

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Odvođenje PCR markerov špecifických pre
B chromozóm ciroku *Sorghum purpureo-
sericeum* a ich využitie pre selekciu
B-pozitívnych jedincov**

Bakalárská práce

Natália Harnádková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2022 Vedoucí práce: Mgr. Miroslava Karafiátová, Ph.D.

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Akademický rok: 2020/2021

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Natália HARNÁDKOVÁ**
Osobní číslo: **R19828**
Studijní program: **B1501 Biologie**
Studijní obor: **Molekulární a buněčná biologie**
Téma práce: **Odvození PCR markerov špecifických pre B chromozóm čiroku Sorghum purpureosericeum a ich využitie pre selekciu B-pozitívnych jedincov**
Zadávající katedra: **Katedra buněčné biologie a genetiky**

Zásady pro vypracování

- Izolácia DNA z klasov
- Identifikácia rastlín nesúcich B chromozóm pomocou prietokového cytometru
- Polymerázová retazová reakcia (PCR)
- elektroforéza v agarózovom géli

Rozsah pracovní zprávy:

Rozsah grafických prací:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Jazyk zpracování: **Slovenština**

Seznam doporučené literatury:

Karaňátová, M.; Bednářová, M.; Said, M.; Čížková, J.; Holušová, K.; Blavet, N.; Bartoš, J. B chromosome of Sorghum purpureosericeum reveals the first pieces of its sequence. *J. Exp. Bot.* 2020, eraa548

Rakshit S, Ganapathy KN and Visarada KBRS: Cytogenetics of Sorghum. In: Compendium of plant genomes – The sorghum genome. Rakshit and Wang (eds). Springer Int. Publishers AG. 2016

Hariprasanna K and Patil JV: Sorghum: Origin, Classification, Biology and Improvement. In: Sorghum Molecular Breeding. Madhusudhana et al. (eds). Springer India. 2015

Jones RN and Rees H: B chromosomes. Academic Press Inc. (London) LTD. 1982

Wu TP: B chromosomes in Sorghum purpureosericeum. *Proc. Natl. Sci. Counc. B. ROC* 8 (3), 1984. pp 198-209

Darlington CD, Thomas FRS and Thomas PT: Morbid mitosis and the activity of inert chromosomes in Sorghum. *Proc. Roy. Soc. London B*, 1941, 130: 127-150

Douglas RN and Birchler JA: B chromosomes. In: Chromosome structure and aberrations. Bhat TA and Wani AA (eds). Springer India 2017. pp 13-39

Jones RN: Transmission and drive involving parasitic B chromosomes. *Genes* 2018, 9, 388

Vedoucí bakalářské práce: Mgr. Miroslava Karafiátová, Ph.D.
UEB Olomouc, AVČR

Datum zadání bakalářské práce: 10. března 2021

Termín odevzdání bakalářské práce: 31. července 2022

L.S.

doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.
děkan

prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.
vedoucí katedry

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
KATEDRA BUNĚČNÉ BIOLOGIE A GENETIKY
Šlechtitelů 27, 783 71 Olomouc – Holice
tel.: +420 585 634 000
-2- 12 -03- 2021

Bibliografická identifikácia

Meno a priezvisko autora: Natália Harnádková

Názov práce: Odvodenie PCR markerov špecifických pre B chromozóm ciroku *Sorghum purpureo-sericeum* a ich využitie pre selekciu B-pozitívnych jedincov

Typ práce: bakalárska

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

Vedúci práce: Mgr. Miroslava Karafiátová, Ph.D.

Rok obhajoby práce: 2022

Kľúčové slová: cirok, *Sorghum purpureo-sericeum*, B chromozóm, špecifické markery, PCR

Počet strán: 50

Počet príloh: 1

Jazyk: slovenčina

SÚHRN

B chromozómy sú nadpočetné chromozómy nachádzajúce sa v rastlinách, živočíchoch a hubách. Typickým znakom je, že sa ich prenos neriadí mendelovskou dedičnosťou, preto sa ich počet môže líšiť v rámci jedincov toho istého druhu aj v rámci pletív toho istého jedinca. *Sorghum purpureo-sericeum* je planý diploidný druh, ktorý disponuje týmito chromozómami, a u ktorého bola preukázaná ich prítomnosť iba v generatívnych orgánoch.

Cieľom tejto práce bolo odvodiť PCR špecifické markery, ktoré by vykazovali špecifickosť v prostredí Direct PCR s možnosťou ich využitia pri detekcii B chromozómu v endosperme a selekcii B-pozitívnych jedincov. Pre experiment bolo navrhnutých celkovo 29 párov primerov špecifických pre B chromozóm, ktoré boli otestované na DNA jedincoch vybraných líniiach izolovaných tromi rôznymi kitmi. Testovanie pomocou metódy PCR preukázalo špecifickosť 2 markerov. Bohužiaľ však ani jeden marker nebol špecifický v prostredí Direct PCR a pre detekciu B chromozómu v endosperme tak bude nutné použiť alternatívny prístup izolácie DNA z limitovaného množstva pletiva.

Bibliographical identification

Author's first name and surname: Natália Harnádková

Title: Development of PCR markers specific for the B chromosome in *Sorghum purpureo-sericeum* and their application in screening for B-positive individuals

Type of thesis: bachelor

Department: Department of Cell Biology and Genetics, Faculty of Science, Palacký University Olomouc

Supervisor: Mgr. Miroslava Karafiátová, Ph.D.

The year of presentation: 2022

Keywords: *Sorghum*, *Sorghum purpureo-sericeum*, B chromosome, specific markers, PCR

Number of pages: 50

Number of appendices: 1

Language: Slovak

SUMMARY

The B chromosomes are supernumerary chromosomes that have been found in plants, animals and fungi. Typically their transmission is not governed by Mendelian inheritance, so their number may vary within individuals of the same species, as well as within the tissues of the same individual. *Sorghum purpureo-sericeum* is a wild diploid species carrying this kind of chromosomes and their presence has been proven almost exclusively in generative organs.

The aim of the thesis was to develop B-specific PCR markers that would reliably work in Direct PCR with application in detection of the B chromosome in the endosperm and selection of B-positive individuals. A total of 29 pairs of B-specific primers were designed for the experiment and tested on selected lines. Out of all, 2 markers were found to be B-specific. Nevertheless, none of them did not target B chromosome sequence reliably in Direct PCR and alternative approach of mini DNA isolation have to be used to detect the B chromosome in endosperm.

Prehlásenie

Čestne prehlasujem, že som túto bakalársku prácu vypracovala samostatne pod vedením vedúcej práce Mgr. Miroslavy Karafiátovej Ph.D. a za použitia uvedenej literatúry.

V Olomouci dňa

Pod'akovanie

Rada by som poďakovala svojej školiteľke Mgr. Miroslave Karafiátovej Ph.D. za odborné vedenie, venovaný čas, trpezlivosť a ochotu, ktorú mi venovala v priebehu spracovania bakalárskej práce. Moje poďakovanie patrí taktiež zamestnancom Centra štruktúrnej a funkčnej genómiky rastlín Ústavu experimentálnej botaniky AV ČR v Olomouci za ich ochotu vždy pomôcť a poradiť.

OBSAH

ZOZNAM SKRATIEK.....	vii
ZOZNAM OBRÁZKOV	viii
ZOZNAM TABULIEK	ix
1 ÚVOD.....	1
2 CIELE PRÁCE	2
3 LITERÁRNY PREHĽAD	3
3.1 <i>Sorghum</i> (Cirok)	3
3.1.1 Taxonómia ciroku	3
3.1.2 Geografické rozšírenie ciroku.....	4
3.1.3 Anatómia rastlín ciroku	4
3.1.4 Využitie ciroku	5
3.2 B chromozómy	6
3.2.1 Morfológia	6
3.2.2 Dedičnosť.....	8
3.2.3 Pôvod a evolúcia.....	9
3.2.4 Funkcie.....	10
3.3 Výskum B chromozómov	11
3.3.1 B chromozómy rodu <i>Sorghum</i>	15
4 MATERIÁL A METÓDY.....	17
4.1 Biologický materiál.....	17
4.2 Použité chemikálie a roztoky	18
4.3 Zoznam použitých prístrojov a zariadení.....	19
4.4 Použité experimentálne a vyhodnocovacie postupy	20
4.4.1 Izolácia genómovej DNA <i>Sorghum purpureo-sericeum</i>	20
4.4.2 Navrhnutie B-špecifických primerov.....	20
4.4.3 Testovanie špecifickosti primerov navrhnutých pre B chromozóm v štandardnej PCR reakcii.....	20
4.4.4 Testovanie primerov metódou Direct PCR.....	21

4.4.5	Izolácia DNA <i>Sorghum purpureo-sericeum</i> pomocou kitu pre malé množstvo pletiva	22
5	VÝSLEDKY	23
5.1	Izolácia genómovej DNA.....	23
5.2	Overenie špecifickosti primerov pre B chromozóm ciroku	24
5.2.1	Testovanie primerov navrhnutých na sekvencie vzišlé z komparatívnej analýzy sekvencií B+ x B0 rastlín	24
5.2.2	Testovanie primerov navrhnutých na génové oblasti vzišlé z transkriptomu B+ embrya.....	27
6	DISKUSIA.....	30
7	ZÁVER	32
8	LITERATÚRA	33
9	PRÍLOHY	40

ZOZNAM SKRATIEK

B+	B-pozitívny jedinec (B-positive individual)
B0	B-negatívny jedinec (B-negative individual)
ICRISAT	Medzinárodný inštitút pre výskum plodín v polovyprahnutých oblastiach (International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics)
LINE	dlhé rozptýlené jadrové elementy (long interspersed nuclear element)
NCR	non-disjunkčná kontrolná oblasť (nondisjunction control region)
PDA	pisatín demetyláza (pisatin demethylase)
PCR	polymerázová reťazová reakcia (polymerase chain reaction)
rDNA	ribozomálna DNA (ribosomal DNA)
USDA	Americké ministerstvo poľnohospodárstva (United States Department of Agriculture)

ZOZNAM OBRÁZKOV

Obrázok 1 Klasifikácia rodu <i>Sorghum</i>	3
Obrázok 2 Detail kvetenstva kultivovaného a planého ciroku..	5
Obrázok 3 B chromozómy pažítky <i>Allium schoenoprasum</i> v metafáze.....	7
Obrázok 4 Diagram zobrazujúci akumulčné mechanizmy B chromozómov.	9
Obrázok 5 Schéma zobrazujúca B chromozóm kukurice.....	12
Obrázok 6 15 DAP staré embryo <i>Aegilops speltoides</i> vykazujúce úplnú absenciu B chromozómov v bunkách koreňa.	14
Obrázok 7 Elektroforéza PCR produktov prvých desiatich párov primerov (01, 02, 03, 04, 05, 06, 07, 08, 09, 10) testovaných na 578 F0 B+ DNA a B0 DNA.	24
Obrázok 8 Elektroforéza PCR produktov desiatich párov primerov (11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20) testovaných na 578 F0 B+ DNA a B0 DNA.	25
Obrázok 9 Elektroforéza PCR produktov Direct PCR piatich párov primerov (02, 03, 07, 15, 18) testovaných na 578_1 F1 B+ DNA a 578_6 F1 B0 DNA.	27
Obrázok 10 Elektroforéza PCR produktov deviatich párov primerov (21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29) testovaných na 578_6 F1 B0 DNA a 578_1 F1 B+ DNA.	28
Obrázok 11 Elektroforéza PCR produktov dvoch párov primerov (24, 27) testovaných na embryu a endospermu F1 potomstve línie 578.	29

ZOZNAM TABULIEK

Tabuľka 1 Zoznam rastlín druhu <i>Sorghum purpureo-sericeum</i> použitých v experimentoch a informácie o prítomnosti B chromozómu	17
Tabuľka 2 Podmienky PCR reakcie pre testovanie primerov	21
Tabuľka 3 Podmienky Direct PCR reakcie pre testovanie primerov	21
Tabuľka 4 Výsledné koncentrácie vyizolovanej genómovej DNA použitých rastlín <i>Sorghum purpureo-sericeum</i>	23
Tabuľka 5 Špecifickosť párov primerov 01–20 na F0 generácii rastlín použitých v experimentu	26

1 ÚVOD

B chromozómy sú nadpočetné chromozómy vyskytujúce sa v karyotype približne 15 % eukaryotických organizmov, vrátane tých rastlinných (D'Ambrosio *et al.*, 2017). Predstavujú akýsi doplnkový genetický materiál k štandardnému genómu. Napriek tomu, že tvoria dodatočnú DNA, ich prítomnosť je vo väčšine prípadov pre jedinca postrádateľná, pretože svojim nositeľom neposkytujú takmer žiadne výhodné vlastnosti, naopak, ich prítomnosť je spojená s negatívnymi dopadmi na fenotyp (Jones, 1995; Houben *et al.*, 2014). Ich výskyt bol preukázaný u piatich druhov rodu *Sorghum*, pričom jedným z nich je planý diploidný druh *Sorghum purpureo-sericeum*, u ktorého bola zistená prítomnosť B chromozómov v rozmedzí až šiestich kópií (Janaki-Ammal, 1940; Bednářová *et al.*, 2021). Ich typickým znakom je nemendelovská dedičnosť (Camacho *et al.*, 2000). Počas svojej existencie si vytvorili stratégie, ktoré im umožňujú pretrvávajúť v populácii. Jednou z nich je mechanizmus non-disjunkcie. Tá u rodu *Sorghum* nastáva v prvej peľovej mitóze počas dozrievania gametofytov. V dôsledku nepravidelnej dedičnosti sa prítomnosť B chromozómov môže líšiť nie len medzi jedincami rovnakého druhu, ale i medzi pletivami toho istého jedinca. V prípade *Sorghum purpureo-sericeum* sa preukázala ich absencia v koreňoch, stonkách a listoch a výskyt je obmedzený takmer výhradne na generatívne orgány (Darlington a Thomas, 1941).

2 CIELE PRÁCE

Cieľom tejto práce bolo odvodiť PCR markery špecifické pre B chromozóm ciroku *Sorghum purpureo-sericeum*, ktoré by vykazovali dostatočnú špecifickosť v metóde Direct PCR, ktorá by veľmi rýchlo a spoľahlivo umožnila detekciu B-pozitívnych jedincov. Vzhľadom k tomu, že u *Sorghum purpureo-sericeum* nosia B chromozóm obe spermatické bunky, je možné stanoviť status jedinca už v štádiu semena.

3 LITERÁRNY PREHĽAD

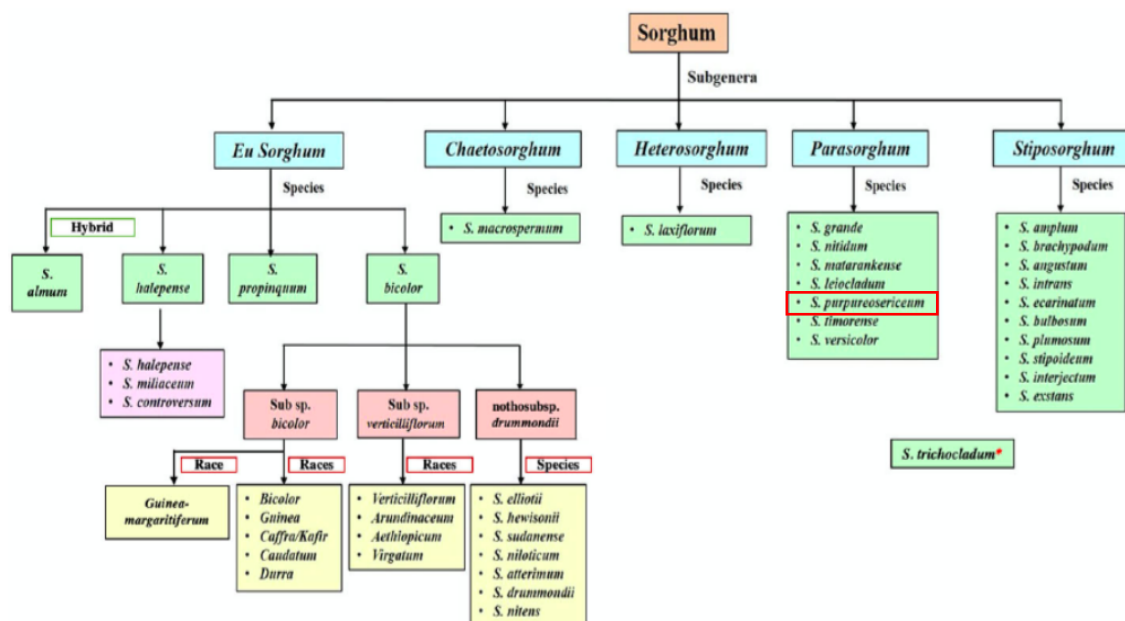
3.1 *Sorghum* (Cirok)

Cirok je jednou z piatich plodín, ktoré predstavujú obživu pre milióny ľudí, vďaka čomu sa stáva hospodársky jednou z najvýznamnejších obilnín súčasnosti (Vanamala *et al.*, 2018). Je nie len súčasťou potravy pre človeka, ale taktiež je dôležitou zložkou rôznych krmív (Ananda *et al.*, 2020). Jedná sa o krátkodennú C₄ rastlinu, ktorá vďaka svojej vysokej fotosynthetickej schopnosti dokáže rásť v miernych aj tropických oblastiach (Hariprasanna a Patil, 2015; Chadalavada, 2021).

3.1.1 Taxonómia ciroku

Rod *Sorghum* prvýkrát klasifikoval švédsky taxonóm Carl Linneaus ako rod *Holcus* v roku 1753 (Ananda *et al.*, 2020). O 41 rokov neskôr, v roku 1794 Conrad Moench zaradil *Sorghum* do samostatného rodu.

Podľa klasifikácie patrí do čeľade lipnicovité (*Poaceae*), kmeňa *Andropogoneae*, podkmeňa *Sorghinae*. Rod *Sorghum* je na základe morfológických znakov ešte členený na päť podrodov: *Eusorghum*, *Chaetosorghum*, *Heterosorghum*, *Parasorghum* a *Stiposorghum*. Rod pozostáva z 25 rastlinných druhov (Dillon *et al.*, 2004). Niektoré druhy sekcie *Eusorghum* sa ešte ďalej delia na poddruhy (obr. 1).



Obrázok 1 Klasifikácia rodu *Sorghum*. Červenou je zdôraznené zaradenie divokého druhu *S. purpureo-sericeum*. U druhu *S. trichocladium* (*) je presná pozícia v rámci fylogenie stále nejasná. Modifikované z: Ananda *et al.*, 2020

3.1.2 Geografické rozšírenie ciroku

Niektoré druhy ciroku sú špecifické pre určitý biotop, avšak mnohé z nich sú schopné adaptácie na prostredie (Lazarides *et al.*, 1991). Archeologické dôkazy ukazujú miesta pôvodu ciroku v Sudáne, Etiópii a západnej Afrike (Ananda *et al.*, 2020). Tieto oblasti sú typické pre cirok, keďže je schopný rásť aj v suchých oblastiach, ktoré neumožňujú pestovanie hlavných hospodárskych plodín.

Druhy podrodu *Eusorghum* sa vyskytujú hlavne v Afrike a južnej Ázii (Ananda *et al.*, 2020). *Sorghum halepense*, ktorý taktiež spadá do tohto podrodu, je ale rozptýlený v Stredomorí a tiahne sa až k ostrovom juhovýchodnej Ázie (de Wet, 1967).

Podrod *Parasorghum* zahrňuje sedem druhov, päť z nich osídľujú Austráliu (*S. grande*, *S. leiocladum*, *S. matarankense*, *S. nitidum* a *S. timorense*.), *S. purpureo-sericeum* sa vyskytuje v Indii a na južnom okraji Sahary a *S. versicolor* sa nachádza na juhu a na východe Afriky (Ananda *et al.*, 2020). Súčasťou podrodu *Stiposorghum* je desať endemických druhov vyskytujúcich sa v Austrálii (Ananda *et al.*, 2020). V Austrálii sa taktiež vyskytujú druhy podrodov *Chaetosorghum* a *Heterosorghum* (Price *et al.*, 2005). *Heterosorghum* sa navyše vyskytuje aj na Novej Guinei (Ananda *et al.*, 2020).

3.1.3 Anatómia rastlín ciroku

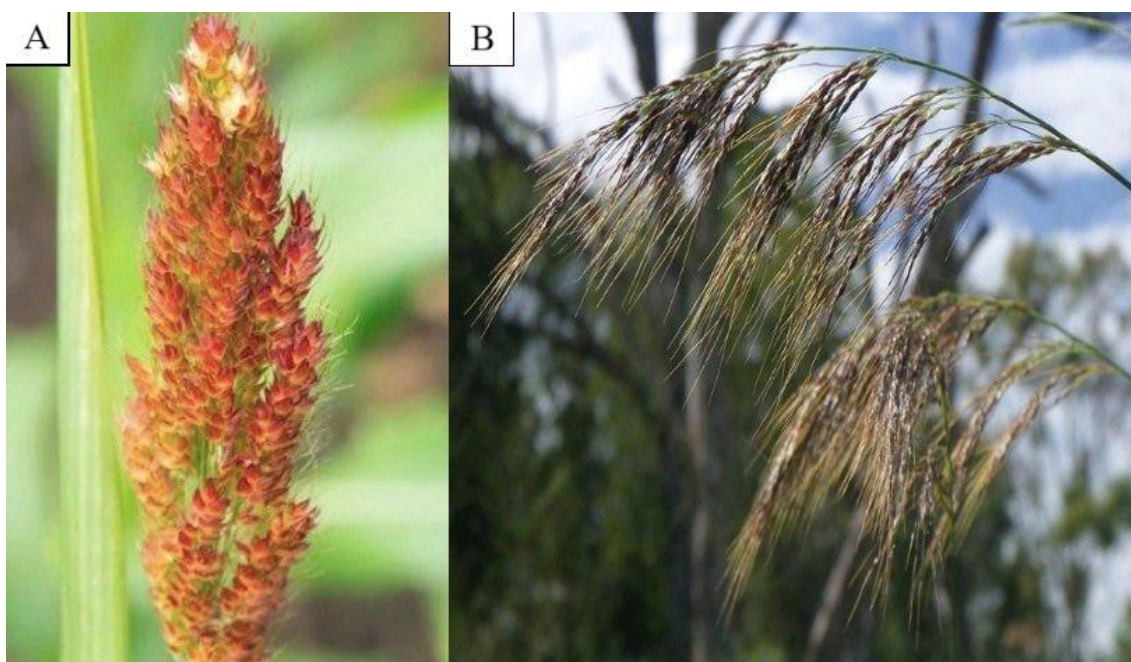
V rámci rodu existuje 25 druhov, pričom polymorfizmus je rozsiahly a pravdepodobne vznikol v dôsledku veľkej variability biotopov (Ananda *et al.*, 2020). Zahrňuje jednak jednoročné aj trvalé byliny, čo sú napríklad *S. halepense* alebo *S. nitidum*.

Najvýznamnejším a najviac charakterizovaným druhom je kultivovaný *S. bicolor* (L) Moench (Cirok dvojfarebný). Ide o starú kultúrnu rastlinu, ktorá sa pestuje v Afrike viac ako 5 000 rokov. Súčasnosti patrí medzi päť celosvetovo najdôležitejších obilnín, hneď po pšenici, ryži, kukurici a jačmeni (Lewington, 2003).

Patrí medzi jednoročné byliny bez oddenku, čepeľ listov môže dosahovať 1–8 cm, lata býva hustá, vajcovitá až elipsovité. Vreteno lavy je vždy zakryté vetvami. Vetvenie je priame mnohokvetné. Veľkosť prisadnutých kláskov sa pohybuje medzi 4–6 mm (obr. 2A), tvar semien býva vajcovitý až guľovitý. Obilky dosahujú veľkosť 2–8 mm (Kaplan *et al.*, 2002). Taxonomicky spadá do podrodu *Eusorghum* a člení sa na ďalšie tri poddruhy: *S. bicolor*, *S. verticilliflorum* a *S. drummondii*.

Morfológia medzi kultivovanými a planými druhmi ciroku je výrazne odlišná. *Sorghum laxiflorum* sa zaraďuje medzi plané jednoročné ciroky. Steblá sú vzpriamené

alebo genikulárne stúpajúce s dĺžkou 1–2 m. Listové čepele dosahujú šírku 3–16 mm, povrch býva holý alebo pokrytý chlpkami, čepeľ listu má špicatý tvar. Lata je otvorená, elipsovité s dĺžkou približne 7–17 cm a s vetvami tvoriace strapce (obr. 2B). *S. purpureo-sericeum* je planá jednoročná bylina. Na rozdiel od kultivovaného *S. bicolor*, ktorého výška môže dosahovať až 2 m, je pomerne menší, má približne 80–100 cm. Cirok je primárne samoprašný, ale významné množstvo semien môže vzniknúť sprášením s inou rastlinou. Početnosť vzájomného opelenia je vyššia u planých druhov, kde môže dosahovať až 30 % (House, 1985).



Obrázok 2 Detail kvetenstva kultivovaného a planého ciroku. A – Cirok dvojfarebný (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). B – *Sorghum laxiflorum*. Prevzaté z: <https://powo.science.kew.org>

3.1.4 Využitie ciroku

Cirok, ako plodina C₄, ktorá je odolná voči suchu a vysokým teplotám, disponuje nízkymi požiadavkami na vstupy umožňujúce vysoké výnosy, vďaka čomu patrí medzi základné potraviny pre milióny ľudí v tropických a subtropických oblastiach, najmä v Afrike (Ananda *et al.*, 2020, Epitia-Hermández *et al.*, 2020).

Využitie ciroku je takmer výhradne obmedzené na *Sorghum bicolor*. V USA, ktorá je zároveň v súčasnosti najväčším producentom ciroku, je jeho primárne využitie pre výrobu biopalív (<http://sorghumchechhoff.com>). V Austrálii sa využíva ako hlavný zdroj krmiva pre hospodárske zvieratá (Ananda *et al.*, 2020; Hao *et al.*, 2021). Podľa uvedených dát USDA (Foreign Agricultural Service) sa v roku 2018/2019 celosvetovo

vyprodukovalo 59 miliónov ton ciroku. Z toho približne 64 % sa použilo na priemyselné osivo potravín a 36 % práve na spotrebu krmív (<http://apps.fas.usda.gov>).

Uplatnenie sa nachádza aj vo výrobe bioproduktov (Silva *et al.*, 2021). Biomasa sa podrobuje intenzívnemu skúmaniu, kvôli jej potenciálu využitia v celulózových a v lignocelulózových obnoviteľných zdrojov (Hao *et al.*, 2021).

3.2 B chromozómy

B chromozómy sú nadpočetné chromozómy vyskytujúce sa v mnohých organizmoch. Predstavujú dodatočnú DNA ku štandardným chromozómom, takzvaným A chromozómom. Ich počet je variabilný a bežne sa líši v rámci jednej populácie medzi jednotlivcami (Houben *et al.*, 2014). Tieto chromozómy boli objavené v genómoch približne 15 % eukaryotických organizmov z toho predstavujú 2 087 rastlinné druhy, 736 živočíšne druhy a 14 druhov húb (D'Ambrosio *et al.*, 2017). Za objaviteľa B chromozómov sa považuje Edmund B. Wilson., ktorý ich objavil v hmyzu *Acanthocephal* v roku 1907 (Jones *et al.*, 2008). V ríši rastlín o nich pochádza prvá zmienka z 20. rokov 20. storočia, kedy boli objavené v raži *Secale cereale* a následne aj v kukurici siatej *Zea mays* (Kuwada, 1925; Longley, 1927). V literatúre sa možno stretnúť s anglickým výrazom 'supernumerary', ktoré im priradil Longley a až o rok neskôr ich Randolph klasifikoval ako 'B chromozómy' (Randolph, 1928). Toto označenie sa používa dodnes.

U rodu *Sorghum* bola zistená prítomnosť B chromozómov u piatich druhov: *Sorghum verticilliflorum*, *Sorghum purpureo-sericeum*, *Sorghum nitidum*, *Sorghum halepense* a *Sorghum stipoides* (Huskins a Smith, 1934; Janaki-Ammal, 1940; Raman a Krishnaswami, 1960; Raman *et al.*, 1964; Wu, 1992) U druhov, u ktorých existujú aj tetraploidné formy, je prítomnosť B chromozómov obmedzená len na diploidné variety (Raman, *et al.*, 1976).

3.2.1 Morfológia

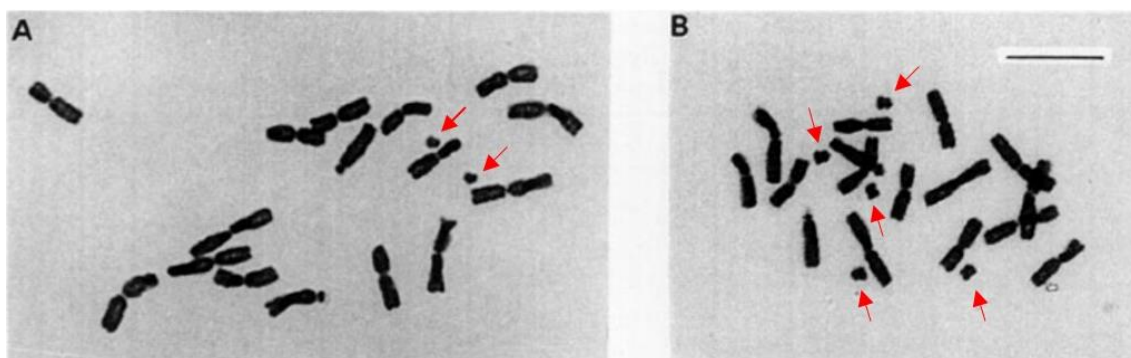
Typicky sú B chromozómy menšie než A chromozómy (Bauerly *et al.*, 2014). Zatiaľ nie je známy žiadny druh v rastlinnej ríši, ktorého B chromozómy by mali väčšiu veľkosť ako chromozómy A. Vo väčšine prípadoch veľkosť B chromozómu dosahuje $\frac{1}{4}$ až $\frac{3}{4}$ veľkosti najmenšieho štandardného chromozómu (Jones, 1995). Zrovnateľná veľkosť s A chromozómami je skôr výnimkou, i napriek tomu sa vyskytujú v druhoch

ako cirok *Sorghum nitidum*, prsiarka *Alopecurus myosuroides* alebo trstinovec *Saccharum ravennae* (Raman a Krishnaswami, 1960; Jones, 1995).

B chromozómy vykazujú vysokú mieru polymorfizmu a to aj v rámci jednotlivých druhov. U niektorých druhov môžu byť rovnaké (monomorfne), u iných druhov sú rozdiely v morfológii (polymorfne). Jeden druh môže mať v jednej bunke viac ako jeden typ B chromozómu. Príkladom je pažitka *Allium schoenoprasum*, kde bola zistená prítomnosť telocentrického B chromozómu o dĺžke približne 1,15 μm (obr. 3A) a metacentrického s dĺžkou približne 1,35 μm (obr. 3B) (Stevens a Bougourd, 1994).

Chromatín B chromozómov môže vykazovať rôznu mieru kondenzácie. Vo väčšine prípadov rastlín sú chromozómy úplne alebo prevažne heterochromatické, napríklad v kraslici *Briza media*, kukurici *Zea mays* (Battaglia, 1964). U niektorých druhov rastlín boli popísané B chromozómy tvorené prevažne euchromatínom, príkladom sú cesnak *Allium cernuum*, škarda *Crepis pannonica*, bledavka *Ornithogalum pyrenaicum* (Battaglia, 1964).

Poloha centroméry býva rozličná (Jones, 1995). B chromozómy môžu byť akrocentrické (krátke rameno je výrazne kratšie ako dlhé rameno) vyskytujúce sa napríklad u škrečka *Tscherskia triton*, telocentrické (centroméra na konci ramien), ktoré boli objavené u mloka *Dicamptodon tenebrosus* a metacentrické (centroméra sa nachádza uprostred ramien) nachádzajúce sa napríklad u ryby *Characidium alipioi* (Green, 2004; Borisov, 2008; Serrano *et al.*, 2017).



Obrázok 3 B chromozómy pažitky *Allium schoenoprasum* v metafáze. A – 2 telocentrické B chromozómy. B – 5 metacentrických B chromozómov. B chromozómy sú naznačené šípkami. Modifikované z: Stevens a Bougourd, 1994

V rámci rodu *Sorghum* B chromozómy vykazujú rôznu morfológiu v jednotlivých druhoch. *S. purpureo-sericeum* disponuje heterochromatickými chromozómami, ktoré sú navzájom odlišné. Boli zistené tri typy: S (short), M (medium) a L (long) a medzi jednotlivými typmi nedochádza k párovaniu a vzniku bivalentov (Darlington a Thomas, 1941). Druh *S. nitium*, má najväčšie B chromozómy zo všetkých cirokov a jeho veľkosť

je rovnaká ako veľkosť chromozómu A (Raman a Krishnaswami, 1960). Prítomnosť euchromatického izochromozómu bola potvrdená u *S. stipoides*, ktorý vykazoval medziramenné párovanie (Wu, 1992). U *S. halepense* boli zistené tri typy B chromozómov, z ktorých dva vykazovali čiastočnú homológiu (Raman *et al.*, 1976). U *S. verticilliflorum* bol behom samčej meiózy pozorovaný ďalší pár chromozómových fragmentov (Huskins a Smith, 1934). To či išlo skutočne o B chromozómy je však otázne, pretože pozorované fragmenty boli veľmi malé a taktiež boli pripojené k bivalentu A. Nakoľko je toto jediná štúdia zaoberajúca sa ich prítomnosťou u tohto druhu, je neisté tvrdiť, že šlo skutočne o B chromozómy alebo skôr išlo o chromozomálne fragmenty (Bednářová *et al.*, 2021).

3.2.2 Dedičnosť

Pre B chromozómy je charakteristické, že sa ich prenos do potomstva neriadi mendelovskou dedičnosťou (Camacho *et al.*, 2000). Z toho dôvodu sa počty B chromozómov môžu odlišovať medzi populáciami a jedincami totožného druhu, medzi rôznymi pletivami rovnakého jedinca aj medzi bunkami jedného pletiva (Ruban *et al.*, 2020).

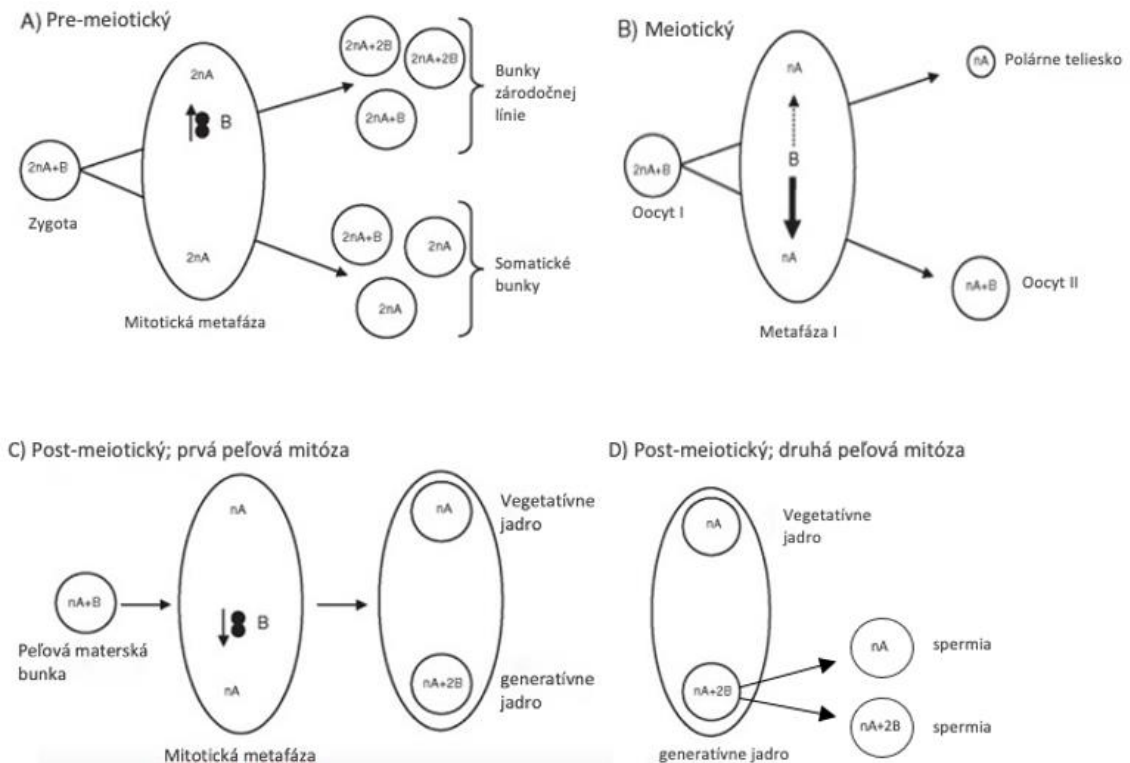
B chromozómy si počas svojej existencie vytvorili rôzne mechanizmy, ktoré ich udržujú v populácii. Ide o akumulčné mechanizmy, z ktorých najčastejšie sú takzvané ‘drive’ procesy. Podľa načasovania, kedy k nim dochádza sú známe tri typy: pre-meiotický, meiotický a post-meiotický (obr.4) (Banaei-Moghaddam *et al.*, 2012).

Pri pre-meiotickom akumulčnom mechanizme B chromozómy smerujú k pólu, z ktorého vznikajú bunky zárodočnej línie, v ktorých je priemerný počet B chromozómov vyšší ako pôvodný počet v zygote (obr. 4A). Tento mechanizmus bol prvýkrát opísaný u kobyľky *Calliptamus palaestinis* (Nur, 1963).

Meiotický akumulčný mechanizmus je typický pre živočíchy a bol pozorovaný v primárnych oocytoch sarančaťa *Myrmeleotettix maculatus* (Hewitt, 1976). V dôsledku asymetrie vretienka B chromozóm prednostne migruje ku životaschopnému pólu bunky, dostáva sa do sekundárneho oocytu (obr. 4B) (Hewitt, 1976; Camacho, 2005).

Post-meiotický akumulčný mechanizmus je veľmi častý u rastlín počas dozrievania gametofytov a dochádza k nemu v priebehu peľových mitóz (Camacho, 2005). U raži *Secale cereale* ho podrobne skúmal Hasegawa (1934) a zistil, že non-disjunkcia chromatíd nastáva v anafáze prvej peľovej mitózy a dvojchromatídový chromozóm potom putuje smerom ku generatívnejmu jadru (obr. 4C). Podobným

akumulačným mechanizmom disponujú B chromozómy kukurice, u ktorej ale dochádza k non-disjunkcii v druhej peľovej mitóze, počas ktorej sa tvoria dve spermie. Výsledkom je umiestnenie oboch kópií B chromozómov len v jednej z nich (obr. 4D). Spermia nesúca nadpočetné chromozómy potom prednostne oplodňuje vajíčko (Roman, 1947; Carlson, 1978; Lamb *et al.*, 2006).



Obrázok 4 Diagram zobrazujúci akumuláciu mechanizmy B chromozómov. A – Pre-meiotický akumulácia mechanizmus (B chromozómy sa dostávajú do buniek zárodočnej línie), B – Meiotický akumulácia mechanizmus (B chromozómy sa dostávajú do jadra vaječnej bunky), C – Post-meiotický akumulácia mechanizmus v I. peľovej mitóze (B chromozómy sa dostávajú do generatívneho jadra), D – Post-meiotický akumulácia mechanizmus v II. peľovej mitóze (tvoria sa dve spermie, z toho len jedna obsahuje obe kópie B chromozómov). Modifikované z: Camacho, 2005

3.2.3 Pôvod a evolúcia

Pôvod B chromozómov bol skúmaný v rôznych organizmoch. Zvyčajne sa predpokladá, že vznikli z A chromozómov. Príkladom podporujúci túto teóriu je B chromozóm raži, u ktorého zistili výskyt génových sekvencií pochádzajúcich od rôznych A chromozómov, primárne z oblastí chromozómov 3R a 7R (Martis *et al.*, 2012). Taktiež môžu vzniknúť z pohlavných chromozómov, ako je tomu u rodu rýb *Characidium*. V tomto prípade majú pôvod z chromozómov Z a W (Pansonato-Alves *et al.*, 2014).

B chromozómy môžu mať pôvod v rovnakom druhu, vtedy sa hovorí o intrašpecifickom pôvode (Camacho *et al.*, 2000). Tento pôvod bol preukázaný

v kukurici *Zea mays*, u sarančaťa *Locusta migratoria* a u ryby *Astyanax scabripinnis* (Mestriner *et al.*, 2000; Teruel *et al.*, 2010; Serrano *et al.*, 2017). Druhý prípad je vznik medzidruhovým krížením – interšpecifický pôvod (Camacho *et al.*, 2000). Príkladom tohto pôvodu sú B chromozómy ryby *Poacilia formosa* (Serrano *et al.*, 2017).

3.2.4 Funkcie

Je obecné známe, že B chromozómy neprinášajú žiadne výhodné vlastnosti ich nositeľom, tj. nie sú nevyhnutné pre rast a vývoj, a preto sa do istej miery považujú za parazitické až sebecké elementy (Banaei-Moghaddam *et al.*, 2012; Houben, 2017; Ruban *et al.*, 2020; Dos Santos *et al.*, 2021).

Prítomnosť menšieho počtu B chromozómov v organizme nemá vo väčšine prípadov takmer žiadny fenotypový prejav (Houben *et al.*, 2014). Na druhú stranu, vysoké počty sú letálne a dochádza k zníženiu vitality a sterility jedinca (Jones, 1995). Tolerancia buniek k prítomnosti B chromozómu je pomerne variabilná a druhovo špecifická. Napríklad u kokoríku *Polygonatum falcatum* je rozptyl v počte B chromozómov 4–8, u pažitky *Allium schoenoprasum* 1–13 a u rastliny *Scilla scilloides* je prítomnosť B chromozómov v bunkách v rozsahu 1 až 31 (Tamura, 1990; Stevens a Bougourd, 1994; Choi *et al.*, 2004).

B chromozómy sú tvorené prevažne repetitívnymi sekvenciami DNA, predovšetkým satelitnou DNA, ribozomálnou DNA (rDNA) a mobilnými elementami (Teruel *et al.*, 2010). V niekoľkých prípadoch sa však preukázalo, že B chromozómy nesú štruktúrne gény kódujúce proteíny (Miao *et al.*, 1991; Teruel *et al.*, 2010). Jedným z nich je patogénna huba *Nectria haematococca*, ktorej rodina génov cytochromu P-450 (PDA) zodpovedá za detoxifikáciu antimikrobiálnej zlúčeniny – pisatínu. Práve gén PDA6 bol identifikovaný na B chromozóme (Miao *et al.*, 1991).

V dnešnej dobe sa diskutuje o tom, že na B chromozómoch sa nachádzajú gény pre určité proteíny, ktoré zohrávajú úlohu pri organizácii mikrotubulov a štruktúre kinetochoru a mohli by hrať úlohu pri prenose chromozómov do dcérskych buniek (Valente *et al.*, 2014). S tým súvisí zapojenie B chromozómov do regulácie ich prenosu v populácii. Konkrétne B chromozóm raži nesie gény zodpovedajúce za reguláciu non-disjunkcie počas post-meiotického akumuláčného procesu (Banaei-Moghaddam *et al.*, 2012).

Existuje príklad, kedy B chromozómy predsa len zasahujú do fenotypu jedinca. Ukázalo sa, že B chromozómy, ktorými disponujú druhy rýb čeľade *Cichlidae* sú

zapojené do určovania pohlavia a to tým, že ovplyvňujú vývoj jedinca ku samičíemu pohlaviu (Yoshida *et al.*, 2011).

3.3 Výskum B chromozómov

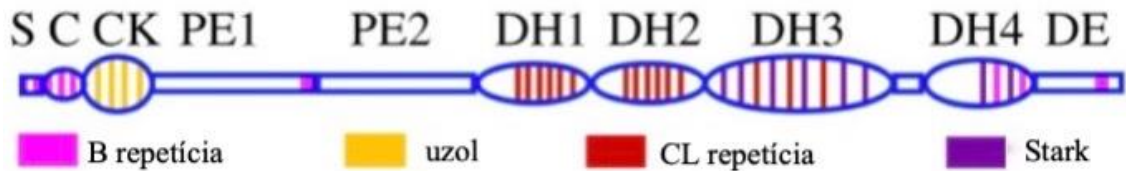
Štúdium B chromozómov začalo pred viac ako storočím, pričom za ten čas bola ich prítomnosť zistená u 2 828 eukaryotických druhov, zahŕňajúc rastliny, živočíchy aj huby (D'Ambrosio *et al.*, 2017). Napriek skutočnosti, že výskyt B chromozómov sa potvrdil takmer u päťnásobne viac druhov rastlín než živočíchov, počet preskúmaných živočíšnych druhov nesúcich chromozóm B je výrazne väčší ako rastlinných (Camacho *et al.*, 2000).

Výskumy u rastlín ostávajú v úzadí a sú obmedzené na identifikáciu B chromozómov a cytologické štúdie, ktoré preukázali ich premenlivý výskyt v rámci ríše. Navzdory veľkému zastúpeniu druhov v oddelení *Chlorophyta* (približne 12 000 druhov) nebola zaznamenaná prítomnosť nadpočetných chromozómov ani u jedného druhu (D'Ambrosio *et al.*, 2017). Podobne aj v oddelení krytosemenných rastlín sú čeľade, u ktorých doteraz nebol preukázaný výskyt B chromozómov – *Ericaceae*, *Apocynaceae* (Camacho *et al.*, 2000).

Naopak, čeľade *Poaceae*, *Asteraceae* a *Asparagaceae* majú najviac druhov, u ktorých bol zistený B chromozóm, a to práve kvôli ich intenzívnym štúdiám (Camacho *et al.*, 2000). Pozornosť je zameraná na rastliny čeľade *Poaceae*, do ktorej spadajú plodiny, podliehajúce ekonomickému záujmu. Keďže kukurica, raž, cirok sú celosvetovo významné, je miera vedomostí o ich B chromozóme výrazne vyššia ako u iných druhov, pričom sú podrobené početným molekulárnym štúdiám, ktoré poskytli informácie o ich pôvode, evolúcii, dedičnosti a funkcii. Aj navzdory nespočetným výskumom, ktorými boli podrobené, ich dedičnosť a spôsob, akým odolávajú selekčnému tlaku, nie je ešte stále dostatočne objasnená (Jones *et al.*, 2008).

Jedným z najdôkladnejšie preštudovaných je B chromozóm kukurice, ktorý vykazuje vysokú mieru heterochromatínu. V nedávnej štúdií sa podarilo zostaviť referenčnú sekvenciu a v nej identifikovať 758 génov kódujúcich proteín. Veľkosť sekvencie chromozómu bola odhadnutá na 125,9 Mb (Blavet *et al.*, 2021). Chromozóm disponuje nie len sekvenciami podobnými na chromozómoch A, ale aj špecifickými repetíciami typickými len pre B chromozóm. Bola detegovaná organelárna DNA (721kbp) pochádzajúca z chloroplastových a mitochondriálnych sekvencií. Mitochondriálne sekvencie boli zväčša umiestnené v proximálnom euchromatíne (PE),

distálnom heterochromatíne (DH3) a distálnom euchromatíne (DE) (obr. 5) (Blavet *et al.*, 2021). B-špecifická repetícia ZmBs bola identifikovaná v oblasti centroméry, v distálnom heterochromatíne (DH4) a distálnom euchromatíne (DE), CL-repetícia je prítomná v častiach DH1, DH2 a DH3 a repetícia Stark sa nachádza vo väčšine DH3 a distálnej časti DH4 (obr.5) (Birchler a Yang, 2021).



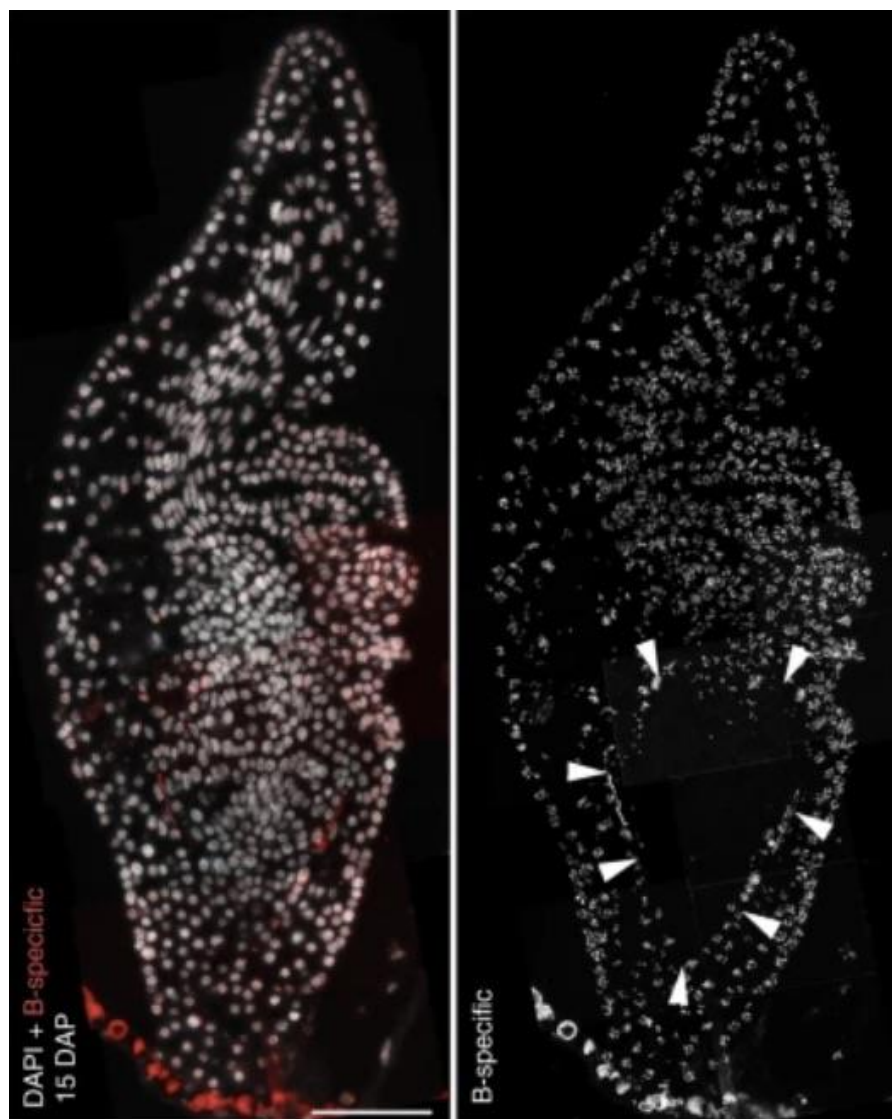
Obrázok 5 Schéma zobrazujúca B chromozóm kukurice. Chromozóm je delený na krátke rameno (S), centroméru (C), centromerický uzol (CK), proximálny euchromatín (PE1, PE2), štyri bloky distálneho heterochromatínu (DH1, DH2, DH3, DH4) a distálny euchromatín (DE). Modifikované z: Birchler a Yang, 2021

Non-disjunkcia B chromozómu kukurice nastáva v druhej peľovej mitóze (Roman, 1947). Faktor potrebný na adhéziu sesterských chromatíd je práve B-špecifická repetícia ZmBs nachádzajúca sa aj v oblasti centroméry, ktorá pôsobí ako *cis* faktor (Blavet *et al.*, 2021). Avšak, adhézia závisí aj na *trans* faktoroch. Jeden z nich sa nachádza v distálnej oblasti dlhého ramena a druhý v oblasti proximálneho euchromatínu (Ward, 1973; Lin, 1978; Lamb *et al.*, 2006). Analýza ukázala, že aby došlo k non-disjunkcii, musí byť v jadre prítomná práve aj distálna oblasť dlhého ramena B chromozómu, avšak nie je podmienkou, aby táto oblasť bola prítomná na rovnakom chromozóme, preto je označovaná za *trans* faktor (Blavet *et al.*, 2021). Podobný mechanizmus sa nachádza aj u B chromozómu raži (Endo *et al.*, 2008).

Okrem kukurice je raž ďalším druhom, ktorého B chromozóm bol podrobený dôkladným štúdiám. Analýzy stanovili veľkosť nadpočetného chromozómu na približne 580 Mbp a odhalili vysokú mieru podobnosti medzi A a B chromozómami, pričom najviac zastúpené sekvencie zodpovedajú tým, ktoré sú na štandardných chromozómoch 3R a 7R. (Martis *et al.*, 2012). Chromozómy B akumulujú veľké množstvo mitochondriálnej a plastidovej DNA (Martis *et al.*, 2012). Okrem toho, sú bohaté na vysokokópiové opakovania v centromerickej oblasti a v terminálnej oblasti dlhého ramena sa nachádzajú dve B-špecifické rodiny opakujúcich sa sekvencií D1100 a E3900 (Sandery *et al.*, 1990; Blunden *et al.*, 1993, Martis *et al.*, 2012). Analýza exprese odhalila skutočnosť, že tieto sekvencie sú transkripčne aktívne a zohrávajú úlohu pri procese non-disjunkcie (Carchilan *et al.*, 2007).

Cytologické štúdie zamerané na raž odhalili, že miera non-disjunkcie sa pohybuje v rozsahu 88 %–95 % v závislosti od populácie (Chen *et al.*, 2022). Non-disjunkcia B chromozómov raži nastáva nie len v samotnej raži, ale aj vtedy, keď sú zavedené do karyotypu hexaploidnej pšenici *Triticum aestivum* (Lindström, 1965). B chromozóm raži je schopný riadiť proces non-disjunkcie a to dvoma odlišnými chromozomálnymi oblasťami (Endo *et al.*, 2008). Koniec dlhého ramena chromozómu B, ktorý je tvorený heterochromatínom sa podieľa na kontrole non-disjunkcie. Ide o takzvanú non-disjunkčnú kontrolnú oblasť (NCR). Deficitné B chromozómy (defB), ktorým chýba heterochromatická koncová oblasť dlhého ramena, podliehajú normálnej disjunkcii v prvej peľovej mitóze (Jones, 1995). V tejto oblasti je umiestený *trans*-pôsobiaci faktor, ktorý ovplyvňuje (peri)centromerické adhézne miesta na chromozóme (Endo *et al.*, 2008). Vďaka schopnosti pôsobiť v *trans*, k non-disjunkcii môže dôjsť aj v prípade, kedy v bunke sú oba typy B chromozómov – štandardný B chromozóm aj defB (Endo *et al.*, 2008).

V nedávnej štúdii, ktorá sa venovala B chromozómom *Aegilops speltoides* sa prišlo k pozoruhodnému zisteniu (Ruban *et al.*, 2020). Už skôr sa vedelo, že u tohto druhu sa B chromozómy nevyskytujú v koreňoch dospelých rastlín (Jones a Rees, 1982). Štúdia ale odhalila, že B chromozómy podliehajú eliminácii v koreňovom pletive už v ranom štádiu vývoja embrya, pričom je tento proces striktne kontrolovaný. 3–5-dňové embryo vykazovalo B-špecifické signály vo všetkých bunkách. Počas vývoja embrya dochádza postupne k zníženiu B-špecifických signálov v koreňovom pletive a v zrelom embryu je embryonálny koreň už úplne prostý B chromozómu (obr. 6). O distribúcii B chromozómu v dospeljej rastline je tak už definitívne rozhodnuté v rámci embryonálneho vývoja (Ruban *et al.*, 2020).



Obrázok 6 15 DAP staré embryo *Aegilops speltoides* vykazujúce úplnú absenciu B chromozómov v bunkách koreňa. B chromozóm je detegovaný pomocou B-špecifickej fluorescenčne značenej sondy (červeno). Koreňová oblasť (prostá signálu) je značená šípkami. Prevzaté z: Ruban *et al.*, 2020

Molekulárny mechanizmus tkaninovo špecifickej distribúcie nie je známy. Predpokladá sa však, že bude výrazne podobný mechanizmu non-disjunkcie. Konkrétne u druhu *A. speltoides* je rozhodujúcim faktorom pre osud B chromozómu symetria delenia. V prípade symetrického delenia v somatických bunkách koreňa dochádza k eliminácii. Naopak, I. peľová mitóza je typicky asymetrická a B chromozóm je vplyvom priestorového usporiadania vťahnutý do generatívneho jadra (Ruban *et al.*, 2020).

Budúce pochopenie mechanizmu eliminácie by tak mohlo poskytnúť viac informácií aj o procese non-disjunkcie. Hoci tento proces je využívaný B chromozómami

k ich udržaniu v populácii, non-disjunkcia chromozómov A je príčinou genetických porúch u človeka aj iných druhov (Banaei-Moghaddam *et al.*, 2012; Ruban *et al.*, 2020).

3.3.1 B chromozómy rodu *Sorghum*

Doterajšie výskumy B chromozómov rodu *Sorghum* zahŕňajú takmer výhradne štúdium morfológie, výskytu, dedičnosti a ich vplyvu na fenotyp jedincov.

V rámci rodu *Sorghum* B chromozómy vykazujú odlišnú morfológiu v jednotlivých druhoch (viď kap. 3.2.1). Distribúcia B chromozómov je nepravidelná a ich výskyt je obmedzený na určité typy pletív. Ich absencia bola prvýkrát pozorovaná v pletive koreňov *Sorghum purpureo-sericeum* a následne v stonkách a listoch *S. purpureo-sericeum* (Janaki-Ammal, 1940; Darlington a Thomas, 1941). Naopak, ich stabilný výskyt bol preukázaný v generatívnych orgánoch *S. purpureo-sericeum* a v kvetenstve *S. stipoides* sa vyskytujú mozaikovo (Darlington a Thomas, 1941; Wu, 1978).

V rámci dedičnosti bola dobre preštudovaná peľová mitóza *S. purpureo-sericeum*. Priebeh primárneho delenia peľových zŕn je nepravidelný a dochádza k non-disjunkcii B chromozómov. U jedincov nesúcich B chromozómy sa došlo k záveru, že vegetatívne jadro môže prechádza nadpočetným delením – polymitózou, čoho výsledkom je vznik nadpočetných generatívnych jadier obsahujúce B chromozómy. Počas delenia nedochádza k rozdeleniu chromatíd, chromozómy smerujú vždy ku generatívnejmu pólu nerozdelené, čo má za následok zdvojenie ich genetickej dávky (Darlington a Thomas, 1941).

Fenotypový prejav čiastočne súvisí so vzrastajúcim počtom B chromozómov. U *S. purpureo-sericeum* majú nepriaznivý vplyv na samčiu fertilitu. Čím väčší je počet B chromozómov v karyotypu, tým je menšia životaschopnosť produkovaného peľu (Janaki-Ammal, 1940). U *S. halepense* s 4–6 B chromozómami nevykazovali nijaké fenotypové rozdiely oproti svojim rodičom, avšak produkcia deformovaných peľových zŕn dosahovala až 60 %. Hybridi s *S. bicolor*, ktorých karyotyp obsahoval 8 a viac B chromozómov, boli menej vitálni a vykazovali redukciu vegetatívnych a generatívnych orgánov a hybridy s 10 B chromozómami vykazovali vyššie percento sterility semien, tie boli pomerne zmenšené (Raman *et al.*, 1976).

Zo všetkých druhov z rodu *Sorghum* nesúcich B chromozóm je najpodrobnejšie preskúmaný *S. purpureo-sericeum*. Ako je uvedené v odstavci vyššie, už dávnejšie sa zistila nepravidelnosť v prenose a výsledky publikované v nedávnej štúdií len potvrdzujú

tento fakt. Analýza časti celých rastlín nesúcich B chromozóm s cieľom identifikovať tkanivá, v ktorých je zachovaná ich prítomnosť ukázala, že okrem kvetenstva, kde sú stabilne prítomné, bola reziduálna populácia jadier s B chromozómami detegovaná v listovom meristéme a poslednom uzle (Karafiátová *et al.*, 2021). B chromozóm je konzistentne detegovaný v meristémoch, z ktorých sa vytvoria generatívne orgány a z väčšiny pletív je eliminovaný pravdepodobne mechanizmom totožným tomu v mnohoštetu *A. speltoides* (Ruban *et al.*, 2020; Karafiátová *et al.*, 2021).

Cytogenetické štúdie zohrávajú nesmierne dôležitú úlohu vo výskume B chromozómov, ale len molekulárne štúdie, ako je sekvenovanie, sú nástrojom, ktoré môžu poskytnúť rozšírené poznatky o génovom obsahu, pôvode a evolúcii (Bednářová *et al.*, 2021). Hoci B chromozómy boli objavené u piatich druhov rodu *Sorghum*, cirok *S. purpureo-sericeum* predstavuje jediný druh, u ktorého je znalosť nadpočetného chromozómu na sekvenčnej úrovni. Karafiátová *et al.* (2021) poskytli prvé informácie o sekvencii B chromozómu a o jeho veľkosti, ktorú odhadli na 421 Mb. Analýza sekvencie odhalila prítomnosť B-špecifického DNA transpozónu/hAT, dlhého rozptýleného jadrového elementu (LINE) a tandemové repetície (satelity) boli taktiež identifikované. S úmyslom sledovať B chromozóm *in situ*, na základe vybraných repetitívnych sekvencií boli vyvinuté spoľahlivé PCR a cytogenetické markery špecifické pre B chromozóm *S. purpureo-sericeum*.

4 MATERIÁL A METÓDY

4.1 Biologický materiál

Pre experiment boli použité rastliny druhu *Sorghum purpureo-sericeum*; jedinci diploidného kultivaru nesúci B chromozómy ($2n=2x=10+B$) (získaný z ICRISAT; položka IS 18947) a ich F1 potomstvo jedincov označených ako 541, 571, 577, 578 premnožených na ÚEB AV ČR. Zoznam jedincov použitých v experimentoch je uvedený v tab. 1. Rastliny boli pestované vo fytotrone v režimu 10 h/deň (29 °C) a 14 h/noc (25 °C) pri vlhkosti 60 %.

Tabuľka 1 Zoznam rastlín druhu *Sorghum purpureo-sericeum* použitých v experimentoch a informácie o prítomnosti B chromozómu

Generácia	Jedinec	B status	Generácia	Jedinec	B status
F0	578	B+	F0	571	B+
F1 578	578_1	B+	F1 571	571_1	B0
	578_2	B+		571_2	B+
	578_3	B+		571_3	B+
	578_6	B0		571_4	B0
	578_7	B+		571_5	B+
	578_8	B+		571_6	B+
	578_9	B0			
	578_10	B+			
	578_11	B0			
	578_12	B+			
	578_13	B+			
Generácia	Jedinec	B status	Generácia	Jedinec	B status
F0	541	B+	F0	577	B+
F1 541	541_1	B+	F1 577	577_1	B+
	541_2	B0		577_4	B0
	541_3	B+			

4.2 Použité chemikálie a roztoky

Použité chemikálie

- Agaróza (Sigma-Aldrich, kat. č. A9539)
- Bromfenolová modra (Sigma-Aldrich, kat. č. B0126)
- Cresol Red (Sigma-Aldrich, kat. č. P5631)
- 2'-Deoxyadenosin 5'-trifosfát (dATP) 100 mM (Sigma-Aldrich, kat. č. D4788-25UMO)
- 2'-Deoxycytidin 5'-trifosfát (dCTP) 100 mM (Sigma-Aldrich, kat. č. D4913-25UMO)
- 2'-Deoxyguanosin 5'-trifostát (dGTP) 100 mM (Sigma-Aldrich, kat. č. D5038-25UMO)
- 2'-Deoxythymidin 5'-trifosfát (dTTP) 100 mM (Sigma-Aldrich, kat. č. T9656-25UMO)
- Dihydrát disodnej soli kyseliny ethylendiamintetraoctovej (Sigma-Aldrich, kat. č. E5134)
- Dodecylsulfát sodný (SDS) (Sigma-Aldrich, kat. č. 817034)
- Ethidium bromid (Sigma-Aldrich, kat. č. E8751)
- Gene Ruler 100 bp DNA Ladder (Fermentas, kat. č. SM0321)
- Glycerol (Sigma-Aldrich, kat. č. G5516)
- Kyselina boritá (Lach-Ner, kat. č. 10017-AP0)
- Sacharóza (Lach-Ner, kat. č. 40135)
- *Taq* DNA polymeráza a pufr pre *Taq* polymerázu (New England Biolabs, kat. č. M0273L)
- Tris base (Sigma-Aldrich, kt. č. 77-86-1)
- Xylencyanol (Sigma-Aldrich, kat. č. X4126)

Použité kity

- Monarch® Genomic DNA purification kit (New England Biolabs, kat. č. T3010S)
- NucleoSpin Plant II kit (Macherey-Nagel, kat. č. 740770)
- Phire Plant Direct PCR Master Mix kit (ThermoFisher Scientific, kat. č. F160S)

Použité roztoky a ich príprava

- 0,05% Cresol Red (100 ml): odvážiť 50 mg Cresol Red a 7,5 g sacharózy a za stáleho miešania a zahrievania na 50 °C rozpustiť v 100 ml destilovanej vode. Po rozpustení prefiltrovať cez 0,2µm filter a rozpipetovať po 1 ml do 1,5ml mikroskúmaviek
- 0,5M EDTA (1 l): 186,1 g dihydrátu disodnej soli ethylendiaminotetraoctovej kyseliny rozpustiť v 800 ml destilovanej vode, doplniť do 1 l a upraviť pH na 8
- 5x TBE pufr (1 l): rozpustiť vo vode 54 g Tris base a 27,5 g kyseliny boritej, pridať 20 ml 0,5M EDTA, doplniť destilovanou vodou do 1 l a upraviť pH na 8
- 0,5x TBE pufr (1 l): zmiešať 100 ml 5x TBE pufru a 900 ml destilovanej vody
- 6x STOP C (10 ml): odvážiť 5 mg bromfenolovej modrej a 5 mg xylencyanolu, pridať 2 ml 0,5M EDTA, 5 ml 42,5% glycerolu, 1 ml 1% SDS, doplniť vodu do 10 ml
- Marker molekulovej hmotnosti (520 µl): zmiešať 20 µl GeneRuler 100 bp, 200 µl 6x STOP C a 300 µl vody, svortexovať
- Roztok ethidium bromid (1 l): v 100 ml destilovanej vode rozpustiť 50 g ethidium bromidu, doplniť destilovanou vodou do 1 l

4.3 Zoznam použitých prístrojov a zariadení

- Centrifúga Mega Star 600R (VWR International)
- Elektroforetická horizontálna aparátúra Owl A6 (ThermoFisher Scientific)
- Laboratórna váha ViBRA AJ-820CE (Shinko Denshi)
- Lyofilizátor CoolSafe s vákuovou pumpou VacSafe (LaboGene)
- Oscilačný mlyn MM301 (Retsch)
- Spektrofotometer NanoDrop One/One^C Microvolume UV-Vis (ThermoFisher Scientific)
- Stolná centrifúga MiniStar silverline (VWR International)
- Thermal mixer (ThermoFisher Scientific)
- Thermocycler C1000 touch (Bio-Rad)
- Thermocycler Mastercycler (Eppendorf 5333)
- UV transluminátor InGenius3 (Syngene)
- Vodná kúpeľ SUB6 (Grant Instruments)
- Vortex REAX Top (Heidolph)

- Zdroj elektrického napätia Consort E122 (Sigma-Aldrich)

4.4 Použité experimentálne a vyhodnocovacie postupy

4.4.1 Izolácia genómovej DNA *Sorghum purpureo-sericeum*

Genómová DNA bola izolovaná z klasov vybraných jedincov druhu *Sorghum purpureo-sericeum* (tab. 1). Klasy boli sušené v lyofilizátore po dobu 24 h a následne homogenizované za pridania sklenených guľčiek v mlynčeku (3 minúty, 27 otáčok/s). Izolácia DNA bola prevedená pomocou NucleoSpin Plant II kitu podľa protokolu výrobcu. Koncentrácia vyizolovanej DNA sa stanovila spektrofotometricky pomocou prístroja NanoDrop.

4.4.2 Navrhnutie B-špecifických primerov

Celkovo bolo navrhnutých 29 párov primerov v troch následných setoch. Navrhnutie oligonukleotidov cieľilo na nízkokópiové sekvencie špecifické pre B chromozóm identifikované v publikovanej genómovej sekvencii B-pozitívnych rastlín druhu *S. purpureo-sericeum* (Karafiátová *et al.*, 2021). Prvé dve sady desiatich párov primerov boli navrhnuté na sekvencie identifikované ako B-špecifické na základe porovnania sekvencie rastliny nesúcej B chromozóm a bez B chromozómu. Pre navrhnutie posledných deviatich párov boli použité génové lokusy identifikované na základe transkriptomu embrya. Primery boli navrhnuté pomocou online softwaru Primer3 (Koressaar *et al.*, 2007; Untergasser *et al.*, 2012). Sekvencie všetkých primerov sú uvedené v prílohe (príloha 1).

4.4.3 Testovanie špecificity primerov navrhnutých pre B chromozóm v štandardnej PCR reakcii

Špecificita primerov bola otestovaná pomocou polymerázovej reťazovej reakcie (PCR). Objem reakčnej zmesi jednej reakcie činil 25 μ l a obsahoval 1x koncentrovaný pufr pre *Taq* Polymerázu (New England Biolabs), 1 U *Taq* DNA polymerázy (New England Biolabs), 0,2 mM zmesi neznačených nukleotidov, 50 ng genómovej DNA, R a F primery, každý o koncentrácii 0,5 μ M, 1x koncentrované farbivo Cresol Red a destilovanú vodu do 25 μ l. Amplifikácia produktov prebiehala za nasledujúcich podmienok (vid' tab.2):

Tabuľka 2 Podmienky PCR reakcie pre testovanie primerov. Teploty nasadania pre konkrétne markery sú uvedené v prílohe 1

Proces	Teplota [°C]	Čas	Počet cyklov
Úvodná denaturácia	94	10 min	
Denaturácia	94	30 s	
Nasadanie primerov	60–62	30 s	34
Extenzia	72	60 s	
Záverečná extenzia	72	10 min	

Výsledné produkty boli skontrolované elektroforézou v 1,2% agarózovom gélu v 0,5x TBE pufru.

4.4.4 Testovanie primerov metódou Direct PCR

Direct PCR je modifikácia PCR reakcie určená pre vzorky s obmedzeným množstvom pletiva. Templát v reakcii nie je izolovaná genómová DNA, ale hrubý lyzát, ktorý vzniká hneď v prvom kroku protokolu. Tento variant je veľmi efektívny pretože úplne odpadá práca s izoláciou DNA.

Lyzáty boli pripravené z prašníkov rastlín uvedených v tab.1. Objem reakčnej zmesi jednej reakcie bol 10 µl. Podľa protokolu odporúčaného výrobcom Phire Plant Direct PCR Master Max kitu reakcia obsahovala 1x Phire Plant Direct PCR Master Mix, R a F primery, každý o koncentrácii 0,5 µM (príloha 1), 0,5 µl lyzátu DNA a destilovanú vodu do 10 µl. Amplifikácia produktov prebiehala za špecifických podmienok uvedených výrobcom kitu (vid' tab. 3):

Tabuľka 3 Podmienky Direct PCR reakcie pre testovanie primerov

Proces	Teplota [°C]	Čas	Počet cyklov
Úvodná denaturácia	98	5 min	
Denaturácia	98	5 s	
Nasadanie primerov	63	5 s	36
Extenzia	72	30 s	
Záverečná extenzia	72	2 min	

Výsledné produkty boli skontrolované elektroforézou v 1,2% agarózovom gélu v 0,5x TBE pufru.

4.4.5 Izolácia DNA *Sorghum purpureo-sericeum* pomocou kitu pre malé množstvo pletiva

Ďalším variantom pre prácu s pletivami s limitovanou veľkosťou sú izolačné kity upravené na nižšie vstupné množstvo materiálu oproti klasickým izolačným kitom. Jedna z aplikácií odvodených markerov bola detekcia B chromozómu v embryu a endosperme, na základe čoho, bol použitý práve kit na izoláciu z malého množstva pletiva.

Templátom pre izoláciu DNA bol opäť bunkový lyzát, ktorý sa pripravil v prvej časti izolácie podľa inštrukcií odporúčaných výrobcom. Bunkové lyzáty boli pripravené z embrya a endospermu jedincov línie 578. Embryo a endosperm z vyvíjajúcich sa semien rastlín F1 populácie 578 boli oddelené a zvlášť zmrazené v tekutom dusíku a rozdrvené pomocou malého plastového tĺčiku. K vzniknutému homogenátu bol pridaný lyzačný pufr a proteináza K. Protokol je primárne optimalizovaný pre izoláciu zo živočíšnych pletív. Pre použitie u rastlín bola potrebná modifikácia: predĺžiť čas inkubácie na 3 hodiny a použiť maximálne doporučené množstvo proteinázy K (10 µl). Izolácia DNA bola prevedená pomocou Monarch® Genomic DNA purification kitu podľa protokolu výrobcu. Elúcia bola prevedená do 35 µl elučného pufru a koncentrácia vyzolovanej DNA sa stanovila spektrofotometricky pomocou prístroja Nanodrop.

5 VÝSLEDKY

5.1 Izolácia genómovej DNA

Z klasov použitých v experimentoch (tab. 1) bola vyizolovaná DNA. Zoznam koncentrácií DNA jednotlivých jedincov je uvedený v tab. 4. V experimentoch sa pracovalo vždy s vybraným setom rastlín.

Tabuľka 4 Výsledné koncentrácie vyizolovanej genómovej DNA použitých rastlín *Sorghum purpureo-sericeum*

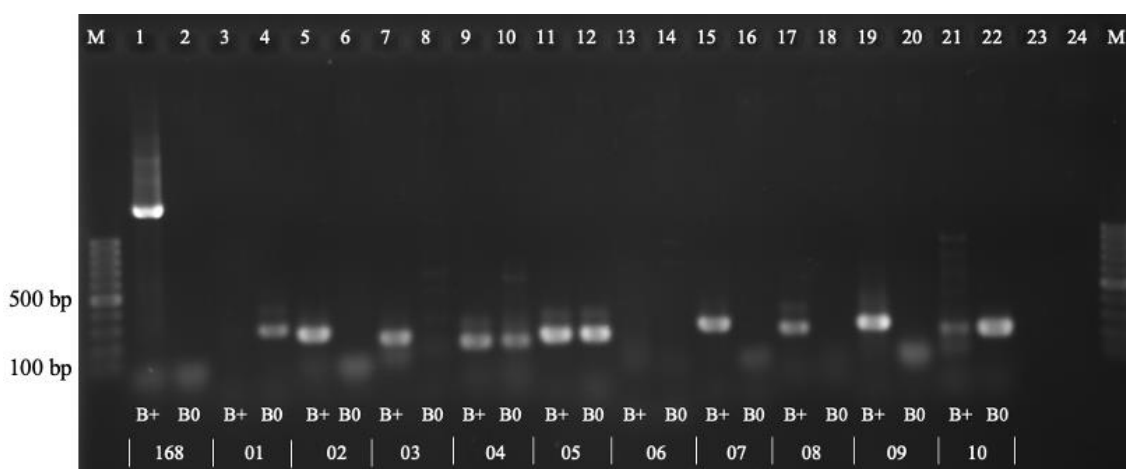
Generácia	Jedinec	B status	Koncentrácia [ng/μl]	Generácia	Jedinec	B status	Koncentrácia [ng/μl]
F0	578	B+	174,8	F0	571	B+	163,1
F1 578	578_1	B+	171,8	F1 571	571_1	B0	23,8
	578_2	B+	220,8		571_2	B+	30,8
	578_3	B+	448,3		571_3	B+	21,7
	578_6	B0	19,6		571_4	B0	28,2
	578_7	B+	160,8		571_5	B+	143,9
	578_8	B+	229,2		571_6	B+	160,8
	578_9	B0	124,4				
	578_10	B+	138,7				
	578_11	B0	136,6				
	578_12	B+	51,7				
578_13	B+	144,1					
Generácia	Jedinec	B status	Koncentrácia [ng/μl]	Generácia	Jedinec	B status	Koncentrácia [ng/μl]
F0	541	B+	142,2	F0	577	B+	153,9
F1 541	541_1	B+	77,1	F1 577	577_1	B+	97,4
	541_2	B0	15,4		577_4	B0	109,2
	541_3	B+	30,7				

5.2 Overenie špecifickosti primerov pre B chromozóm ciroku

5.2.1 Testovanie primerov navrhnutých na sekvencie vzišlé z komparatívnej analýzy sekvencií B+ x B0 rastlín

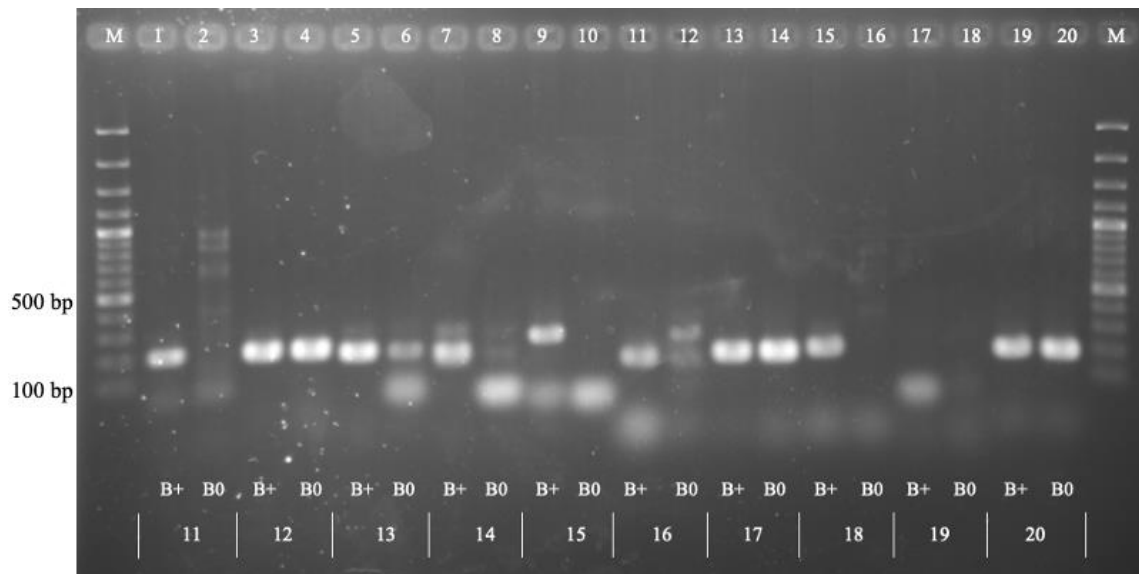
Pre B chromozóm *Sorghum purpureo-sericeum* bolo najprv navrhnutých 20 (2 x 10) párov primerov na základe sekvencií pochádzajúcich z rastlín 578. Významná miera cudzoprašnosti u druhu *S. purpureo-sericeum* je príčinou značne heterogenného genómu. Jednotliví jedinci sú heterozygotní a existuje veľký polymorfizmus aj v rámci populácii. Testovanie špecifickosti markerov bolo preto cielené primárne na potomkov jednej rastliny F0 578.

Špecifickosť prvých desiatich navrhnutých markerov (01–10) bola testovaná na genómovej 578 F0 B+ DNA a B0 DNA PCR reakciou a produkty boli skontrolované elektroforézou v agarózovom gélu (obr. 7). Prítomnosť PCR produktov odpovedajúcej dĺžky u markerov 02, 03, 07, 08, 09 výhradne vo vzorkách B+ DNA naznačuje ich špecifickosť pre B chromozóm. Ostatné páry primerov nevykazovali špecifickú amplifikáciu. Marker 168 slúžil ako pozitívna kontrola.



Obrázok 7 Elektroforéza PCR produktov prvých desiatich párov primerov (01, 02, 03, 04, 05, 06, 07, 08, 09, 10) testovaných na 578 F0 B+ DNA a B0 DNA. Marker 168 – pozitívna kontrola; M – GeneRuler 100 bp DNA Ladder

Druhý set desiatich párov markerov bol otestovaný za rovnakých podmienok na totožnej B+ a B0 DNA (obr. 8). Amplifikácia párov primerov 14, 15 a 18 výlučne vo vzorke B+ DNA indukuje ich špecifickosť. Na základe amplifikácie vo vzorke B+ aj B0 DNA boli markery 11, 12, 13, 16, 17 a 20 označené ako nešpecifické. Marker 19 sa neamplifikoval v B+ DNA ani v B0 DNA, jeho špecifickosť teda nie je možné hodnotiť.



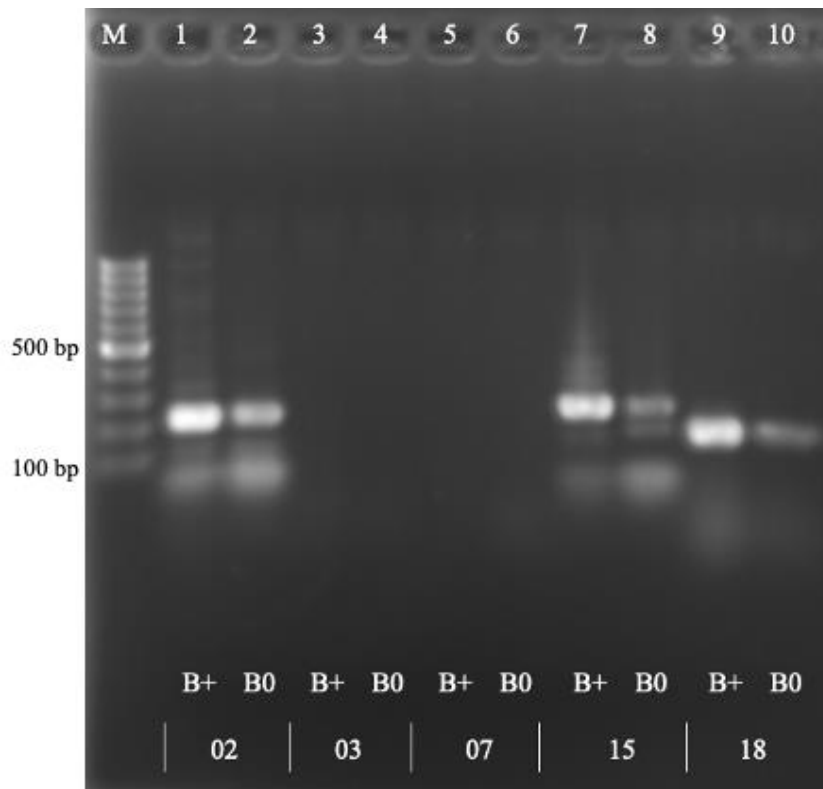
Obrázok 8 Elektroforéza PCR produktov desiatich párov primerov (11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20) testovaných na 578 F0 B+ DNA a B0 DNA. M – GeneRuler 100 bp DNA Ladder

Prvé experimenty odhalili sadu 8 markerov, ktoré boli špecifické pre B chromozóm v línii 578. Cieľom experimentu bolo ale odvodiť čo najviac spoľahlivé a robustné markery, ktorých použitie nebude obmedzené iba na jednu líniu. Rovnaký set 20 markerov bol preto ďalej otestovaný aj na ďalších troch líniah F0 577, 571 a 541. Z 20 testovaných párov primerov, 8 z nich (02, 03, 07, 08, 09, 14, 15, 18), vykazovalo špecifickosť aj medzi jednotlivými líniami F0 generácie. Elektroforetogramy týchto líní nie sú priložené a výsledky sú zhrnuté v nasledujúcej tabuľke (tab. 5).

Tabuľka 5 Špecifickosť párov primerov 01–20 na F0 generácii rastlín použitých v experimentu

	578	577	571	541
01	x	x	x	x
02	✓	✓	✓	✓
03	✓	✓	✓	✓
04	x	x	x	x
05	x	x	x	x
06	x	x	x	x
07	✓	✓	✓	✓
08	✓	✓	✓	✓
09	✓	✓	✓	✓
10	x	x	x	x
11	x	x	x	x
12	x	x	x	x
13	x	x	x	x
14	✓	✓	✓	✓
15	✓	✓	✓	✓
16	x	✓	x	✓
17	x	✓	x	✓
18	✓	✓	✓	✓
19	x	✓	x	✓
20	x	x	x	x

Vzhľadom k zámeru použiť odvodené markery pre rýchly skrining endospermu, bolo ďalším krokom otestovanie špecifických markerov v prostredí Direct PCR, ktorej reakčné podmienky sú vzhľadom k povahe templátovej DNA výrazne voľnejšie a sú vhodné naozaj iba pre vysoko špecifické markery. Na základe navrhnutia všetkých párov primerov na rovnakom princípe, v rámci ďalšej fáze experimentu bol ich výber zúžený na päť, ktoré boli následne otestované v prostredí Direct PCR na potomkoch 578_1 F1 B+ DNA a 578_6 F1 B0 DNA. Páry primerov 02, 15 a 18 neboli špecifické, pretože každý sa amplifikoval vo vzorke B+ aj B0 DNA. Neprítomnosť PCR produktov 03 a 07 vo vzorke B+ DNA naznačuje na nevhodné podmienky pre vznik produktu. Keďže program pre amplifikáciu produktov v rámci Direct PCR je pevne stanovený výrobcom a neumožňuje modifikáciu, nie je možné stanoviť špecifickosť týchto markerov. Žiadny z testovaných 5 markerov tak nebol preukázaný za špecifický v podmienkach Direct PCR (obr. 9).

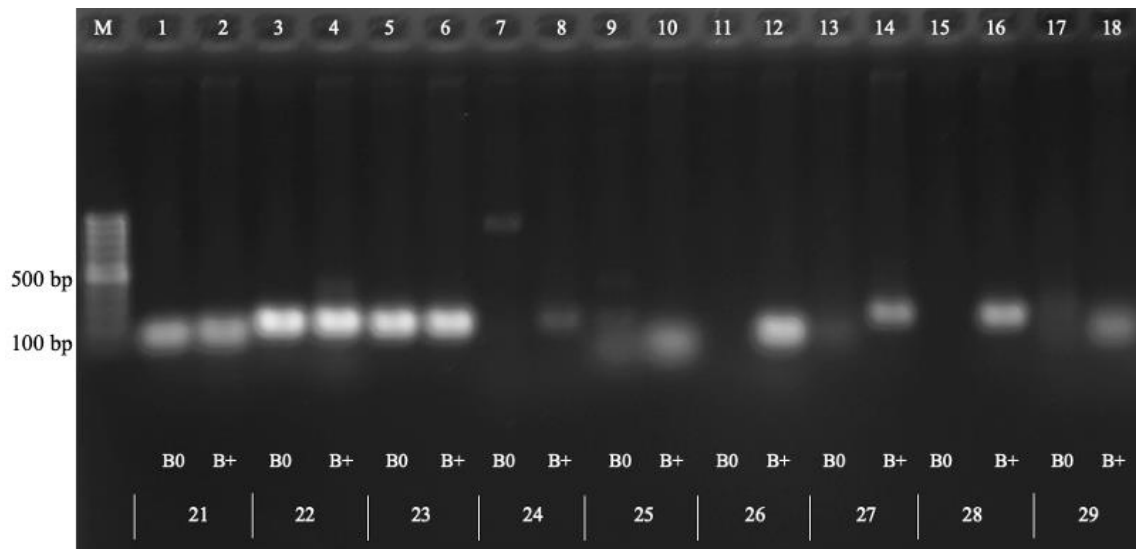


Obrázok 9 Elektroforéza PCR produktov Direct PCR piatich párov primerov (02, 03, 07, 15, 18) testovaných na 578_1 F1 B+ DNA a 578_6 F1 B0 DNA. M – GeneRuler 100 bp DNA Ladder

5.2.2 Testovanie primerov navrhnutých na génové oblasti vzišlé z transkriptomu B+ embrya

Vzhľadom na to, že z 5 testovaných párov primerov ani jeden nevykazoval špecifickosť v prostredí Direct PCR, bol navrhnutý ďalší set primerov – tentokrát na génové sekvencie identifikovaných v transkriptomických dátach embrya 578_1. V dôsledku toho, že špecifickosť primerov nebola vždy konzistentná medzi jednotlivými líniami, bola pozornosť smerovaná na líniu 578 a jej potomstvo.

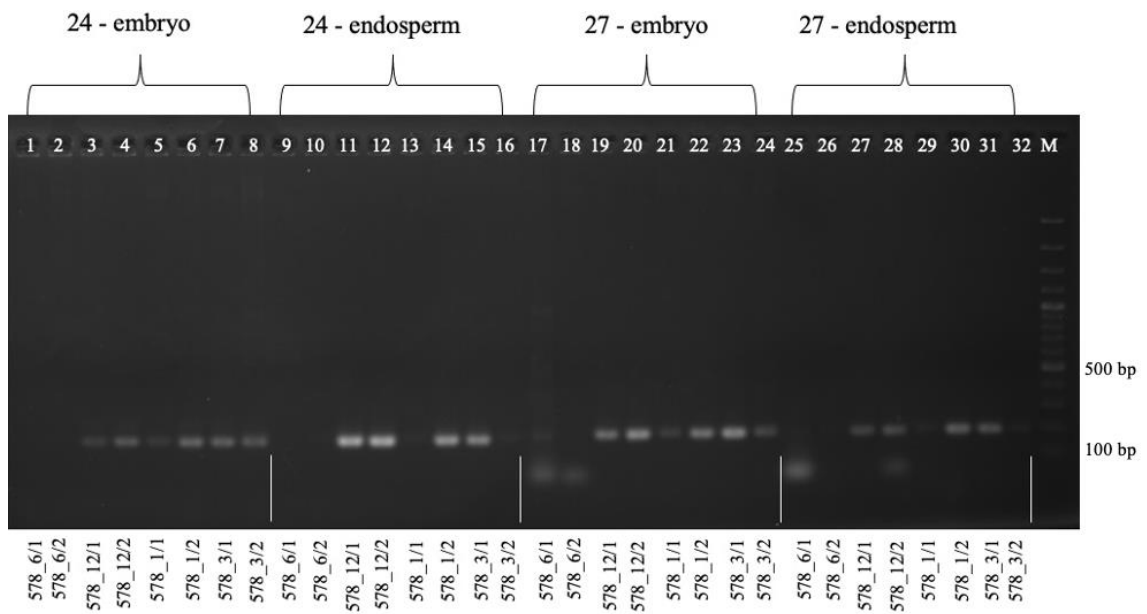
Špecifickosť navrhnutých párov primerov 21–29 bola otestovaná na genómovej 578_6 F1 B0 DNA a 578_1 B+ DNA PCR reakciou a produkty boli skontrolované elektroforézou v agarózovom gélu (obr. 10). Z testovaných primerov boli špecifické markery 24, 26, 27 a 28. U ostatných bol produkt detegovaný aj u B0 rastliny.



Obrázok 10 Elektroforéza PCR produktov deviatich párov primerov (21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29) testovaných na 578_6 F1 B0 DNA a 578_1 F1 B+ DNA. M – GeneRuler 100 bp DNA Ladder

Výsledných 5 párov primerov, ktoré vykazovali B špecifickosť, sa testovalo na ďalších jedincoch F1 populácii 578. Z 5 párov primerov sa medzi jedincami najviac špecifické javili 24 a 27 a tie boli otestované kitom pre Direct PCR. Bohužiaľ však ani tieto markery navrhnuté na génové lokusy neboli dostatočne robustné, aby fungovali v tomto prostredí špecificky.

Alternatívne boli preto tieto markery otestované na DNA izolovanej pomocou kitu Monarch® Genomic DNA purification kit pre pletivá s limitovanou veľkosťou, konkrétne DNA z embrya a endospermu F1 potomstva línie 578 pomocou PCR reakcie a produkty sa skontrolovali elektroforézou v aragózovom gélu (obr. 11). Amplifikácia produktov oboch párov primerov, 24 a 27, výlučne vo vzorkách B+ DNA F1 potomstva línie 578 naznačuje ich špecifickosť.



Obrázok 11 Elektroforéza PCR produktov dvoch párov primerov (24, 27) testovaných na embryu a endospermu F1 potomstva línií 578. M – GeneRuler 100 bp DNA Ladder

6 DISKUSIA

Táto práca sa venovala odvodzovaním PCR markerov špecifických pre B chromozóm ciroku *Sorghum purpureo-sericeum* a ich využitím pre selekciu B-pozitívnych jedincov. Detekciou B chromozómu za využitia PCR špecifických markerov sa zaoberali aj Fantinatti a Martins (2016), ktorí v rámci svojej práce navrhli špecifické PCR markery ktoré poskytli informácie o prítomnosti B chromozómu ryby *Astatotilapia latifasciata*. Na základe testovania získali dostatočne špecifické markery, vďaka ktorým dokázali vyselektovať B-pozitívnych jedincov, pričom výsledné markery vykazovali amplifikáciu dvoch fragmentov v B+ vzorkách a jedného fragmentu v kontrolných (B0) vzorkách (Fantinatti a Martins, 2016). V prípade tejto bakalárskej práce bola detekcia B chromozómu ciroku *Sorghum purpureo-sericeum* postavená na podobnom princípe.

Charakteristickou vlastnosťou B chromozómov je ich nemendelovská dedičnosť. V dôsledku nepravidelnosti v delení vzniká u niektorých druhov zaujímavý fenomén – prítomnosť chromozómu B je obmedzená len na určitý typ pletív. Jedným z príkladov je *Sorghum purpureo-sericeum*, ktorým sa zaoberá táto bakalárska práca. Darlington a Thomas (1941) v rámci svojej štúdie prišli k záveru, že výskyt B chromozómu *Sorghum purpureo-sericeum* je obmedzený len na generatívne orgány. Toto zistenie limituje vedcov v detekcii B chromozómu u potomstva. V súčasnej dobe sa k detekcii rastlín nesúcich B chromozóm používa cytometrický prístup, kedy je v histograme B-pozitívnych rastlín detegovaná extra populácia jadier nesúcich B chromozóm (Karafiátová *et al.*, 2021). Tento postup však určí status rodiča nie vznikajúcich potomkov. Preto sa v tejto práci smerovalo na možnosť jeho detekcie už v endosperme za využitia dostatočne špecifických markerov navrhnutých pre B chromozóm.

Detekcia B chromozómu v endosperme ciroku je možná v dôsledku non-disjunkcie v prvej peľovej mitóze, výsledkom ktorej sú dve spermatické bunky, obe nesúce B chromozóm, čo má za následok prítomnosť nadpočetného chromozómu v bunkách jednak embrya aj endospermu. Rovnaký model sa vyskytuje aj u raži a mnohoštetu *A. speltoides* (Hasegawa, 1934; Mendelson a Zohary, 1972). Naopak, v kukurici táto možnosť detekcie nie je realizovateľná, pretože dochádza k non-disjunkcii v druhej peľovej mitóze, kedy B chromozómy sú prítomné iba v jednej z dvoch spermatických buniek a táto bunka vo väčšine (75 %) prípadov oplodní vajíčko, z ktorého následne vzniká embryo nesúce B chromozómy, (Roman, 1947, Roman, 1948).

V endosperme, ktorý vznikne oplodnením druhou spermiou, sa potom B chromozóm nenachádza. Na základe tejto skutočnosti cirkularizuje sľubný model, u ktorého je možné detegovať B chromozómy už v endosperme a embryu, ktoré by vykazovalo prítomnosť týchto chromozómov je možné využiť v ďalších experimentoch.

Nevýhodou je však časová náročnosť prípravy biologického materiálu. Z toho dôvodu bolo ideálnym cieľom tejto práce získať špecifické markery navrhnuté pre B chromozóm, ktoré by fungovali aj v prostredí modifikovanej PCR reakcie takzvanej Direct PCR. Tento model je už rutinne používaný v kukurici siatej, kde je B chromozóm spoľahlivo detegovaný v listoch týždňových semenáčikov (Svačina *et al.*, v príprave). To sa však v rámci našich experimentov nepodarilo, pretože testované markery vykazovali špecifickosť iba v prípade, že templátom PCR reakcie bola genómová DNA. Ich nefunkčnosť v Direct PCR je pripisovaná nekvalitnej anotácii, na základe ktorej boli markery navrhnuté, taktiež s heterozygotnosťou genómov, ktorá je typickým problémom cudzosprašných druhov.

7 ZÁVER

Táto bakalárska práca sa zaoberala odvodzovaním PCR markerov špecifických pre B chromozóm ciroku *Sorghum purpureo-sericeum* a ich využitím pre detekciu B chromozómu v endosperme a následnú selekciu B-pozitívnych jedincov. Celkovo bolo navrhnutých 29 markerov a tie boli otestované pomocou metódy PCR za rôznych podmienok. Bohužiaľ, žiadny z markerov nevykazoval špecifickosť v podmienkach Direct PCR a túto rýchlu metódu teda nie je možné použiť pre skríning. V rámci testovania sa však podarilo získať 2 dostatočne špecifické PCR markery, 24 a 27, odvodené z génových oblastí. Použitie týchto markerov na DNA vyizolovanej kitom pre obmedzené množstvo materiálu je zástupnou alternatívou, ktorá rovnako dobre poslúži k detekcii B chromozómu v embryách či endospermoch.

8 LITERATÚRA

- Ananda, G.K.S.; Myrans, H.; Norton, S.L.; Gleadow, R.; Furtado, A.; Henry, R.J. (2020): Wild sorghum as a promising resource for crop improvement. *Frontiers Plant Science* 11, 1108.
- Banaei-Moghaddam AM, Schubert V, Kumke K, Weiß O, Klemme S, Nagaki K, Macas J, González-Sánchez M, Heredia V, Gómez-Revilla D, González-García M, Vega JM, Puertas MJ, Houben A. (2012): Nondisjunction in favor of a chromosome: the mechanism of rye B chromosome drive during pollen mitosis. *The Plant Cell* 24(10), 4124–4134.
- Bauerly E, Hughes SE, Vietti DR, Miller DE, McDowell W, Hawley RS. (2014): Discovery of supernumerary B chromosomes in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 196(4), 1007–1016.
- Battaglia, Emilio. (1964): Cytogenetics of B-Chromosomes. *Caryologia* 17 (1), 245–299.
- Bednářová M., Karafiátová M., Hříbová E. and Bartoš J. (2021): B chromosomes on Genus *Sorghum* (Poaceae). *Plants* 10(3).
- Birchler J. A. and Yang H. (2021): The supernumerary B chromosome of maize: drive and genomic conflict. *Open Biology* 11(11).
- Blavet N., Yang H., Su H., et al (2021): Sequence of the supernumerary B chromosome of maize provides insight into its drive mechanism and evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 118(23).
- Blunden R., Wilkes T. J., Forster J. W., Jimenez M. M., Sandery M. J., Karp A. and Jones R. N. (1993): Identification of the E3900 family, a second family of rye chromosome B-specific repeated sequences. *Genome* 36, 706–711.
- Borisov, Yu. M., (2008): Instability of B-chromosomes in somatic and germline cells of *Apodemus peninsulae*. *Russian Journal of Genetics* 44(8), 959–965.
- Camacho, JP (2005): B Chromosomes. *The Evolution of the Genome*. Elsevier 223–286.
- Camacho JP, Sharbel TF, Beukeboom LW. (2000): B-chromosome evolution. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 355(1394), 163–178.

- Carchilan M., Delgado M., Ribeiro T., et al. (2007): Transcriptionally Active Heterochromatin in Rye B chromosomes. *The Plant Cell* 19(6), 1738–1749.
- Carlson, W. (1978): The chromosome of corn. *Annual Review of Genetics* 12(1), 5–23.
- Chadalavada, K., Kumari, B.D.R. & Kumar, T.S. (2021): Sorghum mitigates climate variability and change on crop yield and quality. *Planta* 253(5), 113.
- Chen J., Birchler J. A. and Houben A. (2022): The non-Mendelian behavior of plant B chromosomes. *Chromosome Research*.
- Choi, H.-W., Lee, W.-K., Choi, E.-Y., Park, J.-H., & Bang, J.-W. (2004): Geographical distribution of cytotypes and genomic structures in natural populations of the *Scilla scilloides* complex in Korea. *Journal of Plant Biology*, 47(4), 322–329.
- D'Ambrosio U, Alonso-Lifante MP, Barros K, Kovařík A, Mas de Xaxars G, Garcia S. (2017): B-chrom: a database on B-chromosomes of plants, animals and fungi. *New Phytologist* 216(3), 635–642.
- Darlington C. D. and Thomas P.T. (1941): Morbid mitosis and the activity of inert chromosomes in sorghum. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B - Biological Sciences* 130(859), 127–150.
- de Wet JMJ, Huckabay, J. P. (1967): The origin of *Sorghum bicolor*. II. Distribution and domestication. *Evolution* 21(4), 787–802.
- Dillon, S. L., P. K. Lawrence, R. J. Henry, L. Ross, H. J. Price a Johnston J. S. (2004): *Sorghum laxiflorum* and *S. macrospermum*, the Australian native species most closely related to the cultivated *S. bicolor* based on ITS1 and *ndhF* sequence analysis of 25 *Sorghum* species. *Plant Systematics and Evolution* 249(3-4), 233–246.
- Dos Santos LP, Francisco CM, Campos Júnior EO, Castro JP, Utsunomia R, Morelli S, Porto-Foresti F, Foresti F, Artoni RF. (2021): Chromosomal Instability and Origin of B Chromosomes in the Amazonian Glass Tetra *Moenkhausia oligolepis* (Günther, 1864) (Characiformes, Characidae). *Cytogenetic and Genome Research* 161(5), 249–256.
- Endo T. R., Nasuda S., Jones N., et al. (2008): Dissection of rye B chromosomes, and nondisjunction properties of the dissected segments in a common wheat background. *Genes & Genetic Systems* 83(1), 23–30.

- Espitia-Hernández P., Chávez González M.L., Ascacio-Valdés J.A., Dávila-Medina D., Flores-Naveda A., Silva T., Ruelas Chacón X. & Sepúlveda L. (2020): Sorghum (*Sorghum bicolor* L.) as a potential source of bioactive substances and their biological properties, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 62(8), 2269–2280.
- Fantinatti, Bruno E. A. a Martins, Cesar (2016): Development of chromosomal markers based on next-generation sequencing: the B chromosome of the cichlid fish *Astatotilapia latifasciata* as a model. *BMC Genetics* 17(1), 119.
- Green DM. (2004): Structure and evolution of B chromosomes in amphibians. *Cytogenetic and Genome Research* 106(2–4), 235–242.
- Hao H, Li Z, Leng C, Lu C, Luo H, Liu Y, Wu X, Liu Z, Shang L, Jing HC. (2021): Sorghum breeding in the genomic era: opportunities and challenges. *Theoretical and Applied Genetics* 134(7), 1899–1924.
- Hasegawa, Nobumi. (1934): A Cytological Study on 8-Chromosome Rye. *Cytologia* 6(1), 68–77.
- Hariprasanna K., Patil J. V. (2015): Sorghum: Origin, classification, biology and improvement. *Sorghum molecular breeding*. Eds. Madhusudhana R., Rajendrakumar P., Patil J. V. 3–20.
- Hewitt Godfrey M.. (1976): Meiotic drive for B-chromosomes in the primary oocytes of *Myrmeleotettix maculatus* (Orthopera: Acrididae). *Chromosoma*. 56(4), 381–391.
- Houben A. (2017): B Chromosomes - A Matter of Chromosome Drive. *Frontiers Plant Science* 8, 210.
- Houben, A., Banaei-Moghaddam, A.M., Klemme, S. et al. (2014): Evolution and biology of supernumerary B chromosomes. *Cellular and Molecular Life Sciences* 71(3), 467–478.
- House L. R., 1985. *A Guide to Sorghum Breeding*. ICRISAT. (International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics) Patancheru, Andhra Pradesh, India.
- Huskins, C.L., Smith, S.G. (1934): A cytological study of the genus *Sorghum* pers. *Journ. of Genetics* 28(3), 387–395.
- Janaki-Ammal, E. K. (1940): Chromosome Diminution in a Plant. *Nature* 146(3713), 839–840.
- Jones RN (1995): B chromosomes in plants. *New Phytologist* 131,411–434.
- Jones, RN, Rees, H. (1982): *B chromosomes*. London: Academic Press.

- Jones RN, Viegas W, Houben A. (2008): A century of B chromosomes in plants: so what? *Annals of Botany* 101(6),767–775.
- Kaplan Z., Danihelka J., Chrtek J. jun., Kirschner J., Kubát K., Štech M. & Štěpánek J. (eds) (2002): Klíč ke květeně České republiky [Key to the flore of the Czech Republic]. Academia, Praha.
- Karafiátová M., Bednářová M., Said M., Čížková J., Holušová K., Blavet N. and Bartoš J. (2021): The B chromosome of *Sorghum purpureosericeum* reveals the first pieces of its sequence. *Journal of Experimental Botany* 72(5), 1606–1616.
- Koressaar T, Remm M (2007): Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics* 23(10), 1289–1291.
- Kuwada Y. (1925): On the number of chromosomes in maize. *Botanical Magazine Tokyo* 39, 227–234.
- Lamb, J. C., Han, F., Auger, D. L., and Birchler, J. A. (2006): A trans-acting factor required for non-disjunction of the B chromosome is located distal to the TB-4Lb breakpoint on the B chromosome. *Maize Genetics Cooperation Newsletter*. 80, 51–54.
- Lazarides M, Hacker JB Andrew MH (1991): Taxonomy, cytology and ecology of indigenous Australian sorghums (*Sorghum* Moench: *Andropogoneae*: *Poaceae*). *Australian Systematic Botany* 4, 591–635.
- Lewington, Anna. (2003): *Plants for people*. London: London: Eden Project Books.
- Lin B.-Y. (1978): Regional control of nondisjunction of the B chromosome in maize. *Genetics* 90, 613–627.
- Lindström J. (1965): Transfer to wheat of accessory chromosomes from rye. *hereditas* 54, 149–155.
- Longley AE. (1927): Supernumerary chromosomes in *Zea mays*. *Journal of Agricultural Research* 35,769–784.
- Martis, M. M., Klemme, S., Banaei-Moghaddam, A. M., Blattner, F. R., Macas, J., Schmutzer, T., Scholz, U., Gundlach, H., Wicker, T., Šimková, H., Novák, P., Neumann, P., Kubaláková, M., Bauer, E., Haseneyer, G., Fuchs, J., Doležel, J., Stein, N., Mayer, K. F., & Houben, A. (2012): Selfish supernumerary chromosome reveals its origin as a mosaic of host genome and organellar sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(33), 13343–13346.

- Mendelson, D. and Zohary D. (1972): Behaviour and transmission of supernumerary chromosomes in *Aegilops speltoides*. *Heredity* 29(3), 329–339
- Mestriner, C., Galetti, P., Valentini, S. et al. (2000): Structural and functional evidence that a B chromosome in the characid fish *Astyanax scabripinnis* is an isochromosome. *Heredity* 85(1), 1–9.
- Miao VP, Covert SF, VanEtten HD. (1991): A fungal gene for antibiotic resistance on a dispensable ("B") chromosome. *Science* 254(5039), 1773–1776.
- Nur. Uzi (1963): A mitotically unstable supernumerary chromosome with an accumulation mechanism in a grasshopper. *Chromosoma* 14(4), 407–422.
- Pansonato-Alves JC, Serrano É, Utsunomia R, Camacho JP, da Costa Silva GJ, Vicari MR, Artoni RF, Oliveira C, Foresti F. (2014): Single origin of sex chromosomes and multiple origins of B chromosomes in fish genus *Characidium*. *PLoS One* 9(9), e107169.
- Plants of the World Online. [online] [navštíveno 23.3.2022] Dostupné z <https://powo.science.kew.org>
- Price, H. J., Dillon, S. L., Hodnett, G., Rooney, W. L., Ross, L., & Johnston, J. S. (2005): Genome evolution in the genus *Sorghum* (Poaceae). *Annals of Botany*, 95(1), 219–227.
- Raman, V. S. and Deepa Krishnaswami (1960): "Accessory chromosomes in *Sorghum nitidum* Pers." *The Journal of Indian Botanical Society* 39.
- Raman, V. S., Meenakshi K. a Thangam M. S. (1976): Accessory Chromosomes and Their Meiotic Behaviour in Hybrids of Grain *Sorghum* and Johnson Grass. *Cytologia* 41(2), 193–200.
- Raman, V. S., Meenakshi, K., Thangam, M. S., & Sivagnanam, L. (1964): The cytogenetical behaviour of B-chromosomes in *Sorghum halepense*. *Madras Agricultural Journal*, 51, 72–73.
- Randolph LF. (1928): Types of supernumerary chromosomes in maize. *Anatomical Record* 41,102.
- Roman, H. (1947): Mitotic nondisjunction in the case of interchanges involving the B-type chromosome in Maize. *Genetics* 32(4), 391–409.
- Roman, H. (1948): Directed Fertilization in Maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 34(2), 36–2.

- Ruban, A., Schmutzer, T., Wu, D.D. et al. (2020): Supernumerary B chromosomes of *Aegilops speltoides* undergo precise elimination in roots early in embryo development. *Nature Communications* 11(1), 2764.
- Sandery M. J., Forster J. W., Blunden R., Jones R. N. (1990): Identification of a family of repeated sequences on the rye B-chromosome. *Genome* 33.
- Serrano ÉA, Utsunomia R, Scudeller PS, Oliveira C, Foresti F. (2017): Origin of B chromosomes in *Characidium alipioi* (Characiformes, Crenuchidae) and its relationship with supernumerary chromosomes in other *Characidium* species. *Comparative Cytogenetics* 11(1),81–95.
- Silva TN, Thomas JB, Dahlberg J, Rhee SY, Mortimer JC. (2021): Progress and challenges in sorghum biotechnology, a multi-purpose feedstock for the bioeconomy. *Journal of Experimental Botany* 73(3), 646–664.
- Sorghum Checkoff – Investing in Sorghum Profitability. [online] [navštíveno 25.4.2022] Dostupné z: <https://sorghumcheckoff.com>
- Stevens, J. P., and Bougourd, S. M. (1994): Unstable B-chromosomes in a European population of *Allium schoenoprasum* L. (Liliaceae). *Biological Journal of the Linnean Society* 52(4), 357–363.
- Svačina R., Hloušková L., Karafiátová M. and Bartoš J.: Scoring number of B chromosomes in *Zea mays* L. using droplet digital PCR assay. (rukopis v přípravě)
- Tamura, M. N. (1990): Biosystematic studies on the genus *Polygonatum* (Liliaceae). I. Karyotype analysis of species indigenous to Japan and its adjacent regions. *Cytologia*, 55(3), 443–466.
- Teruel, M., Cabrero, J., Perfectti, F. et al. (2010): B chromosome ancestry revealed by histone genes in the migratory locust. *Chromosoma* 119(2), 217–225.
- Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, Rozen SG. (2012): Primer3 - new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research* 40(15), e115.
- USDA Foreign Agricultural Service. [online] [navštíveno 29.10.2021] Dostupné z <https://www.fas.usda.gov>
- Valente Guilherme T., Matthew A. Conte, Bruno E.A. Fantinatti, Diogo C. Cabral-de-Mello, Robson F. Carvalho, Marcelo R. Vicari, Thomas D. Kocher, Martins C. (2018): Origin and Evolution of B Chromosomes in the Cichlid Fish *Astatotilapia latifasciata* Based on Integrated Genomic Analyses, *Molecular Biology and Evolution* 31(8),2061–2072.

- Vanamala JKP, Massey AR, Pinnamaneni SR, Reddivari L, Reardon KF. (2018): Grain and sweet sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) serves as a novel source of bioactive compounds for human health. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 58(17), 2867–2881.
- Ward E. J. (1973): Nondisjunction: localization of the controlling site in the maize B chromosome. *Genetics* 73, 487–391.
- Wu, Ta-Pen.(1992): B-chromosomes in *Sorghum stipoideum*. *Heredity* 68(5), 457–463.
- Wu, Ta-Pen (1978): Pachytene morphology of *Sorghum nitidum* chromosome complement. *Cytologia* 43(2), 433–440.
- Yoshida K, Terai Y, Mizoiri S, Aibara M, Nishihara H, Watanabe M, Kuroiwa A, Hirai H, Hirai Y, Matsuda Y, Okada N. (2011): B chromosomes have a functional effect on female sex determination in Lake Victoria cichlid fishes. *PLoS Genetics* 7(8), e1002203.

9 PRÍLOHY

Príloha 1 Zoznam navrhnutých primerov špecifických pre B chromozóm *Sorghum purpureo-sericeum*

	Primer	Sekvencie (5' – 3')	Veľkosť produktu [bp]	Teplota nasadenia primerov [°C]
01	tig132484_F tig132484_R	CCTACTACTCGGCCATCAGG GTTAGCCCAAAGGGGAGATG	240	60
02	tig00064641_F tig00064641_R	ATAGGAGGACGAGGTTGTG CCTTGCTACCAGAGCTGTCC	219	60
03	tig0032340_F tig0032340_R	ACCTTACCAATCACTGCAAGG CATAGGCTTTGCAACGGAGT	191	60
04	tig00074034_F tig00074034_R	TCCTTGGCAGCTTTTCTGAT GATCGAGGTGACGAAAGAGC	163	60
05	tig00025846_F tig00025846_R	AGGGAGCTGGCTAGCATTTT TAGTGACGGTCCCTTGGAGT	193	60
06	tig00183170_F tig00183170_R	GTGGGCATACTTCTCGTCGT CCTTGTCCTGGAAGTGGACT	155	60
07	tig00154980_F tig00154980_R	TCAGCCTGCTGCTTCTTACA AGGAACCAATCACTGCAAGG	246	60
08	tig00123827_F tig00123827_R	TTGCAATTAACACAATGAGCAG TTGGACTGTTCCGGTATTGA	207	60
09	tig125134_F tig125134_R	TTTGGTGACCTTCAAAACCA TGCCCTTACGTTGCAATACA	240	60
10	tig00050186_F tig00050186_R	CAGCTTTTTGTGTCCTGCTG GTTGGCAATCTATGCGGAAT	202	60
11	tig00179413_1F tig00179413_1R	ATGTACAGGCCAACGGAAAT GAGGAAGGCGAGCATCTG	231	60
12	tig00179413_2F tig00179413_2R	CGGTCGTGAATCGTGATGTA TGGTTATGTCCCTGATAGTAGGC	240	60
13	tig00179413_3F tig00179413_3R	TGTGAATATGATTACCTCCTGGT GAAACCACCGGCAATAAGAA	245	60
14	tig00025963_F tig00025963_R	CAGCCATGTCACGAAGTACC GGGAAAAAGAAGGATAAATGCAG	221	60

	Primer	Sekvence (5'– 3')	Veľkosť produktu [bp]	Teplota nasadania primerov [°C]
15	tig00076920_F	CGCGCAAGACAAGCCTACT	289	60
	tig00076920_R	GCGTTTCTGTTTTGGCAAGT		
16	tig00196121_F	CCATTAATGCAGGCCCTAAA	243	60
	tig00196121_R	TGAGGAGCTGCTTAGGTTGC		
17	tig00196212_F	CACGATCAGGAACTTCAGCA	252	60
	tig00196212_R	CAATGTGGCGTAATCACTGG		
18	tig00029617_F	ATGCTAAAGCACCGATTCGT	259	60
	tig00029617_R	ACTAATGCCAGCCATGTGAA		
19	tig00009278_F	GCAGCTCTGCCTGTAGGAAA	248	60
	tig00009278_R	TCATGCCATTTTACACTCCTG		
20	tig00124878_F	TGCATTGATCGAAGTCGAAG	267	60
	tig00124878_R	GAACCTAACCACCAGCAGGA		
21	utg5646_gene227940_1F	AGGATGTCATAGTACTCAGCTCC	151	62
	utg5646_gene227940_1R	GCAGCCAGGAATTACTAGAGC		
22	utg22491_gene112652_2F	TGCTGAAATTGGAGTGGTACT	120	62
	utg22491_gene112652_2R	TGGCTTGCCTGTTTCTTGATTA		
23	utg5450_gene22376_1F	TCCAATCCAATCTACTCCTCCC	171	62
	utg5450_gene22376_1R	ACTACTTTCCACCACATTAGCT		
24	utg312_gene155643_2Fa	AACAGCATTGCACACCGTTA	173	62
	utg312_gene155643_2Ra	GTTAGCGTTGCAACATGAGC		
25	utg312_gene155643_2Fb	GCATTGCACACCGTTATTCATCA	50	62
	utg312_gene155643_2Rb	CCATGTCCGGTCATTTTCCTTT		
26	utg15627_gene60894F	CGCGTACTCAGAGTGGAAC	109	62
	utg15627_gene60894R	CGACAGCTCTAGTATCGGCA		
27	utg5443_gene386712F	TTTCCAGCATAGACCCACT	193	62
	utg5443_gene386712R	TCCAAATAGCAGAGACAGGG		
28	utg312_gene155643_1F	CTGGGTCGATCTTGCAGT	180	62
	utg312_gene155643_1R	ACTAATTCAAACCCCTTGCCGA		
29	utg_5646_gene227940_2F	GCACGTTGGAGCTGCT	90	62
	utg_5646_gene227940_2R	TGCATTCACTGAAACATCG		