



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

ANALÝZA GENŮ PRO RIBOZOMÁLNÍ RNA U VARIET BRASSICA NAPUS (ŘEPKA OLEJKA)

ANALYSIS OF RRNA GENES IN VARIETS BRASSICA NAPUS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. KVĚTOSLAVA DOFKOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

RNDr. Aleš Kovařík, CSc.

BRNO 2011



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	FCH-DIP0461/2010	Akademický rok: 2010/2011
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	Bc. Květoslava Dofková	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (N2901)	
Studijní obor:	Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010)	
Vedoucí práce	RNDr. Aleš Kovařík, CSc.	
Konzultanti:	doc. RNDr. Alena Španová, CSc.	

Název diplomové práce:

Analýza genů pro ribozomální RNA u variet Brassica napus (řepka olejka)

Zadání diplomové práce:

1. Vypracujte literární přehled k dané problematice
2. Popište použité experimentální metody
3. Zpracujte získané experimentální výsledky
4. Vyhodnoťte získané výsledky formou diskuse

Termín odevzdání diplomové práce: 13.5.2011

Diplomová práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

Bc. Květoslava Dofková
Student(ka)

RNDr. Aleš Kovařík, CSc.
Vedoucí práce

doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 15.1.2011

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Brassica napus (AACC, $2n = 38$) je allotetraploidním druhem, který vzešel z křížení diploidních druhů *Brassica rapa* (AA, $2n = 20$) a *Brassica oleracea* (CC, $2n = 18$). Cílem práce bylo provést genetickou a epigenetickou analýzu vysokokopiových genů pro ribozomální RNA (rDNA) u několika variet hybridního druhu *B. napus*.

Experimenty zahrnovaly stanovení poměru rodičovských genů v hybridech, sekvenční a methylační analýzu promotorové oblasti rDNA. Pomocí Southernovy hybridizace byla zjištěna značná proměnlivost v zastoupení rodičovských jednotek rDNA mezi jednotlivými varietami. Data ze sekvenční analýzy byly v dobré shodě s hybridizačními experimenty a u jedné z variet byla pomocí sekvenace odhalena genetická rekombinace mezi rodičovskými jednotkami rDNA. Methylační analýzou, která byla provedena pomocí hydrogensířičitanového sekvenování, bylo u hybridů zjištěno, že jednotky rDNA původem z *B. rapa* mají vyšší hodnotu methylace než jednotky původem z *B. oleracea*.

ABSTRACT

Brassica napus (AACC, $2n = 38$) is an allotetraploid species derived from the parental diploid species *Brassica rapa* (AA, $2n = 20$) and *Brassica oleracea* (CC, $2n = 18$). The aim of this thesis was to carry out the genetic and epigenetic analysis of high-copy rRNA genes (rDNA) in several varieties of hybrid species *B. napus*.

The experiments involved determining the ratio of parental genes in hybrids, sequencing and methylation analysis of the promoter region of rDNA. Using Southern hybridization (ITS), it was revealed significant variability in the number of parental rDNA units between each variety. Data from sequence analysis were in good agreement with the results of Southern blot. Genetic recombination between parental rDNA units was revealed in one variety by DNA sequencing of promoter region. To study methylation, bisulfite sequencing was performed. It was found out that rDNA units of *B. rapa* origin have a higher value of methylation than units originated from *B. oleracea*.

KLÍČOVÁ SLOVA

Brassica napus, rDNA, homogenizace rDNA, methylace DNA

KEYWORDS

Brassica napus, rDNA, rDNA homogenization, DNA methylation

DOFKOVÁ, K. *Analýza genů pro ribozomální RNA u variet Brassica napus (řepka olejka)*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2011. 53 s. Vedoucí diplomové práce RNDr. Aleš Kovařík, CSc.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych chtěla poděkovat mému vedoucímu RNDr. Aleši Kovaříkovi, CSc. za jeho čas, trpělivost a cenné rady, které mi věnoval při zpracování zadaného tématu diplomové práce. Také bych ráda poděkovala celému kolektivu Oddělení molekulární epigenetiky BFÚ AV ČR.

OBSAH

1	Úvod.....	7
2	Teoretická část	8
	2.1 <i>Brassica napus</i>	8
	2.1.1 <i>Brassica napus</i> L. subs. <i>napus</i>	9
	2.2 Polyploidie	9
	2.3 Ribozomální DNA.....	11
	2.3.1 Homogenizace rDNA	13
	2.3.1.1 Homogenizace rDNA u allopolyploidních rostlin	14
	2.3.2 Exprese genů pro rRNA	15
	2.3.2.1 Jadéřková dominance	15
	2.3.2.1.1 Genetické mechanismy navození jadéřkové dominance	16
	2.3.3 Methylace cytosinu a acetylace histonů	16
	2.3.3.1 Vztah mezi modifikací chromatinu a expresí rDNA.....	18
3	Cíle práce	19
4	Experimentální část.....	20
	4.1 Rostlinný materiál a pěstování	20
	4.2 Chemikálie	20
	4.3 Metody	21
	4.3.1 Izolace genomové DNA z rostlinného materiálu	21
	4.3.2 Agarózová elektroforéza genomové DNA a PCR produktů	21
	4.3.3 Štěpení genomové DNA restrikčními endonukleázami	21
	4.3.4 Emulzní PCR.....	22
	4.3.4.1 Příprava olejové fáze	22
	4.3.4.2 Příprava vodní fáze – PCR směs	23
	4.3.4.3 Příprava a průběh emPCR	23
	4.3.5 Klonování emPCR produktu	24
	4.3.5.1 Příprava ligační směsi	24
	4.3.5.2 Transformace QIAGEN EZ kompetentních buněk	25
	4.3.5.3 Selekcce klonů	25
	4.3.6 Southern blot	26
	4.3.6.1 Značení próby, hybridizace a detekce	27
	4.3.7 Hydrogensířičitanové genomové sekvenování.....	27
5	Výsledky	29
	5.1 Stanovení poměru homeologních jednotek 45S rDNA.....	29
	5.1.1 Izolace genomové DNA z listů	29
	5.1.2 Southern blot a vyhodnocení	30
	5.2 Sekvenční analýza oblasti IGS.....	32
	5.3 Methylační analýza promotorové oblasti pomocí hydrogensířičitanového sekvenování.....	35
6	Diskuze	41
	6.1 Stanovení počtu homeologních jednotek 45S rDNA ve varietách <i>Brassica napus</i> .	41
	6.2 Sekvenční analýza oblasti IGS	42
	6.3 Methylační analýza promotorové oblasti pomocí hydrogensířičitanového sekvenování.....	43

7 Závěr	45
Seznam použité literatury	47
Seznam a charakteristika roztoků a pufřů:	53

1 ÚVOD

Objevení struktury DNA a objasnění přenosu genetické informace prostřednictvím této biomolekuly právem patří mezi nejvýznamnější objevy 20. století. Přestože bylo od této doby vynaloženo velké úsilí proniknout do tajů replikace DNA, transkripce, translace, jejich regulačních mechanismů atd., řada otázek zůstává stále nezodpovězena. S nástupem éry molekulární biologie nabyly možnosti studia dané problematiky nových rozměrů.

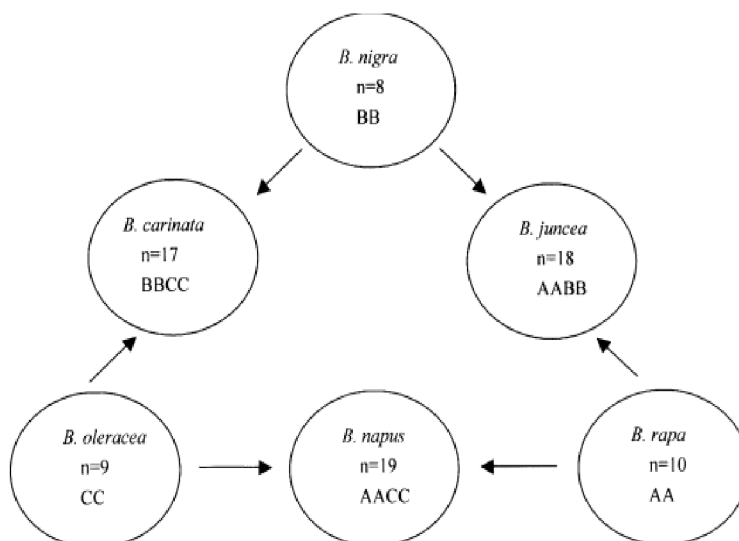
Zásadním zjištěním podpořené řadou experimentálních studií bylo, že sekvence DNA sama o sobě není nositelem veškeré informace potřebné k ustanovení fenotypu daného organismu. Zvláštní případy, které nebylo možné vysvětlit Mendelovými zákony dědičnosti, stály u zrodu nového vědního oboru – epigenetiky. Epigenetika se tedy jako vědní obor zabývá studiem vratných změn v genové expresi, které nejsou zapříčiněny změnami v sekvenci DNA. Epigenetické faktory pak ovlivňují fenotyp beze změny genotypu.

Do popředí vědeckého zájmu se v souvislosti se studiem epigenetiky dostávají zejména polyploidní rostlinné druhy. Stávají se výborným materiálem pro studium, protože u nich byla popsána řada epigenetických jevů jako jadéřková dominance, methylace DNA, aktivace retrotranspozonů, umlčení transgenů a mnoho dalších. Epigenetika proniká do všech aspektů rostlinného vývoje a jak se zdá, je pravděpodobně ještě důležitější než se doposud uvádělo.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 *Brassica napus*

Brassica je zemědělsky velmi významným rostlinným rodem čítající až 100 druhů s odlišnou morfologií a užitnou hodnotou. Stejně jako řada jiných významných kulturních plodin (např. *Triticum*, *Glycine* nebo *Gossypium*) patří *Brassica napus* (brukev řepka) mezi polyploidní druhy a vzešla z křížení diploidních druhů *Brassica oleracea* (brukev zelná) a *Brassica rapa* (brukev řepák). Příbuznost mezi těmito druhy a dalšími třemi, jmenovitě *B. carinata* (brukev kýlnatá), *B. nigra* (brukev černá) a *B. juncea* (brukev sítinovitá), byla ustanovena v roce 1935 (Obr. 1) [1] a později byla potvrzena analýzou chloroplastové DNA (cpDNA) [2].



Obr. 1 Schéma popisující příbuznost šesti druhů *Brassica*, je složeno z tří diploidních druhů, *B. nigra*, *B. rapa* a *B. oleracea*, které jsou zaznačeny v rozích trojúhelníku a tři allotetraploidních druhů, *B. carinata*, *B. juncea* a *B. napus*, které vznikli vzájemným křížením diploidních druhů. Písmena A, B a C představují označení genomu a písmeno n vyjadřuje haploidní počet chromozomů [1].

Systém tří diploidů a tří allotetraploidů (viz. Obr. 1) se stal velmi vhodným nástrojem pro studium genomové evoluce polyploidních druhů.

Brassica napus je jednoletá až dvouletá bylina, která může dorůst až do výšky 200 cm (často v rozmezí 50 – 200 cm). Jedná se o velmi proměnlivý druh, v jehož rámci se rozlišují dva poddruhy, a to *B. napus* L subsp. *napus* (brukev řepka olejka) a subs. *rapifera* Metzger (brukev řepka tuřín neboli kolník), a byl popsán nespočet vyšlechtěných kultivarů.

2.1.1 *Brassica napus* L. subs. *napus*

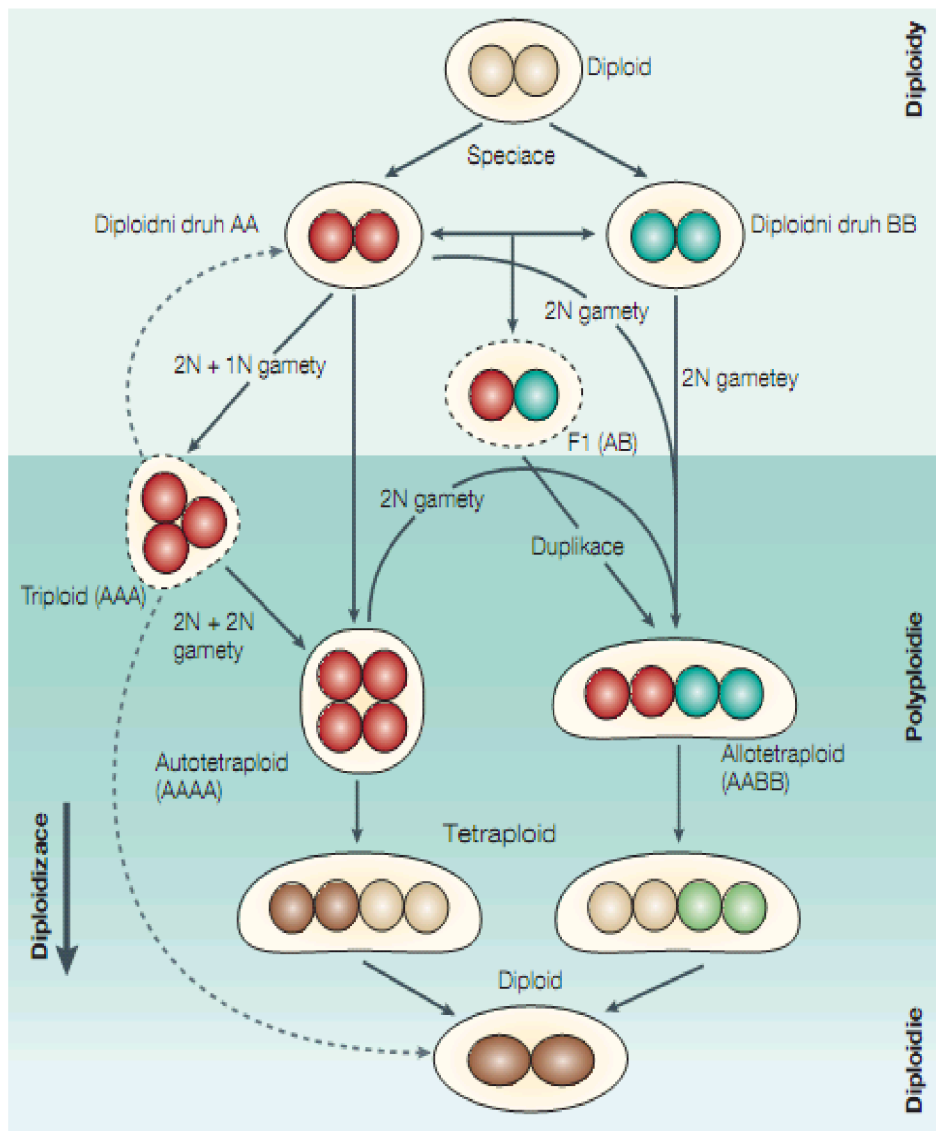
Jedná se o kulturní rostlinu, která je na našem území známá již od 13. století. Pěstuje se jako ozimá a jarní olejnína. Semena obsahují v sušině 44 – 47 % oleje, který se používá jako pokrmový i jako technický. Pokrutiny, obsahující až 20 % bílkovin, mají význam jako krmivo. V ČR se vyskytují tři kvalitativně rozdílné skupiny kultivarů, které se liší obsahem kyseliny erukové v semenech: s vysokým obsahem (pěstivelsky opuštěny, objevují se pouze jako plevel), s minimálním obsahem kyseliny erukové (od r. 1980 rozhodující skupina) a s nízkým obsahem kyseliny erukové a sníženým množstvím glukosinolátů, nazývané „dvounulové“ (zavádějí se postupně od 80. let). Z ozimých kultivarů je nejrozšířenější cv. *Jet Neuf* a z jarních cv. *Loras*. Po roce 1990 se začala řepka uplatňovat jako energetická surovina a od roku 2000 je nejvýznamnější exportní komoditou rostlinné výroby ČR [3].

2.2 Polyploidie

Polyploidie je považována za velmi důležitý proces v evoluci rostlin, o čemž svědčí i fakt, že téměř 80 % krytosemenných rostlin, včetně významných zemědělských plodin, jsou polyploidní [4], [5]. Polyploidie se jen zřídka kdy vyskytuje u zvířat, ale je možné ji najít u některých zástupců hmyzu, ryb či savců [6].

Polyploidie vzniká v důsledku znásobení počtu celých chromozomových sad bez následného rozdělení buněčného jádra. V zásadě se jedná o genomovou mutaci a rozlišujeme dva možné typy – **autopolyploidie** a **allopolyloidie**. V případě autopolyploidie dojde ke zvýšení počtu chromozomových sad daného druhu. Naopak u allopolyloidních jedinců jsou zmnoženy chromozomové sady pocházející od různých druhů (zpravidla velmi příbuzných). Tyto chromozomy pak nazýváme homeologními. Celkový počet chromozomových sad je vyjádřen předponou, tri- (3), tetra- (4), penta- (5), atd [7], [8]. Molekulární analýzy odhalily, že řada rostlinných druhů, které se na první pohled jevíly cytologicky jako diploidní, ve skutečnosti prodělaly jednu či více polyploidních událostí [9].

Existuje několik možností vzniku polyploidie. Buď může dojít ke zmnožení počtu chromozomů v buňkách somatických, nebo v buňkách zárodečných, a to v zygotě nebo gametách (Obr. 2).



Obr. 2 Schéma ukazuje možné dráhy přechodu buňky z diploidního stavu na polyploidní, a i postupný přechod z polyploidie na diploidii. Také je zde ilustrován hybridizační proces vedoucí ke vzniku allopolyploidie. Haploidní genom je zakreslen jako barevný kruh. Barevně odlišný kruh či ovál představují odlišné genomy a útvary s přerušovanou konturou značí vysoce nestabilní polyploidní stav. Písmena A a B znázorňují typ genomu a písmeno N představuje gametický počet chromozomů [7].

Termín polyploidie byl do literatury zaveden v roce 1916 [10] a o rok později Winge ve své práci upozornil na polyploidii jako na velmi důležitý proces v evoluci krytosemenných rostlin [11]. V roce 1937 se podařilo uměle navodit polyploidii v rostlinách pomocí kolchicinu, který je označován jako mitotický jed. Účinek spočívá ve vazbě kolchicinu na mikrotubuly dělicího vřeténka, čímž dochází k narušení procesu dělení buňky [12]. Tato technika se úspěšně využívá k navození duplikace chromozomů až dodnes. Pomocí kolchicinu bylo možné připravit *de novo* syntetické allopolyploidní druhy, např. *Brassica* [13] nebo *Gossypium* [14] a jiné, které se staly vhodným genetickým materiálem pro studium dynamiky genomů. Důvodů, proč je tomu tak, je více. V první řadě se jedná o to, že u řady přirozených polyploidních rostlin nejsou známy jejich skuteční genetičtí rodiče nebo nejsou dostupní. Dalším důvodem

je fakt, že stáří přirozených polyploidů je počítáno na stovky až tisíce let, a proto stav jejich genomu okamžitě po polyploidizaci není znám. Výjimkou jsou recentní allopolyploidní rostliny jako např. rody *Tragopogon* [15], *Spartina* [16] či *Cardamine* [17].

Přestože není doposud zcela jasné, proč jsou polyploidní druhy tak rozšířeny v oddělení krytosemenných rostlin, jejich převaha a úspěch v rostlinné říši naznačují, že polyploidie představuje pro rostliny určité výhody. Duplikace genomu může vést k tomu, že polyploidní druh je životaschopnější než rodič. Velmi výhodným je, že se oproti diploidnímu stavu změní poměr heterozygot:homozygot, ve prospěch heterozygotů, z čehož vyplývá, že se sníží podíl recesivních homozygotů. Tento stav může vést k minimalizování vlivu recesivních alel s nežádoucími vlastnostmi. Jak je také uváděno, nadbytek genů může také fungovat jako ochrana před recesivními mutacemi. Znásobení počtu chromozomových sad je obvykle spojeno se zvětšením buněčného obsahu. Na jedné straně se tímto zvýší užitkovost polyploidních plodin (např. píce), na druhé straně může takový jev vyústit v nežádoucí biochemické a fyziologické změny. Polyploidie může přinášet i další nevýhody, které často souvisí s replikací většího genomu, regulací exprese nadbytečných genů nebo poruchy meiotického dělení [7].

Polyploidizace je velmi dynamický evoluční proces. Vznik nových polyploidních druhů je následován řadou procesů, které jsou důsledkem duplikace a slučování rodičovských homeologních genomů v buněčném jádře. Mezi takové procesy patří přestavba genomu, amplifikace, eliminace či reorganizace repetitivních sekvencí. Polyploidní stav je také spojován se zvýšenou aktivitou transpozibilních elementů – transpozonů a retrotranspozonů. Genetické změny u allopolyploidních druhů mohou vést ke změně genové exprese [18]. Stejně tak v evoluci polyploidů hrají důležitou roli i epigenetické mechanismy, které žádným způsobem nemění sekvenci DNA, ale ovlivňují genovou expresi prostřednictvím modifikace DNA a histonů a jsou dědičné. Vztah mezi změnou epigenetického obrazu a změnou genové exprese u polyploidů byla potvrzena např. studií allopolyploidních druhů obilí [19].

Změny genomové organizace krátce po polyploidizaci byly poprvé popsány roku 1995 u syntetických polyploidů rodu *Brassica*. Změny zahrnovaly delecí fragmentů původem z rodičovských druhů a inzerce fragmentů nových, které se u žádného z rodičů nevyskytovaly. Takové změny, které jsou pravděpodobně způsobeny reciprokní translokací anebo transpozicí, byly detekovány v každé generaci (od F₂ po F₅ generaci) a jejich frekvence souvisela s mírou vzájemné odlišnosti rodičovských diploidních genomů [13]. Změny ve struktuře genomu se projeví fenotypově např. změnou doby kvetení [20]. Naopak u uměle připravených polyploidních druhů rodu *Gosypium* bylo zjištěno, že polyploidizace byla následována jen nepatrným množstvím změn v genomu, což je v rozporu s výše zmíněnou studií u rodu *Brassica* [21].

2.3 Ribozomální DNA

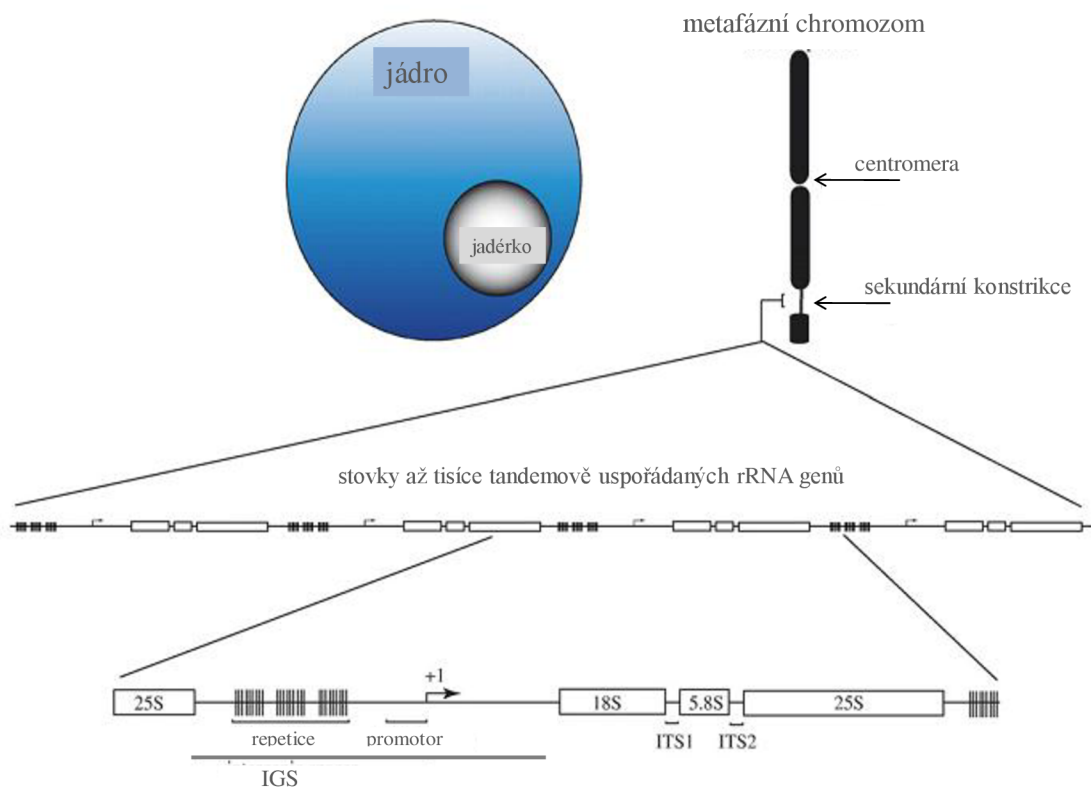
U vyšších eukaryot je velká část jaderného genomu tvořena ribozomální DNA (rDNA) kódující ribozomální RNA (rRNA). Geny pro rRNA jsou v genomu uspořádány jako blok

tandemových repetic. Počet opakujících se jednotek rDNA závisí na rostlinném (či živočišném) druhu a pohybuje se od 1000 do 50 000 [22].

V porovnání s jinými strukturálními geny, jsou geny pro rRNA unikátní v tom, že jejich transkripce probíhá ve vlastní subcelulární struktuře – jadérku. Jadérko je během interfáze nepřehlédnutelnou částí eukaryotického jádra. Je to oblast obsahující relativně málo chromozomální DNA, ale naopak velmi bohatá na RNA, proteiny a jejich komplexy. Poloha jadérka není náhodná. Je určena pozicí chromozomálního lokusu tzv. organizátoru jadérka neboli NOR (nucleolus organizer region), v němž jsou geny pro rRNA lokalizovány. Během metafáze se tato oblast vyznačuje tzv. sekundární konstrikcí [23]. Počet, lokalizace a velikost NOR jsou parametry v eukaryotickém genomu velmi proměnlivé. Mohou se lišit i v rámci druhů [24].

Každá jednotka rDNA je transkribována RNA polymerázou I (Pol I) jako jediný prekurzor. Primární transkript je dále postranskripčně upravován za vzniku 18S, 5,8S a 25S rRNA. Tyto tři rRNA dohromady s 5 S rRNA, která je transkribována RNA Pol III, tvoří jádro ribozomu [26]. Strukturální geny pro rRNA jsou odděleny vnitřními mezerníky (ITS1 a ITS2, internally transcribed spacer) a jednotky v podobě 18S-ITS1-5,8S-ITS2-26S jsou od sebe odděleny vnějším mezerníkem (IGS, intergenic spacer) [22]. Struktura jednotek rDNA je zobrazena na Obr. 3.

Na rozdíl od oblastí ITS a IGS, které vykazují mezi druhy určitý stupeň variability, úsek kódujících sekvencí (čítající 18S, 26S a 5,8S) je oblastí vysoce konzervativní. IGS, jak se doposud jeví, se vyvíjela nejrychleji. O čemž svědčí vysoký stupeň substitucí, delecí či přeskupení v rámci struktury tohoto úseku. Tyto změny zapříčinily, že je možné detekovat variabilitu v sekvenci a délce IGS úseku mezi příbuznými druhy a dokonce i mezi jedinci stejné populace [25]. ITS a IGS úseky patří k nejpoužívanějším molekulárním markerům v systematice a také představují vhodný prostředek pro studium evoluce polyploidních rostlin.



Obr. 3 Schéma znázorňuje vztah mezi jadérkem, sekundární konstrikcí, NOR a geny pro rRNA. Uvnitř NOR jsou geny pro rRNA tandemově uspořádány za sebou a každou jednotku rDNA od sebe dělí oblast IGS obsahující regulační elementy a promotor, kde počátek transkripce je vyjádřen +1. Při genové expresi jsou vedle kódujících sekvencí přepisovány i úseky ITS1 a ITS2 [26].

2.3.1 Homogenizace rDNA

U repetitivních sekvencí obecně, tedy i u jednotek rDNA, je pozorován jev označovaný jako „concerted evolution“, která směřuje k homogenizaci DNA, tj. všechny jednotky vykazují větší či menší stupeň homologie [27]. V tomto procesu se uplatňují dva mechanismy – nerovnoměrný crossing-over a genová konverze. Homogenizace DNA je úzce spjata s evolucí polyploidních druhů a s procesem diversifikace biologického druhu. Bez ohledu na mechanismus, záleží míra homogenizace repetitivních sekvencí na jejich počtu, frekvenci homogenizace po formaci nové variety, efektivní velikosti populace či přírodním výběru. V extrémních případech se repetitivní sekvence mohou stát zcela identickými [28]. Proces homogenizace neprobíhá nejenom mezi jednotlivými kopiemi rDNA, ale byl popsán i u subrepetic uvnitř stejné repetice [29].

Nápadným znakem genů pro rRNA bývá často společné sdílení stejné sady mutací. Nerovnoměrný crossing-over jednotek s mutací může vést ke vzniku jednoho chromozomu, ve kterém se mutace nachází ve dvou jednotkách a druhého chromozomu bez mutace. Chromozomy, u kterých se mutace nachází uvnitř genů pro rRNA, mohou být negativně selektovány. Naopak chromozomy, které mají mutaci v nekódujících sekvencích dané

jednotky, nemusí být vystaveny žádnému nepříznivému vlivu. Nakonec po několika rekombinačních procesech se může počet substitucí v jednotkách rDNA zvýšit či mohou zcela chybět. Jak už bylo řečeno výše, v procesu homogenizace se také uplatňuje i genová konverze, což je nerekiproční přenos úseku DNA mezi dvěma geny. Genová konverze probíhá na sekvencích homologních chromozomů a stejně tak i na chromozomech nehomologních, což samozřejmě zvyšuje míru homogenizace jednotek rDNA v populaci. Podstatná většina experimentálních studií potvrzuje uplatnění crossing-overu v „concerted evolution“, zatímco vliv a výskyt genové konverze stále zůstává nerozluštěn [30].

Účinnost homogenizace mimojiné závisí na fyzické vzdálenosti mezi repetitivními úseky. Jednotky 45S rDNA, které se nachází na stejném NOR, jsou si jedna druhé podobné více než jednotky rDNA, které jsou lokalizovány na odlišných NOR. Z toho vyplývá, že intralokusová homogenizace je podle všeho více efektivní než interlokusová [29].

2.3.1.1 Homogenizace rDNA u allopolyploidních rostlin

V důsledku slučování genomů rodičovských druhů se v jádře právě vzniklých allopolyploidních jedinců vyskytují minimálně dvě různé rodiny jednotek rDNA. Proces jejich homogenizace může vyústit v řadu rozličných událostí.

Homogenizace 45S rDNA byla studována u rodu *Gossypium*, a to u pěti allotetraploidních druhů (AD genom) a diploidních druhů představující jejich předky [31]. Sekvenční analýzou oblastí ITS bylo zjištěno, že oblasti rDNA allotetraploidů i diploidů jsou si velmi podobné. Fakt, že jednotky rDNA byly lokalizovány ve čtyřech chromozomálních lokusech (dva v každém subgenomu), svědčí o tom, že proces homogenizace běžel prostřednictvím interlokusové „concerted evolution“. Zajímavé bylo také zjištění, že u čtyř allotetraploidů vedla homogenizace rDNA ke konverzi ve prospěch D genomu a u jednoho druhu byla zjištěna konverze ve prospěch A genomu. Z tohoto vyplývá, že „concerted evolution“ nemusí jít pouze jedním směrem. Přechod jednoho rodičovského genomu na druhý byl popsán i u hybridu *Nicotiana arentsii* (*N. undulata* x *N. wigandoides*), kde se analýzou RFLP podařilo identifikovat pouze jednotky rDNA původem z *N. undulata* [32].

Naopak existují skupiny rostlin, kde proces homogenizace rDNA zřejmě neprobíhá. U allotetraploidních druhů rodu *Brassica*, a to *B. juncea*, *B. carinata* a *B. napus*, které vzešly z diploidních předků (viz. Obr. 1), byly ve všech třech případech identifikovány jednotlivé rodičovské rodiny 45S rDNA [33]. Zřejmě tedy nedošlo k žádným změnám v sekvenci promotorové oblasti 45S rDNA od okamžiku polyploidizace, která pravděpodobně proběhla před tisíci lety. Podobná situace byla popsána u rodu *Tragopogon* [34]. U druhů *T. miscellus* (*T. dubius* x *T. pratensis*) a *T. mirus* (*T. dubius* x *T. porrifolius*) bylo zjištěno rovnoměrné rozložení obou rodičovských rDNA rodin. Novější studie ale ukazují, že ve skutečnosti dochází k redukci počtu rDNA kopií jednoho z rodičů (*T. dubius*), což ukazuje na započatý proces homogenizace u tohoto rodu [35].

Jak bylo zjištěno u *Nicotiana rustica* (*N. undulata* x *N. paniculata*) proces homogenizace rDNA může mít také za následek vznik nových sekvenčních motivů [32].

2.3.2 Exprese genů pro rRNA

rRNA představují základní strukturní jednotku ribozomů. Protože jsou ribozomy místem proteosyntézy, správně řízená biogeneze ribozomů je velmi důležitá pro život buňky. Proto je i neméně důležitá správná regulace exprese genů pro rRNA. Regulace probíhá na transkripční úrovni a může být řízena řadou mechanismů jako dostupností a afinitou transkripčních faktorů či silou promotoru, atd. S vývojem znalostí v oblasti epigenetiky se ukazuje, že exprese genů pro rRNA je ve velké míře kontrolována prostřednictvím epigenetického umlčení.

Jedním z rysů nově vzniklých allopolyploidních druhů je epigenetické umlčení rodičovských genů pro rRNA. Zdá se, že se jedná o jakýsi mechanismus, díky kterému se buňka vyrovnává s nenadálým nadbytkem transkripčně aktivních genů. Epigenetické změny rDNA, které jsou zodpovědné za různé stavy genové exprese, se mohou cytologicky projevit tvorbou sekundární konstrikce na metafázním chromozomu. Tento jev byl poprvé popsán před 80 lety a dnes je znám pod pojmem jadéřková dominance.

2.3.2.1 Jadéřková dominance

Jadéřková dominance se běžně vyskytuje u mezidruhových hybridů a allopolyploidních druhů, u kterých dochází k transkripci genů pro rRNA získaných pouze z jednoho předka [36].

Jadéřková dominance byla poprvé popsána v roce 1934 při studiu chromozomů druhů a mezidruhových hybridů rostlinného rodu *Crepis*, Navashin pozoroval u D-chromozomů některých mezidruhových hybridů neobvyklý projev sekundární konstrikce. Došlo k tomu, že toto zaškrcení se vytvořilo na chromozomech získaných jen od jednoho z rodičů a nezáleželo na tom, zda chromozomy pocházely z mateřské či otcovské gamety [37]. Navashin nazval jev „differential amphiplasty“, v současnosti ale více známý pod pojmem jadéřková dominance.

Jak bylo také ve studii poznamenáno, sekundární konstrikce původně chybějící se mohla po vhodném zpětném křížení vytvořit na daném chromozomu [37]. Čímž bylo dokázáno, že chromozom se sekundární konstrikcí nebyl ztracen či zničen, a že jadéřková dominance je jev reverzibilní. Ve stejném roce Barbara McClintock (nositelka Nobelovy ceny za objev transpozonů) demonstrovala ve své práci, že sekundární konstrikce odpovídá chromozomálnímu lokusu, kde se během interfáze formuje jadéřko. Lokus pojmenovala jako organizátor jadéřka [23]. McClintock se dále zabývala problematikou, která byla prvně popsána Navashinem, a zjistila, že druhy rodu *Crepis* lze seřadit do určité hierarchie, která odráží jadéřkovou dominanci mezi druhy.

V roce 1966 byl organizátor jadéřka popsán jako lokus, kde jsou geny pro rRNA uspořádány ve stovkách až tisících kopií [38]. O pár let později, v roce 1971, se objevil názor, že jadéřková dominance (v té době stále ještě označována jako „differential amphiplasty“) může být důsledkem exprese pouze jedné rodičovské sady genů pro rRNA [39]. Studií rodu *Xenopus* se podařilo osvětlit molekulární podstatu jadéřkové dominance a tuto domněnku potvrdit [40].

2.3.2.1.1 Genetické mechanismy navození jadéřkové dominance

Jadéřková dominance je jevem velmi rozšířeným, vyskytujícím se u organismů jako hmyz, obojživelníci, savci a samozřejmě rostliny [36]. Existuje řada faktorů ovlivňující jadéřkovou dominanci, ale zpravidla se vyskytují jen u určitých skupin organismů (druhů) a uplatňují se jen v omezené míře. Proto je komplikované určit, který z činitelů je esenciální pro navození jadéřkové dominance.

První z hypotéz snažící se popsat molekulární podstatu jadéřkové dominance (respektive faktory navozující dominanci) vycházela z práci, kde byl jako modelový organismus využit živočišný druh *Xenopus*. Podle této teorie je dominance jednoho druhu nad jiným dána délkou IGS a počtem subrepetic v tomto úseku, které fungují jako zesilovače transkripce [41], [42]. Touto hypotézou lze vysvětlit navození jadéřkové dominance např. u *Triticum aestivum* [43]. Naopak u systémů *Brassica* [44] a *Arabidopsis* [45] nebyla platnost této teorie potvrzena.

Další teorie se týkala druhově specifických transkripčních faktorů. Podle ní geny pro rRNA určitého druhu nemohou být přepisovány v transkripčním systému jiného druhu kvůli inkompatibilitě transkripčních faktorů [46]. Tuto teorie nelze aplikovat u příbuzných druhů, které je možné křížit. Jako např. u rodů *Brassica* a *Arabidopsis*, jejichž hybridní potomstvo vykazuje jadéřkovou dominanci, jsou promotory genů pro rRNA *Brassica* plně funkční po přenosu do protoplastu *Arabidopsis* a naopak [47].

Výše uvedené hypotézy vycházely z předpokladu, že jadéřková dominance je následkem selektivní aktivace pouze jedné sady genů pro rRNA. Jak už ale bylo naznačeno výše, v posledním desetiletí se začíná pohlížet na možný mechanismus jadéřkové dominance jako na selektivní umlčení jedné sady genů pro rRNA, které je spojované s epigenetickými procesy zahrnujícími modifikaci DNA (methylace cytosinů) a histonů (acetylace, methylace nebo fosforylace, atd.) [48]

2.3.3 Methylace cytosinu a acetylace histonů

Modifikace cytosinu methylací je charakteristická pro repetitivní sekvence (např. rDNA) eukaryotického genomu a je často spojován s umlčováním genové exprese na transkripční (Transcriptional Gene Silencing, TGS) [49] i posttranskripční úrovni (PostTranscriptional Gene Silencing, PTGS) [50]. Obvykle se hypermethylací cytosinů vyznačuje heterochromatin a naopak hypomethylace bývá charakteristická pro genovou expresi [51].

Kromě 5-methylcytosinu (m^5C), který byl objeven už v roce 1950 [52], jsou známy i další methylované báze, např. N6-methyladenin, který byl poprvé detekován u bakterií [53]. V bakteriální říši obecně je methylace DNA důležitým obranným mechanismem proti cizorodé DNA, která proniká do bakteriální buňky (např. při virové infekci).

Methylace cytosinu u rostlin je, jak se zdá, podstatně komplexnější než u jiných eukaryotních organismů a vyznačuje se řadou unikátních rysů. Vyskytuje se v několika

specifických sekvenčních motivech – v symetrických dinukleotidech CG a trinukleotidech CHG (kde H představuje A, T anebo C) a v asymetrickém motivu CHH [54]. Co se týče hladiny m^5C , u rostlin je více jak 30 % z celkového podílu cytosinu methylováno, nejčastěji v motivu CG a CHG [55].

Methylace DNA je katalyzována skupinou enzymů označovaných jako DNA methyltransferázy (DNMT). U rostlin rozlišujeme tři typy těchto enzymů - MET1 kontrolující methylaci motivu CG, CMT 3 (ChromoMethylTransferase 3) zajišťuje methylaci CHG sekvence a skupina DRM (Domains Rearranged Methyltransferase), která je zodpovědná za methylaci CHH motivu. Kofaktorem DNMT je S-adenosyl-L-methionin (SAM), který funguje jako donor methylové skupiny. DNA methyltransferázy se skládají ze dvou funkčně rozlišených částí, a to katalytické domény, která se specificky váže na kofaktor a domény, která zajišťuje rozpoznání specifického místa v molekule DNA. Methylace probíhá jako nukleofilní atak na atom uhlíku C6 cytosinu, což vede k protonizaci atomu dusíku N3 a vzniku enamínu, který reaguje s CH_3 skupinou SAM. Následný přenos CH_3 skupiny na atom C5 cytosinu je pak spojen s deprotonací atomu N3. Vedle m^5C je generován jako vedlejší produkt reakce S-adenosylhomocystein (SAH), který je inhibitorem další methylace [56].

DNA methyltransferázy se dělí na tzv. *de novo* a udržovací. *De novo* DNMT odpovídají za methylaci sekvencí DNA, kterým zcela chybí původní methylace. Do této skupiny spadají DRM. Tzv. udržovací methyltransferázy katalyzují methylaci při replikaci DNA, kdy je kopírováno rozložení m^5C v symetrických sekvenčních motivech z mateřského na dceřiné vlákno [57]. Z výše uvedeného vyplývá, že asymetrický CHH motiv může být udržován pouze cestou methylace *de novo*.

U rostlin jsou methylované sekvenční motivy obvykle stabilně udržovány během meiózy i několik generací. Experimenty s demethylačními činidly u rostlin měli významný vliv na jejich morfologii. Např. u rodu *Arabidopsis*, kde redukce hladiny m^5C , která byla způsobena expresí antimediatorové DNMT (MET1) nebo knock-out mutací v DDM1, měla pleiotropický efekt na morfologii, vývoj a také negativně ovlivnila samičí fertilitu [58].

Rostlinná DNA je obvykle vysoce methylována, obsah m^5C ale různě kolísá mezi druhy. Například u tabáku se uvádí, že přibližně 30 % cytosinu je methylováno, u rodu *Arabidopsis* se jedná o 4 % [55].

Vedle methylace cytosinu je acetylace histonu důležitou částí kontroly genové exprese a udržování integrity genomu. Acetylace histonů vede k rozvolnění struktury nukleozomu a podporuje přístup transkripčních faktorů k příslušnému lokusu [59].

Methylace cytosinu a acetylace histonu mají v kontextu genové exprese inverzní vztah. Aktivní geny, které jsou zpravidla hypomethylovány, jsou shlukovány v nukleozomech, jejichž histonové jádro je hyperacetylováno a naopak [48].

2.3.3.1 Vztah mezi modifikací chromatinu a expresí rDNA

Jedním z prvních důkazů o vztahu exprese genů pro rRNA a methylace cytosinu poskytl v roce 1988 R. B. Flavell, který analýzou rDNA u rodu *Triticum* zjistil, že inaktivní geny pro rRNA jsou podstatně více methylovány než aktivní geny [60].

Dalším dokladem byla práce zabývající se změnou exprese umlčených rRNA genů, která byla vyvolána účinkem 5-aza-2'-deoxycytidinu (aza-dC) [48]. Aza-dC je strukturním analogem nukleosidu cytidinu a funguje jako inhibitor DNA methyltransferáz [61]. V práci Chena a Pikarda bylo využito rostlinného druhu *Brassica napus* (viz. Obr. 1). *Brassica napus* vzešla z křížení diploidních druhů *B. oleracea* a *B. rapa*, kde geny pro rRNA *B. rapa* jsou dominantní nad geny *B. oleracea*. Po aplikaci aza-dC došlo k derepresi genů *B. oleracea* a jejich exprese dosahovala úrovně podobné genů dominantní *B. rapa*. Vzhledem k tomu, že jadérková dominance se vyskytuje i u druhu *Drosophila*, kde m⁵C nebyl detekován, vzali autoři v potaz i jiný typ chromatinové modifikace, acetylaci histonů. Proto bylo v práci využito inhibitorů deacetylace histonů – trichostatin A a butyrát sodný. Opět došlo k derepresi genů pro rRNA *B. oleracea*. Avšak při použití obou typů inhibitorů (aza-dC a trichostatin A) nebyl pozorován synergistický účinek, z toho vyplývá, že mechanismy methylace cytosinu a deacetylace histonu působí v stejném cílovém místě nebo po stejné dráze [48].

3 CÍLE PRÁCE

- stanovení poměru A a C jednotek u různých variet *Brassica napus* pomocí Southern blotu
- sekvenční analýza promotorové oblasti rDNA u vybraných variet *Brassica napus*
- mapování m⁵C oblasti IGS pomocí hydrogensířičitanového genomového sekvenování u vybraných variet *Brassica napus*

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Rostlinný materiál a pěstování

Pro analýzu bylo použito celkem 12 variet *Brassica napus*. Z toho 10 variet bylo mnou vypěstováno ve skleníku BFÚ ze semen, které byly poskytnuty z Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), Paris, France (Tab. 1). Dvě variety *Darmor* a *Yudal* a rodičovské druhy *B. oleracea* C10.3 a *B. rapa* RC, které byly také analyzovány, nebyly vypěstovány přímo mnou, ale jinými pracovníky laboratoře a jejich genomová DNA mi byla poskytnuta.

Tab. 1 Přehled všech variet *B. napus*, které byly využity pro analýzu

Variety	Země původu	Pěstovaná forma
<i>Spok</i>	Německo	jarní
<i>Mohican</i>	Velká Británie	zimní
<i>Asparagus kale</i>	neuvedeno	jarní
<i>Maxol</i>	Francie	zimní
<i>Akamar</i>	Nizozemí	zimní
<i>Oro</i>	Kanada	jarní
<i>Loras</i>	Německo	jarní
<i>Norin 6</i>	Japonsko	jarní
<i>Norin 10</i>	Japonsko	jarní
<i>Petranova</i>	Německo	zimní
<i>Yudal</i>	Korea	jarní
<i>Darmor</i>	Francie	zimní

Semena byla naklíčena na buničtinové vatě při laboratorní teplotě (21 – 24 °C) a po několika dnech byly semenáčky přeneseny do skleníku, kde byly zasazeny do zeminy (Zahradnický substrát s aktivním humusem, AGRO). Denní teplota byla ve skleníku udržována v rozmezí 16 – 20 °C, noční pak od 10 do 12 °C.

4.2 Chemikálie

Všechny použité chemikálie byly v čistotě p. a. Roztoky byly připravovány ze sterilních zásobních roztoků a veškeré ředění bylo prováděno sterilní destilovanou vodou. Podrobné složení všech použitých roztoků je uvedeno v kapitole Seznam a charakteristika roztoků a pufřů.

4.3 Metody

4.3.1 Izolace genomové DNA z rostlinného materiálu

Cca 250 mg listů nastříhaných na kousky a zbavených silnějších vodivých pletiv bylo rozetřeno v keramické misce v tekutém dusíku. Vzniklý prášek byl homogenizován v 700 μ l CTAB s 1 μ l β -merkaptoethanolu. Při teplotě 60 °C byla suspenze lyzována po dobu 1 hodiny. Za účelem hrubé deproteinace bylo k suspenzi přidáno 700 μ l roztoku chloroform-oktanol (poměr 24:1), několik minut mícháno a poté byl roztok centrifugován (15 minut, 14 000 obr/min). Po centrifugaci byla odebrána horní vodní fáze a DNA byla vysrážena isopropanolem (2/3 objemu vodní fáze), následovala další centrifugace (2 minuty, 14 000 obr/min) a slití supernatantu. K vysráženému peletu byla přidána směs 70 % ethanolu a 10 mM octanu sodného. Směs byla po 30 minutách stání vyměněna za čerstvou a vzorky byly do následujícího dne skladovány v chladničce. Na druhý den byly vzorky centrifugovány (2 minuty, 14 000 obr/min) a jejich obsah byl slit. Zbývající ethanol byl odstraněn v termostatu při teplotě 50 °C po dobu 10 až 15 minut (dle množství vysrážené DNA). Vysušená DNA byla rozpuštěna v 400 μ l TE pufru. Pro odstranění RNA a proteinů byly k roztoku surové DNA přidány 4 μ l RNázy A (10 mg/ml) a po hodině inkubace při 37 °C byly přidány 4 μ l Proteinázy K (20 mg/ml). Inkubace pak probíhala 2 hodiny při teplotě 55 °C. Poté byla provedena extrakce fenolem. Ke zchlazenému roztoku DNA bylo přidáno 400 μ l směsi fenol-chloroform-isoamylalkohol (poměr 25:24:1). Po deseti minutách extrahování byl roztok centrifugován (5 minut, 14 000 obr/min). K odebrané horní fázi bylo přidáno 0,5 ml směsi chloroform-isoamylalkohol (24:1) a byla provedena centrifugace (1 minuta, 14 000 obr/min). Znovu byla odebrána horní fáze a k ní bylo přidáno 1/10 objemu 2,5 M octanu sodného a 2,5 násobek objemu 96 % ethanolu. Došlo k vysrážení DNA. Vzorky byly centrifugovány (2 minuty, 14 000 obr/min) a supernatant byl slit. Vysrážená DNA byla dále promyta 70 % ethanolem. Zbytek ethanolu byl odstraněn v termostatu při teplotě 50 °C (10 až 15 minut). Vysušená DNA byla rozpuštěna v TE pufru (100 μ l). Její kvalita byla zkontrolována prostřednictvím elektroforézy a koncentrace byla stanovena spektrofotometricky na přístroji NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Inc., USA).

4.3.2 Agarózová elektroforéza genomové DNA a PCR produktů

Agaróza byla rozvařena v 1x TAE 20 minut v tlakovém hrnci. Po zchlazení gelu na teplotu asi 50 °C byl přidán ethidium bromid do koncentrace 0,1 μ g/ml a gel byl nalit do elektroforetické formy s hřebínkem. Ke vzorkům byla před nanesením přidána 1/10 jejich objemu nanášecího pufru pro DNA. Elektroforéza byla prováděna v 1x TAE při gradientu napětí 1 – 4 V/cm. Záznam gelů byl pořízen na přístroji UltraLum (UltraLum Inc., USA)

4.3.3 Štěpení genomové DNA restrikčními endonukleázami

Koncentrace genomové DNA se v 20 μ l restrikční směsi pohybovala mezi 500 – 1000 ng. Při štěpení DNA bylo postupováno podle doporučení výrobce (New England Biolabs Inc.), viz Tab. 2. Bylo používáno 1 – 2 U enzymu na μ g DNA, štěpení probíhalo 4 hodiny při

doporučené teplotě (viz. Tab. 2). Enzym byl přidáván po dvou dávkách po dvouhodinových intervalech.

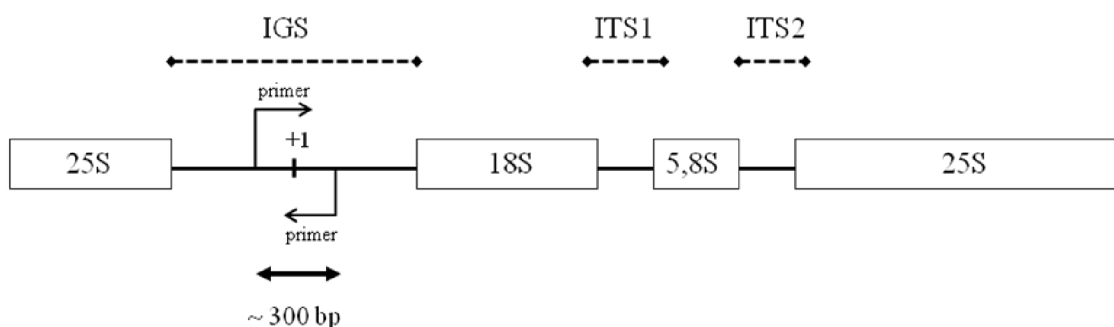
Tab. 5 Použité restrikční endonukleázy

Enzym	Rozpoznávaná sekvence	10 x pufr	Teplota (°C)
Mbo I	5' ... G A T C ... 3' 3' ... C T A G ... 5'	NEB pufr 4	37
EcoRI	5' ... G A A T T C ... 3' 3' ... C T T A A G ... 5'	NEBpufr EcoRI	37

4.3.4 Emulzní PCR

Podstatou emPCR je segregace fragmentů matrice DNA ve vodní fázi emulze typu V/O. V jednotlivých kapénkách vodní fáze pak dochází k amplifikaci fragmentů DNA. Při vhodné zvolené koncentraci DNA lze docílit toho, že v jedné mikrosféře je přítomna právě jedna molekula templátu. Tímto se zamezí vzniku chimerických molekul PCR produktu [62].

Byla provedena amplifikace promotorové oblasti genů pro rRNA – IGS. Velikost PCR produktu byla ~ 300 bp (Obr. 4).



Obr. 4 Schéma umístění primerů pro amplifikaci úseku IGS. Počátek transkripce je vyjádřen +1.

4.3.4.1 Příprava olejové fáze

Složky olejové fáze uvedené v Tab. 2 byly postupně smíchány ve zkumavkách s kalibrovaným objemem (celkový objem směsi byl 5 ml). Po přidání každé složky byla směs důkladně promíchána a krátce centrifugována

Tab. 2 Složky olejové fáze, jejich koncentrace a množství

Složka	Množství	Finální koncentrace
Span 80	225 µl	4,5 %
Tween 80	20 µl	0,4 %
Triton X-100	2,5 µl	0,05 %
Mínérální olej	doplněno do objemu 5 ml	

4.3.4.2 Příprava vodní fáze – PCR směs

Vodní fáze byla připravena smícháním komponentů uvedených v Tab. 3 (objem reakční směsi byl 260 µl). Jako templát byla použita genomová DNA, která byla štěpena restriktivním enzymem Mbo I (postup štěpení viz 4.3.3.). Tento enzym neštěpí amplifikovaný úsek.

Tab. 3 Složky vodní fáze – PCR směsi, jejich koncentrace a množství

Komponenta	Množství
10× reakční pufr kompletní (Finnzymes, Finsko)	26 µl
BSA (100 g/l)	26 µl
primer F (25 µM) 5'-ATG GTT AGA AGA AAA GAA AWT TAT GAA AAT TTA-3'	4 µl
primer R (25 µM) 5'-ACA ATC CRA CCA TCR ACC TCA ACC CA-3'	4 µl
dNTP (25 mM)	2,6 µl
DyNAzyme polymeráza (2 U/µl) (Finnzymes, Finsko)	5,2 µl
DNA templát	170 ng
H ₂ O	doplněno do objemu 260 µl

4.3.4.3 Příprava a průběh emPCR

400 µl připravené olejové fáze bylo přeneseno do kryozkumavek. K tomuto objemu bylo postupně přidáváno 200 µl vodní fáze za stálého míchání na magnetické míchače (1 000 rpm), emulze byla míchána dalších 5 minut. Emulze byla po 50 µl rozpipetována do několika mikrozukumavek a překryta minerálním olejem. Zbylých 60 µl PCR směsi bylo použito jako kontrola neemulzní PCR a v mikrozukumavce také překryto minerálním olejem. Teplotní režim emPCR je uveden v Tab. 4

Tab. 4 Program PCR

Krok	Teplota (°C)	Čas
1 Počáteční denaturace	94	2´
2 Denaturace DNA	94	30´´
3 Hybridizace primerů	55	30´´
4 Syntéza komplementárního DNA vlákna	72	20´´
5 Závěrečná extenze	72	7´

Po prvním cyklu byl 2. – 4. krok zopakován v dalších 29 cyklech. Po skončení programu byl obsah každé mikrozukumavky slit dohromady. Po centrifugaci (5 minut, 13 000 obr/min) byla odstraněna horní olejová fáze. Aby došlo ke zrušení emulze, byla celkem dvakrát provedena extrakce 1 ml vodného roztoku diethyletheru. Zbytek organického rozpouštědla byl odstraněn v termostatu při teplotě 42 °C. Následně byl získaný produkt přečištěn pomocí kitu

NucleoSpin[®] Extrakt II (Macherey – Nagel GmbH & Co. KG, Německo). Produkty emPCR i kontrolní PCR byly detekovány na 1,4 % agarózovém gelu (viz. 3.3.2)

4.3.5 Klonování emPCR produktu

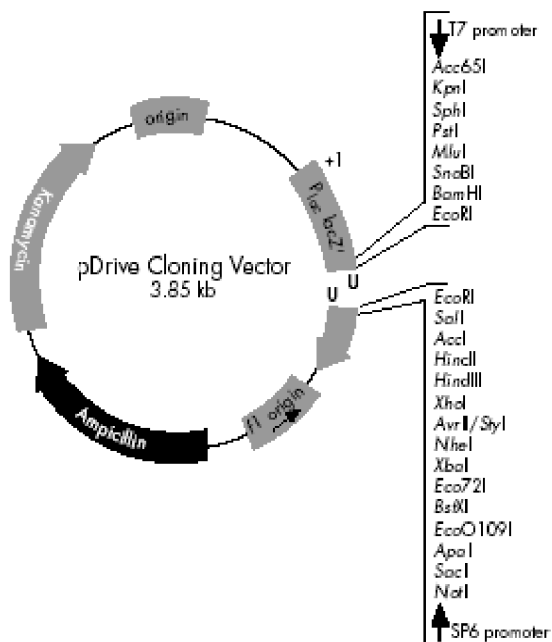
Klonování přečištěného produktu emPCR bylo provedeno pomocí QIAGEN[®] PCR Cloning^{plus} Kit (QIAGEN, Německo).

4.3.5.1 Příprava ligační směsi

Příprava ligační směsi byla prováděna na ledu podle Tab. 6., směs byla krátce promíchána a inkubována 2 hodiny při teplotě 12 °C

Tab. 6 Složení ligační směsi

Komponenta	Množství
pDrive vektor (Obr. 5)	1 µl
emPCR produkt	4 µl
2 x Ligační Master mix	5 µl



Obr. 5 Mapa plazmidového vektoru pDrive. Jeho polylinker je umístěn v části genu kódující proximální část polypeptidu β-galaktozidázy, což umožňuje odlišit rekombinantní a nerekombinantní plazmidy. Gen pro rezistenci k ampicilinu je využíván pro selekci transformant. Linearizovaný vektor obsahuje uracily namísto pro DNA běžných tyminů v klonovacím místě. Tím je zabezpečeno, že se konce vektoru nezlígnou samy se sebou (*E. coli* nemá schopnost ligovat uracilovou DNA) a tím se sníží pozadí. PCR produkty, které obsahují na 3' konci adenin se naopak ligují preferenčně.

4.3.5.2 Transformace QIAGEN EZ kompetentních buněk

25 μ l zamražených kompetentních buněk (s genotypem [F':::Tn10(Tc^r) *proA*⁺ *B*⁺ *lacI*^q Z Δ M15 *recA1 end A1 hsdR17* (r_{K12}⁻ m_{K12}⁺) *lac glnV44 thi-1 gyrA96 relA*) bylo inkubováno na ledu do roztání. Poté byl k buňkám přidán 1 μ l ligační směsi. Suspenze byla ponechána 10 minut na ledu za občasného protřepání, poté byla vystavena teplotnímu šoku při teplotě 42 °C po dobu 30 s a znovu inkubována 2 minuty na ledu. Po přidání 275 μ l tekutého SOC média byly buňky inkubovány při teplotě 37 °C po dobu 30 minut. Následně byl proveden výsev buněk na tři selekční agarové plotny (po 100 μ l suspenze buněk na 1 agarovou plotnu) s LB médiem obsahující na 150 ml LB média: 150 μ l ampicilinu (100 μ g/ml), 17,7 μ l IPTG (100 mM) a 225 μ l X-gal (40 mg/ml). Po 15 – 18 hodinách inkubace při teplotě 37 °C byly vybrány bílé kolonie, tj. klony nesoucí plazmid s vloženým inzertem, přeočkovány na nové agarové plotny (o stejném složení) a po dalších 15 – 18 hodin inkubace při 37 °C byly selektovány pozitivní klony.

4.3.5.3 Selekcce klonů

Za účelem izolace vloženého inzertu byla provedena PCR s primery, které jsou komplementární k sekvenci úseku DNA obklopující klonování místo vektoru pDrive.

Směs pro PCR byla namíchána podle Tab. 7. Do mikrozkušavek obsahující 25 μ l PCR směsi byly jednotlivě přeneseny transformanty z agarových ploten. PCR běžela podle teplotního režimu uvedeného v Tab. 8

Tab. 7 Složení PCR směsi

Komponenta	Množství
10 \times reakční pufr kompletní	2,5 μ l
primer F (25 μ M) 5'-T AAT ACG ACT CAA TAT AGG G-3'	0,5 μ l
primer R (25 μ M) 5'-T AAA TCC ACT GTG ATA TCT T-3'	0,5 μ l
dNTP (25 mM)	0,5 μ l
MgCl ₂ (25 mM)	0,5 μ l
DyNAzyme polymeráza (2 U/ μ l)	0,5 μ l
H ₂ O	20 μ l

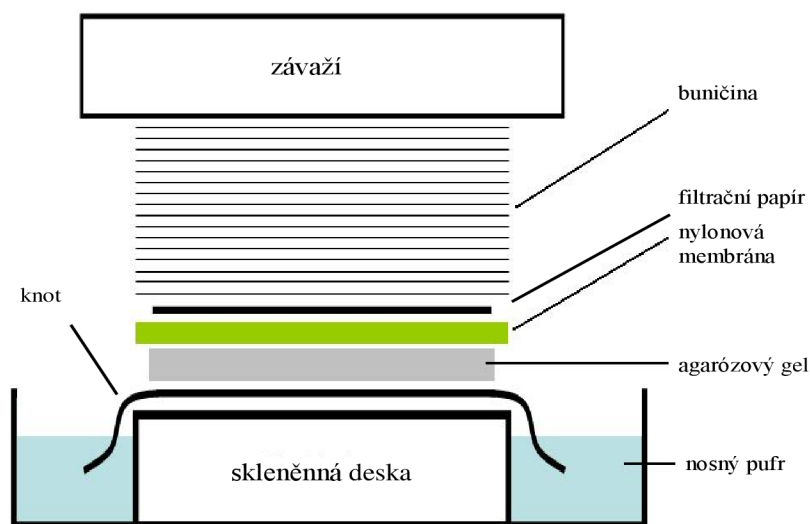
Tab. 8 Program PCR

Krok		Teplota (°C)	Čas
1	Počáteční denaturace	94	2 ′
2	Denaturace DNA	94	30 ″
3	Hybridizace primerů	55	30 ″
4	Syntéza komplementárního DNA vlákna	72	30 ″
5	Závěrečná extenze	72	7 ′

Po prvním cyklu byl 2. – 4. krok zopakován v dalších 34 cyklech. PCR produkty (alíkvt 5 μ l) byly detekovány na 1,4 % agarózovém gelu. V případě, že byl získán pozitivní signál, zbývající objem dané reakce (20 μ l) byl přečištěn pomocí kitu NucleoSpin[®] Extrakt II (Macherey – Nagel GmbH & Co. KG, Německo) a zaslán na sekvenování do společnosti Eurofins MWG Operon (Německo). Senvence byly upraveny v programu BIOEDIT 3 [63] a dále vyhodnoceny v programu PHYLOWIN [64].

4.3.6 Southern blot

Vzorky genomové DNA byly štěpeny restriční endonukleázou EcoRI (štěpení dle kapitoly 4.3.3.) v 30 μ l reakční směsi. Množství DNA ve směsi se pohybovalo kolem 2 μ g. Takto zpracované vzorky byly separovány na 1,5 % agarózovém gelu při napětí 20 V po dobu 18 – 20 hodin. Po separaci byl gel promýván za laboratorní teploty následovně – v roztoku 0,25 M HCl 15 minut, v destilované vodě 1 minutu, 2 x 20 minut v roztoku 0,4 M NaOH. V době promývání byly připraveny komponenty pro blotting – knot a obdélník (o rozměrech gelu) z filtračního papíru (Whatmann) a několik vrstev buničiny (stejně rozměry jako gel). DNA byla blotována na nylonovou membránu Hybond-XL (Amersham Biosciences), která byla o 0,5 cm širší i delší než gel. Membrána byla před sestavením blotovacího sendviče namočená na 10 minut do destilované vody. Všechny části včetně membrány byly před sestavováním krátce promyty v roztoku 0,4 M NaOH a složeny podle schéma na Obr. 6. Po asi 20 hodinách byl blotovací sendvič rozebrán a membrána byla promyta v 6x SSC (10 minut). Fixace DNA k membráně byla provedena v pícce při teplotě 80 °C (2 hodiny).

**Obr. 6** Schéma blotovacího sendviče. Jako nosný pufr byl použit 0,4 M NaOH.

4.3.6.1 Značení próby, hybridizace a detekce

Protože nejsem školená pro práci s radioaktivitou, bylo značení próby, hybridizace a promývání odmyvacími roztoky prováděno jinými pracovníky laboratoře.

Jako próba byl použit klon oblasti ITS1, který byl připraven amplifikací DNA *B. napus* za použití primerů 18S_for (5'-GCG CTA CAC TGA TGT ATT CAA CGA G-3') a 5,8S_rev (5'-CGC AAC TTG CGT TCA AAG ACT CGA-3') [35]. Próba byla označena [α -³²P]dCTP pomocí komerční sady DecaLabel™ DNA Labeling Kit (MBI Fermentas, Litva) metodou „random priming“. Bylo postupováno dle návodu, který je součástí kitu. Před vlastní hybridizací byla provedena prehybridizace. Nylonová membrána byla nejprve smočena v 0,1x SSC a následně prehybridizována 1 hodinu při 65 °C v hybridizačním roztoku. Poté byla k roztoku přidána radioaktivně značená sonda, která byla předtím denaturována varem (10 minut) a prudce zchlazena. Hybridizace probíhala 12 – 16 hodin při 65 °C. Poté byl slit hybridizační roztok a membrána byla promývána odmyvacím roztokem 1 (2 x 5 minut při laboratorní teplotě), odmyvacím roztokem 2 (2 x 20 minut při 65 °C) a na závěr krátce smočena v 0,1x SSC. Membrána byla exponována na zobrazovací desky (Storage Phosphor Screens, GE Healthcare) po dobu několika hodin. Signály byly vizualizovány na přístroji PhosphorImager™ Storm (GE Healthcare, UK) a vyhodnoceny pomocí programu ImageQuant™ (GE Healthcare, UK).

4.3.7 Hydrogensířičitanové genomové sekvenování

Modifikace genomové DNA hydrogensířičitanem sodným byla provedena pomocí komerční sady Epitect® Bisulfite Kit (QIAGEN, Německo). Po modifikaci byl vzorek DNA přečištěn pomocí kitu NucleoSpin[®] Extrakt II (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Německo). Následně byla modifikovaná DNA použita jako templát v PCR, kde došlo k amplifikaci úseku IGS (~ 300 bp). Složení PCR směsi, která běžela v objemu 25 μ l je uvedeno v Tab. 9. V Tab. 10 je popsán teplotní program reakce.

Tab. 9 Složení PCR směsi

Komponenta	Množství
10 \times reakční pufr kompletní	2,5 μ l
25 mM MgCl ₂	0,5 μ l
primer F (25 μ M) 5'-ATG GTT AGA AGA AAA GAA AWT TAT GAA AAT TTA-3'	0,5 μ l
primer R (25 μ M) 5'-ACA ATC CRA CCA TCR ACC TCA ACC CA-3'	0,5 μ l
dNTP (25 mM)	0,5 μ l
DyNAzyme polymeráza (2 U/ μ l)	0,5 μ l
DNA templát	1 μ l
H ₂ O	19 μ l

Tab. 10 Teplotní program PCR

Krok		Teplota (°C)	Čas
1	Počáteční denaturace	94	3 ′
2	Denaturace DNA	94	20 ′′
3	Hybridizace primerů	55	20 ′′
4	Syntéza komplementárního DNA vlákna	72	20 ′′
5	Závěrečná extenze	72	7 ′

Po prvním cyklu byl 2. – 4. krok zopakován v dalších 34 cyklech. PCR produkt byl separován na 1 % agarózovém gelu a poté z gelu izolován pomocí kitu NucleoSpin[®] Extrakt II (Macherey – Nagel GmbH & Co. KG, Německo) dle pokynů výrobce. Přečištěný PCR produkt byl klonován do vektoru pDrive (QIAGEN[®] PCR Cloning^{plus} Kit, QIAGEN, Německo) stejně jako je uvedeno v kapitole 4.3.5. Sekvence byly upraveny v programu BIOEDIT 3 [63] a vyhodnoceny programem CYMATE [65].

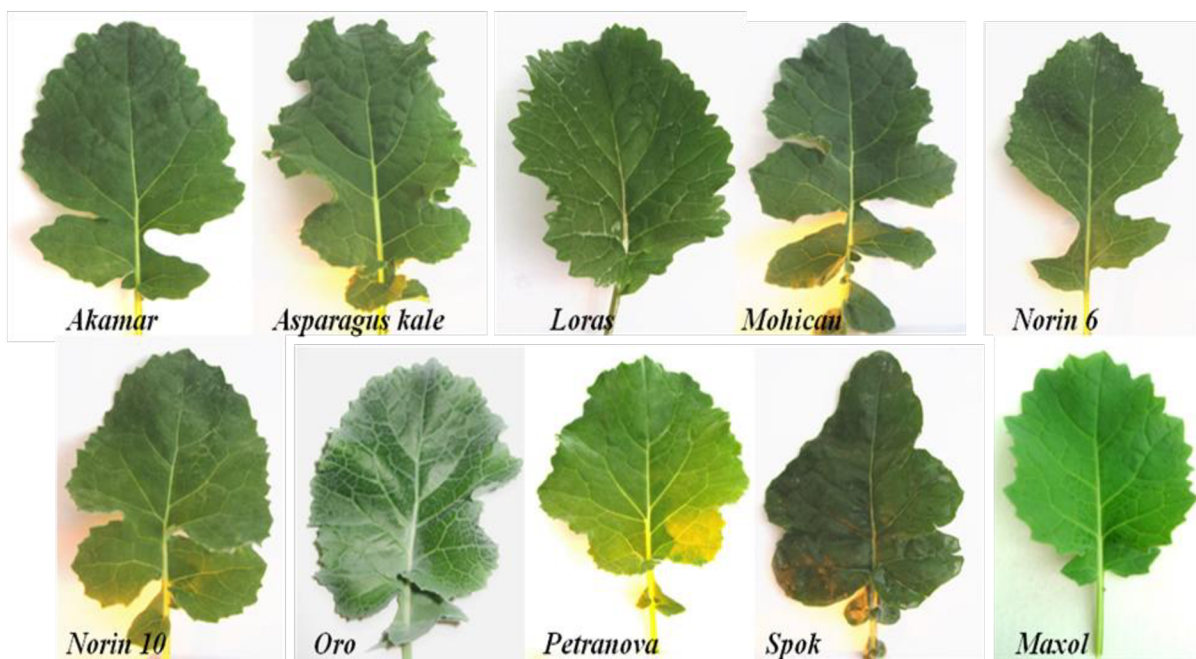
5 VÝSLEDKY

5.1 Stanovení poměru homeologních jednotek 45S rDNA

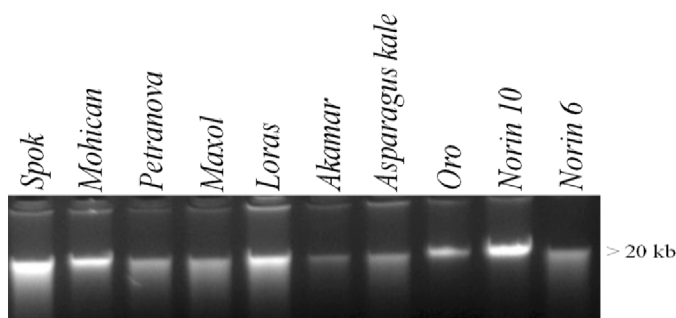
Brassica napus (AACC, n=19) je allotetraploidní druh, který vzešel z křížení dvou diploidů *Brassica rapa* (campestris, AA, n=10) a *Brassica oleracea* (CC, n=10). Jedním z cílů práce bylo stanovení poměru jednotek 45S rDNA původem z diploidních předků, neboli stanovení jednotek původem z genomu A a C. Analýza byla provedena v různých varietách *Brassica napus* pomocí Southern blotu.

5.1.1 Izolace genomové DNA z listů

Pro analýzu bylo použito celkem 12 vzorků genomové DNA variet *B. napus*, z toho 10 vzorků DNA bylo izolováno z vegetativních částí vypěstovaných rostlin (Obr. 7), a dva vzorky genomové DNA diploidních rodičů (*B. rapa* a *B. oleracea*). Izolace DNA byla provedena z listů dostatečně velkých rostlinek (asi 1 měsíc staré) podle protokolu v části 4. 3. 1. Na Obr. 6 jsou fotografie listů variet, které byly použity v diplomové práci. Kvalita izolované DNA byla zkontrolována elektroforeticky (Obr. 8) a její koncentrace byla změřena na spektrofotometru.



Obr. 7 Morfologie listů variet *B. napus*, které byly vypěstovány ve skleníku BFÚ.

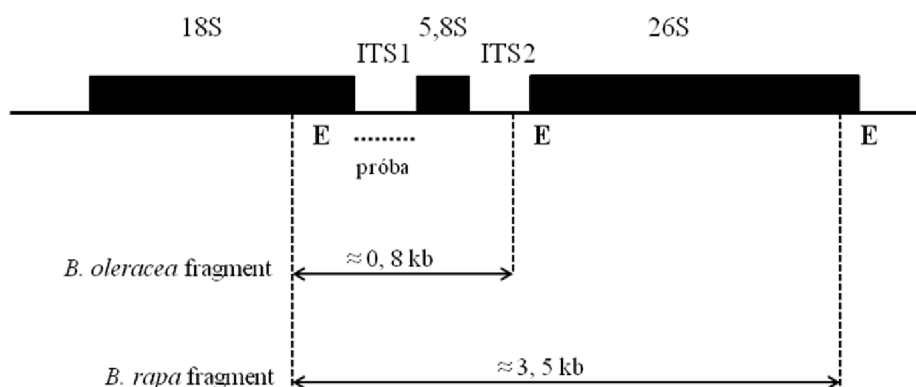


Obr. 8 Kontrola integrity genomové DNA gelovou elektroforézou v přítomnosti ethidium bromidu. Je zřejmé, že většina fluorescence komplexu DNA-ethidium bromid se vyskytuje v oblasti vysokomolekulárních fragmentů délky cca 20 kb.

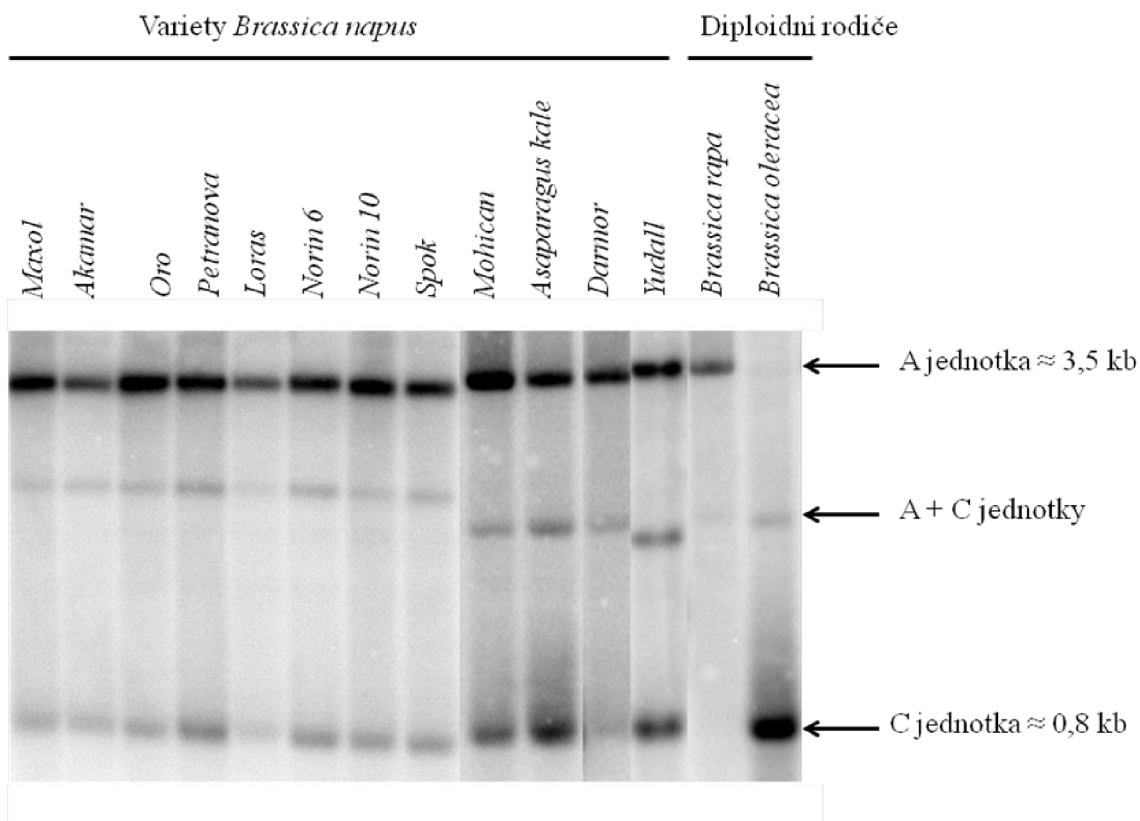
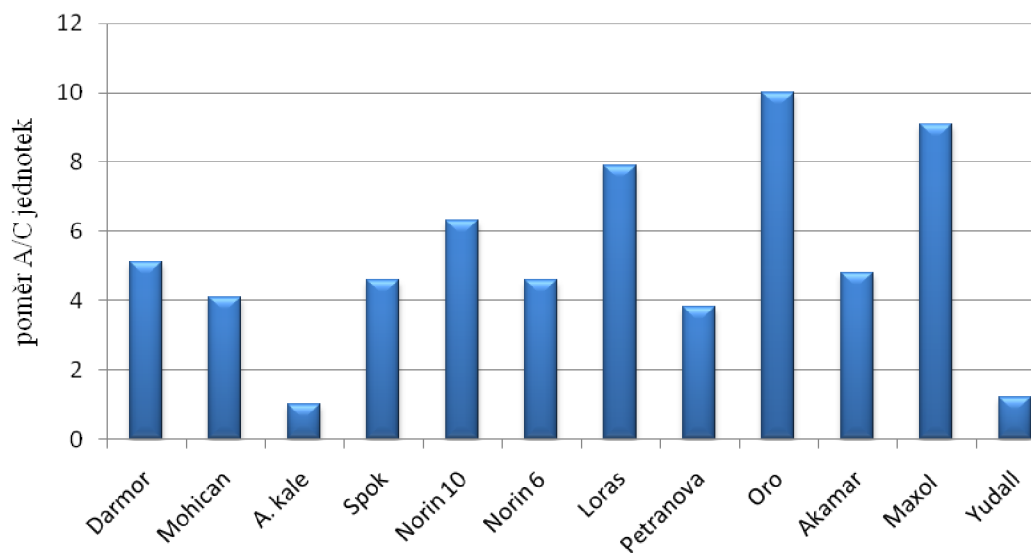
5.1.2 Southern blot a vyhodnocení

Genomová DNA byla nejprve štěpena restriční endonukleázou EcoRI. Po hybridizaci s radioaktivně značenou sondou pro ITS1 bylo možné rozlišit mezi rDNA jednotkami mající původ v genomu A (*B. rapa*) nebo v genomu C (*B. oleracea*) a to na základě různé velikosti štěpných fragmentů (Obr. 9).

Na získané nylonové membráně (Obr. 10, panel A) byly identifikovány u všech analyzovaných variet *B. napus* dva hlavní fragmenty, kratší fragment o velikosti 0,8 kb, který je charakteristický pro genom C a delší fragment o velikosti 3,5 kb, který je specifický pro genom A. Za účelem stanovení poměru A a C rDNA jednotek v *B. napus* byla intenzita signálu vyhodnocena v programu ImageQuant™ integrační obdélníkovou metodou. Výsledky této analýzy jsou uvedeny na Obr 10, panel B. Na první pohled je zřetelná převaha jednotek původem z *B. rapa*. Protože u všech variet byl signál fragmentu původem z *B. oleracea* podstatně slabší a neostrý v porovnání se signálem většího fragmentu, mohla jsem se dopustit nepřesností při vyhodnocování. Abych možnost chyb minimalizovala, bylo zpracování signálů provedeno celkem dvakrát a do grafu (Obr. 10, panel B) byly vyneseny průměrné hodnoty. U dvou variet *Yudal* a *Asparagus kale* byl poměr nejnižší, tedy počet A a C jednotek v genomu je přibližně vyrovnaný. Nejvyšší poměr byl zjištěn u variety *Oro*, kde je počet A jednotek desetkrát vyšší než počet C jednotek. Variety *Yudal*, *Spok* a *Darmor* byly dále podrobeny sekvenční analýze (viz dále).



Obr. 9 Schéma polohy cílových míst EcoRI (E), délky hybridizačních fragmentů a místa hybridizace radioaktivně značené sondy

A**B**

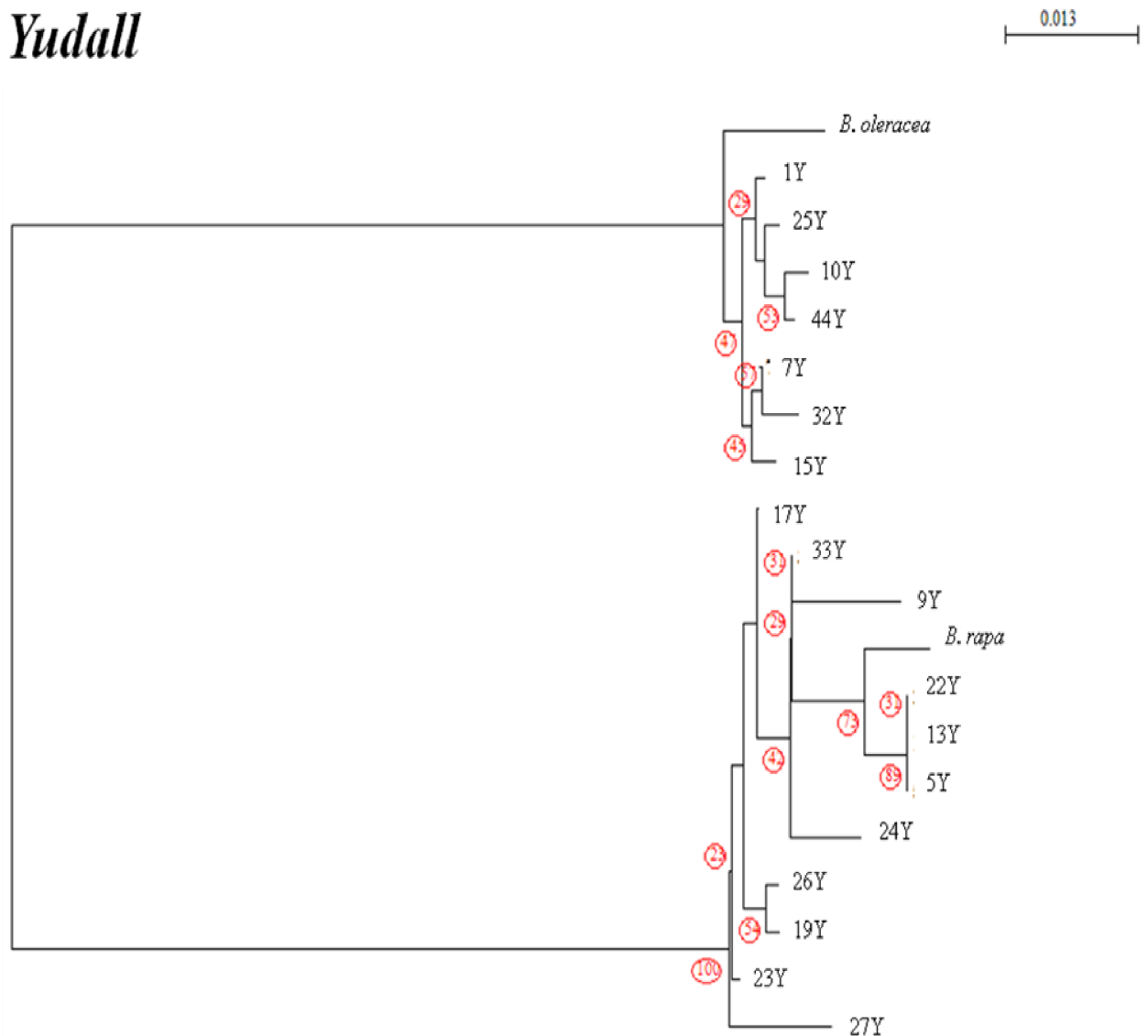
Obr. 10 Stanovení poměru homeologních 45S rDNA jednotek ve varietách *Brassica napus*. Panel A: Výsledek Southern blotu. Pro úplnost je uvedeno i štěpení *B. oleracea* a *B. rapa*. Panel B: Kvantitativní vyhodnocení intenzity signálů poskytující A a C jednotky v *B. napus*. Tyto hodnoty byly do grafu vneseny jako vzájemný poměr.

5.2 Sekvenční analýza oblasti IGS

Analyzovaný úsek promotorové oblasti rDNA byl amplifikován v emPCR dle postupu uvedeného v kapitole 4.3.4. Před amplifikací bylo provedeno štěpení genomové DNA restriční endonukleázou MboI, která rozpoznává sekvence ležící vně amplifikované oblasti. Produkt reakce byl následně klonován do vektoru pDrive (viz. kapitola 4. 3. 5.).

Byla provedena sekvenace klonů z tří variet *Yudal*, *Darmor* a *Spok*. V programu BIOEDIT 3 [63] byly získané sekvence mnohačetně porovnány za využití algoritmu CLUSTALW. Konstrukce dendrogramů byla provedena distanční metodou Neighbor-joining s modelem Kimura-2 Parameter v programu PHYLWIN [66]. Statistická podpora dendrogramů byla otestována bootstrapovou analýzou (500 opakování). Součástí stromů jsou sekvence rodičů (*B. rapa* a *B. oleracea*), které jsou uvedeny na Obr. 11.

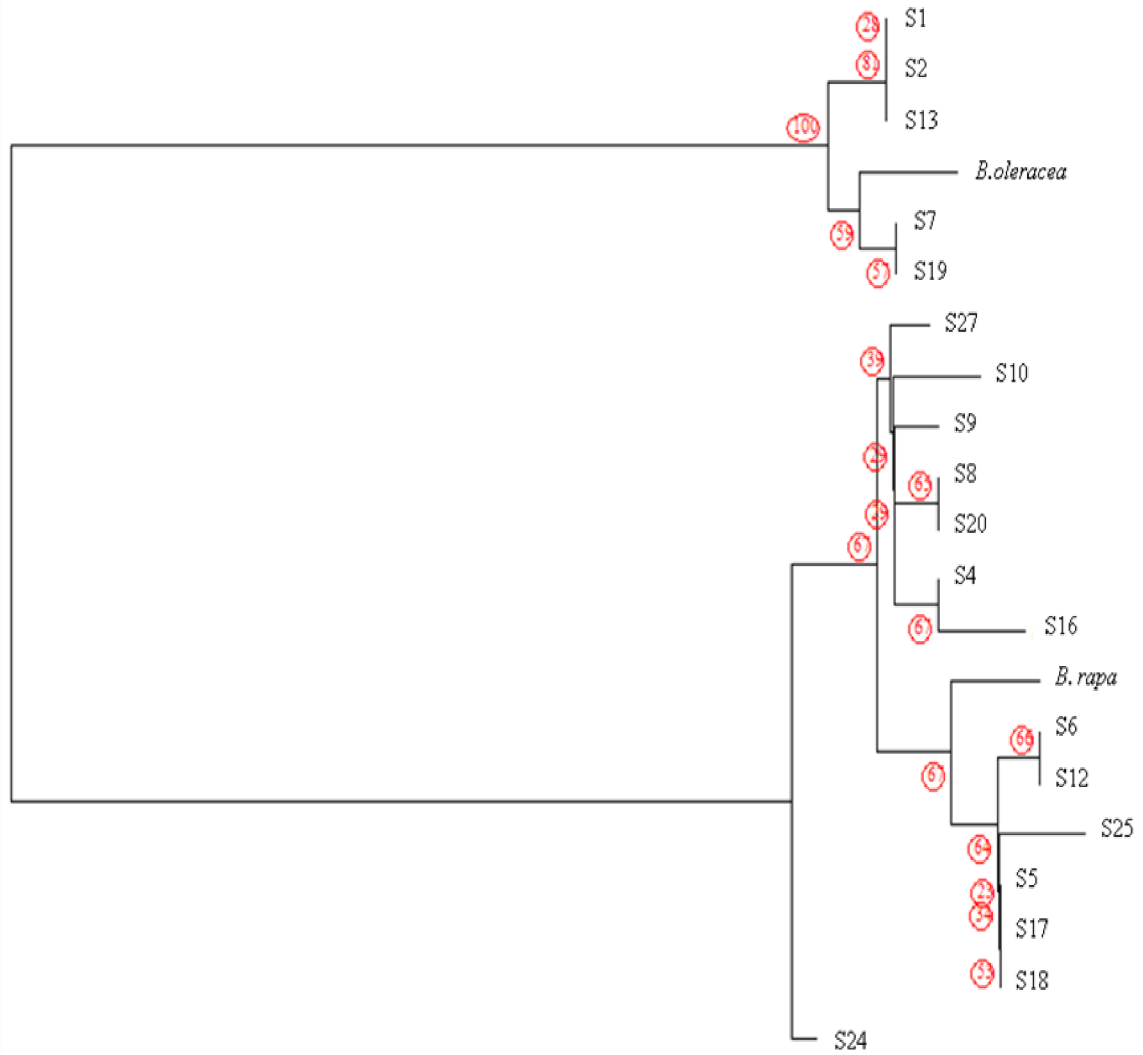
A



B

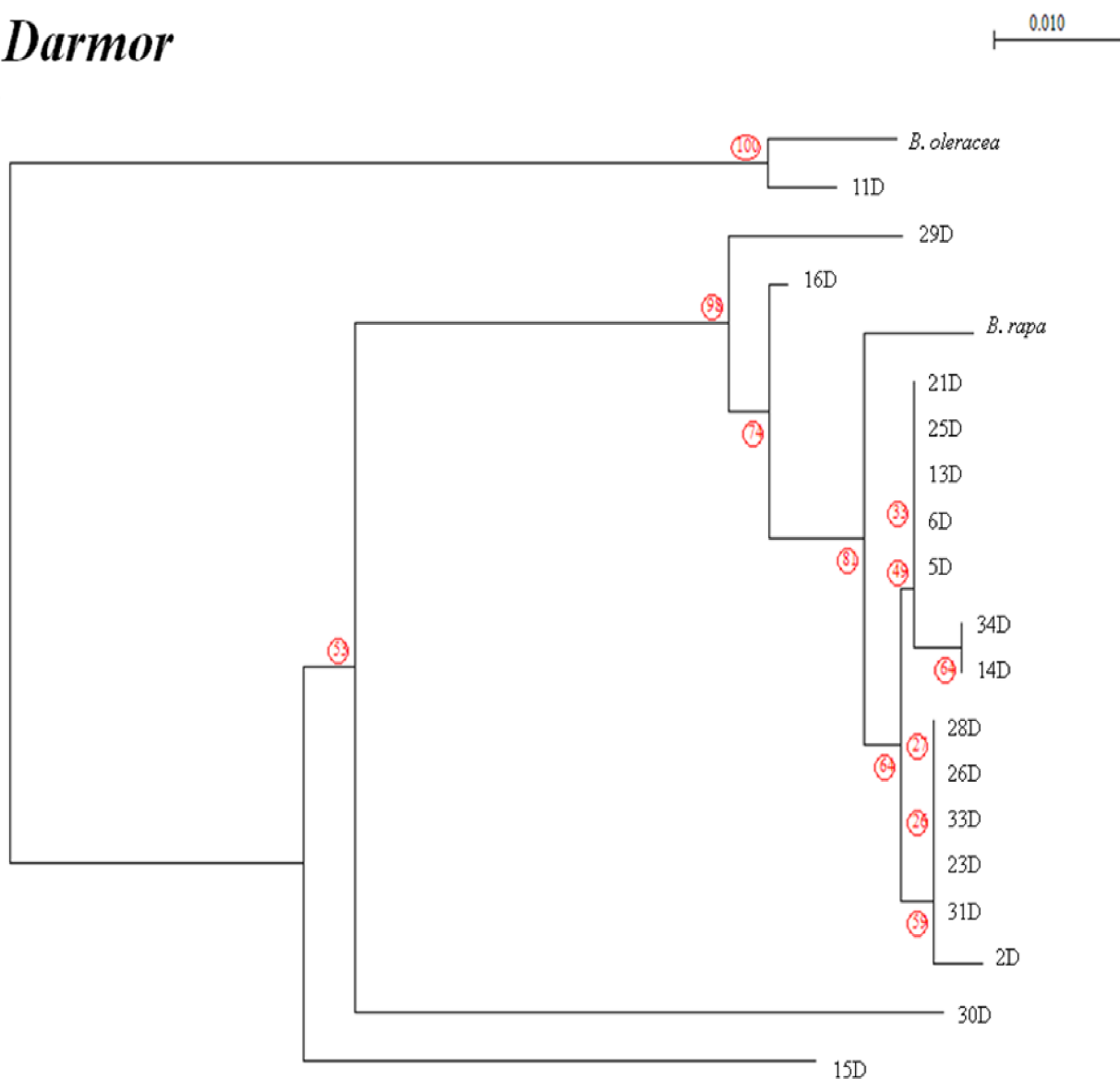
Spok

0.011



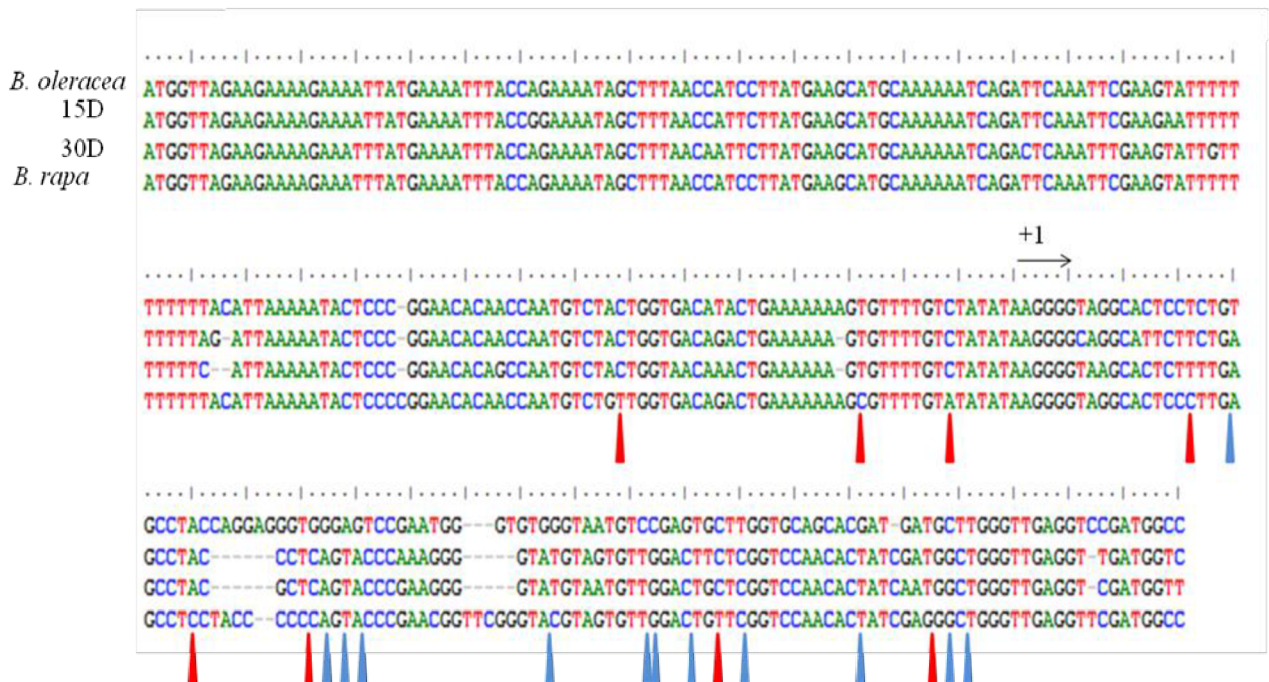
C

Darmor



Obr. 11 Fylogenetické vztahy mezi promotorovými sekvencemi u variet *B. napus* a rodičovskými *B. rapa* a *B. oleracea*. Stromy byly konstruovány metodou Neighbor-joining za použití modelu Kimura-2 Parameter, bootstrap 500 opakování. Panel A: fylogenetický strom pro varietu *Yudal* (sekvenace 18 klonů). Panel B: fylogenetický strom pro varietu *Spok* (sekvenace 19 klonů). Panel C: fylogenetický strom pro varietu *Darmor* (sekvenace 18 klonů)

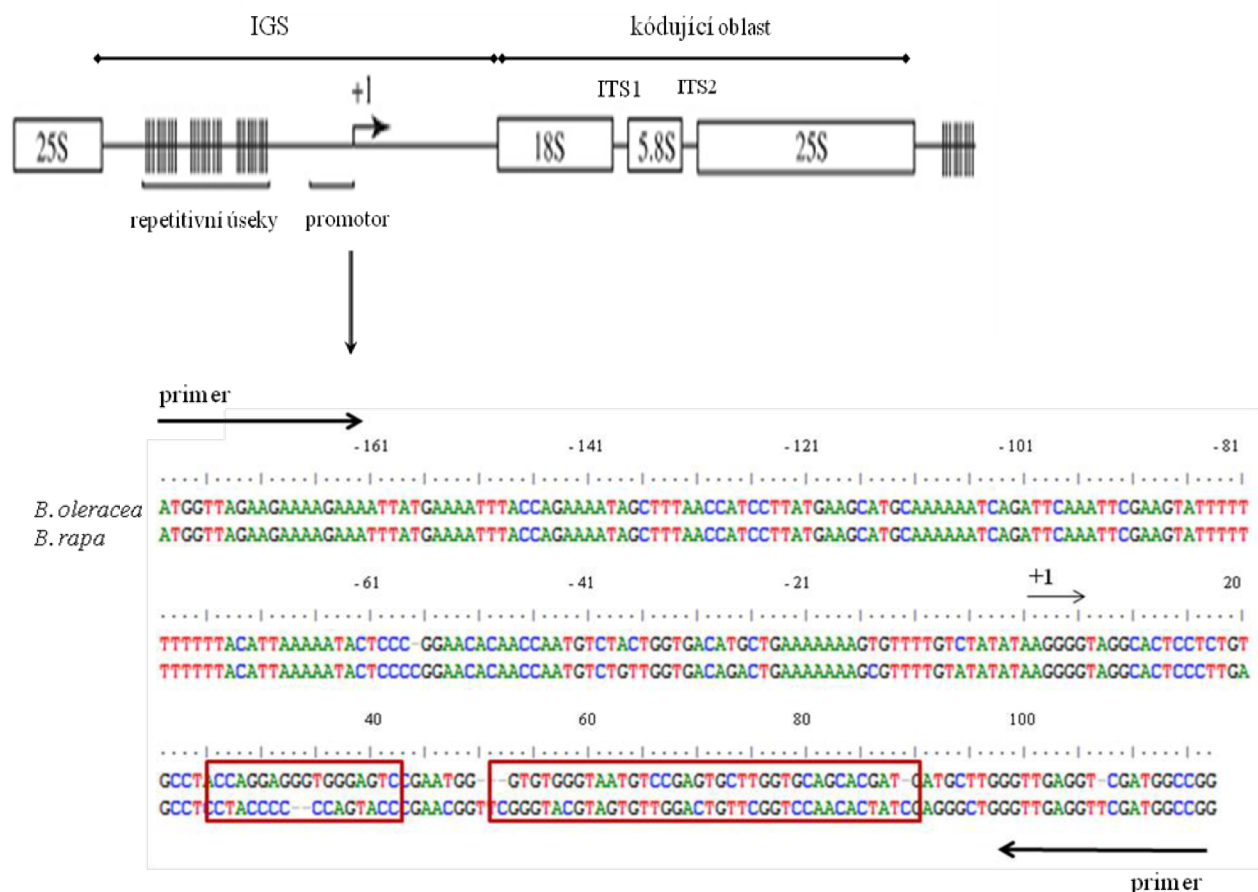
Sekvenční analýzou promotorové oblasti bylo zjištěno následující. U všech tří stromů byly identifikovány dvě základní větve, které vyjadřují podobnost klonů s rodičovskými sekvencemi *B. rapa* nebo *B. oleracea*. V rámci sekvencí, které byly programem přiřazeny k větvi *B. rapa* u variety *Darmor*, se objevily dva klony (15D a 30D), které byly významně geneticky vzdáleny rodičovským sekvencím, ale sdílely sekvenční motivy původem z *B. rapa* i *B. oleracea*. Vlastní přirovnání těchto dvou sekvencí klonů s rodičovskými sekvencemi je zobrazeno na Obr. 12



Obr. 12 Mnohačetné přiřazení sekvencí klonů 15D a 30D analyzované oblasti IGS variety *Darmor* s rodičovskými sekvencemi. Sekvenční motivy vlastní *B. rapa* jsou zaznamenány modrým trojúhelníkem a motivy původem z *B. oleracea* jsou označeny červeným trojúhelníkem. Počátek transkripce je vyznačen +1. Je zřejmé, že se jedná o rekombinační klony mezi oběma klony

5.3 Methylační analýza promotorové oblasti pomocí hydrogensířičitanového sekvenování

Pomocí hydrogensířičitanového genomového sekvenování byla provedena analýza celkové hladiny m^5C v oblasti IGS a také distribuce m^5C v jednotlivých sekvenčních motivech u tří variet *B. napus* (*Yudal*, *Asparagus kale* a *Darmor*). Pro srovnání byla provedena methylační analýza IGS oblasti i u rodičů. Pro každý vzorek bylo sekvenováno 15 – 20 klonů dle metodického postupu uvedeného v kapitole 4. 3. 7. Sekvence byly seřazeny do oddělených FASTA souborů. Toto rozdělení je založeno na druhově specifickém polymorfismu, který umožňuje rozlišit mezi sekvencemi původem z *B. rapa* a *B. oleracea* (Obr. 13).

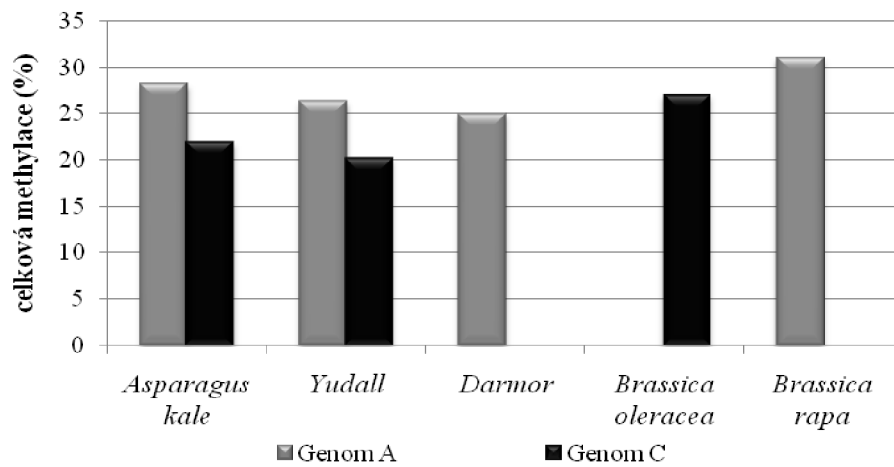


Obr. 13 Schéma strategie methylační analýzy. Obrázek ukazuje analyzovaný úsek promotorové oblasti 45S rDNA, sekvenci rodičů a místo hybridizace primerů. Sekvence rodičů jsou ve velké míře shodné, až na úseky, které jsou červeně ohraničeny. Tato místa umožňují rozlišit u studovaných variet *B. napus* mezi jednotkami rDNA typu C či A.

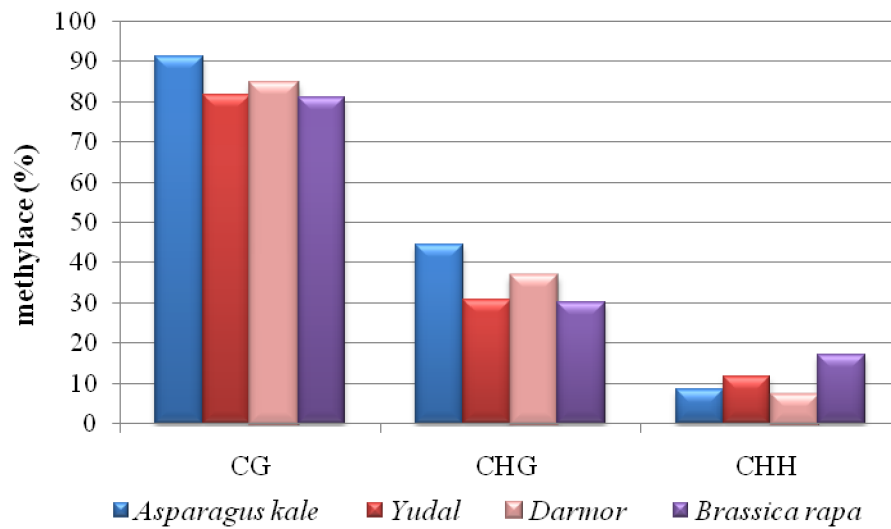
U variet *Asparagus kale* a *Yudal* byly získány sekvence typu C (původem z *B. oleracea*) i sekvence typu A (původem z *B. rapa*). Pouze u variety *Darmor* byly zpracovány pouze sekvence typu A.

Bylo zjištěno, že celková methylace analyzované oblasti je nejvyšší u klonů typu A. U variet se její hodnota pohybovala v rozmezí 25 – 28 %. Naopak u sekvencí typu C se pohybovala v rozmezí 20 – 21 %. V porovnání s hodnotou celkové methylace stanovené u klonů *B. oleracea* (27 %), byla methylace promotorové oblasti ve varietách *B. napus* přibližně o pětinu nižší. Nejvyšší hodnota celkové methylace byla zjištěna u *B. rapa* (31 %). U obou typů sekvencí se m^5C vyskytoval ve velké míře v symetrických methylačních motivech, a to nejčastěji v motivu CG (v rozmezí 91 – 84 % u jednotek typu A a 76 – 71 % u jednotek typu C), kde hodnoty pro m^5C byly více jak dvojnásobné než v motivu CHG. V asymetrickém CHH motivu hodnoty nepřesáhly 15 % (Obr. 14, panel A). Na Obr. 14, panel B je znázorněna distribuce m^5C vyskytujících se v promotorové oblasti pro každou varietu a rodiče *B. oleracea* a *B. rapa*.

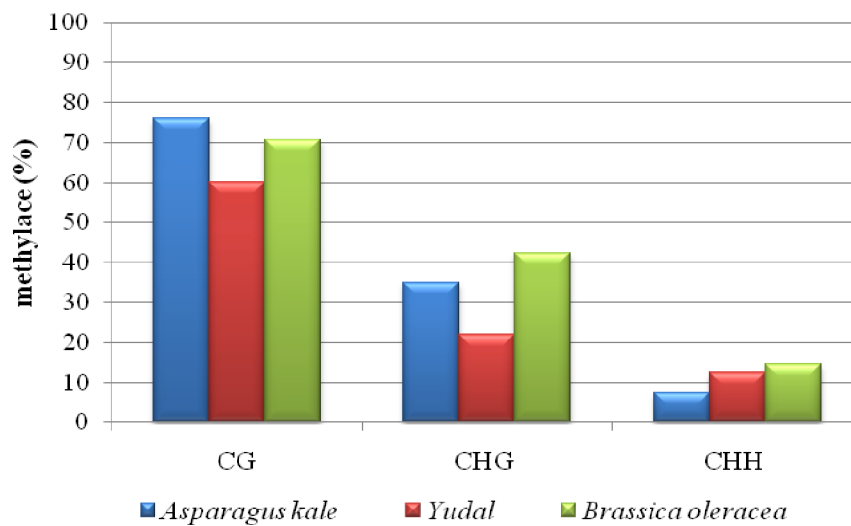
A



Genom A



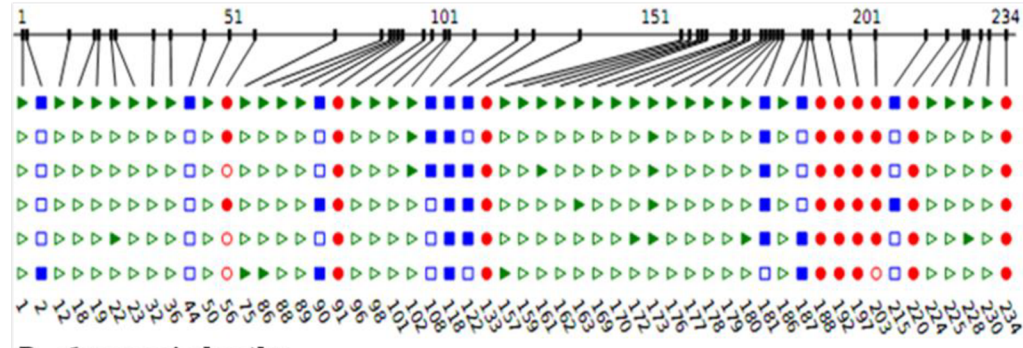
Genom C



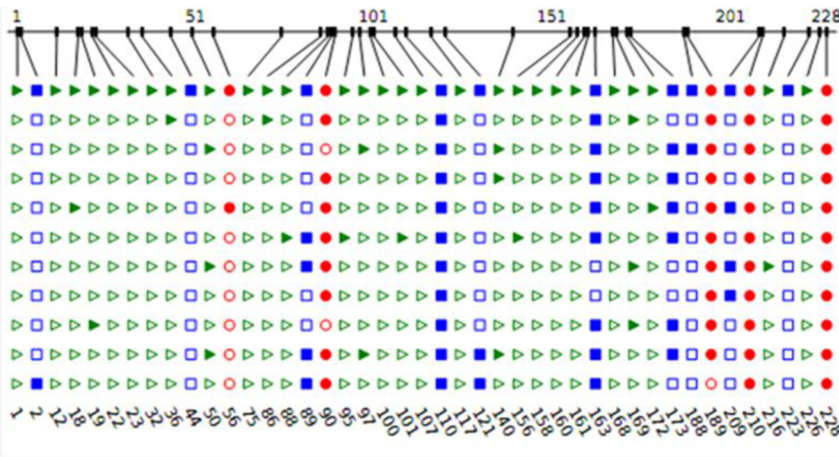
B

Asparagus kale

B. rapa jednotky

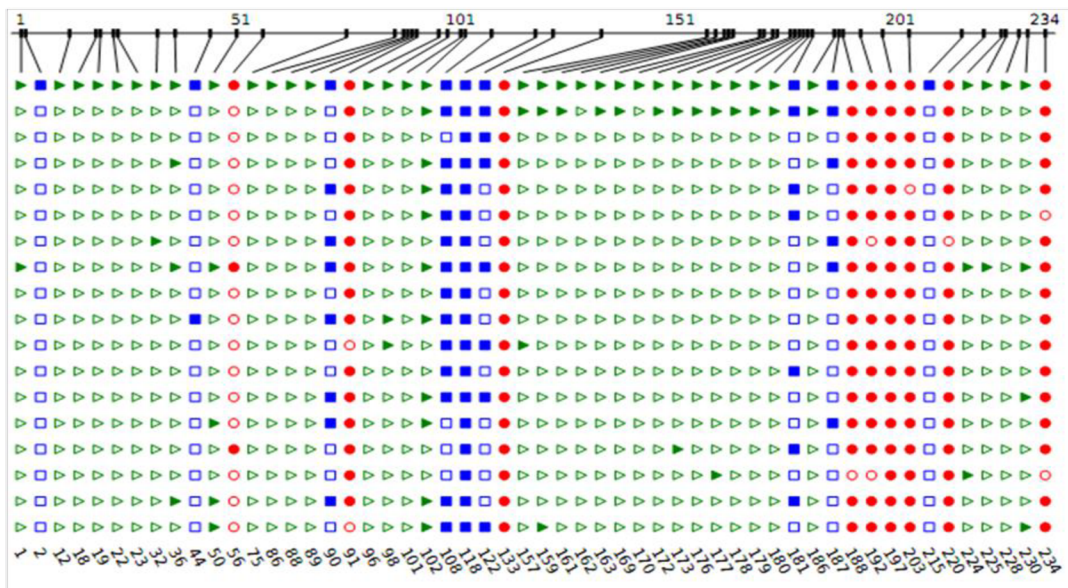


B. oleracea jednotky

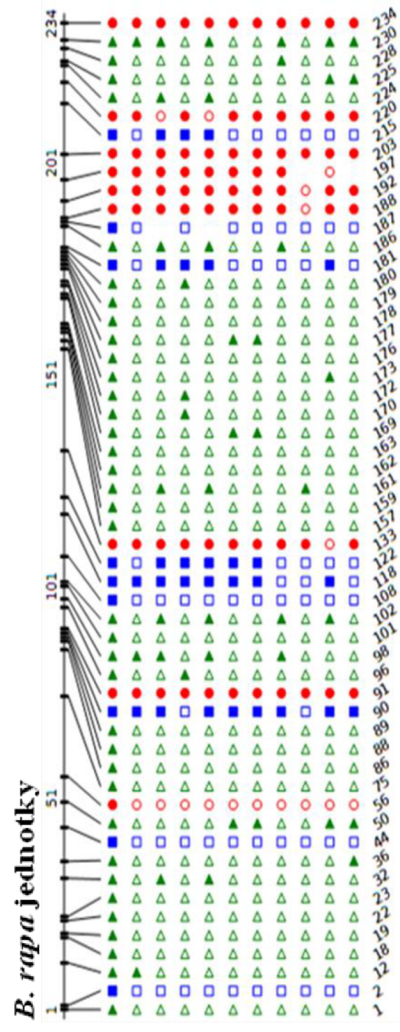


Darmor

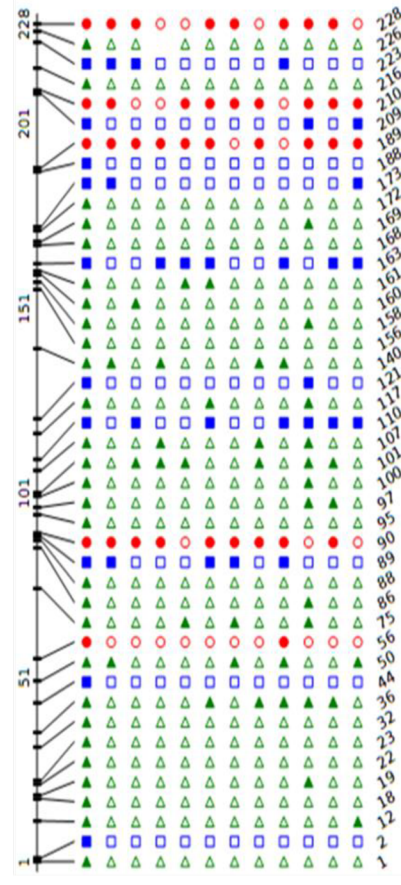
B. rapa jednotky



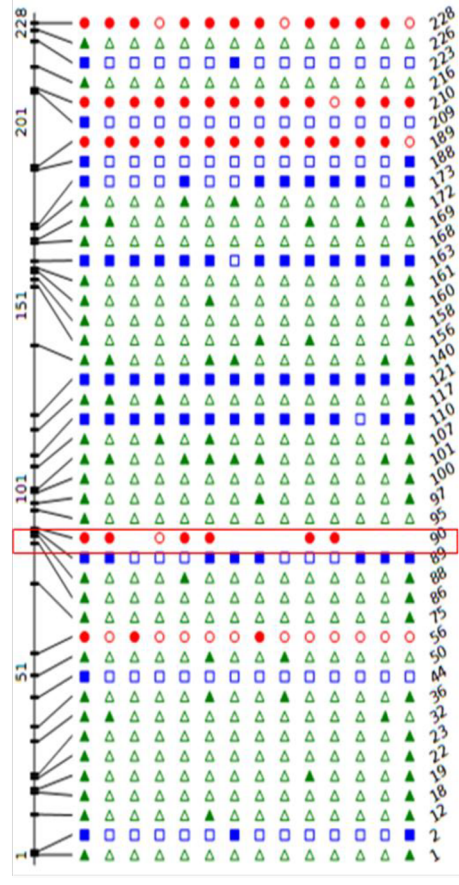
Yudal



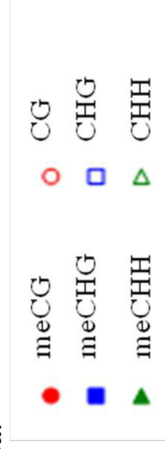
B. oleracea jednotky



B. oleracea RC



legenda:



Obr. 14 Methylační analýza promotorové oblasti variet *B. napus* a rodičovského druhu *B. oleracea* a *B. rapa*. Panel A: grafické vyhodnocení celkové methylace (hodnoty jsou

vypočteny podle vzorce $\frac{m^5C}{m^5C+C} \cdot 100$ a vyneseny na ose y v procentech) a průměrných hodnot m^5C v symetrických a asymetrických sekvenčních motivech. Hodnoty methylace pro *B. rapa* byly získány kolegyní Ing. Z. Tesaříkovou. Panel B: výstup programu CYMATE znázorňuje distribuci m^5C v analyzovaném úseku IGS. Každý řádek v jednotlivých mapách dané variety představuje jeden klon a první sekvence vždy reprezentuje nemodifikované vlákno DNA jednoho z rodičů *B. napus*. V legendě je uveden význam tvarů – nevybarvené značky odpovídají nemethylovaným motivům, vybarvené naopak methylovaným. V červeném obdelníku je zaznačena mutace specifická pro diploidního rodiče *B. oleracea* var. *RC*, která nemá analogii v přirozených hybridech.

6 DISKUZE

Eukaryotické geny pro rRNA jsou velmi unikátní doménou. Na jedné straně genové části patří k evolučně nejstálejším sekvencím, na straně druhé intra- a intergenové části se rychle vyvíjejí. Rovněž počet genů i lokusů na chromosomech může kolísat. Tato proměnlivost se projevuje nejen mezi vzdáleně příbuznými druhy, ale i mezi členy stejného rodu. Dokonce byla odlišnost v rámci úseku IGS popsána i mezi jedinci stejného druhu v stejné populaci. Z těchto důvodů se oblasti IGS a ITS staly užitečným nástrojem fylogenetiky. Stejně tak v cytogenetických studiích je velmi často využíván lokus rDNA jako důležitý chromozomální marker. Předmětem této práce byla analýza struktury, počtu kopií a epigenetických modifikací rDNA u hybridního druhu *Brassica napus* (řepka olejka).

6.1 Stanovení počtu homeologních jednotek 45S rDNA ve varietách *Brassica napus*

Za účelem studie genomové organizace a stanovení počtu kopií homeologních genů u allotetraploidní *B. napus* byl proveden Southern blot za použití próby hybridizující s úsekem ITS2. U jednotek rDNA původem s *B. oleracea* se v úseku ITS2 nachází sekvence rozpoznávaná enzymem EcoRI, u jednotek z *B. rapa* tomu tak není. Po hybridizaci danou sondou byly na membráně detekovány různě velké bandy, odpovídající *B. oleracea* (genom C) nebo *B. rapa* (genom A). U všech analyzovaných variet *B. napus* byly oba rodičovské bandy detekovány (viz. Obr. 10, panel A). Tento výsledek je v souladu se studiemi, které se zabývaly homogenizací rDNA u rodu *Brassica* [33], a který ukazuje na aditivní dědičnost obou rodičovských lokusů [44]. Zdálo by se, že jednotlivé rodiny rDNA spolu neinteragují a pravděpodobně sledují nezávislou evoluční dráhu. Ve druhé části analýzy byl radioaktivní signál membrány kvantifikován a získaný poměr homeologních jednotek 45S rDNA ve varietách byl zpracován graficky (viz Obr. 10, panel B). Bylo zjištěno, že poměr A a C jednotek ve varietách se velmi různí. U variety *Oro* byl detekován nejvyšší poměr A:C, a to 10:1. U žádného ze vzorků nebyla zjištěna převaha C jednotek, v pouze v případě variet *Yudal* a *Asparagus kale* byl poměr 1:1 (respektive 1,2:1).

Pozorování, že homeologní jednotky 45S rDNA původem z *B. rapa* jsou v početní převaze, bylo v zásadě očekáváno, vzhledem k tomu, že nerovnováha v počtu genů se projevuje již v diploidních rodičích. U *B. rapa* je na chromosomech přítomno 5 lokusů, zatímco u *B. oleracea* jsou lokusy 2 (osobní sdělení). Lze hypotetizovat, že homogenizace u variet *Yudal* a *Asparagus kale* probíhá ve prospěch genů *B. oleracea*, zatímco u jiných variet (*Oro*) ve prospěch genů původem z *B. rapa*. Vzhledem k tomu, že se má za to, že *B. napus* je polyfyletický druh (vznikl opakovaně mezidruhovou hybridizací rodičovských druhů), je možné, že rodičovské druhy již vstupovaly do hybridizace s nestejným počtem genů. Odlišný počet genů pro rRNA byl popsán např. u diploidní *Vicia faba* [66]. U tohoto druhu byla identifikována variabilita v množství jednotek rDNA v rámci zástupců jedné populace, kdy některé hodnoty byly až stokrát vyšší. Proměnlivost v počtu kopií byla popsána i mezi odlišnými tkáněmi jedné rostliny. Abych získala informace o rozložení mutací, byla

provedena sekvence promotorové oblasti (klíčový úsek z hlediska transkripce) z několika variet *B. napus* a diploidních rodičů.

6.2 Sekvenční analýza oblasti IGS

Promotory jsou klíčové oblasti regulace genové exprese. Ve srovnání s kódujícími úseky se promotory umístěné v intergenové oblasti (IGS) vyvíjí rychleji, proto je možné identifikovat unikátní ribotypy i dokonce na úrovni stejného genomu [29]. Mutace a epigenetické modifikace promotoru mohou ovlivňovat transkripční aktivitu. Abychom se přesvědčili, že v hybridech jsou oba rodičovské promotory funkční, provedli jsme jejich sekvenční analýzu. Promotory byly amplifikovány pomocí specifických primerů a získané produkty byly klonovány a sekvenovány. Aby nedošlo ke zkreslení výsledků sekvenční analýzy případnými artefakty PCR, byl studovaný úsek amplifikován v emulzní PCR. Podstatou této poměrně nové metody je amplifikace v emulzi typu voda v oleji, kde v každé kapénce vodní fáze je přítomna jedna (maximálně pár) molekul templátu DNA. Tato segregace DNA matrice brání rekombinacím mezi homeologními (nebo částečně homeologními) fragmenty genů [62]. Fylogenetická analýza získaných sekvencí byla provedena u tří variet *Yudal*, *Spok* a *Darmor*. U všech tří stromů, které byly vytvořeny pomocí programu PHYLOWIN [64], byly identifikovány dvě základní větve. K jedné větvi připadaly klony podobné sekvenci *B. rapa* a k druhé větvi klony podobné *B. oleracea* (viz Obr. 11). Toto zjištění je v souladu s výsledkem Southern blotu, kde byly u všech analyzovaných variet detekovány bandy původem z A i C genomu (viz. Obr. 10, panel A). U variety *Darmor*, se objevily dva klony (15D a 30D), které byly významně geneticky vzdáleny rodičovským sekvencím. Tyto klony byly dále samostatně zpracovány s rodičovskými sekvencemi za použití algoritmu CLUSTALW a bylo zjištěno, že klony sdílí některé sekvenční motivy vlastní genomu C a A (viz. Obr. 12). Vystává proto otázka, zda opravdu mezi jednotkami rDNA neprobíhá homogenizace.

Výsledek připomíná situaci u recentních allotetraploidů *Tragopogon*, kde bylo prokázáno, že jednotlivé populace se od sebe významně liší počtem zděděných rodičovských rDNA [67]. Analogie *Tragopogon* a *Brassica* se projevují i na úrovni chromosomů, kde bylo prokázáno, že může docházet k párování homeologních chromosomů a výměně genetického materiálu [68]. Zda je variabilita v počtu genů pro rRNA u *B. napus* způsobena příspěvkem rodičovských genomů, jejichž dědičnost lze popsat Mendlovými zákony, nebo se jedná o následek homogenizace rDNA (nemendelistickou dědičnost) není možné z mých experimentů jednoznačně rozhodnout. Odpověď na tyto otázky by mohly přinést experimenty se syntetickými liniemi *B. napus* kolegyně z laboratoře Molekulární epigenetiky Ing. Zuzany Tesaříkové. Její výsledky naznačují, že sice dochází k přeskupení chromozomálních lokusů, avšak počty genů v lokusech NOR zůstávají víceméně konstantní. Nicméně u trávy *Zingeria* byla popsána částečná eliminace jedné rDNA rodiny, v jejímž důsledku došlo ke změně velikosti nebo ztrátě NOR [69], což je možná souvislost s *B. napus*, kde byla také popsána proměnlivost v počtu lokusů rDNA [70]. U bavlníku byla zjištěna interlokusová genová konverze, která vedla k přeměně jednoho rodičovský genom na druhý (beze změny velikosti lokusu) [31] a v případě *Glycine* se jednalo o částečnou interlokusovou homogenizace rDNA [71].

V předcházející kapitole byly diskutovány již publikované výsledky popisující činitele, kterými je možné vysvětlit, proč homogenizace rDNA u *B. napus* neprobíhá. Jestliže u *B. napus* homogenizace ve skutečnosti probíhá, alespoň u některých variet, je možné, že tyto faktory (např. pozice lokusů či epigenetické modifikace) zpomalují homogenizační proces. Doposud nebyla provedena u *B. napus* sekvenční analýza oblasti IGS za využití emPCR, a proto moje výsledky mohou poskytovat jiný pohled na problematiku homogenizace rDNA.

V posledních letech se začíná prosazovat názor, že homogenizace rDNA je spjata s transkripční aktivitou genů pro rRNA (tedy během interfáze, kdy DNA je v dekonzenzovaném stavu) [72]. Pokud je toto tvrzení pravdivé, bude se homogenizace týkat pouze jednotek aktivně přepisovaných. Z toho důvodu si myslím, že by bylo vhodné v dalším pokračování této práce provést sekvenční analýzu DNA izolované z květů *B. napus* a získaná data porovnat s mými. Protože byla v květních orgánech zjištěna změna exprese genů pro rRNA a docházelo k přepisu obou rodičovských rDNA [44], může se homogenizační profil lišit.

6.3 Methylační analýza promotorové oblasti pomocí hydrogensířičitanového sekvenování

Jak už bylo u řady systémů potvrzeno, geny pro rRNA jsou cílem epigenetické regulace. Proto jsem ve své práci přistoupila k methylační analýze oblasti IGS pomocí hydrogensířičitanového sekvenování. Byla provedena u vybraných variet *Darmor*, *Yudal* a *Asparagus kale* a jednoho z rodičů *B. oleracea* (methylační analýza *B. rapa* byla provedena kolegyní Ing. Z. Tesaříkovou). Byla zaznamenána významná epigenetická proměnlivost a v zásadě žádný z klonů neměl stejný epi-ribotyp. Také nebyl získán jediný klon, který není methylován. Vyšší hladina m⁵C ve varietách *B. napus* byla zjištěna u jednotek A, tedy původem z *B. rapa* (25 – 28 %). Methylace jednotek C, tedy z *B. oleracea*, byla nižší o více jak pětinu (20 – 21 %), viz Obr. 14, Panel A.

Methylcytosin se může v rostlinách vyskytovat v jakémkoliv sekvenčním motivu. Ale nejběžnější je methylace v symetrických sekvenčních motivech – dinukleotidu CG a trinukleotidu CHG. V mé práci bylo u všech variet *B. napus* i u *B. oleracea* zjištěna nejvyšší hladina m⁵C v dinukleotidu CG (60 – 90 %), dále následovaná motivem CHG (20 – 40 %). Vzhledem k tomu, že asymetrický motiv je udržován pouze cestou methylace *de novo*, hodnoty methylcytosinu v trinukleotidu CHH bývají nejnižší [54]. V tomto motivu se obsah methylcytosinu pohyboval mezi 8 – 15 %, viz Obr. 14, Panel A.

Obecně je gen s hypermethylovanou promotorovou oblastí považován za transkripčně umlčený, naopak geny s významně menším obsahem m⁵C bývají transkripčně aktivní [48]. Přímá spojitost mezi hypermethylací a umlčením jednotek rDNA byla potvrzena např. u několika kultivarů hexaploidní pšenice [43]. Také je známo, že jednotky rDNA původem z *B. rapa* jsou ve vegetativních orgánech dominantní nad jednotkami z *B. oleracea* [44], [48]. Z výše uvedených důvodů jsem očekávala, že promotory *B. oleracea* budou methylovány více než geny původem z *B. rapa*. Tento předpoklad se však nepotvrdil. Promotory rDNA původem z *B. rapa* měly v hybridech v průměru vyšší stupeň methylace než promotory

původem z *B. oleracea*. Mnou získané výsledky si vysvětlují následovně. Vyšší hladina methylace jednotek z *B. rapa* u *Brassica napus* může odrážet epigenetický obraz rDNA rodičovského genomu. Jak bylo zjištěno, epigenetická modifikace genomu se liší mezi příbuznými druhy rodu *Brassica*, přičemž genom *B. rapa* se jeví jako více heterochromatický než *B. oleracea* [73]. Je známo, že distribuce methylcytosinu není náhodná, většina m⁵C se vyskytuje uvnitř repetitivních sekvencí (rDNA), které se nachází v heterochromatinu [74]. Nadto epigenetický obraz *B. napus* se více podobá *B. oleracea* [73]. U rodu *Arabidopsis* bylo potvrzeno, že epigenetická informace může být zachována a dále děděna i během meiózy. Jak ale bylo poznamenáno, taková dědičnost nemusí být stoprocentně zachována a může být pozměněna v závislosti na genetickém kontextu [75]. Tomuto by odpovídaly i mé výsledky, protože hodnota celkového obsahu m⁵C detekovaná v promotorové oblasti rDNA *B. oleracea* byla 27 % a celková methylace oblasti IGS jednotek C u variet *B. napus* se pohybovala mezi 20 – 21 %. Podobně nižší hodnoty methylace u hybridů v porovnání s rodičem byly zjištěny i v případě *B. rapa* (viz. Obr. 14, panel A). Je známo, že většina genů pro rRNA je nadbytečná. Proto dalším důvodem, proč jednotky A vykazují vyšší hodnoty m⁵C než jednotky C, může být množství genů pro rRNA. Pravděpodobně *B. rapa* obsahuje velký počet jednotek rDNA, kde je většina umlčena. Závislost mezi hladinou m⁵C a počtem genů byla popsána např. u *Arabidopsis* [76]. Tyto hypotézy však nevysvětlují proč geny *B. oleracea* v hybridech měly nižší stupeň methylace než v mateřské linii, přestože zřejmě v hybridech podléhají transkripčnímu umlčení. Zde je třeba mít na zřeteli, že námi analyzovaná varieta *B. oleracea* nemusí odpovídat pravému rodiči, který dal vznik *B. napus*. Epigenetický obraz rDNA u pravého rodiče mohl být jiný. Skutečnost, že sekvence *B. oleracea* var. C10.3 obsahuje mutaci v pozici 90 (viz. Obr. 14, panel B), která není přítomna v C sekvencích u žádné z analyzovaných variet *B. napus*, nasvědčuje tomu, že donorem genomu allotetraploidní *B. napus* byla jiná populace *B. oleracea*. Konečně je možné, že rDNA genomu C jsou skutečně exprimované u našich variet *B. napus*. Transkripční analýza totiž u zmíněných variet *B. napus* prováděna nebyla.

Vztah mezi hladinou methylace a navozením jadéřkové dominance stále není jednoznačně definován. Byl potvrzen u řady systémů např. *Triticale* [77]. Nicméně jadéřková dominance byla popsána i u rodu *Drosophila* [78], kde byla detekována velmi nízká hladina m⁵C [79]. U *B. napus* bylo zjištěno, že umlčení sady genů pro rRNA je zprostředkováno mechanismy, které operují na úrovni chromatinové struktury. Tyto mechanismy zahrnují acetylaci histonů a metylaci cytosinů. Proto jedním z vysvětlení, do jaké míry je navození jadéřkové dominance svázáno s metylací DNA, je možnost, že důležitou pro regulaci transkripce je methylace cytosinu jen v určitých pozicích. Získané klony, které u každé variety představují v zásadě unikátní epi-ribotyp (viz. Obr. 14, panel B) mohou odrážet tuto možnost. Je také důležité opět zmínit, že vyšší methylace genomu A v porovnání s genom C byla zjištěna i u rodiče *B. rapa* a *B. oleracea* (viz. Obr. 14, panel A). Zdá se tedy, že methylace v hybridech je svázána s obsahem m⁵C v rodičích a navození jadéřkovou dominancí je výsledkem kombinace řady dalších faktorů.

7 ZÁVĚR

Cílem moji diplomová práce bylo provést genetickou a epigenetickou analýzu vysokokopiových genů pro ribozomální RNA (rDNA) u několika variet hybridního druhu *Brassica napus*. Experimenty zahrnovaly stanovení poměru rodičovských genů v hybridech, sekvenční a methylační analýzu promotorů polymerázy I (Pol I).

Pomocí Southernovy hybridizace byly u všech dvanácti variet identifikovány obě rodičovské varianty genů rRNA pocházející z *B. oleracea* (genom C) a *B. rapa* (genom A). Po kvantifikaci hybridizačního signálu byla však zjištěna značná proměnlivost v zastoupení rodičovských jednotek rDNA mezi jednotlivými varietami, přičemž se projevovala početní převaha genomu A u 10 variet. Výjimkou byly variety *Yudal* a *A. kale*, kde byl poměr jednotek A a C vyrovnán. Sekvenační analýza úseku IGS obsahující Pol I promotor byla v dobré shodě s hybridizačními experimenty u variet *Yudal* a *Spok*. U variety *Darmor* pouze jeden klon z celkových 18 sekvenovaných odpovídal sekvenci *B. oleracea*, 15 klonů bylo typických pro *B. rapa*. Zbývající dva klony sdílely sekvenční motivy typické pro oba rodiče, a tudíž by se mohlo jednat o produkty genetické rekombinace. Na základě těchto výsledků se domnívám, že u některých variet *B. napus* může probíhat homogenizace rDNA, přestože dosavadní literární údaje mluví proti této hypotéze. Tyto dřívější práce však neprováděly populační analýzu, a proto moje práce může poskytovat detailnější pohled na problematiku evoluce ribozomálních genů u *B. napus*.

Na základě kvantifikace počtu rodičovských kopií (oblast ITS) a sekvenční analýze oblasti IGS se domnívám, že by bylo zajímavé dále pokračovat ve výzkumu možné homogenizace rDNA u *Brassica napus*. A to sekvenační analýzou IGS u variet, kde byl detekován nejvyšší poměr jednotek A:C (*Oro* nebo *Maxol*).

Součástí mé práce byla i methylační analýza promotorové oblasti rRNA genu u variet *A. kale*, *Yudal* a *Darmor* a rodičů *B. rapa* a *B. oleracea*. U rodičovských diploidních druhů byla methylace Pol I promotorů poněkud vyšší u *B. rapa* (obsah m^5C roven 31 %) než u *B. oleracea* (27 %). U hybridů byla obecně zjištěna nižší methylace rodičovských jednotek. V A genomu se průměrný obsah m^5C pohyboval v rozmezí 24 – 28 %, v C genomu pak 20 – 21%. Toto zjištění je velmi zajímavé vzhledem k tomu, že u *B. napus* je známa jadéřková dominance, kde transkripčně aktivní rRNA geny jsou původem *B. rapa*. Je uznáván názor, že hypermethylace je spjata s umlčením genů. Zatímco hypomethylace aktivních genů *B. rapa* byla vcelku očekávaná, překvapivě umlčené geny *B. oleracea* vyšší stupeň methylace nevykazovaly. Očekávaná korelace mezi hypermethylací a umlčováním se tak nepotvrdila. Domnívám se, že za navození jadéřkové dominance u *B. napus* mohou být odpovědné i další epigenetické faktory.

Jako další perspektivu v této problematice vidím v detailní analýze exprese jednotek rDNA u různých variet *B. napus*, studiu mechanismů navození jadéřkové dominance a také v analýze epigenomu *B. napus* (zahrnující methylační analýzu dalších variet). Zdá se totiž, že ve světle

získaných výsledků, jadéřková dominance nemusí být tak závislá na methylaci DNA, jak se doposud u rodu *Brassica* uvádělo.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] U, N. Genome-analysis in *Brassica* with special reference to the experimental formation of *B. napus* and peculiar mode of fertilization. *Japanese Journal of Botany*, 1935, vol. 7: 389 –452.
- [2] Erickson, L. R., Straus, N. A., Beversdorf, W. D. Restriction patterns reveal origins of chloroplast genomes in Brassica amphiploids. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 1938, vol. 65: 201 – 206.
- [3] Hejtný, S., Slavík, B. Květena České republiky. 2. vyd. Praha: Academia, 2003. 542 s. ISBN 80-2000-1090-4.
- [4] Leitch, I. J., Bennet, M. D. Polyploidy in angiosperms. *Trends in Plant Science*, 1997, vol. 2: 470 – 476.
- [5] Cui, L. et al. Widespread genome duplications throughout the history of flowering plants. *Genome research*, 2006, vol. 16: 738 – 749.
- [6] Otto, S. P., Whitton, J. Polyploid incidence and evolution. *Annual Reviews of Genetics*, 2000, vol. 34: 401 – 437.
- [7] Comai, L. The advantages and disadvantages of being polyploids. *Nature Review Genetics*, 2005, vol. 6: 836 – 846.
- [8] Soltis, D. E., Soltis, P. S. Molecular data and the dynamic nature of polyploidy. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 1993, vol. 12: 243-273.
- [9] Doyle, J. J. et al. Evolutionary genetics of genome merger and doubling in plants. *Annual Review of Genetics*, 2008, vol. 42: 443 – 461.
- [10] Winkler H. Über die experimentelle Erzeugung von Pflanzen mit abweichenden Chromosomenzahlen (1916). *Molecular and General Genetics*, vol. 17: 270 – 272.
- [11] Winge, Ö. The chromosomes: their number and general importance. *Comptes rendus des travaux du laboratoire Carlsberg*, 1917, vol. 13: 131 – 275.
- [12] Blakeslee, A. F., Avery, A. G. Methods of inducing doubling of chromosomes in plants by treatment with kolchicine. *The Journal of Heredity*, 1937, vol. 28: 393 – 411.
- [13] Song, K., Lu, P., Tang, K., Sborn, T. C. Rapid genome change in synthetic polyploids of *Brassica* and its implications for polyploid evolution. *The Proceedings of the National Academy of Sciences Online*, 1995, vol. 92: 7719 – 7723.

- [14] Adams L. K., Percifield R., Wendel J. F. Organ – specific silencing of duplicated genes in a newly synthesized cotton allotetraploids. *Genetics*, 2004, vol. 168: 2217 – 2226.
- [15] Soltis, P. S., Plunkett, G. M., Novak, S. J., Soltis, D. E. Genetic variation in *Tragopogon* species – Additional origins of the allotetraploids *T. mirus* and *T. miscellus* (Compositae). *American Journal of Botany*, 1995, vol. 82: 1329-1341.
- [16] Baumel, A., Ainouche, M. L., Levasseur J. E. Molecular investigations in populations of *Spartina anglica* C. E. Hubbard (Poaceae) invading coastal Brittany (France). *Molecular Ecology*, 2001, vol. 10: 1689 – 1701.
- [17] Urbanska, K. M., Hurka, H., Landolt, E., Neuffer, B., Mummenhoff, K. Hybridization and evolution in *Cardamine* (*Brassicaceae*) at Urnerboden, central Switzerland: biosystematic and molecular evidence. *Plant Systematics and Evolution*, 1997, 204: 233 – 256.
- [18] Adams, K. L., Wendel, J. F. Polyploidy and genome evolution in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 2005, vol. 8: 135 – 141.
- [19] Kashkush, K., Feldman, M. and Levy, A. A. Gene loss, silencing and activation in a newly synthesized wheat allotetraploid. *Genetics*, 2002, vol. 160: 1651 – 1659.
- [20] Pires, J. Ch. et al. Flowering time divergence and genomic rearrangements in resynthesized *Brassica* polyploids. *Biological Journal of the Linnean Society*, 2004, vol. 82: 675 – 688.
- [21] Liu, B., Brubaker, C. L., Mergeai, G., Cronn, R. C., Wendel, J. F. Polyploid formation in cotton is not accompanied by rapid genomic changes. *Genome*, 2001, vol. 44: 321 – 330.
- [22] Hemleben, V., Zentgraf, U. Structural organization and regulation of transcription by RNA polymerase I of plant nuclear ribosomal RNA genes. *Results & Problems in Cell Differentiation*, 1994, vol. 20: 3 – 24.
- [23] McClintock, B. The relation of a particular chromosomal element to the development of the nucleoli in *Zea mays*. *Cell and Tissue Research*, 1934 vol. 21: 294 – 326.
- [24] Álvarez, I., Wendel, J. F. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2003, vol. 29: 417 – 434.
- [25] Flavell, R. B. O'Dell, M., Sharp, P., Nevo, E., Beiles, A. Variation in the intergenic spacer of ribosomal DNA of wild beat, *Triticum dicoccoides*, in Israel. *Molecular Biology and Evolution*, 1986, vol. 3: 547 – 558.
- [26] Preuss, S., Pikaard, C. S. rRNA gene silencing and nucleolar dominance: insights into a chromosome-scale epigenetic on/off switch. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2007, vol. 1769: 383 – 392.

- [27] Dover, G. A. Molecular drive: Cohesive model of species evolution. *Nature*, 1982, vol. 9: 111 – 116.
- [28] Crohn, R. C., Zhao, X., Paterson, A. H., Wendel, J. F. Polymorphism and concerted evolution in a tandemly repeated gene family: 5S ribosomal DNA in diploid and allopolyploid cottons. *Journal of Molecular Evolution*, 1996, vol. 42: 685 – 705.
- [29] Volkov, R. A., Komarova, N. Y., Hemleben, V. Ribosomal DNA in plant hybrids: inheritance, rearrangement, expression. *Systematics and Biodiversity*, 2007, vol. 5: 261 – 276.
- [30] Eickbush, T. H., Eickbush, D. G. Finely orchestrated movements: evolution of their RNA genes. *Genetics*, 2007, vol. 175: 477 – 485.
- [31] Wendel, J. F., Schnabel, A., Seelanan, T. Bidirectional interlocus concerted evolution following allopolyploid speciation in cotton (*Gossypium*). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1995, vol. 92: 280 – 284.
- [32] Kovarik, A., Matyasek, R., Lim, K. Y., Skalicka, K., Koukalova, B., Knapp, S., Chase, M., Leitch, A. R. Concerted evolution of 18-5.8-26S rDNA repeats in *Nicotiana* allotetraploids. *Biological Journal of the Linnean Society*, 2004, vol. 82: 615 – 625.
- [33] Waters, E. R., Schaal, B. A. Biased gene conversion is not occurring among rDNA repeat in the *Brassica* triangle. *Genome*, 1996, vol. 39: 255 – 264.
- [34] Soltis, P. S., Soltis, D. E. Recent and recurrent polyploidy in *Tragopogon*: genetic and evolutionary consequences. *Biological Journal of the Linnean Society*, 2004, vol. 82: 485 – 501.
- [35] Kovarik, A. et al. Rapid concerted evolution of nuclear ribosomal DNA in two *Tragopogon* allopolyploids of recent and recurrent origin. *Genetics*, 2005, vol. 169: 931 – 944.
- [36] Reeder, R. H. Mechanism of nucleolar dominance in animals and plants. *Journal of Cell Biology*, 1985, vol. 101: 2013 – 2016.
- [37] Navashin, M. Chromosomal alterations caused by hybridization and their bearing upon certain genetic problems. *Cytologia*, 1934, vol. 5: 169 – 203.
- [38] Wallace H., Birnstiel M. L. Ribosomal cistrons and the nucleolar organizer. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1966, vol. 114: 296 – 310.
- [39] Wallace, H., Landridge, W. H. R. Differential amphiplasty and the control of ribosomal RNA synthesis. *Heredity*, 1971, vol. 27: 1 – 13.
- [40] Cassidy, D. M., Blackler, A. W., Repression of nucleolar organizer activity in an interspecific hybrid of the genus *Xenopus*. *Developmental Biology*, 1974, vol. 41: 84 – 96.

- [41] Labhart, P., Reeder, R. H. Enhancer-like properties of the 60/81 bp elements in the ribosomal gene spacer of *Xenopus laevis*. *Cell*, 1984, vol. 37: 285 – 289.
- [42] Reeder, R. H., Roan, J. G. The mechanism of nucleolar dominance in *Xenopus* hybrid. *Cell*, 1984, vol. 38: 39 – 44.
- [43] Sardana, R., Odell, M., Flavell, R. Correlation between the size of the intergenic regulatory region, the status of cytosine methylation of ribosomal RNA genes and nucleolar expression in wheat. *Molecular & General Genetics*, 1993, vol. 236: 155 – 162.
- [44] Chen, Z. J., Pikaard, C. S. Transcriptional analysis of nucleolar dominance in polyploid plants: Biased expression/silencing of progenitor rRNA genes is developmentally regulated in *Brassica*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1997, vol. 94: 3442 – 3447.
- [45] Chen, Z. J., Comai, L., Pikaard, C. S. Gene dosage and stochastic effects determine the severity and direction of uniparental ribosomal RNA gene silencing (nucleolar dominance) in *Arabidopsis* allopolyploids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1998, vol. 95: 14891 – 14896.
- [46] Grummt, I., Roth, E., Paule, M. R. rRNA transcription *in vitro* is species – specific. *Nature*, 1982, vol. 296: 173 – 174.
- [47] Frieman, M., Chen, Z. J., Saez – Vasquez, J., Shen, L. A, Pikaard, C. S. RNA polymerase I transcription in a *Brassica* interspecific hybrid and its progenitors: Tests of transcription factor involvement in nucleolar dominance. *Genetics*, 1999, vol. 152: 451 – 460.
- [48] Chen, Z. J., Pikaard, C. S. Epigenetic silencing of RNA polymerase I transcription: a role for DNA methylation and histone modification in nucleolar dominance. *Genes & Development*, 1997, vol. 11: 2124 – 2136.
- [49] Vaucheret, H., Fagard, M. Transcriptional gene silencing in plants: targets, inducers and regulators. *Trends in Genetics*, 2001, vol. 17: 29 – 35.
- [50] Vaucheret, H., Beclin, C., Fagard, M. Post – transcriptional gene silencing in plants. *Journal of Cell Science*, 2001, vol. 114: 3083 – 3091.
- [51] Liu, B., Wendel, J. F. Epigenetic phenomena and the evolution of plant allopolyploids. *Molecular phylogenetics and evolution*, 2003, vol. 29: 365 – 379.
- [52] Wyatt, G. R. Recognition and estimation of 5-methylcytosine in nucleic acids. *Biochemistry Journal*, 1951, vol. 47: 581 – 584.
- [53] Dunn, D. B., Smith, J. D. The occurrence of 6-methylaminopurine in deoxyribonucleic acids. *Biochemical Journal*, 1958, vol. 68: 627 – 636.

- [54] Meyer, P., Niedenhof, I. and Tenlohuis, M. Evidence for cytosine methylation of non – symmetrical sequences in transgenic *Petunia hybrida*. *EMBO Journal*, 1994, vol. 13: 2084 – 2088.
- [55] Kovařík, A., Matyášek, R., Leitch, A., Gazdová, B., Fulneček, J., Bezděk, M. Variability in CpNpG methylation in higher plant genomes. *Gene*, 1997, vol. 204: 25 – 33.
- [56] Fulnecek, J. Rostlinné DNA (cytosine-5)-methyltransferasy. *Biologické Listy*, 2005, vol. 70: 129 – 150.
- [57] Bird, A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes & Development*, 2002, vol. 16: 6 – 21.
- [58] Finnegan, E. J., Peacock, W. J., Dennis, E. S. DNA methylation a key regulator of plant development and other processes. *Current Opinion in Genetics & Development*, 2000, vol. 10: 217 – 223.
- [59] Koryakov, D. E. Histone modification and regulation of chromatin functions. *Russian Journal of Genetics*, 2006, vol. 42: 970 – 984.
- [60] Flavell, R. B., O'Dell, M., Thompson, W. F. Regulation of cytosine methylation in ribosomal DNA and nucleolus organizer expression in bean. *Journal of Molecular Biology*, 1988, vol. 204: 523 – 534.
- [61] Gabbara, S., Bhagwat, A. S. The mechanism of inhibition of DNA (cytosine-5) methyltransferases by 5-azacytosine is likely to involve methyl transfer to the inhibitor. *Biochemical Journal*, 1995, vol. 307: 87 – 92.
- [62] Williams, R. et al. Amplification of complex gene libraries by emulsion PCR, 2006. Dostupný na www: <http://www.nature.com/nmeth/journal/v3/n7/full/nmeth896.html>
- [63] Hall, T. A. BioEdit: a user – friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 1999, vol. 41: 95 – 98.
- [64] Galtier, N., Gouy, M., Gautier, C. SEAVIEW and PHYLOWIN: two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *Computer Applications in the Biosciences*, 1996, vol. 12: 543 – 548.
- [65] Hetzl, J., Foerster, A. M., Raidl, G., Mittelsten, S. O. CyMATE: a new tool for methylation analysis of plant genomic DNA after bisulphite sequencing. *Plant Journal*, 2007, vol. 51: 526 – 536.
- [66] Rogers, S. O, Bendich, A. J. Heritability and variability in ribosomal RNA genes of *Vicia faba*. *Genetics*, 1987, vol. 117: 285 – 295.

- [67] Malinská, H. et al. Similar patterns of rDNA evolution in synthetic and recently formed natural populations of *Tragopogon* (*Asteraceae*) allotetraploids. *Evolutionary Biology*, 2010, vol. 10: 291 – 308.
- [68] Lim, K. Y. Rapid chromosome evolution in recently formed polyploid in *Tragopogon* (
- [69] Kotseruba, V., Gernand, D, Meister, A, Houben, A. Uniparental loss of ribosomal DNA in the allotetraploid grass *Zingieria trichopoda* ($2n=8$). *Genome*, 2003, vol. 46: 156 – 163.
- [70] Hasterok, R. et al. Comparative analysis of rDNA distribution in chromosomes of various species of *Brassicaceae*. *Annals of Botany*, 2006, vol. 97: 205 – 216.
- [71] Joly, S., Rauscher, J.T., Sherman-Broyles, S.L., Brown, A.H.D., Doyle, J.J. Evolutionary dynamics and preferential expression of homeologous 18S-5.8S-26S nuclear ribosomal genes in natural and artificial *Glycine* allopolyploids. *Molecular Biology and Evolution*, 2004, vol. 21: 1409 – 1421.
- [72] Lim, K. Y., Kovařík, A., Matyašek, R., Bezděk, M., Lichtenstein, C. P., Leitch, A. R. Gene conversion of ribosomal DNA in *Nicotiana tabacum* is associated with undermethylated, decondensed and probably active gene units. *Chromosoma*, 2000, vol. 109: 161 – 172.
- [73] Braszewska-Zalewska, A., Bernas, T., Maluszynska, J. Epigenetic chromatin modifications in *Brassica* genomes. *Genome*, 2010, vol. 53: 203 – 210.
- [74] Bennetzen, J. L. The contributions of retroelements to plant genome organization, function and evolution. *Trends in microbiology*, 1996, vol. 4: 347 – 353.
- [75] Riddle, N. C, Richards, E. J. Genetic variation in epigenetic inheritance of ribosomal RNA gene methylation in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 2005, vol. 41: 524 – 532.
- [76] Woo, H. R., Richards, E. J. Natural variation in DNA methylation ribosomal RNA genes of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biology*, 2008, vol. 8: 92 – 104.
- [77] Houchins, K., O'Dell, M., Flavell, R. B., Gustafson, J. P. Cytosine methylation and nucleolar dominance in cereal hybrids. *Molecular and General Genetics*, 1997, vol. 255: 294 – 301.
- [78] Durica, D. S., Krider, H. M. Studies on the Ribosomal RNA Cistrons in Interspecific *Drosophila* Hybrids. II. Heterochromatic Regions Mediating Nucleolar Dominance. *Genetics*, 1978, vol. 89: 37 – 64.
- [79] Lyko, F., Ramsahoye, B. H., Jaenisch R. DNA methylation in *Drosophila melanogaster*. *Nature*, 2000, vol. 408: 538 – 540.

SEZNAM A CHARAKTERISTIKA ROZTOKŮ A PUFRŮ:

CTAB:	1,0 M tris-HCl, pH = 8 5 M NaCl 0,5 M EDTA, pH = 8 1,4 % CTAB (bromid hexadecyltrimethylamonný)
Hybridizační roztok:	10 mM EDTA, pH = 8 7% SDS (dodecylsírán sodný) 0,25 M Na ₂ HPO ₄ 0,25 M NaH ₂ PO ₄
6x nanášecí pufr pro DNA:	15% Ficoll (Pharmacia) 0,25% Bromfenolová modř 0,25% Xylen kyanol FF
Odmývací roztok 1:	0,1% SDS 2x SSC, pH = 7
Odmývací roztok 2:	0,1 % SDS 0,2x SSC, pH = 7
20 x SSC:	3 M NaCl 0,3 M citrát sodný pH = 7
1x TAE pufr:	12,1% tris-acetát 50 mM EDTA, pH= 8.0 pH = 7.6
TE pufr:	0,5 M tris-HCl, pH=7.5 0,5 mM EDTA, pH= 8.0
IPTG (100mM):	238,3 mg isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid 10 ml deionizované vody
X-gal (40 mg/ml):	400 mg 5-brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galaktopyranosid 10 ml dimethylformamid
Ampicilin (100 mg/ml):	5 g ampicilinu (sodná sůl) 50 ml deioinozované vody