

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecké fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Charakterizace potomstev rodičů nesoucích
B chromozóm u planého čiroku
(*Sorghum purpureosericeum*)**

Bakalářská práce

Zdena Kašparová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2022

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

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta
Akademický rok: 2020/2021

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Zdena KAŠPAROVÁ
Osobní číslo: R19833
Studijní program: B1501 Biologie
Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie
Téma práce: Charakterizace potomstev rodičů nesoucích B chromozóm u planého čiroku (*Sorghum purpureosericeum*)
Zadávající katedra: Katedra buněčné biologie a genetiky

Zásady pro vypracování

- Izolace DNA z klasů
- Spektrofotometrické stanovení koncentrace DNA
- Identifikace rostlin nesoucích B chromozóm pomocí průtokového cytometru
- PCR amplifikace B specifických markerů
- Elektroforetická separace PCR produktů v agarozovém gélu

Rozsah pracovní zprávy:

Rozsah grafických prací:

Forma zpracování bakalářské práce: tištěná

Seznam doporučené literatury:

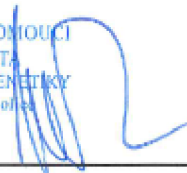
- Hariprasanna K and Patil JV: Sorghum: Origin, Classification, Biology and Improvement. In: Sorghum Molecular Breeding, Madhusudhana et al. (eds). Springer India. 2015
- Jones RN and Rees H: B chromosomes. Academic Press Inc. (London) LTD. 1982
- Bataglia E: Cytogenetics of B chromosomes. *Caryologia* 2016, 17:1, 245-299
- Wu TP: B chromosomes in *Sorghum purpureosericeum*. *Proc. Natl. Sci. Coun. B. ROC* 8 (3), 1984, pp 198-209
- Douglas RN and Birchler JA: B chromosomes. In: Chromosome structure and aberrations. Bhat TA and Wani AA (eds). Springer India 2017, pp 13-39
- Jones RN: Transmission and drive involving parasitic B chromosomes. *Genes* 2018, 9, 388
- Dolezel J, Bartos J: Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. *Ann Bot.* 2005;95(1):99-110. doi:10.1093/aob/mci005
- Karafiátová M, Bednářová M, Said M, et al. The B chromosome of *Sorghum purpureosericeum* reveals the first pieces of its sequence. *J Exp Bot.* 2021;72(5):1606-1616. doi:10.1093/jxb/eraa548

Vedoucí bakalářské práce:

Mgr. Miroslava Karafiátová, Ph.D.
UEB Olomouc, AVČR

Datum zadání bakalářské práce: 15. března 2021
Termín odevzdání bakalářské práce: 31. července 2022

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
KATEDRA BUNĚČNÉ BIOLOGIE A GENETIKY
Šlechtělská 27, 783 71 Olomouc – Holýšovice
L.S. tel.: +420 585 634 901
-2-



8-02-2122

doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.
děkan

prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.
vedoucí katedry

V Olomouci dne 8. února 2022

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora: Zdena Kašparová

Název: Charakterizace potomstev rodičů nesoucích B chromozóm u planého čiroku (*Sorghum purpureosericeum*)

Typ práce: bakalářská

Pracoviště: Katedra buněčné biologie a genetiky

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

Rok obhajoby práce: 2022

Klíčová slova: *Sorghum purpureosericeum*, B chromozómy, DNA markery, PCR, průtoková cytometrie

Počet stran: 45

Jazyk: čeština

Souhrn

Sorghum purpureosericeum je jedním z planých druhů rodu *Sorghum*, u kterého se nad rámec standardního chromozómového komplementu vyskytují i tzv. B chromozómy. Tyto nadbytečné elementy vykazují nepravidelnou dědičnost a obecně vysokou míru polymorfismu. V rámci jednoho druhu tak většinou existuje více typů B chromozómů. U planých čiroků komplikuje studium těchto nadbytečných chromozómů i výrazná míra cizosprašnosti, která udržuje výraznou heterogenitu celého genomu.

Cílem předkládané práce byla charakterizace potomstev čtyř linií rodičů nesoucích ve svém genomu 1 B chromozóm za účelem určení míry cizosprašnosti. Typ B chromozómu byl u potomků stanoven na základě přítomnosti/absence dvou B-specifických PCR markerů CL115 a CL168. Odlišný vzor přítomnosti markerů mezi rodičem a jeho potomky pak poukazoval na možné cizosprašení. Z celkově analyzovaných 49 jedinců, sedm mělo jiný typ B chromozómu než původní rodič. Z toho lze usoudit, že k opylení pylem z jiné rostliny dochází přibližně ve 14 % případů.

Bibliographical identification:

Author's first name and surname: Zdena Kašparová

Title: Characterization of the offspring of parents carrying the B chromosome in wild sorghum (*Sorghum purpureosericeum*)

Type of thesis: bachelor

Department: Department of Cell Biology and Genetics

Supervisor: Mgr. Miroslava Karafiátová, Ph.D.

The Year of Presentation: 2022

Keywords: *Sorghum purpureosericeum*, B chromosomes, DNA markers, PCR, flow cytometry

Number of pages: 45

Language: Czech

Summary

Sorghum purpureosericeum is one of the wild species of the genus *Sorghum* carrying so-called B chromosomes in addition to A complement. These supernumerary elements are passed irregularly to the progeny and have typically high degree of polymorphism. Generally, there are more B chromosome forms described in one species. Moreover, the study of the B chromosomes of wild sorghums is burdened by significant level of cross-pollination, which continuously maintains the genome heterogeneity.

The aim of this thesis was to characterize four offspring lines of parents carrying the 1 B chromosome in their genome with respect to the frequency of cross-pollination. The type of the B chromosome in the offspring was determined based on the presence/absence of the two marker patterns CL115 and CL158. Marker pattern different from the parent may result from pollination with the pollen of the other than parent plant. Among the 49 individuals tested, seven did not match to the parents. These results suggest that cross-pollination may occur with frequency approximately 14 %.

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením školitelky Mgr. Miroslavy Karafiátové, Ph.D. a uvedla všechny použité zdroje a literaturu.

V Olomouci dne

.....

.....

Poděkování

Ráda bych poděkovala Mgr. Miroslavě Karafiátové, Ph.D. za její vedení, užitečné rady, věnovaný čas, pomoc, a hlavně za motivaci pro práci ve vědecké oblasti. Také děkuji pracovníkům Centra strukturní a funkční genomiky rostlin Ústavu experimentální botaniky AV ČR v Olomouci za jejich ochotu a podporu.

Obsah

1 Úvod	1
2 Cíle práce	2
3 Literární přehled	3
3.1 <i>Sorghum</i>	3
3.1.1 Taxonomie rodu	3
3.1.2 Anatomie rostliny	3
3.1.3 Jaderný genom čiroku	5
3.1.4 Divoké druhy čiroku	5
3.1.5 Světová produkce a využití čiroku.....	6
3.2 B chromozómy.....	7
3.2.1 Morfologie B chromozómů	7
3.2.2 Dědičnost B chromozómů	8
3.2.3 Funkce B chromozómů	10
3.2.4 Původ B chromozómů	10
3.2.5 B chromozómy u rodu <i>Sorghum</i>	11
3.3 Vybrané metody analýzy rostlinného genomu	13
3.3.1 Molekulární DNA markery	13
3.3.2 Průtoková cytometrie.....	15
4 Materiál a metody	17
4.1 Biologický materiál	17
4.2 Použité chemikálie a roztoky	17
4.3 Použité přístroje	18
4.4 Postupy experimentálních a vyhodnocovacích metod.....	19
4.4.1 Příprava vzorků pro analýzu průtokovou cytometrií	19
4.4.2 Izolace genomické DNA.....	19
4.4.3 Amplifikace B-specifických sekvencí	19

4.4.4 Elektroforetická separace PCR produktů v agarozovém gelu	20
5 Výsledky	21
5.1 Detekce B chromozómů v F1 potomstvu pomocí průtokové cytometrie	21
5.2 Výsledky izolace DNA z klasů rostlin čiroku <i>S. purpureosericeum</i>	22
5.3 Detekce variant B chromozómu na základě přítomnosti B specifických markerů.....	23
5.4 Analýza míry cizosprašnosti ve vybraných potomstvech.....	26
6 Diskuse.....	28
7 Závěr.....	30
8 Literatura.....	31
8.1 Internetové zdroje	37

Seznam obrázků

Obrázek 1: Klasifikace rodu <i>Sorghum</i> dle de Wetta (1978)	3
Obrázek 2: Variabilita květenství kultivovaného (a) a planého (b) čiroku: a – shloučená lata (<i>S. bicolor</i>), b – rozkladitá lata (<i>S. purpureosericeum</i>)	4
Obrázek 3: Karyotypy dvou zástupců čiroku: a – diploidního (<i>S. bicolor</i>), b – tetraploidního (<i>S. laxiflorum</i>).....	5
Obrázek 4: B chromozómy v karyotypu dvou vybraných druhů rostlin: a – <i>Crepis capillaris</i> , b – <i>Zea mays</i> . B chromozómy jsou naznačeny šipkami.....	8
Obrázek 5: Diagram znázorňující nondisjunkci B chromozómů během I. a II. pylové mitózy v samčích gametofytech	9
Obrázek 6: Detekce B chromozómů v metafázi I meiózy u druhu <i>S. purpureosericeum</i> pomocí cytogenetických markerů SpuCL168 (zelená) a SpuCL115 (růžová). Bivalent tvořený B chromozómy je naznačen bílou šipkou. Růžovou šipkou je označeno mikrojádru, které je typickým znakem B ⁺ pletiv a obvykle je tvořeno B chromozómem.	12
Obrázek 7: Schematické znázornění analýzy vzorků průtokovou cytometrií.....	16
Obrázek 8: Histogramy z průtokového cytometru: a – B ⁺ rostlina (578-10), b – B ⁰ rostlina (495-4).....	21
Obrázek 9: Produkty PCR amplifikace B-specifických oblastí v DNA čiroku <i>S. purpureosericeum</i> v potomcích linie 369.....	24
Obrázek 10: Produkty PCR amplifikace B-specifických oblastí v DNA čiroku <i>S. purpureosericeum</i> v potomcích linie 495.....	24
Obrázek 11: Produkty PCR amplifikace B-specifických oblastí v DNA čiroku <i>S. purpureosericeum</i> v potomcích linie 571.....	25
Obrázek 12: Produkty PCR amplifikace B-specifických oblastí v DNA čiroku <i>S. purpureosericeum</i> v potomcích linie 578.....	26

Seznam tabulek

Tabulka 1: Složení PCR směsi pro amplifikaci B-specifických sekvencí čiroku <i>S. purpureosericeum</i>	20
Tabulka 2: Program PCR amplifikace DNA čiroku <i>S. purpureosericeum</i> pro dlouhé fragmenty doporučený výrobcem	20
Tabulka 3: Výsledky cytometrické analýzy jedinců v F1 potomstvu na přítomnost B chromozómu v květech čiroku <i>S. purpureosericeum</i>	22
Tabulka 4: Přehled koncentrací genomické DNA čiroku <i>S. purpureosericeum</i> vyizolovaných z klasů analyzovaných jedinců	22
Tabulka 5: Přehled přítomnosti B-specifických markerů u jednotlivých jedinců a jejich rodičů.....	27

1 Úvod

Sorghum patří do čeledi lipnicovitých (*Poaceae*). Tento rod sdružuje na 25 druhů, z nichž nejnámější a nejvíce pěstovaný je čirok dvoubarevný (*S. bicolor*), který je jedním ze tří kultivovaných druhů. Dalších 22 druhů je tzv. divokých (Dickson, 2011). Divoké druhy nejsou zemědělsky využívány tak jako ty kultivované, avšak i ony mají své využití zejména jako stavební materiál. Mezi jednotlivými druhy čiroku jsou velké morfologické i cytologické rozdíly, neboť jejich genomy jsou velmi variabilní (Price *et al.*, 2005). K variabilitě silně přispívá skutečnost, že čirok patří do skupiny tzv. často-cizosprašných druhů. To znamená, že jde sice o primárně samosprašnou rostlinu, ale značná část květů je opylena pylem z jiné rostliny (Rakshit a Bellundagi, 2019).

U pěti druhů rodu *Sorghum* byly v genomu nalezeny tzv. B chromozómy (Bednářová *et al.*, 2021). To jsou nadbytečné elementy, které nevykazují klasický model Mendelovské dědičnosti, neboť se dědí nepravidelně, jsou pro jedince postradatelné a také velice polymorfní. Jejich počet se liší jak mezi jednotlivými generacemi, tak i u jedinců jedné linie (Camacho *et al.*, 2000). V genomu organismu obvykle nemají žádný význam, při určitém počtu však mohou mít negativní efekt na daný organismus (Valente *et al.*, 2016). B chromozómy se hned několika svými vlastnostmi vymykají základním pravidlům obecně platným pro biologické systémy. Objasnění mechanismů jejich netradičního chování je tak velmi atraktivní vědeckou otázkou, jejíž odpovědi mohou mít značný přesah do buněčné biologie a medicíny.

2 Cíle práce

Cílem práce bylo zjistit, zda a s jakou četností dochází v nepřírodných podmínkách k cizosprašnému opylení u druhu *Sorghum purpureosericeum*. Plán experimentů vycházel z faktu, že v rámci druhu existují minimálně dvě formy B chromozómů, které je možné odlišit kombinací dvou PCR markerů.

Analýza cizosprašnosti byla provedena na potomstvu čtyř rodičovských linií s identifikovanou formou B chromozómu. V F1 potomstvu byl pomocí markerů určen typ B chromozómu a detekovaná odlišnost formy B chromozómu rodiče a potomků pak naznačovala na možné cizosprašení.

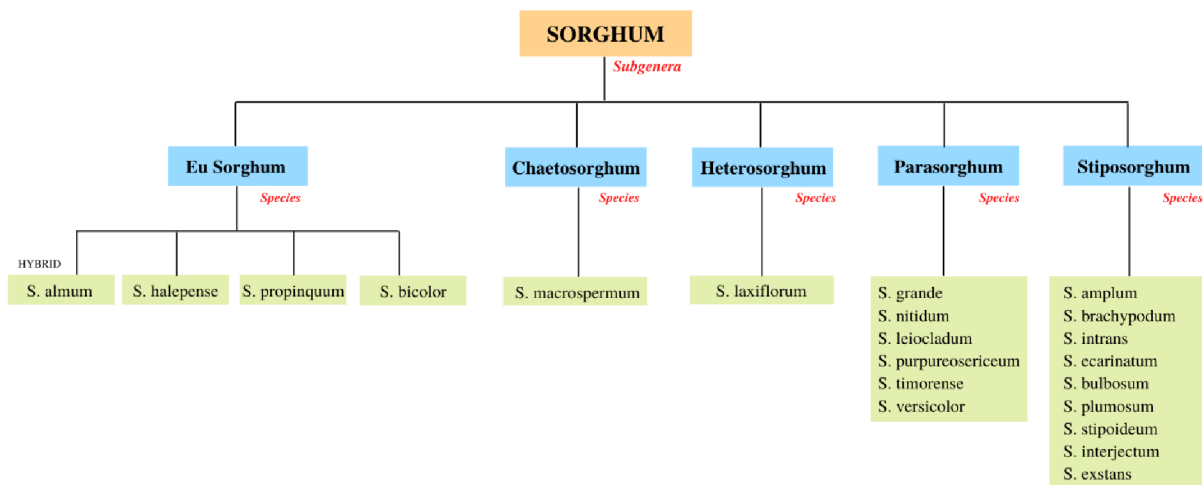
3 Literární přehled

3.1 *Sorghum*

3.1.1 Taxonomie rodu

Rod čirok (*Sorghum*) je řazen do čeledi lipnicovitých (*Poaceae*), podčeledi prosovitě (*Panicoidea*), kmene *Andropogoneae*. Jedná se o rod se zástupci jednoletých i víceletých rostlin. Čirok pochází z Afriky a v dnešní době je pěstován hlavně v tropických a subtropických oblastech Afriky a jižní Indie (Venkateswaran *et al.*, 2015). Rod *Sorghum* sdružuje 25 druhů, z čehož je 22 považováno za tzv. divoké druhy. Zbylé tři jsou kultivované druhy (Dickson, 2011). Systematické rozdělení jednotlivých druhů není stále pevně zakotveno kvůli široké variabilitě čiroků.

V druhé polovině 20. století byla vydána klasifikace podle de Wetta (1978) (Obr. 1), která se využívá i v současné době. De Wett rozdělil rod *Sorghum* do pěti hlavních sekcí: *Stiposorghum*, *Parasorghum*, *Eu Sorghum*, *Heterosorghum* a *Chaetosorghum*. Do sekce *Eu Sorghum* jsou zařazeny tři kultivované druhy čiroku, a to konkrétně *S. halepense*, *S. bicolor* a *S. propinquum*. Do zbylých čtyř sekcí spadají divoké druhy (de Wett, 1978).

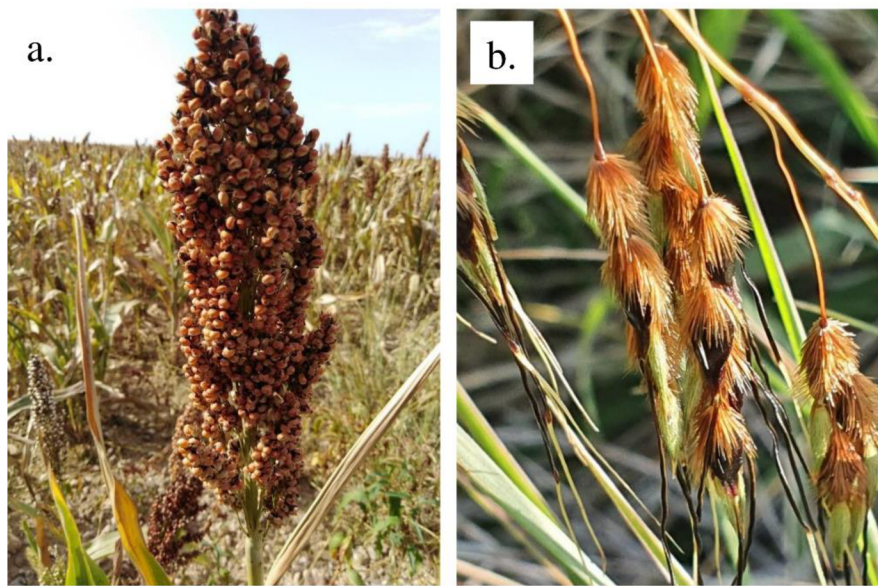


Obrázek 1: Klasifikace rodu *Sorghum* dle de Wetta (1978). Modifikováno z: Ananda *et al.*, 2020

3.1.2 Anatomie rostliny

Nejdůležitějším zástupcem je kultivovaný čirok dvoubarevný (*Sorghum bicolor*), který svým vzrůstem dosahuje až pěti metrů. Primární kořeny vyrůstají v průběhu klíčení a následně jsou nahrazeny kořeny sekundárními. V rámci rodu *Sorghum* však existuje mnoho morfologických odlišností mezi kultivovanými a divokými druhy (House, 1985). Čárkovité listy jsou na stéble rozmístěné podle genotypu rostliny (Hermuth *et al.*, 2012). U některých typů mohou vyrůstat

z prostřední části (např. *S. vulgare*), naopak u některých jsou listy více či méně rozmístěny po celém stéble (např. *S. halepense*) (House, 1985). Jednotlivé druhy čiroku se liší počtem listů. Dobře adaptované rostliny mají obvykle 14-17 listů, ty méně adaptované mohou mít až 30 (House, 1985). Květenstvím čiroku je lata dlouhá až 25 cm, která může být buď shloučená (*S. bicolor*) (Obr. 2a), nebo rozkladitá (*S. purpureosericeum*) (Obr. 2b). Skládá se z jednotlivých klásků, které vyrůstají v párech. Z páru je vždy jeden oboupohlavný a druhý je čistě samičí. Klásky obsahují kvítky, které jsou vždy dva (fertilní a sterilní) (Rooney, 2007) a obsahují tři tyčinky a jeden pestík (Hermuth *et al.*, 2012).



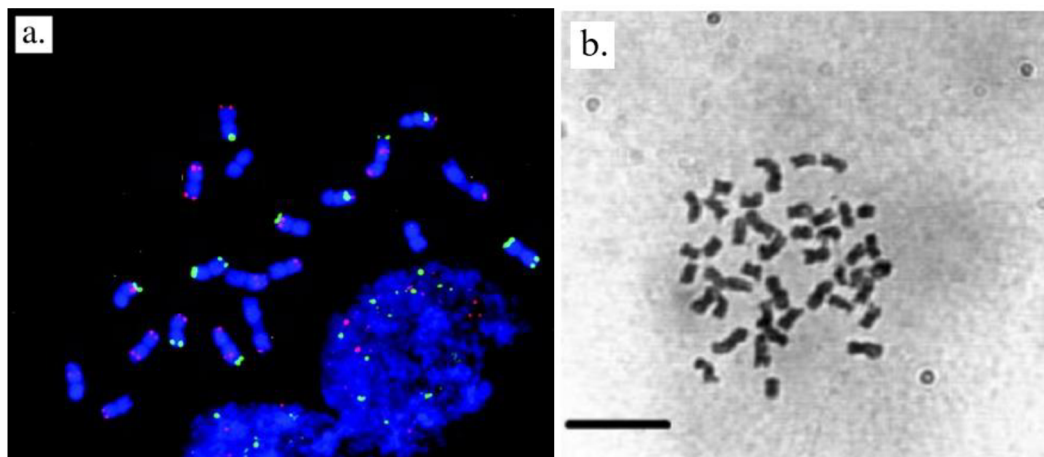
Obrázek 2: Variabilita květenství kultivovaného (a) a planého (b) čiroku: a – shloučená lata (*S. bicolor*), b – rozkladitá lata (*S. purpureosericeum*). Převzato z: www.identify.plantnet.org

Byť je čirok primárně samosprašná rostlina, opylení květu pylem jiné rostliny není výjimkou. Cizosprašení nastává v průměru v šesti procentech případů (Rakshit a Bellundagi, 2019), což řadí čirok do omezené skupiny tzv. často-cizosprašných (often cross-pollinated) druhů podobně jako bob obecný (*Vicia faba*), sezam indický (*Sesamum indicum*) nebo kukuřice setá (*Zea mays*) (Alemayehu a Keneni, 2019). Divoké odrůdy se kříží mezi sebou ve větší míře, než ty kultivované (Sobetski, 2015). Výměna pylu může probíhat pomocí větru (anemogamie) nebo hmyzu (entomogamie). U kultivovaných druhů kvetení nastává mezi 55. a 70. dnem od vyklíčení rostlinky. Ještě před otevřením květu blizna přijímá pyl z prašníku, přičemž po dobu deseti dnů zůstává vnímavá, tudíž během tohoto období může být na bliznu přijat pyl i z jiné rostliny (Sobetski, 2015).

3.1.3 Jaderný genom čiroku

Genom jednotlivých zástupců čiroku je velmi variabilní, což má spojitost s druhovou rozmanitostí zástupců tohoto rodu. Tato rozmanitost se projevuje jak na úrovni obsahu genetické informace, tak v jejím uspořádání v jádře. V rámci komplexní studie z roku 2005 byla změřena velikost genomu 21 čiroků, kde nejmenší genom měl druh *S. timorense* (622 Mbp) a největší pak *S. plumosum* (5047 Mbp) (Price *et al.*, 2005). Oba tyto druhy patří mezi divoké čiroky, jejichž genomy vykazují vyšší variabilitu než kultivované druhy. Nejdůležitější kultivovaný druh (*S. bicolor*) měl velikost genomu 818 Mbp (Price *et al.*, 2005)

Analýzy karyotypu čiroku byly velmi složité kvůli podobnostem ve velikosti a morfologii chromozómů u jednotlivých druhů (Dogget, 1988). Mnoho druhů z rodu *Sorghum* je diploidních ($2n = 2x = 20$) (Obr. 3a), ale jsou známé i druhy, které jsou tetraploidní ($2n = 4x = 40$) (Obr. 3b), například *S. laxiflorum* (Price *et al.*, 2005). Tetraploidní stav byl považován za původní. Výsledky analýz na tomto poli ale nejsou jednotné. Zatímco analýzy meiotického párování chromozómů tomu nenasvědčují (Endrizzi a Morgan, 1955), studie postavené na fluorescenční *in situ* hybridizaci tuto teorii naopak podporují (Gomez *et al.*, 1997).



Obrázek 3: Karyotypy dvou zástupců čiroku: a – diploidního (*S. bicolor*). Převzato z: Kim *et al.*, 2005, b – tetraploidního (*S. laxiflorum*). Převzato z: Price *et al.*, 2005

3.1.4 Divoké druhy čiroku

Divoké druhy čiroku jsou rozdělené do čtyř sekcí: *Stiposorghum*, *Parasorghum*, *Heterosorghum* a *Chaetosorghum*. *Stiposorghum* zahrnuje 10 druhů, které jsou endemické pro Austrálii. Každý druh má ve své genetické výbavě 10 somatických chromozómů v diploidní sadě kromě *S. interjectum* a *S. plumosum*, které mohou mít i 40 chromozómů ($2n = 4x = 40$). Tyto dva druhy jsou také jediné ze sekce *Stiposorghum*, které jsou vytrvalé, zatímco ostatních

osm druhů je jednoletých (Ananda *et al.*, 2020). Hlavním morfologickým znakem této sekce je malý, přisedlý klásek a velmi dobře vyvinutý pedicelátní klásek (Lazarides *et al.*, 1991).

Do sekce *Heterosorghum* spadá pouze jeden druh – *S. laxiflorum* vyskytující se v Austrálii, Nové Guineji a na filipínských ostrovech (Price *et al.*, 2005). Jedná se o jednoletou rostlinu s poměrně velkým, přisedlým kláskem a ovoidní až elipsoidní obilkou.

S. macrospermum je jediný druh spadající do sekce *Chaetosorghum*. Vzhledem je podobný jako *S. laxiflorum*, ale roste pouze v Západní Austrálii (Lazarides *et al.*, 1991). Jde o jediný druh čiroku, který nemá na klasu nody (Garber a Snyder, 1951).

Sekce *Parasorghum* zahrnuje sedm druhů a všechny, kromě dvou, mají původ v Austrálii. Je to velmi variabilní sekce. Druhy mají 10, 20 i 30 chromozómů v diploidní sadě. Řadí se sem *S. nitidum*, který má ze všech zástupců sekce největší geografické rozšíření (Ayyanger a Ponnaiya, 1941). Mezi divoké druhy sekce *Parasorghum* patří i *Sorghum purpureosericeum*, který má původ v západní Indii a východní Africe (Ananda *et al.*, 2020). Jedná se o jednoletou rostlinu s 10 somatickými chromozómy v diploidní sadě ($2n = 2x = 10$), popsáni byli ale i tetraploidní jedinci (Lazarides *et al.*, 1991).

3.1.5 Světová produkce a využití čiroku

Celosvětově je čirok pátou nejvíce pěstovanou plodinou po pšenici (*Triticum aestivum*), rýži (*Oryza sativa*), kukuřici (*Zea mays*) a ječmeni (*Hordeum vulgare*) (Dickson, 2011). Významnými producenty čiroku jsou Indie, Nigérie, Súdán, Spojené státy americké, Niger a Mexiko (Prasad a Staggenborg, 2011). V roce 2011 bylo 42 % světové produkce čiroku vypěstováno v afrických zemích. Na tomto kontinentu jde o druhou nejvíce pěstovanou plodinu, neboť hraje významnou roli v zajištění obživy (Dickson, 2011). Čirok, zejména *Sorghum bicolor*, má velmi široké využití hlavně v potravinářství jako surovina pro vaření piva, k výrobě vína a zdroj krmiva. Vzhledem k tomu, že proteiny v zrnech čiroku neobsahují lepek, je využíván také pro výrobu bezlepkové mouky pro celiaky (Prasad a Staggenborg, 2011). Čirok je bohatým zdrojem vitamínu B, draslíku, fosforu, železa a zinku (Glew *et al.*, 1997; Anglani, 1998). Komerčně se používá k výrobě ethanolu, lepidel, vosků, ale i stavebních materiálů a v posledních letech je to také významná plodina v bioenergetice (Antonopoulou *et al.*, 2008). Divoké druhy čiroku se na zrno nepěstují, ale jejich stébla mohou být využívána jako stavební materiál, zejména pak v Africe (Prasad a Staggenborg, 2011).

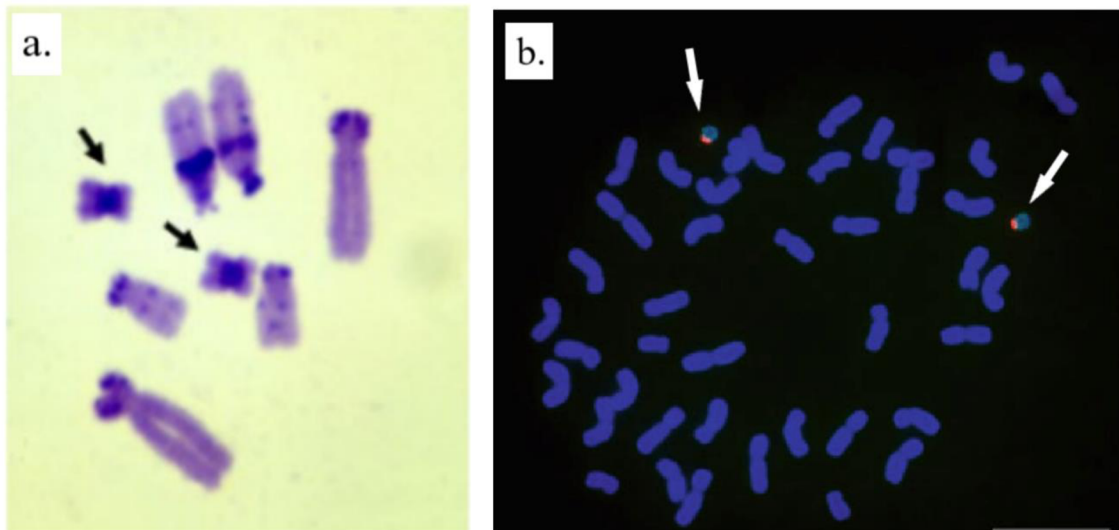
3.2 B chromozómy

B chromozómy, nebo také postradatelné či nadbytečné chromozómy, jsou elementy, které byly pozorovány v karyotypu mnoha rostlin, živočichů i hub. V největší míře se vyskytují u rostlin, kde bylo dosud identifikováno na 1 300 druhů nesoucích B chromozóm. V živočišné říši byly pak pozorovány u více jak 500 druhů (Camacho, 2005). Tyto chromozómy nejsou pro buňku nezbytné, tzn. buňka je k ničemu nevyužívá a jejich přítomnost nemá patologický vliv na buněčné dělení (Rakshit *et al.*, 2016). Počet B chromozómů v jedné buňce je značně variabilní a druhově specifický. Liší se v počtu dokonce i mezi jednotlivci v rámci populace (Camacho, 2005). Rekordmanem mezi rostlinami je sukulent *Pachyphytum fitkaris* s 50 B chromozómy (Uhl a Moran, 1973) a v živočišné říši je maximum 24 B chromozómů u korejské polní myši *Apodemus peninsulae* (Volobujev a Timina, 1980). Obecně nemá přítomnost B chromozómů žádný vliv na fenotyp hostitele, nicméně vyšší počty významně ovlivňují jeho fitness (Jones a Rees, 1982). První popis těchto chromozómů přinesl do cytologie Edmund B. Wilson, který studoval B chromozómy na hmyzu *Metapodius thomasi* (1907). Následně byly B chromozómy prokázány u brouka bláznivce kukuřičného (*Diabrotica virgifera*) (Stevens, 1908). První rostlinou, u které byly B chromozómy popsány, byla kukuřice setá (*Zea mays*) (Kuwada, 1915).

3.2.1 Morfologie B chromozómů

B chromozómy jsou z pohledu velikosti velmi různorodé (Obr. 4), ale obecně lze říci, že jsou většinou středně velké v porovnání se standardními chromozómy. Jejich velikost se liší u různých druhů. Například u myši *Reithrodontomys megalotis* jsou B chromozómy menší než všechny její nejmenší chromozómy A (Peppers *et al.*, 1997). Naproti tomu ryba *Alburnus alburnus* má viditelně větší B chromozómy, než jsou její A chromozómy (Ziegler *et al.*, 2003). B chromozómy jsou také velmi polymorfní, což je dáno jejich podstatou. Jako postradatelné elementy nejsou pod selekčním tlakem a jejich evoluce je velice dynamická (Ahmad *et al.*, 2020). Je tak běžné, že se v rámci jednoho druhu vyskytuje více forem B chromozómu, a to i současně v jedné buňce (Ruban *et al.*, 2014).

Co do polohy centromery, jsou B chromozómy nejčastěji akrocentrické, například u kobyly *Eyprepocnemis plorans* (Henriques-Gil *et al.*, 1984), nebo metacentrické, například u myši *Apodemus peninsulae* (Boeskorov *et al.*, 1991). Poloha centromery B chromozómů často odráží polohu u A chromozómů daného jedince (Camacho, 2005). B chromozómy jsou z většiny tvořené heterochromatinem, což je způsobeno vysokým obsahem opakujících se DNA: satelitních (satDNA), ribozomálních (rDNA) a mobilních elementů (Camacho *et al.*, 2000).



Obrázek 4: B chromozómy v karyotypu dvou vybraných druhů rostlin: a – *Crepis capillaris*. Převzato z: Jones *et al.*, 2008, b – *Zea mays*. Převzato z: Gent *et al.*, 2017. B chromozómy jsou naznačeny šipkami

3.2.2 Dědičnost B chromozómů

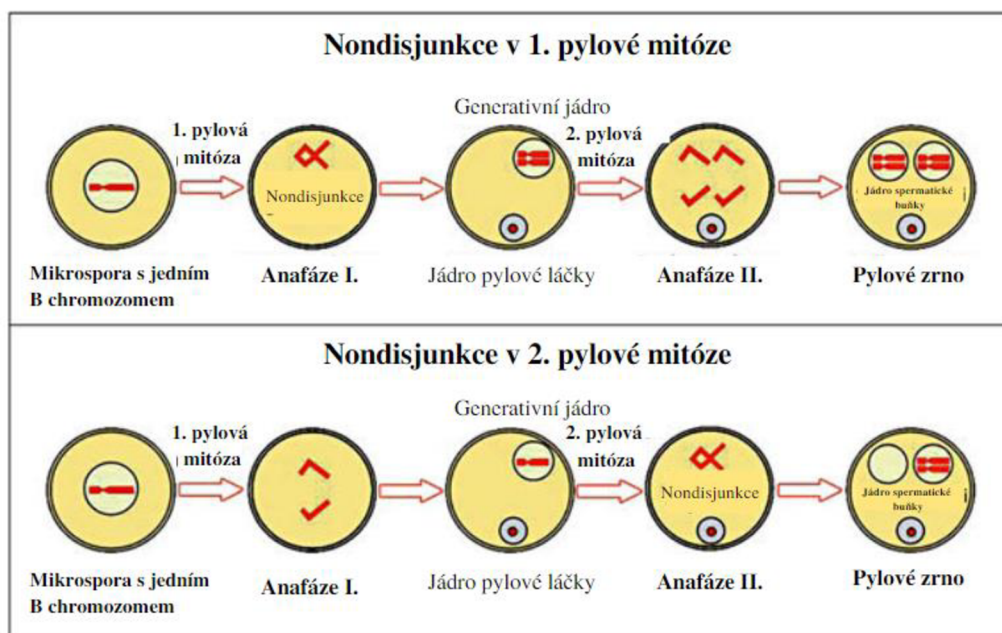
Výrazným znakem B chromozómů je jejich nepravidelná dědičnost, která se neřídí klasickými Mendelovými zákony (Camacho *et al.*, 2000). Jako postradatelné jaderné elementy s většinou negativním dopadem na nositele bojují proti selekčnímu tlaku speciálními akumulacími mechanismy, které zvyšují pravděpodobnost přenosu B chromozómů do potomstva (Houben, 2017). Akumulace nastává několika mechanismy během jaderného dělení, a to těsně před meiózou (pre-meiotický mechanismus), během meiózy (meiotický mechanismus), nebo hned po meióze (post-meiotický mechanismus) (Jones, 1991).

Pre-meiotický mechanismus je ve své podstatě zvýšení počtu B chromozómů v buňkách zárodečné linie během vývoje. Jakmile takovéto buňky vstoupí do meiózy, mají průměrný počet B chromozómů vyšší, než byl původně v zygotě (Nur, 1963). Tento mechanismus byl nejlépe popsán u sarančete *Locusta migratoria*, kdy se buňky s vyšším počtem B chromozómů preferenčně stávají spermatogonií (Kayano, 1971). U tohoto organismu byla poprvé zároveň vizualizována mitotická nondisjunkce B chromozómů během embryogeneze (Pardo *et al.*, 1995).

Meiotický mechanismus akumulace závisí na funkční asymetrii meiotických produktů, neboť u samičí meiózy je jedna ze dvou buněk z obou meiotických dělení přirozeně neživotaschopná (polární tělíska). Alely nebo chromozómy mají 50% šanci na eliminaci do polárního tělíska, ale B chromozómům se může podařit uniknout této eliminaci díky přednostní migraci na životaschopný meiotický pól (Camacho, 2005). Tento mechanismus byl popsán u samičí

meiózy mnoha rostlin a živočichů, např. *Lilium callosum*, kdy B chromozóm místo do polárního tělíska migruje do sekundárního oocytu (Kayano, 1957). U sarančete *Myrmeleotettix maculatus* bylo navíc pozorováno, že dělicí vřeténko je velmi nápadně asymetrické v samičí metafázi I, přičemž pól vajíčka je delší než pól polárního tělíska. Díky tomuto mají B chromozómy vyšší šanci se orientovat a segregovat v anafázi I směrem k jádru vajíčka (Hewitt, 1976). U moučného hmyzu *Pseudococcus affinis* se B chromozómy akumulují během samčí meiózy díky tomu, že se vyhnou heterochromatinizaci a eliminují chromozómální sadu charakteristickou pro spermatogenezi (Nur, 1962).

Nejčastějším mechanismem akumulace B chromozómů u rostlin je **post-meiotický mechanismus**. Celý proces spočívá v řízené nondisjunkci v průběhu I. nebo II. pylové mitózy. Tento mechanismus byl poprvé popsán u žita (*Secale cereale*), kdy B chromozóm preferenčně migruje směrem ke generativnímu jádru během I. pylové mitózy a po druhém dělení nesou obě spermatické buňky B chromozóm (Obr. 5) (Hasegawa, 1934). K nondisjunkci během II. pylové mitózy dochází u kukuřice (*Zea mays*), což má za následek, že spermatické buňky nejsou totožné. Jedna spermatická buňka B chromozóm přenáší a druhá ne (Obr. 5). Ta nesoucí B chromozóm potom preferenčně oplodní vajíčko a zajistí se tak přenos do embrya (Roman, 1950).



Obrázek 5: Diagram znázorňující nondisjunkci B chromozómů během I. a II. pylové mitózy v samčích gametofytech. Převzato z: Jones *et al.*, 2008

3.2.3 Funkce B chromozómů

B chromozómy jsou sice považovány za „nefunkční“, i přesto u nich ale byly popsány jak negativní, tak i pozitivní účinky na jedince (Valente *et al.*, 2016). Obecně je vliv B chromozómů spojován se s níženou vitalitou a fertilitou a tento efekt je výraznější se zvyšujícím se počtem chromozómů (Camacho *et al.*, 2000). Nejvýraznějším negativním efektem přítomnosti B chromozómů je totiž velké množství energie potřebné na jejich stabilizaci v průběhu dělení (Jones a Rees, 1982). Tolerance k počtu B chromozómů v jedné buňce je tak druhově specifická a velmi variabilní (Camacho, 2005). Jednu z nejvyšších tolerancí k B chromozómům u rostlin má kukuřice setá (*Zea mays*), která ve svém karyotypu může obsahovat až 34 B chromozómů (Jones a Rees, 1982). U žita (*Secale cereale*) je tolerance výrazně menší a negativní efekt je patrný již při šesti B chromozómech (Houben, 2017). Jeden z mála pozitivních efektů byl pozorován u houby *Nectria haematococca*, která vykazovala díky přítomnosti B chromozómů rezistenci vůči antibiotikům (Coleman *et al.*, 2009).

B chromozómy mohou hrát roli při určování pohlaví, jako je tomu u vrubozubcovitých ryb (Yoshida *et al.*, 2011). U jednoho druhu těchto ryb jsou B chromozómy charakteristické pro samice. Druhové křížení se samicemi s B chromozómy a bez nich prokázalo, že přítomnost B chromozómů vede u druhu k vychýlení poměru pohlaví ve prospěch samic (Yoshida *et al.*, 2011). V důsledku přítomnosti B chromozómů byl také jednoznačně prokázán zvýšený počet chiasmat a frekvence rekombinací v průběhu meiózy (Burt a Trivers, 2006). Tato modulace rekombinací má potenciál využití při zdokonalování plodin podobně jako modifikace B chromozómů na tzv. umělé minichromozómy, na jejichž syntéze a aplikaci se již několik let pracuje u kukuřice (Birchler, 2020). B chromozóm kukuřice lze také využít ke genetickému mapování, což umožňuje existence translokačních linií A x B chromozómů (Beckett, 1991).

3.2.4 Původ B chromozómů

Původ B chromozómů není přesně znám, mluví se však o dvou hlavních hypotézách vzniku. První z nich vychází z faktu, že jsou B chromozómy odvozené od A chromozómů. S největší pravděpodobností jde o vedlejší produkt karyotypové evoluce, přičemž některé z extra A chromozómů nebo jejich centrické fragmenty se mohou stát B chromozómy, respektive tzv. neo-B chromozómy, které procházejí rychlou strukturální modifikací a je tedy nemožné, aby docházelo k párování s A chromozómem při meióze (Camacho *et al.*, 2000). Procesy, kterými se neo-B chromozómy stávají úplnými B chromozómy, nejsou stále dostatečně popsány. Je

možné, že výskyt aneuploidie je hlavní zdroj vzniku B chromozómů z chromozómů A. Tyto polysomické chromozómy v sadě jsou často snadno heterochromatinizované a jejich vzhled a meiotické chování se přibližuje charakteru B chromozómům (Camacho, 2005). Dalším možným mechanismem vzniku B chromozómů jsou mutace, kterým podléhají právě neo-B chromozómy. Nejčastěji jde o tzv. Robertsonovu translokaci, kdy dochází ke zlomu akrocentrických chromozómů a následnému spojení dlouhých ramen chromozómů (Houben *et al.*, 2012).

Druhá teorie se opírá o mezidruhový původ, tedy že B chromozómy jsou výsledkem mezidruhového křížení (Perfetti a Werren, 2001). Těchto případů však existuje velmi málo. Typickým příkladem je parazitická voska *Nasonia vitripennis*, u které byl díky molekulárním studiím u chromozómu PSR (chromozóm parazitického poměru otcovského pohlaví) zjištěn hybridní původ. B chromozóm v tomto případě způsobuje vznik čistě mužských populací. U této hypotézy je důležité zmínit, že tyto cizí chromozómy u mezidruhových hybridů nejsou obvykle stabilní (Dhar *et al.*, 2019).

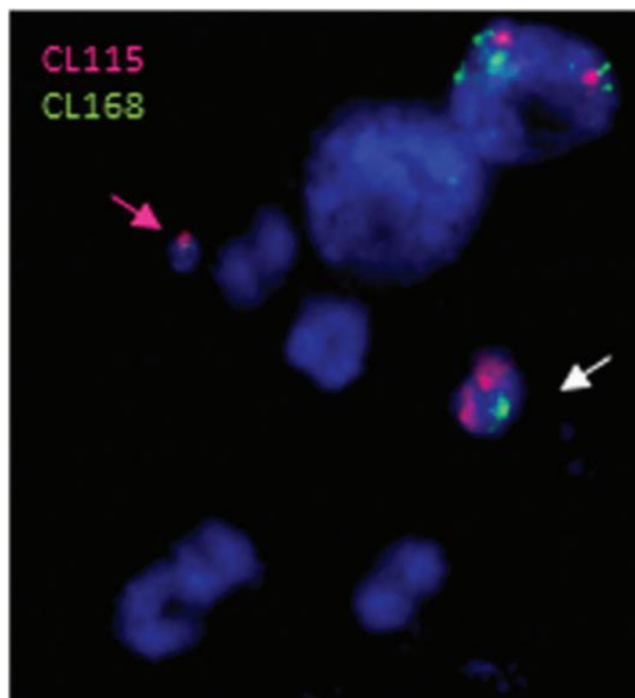
3.2.5 B chromozómy u rodu *Sorghum*

V rámci rodu *Sorghum* byly B chromozómy objeveny u pěti druhů, a to vždy pouze u diploidních zástupců (Bednářová *et al.*, 2021). Jejich počet se pohybuje v rozmezí 1-6 B chromozómů. Ačkoliv mezi B chromozómy u jednotlivých druhů existuje velký polymorfismus, mají jednu zásadní společnou charakteristiku – stabilní výskyt pouze v reprodukčních pletivech. Ostatní pletiva jsou buď zcela prostá B chromozómu, nebo vykazují různá stádia mozaicismu (Karafiátová *et al.*, 2021).

Jako první byly B chromozómy pozorovány u druhu *S. bicolor* spp. *verticilliflorum* (Huskins a Smith, 1934). U tohoto druhu je však jejich přítomnost velmi rozporuplná (Bednářová *et al.*, 2021). Autoři studie objevili pár fragmentů během samčí meiózy, které byly menší, než A chromozómy, a byly připojeny k jejich bivalentům. Považovali je tedy za nadpočetné chromozómy, ale je také možné, že se jednalo o pouhé fragmenty A chromozómů (Huskins a Smith, 1934). V případě tohoto druhu se totiž na chromozómech objevují tzv. křehká místa (Durkin a Glover, 2007), která mohou vést k chromozomálním přestavbám a také mohou způsobit vznik fragmentů během buněčného dělení, čímž může dojít k ovlivnění organizace genomu (Bustamante *et al.*, 2014).

Nejpodrobnější informace o B chromozómech u rodu *Sorghum* jsou k dispozici u druhu *S. purpureosericeum*, kde je jako první popsal Janaki-Ammal (1939). V genomu tohoto druhu

se může vyskytovat až šest B chromozómů (Janaki-Ammal, 1940). Darlington a Thomas (1941) popsali u tohoto druhu tři typy B chromozómů: dlouhé (isoforma), střední a krátké, které se navzájem nepárují. Nejčastěji se v genomu vyskytuje střední typ (Darlington a Thomas, 1941). B chromozómy u *S. purpureosericeum* navíc vykazují jedinečný způsob akumulace, kdy mezi I. a II. pylovou mitózou mohou probíhat další dělení, která pravděpodobně vedou k multiplikaci B chromozómů (Darlington a Thomas, 1941). *S. purpureosericeum* je také jediným druhem z divokých čiroků, k němuž jsou dostupné informace o sekvenci (Karafiátová *et al.*, 2021). Osekvenování genomu nesoucích B chromozóm poskytlo základní data pro odvození molekulárních a cytogenetických markerů (Obr. 6), které jsou nutným základem pro další výzkum směřujícímu k pochopení specifického chování B chromozómů u tohoto druhu (Karafiátová *et al.*, 2021).



Obrázek 6: Detekce B chromozómů v metafázi I meiózy u druhu *S. purpureosericeum* pomocí cytogenetických markerů SpuCL168 (zelená) a SpuCL115 (růžová). Bivalent tvořený B chromozómy je naznačen bílou šipkou. Růžovou šipkou je označeno mikrojádru, které je typickým znakem B+ pletiv a obvykle je tvořeno B chromozómem. Převzato z: Karafiátová *et al.*, 2021

B chromozómy byly dále pozorovány u druhu *S. halepense* (Raman *et al.*, 1971). Během meiózy v pylových buňkách bylo zjištěno aberantní chování B chromozómů, kdy akcesorní bivalenty vykazovaly opožděnou nondisjunkci, což vedlo k následné eliminaci B chromozómů (Raman *et al.*, 1965).

V roce 1960 Raman a Krishnaswami pozorovali B chromozómy u *S. nitidum*. Popsali, že B chromozómy byly stejně velké jako A chromozómy (Raman a Krishnaswami, 1960). Posledním druhem, u kterého byly B chromozómy pozorovány, je *S. stipoidesum*. U tohoto druhu byl popsán pouze jeden typ B chromozómu. Zajímavostí je, že B chromozómy u *S. stipoidesum* jsou kratší, než A chromozómy a také jsou euchromatizované, což je odlišuje od B chromozómů ostatních druhů (Wu, 1992). Další kuriozitou u tohoto druhu je numerická variabilita B chromozómů nejen mezi jednotlivými klásky, ale dokonce i mezi květy jednotlivých klásků (Wu, 1992).

3.3 Vybrané metody analýzy rostlinného genomu

Existence rostlin je základním předpokladem pro přežití všech „vyšších“ organismů na Zemi. Vývoj nástrojů molekulární genetiky umožnil analýzu struktury, evoluce a funkce celých rostlinných genomů (Gebhart *et al.*, 2005). Díky analýzám transkriptů, proteinů a metabolitů přítomných v rostlinných buňkách nebo tkáních se daří sbírat informace, které vedou k lepšímu integrovanému pochopení funkce genomu. Současná paleta metod dostupných k charakterizaci genetické informace je velice široká a kritickým bodem je vždy dobře zvolená technika, která nás přivede k odpovědi na naše otázky. Shrnout logicky všechny nástroje, které lze použít, je velmi těžko uchopitelné, a proto jsou dále zmíněny jen ty s přímou vazbou na řešení této práce.

3.3.1 Molekulární DNA markery

Molekulární markery představovaly průlom v analýzách rostlinných genomů. Jejich využití je založeno na přirozené variabilitě mezi druhy/jedinci. Prvními typy molekulárních markerů byly markery fenotypové a následně biochemické (Mishra *et al.*, 2014). S nástupem éry sekvenačních technologií byly ale oba tyto typy markerů překonány tzv. DNA markery. Rozmach jejich aplikace je úzce spjat s popsáním polymerázové řetězové reakce (PCR) (Mullis, 1990). Základní charakteristikou vhodných markerů je snadná dostupnost, jednoduchost a rychlost jejich testování, vysoký polymorfismus a reprodukovatelnost, kodominantní dědičnost či frekvence výskytu v genomu (Adhikari *et al.*, 2017).

Molekulární DNA markery jsou založeny na přirozeně se vyskytujících polymorfismech v sekvencích DNA, a tak je prvotním předpokladem pro využití DNA markerů dostupnost sekvence studovaného genomu (Mishra *et al.*, 2014). V závislosti na tom, jak je polymorfismus

analyzován, rozdělujeme molekulární DNA markery do dvou kategorií: polymorfismy založené na hybridizaci a polymorfismy založené na polymerázové řetězové reakci (PCR) (Kumar, 1999). Ty založené na hybridizaci zahrnují omezenou skupinu RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*), kdy jsou polymorfismy generovány v důsledku mutací (bodové mutace, inverze nebo translokace), a VNTR (*Variable Number Tandem Repeats*). V tomto případě jsou polymorfismy způsobeny rozdílem v počtu repetitiv (Kumar, 1999).

Většina systémů DNA markerů je však založena na PCR (Kumar, 1999). Ta se stala převratnou technikou molekulární biologie pro výzkum nukleových kyselin. PCR umožňuje rychlou amplifikaci požadovaného úseku DNA na vysoký počet kopií. Pro amplifikaci je třeba vybrat dva vhodné jednovláknové oligonukleotidové primery komplementární s templátovou DNA, termostabilní DNA polymerázu a pufrovací systém (Adhikari *et al.*, 2017). Mezi časté systémy markerů využívajících PCR patří např. AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), SSR (*Single Sequence Repeats*) a SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) (Sharma *et al.*, 2008).

AFLP technika je spolehlivá a užitečná při detekci polymorfismu mezi blízkými příbuznými genotypy (Olson *et al.*, 1989). Procedura AFLP sestává ze tří hlavních fází: štěpení DNA pomocí restriktivního enzymu, selektivní amplifikace sad primerů navržených restriktivními fragmenty a gelové analýzy amplifikovaných fragmentů (Sharma *et al.*, 2008). AFLP se využívá jako nástroj pro DNA fingerprinting, klonování a mapování sekvencí genomové DNA specifické pro různé druhy (Ehrlich *et al.*, 1991).

SSR, často označované jako mikrosatelity, mají v genomech časté zastoupení a vykazují velkou variabilitu v populacích, což z nich dělá velmi vhodné markery (Mishra *et al.*, 2014). SSR markery se široce využívají v rostlinných studiích, kdy se analýza nejvíce zaměřuje na dinukleotidové a trinukleotidové sekvence (Henry, 2012).

SNP označují změnu jedné báze v sekvenci DNA jedinců v populaci (Brookes, 1999). Jsou hojně užívanými molekulárními markery, ačkoli jejich frekvence a výskyt se v rámci druhů liší. SNP jsou detekovány jak v nekódující, tak v kódující oblasti genomu (Aerts *et al.*, 2002). V kódujících oblastech SNP mohou nebo nemusí měnit aminokyselinovou sekvenci, ale musí vykazovat 100% asociaci s fenotypovým znakem. To umožňuje efektivní použití SNP při selekci za pomoci markerů (MAS), konstrukci genetických map s vysokou hustotou a izolaci cíleného genu pomocí pozičního klonování (Adhikari *et al.*, 2017).

PCR markery jsou obecně široce využívány pro konstrukci genetických map, pro vnitrodruhové srovnání různých genomů, k detekci genetických rozdílů mezi odrůdami, kmeny či jednotlivými rostlinami stejného druhu (Gostimsky *et al.*, 2005).

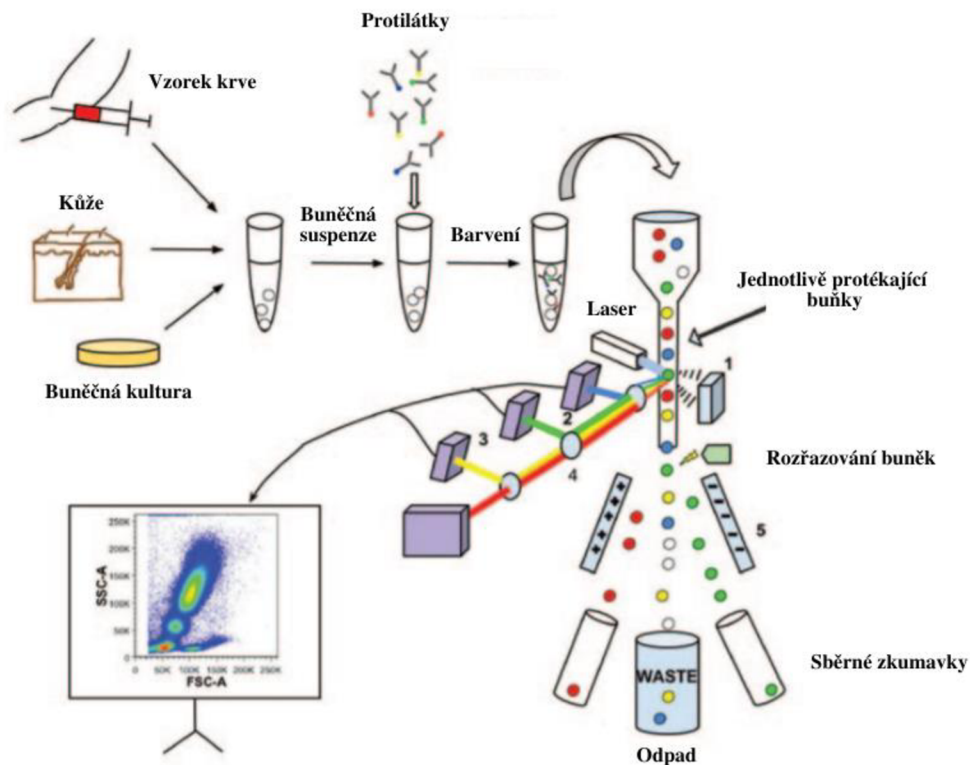
3.3.2 Průtoková cytometrie

Cytometrické techniky souhrnně označují metody užívané k měření různých vlastností buněk. Jedním z nosných odvětví je průtoková cytometrie, která výrazně přispěla ke studiu struktury a funkce rostlinných genomů a díky své rychlosti a preciznosti našla tato metoda uplatnění v mnoha oborech (Doležel *et al.*, 1997). Cytometrie měří parametry buňky každé individuálně a uplatňuje se hlavně při charakterizaci heterogenních buněčných populací (Jahan-Tigh *et al.*, 2012).

Na rozdíl od konvenčních technik, které vyžadují fixaci materiálu na pevném povrchu, průtoková cytometrie analyzuje buňky suspendované v pufovacím roztoku (Doležel *et al.*, 1997). K izolaci jader rostlinných buněk se využívají různé druhy pufrů, které zajišťují integritu a stabilitu jádra a zabraňují degradaci DNA. Po izolaci v nosném pufru musí být jádra fluorescenčně nabarvena (Doležel *et al.*, 1997). Nejčastěji se využívají fluorescenční barviva DAPI a propidium jodid, přičemž DAPI se pevně váže v molekule DNA hlavně na oblasti bohaté na AT. Propidium jodid se naopak váže na DNA interkalací mezi báze s malou nebo žádnou preferencí sekvence (Doležel *et al.*, 1997). Laminární tok buněk je usměřován průtokem unášecí tekutiny, do které jsou buňky vstříkovány otvorem o malém průměru (Obr. 7) (McKinnon, 2018). Buňky při analýze protékají tryskou jedna za druhou a signál z jejich povrchů je snímán jedním nebo více lasery. Průtoková cytometrie je výkonná metoda pro současné získávání informací o různých buněčných procesech, včetně exprese povrchových markerů, intracelulárních cytokinů, signalizace proteiny nebo o buněčném cyklu (Jahan-Tigh *et al.*, 2012).

V rámci studií rostlinných genomů je průtoková cytometrie vhodný nástroj pro analýzy různých charakteristik genomu (Macey, 2007). Jednou z nich je určení ploidie, kdy je pomocí této techniky možné určit stupeň ploidie u analyzovaných rostlin porovnáním polohy píku analyzované rostliny (vzorek) polohou píku druhu se známou ploidií (standard) a to buď v separátních vzorcích (externí standard), nebo v rámci jednoho směsného vzorku (interní standard). Více spolehlivý postup je analýza vzorku s interním standardem (Doležel *et al.*, 1997). Další aplikací je stanovení velikosti genomu. Díky současnému měření vzorku s interním standardem a následným výpočtem poměru poloh píku v G1 pozici, je možné získat

velikost genomu analyzovaného vzorku (Doležel *et al.*, 1997). Důležitou aplikací průtokové cytometrie je možnost separovat a sbírat populace buněk identifikované multiparametrickou analýzou (Macey, 2007). Třídění buněk je využíváno k oddělení a čištění buněk nebo částic pro další analýzu (McKinnon, 2018).



Obrázek 7: Schematické znázornění analýzy vzorků průtokovou cytometrií. Legenda: (1) Detektor předního rozptylu, (2) detektor bočního rozptylu, (3) fluorescenční detektor, (4) filtry a zrcadla (5) vychylovací desky. Převzato z: Jahan-Tigh *et al.*, 2012

Průtokovou cytometrií lze ve specifických případech také využít pro detekci B chromozómů v jaderném genomu. Přítomnost B chromozómů musí však vyvolat takovou změnu v obsahu DNA, která je detekovatelná cytometrem. U druhu *Sorghum purpureosericeum*, kde jsou B chromozómy relativně velké a představují jednu desetinu jaderné DNA, je možné detekovat i jednu kopii B chromozómu, která vede k jasné separaci populací jader nesoucích B chromozóm (Karafiátová *et al.*, 2021). U kukuřice seté (*Zea mays*), kde B chromozómy tvoří podstatně menší hmotu jádra, je možná stejná detekce, ale změny průtokového karyotypu jsou znatelné, pokud jsou v jádře přítomny minimálně tři kopie B chromozómu (Blavet *et al.*, 2021).

4 Materiál a metody

4.1 Biologický materiál

Analýza cizosprašnosti byla prováděna na potomcích čtyř rostlin čiroku *Sorghum purpureosericeum* (původní položka IS18947, genová banka ICRISAT) nesoucích jeden B chromozóm: rostlina 369 (13 F1 jedinců), rostlina 495 (23 F1 jedinců), rostlina 571 (F1 7 jedinců) a rostlina 578 (10 jedinců). Semena byla vyloupána, přes noc namočena v kádince s vodou a následně se nechala klíčit na Petriho misce na buničité vatě a filtračním papíru. Vysazené rostliny byly pěstované ve fytotronu v režimu světlo/tma 10/14 hod, teplotách 29/25 °C a vlhkosti 60 %. Kvůli absenci B chromozómů ve většině somatických buněk pletiv byly veškeré analýzy prováděny na květenství.

4.2 Použité chemikálie a roztoky

Použité chemikálie

- 2-Merkaptoethanol (Sigma-Aldrich, kat. č.: M6250)
- Agaróza (Sigma-Aldrich, kat. č.: A9539)
- Bromfenolová modř (Sigma-Aldrich, kat. č.: B0126)
- DAPI (Roche, kat. č.: 10236276001)
- Deionizovaná voda
- Dihydrát disodné soli ethylendiamintetraoctové kyseliny (EDTA) (Sigma-Aldrich, kat. č.: E9884)
- Ethidium bromid (Sigma-Aldrich, kat. č.: E8751)
- Chlorid sodný (Sigma-Aldrich, kat. č.: 59222C)
- Kyselina boritá (Lach-Ner, kat. č.: 10017-AP0)
- O'GeneRuler™ Express DNA Ladder, ready-to-use (ThermoFisher Scientific, kat. č.: SM1563)
- PrimeSTAR GXL Premix (kat. č.: R051B) obsahující PrimeSTAR GXL DNA polymerázu, PrimeStar GXL pufr pro polymerázu (Mg²⁺ plus) a směs nukleotidů
- RNase A (Machery Nagel, kat. č.: R1961S)
- Spermin tetrahydrochloridu (Sigma-Aldrich, kat. č.: S2876)
- Tris base (Sigma-Aldrich, kat. č.: 77-86-1)
- Triton X-100 (Sigma-Aldrich, kat. č.: 11332481001)

Použité roztoky

- DAPI (0,1 mg/ml): 5 mg DAPI rozpustit v 50 ml destilované vody
- 0,5M EDTA (1 l): 186,1 g dihydrátu disodné soli ethylendiamintetraoctové (EDTA) rozpustit v 800 ml destilované vody, doplnit do 1 l a pH upravit na 8
- 5x TBE pufr (1 l): 54 g Tris báze a 27,5 g kyseliny borité rozpustit v destilované vodě a doplnit do 1 l a pH upravit na 8
- 0,5x TBE pufr (1 l): 100 ml 5x TBE pufru a 900 ml destilované vody
- LB01 pufr s 2-merkaptioethanolem (1 l): smísit 1 815 mg Tris báze, 744,5 mg EDTA- Na_2 , 174 mg spermin tetrahydrochloridu, 5,965 g chloridu draselného, 1 169 g chloridu sodného, 1000 μl 0,1% Tritonu X-100 a doplnit do 1 l destilovanou vodu, pH upravit na 8, přidat 550 μl 2-merkaptioethanolu
- Roztok ethidium bromidu (1 l): 50 g ethidium bromidu rozpustit ve 100 ml destilované vody

Použité kity

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

4.3 Použité přístroje

- Centrifuga Mega Star 600R (VWR International)
- Elektroforetická horizontální aparatura Owl A6 (Thermo Fisher Scientific)
- Laboratorní váhy Vibra (Shinko Denshi)
- Lyofilizátor CoolSafe s vakuovou pumpou VacSafe (LaboGene)
- Oscilační mlýn MM301 (Retsch)
- Spektrofotometr NanoDrop One/One^C Microvolume UV-Vis (Thermo Fisher)
- Stolní centrifuga MiniStar silverline (VWR International)
- Termocykler ThermalCycler C1000 Touch (BIO-RAD)
- UV transiluminátor InGenius3 (Syngene)
- Vodní lázeň Jouan (Trigon-plus)
- Zdroj k elektroforéze Owl EC300XL2 (Thermo Fisher Scientific)

4.4 Postupy experimentálních a vyhodnocovacích metod

4.4.1 Příprava vzorků pro analýzu průtokovou cytometrií

Vzhledem k tomu, že přítomnost B chromozómu u druhu *S. purpureosericeum* je stabilní téměř výhradně jen v reprodukčních pletivech, byla jeho detekce stanovena na klasech jednotlivých potomků. Vzorky květů byly odebírány při nasazení prvního klasu zhruba 5-6 týdnů od vysetí. Z každé rostliny bylo odebráno z prvního klasu 3-5 květů pro cytometrickou analýzu. Květy byly homogenizovány žiletkou ve 400 µl LB01 pufru, v jehož prostředí došlo k uvolnění jader. Suspenze byla přefiltrována přes 20 µm nylonový filtr a jádra byla obarvena přidáním 15 µl fluorescenčního barviva DAPI. Takto připravené vzorky byly analyzovány průtokovým cytometrem.

4.4.2 Izolace genomické DNA

Genomická DNA byla izolována z klasů rostlin čiroku *S. purpureosericeum* pěstovaných ve fytotronu. Odebrané klasy byly vloženy do mikrozkušavek a vysušeny v lyofilizátoru ve vakuu přes noc. Do zkumavek byly k vysušeným klasům přidány skleněné kuličky a klasy byly homogenizovány v oscilačním mlýnku (3 min, 27 otáček/s). Izolace DNA byla provedena pomocí komerčního kitu NucleoSpin Plant II dle protokolu výrobce. Výsledná koncentrace izolované DNA byla stanovena spektrofotometricky přístrojem NanodropOne. Izolovaná genomická DNA byla skladována při teplotě -20 °C a následně použita při PCR amplifikaci.

4.4.3 Amplifikace B-specifických sekvencí

Sekvence specifické pro B chromozóm byly amplifikovány pomocí primerů pro repetitivní klastry CL115 a CL168, které byly již dříve identifikovány v sekvenačních datech z rostlin nesoucích B chromozómy (Karafiátová *et al.*, 2021). Fragmenty byly vzhledem k délce (4100 bp a 1290 bp) amplifikovány pomocí speciální PrimeSTAR polymerázy a oba markery byly detekovány v jedné reakci. Reakční směs byla napipetována dle doporučení výrobce (Tab. 1). Připravené vzorky byly promíchány, zcentrifugovány a umístěny do termocycleru s nastaveným časovým a teplotním profilem pro PCR reakci (Tab. 2).

Tabulka 1: Složení PCR směsi pro amplifikaci B-specifických sekvencí čiroku *S. purpureosericum*

Reagencie PCR směsi	Objem [μl]
PrimeSTAR 5×PS GXL pufr	4
PrimeSTAR dNTP mix (2,5 mM)	1,6
PrimeSTAR GXL DNA polymeráza (1,25 U/μl)	0,4
Primer CL115-F (100 μM) (5' -TTA GCG CTG CAC TGA GTG AT-3')	0,25
Primer CL115-R (100 μM) (5' -CTA GCG TGC ACA CAC ACC TT-3')	0,25
Primer CL168-F (100 μM) (5' -CGC TGC TGC TTG TTT TGA TA-3')	0,25
Primer CL168-R (100 μM) (5' -GGG TGT TCA AAG GTG ATG CT-3')	0,25
Genomická DNA (100 ng)	Dle koncentrace
Deionizovaná voda	Do 20 μl
Celkový objem	20

Tabulka 2: Program PCR amplifikace DNA čiroku *S. purpureosericum* pro dlouhé fragmenty doporučený výrobcem

Fáze	Teplota [°C]	Čas	Počet cyklů
Denaturace	98	10 sekund	
Nasedání primerů	60	15 sekund	34
Syntéza	68	4 minuty	

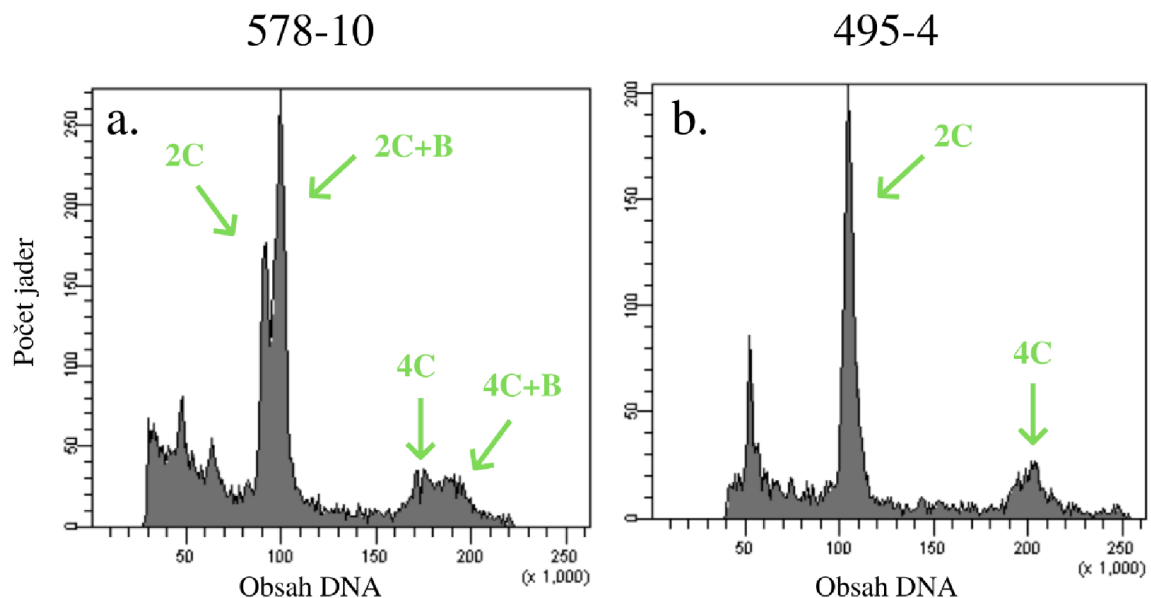
4.4.4 Elektroforetická separace PCR produktů v agarozovém gelu

Pro elektroforetickou separaci PCR produktů byl připraven 1,5% agarozový gel v 0,5× TBE pufru. Do první jamky bylo naneseno 6 μl O'GeneRuler™ Express DNA Ladder. Do dalších jamek 3 μl PCR produktu s 3 μl bromfenolové modři. Produkty byly separovány při 80 V po dobu 1 hod a 20 min. Po dokončení separace byly produkty barveny v roztoku ethidia bromidu na 20 min. Produkty byly poté vizualizovány UV transilumiátorem a vyhodnoceny pomocí programu GeneSnap.

5 Výsledky

5.1 Identifikace jedinců nesoucích B chromozóm v F1 potomstvu pomocí průtokové cytometrie

Prvním krokem práce byla charakterizace F1 jedinců vybraných linií z pohledu přítomnosti B chromozómu. Rostliny nesoucí B chromozóm byly určeny pomocí průtokové cytometrie, kdy se vycházelo z faktu, že přítomnost B chromozómu se projeví změnou v obsahu DNA. Vzhledem k tomu, že B chromozóm u čiroku tvoří v haploidní sadě asi 1/6 obsahu DNA, lze vidět změny ve velikosti genomu již při jedné kopii B chromozómu. V cytometru se přítomnost B chromozómu projeví separací dalších populací v diploidní (2C) i tetraploidní (4C) konstituci a tyto odpovídají jádrům nesoucím B chromozóm (Obr. 8a). Pokud B chromozóm přítomen není, změny obsahu DNA nejsou zaznamenány (Obr. 8b).



Obrázek 8: Histogramy z průtokového cytometru: a – B+ rostlina (578-10), b – B0 rostlina (495-4)

Celkem bylo analyzováno 53 rostlin, z nichž bylo 28 B+ a 25 B0 (Tab.3). Tato četnost výskytu B chromozómů v potomcích 1B rodičů přibližně odpovídá očekávané distribuci v situaci, že nedochází k opylení pylem z jiné rostliny.

Tabulka 3: Výsledky cytometrické analýzy jedinců v F1 potomstvu na přítomnost B chromozómu v květech čiroku *S. purpureosericeum*

Linie 369		Linie 495				Linie 571		Linie 578	
Číslo rostliny	Screening [B+/B0]	Číslo rostliny	Screening [B+/B0]	Číslo rostliny	Screening [B+/B0]	Číslo rostliny	Screening [B+/B0]	Číslo rostliny	Screening [B+/B0]
369-1	B0	495-1	B0	495-17	B0	571-1	B0	578-1	B+
369-2	B+	495-2	B+	495-18	B0	571-2	B+	578-3	B+
369-3	B+	495-4	B0	495-19	B0	571-3	B+	578-6	B0
369-4	B0	495-5	B+	495-20	B0	571-4	B0	578-7	B0
369-5	B+	495-7	B0	495-21	B0	571-5	B+	578-8	B+
369-6	B+	495-8	B0	495-22	B0	571-6	B+	578-9	B0
369-8	B0	495-9	B+	495-23	B0	571-7	B+	578-10	B+
369-9	B+	495-10	B0	495-24	B0			578-11	B0
369-10	B+	495-11	B+	495-25	B0			578-12	B+
369-11	B+	495-12	B+	495-26	B0			578-13	B+
369-12	B+	495-14	B+						
369-13	B+	495-15	B+						
369-14	B+	495-16	B0						
Celkem	13	Celkem		23		Celkem	7	Celkem	10
B+	10	B+		7		B+	5	B+	6
B0	3	B0		16		B0	2	B0	4

5.2 Výsledky izolace DNA z klasů analyzovaných rostlin čiroku *S. purpureosericeum*

Z celkového počtu 53 rostlin analyzovaných průtokovou cytometrií byla genomická DNA vyizolována pouze ze 49 z nich za účelem detekce markerů specifických pro B chromozóm. Čtyři jedinci uhynuli před izolací a byli z analýzy vyřazeni. DNA byla izolována z mladých klasů pomocí komerčního kitu a výsledné koncentrace vyizolované DNA jsou uvedeny v tabulce 4.

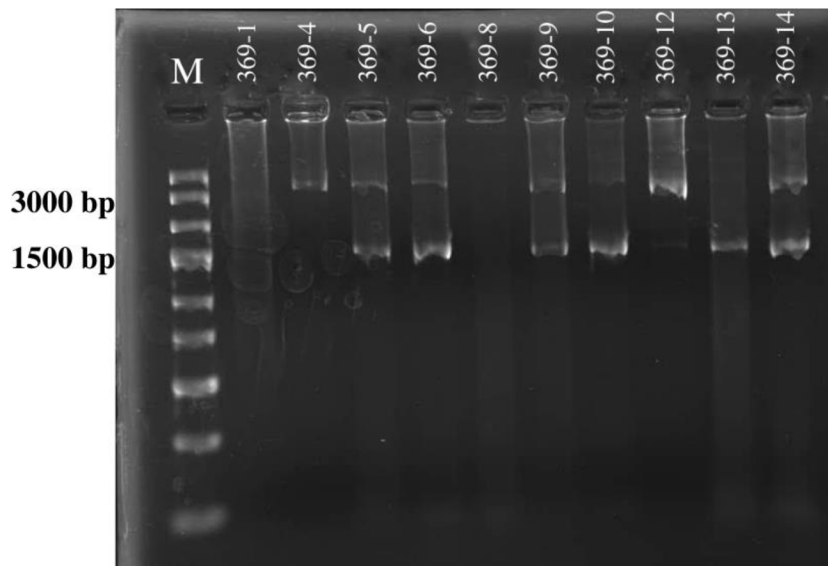
Tabulka 4: Přehled koncentrací genomické DNA čiroku *S. purpureosericeum* vyizolovaných z klasů

Linie 369		Linie 495				Linie 571		Linie 578	
Číslo rostliny	Koncentrace [ng· μ L ⁻¹]	Číslo rostliny	Koncentrace [ng· μ L ⁻¹]	Číslo rostliny	Koncentrace [ng· μ L ⁻¹]	Číslo rostliny	Koncentrace [ng· μ L ⁻¹]	Číslo rostliny	Koncentrace [ng· μ L ⁻¹]
369-1	119,1	495-1	32,7	495-17	26,5	571-1	24,1	578-1	112,7
369-4	63,4	495-2	16,3	495-18	67,4	571-2	30,8	578-3	118,5
369-5	30,3	495-4	133,2	495-19	35,9	571-3	27,5	578-6	53,5
369-6	68,4	495-5	23,4	495-20	22,1	571-4	28,2	578-7	152,6
369-8	93,1	495-7	69,7	495-21	89,0	571-5	68,2	578-8	129,2
369-9	76,1	495-8	27,7	495-22	72,2	571-6	93,2	578-9	124,4
369-10	117,4	495-9	19,1	495-23	149,4	571-7	196,8	578-10	138,7
369-12	113,6	495-10	63,8	495-24	44,4			578-11	136,6
369-13	70,2	495-11	127,3	495-25	60,2			578-13	144,1
369-14	92,6	495-12	66,1	495-26	45,6				
		495-14	40,2						
		495-15	19,8						
		495-16	33,0						

5.3 Detekce variant B chromozómu na základě přítomnosti B specifických markerů

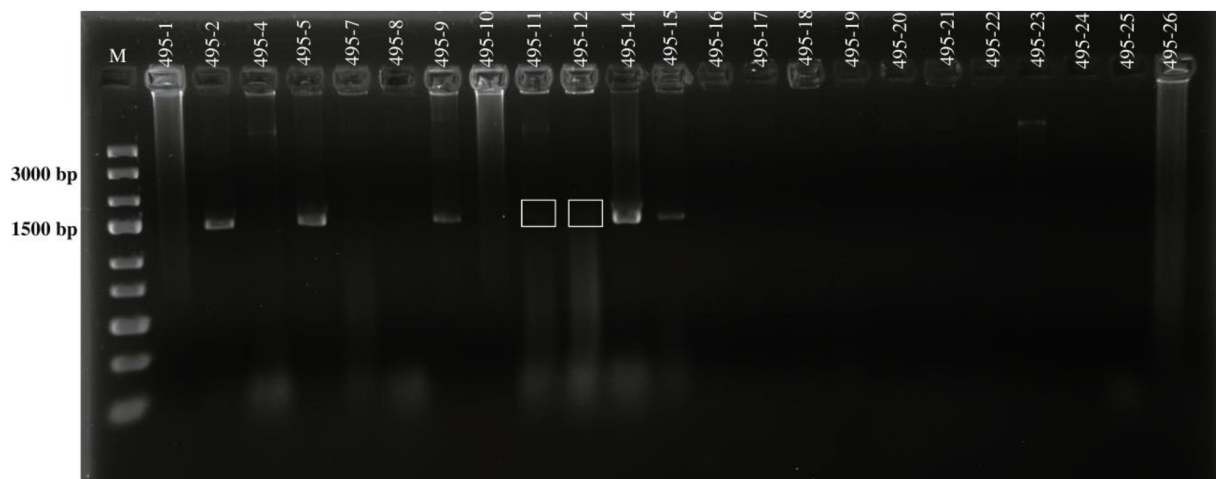
Jak již bylo zmíněno, běžně se u jednoho druhu vyskytuje více forem B chromozómu. U druhu *S. purpureosericeum* bylo v sekvenačních datech zjištěno, že existují minimálně dvě varianty B chromozómu, které se liší přítomností repetice CL115. Druhá repetice CL168 je přítomna v obou variantách. Díky těmto již ověřeným markerům bylo možné v první řadě detekovat B-specifické repetice izolované genomické DNA, která naznačovala přítomnost B chromozómu u daného jedince a dále pak z kombinace markerů odvodit, jaký typ B chromozómu daný jedinec nese. PCR amplifikace B-specifických oblastí byla provedena se 49 vzorky izolované genomické DNA. U markeru CL115 občas docházelo k tomu, že se produkt amplifikoval i v B0 jedincích. To je dáno podstatou repetitivního klastru. Ten je tvořen transpozónem, který se v mnohem menší míře nachází i na ostatních místech genomu. Na B chromozómu je tento transpozón však natolik abundantní, že u jedinců, kteří nesou tuto formu B chromozómu, dochází k výrazněji vyšší amplifikaci než tam, kde přítomnost slabého produktu s B chromozómem nesouvisí. Tato skutečnost byla ověřená cytogeneticky v předchozích studiích.

U potomků linie 369 (Obr. 9) byly markery detekované u sedmi jedinců, což je v souladu s cytometrickou analýzou. Z těchto sedmi B+ jedinců byl u čtyř (369-5, 369-6, 369-10 a 369-13) detekován marker CL168 (slabý produkt markeru CL115 neznáčí přítomnost abundantního klastru na B chromozómu), u zbylých B+ jedinců (369-9, 369-12 a 369-14) pak oba markery CL168, CL115. U jedinců 369-1 a 369-8 amplifikace neproběhla, tudíž se potvrdilo, že tyto rostliny nenesou B chromozóm. U jedince 369-4 byl detekován pouze produkt markeru CL115. Forma B chromozómu bez markeru CL168 není dosud popsána a s ohledem na výsledek cytometrické analýzy byl jedinec vyhodnocen jako B0.



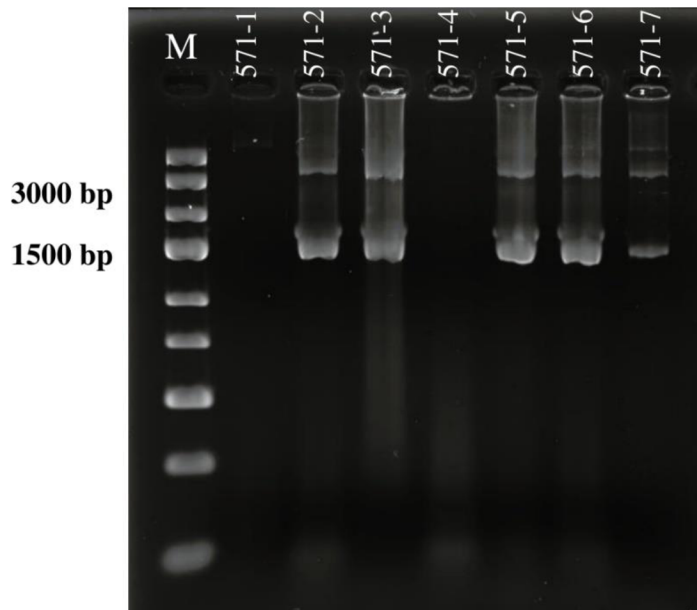
Obrázek 9: Produkty PCR amplifikace B-specifických oblastí v DNA čiroku *S. purpureosericeum* v potomcích linie 369. Legenda: M – O`GeneRuler™ Express DNA Ladder

V linii 495 (Obr. 10) byl detekován pouze marker CL168, a to jen u sedmi jedinců (495-2, 495-5, 495-9, 495-11, 495-12, 495-14, 495-15). Přítomnost markeru u jedinců 495-11 a 495-12 je vyznačen na gelu bílým ohraničením z důvodu špatné viditelnosti bandu na gelu. Přítomnost B chromozómu u těchto jedinců je podpořena výsledkem z cytomeru, tudíž bylo vyhodnoceno, že i tito jedinci nesou B chromozóm. U ostatních 16 jedinců amplifikace B-specifických oblastí neproběhla, tyto rostliny B chromozóm nemají. Přítomnost slabého produktu u jedinců 495-4, 495-11 a 495-23 neodpovídá délkou očekávaným produktům a nesouvisí s přítomností B chromozómu.



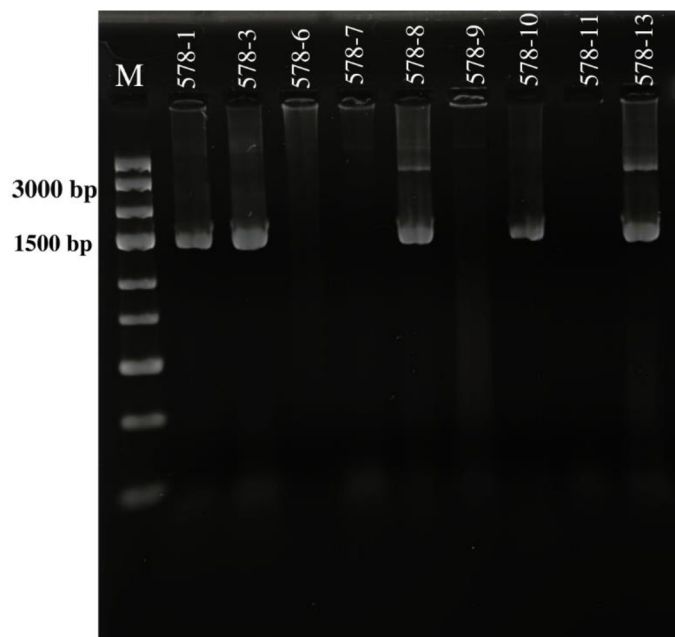
Obrázek 10: Produkty PCR amplifikace B-specifických oblastí v DNA čiroku *S. purpureosericeum* v potomcích linie 495. Legenda: M – O`GeneRuler™ Express DNA Ladder

U potomků linie 571 bylo identifikováno pět B pozitivních jedinců (571-2, 571-3, 571-5, 571-6 a 571-7), kteří jednotně vykazovali přítomnost obou markerů (Obr. 11). V rámci této linie se objevil dosud nepopsaný typ polymorfismu – přítomnost více než jednoho produktu u markeru CL168 u jedinců 571-2, 571-3, 571-5, 571-6. Vzhledem k nedostatku bližších informací k této možné variantě B chromozómu, byli pro účel naší analýzy všichni jedinci považováni za totožné s rodičem. U zbylých dvou jedinců (571-1 a 571-4) amplifikace neproběhla a potvrdilo se, že B chromozóm nemají.



Obrázek 11: Produkty PCR amplifikace B-specifických oblastí v DNA čiroku *S. purpureosericeum* v potomcích linie 571.
 Legenda: M – O`GeneRuler™ Express DNA Ladder

V poslední analyzované linii 578 bylo potvrzeno pět B pozitivních potomků (Obr. 12). Tito potomci vykazovali stejný model jako potomci linie 369. U dvou z B+ jedinců (578-8 a 578-13) byly detekovány oba markery CL168 i CL115. U zbylých B+ jedinců (578-1, 578-3 a 578-10) byl detekován pouze marker CL168. Jedinci 578-6, 578-7, 578-9 a 578-11 nebyli pozitivní ani na jeden z markerů, a tudíž byli vyhodnoceni jako B0 jedinci.



Obrázek 12: Produkty PCR amplifikace B-specifických oblastí v DNA čiroku *S. purpureosericeum* v potomcích linie 578.
 Legenda: M – O'GeneRuler™ Express DNA Ladder

5.4 Analýza míry cizosprašnosti ve vybraných potomstvech

Na základě výše uvedených výsledků pak bylo v rámci potomků jednoho rodiče stanoveno, jestli se typ B chromozómu potomka s rodičem shoduje či nikoliv a v kolika případech došlo ke změně. Přestože se B chromozómy nedědí pravidelně a v linii potomků se mohou objevit jedinci odlišní počtem či přítomností B chromozómů od rodiče, typ B chromozómu při přenosu zůstává zachován. U samosprašných druhů se tak předpokládá, že všichni potomci jsou totožní s rodičem. U druhů, kde je možné cizosprašení, pak odchylka mezi rodičem a potomkem může naznačovat na možné opylení pylem z jiné rostliny.

V našem případě bylo možné cizosprašení odhadnout na základě kombinací přítomnosti/absence obou B-specifických markerů a porovnáním s modelem rodiče (Tab. 5). Z výsledků je patrné, že k odchylce typu B chromozómů v potomstvu došlo pouze u dvou analyzovaných linií ze čtyř. Zatímco potomci linií 571 a 495 byli uniformní a všichni shodní s rodičem, v liniích 369 a 578 byli zaznamenáni takoví jedinci, jejichž vzor markerů se lišil. Takových jedinců bylo sedm, což při celkem 49 analyzovaných jedincích ukazuje na 14% četnost vzájemného opylení.

Tabulka 5: Přehled přítomnosti B-specifických markerů u jednotlivých jedinců a jejich rodičů. Legenda: oranžově zvýraznění – jedinci odlišní produktem od rodiče, zeleně zvýraznění – jedinci shodní produktem s rodičem

Linie 369		Linie 495			Linie 571		Linie 578		
Číslo rostliny	Produkt (CL168/CL115)	Číslo rostliny	Produkt (CL168/CL115)	Číslo rostliny	Produkt (CL168/CL115)	Číslo rostliny	Produkt (CL168/CL115)	Číslo rostliny	Produkt (CL168/CL115)
F0 369	CL168, CL115	F0 495	CL168			F0 571	CL168, CL115	F0 578	CL168, CL115
369-1	–	495-1	–	495-16	–	571-1	–	578-1	CL168
369-4	–	495-2	CL168	495-17	–	571-2	CL168, CL115	578-3	CL168
369-5	CL168	495-4	–	495-18	–	571-3	CL168, CL115	578-6	–
369-6	CL168	495-5	CL168	495-19	–	571-4	–	578-7	–
369-8	–	495-7	–	495-20	–	571-5	CL168, CL115	578-8	CL168, CL115
369-9	CL168, CL115	495-8	–	495-21	–	571-6	CL168, CL115	578-9	–
369-10	CL168	495-9	CL168	495-22	–	571-7	CL168, CL115	578-10	CL168
369-12	CL168, CL115	495-10	–	495-23	–			578-11	–
369-13	CL168	495-11	CL168	495-24	–			578-13	CL168, CL115
369-14	CL168, CL115	495-12	CL168	495-25	–				
		495-14	CL168	495-26	–				
		495-15	CL168						

6 Diskuse

Cílem práce byla charakterizace potomstev rodičovských rostlin čiroku *Sorghum purpureosericeum*, u nichž se v karyotypu nacházel B chromozóm. Toho bylo dosaženo pomocí amplifikace B-specifických míst dvěma páry primerů (CL168 a CL115). Výsledky amplifikace byly podpořeny screeningem přítomnosti B chromozómů pomocí průtokové cytometrie.

Čirok je obecně považován za často-cizosprašný druh, u kterého k vzájemnému oplození dochází v rozmezí 3-6 %, ale existují případy, kdy je cizosprašnost mnohem větší (až 30 %) a to hlavně u divokých druhů čiroku (Rakshit a Bellundagi, 2019). Toto vzájemné křížení vede k velké variabilitě genomu, kdy není možné odhadnout, jak budou potomci vypadat. V předkládané práci byli charakterizováni potomci čtyř linií rodičovských rostlin (369, 571, 578 a 495), přičemž každá z nich nesla v karyotypu 1 B chromozóm. Porovnáním výsledných produktů PCR amplifikace linií potomků s rodičovskou linií bylo možné určit, zda došlo k cizosprašení či nikoliv.

Ze 49 analyzovaných jedinců se sedm evidentně lišilo od svého rodiče. K cizosprašení tak prokazatelně došlo zhruba ve 14 % případů, přičemž se tento model objevoval pouze u linie 369 a 578. U ostatních dvou k vzájemnému oplození nedošlo. S přihlédnutím na údaje uváděné v literatuře se výsledky z této práce s nimi shodují (Rakshit a Bellundagi, 2019). Je však důležité zdůraznit, že při takovém počtu analyzovaných jedinců se těžko může prokazovat směřodatná statistika. Nízký počet jedinců byl způsoben hlavně tím, že planý druh čiroku se těžko adaptoval na uměle upravené podmínky pěstování a rostliny měly malou výnosnost semen. Zároveň ani metoda detekce přítomnosti B chromozómů není ideální, neboť je pravděpodobné, že se v genomu mohou nacházet více jak dva typy B chromozómů, jako je tomu u většiny druhů, například u kobylinky *Eyprepocnemis plorans* (López-León *et al.*, 1993), nebo u prosa *Pennisetum typhoides* (Subba Rao a Pantulu, 1978). Markery použité v této práci cílily pouze na dva lokusy B chromozómu. Zcela jistě však nelze vyloučit, že mohou existovat i formy B chromozómu, které se liší v jiných oblastech, což s použitými markery zachytit nelze.

Vzhledem k tomu, že B chromozómy vykazují nepravidelnou dědičnost, tak se v rámci 49 analyzovaných jedinců objevili i tací, u kterých nebyl detekován žádný z markerů, tudíž byli vyhodnoceni jako B0 jedinci. Takových bylo 25, což je 51 % z celkového počtu analyzovaných potomků. Toto procento B0 jedinců se lehce odchyluje od dat uváděných v literatuře, kde se počet jedinců bez B chromozómu pohybuje u stejného druhu okolo 43 % (Wu, 1984). Zajímavé

je nezvykle nízké procento pozitivních jedinců u linie 495, což může být také připisováno cizosprašení a to pylem z B0 rostliny.

7 Závěr

Předkládaná práce se zabývala charakterizací potomků u čtyř rodičovských linií rostliny *Sorghum purpureosericeum*, které ve svém genomu nesly B chromozóm, a to z pohledu možného cizosprašení. Přítomnost B chromozómu u jednotlivých potomků byla nejdříve stanovena pomocí průtokové cytometrie. Detekcí dvou B-specifických markerů (CL168 a CL115) byl následně určen typ B chromozómu u jednotlivých potomků a srovnáním s variantou B chromozómu rodiče byla odhadnuta frekvence vzájemného opylení.

Ze 49 analyzovaných jedinců se jich sedm lišilo typem B chromozómu od svých rodičovských rostlin. To naznačuje, že k cizosprašení došlo přibližně ve 14% případů. Tyto výsledky potvrzují, že k cizosprašení může docházet i v umělých podmínkách, kde chybí přirození opylovači. Četnost opylení pylem z jiné rostliny je navíc nezanedbatelná a je významnou komplikací při studiu genomu analyzovaného druhu *S. purpureosericeum*. Aby bylo cizosprašení zabráněno, musí být rostliny izolovány. Izolace by však u rostlin mohla vést ke stresu a navození nepřirozených podmínek. Vzhledem k tomu, že i samotný planý čirok měl v uměle navozených podmínkách malou výnosnost, mohla by izolace způsobit oslabení rostlin v ještě větší míře.

8 Literatura

- Ablett G., Hill H., Henry R.J. (2006): Sequence polymorphism Discovery in wheat microsatellite flanking regions using pyrophosphate sequencing. *Molecular Breeding* 17: 281–289.
- Adhikari S., Saha S., Biswas A., Rana T.S., *et al.*, (2017): Application of molecular markers in plant genome analysis: a review. *Nucleus* 60: 283–297.
- Aerts J., Yves Wetzels Y., Cohen N., Aerssens J. (2002): Data Mining of Public SNP Databases for the Selection of Intragenic SNPs. *Human Mutation* 20: 162–173.
- Ahmad S.F., Jehangir M., Cardoso A.L, Wold I.R., *et al.*, (2020): B chromosomes of multiple species have intense evolutionary dynamics and accumulated genes related to important biological processes. *BMC Genomics* 21: 656.
- Alemayehu N., Keneni G. (2019): Genetic Consequences of Failure to Control Outcrossing in Breeding Often CrossPollinated Pulse and Oil Crops. *Ethiop. J. Crop Sci.* 7: 110–119.
- Ananda G.K.S., Myrans H., Norton S.L., Gleadow R., Furtado A., Henry R.J. (2020): Wild Sorghum as a Promising Resource for Crop Improvement. *Front. Plant Sci.* 11: 1108.
- Anglani C. (1998): Sorghum for human food: a review. *Plant Foods Hum. Nutr.* 52: 85–89.
- Antonopoulou G., Gavala H.N., Skiadas I.V., Angelopoulos K., Lyberatos G. (2008): Biofuels generation from sweet sorghum: Fermentative hydrogen production and anaerobic digestion of the remaining biomass. *Bioresource Technology* 1: 147–157.
- Ayyanger G.N.R, Ponnaiya B.X.W (1941): Studies in *Para-sorghum* Snowden—the group with bearded nodes. *Proc Indian Acad Sci* 14:17–24.
- Beckett J.B. (1991): Cytogenetic, Genetic and Plant Breeding Applications of B–A Translocations in Maize. Elsevier Academic Press 2 (A): 493–529.
- Bednářová M., Karafiátová M., Hřibová E., Bartoš J. (2021): B Chromosomes in Genus *Sorghum* (*Poaceae*). *Plants* 10: 505.
- Birchler J.A., Swyers N.C. (2020): Engineered minichromosomes in plants. *Exp Cell Res* 15 (2): 388.

Blavet N., Yang H., Suc H., Solanský P., *et al.*, (2021): Sequence of the supernumerary B chromosome of maize provides insight into its drive mechanism and evolution. PNAS 118 (23).

Boeskorov G.G., Kartavtseva I.V., Zagorodniuk I.V., Belianin A.N., Liapunova E.A. (1995): Nucleolus organizer regions and B-chromosomes of field mice (*Mammalia, Rodentia, Apodemus*) Genetika 31(2): 185–192.

Brookes A. (1999): The essence of SNPs. Gene 234: 177–86.

Burt A., Trivers R. (2006): Genes in conflict: the biology of selfish genetic elements. Belknap Press of Harvard University, Cambridge.

Bustamante F.O., Rocha L.C., Torres G.A., Davide L.C., Mittelman A., Techio V.H. (2014): Distribution of rDNA in diploid and polyploid *Lolium multiflorum* Lam. and fragile sites in 45S rDNA regions. Crop Science 54: 617–625.

Camacho J.P. (2005): B chromosomes In: The Evolution of the Genome, pp. 223–286, Elsevier Academic Press, Cambridge.

Camacho J.P., Sharbel T.F., Beukeboom L.W. (2000): B-chromosome evolution. Philos. T. Roy. Soc. B. 355: 163–178.

Coleman J.J., Rounsley S.D., Rodriguez-Carres M., Kuo A., *et al.* (2009): The genome of *Nectria haematococca*: contribution of supernumerary chromosomes to gene expansion. PLoS Genet 5: e1000618.

Darlington C.D., Thomas T.R.S., Thomas P.T. (1941): Morbid mitosis and the activity of inert chromosomes in Sorghum. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences 130: 127–150.

De Wet, J.M.J. (1978): Systematics and evolution of Sorghum sect. Sorghum (Gramineae). Amer. J. Bot. 65: 477–484.

Dhar M.K., Kourt J., Kaul S. (2019): Origin, Behaviour, and Transmission of B Chromosome with Special Reference to *Plantago lagopus*. Genes (Basel) 10 (2): 152.

Dickson N. (2011): Phylogenetics of the Genus *Sorghum*, Genetic Diversity and Nutritional Value of its Cultivated Species. Doctoral Thesis. Swedish University of Agricultural Sciences.

Doggett H. (1988): Sorghum, 2nd edition. John Wiley & Sons, New York.

- Doležel J. (1997): Application of flow cytometry for the study of plant genomes. *J. Appl. Genet.* 38: 285–302.
- Durkin, S.G., Glover, T.W. (2007): Chromosome fragile sites. *Annu. Rev. Genet.* 41: 169–192.
- Ehrlich H. A., Gelfand D. H., Snisky J. J. (1991): Recent advances in polymerase chain reaction. *Science* 252: 1643–51.
- Endrizzin J.E., Morgan D.T. (1955): Chromosomal interchanges and evidence for duplication. *Journal of Heredity* 46: 201–208.
- Garber E.D., Snyder L.A. (1951): Cytotaxonomic studies in the genus *Sorghum*. II. Two new species from Australia. *Madrona* 11: 6–10.
- Gebhardt C., Schmidt R., Schneider K. (2005): *Plant Genome Analysis: The State of the Art*. Elsevier 247: 223–284.
- Gent J.I., Nannas N., Liu Y., Su H. (2017): Genomics of Maize Centromeres In: *The Maize Genom.*, pp: 59–80. Springer Nature, Switzerland.
- Glew R.H., Vanderjagt D.J., Lockett C., Grivetti L.E., Smith G.C., Pastuszyn A., Millson M. (1997): Amino acid, fatty acid, and mineral composition of 24 indigenous plants of Burkina Faso. *J. Food Comp. Anal.* 10: 205–217.
- Gostimsky S.A., Kokaeva Z.G., Konovalov F.A. (2005): Studying Plant Genome Variation Using Molecular Markers. *Russian Journal of Genetics* 41 (4): 378–388.
- Gu M., Ma H., Liang G.H. (1984): Karyotype analysis of seven species in the genus *Sorghum*. *Journal of Heredity* 75 (3): 196–202.
- Hasegawa N. (1934): A cytological study on 8-chromosome rye. *Cytologia* 6: 68–77.
- Henriques-Gil N., Arana P. (1990): Origin and substitution of B chromosomes in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Evolution* 44: 747–753.
- Henry E.J. (2012): *Molecular Markers in Plants*, pp: 5–9. John Wiley & Sons, Inc., USA.
- Hewitt G.M. (1976): Meiotic drive for B chromosomes in the primary oocytes of *Myrmeleotettix maculatus* (*Orthoptera: Acrididae*). *Chromosoma* 56: 381–391.
- Houben A. (2017): B Chromosomes – A Matter of Chromosome Drive. *Front. Plant Sci.* 8: 210.

- Houben A., Banaei-Moghaddam A.M., Klemme S. (2012): Biology and Evolution of B Chromosomes. *Plant Genome Diversity* 2: 149–165.
- House L.R. (1985): *A Guide to Sorghum Breeding* (2nd edition). ICRISAT, India.
- Huskins C.L., Smith S.G. (1934): A cytological study of the genus *Sorghum* PERS. II. The meiotic chromosomes. *J. Genet.* 28: 387–395.
- Jahan-Tigh R.R., Ryan C., Obermoser G., Schwarzenberger K. (2012): Flow Cytometry. *Journal of Investigative Dermatology* 132.
- Janaki-Ammal E.K. (1939): Supernumerary chromosomes in *para-Sorghum*. *Current Science* 8: 210–211.
- Jones R.N. (1991): B-Chromosome Drive In: *The American Naturalist*, Vol. 137, No. 3, Symposium: The Genetics and Evolutionary Biology of Meiotic Drive, pp: 430–442, The University of Chicago Press for The American Society of Naturalists Stable.
- Jones R.N., Gonzáles-Sánchez M., Gonzáles García M., Vega C.M. (2008): Chromosomes with a life of their own. *Cytogenetic and Genome Research* 120 (3–4): 265–80.
- Jones R.N., Rees H. (1982): *B chromosomes*. Academic Press, London.
- Jones R.N., Viegas W., Houben A. (2008): A Century of B Chromosomes in Plants: So What?. *Annals of Botany* 101 (6): 767–775.
- Karafiátová M., Bednářová M., Said M., Čížková J., Holoušová K., Blavet N., Bartoš J. (2021): The B chromosome of *Sorghum purpureosericeum* reveals the first pieces of its equence. *Journal of Experimental Botany* 72 (5): 1606–1616.
- Kayano H. (1957): Cytogenetic studies in *Lillium callosum*. III. Preferential segregation of a supernumerary chromosome in EMCs. *Proc Jap Acad* 33: 553–558.
- Kayano H. 1971: Accumulation of B chromosomes in the germ-line of *Locusta migratoria*. *Heredity* 27: 119–123.
- Kim J.S., Klein P.E., Klein R.R., Price H.J., Mullet J.E., Stelly D.M. (2005): Chromosome Identification and Nomenclature of *Sorghum bicolor*. *Genetics* 169 (2): 1169–1173.
- Kumar L.S. (1999): DNA markers in plant improvement: An overview. *Elsevier* 17 (2–3): 143–182.

- Kuwada Y. (1915): Ueber die Chromosomenzahl von *Zea mays* L. Bot. Mag. Tokyo, 29: 83–89.
- Lazarides M., Hacker J. B., Andrew M. H. (1991): Taxonomy, cytology and ecology of indigenous Australian sorghums (*Sorghum* Moench: *Andropogoneae*: *Poaceae*). Aust. Syst. Bot. 4: 591–635.
- López-León M.D., Carbero J., Pardo M.C., Viseras E., *et al.*, (1993): Generating high variability of B chromosomes in *Eyprepocnemis plorans* (grasshopper). Heredity, 71: 352–362.
- Macey G.M. (2007): Principles of Flow Cytometry In: Flow Cytometry, pp: 1–17. Human Press, New Jersey.
- Mishra K. K., Fougat R.S., Ballani A., Thakur V., Jha Y., Bora M. (2014): Potential and application of molecular markers techniques for plant genome analysis. Int. J. Pure App. Biosci. 2: 169–188.
- Mullis K.B. (1990): The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction. Scientific American 262 (4): 56–65.
- Nur U. (1962): A supernumerary chromosome with an accumulation mechanism in the lecanoid genetic system. Chromosoma 13: 249–271.
- Nur U. (1963): A mitotically unstable supernumerary chromosome with an accumulation mechanism in a grasshopper. Chromosoma, 14: 407–422.
- Olson M., Hood L., Cantor C., Botstein D. (1989): A common language for physical mapping of human genome. Science 245: 1434–35.
- Pardo M.C., López-León M.D., Viseras E. (1995): Mitotic instability of B chromosomes during embryo development in *Locusta migratoria*. Heredity 74: 164–169.
- Peppers J.A., Wiggins L.E., Baker R.J. (1997): Nature of B chromosomes in the harvest mouse *Reithrodontomys megalotis* by fluorescence *in situ* hybridization (FISH). Chromosome Research 5: 475–479.
- Perfectti F., Werren J.H. (2001): The interspecific origin of B chromosomes: experimental evidence. Evolution 55 (5): 1069–73.
- Price H. J., Dillon S. L., Hodnett G., Rooney W. L., Ross L., Johnston J. S. (2005): Genome evolution in the genus *Sorghum* (*Poaceae*). Ann. Bot. 95: 219–227.

- Rakshit S., Bellundagi A. (2019): Conventional Breeding Techniques in Sorghum In: Breeding Sorghum for Diverse End Uses, pp: 77–91. Woodhead Publishing, United Kingdom.
- Rakshit S., Ganapathy K.N., Visarada K.B.R.S. (2016): Cytogenetics of Sorghum. In: Sorghum Genome, pp: 47–75. Springer International Publishing AG.
- Raman V.S., Meenakshi K., Thangam M.S. (1976): Accessory chromosomes and their meiotic behaviour in hybrids of grain sorghum and Johnson grass. *Cytologia* 41: 193–200.
- Raman V.S.; Krishnaswami D. (1960): Accessory chromosomes in *Sorghum nitidum*. *Pers. J. Indian Bot. Soc.* 39: 278–280.
- Roman H. (1950): Factors affecting mitotic non-disjunction in maize. *Genetics*, 35, 132.
- Rooney L.W. (2007): Breeding sorghum In: Acquaaah G. Principles of Plant Genetics and Breeding. Blackwell publishing, USA.
- Ruban A., Fusch J., Marques A., Schubert V., *et al.*, (2014): B Chromosomes of *Aegilops speltoides* Are Enriched in Organelle Genome-Derived Sequences. *PLOS ONE* 9 (2): e90214.
- Sharma A., Namdeo A.G., Mahadik K.R. (2008): Molecular Markers: New Prospects in Plant Genome Analysis. *Pharmacognosy Reviews* 2 (3).
- Sobetski H. (2015): Sorghum Pollination. ECHO Development Notes no. 126.
- Stevens N.M. (1908): The chromosomes in *Diabrotica vittata*, *Diabrotica soror* and *Diabrotica punctata*. A contribution to the literature on heterochromosomes and sex determination. *J. Exp. Zool.* 5: 453–470.
- Subba Rao M.V., Pantulu J.V. (1978): The effects of derived B-chromosomes on meiosis in pearl millet *Pennisetum typhoides*. *Chromosoma* 69: 121–130.
- Uhl C.H., Moran R. (1973): The Chromosomes of *Pachyphytum* (*Crassulaceae*). *American Journal of Botany* 60 (7): 648–656.
- Valente G.T., Nakajima R.T., Fantinatti B.E.A. *et al.*, (2017): B chromosomes: from cytogenetics to systems biology. *Chromosoma* 126: 73–81.
- Venkateswaran K., Muraya M., Dwivedi S.L., Upadhyaya H.D. (2015): Wild Sorghums-Their Potential Use in Crop Improvement. In: Genetics, Genomics and Breeding of Sorghum, pp: 56–90. GRC Press, New York.

Volobujev V.T., Timina N.Y. (1980): Unusually high number of B-chromosomes and mosaicism by them in *Apodemus peninsulae* (Rodentia, Muridae). Tsitologia Genetika 14: 43–45.

Wilson E.B. (1907): The supernumerary chromosomes of Hemiptera. Sci. New Ser.

Wu T.P. (1984): B-Chromosomes in *Sorghum purpureo-sericeum*. Proceedings of the National Science Council 8 (1): 198–209.

Wu T.P. (1992): B-chromosomes in *Sorghum stipoides*. Heredity 68: 457–463.

Yoshida K., Terai Y., Mizoiri S., Aibara M., Nishihara H., Watanabe M., *et al.*, (2011): B chromosomes have a functional effect on female sex determination in Lake Victoria cichlid fishes. PLoS Genet 7: e1002203.

Ziegler C.G., Lamatsch D.K., Steinlein C., Engel W., Scharl M., Schmid M. (2003): The giant B chromosome of the cyprinid fish *Alburnus alburnus* harbours a retrotransposon-derived repetitive DNA sequence. Chromosome Res. 11: 23–35.

8.1 Internetové zdroje

Čirok obecný *Sorghum bicolor* (L.) MOENCH, možnosti využití v podmínkách České republiky: metodika pro praxi. [on-line] [navštíveno 25.11.2021]. Dostupné na: <https://invenio.nusl.cz/record/155352>

Flow Cytometry: An Overview [on-line] [navštíveno 5.1.2022]. Dostupné na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5939936/>

Growth and Production of Sorghum and Millets [on-line] [navštíveno 17. 10. 2021].

Dostupné na: <https://www.researchgate.net/publication/260392531>

Sorghum bicolor (L.) Moench. [on-line] [navštíveno 5. 12. 2021]. Dostupné na: [https://identify.plantnet.org/the-plant-list/species/Sorghum%20bicolor%20\(L.\)%20Moench/data](https://identify.plantnet.org/the-plant-list/species/Sorghum%20bicolor%20(L.)%20Moench/data)

Sorghum purpureosericeum (A.Rich.) Schweinf. & Asch. [on-line] [navštíveno 5. 12. 2021].

Dostupné na: [https://identify.plantnet.org/the-plant-list/species/Sorghum%20purpureosericeum%20\(A.Rich.\)%20Schweinf.%20%26%20Asch./data](https://identify.plantnet.org/the-plant-list/species/Sorghum%20purpureosericeum%20(A.Rich.)%20Schweinf.%20%26%20Asch./data)