The EMBO journal* 16: 588-98
- Lim KY., Skalicka K., Koukalova B., Volkov RA., Matyasek R., Hemleben V., Leitch AR., Kovarik A. (2004) Dynamic changes in the distribution of a satellite homologous to intergenic 26-18S rDNA spacer in the evolution of *Nicotiana* – *Genetics* 166: 1935-1946
- Liu AZ., Kress WJ., Li DZ. (2010) Phylogenetic analyses of the banana family (*Musaceae*) based on nuclear ribosomal (ITS) and chloroplast (trnL-F) evidence – *Taxon* 59: 4707-4711

- Mai JC., Coleman A. (1997) The internal transcribed spacer 2 exhibits a common secondary structure in green algae and flowering plants – *Journal of Molecular Evolution* 44: 258-271
- Mansour A. (2008) Utilization of genomic retrotransposons as cladistic markers – *Journal of Cell and Molecular Biology* 7: 17-28
- Mansfield ES., Worley JM., McKenzie SE., Surrey S., Rappaport E., Fortina P. (1995) Nucleic acid detection using non-radioactive labelling methods – *Molecular and Cellular probes* 9: 145 -156
- Marais G. (2003) Biased gene conversion: implications for genome and sex evolution – *Trends in Genetics* 19: 330-338
- Mardis E. (2008) The impact of next-generation sequencing technology on genetics – *Trends in Genetics* 24: 133-141
- Margulies M. a kol. (2005) Genome sequencing in open microfabricated high density picoliter reactors – *Nature* 437: 376-380
- Matyasek R., Lim KY., Kovarik A., Leitch AR. (2003) Ribosomal DNA evolution and gene conversion in *Nicotiana rustica* – *Heredity* 91: 268-275
- Mayol M., Rosselló JA. (2001) Why nuclear ribosomal DNA spacers (ITS) tell different stories in *Quercus* – *Molecular Phylogenetics and Evolution* 19: 167-176
- Mentewab A., Jacobsen M., Flowers R. (2011) Incomplete homogenization of 18S ribosomal DNA coding regions in *Arabidopsis thaliana* – *BMC Research Notes* 4: 93
- Muller T., Philippi N., Dandekar T., Schultuz J., Wolf M. (2007) Distinguishing species – *RNA Society* 13: 1469-1472
- Muir G., Fleming CC., Schlotterer C. (2001) Three divergent rDNA clusters predate the species divergence in *Quercus petraea* and *Quercus robur* – *Molecular Biology and Evolution* 18: 112-119
- Nei M., Rooney A. (2005) Concerted and birth-and-death evolution of multigene families – *Annual Review of Genetics* 39: 121-152

- Ochieng JW., Henry RJ., Baverstock PR., Steane DA., Shepherd M. (2007) Nuclear ribosomal pseudogenes resolve a corroborated monophyly of the eucalypt genus *Corymbia* despite misleading hypotheses at functional ITS paralogs – *Molecular Phylogenetics and Evolution* 44: 752-764
- O’Kane SL., Schaal BA., Al-Shehbaz IA. (1996) The origin of *Arabidopsis suecica* as indicated by nuclear rDNA sequences – *Systematic Botanic* 21: 559-566
- Opara UL., Jacobson D., Al-Saady NA. (2010) Analyses of genetic diversity in banana cultivars (*Musa* cvs.) from the South of Oman using AFLP markers and classification by phylogenetic, hierarchical clustering and principal component analyses – *Biomedicine and Biotechnology* 11: 332-341
- Osuji JO., Harrison G., Crouch J., Heslop-Harrison JS. (1997) Identification of the genomic constitution of *Musa* L. lines (bananas, plantains and hybrids) using molecular cytogenetics – *Annals of Botany* 80: 787-793
- Petes TD. (1980) Unequal meiotic recombination within tandem arrays of yeast ribosomal DNA genes – *Cell* 19: 765-774
- Perrier X., Langhe E., Donohue M. a kol. (2011) Multi disciplinary perspectives on banana (*Musa* spp.) domestication – *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108: 11311-11318
- Polanco C., González AI., Fuente A., Dover GA. (1998) Multigene family of ribosomal DNA in *Drosophila melanogaster* reveals contrasting pattern of homogenization for IGS and ITS spacer regions: a possible mechanism to resolve this paradox – *Genetics* 149: 243-256
- Popp M., Oxelman B. (2001) Inferring the history of the polyploid *Silene aegaea* (*Caryophyllaceae*) using plastid and homoeologous nuclear DNA sequences – *Molecular Phylogenetics and Evolution* 20: 474-81.
- Pukkila PJ., Skrzynia C. (1993) Frequent changes in the number of reiterated ribosomal RNA genes throughout the life cycle of the basidiomycet *Ceoprinus cinereus* - *Genetics* 133: 203-21
- Reis-Filho J. (2009) Next-generation sequencing – *Breast Cancer Research* 11: 12

- Risterucci A., Hippolyte I., Perrier X., Xia L., Kilian A., Glaszmann J. (2009) Development and assessment of Diversity Arrays Technology for high-throughput DNA analyses in *Musa* – Theoretical and Applied Genetics 119: 1093-1103
- Rooney A., Ward T. (2005) Evolution of a large ribosomal RNA multigene family in filamentous fungi: birth and death of a concerted evolution paradigm – Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 102: 5084-5089
- Rokas A., Williams BL., King N., Carroll SB. (2003) Genome-scale approaches to resolving incongruence in molecular phylogenies – Nature 425: 798-804
- Ruanguttapha S., Eimert K., Schroder M., Silayoi B., Kanchanapoom K. (2007) Molecular phylogeny of banana cultivars from Thailand based on HAT-RAPD markers – Genetic Resource and Crop Evolution 54: 1565-1572
- Rukazambuga ND., Gold CS., Gowen SR. (1998) Yield loss in East African highland banana (*Musa* spp., AAA-EA group) caused by the banana weevil, *Cosmopolites sordidus* Germar – Crop Protection 17: 581-589
- Sang T., Crawford DJ., Stuessy TF. (1995) Documentation of reticulate evolution in peonies (*Paeonia*) using internal transcribed spacer sequences of nuclear ribosomal DNA: implications for biogeography and concerted evolution - Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 92: 6813-6817
- Seibl R., Höltnke HJ., Rüger R., Meindl A., Zachau HG., Raschofer R., Roggendorf M., Wolf H., Arnold N., Wienberg J. (1990) Non-radioactive labeling and detection of nucleic acids. III. Applications of the digoxigenin system - Biological Chemistry Hoppe Seyler 371: 939 - 951
- Semagn K., Bjornstad A., Ndjondjop MN. (2006) An overview of molecular marker methods for plants – African Journal of Biotechnology 5: 2540-2568
- Sharma SK., Dkhar J., Kumaria S., Tandon P., Rao SR. (2012) Assessment of phylogenetic inter-relationships in the genus *Cymbidium* (*Orchidaceae*) based on internal transcribed spacer region of rDNA – Gene 495: 5-10
- Shepherd K. (1999) Cytogenetics of the genus *Musa* - International network for the improvement of banana and plantain, Montpellier, France, p. 160

- Schlotterer C., Hauser MT., Haeseler A., Tautz D. (1994) Comparative evolutionary analyses of rDNA ITS regions in *Drosophila* – *Molecular Biology and Evolution* 11: 513-522
- Schultz J., Maisel S., Gerlach D. (2005) A common core of secondary structure of the internal transcribed spacer 2 (ITS2) through the Eukaryota – *RNA Society* 11: 361-364
- Schuster S. (2008) Next-generation sequencing transforms today's biology – *Nature Methods* 5: 16-18
- Simmonds NW. (1954) Isolation in *Musa*, sections *Eumusa* and *Rhodochlamys* – *Evolution* 8: 65-74
- Simmonds NW., Shepherd K. (1955) Taxonomy and origins of cultivated bananas – *Journal of the Linnean Society of London, Botany* 55: 302-312
- Simmonds NW. (1956) Botanical results of the banana collecting expedition 1954-1955 – *Kew Bull* 3: 463-489
- Simmonds NW. (1962) *The evolution of the bananas* – London. Longmans
- Stage DE., Eickbush TH. (2007) Sequence variation within the rRNA gene loci of 12 *Drosophila* species – *Genome research* 17: 1888-1897
- Stover RH., Simmonds NW. (1987) *Bananas*. 3rd ed. Longmans
- Szostak JW., Wu R. (1980) Unequal crossing over in the ribosomal DNA of *Saccharomyces cerevisiae* – *Nature* 284: 426-430
- Ude G., Pillay M., Nwakanma D., Tenkouano A. (2002) Genetic diversity in *Musa acuminata* Colla and *Musa balbisiana* Colla and some of their natural hybrids using AFLP markers – *Theoretical and Applied Genetics* 104: 1246-1252
- Ude G., Pillay M., Nwakanma D., Tenkouano A. (2002) Analysis of genetic diversity and sectional relationship in *Musa* using AFLP markers – *Theoretical and Applied Genetics* 104: 1239-1245
- Valárik M., Šimková H., Hřibová E., Šafař J., Doleželová M., Doležel J. (2002) Isolation, characterization and chromosome localization of repetitive DNA sequences in bananas (*Musa* spp.) – *Chromosome Research* 10: 89-100

- Venkatachalam L., Sreedhar RV., Bhagyalakshmi N. (2008) The use of genetic markers for detecting DNA polymorphism, genotype identification and phylogenetic relationships among banana cultivars – *Molecular Phylogenetics and Evolution* 47: 974-985
- Vera JC., Wheat CW., Fescemyer HW., Frilander MJ., Crawford DL., Hanski I., Marden JH. (2008) Rapid transcriptome characterization for a nonmodel organism using 454 pyrosequencing – *Molecular Ecology* 17: 1636-1647
- Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., Lee T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M., Zabeau M. (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting - *Nucleic Acids Research* 23: 4407-4414
- Wagner A., Blackstone N., Cartwright P., Dick M., Misof B. (1994) Surveys of gene families using polymerase chain reaction: PCR selection and PCR drift – *Systematic Biology* 43: 250-261
- Waugh R., McLean K., Flavell AJ., Pearce SR., Kumar A., Thomas BB., Powell W. (1997) Genetic distribution of Bare-1-like retrotransposable elements in the barley genome revealed by sequence-specific amplification polymorphisms (S-SAP) – *Molecular and General Genetics* 253: 687-94
- Wendel JF., Schnabel A., Seelanan T. (1995) An unusual ribosomal DNA sequence from *Gossypium gossypioides* reveals ancient, cryptic, intergenomic introgression – *Molecular Phylogenetics and Evolution* 4: 298-313
- Wendel JF., Schnabel A., Seelanan T. (1995) Bidirectional interlokus concerted evolution following allopolyploid speciation in cotton (*Gossypium*) - *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92: 280-284
- Wenzl P., Carling J., Kudrna D., Jaccoud D., Huttner E., Kleinhofs A., Kilian A. (2004) Diversity Arrays Technology (DArT) for whole-genome profiling of barley - *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 9915-9920
- White TJ., Bruns T., Lee S., Taylor J. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics – *A Guide to Methods and Application*, 315-322

Williams JG., Kubelik AR., Livak KJ., Rafalski JA., Tingey SV. (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers – *Nucleic Acids Research* 18: 6531-6535

Wong C., Kiew R., Argent G., Set O., Lee S., Gan Y. (2002) Assessment of the validity of the sections in *Musa* (*Musaceae*) using AFLP – *Annals of Botany* 90: 231-238

Xiao LQ., Moller M., Zhu H. (2010) High nrDNA ITS polymorphism in the ancient extant seed plant *Cycas*: incomplete concerted evolution and the origin of pseudogenes - *Phylogenetics and Evolution* 55: 168-177

Zheng XY., Cai DY., Yao LH., Teng YW. (2008) Non-concerted ITS evolution, early origin and phylogenetic utility of ITS pseudogenes in *Pyrus* – *Molecular Phylogenetics and Evolution* 48: 892-903

Zimmer EA., Martin SL., Beverley SM., Kan YW., Wilson AC. (1980) Rapid duplication and loss of genes coding for the α chains of hemoglobin – *Genetics* 77: 2158-2162

Internetové odkazy

<http://www.nationmaster.com>

<http://www.fao.org>

<http://www.promusa.org>

<http://bananas.bioiversityinternational.org>

<http://www.crop-diversity.org/banana/>

<http://www.traditionaltree.org>

<http://www.dnabaser.com>

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AFLP	polymorfismus délky amplifikovaných fragmentů (amplified fragment length polymorphism)
atpB	β podjednotka ATP syntázy
bp	páry bází (base pairs)
cpDNA	chloroplastová DNA
DArT	diverzity arrays technology
DNA	deoxyribonukleová kyselina
IGS	mezigenový mezerík (intergenic spacer)
IRAP	amplifikovaný polymorfismus mezi retrotranspozony (inter-retrotranspozon amplified polymorphism)
ITS	vnitřní přepisovaný mezerík (internal transcribed spacer)
matK	maturáza K
ndhF	podjednotka NADH dehydrogenázy
NK	nukleová kyselina
NOR	oblast organizátoru jádérka (nucleolar organizer region)
PCR	polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)

RAPD	náhodně amplifikovaná polymorfni DNA (random amplified polymorphic DNA)
rbcl	rubisco (ribuloso-1,5-bisfosfát-karboxylasa/oxygenasa)
RBIP	polymorfismus inzercí retrotranspozonu (retrotranspozon-based insertion polymorphism)
rDNA	ribozomální DNA
REMAP	amplifikovaný polymorfismus mezi retrotranspozony a mikrosatelity (retrotranspozon-microsatellite amplified polymorphism)
RFLP	polymorfismus délky restričních fragmentů (restriction fragment length polymorphism)
SMRT	sekvenování jednotlivých molekul v reálném čase (single molecule real time sequencing)
SNP	jednonukleotidový polymorfismus (single nucleotide polymorphism)
SOLiD	sekvenování ligací oligonukleotidů a detekce (sequencing by oligo ligation and detection)
SSAP	sekvenčně specifický amplifikovaný polymorfismus (sequence-specific amplified polymorphism)
SSR	jednoduché repetitivní sekvence (simple sequence repeats)
trnT	transferová RNA (threonin)

trnF

transferová RNA (fenylalanin)