

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2022

Barbora Zpěváková

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Sekvenční analýza A a B chromozomální varianty
genu CENH3 u kukuřice**

Bakalářská práce

Barbora Zpěvákova

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: prezenční

Olomouc 2022

Vedoucí práce: Mgr. Radim Svačina, Ph.D.

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Akademický rok: 2020/2021

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Barbora ZPĚVÁKOVÁ**
Osobní číslo: **R19867**
Studijní program: **B1501 Biologie**
Studijní obor: **Molekulární a buněčná biologie**
Téma práce: **Sekvenční analýza A a B chromozomální varianty genu CENH3 u kukuřice**
Zadávající katedra: **Katedra buněčné biologie a genetiky**

Zásady pro vypracování

- Vypracování literární rešerše na téma CENH3 a B chromozomů kukuřice
- Amplifikace produktů A a B chromozomální varianty genu CENH3 pomocí PCR
- Sekvenování A a B chromozomální varianty genu CENH3
- Analýza a interpretace výsledků

Rozsah pracovní zprávy:

Rozsah grafických prací:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

1. Starkley MP, Elasarapu R (2001). Genomics protocols. *Methods in Molecular Biology*, 175.
2. Houben A, Jones N, Martins C, Trifonov V (2019). Evolution, Composition and Regulation of Supernumerary B Chromosomes. *Genes*, 10(2):161.
3. Houben A (2017). B Chromosomes –A Matter of Chromosome Drive. *Frontiers in Plant Science*, 8: 210.
4. Su H, Liu Y, Liu Y, Birchler JA, Han F (2018). The Behavior of the Maize B Chromosome and Centromere. *Genes*. 9(10):476.
5. Feng C, Yuan J, Bai H, Liu Y, Su H, Liu Y, Shi L, Gao Z, Birchler JA, Han F (2020). The deposition of CENH3 in maize is stringently regulated. *Plant J*, 102: 6-17.

Vedoucí bakalářské práce:

Mgr. Radim Svačina, Ph.D.

Katedra buněčné biologie a genetiky

Datum zadání bakalářské práce: 6. dubna 2021
Termín odevzdání bakalářské práce: 31. července 2022

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
KATEDRA BUNĚČNÉ BIOLOGIE A GENETIKY
Šlechtitelů 27, 783 71 Olomouc – Holice
tel.: +420 585 634 901

L.S.

-2-

25-03-2022

doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.
děkan

prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.
vedoucí katedry

V Olomouci dne 25. března 2022

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora: Barbora Zpěváková

Název: Sekvenční analýza A a B chromozomální varianty genu CENH3 u kukuřice

Typ práce: bakalářská

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

Vedoucí práce: Mgr. Radim Svačina, Ph.D.

Rok obhajoby: 2022

Klíčová slova: CENH3, B chromozomy, *Zea mays*, nondisjunkce

Počet stran: 42

Jazyk: čeština

Souhrn

Kukuřice setá (*Zea mays*) je významnou hospodářskou plodinou, která kromě deseti párů standardních chromozomů (A chromozomů) může nést i nadbytečné a postradatelné B chromozomy. B chromozomy jsou často označovány jako „parazitické“ elementy, jelikož na svého nositele obvykle mají negativní vliv. Aby nedocházelo k jejich ztrátám, vyvinuly si pro své zachování a akumulaci v populaci různé „drive“ mechanismy, kterými zvyšují pravděpodobnost přenosu do další generace. U B chromozomů kukuřice je nejdůležitějším drive mechanismem nondisjunkce sesterských chromatid během druhé pylové mitózy spojená s preferenčním oplozením vaječné buňky spermatickou buňkou nesoucí B chromozom(y). Pro správnou segregaci standardních chromozomů je nezbytná přítomnost centromerické varianty histonu H3 (CENH3), jejíž homologní varianta byla objevena na B chromozomu kukuřice.

Podstatou této práce bylo provedení sekvenční analýzy obou variant genu CENH3 za účelem srovnání jejich konzervovanosti u vybraných linií kukuřice seté. Bylo zjištěno, že A i B varianta genu CENH3 je u všech 40 zkoumaných linií kukuřice silně konzervována. Konzervovanost B varianty CENH3 by mohla znamenat její potenciální klíčovou roli při akumulačních mechanismech B chromozomů, možná i v samotné nondisjunkci.

Bibliographical identification

Author's first name and surname: Barbora Zpěváková

Title: Sequence analysis of A and B chromosomal variant of CENH3 gene in maize

Type of thesis: bachelor

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

Supervisor: Mgr. Radim Svačina, Ph.D.

The Year of Presentation: 2022

Keywords: CENH3, B chromosomes, *Zea mays*, nondisjunction

Number of pages: 42

Language: Czech

Summary

Maize (*Zea mays*) is an important agricultural crop which, in addition to ten pairs of standard chromosomes (A chromosomes), can also carry supernumerary and dispensable B chromosomes. B chromosomes are often referred to as 'parasitic' because in most cases they have negative effect on their host. To prevent their loss and to preserve and accumulate in population, they evolved various drive mechanisms increasing the probability of transmission to the next generation. In maize, the most significant drive mechanism of B chromosomes is the nondisjunction of sister chromatids coupled with preferential fertilization of the egg cell by the sperm carrying B chromosome(s). For proper segregation of standard chromosomes, a presence of a centromeric histone H3 (CENH3) is essential. A homologous variant of CENH3 has been discovered in maize B chromosome.

The main purpose of this study was to perform sequence analysis of both CENH3 variants to compare their conservation in selected maize lines. The A and B variants of CENH3 were found to be strongly conserved across all 40 maize lines that were studied. The conserved nature of the B variant of CENH3 could indicate its possible crucial role in the accumulation mechanisms of B chromosomes, potentially in nondisjunction itself.

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

V Olomouci dne.....

.....

Tímto bych ráda poděkovala svému vedoucímu práce, Mgr. Radimu Svačínovi, Ph.D., za veškerou pomoc, odborné vedení, věnovaný čas a všechny cenné rady, které mi během tvorby této práce poskytoval. Mé poděkování patří také zaměstnancům Ústavu experimentální botaniky AV ČR, převážně paní Ing. Marii Seifertové, kteří mi s vypracováním práce pomohli. Dále děkuji své rodině, příteli a přátelům za podporu během mého studia na Univerzitě Palackého v Olomouci.

OBSAH

1	ÚVOD	1
2	CÍLE PRÁCE	2
3	LITERÁRNÍ PŘEHLED	3
3.1	Kukuřice setá (<i>Zea mays</i> L.)	3
3.1.1	Pěstování kukuřice	4
3.1.2	Hospodářský význam	5
3.1.3	Genom	5
3.2	B chromozomy	6
3.2.1	Morfologie a molekulární struktura	7
3.2.2	Funkce	8
3.2.3	Dědičnost	9
3.3	B chromozomy kukuřice	9
3.3.1	Akumulační mechanismy B chromozomu kukuřice seté	9
3.3.2	Morfologie a molekulární charakter B chromozomu kukuřice seté	11
3.4	CENH3	12
4	MATERIÁL A METODY	15
4.1	Biologický materiál	15
4.2	Použité chemikálie, soupravy a roztoky	15
4.2.1	Použité chemikálie a enzymy	15
4.2.2	Použité kity	17
4.2.3	Použité roztoky a jejich příprava	17
4.3	Seznam použitých přístrojů a zařízení	17
4.4	Postupy experimentálních a vyhodnocovacích metod	18
4.4.1	Izolace DNA	18
4.4.2	PCR amplifikace	18
4.4.3	Elektroforetická separace produktů PCR amplifikace	19

4.4.4	ExoSAP přečištění PCR produktů.....	19
4.4.5	Sekvenační reakce	20
4.4.6	Přečištění produktů sekvenační reakce a sekvenování.....	21
4.4.7	Analýza dat.....	21
5	VÝSLEDKY	22
5.1	Izolace DNA	22
5.2	PCR amplifikace a agarózová elektroforéza	22
5.3	Sekvenční analýza	23
6	DISKUZE.....	25
7	ZÁVĚR.....	27
8	LITERATURA.....	28

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Samčí a samičí květenství kukuřice seté	3
Obrázek 2: Srovnání klasu teosintu a dnešní kukuřice seté	4
Obrázek 3: Schematický nákres nondisjunkce B chromozomu kukuřice	10
Obrázek 4: Schematický nákres preferenčního oplození	11
Obrázek 5: Schematický nákres B chromozomu kukuřice	12
Obrázek 6: Elektroforeogram PCR produktů A varianty CENH3 u kukuřice	23
Obrázek 7: Elektroforeogram PCR produktů B varianty CENH3 u kukuřice	23

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Linie kukuřice seté obsahující B chromozom použité pro experiment.....	15
Tabulka 2: Přehled používaných amplifikačních a sekvenačních primerů	16
Tabulka 3: Složení PCR reakční směsi pro 1 vzorek	18
Tabulka 4: Podmínky PCR amplifikace A chromozomální varianty genu CENH3	19
Tabulka 5: Podmínky PCR amplifikace B chromozomální varianty genu CENH3	19
Tabulka 6: Složení ExoSAP reakční směsi pro 1 vzorek.....	20
Tabulka 7: Časový a teplotní profil ExoSAP reakce.....	20
Tabulka 8: Složení směsi pro sekvenační reakci.....	20
Tabulka 9: Časový a teplotní profil sekvenační reakce.....	21
Tabulka 10: Přehled polymorfismů nalezených u A chromozomální varianty genu CENH3 .	24

1 ÚVOD

Kukuřice setá (*Zea mays* L.) je jednoděložná rostlina z čeledi lipnicovitých (*Poaceae*). Je jednou z nejvýznamnějších a celosvětově nejpěstovanějších hospodářských plodin. Kukuřice je schopna adaptace na různá podnebí, lze ji pěstovat jak v mírném, tak tropickém pásu. O téměř dvě třetiny celosvětové roční produkce se zasluhují Spojené státy americké, Čína a Brazílie. Kukuřice se nejvíce využívá jako krmivo pro hospodářská zvířata, menší podíl je využit k lidské potřebě a konzumaci.

Kukuřice setá je diploid nesoucí 20 autozomů ($2n = 2x = 20$), její genom je až z 85 % tvořen transponovatelnými elementy. Kromě obvyklé sady chromozomů mohou některé zplanělé druhy kukuřice nést ve svém genomu tzv. B chromozomy. B chromozomy jsou nadpočetné postradatelné elementy, jež na svého nositele mají obvykle negativní vliv. Jejich přenos do potomstva nepodléhá pravidlům Mendelovské dědičnosti. Pro své zachování a akumulaci v populaci si vyvinuly různé „drive“ mechanismy, díky kterým zvyšují pravděpodobnost svého přenosu do následující generace. U kukuřice je nejvýznamnějším drive mechanismem nondisjunkce sesterských chromatid během druhé pylové mitózy následovaná preferenčním oplozením vajíčka spermatickou buňkou obsahující B chromozomy. Při procesu nondisjunkce hraje významnou roli centromera a distální část dlouhého raménka B chromozomu. U standardních chromozomů se v oblasti centromery vyskytuje kinetochorový protein CENH3 neboli centromerická varianta histonu H3, jenž je nezbytný pro správnou segregaci chromozomů. Důležitost tohoto genu vede k jeho silné konzervovanosti, a mutace způsobující změnu aminokyselinové sekvence tak vedou nejčastěji k letalitě nositele. Na B chromozomu kukuřice byla objevena B chromozomální varianta CENH3, její funkce zatím nebyla objasněna. Avšak pokud se prokáže podobná míra konzervovanosti, lze předpokládat, že tento gen vykazuje důležitou funkci, případně může hrát klíčovou roli při samotné nondisjunkci B chromozomu.

2 CÍLE PRÁCE

1. vypracování literární rešerše na téma CENH3 a B chromozomů kukuřice,
2. amplifikace produktů A a B chromozomální varianty genu CENH3 pomocí PCR,
3. sekvenování A a B chromozomální varianty genu CENH3,
4. analýza a interpretace výsledků.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

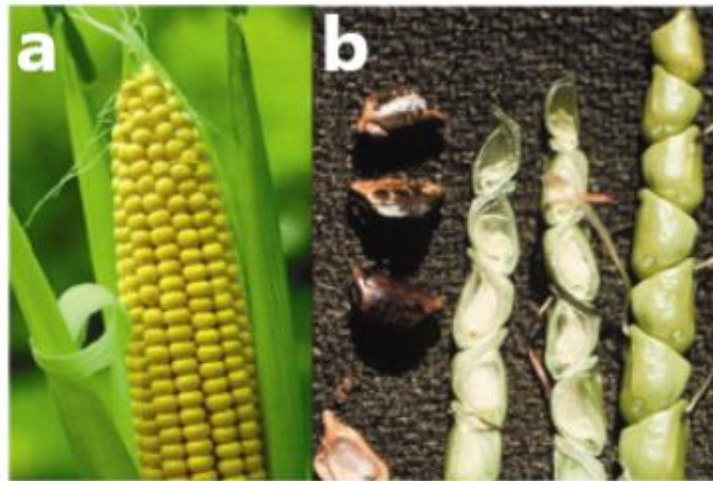
3.1 Kukuřice setá (*Zea mays* L.)

Kukuřice setá se řadí do jednoděložných rostlin (Liliopsida), čeledi lipnicovité (Poaceae), podčeledi Panicoideae, kmene Andropogoneae. Kukuřice setá pravá (*Zea mays* subs. *mays*) vznikla domestikací její příbuzné divoké trávy *Zea mays* subs. *parviglumis*, nazývané teosint. Mezi teosinty patří dále poddruhy *Zea mays huehuetenangensis* a *Zea mays mexicana*. K její domestikaci došlo přibližně před 9000 lety v údolí řeky Balsas v jižním Mexiku (Iltis et Doebley, 1980; Cruz-Cárdenas et al., 2019).

Kukuřice setá je jednoletá jednodomá rostlina, která dorůstá do výšky 1–3 metrů. Květ je jednopohlavní, tvoří jej samčí a samičí květenství. Jako samčí květenství se označuje lata tvořená ze stopkatého a přisedlého klásku (Obrázek 1a). Samičím květenstvím je klas složený z obilek, který je obalen listeny (Obrázek 1b). Právě u klasů je zřetelný dopad evoluce kukuřice pod vlivem lidského výběru. Klas domestikované kukuřice (Obrázek 2a) se od teosintů liší svou velikostí a množstvím semen, je větší a jeho obilky jsou ve více řadách. Klas teosintů (Obrázek 2b) je menší, obsahuje také méně zrn. Čnělky a blizny se nacházejí v chomáči na vrcholu samičího květenství (Brown et al., 2011). Stéblo má hladký povrch, je vzpřímené a dužnaté. Listy jsou vstřícně uspořádané a mají dlouze kopinatý tvar se souběžnou žilnatinou se středním žebrem, mohou být zvlněné (Zimolka et al., 2008). Kořen může dosáhnout do hloubky až 3 metrů (Qi et al., 2021). K opylení dochází nejčastěji cizosprašením (alogamií), ale je možné i samosprašení (autogamie). Po opylení se vyvíjí plod – zrno (Zimolka et al, 2008).



Obrázek 1: Samčí a samičí květenství kukuřice seté. Foto: Dana Michalcová. Modifikováno z: *Pladias*



Obrázek 2: Srovnání klasu teosintu a dnešní kukuřice seté. Modifikováno z: Mahadeva, 2015.

3.1.1 Pěstování kukuřice

Jakožto teplomilná rostlina je kukuřice schopna růst v tropech, ale i v subtropích a mírném pásu s omezením na vegetační období. (Hruška et al., 1962). Množství vláhy je pro pěstování kukuřice stěžejní. Nároky na vodu se zvyšují s růstem rostliny, nejvyšší jsou v období dozrávání generativních orgánů. V případě nedostatečných srážek se mění morfologie kořenového systému – kořeny prostupují do větší hloubky za podzemní vodou. Nároky na charakter půdy se odvíjejí dle oblasti pěstování. V oblastech se sušším klimatem jsou preferovány vlhčí hlinité půdy, v oblasti s mírným až chladnějším podnebím jsou preferovány lehčí provzdušněné půdy. Nejméně vhodné jsou těžké jílovité půdy. Kukuřice snáší jak slabě kyselou, tak slabě zásaditou půdu (Špaldon et al., 1986; Du Plessis, 2003).

Negativní vliv na výnos a kvalitu úrody mají patogeny. Jednou z nejčastějších chorob je hniloba klasů způsobená houbou *Aspergillus flavus*. Klasy po napadení obsahují karcinogenní aflatoxiny, které představují vážné zdravotní riziko jak pro lidi, tak i zvířata. Četné problémy způsobují i houbové patogeny rodu *Fusarium* (Pechanova et Pechan, 2015). V České republice i v ostatních oblastech světa způsobuje významné ztráty sněť kukuřičná, způsobená patogenem *Ustilago maydis*, a zavíječ kukuřičný (*Ostrinia nubilalis*), jehož housenky vyžirají dřeň stébel a zrna klasů. Dalším celosvětově rozšířeným houbovým onemocněním je rez kukuřičná (Jeffers, 2004). Ve snaze ochránit kukuřici před housenkami zavíječe kukuřičného a jiným škodným hmyzem se v ČR od roku 2005 začala pěstovat transgenní Bt kukuřice. Bt kukuřice nese ve svém genomu gen pocházející z bakterie *Bacillus thuringiensis*, který kóduje protein Cry1Ab toxicky působící v zažívacím ústrojí některých druhů hmyzu. Bt kukuřice MON810 cílí specificky na hmyzí škůdce z řádu *Lepidoptera* a je prozatím jedinou povolenou transgenní plodinou, která se může pěstovat na území Evropské unie (Křístková 2009).

3.1.2 Hospodářský význam

Kukuřice spolu s rýží a pšenicí jsou velmi významné obiloviny, poskytující lidstvu více potravy než jakákoliv jiná skupina plodin – tvoří přibližně polovinu celkového denního příjmu kalorií lidstva. Zrno kukuřice obsahuje přibližně 72 % škrobu, 10 % bílkovin a 4 % tuku. Kalorická hodnota je asi 365 kcal/100 g. Je zdrojem vitamínů skupiny B a řady minerálních prvků (Ranum et al., 2014).

Sklížena je celá nadzemní část rostliny. Zatímco zrna jsou určena převážně pro lidskou spotřebu, zbytková část rostliny a menší podíl zrn jsou využity ke krmným účelům. Lidé kukuřici konzumují ve formě kukuřičné mouky, různých krupic, škrobu, oleje či alkoholických nápojů. V posledních 10 letech se zvýšila poptávka po kukuřici až o 40 % za účelem výroby motorového biopaliva, které se používá především jako příměs do benzínu. (Špaldon et al., 1986; Ranum et al., 2014).

Dle Organizace pro výživu a zemědělství (FAO) jsou aktuálně největšími producenty Spojené státy americké, které za rok 2020 vyprodukovaly přes 360 megatun kukuřice. Druhým největším producentem je Čína s více než 260 megatunami vyprodukované kukuřice, třetí Brazílie s necelými 104 megatunami. Česká republika za rok 2020 vyprodukovala přes 825 tisíc tun. (FAO, www.fao.org/faostat).

3.1.3 Genom

V průběhu evoluce prošel genom kukuřice dvěma genomovými duplikacemi, k jedné došlo asi před 70 miliony let (Paterson et al., 2004), ke druhé před 5–12 miliony let (Blanc et Wolfe, 2004). Druhá celogenomová duplikace vedla k oddělení kukuřice od blízkého příbuzného čiroku dvoubarevného (*Sorghum bicolor*) (Paterson et al., 2009). Kukuřice setá je diploid, který má 20 autozomů ($2n = 2x = 20$). Za poslední 3 miliony let se velikost genomu kukuřice razantně zvětšila díky proliferaci LTR retrotranspozonů (SanMiguel et al., 1998). V současnosti je celková velikost genomu kukuřice asi 2,3 Gbp a obsahuje přes 32 tisíc genů v rámci asi 11 892 genových rodin. Asi 8 494 genových rodin má kukuřice společných s rýží, čirokem a huseníčkem. Velikost exonů genů kukuřice je srovnatelná s exony na ortologních genech u rýže a čiroku, introny jsou díky četným inzercím repetitivních elementů větší (Schnable et al., 2009).

Většinou část genomu – téměř 85 % – tvoří stovky rodin transponovatelných elementů, které jsou nerovnoměrně rozmístěny po celém genomu. Sekvenování genomu kukuřice dále odhalilo přítomnost velmi aktivních a variabilních DNA elementů tzv. helitronů,

keré se nejspíše transponují mechanismem valivého kruhu (Kapitonov et Jurka, 2001). U kukuřice je přítomno osm rodin helitronů s počtem kopií okolo 20 tisíc jednotek. Zatímco u dříve studovaných genomů rostlin a živočichů se helitrony vyskytují v oblastech chudých na geny (Schnable et al., 2009), u kukuřice jsou hojné v oblastech bohatých na geny (Yang et Bennetzen, 2009).

Kukuřice je nejen důležitou plodinou s širokou škálou využití, ale její genetická a fenotypová diverzita z ní dělá často využívaný modelový organismus. První studie na kukuřici byly provedeny Gregorem Mendelem roku 1866. Tehdy ji Mendel použil pro potvrzení svých dřívějších šlechtitelských pokusů provedených na hrachu (*Pisum*) (Rhoades, 1984; Strable et Scanlon, 2009). Dalším významným genetikem zkoumajícím kukuřici byla Barbara McClintock. Barbara McClintock během analýzy genů kukuřice kódujících barvu aleuronové vrstvy endospermu objevila transponovatelné elementy. Také jako první pozorovala 10 chromozomů kukuřice během pachytene meiózy (McClintock, 1946; Bennetzen et Hake, 2009).

Kromě normální chromozomální sady se v genomu mnoha variet kukuřice nacházejí nadbytečné chromozomy označované jako B chromozomy (Kuwanda, 1915), které jsou předmětem mnoha studií.

3.2 B chromozomy

B chromozomy byly poprvé pozorovány roku 1907 Edmundem Wilsonem u brouka rodu *Acanthocephala*. E. Wilson je tehdy označil jako nadpočetné (Wilson 1909). U rostlin je jako první pozoroval roku 1924 Kazuo Gotoh, který se zabýval studiem žita. K. Gotoh tyto pozorované nadpočetné chromozomy neoznačil jako dnes známé B chromozomy, ale jako k-chromozomy, aby je odlišil od standardních A chromozomů (Gotoh, 1924). Svůj současný název získaly až roku 1928, kdy je pojmenoval přírodovědec Lowell Fitz Randolph (Randolph, 1928).

Při příležitosti první konference týkající se B chromozomů (the First B chromosome Conference), která se konala ve španělském Madridu v roce 1993, byly definovány 3 nejdůležitější vlastnosti, které B chromozomy nesou: 1) B chromozomy jsou postradatelné elementy eukaryotních buněk přítomné pouze u některých druhů a v rámci těchto druhů jsou přítomné pouze u některých jedinců, 2) nepárují se ani se nerekombinují s žádným chromozomem ze standardní sady A chromozomů, 3) dědí se nepravidelně a nerespektují pravidla Mendelovské dědičnosti (Beukeboom, 1994).

B chromozomy byly objeveny u celé řady rostlin, živočichů a hub. V rostlinné říši se nacházejí nejvíce u krytosemenných kvetoucích rostlin, méně u nahosemenných, kapradin a mechorostů (Jones, 1995; Jones et Houben, 2003). U krytosemenných rostlin byly v rámci taxonomických skupin pozorovány poměrně velké rozdíly v distribuci B chromozomů. U dvouděložných se B chromozomy nacházejí asi u 3 %, kdežto u jednoděložných až u 8 % druhů. Mezi jednoděložné rostliny s vyšším výskytem B chromozomů patří například řád *Liliales* a *Commelinales* (Levin et al., 2005).

Rozsah počtu B chromozomů, který daný druh obvykle nese, je dán druhově specifickou tolerancí a případnou silou akumulace samotných B chromozomů (Camacho et al., 2000; Houben et al., 2014). U většiny druhů je počet B chromozomů nízký (0–8), existují ovšem druhy, u kterých počet B chromozomů může silně převyšovat počet A chromozomů. Příkladem může být kukuřice setá (*Zea mays*) a lumík velký (*Dicrostonyx torquatus*), který nese 34 autozomů ($2n = 34$) a až 42 kopií B chromozomů (Rausch et al., 1972; Vujošević et al., 2018).

Kromě početních rozdílů mezi jedinci určitého druhu existují případy, kdy se kvantita B chromozomů liší napříč tkáněmi či pletivý jednoho druhu, a také mezi jednotlivými buňkami daného pletiva. Příkladem je rostlina *Aegilops mutica*, kdy v jejíchž kořenech jsou B chromozomy eliminovány (Jones et Houben, 2003).

Vznik B chromozomů zatím nebyl objasněn. Navíc se původ u různých druhů může lišit. Nejrozšířenější teorie říká, že B chromozomy jsou odvozeny od A chromozomů daného druhu, tím pádem jsou pouhým vedlejším produktem evoluce standardního karyotypu. Tuto teorii vnitrodruhového původu podporují molekulární studie, které dokázaly přítomnost repetitivních sekvencí DNA, které se nacházejí i na autozomech (Camacho et al., 2000). Takové vnitrodruhově odvozené B chromozomy nese například žito (Houben et al., 1996), kukuřice (Stark et al., 1996) nebo moucha *Drosophila subsilvestris* (Camacho et al., 2002). Další z možných evolučních cest je spontánní vznik při mezidruhové hybridizaci. Tento způsob vzniku byl prokázán u potomků mezidruhového křížení mezi rostlinami *Coix aquaticus* a *Coix gigantea* (Camacho et al., 2000).

3.2.1 Morfologie a molekulární struktura

B chromozomy se od A chromozomů často liší velikostí (Jones et Houben, 2003). Ve většině případů jsou menší, ale mohou být i stejně velké nebo větší než A chromozom. Obvykle ale dosahují jedné čtvrtiny až tří čtvrtin průměrné velikosti A chromozomu (Jones, 1955).

Zatím nejmenší cytologicky zjištělý B chromozom byl pozorován u kapradiny *Ophioglossum*, dosahoval délky 1,4 μm (Goswami et Khandelwal, 1980).

V rámci druhu jsou většinou B chromozomy monomorfní. Ovšem bylo prokázáno, že asi 65 druhů rostlin nese dvě či více polymorfních forem. Mezi druhy s polymorfními formami patří například *Aegilops mutica* nesoucí metacentrické a telocentrické B chromozomy (Mochizuki, 1960) nebo *Brachycome dichromosomatica* nesoucí kombinaci velkých a mikro B chromozomů (Jones, 1995).

Dříve se předpokládalo, že B chromozomy jsou tvořeny převážně heterochromatinem a jsou geneticky inertní. S pomocí klasických molekulárních a cytogenetických metod byly na B chromozomech lokalizovány specifické sekvence zahrnující tandemově uspořádané repetitivní sekvence, LINEs a SINEs elementy, intersticiální telomerické sekvence, či klastry ribozomální DNA (Ahmad et Martins, 2019). Tyto objevené repetitivní sekvence jsou odvozeny buď od fragmentů A chromozomů nebo jsou B-specifické (Jones et Houben, 2003; Houben et al., 2014). B chromozomy jsou dále tvořeny i pseudogeny, transkribovanými sekvencemi nekódujícími RNA a protein-kódujícími geny jako například histony. Může se na nich také nacházet DNA odvozená z genomu chloroplastů či mitochondrií (Houben et al., 2014).

3.2.2 Funkce

B chromozomy byly zpočátku považovány za sobecké a nefunkční elementy bez aktivních genů. Tento předpoklad vznikl na základě jejich struktury, kterou u mnoha druhů tvoří heterochromatin (Camacho et al., 2000). Díky novým přístupům a poznatkům je známo, že B chromozomy často nesou funkční geny zodpovědné za řadu buněčných pochodů. Například u žáby *Leiopelma hochstetteri* hrají roli v determinaci pohlaví. Stejně je tomu tak u cichlidových ryb (Green, 1988; Camacho et al., 2000).

Pokud se v organismu B chromozomy vyskytují v nízkém počtu, obvykle mají na svého nositele neutrální až negativní vliv. Se zvyšujícím se počtem může být vliv B chromozomů až letální. Mezi škodlivé účinky se řadí například energetické výdaje spojené se zachováním B chromozomů v organismu během buněčného cyklu (Jones et Rees, 1982) nebo úplná sterilita samčích nositelů jediného B chromozomu u *Plantago coronopus* (Jones, 1975). Případů, kdy jsou B chromozomy prospěšné svému nositeli není mnoho, z tohoto důvodu jsou často označovány jako parazitické elementy. Příkladem může být situace, kdy B chromozomy houby *Nectria haematococca* udělují patogenitu a také rezistenci vůči antibiotikům (Coleman et al.,

2009). U ovsa mohou geny na B chromozomu zodpovídat za rezistenci ke rzi (Ahmad et Martins, 2019).

3.2.3 Dědičnost

Na rozdíl od A chromozomů se B chromozomy neřídí pravidly Mendelovské dědičnosti. Jejich dědičnost často bývá ovlivněna procesem zvaným chromozomální drive, který se vyznačuje mírou přenosu chromozomů vyšší než 0,5, což neodpovídá rovnoměrné segregaci dle Mendelova zákona (Houben, 2017). Výsledná výhoda přenosu se souhrnně označuje jako „drive“. Tento proces klíčový pro přenos a akumulaci B chromozomů a jeho podstata se liší. V závislosti na daném organismu může být drive pre-meiotický, meiotický či post-meiotický. Nepravidelný přenos B chromozomů může být ovlivněn také mitotickou a meiotickou nestabilitou (Houben et al., 2014).

Pre-meiotický drive se častěji vyskytuje u zvířat (Austin et al., 2009) a zajišťuje početní nárůst B chromozomů v buňkách zárodečných linií během vývoje (Nur, 1969). Při meiotických drive mechanismech se B chromozomy preferenčně dostanou do jádra vaječné buňky, ne však do polárních tělísek (Jones et Rees, 1982). Post-meiotický drive je častý u kvetoucích rostlin během dozrávání gametofytu (Houben et al., 2014). Hasegawa (1934) jako první pozoroval post-meiotický drive B chromozomů během I. pylové mitózy žita. Popsal nondisjunkci sesterských chromatid B chromozomu při anafázi I. pylové mitózy, způsobující jejich společný přenos do jádra jedné gamety. Obdobný mechanismus byl popsán u druhé pylové mitózy kukuřice (Roman, 1950; Jones et Rees, 1982).

3.3 B chromozomy kukuřice

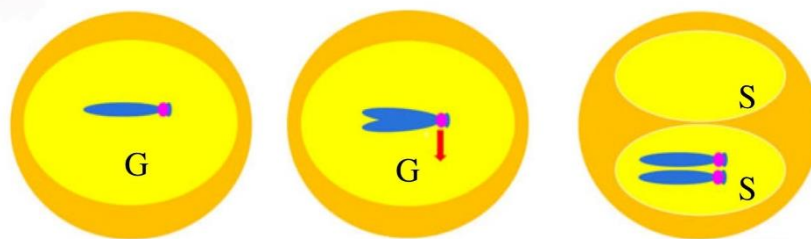
Přítomnost B chromozomů u kukuřice jako první detekoval Kuwanda (1925), o dva roky později také přírodovědec Longley (1927). Kukuřice patří k organismům, u kterých může počet B chromozomů převýšit počet A chromozomů. Kukuřice tak kromě 20 autozomů ($2n = 20$) může v extrémních případech nést až 34 B chromozomů v jednom jádře (Jones et Rees, 1982), přičemž vliv na fenotyp, životaschopnost a reprodukci byl pozorován při výskytu 15 a více kopií B chromozomů (Randolph, 1941).

3.3.1 Akumulační mechanismy B chromozomu kukuřice seté

Tyto nadbytečné chromozomy se vyskytují pouze v několika varietách kukuřice, což naznačuje, že jejich zachování v populaci nezávisí na selekci, ale na akumulacích mechanismech (Huang et al., 2016).

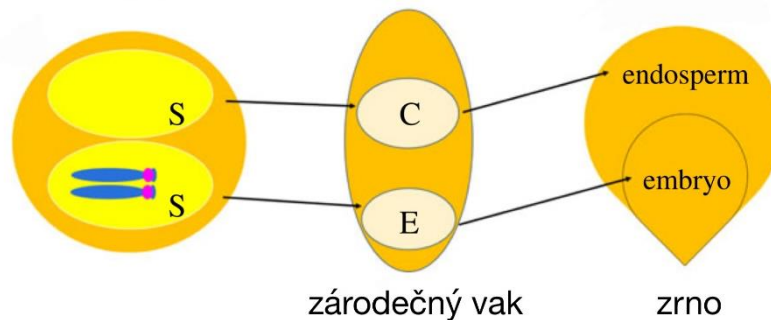
B chromozomy kukuřice si vyvinuly několik akumulčních mechanismů, které zvyšují pravděpodobnost jejich zachování a akumulaci v populaci. Jedním z těchto mechanismů je možnost přenosu B chromozomu v podobě univalentu během meiotického dělení (Carlson et Roseman, 1992). Další drive mechanismus, kterým si B chromozomy zvyšují frekvenci přenosu do další generace, spočívá v nondisjunkci sesterských chromatid během druhé pylové mitózy spojenou s preferenčním oplozením vajíčka spermatickou buňkou obsahující B chromozomy (Roman, 1948).

K nondisjunkci může docházet převážně v druhé pylové mitóze, s menší frekvencí pak v první pylové mitóze (Rusche et al., 1997). Nondisjunkce spočívá v nerozdělení sesterských chromatid v oblasti centromery, kdy pak obě společně putují do jádra pouze jedné z dceřiných buněk. Během první pylové mitózy se B chromozomy nejčastěji chovají stejně jako A chromozomy – jak vegetativní, tak generativní jádro tedy obsahují B chromozom. K nondisjunkci sesterských chromatid B chromozomu dochází během druhé pylové mitózy, při které se dělí generativní jádro na dvě spermatické buňky. Replikovaný B chromozom během tohoto procesu putuje k jednomu pólu dělicího se generativního jádra a poté po samotném rozdělení dochází k akumulaci B chromozomů jen u jedné ze spermatických buněk (Obrázek 3; Chen et al., 2022). Faktor, který přispívá k adhezi chromatid, se označuje jako *cis* a leží pravděpodobně v oblasti centromery. Adheze dále závisí na tzv. *trans* faktorech, z nichž jeden se nachází v distální oblasti dlouhého raménka a druhý v oblasti proximálního euchromatinu (Birchler et Yang, 2021). Identita a mechanismus *cis* ani *trans* faktorů ještě není známá. Pomocí B-A translokačních linií bylo ale dokázáno, že pro správný průběh nondisjunkce je potřeba přítomnosti distální oblasti dlouhého raménka B chromozomu ve stejném jádru jako centromera, nemusí být nutně na stejném chromozomu (Bennetzen et Hake, 2009). Pokud distální část dlouhého raménka chybí, nondisjunkce neproběhne. Velikost chybějící oblasti byla stanovena na asi 2,7 Mb, na které se nachází asi 34 protein-kódujících genů. Jeden z nich by mohl být kandidátem na *trans* faktor (Blavet et al., 2021).



Obrázek 3: Schematický náčrt nondisjunkce B chromozomu kukuřice. Modifikováno z: Birchler et Yang, 2021.

Po nondisjunkci může docházet k dalšímu akumulárnímu mechanismu, a to k preferenčnímu oplození. Při tomto procesu spermatická buňka nesoucí B chromozomy s vyšší pravděpodobností (asi 65 %) splyne s vaječnou buňkou za vzniku embrya (Roman, 1948; Blavet et al., 2021). Za preferenční oplození pravděpodobně zodpovídá centromera nebo přidružený protein, případně jeho modifikace (Bircher et Yang, 2021).



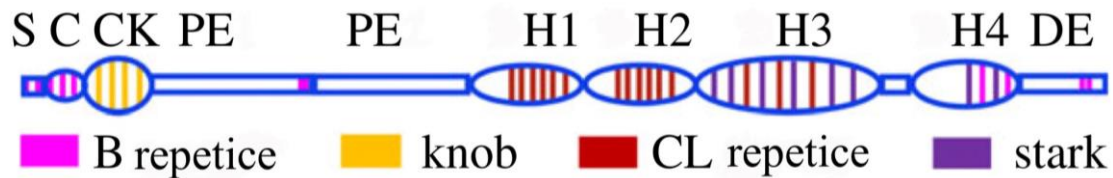
Obrázek 4: Schematický náčrt preferenčního oplození. Modifikováno z: Bircher et Yang, 2021.

3.3.2 Morfologie a molekulární charakter B chromozomu kukuřice seté

Ve srovnání s průměrnou velikostí A chromozomů kukuřice je její B chromozom výrazně menší, jeho velikost je přibližně 126 Mbp, kdy průměrná velikost A chromozomu je 220 Mbp (Blavet et al., 2021). Morfologicky jde o akrocentrický (Randolph, 1925), skoro telocentrický chromozom, kde podíl heterochromatinu výrazně převyšuje podíl euchromatinu. Jakožto akrocentrický chromozom se skládá z velmi malého krátkého raménka, centromery a dlouhého raménka, na kterém se nacházejí heterochromatinové a euchromatinové segmenty (Obrázek 5; Huang et al., 2016).

Většina sekvencí B chromozomu má své analogy na A chromozomech, ale taktéž obsahuje repetitivní elementy, které jsou specifické pouze pro B chromozom. Jedním z těchto elementů jsou tzv. B specifické repetice, nazývané také jako ZmBs, které se nachází v širší oblasti centromery a v subtelomerické oblasti dlouhého raménka. (Su et al., 2018). Tyto ZmBs jsou jedním z kandidátů pro *cis* faktor, jelikož jsou B specifické a jsou v oblasti, kterou zaměřují *trans* faktory. Sekvence dále obsahuje Starkovu repetici a CL repetici, obě se nacházejí hlavně v heterochromatinových úsecích. ZmBs jsou na sekvenční úrovni příbuzné heterochromatinovým oblastem, tzv. knobům, přítomných na A chromozomech. Knoby jsou opakující se jednotky s vysokým počtem kopií, které se výrazně barví chromatinovými barvivy. U kukuřice najdeme dva výrazné knoby: 180 bp knob repetice a TR1 repetice. Poblíž centromery leží také Cent4 repetice (Bircher et Yang, 2021). Nejnovější studie prokázala přítomnost dvou B chromozom-specifických LTR (long terminal repeat) retrotranspozónů,

jejichž sekvence je pouze z části identická se sekvencí jejich homologů na A chromozomech (Su et al., 2018). Jednotlivé oblasti na B chromozomu jsou schematicky zaznamenány na Obrázku 5.



Obrázek 5: Schematický náčrt B chromozomu kukuřice. V literatuře je B chromozom rozdělen na krátké raménko (S), centromeru (C), centromerický knob (CK), proximální euchromatin (PE), distální heterochromatin (DH1-DH4) a distální euchromatin (DE). Barevně jsou naznačeny: B specifické repetice ZmBs, 180 bp knob, CL repetice a Starkova repetice. Modifikováno z: Bircher et Yang, 2021.

Sekvenování B chromozomu kukuřice odhalilo přítomnost 1 781 genů. Mnohé z těchto genů jsou homologní ke genům, které hrají roli v buněčném dělení a buněčném cyklu. Dále bylo prokázáno, že přítomnost B chromozomu způsobuje změny v expresi genů na A chromozomech (Bircher et Yang, 2021). V sekvenci bylo také detekováno 712 kbp mitochondriální a plastidové DNA (Blavet et al., 2021).

Oblast centromery B chromozomu kukuřice má velikost přibližně 700 kbp. Složením a uspořádáním repetit je velmi podobná těm na A chromozomech, s výjimkou B specifických repetit v oblasti středu centromery (Bircher et Yang, 2021). ZmBs jsou jednou ze tří druhů repetitivních sekvencí, které se na centromeře vzájemně prolínají. Další repeticí je CentC (satelit o velikosti 156 bp) a retrotranspozony z CR rodiny zahrnující repetice CRM1, CRM2 a CentA. Všechny tyto repetice mají schopnost interagovat s centromerickou variantou histonu H3 (Jin et al., 2005; Su et al., 2018).

3.4 CENH3

Centromera je nezbytným elementem pro správnou segregaci chromozomů do dceřiných buněk během mitózy a meiózy. Eukaryotická centromerická DNA je vysoce variabilní ve velikosti i struktuře. U vyšších rostlin se velikost centromery pohybuje mezi 3 Mb až 9 Mb a obsahuje především tandemově uspořádané repetice. Tyto repetice mohou být v některých případech zmenšeny až na 5 % původní velikosti, přesto si zachovávají část své schopnosti zprostředkovávat segregaci chromozomů. Strukturální a velikostní rozdíly v centromerické DNA vedly k myšlence, že centromery jsou ovlivňovány epigenetickými mechanismy (Zhong et al., 2002; Feng et al., 2020).

Ukázkovým příkladem epigenetické determinace je role histonů v lokalizaci centromery. Předpokládá se, že umístění centromery je určeno přítomností nukleozomu s CENH3 neboli centromerickou variantou histonu H3, která částečně nahrazuje histon H3 v centromerách (Nagaki et Murata, 2005; Britt et Kupp, 2016). Homology CENH3 nesou různá pojmenování u různých organismů: CENP-A u člověka, CID u mouchy *Drosophila*, Cnp1 u kvasinek či HCP-3 u *Caenorhabditis elegans*. CENH3 je kinetochorový protein, který má za úkol rekrutovat ostatní kinetochorové proteiny, jako je například CENP-C, a umožňuje sestavení a funkci kinetochoru. Mezi eukaryoty je funkce kinetochoru konzervovaná – slouží k vazbě dělicího vřeténka. Tato skutečnost dělá z CENH3 nezbytný element pro segregaci chromozomů (Zhong et al., 2002). Jakákoliv mutace či chyba v expresi může mít negativní důsledky na schopnost sestavení funkčního chromatinu a tím způsobit inaktivaci centromery (Karimi-Ashtiyani, 2015). Změny homologů CENH3 u několika organismů vedly k chybám v segregaci chromozomů a k letalitě. U kvasinek mutace Cnp1 způsobily nondisjunkci chromozomů a zastavení buněčného cyklu v mitóze, u *Caenorhabditis elegans* byly změny HCP-3 až letální (Britt et Kupp, 2016).

CENH3 je složen z C-terminální domény (HFD, z anglického histone-fold domain), která nese čtyři helixové motivy (α N, α 1, α 2, α 3) a loop 1 a loop 2 oblasti, a z N-terminální domény. Loop 1 a α 2 helix slouží k zacílení CENH3 do centromery, oblast vytvořená těmito smyčkami se označuje jako CATD (Elisafenko et al, 2021). Feng et al. (2020) zjistili, že posledních pět aminokyselin v C-terminální doméně je nezbytných pro inkorporaci CENH3 do centromery. C-terminální doména zodpovídá za interakci CENH3 s histonem H4, což naznačuje, že se CENH3 udržuje v centromerách skrze interakce s H4 za vzniku stabilních nukleozomů. Všechny známé CENH3 sdílejí společnou sekvenci centrální domény s histonem H3. Podobnost HFD oblasti v rámci C-terminální domény mezi histonem H3 a jeho centromerickou variantou je asi 50 %. Strukturální i velikostní odlišnosti se vyskytují hlavně v N-terminální doméně, která zabezpečuje interakci s DNA a kinetochorovými proteiny (Chen et al, 2000; Malik et al, 2002). Dále se liší loop 1 oblastí, která specificky interaguje s centromerickou DNA, přičemž u CENH3 je tato oblast o několik nukleotidů delší. CENH3 se na rozdíl od svého kanonického protějšku H3 v průběhu evoluce poměrně rychle vyvíjí, a to zejména v oblastech N-terminální domény a loop 1, které zodpovídají za vazbu DNA. Obě oblasti vykazují znaky adaptivní evoluce. Rychlá evoluce u tak důležitého proteinu není obvyklá, což vede k úvaze, že adaptivní evoluci CENH3 podmiňují rychle se vyvíjející repetitivní satelitní sekvence v centromerách (Malik et Henikoff, 2003; Yuan et al., 2015). Adaptivní evoluce centromerické

varianty histonu H3 je diskutovaná v mnoha studiích (Talbert et al., 2002; Cooper et Henikoff, 2004; Hirsch et al., 2009). CENH3 by tak mohl sloužit jako spojovací molekula mezi konzervovaným kinetochorovým komplexem a rychle se vyvíjející centromerickou DNA (Zhong et al., 2002).

Bylo zjištěno, že organismy s monocentrickými chromozomy nemusí nést pouze jednu kopii CENH3, ale mohou jich nést dvě nebo i více, přičemž každá kóduje jinou variantu proteinů. Duplikace CENH3 u diploidních rostlin byla poprvé objevena u *Arabidopsis halleri* a *Arabidopsis lyrata*. Obě kopie genu jsou funkční a kromě 16 bp delece u jedné z nich oproti původnímu genu u *Arabidopsis thaliana* mají identickou strukturu exonů i intronů. Dílčí duplikace CENH3 byly prokázány dále u druhů *Brassica*, *Pisum*, *Mimulus* a *Vigna*. Obě kopie kódují funkční proteiny, které vzájemně kolokalizují a společně se podílejí na sestavování kinetochoru. Kukuřice ve svém genomu nese pouze jednu kopii CENH3 (Elisafenko et al, 2021). Na B chromozomu kukuřice se ovšem nachází B varianta CENH3. Její role na B chromozomech zatím není známá. Vzhledem k roli CENH3 při segregaci chromozomů se ale předpokládá, že by B chromozomální varianta CENH3 mohla působit při procesu nondisjunkce sesterských chromatid B chromozomu, a tím hrát klíčovou roli v jeho akumulčních mechanismech.

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Biologický materiál

Pro studii bylo použito 40 linií kukuřice seté (*Zea mays*) (Tabulka 1) poskytnutých genovou bankou CIMMYT, Mexiko.

Tabulka 1: Linie kukuřice seté obsahující B chromozom použité pro experiment

Název linie	Země původu	Název linie	Země původu
ARGE 542	Argentina	CHIH 146	Mexiko
BOLI 864	Bolívie	CHIH 152	Mexiko
BOLI 953	Bolívie	CHIH 156	Mexiko
BOLI 969	Bolívie	CHIH 214	Mexiko
CAMP 18	Mexiko	CHIH 218	Mexiko
GUAN GP13	Mexiko	CHOC 333	Kolumbie
GUAT 120	Guatemala	ISRA 4	Izrael
GUAT 253	Guatemala	NICA 72	Nicaragua
GUAT 279	Guatemala	OAXA 306	Mexiko
GUAT 281	Guatemala	P.PA	Pákistán
GUAT 330	Guatemala	RDOM 261	Dominikánská republika
GUAT 344	Guatemala	SALV 100	Salvador
GUAT 426	Guatemala	SALV 105	Salvador
GUAT 552	Guatemala	SALV 107	Salvador
GUAT 68	Guatemala	SALV 54	Salvador
GUAT 71	Guatemala	SALV 70	Salvador
HOND 81	Honduras	SALV 9	Salvador
HOND 93	Honduras	SINA 56	Mexiko
HOND 97	Honduras	SONO 133	Mexiko
CHIH 140	Mexiko	SONO 55	Mexiko

4.2 Použité chemikálie, soupravy a roztoky

4.2.1 Použité chemikálie a enzymy

- 10x Standard Taq Reaction Buffer (New England BioLabs, kat. č. B9014)
- 3730 Buffer (10x) with EDTA (Thermo Fisher Scientific, kat. č. 4335613)
- Agaróza (Sigma-Aldrich, kat. č. A9539)
- Agencourt® CleanSEQ (Beckman Coulter, kat. č. A29154)
- BigDye™ Terminator v1.1, v3.1 5x Sequencing Buffer (Thermo Fisher Scientific, kat. č. 4339843)
- BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing RR-100 (Thermo Fisher Scientific, kat. č. 4336911)

- Bromfenolová modř (Sigma-Aldrich, kat. č. B0126)
- Dihydrát disodné soli ethylendiamintetraoctové kyseliny (EDTA) (Sigma-Aldrich, kat. č. E9884)
- Ethidium bromid (Sigma-Aldrich, kat. č. E8751)
- Exonuclease I (Thermo Fisher Scientific, kat. č. EN0582)
- FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase (Thermo Fisher Scientific, kat. č. EF0651)
- Glycerol (Sigma-Aldrich, kat. č.: G5516)
- Kyselina boritá (Lach-Ner, kat. č. 10017-AP0)
- O'GeneRuler™ Express DNA Ladder, ready-to-use (Thermo Fisher Scientific, kat. č. SM1563)
- POP-7™ Polymer for 3730/3730xl DNA Analyzers (Thermo Fisher Scientific, kat. č. 4332241)
- Primery (Eurofins Genomics) (Tabulka 2)
- PrimeSTAR GXL Premix (Takara Bio, kat. č. R051B) obsahující Primestar GXL DNA polymerase, PrimeStar GXL buffer (Mg²⁺ plus) a dNTP Mixture
- Tris base (Sigma-Aldrich, kat. č. S2876)
- Xylencyanol (Sigma-Aldrich, kat. č.: X4126)

Tabulka 2: Přehled použitých amplifikačních a sekvenačních primerů

Název primeru	Sekvence
482_SR1	CGAGAGTTTTGAATCCAAACC
CENH3A_seq_F1	CTAATATAGATCGGAGCGAC
CENH3A_seq_F3	GAGGGAGTTAACCAATTTCG
CENH3A_seq_newR	AGTCAACAGTTGCACTTTGCG
CENH3A_seq_R1	GCTTTCCTAGTGGTGTAGTT
CENH3A_seq_R2	GCATGTTACCTATGGCCTGC
CENH3A_seq_RP1	ACTCCACAGATGTTAGACTGCG
Zm482_seq_F1	TTGATAATTGATGTCTTTGTTGG
Zm482_seq_F2	TATGCGCTATTTGAACGTTACC
ZmCENH3_gDNA_FP1	TGCTCACCATATAACGCTGC
ZmCENH3_gDNA_RP2	CCATGCAGCATTCAACAACACT

4.2.2 Použité kity

- NucleoSpin Plant II kit (Macherey Nagel, kat. č.: 740770.250)

4.2.3 Použité roztoky a jejich příprava

- 0,5M EDTA (1 l): 186,1 g dihydrátu disodné soli ethylendiamintetraoctové kyseliny bylo rozpuštěno v 800 ml destilované vody a doplněno do 1 l, pH bylo upraveno na 8
- 0,5x TBE pufr (1 l): 100 ml 5x TBE pufru a 900 ml destilované vody
- 5x TBE pufr (1 l): 54 g Tris báze a 27,5 g kyseliny borité bylo rozpuštěno ve vodě, přidáno 20 ml 0,5M EDTA, doplněno vodou na 1 l, pH upraveno na 8
- 6x STOP C (10 ml): 5 mg bromfenolové modři, 2 ml 0,5M EDTA, 4,3 ml 99,9% glycerolu, 5 mg xylencyanolu, 1 ml 10% SDS, vodou doplněno na 10 ml
- Roztok ethidium bromidu (1 l): ve 100 ml destilované vody bylo rozpuštěno 50 g ethidium bromidu a doplněno destilovanou vodou do 1 l

4.3 Seznam použitých přístrojů a zařízení

- Analytické váhy Shinko Denshi AJ-820CE (RoHS Compliant)
- C1000™ Touch Thermal Cycler (Bio-Rad)
- Centrifuga Micro Star 17R (VWR International)
- Elektroforetická horizontální aparatura Owl A6 (Thermo Fisher Scientific)
- Elektronická multikanálová pipeta E1-ClipTip (Thermo Fisher Scientific)
- Genetický analyzátor 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems™)
- Mikropipeta Xplorer 5–100 µl (Eppendorf)
- Minicentrifuga myFuge Mini (Benchmark Scientific)
- Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific)
- Pipetovací robot Biomek NX^P (Beckman Coulter)
- PlateFuge™ MicroCentrifuge (Benchmark Scientific)
- Třepačka Reax Top (Heidolph Instruments)
- UV transiluminátor InGenius3 (Syngene)
- Vodní lázeň SUB6 (Grant)
- Výrobník ledu Ice Flaker (Brema Ice Makers)
- Zdroj k elektroforéze PS600 (Hofer)

4.4 Postupy experimentálních a vyhodnocovacích metod

4.4.1 Izolace DNA

K izolaci genomové DNA byly využity mladé rostliny kukuřice. Do popsaných 2ml mikrozkušavek byla z každé rostliny odštířena část listu. Otevřené mikrozkušavky byly vloženy do lyofilizátoru do druhého dne. Po lyofilizaci byly do mikrozkušavek vloženy sterilní skleněné kuličky, které usnadňují homogenizaci. Homogenizace byla provedena v oscilačním mlýnku při frekvenci 27 kmitů za sekundu po dobu 3 minut. Pro izolaci DNA byl využit komerční kit NucleoSpin Plant II. Koncentrace vyizolované DNA byla změřena na Nanodropu a poté zředěna tak, aby se rovnala asi $20 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$.

4.4.2 PCR amplifikace

Pro PCR amplifikaci A chromozomální varianty genu CENH3 a B chromozomální varianty genu CENH3 byla použita izolovaná genomová DNA kukuřice. Využité primery byly poskytnuty školicím pracovištěm. Takara PrimeStar GXL PCR směs byla připravena dle Tabulky 3.

Tabulka 3: Složení PCR reakční směsi pro 1 vzorek

Reagencie reakční směsi	Zásobní koncentrace	Pracovní koncentrace	Objem [μl]
PrimeStar GXL Buffer	5x	1x	4
dNTPs	2,5 mM	200 μM	1,6
Deionizovaná voda	-	-	8,8
PrimeStar GXL Polymeráza	1,25 $\text{U} \cdot \mu\text{l}^{-1}$	0,5 U	0,4
Primery	50 μM	0,5 μM	0,2
Templátová DNA	20 $\text{ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$	5 $\text{ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$	5
Celkový objem			20

PCR amplifikace A chromozomální varianty genu CENH3 probíhala za podmínek stanovených v Tabulce 4.

Tabulka 4: Podmínky PCR amplifikace A chromozomální varianty genu CENH3

Proces	Teplota [°C]	Čas	Počet cyklů
Denaturace	98	10 s	
Nasedání primerů a elongace	68	4 min	30

PCR amplifikace produktů B chromozomální varianty genu CENH3 probíhala za podmínek stanovených v Tabulce 5.

Tabulka 5: Podmínky PCR amplifikace B chromozomální varianty genu CENH3

Proces	Teplota [°C]	Čas	Počet cyklů
Denaturace	98	10 s	
Nasedání primerů	55	15 s	30
Elongace	68	3 min	

4.4.3 Elektroforetická separace produktů PCR amplifikace

Pro vyhodnocení výsledků PCR amplifikace byla využita gelová elektroforéza v 1,2% agarózovém gelu v 0,5x TBE pufru. Do jamek bylo nanášeno 10 µl standardu molekulové hmotnosti O'GeneRuler™ Express DNA Ladder, dle kterého byla určena velikost vzniklých produktů, a 10 µl směsi složené ze 2 µl PCR produktu, 3 µl barviva STOP C a 5 µl deionizované vody.

Separace produktů probíhala 60 minut při napětí 110 V. Po skončení separace by gel přenesen do roztoku ethidium bromidu, kde byl inkubován po dobu 30 minut, poté byl promyt v deionizované vodě. Gel byl přenesen do UV transiluminátoru a vyhodnocen v programu GeneSnap.

V případě neúspěšné PCR amplifikace byla PCR reakce zopakována. V případě úspěšné PCR amplifikace následovalo ExoSAP přečištění PCR produktů a sekvenační reakce.

4.4.4 ExoSAP přečištění PCR produktů

ExoSAP slouží k enzymatickému přečištění PCR produktu. Reakce se skládá z exonukleázy I, která degraduje primery a jednořetězcové nespecifické produkty, a termosenzitivní alkalické fosfatázy, která inaktivuje dNTPs odstraněním fosfátové skupiny. Reakční směs pro jeden vzorek byla vytvořena dle Tabulky 6.

Tabulka 6: Složení ExoSAP reakční směsi pro 1 vzorek

Reagencie	Objem [μl]
Exonukleáza I	0,05
Termosenzitivní alkalická fosfatáza	0,5
PCR pufr 1x	3,45
PCR produkt	3
Celkový objem	7

ExoSAP přečištění probíhalo za následujících teplotních a časových podmínek.

Tabulka 7: Časový a teplotní profil ExoSAP reakce

Proces	Teplota [°C]	Čas [min]
Optimální teplota enzymů	37	30
Inaktivace enzymů	80	20

4.4.5 Sekvenační reakce

Při tomto kroku byly použity ExoSAP přečištěné PCR produkty. Složení reakční směsi pro jeden vzorek se nachází v Tabulce 8.

Tabulka 8: Složení směsi pro sekvenační reakci

Reagencie	Objem [μl]
Sekvenační pufr	1,5
Big Dye	0,5
Primer 10 μM	1
Deionizovaná voda	2,5
PCR produkt	4,5
Celkový objem	10

Sekvenační reakce probíhala za teplotních a časových podmínek stanovených v Tabulce 9.

Tabulka 9: Časový a teplotní profil sekvenační reakce

Teplota [°C]	Čas	Počet cyklů
98	5 min	1
96	10 s	30
50	5 s	
60	4 min	

4.4.6 Přečištění produktů sekvenační reakce a sekvenování

Přečištění produktů sekvenační reakce a samotná separace produktů kapilární elektroforézou v rámci Sangerova sekvenování bylo provedeno specializovanou pracovnící Ústavu experimentální botaniky. K přečištění byl použit pipetovací robot Biomek® NX^P a kit na bázi paramagnetických kuliček Agentcourt® CleanSEQ a k separaci sekvenačních produktů kapilární elektroforézou genetický analyzátor 3730xl DNA Analyzer. Výsledná data byla importována do programu Geneious Prime.

4.4.7 Analýza dat

Pro porovnání výsledků sekvenace A a B chromozomální varianty genu CENH3 u jednotlivých linií plané kukuřice s referenčními sekvencemi a nalezení případných polymorfismů byl použit program Geneious Prime. Referenční sekvence pro A variantu CENH3 byla získána z bioinformatické databáze NCBI (Sequence ID: AF519807.2), B varianta CENH3 byla publikována v Blavet et al. (2021).

V programu Geneious Prime byl u sekvencí jednotlivých variant genu CENH3 získaných Sangerovým sekvenováním jako první proveden tzv. trimming, který slouží k odstranění nekvalitních a nespolehlivých oblastí na koncích dané sekvence. Takto upravené sekvence byly mapovány k příslušné referenční sekvenci. Pro analýzu byly využity kódující oblasti, jež byly důkladně prohlédnuty kvůli možnému výskytu polymorfismů v heterozygotní konfiguraci. Kódující sekvence byly exportovány do formátu FASTA a pro zjištění případných polymorfismů bylo provedeno mnohočetné přiřazení v programu Geneious Prime.

5 VÝSLEDKY

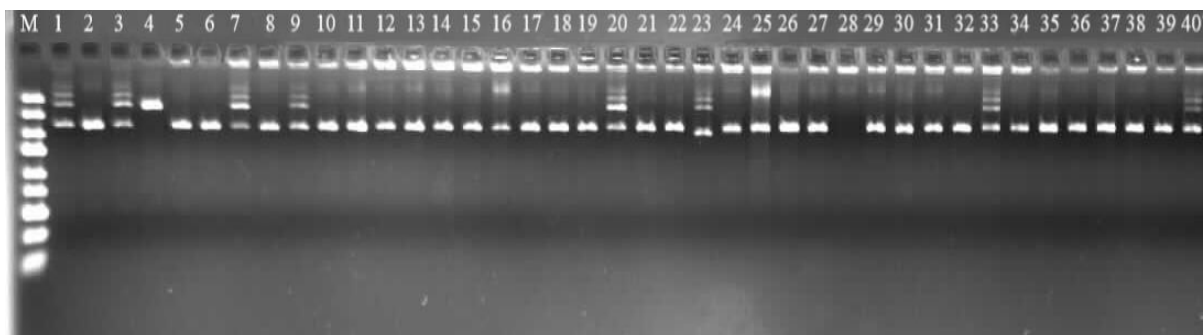
5.1 Izolace DNA

V rámci této bakalářské práce byla hodnocena a srovnávána konzervovanost dvou variant genu CENH3 – varianty A ležící na chromozomu 6 kukuřice a B varianty nacházející se na B chromozomu kukuřice.

Jako vstupní materiál byla využita vyizolovaná genomická DNA z listů mladé rostliny kukuřice. Celkem bylo analyzováno 40 linií kukuřice pocházejících především z oblastí střední a Jižní Ameriky. Všechny tyto linie ve svém genomu obsahovaly B chromozomy. Genomická DNA byla izolována pomocí komerčního kitu NucleoSpin Plant II, který je založen na využití centrifugačních kolonek obsahujících chaotropní soli a na optimalizovaném systému lyzačních pufřů. Pro zajištění stejných podmínek u všech vzorků při dalších aplikacích byla koncentrace vyizolované DNA nejprve změřena pomocí přístroje Nanodrop a poté zředěna na 20 ng·μl⁻¹. Tato vyizolovaná DNA dále sloužila jako templát pro PCR amplifikaci obou variant genu CENH3.

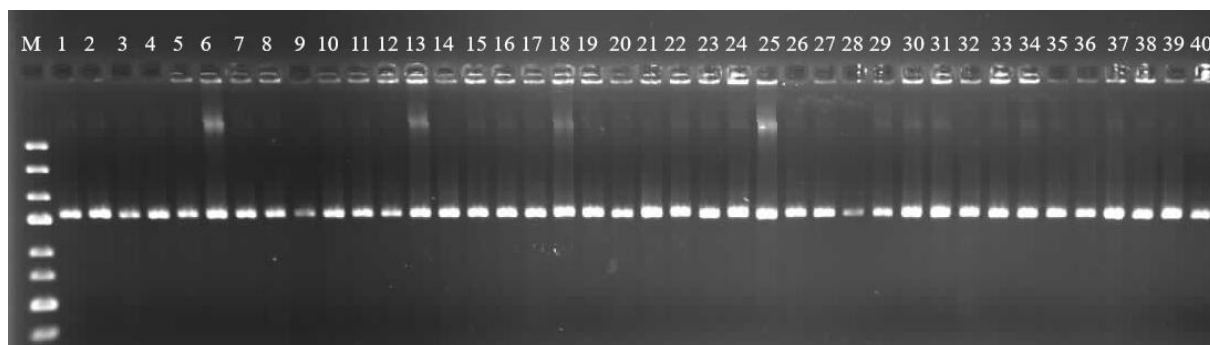
5.2 PCR amplifikace a agarózová elektroforéza

A a B chromozomální varianty genu CENH3 byly amplifikovány PCR reakcí za použití specificky navržených primerů, které byly poskytnuty školicím pracovištěm, kdy izolovaná DNA jednotlivých linií kukuřice sloužila jako templát. Pro zajištění specifity primerů byla každá varianta genu amplifikována za odlišných podmínek. Pro ověření správného průběhu PCR amplifikace byla provedena agarózová elektroforéza. Separace probíhala v 1,2% gelu v roztoku 0,5x TBE pufřů za použití O'GeneRuler™ Express DNA Ladder standardu molekulové hmotnosti. Aby nedošlo k difundování vzorku do pufřů, byl vzorek smíchán s nanášecím pufřem STOP C obsahujícím glycerol o vysoké hustotě a také bromfenolovou modř, která umožňuje sledování a hodnocení průběhu separace. Pro vizualizaci PCR produktů byl gel ponořen do roztoku interkalačního činidla ethidium bromid, ozářen UV zářením v UV transiluminátoru a vyhodnocen. Jak vyplývá z Obrázku 6 a 7, výsledný produkt A varianty genu CENH3 byl dlouhý 2 500 bp, u B varianty CENH3 1 200 bp.



Obrázek 6: Elektroforeogram PCR produktů A varianty CENH3 u kukuřice. M – standard molekulové hmotnosti O'GeneRuler™ Express DNA Ladder; jamky č. 1–40 – amplikony A varianty genu CENH3 u kukuřice

Na Obrázku 6 je vidět, že u A chromozomální varianty genu CENH3 docházelo k amplifikaci různě dlouhých produktů v případě některých linií kukuřice. Sekvenční data napovídají, že se jednalo o variantu genu s duplikovanou oblastí, na kterou byl navržen amplifikační primer. Výsledkem PCR jsou tudíž amplikony různých délek, avšak s identickou sekvencí, která byla sekvenována. Na výslednou sekvenaci to tudíž nemělo vliv a sekvenační primery nasedaly pouze na vybrané cílové oblasti.



Obrázek 7: Elektroforeogram PCR produktů B varianty CENH3 u kukuřice. M – standard molekulové hmotnosti O'GeneRuler™ Express DNA Ladder; jamky č. 1–40 – amplikony B varianty genu CENH3 u kukuřice

5.3 Sekvenční analýza

Posledním krokem této bakalářské práce byla analýza sekvencí obou zkoumaných variant genu CENH3. Samotné analýze přecházelo ExoSAP enzymatické přečištění PCR produktů a sekvenační reakce. Následně byla provedena separace produktů sekvenační reakce kapilární elektroforézou v rámci Sangerova sekvenování a získané sekvence byly pro další postupy přeneseny do programu Geneious Prime. Výsledné sekvence A a B varianty CENH3 byly v tomto programu přiřazeny k referenčním sekvencím. Zkoumány byly pouze kódující sekvence. Celkem bylo sekvenováno 40 linií pro každou variantu.

A chromozomální varianta genu CENH3 obsahuje sedm exonů. U každé sekvence exonu byla ověřena kvalita a poté složena kódující sekvence. Dále bylo provedeno mnohočetné přiřazení

těchto kódujících sekvencí v programu Geneious Prime. Byla zjištěna přítomnost jednonukleotidových polymorfismů u sedmi linií kukuřice, z nichž čtyři byly v heterozygotní konfiguraci a tři v homozygotní konfiguraci. Pro potvrzení konzervovanosti byly jednotlivé nukleotidové sekvence A chromozomální varianty genu CENH3 přeloženy do aminokyselinové sekvence. Bylo zjištěno, že žádný ze zjištěných jednonukleotidových polymorfismů nemění sekvenci aminokyselin výsledného proteinu, což značí, že funkce proteinu zůstává zachována. Přehled jednotlivých jednonukleotidových polymorfismů se nachází v Tabulce 10.

Tabulka 10: Přehled polymorfismů nalezených u A chromozomální varianty genu CENH3

Linie	Poloha polymorfismu na CDS [bp]	Referenční kodon	Mutovaný kodon	Kódovaná aminokyselina
BOLI 969	7	CGA	AGA	Arginin
GUAN GP13	276	GAG	GAR	Kyselina glutamová
HOND 81	383	GCG	GSG	Alanin
HOND 93	258	TTC	TTY	Phenylalanin
CHOC 333	252	GCG	GCS	Alanin
OAXA 306	7	CGA	AGA	Arginin
SALV 70	7	CGA	AGA	Arginin

Y – kóduje cytosin nebo thymin

S – kóduje cytosin nebo guanin

R – kóduje adenin nebo guanin

B chromozomální varianta genu CENH3 obsahuje pět exonů, jejichž kódující sekvence byly přeloženy do sekvence aminokyselin proteinu. Díky mnohočetnému přiřazení kódujících sekvencí v programu Geneious Prime bylo zjištěno, že žádná ze zkoumaných linií kukuřice nenese polymorfismus ve své kódující sekvenci pro gen CENH3. Nepřítomnost polymorfismů naznačuje konzervovanost tohoto genu nacházejícího se na B chromozomu kukuřice u všech 40 zkoumaných linií.

6 DISKUZE

Cílem předkládané bakalářské práce bylo hodnocení konzervovanosti A a B chromozomální varianty genu CENH3 na základě sekvenční analýzy u planých linií kukuřice seté.

Centromerická varianta histonu H3 je nezbytný element pro správnou funkci kinetochoru, tedy i k segregaci chromozomů během buněčného dělení. Jakákoliv mutace mající vliv na výsledný protein může vést k poruchám jeho funkce, a tudíž i k nežádoucím chybám v segregaci chromozomů (Karimi-Ashtiyani, 2015). Na základě toho se předpokládá, že tento gen bude v rámci druhu konzervován a uniformní, což vyplývá i ze studií Nagaki et Murata (2005), kteří zkoumali konzervovanost genu pro CENH3 u cukrové třtiny (*Saccharum officinarum* L.). Kromě cukrové třtiny se zaměřili a na další rostliny z čeledi lipnicovitých, konkrétně na kukuřici (*Zea* sp.) a rýži (*Oryza* sp.). Z jejich sekvenční analýzy vyplývá, že ačkoliv se sekvence genu pro CENH3 i mezi blízkce příbuznými druhy liší, u jedinců stejného druhu zůstává velmi podobná. Nejvíce odlišností se nachází v oblasti N-terminální domény, naopak oblast centrální domény je u těchto vybraných druhů značně podobná. Konzervovanost genu pro CENH3 u kukuřice byla také potvrzena v předkládaném experimentu mé bakalářské práce.

V případě A chromozomální varianty genu CENH3 byla u sedmi linií kukuřice zjištěna přítomnost jednonukleotidových polymorfismů. U čtyř z těchto linií se jednalo o polymorfismus pouze na jedné kopii genu, jednalo se tedy o heterozygoty pro tento gen. U zbylých třech linií se jednalo o homozygotní změnu. Další analýzou jednotlivých sekvencí se potvrdilo, že žádný ze zjištěných jednonukleotidových polymorfismů nemá vliv na výslednou sekvenci aminokyselin proteinu. Jedná se o výsledek tzv. tiché mutace, kdy změna báze kodonu nevede ke změně kódované aminokyseliny. Funkčnost genu je tedy zachována.

O B chromozomální variantě genu CENH3 zatím není příliš mnoho informací. K jejímu popsání došlo teprve nedávno. B varianta genu CENH3 nese vysokou podobnost s A variantou genu CENH3 v kódující sekvenci (Blavet et al., 2021). Vzhledem k roli CENH3 při segregaci chromozomů vznikla domněnka, že by B chromozomální varianta CENH3 mohla hrát roli v nondisjunkci sesterských chromatid B chromozomu kukuřice při procesu druhé pylové mitózy. V případě, že by tato varianta CENH3 hrála klíčovou roli při nondisjunkci, a tedy i akumulaci B chromozomu, každá mutace narušující funkci tohoto genu by vedla k narušení akumulační schopnosti B chromozomu kukuřice, a tudíž by vedla k jeho ztrátě. Právě proto

byla jako první krok v ověření této hypotézy zvolena sekvenční analýza genu CENH3, která by potvrdila jeho konzervovanost v rámci vybraných linií kukuřice. Na základě analýzy sekvencí B varianty CENH3 nebyl nalezen žádný polymorfismus u 40 studovaných linií, z čehož vyplývá, že gen by mohl být opravdu konzervován. Pro úplné potvrzení by bylo ovšem potřeba sekvenovat větší množství linií. Konzervovanost B varianty genu CENH3 by naznačovala, že tento gen má nějakou funkci. O jakou funkci se jedná, je už předmětem dalších studií.

7 ZÁVĚR

Předkládaná bakalářská práce se zabývala sekvenční analýzou A a B chromozomální varianty genu CENH3, která měla srovnat konzervovanost těchto chromozomálních variant u vybraných linií kukuřice seté.

Jako první bylo nutné provést PCR amplifikaci vybraných chromozomálních variant genu CENH3 u všech vybraných linií kukuřice. Následně byla amplifikace ověřena agarózovou elektroforézou. Jednotlivé PCR produkty byly přečištěny pomocí ExoSAP enzymové reakce a poté byla provedena sekvenační reakce a kapilární elektroforéza sekvenačních produktů. V rámci Sangerova sekvenování byly získány sekvence vybraných variant genu CENH3 u 40 linií kukuřice seté.

Studium konzervovanosti bylo založeno na hledání polymorfismů v kódujících sekvencích jednotlivých variant genu CENH3. Hlavním cílem práce bylo zjistit, zda B varianta genu CENH3 ležící na B chromozomu kukuřice je konzervována stejně jako A varianta genu CENH3. Mnohočetným přiřazením bylo zjištěno, že ačkoliv A varianta CENH3 ve své kódující sekvenci obsahuje jednonukleotidové polymorfismy, žádný z nich nevede ke změně sekvence aminokyselin proteinu. Funkce genu je tedy zachována. Kódující sekvence B varianty genu CENH3 byla shodná u všech 40 zkoumaných linií kukuřice seté, což naznačuje, že i tato varianta by mohla být silně konzervována.

8 LITERATURA

- Ahmad, S. F., & Martins, C. (2019). The modern view of B chromosomes under the impact of high scale omics analyses. *Cells*, 8(2), 156.
- Austin, B. U. R. T., & Trivers, R. (2009). Genes in conflict. In *Genes in Conflict*. Harvard University Press.
- Bennetzen, J. L., & Hake, S. C. (Eds.). (2009). *Handbook of maize: genetics and genomics*. Springer Science & Business Media.
- Beukeboom, L. W. (1994). -Bewildering Bs: an impression of the 1st B-Chromosome Conference. *Heredity*, 73(3), 328-335.
- Birchler, J. A., & Yang, H. (2021). The supernumerary B chromosome of maize: drive and genomic conflict. *Open biology*, 11(11), 210197.
- Blanc, G., & Wolfe, K. H. (2004). Widespread paleopolyploidy in model plant species inferred from age distributions of duplicate genes. *The plant cell*, 16(7), 1667-1678.
- Blavet, N., Yang, H., Su, H., Solanský, P., Douglas, R. N., Karafiátová, M., Šimková, L., Zhang, J., Liu, Y., Hou, J., Shi, X., Chen, Ch., El-Walid, M., McCaw, M. E., Albert, P.S., Gao, Z., Zhao, Ch., Ben-Zvi, G., Glick, L., Kol, G., Shi, J., Vrána, J., Šimková, H., Lamb, J. C., Newton, K. Dawe, K., Doležel, J., Ji, T., Baruch, K., Cheng, J., Han, F., Birchler, J., Bartoš, J. (2021): Sequence of the supernumerary B chromosome of maize provides insight into its drive mechanism and evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*,
- Bortiri, E., & Hake, S. (2007). Flowering and determinacy in maize. *Journal of experimental botany*, 58(5), 909-916.
- Britt, A. B., & Kuppup, S. (2016). CenH3: an emerging player in haploid induction technology. *Frontiers in plant science*, 7, 357.7
- Brown, P. J., Upadyayula, N., Mahone, G. S., Tian, F., Bradbury, P. J., Myles, S., ... & Rocheford, T. R. (2011). Distinct genetic architectures for male and female inflorescence traits of maize. *PLoS genetics*, 7(11), e1002383.
- Camacho, J. P. M., Bakkali, M., Corral, J. M., Cabrero, J., Lopez-Leon, M. D., Aranda, I., ... & Perfectti, F. (2002). Host recombination is dependent on the degree of parasitism. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 269(1505), 2173-2177.

- Camacho, J. P. M., Sharbel, T. F., & Beukeboom, L. W. (2000). B-chromosome evolution. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 355(1394), 163-178.
- Carlson, W. R., & Roseman, R. R. (1992). A new property of the maize B chromosome. *Genetics*, 131(1), 211-223.
- Cooper, J. L., & Henikoff, S. (2004). Adaptive evolution of the histone fold domain in centromeric histones. *Molecular biology and evolution*, 21(9), 1712-1718.
- Cruz-Cárdenas, C. I., Cortés-Cruz, M., Gardner, C. A., & Costich, D. E. (2019). Wild relatives of maize. In *North American Crop Wild Relatives, Volume 2* (pp. 3-39). Springer, Cham.
- Dhar, M. K., Friebe, B., Koul, A. K., & Gill, B. S. (2002). Origin of an apparent B chromosome by mutation, chromosome fragmentation and specific DNA sequence amplification. *Chromosoma*, 111(5), 332-340.
- Du Plessis, J. (2003). *Maize production* (pp. 1-38). Pretoria, South Africa: Department of Agriculture.
- Elisafenko, E. A., Evtushenko, E. V., & Vershinin, A. V. (2021). The origin and evolution of a two-component system of paralogous genes encoding the centromeric histone CENH3 in cereals. *BMC plant biology*, 21(1), 1-20.
- FAO, FAOSTAT statistical database. Dostupné z: www.fao.org/faostat [navštíveno 26.12. 2021].
- Feng, C., Yuan, J., Bai, H., Liu, Y., Su, H., Liu, Y., ... & Han, F. (2020). The deposition of CENH3 in maize is stringently regulated. *The Plant Journal*, 102(1), 6-17.
- Goswami, H. K., Khandelwal, S. (1980): Chromosomal elimination in natural populations of *Ophioglossum*. *Cytologia*, 45(1-2), 77-86.
- Gotoh, K. (1924). Über die Chromosomenzahl von *Secale cereale*, L. *Shokubutsugaku Zasshi*, 38(453), 135-152.
- Haberer, G., Young, S., Bharti, A. K., Gundlach, H., Raymond, C., Fuks, G., ... & Messing, J. (2005). Structure and architecture of the maize genome. *Plant physiology*, 139(4), 1612-1624.
- Hasegawa, N. (1934). A cytological study on 8-chromosome rye. *Cytologia*, 6(1), 68-77.

- Hejduk, S. (2014): Kukuřice setá (*Zea mays* L.). Skládanka, J. a kol. Pícninářství. 1. vyd. str. 19—37
- Hirsch, C. D., Wu, Y., Yan, H., & Jiang, J. (2009). Lineage-specific adaptive evolution of the centromeric protein CENH3 in diploid and allotetraploid *Oryza* species. *Molecular biology and evolution*, 26(12), 2877-2885.
- Houben, A. (2017). B chromosomes—a matter of chromosome drive. *Frontiers in plant science*, 8, 210.
- Houben, A., Banaei-Moghaddam, A. M., Klemme, S., & Timmis, J. N. (2014). Evolution and biology of supernumerary B chromosomes. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 71(3), 467-478.
- Houben, A., Jones, N., Martins, C., & Trifonov, V. (2019). Evolution, composition and regulation of supernumerary B chromosomes. *Genes*, 10(2), 161.
- Houben, A., Kynast, R. G., Heim, U., Hermann, H., Jones, R. N., & Forster, J. W. (1996). Molecular cytogenetic characterisation of the terminal heterochromatic segment of the B-chromosome of rye (*Secale cereale*). *Chromosoma*, 105(2), 97-103.
- Huang, W., Du, Y., Zhao, X., & Jin, W. (2016). B chromosome contains active genes and impacts the transcription of A chromosomes in maize (*Zea mays* L.). *BMC plant biology*, 16(1), 1-14.
- Chen, J., Birchler, J. A., & Houben, A. (2022). The non-Mendelian behavior of plant B chromosomes. *Chromosome Research*, 1-11.
- Chen, Y., Baker, R. E., Keith, K. C., Harris, K., Stoler, S., & Fitzgerald-Hayes, M. (2000). The N terminus of the centromere H3-like protein Cse4p performs an essential function distinct from that of the histone fold domain. *Molecular and cellular biology*, 20(18), 7037-7048.
- Iltis, H. H., & Doebley, J. F. (1980). Taxonomy of *Zea* (Gramineae). II. Subspecific categories in the *Zea mays* complex and a generic synopsis. *American Journal of Botany*, 67(6), 994-1004.
- Jeffers, D. (2004). *Maize diseases: a guide for field identification*. Cimmyt.
- Jin, W., Lamb, J. C., Zhang, W., Kolano, B., Birchler, J. A., & Jiang, J. (2008). Histone modifications associated with both A and B chromosomes of maize. *Chromosome Research*, 16(8), 1203-1214.

- Jones, N., & Houben, A. (2003). B chromosomes in plants: escapees from the A chromosome genome?. *Trends in plant science*, 8(9), 417-423.
- Jones, R. N. (1975). B-chromosome systems in flowering plants and animal species. *International Review of Cytology*, 40, 1-100.
- Jones, R. N. (1995). B chromosomes in plants. *New Phytologist*, 131(4), 411-434.
- Jones, R.N., Rees, H. (1982): B chromosomes. London: Academic Press.
- Kapitonov, V. V., & Jurka, J. (2001). Rolling-circle transposons in eukaryotes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(15), 8714-8719.
- Karimi-Ashtiyani, R., Ishii, T., Niessen, M., Stein, N., Heckmann, S., Gurushidze, M., ... & Houben, A. (2015). Point mutation impairs centromeric CENH3 loading and induces haploid plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(36), 11211-11216.
- Křístková, M. (2009). *Dosavadní zkušenosti s pěstováním geneticky modifikované Bt kukuřice v ČR 2005-2009*. Ministerstvo zemědělství.
- Kuwada, Y. (1925). On the number of chromosomes in maize. *Shokubutsugaku Zasshi*, 39(465), 227-234.
- Levin, D. A., Palestis, B. G., Jones, R. N., & Trivers, R. (2005). Phyletic hot spots for B chromosomes in angiosperms. *Evolution*, 59(5), 962-969.
- Longley, A. E. (1927). Supernumerary chromosomes in *Zea mays*. *J. Agric. Res.* 35: 769-784.
- Mahadeva, A. (2015). Evolution of corn: role of single nucleotide polymorphism. *Current Science*, 109(9), 1544.
- Malik, H. S., & Henikoff, S. (2003). Phylogenomics of the nucleosome. *Nature structural & molecular biology*, 10(11), 882-891.
- Malik, H. S., Vermaak, D., & Henikoff, S. (2002). Recurrent evolution of DNA-binding motifs in the *Drosophila* centromeric histone. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(3), 1449-1454.
- McClintock, B. (1946). Maize genetics.
- Michalcová, Dana. Samčí květenství kukuřice seté [foto]. Štěpánov 2010. In: *Pladias* [online]. [Cit. 21.4.2022]. Dostupné z: <https://pladias.cz/taxon/pictures/Zea%20mays#image5>

- Michalcová, Dana. Samičí květenství kukuřice seté [foto]. Rouchovany 2011. In: *Pladias* [online]. [Cit. 21.4.2022]. Dostupné z: <https://pladias.cz/taxon/pictures/Zea%20mays#image5>
- Mochizuki A. 1960. A note on the B-chromosomes in natural populations of *Aegilops mutica* Boiss. in central Turkey. *Wheat Information Service* 11: 31.
- Nagaki, K., & Murata, M. (2005). Characterization of CENH3 and centromere-associated DNA sequences in sugarcane. *Chromosome research*, 13(2), 195-203.
- Paterson, A. H., Bowers, J. E., & Chapman, B. (2004). Ancient polyploidization predating divergence of the cereals, and its consequences for comparative genomics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(26), 9903-9908.
- Paterson, A. H., Bowers, J. E., Bruggmann, R., Dubchak, I., Grimwood, J., Gundlach, H., ... & Rokhsar, D. S. (2009). The Sorghum bicolor genome and the diversification of grasses. *Nature*, 457(7229), 551-556.
- Pechanova, O., & Pechan, T. (2015). Maize-pathogen interactions: an ongoing combat from a proteomics perspective. *International journal of molecular sciences*, 16(12), 28429-28448.
- Qi, W. Z., Liu, H. H., Liu, P., Dong, S. T., Zhao, B. Q., So, H. B., ... & Zhao, B. (2012). Morphological and physiological characteristics of corn (*Zea mays* L.) roots from cultivars with different yield potentials. *European Journal of agronomy*, 38, 54-63.
- Randolph, L. A. (1928). Types of supernumerary chromosomes in maize. *Anat. Rec.*, 41, 102.
- Randolph, L. F. (1925): Chromosome numbers in *Zea mays* L.. Ithaca, N.Y., Cornell University.
- Randolph, L. F. (1941). Genetic characteristics of the B chromosomes in maize. *Genetics*, 26(6), 608.
- Ranum, P., Peña-Rosas, J. P., & Garcia-Casal, M. N. (2014). Global maize production, utilization, and consumption. *Annals of the new York academy of sciences*, 1312(1), 105-112.
- Rausch, V. R., & Rausch, R. L. (1972). Observations on Chromosomes of *Dicrostonyx torquatus stevensoni* Nelson and Chromosomal Diversity in Varying Lemmings= Untersuchungen an den Chromosomen von *Dicrostonyx torquatus stevensoni* Nelson und chromosomale Unterschiede bei Halsbandlemmingsen.

Referenční sekvence CENH3 [online]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; [1988] –. Accession No. AF519807.2, *Zea mays* centromeric histone H3-like protein mRNA, complete cds; [navštíveno 16. 4 2022]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AF519807.2/>

Rhoades, M. M. (1984). The early years of maize genetics. *Annual review of genetics*, 18(1), 1-30.

Roman, H. (1948). Directed fertilization in maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 34(2), 36.

Roman, H. (1950). Factors affecting mitotic nondisjunction in maize. *Genetics*, 35, 132-33.

Rusche, M. L., Mogensen, H. L., Shi, L., Keim, P., Rougier, M., Chaboud, A., & Dumas, C. (1997). B chromosome behavior in maize pollen as determined by a molecular probe. *Genetics*, 147(4), 1915-1921.

SanMiguel, P., Gaut, B. S., Tikhonov, A., Nakajima, Y., & Bennetzen, J. L. (1998). The paleontology of intergene retrotransposons of maize. *Nature genetics*, 20(1), 43-45.

Schnable, P. S., Ware, D., Fulton, R. S., Stein, J. C., Wei, F., Pasternak, S., ... & Presting, G. G. (2009). The B73 maize genome: complexity, diversity, and dynamics. *science*, 326(5956), 1112-1115.

Stark, E. A., Connerton, I., Bennett, S. T., Barnes, S. R., Parker, J. S., & Forster, J. W. (1996). Molecular analysis of the structure of the maize B-chromosome. *Chromosome Research*, 4(1), 15-23.

Strable, J., & Scanlon, M. J. (2009). Maize (*Zea mays*): a model organism for basic and applied research in plant biology. *Cold spring harbor protocols*, 2009(10), pdb-emo132.

Su, H., Liu, Y., Liu, Y., Birchler, J. A., & Han, F. (2018). The behavior of the maize B chromosome and centromere. *Genes*, 9(10), 476.

Špaldon E., Andraščík M., Bechyně M., Belej J., Fric V., Fuciman L., Hruška L., Krausko A., Petr J., Rybáček V., Škula K., Váša F., Votoupal B., Vrzalová J., 1986: Rostlinná výroba. Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 714 s.

Talbert, P. B., Masuelli, R., Tyagi, A. P., Comai, L., & Henikoff, S. (2002). Centromeric localization and adaptive evolution of an Arabidopsis histone H3 variant. *The Plant Cell*, 14(5), 1053-1066.

Vujošević, M., Rajčić, M., & Blagojević, J. (2018). B chromosomes in populations of mammals revisited. *Genes*, 9(10), 487.

Wilson, E. B. (1909). Studies on chromosomes. V. The chromosomes of *Metapodius*. A contribution to the hypothesis of the genetic continuity of chromosomes. *Journal of Experimental Zoology*, 6(2), 147-205.

Yang, L., & Bennetzen, J. L. (2009). Structure-based discovery and description of plant and animal Helitrons. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(31), 12832-12837.

Yuan, J., Guo, X., Hu, J., Lv, Z., & Han, F. (2015). Characterization of two CENH 3 genes and their roles in wheat evolution. *New Phytologist*, 206(2), 839-851.

Zhong, C. X., Marshall, J. B., Topp, C., Mroczek, R., Kato, A., Nagaki, K., ... & Dawe, R. K. (2002). Centromeric retroelements and satellites interact with maize kinetochore protein CENH3. *The Plant Cell*, 14(11), 2825-2836.

Zimolka, J. (2008). *Kukuřice: hlavní a alternativní užitkové směry*. Profi Press.