

Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta

Katedra buněčné biologie a genetiky



**Studium genetické diverzity banánovníku (*Musa sp.*) pomocí SSR
genotypovací platformy**

Diplomová práce

Markéta Hušáková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2015

Vedoucí práce: Mgr. Eva Hřibová, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně s pomocí vedoucí práce paní Mgr. Evy Hřibové, Ph.D. a použité citované literatury.

V Olomouci dne

.....

PODĚKOVÁNÍ

Děkuji své vedoucí práce Mgr. Evě Hřibové, Ph.D. za to, že mi byla ochotnou a trpělivou školitelkou při tvorbě mé diplomové práce. Děkuji také paní laborantce Ing. Marii Seifertové za provedení fragmentačních analýz na sekvenátoru, nezbytných pro získání výsledků mé práce. V neposlední řadě děkuji svým rodičům, přátelům a partnerovi za obrovskou podporu a vytvoření stabilního zázemí.

BIBLIOGRAFICKÁ IDENTIFIKACE

Jméno a příjmení autora: Markéta Hušáková

Název práce: Studium genetické diverzity banánovníku (*Musa* sp.) pomocí SSR genotypovací platformy

Typ práce: Diplomová

Pracoviště: Katedra buněčné biologie a genetiky, Přírodovědecká fakulta UP a Centrum strukturní a funkční genomiky rostlin, Ústav experimentální botaniky AV ČR

Vedoucí práce: Mgr. Eva Hříbová, Ph.D.

Rok obhajoby: 2015

ABSTRAKT

Banánovník patří mezi plodiny s největším hospodářským významem na světě. Nejvíce je pěstován v tropických oblastech Afriky a Asie, kde tvoří základní potravinu pro miliony lidí. Diverzita banánovníku je však v současné době ohrožena patogeny a škůdci přičemž dochází ke ztrátám genetických zdrojů. Kvůli této skutečnosti je vyvíjeno úsilí pro charakterizaci a uchovávání dostupných položek banánovníku v genových bankách. Kolekce položek banánovníků mohou sloužit pro následné studium genů rezistence a šlechtění odolnějších odrůd banánovníků. Největší sbírka banánovníku je uložena v mezinárodní genové bance banánovníku v Lovani v Belgii, která je spravována mezinárodní organizací Bioversity International. Vzhledem ke sterilitě jedlých typů banánovníku a nízké fertilitě semen planých druhů, jsou veškeré položky v genové bance uchovávány ve formě *in vitro* rostlin. K podrobné charakterizaci položek banánovníku uchovaných v genové bance byla ve spolupráci s Bioversity International vyvinuta SSR genotypovací platforma využívající 19 mikrosatelitových markerů. Pomocí této platformy je možné odhalit přítomnost pravděpodobných duplikátů vzorků uchovávaných v genové bance, identifikovat špatně popsané položky a určit nové položky banánovníku. Tato diplomová práce si klade za cíl analyzovat soubor vzorků banánovníku poskytnutých genovou bankou International Transit Centre, Leuven v Belgii a především se zaměřit na využití SSR genotypování pro odhalení přítomnosti somaklonální variability u jednotlivých klonů různých genotypů banánovníku, ke které může docházet při pěstování položek v explantátových kulturách. Práce také přispívá k rozšíření znalosti o diverzitě banánovníku a metodikách používaných k charakterizaci genetické diverzity.

Klíčová slova: banánovník, diverzita, mikrosatelity, SSR genotypovací platforma, markery

Počet stran: 57

Počet příloh: 0

Jazyk: Čeština

BIBLIOGRAPHIC IDENTIFICATION

First name and surname of the author: Markéta Hušáková

Name of the thesis: Analysis of genetic diversity of banana (*Musa* sp.) using SSR genotyping platform

Type of thesis: Diploma

Workplace: Department of Cell Biology and Genetics, Faculty of Science and Centre of Plant Structural and Functional Genomic, Institute of Experimental Botany, AS CR

Thesis supervisor: Mgr. Eva Hřibová, Ph.D.

Year of defence: 2015

ABSTRACT

Bananas and plantains are crops with the largest economic importance in the world. They are mostly grown in tropical regions of Africa and Asia, where form a staple food for millions of people. However, diversity of the banana is currently endangered by pathogens and pests which cause loss of genetic resources. As a consequence of this fact is made an effort for characterization and conservation of available banana germplasm in gene banks. Collections of the banana germplasm can be used for subsequent studies of resistance traits and breeding new cultivars of banana. The largest collection of banana germplasm is stored in the international banana gene bank in Leuven, Belgium, which is under the control of the international organisation called Bioversity International. Because of the sterility of the edible types of banana and low fertility of the wild type's seeds, all germplasm is stored in gene bank like in vitro cultures. To characterize the germplasm of the banana stored in gene bank was in cooperation with Bioversity International developed SSR genotyping platform using 19 microsatellite markers. This platform allows to reveal the presence of probable duplicates of samples stored in gene bank and identify wrongly described germplasm or new germplasm of banana. This diploma thesis aims to analyze a set of samples provided by the banana gene bank International Transit Centre in Leuven, Belgium and mainly focus on the use of SSR genotyping to detect the presence of somaclonal variability in individual clones of different genotypes of banana, which can occur when grown in explant in vitro cultures. Thesis also contributes to the expansion of knowledge about the diversity of banana and methods used to characterize genetic diversity.

Keywords: banana, diversity, microsatellites, SSR genotyping platform, markers

Number of pages: 57

Number of appendices: 0

Language: Czech

OBSAH

Úvod	9
Cíle práce	10
1. Obecná charakteristika banánovníku	11
1.1. Morfologie banánovníku.....	11
1.2. Hospodářský význam banánovníku	13
2. Taxonomie banánovníku	14
2.1. Morfotaxonomické deskriptory	16
3. Uchování genetické diverzity banánovníku	18
3.1. Genové banky	18
4. Struktura genomu banánovníku	20
4.1. Složení genomu.....	22
5. Využití molekulárních markerů pro studium genetické diverzity banánovníku	25
6. SSR genotypovací platforma a její využití pro charakterizaci položek v genové bance	28
Materiály a metody	30
1. Biologický materiál	30
2. Metody	33
2.1. Příprava vzorků na izolaci DNA.....	33
2.2. Izolace genomové DNA.....	33
2.3. Ověření kvality a kvantity genomové DNA	34
2.4. SSR analýza	35
2.5. Purifikace PCR produktů	35
2.6. Fragmentační analýza	36
2.7. Analýza získaných dat	36
Výsledky	38
Diskuze	45
Závěr	47
Seznam použité literatury	48
Seznam použitých zkratk	57

Úvod

Banánovník (*Musa* spp., čeleď *Musaceae*) je velká jednoděložná bylina s původem v jižní Asii a západním Pacifiku (Davey et al. 2013). Tato největší vytrvalá, vegetativně se šířící bylina světa má velký hospodářský význam zejména v rozvojových zemích, kde tvoří hlavní zdroj potravy a je významnou exportní komoditou. Patří mezi nejdůležitější plodinu v tropických a subtropických oblastech a zahrnuje širokou škálu jak planých forem banánovníků tak jedlých, především triploidních typů, které se vyvinuli mezidruhovou a vnitrodruhovou hybridizací dvou diploidních planých druhů banánovníku (Crouch et al. 2000).

Proces domestikace banánovníku začal před 7 000 lety v jižní Asii. To zahrnovalo hybridizace mezi různými druhy a poddruhy *M. acuminata* (A genom) a *M. balbisiana* (B genom), podporované migracemi lidí a selekcí diploidních a triploidních bezsemenných, partenokarpních hybridů, které se následně široce rozšířily vegetativním množením. Polovina současné produkce je závislá na somatoklonech odvozených z jediného triploidního genotypu „Cavendish“ (AAA), (D'Hont et al. 2012), který v současné době tvoří více než 90 % komerčního vývozu (Molina et al. 2010). Tato závislost na jednom typu kultivaru a následný nedostatek genetické variability měla za následek vznik plodiny, která je potenciálně vysoce náchylná k pandemickým chorobám (Davey et al. 2013). Škůdci a choroby, které se postupně přizpůsobily nyní představují bezprostřední nebezpečí pro globální produkci plodů banánovníku (D'Hont et al. 2012). Je proto velmi důležité zachovat dostatečnou genetickou variabilitu banánovníků pro následné studie genů rezistence a získávání odolnějších kultivarů.

Tato diplomová práce přispívá k objasnění genetické variability genotypů banánovníku. V současné době existuje mnoho genomických nástrojů a metod používaných pro studium genetické diverzity banánovníku. Mezi nejčastější patří markery založené na PCR jako je AFLP, RAPD a SSR neboli mikrosatelity, které jsou použity v této diplomové práci. První část diplomové práce seznamuje s morfologií banánovníku a objasňuje jeho hospodářský význam. Dále následuje kapitola týkající se taxonomie s uvedením morfotaxonomických deskriptorů. Kapitola uchování genetické diverzity banánovníku uvádí hlavní centra diverzity a shrnuje informace o genových bankách. Následuje pojednání o struktuře genomu banánovníku, využití molekulárních markerů a SSR genotypovací platformy s cílem charakterizovat genetickou diverzitu položek rodu *Musa* uchovávaných v genové bance banánovníku – ITC kolekci (Lovaň, Belgie).

Cíle práce

1. Vypracovat literární přehled o diverzitě banánovníku a metodikách používaných pro charakterizaci genetické diverzity

Cílem první části diplomové práce je zpracovat literární přehled zahrnující popis a význam banánovníku, taxonomické zařazení s uvedením morfotaxonomických deskriptorů dále uvést způsoby uchování genetické diverzity v genových bankách, popsat strukturu genomu banánovníku a využití molekulárních markerů včetně SSR genotypovací platformy.

2. Připravit vzorky pro SSR genotypování

Dalším cílem diplomové práce je připravit vzorky pro SSR genotypování což zahrnuje izolaci genomové DNA, PCR s fluorescenčně značenými mikrosatelitovými markery, purifikaci produktů a fragmentační analýzu na sekvenátoru.

3. Analyzovat výsledky fragmentační analýzy

Třetím cílem předkládané diplomové práce je analýza výsledků fragmentační analýzy pomocí bioinformatických programů. Vyhodnotit délku alel programem GeneMarker a vytvořit dendrogram pomocí programu PowerMarker s využitím algoritmu UPGMA.

1. Obecná charakteristika banánovníku

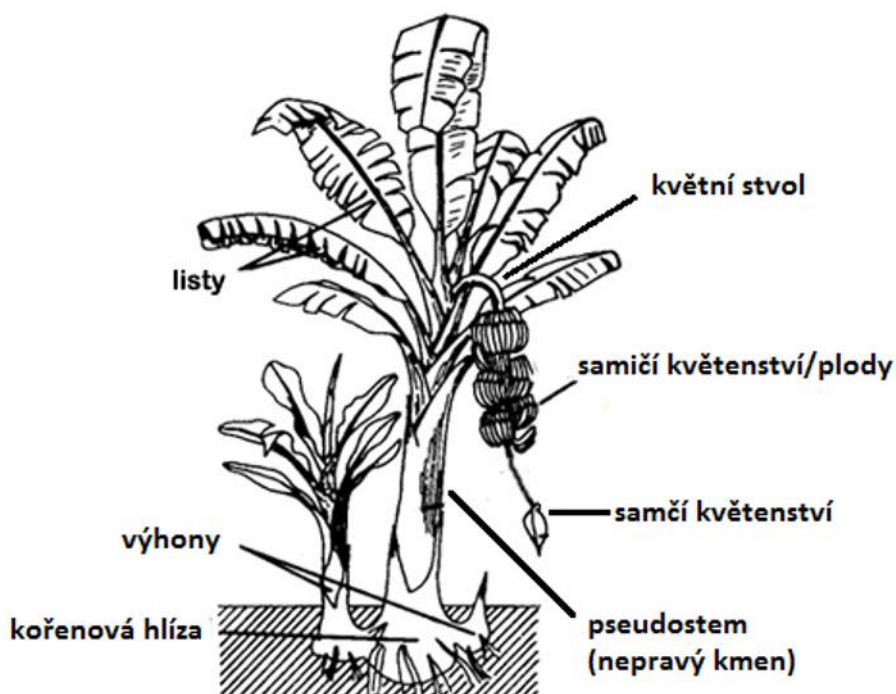
1.1. Morfologie banánovníku

Banánovníky představují jedny z největších vytrvalých bylin s rozsahem výšky 2-9 m u kultivovaných rostlin a 10-15 m u planě rostoucích druhů. Rostlina se skládá z podzemního stonku, pseudostemu, listů a květenství. Podzemní stonek se na bázi rostliny rozšiřuje v kořenovou hlízu, ze které vyrůstají mladé výhony zachovávající životní cyklus rostliny (Obr. č. 1). Rostliny banánovníku jsou monokarpické, což znamená, že kvetou pouze jednou za svůj životní cyklus a po vytvoření a dozrání plodů odumírají. Životní cyklus je zachován nepřetržitou produkcí nových výhonů, které se vytvářejí z přídavných pupenů produkovaných kořenovou hlízou. Tento proces obnovy udává banánovníku status vytrvalé rostliny (Simmonds 1962). Výhony jsou hlavním způsobem šíření banánovníku a vytvářejí následnou vegetativní generaci. Poté co předchozí rostlina odplodí a odumře, objevuje se zprvu tzv. „panenský“ výhon (maiden sucker) - velký, ale plody nevytvářející výhon, který pokračuje v životním cyklu. Banánovníky se rozmnožují vegetativně pomocí výhonů ačkoliv plané druhy se mohou také rozmnožovat semeny (Stover & Simmonds 1987).

Pseudostem, tzv. nepravý kmen je tvořen velkými překrývajícími se listovými pochvami, které jsou navzájem těsně stočeny a vytvářejí tak pevnou strukturu připomínající kmen (Purseglove 1972; Stover & Simmonds 1987). Pseudostem je značně variabilní část banánovníku a právě odlišnosti v jeho výšce, barvě a uspořádání jsou používány k rozlišování jednotlivých kultivarů. Např. pseudostem skupin genotypů AB, AAB (tzv. plantainy) a ABB je převážně žluto-zelený s částečnou růžovou pigmentací na spodních pochvách listů popř. zcela bez pigmentace. Skupiny genotypů AA a AAA jsou obecně různorodě zbarvené. Pseudostem skupiny genotypu AA je převážně hnědý v místě spojení pseudostemu a řapíku, zatímco genotyp AAA má matně zelené až zeleno-hnědé či narůžovělé vrchní listové pochvy. Výška pseudostemu se rovněž liší mezi kultivary a v rámci různých agro-ekologických podmínek např. pro typ „Gros Michel“ (sladký typ banánovníku s genomem AAA) rostoucí na pláních od 4 m do 8 m u rostlin rostoucích v chráněných údolích (Purseglove 1972). Většina kultivarů má pseudostem rovný a vzpřímený, ale některé kultivary podskupiny Lujugira-Mutika jako je „Mukazi-aranda“ má zřetelný plazivý habitus od čehož je odvozen jeho název, který v Luganda dialektu znamená „plazící se lady“.

Z apikálního meristému kořenové hlízy se zakládají listy a květenství. Listy se vyvíjejí víceméně vertikálně, postupně se stávají horizontálními až převislými. Nový vyvíjející se list má tvar stočeného válce (odtud název „cigar leaf“ neboli „doutníkový list“), a vyrůstá zevnitř

pseudostemu. Během svého života vytvoří banánovník cca 30-40 listů. Po vytvoření určitého množství listů se započne z meristému zakládat květní stvol, který prorůstá směrem vzhůru pseudostemem. Květenství banánovníku je tvořeno třemi typy květů. Samičí květy se objevují jako první a jejich velké semeníky se posléze přeměňují v plody. Jakmile jsou samičí květy vyvinuty, vytváří se květy samčí uložené v pupenu (Obr. č. 1). Samčí květy produkují pyl, který může být buď fertilní či sterilní. Třetí typ květů zvaný „bezpohlavní“ je umístěn na ose květenství mezi samičími květy a samčím pupenem. Obvykle je sterilní. Většina pěstovaných banánovníků však vytváří plody partenokarpicky čímž nedochází k tvorbě semen, která by jinak činila plody nevhodné ke konzumaci (Simmonds 1962).



Obr. č. 1: Morfologie rostliny banánovníku. <http://www.fao.org/docrep/>, převzato s úpravami.

1.2. Hospodářský význam banánovníku

Tato největší vytrvalá bylina světa roste v tropických a subtropických oblastech subsaharské Afriky, jižní a centrální Ameriky, Asie a Pacifiku a s její produkcí, která v roce 2012 přesáhla 105 miliónů tun se banánovník řadí mezi deset nejpěstovanějších plodin světa (FAO 2012). Přibližně 90 % produkce je spotřebováno lokálně jako důležitý zdroj potravy pro stovky miliónů lidí v rozvojových zemích. Banánovníky se pěstují ve více než sto zemích světa. Organizace pro výživu a zemědělství (FAO – Food and Agriculture Organisation) roku 2012 uvedla Indii jako největšího světového producenta banánových plodů s produkcí cca 24 miliónů tun. Afrika údajně produkuje 35 % banánů, Asie a Pacifik 29 % a Latinská Amerika a Karibik 35 %. Afrika a Asie produkuje banány hlavně pro lokální spotřebu zatímco státy střední Ameriky pěstují banány (převážně typ „Cavendish“) především pro vývoz. Banány jsou připravovány a konzumovány mnoha způsoby přičemž každá země má vlastní tradiční pokrmy a metody přípravy (Frison & Sharrock 1998). Mohou se konzumovat vařené, pečené nebo smažené v zralém nebo nezralém stavu. Nutričně, čerstvé banány obsahují 35 % sacharidů, 6-7 % vlákniny, 1-2 % proteinů a tuků, navíc hlavní prvky jako je draslík, hořčík, fosfor, vápník, železo a vitaminy A, B6 a C (Robinson 1996).

Produkce je rozdělena do dvou hlavních skupin na sladké neboli „dessert bananas“ konzumované syrové či tepelně upravené a škrobové banány tzv. „cooking bananas“, které jsou určeny výhradně k tepelné úpravě. Zatímco sladké typy banánovníků jsou představovány především hybridy s genomovým složením AA, AAA, škrobové banány, mezi které patří např. i známé plantainy, jsou mezidruhoví hybridy s genomovým složením AAB, ABB. Dezertní typy banánů jsou po dozrání sladké zatímco plantainy zůstávají škrobovité a jsou jedlé až po tepelné úpravě. Převážná většina jedlých typů banánovníku vznikly přirozeným vnitrodruhovým nebo mezidruhovým křížením mezi dvěma planými diploidními druhy nesoucími semena - *Musa acuminata* spp. a *M. balbisiana* spp. (Simmonds 1995). Většina pěstovaných forem banánovníků jsou triploidní, vysoce sterilní rostliny, které se již po několik staletí rozmnožují vegetativně (Risterucci et al. 2009). Další skupina jedlých typů banánů vznikla v rámci evoluce banánovníku nezávisle a to díky přirozené hybridizaci druhů v rámci sekce Callimusa (viz níže). Tyto jedlé typy banánovníků se nazývají Fe'i banány a jsou typické pro oblast jihovýchodní Asie. Zatímco 90 % veškeré produkce banánovníku je vyprodukováno malo-pěstiteli a zkonsumováno přímo v místě produkce, jen asi 10 % celosvětové produkce banánovníku je určeno pro vývoz. Vyvážejí se především banány dezertního typu, které jsou představovány výhradně jedním typem – triploidním klonem s genomem AAA „Cavendish“ (Ortiz et al. 1998).

Banánovník je tropická plodina velkého socio-ekonomického významu, jako základní potravina v rozvojových zemích produkující cukernou biomasu, škrob a celulózu používanou při výrobě papíru, textilu a paliva (Droc et al. 2013). Jiné produkty z banánovníku zahrnují džemy, džusy a sirupy, banánové chipsy a banánovou mouku. Banánovníky se také používají ve výrobě piva, vína a dalších produktů a vytvářejí tak důležitou část kulturního života mnoha lidí (Stover & Simmonds 1987). Kromě potravy a příjmů zastávají banánovníky mnoho důležitých funkcí. Například banánovníkové listy mohou být použity jako stavební materiál pro domy, jako talíře, ubrusy, deštníky nebo krmení pro zvířata. Banánové listy a pseudostemy obsahují vysoce kvalitní vlákno používané pro výrobu provazů, košů, kobereců a ručně vyráběného papíru. Ve smíšených pěstebních systémech, banánovníky poskytují stín pro plodiny, které rostou lépe v zastíněných podmínkách jako je kakaovník, pepřovník, kávovník a vanilka. Banánovníky také udržují strukturu půdy a chrání ji před větrnou a dešťovou erozí (Simmonds 1962).

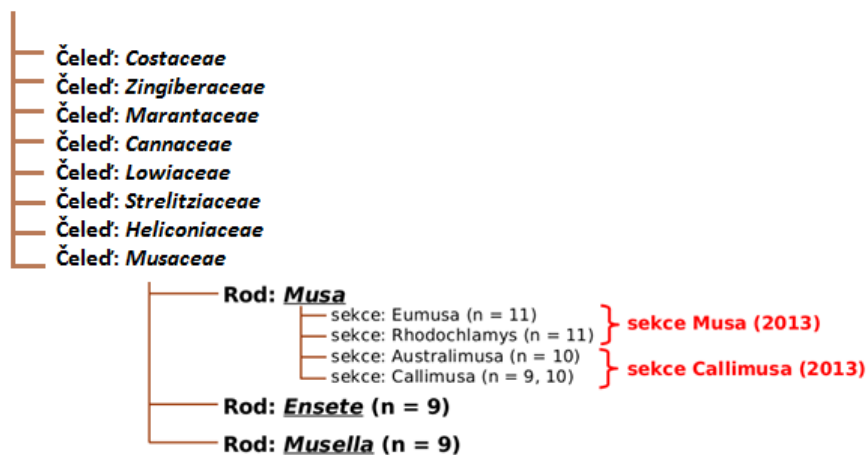
2. Taxonomie banánovníku

Banánovník náleží do rodu *Musa* L., čeledi *Musaceae* – banánovníkovité a řádu Zingiberales – zázvorníkotvaré (Obr. č. 2). Rod *Musa* obsahuje široký rozsah planých forem banánovníků a diploidních, triploidních a tetraploidních typů, které se vyvinuly z mezidruhových a vnitrodruhových hybridů dvou planých diploidních druhů *M. acuminata* Colla. (donor A genomu) a *M. balbisiana* Colla. (donor B genomu), (Simmonds & Shepherd 1955). Taxonomie rodu *Musa* zahrnuje více než 70 druhů (NCBI 2015). Čeleď *Musaceae* zahrnuje ještě další dva rody a to rod *Ensete* a *Musella*.

Vůbec první zmínku o nomenklatuře banánovníků uvedl Carl Linné ve svém díle *Species Plantarum* (1753) popisem druhu *Musa paradisiaca*. Od té doby bylo popsáno velké množství druhů banánovníků, které botanici zpočátku třídili na základě morfologie (Häkkinen 2013). Sagot (1887) rozdělil rod *Musa* do tří bezejmenných skupin nazvaných sekce: 1) banánovníky s dužnatými plody, většinou jedlé např. *M. paradisiaca*, *M. sapientum* a *M. troglodytarum*; 2) okrasné banánovníky se vzpřímeným květenstvím a pestrobarevnými listy např. *M. ornata*, *M. sanguinea* a *M. coccinea*; 3) velké banánovníky jako *M. ensete*. Cheesman (1947) později vytvořil jasný a ucelený klasifikační systém pro rod *Musa*. Ten je charakterizován souborem morfologických deskriptorů a má základní chromozomové číslo (x) 9, 10 nebo 11 (Simmonds & Shepherd 1955). Na základě fenotypu rostliny a počtu chromozomů se rod tradičně rozděloval do 4 sekcí: Eumusa (x = 11), Rhodochlamys (x = 11),

Callimusa ($x = 9, 10$) a Australimusa ($x = 10$), (Bartoš et al. 2005). Argent (1976) přidal pátou sekci, Ingentimusa ($x = 7$), obsahující jen jeden druh *M. ingens*. Avšak, od té doby co tento druh roste v rámci oblasti Australimusa (Nová Guinea), nebyl status této sekce prokázán v porovnání s *M. beccarii* ($x = 9$), který roste v oblasti Callimusa (Borneo) a zůstává klasifikován jako Callimusa.

Řád: Zingiberales



Obr. č. 2: Schéma taxonomie řádu Zingiberales.

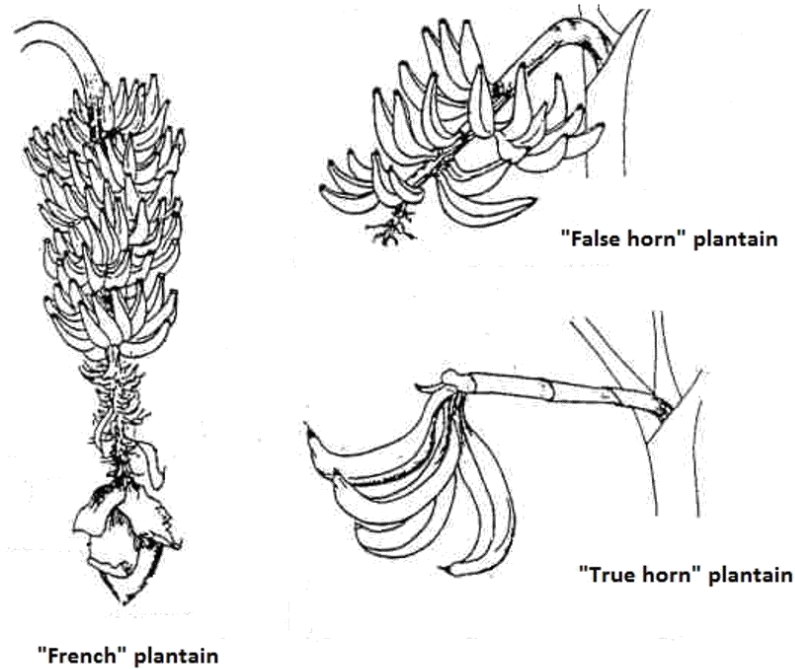
V současné době byly tradiční přístupy založené na analýze morfologie a počtu chromozomů doplněny analýzou sekvencí DNA jako je délka genu ribosomálního mezerníku (ribosomal gene spacer length), (Lanaud et al. 1992; Li et al. 2010; Liu et al. 2010; Hřibová et al. 2011), genové oblasti a pro analýzu genetické diverzity bylo využito velkého počtu molekulárních markerů jak např. RFLP (Gawel et al. 1992; Jarret et al. 1992) a AFLP (Wong et al. 2001; Ude et al. 2002a, b), DArT markery (Risterucci et al. 2009; Hippolyte et al. 2010) nebo SSR makery (Gaudeul et al. 2004; Christelová et al. 2011). Analýza genetické diverzity v rámci rodu *Musa* a především fylogenetické studie čeledi *Musaceae* využívající sekvenční informaci ITS oblasti a jednokopiových genů vedly k revizi taxonomie v rámci rodu *Musa* (Hakkinen 2013), kdy byly sloučeny sekce Eumusa a Rhodochlamys do jedné sekce s názvem Musa a podobně, sekce Australimusa a Callimusa byly sloučeny do sekce s názvem Callimusa (Obr. č. 2).

2.1. Morfotaxonomické deskriptory

Nejpoužívanější systém klasifikace zástupců rodu *Musa* vytvořil Simmonds a Shepherd (1955). Tito autoři použili techniku skórování k určení procentuálního podílu každého ze dvou diploidů druhu *Musa* v jakémkoliv zástupci. Jejich systém obsahoval 15 diagnostických deskriptorů. Stupnice pro každý kvalitativní deskriptor měla rozsah od 1 (fenotypově rovný *M. acuminata*) do 5 (čistě *M. balbisiana*), (Ortiz et al. 1998). Taxonomicky se jednotlivé typy banánovníků klasifikovaly na základě uvedeného souboru deskriptorů a analýzy ploidie do genomových skupin lišících se konstitucí genomu a ploidií (Simmonds a Shepherd 1995). Hlavní skupiny genomů jsou AA, AAA, AAB a ABB, ačkoliv kombinace AB, AAAB, AABB a ABBB jsou také možné (Stover & Simmonds 1987). Blíže příbuzné klony nebo zástupci vzniklé mutací v jednom genotypu jsou přiřazeny do tzv. podskupin, charakterizovaných specifickými morfologickými vlastnostmi a znaky kvality plodů (Simmonds 1973). S využitím tohoto systému deskriptorů byly přiřazeny typy „Cavendish“ a „Gros Michel“ ke skupině genomu AAA. Podobně byly přiřazeny, typy odvozené z mezidruhových křížení *M. acuminata* a *M. balbisiana*, jako jsou triploidní „cooking bananas“ ke skupině ABB a triploidní plantainy stejně tak jako lokálně konzumované dezertní banány Indie a Brazílie ke skupině AAB (Ortiz et al. 1998).

Plantainy jsou morfologicky variabilní obzvláště ve znacích květenství. Na základě tohoto zjištění byly identifikovány čtyři rozsáhlé skupiny plantainů: French, French Horn, False Horn a True Horn (Tezenas du Montcel et al. 1983), (Obr. č. 3). „Horn“ typy jsou charakterizovány absencí samčích květů a přítomností velkých plodů ve tvaru rohu, zatímco „French“ plantainy mají jak samčí tak samičí květy a menší velikost plodů (Kervégant 1935). V rámci každé skupiny se dále rozdělují dle jejich celkového počtu listů, který je signifikantně spojen s výškou rostliny. Velké plantainy mají více než 38 listů, zatímco malé vytvářejí méně než 32 listů (Swennen et al. 1995). Dva primární určovací znaky založené na květenství a velikosti (např. Horn/False Horn/French a velký/střední/malý) byly použity v kombinaci s limitovaným počtem sekundárních deskriptorů k vylepšení klasifikace. Sekundární deskriptory se většinou týkají různých vlastností svazku plodů jako je morfologie plodu a barva vegetativních částí a plodů. Tyto deskriptory usnadnily klasifikaci 56 typů plantainů kultivovaných v deštném pralese Congo Basin (De Langhe 1964a). V rámci této klasifikace byla odhalena negativní korelace mezi velikostí plodů a jejich počtem, a velikostí plodů a počtem samčích květů. V každé velikostní kategorii rostlin, kultivary s většími plody produkovaly menší počet plodů a měly méně rozvinuté samčí květy. Nejextrémnějšími případy jsou „Horn“ plantainy, které mají málo plodů vážících mezi 400-800 g. Bylo

navrženo, že u evoluce plantainů šlo o progresivní nárůst velikosti plodů na úkor počtu plodů a rozvoje samčích pupenů. Pro tento proces byl vytvořen termín „degenerace květenství“ (De Langhe 1964b).



Obr. č. 3: Základní skupiny plantainů. Zdroj: Fruits 38(6) 1983, převzato s úpravami.

V současné době se používají morfotaxonomické deskriptory vytvořené ve spolupráci Bioversity International a CIRAD (IPGRI-INIBAP/CIRAD 1996). Tento soubor zahrnuje kromě podrobných morfologických deskriptorů také deskriptory týkající se parametrů životního prostředí a lokalit banánovníků nebo informace o výnosu, agronomické hodnotě, náchylnosti k chorobám, biochemických a cytologických znacích popř. informace o registraci v genových bankách.

3. Uchování genetické diverzity banánovníku

Indie, je společně se zeměmi jihovýchodní Asie považována za jedno z hlavních center původu a diverzity banánovníku v globálním měřítku (Simmonds 1962). Velká diverzita se však také vyskytuje v subsaharské Africe, která je centrem druhotné diverzity banánovníku. Plantainy genotypu AAB se pěstují ve vlhkých nížinách západní a centrální Afriky, zatímco typy AAA „cooking“ a „beer bananas“, stejně tak jako ABB „cooking bananas“ jsou pěstovány ve středních výškách východní Afriky (Vuylsteke et al. 1993). Západní a centrální Afrika je centrem sekundární diverzifikace plantainů, kdežto východní Afrika je považována za sekundární centrum diverzity banánovníků skupiny AAA (Swennen et al. 1995). Předpokládá se, že tato centra sekundární diverzity banánovníků jsou výsledkem akumulace somatických mutací a selekce člověkem během dlouhé historie kultivace plodin v dané oblasti (De Langhe 1961, 1964).

Přítomnost genetické diverzity je nejdůležitějším faktorem v jakémkoliv programu pro šlechtění rostlin. Vyhledávání, shromažďování a uchovávání klonů vyžaduje pozornost při záchraně genofondu - zabránění jeho erozi, a zajišťuje jeho využití ve šlechtitelských programech (Venkatachalam et al. 2008). Úspěšný management rostlinných genetických zdrojů by měl být založen na a) posouzení genetických zdrojů podle morfologických deskriptorů; b) determinaci agronomické hodnoty genetických zdrojů a c) prokázání mezidruhových a vnitrodruhových vztahů (Sevilla & Holle 1995). Charakterizace a klasifikace genetických zdrojů poskytuje užitečnou informaci nejen pro správce genových bank, ale také především pro pěstitele a případné šlechtitele. Morfologické deskriptory by měli být skórovány jednoduše a musí mít stálou fenotypovou expresi ve všech typech prostředí, tj. vysokou dědivost a nízký vliv prostředí (Ortiz 1985). Vhodnými deskriptory pro charakterizaci genetických zdrojů jsou tedy ty, které nejsou ovlivněny prostředím (Ortiz 1997).

3.1. Genové banky

Hlavním cílem genových bank je jednak uchování genetické diverzity, ale také distribuce materiálů širší vědecké komunitě, pěstitelům a šlechtitelům. Za tímto účelem je velmi důležité nejen uchovávat genetické zdroje, ale také mít nástroje pro jejich jednoznačnou charakterizaci. Genetické zdroje banánovníku jsou uchovávány v národních i mezinárodních bankách. Národní banky uchovávají jednotlivé položky banánovníku ve formě polních sbírek,

což sebou přináší značné nároky na prostor, tyto sbírky jsou často devastovány nejen chorobami a škůdci, ale také přírodními podmínkami – např. tajfuny, které mají za následek devastaci těchto sbírek. Navíc je velmi složitá také distribuce a transfer položek z polních sbírek. Proto byla společností Bioversity International založena mezinárodní genová banka banánovníku, jejímž cílem je uchovávat a distribuovat položky banánovníku širší vědecké komunitě, pěstitelům a šlechtitelům banánovníku. Bioversity International kromě spravování genové banky banánovníku, také zastřešuje, koordinuje a finančně podporuje veškerý výzkum banánovníku. Vzhledem ke sterilitě jedlých typů banánovníku a nízké fertilitě semen planých druhů, jsou veškeré položky banánovníku v mezinárodní genové bance uchovávány jako *in vitro* rostliny. Tato skutečnost klade vysoké finanční nároky na udržitelnost genové banky. Společně s nízkým rozlišením morfotaxonomických deskriptorů se Bioversity International rozhodla charakterizovat genetickou diverzitu položek uchovaných v genové bance a napomoci tak nejen jednoznačné charakterizaci jednotlivých položek, ale především identifikovat špatně klasifikované položky nebo položky duplikované. K odstranění problémů s duplikáty v rámci národních, regionálních a globálních sbírek, napomáhá přesná a standardizovaná charakterizace nově zavedených přírůstků stejně tak jako těch již uskladněných v genových bankách (Christelová et al. 2011). Eliminace předpokládaných duplikátů v genových bankách musí být založena na dvoukrokovém postupu. Kurátoři genetických zdrojů mohou identifikovat údajné duplikáty na základě kvalitativních deskriptorů posouzených na neopakovaných pěstebních plochách a poté potvrdit svá pozorování porovnáním kvantitativních deskriptorů zaznamenaných při opakovaných polních pokusech. Alternativní metodou je porovnání předpokládaných duplikátů použitím DNA markerů, dostupných pro banánovníky (Faure et al. 1993; Howell et al. 1994; Jarret et al. 1994; Kammer et al. 1992).

National Research Centre for Banana (NRCB), Tamil Nadu uchovává sbírku celkem 525 položek z celé Indie. Některé klony byly posuzovány pro jejich reakci k houbovým patogenům *Mycosphaerella fijiensis* (způsobující chorobu zvanou „Black Sigatoka“), *Fusarium oxysporum* („Panama Disease“ způsobující vadnutí rostlin) a hád'átkům, jiné pro lepší výnos a kvalitu ovoce (Venkatachalam et al. 2008; Molina et al. 2010; Marin et al. 2003). Většina kultivovaných typů banánovníků je výsledkem přirozené mutace a selekce a proto je nezbytné odhalit užitečné klony pomocí důkladné evaluace. Následná *in vitro* propagace takto selektovaných klonů, je dobrým slibem pro budoucí genetické programy šlechtění banánovníků (Horry & Arnaud 1997).

Cílem založení genové banky v International Institute of Tropical Agriculture (IITA) v Nigérii je zachovat a posoudit světovou diverzitu banánovníků v rámci pracovní sbírky. IITA Onne Station uchovává cca 400 položek. Všechny přírůstky („wild“ typy, africké a exotické plané odrůdy a uměle vytvoření hybridů) jsou uchovávány pro celosvětovou společnost a jsou volně dostupné v souladu se zásadami pro rostlinné genetické zdroje - Consultative Group for International Agricultural Research (CGIAR). Genová banka v IITA byla vytvořena jako regionální referenční sbírka v rámci programu International Network for the Improvement of Banana and Plantain společnosti International Plant Genetics Resources Institute (Ortiz 1997).

Jak již bylo řečeno, největší sbírku banánovníků uchovává Bioversity International, v Katolické Univerzitě města Lovaň v Belgii. Sběrka obsahuje více než 1500 položek uchovávaných jako in vitro rostliny. Každý genotyp byl získán z meristému jedné rostliny a následně rozklonován tak, aby každý zástupce banánovníku byl charakterizován 10–15 klony (MusaNet 2015). Bioversity International se také podílí i na uchovávání genetické diverzity pomocí procesu kryoprezervace při $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$. Takto zakonzervovaný materiál může být obnoven do plně životaschopných rostlin v případě potřeby. Celá kolekce je navíc postupně duplikována a ukládána v Institut de Recherche pour le développement (IRD) města Montpellier ve Francii (<http://www.bioversityinternational.org/>).

4. Struktura genomu banánovníku

Jednou ze základních charakteristik druhu je velikost jaderného genomu. Jaderný genom banánovníku je relativně malý ($1\text{C}\times \sim 550\text{--}750\text{ Mbp}$), genom *Musa acuminata* má velikost 600-650 Mbp a *M. balbisiana* 550 Mbp (Bartoš et al. 2005; Doležel et al. 1994; Čížková et al. 2013). Bartoš et al. (2005) rozšířil znalost jaderného obsahu DNA v rámci jednotlivých sekcí. Analýza na průtokovém cytometru ukázala, že 2C jaderný obsah DNA zástupců sekce Eumusa ($x = 11$) se pohybuje v rozmezí 1,130-1,377 pg a *Rhodochlamys* ($x = 11$) 1,191-1,299 pg. Druhy náležící k sekci Australimusa ($x = 10$) měli 2C jaderný obsah DNA mezi 1,435 a 1,547 pg a *M. beccarii*, jediný analyzovaný zástupce sekce Callimusa ($x = 9, 10$) měl nejvyšší 2C jaderný obsah DNA 1,561 pg. Jaderný genom banánovníku je rozdělen do 1–2 μm dlouhých morfologicky podobných chromozomů, což činí cytogenetické studie obtížné a zatím neexistuje žádná spolehlivá metoda k identifikaci všech chromozomů v rámci karyotypu a rozpoznání rodičovských chromozomů u hybridů. Jediné sekvence cytogeneticky mapované na chromozomech banánovníku jsou rRNA geny (viz níže). Počet

45S rDNA lokusů je konzervovaný v rámci jednotlivých sekcí zatímco počet 5S rDNA lokusů se liší v rámci sekcí a dokonce také v rámci jednotlivých druhů. Metodou FISH se sondami pro 45S rDNA, 5S rDNA, specifické LINE elementy a DNA satelity CL18 a CL33 (viz níže) byly identifikovány chromozomy diploidních zástupců banánovníku (Obr. č. 4). V rámci A genomu (*M. acuminata* „Maia Oa“) mohou být identifikovány 3 chromozomy a v případě *M. acuminata* klonů „Long Tavoy“ a „Tuu Gia“ 4 chromozomy. V genomu *M. acuminata* „DH Pahang“ můžeme rozlišit 5 různých chromozomů, v rámci zástupců *M. balbisiana* „Cameroun“ 4 chromozomy, u typů „Tani“ a „Pisang Klutuk Wulug“ 5 chromozomů a v případě typu „Honduras“ bylo identifikováno 6 chromozomů. V důsledku nedostatku specifických cytogenetických sond pro A, B, S a T genomy není však možné identifikovat homologní chromozomy mezidruhových hybridů (Čížková et al. 2013; Doleželová et al. 1998; Osuji et al. 1998; Čížková et al. in press). Genomic *in situ* hybridisation (GISH) byla použita příležitostně k identifikaci rodičovských chromozomů u některých hybridních kultivarů (D'Hont et al. 2000; Osuji et al. 1997). Tato metoda však rozlišuje jen (peri)centromerické oblasti chromozomů. Metoda GISH je časově náročná, komplikovaná, vyžaduje vysokou úroveň zkušeností a nemusí být vhodná pro „high-throughput“ skríníng velkých populací (Osuji et al. 1997).

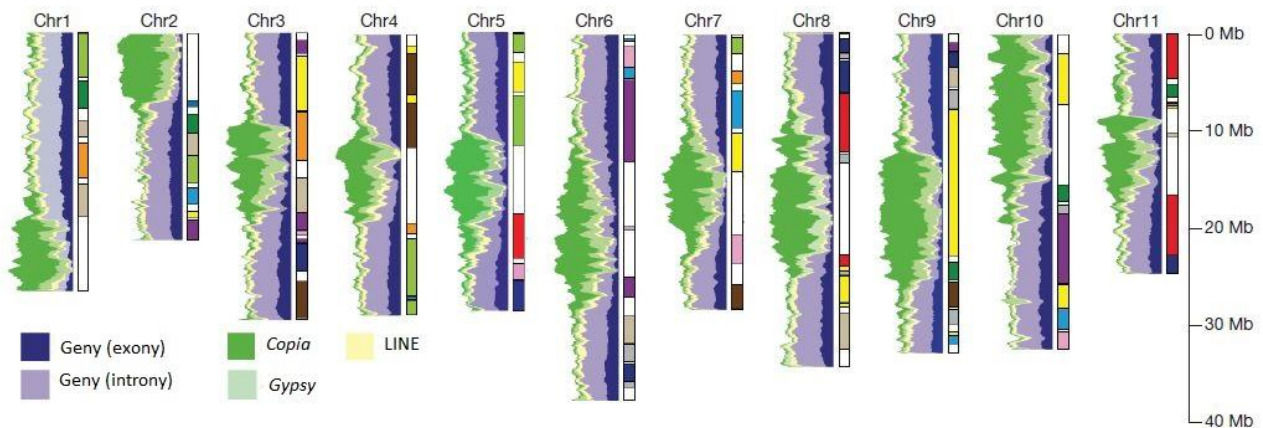
V heterochromatických oblastech chromozomů se často nacházejí velké bloky satelitní DNA, které jsou typickými komponenty centromerických a telomerických oblastí. Satelitní DNA sekvence se skládají z tandemově uspořádaných repetitivních jednotek s délkou do tisíce nukleotidů. Evoluční procesy kterými satelity vznikly zahrnují nerovnoměrný crossing over, genovou konverzi, transpozice a vznik extrachromozomální kruhové DNA. Na satelity bohaté lokusy mohou vykazovat specifickou lokalizaci a usnadňovat tak identifikaci chromozomů a analýzu strukturálních chromozomových změn. Na rozdíl od mnoha jiných genomů jsou jaderné genomy banánovníku na satelitní DNA chudé. Ačkoliv je genom banánovníku cca z 45 % tvořen různými repetitivními sekvencemi, repetice satelitní DNA představuje jen přibližně 0,3 % genomu (Hřibová et al. 2010; Čížková et al. 2013). Uspořádání dvou hlavních DNA satelitů banánovníku maTR_CL18 a maTR_CL33 studovala autorka Čížková et al. (2013). Zatímco signály satelitu maTR_CL18 byly viditelné u všech použitých zástupců banánovníku, přítomnost satelitu maTR_CL33 nebyla potvrzena u žádného ze čtyř zástupců *M. balbisiana*. Byly pozorovány jen slabé signály satelitu maTR_CL33 u hybridních klonů genomu ABB. Výskyt DNA satelitů na specifických chromozomových lokusech činí tyto sekvence potenciálními cytogenetickými markery.

Podobně jako u ostatních eukaryot se také v rostlinných genomech objevují jaderné ribozomální RNA (rRNA) geny. Tyto geny jsou uspořádány do genových rodin, které jsou lokalizovány jako tzv. klastry tandemově se opakujících jednotek dvou oddělených lokusů ve více než 20 000 kopiích na genom. Zatímco 5S DNA lokus kóduje 5S rRNA geny, lokus 45S obsahuje geny pro 18S, 5,8 S a 26S rRNA, které se transkribují jako jeden celek a poté jsou sestříhány. Ribozomální RNA geny 18S, 5,8S a 26S jsou odděleny dvěma mezerníky (ITS1 a ITS2) a 45S transkripční jednotky samotné jsou od sebe odděleny pomocí ne-transkribovaných mezigenových mezerníků (IGS), (Rogers & Bendich 1987; Nwakanma et al. 2003). Ribozomální geny uspořádané v tandemu jsou charakterizovány nízkou vnitro-genomickou diverzitou v důsledku společné evoluce. Jednotlivé kopie rRNA genů se vyvíjí víceméně společně což je pravděpodobně způsobeno nerovnoměrným crossing overem a vysokou frekvencí genové konverze (Dover et. al 1982; Baldwin et al. 1995; Elder & Turner 1995). Vnitrodruhová a vnitro-populační stabilita rRNA lokusu na jedné straně a relativně rychlá evoluce ITS1 a ITS2, které jsou pod nízkým selekčním tlakem, činí ITS jeden z nejpopulárnějších markerů pro fylogenetické studie (Alvarez & Wendel 2003; Francisco-Ortega et al. 2001). Většina analyzovaných vnitrodruhových hybridů banánovníku obsahuje konzervované parentální ITS sekvence indikující neúplnou společnou evoluci rDNA lokusu. Nezávislá evoluce rodičovských typů rDNA u hybridů umožňuje determinaci genomové konstituce hybridů použitím ITS.

4.1. Složení genomu

Ačkoliv je jaderný genom banánovníku relativně malý, množství informací o jeho složení je stále omezené. Předchozí studie odhadují, že přibližně 55 % genomu banánovníku je tvořeno různými typy DNA repetice (Hřibová et al. 2007), ovšem jen určité množství repetitivních DNA sekvencí bylo již charakterizováno. Současné zavedení sekvenačních metod nové generace (Margulies et al. 2005), poskytuje silné nástroje pro objevování a charakterizaci DNA repetice i komplexních rostlinných genomů. Valárik et al. (2002) popsal 12 *Radka* repetice představující část sekvencí různých mobilních elementů a rRNA genů. Hřibová et al. (2010) použila technologii 454 sekvenování k charakterizaci repetitivní DNA v jaderném genomu banánovníku (*Musa acuminata* 'Calcutta 4'). Navzdory relativně malé části sekvenované DNA z celého genomu byla již identifikována a charakterizována většina typů retrotransposonů a objeveny 2 nové tandemové repetitivní sekvence, které byly použity nejen jako specifické cytogenetické markery, ale také jako referenční dataset pro analýzu

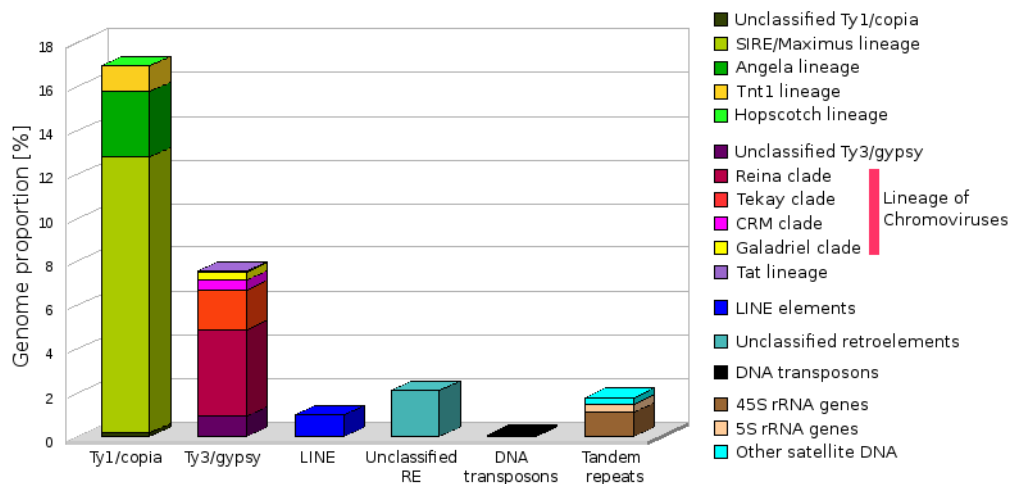
repetitivních DNA sekvencí v rámci projektu celogenomového sekvenování banánovníku (D'Hont et al. 2012).



Obr. č. 4: Rozdělení hlavních sekvencí na chromozomech genomu *M. acuminata*. D'Hont et al. (2012), převzato s úpravami.

Nejpočetnější DNA sekvence (až 50 %) nalezené v genomu banánovníku jsou LTR-retrotransposony. Dlouhé opakující se repetice retrotranspozonů představují největší část Ty1/*Copia* elementy, které jsou mnohem početnější (více než 16 % genomu) než Ty3/*Gypsy* elementy např. retrotransposon *monkey* (cca 7 % genomu), (Obr. č. 5). Další charakterizované sekvence zahrnují např. druhově specifický element Brep-1 (Baurens et al. 1996; Baurens et al. 1997). Retrotransposon *monkey* je přednostně lokalizován v místech sekundární konstriktce (Balint-Kurti et al. 2000), zatímco ostatní uvedené elementy se nacházejí většinou v pericentromerických oblastech a některé doplňkové lokusy na vzdálených částech všech chromozomů. Ve srovnání s LTR-retrotransposony se non-LTR retrotransposony a DNA transposony vyskytují relativně vzácně. Dlouhé rozptýlené elementy (LINEs) představují 1 % genomu (Obr. č. 5). LINE elementy jsou obzvláště početné v centromerických a pericentromerických oblastech chromozomu. Jejich akumulace v těchto oblastech, obzvláště těch nejstarších, dokládá, že jsou preferenčně eliminovány z genově bohatých oblastí (Paterson et al. 2009). Pozoruhodně, typicky krátké tandemové centromerické repetice nebyli u banánovníku nalezeni. Pomocí FISH byly do oblastí centromery mapovány jednak LINE elementy a pak také jeden typ Ty3/*Gypsy* elementu ze skupiny Chromoviridae (Hřibová et al. 2010; Neumann et al. 2011; D'Hont et al. 2012; Čížková et al. 2013). Nízká četnost LINE elementů a DNA transpozonů se zdá být typická pro rostlinné genomy jelikož podobné

četnosti byly pozorována u genomu rýže, vinné révy a kukuřice (International Rice Genome Sequencing Project 2005; Velasco et al. 2007; Messing et al. 2004).



Obr. č. 5: Zastoupení hlavních skupin repetitivních sekvencí identifikovaných v genomu banánovníku 454 sekvenováním. Hřibová et al. 2010, převzato s úpravami.

Studii D'Hont et al. (2012) bylo identifikováno 36 542 protein kódujících genů v genomu banánovníku. S počtem 3 155 genů, byl počet transkripčních faktorů banánovníku identifikován mezi nejvyšší v rámci všech sekvenovaných rostlinných genomů. Pro evoluci genomu angiospermních rostlin mají velký význam celogenomové duplikace (WGDs) (Van de Peer et al. 2009). První důkaz celogenomové duplikace u banánovníku byl publikován ve studii Lescot et al. (2008). Studie D'Hont et al. (2012) odhalila komplexní vzor paralogních vztahů mezi 11 chromozomy banánovníku. Nejvíce paralogní klastry genů sdílely vztahy s třemi dalšími klastry, což navrhovalo výskyt dvou WGDs (označených jako α a β). Klastry duplikovaných genů byly předběžně sestaveny do 12 ancestrálních bloků na základě syntenie. Duplikované úseky zahrnuté v ancestrálních blocích banánovníku pokrývají 222 Mb a obsahují 26 829 genů.

5. Využití molekulárních markerů pro studium genetické diverzity banánovníku

Pro posouzení genetické diverzity a fylogenetických vztahů banánovníku byla použita již řada genomických metod, nástrojů a molekulárních markerů. Obzvláště používané jsou pak markery založené na PCR zahrnující AFLP, RAPD a mikrosatelity (Grapin et al. 1998; Loh et al. 2000; Wong et al. 2001). Mezi fingerpringingovými technikami jsou markery AFLP a mikrosatelity nejvíce informativní. Technika **AFLP** je založena na selektivní amplifikaci restričních fragmentů získaných štěpením genomové DNA. Vzhledem k jejich dominantnímu a bialelickému původu jsou AFLP markery stále častěji používány u různých rostlin, hlavně z důvodu schopnosti detekce velmi vysokého počtu polymorfismů v jednom testu, dobré reprodukovatelnosti a přiměřeného pokrytí genomu (Vos et al. 1995; Cervera et al. 1998). AFLP bylo použito k detekci genetické diverzity jak u kultivovaných banánovníků tak u „wild“ typů, přičemž byly zjištěny vysoké úrovně polymorfismu tohoto markeru u obou uvedených skupin (Wong et al. 2001).

Howell et al. (1994) použil **RAPD** markery ke klasifikaci 9 genotypů banánovníku do 4 skupin reprezentující AA, AAA, AAB a BB genomy. AAB klony však vytvářely klastry se skupinou AAA, což naznačuje, že tyto markery neměli dostatečné rozlišení. Pillay et al. (2000) identifikoval RAPD markery ve spojitosti s „A“ a „B“ genomovými sekvencemi u banánovníku. Tyto markery jsou užitečné pro determinaci složení genomu hlavně při počátečních výběrech populací banánovníků pro účely šlechtění, jelikož RAPD fragmenty reprezentují anonymní sekvence, které mohou segregovat zkresleně při experimentech s mapováním (Faure et al. 1993).

Mikrosatelity neboli krátké tandemové repetice (také jednoduché opakující se sekvence - **SSR** – Simple Sequence Repeats), (Tautz 1989) jsou úseky jednoduchých 1-6 bp dlouhých opakujících se motivů, uspořádaných tandemově v genomech prokaryotických a eukaryotických organismů. Mikrosatelitové oblasti jsou obvykle vysoce konzervované a proto vhodné pro navrhování lokusově specifických primerů. Z důvodu jejich početnosti, rovnoměrného rozšíření v genomech, hypervariability, kodominantního původu a dostupnosti pro výzkumné laboratoře (Compbell et al. 2003; Gaudeul et al. 2004) jsou často používány k detekci genetické diverzity rostlin. SSR byly již úspěšně aplikovány v molekulárním genotypování mnoha důležitých plodin jako je rýže (Pessoa-Filho et al. 2007), obiloviny (Hayden et al. 2007), vinná réva (This et al. 2004), nebo kakaovník (Zhang et al. 2006).

Použití SSR markerů navíc umožňuje automatizaci a multiplexing což zvyšuje efektivitu metody (Christelová et al. 2011).

DArT markery (Diversity Arrays Technology) byly vyvinuty za účelem celogenomového profilování plodin bez nutnosti předchozí znalosti sekvence. Tato metoda je založena na DNA/DNA hybridizaci a použití microarray platformy pomocí níž se zjišťuje přítomnost nebo absence jednotlivých fragmentů v genomických reprezentacích (Jaccoud et al. 2001). Síla této fingerprintingové metody spočívá ve schopnosti porovnávat velký počet lokusů různých genomů v jednom testu. DArT markery umožňují identifikovat oblasti genomů sdílené mezi příbuznými genotypy a efektivně doplňují jiné molekulární markery pro studium genetické diverzity, studie genomů a šlechtění. Tyto markery byly již dříve použity pro celogenomové profilování blahovičnicku (Lezar et al. 2004), pšenice (Akbari et al. 2006; White et al. 2008), kajanu indického (Yang et al. 2006) nebo čiroku (Mace et al. 2008).

Studie Risterucci et al. (2009) se zaměřila na vývoj DArT markerů u banánovníku a prokázala, že tyto markery mohou být použity pro analýzy celého genomu a stanovení vztahů mezi genotypy banánovníku. Dále bylo prokázáno, že DArT umožňuje rozlišovat mezi vegetativně se množícími triploidy jako je typ „Cavendish“ nebo „Gros Michel“. Studií Creste et al. (2003) byla zjištěna celková genetická uniformita banánovníků typu „Cavendish“ s použitím SSR markerů, Risterucci et al. (2009) však odhalila signifikantní přítomnost diverzity v rámci těchto triploidních typů banánovníku. DArT markery případně v kombinaci s dalšími typy markerů nacházejí využití při zahušťování vazebných map banánovníku jak uvádí studie Hippolyte et al. (2010), která využila kombinaci DArT markerů s SSR markery. V případě pšenice byly DArT markery použity pro vazebné mapování společně s markery SSR a AFLP (Semagn et al. 2006).

Analýza **ITS** (Internal Transcribed Spacer) je dobrým nástrojem pro určování fylogenetických vztahů na nižších taxonomických úrovních. Mezidruhová variabilita sekvencí v ITS oblasti je vysoká a objevuje se dokonce i mezi blízce příbuznými druhy nebo klony (Nwakanma et al. 2003). Tato metoda byla aplikována na velký počet rostlin zahrnujících trávy (Hsiao et al. 1994), bavlník (Pillay & Meyers 1999), ořešák (Stanford et al. 2000) nebo slunečnici (Clevinger & Panero 2000). Fylogenetická rekonstrukce založená na ITS sekvenci prokázala, že rod *Musa* je rozdělen do dvou odlišných větví – *Callimusa* a *Australimusa* a *Eumusa* a *Rhodochlamys* (Li et al. 2010; Liu et al. 2010; Hřibová et al. 2011).

Dalšími používanými molekulárními markery jsou mezigenové mezerníky (IGS), (Lanaud et al. 1992), **RFLPs** (Jarret et al. 1992), **ISSRs** (Inter-Simple Sequence Repeats), (Godwin et al. 1997), **IRAP** (Inter-Retroelement Amplified Polymorphism), (Nair et al. 2005) a **MSAP** (Methylation Sensitive Amplification Polymorphism), (Noyer et al. 2004). Mezi nové přístupy analýzy genetické diverzity patří také metody založené na tzv. **Next-Gen sekvenování**. Jednak se jedná o alternativu DArT genotypování, tzv. **DArT-seq**, kdy oproti klasickému DArT genotypování nejsou vytvářeny knihovny markerů, které jsou poté screenovány pomocí hybridizace, ale genomové reprezentace jsou rovnou sekvenovány přístupem illumina. Mezi další metody, patří různé typy tzv. **skim sekvenování** (Golicz et al. 2015), jako např. Genotyping By Sequencing (**GBS**), nebo **RAD** sekvenování. Oba přístupy jsou podobně jako DArT-seq založeny na redukcí komplexity genomu a následném sekvenování. Ikdyž se uvádí, že výsledná cena těchto sekvenačních přístupů na získaný data-point je řádově nižší než u tradičních přístupů a analýza je velmi rychlá, je nutné zmínit, že metody založené na masivně paralelním sekvenování se vyplatí pouze pro analýzu velkého počtu vzorků – násobky 94 vzorků a také nejsou zcela výhodné pro analýzu diverzity fylogeneticky vzdálenějších zástupců. V takovém případě totiž díky redukcí komplexity genomu, která je jednak nevyhnutelná pro analýzu velkého množství zástupců v jedné analýze a také samozřejmě absolutně nutná pro maximální snížení ceny analýzy, bohužel dochází k velkému procentu chybějících dat, které v konečném důsledku velmi snižují rozlišovací schopnost takový studií. Na druhou stranu je však také nutné podotknout, že GBS nebo RAD sekvenování může přinést nové informace o diverzitě v rámci blízkce příbuzných zástupců (Elshire et al. 2011; Wong et al. 2015; Li et al. 2015; Rowe et al. 2011; Talukder et al. 2014). V případě banánovníku např. v rámci jednotlivých typů jedlých banánů, kdy se naopak předpokládá, že chybějících dat vzhledem k vysoké similaritě položek je jen velmi málo a velké množství získaných dat tak může mít mnohem větší rozlišovací schopnost než klasické přístupy studia genetické diverzity založeny např. na mikrosatelitových markerech. Ovšem, stále platí, že analýza využívající masivně paralelního sekvenování se vyplatí pouze pro analýzu velkého množství položek najednou, a je takřka nepoužitelná pro identifikaci několika málo nebo jednotlivých položek. Navíc pro analýzu dat z masivně paralelního sekvenování s cílem analýzy diverzity je potřebná existence tzv. referenční DNA sekvence, čímž je většinou celogenomová sekvence studovaného druhu. Tyto genomické zdroje však nejsou dostupné pro všechny studované druhy, nebo jsou dostupné jen pro jeden genotyp .

6. SSR genotypovací platforma a její využití pro charakterizaci položek v genové bance

S cílem vyvinout a standardizovat protokol ke klasifikaci genetických zdrojů banánovníku testovala a optimalizovala autorka Christelová et al. (2011) použití 22 publikovaných SSR markerů pro charakterizaci genetické diverzity na souboru vybraných genotypů banánovníku. Soubor 22 SSR markerů byl vybrán institucí CIRAD jako sada umožňující rozpoznat jednotlivé položky banánovníku v referenčním souboru DNA (Crouch et al. 1998; Lagoda et al. 1998; Hippolyte et al. 2010). SSR lokusy 22 mikrosatelitových markerů byly amplifikovány s použitím specifických primerů s upravenými 5'M13 konci umožňující použití univerzálního fluorescenčně značeného primeru (Schuelke 2000). Primery byly značeny čtyřmi typy fluoroforů (6-FAM, VIC, NED, PET), což následně umožnilo tzv. multiplexování - analýzu až 4 různých markerů najednou. Detekce signálu a elektroforetická separace produktů byla provedena za pomoci 96-kapilárového DNA analyzáru. Analýza dat a vyhodnocení velikosti jednotlivých alel bylo provedeno pomocí programu GeneMarker®. Data jednotlivých genotypů byla poté převedena do binárního systému (kódována jako: 1-presence/ 0-absence) a analyzována jako dominantní marker. Výsledná analýza genetické diverzity byla provedena s použitím programu PowerMarker a algoritmu UPGMA.

Po počátečním dvakrát opakovaném testování primerů bylo z 22 výchozích markerů vybráno 19 pro jejich dobrou reprodukovatelnost amplifikace. Tři markery, které byly z analýzy vyřazeny vytvářely značné „stutter píky“ což znemožňovalo reprodukovatelnost SSR profilů. Všechny následující analýzy byly dále prováděny s vybranými 19-ti mikrosatelitovými markery (Tab. č. 1).

Tabulka č. 1: Seznam 22 testovaných SSR markerů, Christelová et al. 2011, převzato s úpravami.

Marker	Fluorofor	Motif	Reference	Položka v genové bance	Teplota annealingu [°C]	Min. velikost alely [bp]	Max. velikost alely [bp]
mMaCIR01	6-FAM	(GA)20	Lagoda et al., 1998	X87262	55	241	440
mMaCIR03	6-FAM	(GA)10	Lagoda et al., 1998	X87263	55	11	147
mMaCIR07	NED	(GA)13	Lagoda et al., 1998	X87258	53	136	195
mMaCIR08	VIC	(TC)6N24(TC)7	Lagoda et al., 1998	X87264	55	229	283
mMaCIR13	PET	(GA)16N76(GA)8	Lagoda et al., 1998	X90745	53	268	427
mMaCIR24	PET	(TC)7	Lagoda et al., 1998	Z85972	48	240	291
mMaCIR27*	PET	(GA)9	Lagoda et al., 1998	Z85962	58	232	277
mMaCIR39	VIC	(CA)5GATA(GA)5	Lagoda et al., 1998	Z85970	52	329	390
mMaCIR40	6-FAM	(GA)13	Lagoda et al., 1998	Z85977	54	169	247
mMaCIR45	6-FAM	(TA)4CA(CTCGA)4	Lagoda et al., 1998	Z85968	57	274	318
mMaCIR150	VIC	(CA)10	Hippolyte et al., 2010	AM950440	54	253	376
mMaCIR152	6-FAM	(CTT)18	Hippolyte et al., 2010	AM950442	54	147	195
mMaCIR164	VIC	(AC)14	Hippolyte et al., 2010	AM950454	55	256	458
mMaCIR195*	VIC	(GA)17	Hippolyte et al., 2010	AM950461	54	262	306
mMaCIR196	NED	(TA)4, (TC)17, (TC)3	Hippolyte et al., 2010	AM950462	55	163	201
mMaCIR214	NED	(AC)7	Hippolyte et al., 2010	AM950480	53	115	238
mMaCIR231	NED	(TC)10	Hippolyte et al., 2010	AM950497	55	236	286
mMaCIR260	PET	(TG)8	Hippolyte et al., 2010	AM950515	55	204	264
mMaCIR264	6-FAM	(CT)17	Hippolyte et al., 2010	AM950519	53	234	383
mMaCIR307	NED	(CA)6	Hippolyte et al., 2010	AM950533	54	143	173
Ma-1-32*	NED	(GA)17AA(GA)8AA(GA)2	Crouch et al., 1998	n/a	58	208	251
Ma-3-90	PET	(CT)11	Crouch et al., 1998	n/a	53	147	191

* Vyřazeno z analýzy z důvodu nereprodukovatelné amplifikace.

Genotypovací platforma založená na 19-mikrosatelitových markerech byla testována a optimalizována na souboru 70-diploidních a 38-triploidních položek banánovníku. Ověření spolehlivosti optimalizované genotypovací platformy a jejího potenciálu jako standardizované metody pro molekulární charakterizaci nových položek bylo provedeno pomocí tzv. slepého testu. V tomto testu byl analyzován soubor neznámých vzorků banánovníku poskytnutý ITC přičemž byl následován stejný postup jako se souborem referenčních vzorků DNA. Správná velikost alel a kontrola elektroforetických podmínek byla zajištěna zahrnutím negativních a pozitivních kontrol charakterizovaných pěti předešle analyzovanými referenčními genotypy.

Výsledná genotypovací platforma 19-ti mikrosatelitových markerů poskytuje dostatek polymorfismu k determinaci jednotlivých položek druhů a poddruhů banánovníku. Tento univerzální nástroj umožňuje charakterizovat nově zavedené položky banánovníků celosvětové genové banky (International Transit Centre, ITC, Leuven, Belgium) a dále nachází využití v širším výzkumu banánovníku a šlechtitelských programech. Použití uvedené genotypovací platformy také řeší jeden z běžných problémů genových bank, kterým je nesprávné označení položek a přítomnost duplikátů. Výsledky slepého testu také prokázaly, že publikovaný genotypovací systém je vhodný pro charakterizaci zcela neznámých položek banánovníků (Christelová et al. 2011).

Materiál a metody

1. Biologický materiál

Veškeré položky banánovníku analyzované v této studii (Tab. č. 2) byly získány jako *in vitro* rostliny z genové banky – Bioersity International Transit Center (ITC) Leuven v Belgii. Každý genotyp byl představován 5 jednotlivými rostlinami. Živý rostlinný materiál byl použit pro stanovení ploidie a následně lyofilizován (každá rostlina, reprezentující genotyp, byla lyofilizována ve zvláštní zkumavce).

Tabulka č. 2: Charakteristika analyzovaných genotypů, převzato z: databáze MGIS (Musa Germplasm Information systém) a doplněno o nově získané informace.

ITC kód	Sekce	Rod	Druh/typ*	Název položky	Ploidie**	Původ
1698	Musa	<i>Musa</i>	<i>acuminata</i>	Sario	2x	Neznámý
1694	Musa	<i>Musa</i>	<i>acuminata</i>	Ayam	2x	Neznámý
1701	Musa	<i>Musa</i>	<i>acuminata</i>	<i>M. acuminata</i> <i>sp. sumatrana</i>	2x	Neznámý
1689	Callimusa	<i>Musa</i>	<i>viridis</i>	Chuoi rung hoa sen	2x	Vietnam
1647	Callimusa	<i>Musa</i>	<i>coccinea</i>	<i>M. coccinea</i>	2x	Neznámý
1690	Neznámá	Neznámý	Neznámý	Chuoi rung hoa soan	2x	Vietnam
1692	Musa	<i>Musa</i>	AA	Keja	3x	Neznámý
1685	Musa	<i>Musa</i>	AA	Chuoi bom	3x	Neznámý
1680	Musa	<i>Musa</i>	AA	Chuoi cau tay	3x	Vietnam
1699	Musa	<i>Musa</i>	AA	Sipulut	3x	Neznámý
1697	Musa	<i>Musa</i>	AA	Usim	3x	Neznámý
1624	Musa	<i>Musa</i>	AAA Lujugira/Mutika	Kibiddebidde	3x	Uganda
1627	Musa	<i>Musa</i>	AAA/ Lujugira/Mutika	Lusumba	3x	Uganda
1603	Musa	<i>Musa</i>	AAA/ Lujugira/Mutika	Nakyatengu tall	3x	Uganda
1630	Musa	<i>Musa</i>	AAA/ Lujugira/Mutika	Enjagata	3x	Uganda
1625	Musa	<i>Musa</i>	AAA/ Lujugira/Mutika	Bukumu	3x	Uganda
1708	Musa	<i>Musa</i>	AAB/Plantain	Biya 2	3x	Kamerun
1712	Musa	<i>Musa</i>	AAB/Plantain	Byie	3x	Kamerun

1713	Musa	<i>Musa</i>	AAB/Plantain	Elat Noir	3x	Kamerun
1714	Musa	<i>Musa</i>	AAB/Plantain	Fouem	3x	Kamerun
1663	Musa	<i>Musa</i>	AAB/Plantain	Ebang Mboe	3x	Neznámý
1615	Musa	<i>Musa</i>	AAB/Plantain	Banane Tigrée	3x	Neznámý
1665	Musa	<i>Musa</i>	AAB/Plantain	Ebibi	3x	Neznámý
1661	Musa	<i>Musa</i>	AAB/Plantain	Corne 3	3x	Neznámý
1617	Musa	<i>Musa</i>	AAB/Plantain	Mimbomena	3x	Neznámý
1618	Musa	<i>Musa</i>	AAB/Plantain	Toutoun kelong	3x	Neznámý
1676	Musa	<i>Musa</i>	AAB/Plantain	Nzorba	3x	Neznámý
1659	Musa	<i>Musa</i>	AAB/Plantain	Ban 612	3x	Neznámý
1620	Musa	<i>Musa</i>	AAB/Plantain	Mboutoukou No2	3x	Neznámý
1674	Musa	<i>Musa</i>	AAB/Plantain	Mbotoko Vert	3x	Neznámý
1662	Musa	<i>Musa</i>	AAB/Plantain	Douala	3x	Neznámý
1667	Musa	<i>Musa</i>	AAB/Plantain	French Claire Rose	3x	Neznámý
1710	Musa	<i>Musa</i>	AAB/Plantain	76-17	3x	Kamerun
1614	Musa	<i>Musa</i>	AAB/Plantain	2 Hands Planty	3x	Neznámý
1637	Musa	<i>Musa</i>	AAB/Pome	Kallar Ladan	3x	Indie
1606	Musa	<i>Musa</i>	AAB/Pome	Chinali	3x	Indie
1610	Musa	<i>Musa</i>	AAB/Pome	Padathi	3x	Indie
1631	Musa	<i>Musa</i>	AAB/Silk	Malbhog	3x/6x	Indie
1632	Musa	<i>Musa</i>	AAB/Silk	Dubhsagar	3x	Indie
1612	Musa	<i>Musa</i>	AAB/Silk	Amrithapani	3x	Indie
1633	Musa	<i>Musa</i>	AAB/Silk	Digjowa	3x	Indie
1634	Musa	<i>Musa</i>	AAB/Silk	Honda	3x	Indie
1651	Musa	<i>Musa</i>	AAB/Mysore	Alpan	3x	Indie

1703	Musa	<i>Musa</i>	AAB/Pisang Raja	Raja	3x	Neznámý
1600	Musa	<i>Musa</i>	ABB/Saba	INIVIT PB- 2003	3x	Kuba
1715	Musa	<i>Musa</i>	ABB	Raja Kinalun	3x	Neznámý
1602	Musa	<i>Musa</i>	AAAB	Seleccion P- INIVIT	3x	Kuba
1706	Musa	<i>Musa</i>	Neznámý	Pagat	3x	Neznámý

* Popis převzat z databáze MGIS

** Ploidie byla stanovena pomocí průtokové cytometrie na ÚEB AV ČR, v. v. i.

2. Metody

2.1. Příprava vzorků na izolaci DNA

Z každého lyofilizovaného vzorku listů banánovníku zaslaných genovou bankou (Bioversity International Transit Center) byla odebrána část listu, která byla vložena zvlášť do mikrozkuhavky společně se dvěma skleněnými kuličkami o průměru 5 mm. Lyofilizované listy banánovníku byly homogenizovány při 27 Hz po dobu 4 minut pomocí homogenizátoru MM301 (Retsch, Německo). V případě nedostatečné homogenizace byl krok opakován.

2.2. Izolace genomové DNA

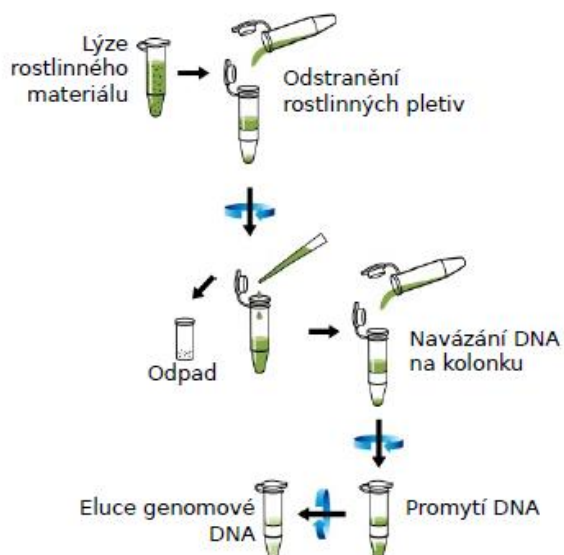
Pro izolaci genomové DNA byly použity vzorky 48 genotypů banánovníku přičemž každý genotyp byl zastoupen 4 klony. Celkem bylo tedy izolováno 192 vzorků. Izolace DNA byla provedena extrakčním kitem NucleoSpin® Plant II (Macherey-Nagel, June 2012/Rev. 06, Germany). Postup izolace DNA (Obr. č. 6) zahrnoval oproti standardnímu protokolu několik změn:

Část: Buněčná lýze s použitím pufru PL1

Vzorky byly vortexovány pouze jednou a to až po přidání 10 µl RNasy A. Doba inkubace suspenze byla navýšena na 20 minut při 65 °C ve vodní lázni a vzorky byly 2x za 20 min promíchány.

Část: Eluce DNA

Po přidání 50 μl pufru PE (65 $^{\circ}\text{C}$) nebyly již vzorky inkubovány ve vodní lázni a v druhém kole eluce bylo použito jen 25 μl pufru PE (65 $^{\circ}\text{C}$).



Obr. č. 6: Izolace DNA banánovníku pomocí komerčního kitu (Macherey-Nagel).

2.3. Ověření kvality a kvantity genomové DNA

Ověření přítomnosti genomové DNA v elučním pufru a její koncentrace bylo provedeno pomocí agarózové gelové elektroforézy v 1% gelu s použitím 0,5 \times TBE (Obr. č. 7). Elektroforetická separace izolované genomové DNA probíhala po dobu 45 minut při 4 V/cm. Jako nanášecí pufr bylo použito barvivo 6 \times StopC a jako marker molekulové hmotnosti byly použity dvě koncentrace markeru Lambda DNA - 50 ng/ μl a 100 ng/ μl . Pro nanášení vzorků včetně markerů byly použity 3 μl nanášecího pufru 6 \times StopC. Do první jamky elektroforetického gelu bylo naneseno 5 μl markeru Lambda o koncentraci 10 ng/ μl (výsledná koncentrace 50 ng/ μl). Do druhé jamky byl nanesen 1 μl markeru Lambda o koncentraci 100 ng/ μl . Po elektroforetické separaci byl agarózový gel barven v roztoku ethidiumbromidu (0,5 mg/ml) nejméně 15 minut a rozdělené DNA fragmenty byly vizualizovány pomocí programu GeneSnap dokumentačního zařízení Syngene (Trigon plus).

2.4. SSR analýza

SSR analýza je založena na principu PCR s jejíž pomocí bylo amplifikováno 19 mikrosatelitových lokusů. Pro PCR byly použity 3 typy primerů: fluorescenčně značené primery s upravenými 5' M13 konci umožňující použití univerzálního fluorescenčního značení. Pro značení primerů byly použity 4 typy fluoroforů – 6-FAM, VIC, NED a PET. Druhým použitým primerem byl lokusově specifický forward primer s 20-nukleotidovou extenzí M13 primeru a třetím použitým primerem byl lokusově specifický reverse primer.

PCR reakce probíhala ve 20 μ l na vzorek a obsahovala 1 \times PCR pufr s Mg²⁺; 10 mM dNTP's; 0,06 μ M fluorescenčně značeného primeru; 0,08 μ M extendovaného forward primeru; 0,1 μ M reverse primeru; 1,5 U/100 μ l Taq polymerasy. Reakce obsahovala 15 μ g DNA.

Program PCR reakce se stával z 35 cyklů a následujících podmínek: počáteční denaturace 94 °C 5 min, denaturace 94 °C 45 s, nasedání primerů – teplota dle typu lokusově specifického primeru (Tab. č. 1) 1 min, extenze 72 °C 1 min a závěrečná extenze 72 °C 5 min.

2.5. Purifikace PCR produktů

Purifikace PCR produktů byla provedena pomocí následujícího postupu:

- 1) Do sterilní vaničky byla připravena směs 96% čistého etanolu a 3M octanu sodného dle rozpisu:

Na 4 desky (cca 400 vzorků)	31,5 ml.....96% EtOH
	<u>1350 μl..... 3M NaAc (pH 5,2)</u>

- 2) Směs byla propipetována multikanálovou pipetou a 73 μ l směsi bylo pipetováno na jamku. Pozn. špičky by se neměly dotknout jamek, pokud se tak stane, špičky je nutno vyměnit.
- 3) Deska byla poté řádně zakryta filmem a opatrně vortexována cca 7 vteřin (směs se nesmí dostat na film!).
- 4) Desky byly dále inkubovány při pokojové teplotě 15 min za tmy aby nedocházelo k vyzářování fluorescenčního barviva.
- 5) Desky byly vloženy do ochranných nosičů (chrání před prasknutím desky při centrifugaci) a následně centrifugovány 30 min při 4300 RPM a 4°C (radius 128 mm).

Pozn. centrifugace musí probíhat vždy přesně, vzorky nesmí stát jinak by docházelo k rozpouštění DNA a ztrátě PCR produktů!

- 6) Po centrifugaci byl opatrně vylit supernatant a desky byly osušeny pomocí buničité vaty.
- 7) Následovala purifikace 70% etanolem. Nejdříve bylo napipetováno 100 μ l 70% etanolu na jamku a poté byly desky centrifugovány 15 min při 4300 RPM a 4°C.
- 8) Supernatant byl opět vylit (nutno pracovat rychle, vzorky nesmí stát!) a desky byly osušeny.
- 9) Poté byly kroky 7-8 zopakovány (celkem byly provedeny 2 purifikace 70% etanolem).
- 10) Desky byly zakryty vrstvou buničité vaty, otočeny dnem vzhůru a takto centrifugovány 30 sekund při 500 RPM.
- 11) Dále byly desky vysušeny ve flowboxu po dobu 30 min (bez světla!). Pozn. po vysušení nesmí být cítit etanol, pokud se tak stane dosoušíme desky opatrně fénem.
- 12) Nakonec bylo přidáno 50 μ l redestilované vody a desky byly centrifugovány 30 sekund při 500 RPM pro lepší rozpuštění.
- 13) Desky byly inkubovány 15 min v lednici a poté uchovávány v mrazicím boxu při -20 °C.

2.6. Fragmentační analýza

Data velikostí jednotlivých alel byla získána fragmentační analýzou, která je založena na principu kapilární elektroforézy a umožňuje analýzu velkého množství markerů. Produkty amplifikace byly nejdříve smíchány s vysoce deionizovaným formamidem a vnitřním standardem, poté denaturovány 5 min při 95°C a nanášeny do automatického 96-kapilárového ABI 3730xl DNA analyzáru. PCR produkty značené fluorofory po průchodu kapilárou a ozáření laserem emitují světlo různé barvy a intezity a přístroj detekuje tzv. píky. Použití 4 různých fluoroforů umožňuje multiplexing reakce a tedy analýzu více PCR produktů naráz.

2.7. Analýza získaných dat

Výstupy fragmentační analýzy byly dále analyzovány programem GeneMarker® pomocí kterého byly odečteny velikosti jednotlivých alel daných markerů. Data velikostí alel byla převedena do binárního kódu a analyzována jako dominantní typ markeru, kde číslo 1 znamenalo přítomnost dané alely určitého typu markeru v uvedeném genotypu, číslo 0 značilo

nepřítomnost a ? byl použit pro chybějící data - tzv. „missing data“. Následně byla binární matice převedena do programu PowerMarker v3.25, kde byla analyzována za použití UPGMA algoritmu a koeficientu genetické vzdálenosti Nei (1973). Výsledný kladogram byl zoprazen pomocí programu TreeView v1.6.6 a graficky upraven programem FigTree v1.4.0 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

Použité chemikálie a pufry

70% etanol

96% etanol

3M octan sodný (NaAc), pH 5,2

Redestilovaná voda

0,5× TBE pufr

Roztok ethidiumbromidu 0,5 mg/ml

Použité přístroje a zařízení

Vortex Heidolph reax control (Německo)

Genetický DNA analyzátor ABI 3730xl

Lednice Calex Samsung 175

Vortex IKA® Vortex genius 3

Stolní centrifuga VWR – PCR plate spinner

Thermal Cycler C 1000 Touch

Elektroforéza Owl

Zdroj elektrického napětí MS 300V Power S Major Science

Mikrovlnná trouba Daewoo kor-6C2B

UV transluminátor Syngene Bio imagin ingenius (Trigon plus), software GeneSnap

Výrobník šupinkového ledu Brema® Ice Makers

Flowbox Holten LaminAir (Trigon plus)

Centrifuga na mikrozkuhavky PrismR (Labnet International, Inc.)

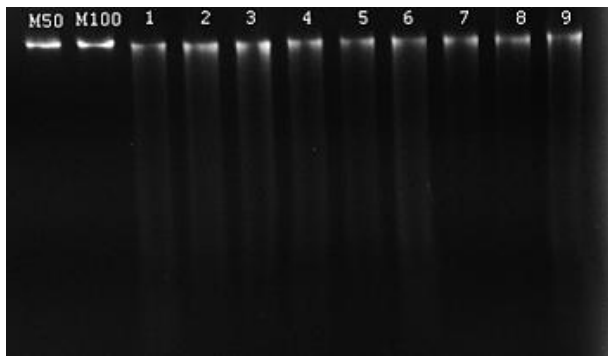
Centrifuga na desky Jouan J18 (Trigon plus)

Homogenizátor Retsch® MM 301

Výsledky:

Kvantitativní a kvalitativní ověření izolované genomové DNA

Kontrola přítomnosti genomové DNA ve vzorku a ověření její dostatečné koncentrace bylo provedeno s použitím agarózové gelové elektroforézy. Pro stanovení byly použity dvě různé koncentrace markeru molekulové hmotnosti Lambda DNA.



Obr. č. 7: Elektroforetická analýza vzorků genomové DNA banánovníku.

1% agaróza/0,5× TBE; barveno v roztoku EtBr; napětí 4 V/cm; pořízeno dokumentačním zařízením Syngene

M50: marker molekulové hmotnosti Lambda DNA 50 ng/μl

M100: marker molekulové hmotnosti Lambda DNA 100 ng/μl

Dráha č. 1-9: vzorky genomové DNA banánovníku

Na základě intenzity produktů a jejich porovnání s markerem byly jednotlivé vzorky naředěny na koncentraci ~ 5 ng/μl a použity jako templátová DNA pro PCR amplifikaci SSR markerů.

SSR analýza

Pomocí SSR genotypovací platformy obsahující 19 mikrosatelitových markerů byly analyzovány vždy 4 jednotlivé klony každého z 48 genotypů banánovníku (Tab. č. 2). Celkem bylo skrínováno 192 vzorků banánovníku na přítomnost 19-ti mikrosatelitových lokusů a pro ověření správnosti zaznamenaných velikostí alel byl tento screening opakován 2x. Soubor vzorků zahrnoval položky diploidní, triploidní a navíc jeden vzorek mixoploidního banánovníku (Tab. č. 2). Tento vzorek byl původně charakterizován jako triploidní, ovšem při pěstování na explantátových kulturách pravděpodobně došlo k polyploidizaci a v následné analýze průtokovým cytometrem byl vzorek stanoven jako hexaploidní (3x/6x). Analyzováno

bylo také 5 položek banánovníku, které byly původně charakterizované jako diploidní, stanovení ploidie pomocí průtokové cytometrie však prokázalo jejich triploidní charakter (Tab. č. 2).

Vzhledem ke skutečnosti, že je genotypovací platforma založena na analýze genomové DNA izolované ze směsného vzorku všech rostlin charakterizujících daný genotyp, bylo cílem práce zjistit, zda u některých genotypů nedošlo k somaklonální variaci, která by se mohla projevit v získání různých SSR profilů u jednotlivých rostlin. SSR data získaná analýzou 4 rostlin byla mimo jiné srovnána s původními genotypovacími daty (v kladogramu označena jako „mixed“).

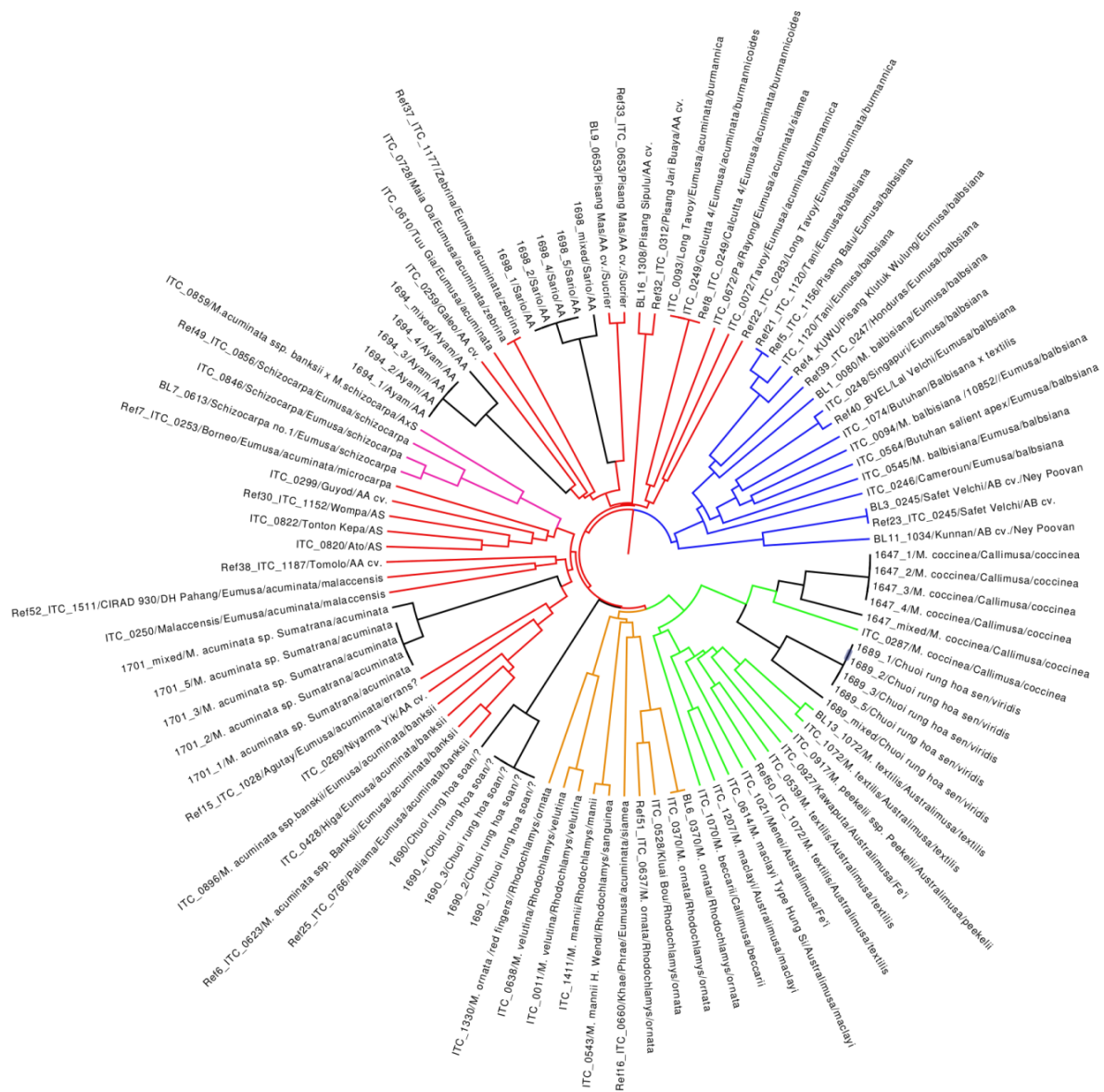
Analýza diploidních položek

Diploidní položky banánovníku byly oproti položkám triploidním v analýze zastoupeny v menšině. Ze souboru 48 genotypů bylo 6 položek diploidních. Kladogram zahrnuje kromě 6-ti nově analyzovaných položek již předem analyzované vzorky původní genotypovací platformy publikované v článku Christelová et al. (2011). Tato původní referenční kolekce je vyznačena červeně (Obr. č. 8). Nově analyzované položky doplňující kladogram jsou vyznačeny černě. Na obrázku č. 9 jsou větve klastrujících položek rozlišeny barevně, dle příslušnosti genotypů k jednotlivým typům genomů popř. sekcím.



Obr. č. 8: Kladogram diploidních položek banánovníku.

Kladogram byl získán pomocí analýzy referenčního datasetu společně s nově analyzovanými položkami, metodou UPGMA. Větve nově analyzovaných položek společně s odpovídajícím smíšeným vzorkem (viz. metodika) jsou zvýrazněny černě, referenční dataset červeně.



Obr. č. 9: Kladogram diploidních položek banánovníku.

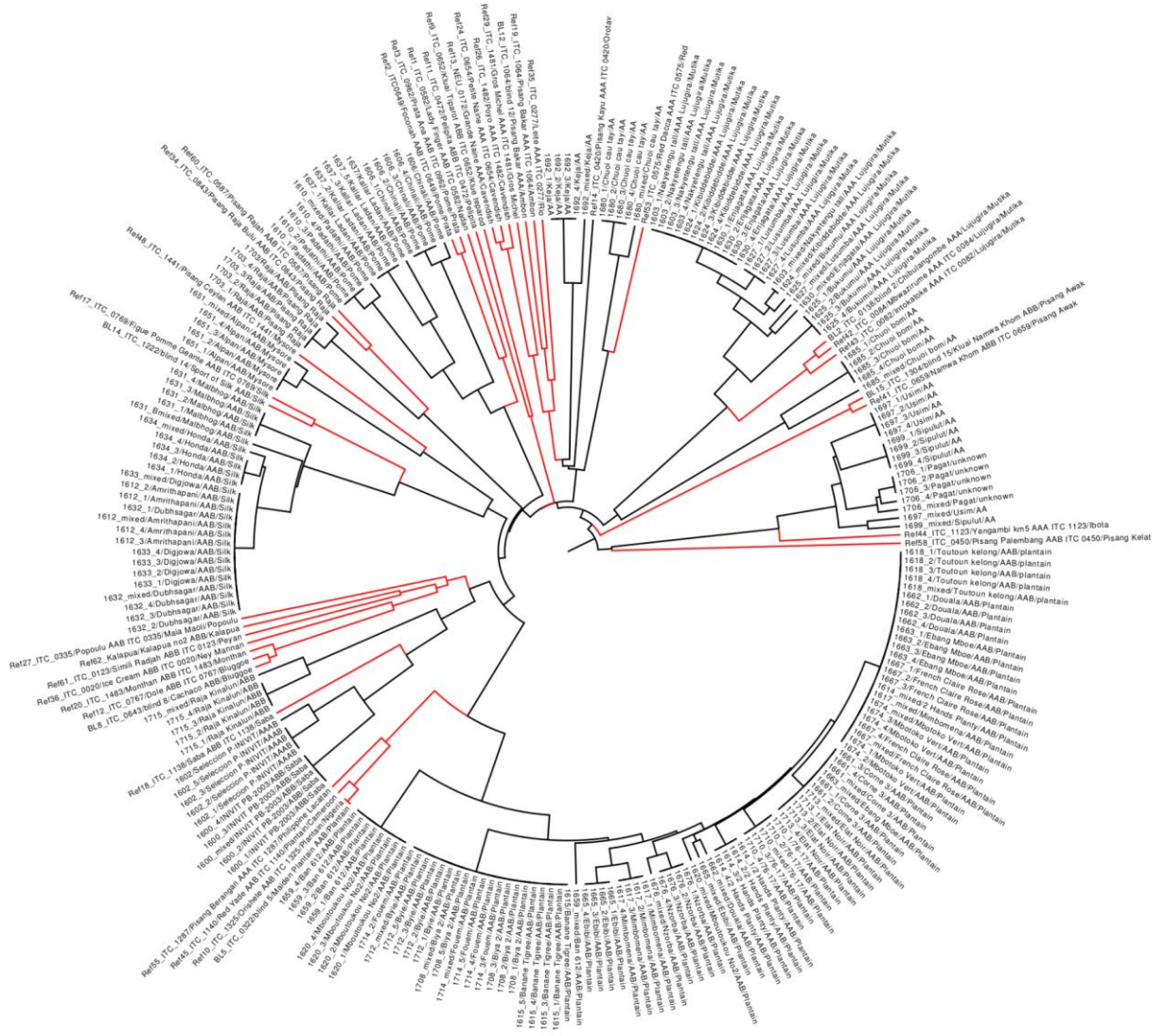
Kladogram byl získán pomocí analýzy referenčního datasetu společně s nově analyzovanými položkami, metodou UPGMA. Původní sekce rodu *Musa* a genomy AA a BB jsou odlišeny barevně: modrá - klony s genomem BB; zelená – sekce *Callimusa* + *Australimusa*; oranžová – sekce *Rhodochlamys*; růžová - klony odvozené od *Musa schizocarpa* s genomem SS; červená – klony s genomem AA; černá – položky analyzované v diplomové práci.

U všech analyzovaných diploidních položek nebyly zjištěny žádné změny ve velikosti alel vůči původně analyzovaným genotypům banánovníku, což je patrné také v kladogramu, kde se tyto položky nachází na nerozlišených větvích. Avšak vzhledem k přítomnosti většího počtu tzv. „missing dat“, kdy se nepodařilo identifikovat velikosti alel u všech SSR markerů oproti již dříve analyzovanému smíšenému vzorku, se nově analyzované položky nenachází společně na nerozlišené větvi s původně charakterizovaným genotypem.

V rámci diploidů, byly analyzovány tři položky popsané jako *M. acuminata* (AA genom), dvě položky patřící do sekce Callimusa - *M. coccinea* a *M. viridis*, a jedna položka (ITC 1690), u které nebyla dostupná žádná charakterizace. Položky popsané jako *M. acuminata* klastrovaly s příslušnými genotypy se stejným genomovým složením, *M. coccinea* a *Musa viridis* se nachází na stejné větvi společně s ostatními druhy sekce Callimusa. Položku 'Chuoí rung hoa soan' ITC 1690, se pomocí genotypovací platformy podařilo nově charakterizovat, a to nejen na úroveň sekce – Musa, ale také na úroveň druhovou – *M. acuminata*.

Analýza triploidních položek

Celkem bylo analyzováno 41 triploidních položek banánovníků. Do kladogramu byl zařazen také vzorek mixoploidního (3x/6x) banánovníku. Červeně označené jsou opět položky původní genotypovací platformy a černě nově analyzované vzorky.



Obr. č. 10: Kladogram triploidních položek banánovníku.

Kladogram byl získán pomocí analýzy referenčního datasetu společně s nově analyzovanými položkami, metodou UPGMA. Větve nově analyzovaných položek společně s odpovídajícím směsným vzorkem (viz. metodika) jsou zvýrazněny černě, referenční dataset červeně.

U triploidů bylo analyzováno několik položek původně charakterizovaných genovou bankou jako diploidní s genomem AA, ovšem po analýze na průtokovém cytometru bylo zjištěno, že se jedná o triploidy, tudíž byly tyto položky analyzovány společně s ostatními triploidy. Největší zastoupení měla v analýze skupina jedlých typů banánovníků - plantainů (genom AAB), které v důsledku vysoké příbuznosti klastrovaly často společně na nerozlišených větvích a celkově tvoří dominantní klastr kladogramu. Další analyzované položky s genomem AAB, banánovníky s označením Silk klastrovaly rovněž společně a z většiny na nerozlišených větvích. Výjimkou může být např. unikátní případ mixoploidního banánovníku (genom 3x/6x), který se v rámci klastru banánovníků typu Silk nachází na rozlišené větvi. Všechny zbylé položky s genomem AAB označené jako Pome, Mysore a Raja klastrují na rozlišených větvích. Všechny analyzované položky s genomem AAA se nacházejí v jednom klastru, tentokrát však na rozlišených větvích což značí nižší vzájemnou příbuznost než např. u plantainů klastrujících společně na nerozlišené větvi.

V rámci studie byla analyzována také jedna položka, která byla původně popsána jako tetraploidní - 'Seleccion P-INIVIT' ITC 1602, po stanovení ploidie pomocí průtokové cytometrie byl odhalen její triploidní charakter a proto byla analyzována společně s jinými triploidními genotypy. Na základě SSR genotypování můžeme říci, že tato položka má pravděpodobně genomové složení AAB, vzhledem k tomu, že klastruje na společné větvi s jinou triploidní položkou se stejným genomovým složením a navíc můžeme určit také typ tohoto klonu – Saba. Stejně jako u diploidních zástupců, byl i v rámci triploidů analyzován jeden zástupce s neznámých původem – 'Pagat' ITC 1706. I u této položky jsme pomocí genotypovací platformy byli schopni určit její pravděpodobné genomové složení – AAA. Typ hybridního klonu se u této položky zatím zjistit nepodařilo, a to vzhledem ke skutečnosti, že nejbližším příbuzným zástupcem jsou dvě špatně popsané položky (původně jako diploidi AA) - 'Usim' ITC 1697 a 'Sipulut' ITC 1699. Dá se předpokládat, že po analýze většího počtu triploidních klonů, se i u těchto položek podaří zjistit ke které skupině triploidních klonů s genomem AAA náleží.

Díky relativně velkému počtu analyzovaných položek, se čitelnost položek v příložených kladogramech stává dosti náročnou, proto je součástí elektronické verze také kladogram ve formátu pdf a ve formátu tre.

Diskuze

Jak bylo zmíněno výše, největší kolekci banánovníků spravuje mezinárodní genová banka v Lovani, v Belgii. Všechny genotypy, kterých je více než 1500, jsou v genové bance uchovávány ve formě *in vitro* rostlin, a popsány jen na základě charakterizace pomocí morfo-taxonomických deskriptorů. Správná identifikace položek je zásadní pro uchovávání genetických zdrojů, které mohou sloužit k dalšímu výzkumu diverzity banánovníku, hledání genů rezistence a případnému šlechtění odolnějších typů. Dříve používaný systém morfotaxonomických deskriptorů publikovaný v práci Simmonds & Shepherd 1955 byl v současné době inovován společností Bioversity International a CIRAD (IPGRI-INIBAP/CIRAD 1996) o řadu dalších deskriptorů umožňující přesnější identifikaci položek. Tyto deskriptory však mají relativně nízkou rozlišovací schopnost a některé položky, především nové plané diploidní druhy nelze jednoznačně určit jen na základě morfologie rostliny. Navíc, spousta jedlých typů banánovníku je v různých místech jejich rozšíření popisována rozdílnými názvy a v genové bance se tak mohou tyto genotypy vyskytovat opakovaně. I díky tomu dochází v genových bankách k problémům s duplikáty vzorků nebo vzhledem k uchovávání položek ve formě *in vitro*, může docházet ke vzniku somaklonální variability, kterou je žádoucí odhalit. SSR genotypovací platforma publikovaná ve studii Christelová et al. (2011) se zdá být vhodným nástrojem pro řešení těchto problémů. SSR markery jsou v rostlinné biologii hojně využívány pro jejich rovnoměrné rozptýlení po genomech, početnost, hypervariabilitu, kodominantní původ, dostupnost a možnost automatizace analýz. Na druhou stranu však neumožňují vždy dostatečné rozlišení položek. Kladogram triploidních položek (Obr. č. 10) obsahuje několik genotypů banánovníku (převážně se jedná o plantainy AAB např. Silk) klastrujících společně na jedné větvi. Takovéto klastrování lze konkrétně u skupiny plantainů očekávat jelikož se předpokládá, že všechny plantainy pocházejí z jednoho klonu s původem v Asii nebo jsou typickým příkladem jednoho pěstovaného klonu, který má v různých oblastech Afriky svůj specifický název. Položky plantainů se v tomto případě od sebe neliší mikrosatelitovými sekvencemi, mohou se však lišit jinými typy sekvencí, morfologicky anebo geograficky. Bližší rozlišení těchto položek by umožnilo použití metod založených na sekvenčních technologiích nové generace, např. GBS (Genotyping By Sequencing) nebo RAD sekvenování. Tyto metody, založené na redukci komplexity mohou poskytnout informace o blízké příbuzných zástupcích, ale vyplatí se pouze pro analýzy velkého množství vzorků najednou. Navíc je pro analýzu diverzity těmito přístupy potřebná referenční DNA sekvence, která není dostupná pro všechny studované druhy.

Amplifikace některých SSR markerů se zdá být obtížnější a v kombinaci s určitými vzorky nebylo možné ani po třetím opakování získat dostatečně spolehlivý profil, případně byly píky neskórovatelné. Z tohoto důvodu byly některé klony označeny jako chybějící data („missing data“). V případě většího výskytu „missing dat“ se jednotlivé klony jednoho genotypu nezobrazují v kladogramu společně na jedné nerozlišené větvi s původním genotypovaným vzorkem. Přesto se však jedná ve všech případech o identické klony a klony, které u všech skórovatelných markerů měly stejný SSR profil jako dříve analyzovaný směsný vzorek.

Závěr

Jedním z cílů této diplomové práce bylo rozšířit znalost o diverzitě banánovníku, zpracovat přehled metodik používaných k charakterizaci genetické diverzity a hlavně se zaměřit na využití mikrosatelitových markerů pro charakterizaci banánovníkových položek v genových bankách.

Hlavním cílem této diplomové práce bylo analyzovat sadu vzorků poskytnutých genovou bankou International Transit Centre v belgické Lovani a pomocí dostupné SSR genotypovací platformy zjistit zda u daných vzorků došlo ke vzniku somaklonální variability. Celkově bylo analyzováno 192 vzorků – každý z 48 genotypů byl zastoupen 4 klony, které byly analyzovány zvlášť a následně porovnány se směsným - referenčním vzorkem. Klony některých genotypů však neposkytovaly dostatečně spolehlivé profily velikostí alel, popř. píky nebyly skórovatelné, takovéto klony musely být označeny jako „missing data“. SSR analýza poskytla ve všech případech analyzovaných klonů stejné profily velikostí alel jako u směsných referenčních vzorků, což naznačuje, že v žádném z analyzovaných klonů nedošlo během pěstování na explantátových in vitro kulturách ke vzniku somaklonální variability a jedná se tedy o identické klony daných genotypů.

V rámci analýzy jak diploidních tak triploidních položek byla analyzována vždy jedna neznámá položka. U diploidů se jednalo o položku ITC 1690 'Chuoí rung hoa soan'. Tuto položku se pomocí SSR genotypovací platformy podařilo charakterizovat na úroveň sekce – *Musa*, ale také na úroveň druhu – *Musa acuminata*. U triploidů byl analyzován zástupce s neznámým původem – 'Pagat' ITC 1706. I u této položky bylo možné pomocí genotypovací platformy určit její pravděpodobné genomové složení – AAA. Prozatím se však nepodařilo zjistit typ hybridního klonu jelikož nejbližším příbuzným zástupcem jsou dvě špatně popsane položky (původně AA). Pro zjištění, ke které skupině triploidních klonů s genomem AAA položky náleží je třeba provést analýzu většího počtu triploidních klonů.

Seznam použité literatury

- Akbari, M., Wenzl, P., Vanessa, C., Carling, J., Xia, L., Yang, S., Uszynski, G., Mohler, V., Lehmensiek, A., Kuchel, H., Hayden, J.-M., Howes, N., Sharp, P., Rathmell, B., Vaughan, P., Huttner, E. & Kilian, A. (2006): Diversity Arrays Technology (DART) for high-throughput profiling of the hexaploid wheat genome. - *Theoretical and Applied Genetics* 113: 1409–1420.
- Alvarez, I. & Wendel, F.-J. (2003): Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. - *Molecular phylogenetics and evolution* 29: 417–434.
- Argent, G.-C.-G. (1976): The wild bananas of Papua New Guinea. - *Notes from the Royal Botanical Garden Edinburgh* 35: 77–114.
- Baldwin, B.-G., Sanderson, J.-M., Porter, J.-M., Wojciechowski, F.-M., Campbell, C.-S., et al. (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.
- Bartoš, J., Alkhimova, O., Doleželová, M., De Langhe, E. & Doležel, J. (2005): Nuclear genome size and genomic distribution of ribosomal DNA in *Musa* and *Ensete* (*Musaceae*): taxonomic implications. - *Cytogenetic and Genome Research* 109: 50–57.
- Balint-Kurti, J.-P., Clendennen, K.-S., Doleželová, M., Valárik, M., Doležel, J., Beetham, P.-R. & May, D.-G. (2000): Identification and chromosomal localization of the monkey retrotransposon in *Musa* sp. - *Molecular & general genetics* 263: 908–915.
- Baurens, C.-F., Noyer, J.-L., Lanaud, C. & Lagoda, J.-L.-P. (1996): Use of competitive PCR to assay copy number of repetitive elements in banana. - *Molecular & general genetics* 253: 57–64.
- Baurens, C.-F., Noyer, J.-L., Lanaud, C. & Lagoda, J.-L.-P. (1997): Assessment of a species-specific element (Brep 1) in banana. - *Theoretical and Applied Genetics* 95: 922–931.
- Boonruangrod, R., Desai, D. & Fluch, S. (2008): Identification of cytoplasmic ancestor gene-pools of *Musa acuminata* Colla and *Musa balbisiana* Colla and their hybrids by chloroplast and mitochondrial haplotyping. - *Theoretical and Applied Genetics* 118: 43–55.
- Boonruangrod, R., Fluch, E.-S. & Burg, E.-K. (2009): Elucidation of origin of the present day hybrid banana cultivars using the 5' ETS rDNA sequence information. - *Molecular Breeding* 24: 77–91.
- Cervera, M.-T., Cabezas, A.-J., Sancha, C.-J., Martínez de Toda, F. & Martínez-Zapater, J.-M. (1998): Application of AFLPs to the characterization of grapevine *Vitis vinifera* L. genetic resources. A case study with accessions from Rioja (Spain). - *Theoretical and Applied Genetics* 97: 51–59.
- Clevinger, A.-J. & Panero, J.-L. (2000): Phylogenetic analysis of *Silphium* and subtribe Engelmanniinae (*Asteraceae*: Heliantheae) based on ITS and ETS sequence data. - *American journal of botany* 87: 565–572.
- Compbell, D., Duchesne, P. & Bernatchez, L. (2003): AFLP utility for population assignment studies: analytical investigation and empirical comparison with microsatellites. - *Molecular Ecology* 12: 1979–1991.

- Creste, S., Tulmann Neto, A., de Oliveira Silva, S. & Figueira, A. (2003): Genetic characterization of banana cultivars (*Musa* spp.) from Brazil using microsatellite markers. - *Euphytica* 132: 259-258.
- Crouch, H-K., Crouch, H-J., Jarret, L-R., Cregan, B-P. & Ortiz, R. (1998): Segregation of microsatellite loci in haploid and diploid gametes of *Musa*. - *Crop Science* 38: 211–217.
- Crouch, H-K., Crouch, H-J., Madsen, S., Vuylsteke, D-R. & Ortiz, R. (2000): Comparative analysis of phenotypic and genotypic diversity among plantain landraces (*Musa* spp., AAB group). - *Theoretical and Applied Genetics* 101: 1056-1065.
- Čížková, J., Hříbová, E., Humplíková, L., Christelová, P., Suchánková, P. & Doležel, J. (2013): Molecular Analysis and Genomic Organization of Major DNA Satellites in Banana (*Musa* spp.). – *Plos One* 8(1): e54808.
- Čížková, J., Hříbová, E., Christelová, P., Van den Houwe, I., Hakkinen, M., Roux, N., Swennen, R. & Doležel, J. (2015): Molecular and cytogenetic characterization of wild *Musa* species newly introduced to ITC collection. – in press.
- Davey, M-W., Gudimella, R., Harikrishna, A-J., Sin, L-W., Khalid, N. & Keulemans, J. (2013): „A draft *Musa balbisiana* genome sequence for molecular genetics in polyploid, inter- and intra-specific *Musa* hybrids”. – *BMC Genomics* 14: 683.
- Davey, M-W., Van den Bergh, I., Markham, R., Swennen, R. & Keulemans, J. (2009): Genetic variability in *Musa* fruit provitamin A carotenoids, lutein and mineral micronutrient contents. - *Food Chemistry* 115: 806–813.
- De Langhe, E. (1961): Le taxonomie du bananier plantain en Afrique Equatoriale. - *Journal d' Agriculture Tropicale et de Botanique Appliquee* (Brussels) 8: 419–449.
- De Langhe, E. (1964a): The origin of variation in the plantains and bananas. - *State Agricultural University of Ghent* 39: 45–80.
- De Langhe, E. (1964b): Influence de la parthénocarpie sur la dégénérescence florale chez le bananier. - *Fruits* 19: 311–322.
- D'Hont, A., Denoeud, F., Aury, J-M., Baurens, F-Ch., Carreel, F., Garsmeur, O., Noel, B., Bocs, S., Droc, S., Rouard, M., Da Silva, C., Jabbari, K., Cardi, C., Poulain, J., Souquet, M., Labadie, K., Jourda, C., Lenggellé, J., Rodier-Goud, M., Alberti, A., Bernard, M., Correa, M., Ayyampalayam, S., Mckain, M-R., Leebens-Mack, J., Freeling, M., Mbéguié-A-Mbéguié, D., Chabannes, M., Wicker, T., Panaud, O., Bardosa, J., Hribova, E., Heslop-Harrison, P., Habas, R., Rivallan, R., Francois, P., Poiron, C., Kilian, A., Burthia, D., Jenny, Ch., Bakry, F., Brown, S., Guignon, V., Kema, G., Dita, M., Waalwijk, C., Joseph, S., Dievart, A, Jaillon, O., Leclercq, J., Argout, X., Lyons, E., Almeida, A., Jeridi, M., Doležel, J., Roux, N., Risterucci, A-M., Weissenbach, J., Ruiz, M., Glaszmann, Ch-J., Quétier, F., Yahiaoui, N. & Wincker, P. (2012): The banana (*Musa acuminata*) genome and the evolution of monocotyledonous plants. – *Nature* 488(9): 213-217.
- D'Hont, A., Paget-Goy, A., Escoute, J., & Carreel, F. (2000): The interspecific genome structure of cultivated banana, *Musa* spp. revealed by genomic DNA in situ hybridization. - *Theoretical and Applied Genetics* 100: 177–183.
- Doležel, J., Doleželová, M. & Novák, F-J. (1994): Flow cytometric estimation of nuclear DNA amount in diploid bananas (*Musa acuminata* and *Musa balbisiana*). – *Plant Biology* 36: 351–357.

- Doleželová, M., Valárik, M., Swennen, R., Horry, J-P., Doležel, J. (1998): Physical mapping of the 18S-25S and 5S ribosomal RNA genes in diploid bananas. – *Biologia Plantarum* 41: 497-505.
- Dover, A-G., Strachan, T. & Coen, E-S. (1982): Molecular drive. - *Science* 218: 1069.
- Droc, G., Larivière, D., Guignon, V., Yahiaoui, N., This, D., Garsmeur, O., Dereeper, A., Hamelin, C., Argout, X., Dufayard, J-F., Lengelle, J., Baurens, F-C., Cenci, A., Pitollat, B., D'Hont, A., Ruiz, M., Rouard, M., & Bocs, S. (2013): The Banana Genome Hub. – Database 1-14.
- Elder, F-J., J-R. & Turner, B-J. (1995): Concerted evolution of repetitive DNA sequences in eukaryotes. - *The Quarterly review of biology* 70: 297–320.
- Elshire, R-J., Glaubitz, J-C., Sun, Q., Poland, J-A., Kawamoto, K., Buckler, E-S. & Mitchell, S-E. (2011): A robust, simple genotyping-by-sequencing (GBS) approach for high diversity species. - *PLoS One* 6(5): e19379.
- Englberger, L., Schierle, J., Aalbersberg, W., Hofmann, P., Humphries, J., Huang, A., Lorens, A., Levendusky, A-M-Y., Daniells, J., Marks, C-G. & Fitzgerald, H-M. (2006): Carotenoid and vitamin content of Karat and other Micronesian banana cultivars. - *International journal of food sciences and nutrition* 57: 399–418.
- FAO – Food and Agriculture Organisation. [Online]. © 2012. Řím, Itálie: [cit. 26. 3. 2015]. Dostupné z: <http://faostat3.fao.org/download/Q/QC/E>
- FAO corporate document repository – bananas. [Online]. © Řím, Itálie: [cit. 9. 4. 2015]. Dostupné z: <http://www.fao.org/docrep/006/t0308e/T0308E03.htm>
- Faure, S., Noyer, J-L., Horry, J-P., Bakry, F., Lanaud, C. & Gonzalez de Leon, D. (1993): A molecular marker-based linkage map of diploid bananas (*Musa acuminata*). - *Theoretical and Applied Genetics* 87: 517—526.
- Francisco-Ortega, J., Barber, C-J., Santos-Guerra, A., Febles-Hernández, R. & Jansen, R-R. (2001): Origin and evolution of the endemic genera of Gonosperminae (*Asteraceae*: Anthemideae) from the Canary Islands: Evidence from nucleotide sequences of the internal transcribed spacers of the nuclear ribosomal DNA. - *American journal of botany* 88: 161–169.
- Frison, E., & Sharrock, S. (1998): The economic, social and nutritional importance of banana in the world. - In: Picq, C., Foure, E., & E. A Frison, A-E. (eds.): *Bananas and Food Security*. - INIBAP, International Symposium, Douala, Kamerun, 21-35 pp.
- Gaudeul, M., Till-Bottraud, I., Barjon, F. & Manel, S. (2004): Genetic diversity and differentiation in *Eryngium alpinum* L. (*Apiaceae*): comparison of AFLP and microsatellite markers. - *Heredity* 92: 508–518.
- Gawel, J-N., Jarret, L-R. & Wittermore, A. (1992): Restriction fragment length polymorphism (RFLP) based phylogenetic analysis of *Musa*. - *Theoretical and Applied Genetics* 84: 286– 290.
- Godwin, D-I., Aitken, A-B-E. & Smith, L-W. (1997): Application of inter simple sequence repeat (ISSR) markers to plant genetics. - *Electrophoresis* 18: 1524–1528.
- Golicz, A-A., Bayer, P-E. & Edwards, D. (2015): Skim-based genotyping by sequencing. - *Methods Molecular Biology* 1245: 257-70.

- Grabin, A., Noyer, J-L., Carreel, F., Dambier, D., Baurens, C-F., Lanaud, C. & Lagoda, J-L-P. (1998): Diploid *Musa acuminata* genetic diversity assayed with sequence tagged microsatellite sites. - *Electrophoresis* 19: 1374– 1380.
- Häkkinen, M. (2013): Reappraisal of sectional taxonomy in *Musa* (*Musaceae*). – *Taxon* 62(4): 809-813.
- Hayden, M-J., Nguyen, M-T., Waterman, A., McMichael, G-L., & Chalmers, J-K. (2007): Application of multiplex-ready PCR for fluorescence based SSR genotyping in barley and wheat. - *Molecular Breeding* 21: 271–281.
- Hippolyte, I., Bakry, F., Seguin, M., Gardes, L., Rivallan, R., Risterucci, A-M., Jenny, C., Perrier, X., Carreel, F., Argout, X., Piffanelli, P., Khan, A-I., Miller, G-N-R., Pappas, G-J., Mbéguié-A-Mbéguié, D., Matsumoto, T., De Bernardinis, V., Huttner, E., Kilian, A., Baurens, C-F., D’Hont, A., Cote1, F., Courtois, B. & Glaszmann, C-J. (2010): A saturated SSR/DArT linkage map of *Musa acuminata* addressing genome rearrangements among bananas. - *BMC Plant Biology* 10: 65.
- Horry, J. & Arnaud, E. (1997): Descriptors for Banana (*Musa* spp.). - IPGRI, Rome, Italy, 58 pp.
- Howell, C-E., Newbury, J., Swennen, L-R., Withers, A-L. & Ford-Lloyd, B-V. (1994): The use of RAPD for identifying and classifying *Musa* germplasm. - *Genome* 37: 328—332.
- Hřibová, E., Doleželová, M., Town, C-D., Macas, J. & Doležel, J. (2007): Isolation and characterization of the highly repeated fraction of the banana genome. - *Cytogenetic Genome Research* 119: 268-274.
- Hřibová, E., Neumann, P., Matsumoto, T., Roux, N., Macas, J., et al. (2010): Repetitive part of the banana (*Musa acuminata*) genome investigated by low-depth 454 sequencing. - *BMC Plant Biology* 10: 204.
- Hřibová, E., Čížková, J., Christelová, P., Taudien, S., De 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(3): e17863. doi:10.1371/journal.pone.0017863.
- Hsiao, C., Chatterton, N-J., Asay, H-K. & Jensen, B-K. (1994): Phylogenetic relationships of ten grass species: an assessment of phylogenetic utility of the internal transcribed spacer region in the nuclear ribosomal DNA in monocots. - *Genome* 37: 112–120.
- Cheesman, E-E. (1947): Classification of the bananas. - *Kew Bulletin* 2: 106–117.
- Christelová, P., Valárik, M., Hřibová, E., Van den houwe, I., Channelière, S., Roux, N. & Doležel, J. (2011): A platform for efficient genotyping in *Musa* using microsatellite markers. – *AoB Plants – special issue: ‘Molecular technologies to improve vegetatively propagated banana and cassava’* 1-14.
- IITA (International Institute of Tropical Agriculture) Research Guide. [Online]. © 2015. Ibadan, Nigérie: [cit. 22. 2. 2015]. Dostupné z: http://old.iita.org/cms/details/trn_mat/irg66/irg661.html
- International *Musa* Germplasm Transit Centre. [Online]. © 2015. Leuven, Belgie: [cit. 27. 2. 2015]. Dostupné z: <http://www.biodiversityinternational.org/research-portfolio/conservation-use-of-bananas-tree-crops/international-musa-germplasm-transit-centre/>
- International Plant Genetic Resources Institute-International Network for the Improvement of Banana and Plantain/Centre de Coopération internationale en recherche agronomique pour le développement [IPGRI-INIBAP/CIRAD] (1996): Description for Banana (*Musa* spp.). Int. Network for the Improvement of Banana and Plantain, Montpellier, France; Centre de coopération int. en recherche agronomique pour le développement, Montpellier, France; International Plant Genetic Resources Institute Press, Rome.

- International Rice Genome Sequencing Project (2005): The map-based sequence of the rice genome. - *Nature* 436: 793-800.
- Jaccoud, D., Peng, K., Feinstein, D. & Kilian, A. (2001): Diversity Arrays: a solid-state technology for sequence information independent genotyping. - *Nucleic Acids Research* 29: e25.
- Jarret, L-R., Bhat, K-V., Cregan, P., Ortiz, R. & Vuylsteke, D. (1994): Isolation of microsatellite DNA markers in *Musa*. - *InfoMusa* 3: 3—4.
- Jarret, L-R., Gawel, N., Whittemore, A. & Sharrock, S. (1992): RFLP-based phylogeny of *Musa* species in Papua New Guinea. - *Theoretical and Applied Genetics* 84: 579–584.
- Jeridi, M. et al. (2011): Homoeologous chromosome pairing between the A and B genomes of *Musa* spp. revealed by genomic in situ hybridization. - *Annals of botany (Lond.)* 108: 975–981.
- Kammer, D., Afza, E., Weising, K., Kahl, G. & Novak, F-J. (1992): Oligonucleotide and amplification fingerprinting of wild species and cultivars of banana (*Musa* spp.). - *Bio/Technology* 10: 1030—1055.
- Kervégant, D. (1935): *Le bananier et son exploitation*. - Soc. Edit. Marit. et Colon., Paris.
- Lescot, M. et al. (2008): Insights into the *Musa* genome: syntenic relationships to rice and between *Musa* species. - *BMC Genomics* 9: 58.
- Lagoda, J-L-P., Noyer, J-L., Dambier, D., Baurens, C-F., Grapin, A. & Lanaud, C. (1998): Sequence tagged microsatellite site (STMS) markers in the *Musaceae*. - *Molecular Ecology* 7: 657–666.
- Lanaud, C., Tezenas Du Montcel, H., Jolivot, M-P., Glaszmann, J-C. & Gonzalez de Leon, D. (1992): Variation of ribosomal gene spacer length among wild and cultivated bananas. - *Heredity* 68: 147–156.
- Lezar, S., Myburg, A-A., Berger, D-K., Wingfield, J-M. & Wingfield, B-D. (2004): Assessment of microarray-based DNA fingerprinting in *Eucalyptus grandis*. - *Theoretical and Applied Genetics* 109: 1329–1336.
- Li, C., Li, Y., Shi, Y., Song, Y., Zhang, D., Buckler, E-S., Zhang, Z., Wang, T. & Li, Y. (2015): Genetic control of the leaf angle and leaf orientation value as revealed by ultra-high density maps in three connected maize populations. - *PLoS One* 10(3): e0121624.
- Li, F-L., Hakkinen, M., Yuan, M-Y., Hao, G. & Ge, X-J. (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.
- Liu, A-Z., Kress, J. & Li, D-Z. (2010): Phylogenetic analyses of the banana family (*Musaceae*) based on nuclear ribosomal (ITS) and chloroplast (trnL-F) evidence. - *Taxon* 59: 20–28.
- Loh, J-P., Kiew, R., Set, O., Gan, H-L. & Gan, Y-Y. (2000): Amplified fragment length polymorphism fingerprinting of 16 banana cultivars (*Musa* cvs.). - *Molecular phylogenetics and evolution* 17: 360–366.
- Ma, J., Devos, K-M. & Bennetzen, J-L. (2004): Analyses of LTR-retrotransposon structures reveal recent and rapid genomic DNA loss in rice. - *Genome Research* 14: 860–869.
- Mace, E-S., Xia, L., Jordan, D-R., Halloran, K., Parh, D-K., Huttner, E., Wenzl, P. & Kilian, A. (2008): DArT markers: diversity analyses and mapping in *Sorghum bicolor*. - *BMC Genomics* 9: 26.

- Margulies, M., Egholm, M., Altman, E-W., Attiya, S., Bader, J-S., Bembem, A-L., Berka, J., Braverman, M-S., Chen, J-Y., Chen, T-Z., Dewell, B-S., Du, L., Fierro, J-M., Gomes, V-X., Godwin, B-C., He, W., Helgesen, S., Ho, CH., Irzyk, G-P., Jando, C-S., Alenquer, I-L-M., Jarvie, P-T., Jirage, B-K., Kim, B-J., Knight, J-R., Lanza, J-R., Leamon, H-J., Lefkowitz, M-S., Lei, M., Li, J., Lohman, K-L., Lu, H., Makhijani, B-V., McDade, E-K., McKenna, M-P., Myers, E-W., Nickerson, E., Nobile, J-R., Plant, R., Puc, B-P., Ronan, M-T., Roth, G-T., Sarkis, G-J., Simons, F-J., Simpson, J-W., Srinivasan, M., Tartaro, K-R., Tomasz, A., Vogt, A-K., Volkmer, A-G., Wang, H-S., Wang, Y., Weiner, M-P., Yu, G-P., Begley, F-R. & Rothberg, J-M (2005): Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. - *Nature* 473: 376-380.
- Marin, D., Romero, R., Guzmán, M. & Sutton, T. (2003): Black Sigatoka: an increasing threat to banana cultivation. - *Plant disease* 87: 208–221.
- Messing, J., Bharti, A-K., Karlowski, M-W., Gundlach, H., Kim, H-R., Yu, Y., Wei, F., Fuks, G., Soderlund, A-C., Mayer, F-K. & Wing, A-R. (2004): Sequence composition and genome organization of maize. – *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 101: 14349-14354.
- MGIS (Musa Germplasm Information system). [Online]. © 2015. Port Harcourt, Nigérie: [cit. 16. 4. 2015]. Dostupné z: <http://www.crop-diversity.org/mgis/>
- Molina, A-B., Williams, C-R., Hermanto, C., Suwanda, M., Komolong, B. & Kokoa, P. (2010): Mitigating the threat of banana *Fusarium* wilt: understanding the agroecological distribution of pathogenic forms and developing disease management strategies, Final Report. - ACIAR, Canberra, Australia, 76 pp.
- MusaNet (Bioversity International). [Online]. © 2015. Montpellier, Francie: [cit. 27. 2. 2015]. Dostupné z: <https://sites.google.com/a/cgxchange.org/musanet/musa-collections/international-transit-center-itc>
- Nair, A-S., Teo, C-H., Schwarzacher, T. & Heslop-Harisson, J-S. (2005): Genome classification of banana cultivars from South India using IRAP markers. - *Euphytica* 114: 285–290.
- Neumann, P., Navrátilová, A., Koblížková, A., Kejnovský, E., Hřibová, E., Hobza, R., Widmer, A., Doležel, J. & Macas, J. (2011): Plant centromeric retrotransposons: a structural and cytogenetic perspective. - *Mobile DNA* 2(1): 4.
- NCBI (National Center for Biotechnology Information). [Online]. © 2015. Bethesda, USA: [cit. 27. 2. 2015]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=630214&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>
- Noyer, J-L., Causse, S., Tomekpe, K., Bouet, A. & Baurens, C-F. (2004): A new image of plantain diversity assessed by SSR, AFLP and MSAP markers. - *Genetica* 124: 61–69.
- Nwakanma, C-D., Pillay, M., Okoli, B-E. & Tenkouano, A. (2003): PCR-RFLP of the ribosomal DNA internal transcribed spacers (ITS) provides markers for the A and B genomes in *Musa* L. - *Theoretical and Applied Genetics* 108: 154-159.
- Ortiz, R. (1985): Efecto ambiental, interaccion genotipo por ambiente y heredabilidad de las características morfológicas utilizadas en la clasificación racial de maíz en la Sierra del Peru. - Unpublished MSc. Thesis, Universidad Nacional Agraria – La Molina, Lima, Peru.
- Ortiz, R. (1997): Morphological variation in *Musa* germplasm. – *Genetic Resources and Crop Evolution* 44: 393-404.

- Ortiz, R., Madsen, S. & Vuylsteke, D. (1998): Classification of African plantain landraces and banana cultivars using a phenotypic distance index of quantitative descriptors. – *Theoretical and Applied Genetics* 96: 904–911.
- Osuji, J-O., Crouch, J., Harrison, G. & Heslop-Harrison, J-S. (1997): Molecular cytogenetics of *Musa* species, cultivars and hybrids: location of 18S-5.8S-25S and 5S rDNA and telomere-like sequences. – *Annals of Botany* 82: 243–248.
- Osuji, J-O., Harrison, G., Crouch, J. & Heslop-Harrison, J-S. (1997): Identification of the genomic constitution of *Musa* L. lines (bananas, plantains and hybrids) using molecular cytogenetics. - *Annals of Botany* 80: 787–793.
- Osuji, J-O., Crouch, J., Harrison, G. & Heslop-Harrison, J-S. (1998): Molecular cytogenetics of *Musa* species, cultivars and hybrids: location of 18S-5.8S-25S and 5S rDNA and telomere-like sequences. – *Annals of Botany* 82: 243-248.
- Paterson, A-H. et al. (2009): The *Sorghum bicolor* genome and the diversification of grasses. - *Nature* 457: 551–556.
- Pessoa-Filho, M., Beló, A., Alcochete, A-A-N., Rangel, H-N-P. & Ferreira, E-M. (2007): A set of multiplex panels of microsatellite markers for rapid molecular characterization of rice accessions. - *BMC Plant Biology* 7: 23.
- Pillay, M. & Myers, G-O. (1999): Genetic diversity in cotton assessed by variation in ribosomal RNA genes and AFLP markers. - *Crop Science* 39: 1881–1886.
- Pillay, M., Nwakanma, C-D. & Tenkouano, A. (2000): Identification of RAPD markers linked to A and B genome sequences in *Musa* L. - *Genome* 43: 763–767.
- Purseglove, J-W. (1972): Tropical crops: Monocotyledons. – In: Pillay, M. & Tenkouano, A. (eds.): *Banana Breeding: Progress and Challenges*. – CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, 383 pp.
- Raboin, L., Carreel, F. & Noyer, J. (2005): Diploid ancestors of triploid export banana cultivars: molecular identification of 2n restitution gamete donors and n gamete donors. - *Molecular Breeding*, 16: 333–341.
- Risterucci, A-M., Hippolyte, I., Perrier, X., Xia, L., Caig, V., Evers, M., Huttner, E., Kilian, A. & Glaszmann, C-J. (2009): Development and assessment of Diversity Arrays Technology for high-throughput DNA analyses in *Musa*. - *Theoretical and Applied Genetics* 119: 1093-1103.
- Robinson, C-J. (1996): *Crop production in horticulture: Bananas and Plantains*. - CAB International, Oxon.
- Rogers, O-S. & Bendich, A-J. (1987): Ribosomal RNA genes in plants: variability in copy number and in intergenic spacer. - *Plant Molecular Biology* 9: 509–520.
- Rowe, H-C., Renaut, S., Guggisberg, A. (2011): RAD in the realm of next-generation sequencing technologies. - *Molecular Ecology* 20(17) :3499-502.
- Sagot, P. (1887): Sur le Genre Bananier. - *Bulletin de la Société botanique de France* 34: 328-330.
- Semagn, K., Bjornstad, A., Skinnes, H., Maroy, A-G., Tarkegne, Y. & William, M. (2006): Distribution of DArT, AFLP, and SSR markers in a genetic linkage map of a doubled-haploid hexaploid wheat population. - *Genome* 49: 545–555.
- Sevilla, R. & Holle, M. (1995): *Recursos Geneticos Vegetales*. - La Molina, Lima, Peru.

- Schuelke, M. (2000): An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. - *Nature Biotechnology* 18: 233–234.
- Simmonds, N-W. (1962): The evolution of the bananas. - Longman, London, 170 pp.
- Simmonds, N-W. (1973): Los plátanos: técnicas agrícolas y producciones tropicales. - Editorial Blume, Barcelona, Spain.
- Simmonds, N-W (1995): Bananas *Musa* (*Musaceae*). In: Smartt, J., Simmonds, N-W. (eds.): Evolution of crop plants. - Longman Scientific and Technical, London, 370–375 pp.
- Simmonds, N-W. & Shepherd, K. (1955): The taxonomy and origins of cultivated bananas. - *Botanical Journal of the Linnean Society* 55: 302-312.
- Stanford, A-M., Harden, R. & Parks, C-R. (2000): Phylogeny and Biogeography of *Juglans* (*Juglandaceae*) based on matK and ITS sequence. - *American journal of botany* 87: 872–882.
- Stover, H-R. & Simmonds, N-W. (1987): Bananas. Third edition. - In: Kole, Ch. (ed.): Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants: Fruits and Nuts. – Springer, Berlin, 370 pp.
- Swennen, R., Vuylsteke, D. & Ortiz, R. (1995): Phenotypic diversity and patterns of variation in West and Central African plantains (*Musa* spp., AAB group *Musaceae*). - *Economic Botany* 49: 320–327.
- Talukder, Z-I., Gong, L., Hulke, B-S., Pegadaraju, V., Song, Q., Schultz, Q., Qi, L. (2014): A high-density SNP Map of sunflower derived from RAD-sequencing facilitating fine-mapping of the rust resistance gene R12. - *PLoS One* 9(7): e98628.
- Tautz, D. (1989): Hypervariability of simple sequence as a general source for polymorphic DNA markers. - *Nucleic Acids Research* 17: 6463–6471.
- Tezenas du Montcel, H., De Langhe, E. & Swennen, R. (1983): Essai de classification des bananiers plantains (AAB). - *Fruits* 38: 461– 474.
- This, P., Jung, A., Boccacchi, P., Borrego, J., Botta, R., Constantini, L., Crespan, M., Dangl, G-S., Eisenheld, C., Ferreira-Monteiro, F., Grando, S., Ibañez, J., Lacombe, T., Laucou, V., Magalhães, R., Meredith, C-P., Milani, N., Peterlung, E., Regner, F., Zulini, L. & Maul, E. (2004): Development of a standard set of microsatellite reference alleles for identification of grape cultivars. - *Theoretical and Applied Genetics* 109: 1448–1458.
- Ude, G., Pillay, M., Nwakanma, C-D. & Tenkouano, A. (2002a): Analysis of genetic diversity and sectional relationships in *Musa* using AFLP markers. - *Theoretical and Applied Genetics* 104: 1239–1245.
- Ude, G., Pillay, M., Nwakanma, C-D. & Tenkouano, A. (2002b): 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.
- Valárik, M., Šimková, H., Hřibová, E., Safář, J., Doleželová, M. & Doležel, J. (2002): Isolation, characterization and chromosome localization of repetitive DNA sequences in bananas (*Musa* spp.). - *Chromosome Research* 10: 89-100.
- Van de Peer, Y., Fawcett, J., A., Proost, S., Sterck, L. & Vandepoele, K. (2009): The flowering world: a tale of duplications. - *Trends Plant Science* 14: 680–688.
- Velasco, R., Zharkikh, A., Troglio, M., Cartwright, A-D., Cestaro, A., Pruss, D., Pindo, M., FitzGerald, L-M., Vezzulli, S., Reid, J., Malacarne, G., Iliev, D., Coppola, G., Wardell, B., Micheletti, D., Macalma, T.,

- Facci, M., Mitchell, J-T., Perazzolli, M., Eldredge, G., Gatto, P., Oyzerski, R., Moretto, M., Gutin, N., Stefanini, M., Chen, Y., Segala, C., Davenport, C., Dematte, L., Mraz, A., Battilana, J., Stormo, K., Costa, F., Tao, Q-Z., Si-Ammour, A., Harkins, T., Lackey, A., Perbost, C., Taillon, B., Stella, A., Fawcett, A-J., Sterck, L., Vandepoele, K., Grando, M-S., Toppo, S., Moser, C., Lanchbury, J., Bogden, R., Skolnick, M., Sgaramella, V., Bhatnagar, K-S., Fontana, P., Gutin, A., Van de Peer, Y., Salamini, F. & Viola, R. (2007): High quality draft consensus sequence of the genome of a heterozygous grapevine variety. - PLoS ONE, 2(12): e1326.
- Venkatachalam, L., Sreedhar, R-V. & 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.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de 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.
- Vuylsteke, D., Ortiz, R. & Ferris, S. (1993): Genetic and agronomic improvement for sustainable production of plantain and banana in sub-Saharan Africa. - African Crop Science 1: 1–8.
- White, J., Law, J-R., Mackay, I., Chalmers, J-K., Smith, C-J-S., Kilian, A. & Powell, W. (2008): The genetic diversity of UK, US and Australian cultivars of *Triticum aestivum* measured by DArT markers and considered by genome. - Theoretical and Applied Genetics 116: 439–453.
- Wilson, F-G. (1983): Plantains production: prospects for improving the food situation in the tropics. – Fruits 38: (6) 229-239.
- Wong, C., Kiew, R., Loh, J-P., Gan, H-L., Set, O., Lee, K-S., Lum, S. & Gan, Y-Y. (2001): Genetic diversity of the wild banana *Musa acuminata* Colla in Malaysia as evidenced by AFLP. – Annals of Botany 88: 1017–1025.
- Wong, M-M., Gujaria-Verma, N., Ramsay, L., Yuan, H-Y., Caron, C., Diapari, M., Vandenberg, A. & Bett, K-E. (2015): Classification and Characterization of Species within the Genus *Lens* Using Genotyping-by-Sequencing (GBS).- PLoS One 10(3): e0122025.
- Yang, S., Pang, W., Ash, G., Harper, J., Carling, J., Wenzl, P., Huttner, E., Zong, X. & Kilian, A. (2006): Low level of genetic diversity in cultivated Pigeon pea compared to its relatives is revealed by diversity arrays technology. - Theoretical and Applied Genetics 113: 585–595.
- Zhang, D., Mischke, S., Goenaga, R., Hemeida, A-A. & Saunders, A-J. (2006): Accuracy and reliability of high-throughput microsatellite genotyping for cacao clone identification. - Crop Science 46: 2084–2092.

Seznam použitých zkratek

AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism – polymorfismus délky amplifikovaných fragmentů
CIRAD	Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement
DArT	Diversity Arrays Technology
DNA	DeoxyriboNucleic Acid - deoxyribonukleová kyselina
dNTP	deoxyriboNucleotide TriPhosphate – deoxyribonukleotid trifosfát
FAO	Food and Agriculture Organisation – organizace pro výživu a zemědělství
FISH	Fluorescent <i>In Situ</i> Hybridisation – fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace
GBS	Genotyping By Sequencing – genotypování sekvenováním
GISH	Genomic <i>In Situ</i> Hybridisation – genomická <i>in situ</i> hybridizace
IGS	InterGenetic Spacer – mezigenový mezerník
IRAP	Inter-Retroelement Amplified Polymorphism – amplifikovaný polymorfismus mezi retroelementy
ISSR	Inter-Simple Sequence Repeat – jednoduché opakující se mezi-sekvence
ITS	Internal Transcribed Spacer – vnitřní transkribovaný mezerník
LINE	Long interspersed elements – dlouhé rozptýlené elementy
MSAP	Methylation Sensitive Amplification Polymorphism – amplifikovaný polymorfismus citlivý k metylaci
PCR	Polymerase Chain Reaction – polymerázová řetězová reakce
RAD	Restriction site Associated DNA – markery asociované s restričními místy na DNA
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA – náhodně amplifikovaná polymorfnní DNA
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism – polymorfismus délky restričních fragmentů
SSR	Simple Sequence Repeats – jednoduché opakující se sekvence
UPGMA	Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic mean