

**Univerzita Palackého v Olomouci**  
**Přírodovědecká fakulta**  
**Katedra buněčné biologie a genetiky**



**Analýza cizorodého genetického materiálu  
u zástupců rodu *Hordeum***

**Bakalářská práce**

**Tereza Křivánková**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

**Olomouc 2019**

**Vedoucí práce: RNDr. Jan Šafář, Ph.D.**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením RNDr. Jana Šafáře, Ph.D. a za použití uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci dne .....

.....

Tereza Křivánková

## Souhrn

Ječmen setý (*Hordeum vulgare* L.) je jedna z nejdříve domestikovaných a zároveň nejdéle pěstovaných obilnin v historii lidstva. V souvislosti se stále narůstající mírou populace je předním cílem základního výzkumu dokonalá znalost genomu, která může zajistit efektivní a šetrné zemědělství, a přitom uspokojit nároky na jeho produkci.

Předkládaná bakalářská práce se skládá z teoretické a praktické části. Cílem teoretické části bakalářské práce je vypracování literární rešerše zaměřené na studium a analýzu rDNA u vybraných zástupců rodu *Hordeum* (podčeleď *Pooideae*) v širším fylogenetickém kontextu. Praktická část se skládá z optimalizace metody PCR a následného skrínování BAC DNA knihovny *Hordeum stenostachys*. Cílem bylo nalezení BAC klonů, které indikují přítomnost cizí rDNA pocházející z podčeledi *Panicoideae*.

Tímto způsobem byly selektovány pozitivní BAC klony 55F16 a 92M24. Sekvenční analýza ukázala, že tato rDNA pochází z příbuzného rodu *Arundinella*.

## Summary

Barley (*Hordeum vulgare* L.) is one of the earliest domesticated and the longest-grown cereal in human history. In the context of an ever-increasing population, the ultimate goal of basic research is to have a thorough knowledge of the genome, which can provide efficient information for economical farming while meeting the demands of its production.

This bachelor's thesis consists of theoretical and practical part. The aim of the theoretical part of the thesis is to elaborate on a literary review focused on the study and analysis of rDNA in selected representatives of the genus *Hordeum* (subfamily *Pooideae*) in a broader phylogenetic context. The practical part consists of optimization of PCR method and subsequent screening of BAC DNA library *Hordeum stenostachys*. The aim of work was to find BAC clones that indicate the presence of foreign rDNA originating from the *Panicoideae* subfamily.

Positive BAC clones 55F16 and 92M24 were selected. Sequencing analysis showed that this rDNA originated from a related *Arundinella* genus.

## **Poděkování**

Tímto bych chtěla poděkovat panu RNDr. Janu Šafářovi, Ph.D. za jeho odborné rady, vstřícný přístup, čas a trpělivost při zpracování mé bakalářské práce. Zároveň bych chtěla poděkovat paní Heleně Tvardíkové za pomoc při provádění experimentů a všem dalším laborantkám za skvělé laboratorní zázemí a pomoc při práci. V neposlední řadě také děkuji prof. Ing. Jaroslavu Doleželovi, DrSc. za možnost vypracovat bakalářskou práci na Ústavu experimentální botaniky AV ČR, v. v. i. v Olomouci.

# OBSAH

SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK .....	vii
SEZNAM OBRÁZKŮ .....	viii
1 ÚVOD .....	1
2 CÍLE PRÁCE .....	2
3 LITERÁRNÍ PŘEHLED .....	3
3.1 Ječmen setý ( <i>Hordeum vulgare</i> L.) .....	3
3.1.1 Taxonomická klasifikace .....	3
3.1.2 Pěstované typy ječmene a vybrané sladovnické odrůdy .....	5
3.1.3 Genom ječmene .....	6
3.1.4 Diverzita rodu <i>Hordeum</i> .....	7
3.2 Fylogenetický vývoj čeledi <i>Poaceae</i> .....	10
3.2.1 Fylogeneze .....	10
3.2.2 Diverzita čeledi <i>Poaceae</i> .....	10
3.2.3 Kmen <i>Triticeae</i> .....	11
3.2.4 Podčeled <i>Panicoideae</i> .....	12
3.2.5 Molekulární fylogenetika .....	14
3.3 Ribozomální geny .....	15
3.3.1 Struktura a funkce rDNA u rostlin .....	15
3.3.2 Využití ribozomálních ITS sekvencí pro účely molekulární fylogenetiky .....	19
3.3.3 Možné způsoby zanesení cizích rDNA genů do genomu ječmene .....	21
4 MATERIÁL A METODY .....	25
4.1 Biologický materiál .....	25
4.2 Použité chemikálie, soupravy a roztoky .....	25
4.2.1 Použité chemikálie .....	25
4.2.2 Použité soupravy .....	25
4.2.3 Použité roztoky a jejich příprava .....	25

4.3	Seznam použitých přístrojů a zařízení.....	26
4.4	Použité experimentální a vyhodnocovací postupy .....	27
4.4.1	Izolace genomické DNA .....	27
4.4.2	Přečištění DNA .....	27
4.4.3	Měření koncentrace DNA .....	27
4.4.4	Příprava BAC knihovny .....	27
4.4.1	Příprava DNA poolů.....	27
4.4.2	Polymerázová řetězová reakce .....	29
4.4.3	Elektroforéza na agarózovém gelu a vizualizace .....	30
5	VÝSLEDKY .....	31
5.1	Příprava DNA BAC poolů.....	31
5.2	Optimalizace PCR .....	31
5.3	Prohledávání BAC knihovny pomocí univerzálního primeru .....	31
5.4	Prohledávání BAC knihovny pomocí specifických primerů .....	32
5.5	Analýza selektovaných BAC klonů.....	34
6	DISKUZE.....	35
7	ZÁVĚR.....	38
8	LITERATURA.....	39

## SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK

BAC	umělý bakteriální chromozóm ( <i>bacterial artificial chromosome</i> )
bp	páry bází ( <i>base pairs</i> )
cDNA	komplementární DNA ( <i>complementary DNA</i> )
CR	centromerický retrotranspozón ( <i>centromeric retrotransposon</i> )
EST	krátká subsekvence cDNA ( <i>expressed sequence tag</i> )
F primer	<i>forward</i> primer
FISH	fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace ( <i>fluorescent in situ hybridization</i> )
HGT	horizontální přenos genů ( <i>horizontal gene transfer</i> )
IGS	dlouhý netranskribovaný mezerník ( <i>intergenic spacer</i> )
ITS	vnitřní transkribovaný mezerník ( <i>internal transcribed spacer</i> )
LTR	dlouhá terminální repetice ( <i>long terminal repeat</i> )
n	haploidní počet chromozómů
NOR	oblast organizátoru jadérka ( <i>nucleolar organizer region</i> )
PCR	polymerázová řetězová reakce ( <i>polymerase chain reaction</i> )
R primer	<i>reverse</i> primer
rDNA	ribozomová DNA ( <i>ribosome DNA</i> )
rRNA	ribozomová RNA ( <i>ribosome RNA</i> )
T <sub>a</sub>	teplota nasedání primerů ( <i>annealing temperature</i> )
TE	transpozibilní element ( <i>transposable element</i> )
x	základní chromozómové číslo



## SEZNAM OBRÁZKŮ

<b>Obrázek 1:</b> Fylogeneze čeledi <i>Poaceae</i> . .....	4
<b>Obrázek 2:</b> Morfologie klásku dvouřadého (2 r) a šestiřadého ječmene (6 r). .....	6
<b>Obrázek 3:</b> Idiogram chromozómů ječmene setého s vyznačením místa sekundární konstrikce. ....	7
<b>Obrázek 4:</b> Mapa Blízkého Východu zobrazující oblast úrodného půlměsíce a charakter šíření ječmene. ....	8
<b>Obrázek 5:</b> Fylogeneze kmenu <i>Triticeae</i> . .....	12
<b>Obrázek 6:</b> Organizace rDNA jednotek v oblasti NOR. ....	16
<b>Obrázek 7:</b> Kondenzované rDNA jednotky na hranici jadérka v interfázních buňkách. ....	17
<b>Obrázek 8:</b> Fylogeneze rodu <i>Hordeum</i> založená na 353 ITS sekvencích z 91 zástupců. ....	21
<b>Obrázek 9:</b> Možné cesty umožňující horizontální přenos genů u rostlin. ....	22
<b>Obrázek 10:</b> Strategie 3D poolování. ....	28
<b>Obrázek 11:</b> Schéma uspořádání sloupcových, resp. řádkových DNA poolů genomické DNA <i>Hordeum stenostachys</i> na mikrotitrační destičce. ....	28
<b>Obrázek 12:</b> Příklad elektroforetického profilu s pozitivním signálem pro primerový pár ITS-Poa-f/ITS-Pan-bac (univerzální primer) na miskovém poolu č. 55. ....	32
<b>Obrázek 13:</b> Příklad elektroforetického profilu s negativním signálem pro primerový pár ITS-Poa-f/ITS-Pan-bac (univerzální primer) na miskovém poolu č. 13. ....	32
<b>Obrázek 14:</b> Příklad elektroforetického profilu s negativním signálem pro primerový pár Set_31F/Set_202R ( <i>Setarium</i> ) na miskovém poolu č 55. ....	33
<b>Obrázek 15:</b> Elektroforetický profil BAC klonu 55F16. ....	33
<b>Obrázek 16:</b> Elektroforetický profil BAC klonu 92M24. ....	34

# 1 ÚVOD

Obiloviny tvoří nejvýznamnější složku lidské obživy. Jsou zdrojem důležitých živin, zejména sacharidů a proteinů. Ječmen je jedna z nejdříve domestikovaných obilovin na světě. Genom této plodiny je dlouhodobě intenzivně studován pro zefektivnění výnosu a získání nových odolných odrůd.

Zajímavou součástí genomu jsou ribozomální geny (rDNA), které jsou tvořeny ribozomálními RNA (rRNA) repeticemi. rRNA spolu se specifickými proteiny tvoří ribozomy. Ty jsou klíčové pro proteosyntézu, při níž vznikají procesem translace proteiny. Jejich vysoká míra konzervovanosti a přítomnost ve všech genomech eukaryot umožňuje využívat rDNA jako molekulární markery. Tato práce se zabývá analýzou vnitřních transkribovaných mezerníků (ITS) u ječmene (*Hordeum*). Jedním z nejpoužívanějších je oblast tzv. mezerníků ITS1-5,8S-ITS2. Díky vysoké variabilitě v této sekvenci DNA se používá k rozlišení blízkce příbuzných druhů. V genomu 16 diploidních druhů ječmene byla objevena cizorodá rDNA. Následující studium ukázalo, že tato rDNA náleží do pěti rodů podčeledi *Panicoideae*, která se oddělila od podčeledi *Pooideae* před asi 60 miliony let. Tyto skupiny rostlin jsou v současnosti pohlavně inkompatibilní. Fylogenetické, cytogenetické a genomické analýzy naznačují, že ječmen cizorodou rDNA získal teprve před 1–5 miliony let (Mahelka *et al.*, 2017). Jako jedna z možných cest přenosu této panicoidní DNA do genomu ječmene se jeví horizontální přenos genetické informace (HGT). U vyšších rostlin je však tento způsob přenosu dědičné informace velmi málo dokumentován.

Předkládaná bakalářská práce se zabývá bližší analýzou cizorodé rDNA u ječmene a polemizuje nad možnými cestami, které by umožnily přenos těchto genů mezi pohlavně inkompatibilními druhy.

## 2 CÍLE PRÁCE

Předložená bakalářská práce se skládá z teoretické a praktické části. Cílem teoretické části je vypracování literární rešerše zaměřené na ribozomální geny, jejich strukturu, distribuci u rostlin a popis rostlinného materiálu planých ječmenů a ostatních trav s ohledem na jejich fylogenetickou příbuznost. Cílem praktické části je identifikace klonů obsahujících cizorodé rDNA elementy v BAC knihovně připravené z genomu planého druhu ječmene *Hordeum stenostachys*.

### 3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

#### 3.1 Ječmen setý (*Hordeum vulgare* L.)

Jedna z nejdříve domestikovaných obilnin je ječmen setý (*Hordeum vulgare* L.). Pro účely obživy byla tato významná plodina pěstována již před 16 000 lety v oblasti Egypta. Výskyt původních druhů ječmene zahrnuje oblasti ve středovýchodní Asii, Přední Asii a v Etiopii. Za planou formu dnešních odrůd ječmene se považují dvouřadé ječmeny odvozené z druhu *Hordeum spontaneum* L. (Chloupek, 2000).

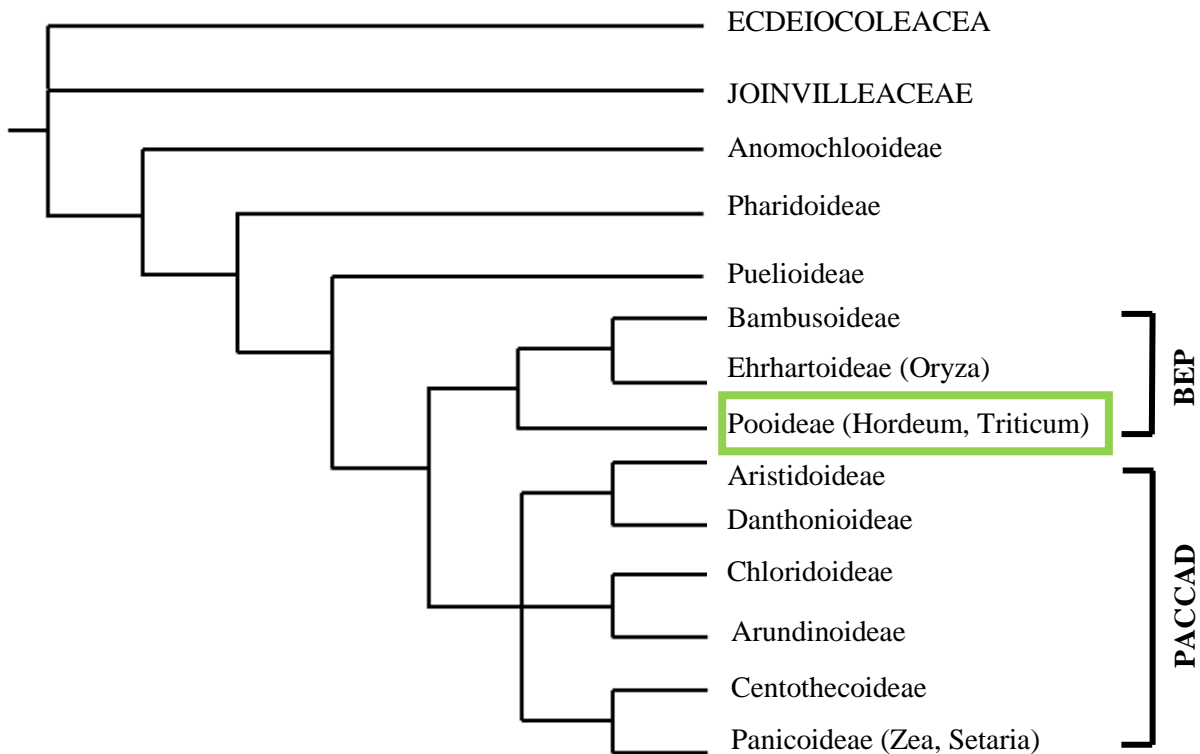
Ječmen patří k nejdůležitějším plodinám na světě. Jeho celková produkce za rok 2016 činí téměř 146 milionů tun vypěstovaných na zhruba 47 milionech hektarů půdy (OECD, 2018, <https://data.oecd.org/agriculture.htm>). Brzká doba zrání a vysoká míra adaptability vůči stresovým podmínkám usnadňuje pěstování v širokém pásmu, které zahrnuje boreální i rovníkové oblasti. Přibližně tři čtvrtiny celosvětové produkce ječmene je využíváno do krmných směsí pro hospodářská zvířata, zbývající třetina se využívá pro výrobu sladu a v alkoholovém průmyslu (především výroba whisky). Přestože ječmen již není primárním zdrojem obživy pro lidstvo, v některých částech světa jde stále o důležitý zdroj kalorií. V Etiopii ječmen stále tvoří přibližně 60 % celkového příjmu potravy (Schulte *et al.*, 2009).

##### 3.1.1 Taxonomická klasifikace

Ječmeny řadíme do rodu *Hordeum*, který patří do kmene *Triticeae* v čeledi *Poaceae* (Lipnicovitě). Kmen *Triticeae* tvoří několik ekonomicky velmi významných druhů obilnin jako je pšenice (*Triticum* L.) a žito (*Secale* L.). Patří sem také zhruba 350 divokých druhů ječmene (Bothmer *et al.*, 1992). Rod *Hordeum* se skládá z 32 druhů a 45 taxonů (Houben *et al.*, 2009).

Dvě velké skupiny tvoří základ čeledi *Poaceae*. První skupina se skládá ze sedmi podčeledí: *Panicoideae*, *Arundinoideae*, *Chloridoideae*, *Centothecoideae*, *Aristidoideae*, a *Danthonioideae* (Zhao *et al.*, 2013). Někdy je do této skupiny zahrnuta také podčeleď *Micrairoideae* (Sánchez-Ken *et al.*, 2010). Původnější linii představuje podčeleď *Bambusoideae*, podčeleď *Ehrhartoideae*, někdy také *Oryzoideae*, a podčeleď *Pooideae*, které spolu tvoří druhou skupinu (Duvall *et al.*, 2007). Obě tyto skupiny znázorňuje Obrázek 1. Nejdříve diverzifikovanými liniemi v *Poaceae* jsou podčeledi *Anomochlooideae*, *Pharoidaeae* a *Puelioideae* (Grass phylogeny working group *et al.*, 2001). Nedávné studie poukazují na to,

že sesterskou skupinou *Poaceae* může být čeleď *Ecdeiocoleaceae* nebo čeleď *Joinvilleaceae* nebo i obě dvě (Duvall *et al.*, 2007).



**Obrázek 1:** Fylogeneze čeledi *Poaceae* (inspirováno podle Preston *et* Kellong, 2006). Čeledi *Ecdeiocoleaceae* a/nebo *Joinvilleaceae* jsou sesterské k monofyletické čeledi *Poaceae*. Nejstaršími a také nejdříve diverzifikovanými jsou podčeledi *Anomochlooideae*, *Pharioideae* a *Puelioideae*. Podčeleď *Pooideae*, kam náleží mimo rod *Hordeum* také významný rod *Triticum* (pšenice), patří společně s podčeledí *Bambusoideae* a *Ehrhartoideae* do první skupiny. Podčeleď *Ehrhartoideae* je někdy nazývána *Oryzoideae* podle rodu *Oryza* (rýže). Celkem šest podčeledí náleží do druhé skupiny, kam do podčeledi *Panicoideae* patří další významný rod *Zea* (kukuřice). BEP ... *Bambusoideae*, *Ehrhartoideae*, *Pooideae*; PACCAD ... *Panicoideae*, *Arundinoideae*, *Chloridoideae*, *Centothecoideae*, *Aristidoideae*, *Danthonioideae*.

Podčeleď *Bambusoideae* představuje bazální větev BEP (*Bambusoideae*, *Ehrhartoideae*, *Pooideae*) skupiny. Obývá areály tropického pásma, kam v lesních vlhkých biotopech diverzifikovala v několik stovek druhů. Jako jediná podčeleď u *Poaceae* má dřevnatý charakter stébla. Namísto typických obilek jsou plodem dužnaté peckovice. Do podčeledi *Ehrhartoideae* náleží velké množství vlhkomilných až bažinných jednoletých tropických druhů. Patří sem i naše vzácná vodní tráva tajnička rýžovitá (*Leersia oryzoides*). Nejvíce diverzifikovanou

podčeledí je *Pooideae*, kam řadíme všechny agronomicky významné druhy trav i jejich divoce rostoucí příbuzné, včetně rodu *Hordeum*. Tato podčeleď nese všechny typické morfologické znaky pro *Poaceae*. Diverzifikovala do mnoha set druhů zejména v oblastech mírného pásu na severní polokouli. Z ekologického hlediska tyto druhy obsadily především areály bezlesých ploch a sušších stanovišť (Hrouda, 2010).

### 3.1.2 Pěstované typy ječmene a vybrané sladovnické odrůdy

Rod *Hordeum* je značně diverzifikován. Nalezneme zde druhy vytrvalé, roční, samosprašné i cizosprašné (Houben *et* Pickering, 2009). Divoký ječmen *Hordeum spontaneum* a jeho domestikovaná forma *Hordeum vulgare* jsou si morfologicky velmi podobné. Pěstovaná forma ječmene má na rozdíl od formy domestikované listy širší, kratší stonek, osiny, kratší a tlustší klas a větší zrna (Badr *et al.*, 2000).

Pro agronomické účely se využívá dvouřadý a šestiřadý ječmen (viz Obrázek 2) ve dvou formách: jarní a ozimé. Ječmen je silně samosprašná rostlina (Chloupek, 2000). Klásky jsou uspořádány po trojicích rostoucích střídavě podél hlavního stébla. U divokého ječmene a ostatních druhů „starého světa“ je pouze centrální klásek fertillní, zatímco zbylé dva jsou redukovány. Tento znak je zachován i u některých odrůd dvouřadého ječmene. Jediná dvojice mutací způsobuje fertilitu bočních klásků, což je znak charakterizující šestiřadé ječmeny (Zohary *et* Hopf, 2000). Mutace genu *vrs1* (*six-rowed spike 1*) je zodpovědná za přechod dvouřadých ječmenů na šestiřadé, které mají obecně vyšší výnos (Komatsuda *et al.*, 2007). Šestiřadá forma ječmene je výsledkem ztráty funkce tohoto genu a konverze počátečních bočních klásků na plně funkční (Ma *et al.*, 2009). Nedávné studie poukazují na to, že genotypy šestiřadých a dvouřadých ječmenů mají odlišný a nezávislý původ. Nicméně tato nová zjištění jsou v souladu s dřívějšími oblastmi domestikace v Jordánském údolí. Nová data však otevřela diskuzi na téma difyletického charakteru domestikace ječmene (Kilian *et al.*, 2009).

Na šlechtění ječmene se významně podílela i Česká republika, která je proslulá svou produkcí kvalitního sladovnického ječmene. Úrodné oblasti kolem řeky Labe a oblast Hané poskytly příhodné podmínky pro vyšlechtění celosvětově známých odrůd Proskowitz Hana Pedigree, Diamant a ječmenů Kneiflův (Opavský) a Valtický (Psota *et al.*, 2009). Šestiřádková sladovnická odrůda Morex, vyšlechtěná v Americe, se stala významným modelem molekulární biologie ječmene.

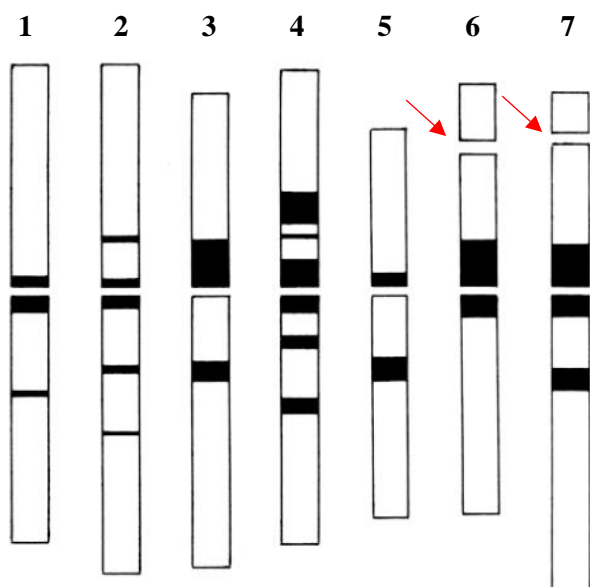


**Obrázek 2:** Morfologie klásku dvouřadého (2 r) a šestiřadého ječmene (6 r; převzato z Komatsuda *et al.*, 2007).

### 3.1.3 Genom ječmene

Ječmen je charakteristický obsáhlým a velmi komplexním genomem o celkové velikosti přibližně 5,1 Gbp (Doležel *et al.*, 1998). Velké genomy jsou typické pro druhy kmene *Triticeae*, které mají velké genomy tvořené ze 75–80 % repetitivními sekvencemi (Schulte *et al.*, 2009; Wicker *et al.*, 2009). Cytotypy v tomto rodu existují na třech úrovních ploidie. *H. vulgare* a jeho divoký předchůdce *H. spontaneum* jsou diploidní druhy ( $2n=2x=14$ ), ostatní druhy rodu *Hordeum* však mohou být i tetraploidní ( $2n=4x=28$ ) nebo hexaploidní ( $2n=6x=42$ ; Komatsuda *et al.*, 1999). Základní chromozomové číslo je 7. Na základě analýzy hybridů a C-bandingů u rodu *Hordeum* byly rozlišeny čtyři genové komplexy označované H (*H. bulbosum*, *H. vulgare*), Xa (*H. marinum*), Xu (*H. murinum*) a I, kam náleží všechny zbývající druhy daného rodu.

Chromozómy genomu H byly charakterizovány pomocí sond FISH (fluorescenční *in situ* hybridizace) z trinukleotidových krátkých tandemových repetitiv, což poskytlo podrobné informace o sekvenci chromatinu ječmene. Na základě těchto informací bylo možné vytvořit fyzické mapy všech chromozómů ječmene (Dou *et al.*, 2016). Velikost chromozómů napříč rodem je velmi podobná. Sedm párů chromozómů tvořících genom ječmene je převážně metacentrických s poměrem ramen 1–1,5 (viz Obrázek 3). Jsou přítomny dva satelitní chromozómy nesoucí oblast organizátoru jádérka (NOR; Houben *et al.*, 2009), o které blíže pojednává kapitola 3.3.



**Obrázek 3:** Idiogram chromozómů ječmene setého s vyznačením místa sekundární konstriktce (převzato a upraveno podle <https://wheat.pw.usda.gov/GG3/>). Chromozómy 6 a 7 jsou satelitní chromozómy, které nesou oblast NOR.

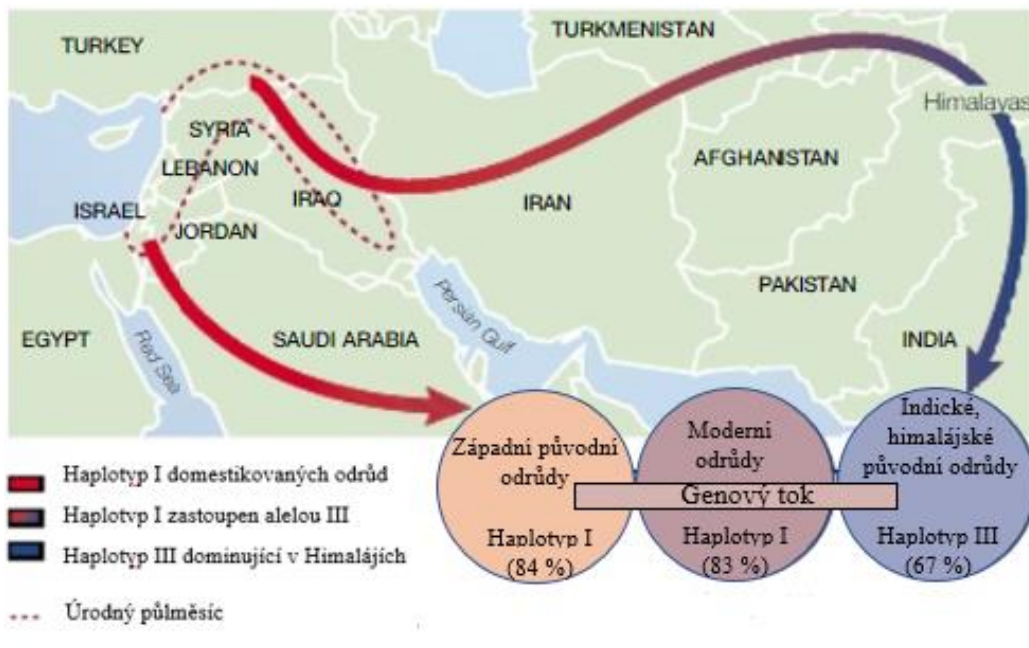
### 3.1.4 Diverzita rodu *Hordeum*

Počátky domestikace ječmene začaly před více než 10 000 lety v oblasti „úrodného půlměsíce“. Toto území zahrnuje dnešní státy Izrael, Jordánsko, Libanon, západní Sýrii, jihovýchodní Turecko a části Iráku a Íránu (viz Obrázek 4). Divoký ječmen (*H. spontaneum*) se z této oblasti postupně šířil do světa dvěma směry: na západ do jižní Evropy a na východ do Střední Asie (Kilian *et al.*, 2009). Tento geografický charakter šíření divokého ječmene podporuje názor, že jeho domestikace měla více center. Nicméně je třeba vyloučit domestikační centrum v Himalájích, jelikož bylo zjištěno, že místní himalájská forma divokého ječmene (*H. agriocrithon*) je hybrid mezi divokou a domestikovanou formou ječmene (Salamini *et al.*, 2002).

Badr *et al.* (2000) ve své studii uvádí monofyletickou povahu domestikace ječmene na základě frekvence polymorfismu u 400 alel, které byly studovány u 317 divokých a 57 domestikovaných linií ječmene. Genofond divoké populace z Izraele a Jordánska si byl nejvíce podobný. Výsledky této studie podporují hypotézu, že region Izraele a Jordánska byl ten, ze kterého byl ječmen rozšířen do světa. Diagnostická alela I pocházející z homeoboxního genu *BKn-3* (*barley knotted-like 3*) byla nalezena v izraelském planém ječmeni *H. spontaneum*. Dále byla všudypřítomná v západních zemích a v moderních pěstovaných odrůdách. V Indii a Himalájích převažuje alela III genu *BKn-3*, což poukazuje na záměnu alel, která se odehrála



v průběhu migrace ječmene z oblasti úrodného půlměsíce do Jižní Asie. Himaláje mohou být považovány za oblast domestikace ječmene a také jeho diverzifikace. Studie založené na molekulárních markerech porovnávající divokou a domestikovanou formu ječmene poukazují na velkou ztrátu nukleotidové diverzity u dnešních domestikovaných odrůd (Kilian *et al.*, 2009).



**Obrázek 4:** Mapa Blízkého Východu zobrazující oblast úrodného půlměsíce a charakter šíření ječmene. Odtud došlo k postupnému rozšíření do oblasti Střední Asie až po Himaláje, kde došlo k jeho diverzifikaci (převzato a upraveno podle Salamini *et al.*, 2002). Tok genů do oblasti Himalájí byl sledován pomocí haplotypů genu *Bkn-3* z populací divokého ječmene *H. spontaneum* do zárodečných linií pěstovaných forem domestikovaného ječmene. Haplotype I je přítomen u všech forem domestikovaného ječmene (84 % odrůd; spodní šipka). Haplotype III převládá u himalájských a asijských forem ječmene (67 % odrůd; horní šipka). Hranice areálu primárního centra domestikace ječmene (oblast úrodného půlměsíce) představuje přerušovaná červená čára.

Rod *Hordeum* je z geografického hlediska rozšířen do oblastí Jižní Ameriky, Jižní Afriky a rovnoměrně po celé severní polokouli (Dou *et al.*, 2016). Na základě konceptu podle Harlana a de Weta je rozdělen do tří genofondů (Harlan *et de Wet*, 1971). První je zastoupen genomem *H. vulgare* a jeho blízkého příbuzného *H. spontaneum*, se kterým se volně kříží. Je tedy užitečným zdrojem pro šlechtitelství. Do další genomové skupiny náleží jediný druh, *H. bulbosum* ( $2n=4x=28$ ), který má velký potenciál v genomovém inženýrství jako donor genů pro rezistenci vůči různým chorobám ječmene. Toho se využívá v pěstitelských programech

především v Německu a na Novém Zélandu. Podobně je předmětem výzkumu v této oblasti také *H. capense* ( $2n=4x=28$ ; Knüpfper, 2009). Třetí skupina zahrnuje zbylých 29 druhů ječmene, které se vyskytují v Severní a Jižní Americe, Evropě, Blízkém Východu, Centrální Asii a Jižní Africe. V řadě experimentů se křížili někteří zástupci tohoto genofondu s *H. vulgare*, pokusy však byly vždy znemožněny silnými reprodukčními bariérami a nízkou mírou párování chromozómů u hybridů (Pickering *et* Johnston, 2005). *H. bogdanii* je asijský diploidní druh ( $2n=2x=14$ ), který se vyskytuje v pásmu od západního Íránu po východní Čínu (Dou *et al.*, 2016).

## 3.2 Fylogenetický vývoj čeledi *Poaceae*

### 3.2.1 Fylogeneze

Fylogeneze se zabývá vznikem a vývojem jednotlivých vývojových linií a snaží se rekonstruovat zejména průběh kladogeneze, tzn. pořadí a způsob větvení všech vývojových linií v průběhu evoluce. Jedná se o proces postupného odlišování jednotlivých vývojových linií a kumulaci jejich fenotypových (anagenetických) změn. V průběhu fylogeneze z původně jedné vývojové linie (označované jako monofylum) vznikají procesem štěpné speciace nové vývojové linie postupným odlišováním. Ve vývojové linii neustále vznikají a zanikají jednotlivé druhy, fenotypové vlastnosti nových druhů se mohou lišit od fenotypových vlastností druhů starých. Proces vzájemného odlišování (v některých případech i splývání) vývojových linií se označuje jako kladogeneze. Grafickým znázorněním průběhu kladogeneze je dendrogram. Schémata kladogeneze vyjadřující příbuznost druhů se odvozují na základě sdílení znaků, které vznikaly evolučně nezávisle na sobě. Tyto znaky se označují jako homoplazie. Ve fylogenetice se uplatňuje princip maximální parsimonie, postavený na tom, že pravděpodobnější je takový průběh kladogeneze, který vyžaduje rozložení jednotlivých forem znaků v rámci dendrogramu nejmenší počet anagenetických změn. Do dendrogramu se obvykle zahrnuje i druh, o němž s jistotou víme, že se odlišil od společného předka dříve, než se odlišily ostatní analyzované druhy, tzv. *outgroup* (Flegr, 2009).

### 3.2.2 Diverzita čeledi *Poaceae*

Čeď *Poaceae* je jedna z největších a nejrozšířenějších skupin kvetoucích rostlin. Obsahuje přibližně 768 rodů s více než 11 000 druhy. Navzdory významnému ekonomickému potenciálu jsou fylogenetické a evoluční vztahy v této čeledi pochopeny stále jen částečně. Na základě molekulárních analýz se *Poaceae* řadí do podtřídy *Commelinidae*, do jednoděložných (*Liliopsida*), krytosemenných (*Magnoliophyta*) rostlin. Jedním ze základních znaků *Commelinidae* je bohatý škrobnatý endosperm v semenech, což je významným rysem zejména u užitkových trav, ale i banánovníků (*Musaceae*) náležících rovněž do této skupiny.

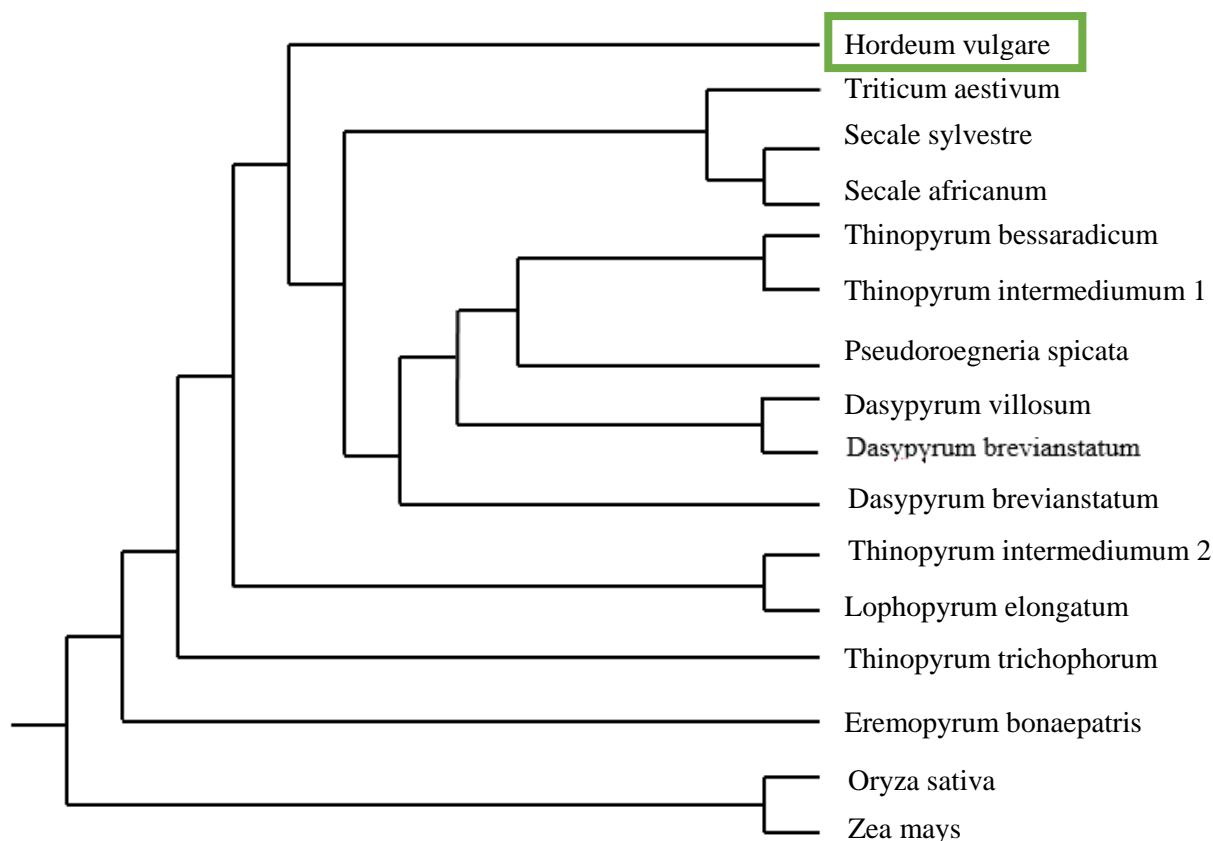
Převážná většina trav patří do podčeledi *Pooideae*, kam patří téměř 4 000 druhů v 202 rodech (Soreng *et al.*, 2017). Druhy mají všechny typicky morfologické znaky trav a jako jediná tato podčeď diverzifikovala do mnoha set druhů v mírném pásmu severní polokoule. Do této podčeledi řadíme všechny evropské obilniny a jejich příbuzné druhy. Podčeledi *Chloridoideae* a *Panicoideae* jsou dominanty savan, prérií a pamp. Z podčeledi *Panicoideae* pochází několik

agronomicky významných plodin: kukuřice setá (*Zea mays*), čirok (*Sorghum* L.) nebo cukrová třtina (*Saccharum officinarum*). Zástupci této skupiny se u nás vyskytují spíše jako ruderální teplomilné druhy jako je bér (*Setaria*). Podčeleď *Arundinoideae* se vyskytuje na jižní polokouli a do Evropy zasahují jen kosmopolitní rody velkých trav jako je rákos (*Phragmites*) (Hrouda, 2010).

### 3.2.3 Kmen *Triticeae*

Kmen *Triticeae* se vyvinul před asi 12 miliony let v rámci podčeledi *Pooideae* (Schulte *et al.*, 2009). Zahrnuje širokou škálu druhů (viz Obrázek 5), přičemž dominantní postavení mají agronomicky významné plodiny mírného pásma jako je ječmen setý (*Hordeum vulgare* L.,  $2n=2x=14$ ; HH), hexaploidní chlebová pšenice (*Triticum aestivum* L.,  $2n=6x=42$ ; AABBDD), tetraploidní pšenice odrůdy durum (*Triticum turgidum*,  $2x=4x=28$ ; AABB) a žito seté (*Secale cereale* L.,  $2n=2x=14$ ; RR). Genomy těchto významných obilnin jsou velmi rozsáhlé a vykazují vysokou míru komplexnosti. Ta je pozorována především u tetraploidní a hexaploidní pšenice, jejíž genomy se skládají z dvou nebo tří homoelogních genomů. Polyploidie a přítomnost repetitivní DNA výrazně komplikuje klonování genů a sekvencování genomů u *Triticeae* (Doležel *et al.*, 2009). S velikostí genomu  $\sim 16,94$  Gbp (Bennett *et Smith*, 1976) je hexaploidní pšenice zhruba 35x větší než genom rýže ( $\sim 489$  Mbp; Bennett *et Smith*, 1991). Pro srovnání genom ječmene je pouze 10x větší.

Největší část jaderné DNA se skládá z mobilních genetických elementů, které jsou rozptýleny napříč celým genomem. Geny kódující proteiny představují pouze zlomek genomu (2–3 %; Bartoš *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2004; Paux *et al.*, 2006). Sedm chromozómů je základním násobkem genomů u *Triticeae* (Sreenivasulu *et al.*, 2008). Ty jsou charakteristické tzv. genovými ostrůvky rozptýlenými mezi velkým množstvím repetitivní DNA.



**Obrázek 5:** Fylogeneze kmene *Triticeae* (inspirováno podle Liu *et al.*, 2006).

### 3.2.4 Podčeleď *Panicoideae*

*Panicoideae* je druhou největší podčeleď v *Poaceae* s více než 3 500 druhy, které se vyskytují převážně v teplých až tropických oblastech. Celkem 247 rodů ve 13 kmenech je v současné době řazeno do této podčeledi. Jádrem *Panicoideae* tvoří tři největší kmene *Paniceae*, *Paspaleae*, *Andropogoneae* spolu s malým kmenem *Arundinelleae* (Soreng *et al.*, 2017). Kmen *Paniceae* je charakteristický svou rozmanitostí, která je reprezentována především dvěma liniemi, které se liší v základním chromozómovém čísle ( $x=9$  a  $x=10$ ). Z tohoto hlediska se stal kmen *Paniceae* předmětem molekulárních studií, které potvrdily jeho parafyletický základ (Morrone *et al.*, 2012). Do tohoto kmene patří rod *Panicum* (proso). Patrně nejvýznamnějším zástupcem celé podčeledi je kukuřice setá, která je nejen hospodářsky významnou plodinou, ale také velmi důležitým molekulárním modelem. Kukuřice ( $2n=2x=20$ ) má velikost genomu 2,66 Gbp (Lysák *et Doležel*, 2012). Genom kukuřice prošel několika stupni duplikace (první před 70 miliony let, další před 5–12 miliony let), přičemž druhá duplikační událost odlišila kukuřici od jejího blízkého příbuzného čiroku. Genom kukuřice reprezentuje deset strukturně různorodých chromozómů, které podstoupily značné dynamické změny týkající se převážně

chromozomální kompozice. Velikost genomu kukuřice se významně rozšířila během posledních 3 milionů let převážně prostřednictvím proliferace retrotranspozónů s dlouhými terminálními koncemi (LTR). Téměř 85 % genomu je tvořeno množstvím transpozibilních elementů (TE), které jsou nerovnoměrně rozšířeny přes celý genom (Schnable *et al.*, 2009). Jedná se o mobilní segmenty DNA, které objevila Barbara McClintock. Její studie poukázaly na to, že pohyb TE může způsobovat chromozomální zlomy a dramaticky tak ovlivnit fenotypové vlastnosti. Tím také vyvrátila myšlenku tzv. statického genomu (Feschotte *et Pritham*, 2009). TE hrají důležitou roli v evoluci genů. Jejich inserce může narušit geny a zprostředkovat tak přeskupení chromozómů. Také mohou poskytnout alternativní promotory, exony, terminátory nebo určitý druh spoje. Několik genů rýže obsahuje sekvence odvozené od TE. U kukuřice se jedná o tzv. kontrolní prvky, které mění expresi některých genů v důsledku transkripce nekódující RNA z promotorů transpozónů, které přispívají k epigenetické regulaci sousedních genů (Vicient, 2010). Retrotranspozóny LTR představují většinu TE, které jsou identifikovány v genomech rostlin. Dělí se na dvě velké skupiny: copia (*Pseudoviridae*) a gypsy (*Metaviridae*). Retrotranspozóny copia jsou nejlépe prostudované u rostlin, jelikož vykazují vysokou míru konzervace v evoluci rostlin (Santos *et al.*, 2015)

Podčeleď *Panicoideae* se oddělila od podčeledi *Pooideae* před asi 60 miliony let. Druhy jednotlivých podčeledí jsou pohlavně inkompatibilní. S využitím ITS sekvencí byla u souboru 16 diploidních druhů ječmene (*Hordeum*) objevena cizí rDNA. Bylo zjištěno, že tato rDNA náleží do pěti rodů *Panicoideae*: *Arundinella*, *Euclasta*, *Paspalum*, *Panicum* a *Setaria*. Fylogenetické, cytogenetické a genomické analýzy poukazují na to, že tato cizí rDNA byla získána teprve před 1–5 miliony let sérií minimálně devíti přenosů. Dnešní druhy *Hordeum* mají ve svých genomech až pět panicoidních rDNA jednotek mimo původní *Hordeum* rDNA kopie. Dosud nebyly nalezeny důkazy, že by tato cizí rDNA byla transkribována, některé naopak naznačují, že se vyskytuje ve formě tzv. pseudogenů. Jediná kopie panicoidní rDNA přítomná v *H. bogdanii* byla přerušena původním transpozónem a obklopena ~70 kbp převážně nekódujících sekvencí panicoidního původu. Nejpravděpodobnější vysvětlení přítomnosti panicoidní rDNA u těchto druhů *Triticeae* představuje přenos těchto genů prostřednictvím HGT. O tomto možném přenosu jaderné DNA blíže pojednává podkapitola 3.3.3. Alternativním vysvětlením by mohla být úspěšná hybridizace mezi trávami podčeledi *Pooideae* a *Panicoideae*. V tomto jim však brání přirozené reprodukční biologické bariéry (Mahelka *et al.*, 2017).

### 3.2.5 Molekulární fylogenetika

Jedná se o samostatný vědní obor, který využívá molekulární data pro účely fylogenetické a systematické biologie. Nejčastěji se dnes používají k těmto účelům DNA markery, které jsou vysoce variabilní a poskytují informace o primární struktuře DNA, a přitom jsou nezávislé na podmínkách prostředí, protože nepodléhají selekčním tlakům. Pro použití DNA markerů v molekulární fylogenetice platí několik podmínek. Nejdůležitějšími z nich jsou četnost a rovnoměrné zastoupení v genomu, dále vysoká míra zastoupení polymorfních lokusů a v neposlední řadě také experimentální nenáročnost a dobrá reprodukovatelnost výsledků (Flegr, 2009).

Molekulární znaky mají na rozdíl od klasických znaků kvalitativní charakter. V praxi jsou zjišťovány pomocí přímých metod postavených na sekvencování nukleových kyselin, nebo metod nepřímých, kdy se vyhodnocuje přítomnost restrikčních míst. Sekvenační analýza umožňuje získání celé informace zapsané v DNA na základě přesného pořadí nukleotidů v určitém úseku DNA. Využívá při tom tzv. SNP markerů (jednonukleotidový polymorfismus). Jedná se o změny v jednotlivých párech bází, které jsou mnohem častější, než polymorfismy v jiných molekulárních markerech. Mohou se vyskytovat jak v kódujících, tak v nekódujících oblastech genomu. Předpokládá se, že tyto markery budou dominovat v genetických studiích pšenice a ječmene v budoucnosti (Lehmensiek *et al.*, 2009). Ve fylogenezi rostlin se nejčastěji používají DNA sekvence pro chloroplastové a mitochondriální geny a vnitřní transkribované mezerníky (ITS), které oddělují ribozomální geny u 45S rDNA lokusu.

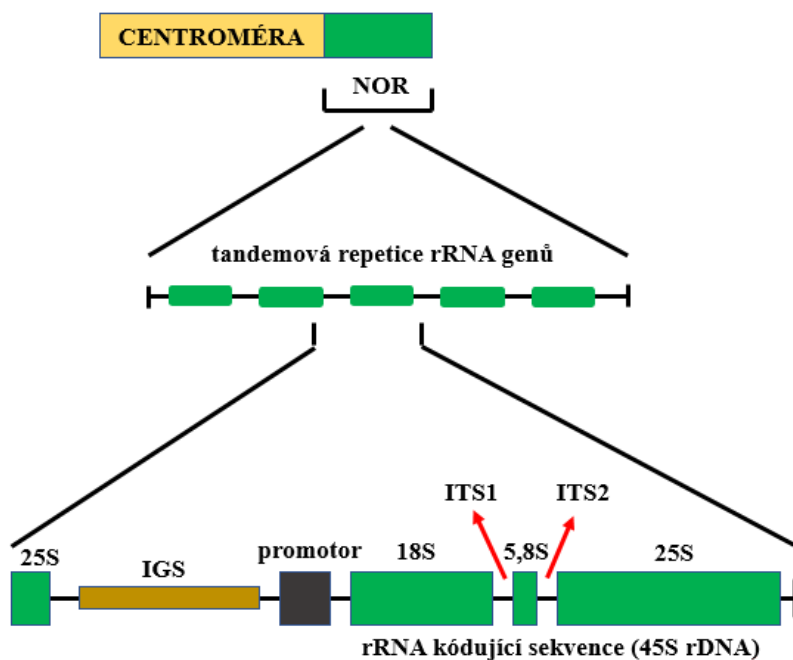
### 3.3 Ribozomální geny

#### 3.3.1 Struktura a funkce rDNA u rostlin

Geny kódující ribozomální RNA (rDNA) jsou velmi podstatnou složkou genomu eukaryotních organismů, díky nimž vznikají proteiny. Ty se z velké části podílejí na utváření cytoplazmatických, plastidových a mitochondriálních ribozomů. Jaderný genom rostlin obsahuje stovky až několik tisíc kopií každého druhu ribozomální RNA (rRNA), zatímco v plastidech a mitochondriích jsou rDNA přítomny v řádu jednotek až desítek. Obvykle jsou tyto geny uspořádány ve zřetelných tandemových uskupeních skládajících se z opakujících se jednotek rRNA nebo jednotlivých genů (5S).

Jaderná ribozomální jednotka 45S rDNA obsahuje u rostlin geny pro 18S, 5,8S a 25S rRNA, které jsou mezi sebou odděleny ITS mezerníky (viz Obrázek 6). Jednotlivé jednotky rRNA jsou značeny na základě Svedbergova koeficientu. Ten udává čas, za který dojde k sedimentaci dané makromolekuly při její ultrafiltraci při daném zrychlení centrifugy. Mezi jednotkami 18S a 5,8S rRNA se nachází ITS1, ITS2 se nachází mezi 5,8S a 25S rRNA. Dlouhé netranskribované mezerníky (IGS) oddělují vzájemně celé 45S rDNA jednotky (Bena *et al.*, 1998). Znalost počtu rDNA lokusů a kopií jednotlivých genů přináší informace v porovnávacích studiích organismů a molekulární evoluci na různých fylogenetických úrovních (Rosato *et al.*, 2016).



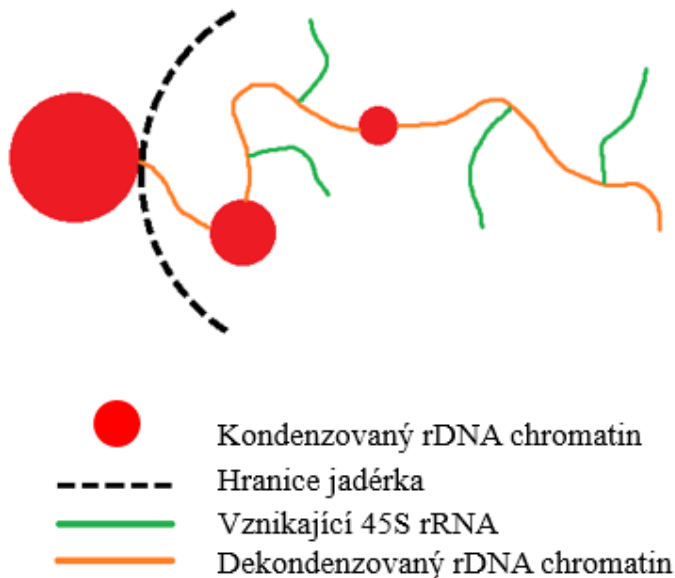


**Obrázek 6:** Organizace rDNA jednotek v oblasti NOR (inspirováno podle Neves *et al.*, 2005). Tato oblast je složená z tandemově uspořádaných repetice rRNA genů. Tyto repetice jsou tvořeny opakujícími se transkripty 45S rDNA, které jsou složeny z jednotek 18S, 5,8S a 25S rRNA, navzájem oddělených mezerníky ITS1 a ITS2. 45S rDNA jednotky jsou navzájem od sebe odděleny mezerníky IGS.

Ribozomální RNA spolu s několika třídami proteinových komplexů tvoří ribozomy, ve kterých dochází k syntéze proteinů díky translačnímu procesu v cytoplasmě. Transkript 45S je kódován rDNA tandemově se opakujícími jednotkami, které se nacházejí se na specifických místech chromozómů, tzv. NOR. Transkripce této rDNA vede ke vzniku jádérka. 5S rRNA je výsledkem transkripce různých souborů genů nacházejících se na různých (minoritních) místech chromozómů. Počet a výskyt NOR oblastí je ve skupinách a rodech evolučně nestálý (Neves *et al.*, 2005). U kmene *Triticeae* byly zjištěny větší a menší rDNA oblasti, jejichž chromozomální lokalita se mění napříč druhy (Dubcovsky *et Dvořák*, 1995).

Aktivita v oblasti NOR může být vizualizována v průběhu interfáze v následující metafázi jako oblast sekundární konstriktce. Začlenění NOR do heterochromatinových oblastí umožňuje opakující se charakter jednotek rDNA. U většiny eukaryotních organismů je přepisována pouze malá frakce těchto jednotek. Nedávné studie u hrachu (*Pisum sativum*) zjistily, že se přepisuje pouze 5 % jednotek (González-Melendi *et al.*, 2001), což poukazuje na to, že převážná část rDNA zůstává transkripčně neaktivní. DNA, která se organizuje v heterochromatinu, běžně podléhá metylaci v cytosinových zbytcích, což koreluje

s transkripční inaktivací. Ta vyžaduje vysokou míru kondenzace rDNA frakcí chromatinu, kterou můžeme sledovat jako chromatinové bloky na hranici jadérka (viz Obrázek 7). Tyto rDNA uzly jsou transkripčně neaktivní. Kondenzovaný rDNA chromatin se také může objevit uvnitř jadérka, tato vlastnost se zdá být druhově specifická. Nepřepisované rDNA jednotky se vždy vyskytují poblíž centromery v místě nejbližší NOR domény (Neves *et al.*, 2005).



**Obrázek 7:** Kondenzované rDNA jednotky na hranici jadérka v interfázních buňkách (inspirováno podle Neves *et al.*, 2005). Přítomnost uzlů z kondenzované rDNA uvnitř jadérka je druhově specifická vlastnost.

Dlouhou dobu byla jaderná rDNA pokládána pouze za strukturu účastnící se biogeneze ribozomů a jadérka. Nedávné důkazy však významně změnily pohled na tuto problematiku. Byly objeveny další buněčné procesy, ve kterých hraje rDNA důležitou roli. Je centrálním činitelem udržování a organizace genomu, moduluje buněčnou homeostázu za účelem uchování genomové stability, aktivuje buněčné stárnutí a senescenci, reguluje odolnost vůči poškození genomu, udržuje strukturu chromatinu na úrovni genomu a moduluje variace v genové expresi napříč genomem. Strukturně je zároveň jednou z nejméně stabilních oblastí v genomu. Důvody pro nestabilitu nejsou doposud komplexně pochopeny, nicméně bylo zjištěno, že rDNA lokusy jsou místa, která často podléhají opakujícím se rekombinacím (Kobayashi, 2005). Nerovnoměrná rekombinace mezi homologními a homeologními lokusy může vyvolat intragenomické kolísání v počtu kopií rDNA a amplifikaci nových sad. Také bylo zjištěno, že rDNA sady a jejich sousedící oblasti jsou jedním z častých cílů pro inserce genetických

mobilních elementů (Raskina *et al.*, 2008). Transpozice může podporovat evoluční dynamiku rDNA lokusů nejenom napříč druhy, ale také během intradruhové diferenciace a domestikace, což může způsobit jaderné přeskupování. To může být pokračováním procesu speciace, který souvisí s genetickou diferenciací (Rosato *et al.*, 2016).

Geny pro rRNA jsou typickým příkladem multigenové rodiny, která podléhá „evoluci v koncertu“. Jedná se o genetický proces, při kterém dochází k homogenizaci opakujících se sekvencí DNA tak, že sekvence dané rodiny multigenů v rámci druhu sdílí mnohem vyšší identitu, než sekvence homologní genové rodiny mezi dvěma různými druhy. Tento mechanismus poprvé navrhl Brown (1972), který studoval rRNA geny u žáby drápatky (*Xenopus*). Existence těchto genů ve více kopiích může souviset s poptávkou metabolismu rRNA v buňce, protože transkripce jediného genu nemusí být dostatečná k produkci požadovaného množství rRNA pro syntézu proteinů (Liao, 2001). Opakující se sekvence často vykazují homogenizaci, která je pravděpodobně způsobená procesem nerovnoměrného crossing-overu a genové konverze, což jsou předpokládané mechanismy odpovědné za evoluci v koncertu (Kovařík, 2005).

U ječmene se vyskytují dvě kodominantní NOR oblasti, které jsou lokalizovány na satelitních chromozómech 6 a 7. V některých liniích ječmene jsou tyto NOR oblasti lokalizovány na stejném chromozómu v důsledku translokace v místech zlomu daleko od rDNA lokusu. NOR oblast ležící na chromozómu 6 se v důsledku působení pozičního efektu, který má vliv na transkripci rDNA, tímto stává dominantním. U pšenice seté se NOR oblasti vyskytují na chromozómech 1B a 6B. Lokus 1B je zodpovědný za 60 % obsahu jadérka a téměř polovinu rRNA genů. Lokus 6B má více repetitivní DNA a je méně transkripčně aktivní (Neves *et al.*, 2005). Na chromozómech jsou rDNA lokusy organizovány tandemově do tzv. *arrays* a k nim přilehlých oblastí umístěných na jednom nebo několika chromozómech. Studium těchto lokusů je založeno na kombinaci sekvencování a metody FISH, což umožňuje stanovit chromozomální lokalitu různých jednotek rDNA (Sergeeva *et al.*, 2017). Pro genom pšenice se v současné době uplatňuje metoda sekvencování BAC-by-BAC, která byla použita pro krátké raménko chromozómu 7D. Tato metoda je velmi přesná a má vysoké rozlišení. Jedná se o spojení procesu mapování genomu a současného třídění chromozómového toku. V genomu se nachází řada tandemových repetitivních (~800 kbp), které jsou současnými metodami sekvencování nedostupné (Staňková *et al.*, 2016).

DNA sonda pTa71 byla použita pro charakterizaci genomu ječmene metodou FISH. Tato sonda je specifická pro 45S rDNA a hybridizuje s pěti chromozómovými páry. Dvě hlavní části

spojované s lokalizací NOR oblastí se nachází na chromozómu 5H a 6H. Minoritní oblasti jsou lokalizované na chromozómech 1H, 2H a 7H. Subtelomerické oblasti všech chromozómů ječmene lze spolehlivě identifikovat pro ječmen specifickou tandemovou repeticí HvT01 nebo pomocí AT bohatých tandemových repetic specifických pro kmen *Triticeae* pHvMWG2315. Ječmen má jedny z nejlépe prostudovaných centromérů u *Triticeae*, které jsou kolokalizované retroelementem cereba Ty3/gypsy-like a GC bohatými satelitními sekvencemi (Houben *et al.*, 2009). Cereba je centromerický retrotranspozón (CR) tvořený LTR, který byl popsán u centromérů *H. vulgare* (Presting *et al.*, 1998). CR náleží do větve *Chromoviridae*, linie Ty3/gypsy retrotranspozónů (Divashuk *et al.*, 2016). S těmito dvěma místy interaguje centromericky specifický histon H3, který obsahuje místo pro navázání kinetochorového komplexu na aktivní centroméry (Houben *et al.*, 2007). Ačkoliv se tato interakce objevuje u celé řady eukaryot, nachází se zde stabilní zkrácené telochromozómy ječmene, jejichž centroméry vyžadují retroelementy cereba a GC satelitní sekvence pro normální průběh mitózy a meiózy (Nasuda *et al.*, 2005).

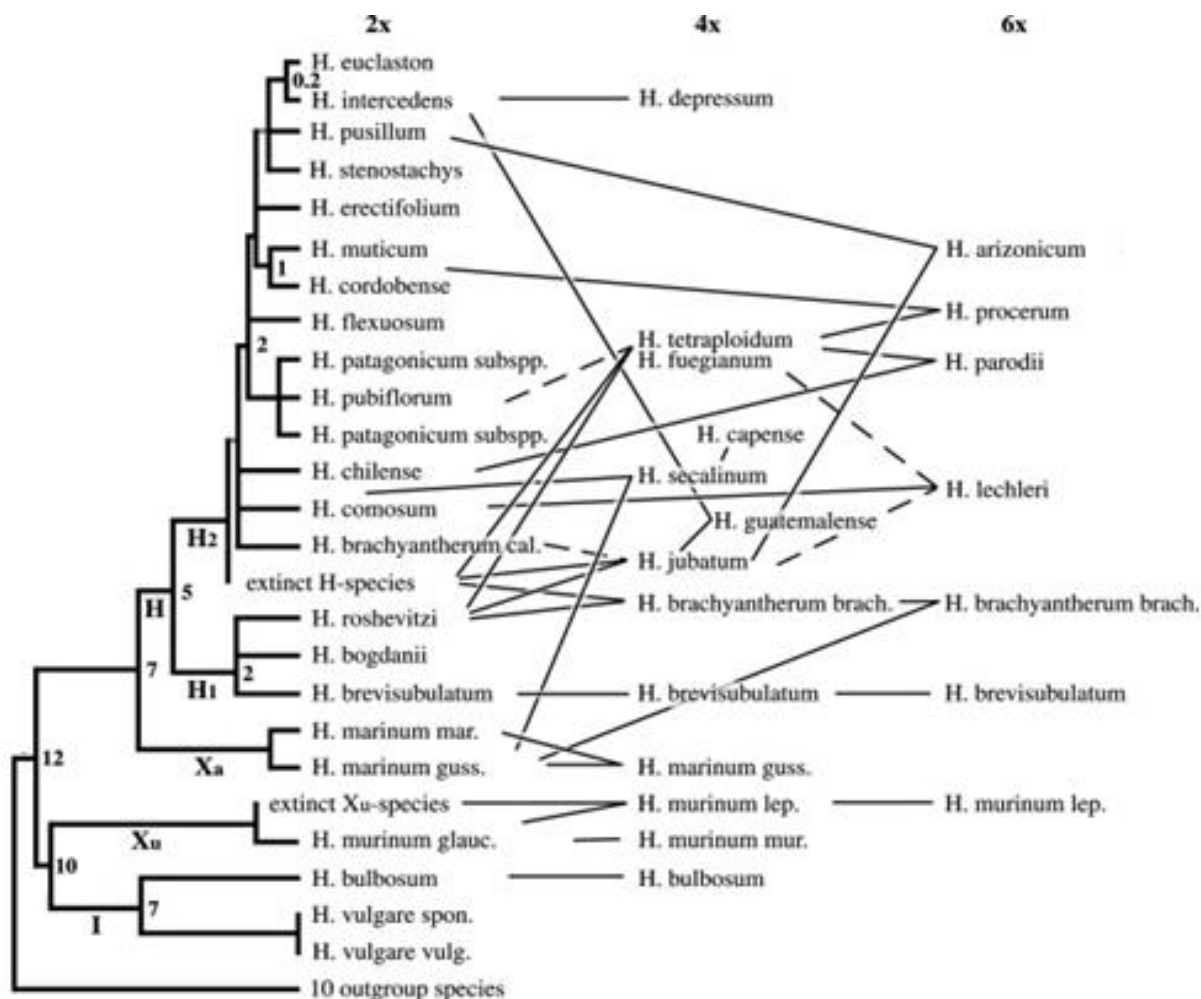
### 3.3.2 Využití ribozomálních ITS sekvencí pro účely molekulární fylogenetiky

Jednou z nejpoužívanějších DNA sekvencí u rostlin sloužící pro fylogenetické určení vztahů jsou ITS sekvence, kde patří ITS1 a ITS2. Jak již bylo zmíněno výše, tato oblast se nachází v jaderné ribozomální jednotce 18S-5,8S-26S. U rostlin je molekulární fylogenetika založena na sekvenačních studiích zejména genů a mezerníků pocházejících z plastidového genomu. Známým příkladem je gen *rbcL*, který kóduje velkou podjednotku ribulóza-1,5-bisfosfát karboxylázy (Chase *et al.*, 1993).

Důvodů, proč jsou fylogenetické analýzy převážně založeny na ITS, je několik. Jednou z největších výhod je univerzálnost. White *et al.* (1990) popsal soubor primerů, které jsou užitečné pro amplifikaci ITS sekvencí většiny rostlin a hub. Dědičnost ITS je biparentální a od chloroplastové DNA se odlišují širším spektrem využití. Dalším faktorem je jednoduchost z hlediska izolace. Jednotlivé 18S-5,8S-26S repetice mají typickou velikost kolem 10 kbp a v genomu rostlin se nacházejí ve stovkách až tisících kopiích. Velikost ITS sekvencí se pohybuje v rozmezí 500–700 bp u krytosemenných a 1500–3700 bp u nahosemenných rostlin. Malá velikost cílových DNA fragmentů a vysoký počet kopií ITS výrazně usnadňuje jejich amplifikaci pomocí metody PCR (polymerázová řetězová reakce). Dalším významným parametrem je intergenomická variabilita v dané oblasti, což je klíčový znak pro aplikovatelnost v oblasti fylogenetických analýz. Funkce ITS souvisí se specifickým štěpením

primárního transkriptu v rámci ITS1 a ITS2 v průběhu zrání malé podjednotky, 5,8S a velké podjednotky ribozomální RNA. Proces dozrávání a sestřihu závisí na sekundární struktuře ITS. To značí jistý stupeň konzervace na úrovni sekvence nebo struktury. Některé repetice degenerují do pseudogenů, které jsou většinou následně odstraněny z genomu nebo se samovolně rozpadnou, aniž by se mohly dále amplifikovat. Vysoký obsah nukleotidů GC poskytuje stabilitu sekundárních struktur DNA a RNA. Jsou spojeny s tvorbou smyček a jiných složitějších sekundárních struktur. Vysoký obsah daných nukleotidů zejména v konzervovaných oblastech a strukturální znaky smyčky naznačují, že kompenzační změny bází jsou časté mezi různými nukleotidovými místy. Je také jasné, že existují rozdíly ve tvaru a počtu struktur této smyčky mezi různými organismy (Álvarez, 2003).

Studiem fylogenetických vztahů u diploidních a polyploidních zástupců rodu *Hordeum* založených na ITS sekvencích byly odhaleny čtyři hlavní linie (viz Obrázek 8). Ty odpovídají čtyřem genomovým skupinám (H, I, X<sub>a</sub> a X<sub>u</sub>), které byly zmíněny již výše. Byly objeveny dva hlavní rDNA úseky vyskytující se u většiny diploidních druhů, které se objevují na různých chromozómech a někdy bývají doplněny minoritními rDNA úseky. Oblasti NOR obsahující rDNA geny mohou vést k různým ITS sekvencím v rámci jednoho jedince za předpokladu, že nedojde k homogenizaci rDNA mezi těmito skupinami. Různé směry homogenizace a evoluce v koncertu těchto NOR oblastí mohou komplikovat analýzu fylogenetických studií založených na ITS (Blattner, 2004).



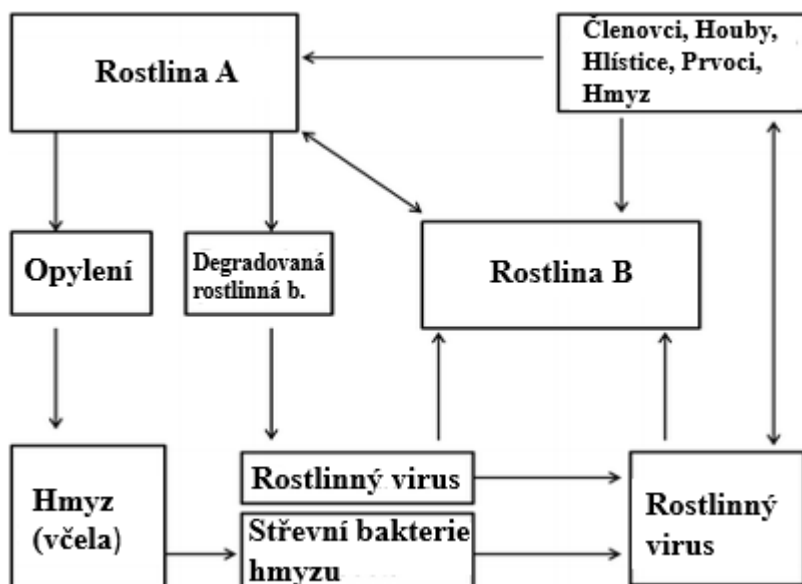
**Obrázek 8:** Fylogeneze rodu *Hordeum* založená na 353 ITS sekvencích z 91 zástupců (převzato a upraveno podle Blattner, 2004). Diploidní druhy (2x) jsou znázorněny v prvním sloupci, tetraploidní (4x) a hexaploidní (6x) druhy jsou vpravo. Linky spojují taxony s jejich mateřským druhem. Přerušované linky značí dvojznačnou rodičovskou příslušnost. Příslušnost k dané genomové skupině je uvedena pod větvemi (H, I, X<sub>a</sub> a X<sub>u</sub>). Čísla vpravo od větvících se bodů udávají dobu (v milionech let), kdy došlo k oddělení daných linií. Tato doba byla vypočtena na základě předpokladu oddělení předků *Triticum* a *Hordeum* před 13 miliony let.

### 3.3.3 Možné způsoby zanesení cizích rDNA genů do genomu ječmene

HGT se jeví jako jedna z možných cest pro zanesení panicoidních genů do genomu ječmene. Jedná se o přenos genetického materiálu přes biologickou bariéru oddělující dva fylogeneticky vzdálené druhy cestou jinou, než je běžný vertikální přenos sexuální reprodukci (Dunning *et al.*, 2019). Přenos je umožněn cytoplazmatickými organelami (chloroplasty, mitochondrie) nebo jádrem. Dědičnost takto získané DNA nepodléhá mendelovské dědičnosti. HGT je častým způsobem přenosu genů v mikrobiálních genomech. U eukaryot je velmi málo

dokumentován a mechanismus přenosu je zatím nesrozumitelný. HGT lze v závislosti na způsobu realizace samotného přenosu rozdělit na tři typy: přenos celých organel, přenos jaderné DNA a přenos RNA.

U prokaryotních organismů je HGT poměrně běžný způsob přenosu genů a nejčastěji se uskutečňuje prostřednictvím transformace, konjugace a transdukce. Eukaryotní organismy mají dvě možné cesty přenosu. První se uskutečňuje přímou výměnou DNA (z rostliny do rostliny) při roubování, symbióze, parazitismu a patogenězi. Druhá potřebuje ke své realizaci vektor sloužící jako most mezi dvěma organismy. Tímto vektorem může být bakterie, virus, houba, plazmid, transpozón nebo hmyz (viz Obrázek 9; Gao *et al.*, 2014). Doloženým příkladem HGT u eukaryot je organelogeneze, která je doprovázena přenosem stovek genů z endosymbiotických organismů do organismů hostitelského jaderného genomu (Qiu *et al.*, 2016). Bylo také zjištěno, že celé organely jsou zapojeny do HGT mezi různými druhy tabáku (Gurdon *et al.*, 2016) a dokonce i mezi pohlavně inkompatibilními druhy jako jsou dub a bříza (Stegemann *et Bock*, 2009). HGT je podstatnou hnací silou genomické variability a biologických inovací. Hraje důležitou funkční a evoluční roli v eukaryotních i prokaryotních genomech. Představuje formu vzácné genomické změny, která může být použita jako fylogenetický marker. Díky tomu je možné obecněji pochopit, jak selekce distribuuje cenné geny přes strom života.



**Obrázek 9:** Možné cesty umožňující horizontální přenos genů u rostlin (převzato a upraveno podle Gao *et al.*, 2014).

Nicméně přenos jaderné DNA mezi vyššími rostlinami je považován za velmi ojedinělý a zatím málo pochopený jev. Výměny nejaderné DNA mezi jednotlivými druhy rostlin jsou relativně časté (zejména mitochondriální a plastidové geny), zato výměna jaderné DNA byla zaznamenána pouze ve velmi vzácných případech (Mahelka *et al.*, 2017). Nedávná studie ukázala, že genom trávy *Alloteropsis semialata* (*Panicoideae*) obsahuje přinejmenším 59 funkčních genů získaných horizontálně od nejméně devíti různých dárců. Distribuce tohoto druhu v daném areálu ve velkém měřítku spolu s vegetativním růstem mohlo usnadnit kontakt mezi buňkami a následně umožnit HGT. Přenos těchto funkčních genů ukazuje, že tento proces bude pravděpodobně souviset s přizpůsobováním se rostlin daným podmínkám. HGT by tak mohl být funkčním nástrojem pro diverzifikaci některých skupin rostlin a působit jako zdroj genetické variability s potenciálně adaptivním významem. Šíření funkčních genů napříč travami, které si vyvinuly odlišné fyziologické a ekologické adaptace, může proto představovat významnou evoluční hybnou sílu v této celosvětově významné skupině rostlin (Dunning *et al.*, 2019).

Cizí typ ITS byl objeven u pýru plazivého (*Elymus repens*; *Triticeae*, *Pooideae*), jehož genom je odvozen od rodu *Pseudoroegneria* a *Hordeum*. Tento allopolyploid není křížitelný s rodem *Panicum*, ze kterého tato ITS pochází. Na základě těchto poznatků zůstává předmětem dalších studií, zda k případnému přenosu jaderné DNA došlo před, nebo po allopolyploidizační události. Ačkoliv byla dokázána přítomnost panicoidní rDNA u obou rodů, sekvenční data upřednostňují představu, že *E. repens* zdědil tuto panicoidní rDNA z *Hordeum bogdanii* (Mahelka *et* Kopecký, 2010).

Skrínink na cizorodou rDNA byl realizován u všech výše zmíněných 16 diploidních druhů ječmene náležících do sekce *Stenostachys* (všechny patří do genomové skupiny I). Dva z pěti druhů rodu *Pseudoroegneria* (*P. strigosa* a *P. spicata*) byly taktéž pozitivní na cizí rDNA. Většina starobylých přenosů u rodu *Hordeum* pocházela z ITS označované jako *Panicum* 1, jelikož tento rDNA typ byl nalezen ve všech taxonech centrální Asie a ve většině taxonů pocházejících z Jižní Ameriky. *Paspalum* 5, 6 a *Euclasta* 8 byly nejčastěji přítomny u amerických druhů ječmene, zatímco *Panicum* 2 a *Arundinella* 9 pouze u několika málo jedinců. Na základě metody maximální parsimonie se předpokládá, že malý počet evolučních událostí přenesl panicoidní rDNA do amerických druhů ječmene před hlavním speciálním obdobím. Tyto přenosy pak byly vertikálně rozšířeny do dalších nově se vyvíjejících se druhů.

Bližší charakterizace strukturních vlastností panicoidní rDNA byla provedena pomocí analýzy BAC (umělý bakteriální chromozóm) klonů z knihovny konstruované



z genomu *H. bogdani*. Tento druh ječmene pochází z centrální Asie a jeho genom obsahuje pouze cizí rDNA typu *Panicum* 1 ITS. Z této BAC knihovny byl pomocí skríninku získán pozitivní klon BAC 46L9, který byl následně sekvencován. Analýza odhalila kromě přítomnosti panicoidní rDNA i oblast bohatou na repetitivní sekvence. Tato oblast (~70 kpb) obsahující zejména DNA z rodu *Panicum*, byla přerušena dvěma ječmennými kopiemi transpozónu (Mahelka *et al.*, 2017).

HGT však není jedinou možností, jak se mohla panicoidní rDNA dostat do genomu *Hordeum*. V úvahu je také třeba brát i nelegitimní opylení, které může být realizováno hmyzem jako nelegitimním vektorem pro přenos pylu, nebo také heterostylií (různočleněností), což je schopnost rostliny vytvářet dva morfologicky odlišné typy květů. Adaptivní význam heterostylie spočívá v podpoře křížení nepříbuzných jedinců (tzv. *outcrossing*), čímž se snižuje plýtvání pylu nelegitimním opylením (Björkman, 1995). Některý hmyz se spíše než opylovač chová jako zloděj pylu, což také významně přispívá k nelegitimním interakcím (Solís-Montero *et al.*, 2015). U některých rostlin se za tímto účelem vytvořila strategie „klamné přitažlivosti“ některých souborů tyčinek, které fungují jako potrava pro opylovače, zatímco další se specializují na opylení (Li *et al.*, 2015).

## 4 MATERIÁL A METODY

### 4.1 Biologický materiál

V praktické části bakalářské práce byla pro přípravu parciální BAC knihovny použita genomická DNA ze semen planého druhu ječmene *Hordeum stenostachys* ( $2n=14$ ) s přístupovým číslem BCC2021, která byla obdržena z genové banky IPK Gatersleben v Německu. BAC knihovna obsahovala 36 864 BAC klonů umístěných v 96 miskách o 384 jamkách.

### 4.2 Použité chemikálie, soupravy a roztoky

#### 4.2.1 Použité chemikálie

- agaróza (VWR, kat. č. 9012-36-6; USA)
- destilovaná voda
- ethidium bromid (Sigma-Aldrich, kat.č. E8751; USA)
- $5 \text{ U} \cdot \mu\text{l}^{-1}$  Taq polymeráza (NEB, kat. č. M027X; USA)
- nukleotidy,  $100 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  dATP, dCTP, dGTP, dTTP (VWR, kat. č. 733-1855; USA)
- primery (Biogen, ČR; viz Tabulka 3)

#### 4.2.2 Použité soupravy

- NucleoSpin Plant II (Macherey-Nagel, kat. č. 740770.50; DEU)
- DNeasy Plant Mini Kit II (Qiagen, kat. č. 69104; DEU)

#### 4.2.3 Použité roztoky a jejich příprava

- **5× TBE pufr** (1 000 ml, pH 8):
  - 54 g Tris (Sigma-Aldrich, kat. č. T1503; USA)
  - 27,5 g kyselina boritá (Lach-Ner, kat. č. 10017-AP0; ČR)
  - 20 ml  $0,5 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  EDTA, pH = 8,0 (Sigma-Aldrich, kat. č. E5134; USA)
  - Doplnit destilovanou vodou na objem 1 000 ml, upravit pH na 8
- **TE pufr** (100 ml, pH 8):
  - 1 ml  $1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  Tris-HCl, pH = 8,0 (Sigma-Aldrich, kat. č. 1185-53-1; USA)
  - 200  $\mu\text{l}$   $0,5 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  EDTA, pH = 8,0 (Sigma-Aldrich, kat. č. E5134; USA)
  - Doplnit destilovanou vodou na objem 100 ml, upravit pH na 8

- **roztok cresol red (100 ml):**
  - 50 mg 0,01 % *o*-kresolová červeně (Sigma-Aldrich, kat. č. 1733-12-6; USA)
  - 7,5 g 1,5 % sacharóza (Lach-Ner, kat. č. 40135-AP0; ČR)
  - Doplnit destilovanou vodou na objem 100 ml
- **10× PCR pufr (40 ml):**
  - 4 ml 100 mmol·l<sup>-1</sup> Tris-HCl, pH = 8,2 (Sigma-Aldrich, kat. č. 1185-53-1; USA)
  - 20 ml 500 mmol·l<sup>-1</sup> chlorid draselný (KCl) (Lach-Ner, kat. č. 30076-AP0; ČR)
  - 600 μl 15 mmol·l<sup>-1</sup> chlorid hořečnatý (MgCl<sub>2</sub>) (NEB, kat. č. M027X; USA)
  - 400 μl 1 % Triton X-100 (Sigma-Aldrich, kat. č. X100; USA)
  - Doplnit destilovanou vodou na objem 40 ml
- **DNA marker relativní molekulové hmotnosti (600 μl roztoku):**
  - 24 μl Gene Ruler 100 bp DNA Ladder Plus (Thermo Fisher Scientific, kat. č. SM0322; USA)
  - 100 μl 6× DNA Loading Dye (Thermo Fisher Scientific, kat. č. R0611; USA)
  - 476 μl destilovaná voda

### 4.3 Seznam použitých přístrojů a zařízení

- Elektroforetická aparatura Owl A6 (Thermo Fisher Scientific; USA)
- Centrifuga Fresco 17 (Thermo Fisher Scientific; USA)
- Centrifuga MiniStar Silverline (VWR; USA)
- Centrifuga PlateFuge MicroCentrifuge (Benchmark Scientific; USA)
- Digitální předvážky Vibra AJ-820CE (Shinko Denshi; JAP)
- Laboratorní digestoř M 1266 (Merci; ČR)
- Mikrovlnná trouba KOR-6C2B (DAEWOO; KOR)
- Robot, Biomek NX<sup>P</sup> (Beckman Coulter; USA)
- Spektrofotometr NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific; USA)
- Termocyklér, C-1000 Touch (Bio-Rad; USA)
- Třepačka, Reax Control (Heidolph Instruments; DEU)
- UV transiluminátor, InGenius (Syngene; IND)
- Výrobník ledové tříště MF26AS (Scotsman; USA)
- Zdroj, MP-300V (Major Science; USA)

## **4.4 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy**

### **4.4.1 Izolace genomické DNA**

Rostlinný materiál byl odebrán ve formě mladých listů z rostliny *Hordeum stenostachys* ve stádiu 3 listů. Ve třecí misce bylo postupně homogenizováno 100 mg rostlinného materiálu pomocí tekutého dusíku. DNA byla izolována pomocí kitu NucleoSpin Plant II přesně podle instrukcí od výrobce (Macherey-Nagel).

### **4.4.2 Přečištění DNA**

Zachycená DNA na membráně z předešlého kroku byla promyta 700  $\mu$ l promývacího pufru s etanolem a centrifugována 1 minutu při 11 000 g. Supernatant obsahující balastní látky (proteiny a zbytkovou RNA) se vylil a kolonka byla opět promyta 700  $\mu$ l promývacího pufru s etanolem a centrifugována 1 minutu při 11 000 g. Pro eluci byl použit eluční pufr předehřátý na 65 °C v objemu 50  $\mu$ l, vzorek byl takto inkubován po dobu 5 minut a poté opět centrifugován 1 minutu při 11 000 g. Tento krok byl poté zopakován.

### **4.4.3 Měření koncentrace DNA**

Koncentrace izolované genomické DNA z ječmene *H. stenostachys* byla měřena na spektrofotometru NanoDrop. Přístroj byl nejprve kalibrován 1  $\mu$ l destilované vody (0 ng  $\cdot$   $\mu$ l<sup>-1</sup>) a poté byla měřena koncentrace 1  $\mu$ l vzorku.

### **4.4.4 Příprava BAC knihovny**

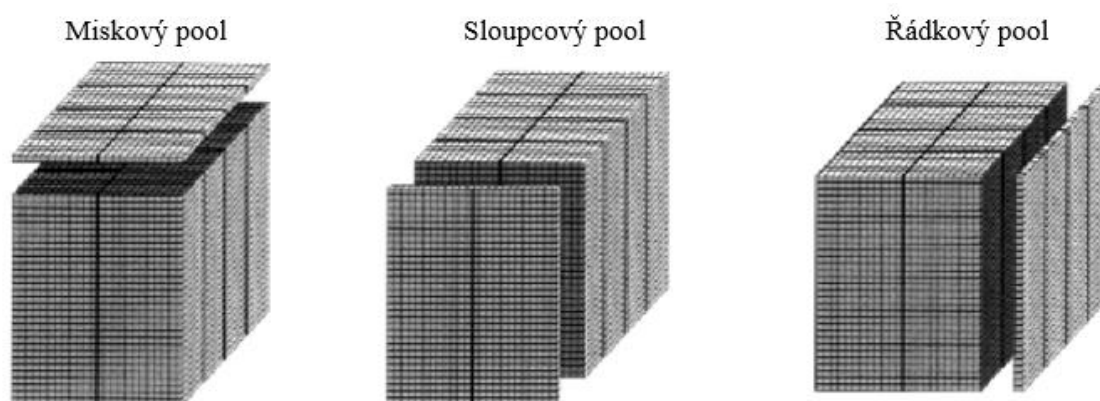
Knihovna BAC byla připravena z genomické DNA ječmene *H. stenostachys* (BCC2021) podle Šafář *et al.* (2004). Vysokomolekulární DNA (100–300 kbp) byla ligována do defosforylovaného plazmidu pCC1BAC Copy Control (Lucigen). Rekombinantní plazmid byl následně transformován do buněk bakterie *Escherichia coli* (TransforMax EPI300™) prostřednictvím elektroporace. BAC klony byly posbírány pomocí automatizované robotické stanice a uskladněny v 96 destičkách o 384 jamkách.

### **4.4.1 Příprava DNA poolů**

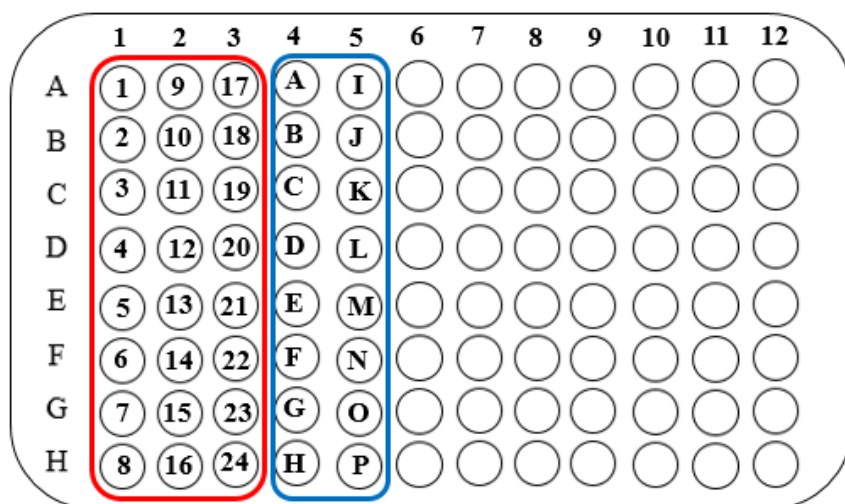
DNA pooly z genomické DNA *H. stenostachys* byly připraveny na Ústavu experimentální botaniky AV ČR v.v.i. v Olomouci. Miskové DNA pooly byly připraveny spipetováním jednotlivých klonů dané destičky dohromady pomocí automatického pipetovacího robota (Biomek). Z takto vzniklého směsného poolu klonů byla následně izolována DNA pomocí DNeasy Plant Mini Kit II (Qiagen). Strategie 3D poolování je zobrazena na Obrázku 10. Každý řádkový pool (A–H) byl přepipetován do 2ml mikrozkuavek a centrifugován 10 minut při 10 000 g pro usazení bakterií. Následně bylo k lyzátu přidáno

500 µl TE pufru, krátce zvortexováno a vařeno 30 minut při zhruba 100 °C. Poté byl lyzát krátce zcentrifugován a byla z něj odpipetována DNA s TE pufrém do PCR destičky (100 µl na jamku) a zamrazeno při -20 °C.

Pro přípravu sloupcových a řádkových DNA poolů byly použity pouze pozitivní 384-jamkové mikrotitrační destičky. Obdobně jako u miskových poolů byly nejprve klony jednotlivých řádků respektive sloupců příslušné 384-jamkové mikrotitrační destičky spipetovány dohromady a poté izolována DNA daných klonů. Směsné DNA pooly byly poté napipetovány do 96-jamkové mikrotitrační destičky. Schéma uspořádání jednotlivých DNA BAC poolů zobrazuje Obrázek 11.



**Obrázek 10:** Strategie 3D poolování (převzato a upraveno podle Klein *et al.*, 2000)



**Obrázek 11:** Schéma uspořádání sloupcových, resp. řádkových DNA poolů genomické DNA *Hordeum stenostachys* na mikrotitrační destičce. Tyto směsné DNA pooly byly připraveny pouze z pozitivních destiček číslo 10, 24, 55, 65 a 92 pro následné testování se specifickými primery (Tabulka 3) na jednotlivé zástupce panicoidních trav. 1–24 ... sloupcové pooly, A–P ... řádkové pooly.

#### 4.4.2 Polymerázová řetězová reakce

PCR byla provedena v objemu 20  $\mu\text{l}$  v 96-jamkových PCR destičkách (VWR; USA) z připravených řádkových a sloupcových DNA poolů ječmene *Hordeum stenostachys*. Byla použita DNA z 5 miskových, 16 řádkových a 24 sloupcových poolů. Jako pozitivní kontrola byla použita genomická DNA z ječmenů *H. stenostachys* a *H. pubiflorum* a BAC klonu 46L9. Složky reakční směsi jsou uvedené v Tabulce 1.

**Tabulka 1:** Složení PCR reakční směsi.

Složka PCR reakční směsi	Objem [ $\mu\text{l}$ ]
10 $\times$ PCR pufr	2
cresol red	4
10 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ dNTP	0,4
10 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ <i>forward</i> primer	0,5
10 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ <i>reverse</i> primer	0,5
5 $\text{U}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ <i>Taq</i> polymeráza	0,1
destilovaná voda	10,5
10 $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ DNA	2
<b>Celkem</b>	<b>20</b>

Teplotní průběh reakce se řídil podle teploty nasedání primerů (viz Tabulka 2) testovaných amplikonů (Tabulka 3).

**Tabulka 2:** Podmínky PCR.

Krok	Teplota [ $^{\circ}\text{C}$ ]	Čas	Počet cyklů
Predenaturace	95	3 minuty	1x
PCR amplifikace	denaturace	95	30 sekund
	nasedání	$T_a$	30 sekund
	extense	72	30 sekund
Závěrečná elongace	72	3 minuty	1x
Udržování	4	-	1x

$T_a$  ... teplota *annealingu* pro jednotlivé páry specifických primerů je uvedena v Tabulce 3.

**Tabulka 3:** Seznam testovaných primerů pro amplifikaci dané oblasti.

Amplikon	Primer	Sekvence F a R primerů (5' → 3')	T <sub>a</sub> [°C]
Amplikon 1	ITS-Poa-f	AAGGATCATTGTCGTGACC	51
	ITS-Pan-bac	ACACTGCACCGAGAACAAC	
Amplikon 2	Pas_141F	ATATTGCCTTGCGAGGGTGA	55
	Pas_435R	TGCACCATGGCACGAGAG	
	Pan1_162F	GTTCGGCCTGTCGCGCAT	55
	Pan1_486R	ACATGCAGGTGCCCCGACA	
	Pan2_65F	AAGGCCCCCAGTCAACATTT	60
	Pan2_484R	CGTGCAAGTACCTAACACGG	
	Euc_140F	TATTGACTTGCTCGGCGGAG	60
	Euc_481R	TGCTGTCCCGATACGATTC	
	Set_31F	CGTGTCATCCATGCCGCAT	55
	Set_202R	AGATAGCATCGTTACACGAGGT	
	Aru_49F	GGGCTTCGGTCCGGTTTA	54
	Aru_168R	GCCGACCGCTCCACCGT	

Poznámka: Specifické páry primerů (amplikon 2) nesou rDNA sekvenci charakteristickou pro 5 rodů *Panicoideae*: Pas ... *Paspalum*, Pan1 ... *Panicum* typ 1, Pan2 ... *Panicum* typ 2, Euc ... *Euclasta*, Set ... *Setarium*, Aru ... *Arundinella*; ITS-Poa-f/ITS-Pan-bac ... univerzální primer, T<sub>a</sub> ... teplota *annealingu*, F ... *forward* primer, R ... *reverse* primer

#### 4.4.3 Elektroforéza na agarózovém gelu a vizualizace

Produkty PCR byly separovány elektroforézou na 1,5% agarózovém gelu (4,5 g agarózy a 300 ml 0,5× TBE pufu). Produkty PCR a marker relativní molekulové hmotnosti byly naneseny na gel v objemu 2 µl. Elektroforéza probíhala po dobu 80 minut při napětí 120 V. Separované produkty PCR byly barveny 0,05% ethidium bromidem po dobu 20–30 minut. PCR produkty byly vizualizovány v UV transiluminátoru.

## 5 VÝSLEDKY

### 5.1 Příprava DNA BAC poolů

DNA pooly byly připraveny z parciální BAC knihovny *H. stenostachys* (BCC2021) na Ústavu experimentální botaniky AV ČR v.v.i. v Olomouci. Zvolenou strategií pro prohledávání BAC knihovny představovala technika přípravy 3D poolů a následně skrínink pomocí PCR. Pro přípravu DNA poolů byl použit software Biomek. Koncentrace izolované BAC DNA *Hordeum stenostachys* z řádků, resp. sloupců 384-jamkové mikrotitrační destičky činila  $\sim 100 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$  pro jednotlivé vzorky. Nejvyšší koncentrace byla získána vždy z miskových poolů, což je dáno vysokou koncentrací BAC klonů.

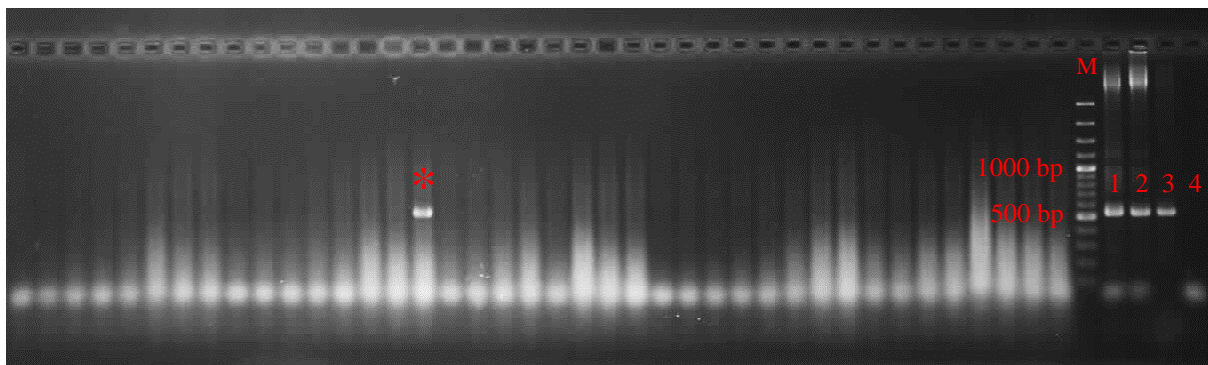
### 5.2 Optimalizace PCR

DNA izolovaná z BAC klonů *H. stenostachys* vykazovala při počátečních PCR reakcích vysokou míru falešně pozitivních výsledků, z tohoto důvodu bylo potřeba tuto metodu optimalizovat pro amplifikaci PCR produktu v co nejvyšší kvalitě. Toho bylo dosaženo upravením teploty pro nasedání (*annealing*) daného páru primerů na templátovou DNA. Upravené teploty ( $T_a$ ) jsou uvedené v Tabulce 3. Dále byla optimalizována koncentrace templátové DNA, resp. DNA poolů z  $5\times$  na  $10\times$  koncentrované také z důvodu velkého množství nespecifických produktů.

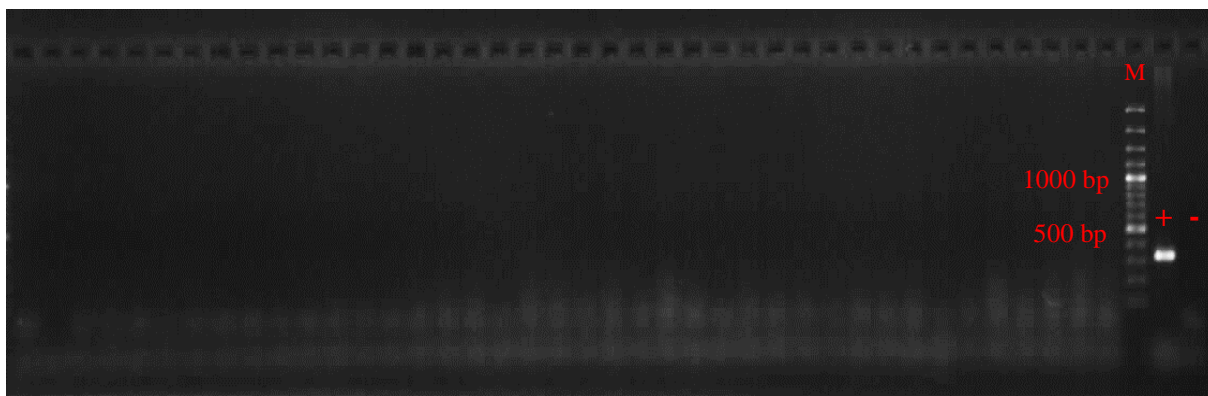
### 5.3 Prohledávání BAC knihovny pomocí univerzálního primeru

Po optimalizaci podmínek PCR pro použité primery byla knihovna DNA skrínovaná pomocí *Poaceae*-specifického páru primerů ITS-Poa-f/ITS-Pan-bac (viz Tabulka 3). Tento univerzální primerový pár je navržen tak, aby zachycoval ITS sekvence pro zástupce *Poaceae*. Tímto způsobem bylo prohledáváno všech 96 destiček o 384 jamkách parciální knihovny *H. stenostachys*. Takto bylo identifikováno 5 pozitivních 384-jamkových destiček (DNA poolů) z celkového počtu 96. Příklad pozitivního miskového DNA poolu zobrazuje Obrázek 12. Pozitivní destičky číslo 10, 24, 55, 65 a 92 byly použity pro přípravu řádkových, resp. sloupcových směsných poolů (viz Obrázek 11) pro následné testování se specifickými primery na jednotlivé zástupce panicoidních trav.





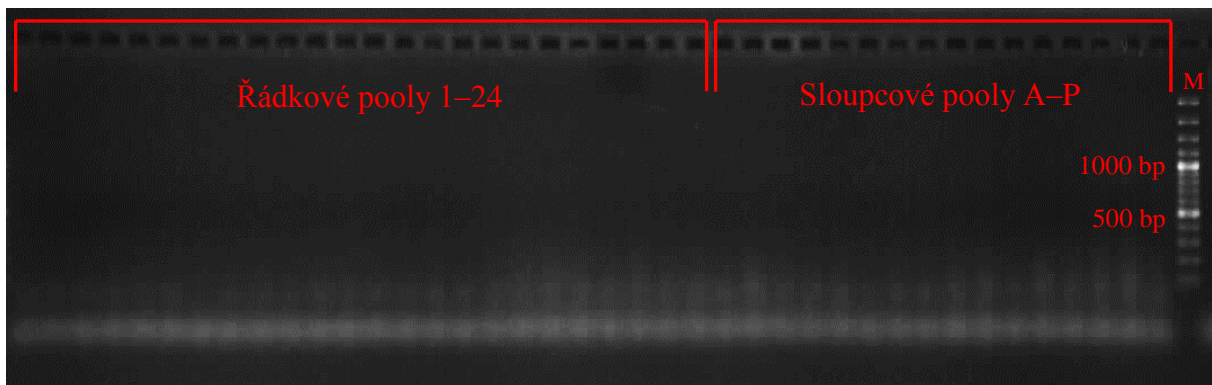
**Obrázek 12:** Příklad elektroforetického profilu s pozitivním signálem pro primerový pár ITS-Poa-f/ITS-Pan-bac (univerzální primer) na miskovém poolu č. 55. Jamky označené 1–3 jsou pozitivní kontroly. M ... marker relativní molekulové hmotnosti, 1 ... *H. stenostachys*, 2 ... *H. pubiflorum*, 3 ... BAC 46L9, 4 ... negativní kontrola.



**Obrázek 13:** Příklad elektroforetického profilu s negativním signálem pro primerový pár ITS-Poa-f/ITS-Pan-bac (univerzální primer) na miskovém poolu č. 13. M ... marker relativní molekulové hmotnosti, + ... pozitivní kontrola BAC 46L9, - ... negativní kontrola.

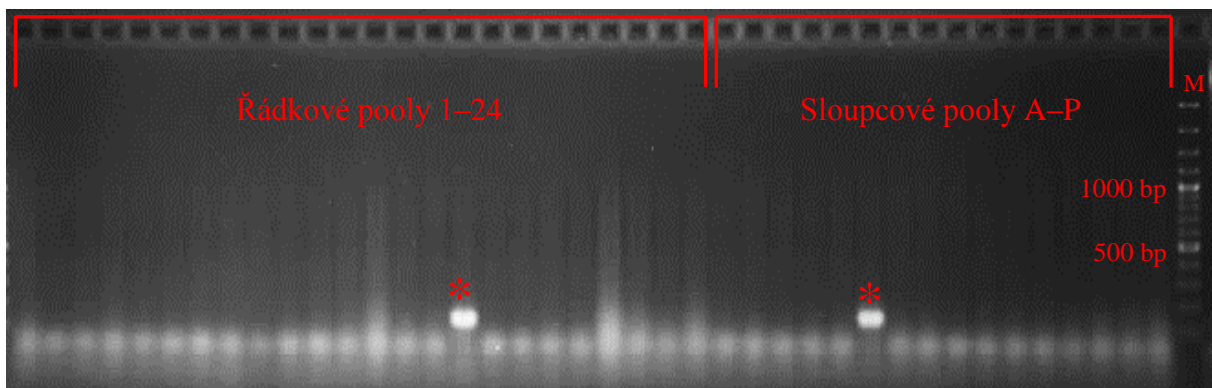
#### 5.4 Prohledávání BAC knihovny pomocí specifických primerů

3D pooly byly připraveny pro 5 vytipovaných 384-jamkových destiček na Ústavu experimentální botaniky AV ČR v.v.i. v Olomouci. 3D pooly těchto destiček byly skrínovány na přítomnost panicoidní rDNA v genomu planého ječmene *Hordeum stenostachys* pomocí *Panicoideae*-specifických primerových párů (Tabulka 3). Tyto primery obsahují sekvenci panicoidní rDNA, která odpovídá 5 rodům *Panicoideae*: *Paspalum*, *Panicum* 1, *Panicum* 2, *Euclasta*, *Setarium* a *Arundinella*. Skrínink pomocí specifických párů primerů Pas, Pan1, Pan2, Euc a Set byl u všech negativní a nebyl identifikován žádný pozitivní klon (viz Obrázek 14).

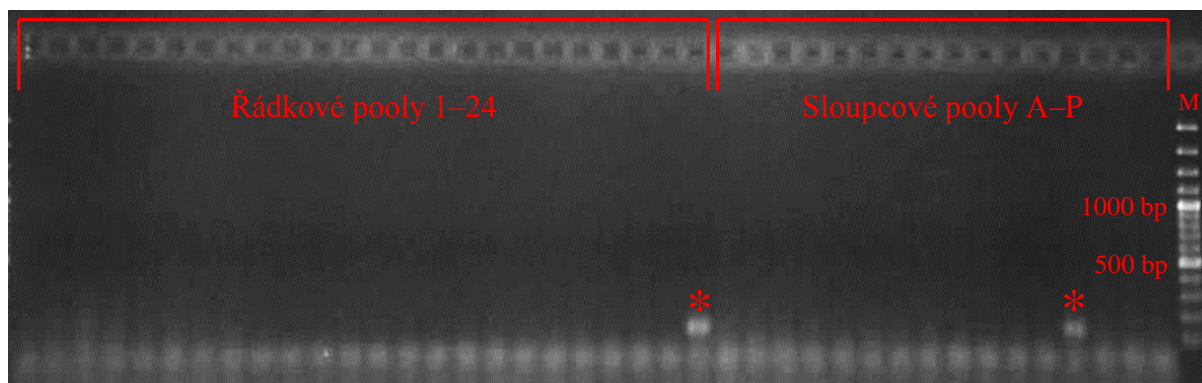


**Obrázek 14:** Příklad elektroforetického profilu s negativním signálem pro primerový pár Set\_31F/Set\_202R (*Setarium*) na miskovém poolu č 55. Podobně poskytovaly negativní signál také primerové páry Pas\_141F/Pas\_435R (*Paspalum*), Pan1\_162F/Pan1\_486R (*Panicum* typ 1), Pan2\_65F/Pan2\_484R (*Panicum* typ 2) a Euc\_140F/Euc\_481R (*Euclasta*). M ... marker relativní molekulové hmotnosti.

Pouze pomocí primerového páru Aru\_49F/Aru\_168R byly detekovány dva pozitivní klony (viz Obrázek 15 a 16) na misce č. 55 a č. 92, které byly poté identifikovány dle schématu směsných DNA poolů (viz Obrázek 11). Tento primerový pár odpovídá ITS rDNA rodu *Arundinella*.



**Obrázek 15:** Elektroforetický profil BAC klonu 55F16. Produkty PCR byly separovány elektroforézou na 1,5 % agarovém gelu. Pro amplifikaci byly použity primery Aru\_49F/Aru\_168R. BAC klon pocházel z miskového poolu č. 55, řádku 16 a sloupce F. 1–24 ... řádkové DNA pooly; A–P sloupcové DNA pooly; M ... marker relativní molekulové hmotnosti.



**Obrázek 16:** Elektroforetický profil BAC klonu 92M24 Produkty PCR byly separovány elektroforézou na 1,5 % agarovém gelu. Pro amplifikaci byly použity primery Aru\_49F/Aru\_168R. BAC klon pocházel z miskového poolu č. 92, řádku 24 a sloupce M. 1–24 ... řádkové DNA pooly; A–P sloupcové DNA pooly; M ... marker relativní molekulové hmotnosti.

## 5.5 Analýza selektovaných BAC klonů

DNA pozitivních BAC klonů byla izolována a následně sekvencována pomocí technologie Illumina. Sekvence BAC klonů byla assemblována a analyzována pro potvrzení přítomnosti panicoidní rDNA. BAC sekvence byly testovány na přítomnost sekvence ITS podobné *Panicum* a na přítomnost nativní sekvence ITS *H. stenostachys*. Analýza se prováděla za účelem identifikace co nejvyšší podobnosti a také pro posouzení funkčnosti dané sekvence. Sekvenční analýza odhalila skutečnou přítomnost sekvence rDNA pocházející z genomu trávy *Arundinella*. Sekvencování a následná analýza sekvence probíhala v rámci řešení projektu na Ústavu experimentální botaniky AV ČR v.v.i. v Olomouci.

## 6 DISKUZE

Cílem této bakalářské práce byla identifikace a bližší charakterizace cizí rDNA u vybraných zástupců rodu *Hordeum*, konkrétně pro jihoamerický druh *H. stenostachys*. Byla připravena parciální BAC knihovna z genomické DNA planého ječmene *Hordeum stenostachys*. Tato knihovna byla prohledávána za účelem identifikace klonů, ve kterých se nacházejí segmenty cizorodé rDNA z příbuzné podčeledi *Panicoideae*. Zvolená metodika zahrnovala 3D poolovací strategii a následný skrínink pomocí PCR, kterou se podařilo optimalizovat v teplotě nasedání primerů na templátovou DNA.

V původní práci Mahelka *et al.* (2017) byl pro identifikaci *Panicum* 1 ITS u planého ječmene *Hordeum bogdanii* použit skrínink pomocí radioaktivní hybridizace. Tento postup spočívá v přenosu BAC klonů na vysokohustotní filtry umístěné na nylonové membráně a následné hybridizaci s radioaktivně značenou sondou. Tato technika má celou řadu nevýhod (práce s radioaktivním materiálem, poměrně častý výskyt falešně pozitivních výsledků způsobený nespecifickou hybridizací a také náročnost při přípravě vysokohustotních filtrů) oproti skríninku pomocí PCR strategií 3D poolů. Z tohoto důvodu byla pro skrínink panicoidní rDNA v BAC knihovně *H. stenostachys* zvolena metoda PCR.

Skrínink 3D BAC poolů pomocí PCR má celou řadu výhod: nižší stupeň výskytu falešně pozitivních výsledků, vyšší výkonnost v porovnání s metodami založenými na hybridizaci a také jde o poměrně dobře finančně dostupnou metodu. Tato technika je vysoce citlivá a technicky snadná, avšak časově náročnější (kultivace klonů, izolace DNA požadované kvality, elektroforetická separace). Skrínink PCR založený na 3D poolování je elegantním řešením pro snadnou identifikaci BAC klonů ve velkém množství vzorků a při vyšším počtu DNA markerů, které chceme použít pro skrínink. Pozitivní BAC klon se nachází na průsečíku tří pozitivních vrstev (miska, řádek, sloupec). Je však třeba brát v úvahu zejména hustotu DNA BAC poolů, jelikož s tím úzce souvisí citlivost a přesnost PCR. Dále je také třeba zvážit počet PCR cyklů, jelikož se od toho odvíjí i časová náročnost. Zvyšováním dimenzionálního uspořádání se zvyšuje pracnost v případě, že není k dispozici vhodné automatické zařízení. Na druhou stranu například použitím 6D strategie poolování namísto 3D lze výrazně zvýšit citlivost a snížit výskyt falešných pozitiv (Yim *et al.*, 2007).

Pro amplifikaci cizí rDNA bylo nutné optimalizovat podmínky PCR pro maximální výtěžek a čistotu PCR produktů. Optimalizace byla důležitým parametrem zejména pro snížení poměrně vysoké míry nespecifických signálů při počátečních experimentech (Rychlik *et al.*,

1990). To bylo pravděpodobně způsobeno nedostatečně čistou DNA. Pro přípravu DNA z poolu bakterií je nutná její izolace, která spočívá v povaření a lýzi bakteriálních buněk. Takto připravený lyzát je rychlý na přípravu, ale kromě požadované DNA z BAC klonů obsahuje i DNA bakterií a celou řadu organických molekul, které výrazně znečišťují tuto DNA. Kvůli tomu bylo nutné oproti experimentům s kontrolní genomickou DNA upravit teploty nasedání primerů na templátovou DNA pro každý primerový pár jednotlivě. Optimalizace teploty pro nasedání primerů je zvláště důležitá při použití poolované (pouze povařené) DNA jako templátu pro PCR. Sérií několika počátečních PCR reakcí byla teplota nasedání primerů optimalizována postupně pro jednotlivé páry primerů.

Nízké procento výskytu pozitivních BAC klonů (BAC 55F16 a BAC 92M24) je způsobeno rozsáhlým genomem ječmene a zejména nízkou *coverage* naší BAC knihovny, která pokryla genom *H. stenostachys* pouze ~0,8x. Z tohoto důvodu nebylo možné proskrinovat celý genom a nalézt veškeré pozitivní klony nesoucí panicoidní rDNA v porovnání se studií Dunning *et al.* (2017), kde genom trávy *Alloteropsis semialata* byl oproti genomu ječmene malý, a proto mohl být přímo sekvencován bez konstrukce BAC knihovny. Naším primárním cílem však bylo najít alespoň nějaké pozitivní BAC klony, které by mohly být dále analyzovány.

Pozitivní BAC klony 55F16 a 92M24 byly sekvencovány pomocí technologie Illumina a následná analýza těchto sekvencí potvrdila přítomnost panicoidní rDNA v genomu *H. stenostachys* na základě tzv. *assemblování*, které spočívá v generování jednotlivých náhodných sekvencí a následném hledání jejich překryvů, které se postupně skládají do tzv. *kontigů*. Sekvenční analýza potvrdila přítomnost rDNA pocházející z rodu *Arundinella*. Implementace této cizí rDNA do genomu *H. stenostachys* se jeví jako evolučně recentní událost.

U planého ječmene *H. bogdanii* byl již dříve objeven BAC 46L9, který byl pozitivní na panicoidní rDNA (Mahelka *et al.*, 2017). Jeho sekvencování odhalilo rDNA pocházející z příbuzného rodu *Panicum*. Na základě sekvenční divergence v 5' a 3' LTR bylo odhadnuto načasování transpozičních událostí na 0,25–0,29 milionů let. Tato transpoziční událost je podstatně pozdější než bylo získávání panicoidní rDNA u ječmene. Srovnáváním distribuce nenativních ITS sekvencí s fylogenezí rodu *Hordeum* založené na nativních ITS sekvencích bylo zjištěno, že pravděpodobně nejstarší přenos zahrnoval rDNA z *Panicum* 1. Tento typ rDNA byl nalezen ve všech taxonech Střední Asie, ale také ve většině zástupců Jižní Ameriky. Tato událost pravděpodobně nastala u jejich společného předka, který předcházel diverzifikaci

oddělení *Stenostachys*. Načasování přenosu se odhaduje na 1,7–5,0 milionů let a místo lokalizace Střední Asie.

Detekce HGT je zcela náhodný proces a systematické vyhledávání v tak rozsáhlém genomu, jaký má rod *Hordeum*, je jen těžko proveditelný. Není zcela zřejmé, zda by mohla být jediná kopie cizí rDNA spolehlivě detekována za použití celogenomového přístupu. Napříč těmto technickým limitům detekce nemusí být HGT zas tak výjimečnou událostí u trav, jak tomu naznačují i některé další studie (Dunning *et al.*, 2017).

## 7 ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce byla identifikace cizích rDNA elementů v genomu planého ječmene *Hordeum stenostachys*. Pro testování na přítomnost panicoidní rDNA byla vytvořena parciální BAC knihovna z genomické DNA tohoto ječmene.

Zvolená strategie pro prohledávání BAC knihovny zahrnovala skrínink 3D poolů pomocí metody PCR. Tato metoda musela být nejprve optimalizována s ohledem na specifitu nasedání primerů na DNA z těchto poolů.

V parciální BAC knihovně DNA připravené pro genom *Hordeum stenostachys* bylo pomocí univerzálního primeru pro *Poaceae* ITS selektováno 5 pozitivních destiček o 384 jamkách. Z těchto pozitivních destiček byly připraveny řádkové a sloupcové směsné pooly pro další skrínink se specifickými primery. Pomocí specifického primeru Aru\_49F/Aru\_168R byly identifikovány BAC klony 55F16 a 92M24. V rámci projektu byly tyto BAC klony sekvencovány a byla zpracována sekvenační analýza těchto dat. Ta ukázala, že tato rDNA skutečně pochází z příbuzného rodu *Arundinella*. Informace o sekvenci rDNA ječmene tohoto charakteru přispěje k lepšímu pochopení fylogenetických vztahů a je dalším důkazem, že dosud neznámým způsobem jsou genomy planých druhů ječmene náchylné na uchování rDNA pocházející z fylogeneticky vzdálených druhů trav.

## 8 LITERATURA

- Álvarez I. (2003): Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 29(3): 417–434.
- Badr A., Müller K., Schäger-Pregl R., El Rabey H., Effgen S., Ibrahim H. H., Pozzi C., Rohde W., Salamini F. (2000): On the Origin and Domestication History of Barley (*Hordeum vulgare*). *Molecular Biology and Evolution*, 17(4): 499–510.
- Bartoš J., Paux E., Kofler R., Havránková M., Kopecký D., Suchánková P., Šafář J., Šimková H., Town C., Lelley T., Feuillet C., Doležel J. (2008): A first survey of the rye (*Secale cereale*) genome composition through BAC end sequencing of the short arm of chromosome 1R. *BMC Plant Biology*, 8(1): 1–12.
- Bena G., Jubier M., Olivieri I., Lejeune B. (1998): Ribosomal External and Internal Transcribed Spacers: Combined Use in the Phylogenetic Analysis of *Leguminosae*. *Journal of Molecular Evolution*, 46(3): 299–306.
- Bennett M., Smith J. (1976): Nuclear DNA Amounts in Angiosperms. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 274(933): 227–274.
- Bennett M., Smith J. (1991): Nuclear DNA amounts in angiosperms. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 334(1271): 309–345.
- Björkman T. (1995): The effectiveness of heterostyly in preventing illegitimate pollination in dish-shaped flowers. *Sexual Plant Reproduction*, 8(3): 143–146.
- Blattner F. (2004): Phylogenetic analysis of *Hordeum* (*Poaceae*) as inferred by nuclear rDNA ITS sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 33(2): 289–299.
- Bothmer R., Seberg O., Jacobsen N. (1992): Genetic resources in the *Triticeae*. *Hereditas*, vol. 116: 141–150.
- Divashuk M., Khuat T., Kroupin P., Kirov I., Romanov D., Kiseleva A., Khrustaleva L., Alexeev D., Zelenin A., Klimushina M., Razumova O., Karlov G., Kashkush K. (2016):



Variation in Copy Number of Ty3/Gypsy Centromeric Retrotransposons in the Genomes of *Thinopyrum intermedium* and Its Diploid Progenitors. PLOS ONE, 11(4).

Doležel J., Greilhuber J., Lucretti S., Meister A., Lysák M., Nardi L., Obermayer R. (1998): Plant Genome Size Estimation by Flow Cytometry: Inter-laboratory Comparison. Annals of Botany, 82(1): 17–26.

Doležel J., Šimková H., Kubaláková M., Šafář J., Suchánková P., Číhalíková J., Bartoš J., Valárik M. (2009): Chromosome Genomics in the *Triticeae*. In Genetics and Genomics of the *Triticeae*. New York, NY: Springer US: 285–316.

Dou Q., Liu R., Yu F. (2016): Chromosomal organization of repetitive DNAs in *Hordeum bogdanii* and *H. brevisubulatum* (*Poaceae*). Comparative Cytogenetics, 10(4): 465–481.

Dubcovsky J., Dvořák J. (1995): Ribosomal RNA multigene loci: nomads of the *Triticeae* genomes: nomads of the *Triticeae* genomes. Genetics, 140(4): 1367–1377.

Dunning L., Olofsson J., Parisod C., Choudhury R., Moreno-Villena J., Yang Y., Dionora J., Quick W., Park M., Bennetzen J., Besnard G., Nosil P., Osborne C., Christin P. (2019): Lateral transfers of large DNA fragments spread functional genes among grasses. Proceedings of the National Academy of Sciences, 116(10): 4416–4425.

Duvall M., Davis J., Clark L., Noll J., Goldman D., Sánchez-Ken G. (2007): Phylogeny of the Grasses (*Poaceae*) Revisited. Aliso, 23(1): 237–247.

Feschotte C., Pritham E. (2009): A cornucopia of Helitrons shapes the maize genome. Proceedings of the National Academy of Sciences, 106(47): 19747–19748.

Flegr J. (2009): Evoluční biologie. (2. opravené a rozšířené vydání). Praha: Academia. ISBN 987-80-200-1767-3.

Gao C., Ren X., Mason A., Liu H., Xiao M., Li J., Fu D. (2014): Horizontal gene transfer in plants. Functional and Integrative Genomics, 14(1): 23–29.

González-Melendi P., Wells B., Beven A., Shaw P. (2001): Single ribosomal transcription units are linear, compacted Christmas trees in plant nucleoli. The Plant Journal, 27(3): 223–233.

Grass Phylogeny Working Group, Barker N. P., Clark L. G., Davis J. I., Duvall M. R., Guala, G. F., Hsiao C., Kellogg E. A., Linder H. P., Mason-Gamer R. J., Mathews S. Y., Simmons M. P., Soreng R. J., Spangler R. E. (2001): Phylogeny and Subfamilial Classification of the Grasses (*Poaceae*). *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 88(3): 373–457.

GrainGenes. [online] [navštíveno 21. 7. 2018] Dostupné z: <https://wheat.pw.usda.gov/GG3/>

Gurdon C., Svab Z., Feng Y., Kumar D., Maliga P. (2016): Cell-to-cell movement of mitochondria in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(12): 3395–3400.

Harlan J., de Wet J. (1971): Toward a Rational Classification of Cultivated Plants. *Taxon*, 20(4): 509–517.

Houben A., Pickering R. (2009): Applying Cytogenetics and Genomics to Wide Hybridisations in the Genus *Hordeum*. In *Genetics and Genomics of the Triticeae*. New York, NY: Springer US: 137–162.

Houben A., Schroeder-Reiter E., Nagaki K., Nasuda S., Wanner G., Murata M., Endo T. (2007): CENH3 interacts with the centromeric retrotransposon cereba and GC-rich satellites and locates to centromeric substructures in barley. *Chromosoma*, 116(3): 275–283.

Hrouda L. (2010): Trávy a jejich příbuzní napříč biotopy. *Živa: časopis pro biologickou práci*, 58(1): 12–16.

Chase M., Soltis D., Olmstead R., Morgan D., Les D., Mishler B., Duvall M., Price R., Hills H., Qiu Y., Kron K., Rettig J., Conti E., Palmer J., Manhart J., Sytsma K., Michaels H., Kress W., Karol K., Clark W., Hedren M., Gaut B., Jansen R., Kim K., Wimpee C., Smith J., Furnier G., Strauss S., Xiang Q., Plunkett G., Soltis P., Swensen S., Williams S., Gadek P., Quinn C., Eguiarte L., Golenberg E., Learn G., Graham S., Barrett S., Dayanandan S., Albert V. (1993): Phylogenetics of Seed Plants: An Analysis of Nucleotide Sequences from the Plastid Gene *rbcl*. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 80(3): 528–580.

Chloupek O. (2000): Genetická diverzita, šlechtění a semenářství. (2. upravené a rozšířené vydání). Praha: Academia. ISBN 978-80-200-1566-2.

- Kilian B., Özkan H., Pozzi C., Salamini F. (2009): Domestication of the *Triticeae* in the Fertile Crescent. In *Genetics and Genomics of the Triticeae*. New York, NY: Springer US: 81–199.
- Klein P. E., Klein R. R., Cartinhour S. W., Ulanich P. E., Dong J., Obert J. A., Morishige D. T., Schueter S. D., Childs K. L., Ale M., Mullet J. E. (2000): A High-throughput AFLP-based Method for Constructing Integrated Genetic and Physical Maps: Progress Toward a *Sorghum* Genome Map. *Genome Research*, 10(6): 789-807.
- Knüpffer H. (2009): *Triticeae* Genetic Resources in *ex situ* Genebank Collections. In *Genetics and Genomics of the Triticeae*. New York, NY: Springer US: 31–79.
- Kobayashi T. (2005): Recombination Regulation by Transcription-Induced Cohesin Dissociation in rDNA Repeats. *Science*, 309(5740): 1581–1584.
- Komatsuda T., Pourkheirandish M., He C., Azhaguvel P., Kanamori H., Perovic D., Stein N., Graner A., Wicker T., Tagiri A., Lundqvist U., Fujimura T., Matsuoka M., Matsumoto T., Yano M. (2007): Six-rowed barley originated from a mutation in a homeodomain-leucine zipper I-class homeobox gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(4): 1424–1429.
- Komatsuda T., Tanno K., Salomon B., Bryngelsson T., Bothmer R. (1999): Phylogeny in the genus *Hordeum* based on nucleotide sequences closely linked to the *vrs1* locus (row number of spikelets). *Genome*, 42(5): 973–981.
- Kovařík A. (2005): Rapid Concerted Evolution of Nuclear Ribosomal DNA in Two *Tragopogon* Allopolyploids of Recent and Recurrent Origin. *Genetics*, 169(2): 931–944.
- Lehmensiek A., Bovill W., Wenzl P., Langridge P., Appels R. (2009): Genetic Mapping in the *Triticeae*. In *Genetics and Genomics of the Triticeae*. New York, NY: Springer US: 201–235.
- Liao D. (2001): Concerted Evolution. In *Encyclopedia of Life Sciences*. Chichester: John Wiley and Sons: 1–6.
- Li J., Song Y., Xu H., Zhang Y., Zhu J., Tang L. (2015): High ratio of illegitimate visitation by small bees severely weakens the potential function of heteranthery. *Journal of Plant Ecology*, 8(2): 213–223.

Li W., Zhang P., Fellers J., Friebe B., Gill B. (2004): Sequence composition, organization, and evolution of the core *Triticeae* genome. *The Plant Journal*, 40(4): 500–511.

Liu C., Yang Z. J., Li G. R., Feng J., Deng K. J., Huang J., Ren Z. L. (2006): Sequence Variation of Chloroplast Gene *infA-rpl36* Region Occurred in some *Triticeae* Species. *Hereditas*, 28(10): 1265-1272.

Lysák M., Doležel J. (2012): Estimation of nuclear DNA content in *Sesleria* (*Poaceae*). *Caryologia*, 51(2): 123–132.

Mahelka V., Kopecký D. (2010): Gene Capture from across the Grass Family in the Allohexaploid *Elymus repens* (L.) Gould (*Poaceae*, *Triticeae*) as Evidenced by ITS, GBSSI, and Molecular Cytogenetics. *Molecular Biology and Evolution*, 27(6): 1370-1390.

Mahelka V., Krak K., Kopecký D., Fehrer J., Šafář J., Bartoš J., Hobza R., Blavet N., Blattner F. (2017): Multiple horizontal transfers of nuclear ribosomal genes between phylogenetically distinct grass lineages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(7): 1726–1731.

Ma W., Anderson O., Kuchel H., Bonnardeaux Y., Collins H., Morell M., Langridge P., Appels, R. (2009): Genomics of Quality Traits. In *Genetics and Genomics of the Triticeae*. New York, NY: Springer US: 611–652.

Morrone O., Aagesen L., Scataglini M., Salaricato D., Denham S., Chemisquy M., Sede S., Giussani L., Kellogg E., Zuloaga F. (2012): Phylogeny of the *Paniceae* (*Poaceae*: *Panicoideae*). *Cladistics*, 28(4): 333–356.

Nasuda S., Hudakova S., Schubert I., Houben A., Endo T. (2005): Stable barley chromosomes without centromeric repeats. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(28): 9842–9847.

Neves N., Delgado M., Silva M., Caperta A., Morais-Cecílio L., Viegas W. (2005): Ribosomal DNA heterochromatin in plants. *Cytogenetic and Genome Research*, 109(1-3): 104–111.

OECD (2018), Crop production (indicator). [online] [navštíveno 13. 5. 2018] Dostupné z: <https://data.oecd.org/agriculture.htm>

- Paux E., Roger D., Badaeva E., Gay G., Bernard M., Sourdille P., Feuillet C. (2006): Characterizing the composition and evolution of homoeologous genomes in hexaploid wheat through BAC-end sequencing on chromosome 3B. *The Plant Journal*, 48(3): 463–474.
- Pickering R., Johnston P. (2005): Recent progress in barley improvement using wild species of *Hordeum*. *Cytogenetic and Genome Research*, 109(1-3): 344–349.
- Presting G., Malysheva L., Fuchs J., Schubert I. (1998): A Ty3/gypsy retrotransposon-like sequence localizes to the centromeric regions of cereal chromosomes. *The Plant Journal*, 16(6): 721–728.
- Preston J., Kellogg E. (2006): Reconstructing the evolutionary history of paralogous APETALA1/FRUITFULL-like genes in grasses (*Poaceae*). *Genetics*, 174(1): 421–437.
- Psota V., Hartmann J., Sejkorová Š., Loučková T., Vejražka K. (2009): 50 Years of Progress in Quality of Malting Barley Grown in the Czech Republic. *Journal of the Institute of Brewing*, 115(4): 279–291.
- Qiu H., Cai G., Luo J., Bhattacharya D., Zhang N. (2016): Extensive horizontal gene transfers between plant pathogenic fungi. *BMC Biology*, 14(1): 1–11.
- Raskina O., Barber J., Nevo E., Belyayev A. (2008): Repetitive DNA and chromosomal rearrangements: speciation-related events in plant genomes. *Cytogenetic and Genome Research*, 120(3-4): 351–357.
- Rosato M., Kovařík A., Garilletei R., Rosselló J., Li X. (2016): Conserved Organisation of 45S rDNA Sites and rDNA Gene Copy Number among Major Clades of Early Land Plants. *PLOS ONE*, 11(9): 1–18.
- Rychlik W., Spencer W. J., Rhoads R. E (1990): Optimization of the annealing temperature for DNA amplification *in vitro*. *Nucleic Acids Research*, 18(21): 6409-6412.
- Salamini F., Özkan H., Brandolini A., Schäfer-Pregl R., Martin W. (2002): Genetics and geography of wild cereal domestication in the near east. *Nature Reviews Genetics*, 3(6): 429–441.

Sánchez-Ken J., Clark L. (2010): Phylogeny and a new tribal classification of the *Panicoideae* s.l. (*Poaceae*) based on plastid and nuclear sequence data and structural data. *American Journal of Botany*, 97(10): 1732–1748.

Santos F., Guyot R., do Valle C., Chiari L., Techio V., Heslop-Harrison P., Vanzela A. (2015): Chromosomal distribution and evolution of abundant retrotransposons in plants: gypsy elements in diploid and polyploid *Brachiaria* forage grasses. *Chromosome Research*, 23(3): 571–582.

Sergeeva E., Shcherban A., Adonina I., Nesterov M., Beletsky A., Rakitin A., Mardanov A., Ravin N., Salina E. (2017): Fine organization of genomic regions tagged to the 5S rDNA locus of the bread wheat 5B chromosome. *BMC Plant Biology*, 17(S1): 144–155.

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

Schulte D., Close T., Graner A., Langridge P., Matsumoto T., Muehlbauer G., Sato K., Schulman A., Waugh R., Wise R., Stein N. (2009): The International Barley Sequencing Consortium--At the Threshold of Efficient Access to the Barley Genome. *Plant Physiology*, 149(1): 142–147.

Solis-Montero L., Vergara C., Vallejo-Marín M. (2015): High incidence of pollen theft in natural populations of a buzz-pollinated plant. *Arthropod-Plant Interactions*, 9(6): 599–611.

Soreng R., Peterson P., Romaschenko K., Davidse G., Teisher J., Clark L., Barberá P., Gillespie L., Zuloaga F. (2017): A worldwide phylogenetic classification of the *Poaceae* (*Gramineae*) II: An update and a comparison of two 2015 classifications. *Journal of Systematics and Evolution*, 55(4): 259–290.

Sreenivasulu N., Graner A., Wobus U. (2008): Barley Genomics: An Overview. *International Journal of Plant Genomics*, vol. 2008: 1–13.

Staňková H., Hastie A., Chan S., Vrána J., Tulpová Z., Kubaláková M., Visendi P., Hayashi S., Luo M., Batley J., Edwards D., Doležel J., Šimková H. (2016): BioNano genome mapping of individual chromosomes supports physical mapping and sequence assembly in complex plant genomes. *Plant Biotechnology Journal*, 14(7): 1523–1531.

Stegemann S., Bock R. (2009): Exchange of Genetic Material Between Cells in Plant Tissue Grafts. *Science*, 324(5927): 649–651.

Šafář J., Noa-Carrazana J., Vrána J., Bartoš J., Alkhimova O., Sabau X., Šimková H., Lheureux, F., Caruana M., Doležel J., Piffanelli P. (2004): Creation of a BAC resource to study the structure and evolution of the banana (*Musa balbisiana*) genome. *Genome*, 47(6): 1182–1191.

Taketa S., Ando H., Takeda K., Von Bothmer R. (2001): Physical locations of 5S and 18S-25S rDNA in Asian and American diploid *Hordeum* species with the I genome. *Heredity*, 86(5): 522–530.

Taketa S., Ando H., Takeda K., Von Bothmer R. (1999): Physical locations of 5S and 18S-25S rDNA in Asian and American diploid *Hordeum* species with the I genome. *Heredity*, 86(5): 522–530.

Vicient C. (2010): Transcriptional activity of transposable elements in maize. *BMC Genomics*, 11(1): 1–10.

Wicker T., Taudien S., Houben A., Keller B., Graner A., Platzer M., Stein N. (2009): A whole-genome snapshot of 454 sequences exposes the composition of the barley genome and provides evidence for parallel evolution of genome size in wheat and barley. *The Plant Journal*, 59(5): 712–722.

Zhao L., Zhang N., Ma P., Liu Q., Li D., Guo Z., Janke A. (2013): Phylogenomic Analyses of Nuclear Genes Reveal the Evolutionary Relationships within the BEP Clade and the Evidence of Positive Selection in *Poaceae*. *PLoS ONE*, 8(5).

Zohary D., Hopf M. (2000): *Domestication of plants in the old world: the origin and spread of cultivated plants in West Asia, Europe, and the Nile Valley*. (3rd ed). New York: Oxford University Press.