

Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta

Katedra buněčné biologie a genetiky



**Analýza dvou typů mobilních elementů
vykazujících kontrastní FISH lokalizaci v
genomech druhů *Festuca* sp. a *Lolium* sp.**

Diplomová práce

Bc. Veronika Kapustová

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

Olomouc 2017

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

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením vedoucí práce a s použitím odborné literatury.

V Olomouci dne

.....

Veronika Kapustová

Souhrn

Předkládaná diplomová práce se věnuje analýze dvou mobilních elementů, které vykazovaly kontrastní lokalizaci po fluorescenční *in situ* hybridizaci v genomu kostřavy luční (*Festuca pratensis*). Hlavním cílem bylo objasnit, zda se tyto dva mobilní elementy vyskytují i v blízkce příbuzných druzích kostřav a jílků, respektive u příbuzných obilovin.

Teoretická část této práce se zabývá základní charakteristikou čeledi *Poaceae*, se zaměřením na rody *Festuca* a *Lolium*, a strukturou genomu této čeledi. Dále se věnuje repetitivním sekvencím DNA, jejich funkcím v jaderném genomu a jejich využití. V neposlední řadě je popsáno cytogenetické mapování, jako stěžejní molekulárně biologická metoda, využitá v této práci pro identifikaci organizace dvou studovaných mobilních elementů v jaderném genomu.

Experimentální část práce představovala částečnou analýzu sekvencí *in silico*, kdy byly identifikovány sekvence homologní k již dříve popsaným elementům CL4 (DNA transpozón nadrodiny CACTA) a CL38 (pravděpodobný LTR element). Součástí této analýzy byla především identifikace dlouhých sekvencí obsahujících kódující domény a jejich využití pro podrobnou charakterizaci těchto repetitivních elementů u několika zástupců rodů *Festuca* a *Lolium* a některých dalších zástupců čeledi *Poaceae*. V neposlední řadě bylo provedeno cytogenetické mapování vybraných mobilních elementů u studovaných druhů s cílem zjistit jejich lokalizaci v jaderném genomu. Pro cytogenetické mapování bylo využito metody vícebarevné fluorescenční *in situ* hybridizace na metafázních chromozómech.

Na základě provedených analýz byly oba typy studovaných mobilních elementů identifikovány ve všech analyzovaných druzích. U elementu, který byl dříve popsán jako pravděpodobný LTR retrotranspozón, byly identifikovány dostatečně dlouhé kontigy, nesoucí kódující domény, díky nimž se jednoznačně podařilo charakterizovat tento retroelement jako *Cereba*-like retrotranspozón z rodiny *Ty3/Gypsy*, skupiny *Chromoviridae*. Cytogenetické mapování potvrdilo velmi podobnou lokalizaci studovaných elementů nejen u blízkce příbuzných druhů kostřav a jílků, ale také u vzdálenějších zástupců obilovin.

Summary

The diploma thesis is dealing with analysis of two mobile elements which were differentially localized after fluorescence *in situ* hybridization in the genome of *Festuca pratensis*. The main aims were to find out presence of these mobile elements in closely related species of fescues and ryegrasses, as well as in related grain species.

Theoretical part of this thesis is focused on general characteristics of the family *Poaceae*, especially on the genera *Festuca* and *Lolium*, and genome structure of this family. Furthermore, it is dealing with repetitive DNA sequences, their function in nuclear genomes of plants and their use. Other part focuses on cytogenetic mapping, as the main method used in this thesis to identify the organization of analyzed mobile repetitive elements in nuclear genome.

Experimental part of the thesis described partial *in silico* analysis of the chosen mobile elements, identification of homologous sequences in related species and use of coding domains for detailed characterization of respected elements in selected representatives of the genera *Festuca* and *Lolium* and some other members of the family *Poaceae*. Finally, cytogenetic mapping of the chosen mobile elements in the studied species was performed using multicolor fluorescence *in situ* hybridization on metaphase chromosomes.

The analyzed repetitive elements were identified in all studied species. Using homology searches, long sequence contigs representing putative LTR retrotransposon CL38 were identified and their coding domains enabled further characterization of this DNA repetitive element as a *Cereba*-like representative of *Ty3/Gypsy Chromoviridae* family. Cytogenetic mapping confirmed very similar pattern of the elements in all closely related species of fescues and ryegrasses, as well as in nuclear genomes of selected cereals.

Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala především své školitelce Mgr. Evě Hřibové, Ph.D. za ochotu, lidský přístup, cenné rady a věnovaný čas v průběhu celé diplomové práce. Mé díky patří také celému kolektivu Centra strukturní a funkční genomiky rostlin, Ústavu experimentální botaniky AV ČR, a to za jejich ochotu kdykoli pomoci a poradit.

Obsah

1 ÚVOD	8
2 CÍLE PRÁCE.....	9
3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	10
3.1 Význam rodů <i>Festuca</i> L. a <i>Lolium</i> L.	10
3.2 Struktura genomu u čeledi <i>Poaceae</i>.....	13
3.3 Repetitivní sekvence DNA u rostlin	14
3.3.1 Funkce repetitivních sekvencí DNA v jaderném genomu	15
3.3.2 Využití repetitivních sekvencí DNA	17
3.4 Struktura genomu - cytogenetické mapování <i>Loliinae</i>	21
3.4.1 Lokalizace tandemových repetitivních sekvencí.....	21
3.4.2 Lokalizace mobilních elementů	22
3.4.2.1 DNA transpozóny	22
3.4.2.1.1 CACTA elementy	23
3.4.2.1.2 Retrotranspozóny	24
4 MATERIÁLY A METODIKA	27
4.1 Materiál	27
4.1.1 Biologický materiál.....	27
4.1.2 Použité chemikálie a kity	27
4.1.3 Roztoky	29
4.1.4 Přístroje	31
4.1.5 Software	33
4.2 Metodika.....	33
4.2.1 Identifikace kontigů nesoucích homologii k vybraným mobilním elementům	33
4.2.2 Fylogenetická analýza vybraných elementů.....	34
4.2.3 Roztlakové preparáty	35
4.2.4 Izolace genomové DNA.....	36
4.2.5 Příprava sond	36
4.2.6 Ověření sond	38
4.2.7 Fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace.....	38
5 VÝSLEDKY	40
5.1 Identifikace a charakterizace sekvencí homologních k DNA transpozónu CL4	40
5.2 Identifikace a charakterizace sekvencí homologních k LTR elementu CL38.....	43
5.3 Ověření sond	46

5.4 Cytogenetická lokalizace DNA transpozónu a centromerického LTR elementu	48
5.4.1 Lokalizace DNA transpozónu CL4 z nadrodiny CACTA.....	48
5.4.2 Lokalizace <i>Ty3/Gypsy</i> retrotranspozónu CL38.....	48
5.4.3 Lokalizace rRNA genů.....	49
6 DISKUZE	56
7 ZÁVĚR.....	60
8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	61
9 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	78

1 Úvod

Čeďed' *Poaceae* je velmi početná a divergovaná skupina, zahrnující trávy, obiloviny i další druhy významné jak pro člověka, tak zvířata. Ekonomický a ekologický význam zástupců čeďedi *Poaceae* vedl mimo jiné k širokému zájmu charakterizovat genomy těchto druhů. Tato čeďed' zahrnuje druhy s velkými genomy, které obsahují vysoké procento repetitivních DNA sekvencí, které stěžují celogenomové sekvenování těchto druhů.

Dříve byla repetitivní DNA považována za tzv. ‚odpadní‘ DNA, později však bylo objeveno, že plní mnoho důležitých funkcí v jaderném genomu. Repetice jsou součástí telomer a centromer, které zajišťují správnou replikaci jaderného genomu a jeho přenos do dceřiných buněk. Geny kódující ribozomální RNA mají také charakter repetitivní DNA, uspořádané do tandemů. Nejpočetnějšími repeticemi jsou mobilní elementy, schopné pohybovat se v jaderném genomu procesem transpozice. Transponovatelné elementy se můžou v genomech pohybovat prostřednictvím DNA meziproductů (transpozóny I. třídy) nebo RNA meziproductů (transpozóny II. třídy).

Repetitivní DNA sekvence představují rychle se vyvíjející sekvence DNA, vhodné jako zdroj molekulárních markerů, na rozdíl od konzervovaných genových sekvencí, které jsou neustále pod selekčním tlakem. Existuje mnoho typů molekulárních markerů, odvozených od repetitivních DNA sekvencí, včetně mikrosatelitů a dalších. Repetice jsou široce využívány i jako cytogenetické markery, které mohou být druhově i chromozómově specifické.

2 Cíle práce

1. Vypracovat literární rešerši na dané téma.
2. Identifikovat a charakterizovat sekvence homologní k DNA transpozónu CL4 a pravděpodobnému LTR retrotranspozónu CL38 a jejich fylogenetická analýza.
3. Přípravit a ověřit sílu sond pro cytogenetické mapování.
4. Cytogenetická lokalizace DNA elementů na mitotické chromozómy metodou fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH).

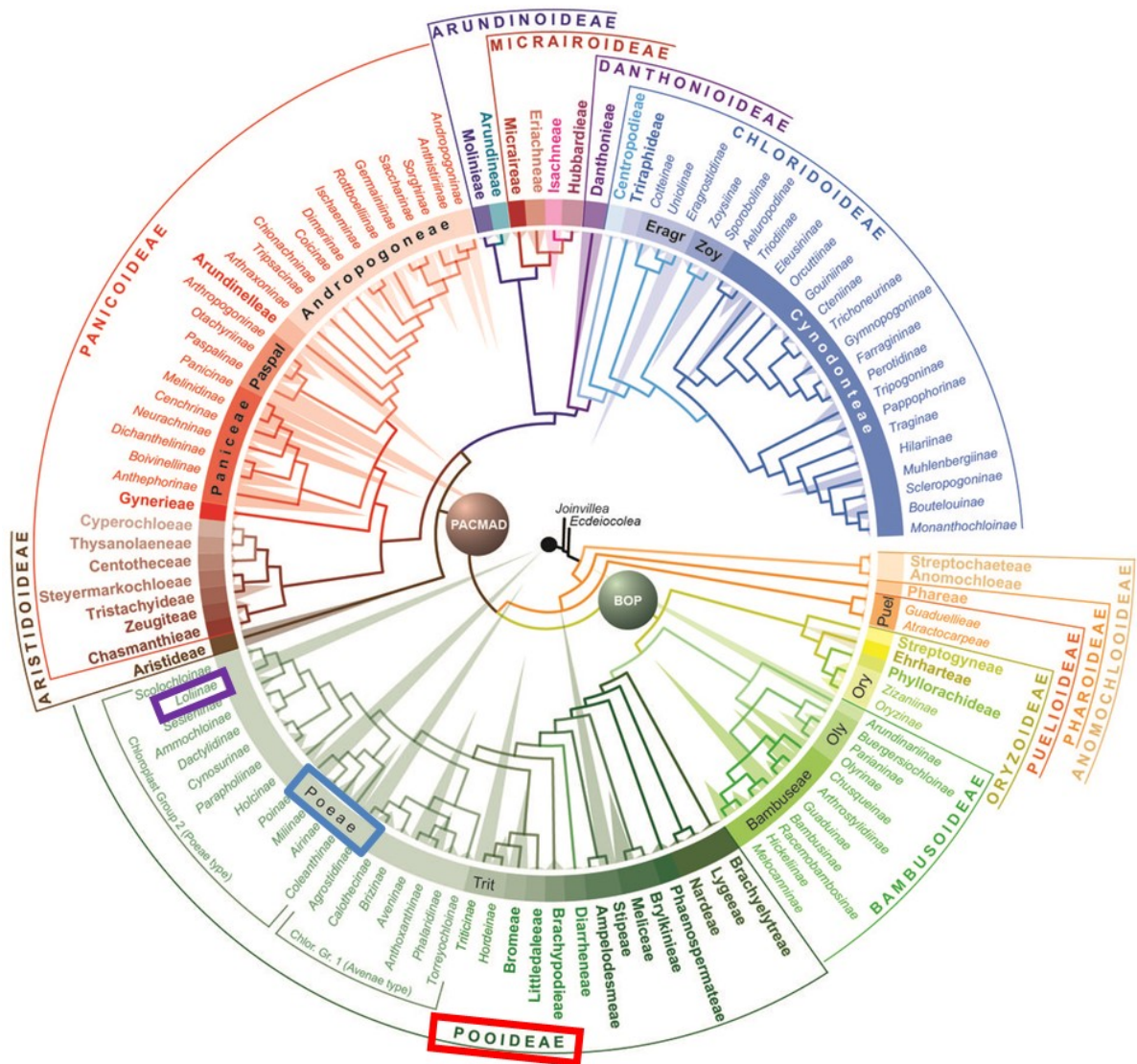
3 Současný stav řešené problematiky

3.1 Význam rodů *Festuca* L. a *Lolium* L.

Zástupci čeledi lipnicovité (*Poaceae*), a to především obiloviny, trávy, bambus a cukrová třtina, mají zásadní význam pro světovou ekonomiku (Grass Phylogeny Working Group *et al.*, 2001). Zástupci této čeledi se vyskytují prakticky ve všech pevninských biotopech a zabírají až jednu pětinu pevniny (Grass Phylogeny Working Group *et al.*, 2001). *Poaceae* je relativně divergovaná skupina rostlin, zahrnující asi 10 000 druhů zařazených do více než 700 rodů (Grass Phylogeny Working Group *et al.*, 2001). Na základě fylogenetické analýzy byla navržena klasifikace čeledi *Poaceae* na 12 podčeledí (*Anomochlooideae*, *Aristidoideae*, *Arundinoideae*, *Bambusoideae*, *Chloridoideae*, *Danthonioideae*, *Micraioideae*, *Oryzoideae*, *Panicoideae*, *Pharoideae*, *Puelioideae* a *Pooideae*), 6 nadoddělení, 51 oddělení, a 80 pododdělení (Obr. 1) (Soreng *et al.*, 2015). Do podčeledi *Pooideae* jsou řazeny veškeré trávy, obiloviny a další významné rostliny, včetně čtyř zemědělsky nejdůležitějších a nejpěstovanějších plodin na Zemi – rýže, kukuřice, pšenice a cukrové třtiny (Devos, 2010; Soreng *et al.*, 2015).

Trávy patří do oddělení *Poeae* (Obr. 1) a jde o nejdůležitější a široce pěstované rostliny na Zemi, které odhadem zabírají dvakrát více plochy než nejpěstovanější plodiny. V Evropě je 50% hospodářské krajiny pokryto trávami, což přispívá z velké části roční produkci mléka a hovězího masa. Trávy jsou široce využívány jako trávničky a pro okrasné účely a mají významnou roli v ochraně půdy a zdrojů životního prostředí (Kopecký *et al.*, 2009).

Zástupci blízké příbuzných rodů kostřava (*Festuca* L.) a jílek (*Lolium* L.), řadí se do pododdělení *Loliinae* (Obr. 1), patří mezi nejvíce studované trávy (Jauhar, 1993). Rod *Festuca* je jeden z nejpočetnějších v čeledi *Poaceae* s téměř 500 druhy, jejichž ploidie může nabývat hodnot od 2x až po 12x (Kopecký *et al.*, 2009). Na druhou stranu rod *Lolium* zahrnuje pouze osm diploidní druhů (Kopecký *et al.*, 2009).



Obr. 1 Fylogenetický strom čeledi *Poaceae* sestavený metodou maximum likelihood vytvořený s využitím nukleotidové sekvence dvou plastidových DNA markerů - *matK* a *ndhF* (převzato ze Soreng *et al.*, 2015). Podčeleď *Pooideae* je označena červeně, oddělení *Poeae* modře a pododdělení *Loliinae* fialově.

Na základě fylogenetické analýzy byly v rámci rodu *Festuca* rozlišeny dvě hlavní vývojové linie – širokolisté a úzkolisté košťavy (Charmet *et al.*, 1997; Torrecilla *et Catalán*, 2002). Podrod *Schedonorus*, zahrnující některé důležité druhy, se řadí do širokolistých košťav. Již v minulosti byla pomocí chromozomových analýz a umělých křížení zjištěna příbuznost zástupců rodu *Lolium* a širokolistých košťav z podrodu *Schedonorus* (Jenkin, 1933; Malik *et Thomas*, 1966), později byla jejich příbuznost dokázána i pomocí fylogenetických analýz (Torrecilla *et Catalán*, 2002; Catalán *et al.*, 2004). Navíc existují důkazy, že *Lolium* je relativně nový rod, který se pravděpodobně vyvinul z evropského předka

podrodu *Schedonorus* (Jenkin, 1933; Catalán *et al.*, 2004). Fakt, že je *Lolium* vývojově relativně mladý rod, může být vysvětlením, proč v průběhu evoluce u rodu *Lolium* nedocházelo k polyploidizaci, přestože u rodu *Festuca* hrála významnou roli (Jauhar, 1993).

Rody *Festuca* a *Lolium* zahrnují vysoce produktivní, výživné, vytrvalé a dobře adaptované druhy, které jsou široce využívány pro zemědělské a rekreační účely. Mezi agronomicky významné zástupce rodu *Festuca* patří především diploidní kostřava luční (*Festuca pratensis* Huds.), vytrvalá tráva, která dobře snáší abiotický stres, a vyznačuje se dobrou produkcí semen ke konci léta, dále pak hexaploidní kostřava rákosovitá (*Festuca arundinacea* Schreb.), která je vytrvalá a roste brzy na jaře. Z rodu *Lolium* jsou nejvýznamnějšími druhy jílek mnohokvětý (*Lolium multiflorum* L.), který se vyznačuje rychlým klíčením, dobrou produkcí semen, brzkým jarním růstem a rychlým zotavením po odlistění, a jílek vytrvalý (*Lolium perenne* L.), který vyniká především svou vytrvalostí, velkou hustotou postranních výhonů a odolností vůči sešlapávání (Jauhar, 1993).



Obr. 2 Kostřava luční (*Festuca pratensis* Huds.) a jílek mnohokvětý (*Lolium multiflorum* Lam.) (převzato a upraveno z Polívka, 1902)

Kostřavy a jílky byly po mnoho let používány ve šlechtění, což vedlo ke vzniku kvalitnějších odrůd těchto druhů, které svými vlastnostmi překonaly své předky (Kopecký *et al.*, 2009). Kromě šlechtění odrůd kostřav a jílek byl šlechtiteli vyvinut i mezirodový hybrid *Festulololium*, který kombinuje kýžené zemědělské vlastnosti obou rodů (Jauhar, 1993).

3.2 Struktura genomu u čeledi *Poaceae*

V čeledi *Poaceae* existují významné rozdíly ve velikosti genomu u jednotlivých druhů. Druhem s největším genomem je oktoploidní *Triticale*, hybrid vzniklý křížením pšenice a žita, jehož velikost genomu (1C) je více než 25 Gbp. Zatímco nejmenší genom o velikosti 245 Mbp (1C) má *Oropetium thomaeum* (Bennett et Leitch, 2012 (<http://www.kew.org/cvalues/>)). Zástupci rodu *Festuca* mají genomy různých velikostí, které nabývají hodnot (1C) od 1,9 Gbp (*Festuca arvernensis*) do 12,5 Gbp (*Festuca summilusitana*). Nejvýznamnější druhy *Festuca pratensis* a *Festuca arundinacea* mají genom o velikosti (1C) cca 2 Gbp, resp. 4 Gbp. Zástupci rodu *Lolium* mají velikost genomu (1C) v rozsahu cca 2,1 Gbp (*Lolium canariense*) až 3,1 Gbp (*Lolium persicum*). Přičemž *Lolium perenne* a *Lolium multiflorum* mají genom velký (1C) shodně asi 2,7 Gbp (Bennett et Leitch, 2012 (<http://www.kew.org/cvalues/>)).

Ekonomický význam plodin hrál jistě podstatnou roli při soustředování celogenomového sekvenování na čeleď *Poaceae*. Již několik druhů z čeledi *Poaceae* bylo plně sekvenováno, což umožnilo nahlédnout do organizace a evoluce genomů této čeledi. Jako první z čeledi *Poaceae* byly plně sekvenovány v roce 2002 genomy dvou poddruhů rýže seté (*Oryza sativa* L. ssp. *indica* a *Oryza sativa* L. ssp. *japonica*) (Goff et al., 2002; Yu et al., 2002). V roce 2009 byla publikována celogenomová sekvence kukuřice seté (*Zea mays* L.) (Schnable et al., 2009) a čiroku dvoubarevného (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) (Paterson et al., 2009). *Brachypodium distachyon* byl první osekvenovaný zástupce z podčeledi *Pooideae*, do které patří hlavní obiloviny (pšenice, ječmen, žito, oves) i trávy ze skupiny *Loliineae*, včetně rodů *Festuca* a *Lolium* (International Brachypodium Initiative, 2010). Počet genů se velmi neliší mezi jednotlivými druhy a bývá většinou kolem 28 000 na haploidní genom. Shodně i počet genových rodin je podobný u různých druhů (Devos, 2010). Obrovské množství genomu zaujímají repetitivní sekvence DNA, a to až více než 80%. Jedná se především o disperzní repetice, představované především transponovatelnými elementy – retrotranspozóny a DNA transpozóny. V genomech nebývají všechny rodiny transpozónů zastoupeny stejně, ale časté je, že se zvětšování velikosti genomu děje v důsledku relativně krátkých období intenzivní aktivity pouze několika specifických DNA elementů (Devos, 2010). Celogenomové sekvence ukázaly, že obsah retrotranspozónů pravděpodobně koreluje s velikostí genomu. *Brachypodium distachyon* (~350 Mbp) má asi 23 % genomu tvořeno retrotranspozóny (International Brachypodium Initiative, 2010), u čiroku (~730 Mbp) to činí asi 55 % (Paterson et al., 2009) a u kukuřice (~2,7 Gbp) to dosahuje až asi 76 % (Schnable et

al., 2009). Na rozdíl od retrotranspozónů, obsah DNA transpozónů není závislý na velikosti genomu. U kukuřice se většina DNA transpozónů vyskytuje v oblastech bohatých na geny, což ale neplatí pro CACTA elementy (Schnable *et al.*, 2009). Komparativní genomika ukázala, že geny a repetitivní DNA sekvence jsou uspořádány rozdílně v závislosti na velikosti genomu. Pro malé genomy je typické zřetelné rozdělení euchromatinových oblastí bohatých na geny a na geny chudých pericentromerických oblastí. Tento jev se u velkých genomů vyskytuje v mnohem menší míře, protože mnoho repetitivních jevů je rozptýleno mezi jednotlivými geny nebo genovými ostrovy (Devos, 2010).

3.3 Repetitivní sekvence DNA u rostlin

Již ke konci 60. let minulého století bylo objasněno, že rostliny s velkými genomy obsahují vysoké procento repetitivních sekvencí DNA (Britten *et Kohne*, 1968).

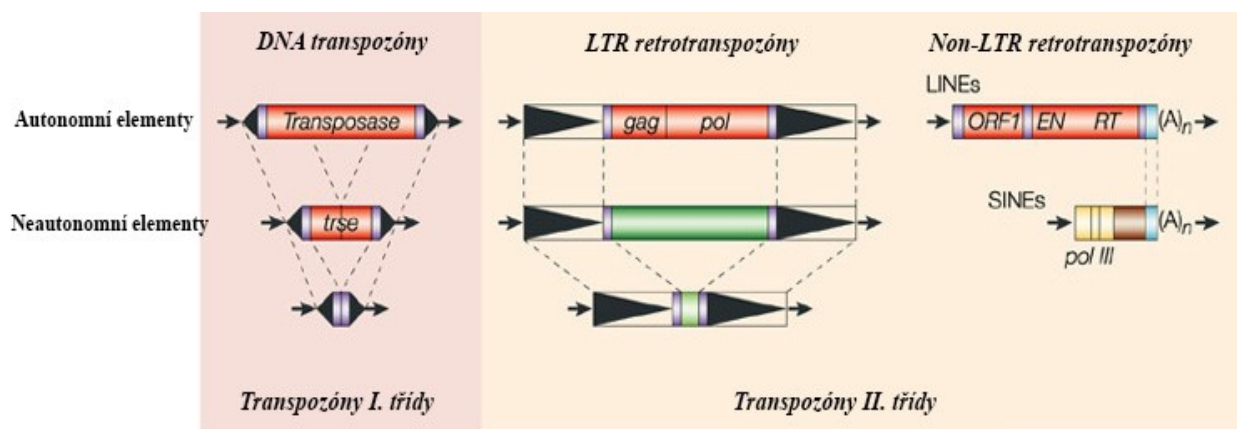
Na základě jejich organizace v genomu rozlišujeme dva hlavní typy repetitivní DNA, a to rozptýlené a tandemové repetice.

Tandemové repetice se skládají z opakujících se repetitivních jednotek, které jsou přímo přilehlé k sobě (uspořádány v tandemu). Tautz (1993) se pokusil vyřešit chaos v názvosloví tandemových repetitivních jednotek a na základě délky repetitivní jednotky rozlišil tři skupiny – mikrosatelity, minisatelity a satelitní DNA. Satelitní DNA se mohou skládat z repetitivních jednotek o délce až několika tisíc párů bází. Minisatelity obsahují repetitivní jednotky o délce do 100 bp. A mikrosatelity jsou tandemové repetice s monomery o délce 1 – 6 bp. Toto rozdělení však není jednoznačné. Existuje satelitní DNA, jejíž opakující se jednotky mají méně než 100 bp. Tandemové repetice se dělí také podle jejich četnosti v genomu, pozice na chromozomech nebo jejich funkce.

Rozptýlené repetice představují různé typy mobilních elementů, jejichž významnou vlastností je schopnost pohybovat se v jaderných genomech procesem transpozice. Na základě charakteru meziproductu transpozice se rozlišují dvě hlavní třídy mobilních elementů – transponovatelných elementů (Obr. 3). Transpozóny I. třídy, neboli DNA transpozóny, se v genomu pohybují přes DNA meziproduct. Ve své struktuře obsahují obrácené koncové repetice (TIR) a zdvojení cílového místa (TSD). Transpozóny II. třídy, neboli retroelementy, se pohybují v genomu přes RNA meziproduct, který je kódovaný přímo samotným elementem (Feschotte *et al.*, 2002). Takový retroelement se přepíše do RNA, poté dojde k reverzní transkripci této molekuly, a nakonec se nová kopie retroelementu reintegruje zpět do genomu. Retroelementy mají tedy ve všech případech duplikativní charakter (Kazazian,

2004). Transpozóny II. třídy se dělí na dvě podskupiny na základě jejich struktury a mechanismu transpozice. LTR retrotranspozóny obsahují ve své struktuře dlouhé koncové repetice (LTR) a zdvojení cílového místa (TSD). Autonomní LTR retrotranspozóny obsahují alespoň dva geny, *gag* a *pol*. Gen *gag* kóduje kapsidové proteiny a gen *pol* kóduje polyprotein zodpovědný za aktivitu všech nezbytných enzymů – proteázy, reverzní transkriptázy, RNázy H a integrázy (Feschotte *et al.*, 2002). Vzhledem k přítomnosti těchto genů jsou LTR retrotranspozóny podobné retrovirům. Od těch se však liší tím, že nejsou schopny se pohybovat z buňky do buňky, protože jim chybí funkční gen *env*, zodpovědný za tvorbu proteinového obalu retrovirů (Kazazian, 2004). Neautonomní LTR retrotranspozóny postrádají většinu nebo úplně všechny kódující sekvence. Druhé skupině retroelementů ve struktuře chybí dlouhé koncové repetice a patří mezi ně dva typy elementů – LINE a SINE.

Aktivní elementy však tvoří pouze velmi malou část genomu většiny mnohobuněčných organismů (Feschotte *et al.*, 2002). MITE (miniature inverted-repeat transposable elements) elementy, skupina DNA transpozónů, a LTR retrotranspozóny se vyskytují ve velkém počtu kopií v rostlinných genomech a významně přispěly k diverzifikaci rostlinných genomů (Feschotte *et al.*, 2002).

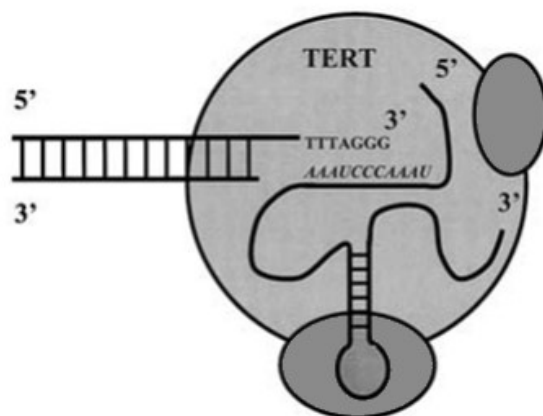


Obr. 3 Struktura mobilních elementů (převzato a upraveno z Feschotte *et al.*, 2002)

3.3.1 Funkce repetitivních sekvencí DNA v jaderném genomu

Vzhledem k repetitivní povaze telomerických a centromerických oblastí a genů kódujících rRNA geny, jsou repetitivní sekvence DNA bezesporu nepostradatelné pro správné fungování genomu. Je zřejmé, že jsou nezbytné jako signály pro regulaci exprese kódujících sekvencí a hrají významnou roli při replikaci genomu a jeho přenosu do dceřiných buněk (Shapiro *et von Sternberg*, 2005).

V roce 1988 byla izolována první rostlinná telomerická sekvence, a to z huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) (Richards *et al.*, 1988). Telomerická sekvence *Arabidopsis thaliana* se skládá z tandemově se opakujících sekvencí 5'-C(C/T)CTAAA-3'. Později se ukázalo, že tato heptanukleotidová sekvence tvoří i telomery dalších druhů z různých čeledí vyšších rostlin, což signalizuje, že je tento typ telomerických repetice vysoce konzervovaný, a předpokládá se, že představuje hlavní telomerické repetice vyšších rostlin (Fuchs *et al.*, 1995). Funkce telomer byla objasněna spolu s objevem telomerázy. Telomeráza je ribonukleoproteinový enzym, syntetizující telomerické sekvence, které chrání DNA proti zkracování a brání stárnutí buněk. Telomeráza se skládá ze dvou komponent – sekvence RNA a samotného enzymu, telomerázové reverzní transkriptázy. Sekvence RNA je komplementární k telomerické sekvenci a slouží tak jako templát pro jejich syntézu (Greider *et al.*, 1985; Blackburn, 1991).

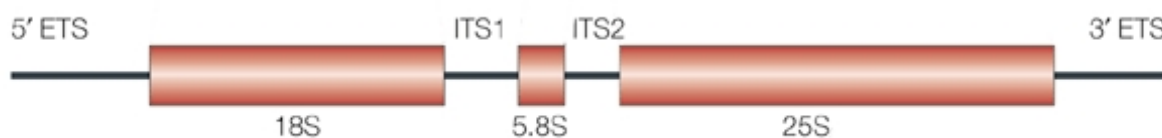


Obr. 4 Telomera s připojenou telomerázou (převzato a upraveno z McKnight *et al.*, 2002)

Centromery jsou chromozomální struktury zodpovědné za správné rozdělení replikovaných chromozómů do dceřiných buněk během mitotického i meiotického buněčného dělení (Carbon, 1984). U všech eukaryotických organismů centromery zodpovídají za kohezi chromatid od S-fáze až po anafázi, připojení vláken dělicího vřeténka během metafáze a za pohyb chromozómů během rané metafáze a v anafázi. Na aktivních centromerách se sestavují proteinové kinetochory, které umožňují pohyb chromozómů. Na rozdíl od telomer, centromery nejsou tvořeny vysoce konzervovanými repetitivními sekvencemi (Houben *et al.*, 2003). Centromericky specifické repetice však byly identifikovány u některých rostlin. Například u *Arabidopsis thaliana* je centromerická oblast tvořena 178 bp dlouhými opakujícími se tandemovými repeticemi spolu s vmezeřenými úseky *Ty3/Gypsy* retrotranspozónu *Athila* (Kumekawa *et al.*, 2000; Kumekawa *et al.*, 2001a; Hosouchi *et al.*,

2002). U obilovin byly objeveny dvě konzervované centromericky specifické repetice – CCS1 (Aragón-Alcaide *et al.*, 1996) a pSau3A9 (Jiang *et al.*, 1996). Později bylo zjištěno, že obě tyto repetice představují části *Ty3/Gypsy* retroelementu (Presting *et al.*, 1998; Hudakova *et al.*, 2001). Jednotným rysem většiny eukaryotických centromer je přítomnost proteinu CENP-A, centromerické varianty histonu H3. Nicméně nedávné studie naznačují, že specifické sekvence DNA mohou přispívat k funkci centromer (McKinley *et al.*, 2016).

Podobně jako telomerické sekvence, mají i geny kódující ribozomální RNA povahu tandemové repetice. 45S rDNA lokus rostlin obsahuje tandemově se opakující geny pro 18S, 5.8S a 25S rRNA, přičemž každá repetitivní jednotka se transkribuje vcelku (Rogers *et al.*, 1987). Geny pro 45S rRNA jsou většinou lokalizovány v oblasti organizátoru jadérka, která je pozorovatelná jako sekundární konstriktce (Sousa *et al.*, 2011).



Obr. 5 Organizace 45S rDNA lokusu (převzato a upraveno z Lafontaine *et al.*, 2001)

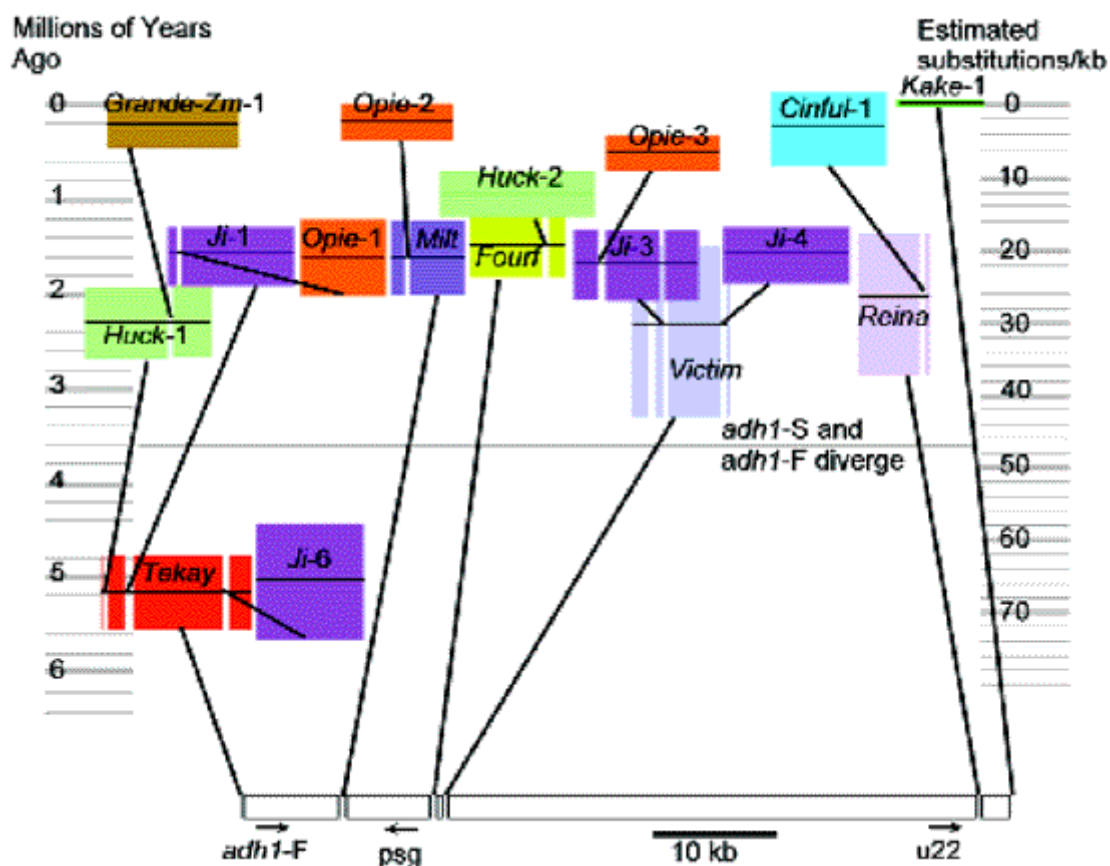
U většiny eukaryot se geny pro 5S rRNA vyskytují v genomu odděleně od genů pro ostatní ribozomální RNA. Geny pro 5S rRNA existují ve formě tandemových repetic, které jsou vzájemně odděleny mezerníky. U různých organismů se může vyskytovat jeden či více 5S rDNA lokusů (Long *et al.*, 1980).

Repetitivní DNA má v genomu ale i další funkce. Repetice byly objeveny jako součást regulačních sekvencí - promotorů a enhancerů (Ott *et al.*, 1996; Foster *et al.*, 2003; Santi *et al.*, 2003). Mobilní elementy jsou součástí oblastí asociovaných s jadernou matrix (MARs), které jsou zodpovědné za přichycení DNA k matrix jádra (Avramova *et al.*, 1998). Bylo zjištěno, že repetitivní sekvence hrají roli i při metylaci DNA (Müller *et al.*, 2002) a jsou součástí heterochromatinu (Pélissier *et al.*, 1996; Ananiev *et al.*, 1998).

3.3.2 Využití repetitivních sekvencí DNA

Dřívější studie ukázaly, že počet genů se významně neliší mezi jednotlivými druhy, a za diverzifikací genomů rostlin tak stojí repetitivní sekvence DNA (Devos, 2010). Názorným příkladem, jak repetice způsobují přestavby genomu, je kukuřice. Amplifikace několika rodin LTR retrotranspozónů zapříčinila zvojnásobení genomu kukuřice za posledních 6 miliónů let (SanMiguel *et al.*, 1998). K datování stáří jednotlivých typů LTR retrotranspozónů se využívá

právě nukleotidových sekvencí dlouhých koncových repetit (LTR oblastí), které jsou typické vysokou variabilitou na úrovni DNA (Obr. 6).



Obr. 6 Časové rozmístění retrotranspozónů v oblasti *adh1-F* u kukuřice (převzato ze SanMiguel *et al.*, 1998)

Nižší míra selekce a vysoká rychlost evoluce repetitivních sekvencí DNA, v porovnání s konzervovanými genovými sekvencemi DNA, činí z repetit velmi dobrý zdroj molekulárních markerů.

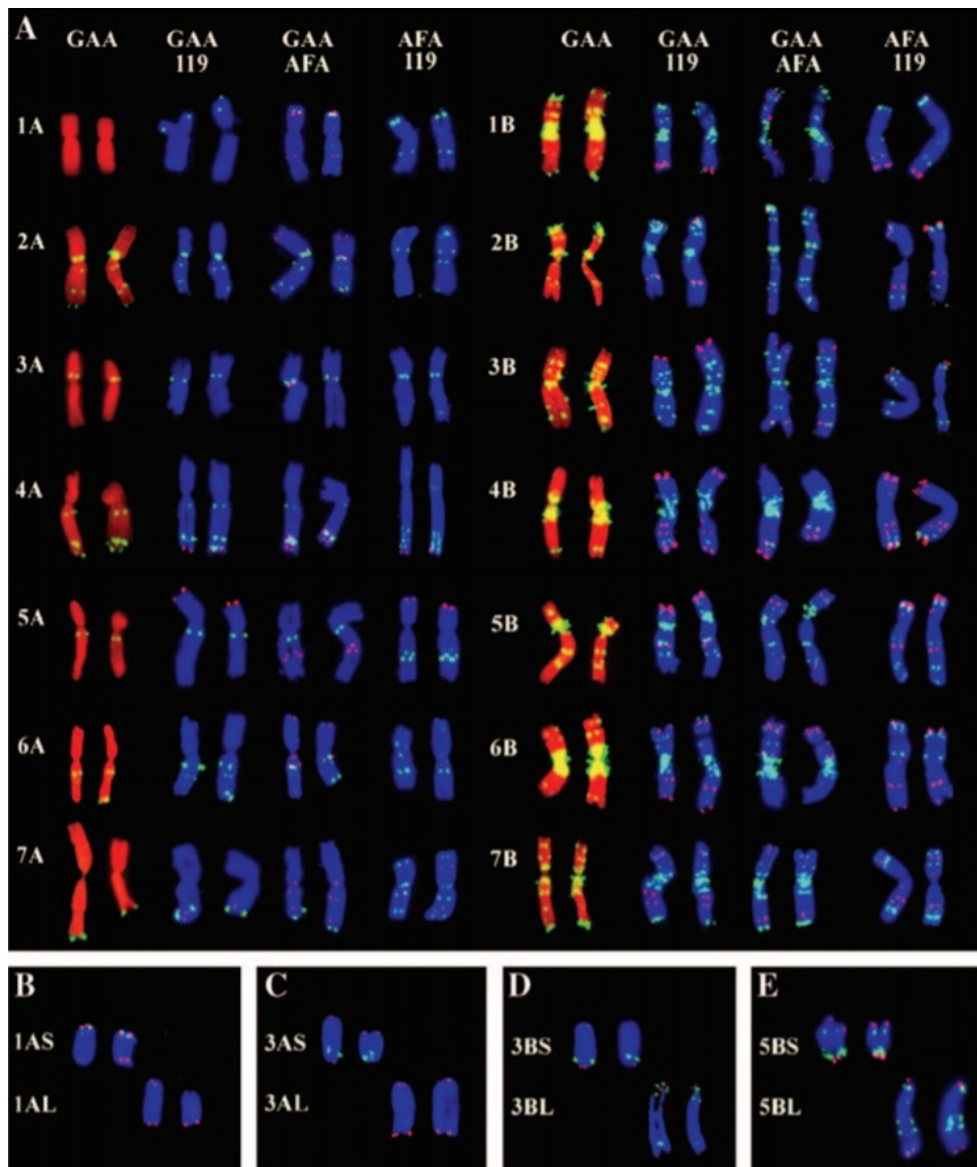
Mikrosatelity jsou široce využívány jako genetické markery. Jsou typické tím, že se dědí kodominantně, a většinou jsou chomozómově specifické, což je výhodné pro polyploidní genomy, jako například pšenici setou (*Triticum aestivum* L). Takovéto markery jsou pak vhodné pro mapování agronomicky důležitých genů nebo kvantitativních znaků (Röder *et al.*, 1998). Röder *et al.* (1998) například sestrojili první genetickou mapu pšenice seté založenou na mikrosatelitech. V roce 2004 bylo v genomu pšenice identifikováno 74 mikrosatelitových markerů, odvozených z EST (expressed sequence tags) databází, které vykazovaly významnou podobnost se známými geny, zapojenými do různých procesů, včetně metabolismu, rezistence vůči stresu, transkripce, vývoje, atd (Gao *et al.*, 2004). *In silico* komparativní analýza mikrosatelitových markerů z ječmene, odvozených z EST databází, a

dat z žita, pšenice a rýže naznačují, že se ve zkoumaných druzích vyskytují ortologové testovaných markerů (Varshney *et al.*, 2005). Varshney *et al.* (2005) ukázali, že genetické mapy obilovin, obsahující menší množství markerů, mohou být obohaceny o mikrosatelitové markery ječmene. Typické je využívání mikrosatelitových markerů pro mapování významných genů či lokusů, asociovaných s různými nemocemi (Su *et al.*, 2006; Hiebert *et al.*, 2007; Tyrka *et al.*, 2008).

Kromě mikrosatelitových markerů se využívají další typy molekulárních markerů založených na repetičích – např. minisatelity (Latif *et al.*, 2011), ISSR (Inter-simple sequence repeats) markery, založené na polymorfismu sekvencí mezi dvěma mikrosatelity (Godwin *et al.*, 1997), ISBP (Insertion site-based polymorphism) markery, založené na polymorfismu místa inzerce mobilního elementu (Paux *et al.*, 2010), IRAP (Inter-retrotransposon amplified polymorphism) markery, založené na blízkosti stejných LTR sekvencí (Kalendar *et al.*, 1999) a REMAP (Retrotransposon-microsatellite amplified polymorphism) markery, založené na amplifikaci hraničních oblastí mezi LTR sekvencí a mikrosatelitem (Kalendar *et al.*, 1999).

Charakterizace genetické diverzity je další významná oblast, kde se využívá molekulárních markerů. Genetická diverzita představuje dědičné změny uvnitř a mezi populacemi (Emon *et al.*, 2010). Byla definována jako celá škála alel a genotypů přítomných v populaci (Toro *et Caballero*, 2005). Znalost genetické diverzity a struktury populace je důležitým základem pro zdokonalování vlastností plodin (Emon *et al.*, 2010). Využívání molekulárních technik přispělo k lepšímu porozumnění genetické diverzity u mnohých druhů (Rao *et Iwanaga*, 1997). Mikrosatelity a ISSR markery byly použity pro charakterizaci genetické diverzity u různých druhů rýže (Bao *et al.*, 2006a; Shishido *et al.*, 2006; Eizenga *et al.*, 2009), pšenice (Plaschke *et al.*, 1995; Emon *et al.*, 2010), lilku brambor (Bornet *et al.*, 2002), cizrny (Hajibarat *et al.*, 2015), bavlny (Bertini *et al.*, 2006), a dalších rostlin.

Repetitivní sekvence DNA se využívají i jako cytogenetické markery, které mohou být druhově i chromozómově specifické. V mnohých studiích byly využity repetece jako chromozómově specifické markery pro indentifikaci chromozómů u různých druhů rostlin (Dong *et al.*, 2000; Snowdon *et al.*, 2000; Sadder *et Weber*, 2001; Kwiatek *et al.*, 2013). Badaeva *et al.* (2015) použili satelit pTa535, vykazující chromozómově i druhově specifickou hybridizaci, který jim umožnil identifikovat chromozómy a rozlišit různé druhy pšenice. Fradkin *et al.* (2013) charakterizovali různé odrůdy Triticale za pomoci cytogenetických markerů specifických pro *Secale cereale*. Použití sond na GAA mikrosatelity, *Afa* repetece a pSC119.2 klon, obsahující vysoce repetitivní sekvence DNA, vedlo k vytvoření prvního molekulárního karyotypu pšenice tvrdé (Obr. 7) (Kubaláková *et al.*, 2005).



Obr. 7 Karyotyp pšenice tvrdé vytvořený na základě FISH lokalizace repetitivních sekvencí. DNA sondy byly značeny fluoresceinem (zelené signály) nebo Cy3 (červené signály). Chromozómy byly nabarveny propidium jodidem (červená) nebo DAPI (modrá). (A) Distribuce tří repetitivních DNA sekvencí, GAA mikrosatelitů (GAA), *Afa* repetice (AFA) a *pSc119.2* (119) na chromozómech ze subgenomů A a B pšenice tvrdé. (B-E) Chromozómová ramena natříděná z ditelozomických linií pšenice tvrdé po FISH se sondami na GAA mikrosatelit (zelené signály) a telomerické repetice (červené signály) (převzato z Kubaláková *et al.*, 2005)

Kromě identifikace chromozómů repetitivní sekvence DNA přispěly i ke konstrukci cytogenetických map různých druhů rostlin, např. čiroku (Islam-Faridi *et al.* 2002), huseníčku (Fransz *et al.*, 2000), *Aegilops tauschii* (Boyko *et al.*, 2002), okurky (Ren *et al.*, 2009), fazolu (Fonsêca *et al.*, 2010), a mnoha dalších.

3.4 Struktura genomu - cytogenetické mapování *Loliinae*

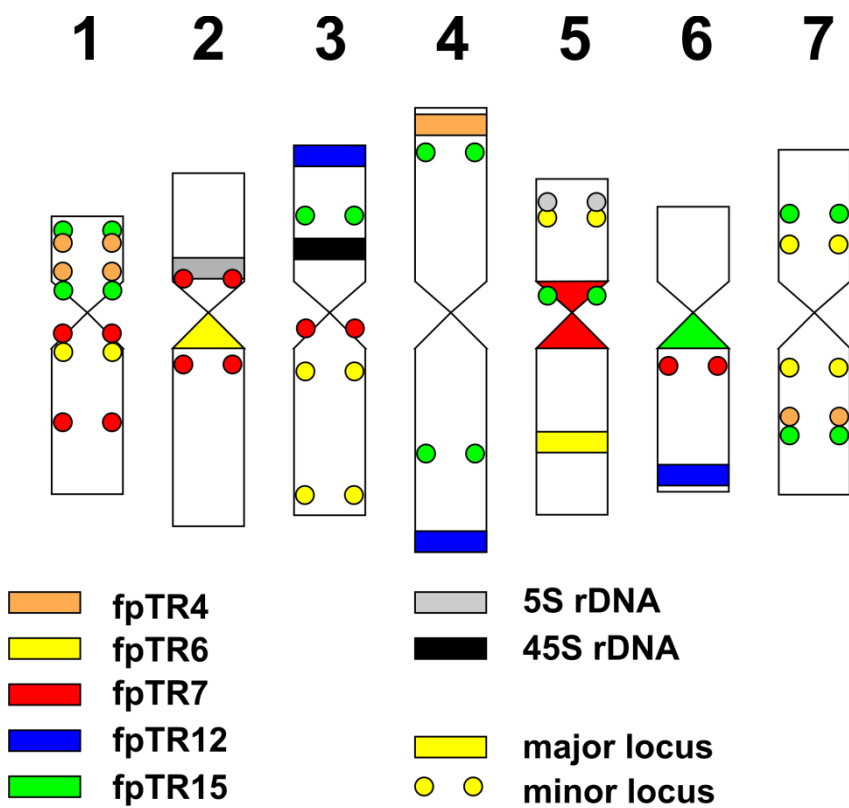
Vzhledem k hybridní povaze velké většiny druhů pododdělení *Loliinae*, a také vzhledem k ekonomickému významu uměle vytvořeného mezirodového křížence *Festulolium* (*Festuca* x *Lolium*) je velmi často využívána metoda genomové *in situ* hybridizace (GISH) s cílem charakterizovat genomového složení hybridních zástupců trav. Kromě identifikace pravděpodobných rodičovských genomů, které se podílely na vzniku polyploidních kostřav (Humphreys *et al.*, 1995) je GISH hojně využívána pro identifikaci genomového složení u *Festulolií* (Kopecký *et al.*, 2006; Kopecký *et al.*, 2008a).

Oproti tomu fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) je metoda využívaná k lokalizaci specifických DNA sekvencí v jaderném genomu (na chromozómech), a je tak vhodná například pro identifikaci jednotlivých chromozómů a vytvoření molekulárního karyotypu (Křivánková *et al.* 2017).

3.4.1 Lokalizace tandemových repetice

Jak již bylo zmíněno, tandemově organizované repetitivní sekvence DNA, a to především satelitní DNA, která se v genomu vyskytuje ve velkém počtu kopií, a v genomu (na chromozómech) je lokalizována v dlouhých úsecích uspořádaných těsně za sebou (tandemově), jsou hojně využívaným cytogenetickým markerem. Vzhledem k tomu, že tandemové repetice poskytují v genomech specifické uspořádání a často jsou chromozomově specifické, jsou využívány pro identifikaci jednotlivých chromozómů v jaderných genomech a sestavení karyotypů. Jedny z prvních karyotypů zástupců rodu *Festuca* a *Lolium* byly vytvořeny již v roce 1966 (Malik *et Thomas*, 1966). Molekulární karyotypy založené na FISH však začaly vznikat až později. Thomas *et al.* (1997) lokalizovali geny pro 5S a 45S rRNA v různých druzích kostřav a díky tomu byli schopni identifikovat dva chromozómy druhu *Festuca pratensis*. V roce 2008 byly identifikovány chromozómy několika odrůd druhu *Festuca pratensis* a byl sestaven karyotyp na základě fluorescenční *in situ* hybridizace se sondami pro 5S a 45S rDNA a BAC klon, vykazující specifický hybridizační vzor, charakteristický pro každý chromozóm (Kopecký *et al.*, 2008b). Křivánková *et al.* (2017) využili tandemově organizované repetitivní DNA sekvence identifikované v Illumina sekvenačních datech chromozómu 4F z *Festuca pratensis* (Kopecký *et al.*, 2013) a vytvořili molekulární karyotyp tohoto druhu (Obr. 8). Navíc provedli také komparativní analýzu

karyotypů různých odrůd kostřavy luční a zjistili jen zanedbatelné rozdíly v karyotypu mezi různými odrůdami.



Obr. 8 Idiogram odrůdy *Festuca pratensis* 'Fure' znázorňující sedm chromozómů s naznačenými pozicemi 5S (šedě), 45S rDNA (černě) a pěti tandemově organizovaných repetitivních DNA sekvencí: fpTR4 (oranžově), fpTR6 (žlutě), fpTR7 (červeně), fpTR12 (modře) a fpTR15 (zeleně) (převzato z Křivánková *et al.*, 2017)

3.4.2 Lokalizace mobilních elementů

3.4.2.1 DNA transpozóny

DNA transpozóny u rostlin vykazují preferenční inzerci a výskyt v nemetylovaných, geneticky aktivních, euchromatických oblastech (Bennetzen, 2000). Například u kukuřice byla objevena genově specifická inzerce MITE elementů (Tikhonov *et al.*, 1999), podobně jako preferenční inzerce DNA transpozónů z třídy *Mutator* do nízkokopiových oblastí kukuřice (Cresse *et al.*, 1995). MITE elementy byly nalezeny asociovány s více než 40 geny jednoděložných i dvouděložných rostlin (Bureau *et Wessler*, 1994). Na preferenci vkládat se do genových oblastí ukazuje i fakt, že mnoho DNA transpozónů nese fragmenty genů, které získaly v důsledku své schopnosti transpozice. Tento fenomén byl pozorován u DNA transpozónů z několika rodin, a to u různých druhů rostlin. Šlo například o *Mutator*-like elementy kukuřice (Talbert *et Chandler*, 1988), rýže (Ohtsu *et al.*, 2005) a huseníčku (Hoen *et*

al., 2006), Helitrony kukuřice (Lal *et al.*, 2003; Lai *et al.*, 2005) a CACTA elementy sóji (Zabala *et Vodkin*, 2005).

3.4.2.1.1 CACTA elementy

CACTA elementy jsou velmi významně zastoupeny v genomech *Poaceae*, respektive *Loliinae*, a svůj název získaly podle konzervované sekvence ‚CACTA‘, kterou tyto DNA transpozóny nesou na úplném konci svých obrácených koncových repetit. CACTA elementy navíc obsahují subterminální repetice, které se skládají z 10bp až 20bp jednotek s přímou a obrácenou orientací (Wicker *et al.*, 2003). DNA transpozóny z nadrodiny CACTA byly do dnešní doby identifikovány pouze v rostlinách (Tian, 2006). Jde například o *En/Spm* elementy kukuřice (Pereira *et al.*, 1986), *Tgm1* elementy sóji (Vodkin *et al.*, 1983), *Cs1* elementy čiroku (Chopra *et al.*, 1999), *Tnr3* a *Tnr12* elementy rýže (Motohashi *et al.*, 1996; Han *et al.*, 2000), *Cac1* elementy huseníčku (Miura *et al.*, 2001), a další. U rýže byly objeveny *Rim2* elementy, které nesou sekvenci ‚CACTG‘ na okraji svých obrácených koncových repetit. I přes odlišnost v jednom nukleotidu jsou tyto elementy řazeny mezi CACTA elementy (Wang *et al.*, 2003). Transpozice těchto elementů je založena na tvorbě vlásenky mezi dvěma komplementárními obrácenými koncovými repeticemi (Hehl *et al.*, 1987). Ukázalo se, že subterminální repetice jsou nezbytné pro transpozici CACTA elementů, a důsledkem jejich metylace nedochází k transpozici (Fedoroff *et al.*, 1995; Raina *et al.*, 1998). Většina CACTA elementů v průběhu evoluce ztratila schopnost transpozice, pouze několik z nich zůstalo aktivních, včetně výše uvedených elementů kukuřice a huseníčku (Tian, 2006).

Bylo zjištěno, že patogenní infekce dokáže indukovat transkripci u CACTA elementů. Například elementy z rodiny *Rim2* mohou být transkripčně aktivováni infekcí patogenní houbou *Magnaporthe grisea* (He *et al.*, 2000). Před tímto objevem již byl znám příklad retroelementu, jehož transkripce může být indukována patogeny, což naznačuje korelaci mezi aktivací elementu a odpovědí rostliny na mikrobiální stres (Pouteau *et al.*, 1994).

Wicker *et al.* (2003) identifikovali 41 CACTA elementů u skupiny *Triticeae*, z čehož pouze 7 kódovalo protein podobný známým transpozázám. Zbylé elementy jsou považovány za deleční deriváty. Navíc byla provedena detailní charakterizace identifikovaných elementů, která umožnila je rozdělit do sedmi podskupin. Hlavní podskupinou byla rodina *Caspar*, která byla v genomu *Triticum monococcum* přítomná v nejméně 3 000 kopiích. Objevili také, že mnoho z identifikovaných elementů je potenciálně asociováno s geny.

Kvůli jejich všudypřítomnosti v genomech obilovin a inzerčnímu polymorfismu jsou CACTA elementy vhodné jako molekulární markery pro konstrukci map, studium genetické

diverzity a pro genetické analýzy (Kwon *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2005). CACTA elementy byly použity i pro značení genů při molekulárním klonování, a to kvůli jejich náhodnému inzerčnímu polymorfismu a působení genových mutací (Gierl *et Saedler*, 1992; Tian, 2006).

3.4.2.2 Retrotranspozóny

Retrotranspozóny, neboli transpozóny II. třídy, jsou mobilní genetické elementy schopné pohybovat se v genomu pomocí RNA meziprojektu, vznikajícího transkripcí elementu, a jeho následným začleněním do genomu s využitím reverzní transkriptázy (Feschotte *et al.*, 2002). Proces jejich transpozice má za důsledek duplikativní charakter retrotranspozónů (Kazazian, 2004). Transpozóny II. třídy zahrnují dvě skupiny – LTR- a Non-LTR retrotranspozóny, které mohou být jak autonomní, tak neautonomní, v závislosti na jejich struktuře (Feschotte *et al.*, 2002). Retrotranspozóny mají potenciál významně modifikovat funkci genů a strukturu genomu, z toho důvodu je jejich transpoziční aktivita regulována pomocí faktorů původem z hostitele i samotného elementu (Kumar *et Bennetzen*, 1999).

Velmi významné jsou centromerické retrotranspozóny (CR), patřící do *Ty3/Gypsy* rodiny retrotranspozónů s dlouhými koncovými repeticemi (LTR retrotranspozónů). Na základě fylogenetické analýzy, založené na přítomnosti reverzní transkriptázy (RT), se ukázalo, že CR patří do skupiny *Chromoviridea* (chromoviry), a jsou široce rozšířené a vysoce konzervované u semenných rostlin (Gorinšek *et al.*, 2004). První člen CR rodiny o plné délce byl objeven v centromerách ječmene, žita a pšenice (Presting *et al.*, 1998). Na rozdíl od ostatních rostlinných LTR retrotranspozónů, CR se akumulují převážně v centromerických a pericentromerických oblastech, což bylo mnohokrát potvrzeno pomocí FISH analýz (Miller *et al.*, 1998; Langdon *et al.*, 2000; Hudakova *et al.*, 2001), a později i pomocí imunobarvení protilátkou specifickou pro CENH3 protein, s navazující FISH analýzou (Li *et al.*, 2013). Obvykle se vyskytují v blízkosti satelitní DNA, která tvoří převážnou část centromerických sekvencí většiny druhů (Jiang *et al.*, 2003). Nicméně v centromerách některých druhů rostlin, jako například pšenice, převažují centromerické retrotranspozóny (Liu *et al.*, 2008). Zatím nebylo objasněno, zda se cílení CR do centromer vyvinulo z toho důvodu, že je méně pravděpodobná disrupce genů v těchto oblastech, anebo proto, že CR ve skutečnosti mají podíl na funkci centromer (Sharma *et Presting*, 2014), což naznačuje jejich kolokalizace s CENH3 proteinem, který je nezbytný pro funkční centromery. Nepřímé důkazy naznačují, že CR měly vliv na evoluci centromer, jejich struktury a funkce (Neumann *et al.*, 2011). Jejich transpoziční aktivita přispívá k vysoké evoluční dynamice centromer generováním nových inzercí, které mohou dále podléhat nehomologní rekombinaci

(Ma *et al.*, 2007). Nedávno bylo zjištěno, že CR mohou dát vznik tandemovým repetitívám, které jsou dalším typickým znakem některých centromer (Sharma *et al.*, 2013).

V genomech různých druhů trav a obilovin bylo již identifikováno a charakterizováno mnoho CR. Jmenovitě byly charakterizovány například CRM elementy u kukuřice (*Zea mays*) (Nagaki *et al.*, 2003), RIRE7 a CRR elementy u rýže (*Oryza sativa*) (Kumekawa *et al.*, 2001b; Cheng *et al.*, 2002; Nagaki *et al.*, 2005), CRW elementy u divoké formy pšenice jednozrnky (*Triticum boeoticum*) (Liu *et al.*, 2008), *Cereba* elementy u ječmene (*Hordeum vulgare*) (Presting *et al.*, 1998) nebo Bilby elementy u žita (*Secale cereale*) (Francki, 2001). Z dvouděložných rostlin stojí za zmínku například CRA elementy u huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) (Gorinšek *et al.*, 2004; Sharma *et al.*, 2008).

Pro CR je charakteristická přítomnost integrázové chromodomény. Předpokládá se, že integrázová chromodoména zajišťuje správné cílení do centromerické oblasti (Kordiš, 2005).

Další fylogenetická klasifikace chromovirů ukázala, že tato rodina *Ty3/Gypsy* elementů obsahuje 5 podrodin (Gorinšek *et al.*, 2004). CR tvoří podrodinu popsanou jako CRM (dále jen CRM elementy), která byla pojmenována podle CRM elementů kukuřice (Gorinšek *et al.*, 2004, Kordiš, 2005). Ačkoli jsou chromoviry široce rozšířené v genomech eukaryot, CRM elementy jsou specifické pouze pro rostliny (Gorinšek *et al.*, 2004).

Neumann *et al.* (2011) provedli podrobnou charakterizaci elementů náležících ke skupině CRM chromovirů. Přestože se předpokládalo, že C-koncové sekvence integrázy obsahující PTD (putative targeting domain), jsou zodpovědné za cílení elementu do centromerické oblasti, *in silico* analýza 190 CRM elementů, identifikovaných v různých rostlinných genomech, ukázala, že tyto sekvence (PTD) jsou u CRM elementů nečekaně heterogenní. Na základě rozdílů byly CRM elementy rozděleny do tří skupin – A, B a C. Skupiny se od sebe lišily z hlediska své distribuce na chromozómech, což korelovalo s rozdílnými C-terminálními sekvencemi integráz. Pro elementy ze skupiny A je typický CR motiv a jsou koncentrovány v centromerických oblastech. Oproti tomu elementy ze skupiny C mají chromodoménu typu II a jsou rozptýlené po celém genomu. Ačkoli elementy ze skupiny B postrádaly PTD jakéhokoli typu, tak se u testovaných druhů jeví, že jsou elementy preferenčně lokalizovány v centromerách. Analýza ukázala, že CR v pravém slova smyslu reprezentují pouze jednu skupinu (skupinu A) CRM elementů. Tyto CR jsou přítomny u jednoděložných i dvouděložných rostlin, zatímco u nahosemenných a vývojově starších rostlin zatím nalezeny nebyly. Neumann *et al.* (2011) také zjistili, že všechny testované elementy jsou transkripčně aktivní, což koresponduje s představou, že transkripce CR má roli při normální funkci centromer.

Sharma *et* Presting (2014) provedli rozsáhlou fylogenetickou analýzu CR v rámci čeledi *Poaceae*. Získané výsledky naznačují, že mezi podčeleděmi *Oryzoideae* (rýže) a *Panicoideae* (kukuřice, proso, čirok, aj.) mohlo docházet k horizontálnímu přenosu CR, a zároveň k následné rekombinaci mezi takto získanými CR a endogenními elementy, což mělo významnou roli v evoluci CR. Sharma *et* Presting (2014) také zavedli nové názvosloví pro CR elementy, založené na jejich fylogenetických vztazích, nezávislé na hostitelském organismu. CR kukuřice, rozdělené do šesti podrodin, byly využity jako standard. CR2 podrodina je v genomech trav ze všech nejrozšířenější, a proto je také nejpravděpodobnější její role při funkci centromer u trav.

4 Materiály a metodika

4.1 Materiál

4.1.1 Biologický materiál

V experimentech byla použita semena druhů *Festuca pratensis* ‚Fure‘ (FPF), *Festuca pratensis* ‚Westa‘ (FPW), *Festuca arundinacea* (FAR), *Festuca glaucescens* (FGL), *Festuca gigantea* (FGI), *Festuca mairei* (FMA), *Lolium multiflorum* ‚Mitos‘ (LMM), *Lolium perenne* (LP), *Lolium perenne* ‚Neptun‘ (LPN), *Avena sativa* ‚Atego‘ (ASAT), *Secale cereale* ‚Dankowskie Diament‘ (SCER), *Hordeum vulgare* ‚Morex‘ (HVUL), *Triticum aestivum* ‚Chinese Spring‘ (TAES), *Aegilops tauschii* (ATAU) a *Triticum monococcum* (TMON).

Semena druhů LMM, LP, FAR, FPW a FGI byla získána z genové banky IPK, Gatersleben, Německo. Semena druhu FMA byla získána z USDA/GRIN databáze. Semena druhů FGL, FPF a LPN byla získána od Ing. Vladimíra Černocho z DLF, Hladké Životice. Semena druhu ASAT byla získána ze šlechtitelské stanice Krukanice. Semena druhu SCER byla získána z genové banky Výzkumného ústavu rostlinné výroby, Praha-Ruzyně (GRIN Czech). Semena druhu HVUL byla získána ze Zemědělského výzkumného ústavu, Kroměříž. Semena TAES poskytl Dr. Adam Lukaszewski z Kalifornské univerzity v Riverside, Kalifornie, USA. Semena ATAU byla získána z Centra pro zemědělský výzkum, Martonvásár, Maďarsko. Semena TMON poskytl Dr. Jorge Dubcovsky ze Státní univerzity v Kansasu, Kansas, USA.

4.1.2 Použité chemikálie a kity

- 35% kyselina chlorovodíková (Lach-Ner, s.r.o., Neratovice, Česká republika)
- 99,8% etylalkohol pro UV spektroskopii (Lach-Ner, s.r.o., Neratovice, Česká republika)
- 99,8% kyselina octová p.a. (Lach-Ner, s.r.o., Neratovice, Česká republika)
- 99,9% glycerol (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA)
- λ DNA 300 ng/ μ l (Fermentas, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)
- agaróza (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA)

- anti-digoxigenin-fluorescein, Fab fragments (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Německo)
- Biotin-16-dUTP (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA)
- Biotin-Nick Translation Mix (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Německo)
- Blocking reagent (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, Velká Británie)
- BM Purple AP substrát (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Německo)
- bromfenolová modř (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA)
- Cy3-Streptavidin 1 mg/ml (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)
- dextran sulfát, sodná sůl (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Německo)
- DIG – Nick Translation Mix (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Německo)
- dihydrát citrátu sodného (PLIVA – Lachema a.s., Brno, Česká republika)
- dihydrát disodné soli kyseliny ethylendiamintetraoctové (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA)
- dodecylsírán sodný (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Německo)
- dATP, dTTP, dCTP, dGTP (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)
- Digoxigenin-11-dUTP, alkali-stable (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA)
- ethidium bromid (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA)
- hexahydrát chloridu hořečnatého (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA)
- hydroxid sodný (Lach-Ner, s.r.o., Neratovice, Česká republika)
- chlorid sodný (Lach-Ner, s.r.o., Neratovice, Česká republika)
- imerzní olej Immersol 518F (Carl Zeiss, Oberkochen, Německo)
- karmín (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA)
- kyselina boritá (Lach-Ner, s.r.o., Neratovice, Česká republika)
- kyselina maleinová (P-LAB, Praha, Česká republika)
- NucleoSpin® Plant II kit (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Německo)
- *Pst*I restrikční endonukleáza (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, USA)
- pufr pro polymerázu 10x Standard *Taq* Reaction Buffer (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, USA)
- roztok formaldehydu min. 37 % p.a. (Merck KGaA, Darmstadt, Německo)
- Streptavidin-AP Conjugate (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Německo)
- Trizma® base (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA)

- Tween 20 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA)
- *Taq* DNA polymeráza (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, USA)
- Vectashield s DAPI (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, Kalifornie, USA)
- xylenecyanol (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA)

4.1.3 Roztoky

Fixační roztok 3:1

7,5 ml	99,8% etylalkohol pro UV spektroskopii
2,5 ml	99,8% kyselina octová

1% acetokarmín

10 g	karmín
1 l	45% kyselina octová

20x SSC

175,3 g	chlorid sodný
88,2 g	dihydrát citrátu sodného
doplnit do 1 l	redestilovaná voda
pH 7,0	

0,1x SSC

5 ml	20x SSC
0,406 g	hexahydrát chloridu hořečnatého
1 ml	Tween 20
doplnit do 1 l	redestilovaná voda
pH 7,0	

2x SSC

100 ml	20x SSC
doplnit do 1 l	redestilovaná voda
pH 7,0	

4x SSC

200 ml	20x SSC
2 ml	Tween 20
doplnit do 1 l	redestilovaná voda
pH 7,0	

4% formaldehyd

10,8 ml	roztok formaldehydu min. 37 % p.a.
Doplnit do 100 ml	2x SSC

50% dextran sulfát

2,5 g	dextran sulfát sodná sůl
5 ml	redestilovaná voda

1% blokovací činidlo

0,5 g	Blocking reagent
50 ml	4x SSC

0,5mg.ml⁻¹ ethidium bromidu

50 mg	ethidium bromid
100 ml	redestilovaná voda

Pracovní roztok ethidium bromidu

100 ml	0,5mg.ml ⁻¹ ethidium bromid
Doplnit do 1 l	redestilovaná voda

0,5mol.l⁻¹ EDTA

18,61 g	dihydrát disodné soli kyseliny ethylendiamintetraoctová
doplnit do 100 ml	redestilovaná voda
pH 8,0	

6x STOP C

2 ml	0,5mol.l ⁻¹ EDTA
1 ml	10% SDS
4,3 ml	99,9% glycerol
5 mg	bromfenolová modř
5 mg	xylenecyanol
doplnit do 10 ml	redestilovaná voda

5x TBE (pH 8,0)

54 g	Trizma® base
27,5 g	kyselina boritá
20 ml	0,5mol.l ⁻¹ EDTA (pH 8,0)
doplnit do 1 l	redestilovaná voda
pH 8,0	

5 x pufr 1

5,8 g	0,5mol.l ⁻¹ kyselina maleinová
4,4 g	0,75mol.l ⁻¹ chloridu sodného
doplnit do 100 ml	redestilovaná voda

Blokovací pufr II

10 ml	5 x Pufr 1
5 ml	10% Blocking reagent

4.1.4 Přístroje

- autokláv 2340E (Tuttnauer, Breda, Nizozemsko)
- centrifuga IEC Micromax RF Refrigerated Microcentrifuge (International Equipment Company, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)
- elektroforetická aparatura Owl A6 (Owl Separation Systems, Inc., Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)
- fluorescenční mikroskop Axio Imager.Z2 (Carl Zeiss, Oberkochen, Německo) s CCD kamerou, zdroj Power Supply 232 (Eplax GmbH, Bremen, Německo), UV lampa X-Cite exacte (Excelitas, Technologies, Waltham, Massachusetts, USA)

- hybridizační pec SM30 pro FISH (Boekel Scientific, Feasterville, Pennsylvania, USA)
- lyofilizátor Heto Drywinner (Trigon-plus spol. s r.o., Říčany u Prahy, Česká republika) a vakuová pumpa (Vacubrand GMBH + CO KG, Wertheim, Německo)
- mikrocentrifuga Mini Star silverline (VWR International, Radnor, Pennsylvania, USA)
- mikrovlnná trouba KOR-6C2B (Daewoo, Soul, Jižní Korea)
- oscilační mlýn MM301 (Retsch, Haan, Německo)
- přístroj na úpravu vody Aqua Osmotic 04 (AquaOsmotic s.r.o., Tišnov, Česká republika)
- spektrofotometr NanoDrop ND – 1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)
- světelný mikroskop Primo Star (Carl Zeiss, Oberkochen, Německo)
- termocykler Mastercycler pro FISH (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- termocykler na 96-jamkové desky C1000 Touch (Bio – Rad Laboratories, Inc., Hercules, Kalifornie, USA)
- termocykler na mikrozkušavky PTC-200 (Major Science, Saratoga, Kalifornie, USA)
- termostat BT 120 (LABO-MS spol. s.r.o., Praha, Česká republika)
- tiskárna Digital Graphic Printer UP – D897 (Sony Corporation, Tokio, Japonsko)
- třepačka Duomax 1030 (Heidolph Instruments, Schwabach, Německo)
- UV Stratalinker 2400 (Stratagene, Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, Kalifornie, USA)
- UV transiluminátor InGenius (Syngene, Synoptics, Cambridge, Velká Británie)
- váhy Vibra AJ – 820CE (Shinko Denshi Co., Ltd., Tokio, Japonsko)
- vodní lázeň WB14 (Memmert, Schwabach, Německo)
- vortex Reax top (Heidolph Instruments, Schwabach, Německo)
- výrobce ledové tříště Scotsman MF 26 Ice Flaker (Scotsman Ice Systems, Ipswich, Velká Británie)

- zdroj MP – 300V (Major Science, Saratoga, Kalifornie, USA)

4.1.5 Software

MMC v. 2.4.1, ISIS v. 5.4.7, GeneSnap V 7.07 (Syngene, Synoptics, Cambridge, Velká Británie), ND-1000 V3.1.2 (Coleman Technologies, Inc., Newtown Square, Pennsylvania, USA)

Adobe Photoshop CC 2015 (Adobe Systems, San José, Kalifornie, USA)

4.2 Metodika

4.2.1 Identifikace kontigů nesoucích homologii k vybraným mobilním elementům

Kontigy představující repetitivní DNA sekvence byly získány *de novo* analýzou Illumina sekvenačních dat. Tato část práce byla provedena školitelem, a to před započítím diplomové práce (Hřibová *et al.*, nepublikováno).

Částečná sekvenační data osmi analyzovaných zástupců byla získána metodou Illumina. Illumina sekvence byly selektovány na kvalitu (-q 20 -p 90) a na délku (250 bp) programem FASTX-Toolkit (http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/index.html), a následně byl vybrán náhodný soubor dat představující 1% genomu analyzovaných druhů. Tento soubor dat byl použit pro *de novo* identifikaci a charakterizaci repetitivních sekvencí DNA pomocí programu RepeatExplorer (Novák *et al.*, 2010). Tento program pracuje jako tzv. programová pipeline, tedy soubor jednotlivých na sebe navazujících programů, které v prvním kroku roztrídí sekvenační čtení do jednotlivých skupin (klastřů) na základě jejich podobnosti (94%), a to tak, že každá sekvence má homologii alespoň k jedné další sekvenci v daném klastru. Tento proces využívá teorii grafů (tzv. graph-based clustering), kdy sekvenační čtení tvoří vrcholy grafů a vzájemné homologie tvoří spojnice mezi sekvencemi - vrcholy grafů. A zároveň síla spojnic je přímo úměrná počtu nalezených homologii. Důležitým krokem této části programové pipeline je, kromě vytvoření klastřů obsahujících navzájem vysoce homologní sekvenační čtení, také grafické znázornění grafů.

Jednotlivá sekvenační čtení jsou dále v rámci jednotlivých klastřů sestavována do delších kontigů, a to programem CAP3 (Huang *et Madan*, 1999). Jednotlivé kontigy i jednotlivé sekvence v rámci každého klastru, který představuje alespoň 0,01% analyzovaných sekvencí, jsou charakterizovány programy BLASTN a BLASTX (Altschul *et al.*, 1990), a to

jak s databází sekvencí uložených v NCBI, tak s použitím specifických databází, vytvořených pro RepeatExplorer, obsahujících kódující domény již známých repetitivních elementů (Novák *et al.*, 2010).

Vzhledem k tomu, že poměr sekvenačních čtení daného klastru ku počtu všech sekvenačních čtení použitých pro klastrování pomocí grafů vyjadřuje reprezentaci daného sestaveného elementu v genomu, umožňuje RepeatExplorer zároveň také *in silico* identifikaci jeho četnosti v genomu.

Stejný postup byl zvolen také pro *de novo* identifikaci a charakterizaci repetitivních DNA elementů příbuzných druhů, s tím rozdílem, že pro analýzu byla použita data stažená z databáze SRA: *Ae. Tauschii* (SRR124194), *Hordeum vulgare* (SRR490932), *Secale cereale* (ERR493591), *Triticum monococcum* (ERR657693) a *Triticum aestivum* cv. Renan (illumina sekvenační data získána od zahraničního partnera – INRA, Francie, v rámci společného projektu).

Pro identifikaci elementů homologních k DNA transpozónu CL4 a pravděpodobnému LTR elementu CL38, původně identifikovaných v sekvenačních datech chromozómu 4F druhu *Festuca pratensis* ‚Fure‘ (Kopecký *et al.*, 2013), byly následně použity kontigy sestavené pro jednotlivé analyzované druhy pomocí programu BLASTALL v2.2.26 (Altschul *et al.* 1990).

Veškeré analýzy probíhaly na IBM serverech Gambrinus (Linux Red Hat systém; 16 procesorů, 100Gb RAM, 17Tb disk) a Radegast (Linux Debian systém; 40 procesorů, 1.5Tb RAM, 90Tb disk), které jsou napojeny na gridovou infrastrukturu CESNET MetaCentrum (<https://metavo.metacentrum.cz/>).

4.2.2 Fylogenetický analýza vybraných elementů

V případě centromerického LTR retrotranspozónu byly použity proteinové sekvence kódující doménu pro reverzní transkriptázu a chromodoménu a začleněny do již existujícího souboru dat známých kódujících domén, který byl dále doplněn o domény CRM-like elementů (Neumann *et al.*, 2011) získaných analýzou příbuzných druhů.

Pro fylogenetickou analýzu DNA transpozónů bylo využito proteinových sekvencí kódujících doménu pro DNA transpozázu a společně s již známými proteinovými sekvencemi (Buchmann *et al.*, 2014) byly, stejně jako v předešlém případě, použity pro mnohočetné přiřazení (tzv. multiple alignment) pomocí programu MAFFT v7.158 (--globalpair --maxiterate 1000) (Kato *et al.*, 2005) a výsledek byl graficky znázorněn v programu SeaView

v4.2.1. (Galtier *et al.*, 1996). Fylogenetická analýza byla provedena pomocí metody maximum likelihood, a také pomocí programu SplitsTree (Huson *et Bryant*, 2006). Výsledné fylogenetické stromy byly editovány programem FigTree (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

4.2.3 Roztlakové preparáty

Semena jednotlivých druhů byla 2 h namočena v kádinkách s redestilovanou vodou, a poté byla vyseta na Petriho misky vystlané dvěma vrstvami buničité vaty a jednou vrstvou filtračního papíru. Petriho misky se uložily na 1 den do lednice, a následně se přesunuly do termostatu nastaveného na 27 °C. V těchto podmínkách se semena nechala klíčit po dobu 3 – 10 dní, v závislosti na druhu.

Kořínky naklíčených rostlin se odebraly pinzetou do kádinek s redestilovanou vodou, které byly umístěny na ledové tříšti. Kořínky se odebíraly asi mezi 11:00 a 13:00, kdy mají nejvyšší mitotický index, tedy podíl dělicích se buněk. Odebrané kořínky byly v ledové vodě nechány 26 – 27 h, a poté byly kořínky přeneseny do fixačního roztoku (3:1), ve kterém byly ponechány 7 dní ve 37 °C. Po týdnu se kořínky nabarvily v 1% roztoku acetokarmínu po dobu 2 h. Následně se mohly kořínky použít k přípravě roztlakových preparátů nebo se mohly uložit v -20 °C ve fixačním roztoku (3:1).

Po vytažení z -20 °C se kořínky dobarvily po dobu asi 15 min v roztoku acetokarmínu. Pro přípravu preparátů byla použita mikroskopická skla, která byla 2 dny uložena v 96% ethanolu, kvůli jejich odmaštění. Z kořínku byla skalpelem uříznuta kořenová špička a byla přenesena do kapky 45% kyseliny octové na mikroskopickém sklu. Kořenová špička byla přikryta krycím sklem, které bylo částečně podloženo žiletkou, aby měly buňky prostor se rozestoupit. Ťukáním párátkem bylo pletivo roztačeno, žiletka byla odstraněna a preparát byl několikrát opálen nad kahanem. Diamantem se označila poloha preparátu a název vzorku. Na preparát se poté silně zatlačilo a položil se krycím sklem dolů na blok suchého ledu, na němž se všechny preparáty ponechaly po dobu 1 h. Následně byla krycí sklíčka z preparátů odstraněna za pomoci žiletky a preparáty byly vloženy do 45% kyseliny octové při laboratorní teplotě. Po chvíli se preparáty přenesly do 45% kyseliny octové nahřáté na 50 °C, kde se inkubovaly 3 min. Po samovolném uschnutí byly preparáty prohlédnuty pod světelným mikroskopem a nejvhodnější preparáty byly použity pro další práci.

Následně byla provedena postfixace preparátů pro zvýšení stability chromozómů při FISH. Preparáty byly postfixovány pomocí 4% roztoku formaldehydu, ve kterém byla skla

inkubována 10 min při laboratorní teplotě. Následně byla skla dehydratována ve vzestupné ethanolové řadě, tj. 2 min postupně v 70%, 90% a 99,8% ethanolu. Poté se skla nechala pořádně uschnout.

4.2.4 Izolace genomové DNA

Malé množství rostlinného materiálu bylo vloženo do 1,5 ml zkumavky spolu s dvěma skleněnými kuličkami a materiál byl homogenizován v oscilačním mlýnu MM301 nastaveném na frekvenci 27 Hz a čas 4 min. Po homogenizaci byla vyizolována genomová DNA všech druhů pomocí komerčního kitu NucleoSpin® Plant II, přičemž se postupovalo podle protokolu dodaného výrobcem kitu. Úspěšnost izolace byla potvrzena pomocí elektroforézy v 1,2% agarózovém gelu, kde se jako molekulární marker použilo 150 ng λ DNA štěpené enzymem *Pst*I. Elektroforéza probíhala při 4 V/cm po dobu 90 min, a DNA byla v gelu vizualizována barvením v roztoku ethidium bromidu.

Koncentrace vyizolované DNA byla stanovena pomocí spektrofotometru NanoDrop ND-1000.

4.2.5 Příprava sond

Sondy byly připraveny buď pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) anebo pomocí nick translace.

PCR reakce byla provedena v celkovém objemu 20 μ l a obsahovala 10x naředěný pufr pro *Taq* polymerázu, biotinem nebo digoxigeninem značený nukleotidový mix o koncentraci 200 μ mol.l⁻¹ (poměr biotin-16-dUTP, resp. digoxigenin-11-dUTP : dTTP = 1:3, koncentrace biotin-16-dUTP, resp. digoxigenin-11-dUTP = 12,5 μ mol.l⁻¹), specifické primery o koncentraci 1 μ mol.l⁻¹, 0,4 U *Taq* polymerázy a 30 ng templátové genomové DNA. Objem PCR reakce byl doplněn sterilní redestilovanou vodou.

PCR reakce probíhala za následujících podmínek:

Počáteční denaturace	94 °C	5 min	} 35 cyklů
Denaturace	94 °C	50 s	
Nasedání primerů	56 °C	1 min	
Extenze	72 °C	1 min	
Závěrečná extenze	72 °C	5 min	

Sekvence primerů jsou uvedeny v Tab. 1.

Tab. 1 Sekvence primerů pro přípravu sond

Sondy	Název primeru	Sekvence primeru
CL4	CL4_contig141_L	5'-ATGGAACGCAATGGAGAAAG-3'
	CL4_contig141_R	5'-CCACACACGTACACCAGGTC-3'
CL22	CL22_DNAtransp_L	5'-GACCTGGTGTACGTGTGTGG-3'
	CL22_DNAtransp_R	5'-TCCCTTCGGAAGTATTGTC-3'
CL38	CL38_contig72_L	5'-TTCTGGGTCGGTTATTTTGG-3'
	CL38_contig72_R	5'-GATTGATTCCTGTCGCCAAT-3'
RT	CRM_RT_L	5'-GGCGCATGTGTGTAGATTGT-3'
	CRM_RT_R	5'-ATCACGCAACACTTGCAAAA-3'
5S rRNA	FPF_5S_L	5'-CTAGGATGGGTGACCTCCTG-3'
	FPF_5S_R	5'-ACGCTTTTCCCCTTATGCTT-3'

Po proběhnutí PCR reakce byla provedena kontrolní elektroforéza v 1,2% agarózovém gelu, kde se jako molekulární marker použilo 150 ng λ DNA štěpené enzymem *Pst*I. Elektroforéza probíhala při 4 V/cm po dobu 90 min, a vizualizována barvením gelu v roztoku ethidium bromidu.

Pomocí nick translace byly připraveny sondy specifické na 45S rDNA, které byly naznačené biotinem nebo digoxigeninem. Jako templátová DNA byl použit vyizolovaný klon pTa71 nesoucí 4,6 kbp dlouhý fragment 45S rDNA druhu *Triticum aestivum* (Barker *et al.*, 1988). Do nick translační reakce bylo použito 1,5 μ g templátové DNA o objemu 16 μ l a do reakce byly přidány 4 μ l Biotin nebo Digoxigenin Nick translačního mixu. Reakce probíhala 2 h při 15 °C. Následně byla zkontrolována úspěšnost nick translační reakce pomocí elektroforézy v 1,2% agarózovém gelu, kde se jako molekulární marker použily 150 ng λ DNA/*Pst*I. Správně proběhnutá reakce se projevila vytvořením DNA fragmentů o velikosti asi 200 - 500 bp po obarvení gelu v roztoku ethidium bromidu. Poté se reakce zastavila přidáním 0,5mol.l⁻¹ EDTA.

4.2.6 Ověření sond

Byla připravena koncentrační řada pěti roztoků sondy, kdy každý vzorek byl vždy 10x naředěn z předchozího redestilovanou vodou. Vzniklé vzorky byly napipetovány na nylonovou membránu Hybond N+ (GE Healthcare, Chicago, USA) a nechaly se uschnout. Membrána byla inkubována 10 min v pufru 1 za stálého třepání při laboratorní teplotě. Roztok Puftru 1 byl vyměněn za blokovací pufr II, ve kterém byla membrána inkubována 30 min za stálého třepání při laboratorní teplotě. Poté byla k blokovacímu pufru přidána protilátka anti-digoxigenin-AP (ředění 1:10 000) nebo anti-biotin-AP (ředění 1:30 000), a membrána byla inkubována dalších 30 min za stálého třepání při laboratorní teplotě. Následně byla protilátka vymyta za mírného třepání v pufru 1 s přidavkem 0,3 % Tweenu 20, a to 2x po 15 min při laboratorní teplotě. Membrána byla nakonec opláchnuta v redestilované vodě a signály byly detekovány pomocí chromogenního substrátu. Membrána se zalila několika kapkami roztoku BM purple AP substrátu tak, aby byla rovnoměrně pokryta. Inkubace se substrátem probíhala 30 min - 2 h ve tmě. Poté se membrána opláchla redestilovanou vodou a nechala se usušit.

4.2.7 Fluorescenční *in situ* hybridizace

Na jeden preparát bylo použito 30 μ l hybridizační mixu, který obsahoval 50% formamid, 1x SSC, 10% dextran sulfát, 5 ng/ μ l značené sondy a vodu pro doplnění objemu. Stringence reakce byla 82 %.

Na preparát se napipetoval hybridizační mix, přikryl se krycím sklem a denaturoval se v termocycleru 3 min při 80 °C. Poté se nechala probíhat hybridizace sondy při 37 °C přes noc ve vlhké komůrce.

Druhý den byly preparáty promyty a nechaly se inkubovat s protilátkami. Nejprve se preparáty promývaly při 42 °C 10 min ve 2x SSC, 5 min v 0,1x SSC a 5 min ve 2x SSC. Poté byly promývány při laboratorní teplotě 10 min ve 4x SSC. Poté se na preparáty napipetovalo po 90 μ l 1% blokovacího činidla, přikryly se parafilmem a nechaly se inkubovat 5 min při laboratorní teplotě. Poté se na preparáty napipetovalo 100 μ l směsi 1% blokovacího činidla s protilátkou streptavidin Cy3 (ředění 1:1 000) pro detekci biotinem značených sond a anti-digoxigenin FITC (ředění 1:200) pro detekci digoxigeninem značených sond. Preparáty se přikryly parafilmem a nechaly se inkubovat při 37 °C po dobu 1 h. Poté byly preparáty promyty při 42 °C 3x po 5 min ve 4x SSC. Preparáty byly opláchnuty redestilovanou vodou a nechaly se volně uschnout. Poté bylo na preparáty přiloženo krycí sklo se 14 μ l montovacího média Vectashield s DAPI. Tlakem rukou na krycí sklo byly odstraněny případné vzduchové

bubliny a skla se vložila na 1 h do lednice.

Preparáty byly poté prohlédnuty pod fluorescenčním mikroskopem a nasnímány pomocí CCD kamery. Obrázky byly získány pomocí softwaru ISIS v. 5.4.7. Chromozómové figury byly nasnímány, uloženy a upraveny pomocí softwaru Adobe Photoshop CC 2015.

5 Výsledky

Výsledky získané v průběhu diplomové práce jsou představeny v této kapitole a jsou rozděleny na tři hlavní části. V první části byla provedena *in silico* analýza vybraných mobilních elementů – DNA transpozónu CL4 a pravděpodobného LTR retrotranspozónu CL38, jejíž součástí byla identifikace a charakterizace sekvencí homologních k těmto elementům a jejich fylogenetická analýza. Druhá část představuje ověření síly sond, specifických na vybrané mobilní elementy a 5S rDNA, připravených pomocí PCR. A třetí část je zaměřená na cytogenetické mapování obou elementů.

5.1 Identifikace a charakterizace sekvencí homologních k DNA transpozónu CL4

Ačkoliv DNA transpozón CL4, původně identifikovaný v sekvenačních datech chromozomu 4F druhu *Festuca pratensis* ‚Fure‘, obsahoval kódující doménu pro DNA transpozázu a byl již v předchozí studii charakterizován pomocí fylogenetické analýzy jako zástupce CACTA nadrodiny DNA transpozónů (Křivánková *et al.*, 2017), cílem této práce bylo zjistit, zda se tento element vyskytuje také v dalších příbuzných druzích rodů *Festuca* a *Lolium*, respektive u dalších příbuzných druhů obilovin, použitých v předkládané práci.

Na základě homologií byly identifikovány všechny kontigy vykazující vysokou similaritu vůči DNA transpozónu CL4. Tento typ elementu byl nalezen ve všech analyzovaných druzích, a to ve vysokých kopiích (Tab. 2). Pro podrobnou charakteristiku byly využity proteinové sekvence domény kódující DNA transpozázu, které byly společně s již známými proteinovými sekvencemi (Buchmann *et al.*, 2014) použity pro konstrukci fylogenetického stromu (Obr. 9).

Tab. 2 Zastoupení elementů homologních k DNA transpozónu CL4 v genomech analyzovaných druhů

Název druhu	Ploidie	Homologie k DNA transpozónu CL4-4F	Genomová reprezentace [%]
<i>F. pratensis</i> ‚Fure‘	2n = 2x = 14	CL28	0.44 (~28 Mbp)
<i>F. pratensis</i> ‚Westa‘	2n = 4x = 28	CL38	0.36 (~44 Mbp)
<i>F. mairei</i>	2n = 4x = 28	CL21	0.28 (~45 Mbp)
<i>F. arundinacea</i>	2n = 6x = 42	CL46	0.27 (~40 Mbp)
<i>F. gigantea</i>	2n = 6x = 42	CL28	0.54 (~107 Mbp)
<i>F. glaucescens</i>	2n = 4x = 28	CL57	0.21 (~22 Mbp)
<i>L. multiflorum</i> ‚Mitos‘	2n = 4x = 28	CL38	0.28 (~28 Mbp)
<i>L. perenne</i>	2n = 2x = 14	-	-
<i>L. perenne</i> ‚Neptun‘	2n = 4x = 28	CL22	0.4 (~43 Mbp)
<i>Aegilops tauschii</i>	2n = 2x = 14	CL112 + CL151	0.24 (~19 Mbp)
<i>Triticum monococcum</i>	2n = 2x = 14	CL454 + CL458 + CL 619 + CL253 + CL454	0.05 (~3 Mbp)
<i>Triticum aestivum</i> ‚Chinese Spring‘	2n = 6x = 42	CL146	0.1 (~34 Mbp)
<i>Hordeum vulgare</i> ‚Morex‘	2n = 2x = 14	CL29	0.52 (~53 Mbp)
<i>Secale cereale</i> ‚Dankowskie diament‘	2n = 2x = 14	CL28	0.58 (~106 Mbp)

Na základě mnohočetného přiřazení (multiple alignmentu) a homologie s již známými sekvencemi byly identifikovány také dva úseky, které byly použity pro navržení specifických primerů s cílem získat specifické sondy pro cytogenetické mapování. Jeden úsek (CL4) představoval nekódující oblast DNA transpozónu, která byla identifikována již v původních datech specifických pro chromozóm 4F (Kopecký *et al.*, 2013; Křivánková *et al.*, 2017) a druhý úsek (CL22) použitý pro navržení primerů obsahuje vysoce konzervovanou oblast DNA transpozázy.

5.2 Identifikace a charakterizace sekvencí homologních k LTR elementu CL38

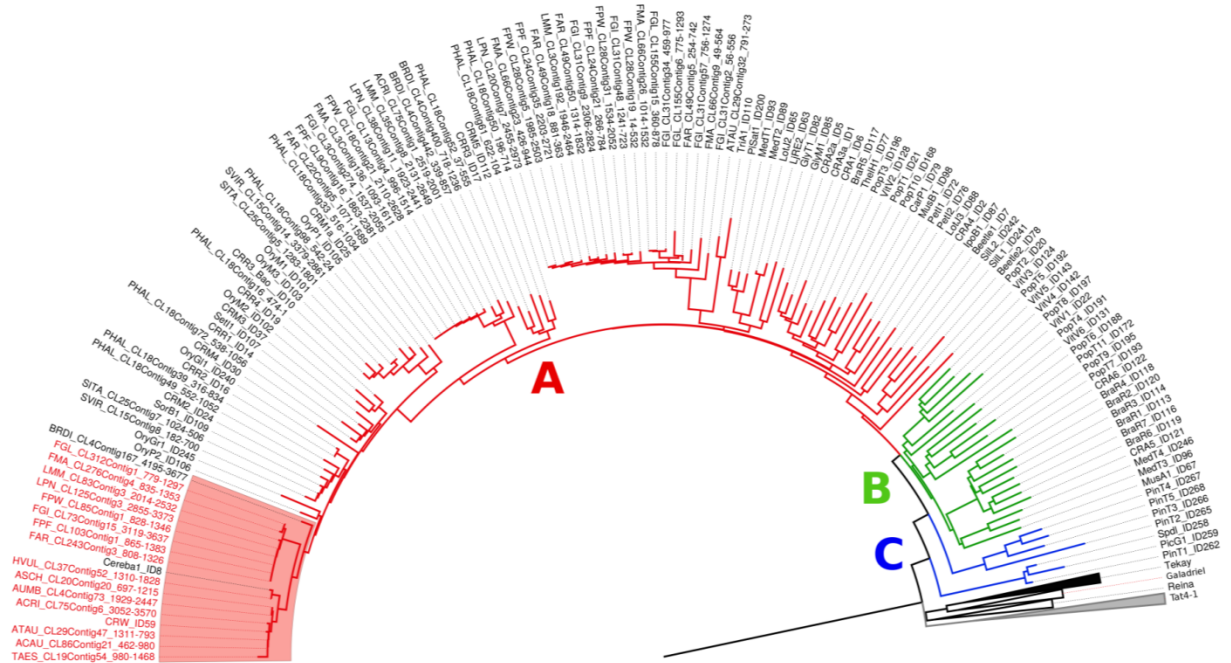
Cílem této části práce bylo podobně jako v předešlém případě identifikovat homologní sekvence ve studovaných druzích. Další podstatnou částí však bylo zjistit, o jaký přesně typ elementu se jedná. Vzhledem k tomu, že v původních datech byl tento repetitivní DNA element sestaven jen do velmi krátkých kontigů, které neobsahovaly žádnou kódující doménu, potřebnou k jednoznačné identifikaci, se jen na základě přítomnosti pravděpodobné LTR sekvence a její cytogenetické lokalizace do centromerické oblasti všech chromozómů spekulovalo o jeho podstatě (Kopecký *et al.* 2013; Křivánková *et al.* 2017).

Ve všech analyzovaných druzích byly identifikovány klastry homologní k původnímu elementu CL38 (Tab. 3). Díky analýze celogenomových dat, ačkoliv data představovala jen 1% genomu, byly sestaveny dlouhé kontigy odpovídající elementu CL38 a obsahující kódující domény. Fylogenetická analýza prokázala, že se skutečně jedná o *Ty3/Gypsy* element ze skupiny *Chromoviridea*, a podrodiny CRM (Obr. 10).

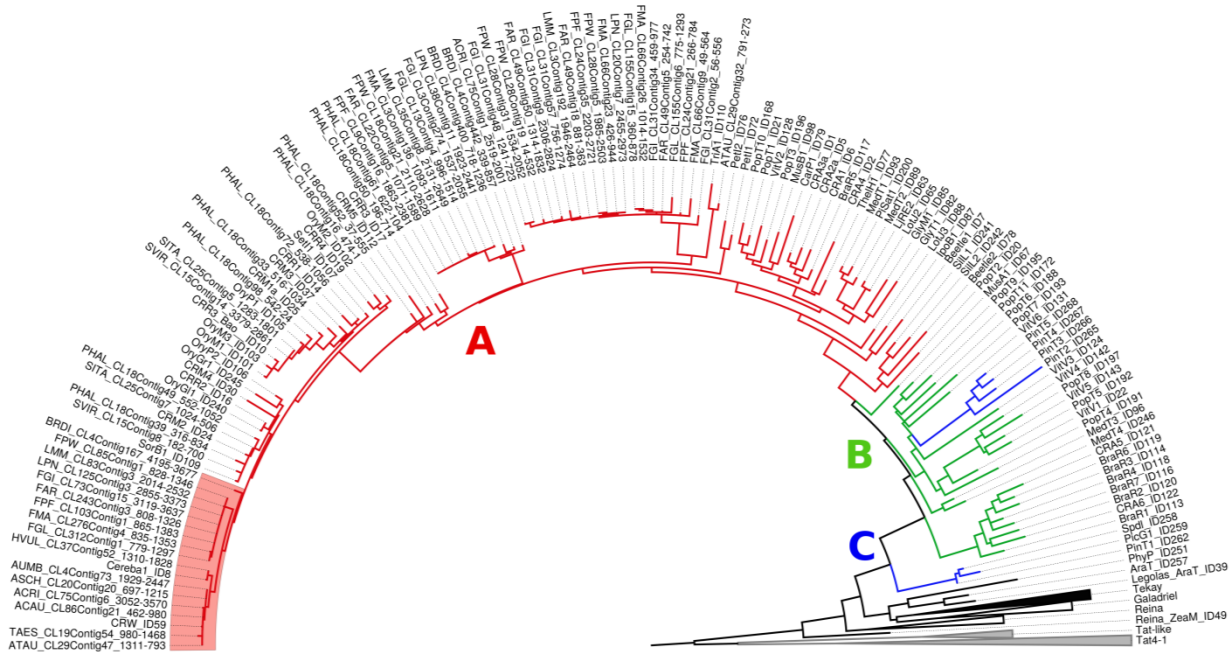
Tab. 3 Zastoupení elementů homologních k LTR retrotranspozónu CL38 v genomech analyzovaných druhů

Název druhu	Ploidie	Homologie k LTR retrotranspozónu / Grasses	Genomová reprezentace [%]	Homologie k LTR retrotranspozónu CL38-4F	Genomová reprezentace [%]
<i>F. pratensis</i> , 'Fure'	2n = 2x = 14	CL103 + CL110 (<i>Cereba</i>)	0.28 (~18 Mbp)	CL8	1.15 (~72 Mbp)
<i>F. pratensis</i> , 'Westa'	2n = 4x = 28	CL85 (<i>Cereba</i>)	0.19 (~23 Mbp)	CL9	1.08 (~132 Mbp)
<i>F. mairei</i>	2n = 4x = 28	CL276 (<i>Cereba</i>)	0.04 (~5 Mbp)	CL3	1.26 (~200 Mbp)
<i>F. arundinacea</i>	2n = 6x = 42	CL172 (<i>Cereba</i>)	0.08 (~130 Mbp)	CL14	4.9 (~820 Mbp)
<i>F. gigantea</i>	2n = 6x = 42	CL73 (<i>Cereba</i>)	0.21 (~42 Mbp)	CL3	2.28 (~452 Mbp)
<i>F. glaucescens</i>	2n = 4x = 28	CL331 (<i>Cereba</i>)	0.02 (~2 Mbp)	CL17	0.4 (~420 Mbp)
<i>L. multiflorum</i> , 'Mitos'	2n = 4x = 28	CL83 + CL87 (<i>Cereba</i>)	0.29 (~29 Mbp)	CL32	0.34 (~34 Mbp)
<i>L. perenne</i>	2n = 2x = 14	-	-		
<i>L. perenne</i> , 'Neptun'	2n = 4x = 28	CL96 + CL125 (<i>Cereba</i>)	0.21 (~23 Mbp)	CL24	0.34 (~37 Mbp)
<i>Aegilops tauschii</i>	2n = 2x = 14	CL29 (<i>Cereba</i>)	0.34 (~27 Mbp)	CL29 + CL88	0.5 (~39 Mbp)
<i>Triticum monococcum</i>	2n = 2x = 14	CL85 (<i>Cereba</i>)	0.09 (~5 Mbp)	CL85	0.09 (~5 Mbp)
<i>Triticum aestivum</i> , 'Chinese Spring'	2n = 6x = 42	CL19 (<i>Cereba</i>)	0.52 (~177 Mbp)	CL19	0.52 (~177 Mbp)
<i>Hordeum vulgare</i> , 'Morex'	2n = 2x = 14	CL37 (<i>Cereba</i>)	0.34 (~34 Mbp)	CL37	0.34 (~35 Mbp)
<i>Secale cereale</i> , 'Dankowskie diament'	2n = 2x = 14	CL26 a CL40 (<i>Cereba</i>)	1.1 (~200 Mbp)	CL26 a CL40	1.1 (~200 Mbp)

A



B



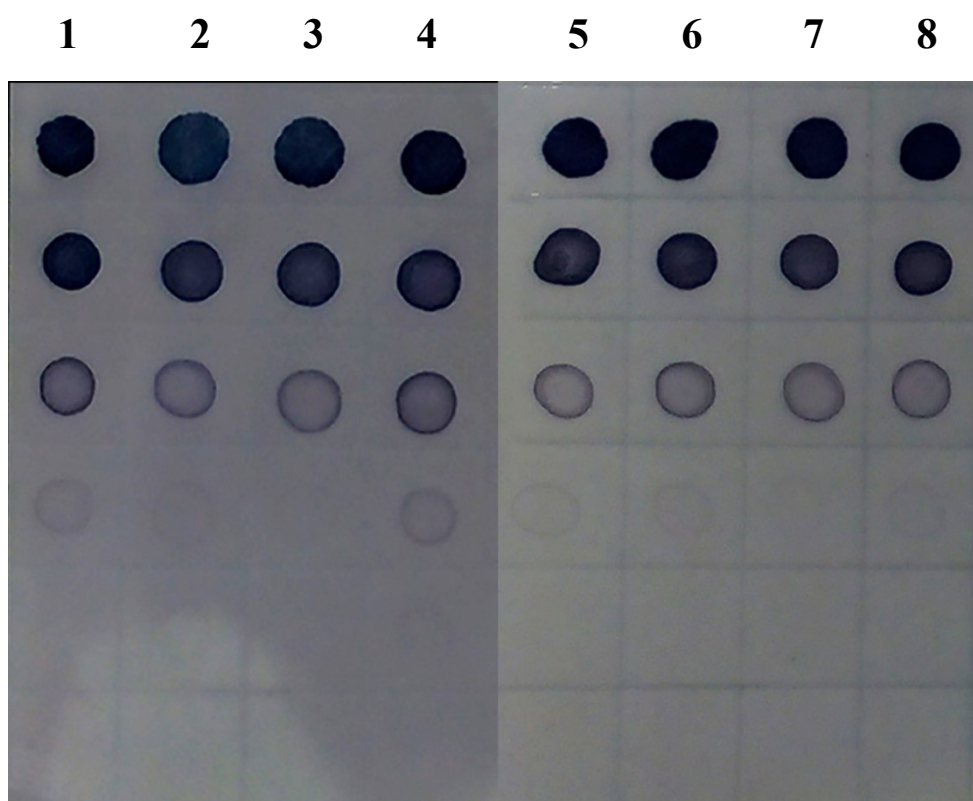
Obř. 10 Fylogenetický strom sekvencí homologních k LTR retrotranspozónu CL38 sestřený metodou BioNJ (A) a maximum likelihood (B). Červeně je vyznačena větev *Cereba* elementu a analyzovaných trav.

Jak je patrné z fylogenetického stromu (Obr. 10), LTR retrotranspozóny homologní k CL38 elementu, identifikované ve všech studovaných druzích, jsou blízce příbuzné již dříve identifikovanému *Ty3/Gypsy* elementu *Cereba* původem z ječmene (Presting *et al.*, 1998).

Na základě mnohočetného přiřazení (multiple alignmentu) byly, podobně jako pro DNA transpozón, identifikovány dva úseky a následně použity pro navržení specifických primerů s cílem získat specifické sondy pro cytogenetické mapování. Jeden úsek (CL38) představoval LTR oblast retrotranspozónu, která byla identifikována již v původních datech specifických pro chromozom 4F (Kopecký *et al.*, 2013, Křivánková *et al.*, 2017) a druhý úsek (RT), použitý pro navržení primerů, obsahuje vysoce konzervovanou oblast pro reverzní transkriptázu.

5.3 Ověření sond

Sondy pro cytogenetické mapování byly vytvořeny pomocí PCR s použitím specifických primerů a směsi značených nukleotidů. PCR produkty byly následně použity pro přípravu koncentrační řady a nanesené na nylonovou membránu Hybond N+. Použitím specifických protilátek anti-digoxigenin-AP a anti-biotin-AP byly detekovány signály, které byly následně vizualizovány za pomoci chromogenního substrátu BM purple AP. Vyhodnocení bylo provedeno prostým okem na základě počtu zabarvených signálů (koleček), odpovídajících pěti vzorkům koncentrační řady, po inkubaci se substrátem. Počet zabarvených koleček představuje přibližnou koncentraci sondy, kdy čtyři viditelné signály znamenají koncentraci 20 – 50 ng/μl a pět signálů koncentraci 50 – 100 ng/μl. Pro příklad je uvedeno ověření několika sond značených biotinem a digoxigeninem (Obr. 11). Vyhodnocení je uvedeno v Tab. 4.



Obr. 11 Ověření sond značených biotinem specifických na: (1) CL4 oblast, (2) CL38 oblast, (3) RT doménu, (4) 5S rDNA; a sond značených digoxigeninem specifických na: (5) CL4 oblast, (6) CL38 oblast, (7) RT doménu, (8) 5S rDNA

Tab. 4 Ověření síly sond

	Sonda	Počet zabarvených koleček	Koncentrace sondy [ng/μl]
Biotinem značené sondy	CL4	4	25 – 50
	CL38	5	50 – 100
	RT	4	25 – 50
	5S	5	50 – 100
Digoxigeninem značené sondy	CL4	4	25 – 50
	CL38	4	25 – 50
	RT	4	25 – 50
	5S	4	25 – 50

Většina sond má shodně koncentraci 25 – 50 ng/μl, sondy CL38 a 5S značené biotinem mají koncentraci dokonce 50 – 100 ng/μl. Všechny sondy mají vysokou koncentraci, a jsou tak vhodné pro cytogenetické mapování.

5.4 Cytogenetická lokalizace DNA transpozónu a centromerického LTR elementu

Vybrané mobilních elementy, společně s rRNA geny, byly cytogeneticky mapovány pomocí fluorescenční *in situ* hybridizace na metafázních mitotických chromozómech čtyř zástupců rodu *Festuca*, tří zástupců rodu *Lolium* a několika druhů obilovin. Pro FISH byly použity čtyři různé sondy, a to sonda specifická pro nekódující oblast DNA transpozónu (CL4), pro vysoce konzervovanou oblast DNA transpozázy tohoto elementu (CL22), pro LTR oblast retrotranspozónu (CL38) a pro vysoce konzervovanou oblast pro reverzní transkriptázu LTR retrotranspozónu (RT). U některých druhů však nebyly lokalizovány všechny čtyři sondy, protože nebyly k dispozici použitelné metafázní figury, a to z důvodu nízkého mitotického indexu na preparátech. Kromě sond specifických pro mobilní elementy byla na některých metafázních chromozómech lokalizována i 5S nebo 45S rDNA jako kontrola správného průběhu FISH.

5.4.1 Lokalizace DNA transpozónu CL4 z nadrodiny CACTA

Jak je vidět na Obr. 12, 13, 14 a 15, sonda specifická pro nekódující oblast DNA transpozónu CL4 (CL4) je přednostně lokalizována v subtelomerických oblastech chromozómů, a to u všech studovaných druhů. Sonda specifická pro konzervovaný úsek domény kódující DNA transpozázu (CL22) poskytla u většiny druhů velmi podobný pattern na chromozómech studovaných druhů. Jedinou výjimkou byl druh *Secale cereale*, kde sonda specifická pro doménu kódující DNA transpozázu elementu CL4 poskytla mnohem silnější signály, a to po celé délce chromozómů kromě centromerické oblasti a telomerických heterochromatinových oblastí (Obr. 14, F). U druhu *Triticum aestivum* byla navíc testována interakce CL4 elementu s *Afa* repeticemi (Obr. 16). Z výsledku bylo zřejmé, že na některých chromozómech je CL4 element sice lokalizován ve stejných oblastech chromozómů jako *Afa* repetice, jejich signály se však zcela nepřekrývají. *Afa* repetice jsou specifické repetitivní DNA sekvence pro subgenom D u *Triticum aestivum*.

5.4.2 Lokalizace *Ty3/Gypsy* retrotranspozónu CL38

Jak lze vidět na Obr. 12 a 13, sonda specifická pro LTR oblast retrotranspozónu CL38 (CL38) je přednostně lokalizována v centromerických a pericentromerických oblastech chromozómů zástupců rodů *Festuca* a *Lolium*. Na rozdíl od kostřav a jílků, u většiny druhů

obilovin tato sonda nebyla lokalizována vůbec (Obr. 14 a 15). U druhu *Avena sativa* tato sonda poskytovala jen velmi slabé signály (Obr. 14, C). Sonda specifická pro konzervovanou oblast kódující reverzní transkriptázu LTR retrotranspozónu (RT) byla taktéž lokalizována v centromerických a pericentromerických oblastech chromozómů, a to u trav i obilovin (Obr. 12, 13, 14 a 15).

5.4.3 Lokalizace rRNA genů

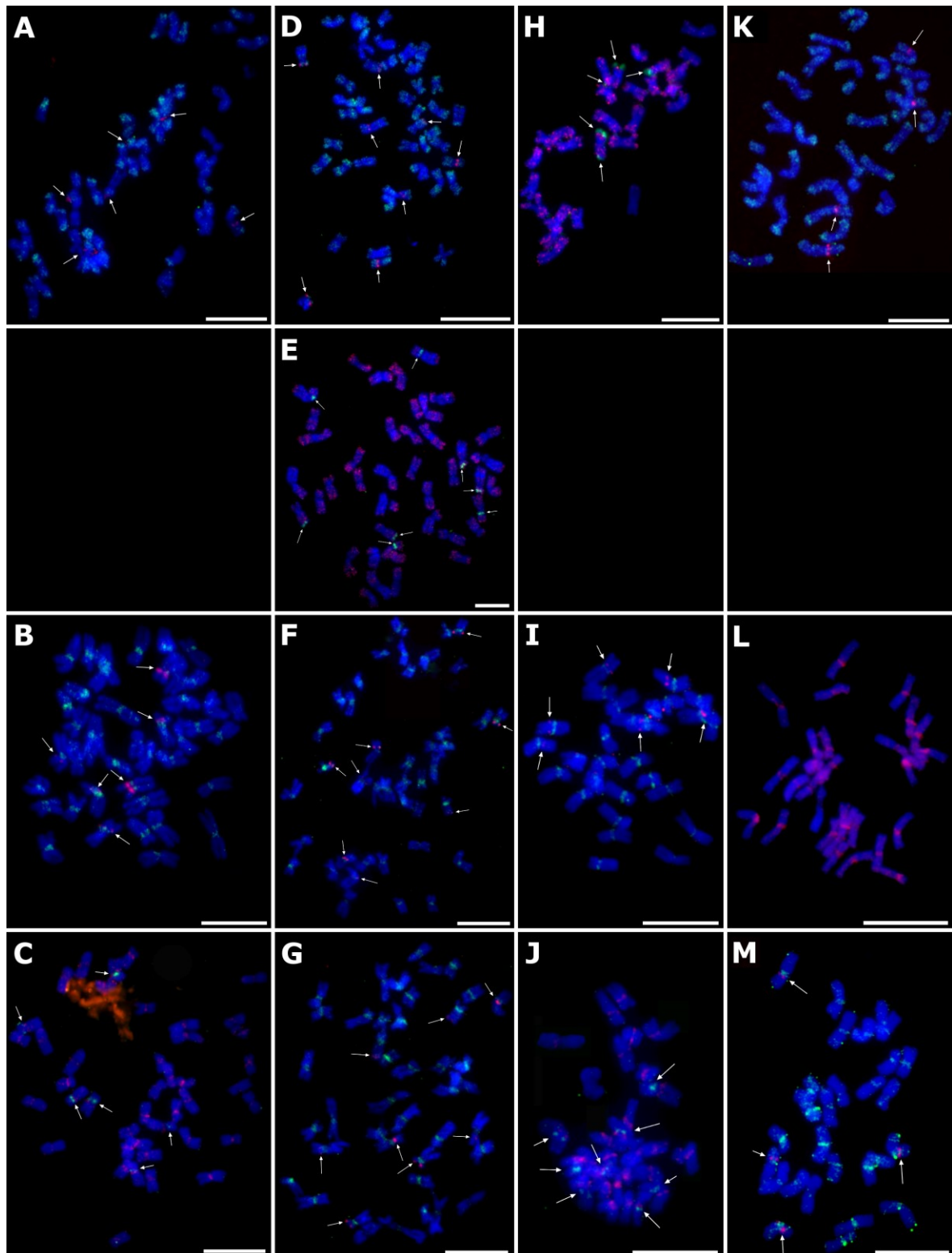
Jak již bylo uvedeno, geny kódující 5S nebo 45S rRNA byly využity jako kontrola správného průběhu FISH. Počty lokalizovaných 5S a 45S rDNA lokusů se lišily u jednotlivých druhů a jsou uvedeny v Tab. 5.

Obecně lze říci, že sonda specifická pro 45S rDNA byla lokalizována do oblastí organizátoru jadérka, a to u všech analyzovaných druhů. U některých analyzovaných druhů byly na chromozómech viditelné jen tzv. majoritní signály, které představují vysoké počty kopií v genomu, jako například u druhu *Lolium perenne* „Neptun“ (Obr. 13, F). U *Triticum aestivum* byly viditelné čtyři nebo pět signálů 45S rDNA, přičemž většinu minoritních signálů nebylo možné lokalizovat (Obr. 15; G, H, I). U druhu *Festuca mairei* byly navíc viditelné dva chromozómy, které nesly signály 45S rDNA na obou svých ramenech (Obr. 12, H).

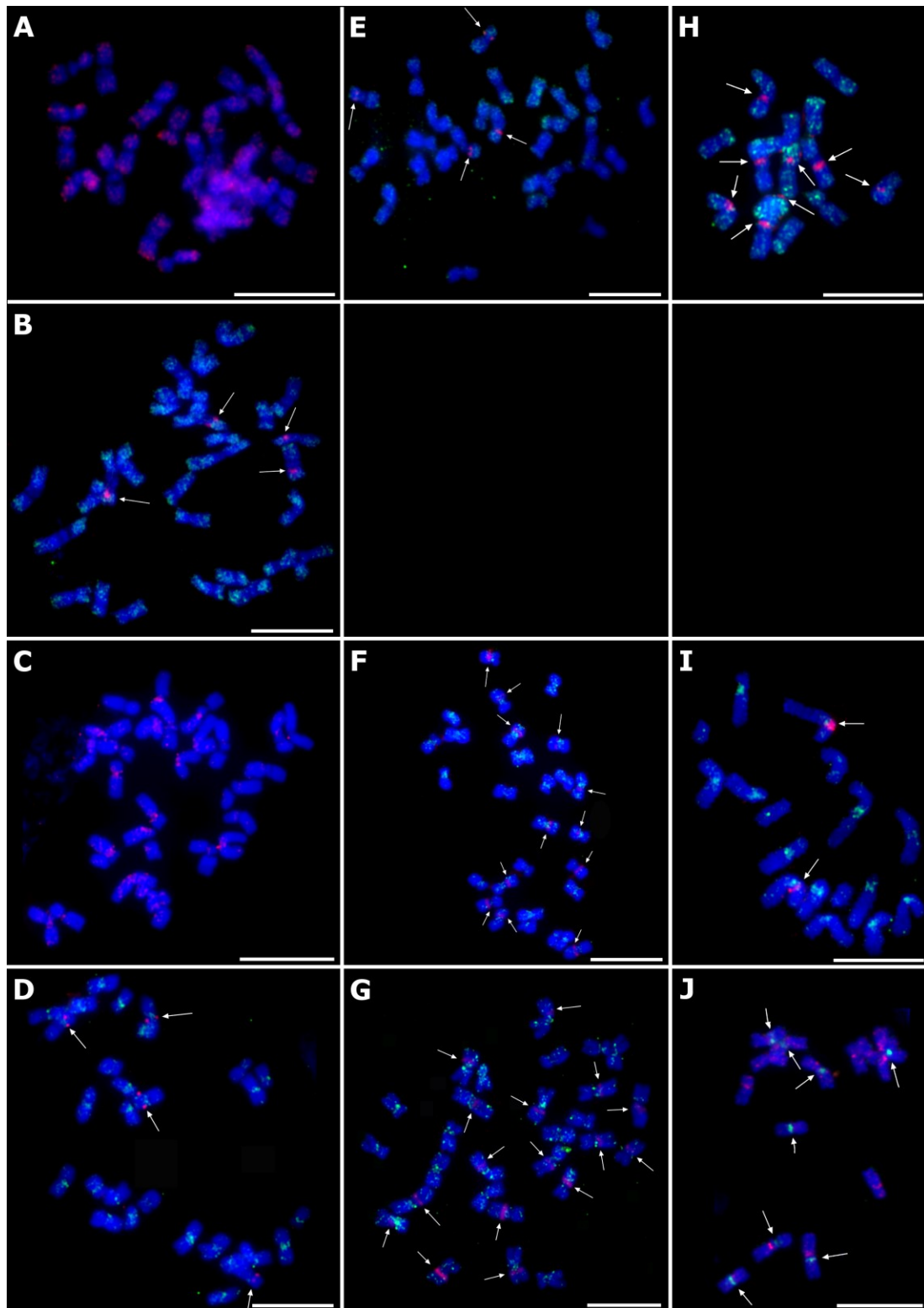
Sondy specifické pro 5S rDNA poskytly signály viditelně oddělené od signálů pro 45S rDNA a počty lokusů pro 5S rDNA jsou uvedeny taktéž v Tab. 5. Podobně jak tomu bylo při některých experimentech se 45S rDNA, také při použití 5S rDNA sond byly v některých experimentech viditelné jen silné, majoritní signály, a to v případě druhu *Festuca mairei* (Obr. 12, I).

Tab. 5 Počet 5S a 45S rDNA lokusů u jednotlivých druhů

Název druhu	Ploidie	5S	45S
FAR	$2n = 6x = 42$	6	6
FGI	$2n = 6x = 42$	8	4
FMA	$2n = 4x = 28$	6 (8)	5
FPW	$2n = 4x = 28$	4	4
LMM	$2n = 4x = 28$	4	14
LPN	$2n = 4x = 28$	4	12 (16)
LP	$2n = 2x = 14$	2	8
ASAT	$2n = 6x = 42$	-	6
SCER	$2n = 2x = 14$	2	2
HVUL	$2n = 2x = 14$	2	4
ATAU	$2n = 2x = 14$	2	2
TMON	$2n = 2x = 14$	-	4
TAES	$2n = 6x = 42$	-	7

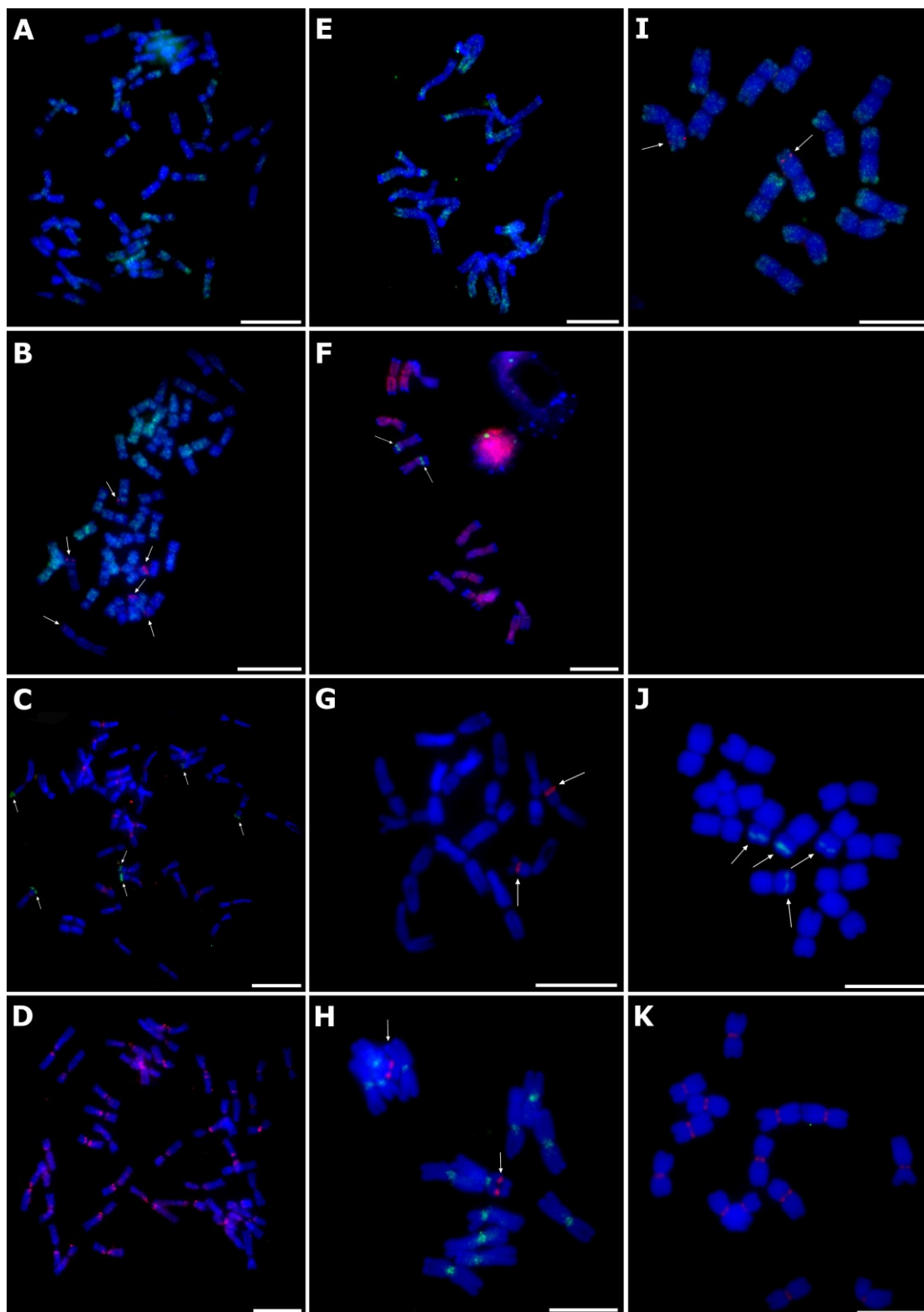


Obr. 12 Lokalizace vybraných mobilních elementů na mitotických chromozómech druhů *F. arundinacea* (A – C), *F. gigantea* (D – G), *F. mairei* (H – J) a *F. pratensis* ‚Westa‘ (K – M). Sonda specifická pro nekódující oblast DNA transpozónu CL4 je lokalizována na obrázcích A, D, H, K; sonda specifická pro doménu kódující DNA transpozázu je lokalizována na obrázku E; sonda specifická pro LTR oblast retrotranspozónu CL38 je lokalizována na obrázcích B, F, I, L a sonda specifická pro doménu kódující reverzní transkriptázu retroelementu CL38 je lokalizována na obrázcích C, G, J a M.). Šipkami jsou vyznačeny signály rDNA: 5S rDNA (B – G, I – K, M), 45S rDNA (A, H). Měřítka odpovídá 10 μ m.



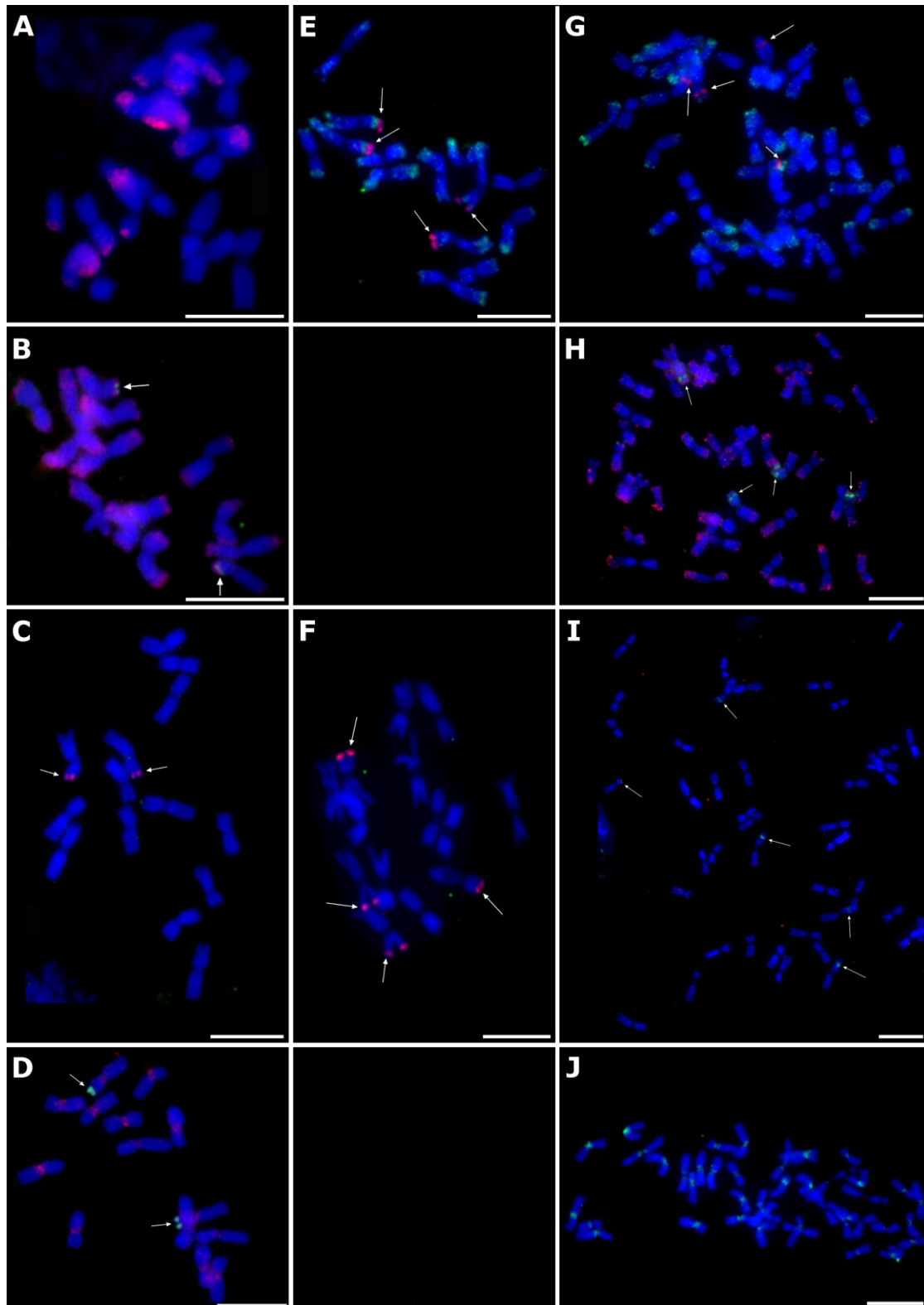
Obr. 13 Lokalizace vybraných mobilních elementů na mitotických chromozómech druhů *L. multiflorum* (A – D), *L. perenne* ‚Neptun‘ (E – G) a *L. perenne* (H – J).

Sonda specifická pro nekódující oblast DNA transpozónu CL4 je lokalizována na obrázcích A, E, H; sonda specifická pro doménu kódující DNA transpozázu je lokalizována na obrázku B; sonda specifická pro LTR oblast retrotranspozónu CL38 je lokalizována na obrázcích C, F, I a sonda specifická pro doménu kódující reverzní transkriptázu retroelementu CL38 je lokalizována na obrázcích D, G, J. Šipkami jsou vyznačeny signály rDNA: 5S rDNA (B, D, E, I), 45S rDNA (F – H, J). Měřítka odpovídá 10 μm .

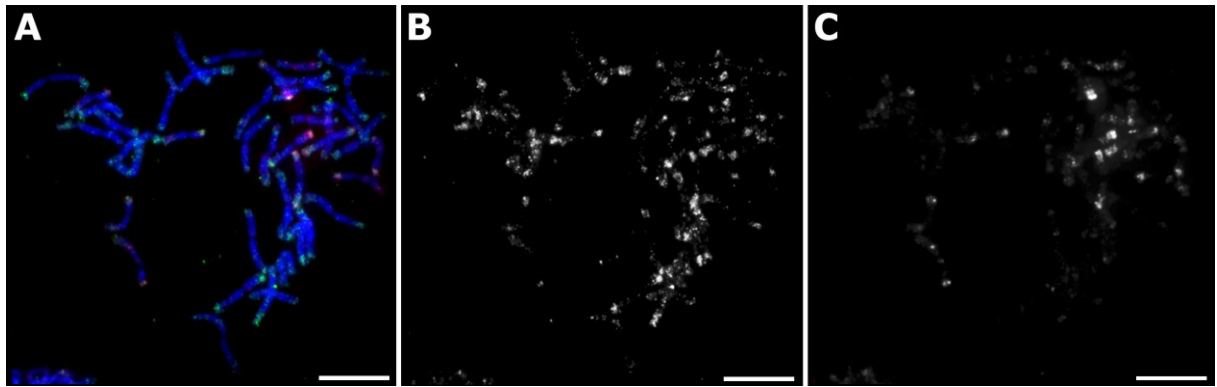


Obr. 14 Lokalizace vybraných mobilních elementů na mitotických chromozómech druhů *Avena sativa* (A – D), *Secale cereale* (E – H) a *Hordeum vulgare* (I – K).

Sonda specifická pro nekódující oblast DNA transpozónu CL4 je lokalizována na obrázcích A, E, I; sonda specifická pro doménu kódující DNA transpozázu je lokalizována na obrázcích B, F; sonda specifická pro LTR oblast retrotranspozónu CL38 je lokalizována na obrázcích C, G, J a sonda specifická pro doménu kódující reverzní transkriptázu retroelementu CL38 je lokalizována na obrázcích D, H, K. Šipkami jsou vyznačeny signály rDNA: 5S rDNA (I), 45S rDNA (B, C, F – H, J). Měřítka odpovídá 10 μm .



Obr. 15 Lokalizace vybraných mobilních elementů na mitotických chromozómech druhů *Aegilops tauschii* (A – D), *Triticum monococcum* (E, F) a *Triticum aestivum* (G – J). Sonda specifická pro nekódující oblast DNA transpozónu CL4 je lokalizována na obrázcích A, E, G; sonda specifická pro doménu kódující DNA transpozázu je lokalizována na obrázcích B, H; sonda specifická pro LTR oblast retrotranspozónu CL38 je lokalizována na obrázcích C, F, I a sonda specifická pro doménu kódující reverzní transkriptázu retroelementu CL38 je lokalizována na obrázcích D, J. Šipkami jsou vyznačeny signály rDNA: 5S rDNA (B), 45S rDNA (C – I). Měřítko odpovídá 10 μm .



Obr. 16 Lokalizace DNA transpozónu CL4 a *Afa* repetice u *Triticum aestivum*. (A) sloučený obrázek, (B) lokalizace sondy specifické pro nekódující oblast DNA transpozónu CL4, (C) lokalizace *Afa* repetice

6 Diskuze

Trávy a obiloviny mají relativně velké genomy, obsahující převážně repetitivní DNA sekvence. Repetitivní sekvence DNA zastávají různé funkce v genomech rostlin, a jsou tak nezbytné pro jejich správné fungování. Mimo jiné, i geny pro ribozomální RNA mají charakter repetitivní DNA a jsou v genomu uspořádány do tandemů. Kromě tandemových repetitivních jsou v genomech významně zastoupeny i mobilní elementy, jak DNA transpozóny, tak především retrotranspozóny. Cílem této diplomové práce bylo charakterizovat dva vybrané mobilní elementy, identifikované v Illumina sekvenčních datech chromozómu 4F druhu *Festuca pratensis* „Fure“, a to DNA transpozón CL4 z CACTA nadrodiny a pravděpodobný LTR retrotranspozón CL38 (Kopecký *et al.*, 2013), který nebyl v dřívější studii podrobněji charakterizován.

V první části byly *in silico* identifikovány homologní sekvence k těmto elementům u několika zástupců z rodů *Festuca* a *Lolium* a u příbuzných obilovin. Oba mobilní elementy byly přítomny v genomech analyzovaných druhů, a to ve velkém počtu kopií. Navíc byla provedena i fylogenetická analýza, která ukázala, že DNA transpozóny homologní k CL4 elementu, identifikované v analyzovaných druzích, jsou blízce příbuzné elementu *Caspar* ze skupiny *En/Spm* transpozónů CACTA nadrodiny. Příbuznost DNA transpozónu CL4 a *Caspar* elementu byla popsána již v dřívější studii (Křivánková *et al.*, 2017). DNA transpozóny příbuzné *Caspar* elementu byly již dříve nalezeny ve velkém počtu kopií v genomech různých zástupců čeledi *Poaceae* (Wicker *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2004; Wicker *et al.*, 2009; Sergeeva *et al.*, 2010).

Cytogenetické mapování tohoto elementu u několika zástupců rodů *Festuca* a *Lolium* a u příbuzných obilovin prokázalo jejich specifickou organizaci v jaderném genomu. DNA transpozón CL4 z CACTA nadrodiny ve většině případů vykazoval preferenční lokalizaci v subtelomerických oblastech, což bylo pozorováno již dříve u druhu *Festuca pratensis* (Křivánková *et al.*, 2017). Získané výsledky podporují již dřívější studie, ve kterých bylo zjištěno, že *Caspar* elementy jsou preferenčně lokalizovány v subtelomerických oblastech rostlinných chromozómů (Sergeeva *et al.*, 2010), zatímco některé jiné DNA transpozóny z CACTA nadrodiny jsou rozptýleny po celých chromozómech zástupců *Poaceae* (Altinkut *et al.*, 2006). Lokalizace obou sond (sonda pro DNA transpozázu a sonda pro nekódující oblast) specifických pro CL4 (*Caspar*-like) element byla velmi podobná u téměř všech studovaných druhů.

U allohexaploidní pšenice, jejíž genom je složen ze tří subgenomů – A, B a D, byla

sonda specifická pro DNA transpozón kolokalizována také s tandemovou repeticí rodiny *Afa*. Tandemová repetice rodiny *Afa* je lokalizována v subtelomerických oblastech chromozomů subgenomu D u druhu *Triticum aestivum*. S cílem zjistit kolokalizaci signálů byla provedena FISH na mitotických chromozómech. Kolokalizace (překrytí) signálů CACTA elementu a *Afa* repetice by mohla naznačovat podíl CACTA elementu na evoluci této specifické tandemové repetice. Jedna z teorií evoluce tandemových repetic totiž je, že se vyvinuly z mobilních elementů. V dřívější studii bylo zjištěno, že satelitní DNA repetice *Sobo* původem z diploidního druhu lilku brambor (*Solanum bulbocastanum*) má vysokou homologii k LTR sekvencím *Ty3/Gypsy* retrotranspozónu *Sore1* z hexaploidního lilku brambor (*Solanum demissum*), z čehož je patrné, že tento satelit tak pravděpodobně vznikl amplifikací oblasti genomu obsahující LTR sekvenci tohoto retrotranspozónu (Tek *et al.*, 2005). FISH na mitotických metafázních chromozómech však přes relativně nízké rozlišení neposkytla jednoznačné důkazy o tom, že se v subgenomu D pšenice seté překrývají signály obou lokalizovaných DNA sekvencí – tedy DNA transpozónu a tandemové repetice *Afa*, a nedá se tedy spekulovat, že by tandemová repetice *Afa* mohla původně vzniknout z DNA transpozónu CL4 z CACTA nadrodiny. Pro podrobnější ověření by bylo potřeba použít chromozómových preparátů s vyšším rozlišením, např. pachytenních chromozomů nebo FISH na DNA vláknech, anebo získat kvalitní celogenomovou sekvenci.

Odlišná lokalizace sondy specifické pro doménu kódující DNA transpozázu a sondy specifické pro nekódující oblast CL4 elementu byla zjištěna u druhu *Secale cereale*. Zatímco sonda specifická pro nekódující část CL4 elementu je, stejně jako u všech ostatních analyzovaných druhů, přednostně lokalizována do subtelomerických oblastí všech chromozomů, sonda specifická pro doménu kódující DNA transpozázu je v genomu organizována odlišně – poskytla silný signál po celé délce chromozomů kromě centromerické oblasti a telomerických heterochromatinových oblastí. Z tohoto výsledku je tak možné usuzovat, že doména kódující DNA transpozázu tohoto elementu je, na rozdíl od jeho nekódujících oblastí, vysoce konzervovaná a v průběhu evoluce podléhala pravděpodobně vysokému selekčnímu tlaku. Dá se tedy usuzovat, že v genomu *Secale cereale* se vyskytují dva příbuzné elementy této skupiny DNA transpozónu, jejichž rozdílná evoluce, respektive diverzifikace v genomu žita setého, vedla také k jejich odlišné organizaci v jaderném genomu. Cytogenetická lokalizace domény kódující DNA transpozázu elementu CL4 z nadrodiny CACTA v jaderném genomu žita setého, kdy byla zjištěna jeho přítomnost v podstatě po celé délce chromozomů, v euchromatinových oblastech, může také naznačovat jeho preferenční inzerci do oblastí obsahujících geny, jak bylo zjištěno například pro zástupce CACTA

elementů v genomu sóji (Zabala *et al.*, 2005). Preferenci některých zástupců CACTA elementů vkládat se do genových oblastí v jaderném genomu žita setého bude ale možné potvrdit až po získání celogenomové sekvence tohoto významného druhu. Nedávno publikovaná práce o vytvoření tzv. „draft“ sekvence (první nástin celogenomové sekvence) druhu *Secale cereale* totiž zatím představuje jen asi 30% genomu a celogenomová assembly má zatím velmi nízkou kvalitu (Bauer *et al.* 2017).

Fylogenetická analýza sekvencí homologních k CL38 retroelementu prokázala, že se jedná o *Ty3/Gypsy* element ze skupiny *Chromoviridea* a podrodiny CRM, o čemž se již dříve spekulovalo (Křivánková *et al.*, 2017). V roce 2002 bylo na základě chromatinové imunoprecipitace objeveno, že CRM elementy a CENH3 proteiny u kukuřice spolu interagují, což ukazuje na pravděpodobnou roli těchto elementů ve funkci centromer (Zhong *et al.*, 2002). Z fylogenetického stromu sekvencí homologních k LTR retrotranspozónu CL38 je také zřejmá blízká příbuznost *Cereba* elementu původem z ječmene (Presting *et al.*, 1998) k tomuto retroelementu.

V předložené diplomové práci bylo zjištěno, že *Ty3/Gypsy* LTR retrotranspozón CL38 byl preferenčně lokalizován v centromerických a pericentromerických oblastech chromozómů všech studovaných druhů, což bylo pozorováno již dříve u druhu *Festuca pratensis* (Křivánková *et al.*, 2017). V dřívějších studiích bylo potvrzeno, že zástupci některých skupin centromerických retrotranspozónů jsou preferenčně lokalizováni v centromerických oblastech u různých druhů (Miller *et al.*, 1998; Langdon *et al.*, 2000; Hudakova *et al.*, 2001; Nagaki *et al.*, 2005; Bao *et al.*, 2006b; Neumann *et al.*, 2011), což bylo později potvrzeno i pomocí imunobarvení protilátkou specifickou pro CENH3 protein, s navazující FISH analýzou (Li *et al.*, 2013). Lokalizace do centromer byla pozorována i u *Cereba* elementu původem z ječmene (Presting *et al.*, 1998), jehož příbuznost k CL38 elementu byla v této práci potvrzena.

Při experimentech byly v diplomové práci používány dva typy sond pro lokalizaci CL38 elementu, a to sonda specifická pro jeho LTR oblast a sonda specifická pro doménu kódující reverzní transkriptázu. Pouze sonda specifická pro doménu reverzní transkriptázy byla lokalizována na metafázních chromozómech všech druhů. Lokalizovat LTR oblast tohoto elementu bylo možné pouze u kostřav, jílků a částečně u druhu *Avena sativa*. Signály obou sond specifických na CL38 retrotranspozón byly velmi podobné u kostřav a jílků. Sonda specifická na LTR oblast tohoto elementu však poskytovala pouze velmi slabé signály u druhu *Avena sativa* a v případě ostatních studovaných druhů obilovin neposkytla žádné viditelné signály. Tento jev byl s největší pravděpodobností způsoben tím, že LTR oblasti retroelementů jsou vysoce variabilní, a sonda navržená na LTR oblast CL38 elementu je specifická jen pro

užší fylogenetickou skupinu studovaných druhů. Ačkoli je tento retroelement přítomen v genomech všech studovaných druhů, v rámci širších fylogenetických skupin došlo k jeho divergenci.

Kromě sond specifických na vybrané mobilní elementy byly také mapovány sondy specifické na 5S nebo 45S rDNA, a to především jako kontrola správného průběhu FISH. Počty lokalizovaných 5S a 45S rDNA lokusů se lišily u jednotlivých druhů a v některých případech nebylo možné lokalizovat minoritní nízkokopiové signály rDNA. Například *Triticum aestivum* nese v genomu celkem sedm lokusů 45S rDNA, přičemž pouze čtyři z nich poskytují silné majoritní signály (Flavell *et* O'Dell, 1979; Werner *et al.*, 1992; Dubcovsky *et* Dvořák, 1995). V této práci bylo možné lokalizovat pouze čtyři nebo pět ze všech sedmi 45S rDNA lokusů.

Druh *Festuca mairei* po FISH se sondou specifickou na 45S rDNA poskytl signály na obou ramenech dvou chromozómů. Tento jev byl ojedinělý, nevyskytoval se u žádného jiného ze studovaných druhů, a je tak možné, že došlo k částečné přestavbě karyotypu v průběhu evoluce druhu *Festuca mairei*.

7 Závěr

V teoretické části této práce byla charakterizována čeleď *Poaceae* a popsána struktura genomu u této čeledi. Další kapitoly se věnovaly repetitivním DNA sekvencím, jejich funkcím v jaderném genomu a využití. Pozornost byla věnována také cytogenetickému mapování u pododdělení *Loliinae*.

V experimentální části byla provedena částečná *in silico* analýza DNA transpozónu CL4 a LTR retrotranspozónu CL38. Byly identifikovány sekvence homologní k těmto mobilním elementům u několika zástupců z rodů *Festuca* a *Lolium* a příbuzných obilovin, a dále byla provedena fylogenetická analýza. Oba elementy byly identifikovány ve studovaných druzích ve velkém počtu kopií. Fylogenetická analýza prokázala, že CL38 element je *Cereba*-like retrotranspozón, patří do *Ty3/Gypsy* rodiny elementů, skupiny *Chromoviridea* a podrodiny CRM, o čemž se dříve jen spekulovalo. Sondy specifické na vybrané mobilní elementy byly využity pro navazující cytogenetické mapování těchto elementů pomocí fluorescenční *in situ* hybridizace na metafázních chromozómech studovaných druhů. Cytogenetické mapování ukázalo, že oba elementy mají unikátní lokalizaci v jaderném genomu všech studovaných druhů. CL4 element byl preferenčně lokalizován v subtelomerických oblastech u většiny druhů, zatímco CL38 element byl lokalizován v centromerických a pericentromerických oblastech všech druhů.

8 Seznam použité literatury

- Altinkut A., Raskina O., Nevo E., Belyayev A. (2006) *En/Spm*-like transposons in *Poaceae* species: Transposase sequence variability and chromosomal distribution. *Cellular and Molecular Biology Letters*. **11** (2): 214-230
- Altschul S. F., Gish W., Miller W., Myers E. W., Lipman D. J. (1990) Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*. **215** (3): 403-410
- Ananiev E. V., Phillips R. L., Rines H. W. (1998) Complex structure of knob DNA on maize chromosome 9: Retrotransposon invasion into heterochromatin. *Genetics*. **149** (4): 2025-2037
- Aragón-Alcaide L., Miller T., Schwarzacher T., Reader S., Moore G. (1996) A cereal centromeric sequence. *Chromosoma*. **105** (5): 261-268
- Avramova Z., Tikhonov A., Chen M., Bennetzen J. L. (1998) Matrix attachment regions and structural colinearity in the genomes of two grass species. *Nucleic Acids Research*. **26** (3): 761-767
- Badaeva E. D., Amosova A. V., Goncharov N. P., Macas J., Ruban A. S., Grechishnikova I. V., Zoshchuk S. A., Houben A. (2015) A set of cytogenetic markers allows the precise identification of all A-genome chromosomes in diploid and polyploid wheat. *Cytogenetic and Genome Research*. **146** (1): 71-79
- Bao J., Corke H., Sun M. (2006a) Analysis of genetic diversity and relationships in waxy rice (*Oryza sativa* L.) using AFLP and ISSR markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*. **53** (2): 323-330
- Bao W., Zhang W., Yang Q., Zhang Y., Han B., Gu M., Xue Y., Cheng Z. (2006b) Diversity of centromeric repeats in two closely related wild rice species, *Oryza officinalis* and *Oryza rhizomatis*. *Molecular Genetics and Genomics: MGG*. **275** (5): 421-430
- Barker R. F., Harberd N. P., Jarvis M. G., Flavell R. B. (1988) Structure and evolution of the intergenic region in a ribosomal DNA repeat unit of wheat. *Journal of Molecular Biology*. **201** (1): 1-17

- Bauer E., Schmutzer T., Barilar I., Mascher M., Gundlach H., Martis M. M., Twardziok S. O., Hackauf B., Gordillo A., Wilde P., Schmidt M., Korzun V., Mayer K. F., Schmid K., Schön C. C., Scholz U. (2017) Towards a whole-genome sequence for rye (*Secale cereale* L.). *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*. **89** (5): 853-869
- Bennett M. D., Leitch I. J. (2012) Angiosperm DNA C-values database (release 8.0, Dec. 2012). Dostupné z: <http://data.kew.org/cvalues/> (cit. 22. 4. 2017)
- Bennetzen J. L. (2000) Transposable element contributions to plant gene and genome evolution. *Plant Molecular Biology*. **42** (1): 251-269
- Bertini C. H. C., Schuster I., Sedyama T., de Barros E. G., Moreira M. A. (2006) Characterization and genetic diversity analysis of cotton cultivars using microsatellites. *Genetics and Molecular Biology*. **29** (2): 321-329
- Blackburn E. H. (1991) Structure and function of telomeres. *Nature*. **350** (6319): 569-573
- Bornet B., Goraguer F., Joly G., Branchard M. (2002) Genetic diversity in European and Argentinian cultivated potatoes (*Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum*) detected by inter-simple sequence repeats (ISSRs). *Genome*. **45**: 481-484
- Boyko E., Kalendar R., Korzun V., Fellers J., Korol A., Schulman A. H., Gill B. S. (2002) A high-density cytogenetic map of the *Aegilops tauschii* genome incorporating retrotransposons and defense-related genes: Insights into cereal chromosome structure and function. *Plant Molecular Biology*. **48** (5): 767-789
- Britten R. J., Kohne D. E. (1968) Repeated sequences in DNA. Hundreds of thousands of copies of DNA sequences have been incorporated into the genomes of higher organisms. *Science (New York, N.Y.)*. **161** (3841): 529-540
- Buchmann J. P., Löytynoja A., Wicker T., Schulman A. H. (2014) Analysis of CACTA transposases reveals intron loss as major factor influencing their exon/intron structure in monocotyledonous and eudicotyledonous hosts. *Mobile DNA*. **5**: 24
- Bureau T. E., Wessler S. R. (1994) *Stowaway*: A new family of inverted repeat elements associated with the genes of both monocotyledonous and dicotyledonous plants. *The Plant Cell*. **6** (6): 907-916
- Carbon J. (1984) Yeast centromeres: Structure and function. *Cell*. **37** (2): 351-353

- Catalán P., Torrecilla P., López Rodríguez J. A., Olmstead R. G. (2004) Phylogeny of the festucoid grasses of subtribe *Loliinae* and allies (*Poeae*, *Pooideae*) inferred from ITS and *trnL-F* sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. **31** (2): 517-541
- Cresse A. D., Hulbert S. H., Brown W. E., Lucas J. R., Bennetzen J. L. (1995) *Mu1*-related transposable elements of maize preferentially insert into low copy number DNA. *Genetics*. **140** (1): 315-324
- Devos K. M. (2010) Grass genome organization and evolution. *Current Opinion in Plant Biology*. **13** (2): 139-145
- Dong F., Song J., Naess S. K., Helgeson J. P., Gebhardt C., Jiang J. (2000) Development and applications of a set of chromosome-specific cytogenetic DNA markers in potato. *Theoretical and Applied Genetics*. **101** (7): 1001-1007
- Dubcovsky J., Dvořák J. (1995) Ribosomal RNA multigene loci: Nomads of the *Triticeae* genomes. *Genetics*. **140** (4): 1367-1377
- Eizenga G. C., Agrama H. A., Lee F. N., Jia Y. (2009) Exploring genetic diversity and potential novel disease resistance genes in a collection of rice (*Oryza* spp.) wild relatives. *Genetic Resources and Crop Evolution*. **56** (1): 65-76
- Emon R. M., Gustafson J. P., Nguyen H., Musket T., Jahiruddin M., Islam M. A., Haque M. S., Islam M. M., Begum S. N., Hassan M. M. (2010) Molecular marker-based characterization and genetic diversity of wheat genotypes in relation to Boron use efficiency. *Indian Journal of Genetics and Plant Breeding*. **70** (4): 339-348
- Fedoroff N., Schläppi M., Raina R. (1995) Epigenetic regulation of the maize *Spm* transposon. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*. **17** (4): 291-297
- Feschotte C., Jiang N., Wessler S. R. (2002) Plant transposable elements: Where genetics meets genomics. *Nature Reviews. Genetics*. **3** (5): 329-341
- Flavell R. B., O'Dell M. (1979) The genetic control of nucleolus formation in wheat. *Chromosoma*. **71** (2): 135-152

- Fonsêca A., Ferreira J., dos Santos T. R., Mosiolek M., Bellucci E., Kami J., Gepts P., Geffroy V., Schweizer D., dos Santos K. G., Pedrosa-Harand A. (2010) Cytogenetic map of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Chromosome Research: An International Journal on the Molecular, Supramolecular and Evolutionary Aspects of Chromosome Biology*. **18** (4): 487-502
- Foster E., Hattori J., Zhang P., Labbé H., Martin-Heller T., Li-Pook-Than J., Ouellet T., Malik K., Miki B. (2003) The new RENT family of repetitive elements in *Nicotiana* species harbors gene regulatory elements related to the tCUP cryptic promoter. *Genome*. **46** (1): 146-155
- Fradkin M., Ferrari M. R., Espert S. M., Ferreira V., Grassi E., Greizerstein E. J., Poggio L. (2013) Differentiation of Triticale cultivars through FISH karyotyping of their rye chromosomes. *Genome*. **56** (5): 267-272
- Francki M. G. (2001) Identification of Bilby, a diverged centromeric *Ty1-copia* retrotransposon family from cereal rye (*Secale cereale* L.). *Genome*. **44** (2): 266-274
- Fransz P. F., Armstrong S., de Jong J. H., Parnell L. D., van Drunen C., Dean C., Zabel P., Bisseling T., Jones G. H. (2000) Integrated cytogenetic map of chromosome arm 4S of *A. thaliana*: Structural organization of heterochromatic knob and centromere region. *Cell*. **100** (3): 367-376
- Fuchs J., Brandes A., Schubert I. (1995) Telomere sequence localization and karyotype evolution in higher plants. *Plant Systematics and Evolution*. **196** (3): 227-241
- Galtier N., Gouy M., Gautier C. (1996) SEAVIEW and PHYLO_WIN: Two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *Computer Applications in the Biosciences: CABIOS*. **12** (6): 543-548
- Gao L. F., Jing R. L., Huo N. X., Li Y., Li X. P., Zhou R. H., Chang X. P., Tang J. F., Ma Z. Y., Jia J. Z. (2004) One hundred and one new microsatellite loci derived from ESTs (EST-SSRs) in bread wheat. *Theoretical and Applied Genetics*. **108** (7): 1392-1340
- Gierl A., Saedler H. (1992) Plant-transposable elements and gene tagging. *Plant Molecular Biology*. **19** (1): 39-49
- Godwin I. D., Aitken E. A., Smith L. W. (1997) Application of inter simple sequence repeat (ISSR) markers to plant genetics. *Electrophoresis*. **18** (9): 1524-1528

Goff S. A., Ricke D., Lan T. H., Presting G., Wang R., Dunn M., Glazebrook J., Sessions A., Oeller P., Varma H., Hadley D., Hutchison D., Martin C., Katagiri F., Lange B. M., Moughamer T., Xia Y., Budworth P., Zhong J., Miguel T., Paszkowski U., Zhang S., Colbert M., Sun W. L., Chen L., Cooper B., Park S., Wood T. C., Mao L., Quail P., Wing R., Dean R., Yu Y., Zharkikh A., Shen R., Sahasrabudhe S., Thomas A., Cannings R., Gutin A., Pruss D., Reid J., Tavtigian S., Mitchell J., Eldredge G., Scholl T., Miller R. M., Bhatnagar S., Adey N., Rubano T., Tusneem N., Robinson R., Feldhaus J., Macalma T., Oliphant A., Briggs S. (2002) A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*). *Science (New York, N.Y.)* **296** (5565): 92-100

Gorinšek B., Gubenšek F., Kordiš D. (2004) Evolutionary genomics of chromoviruses in eukaryotes. *Molecular Biology and Evolution*. **21** (5): 781-798

Grass Phylogeny Working Group (2001) Phylogeny and subfamilial classification of the grasses (*Poaceae*). *Annals of the Missouri Botanical Garden*. **88** (3): 373-457

Greider C. W., Blackburn E. H. (1985) Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. *Cell*. **43**: 405-413

Hajibarat Z., Saidi A., Hajibarat Z., Talebi R. (2015) Characterization of genetic diversity in chickpea using SSR markers, Start Codon Targeted Polymorphism (SCoT) and Conserved DNA-Derived Polymorphism (CDDP). *Physiology and Molecular Biology of Plants: An International Journal of Functional Plant Biology*. **21** (3): 365-373

Han C. G., Frank M. J., Ohtsubo H., Ohtsubo E. (2000) New transposable elements identified as insertions in rice transposon *Tnr1*. *Genes & Genetic Systems*. **75** (2): 69-77

He Z. H., Dong H. T., Dong J. X., Li D. B., Ronald P. C. (2000) The rice *Rim2* transcript accumulates in response to *Magnaporthe grisea* and its predicted protein product shares similarity with TNP2-like proteins encoded by CACTA transposons. *Molecular and General Genetics: MGG*. **264** (1-2): 2-10

Hehl R., Sommer H., Saedler H. (1987) Interaction between the Tam1 and Tam2 transposable elements of *Antirrhinum majus*. *Molecular and General Genetics: MGG*. **207** (1): 47-53

Hiebert C. W., Thomas J. B., Somers D. J., McCallum B. D., Fox S. L (2007) Microsatellite mapping of adult-plant leaf rust resistance gene *Lr22a* in wheat. *Theoretical and Applied Genetics*. **115** (6): 877-884

- Hoehn D. R., Park K. C., Elrouby N., Yu Z., Mohabir N., Cowan R. K., Bureau T. E. (2006) Transposon-mediated expansion and diversification of a family of ULP-like genes. *Molecular Biology and Evolution*. **23** (6): 1254-1268
- Hosouchi T., Kumekawa N., Tsuruoka H., Kotani H. (2002) Physical map-based sizes of the centromeric regions of *Arabidopsis thaliana* chromosomes 1, 2, and 3. *DNA Research: An International Journal for Rapid Publication of Reports on Genes and Genomes*. **9** (4): 117-121
- Houben A., Schubert I. (2003) DNA and proteins of plant centromeres. *Current Opinion in Plant Biology*. **6** (6): 554-560
- http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/index.html (cit. 23. 4. 2017)
- <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/> (cit. 23. 4. 2017)
- Huang X., Madan A. (1999) CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome Research*. **9** (9): 868-877
- Hudakova S., Michalek W., Presting G. G., ten Hoopen R., dos Santos K., Jansencakova Z., Schubert I. (2001) Sequence organization of barley centromeres. *Nucleic Acids Research*. **29** (24): 5029-5035
- Humphreys M. W., Thomas H. M., Morgan W. G., Meredith M. R., Harper J. A., Thomas H., Zwierzykowski Z., Ghesqui re M. (1995) Discriminating the ancestral progenitors of hexaploid *Festuca arundinacea* using genomic *in situ* hybridization. *Heredity*. **75**: 171-174
- Huson D. H., Bryant D. (2006) Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Molecular Biology and Evolution*. **23** (2): 254-267
- Charmet G., Ravel C., Balfourier F. (1997) Phylogenetic analysis in the *Festuca-Lolium* complex using molecular markers and ITS rDNA. *Theoretical and Applied Genetics*. **94** (8): 1038-1046
- Cheng Z., Dong F., Langdon T., Ouyang S., Buell C. R., Gu M., Blattner F. R., Jiang J. (2002) Functional rice centromeres are marked by a satellite repeat and a centromere-specific retrotransposon. *The Plant Cell*. **14** (8): 1691-1704

- Chopra S., Brendel V., Zhang J., Axtell J. D., Peterson T. (1999) Molecular characterization of a mutable pigmentation phenotype and isolation of the first active transposable element from *Sorghum bicolor*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **96** (26): 15330-15335
- International Brachypodium Initiative (2010) Genome sequencing and analysis of the model grass *Brachypodium distachyon*. *Nature*. **463** (7282): 763-768
- Islam-Faridi M. N., Childs K. L., Klein P. E., Hodnett G., Menz M. A., Klein R. R., Rooney W. L., Mullet J. E., Stelly D. M., Price H.J. (2002) A molecular cytogenetic map of sorghum chromosome 1: Fluorescence *in situ* hybridization analysis with mapped bacterial artificial chromosomes. *Genetics*. **161** (1): 345-353
- Jauhar P. P. (1993) The *Festuca-Lolium* Complex: A fascinating group of grasses. *Cytogenetics of the Festuca-Lolium Complex*. 1-8, Springer-Verlag GmbH. ISBN 978-0387521138
- Jenkin T. J. (1933) Interspecific and intergeneric hybrids in herbage grasses. Initial crosses. *Journal of Genetics*. **28**: 205-264
- Jiang J., Birchler J. A., Parrott W. A., Dawe R. K. (2003) A molecular view of plant centromeres. *Trends in Plant Science*. **8** (12): 570-575
- Jiang J., Nasuda S., Dong F., Scherrer C. W., Woo S. S., Wing R. A., Gill B. S., Ward D. C. (1996) A conserved repetitive DNA element located in the centromeres of cereal chromosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **93** (24): 14210-14213
- Kalendar R., Grob T., Regina M., Suoniemi A., Schulman A. (1999) IRAP and REMAP: Two new retrotransposon-based DNA fingerprinting techniques. *Theoretical and Applied Genetics*. **98** (5): 704-711
- Katoh K., Kuma K., Toh H., Miyata T. (2005) MAFFT version 5: Improvement in accuracy of multiple sequence alignment. *Nucleic Acids Research*. **33** (2): 511-518
- Kazazian H. H. Jr (2004) Mobile elements: Drivers of genome evolution. *Science*. **303** (5664): 1626-1632

- Kopecký D., Bartoš J., Lukaszewski A. J., Baird J. H., Černoch V., Kölliker R., Rognli O. A., Blois H., Caig V., Lübberstedt T., Studer B., Shaw P., Doležel J., Kilian A. (2009) Development and mapping of DArT markers within the *Festuca - Lolium* complex. *BMC Genomics*. **10** (1): 473
- Kopecký D., Loureiro J., Zwierzykowski Z., Ghesquière M., Doležel J. (2006) Genome constitution and evolution in *Lolium* × *Festuca* hybrid cultivars (Festulolium). *Theoretical and Applied Genetics*. **113** (4): 731-742
- Kopecký D., Lukaszewski A. J., Doležel J. (2008a) Cytogenetics of Festulolium (*Festuca* × *Lolium* hybrids). *Cytogenetic and Genome Research*. **120** (3-4): 370-383
- Kopecký D., Lukaszewski A. J., Doležel J. (2008b) Meiotic behaviour of individual chromosomes of *Festuca pratensis* in tetraploid *Lolium multiflorum*. *Chromosome Research: An International Journal on the Molecular, Supramolecular and Evolutionary Aspects of Chromosome Biology*. **16** (7): 987-998
- Kopecký D., Martis M., Číhalíková J., Hřibová E., Vrána J., Bartoš J., Kopecká J., Cattonaro F., Stočes Š., Novák P., Neumann P., Macas J., Šimková H., Studer B., Asp T., Baird J. H., Navrátil P., Karafiátová M., Kubaláková M., Šafář J., Mayer K., Doležel J. (2013) Flow sorting and sequencing meadow fescue chromosome 4F. *Plant Physiology*. **163** (3): 1323-1337
- Kordiš D. (2005) A genomic perspective on the chromodomain-containing retrotransposons: Chromoviruses. *Gene*. **347** (2): 161-173
- Křivánková A., Kopecký D., Stočes Š., Doležel J., Hřibová E. (2017) Repetitive DNA: a versatile tool for karyotyping in *Festuca pratensis* Huds. *Cytogenet Genome Res.* DOI: 10.1159/000462915.
- Kubaláková M., Kovářová P., Suchánková P., Číhalíková J., Bartoš J., Lucretti S., Watanabe N., Kianian S. F., Doležel J. (2005) Chromosome sorting in tetraploid wheat and its potential for genome analysis. *Genetics*. **170** (2): 823-829
- Kumar A., Bennetzen J. L. (1999) Plant retrotransposons. *Annual Review of Genetics*. **33**: 479-532

- Kumekawa N., Hosouchi T., Tsuruoka H., Kotani H. (2000) The size and sequence organization of the centromeric region of *Arabidopsis thaliana* chromosome 5. *DNA Research: An International Journal for Rapid Publication of Reports on Genes and Genomes*. **7** (6): 315-321
- Kumekawa N., Hosouchi T., Tsuruoka H., Kotani H. (2001a) The size and sequence organization of the centromeric region of *Arabidopsis thaliana* chromosome 4. *DNA Research: An International Journal for Rapid Publication of Reports on Genes and Genomes*. **8** (6): 285-290
- Kumekawa N., Ohmido N., Fukui K., Ohtsubo E., Ohtsubo H. (2001b) A new gypsy-type retrotransposon, *RIRE7*: Preferential insertion into the tandem repeat sequence TrsD in pericentromeric heterochromatin regions of rice chromosomes. *Molecular Genetics and Genomics*. **265** (3): 480-488
- Kwiatek M., Wiśniewska H., Apolinarska B. (2013) Cytogenetic analysis of *Aegilops* chromosomes, potentially usable in triticale (*X Triticosecale* Witt.) breeding. *Journal of Applied Genetics*. **54** (2): 147-155
- Kwon S. J., Park K. C., Kim J. H., Lee J. K., Kim N. S. (2005) *Rim 2/Hipa* CACTA transposon display: A new genetic marker technique in *Oryza* species. *BMC Genetics*. **6**: 15
- Lafontaine D. L., Tollervey D. (2001) The function and synthesis of ribosomes. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*. **2** (7): 514-520
- Lai J., Li Y., Messing J., Dooner H. K. (2005) Gene movement by *Helitron* transposons contributes to the haplotype variability of maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **102** (25): 9068-9073
- Lal S. K., Giroux M. J., Brendel V., Vallejos C. E., Hannah L. C. (2003) The maize genome contains a *Helitron* insertion. *The Plant Cell*. **15** (2): 381-391
- Langdon T., Seago C., Mende M., Leggett M., Thomas H., Foster J. W., Jones R. N., Jenkins G. (2000) Retrotransposon evolution in diverse plant genomes. *Genetics*. **156** (1): 313-325
- Latif M. A., Rafii Yusop M., Motiur Rahman M., Bashir Talukdar M. R. (2011) Microsatellite and minisatellite markers based DNA fingerprinting and genetic diversity of blast and ufra resistant genotypes. *Comptes Rendus Biologies*. **334** (4): 282-289

- Lee J. K., Kwon S. J., Park K. C., Kim N. S. (2005) *Isaac*-CACTA transposons: New genetic markers in maize and sorghum. *Genome*. **48** (3): 455-460
- Li B., Choulet F., Heng Y., Hao W., Paux E., Liu Z., Yue W., Jin W., Feuillet C., Zhang X. (2013) Wheat centromeric retrotransposons: The new ones take a major role in centromeric structure. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*. **73** (6): 952-965
- Liu Z., Yue W., Li D., Wang R. R., Kong X., Lu K., Wang G., Dong Y., Jin W., Zhang X. (2008) Structure and dynamics of retrotransposons at wheat centromeres and pericentromeres. *Chromosoma*. **117** (5): 445-456
- Long E. O., Dawid I. B. (1980) Repeated genes in eukaryotes. *Annual Review of Biochemistry*. **49**: 727-764
- Ma J., Wing R. A., Bennetzen J. L., Jackson S. A. (2007) Plant centromere organization: A dynamic structure with conserved functions. *Trends in Genetics*. **23** (3): 134-139
- Malik C. P., Thomas P. T. (1966) Karyotypic studies in some *Lolium* and *Festuca* species. *Caryologia*. **2**: 167-196
- McKinley K. L., Cheeseman I. M. (2016) The molecular basis for centromere identity and function. *Nature Reviews: Molecular Cell Biology*. **17** (1): 16-29
- McKnight T. D., Riha K., Shippen D. E. (2002) Telomeres, telomerase, and stability of the plant genome. *Plant Molecular Biology*. **48** (4): 331-337
- Miller J. T., Dong F., Jackson S. A., Song J., Jiang J. (1998) Retrotransposon-related DNA sequences in the centromeres of grass chromosomes. *Genetics*. **150** (4): 1615-1623
- Miura A., Yonebayashi S., Watanabe K., Toyama T., Shimada H., Kakutani T. (2001) Mobilization of transposons by a mutation abolishing full DNA methylation in *Arabidopsis*. *Nature*. **411** (6834): 212-214
- Motohashi R., Ohtsubo E., Ohtsubo H. (1996) Identification of *Tnr3*, a suppressor-mutator/enhancer-like transposable element from rice. *Molecular and General Genetics: MGG*. **250** (2): 148-152

- Müller A., Marins M., Kamisugi Y., Meyer P. (2002) Analysis of hypermethylation in the RPS element suggests a signal function for short inverted repeats in *de novo* methylation. *Plant Molecular Biology*. **48** (4): 383-399
- Nagaki K., Neumann P., Zhang D., Ouyang S., Buell C. R. Cheng Z., Jiang J. (2005) Structure, divergence, and distribution of the CRR centromeric retrotransposon family in rice. *Molecular Biology and Evolution*. **22** (4): 845-855
- Nagaki K., Song J., Stupar R. M., Parokonny A. S., Yuan Q., Ouyang S., Liu J., Hsiao J., Jones K. M., Dawe R. K., Buell C. R., Jiang J. (2003) Molecular and cytological analyses of large tracks of centromeric DNA reveal the structure and evolutionary dynamics of maize centromeres. *Genetics*. **163** (2): 759-770
- Neumann P., Navrátilová A., Koblížková A., Kejnovský E., Hřibová E., Hobza R., Widmer A., Doležel J., Macas J. (2011) Plant centromeric retrotransposons: A structural and cytogenetic perspective. *Mobile DNA*. **2** (1): 4
- Novák P., Neumann P., Macas J. (2010) Graph-based clustering and characterization of repetitive sequences in next-generation sequencing data. *BMC Bioinformatics*. **11**: 378
- Ohtsu K., Hirano H. Y., Tsutsumi N., Hirai A., Nakazono M. (2005) *Anaconda*, a new class of transposon belonging to the *Mu* superfamily, has diversified by acquiring host genes during rice evolution. *Molecular Genetics and Genomics: MGG*. **274** (6): 606-615
- Ott R. W., Hansen L. K. (1996) Repeated sequences from the *Arabidopsis thaliana* genome function as enhancers in transgenic tobacco. *Molecular and General Genetics: MGG*. **252** (5): 563-571
- Paterson A. H., Bowers J. E., Bruggmann R., Dubchak I., Grimwood J., Gundlach H., Haberer G., Hellsten U., Mitros T., Poliakov A., Schmutz J., Spannagl M., Tang H., Wang X., Wicker T., Bharti A. K., Chapman J., Feltus F. A., Gowik U., Grigoriev I. V., Lyons E., Maher C. A., Martis M., Narechania A., Ollilar R. P., Penning B. W., Salamov A. A., Wang Y., Zhang L., Carpita N. C., Freeling M., Gingle A. R., Hash C. T., Keller B., Klein P., Kresovich S., McCann M. C., Ming R., Peterson D. G., Mehboob-ur-Rahman, Ware D., Westhoff P., Mayer K. F., Messing J., Rokhsar D. S. (2009) The *Sorghum bicolor* genome and the diversification of grasses. *Nature*. **457** (7229): 551-556

- Paux E., Faure S., Choulet F., Roger D., Gauthier V., Martinant J. P., Sourdille P., Balfourier F., Le Paslier M. C., Chauveau A., Cakir M., Gandon B., Feuillet C. (2010) Insertion site-based polymorphism markers open new perspectives for genome saturation and marker-assisted selection in wheat. *Plant Biotechnology Journal*. **8** (2): 196-210
- Pélissier T., Tutois S., Tourmente S., Deragon J. M., Picard G. (1996) DNA regions flanking the major *Arabidopsis thaliana* satellite are principally enriched in *Athila* retroelement sequences. *Genetica*. **97** (2): 141-151
- Pereira A., Cuypers H., Gierl A., Schwarz-Sommer Z., Saedler H. (1986) Molecular analysis of the *En/Spm* transposable element system of *Zea mays*. *The EMBO Journal*. **5** (5): 835-841
- Plaschke J., Ganai M. W., Röder M. S. (1995) Detection of genetic diversity in closely related bread wheat using microsatellite markers. *Theoretical and Applied Genetics*. **91** (6-7): 1001-1007
- Polívka F. (1902) Názorná květena zemí koruny české. Svazek IV. R. Promberger, 712 s.
- Pouteau S., Grandbastien M. - A., Boccara M. (1994) Microbial elicitors of plant defence responses activate transcription of a retrotransposon. *The Plant Journal*. **5** (4): 535-542
- Presting G. G., Malysheva L., Fuchs J., Schubert I. (1998) A *Ty3/gypsy* retrotransposon-like sequence localizes to the centromeric regions of cereal chromosomes. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*. **16** (6): 721-728
- Raina R., Schläppi M., Karunanandaa B., Elhofy A., Fedoroff N. (1998) Concerted formation of macromolecular Suppressor–mutator transposition complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **95** (15): 8526-8531
- Rao V. R., Iwanaga M. (1997) Utilization of plant genetic resources. In: Watanabe K., Pehu E. *Plant Biotechnology and Plant Genetic Resources for Sustainability and Productivity*. 247 s. Academic Press. ISBN 978-1570594199
- Ren Y., Zhang Z., Liu J., Staub J. E., Han Y., Cheng Z., Li X., Lu J., Miao H., Kang H., Xie B., Gu X., Wang X., Du Y., Jin W., Huang S. (2009) An integrated genetic and cytogenetic map of the cucumber genome. *PloS One*. **4** (6): e5795
- Richards E. J., Ausubel F. M. (1988) Isolation of a higher eukaryotic telomere from *Arabidopsis thaliana*. *Cell*. **53** (1): 127-136

- Röder M. S., Korzun V., Wendehake K., Plaschke J., Tixier M. H., Leroy P., Ganal M. W. (1998) A microsatellite map of wheat. *Genetics*. **149** (4): 2007-2023
- Rogers S. O., Bendich A. J. (1987) Ribosomal RNA genes in plants: Variability in copy number and in the intergenic spacer. *Plant Molecular Biology*. **9** (5): 509-520
- Sadder M. T., Weber G. (2001) Karyotype of maize (*Zea mays* L.) mitotic metaphase chromosomes as revealed by fluorescence *in situ* hybridization (FISH) with cytogenetic DNA markers. *Plant Molecular Biology Reporter*. **19** (2): 117-123
- 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
- Santi L., Wang Y., Stile M. R., Berendzen K., Wanke D., Roig C., Pozzi C., Müller K., Müller J., Rohde W., Salamini F. (2003) The GA octodinucleotide repeat binding factor BBR participates in the transcriptional regulation of the homeobox gene *Bkn3*. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*. **34** (6): 813-826
- Sergeeva E. M., Salina E. A., Adonina I. G., Chalhoub B. (2010) Evolutionary analysis of the CACTA DNA-transposon *Caspar* across wheat species using sequence comparison and *in situ* hybridization. *Molecular Genetics and Genomics: MGG*. **284** (1): 11-23
- Shapiro J. A., von Sternberg R. (2005) Why repetitive DNA is essential to genome function. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*. **80** (2): 227-250
- Sharma A., Presting G. G. (2008) Centromeric retrotransposon lineages predate the maize/rice divergence and differ in abundance and activity. *Molecular Genetics and Genomics*. **279** (2): 133-147
- Sharma A., Presting G. G. (2014) Evolution of centromeric retrotransposons in grasses. *Genome Biology and Evolution*. **6** (6): 1335-1352
- Sharma A., Wolfgruber T. K., Presting G. G. (2013) Tandem repeats derived from centromeric retrotransposons. *BMC Genomics*. **14**: 142
- Shishido R., Kikuchi M., Nomura K., Ikehashi H. (2006) Evaluation of genetic diversity of wild rice (*Oryza rufipogon* Griff.) in Myanmar using simple sequence repeats (SSRs). *Genetic Resources and Crop Evolution*. **53** (1): 179-186

Schnable P. S., Ware D., Fulton R. S., Stein J. C., Wei F., Pasternak S., Liang C., Zhang J., Fulton L., Graves T. A., Minx P., Reily A. D., Courtney L., Kruchowski S. S., Tomlinson C., Strong C., Delehaunty K., Fronick C., Courtney B., Rock S. M., Belter E., Du F., Kim K., Abbott R. M., Cotton M., Levy A., Marchetto P., Ochoa K., Jackson S. M., Gillam B., Chen W., Yan L., Higginbotham J., Cardenas M., Waligorski J., Applebaum E., Phelps L., Falcone J., Kanchi K., Thane T., Scimone A., Thane N., Henke J., Wang T., Ruppert J., Shah N., Rotter K., Hodges J., Ingenthron E., Cordes M., Kohlberg S., Sgro J., Delgado B., Mead K., Chinwalla A., Leonard S., Crouse K., Collura K., Kudrna D., Currie J., He R., Angelova A., Rajasekar S., Mueller T., Lomeli R., Scara G., Ko A., Delaney K., Wissotski M., Lopez G., Campos D., Braidotti M., Ashley E., Golser W., Kim H., Lee S., Lin J., Dujmic Z., Kim W., Talag J., Zuccolo A., Fan C., Sebastian A., Kramer M., Spiegel L., Nascimento L., Zutavern T., Miller B., Ambroise C., Muller S., Spooner W., Narechania A., Ren L., Wei S., Kumari S., Faga B., Levy M. J., McMahan L., Van Buren P., Vaughn M. W., Ying K., Yeh C. T., Emrich S. J., Jia Y., Kalyanaraman A., Hsia A. P., Barbazuk W. B., Baucom R. S., Brutnell T. P., Carpita N. C., Chaparro C., Chia J. M., Deragon J. M., Estill J. C., Fu Y., Jeddelloh J. A., Han Y., Lee H., Li P., Lisch D. R., Liu S., Liu Z., Nagel D. H., McCann M. C., SanMiguel P., Myers A. M., Nettleton D., Nguyen J., Penning B. W., Ponnala L., Schneider K. L., Schwartz D. C., Sharma A., Soderlund C., Springer N. M., Sun Q., Wang H., Waterman M., Westerman R., Wolfgruber T. K., Yang L., Yu Y., Zhang L., Zhou S., Zhu Q., Bennetzen J. L., Dawe R. K., Jiang J., Jiang N., Presting G. G., Wessler S. R., Aluru S., Martienssen R. A., Clifton S. W., McCombie W. R., Wing R. A., Wilson R. K. (2009) The B73 maize genome: Complexity, diversity, and dynamics. *Science (New York, N.Y.)*. **326** (5956): 1112-1115

Snowdon R. J., Friedt W., Köhler A., Köhler W. (2000) Molecular cytogenetic localization and characterization of 5S and 25S rDNA loci for chromosome identification in oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Annals of Botany*. **86** (1): 201-204

Soreng R. J., Peterson P. M., Romaschenko K., Davidse G., Zuloaga F. O., Judziewicz E. J., Filgueiras T. S., Davis J. I., Morrone O. (2015) A worldwide phylogenetic classification of the *Poaceae* (*Gramineae*). *Journal of Systematics and Evolution*. **53** (2): 117-137

Sousa A., Barros e Silva A. E., Cuadrado A., Loarce Y., Alves M. V., Guerra M. (2011) Distribution of 5S and 45S rDNA sites in plants with holokinetic chromosomes and the “chromosome field” hypothesis. *Micron (Oxford, England: 1993)*. **42** (6): 625-631

- Su C. C., Zhai H. Q., Wang C. M., Sun L. H., Wan J. M. (2006) SSR mapping of brown planthopper resistance gene *Bph9* in Kaharamana, an *Indica* rice (*Oryza sativa* L.). *Yi Chuan Xue Bao = Acta Genetica Sinica*. **33** (3): 262-268
- Talbert L. E., Chandler V. L. (1988) Characterization of a highly conserved sequence related to mutator transposable elements in maize. *Molecular Biology and Evolution*. **5** (5): 519-529
- Tautz D. (1993) Notes on the definition and nomenclature of tandemly repetitive DNA sequences. In: Pena S. D. (Ed.). *DNA Fingerprinting: State of the Science*. 21-28, Birkhäuser Verlag GmbH. ISBN 978-0817629069
- Tek A. L., Song J., Macas J., Jiang J. (2005) Sobo, a recently amplified satellite repeat of potato, and its implications for the origin of tandemly repeated sequence. *Genetics*. **170** (3): 1231-1238
- Thomas H. M., Harper J. A., Meredith M. R., Morgan W. G., King I. P. (1997) Physical mapping of ribosomal DNA sites in *Festuca arundinacea* and related species by *in situ* hybridization. *Genome*. **40** (3): 406-410
- Tian P. F. (2006) Progress in plant CACTA elements. *Yi Chuan Xue Bao = Acta Genetica Sinica*. **33** (9): 765-774
- Tikhonov A. P., SanMiguel P. J., Nakajima Y., Gorenstein N. M., Bennetzen J. L., Avramova Z. (1999) Colinearity and its exceptions in orthologous *adh* regions of maize and sorghum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **96** (13): 7409-7414
- Toro M. A., Caballero A. (2005) Characterization and conservation of genetic diversity in subdivided populations. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*. **360** (1459): 1367-1378
- Torrecilla P., Catalán P. (2002) Phylogeny of broad-leaved and fine-leaved *Festuca* lineages (*Poaceae*) based on nuclear ITS sequences. *Systematic Botany*. **27** (2): 241-251
- Tyrka M., Perovic D., Wardynska A., Ordon F. (2008) A new diagnostic SSR marker for selection of the *Rym4/Rym5* locus in barley breeding. *Journal of Applied Genetics*. **49** (2): 127-134

- Varshney R. K., Sigmund R., Börner A., Korzun V., Stein N., Sorrells M. E., Langridge P., Graner A. (2005) Interspecific transferability and comparative mapping of barley EST-SSR markers in wheat, rye and rice. *Plant Science*. **168** (1): 195-202
- Vodkin L. O., Rhodes P. R., Goldberg R. B. (1983) Ca lectin gene insertion has the structural features of a transposable element. *Cell*. **34** (3): 1023-1031
- Wang G. D., Tian P. F., Cheng Z. K., Wu G., Jiang J. M., Li D. B., Li Q., He Z. H. (2003) Genomic characterization of *Rim2/Hipa* elements reveals a CACTA-like transposon superfamily with unique features in the rice genome. *Molecular Genetics and Genomics: MGG*. **270** (3): 234-242
- Werner J. E., Endo T. R., Gill B. S. (1992) Toward a cytogenetically based physical map of the wheat genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **89** (23): 11307-11311
- Wicker T., Guyot R., Yahiaoui N., Keller B. (2003) CACTA transposons in *Triticeae*. A diverse family of high-copy repetitive elements. *Plant Physiology*. **132** (1): 52-63
- Wicker T., Taudien S., Houben A., Keller B., Graner A., Platzer M., Stein N. (2009) A whole-genome snapshot of 454 sequences exposes the composition of the barley genome and provides evidence for parallel evolution of genome size in wheat and barley. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*. **59** (5): 712-722
- Yu J., Hu S., Wang J., Wong G. K., Li S., Liu B., Deng Y., Dai L., Zhou Y., Zhang X., Cao M., Liu J., Sun J., Tang J., Chen Y., Huang X., Lin W., Ye C., Tong W., Cong L., Geng J., Han Y., Li L., Li W., Hu G., Huang X., Li W., Li J., Liu Z., Li L., Liu J., Qi Q., Liu J., Li L., Li T., Wang X., Lu H., Wu T., Zhu M., Ni P., Han H., Dong W., Ren X., Feng X., Cui P., Li X., Wang H., Xu X., Zhai W., Xu Z., Zhang J., He S., Zhang J., Xu J., Zhang K., Zheng X., Dong J., Zeng W., Tao L., Ye J., Tan J., Ren X., Chen X., He J., Liu D., Tian W., Tian C., Xia H., Bao Q., Li G., Gao H., Cao T., Wang J., Zhao W., Li P., Chen W., Wang X., Zhang Y., Hu J., Wang J., Liu S., Yang J., Zhang G., Xiong Y., Li Z., Mao L., Zhou C., Zhu Z., Chen R., Hao B., Zheng W., Chen S., Guo W., Li G., Liu S., Tao M., Wang J., Zhu L., Yuan L., Yang H. (2002) A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *indica*). *Science (New York, N.Y.)*. **296** (5565): 79-92

Zabala G., Vodkin L. O. (2005) The *wp* mutation of *Glycine max* carries a gene-fragment-rich transposon of the CACTA superfamily. *The Plant Cell*. **17** (10): 2619-2632

Zhang P., Li W., Fellers J., Friebe B., Gill B. S. (2004) BAC-FISH in wheat identifies chromosome landmarks consisting of different types of transposable elements. *Chromosoma*. **112** (6): 288-299

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

9 Seznam použitých zkratek

AP	alkalická fosfatáza
ASAT	<i>Avena sativa</i> ‚Atego‘
ATAU	<i>Aegilops tauschii</i>
BAC	umělý bakteriální chromozóm
BioNJ	bio neighbor-joining
bp	páry bází
CENP-A/CENH3	centromerický protein A/centromerická varianta histonu H3
CR	cenromerické retrotranspozóny
Cy3	cyanin 3
DAPI	4',6-diamidin-2-fenylindol
dATP	2'-deoxyadenosin-5'-trifosfát
dCTP	2'-deoxycytidin-5'-trifosfát
dGTP	2'-deoxyguanosin-5'-trifosfát
DIG	digoxigenin
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dTTP	2'-deoxythymidin-5'-trifosfát
dUTP	2'-deoxyuridin-5'-trifosfát
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
EST	expressed sequence tag
FAR	<i>Festuca arundinacea</i>
FGI	<i>Festuca gigantea</i>
FGL	<i>Festuca glaucescens</i>
FISH	fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace
FITC	fluorescein isothiokyanát
FMA	<i>Festuca mairei</i>
FPF	<i>Festuca pratensis</i> ‚Fure‘
FPW	<i>Festuca pratensis</i> ‚Westa‘
Gbp	giga páry bází
GISH	genomová <i>in situ</i> hybridizace
HVUL	<i>Hordeum vulgare</i> ‚Morex‘
IRAP	inter-retrotransposon amplified polymorphism
ISBP	insertion site-based polymorphism

ISSR	inter-simple sequence repeats
LINE	dlouhé rozptýlené jaderné elementy
LMM	<i>Lolium perenne</i> ‚Mitos‘
LP	<i>Lolium perenne</i>
LPN	<i>Lolium perenne</i> ‚Neptun‘
LTR	dlouhé koncové repetice
MARs	oblasti asociované s jadernou matrix
Mbp	mega páry bází
MITE	miniature inverted-repeat transposable elements
p.a.	pro analýzu
PCR	polymerázová řetězová reakce
PTD	putative targeting domain
REMAP	retrotransposon-microsatellite amplified polymorphism
rDNA	ribozomální DNA
RNA	ribonukleová kyselina
RNáza H	ribonukleáza H
rRNA	ribozomální RNA
RT	reverzní transkriptáza
SCER	<i>Secale cereale</i> ‚Dankowskie Diament‘
SDS	dodecylsírán sodný
SINE	krátké rozptýlené jaderné elementy
SSC	citrát sodný
TAES	<i>Triticum aestivum</i> ‚Chinese Spring‘
TBE	Trizma® base, kyselina boritá, EDTA
TIR	obrácené koncové repetice
TMON	<i>Triticum monococcum</i>
TSD	zdvojení cílového místa