

Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Diverzita B chromozómu u kukuřice seté
(*Zea mays*)

B chromosome diversity in *Zea mays*

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Tereza Bojdová

Studijní program: B1406 Biochemie

Studijní obor: 1406R012 Biotechnologie a genové inženýrství

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2021 Vedoucí práce: Mgr. Miroslava Karafiátová, Ph.D.

Podklad pro zadání BAKALÁŘSKÉ práce studenta

Jméno a příjmení: Tereza BOJDOVÁ
Osobní číslo: R18670
Adresa: 5. května 1539, Rožnov pod Radhoštěm, 75661 Rožnov pod Radhoštěm 1, Česká republika
Téma práce: Diverzita B chromozómu u kukuřice seté (*Zea mays*)
Téma práce anglicky: B chromosome diversity in *Zea mays*
Vedoucí práce: Mgr. Miroslava Karafiátová, Ph.D.

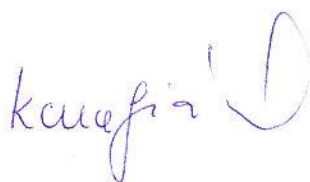
Zásady pro vypracování:

V karyotopu kukuřice seté se vyskytují B chromozómy, které oproti deseti A chromozómům vyjadřují odlišnost ve vzhledu i chování. Cílem této práce je dozvědět se více o diverzitě morfologie těchto B chromozómů na divokých druzích kukuřice pomocí metody fluorescenční in situ hybridizace, přičemž je dbán důraz na repetitivní sekvence.

Seznam doporučené literatury:

- Lamb, J.C., Riddle, N.C., Cheng, Y. *et al.* Localization and transcription of a retrotransposon-derived element on the maize B chromosome. *Chromosome Res* 15, 383-398 (2007).
- Lo, K., Peng, S., Chen, L. *et al.* Tandem organization of *StarkB* element (22.8 kb) in the maize B chromosome. *Mol Genet Genomics* 282, 131-139 (2009)
- Schwarzacher, T., Heslop-Harrison, J., & Heslop-Harrison, P. (2000). *Practical in Situ Hybridization*. BIOS.
- Singh, R. J. 1993. *Plant Cytogenetics*, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida.
- Carlson W. (2009) The B Chromosome of Maize. In: Bennetzen J.L., Hake S. (eds) *Handbook of Maize*. Springer, New York, NY

Podpis vedoucího práce:



Datum: 1. 7. 2020

Podpis vedoucího pracoviště:

Datum:

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

V Olomouci dne

.....

Poděkování

Mé poděkování patří Mgr. Miroslavě Karafiátové, Ph.D. za odborné vedení, ochotu, trpělivost a věnovaný čas. Vedoucí práce také děkuji za velkou motivaci a inspiraci pro práci ve vědě. Dále bych ráda poděkovala zaměstnancům Centra strukturní a funkční genomiky rostlin Ústavu experimentální botaniky AV ČR v Olomouci za jejich cenné rady a ochotu.

Tato bakalářská práce byla zpracována za podpory projektu MŠMT číslo LTT19 (program Inter-Excellence).

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora: Tereza Bojdová

Název: Diverzita B chromozómu u kukuřice seté (*Zea mays*)

Typ práce: bakalářská

Pracoviště: Ústav experimentální botaniky AV ČR, v.v.i.

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

Rok obhajoby práce: 2021

Klíčová slova: *Zea mays*, B chromozómy, diverzita B chromozómů, cytogenetika, FISH

Počet stran: 54

Jazyk: čeština

Souhrn

Kukuřice setá (*Zea mays*) je významná hospodářská plodina. Její karyotyp se běžně sestává z deseti párů chromozómů, ale v některých případech může obsahovat také nadbytečné genetické elementy, které se nazývají B chromozómy. Přítomnost těchto „parazitických“ chromozómů má na nositele většinou negativní vliv, a tak aby nedošlo k jejich zániku vlivem selekčního tlaku, vyvinuly si tyto chromozómy mechanismy, které jim zajišťují přenos do potomstva. U kukuřice bylo prokázáno, že se tohoto akumulčního mechanismu aktivně účastní jedna z repetit nacházející se v centromere.

Cílem této práce bylo analyzovat diverzitu repetit na B chromozómech u osmi linií kukuřice pomocí metody fluorescenční *in situ* hybridizace. Pro studium variability bylo vybráno pět repetit – Stark, CRM, CentC, knob a ZmBs, z nichž byly odvozeny fluorescenčně značené sondy. Ty byly lokalizovány na metafázních chromozómech získaných z kořenových meristémů kukuřice. Standardem pro studii byl osekvenovaný B chromozóm linie B73+B. Pozice všech repetit byla analyzována na setu osmi vybraných linií a nebyla zaznamenána žádná významná odchylka od referenčního standardu. Všechny sekvence byly přítomny a pozice signálů se shodovala s referenční linií B73.

Bibliographical identification

Author's first name and surname: Tereza Bojdová

Title: B chromosome diversity in *Zea mays*

Type of thesis: bachelor

Department: Institute of Experimental Botany of the AS CR, v.v.i.

Supervisor: Mgr. Miroslava Karafiátová, Ph.D.

The Year of Presentation: 2021

Keywords: *Zea mays*, B chromosomes, B chromosome diversity, cytogenetics, FISH

Number of pages: 54

Language: Czech

Summary

Maize (*Zea mays*) is a plant of an agricultural importance. Generally, the karyotype of maize consists of ten chromosome pairs, but in some lines so-called accessory genetic elements can be detected. The presence of these „parasitic“ chromosomes usually has a negative effect on its carriers. To prevent themselves from being lost, B chromosomes have evolved mechanisms ensuring them the transfer to the progeny. It has been recently proved in maize that one of the centromeric repeat has a key role in this accumulation mechanism. However, it can also contain B chromosomes that hold a lot of repetitive sequences.

The aim of the thesis was to analyse diversity of repeats harbored on the B chromosome within the set of eight lines using the method fluorescence *in situ* hybridization. The five repeats – Stark, CRM, CentC, knob and ZmBs were chosen for study of B chromosome diversity. The fluorescently labelled probes were derived from selected repeats and those were localized on metaphase chromosomes from root meristems. Sequenced B chromosome from line B73+B was a standard for this study. The hybridization pattern of all repeats was established in eight selected lines and the analysis did not reveal any significant difference in comparison to reference.

Obsah

1	Úvod.....	9
2	Cíle práce	10
3	Literární přehled	11
3.1	Kukuřice setá.....	11
3.1.1	<i>Zea mays subsp. mays</i>	11
3.2	B chromozómy	14
3.2.1	Objev B chromozómů	14
3.2.2	Morfologie a stabilita.....	15
3.2.3	Funkce.....	16
3.2.4	Výskyt a dóze B chromozómů v organismech	16
3.2.5	Dědičnost	17
3.2.6	Původ B chromozómů	17
3.2.7	B chromozómy kukuřice seté	18
3.2.7.1	Akumulační mechanismy B chromozómu kukuřice seté	19
3.2.7.2	Složení sekvencí na B chromozómu kukuřice seté	20
3.3	Cytogenetická analýza rostlinných genomů.....	22
3.3.1	Fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace.....	23
3.3.2	Značení a typy sond	24
3.3.3	Využití FISH	26
4	Materiál a metody	29
4.1	Biologický materiál.....	29
4.2	Použité chemikálie a roztoky	30
4.3	Použité přístroje	32
4.4	Postupy experimentálních a vyhodnocovacích metod	33
4.4.1	Kultivace a odběr kořínků.....	33
4.4.2	Příprava nakapávaných preparátů.....	33

4.4.3	Izolace genomické DNA kukuřice seté	34
4.4.4.	Testování primerů	34
4.4.5	Příprava repetitivních sond pro FISH	35
4.4.6	Fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace	35
5	Výsledky	37
5.1	Příprava preparátů	37
5.2	Testování primerů pro repetice	37
5.3	Příprava repetitivních sond	38
5.4	FISH na linii B73	39
5.5	FISH na vybraném setu linií kukuřice seté	39
6	Diskuze	42
7	Závěr	45
8	Seznam literatury	46
9	Seznam zkratk	54

1 Úvod

Zea mays subsp. *mays*, patřící do čeledi lipnicovitých (*Poaceae*), je celosvětově jedna z nejpěstovanějších plodin. Je to velmi adaptabilní rostlina schopná růstu v tropech i v mírném pásu, až do nadmořské výšky 3,6 kilometrů (Gwirtz and Garcia-Casal, 2013). Největšími producenty kukuřice jsou Spojené státy americké, Čína a Brazílie, kteří dohromady vypěstují více než 2/3 roční světové produkce kukuřice (Ranum *et al.*, 2014). Ve Spojených státech amerických je kukuřice ze 40 % využita k výrobě biopaliva z 50 % krmení dobytka, pouze malá část pak v potravinářském průmyslu (Ranum *et al.*, 2014). Naopak v rozvojových zemích Afriky a Latinské Ameriky je kukuřice hlavním zdrojem potravy (Ranum *et al.*, 2014). Kukuřice obsahuje přibližně 72 % škrobu, 10 % bílkovin a 4 % tuku, celkově poskytuje energii o hodnotě 365 kcal na 100 g (Ranum *et al.*, 2014). V potravinářském průmyslu se používá k výrobě oleje, fruktózového sirupu či kukuřičné mouky.

Kukuřice setá je rostlina diploidní a její karyotyp se běžně sestává z 20 chromozómů ($2n=2x=20$). V některých případech mohou být ale v genomu kukuřice přítomny také tzv. nadpočetné chromozómy, známé obecně jako B chromozómy. Tyto B chromozómy jsou postradatelné, často nositeli neposkytují žádnou evoluční výhodu, a naopak jejich přítomnost má většinou negativní efekt. Jejich významným znakem je, že na rozdíl od A chromozómů se jejich přenos do potomstva neřídí Mendelovskou dědičností. B chromozómy si totiž v průběhu evoluce vyvinuly mechanismy, kterými bojují proti selekčnímu tlaku a zajišťují si „přežití“ v populacích. Tyto mechanismy jsou aktivně řízeny geny, které se nacházejí na B chromozómu. Jedním z těchto mechanismů je u kukuřice tzv. nondisjunkce. Přesný mechanismus zatím není znám, ale bylo prokázáno, že v akumulaci B chromozómů hraje klíčovou roli oblast centromery (Blavet *et al.*, in press). Dá se tedy předpokládat, že regiony zodpovědné za zachování B chromozómu budou více konzervované než ty, které žádný důležitý význam nemají.

2 Cíle práce

Cílem práce byla analýza variability B chromozómů ve vybraném souboru linií kukuřice pocházejících z různých geografických oblastí. Studium diverzity B chromozómu bylo založeno na porovnání pozice 5 významných repetice dříve identifikovaných na B chromozómu kukuřice se pomocí cytogenetické metody fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH). Zjištěné odlišnosti v uspořádání DNA na B chromozómech v různých druzích mohou poukázat na model a rychlost evoluce B chromozómu u kukuřice.

3 Literární přehled

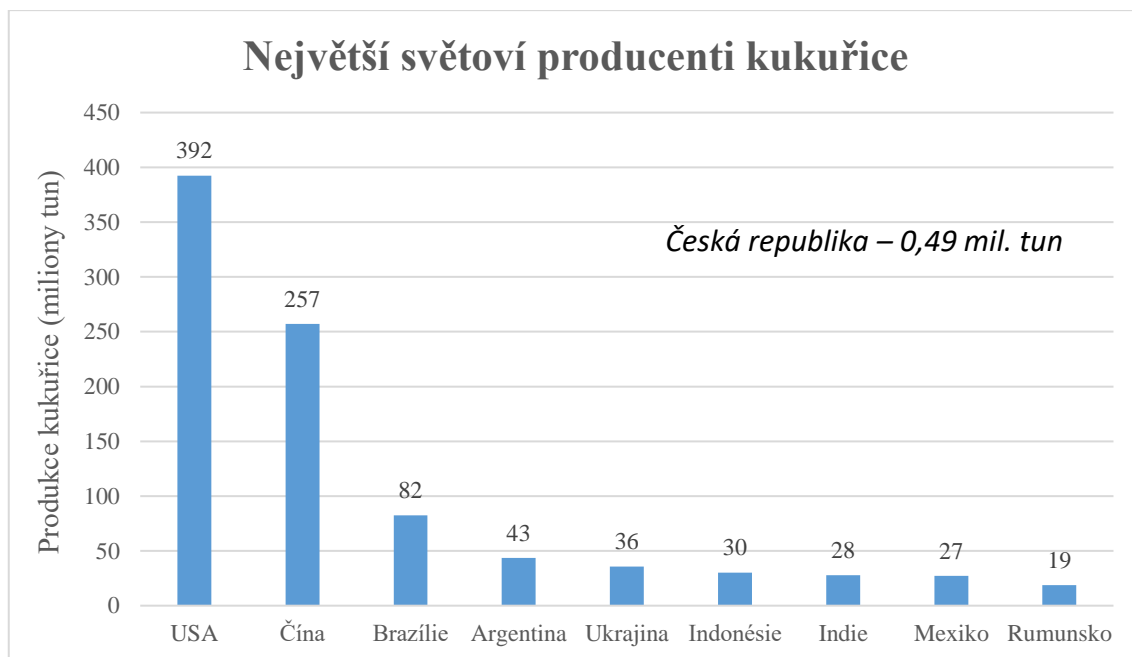
3.1 Kukuřice setá

Kukuřice setá (*Zea mays*) patří do čeledi lipnicovitých (*Poaceae*), podčeledi *Panicoideae*, kmene *Andropogoneae*. Druh *Zea mays* je na základě morfologie, cytogenetiky a geografického původu dále dělen do čtyř poddruhů – *Z. m. huehuetenangensis*, *Z. m. mexicana*, *Z. m. parviglumis* a *Z. m. mays* (Iltis and Doebley, 1980). Pouze *Zea mays subsp. mays* (kukuřice setá pravá) je ale domestikovaný poddruh, zbylé tři jsou divoké poddruhy (tzv. teosinty).

Kukuřice setá byla domestikována v průběhu posledních 10 000 let z teosintů ve Střední Americe (Doebley *et al.*, 2006). Nejbližším divokým příbuzným kukuřice seté je *Zea mays ssp. mexicana* L. (Lu *et al.*, 2017). Mnoho forem kukuřice je často rozlišováno na základě obsahu škrobu v jejich zrnech. *Zea mays* var. *saccharata* a *Zea mays* var. *rugosa*, neboli cukrová kukuřice, obsahují velký podíl cukru díky přirozené mutaci genů (Erwin, 1951) zabezpečujících konverzi cukru na škrob uvnitř endospermu kukuřičných zrn. Popcorn (*Zea mays* var. *evarta*) obsahuje škrobovitý endosperm s podílem vlhkosti, která se zahříváním mění v páru. Následně pára vytvoří tlak, který vyústí v charakteristické praskání a zvětšování zrna (Hoseney *et al.*, 1983). Další formy kukuřice jsou například kukuřice moučná (*Zea mays* var. *amylacea*), kukuřice s vysokým podílem škrobu (*Zea mays* var. *indentata*) či amylopektinu (*Zea mays* var. *ceratina*). Flintová kukuřice (*Zea mays* var. *indurata*) má tvrdou vnější vrstvu chránící endosperm.

3.1.1 *Zea mays subsp. mays*

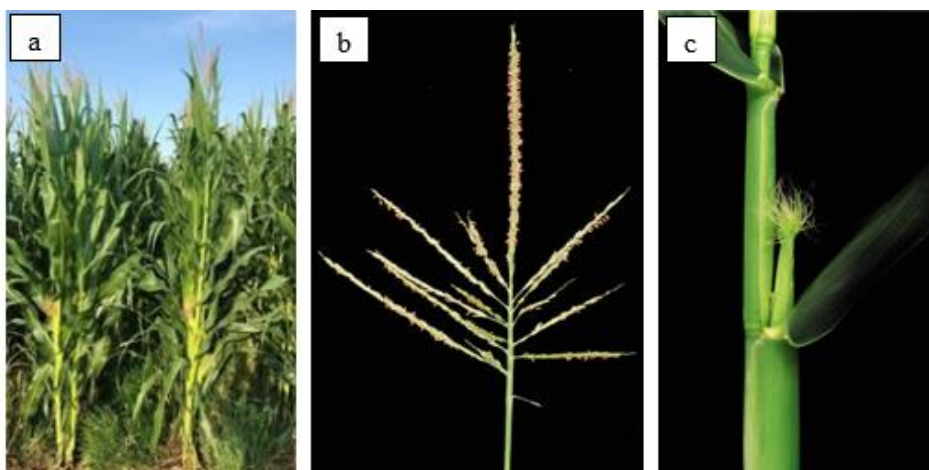
Kukuřice je jednoděložná jednoletá rostlina. Díky svému mělkému kořenovému systému je závislá na půdní vlhkosti. Kukuřice je teplomilná rostlina, dokáže však být velmi adaptabilní. Je schopná růstu v tropech i v mírném pásu, až do nadmořské výšky 3,6 kilometrů (Gwirtz and Garcia-Casal, 2013). Ročně se po celém světě vypěstuje více kukuřice než jakékoliv jiné obilniny (Gwirtz and Garcia-Casal, 2013). Dle organizace pro výživu a zemědělství (FAO) za rok 2018 vyprodukovaly nejvíce kukuřice Spojené státy americké, kde výnos činil 392 milionů tun. Následuje Čína s 257 miliony tun a Brazílie s celkem 82 miliony tun (FAO, www.fao.org/faostat). Oproti tomu Česká republika za stejný rok vypěstovala pouze půl milionu tun kukuřice (FAO) (Obr. 1).



Obrázek 1: Největší světoví producenti kukuřice seté (*Zea mays*) za rok 2018 podle FAO. Modifikováno z: www.fao.org/faostat.

V rozvojových zemích Latinské Ameriky a Afriky slouží kukuřice jako hlavní složka potravy a základní zdroj živin. Kukuřice obsahuje asi 72 % škrobu, 10 % bílkovin a 4 % tuku. Poskytuje energii o hodnotě 365 kcal na 100 g (Ranum *et al.*, 2014). Obsahuje také značný podíl vitamínů, zejména B komplexu a vitamínu E (Gwirtz and Garcia-Casal, 2013). V rozvinutých zemích se pěstuje převážně jako krmivo pro hospodářská zvířata, pro výrobu bioetanolu a dále také zejména k výrobě oleje, kukuřičného škrobu a sirupu, glukózy, alkoholu (Ranum *et al.*, 2014).

Kukuřice setá pravá je domestikovaná tráva, která se dorůstá nejčastěji do výšky 1–3 metrů, její výška však záleží na vlhkosti půdy (Obr. 2a). Její listy se souběžnou žilnatinou tvoří čepele dlouhé 30–90 centimetrů. Jednopohlavní květy kukuřice tvoří květenství. Samčí květenství (lata) (Obr. 2b) se skládá z klásků (stopkatého a přisedlého). Květ se skládá z pluchy a plušky, tří tyčinek a dvou plenek. V úžlabí listů vyrůstá samičí květenství, pochvami listenů obalený, 2–5 centimetrů tlustý klas neboli palice (Obr. 2c). Palice se skládají z mnoha obilek. Na vrcholu tohoto květenství se nachází chomáč tvořený čnělkami s bliznami.



Obrázek 2: Kukuřice setá (*Zea mays subsp. mays*), a – celá rostlina, b – samčí květenství (lata), c – samičí květenství (palice). Převzato z: a – Moore *et al.* 2019, b + c – Brendel *et al.* 2002.

Pyl je přenášen větrem (anemogamií), semena jsou opložena nejčastěji cizosprášením (alogamií). Po oplození se tvoří semena o maximální velikosti 2,5 centimetrů. Zrna mohou nabývat různých barev – žluté, zelené, bílé, černé, modrošedé, červené i fialové – a tvarů (Obr. 3) Největší diverzitu nalezneme v Mexiku (Prasanna, 2010) a Indii (Wilkes, 1981). Diverzita různých fenotypů semen koreluje s genetickou variabilitou kukuřice (Ortiz *et al.*, 2010; Prasanna, 2000). Největší genová banka shromažďující kukuřici různých fenotypů CIMMYT (International Maize and Wheat Improvement Center), sídlící v Mexiku, kromě shromažďování a sdílení semen (zárodečné plazmy) inovuje zemědělské postupy pro pěstování kukuřice pro zlepšení produkce a předcházení chorobám plodin. Divoká kukuřice uvolňuje semena z palice samovolně, domestikovaná kukuřice však tuto schopnost ztratila a je zcela závislá na uvolnění semen za pomoci člověka (Pascher, 2016). Jako mnoho tropických rostlin má kukuřice fotosyntézu typu C4, z čehož vyplývá její schopnost rychlého růstu a produkce biomasy při dostatečném osvětlení.



Obrázek 3: Diverzita pigmentování semen kukuřice seté (*Zea mays*). Převzato z: a – Chatham *et al.*, 2019, b – [CIMMYT](#).

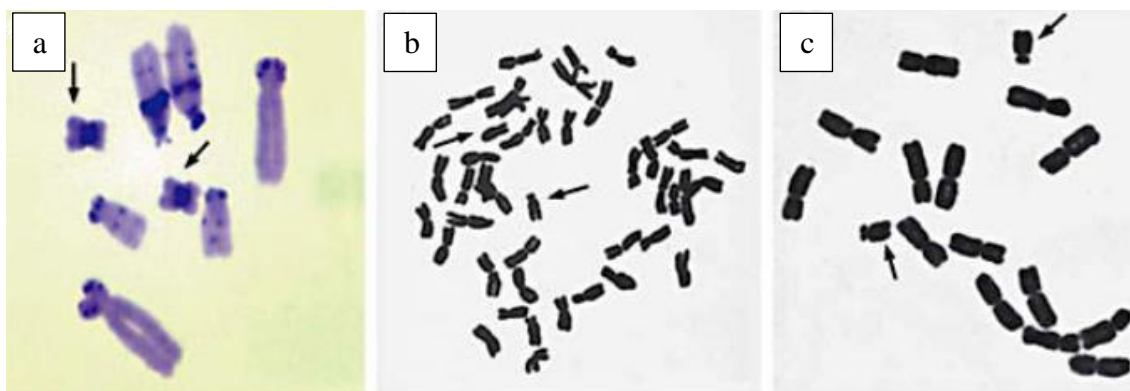
Velikost genomu kukuřice je 2,3 Gbp a čítá přes 32 000 genů (Schnable *et al.*, 2009). Genom je diploidní, tedy $2n=2x=20$; existují ale i tetraploidní varianty $2n=4x=40$ (Khatefov, 2019). Tetraploidní kukuřice slouží převážně výzkumným účelům. Byla využita například pro studium dóze genů (Birchler, 1993) či chování meiotických a somatických chromozómů (Mastenbroek *et al.*, 1982) Některé chromozómy kukuřice a jejich příbuzných druhů obsahují tzv. „chromozomální uzly“, což jsou heterochromatické vysoce repetitivní domény (McClintock *et al.*, 1981). Barbara McClintocková získala v roce 1983 Nobelovu cenu za použití těchto chromozomálních markerů jako důkaz pro svou teorii o transpozónech (McClintock, 1950). Kukuřice je dodnes používaný modelový organismus pro studium genetiky a vývojové biologie.

V roce 2016 byla celá třetina celosvětové produkce kukuřice geneticky modifikovaná. V USA v téže roce podíl geneticky modifikované kukuřice dosahoval dokonce až 92 % (Clive, 2016). GMO kukuřice je odolná vůči glyfosátovým herbicidům, vůči hmyzu (tzv. Bt kukuřice obsahující delta toxiny z *Bacillus thuringiensis*) a suchu. Současně se také vyvíjejí GMO kukuřice, které by měly zvýšenou nutriční hodnotu, například zvýšený výnos methioninu díky vnesení genů z *Escherichia coli* (Planta *et al.*, 2017).

3.2 B chromozómy

3.2.1 Objev B chromozómů

B chromozómy (Obr. 4) jsou nadpočetné, postradatelné chromozómy vyskytující se v genomech hub, rostlin a živočichů nad rámec normální chromozomální sady. Byly objeveny již na začátku minulého století. Poprvé je pozoroval roku 1907 Edmund Wilson u vroubenkovitého brouka rodu *Metapodius* a označil je jako nadpočetné (Wilson, 1907; Wilson 1909). Anglický termín „supernumerary“ je doteď mezi vědci hojně užíván. Následně byly B chromozómy popsány u brouka *Diabrotica* (Stevens, 1908) a u kukuřice (Kuwada, 1915; 1925). Pojem „B chromozóm“ zavedl až Lowell Fitz Randolph roku 1928, aby bylo jednodušší je odlišit od standardních „A chromozómů“ (Randolph, 1925). Jejich výskyt je běžný napříč eukaryoty. Doposud byl chromozóm B nalezen u 14 druhů hub, 2087 druhů rostlin a 736 druhů zvířat (D'Ambrosio and Garcia, 2017).



Obrázek 4: Polymorfismus B chromozómů. a – *Crepis capillari*, b – Lindströmská pšenice s žitnými B chromozómy, c – *Secale cereale*. B chromozómy jsou indikovány šipkami. Převzato z: Jones *et al.*, 2008.

J.P.M. Camacho a J.S. Parker navrhli definici, která říká, že „B chromozómy jsou dodatečné postradatelné chromozómy, které jsou přítomné v některých populacích některých druhů, a které pravděpodobně vzešly z A chromozómů, ale mají své vlastní evoluční pokračování.“ (Camacho, 2005). Z definice plynou zmiňované vlastnosti B chromozómů – jejich postradatelnost, původ z A chromozómů a jejich diferenciaci s A chromozómy, s kterými již nerekombinují (Camacho, 2005).

3.2.2 Morfologie a stabilita

B chromozómy jsou různorodé, co se týče velikosti, počtu, stability a morfologie (Jones and Rees, 1982). V somatické tkáni vykazují většinou konstantní počet, ale mohou chybět v některých tkáních, jako tomu je například u rostliny *Aegilops mutica*, jejíž kořeny B chromozómy neobsahují (Jones, 2003). B chromozómy u rostlin dosahují délky jedné až tří čtvrtin průměrné velikosti A chromozómů (Jones, 1955). V některých druzích jsou však znatelně menší než i ty nejmenší A chromozómy, pak hovoříme o tzv. mikro B chromozómech. Jedná se např. o rostlinu *Hypochoeris maculata*, kde B chromozóm dosahuje šestiny velikosti nejmenšího A chromozómu (Parker, 1976). Dosud nejmenší cytologicky zjištělý rostlinný B chromozóm se nachází u kapradiny *Ophioglossum*, jeho velikost je v rozmezí 1–1,4 μm (Goswami and Khandelwal, 1980). Poloha centromery může být také různorodá – B chromozómy mohou být metacentrické (obě ramena přibližně stejné délky) či akrocentrické (centromera je v blízkosti konce jednoho ramene chromozómu), a to se může lišit dokonce i v rámci jednoho druhu (Penitente *et al.*, 2016).

3.2.3 Funkce

Ačkoliv jsou B chromozómy bez výrazného funkčního projevu, jejich přítomnost může mít vliv na jejich nositele. Obecně se jejich přítomnost projevuje spíše negativně (Valente *et al.*, 2016). V důsledku toho se B chromozómy označují také jako chromozómy sobecké (Östergren, 1945) či parazitické genetické elementy (Doolittle and Sapienza, 1980). Tento projev se vztahuje především na vitalitu a fertilitu (Camacho *et al.* 2005). Jedním z nejškodlivějších účinků B chromozómů jsou energetické výdaje zajišťující zachování B chromozómu během buněčného cyklu a jejich potenciální interferenci se správným uspořádáním A chromozómů během meiózy (Jones and Rees, 1982). Zajímavý efekt byl vypořizován u cichlidových ryb, kde B chromozómy hrají roli v sexuální determinaci (Yoshida *et al.*, 2011). Situace, kdy B chromozóm přináší svému nositeli benefit, byl pozorován mnohem vzácněji. Jeden z takových případů je houba *Nectria haematococca*, které udělují B chromozómy patogenitu a také rezistenci vůči antibiotikům (Coleman *et al.*, 2009). Rostlině *Allium schoenoprasum* prospívají v suchých podmínkách a zvyšují její rychlost klíčení (Plowman and Bougourd, 1994), a houbě *Magnaporthe oryzae* poskytuje efektorové geny, zvyšující tak její patogenitu (Peng *et al.*, 2019)

Jeden z dalších zajímavých účinků B chromozómů je ovlivnění genové exprese A chromozómů. Například u druhů *Scilla autumnalis* (Ruíz-Rejón *et al.*, 1980; Oliver *et al.*, 1982) a *Allium schoenoprasum* (Plowman and Bougourd, 1994) B chromozómy ovlivňují expresi genů pro esterázy a proteinu endospermu na A chromozómech. U mnoha rostlinných a živočišných druhů byl prokázán vliv přítomnosti B chromozómů na frekvenci rekombinací A chromozómů v meióze (Jones and Rees, 1982; Bell and Burt 1990; Camacho *et al.*, 2002).

3.2.4 Výskyt a dóze B chromozómů v organismech

Jednotlivé organismy mají svou vlastní, druhově specifickou toleranci B chromozómů, která je definovaná jako schopnost nést B chromozómy bez vážného poškození (Camacho *et al.*, 2003). Různý stupeň tolerance se odvíjí od počtu kopií B chromozómů (Camacho, *et al.*, 2003). Může docházet k úplné intoleranci (vitalita organismu je zasažena i při jedné kopii B chromozómu a s každou další dále klesá), neúplné toleranci (vitalita není ovlivněna při nízkém počtu B chromozómů, ale zároveň se snižuje při vysokém počtu kopií), úplné toleranci (vitalita je naprosto nezávislá na počtu kopií B chromozómu) a dokonce i k přehnané toleranci (vitalita se s počtem B chromozómů zvyšuje) (Camacho, 2005). Protože se nepříznivé fenotypové účinky chromozómů B příliš neprojevují při

nízkém počtu kopií (Jones, 1985), dá se říct, že nejčastější reakce hostitelských genomů na B chromozómy je tolerance neúplná, přičemž její hranice je velmi variabilní (Camacho, 2005). Například žába z *Leiopelma hochstetteri* může nést až 15 kopií (Green, 2004), žito 6 kopií (Houben, 2017) a lumík *Dicrostonyx torquatus* až 42 kopií B chromozómů (Vujošević *et al.*, 2018).

3.2.5 Dědičnost

Významnou vlastností B chromozómů je jejich nepravidelná ne-Mendelovská dědičnost. Protože neposkytují hostitelům žádnou jasnou výhodu, mělo by docházet k jejich vymýcení, což se ale neděje. K udržení se v populaci si B chromozómy vyvinuly mechanismy, které se označují jako „akumulační“ a obecně je lze rozdělit na premeiotické, meiotické a postmeiotické (Östergren, 1945). Například pre-meiotický akumulací mechanismus zajišťuje nárůst počtu B chromozómů v buňkách zárodečných linií během vývoje, při vstupu do meiózy je tedy počet B chromozómů vyšší než původní zygote (Nur, 1963). Tento mechanismus byl popsán u kobylky *Camnula pellucida*, kde spermatocyty obsahovaly B chromozómy s o 37 % vyšší frekvencí než ve slepém střevě (Nur, 1969). Podobné pre-meiotické mechanismy byly pozorovány i u rostlin (Rutishauser & Röthlisberger, 1966). Při meiotických mechanismech B chromozómy preferenčně migrují na životaschopný meiotický pól v prvním dělení (Jones and Rees, 1982). Post-meiotický akumulací mechanismus byl poprvé nalezen u žita (Hasegawa, 1934), kdy dochází k nondisjunkci v I. pylové mitóze – tedy k přechodu obou sesterských chromatid B chromozómů do jádra gamety. Stejný mechanismus, jen ve druhém pylovém dělení, byl následně popsán i u kukuřice (Roman, 1950)

3.2.6 Původ B chromozómů

B chromozómy pravděpodobně vznikly jako vedlejší produkt karyotypické evoluce z A chromozómů, ale přesný mechanismus vzniku není znám (Jones, 2003). Akumulace repetitivních DNA sekvencí se jeví jako velmi častá dráha v diferenciaci B chromozómů a přítomnost rDNA v B chromozómech mnoha druhů může také naznačovat jistou roli této DNA v původu B chromozómů (Camacho, 2005). Komparativní analýzy DNA sekvencí A a B chromozómů žita ukázaly, že B chromozómy většinu DNA sdílí s A chromozómy (Wilkes *et al.*, 1995; Houben *et al.*, 1996), což by nasvědčovalo jejich vnitrodruhovému původu (Puertas, 2002). Tyto vnitrodruhově odvozené B chromozómy byly nalezeny také u kukuřice (Stark *et al.*, 1996) či například u mouchy *Drosophila subsilvestris* (Camacho *et al.*, 2002). Druhou možností původu je mezidruhový původ,

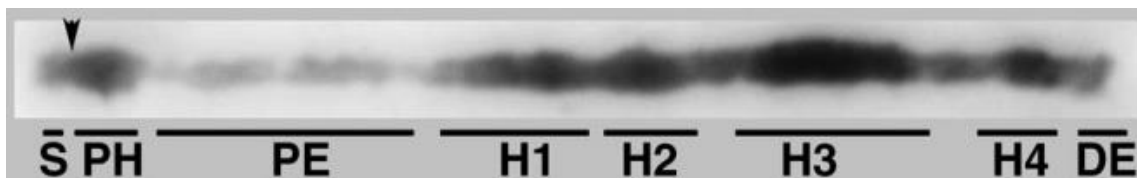
který je odvozen od přítomnosti B-specifických sekvencí DNA, které nejsou přítomny v hostitelských chromozómech, ale naopak jsou přítomny u příbuzných druhů (McAllister and Werren, 1997). Takovým příkladem je například PSR chromozóm u vosy *Nasonia vitripennis*, ve které molekulární fylogeneze retrotranspozonu NATE odhalila nedávný přenos tohoto PSR chromozómu z rodu *Trichomalopsis* do *N. vitripennis* (McAllister and Werren, 1997). Původ B chromozómů ale stále nebyl kompletně objasněn a v současné době je stále předmětem mnoha studií.

3.2.7 B chromozómy kukuřice seté

Poprvé byl B chromozóm kukuřice seté popsán v roce 1915 (Kuwada, 1915). Od té doby byly popsány v mnoha jejích varietách. Byly objeveny například v cukrové kukuřici (Longley, 1927), moučné kukuřici (Longley, 1927) i popcornu (Kozhuchov, 1933). Existuje také jistá pozitivní korelace mezi frekvencí B chromozómů a nadmořskou výškou, kdy se vzrůstající nadmořskou výškou nesou kukuřice B chromozómy častěji (Rosato *et al.*, 1998).

Kukuřice vykazuje ve srovnání s jinými druhy k B chromozómům vysokou míru tolerance. Nejvyšší zaznamenaný počet byl 34 kopií v jednom jádře (Jones and Rees, 1982), přičemž výraznější fenotypový projev byl pozorován až u 15 a více kopií B chromozómů (Randolph, 1941). Fenotypový projev do jisté míry souvisí s počtem B chromozómů (Stark *et al.*, 1996). Rostliny s vyšším počtem B chromozómů mají sníženou fertilitu a vitalitu, produkují semena s defekty, mají zjizvený endosperm a často podélné bílé pruhy na listech (Randolph, 1941; Staub, 1987).

Vzhledem k celosvětovému významu kukuřice je úroveň znalostí o jejím B chromozómu vyšší než u jiných druhů. Struktura B chromozómového bivalentu v pachytene meiotické profáze byla poprvé popsána v roce 1933 (McClintock, 1933). Morfologicky jde o akrocentrický chromozóm (Randolph, 1925), mnoho studií jej však popisuje také jako telocentrický (Rhoades, 1940, Stark, 1996). Svou velikostí odpovídá 4 % genomu kukuřice seté (Rosato, 1998). Chromozóm obsahuje jak euchromatické, tak heterochromatické regiony, ale podíl přítomného heterochromatinu je neobvykle velký (Carlson, 1978). Je tvořen velmi malým krátkým ramenem, centromerou (centromerický chromatin) a dlouhým ramenem složeným z několika heterochromatinových a euchromatinových bloků (Obr. 5).

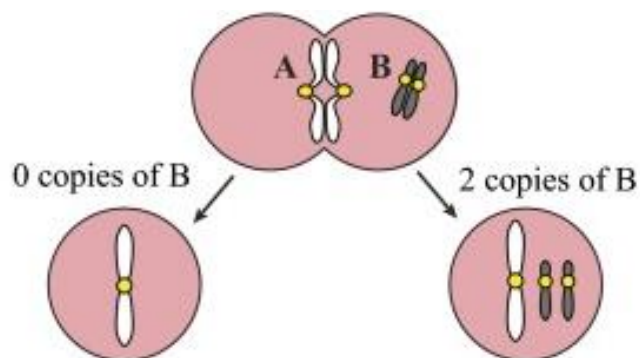


Obrázek 5: Mikroskopický obraz B chromozómu kukuřice (invertované DAPI zbarvení). Skládá z krátkého ramena (S), centromery (indikováno šipkou), proximálního heterochromatinu (PH), proximálního euchromatinu (PE), čtyř bloků distálního heterochromatinu (H1-H4) a distálního euchromatinu (DE). Převzato z: Lamb *et al.*, 2007.

3.2.7.1 Akumulační mechanismy B chromozómu kukuřice seté

U kukuřice existuje několik mechanismů, které zajišťují přežití B chromozómů v populaci – přenos meiózou jako univalent, nondisjunkce v druhé pylové mitóze a preferenční oplození vajíčka B chromozóm obsahující spermii (Lamb *et al.*, 2007). Přesný mechanismus těchto procesů, jejich genetická podstata a regulace, není plně objasněn. Podle posledních studií je ale zřejmé, že geny, které jsou v těchto procesech podstatné, jsou kódovány B chromozómem samotným (Alfenito and Birchler, 1993; Lamb *et al.*, 2007). Bylo prokázáno, že zachování univalentu v meióze a jeho přechod do pylu je řízen regionem ve třetím heterochromatickém bloku dlouhého ramene (Carlson and Roseman, 1992).

Podobně i mechanismus nondisjunkce (nerozdělení sesterských chromatid v druhé pylové mitóze (Obr. 6)) vyžaduje faktory, z nichž jeden se nachází na dlouhém rameni v proximálním euchromatinu (Ward, 1973; Lin, 1978), druhý dokonce až na špičce dlouhého ramene distálního euchromatinu B chromozómu (Roman, 1950; Carlson, 1978). Tento faktor zajišťuje silné připojení regionu centromery B chromozómu při druhém pylovém mitotickém dělení, čímž zabraňuje rozdělení sesterských centromer. Jelikož se na nondisjunkci podílí centromera a distální rameno chromozómu, tedy elementy na opačných stranách chromozómů, je zajištěna jeho integrita. Zajímavé je, že se nondisjunkce může objevit i v somatických buňkách, je-li B chromozóm přítomen v pěti a více kopiích (Masonbrink and Birchler, 2010).



Obrázek 6: Během druhé pylové mitózy se vytváří dvě spermie. A chromozómy segregují správně pouze s jednou kopií, kdežto B chromozómy se typicky neoddělí, přičemž vzniká jedna spermie bez kopie B chromozómu a jedna spermie s dvěma kopiemi. Převzato z: Nannas and Dawe, 2015.

Při preferenčním oplození dochází přednostně k oplození vajíčka spermií, která nese B chromozóm, a to přibližně v 65 % případů (Roman, 1948). Pro toto preferenční oplození není znám přesný mechanismus, ale je možné, že nondisjunkce v druhé pylové mitóze může být polarizována tak, že dva B chromozómy často migrují na specifický pól. Na tomto pólu má spermie poziční výhodu oproti druhému spermatu v procesu oplodňování vajíčka (Carlson, 1978).

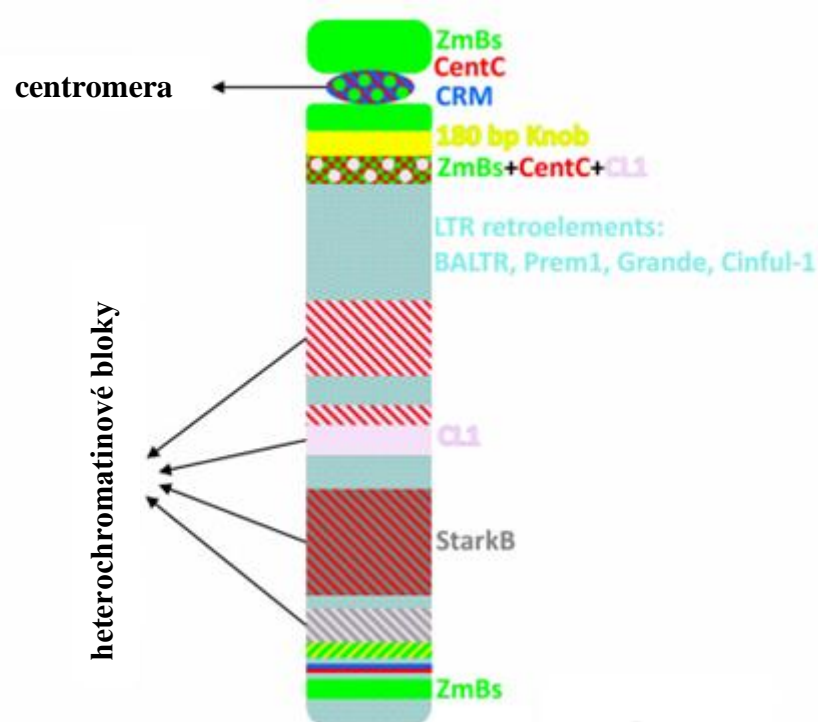
3.2.7.2 Složení sekvencí na B chromozómu kukuřice seté

B chromozóm kukuřice seté se skládá z přibližně 50 % heterochromatických a 50 % euchromatických oblastí (Stark *et al.*, 1996). Jeho velikost je přibližně 126 Mbp (Blavet *et al.*, in press). Většina jeho sekvencí má své analogy na A chromozómech, ale existují i takové, které jsou specifické jen pro B chromozóm. Po mnoho desetiletí se věřilo, že se B chromozómy skládají pouze z repetitivních sekvencí. Podle současných studií se potvrdilo, že obsah repetitivních sekvencí je v DNA B chromozómů opravdu dominantní; jen mobilní elementy představují 65 % celé sekvence B chromozómu kukuřice. Zároveň se ale ukazuje, že ani podíl genů není zanedbatelný.

V posledních letech byly v několika studiích identifikovány aktivně transkribované geny na B chromozómech (Dalla Benetta *et al.*, 2019; Blavet *et al.*, in press). V sekvenci B chromozómu kukuřice seté bylo nalezeno 1781 genů a 3504 transkriptů (Blavet *et al.*, in press). Ontologická analýza odhalila, že významná část těchto genů má roli v buněčném dělení, buněčném cyklu a součinnosti tak zajišťují jeho přežití.

V sekvenci B chromozómu byla dále detekována také organelární DNA (Blavet *et al.*, in press). B chromozóm obsahuje celkem 712 kbp DNA z mitochondrií a plastidů, tedy celkově asi 0,6 % genetické informace chromozómu.

Struktura centromery B chromozómu byla již dříve popsána jako přibližně 700 kbp centromerická doména složená ze tří navzájem se prolínajících repetitivních sekvencí (Jin *et al.*, 2005) (Obr.7) – CentC (156 bp centromerický satelit), CRM (aktivní centromerický retrotranspozon) a ZmBs (B chromozóm specifický repetitivní element) (Ananiev *et al.*, 1998; Sharma and Presting, 2008; Alfenito and Birchler, 1993). CentC satelit a CRM retrotranspozon se nachází běžně ve všech kukuřičných centromerách (Lamb, et al., 2005), kromě toho se klastry CentC nachází i na dlouhém rameni B chromozómu, což potvrdila i již zmiňovaná nová studie (Blavet *et al.*, in press). Co se týče specifické ZmBs repeticie, výsledky studií důrazně nasvědčují o její roli v procesu nondisjunkce (Han *et al.*, 2007; Masonbrink and Birchler, 2012). Všechny tři velké repetitivní sekvence B chromozómu mají schopnost vázat CENH3 nukleosomy a pozorování chování těchto histonových variant indikuje, že si centromera zachovala strukturu a funkci podobnou ostatním kukuřičným centromerám (Jin *et al.*, 2005).



Obrázek 7: Idiogram B chromozómu kukuřice s vyznačenou polohou repetitivních sekvencí. Modifikováno z: Marques *et al.*, 2018.

V sekvenci B chromozómu existují i repetice specifické jen pro B chromozóm. Jedna, ZmBs repetice, se nachází v oblasti centromery B chromozómu a na distálním konci dlouhého ramene (Alfenito and Birchler, 1993). Druhá, CL-1 repetice s velikostí jednotky 1500 bp, je přítomna v prvních třech heterochromatických blocích dlouhého ramene (Cheng and Lin, 2004). Na třetím a čtvrtém bloku distálního heterochromatinu B chromozómu se nachází repetice StarkB (22 kbp). Různé kopie této repetice se od sebe vzájemně liší malými insercemi, delecemi, duplikacemi a jedno nukleotidovými polymorfismy a jedna jeho varianta je specifická jen pro B chromozóm. (Lamb *et al.*, 2007).

3.3 Cytogenetická analýza rostlinných genomů

Analýza genomů zahrnuje všechny postupy, které vedou k poznávání genomů z hlediska struktury, organizace či funkce. Jedním z přístupů je cytogenetická analýza, která se soustřeďuje na charakterizaci genomu na úrovni jádra či chromozómů. Poskytuje základní informace o rozložení a organizaci DNA během buněčného cyklu a podává vizuální informace v přímé souvislosti k poloze. Cytogenetické metody umožnily propojení molekulárních dat o DNA sekvenci s chromozomálními a expresními informacemi na tkáňové, buněčné i subcelulární úrovni (Schwarzacher and Heslop-Harrison, 2000).

Kromě základních mikroskopických pozorování se za první cytogenetickou techniku považuje metoda tzv. pruhování - „banding“. Metoda je založena na studiu pruhovaného paternu, který lze po použití specifických barviv na chromozómech pozorovat. Poprvé tuto techniku popsala Barbara McClintock v roce 1929, kde za použití karmínu byla schopna identifikovat jednotlivé chromozómy kukuřice (McClintock, 1929). Později byly zavedeny další metody bandingu. C-banding používá hydroxid barnatý a Giemsovův roztok, zabarvující konstitutivní (trvale inaktivní) heterochromatin (Pardue and Gall, 1970). Další způsob barvení je G-banding, který vizualizuje chromozómy na základě působení trypsinu a následným obarvením Giemsovým roztokem (Wurster, 1972), což dává za vznik světlým a tmavým pruhům, dnes používaným v medicíně například pro lokalizaci genů a pro popis strukturních změn karyotypu. Q-banding používá fluorescenční barvivo chinakrin (Caspersson *et al.*, 1970). Dalšími typy bandingu je R-banding (reverzní), který barví opačné oblasti G-bandingu (Dutrillaux and Lejeune, 1991), a N-banding,

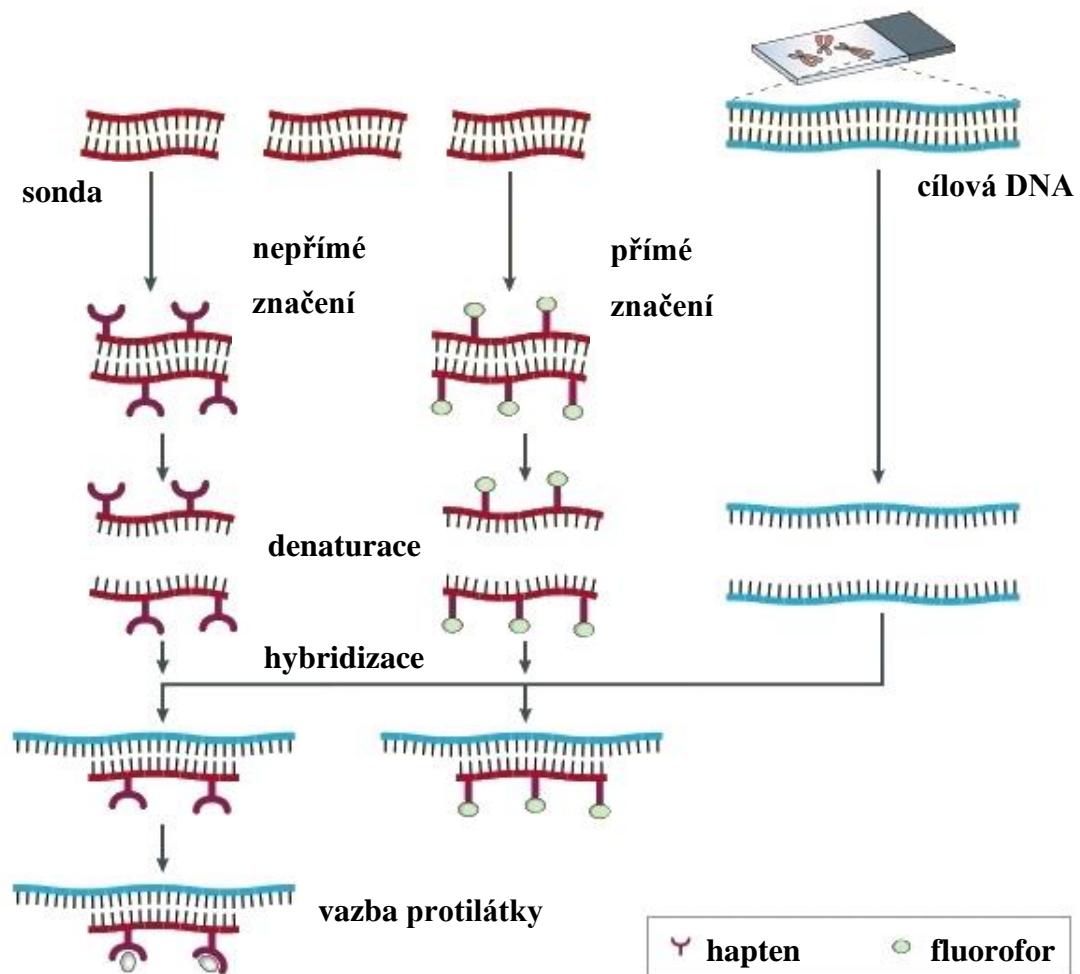
identifikující proteiny v NOR (Nucleolar Organizer Regions) oblastech (Matsui and Sasaki, 1973).

Pokročilou technikou zobrazení specifických DNA či RNA sekvencí, poprvé použitou poprvé roku 1969 (Gall and Pardue, 1969), je *in situ* hybridizace. Původní radioaktivní značení nebylo příliš efektivní a bezpečné, časem bylo zaměněno za značení fluorescenční (Schwarzacher and Heslop-Harrison, 2000; Langer-Safer, *et al.*, 1982). Kromě urychlení procesu a vynechání práce s radioaktivitou přineslo použití fluorescenčně značených sond i vyšší rozlišení a lokalizace více sekvencí najednou (Schwarzacher and Heslop-Harrison, 2000). Na druhou stranu nevýhodou fluorescenční *in situ* hybridizace je použití světelně či tepelně nestabilních látek a nutnost použití fluorescenčního mikroskopu s vysokou pořizovací cenou (Schwarzacher and Heslop-Harrison, 2000).

3.3.1 Fluorescenční *in situ* hybridizace

Fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) je nejvýznamnější cytogenetická metoda, kombinující metody cytogenetiky, molekulární biologie, mikroskopie a analýzy obrazu (Schwarzacher and Heslop-Harrison, 2000). Byla vyvinuta začátkem 80. let 20. století (Langer-Safer *et al.* 1982) a rychlý rozvoj zaznamenala hlavně v 90. letech s nástupem snímacích kamer a zobrazovacích systémů pro zpracování FISH signálů (Vrolijk *et al.*, 1994).

Metoda umožňuje detekci specifických sekvencí na interfázním jádře či chromozómech pomocí fluorescenčně značených sond. Princip spočívá v denaturaci cílové DNA, na kterou poté hybridizuje sonda s komplementární sekvencí (Obr. 8). Výsledný barevný signál sondy navázané na sekvenci je možné vizualizovat pomocí fluorescenčního mikroskopu (Langer-Safer *et al.*, 1982).



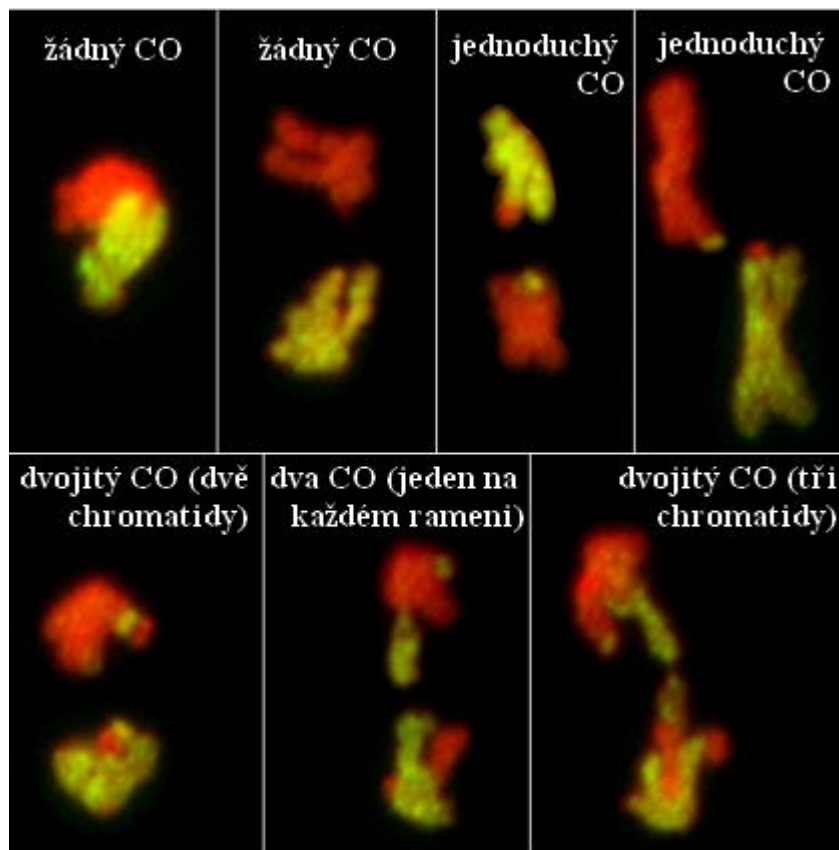
Obrázek 8: Princip fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH). Modifikováno z: Speicher, 2005.

3.4.2 Značení a typy sond

Sondou se rozumí fragment DNA nebo RNA, který je označen fluoroforem, jehož signál je detekován. Značení může být buď přímé, kde se využije fluoroforem značených nukleotidů (Wiegant *et al.*, 1991), anebo nepřímé, kde se na sondu váže haptén, který je v dalším kroku detekován vazbou protilátky s fluoroforem (Langer-Safer *et al.*, 1982). Fluoroforem se rozumí chemická sloučenina s funkční skupinou schopnou absorbovat energii excitačního záření a emitovat přebytečnou energii jako signál specifické vlnové délky. Prvním fluoroforem použitým ve fluorescenční *in situ* hybridizaci byl fluorescein isothiokyanát (FITC) (Pinkel *et al.*, 1986). Dále se využívají Cyanin Cy3 a Cy5, Texas Red, FAM (fluorescein amidite) či různé fluorofory řady Alexa Fluor a Atto. Výhodou přímého značení je větší rychlost experimentu a menší nespecifické pozadí (Wiegant *et al.*, 1991), nevýhodou je však menší citlivost a intenzita (Schwarzacher, 2003).

Sondy lze připravit pomocí několika metod v závislosti na délce značeného fragmentu či dostupnosti sekvence. Původní metoda nick translace byla vyvinuta v druhé polovině 70. let (Rigby *et al.*, 1977) a používá se pro značení dlouhých fragmentů či genomické DNA. Druhým nejvýznamnějším způsobem značení je PCR (polymerázová řetězová reakce), která se od běžné PCR reakce liší pouze přidáním značených nukleotidů (Fuchs *et al.*, 1994). Méně používané jsou pak metody náhodného značení (Yu *et al.*, 1994) a koncového značení (Schmitz *et al.*, 1991). V současnosti je také možné si objednat komerčně vyráběné syntetické oligonukleotidy. Tato efektivní automatizovaná syntéza však zvyšuje výrobní náklady a možnost jejího využití závisí na typu experimentu (Wittwer and Makrigiorgos, 2018).

Sondy můžeme klasifikovat také na základě jejich specifčnosti. Takové sondy mohou být tedy například jednokopiové (Jiang *et al.*, 1995) repetitivní (Pedersen and Langridge, 1997), genomové (GISH) či chromozómově specifické nebo celochromozómové (Pinkel *et al.*, 1988). Jednokopiové sondy jsou takové, které se objevují v genomu v jedné kopii a obvykle představují geny či regulační oblasti (Jiang *et al.*, 1995). Repetitivní sondy cílí na velkou skupinu sekvencí v rostlinném genomu, nacházející se v genomu v heterochromatických oblastech (Kubis *et al.*, 1998). Takovými oblastmi mohou být mikrosatelity a tandemové repetice, kterými jsou běžně například telomery a centromery. Další variantou je GISH (genomická *in situ* hybridizace), která používá celou genomickou DNA jednoho druhu jako sondu. Používá se například pro studium hybridů a polyploidů (Silva and Souza, 2013). Příklad využití GISH lze vidět na Obr. 9, kde byla jako sonda použita genomová DNA *Festuca pratensis*, která hybridizovala s DNA na preparátech *Lolium multiflorum* (Ferreira *et al.*, 2020). Takto byly studovány crossing-over a chromatidové interference v meióze těchto hybridů.



Obrázek 9: GISH hybridů tráv *Lolium multiflorum* (červená) × *Festuca pratensis* (žlutá) v anafázi I ukazující různé typy crossoverů (CO). Převzato z: Ferreira *et al.*, 2020.

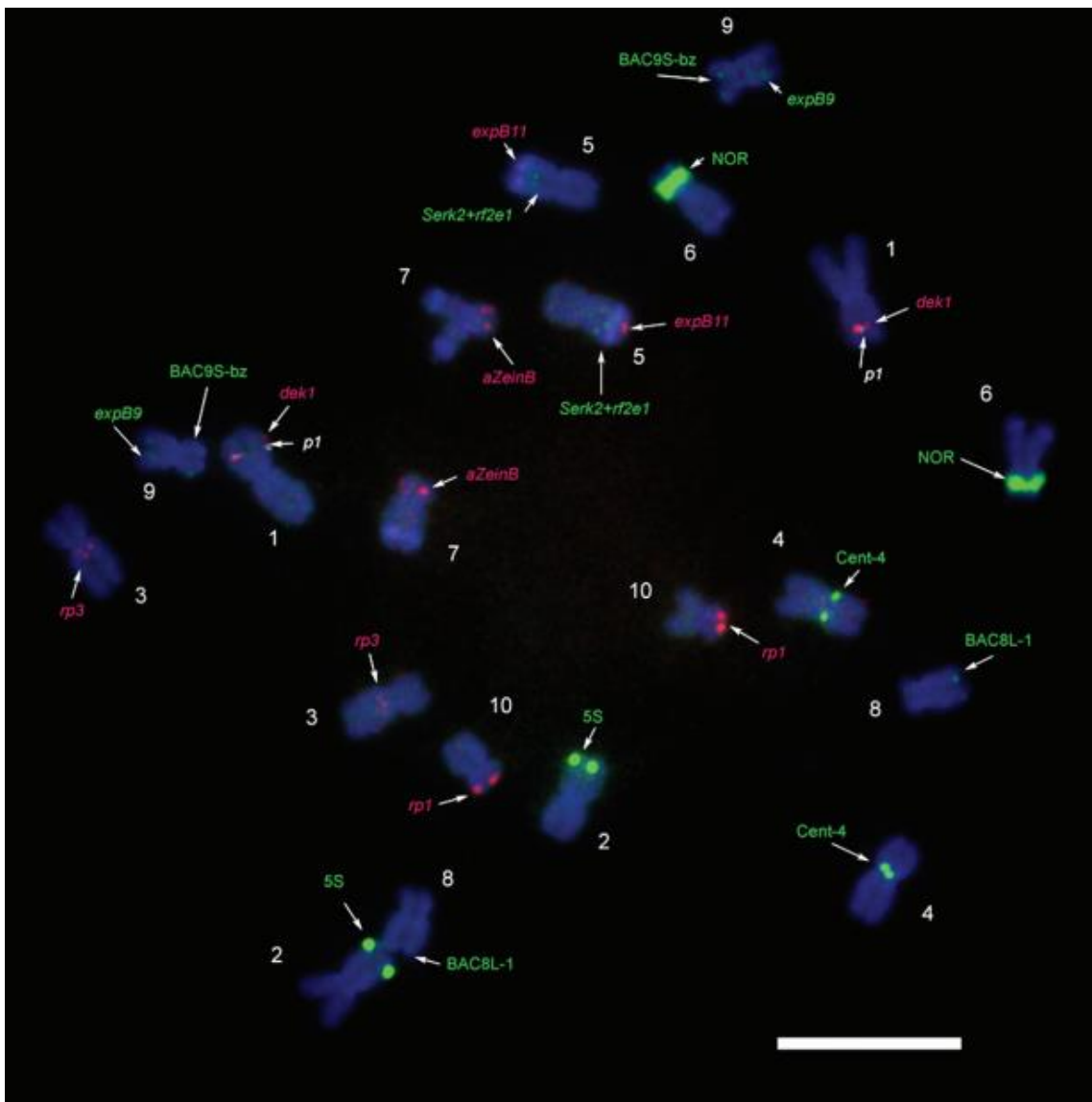
Extrémním případem chromozómově specifické sondy jsou sondy celochromozómové. Aplikace využívající tyto sondy se nazývá „chromosome painting“ a rutinně slouží jako diagnostický nástroj v humánní medicíně (Speicher *et al.*, 1996). Na rostlinách nebyl dlouho chromozómový painting možný kvůli nespecifické hybridizaci repetitivních sekvencí obsažených v sondách, které nelze efektivně blokovat (Fuchs *et al.*, 1996). Alternativou u rostlin byl dlouhodobě painting pomocí koktejlu BAC klonů, které jsou odvozené od specifických chromozómů (Lysák *et al.*, 2002). Dnes se u rostlin dá využít metoda oligopaintingu (Han *et al.*, 2016), která je ale vhodná pouze pro druhy s kvalitní referenční sekvencí a omezeným obsahem repetice, jako je například banánovník (Šimoníková *et al.*, 2019).

3.3.3 Využití FISH

Jednou z nejčastějších aplikací FISH u rostlin je mapování DNA sond na chromozómy, což umožňuje sestavení cytogenetických map (Jiang, 2019). Je-li DNA sonda z oblasti, kde existují genetické markery, je možné takto obě tyto mapy integrovat (Jiang and Gill,

1994). Cytogenetické mapy poskytují důležité biologické informace o organizaci genomu, spojují údaje o genetické vzdálenosti s cytologickými strukturami a mají doplňkovou roli při sestavování konečné sekvence organismu (Wang *et al.*, 2006)

Fluorescenční *in situ* hybridizace je také důležitým nástrojem pro identifikaci chromozómu a sestavení karyotypu u rostlin. Princip spočívá v navržení sond na repetitivní či jednolokusové oblasti chromozómu (specifické pro daný chromozóm) na základě jejichž barevných signálů je poté možné chromozómy od sebe navzájem rozlišit. Tímto způsobem bylo identifikováno všech deset somatických chromozómů kukuřice seté (Lamb *et al.*, 2006) (Obr.10).



Obrázek 10: Identifikace kukuřičných somatických chromozómů s použitím specifických sond. Převzato z: Lamb *et al.*, 2006.

Významnou aplikací FISH je v neposlední řadě i studium prostorového uspořádání chromatinu a architektury interfázního jádra metodou 3D-FISH. Metoda je založena na uchování objektů v jejich prostorovém rozměru a na 3D mikroskopii. Pomocí sond lze sledovat pozici či vzájemnou orientaci jak individuálních genových lokusů, tak celých chromozómových domén. 3D FISH je možné provést na buňkách, embryích, tlustých řezech tkáně či tenkých kryo-řezech buněk (Kempfer and Pombo, 2019).

4 Materiál a metody

4.1 Biologický materiál

Referenčním standardem pro experiment byla linie kukuřice seté (*Zea mays*, 2n=2x=20 +B) B73 s vysokou frekvencí výskytu B chromozómů. Rostliny pro izolaci DNA byly pěstovány ve skleníku v režimu světlo/tma (16h 24°C/8h 20°C).

Pro samotný experiment byl použit set osmi linií (Tab.1) získaných z genové banky CIMMYT, Mexiko. Vzorek linií byl vybrán na základě geografických odlišností a frekvence výskytu B chromozómu.

Tabulka 1: Výběr linií kukuřice seté použité pro experimenty

Linie	Identifikační číslo	Země původu	Nadm. výška (m n.m.)	Klima
BOLI 344	CIMMYTMA 16867	Bolívie	1900	Mírné podnebí
BOLI 864	CIMMYTMA 18679	Bolívie	2378	Tundra, polární oblasti
GUAT 68	CIMMYTMA 5165	Guatemala	366	Tundra, polární oblasti
GUAT 426	CIMMYTMA 10024	Guatemala	1844	Mírné podnebí
HOND 52	CIMMYTMA 876	Honduras	40	Tropy, savana
RDOM 261	CIMMYTMA 1321	Dominikánská republika	7	Tropy, deštné pralesy
RDOM 302	CIMMYTMA 1117	Dominikánská republika	100	Tropy, savana
SALV 110	CIMMYTMA 3647	Salvadorská republika	45	Tropy, savana

4.2 Použité chemikálie a roztoky

Použité chemikálie

- Agaróza (Sigma-Aldrich, kat. č. A9539)
- Aminoallyl-dUTP – DEAC (Jena Biosciences, kat. č. NU-803-DEAC)
- Aminoallyl-dUTP-5-FAM (Jena Biosciences, kat. č. NU-803-5FM)
- Aminoallyl-dUTP-ATTO-647N (Jena Biosciences, kat. č. NU-803-647N-L)
- Bromfenolová modř (Sigma-Aldrich, kat. č.: B0126)
- Celulóza Onozuka R-10 (Yakult Honsa, kat. č. 201069)
- Dextran sulfát, sodná sůl (SERVA, kat. č. 9011-18-1)
- Ethanol 99,8% (Lach-Ner, kat. č. 20025-U99)
- Ethidium bromid (Sigma-Aldrich, kat. č. E8751)
- Formaldehyd 37% (Sigma-Aldrich, kat.č. 818708)
- Formamid 99,5% (Sigma-Aldrich, kat. č. F9037)
- Gene Ruler 100 bp DNA Ladder (Fermentas, kat. č.: SM0321)
- Glycerol (Sigma-Aldrich, kat. č.: G5516)
- Chlorid draselný (KCl) (Lach-Ner, kat. č. 7447-40-7)
- Chlorid sodný (NaCl) (Lach-Ner, kat. č. 30423)
- Imerzní olej Immersol 518F (Carl Zeiss, kat. č. 12-624-66A)
- Kyselina boritá (Lach-Ner, kat. č. 10017-AP0)
- Kyselina ethylendiamintetraoctové (EDTA) (Sigma-Aldrich, kat. č. E5134)
- Kyselina octová 99,8 % (Lach-Ner, kat. č. 10047-A99)
- Methanol 99,5 % (Lach-Ner, kat. č. 20038-ATO)
- Nick-translační mix (Roche, kat. č. 11745808910)
- Nukleotidy: dATP, dCTP, dGTP, dTTP, každý 100mM (VWR International, kat. č. 733-1364)
- Pektolyáza Y-23 (Ducheve, kat. č. P8004.0001)
- PrimeSTAR GXL Premix (kat. č. R051B) obsahující Primestar GXL DNA polymerázu, PrimeStar GXL pufr pro polymerázu (Mg²⁺ plus) a mix nukleotidů
- Pufr pro *Taq* polymerázu (New England Biolabs, kat.č. B7002S)

- *Taq* DNA polymeráza (New England Biolabs, kat. č. M0209L)
- Tetramethyl-Rhodamine-5-dUTP (Roche, kat. č. 11534378910)
- Texas Red-12-dUTP (Thermo Fisher Scientific, kat. č. C7631)
- Tris base (Sigma-Aldrich, kat. č. 77-86-1)
- Vectashield s DAPI (Vector Laboratories, kat. č. H-1200)
- Xylencyanol (Sigma-Aldrich, kat. č.: X4126)
- λ HindIII DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, kat. č. SM0101)

Použité roztoky

- 0,5M EDTA (1 l): 186,1 g dihydrátu disodné soli ethylendiamintetraoctové kyseliny rozpustit v 800 ml destilované vody, 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
- 1M Tris-HCl pufr (1 l): rozpustit 121,14 g Tris v 800 ml destilované vody, doplnit do 1 litru a upravit pH na 8
- 1x KCl pufr (250 ml): 2,796 g KCl a 0,396 g EDTA rozpustit v destilované vodě, doplnit do 250 ml a upravit pH na 4
- 20x SSC pufr (1 l): v 800 ml destilované vody rozpustit 88,2 g citrátu sodného a 175,3 g NaCl), upravit pH na 7, doplnit destilovanou vodou do 1 l
- 2x SSC pufr (1 l): 100 ml zásobního roztoku 20x SSC pufru a 900 ml destilované vody
- 4% formaldehyd (56 ml): 6 ml 37% formaldehydu a 50 ml 2xSSC
- 45% kyselina octová (100 ml): 45 ml 99,8% kyseliny octové a 55 ml destilované vody
- 50% sodná sůl dextran sulfátu: 20 g rozpustit ve 40 ml vody
- 5x TBE pufr (1 l): 54 g Tris báze a 27,5 g kyseliny borité rozpustit ve vodě, přidat 20 ml 0,5M EDTA, doplnit vodou na 1 l, upravit pH na 8
- 5x TBE pufr (1 l): 54 g Tris báze, 27,5 g kyseliny borité a 20 ml 0,5M EDTA rozpustit v 800 ml destilované vody, doplnit do 1 l a upravit pH na 8
- 6x STOP C (10 ml): 5 mg bromfenolové modři, 2 ml 0,5M EDTA, 4,3 ml 99,9% glycerolu, 5 mg xylencyanolu, 1 ml 10% SDS, doplnit vodou na 10 ml

- 90% kyselina octová (100 ml): 90 ml 99,8% kyseliny octové a 10 ml destilované vody
- Hybridizační roztok: formamid, 50% dextran, 20x SSC v poměru 5:2:1
- Marker molekulového hmotnosti: 20 µl Gene Ruler 100 bp, 200 µl 6x STOP C, 300 µl vody, zvortexovat
- Roztok ethidium bromidu (1 l): ve 100 ml destilované vody rozpustit 50 g ethidium bromidu, doplnit destilovanou vodou do 1 l
- Směs enzymů 4% celulóza a 1% pektolyáza: 0,2 g celulózy a 0,05 g pektolyázy rozmíchat na ledu ve 4 ml 1x KCl, doplnit 1x KCl do 5 ml, rozpipetovat do zkumavek po 20 µl
- Směs neznačených a značených nukleotidů: do 5,25 µl vody napipetovat 0,5 µl 10mM dATP, 0,5 µl 10mM dCTP, 0,5 µl 10 mM dGTP, 1,65 µl 2mM dTTP a 1,6 1mM dUTP (ATTO-647-dUTP, FAM-dUTP, DEAC-dUTP, Tetramethyl rhodamin-dUTP nebo Texas Red-dUTP)
- TE (Tris-EDTA) pufr (100 ml): 1 ml 1M Tris-HCl (pH 10-11) smíchat s 0,2 ml 0,5M EDTA, destilovanou vodou doplnit na 100 ml a pH upravit na 7,6

Použité kity

- NucleoSpin Plant II kit (Macherey Nagel, kat. č.: 740770)

4.3 Použité přístroje

- Centrifuga Micro Star 17R (VWR International)
- Digestoř (Merci)
- Elektroforetická horizontální aparatura Owl A6 (Thermo Fisher Scientific)
- Fluorescenční mikroskop Axio Imager.Z2 (Carl Zeiss) s CCD kamerou, zdrojem Power Suply (Eplax GmbH) a UV lampou X-Cite exacte (Excelitas)
- Hybridizační komůrka SM30 (Boeckel Scientific)
- Lyofilizátor CoolSafe s vakuovou pumpou VacSafe (LaboGene)
- Oscilační mlýn MM301 (Retsch)
- Spektrofotometr NanoDrop One/One^C Microvolume UV-Vis (Thermo Fisher Scientific)

- Stolní centrifuga MiniStar silverline (VWR International)
- Světelný binokulární mikroskop Primo Star (Carl Zeiss)
- Termocykler MasterCycler (Eppendorf 5333)
- Termocykler PCT-200 (MJ Research)
- UV transiluminátor InGenius3 (Syngene)
- Vodní lázeň SUB6 (Grant Instruments)
- Zdroj k elektroforéze Owl EC300XL2 (Thermo Fisher Scientific)

4.4 Postupy experimentálních a vyhodnocovacích metod

4.4.1 Kultivace a odběr kořínků

Semena byla přes noc namočena ve vodě a poté vyseta na vlhký filtrační papír na Petriho misky, kde se nechala klíčit 3 dny při pokojové teplotě. V poledních hodinách, kdy je kořenový meristém nejaktivnější, byly semenáčkům odebrány kořínky. Buněčný cyklus byl zastaven působením ledové vody po 24 hodin. Kořínky byly následně fixovány 10 minut v 90% kyselině octové na ledu a skladovány pro pozdější použití v 70% ethanolu na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.4.2 Příprava nakapávaných preparátů

Příprava suspenze protoplastů z kořenových meristémů probíhala po celou dobu na ledu. Kořeny byly nejdříve třikrát promyty v destilované vodě během 5 minut a poté 5 minut v 1x KCl pufru. Následně byly z kořenů odříznuty kořenové špičky, které byly inkubovány 62 minut v $20\text{ }\mu\text{l}$ směsi enzymů (4% celulóza Onozuka R-10 a 1% pektolyáza Y-23) ve vodní lázni při 37°C . Působení enzymů bylo zastaveno přidáním TE pufru na dobu 5 minut. Natrávené kořenové špičky byly promyty 3x 5 minut 99,8% ethanolem. Nakonec byly kořenové špičky homogenizovány ve $30\text{ }\mu\text{l}$ fixáže (ledové kyseliny octové a methanolu v poměru 9:1), $7\text{ }\mu\text{l}$ této suspenze bylo nakápnuto na podložní skla ve vlhkém prostředí a po zaschnutí byla kvalita preparátů (počty chromozómů, mitotický index) zkontrolována pod světelným mikroskopem s fázovým kontrastem. Hotové preparáty byly skladovány při teplotě $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.4.3 Izolace genomické DNA kukuřice seté

Genomická DNA byla izolována z mladých listů rostlin kukuřice seté linie B73+B pěstovaných ve skleníku. Odebrané listy byly vloženy do mikrozkušavek a sušeny v lyofilizátoru přes noc za sníženého tlaku. Do zkušavek byly k vysušeným listům přidány skleněné kuličky a listy byly homogenizovány v oscilačním mlýnku (4 minuty, 27 otáček/s). Samotná izolace DNA byla provedena dle protokolu výrobce pomocí komerčního kitu NucleoSpin Plant II. Výsledná koncentrace izolované DNA byla stanovena spektrofotometricky přístrojem Nanodrop.

4.4.4. Testování primerů

Pro detekci polymorfismu v rámci B chromozómů bylo vybráno 5 repetitivních sekvencí: B-specifická repetice ZmBs (CL9), CentC (CL63), knob repeat (CL84), CRM a Stark. Primery pro jednotlivé repetice byly navrženy pomocí online softwaru Primer3 (Untergasser *et al.*, 2012; Koressaar *et al.*, 2007) s využitím sekvencí dostupných v databázi GenBank (Tab. 2). Sekvence navržených primerů jsou uvedeny v tabulce 2. Primery byly testovány pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR). Reakční směs obsahovala 50 ng genomické DNA kukuřice seté, 1x koncentrovaný pufr pro *Taq* polymerázu, 100 μM směsi neznačených nukleotidů, 1 U *Taq* polymerázy a R i F primery, každý o koncentraci 0,5 μM. Směs byla doplněna vodou do 25 μl. Podmínky reakce byly následující: 94 °C/5 min, 34 cyklů: 94 °C /50 s, 58 °C /50 s, 72 °C /50 s; 72 °C /5 min. Produkty byly zkontrolovány elektroforézou v 1,5% agarózovém gelu v 0,5x TBE pufru.

Tabulka 2: Seznam primerů pro repetitivní sondy.

Sonda	Kód v GenBank	Primer	Sekvence primeru (5' → 3')	Velikost produktu (bp)
CL9	S67586.1	MaizeB_CL9_L	AGACCCTAAACCCTGAACCC	311
		MaizeB_CL9_R	CTGGTGCTAAGTGTTTGGGG	
CL63	CL569181	MaizeB_CL63_L	TTGTATGCACCCCGATACCG	258
		MaizeB_CL63_R	TTTTGCCACCGGAACCATTT	
CL84	M32532.1	MaizeB_CL84_L	GCCCAATAACGTCTTCATCA	296
		MaizeB_CL84_R	GAGCCTCTGGTCGATGATCA	
CRM	KT989678.1	CL7Contig197RT_L	ATGTGCGTAGATTGTCTGTCG	278
		CL7Contig197RT_R	AAGGCCCGTAGAACTTCGTT	
Stark	KX760165.1	pSTARTK5,5_1_L	GTAGCACGGACATCCCAAGT	5224
		pSTARTK5,5_1_R	CTTGTGCTGGAAAGTGACGA	
		pSTARTK5,5_2_L	TCGTGCCATGCTATGCTTAC	2426
		pSTARTK5,5_2_R	GATGCACGAGAGACAGTGA	

4.4.5 Příprava repetitivních sond pro FISH

Čtyři z pěti používaných sond (CL9, CL63, CL84 a CRM) byly repetece s krátkou repetitivní jednotkou a byly značeny analogicky pomocí PCR. Reakční směs pro přípravu sond měla identické složení vyjma nukleotidů. Směs nukleotidů obsahovala neznačené nukleotidy (dATP, dCTP, dGTP a dTTP) a jeden z nukleotidů značených fluoroforem (aminoallyl-dUTP-FAM, aminoallyl-dUTP-DEAC, tetramethyl-rhodamine-5-dUTP či Texas Red-12-dUTP o koncentracích 50 μ M). Značení sondy probíhalo za stejných podmínek jako testování primerů. Produkty PCR reakce byly opět zkontrolovány za použití elektroforézy (1,5% agaróza, 0,5x TBE pufru). Poslední sonda pro transpozon Stark se skládala ze dvou dlouhých fragmentů o délkách 5224 bp a 2426 bp. V prvním kroku přípravy sondy byly oba fragmenty nejprve amplifikovány pomocí primerů (Tab. 2) a ty byly následně značeny nick translací. Reakční směsi pro amplifikaci obou fragmentů této smíšené sondy obsahovaly 5 U polymerázy PrimeStar GXL, 1x koncentrovaný pufr pro PrimeStar polymerázu, 100 μ M směsi neznačených nukleotidů z Primestar GXL Premixu, 50 ng DNA a vodu do 20 μ l. Produkt byl amplifikován za podmínek: 30 cyklů: 98 $^{\circ}$ C /10 s, 60 $^{\circ}$ C /15 s, 68 $^{\circ}$ C /5 min), 68 $^{\circ}$ C /5 min. Kvalita PCR produktu byla ověřena elektroforézou (1,5% agaróza, 0,5% TBE) a koncentrace DNA produktu byla změřena pomocí spektrofotometru Nanodrop. Značení nick translací probíhalo ve 20 μ l reakční směsi, která obsahovala 100 ng PCR produktu, 4 μ l mixu pro nick translaci, 4 μ l směsi nukleotidů (dATP, dCTP, dGTP, dTTP a aminoallyl-dUTP-ATTO-647N) a vodu. Značení sondy probíhalo 2 h při 15 $^{\circ}$ C.

4.4.6 Fluorescenční *in situ* hybridizace

Připravené preparáty byly před použitím promyty v sérii roztoků: 5 minut v 2x SSC, 10 minut v 45% kyselině octové, 10 minut v 2x SSC a 2x 5 minut v 2x SSC. Následovala post-fixace ve 4% formaldehydu po dobu 10 minut. Poté byly preparáty třikrát promyty 4 minuty v 2x SSC a dehydratovány v 70%, 90% a 99,8% ethanolu (po 2 minutách). Hybridizační mix na jeden preparát obsahoval 18 μ l hybridizačního roztoku a 1 μ l od každé sondy. Preparáty s hybridizačním mixem byly překryty krycím sklem denaturovány při 80 $^{\circ}$ C 2,5 minuty. Hybridizace sondy probíhala přes noc ve vlhké hybridizační komůrce při teplotě 37 $^{\circ}$ C. Nenavázané sondy byly po hybridizaci odmyty 20 minut v 2x SSC při pokojové teplotě. Skla s preparáty byla poté omyta destilovanou vodou a po oschnutí bylo aplikováno montovací médium s DAPI. Do vyhodnocení byly

preparáty skladovány při teplotě 4 °C. Signály byly vyhodnoceny pomocí epifluorescenčního mikroskopu Zeiss Axio Imager Z.2, figury nasnímány CCD kamerou v softwaru ISIS. Úprava snímků probíhala pomocí softwaru Adobe Photoshop 2021 (verze 22.3.0.).

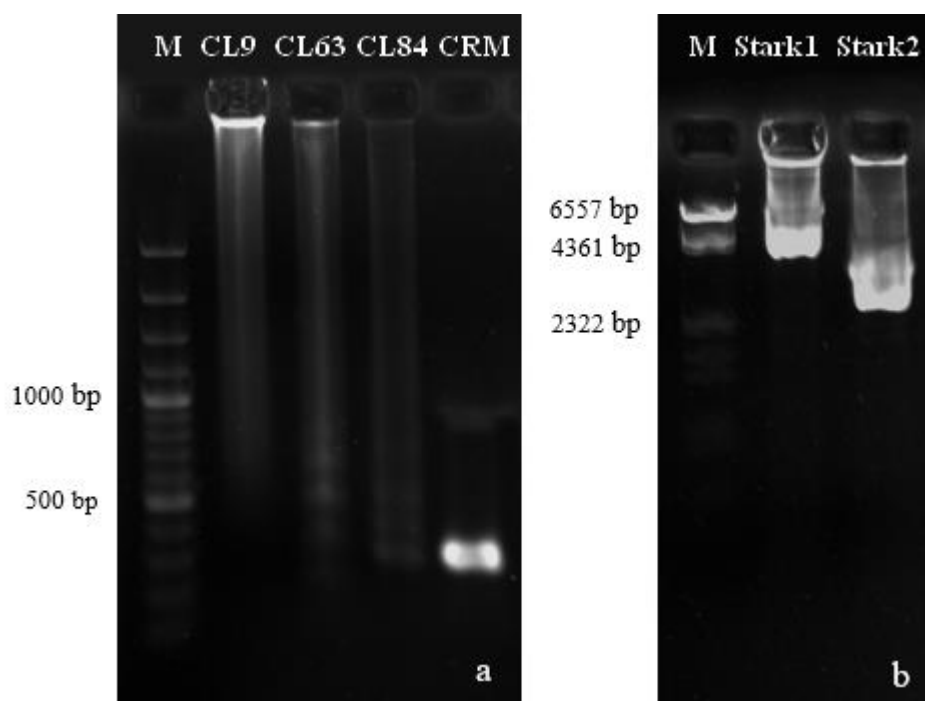
5 Výsledky

5.1 Příprava preparátů

Z kořenových meristémů byly připraveny suspenze protoplastů vybraného setu linií kukuřice seté pomocí metody nakapávaných preparátů. Preparáty s dostatečným počtem mitotických figur byly vybrány pro další experimenty.

5.2 Testování primerů pro repetice

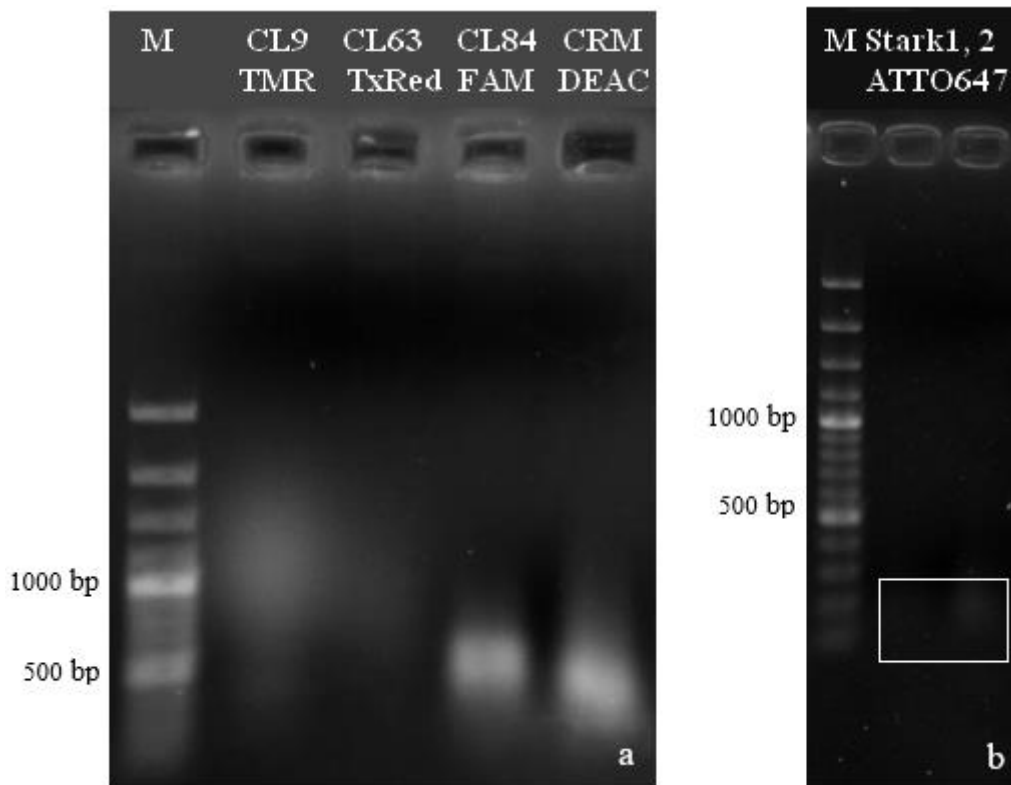
Celkem bylo navrženo 6 párů primerů pro 5 sond (Tab. 2). Funkčnost primerů byla otestována pomocí PCR a produkty reakce byly ověřeny elektroforézou v agarózovém gelu (Obr. 11). Amplifikace všech primerů byla úspěšná a poskytla produkt očekávané délky (Tab. 2). Vzhledem k délce produktu byly produkty primerů pro repetici Stark kontrolovány separátně s odlišným markerem (Obr. 11b). Tyto produkty sloužily následně jako templát pro přípravu sondy a byla u nich stanovena koncentrace pomocí Nanodropu.



Obrázek 11: Výsledek gelové elektroforézy fragmentů amplifikovaných z navržených primerů. a – elektroforetogram krátkých fragmentů se 100 bp markerem molekulové hmotnosti (M), b – elektroforetogram dlouhých fragmentů s markerem molekulové hmotnosti λ DNA/HindIII (M).

5.3 Příprava repetitivních sond

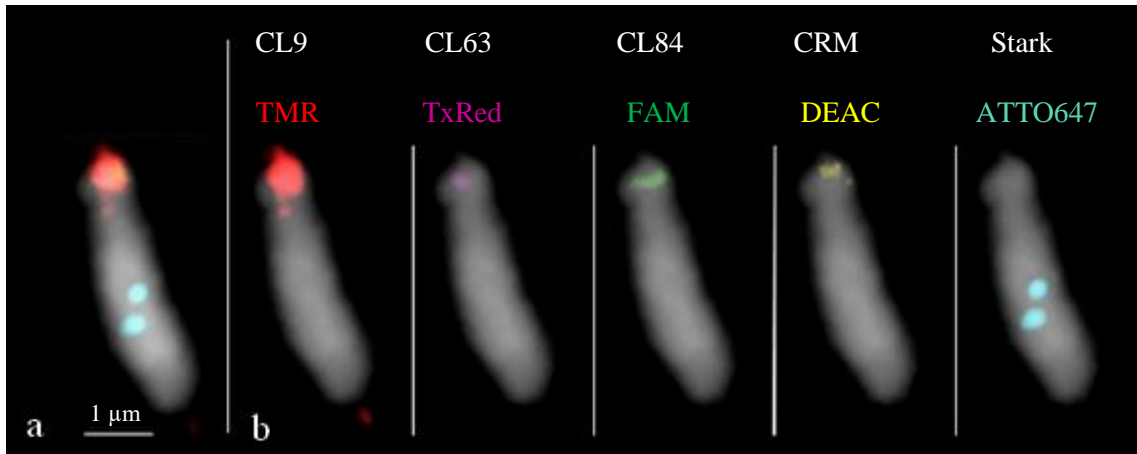
Navržené primery byly použity na přípravu přímo značených sond. V případě krátkých repetitivních byly fragmenty značeny pomocí PCR, v případě dlouhých fragmentů pro transpozón Strak pak nick translací. Pro značení byla použita kombinace fluoroforů tetramethylrhodamin (TMR), Texas Red, FAM a DEAC a ATTO647. Úspěšnost značení sond byla zkontrolována elektroforézou v agarózovém gelu (Obr. 12a, b).



Obrázek 12: Kontrolní elektroforetogram značených krátkých repetitivních (a) a fragmentů Stark (b) se 100 bp markerem molekulové hmotnosti.

5.4 FISH na linii B73

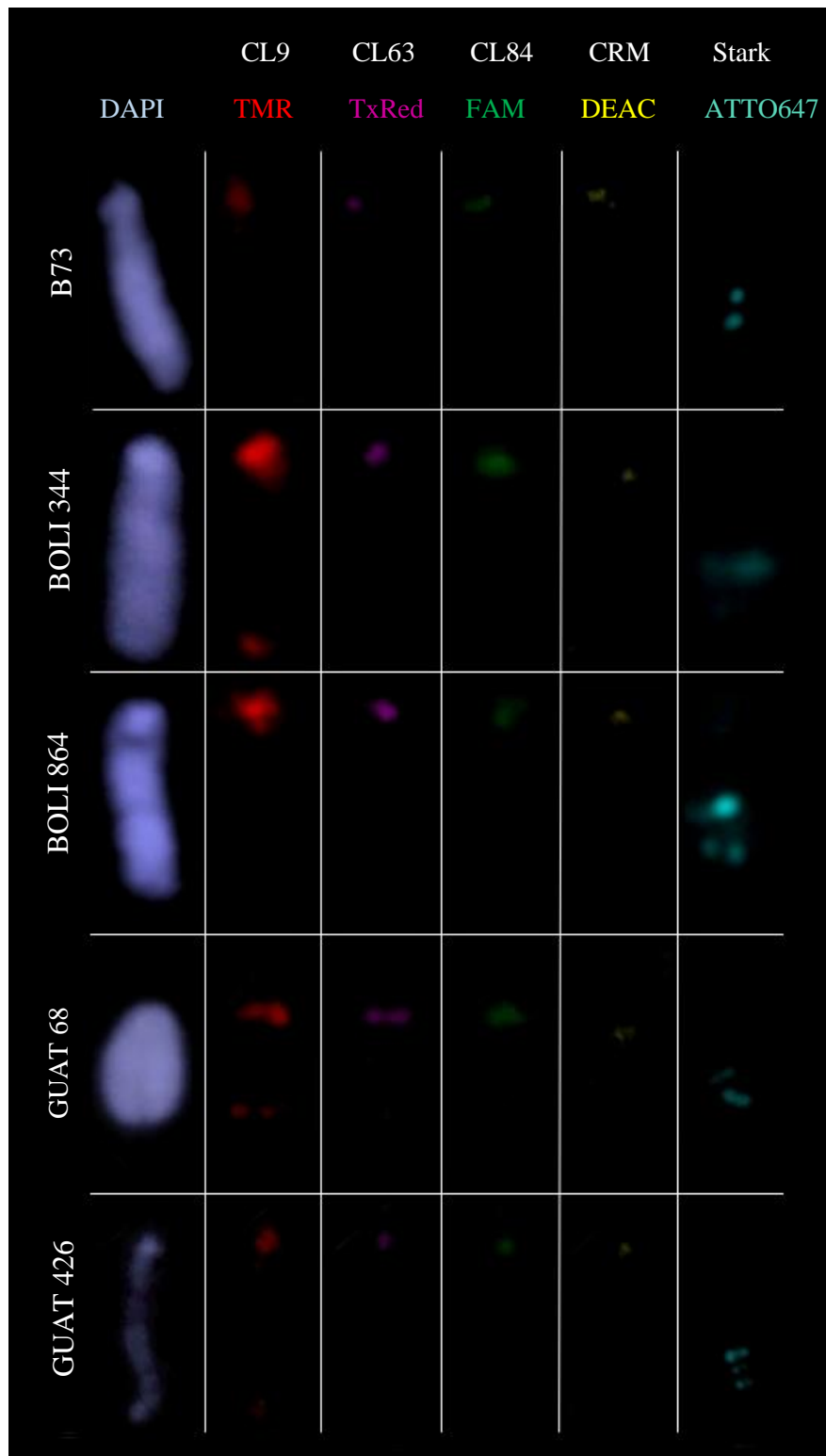
Všechny sondy byly lokalizovány na B chromozóm kukuřice v rámci jednoho experimentu (Obr. 13a). Optimalizace pětibarevné FISH probíhala na referenční linii B73. Sonda Stark (značeno ATTO647) hybridizovala na dlouhém rameni B chromozómu ve třetím distálním heterochromatinu (Obr. 13b). Sondy CL9 (TMR), CL63 (TexasRed), CL84 (FAM) a CRM (DEAC) hybridizovaly všechny v oblasti pericentromery na krátkém rameni (Obr. 13b).



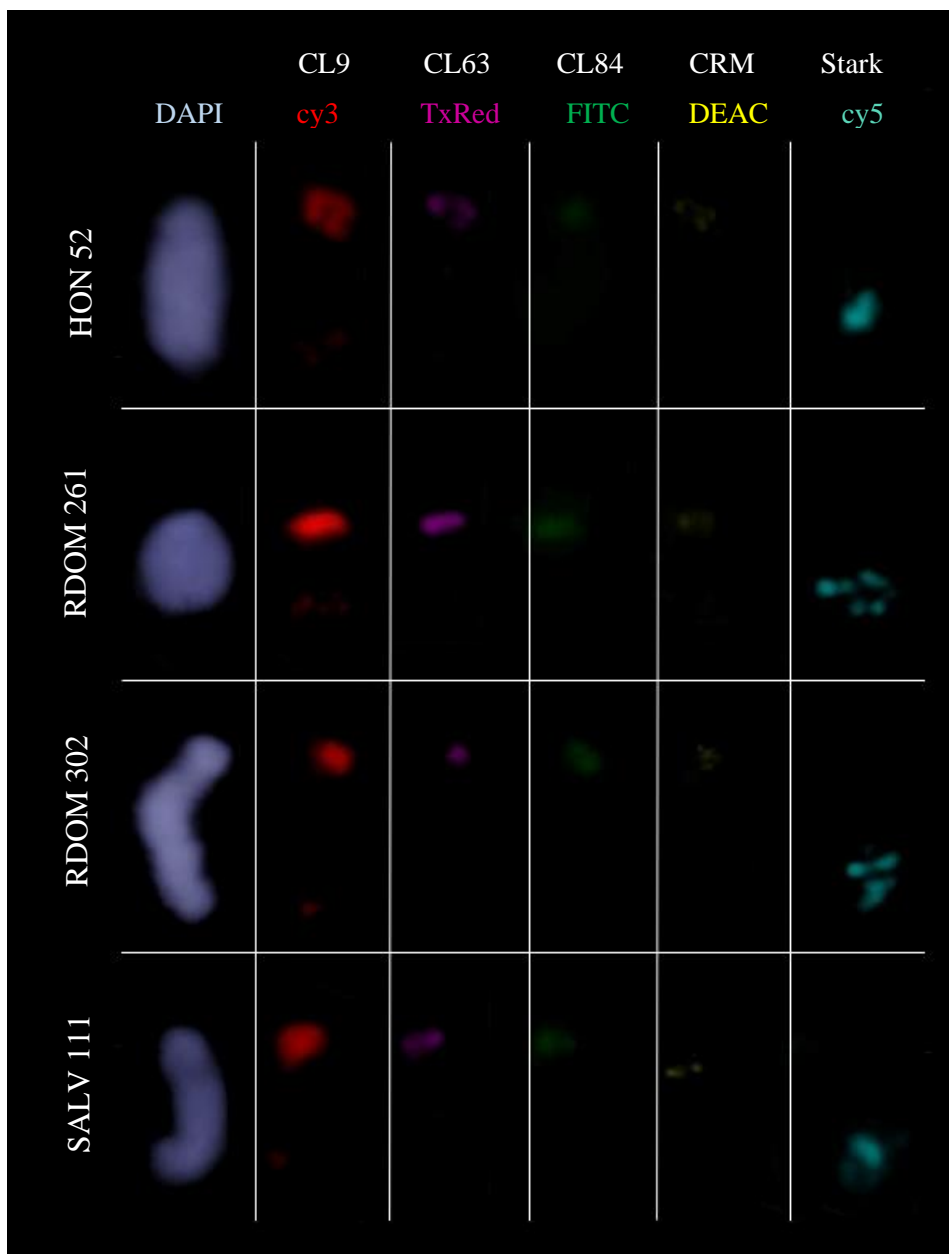
Obrázek 13: Výsledky pětibarevného FISH experimentu na linii B73+B. a – složený obraz signálů, b – rozložené signály. Popisky nahoře odpovídají sondám repetice a barevným kanálům. Zvětšení 1000x.

5.5 FISH na vybraném setu linií kukuřice seté

Hybridizace sond na jednotlivých liniích neukázala ani v jednom případě výraznější odlišnosti. Všechny sondy hybridizovaly stabilně do stejných míst u všech linií (Obr. 14a, 14b). Nicméně intenzita a velikost signálů byla do jisté míry odlišná od paternu na referenční linii B73+B. Týkalo se to zejména repetice specifické pro B chromozóm ZmBs (CL9). U linie BOLI 344 byl signál ze sondy CL9 zřetelně větší než u B chromozómu v referenční linii. Podobně tomu bylo i u linií BOLI 864 a HON 52. V případě dalších sond nebyly v intenzitách signálu žádné větší odchylky a hybridizační patern byl podobný referenčnímu B chromozómu.



Obrázek 14a: Pětibarevný FISH na liniích B73, BOLI 344, BOLI 864, GUAT 68, GUAT 426, zvětšení 1000x.



Obrázek 14b: Pětibarevný FISH na liniích HON 52, RDOM 261, RDOM 302, SALV 111, zvětšení 1000x.

6 Diskuze

Cílem bakalářské práce byla detekce polymorfismu B chromozómů ve vybraném setu linií kukuřice seté na základě cytogenetické analýzy. Pro studium variability B chromozómu bylo vybráno 5 repetitivních sond, které byly metodou fluorescenční *in situ* hybridizace lokalizovány na B chromozómech daných linií.

Z důvodu časové úspory bylo všech pět sond lokalizováno v rámci jednoho experimentu. Čtyři z pěti lokusů vybraných pro detekci změn ve struktuře B chromozómu pocházely z oblasti kolem centromery a docházelo k překryvu jejich signálů. Při zobrazení všech sond v rámci jednoho obrázku pak nebylo možné od sebe jednotlivé sekvence rozeznat (Obr. 13a). Tento problém s vizualizací byl snadno vyřešen rozložením fotek signálů z pětibarevného experimentu na jednotlivé kanály. Vliv na nedostatečné rozlišení signálů má i vysoký stupeň kondenzace metafázních chromozómů. K lepšímu rozlišení by vedlo provedení fluorescenční *in situ* hybridizaci na chromatinu s nižším stupněm kondenzace; např. pachytenních chromozómech či dokonce natažených vlákních DNA. Mapování pomocí pachytenních chromozómů bylo úspěšně využito při sestavování cytogenetických map *Medicago truncatula*, kde byly chromozómy v této meiotické fázi použity k mapování tří repetitivních sekvencí a dvaceti BAC klonů (Kulikova *et al.*, 2001). Chromozómy v pachytene fázi byly až dvacetkrát delší než chromozómy ve fázi mitózy a tento postup zaručil lepší rozlišení a citlivost detekce. Využití pachytenních chromozómů by bezesporu pomohlo rozlišení sond v oblasti centromery, ale pro přípravu těchto preparátů pro FISH by bylo zapotřebí květy rostlin, a tudíž experiment nebylo možné realizovat z časových důvodů.

Je obecně známo, že B chromozómy vykazují značný polymorfismus. I v rámci jednoho druhu může existovat více typů B chromozómů. Velmi častý je výskyt B chromozómů různých délek, které jsou většinou derivátem jednoho původního B chromozómu. To je případ např. žita (Jones and Rees, 1982) nebo čiroku (Darlington, 1941). U ryby *Astyanax* byla zaznamenána dokonce i různá poloha centromery B chromozómu (Penitente *et al.*, 2016). U B chromozómu kukuřice seté zatím výskyt více morfologických forem nebyl prokázán, a to i přes to, že B chromozóm kukuřice patří u rostlin k těm nejlépe prostudovaným. Důvodem může být fakt, že téměř všechny dosud publikované studie jsou prováděny na linii B73, ve které se B chromozóm ale přirozeně nevyskytuje a byl do

ní vnesen křížením před více než třiceti lety (osobní komunikace, prof. J.A. Birchler). Všechna semena, která jsou tedy pro linii B73+B nyní k dispozici, jsou tak v podstatě klonem původního B chromozómu a prostor pro jakoukoliv změnu je z evolučního pohledu zatím velmi krátký. Polymorfismus v délce chromozómu nebyl ale zaznamenán zatím ani u jiných linií kukuřice, u nichž byl B chromozóm detekován (Longley and Kato Yamakake, 1965). Předmětem našeho zájmu tedy byla diverzita samotných sekvencí na B chromozómu.

Mechanismy zajišťující akumulaci B chromozómu jsou úzce spjaty s centromerickou oblastí (Alfenito and Birchler, 1993; Lamb *et al.*, 2007; Ward, 1973; Lin, 1978). Lze tedy očekávat, že i v případě existence polymorfních typů B chromozómu, by tyto oblasti, zajišťující přenos B chromozómu, zůstaly konverzované a uniformní napříč liniemi. Z tohoto důvodu (i přes očekávané komplikace při vizualizaci signálů) byly pro analýzu polymorfismu vybrány právě sekvence, které se nacházejí v oblasti centromery. Cílem bylo najít linii, u které by byla identifikována přestavba v centromerické oblasti. I tato linie by totiž logicky musela mít zachován mechanismus nondisjunkce a byla by tak cenným zdrojem informací k objasnění mechanismu a regulace akumulace B chromozómu u kukuřice seté.

Cytogenetická analýza B chromozómů vybraných linií však bohužel žádnou významnou diverzitu B chromozómů v liniích kukuřice seté neprokázala. Všechny sekvence byly přítomné na všech liniích a pozice signálů byla fixní. Jedinou zaznamenanou odlišností je velikost a intenzita signálu ze sondy CL9 (repetice ZmBs) v porovnání s referenční linií B73. Sonda CL9 ve většině linií vykazovala větší signály než referenční linie B73 (Obr. 14a, 14b), opět je třeba však brát v potaz jinak kondenzované figury preparátů linií. U linie HON 52 by se dle velikosti a tvaru signálu dalo spekulovat o duplikaci celé či části sekvence CL9 (Obr. 14b). Jelikož je ZmBs repetice kandidátní sekvencí zapojenou v procesu nondisjunkce (Blavet *et al.*, in press), je jakákoliv úroveň variability v této oblasti bezesporu zajímavá.

V předkládané práci bylo cílem určit, zda některá ze sond nechybí v dané linii úplně, což se ale nepotvrdilo. V další fázi bude tedy nutno přistoupit k alternativním analýzám. Cytogenetická studie pomocí metody FISH má své limitace v rozlišení. Není možné odhalit nukleotidové přestavby či delece a inserce menší než 1 Mbp. Pro přesnější

výsledky a potvrzení minimální diverzity B chromozómů u kukuřice seté je zapotřebí bioinformatická analýza sekvenčních dat vybraných linií.

7 Závěr

Předkládaná práce se zabývala analýzou variability B chromozómů ve vybraném setu linií kukuřice seté pocházejících z různých geografických oblastí. Studium variability bylo založeno na porovnání pozice 5 významných repetice identifikovaných na B chromozómech (CL9, CL63, CL84, CRM a Stark). Hlavní cíl této práce spočíval v odhalení delecí či translokací těchto sekvencí, zvláště těch v centromerické oblasti z důvodu studia akumulčních mechanismů a evoluce B chromozómů kukuřice seté. Na žádné analyzované linii vybraného setu však nebyly zjištěny významnější odlišnosti, všechny sekvence byly přítomné a pozice signálů byla stabilní.

8 Seznam literatury

- Alfenito, M. R., Birchler, J. A. (1993): Molecular characterization of a maize B chromosome centric sequence. *Genetics*, **135**, 589–597.
- Ananiev, E. V., Phillips, R. L., Rines, H. W. (1998): Chromosome-specific molecular organization of maize (*Zea mays* L.) centromeric regions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **95**, 13073–13078.
- Bell, G., Burt, A. (1990): B chromosomes: germ-line parasites which induce changes in host recombination. *Parasitology*, **100**, 19-26.
- Birchler, J., (1993): Dosage analysis of maize endosperm development. *Annual Review of Genetics*, **27**, 181-204.
- Blavet, N., Yang, H., Su, H., Solanský, P., Douglas, R. N., Karafiátová, M., Šimková, L., Zhang, J., Liu, Y., Hou, J., Shi, X., Chen, Ch., El-Walid, M., McCaw, M. E., Albert, P.S., Gao, Z., Zhao, Ch., Ben-Zvi, G., Glick, L., Kol, G., Shi, J., Vrána, J., Šimková, H., Lamb, J. C., Newton, K., Dawe, K., Doležel, J., Ji, T., Baruch, K., Cheng, J., Han, F., Birchler, J., Bartoš, J. (2021): Sequence of the supernumerary B chromosome of maize provides insight into its drive mechanism and evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*,
- Brendel, V., Kurtz, S., Walbot, V. (2002): Comparative genomics of *Arabidopsis* and maize: prospects and limitations. *Genome Biology*, **3**(3), 1005.1–1005.6.
- Camacho, J.P.M., Bakkali, M., Corral, J.M., Cabrero, J., López-León, M.D., Aranda, I., Martín-Alganza, A., Perfectti, F. (2002): Host recombination is dependent on the degree of parasitism. *Proceedings of the Royal Society B*, **269**, 2173–2177.
- Camacho, J.P.M., Cabrero, J., López-León, M., Perfectti, F. (2003): The B chromosomes of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans* and the intragenomic conflict. *Genetica*, **117**, 77-84
- Camacho, J. P.M. (2005): B chromosomes. In: *The Evolution of the Genome*. Academic Press, 223-286.
- Carlson, W. (1978): The B chromosome of corn. *Annual Review of Genetics*, **12**(1), 5-23.
- Carlson, W., Roseman, R. (1992): A new property of the maize B chromosome. *Genetics*, **131**(1), 211-23.
- Caspersson, T., Zech, L., Johansson, C. (1970): Differential binding of alkylating fluorochromes in human chromosomes. *Experimental cell research*, **60**(3), 315-319.
- CIMMYT, International Maize and Wheat Improvement Center, dostupné z: www.cimmyt.org [navštíveno 9. 11. 2020].
- Clive, J. (2016). ISAAA – International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications, dostupné z: www.isaaa.org [navštíveno 10.10. 2020].

- Coleman, J.J., Rounsley, S.D., Rodriguez-Carres, M., Kuo, A., ... Vanetten, H. D. (2009): The genome of *Nectria haematococca*: contribution of supernumerary chromosomes to gene expansion. *PLoS Genetics*, **5**(8).
- D'Ambrosio, U., Alonso-Lifante, M. P., Barros, K., Kovařík, A., Mas de Xaxars, G.; Garcia, S. (2017): B-chrom: a database on B-chromosomes of plants, animals and fungi. *New Phytologist*, **216**(3), 635-642.
- Dalla Benetta, E., Akbari, O. S., Ferree, P. M. (2019): Sequence Expression of Supernumerary B Chromosomes: Function or Fluff? *Genes*, **10**(2).
- 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 London*, **130**, 127-150.
- Doebley, J. F., Gaut, B. S., Smith, B. D. (2006): The Molecular Genetics of Crops Domestication. *Cell*, **127**(7), 1309-1321.
- Doolittle, W., Sapienza, C. (1980): Selfish genes, the phenotype paradigm and genome evolution. *Nature*, **284**, 601-603.
- Dutrillaux, B., Lejeune, J. (1991): Sur une nouvelle technique d'analyse du caryotype humain. *C. R. Acad. Sci.*, **272**, 2638–2640.
- Erwin, A. T. (1951): Sweet Corn—Mutant or historic species? *Economic Botany*, **5**(3), 302-306.
- FAO, *FAOSTAT statistical database*. Dostupné z: www.fao.org/faostat [navštíveno 15.10. 2020].
- Ferreira, M.T., Glombik, M., Perničková, K., Duchoslav, M., Scholten, O., Karafiátová, M., Techio, V., Dolezel, J., Lukaszewski, A., Kopecky, D. (2020): Direct Evidence for Crossover and Chromatid Interference in Meiosis of Two Plant Hybrids (*Lolium Multiflorum* × *Festuca Pratensis* And *Allium Cepa* × *A. Roylei*). *Journal of experimental botany*, **72**.
- Fuchs, J., Pich, U., Meister, A., Schubert, I., (1994): Differentiation of field bean heterochromatin by in situ hybridization with a repeated FokI sequence. *Chromosome Research*, **2**(1), 25-28
- Fuchs, J., Houben, A., Brandes, A., Schubert, I. (1996): Chromosome 'painting' in plants - A feasible technique?. *Chromosoma*, **104**, 315-320.
- Gall, J. G., Pardue, M. L. (1969): Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **63**, 378-383.
- Goswami, H. K., Khandelwal, S. (1980): Chromosomal elimination in natural populations of *Ophioglossum*. *Cytologia*, **45**, 77–86.
- Green, D. (2004): Structure and evolution of B chromosomes in amphibians. *Cytogenetic and genome research*, **106**, 235-242.
- Gwartz, J. A., Garcia-Casal, M. N. (2013): Processing maize flour and corn meal food products. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **1312**(1), 66–75.
- Han, F., Gao, Z., Yu, W., Birchler, J. A. (2007): Minichromosome Analysis of Chromosome Pairing, Disjunction, and Sister Chromatid Cohesion in Maize. *Plant Cell*, **19**, 3853–3863.

- Han, Y., Zhang, T., Thammaphichai, P., Weng, Y., Jiang, J. (2016): Chromosome-Specific Painting in Cucumis Species Using Bulked Oligonucleotides. *Genetics*, **200**(3), 771–779.
- Hasegawa, N. (1934): A cytological study on 8-chromosome rye. *Cytologia*, **6**, 68-77.
- Hoseney, R., Zeleznak, K., Abdelrahman, A. (1983): Mechanism of popcorn popping. *Journal of Cereal Science*, **1**(1), 43-52.
- Houben, A. (2017): B Chromosomes – A Matter of Chromosome Drive. *Frontiers in Plant Science*, **8**, 210.
- Houben, A., Kynast, R.G., Heim, U., Hermann, H., Jones, R.N., Forster, J.W. (1996): Molecular cytogenetic characterisation of the terminal heterochromatic segment of the B chromosome of rye (*Secale cereale*). *Chromosoma*, **105**, 97-103.
- Chatham, L., Paulsmeyer, M., Juvik, J. (2019): Prospects for economical natural colorants: insights from maize. *Theoretical and Applied Genetics*, **132**, 2927–2946.
- Cheng, Y., Lin, B. (2004): Molecular organization of large fragments in the maize B chromosome: indication of a novel repeat. *Genetics*, **166**(4), 1947-1961.
- Iltis, H., Doebley, J. (1980): Taxonomy of *Zea* (*Gramineae*). II. Subspecific Categories in the *Zea Mays* Complex and a Generic Synopsis. *American Journal of Botany*, **67**(6), 994-1004.
- Jiang, J., Gill, B. (1994): Nonisotopic *in situ* hybridization and plant genome mapping: the first 10 years. *Genome*, **37**, 717– 725.
- Jiang, J., Gill, B., G-L., Wang, P.C., Ronald, Ward, D.C. (1995): Metaphase and interphase fluorescence *in situ* hybridization mapping of the rice genome with bacterial artificial chromosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **92**, 4487-4491.
- Jiang, J. (2019): Fluorescence *in situ* hybridization in plants: recent developments and future applications. *Chromosome Research*, **27**(3), 153-165.
- Jin, W. L. J. V. J., Dawe, R., Birchler, J., Jiang, J. (2005): Molecular and functional dissection of the maize B chromosome centromere. *Plant Cell*, **17**, 1412–1423.
- Jones, R.N., Rees, H. (1982): *B chromosomes*. London: Academic Press.
- Jones, R.N. (1995): B chromosomes in plants. *New Phytologist*, **131**(4), 411–434.
- Jones, N. (2003): B chromosomes in plants: escapees from the A chromosome genome? *Trends in Plant Science*, **8**(9), 417-423.
- Jones, R.N., González-Sánchez, M., González-García, M., Vega, J.M., Puertas, M.J. (2008): Chromosomes with a life of their own. *Cytogenetic and Genome Research*, **120**(3-4), 265-280.
- Kempfer, R., Pombo, A. (2019): Methods for mapping 3D chromosome architecture. *Nature Reviews Genetics*, **21**(4), 207-226.
- Khatefov, E. (2019): Creating Tetraploid Lines of Sweet Corn (*Zea Mays Saccharata*) and Studying Biochemical Content of Their Grain. *KnE Life Sciences*, 1003–1012.
- Koressaar, T., Remm, M. (2007): Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics*, **10**(23), 1289-91.

- Kozhuchov, Z. A. (1933): Uber die Natur der Extrachromosomen bei *Zea mays* L.. *Planta*, **19**, 91-116.
- Kubis, S., Schmidt, T., Heslop-Harrison, S. (1998): Repetitive DNA Elements as a Major Component of Plant Genomes. *Annals of Botany*, **82**(1), 45–55.
- Kulikova, O., Gualtieri, G., Geurts, R., Kim, D.-J., Cook, D., Huguet, T., De Jong, J.H., Fransz, P.F. and Bisseling, T. (2001): Integration of the FISH pachytene and genetic maps of *Medicago truncatula*. *The Plant Journal*, **27**, 49-58.
- Kuwada, Y. (1915): Ueber die Chromosomenzahl von *Zea mays* L. *Bot. Mag. Tokyo*, **29**, 83-89.
- Kuwada, Y. (1925): On the Number of Chromosomes in Maize. *Bot. Mag. Tokyo*, **465**(39), 227-234.
- Lamb, J. C., Kato, A., Birchler, J. A. (2005): Sequences associated with A chromosome centromeres are present throughout the maize B chromosome. *Chromosoma*, **113**, 337-349.
- Lamb, J. C., Danilova, T., Bauer, M. J., Meyer, J. M., Holland, J. J., Jensen, M. D., Birchler, J. A. (2006): Single-Gene Detection and Karyotyping Using Small-Target Fluorescence *in situ* Hybridization on Maize Somatic Chromosomes. *Genetics*, **175**(3), 104.
- Lamb, J.C., Riddle, N.C., Cheng, Y.M., Theuri, J., Birchler, J.A. (2007): Localization and transcription of a retrotransposon-derived element on the maize B chromosome. *Chromosome Research*, **15**(3), 383-398.
- Langer-Safer, P. R., Levine, M., Ward, D. C. (1982): Immunological method for mapping genes on *Drosophila* polytene chromosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **79**(14), 4381-4385.
- Lin, B.-Y. (1978): Regional control of nondisjunction of the B chromosome in maize. *Genetics*, **90**, 613–627.
- Longley, A. (1927): Supernumerary chromosomes in *Zea mays*. *J. Agric. Res.*, **35**, 769-784.
- Longley, A.E., Kato Yamakake, T.A. (1965): Chromosome morphology of certain races of maize in Latin America. CIMMYT; ENA, CIMMYT Research Bulletin, Mexico, 112 stran.
- Lu, X., Yang, L., Yu, M., Lai, J., Wang, C., McNeil, D., Zhou, M., Yang, C. (2017): A novel *Zea mays* ssp. *mexicana* L. MYC-type ICE-like transcription factor gene ZmmICE1, enhances freezing tolerance in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology and Biochemistry*, **113**, 78-88.
- Lysak, M. A., Fransz, P. F., Ali, H. B. M., Schubert, I. (2002): Chromosome painting in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, **28**(6), 689-697.
- Masonbrink, R. E., Birchler, J. A. (2010): Sporophytic nondisjunction of the maize B chromosome at high copy numbers. *J. Genet. Genomics*, **37**, 79-84.
- Masonbrink, R., Birchler, J. A. (2012): Accumulation of Multiple Copies of Maize Minichromosomes. *Cytogenet. Genome Res.*, **137**, 50-59.
- Mastenbroek, I., Dewet, J., Chieh-Yin, L. (1982): Chromosome behavior in early and advanced generation of tetraploid maize. *Caryologia*, **35**, 463-470.

- Matsui, S., Sasaki, M. (1973): Differential staining of nucleolus organisers in mammalian chromosomes. *Nature*, **246**, 148-150.
- McAllister, B., Werren, J. (1997): Hybrid origin of a B chromosome (PSR) in the parasitic wasp *Nasonia vitripennis*. *Chromosoma*, **106**(4), 243-253.
- McClintock, B. (1929): Chromosome Morphology in *Zea mays*. *Science*, **69**.
- McClintock, B. (1933): The association of non-homologous parts of chromosomes in the mid-prophase of meiosis in *Zea mays*. *Zeitschr. mik. Anat.*, **19**, 191-237.
- McClintock, B. (1950): The origin and behavior of mutable loci in maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **36**(6), 344-355.
- McClintock, B., T., Y., Blumenschein, A. (1981): Chromosome constitution of races of maize: its significance in the interpretation of relationships between races and varieties in the Americas. Chapingo, Mexico: Colegio de Postgraduado.
- Moore, K., Anex, R., Elobeid, A., Flora, C., Goggi, A., Jacobs, K., Jha, Pr., Kaleita, A, Karlen, D., Laird, D., Lenssen, A., Lübberstedt, T., Mcdaniel, M., Raman, D., Weyers, S. (2019): Regenerating Agricultural Landscapes with Perennial Groundcover for Intensive Crop Production. *Agronomy*, **9**(8).
- Nannas, N., Dawe, R. (2015): Genetic and Genomic Toolbox of *Zea mays*. *Genetics*, **199**, 655-669.
- Nur, U. (1963): A mitotically unstable supernumerary chromosome with an accumulation mechanism in a grasshopper. *Chromosoma*, **14**, 407-422.
- Nur, U. (1969): Mitotic instability leading to an accumulation of B-chromosomes in grasshoppers. *Chromosoma*, **27**, 1-19.
- Oliver, J.L., Posse, F., Martínez-Zapater, J.M., Enriquez, A.M., Ruiz-Rejón, M. (1982): B chromosomes and E1 isoenzyme activity in mosaic bulbs of *Scilla autumnalis*. *Chromosoma*, **85**, 399-403.
- Ortiz, R., Taba, S., Tovar, V., Mezzalama, M., Xu, Y., Yan, J., Crouch, J. (2010): Conserving and Enhancing Maize Genetic Resources as Global Public Goods-A Perspective from CIMMYT. **50**, 13-28.
- Östergren, G. (1945): Parasitic nature of extra fragment chromosomes. *Botaniska Notiser*, **2**, 157-163.
- Pardue, M. L., Gall, J. G. (1970): Chromosomal localization of mouse satellite DNA. *Science*, **168**, 1356-1358.
- Parker, J.S. (1976): The B-chromosome system of *Hypochoeris maculata*. *Chromosoma*, **59**, 167-177.
- Pascher, K. (2016): Spread of volunteer and feral maize plants in Central Europe: recent data from Austria. *Environmental Sciences Europe*, **28**(1).
- Pedersen, C., Langridge, P. (1997): Identification of the entire chromosome complement of bread wheat by two-colour FISH. *Genome*, **40**(5), 589-593.

- Peng, S.-F., Lin, Y.-P., Lin, B. (2005): Characterization of AFLP sequences from regions of maize B chromosome defined by 12 B-10L translocations. *Genetics*, **169**, 375-388.
- Peng, Z., Oliveira-Garcia, E., Lin, G., Hu, Y., Dalby, M., Migeon, P., Tang, H., Farman, M., Cook, D., White, F.F., Valent, B., Liu, S. (2019): Effector gene reshuffling involves dispensable mini-chromosomes in the wheat blast fungus. *PLoS Genetics*, **15**(9).
- Penitente, M., Daniel, S. N., Scudeler, P. E. S., Foresti, F., Porto-Foresti, F. (2016): B chromosome variants in *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae) analyzed by microdissection and chromosome painting techniques. *Caryologia*, **69**(2), 181-186.
- Pinkel, D., Landegent, J., Collins, C., Fuscoe, J., Segraves, R., Lucas, J., Gray, J. (1988): Fluorescence *in situ* hybridization with human chromosome-specific libraries: detection of trisomy 21 and translocations of chromosome 4. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **85**, 9138-9142.
- Pinkel, D., Straume, T., Gray, J. (1986): Cytogenetic analysis using quantitative, high sensitivity fluorescence hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **83**, 2934-2938.
- Planta, J., Xiang, X., L. T., Messing, J. (2017): Engineering sulfur storage in maize seed proteins without apparent yield loss. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **114**(43), 11386-11391.
- Plowman, A., Bougourd, S. (1994): Selectively advantageous effects of B chromosomes on germination behaviour in *Allium schenoprasum* L. *Heredity*, **72**.
- Prasanna, B. (2010): Phenotypic and molecular diversity of maize landraces: characterization and utilization. *Indian Journal of Genetics and Plant Breeding*, **70**(4), 315-327.
- Puertas, M. (2002): Nature and evolution of B chromosomes in plants: A non-coding but information-rich part of plant genomes. *Cytogenetic Genome Research*, **96**, 198-205.
- Randolph, L. F. (1925): Chromosome numbers in *Zea mays* L.. Ithaca, N.Y., Cornell University.
- Randolph, L. F. (1941): Genetic Characteristics of the B Chromosomes in Maize. *Genetics*, **26**(6), 608-631.
- Ranum, P., Peña-Rosas, J., Garcia-Casal, M. (2014): Global maize production, utilization, and consumption. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **1312**, 105-112.
- Rhoades, M. M. (1940): Studies of a telocentric chromosome in maize with reference to the stability of its centromere. *Genetics*, **25**, 483-520.
- Rigby, P., Dieckmann, M., Rhodes, C., Berg, P. (1977): Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. *J. Mol. Biol.*, **113**(1), 237-251.
- Roman, H. (1948): Directed Fertilization in Maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **34**(2), 36-42.
- Roman, H. (1950): Factors affecting mitotic non-disjunction in maize. *Genetics*, **35**, 132.

- Rosato, M. C. A. M., Naranjo, C. A., Hernandez, J. C., Poggio, L. (1998): Genome size and numerical polymorphism for the B chromosome in races of maize (*Zea mays ssp. mays*, *Poaceae*). *American Journal of Botany*, **85**(2), 68-174.
- Ruíz-Rejón, M., Posse, F., Oliver, J. (1980): The B chromosome system of *Scilla autumnalis* (*Liliaceae*): effects at the isozyme level. *Chromosoma*, **79**, 341-348.
- Rutishauser, A., Röthlisberger, E. (1966): Boosting mechanism of B chromosomes in *Crepis capillaris*. *Chromosome Today*, **1**, 28-30.
- Sharma, A., Presting, G. G. (2008): Centromeric retrotransposon lineages predate the maize/rice divergence and differ in abundance and activity. *Mol. Genet. Genomics*, **279**, 133-147.
- Schmitz, G. G., Walter, T., Seibl, R., Kessler, C. (1991) Nonradioactive labeling of oligonucleotides in vitro with the hapten digoxigenin by tailing with terminal transferase. *Analytical biochemistry*, **192**(1), 222-231.
- Schnable, P. S., Ware, D., Fulton, R. S., Stein, J. C., Wei, F., Pasternak, S., ... Graves, T. A. (2009): The B73 Maize Genome: Complexity, Diversity, and Dynamics. *Science*, **326**, 1112-1115.
- Schwarzacher, T., Heslop-Harrison, J. (2000): Practical *in situ* hybridization. Oxford: BIOS.
- Schwarzacher, T. (2003): DNA, chromosomes, and *in situ* hybridization. *Genome*, **46**(6), 953-962.
- Silva, G., Souza, M. (2013): Genomic *in situ* hybridization in plants. *Genetics and Molecular Research*, **12**(3), 2953-2965.
- Speicher, M. R., Ballard, S., Ward, D. (1996): Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. *Nature Genetics*, **12**, 368-375.
- Speicher, M. R., Carter, N. P. (2005): The new cytogenetics: blurring the boundaries with molecular biology. *Nature Reviews Genetics*, **6**(10), 782-792.
- Stark, E. A., Connerton, I., Bennett, S. T., Barnes, S. R., Parker, J. S., Forster, J. W. (1996): Molecular analysis of the structure of the maize B-chromosome. *Chromosome Research*, **4**(1), 15-23.
- Staub, R. (1987): Leaf striping correlated with the presence of B chromosomes in maize. *Journal of Heredity*, **78**, 71-74.
- Stevens, N. (1908): The chromosomes in *Diabrotica vittata*, *Diabrotica soror* and *Diabrotica punctata*. A contribution to the literature on heterochromosomes and sex determination. *Journal of Experimental Zoology*, **5**, 453-470.
- Šimoníková, D., Němečková, A., Karafiátová, M., Uwimana, B, Swennen, R., Doležel, J, Hříbová, E. (2019): Chromosome Painting Facilitates Anchoring Reference Genome Sequence to Chromosomes In Situ and Integrated Karyotyping in Banana (*Musa Spp.*). *Frontiers in Plant Science*, **10**.
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B.C., Remm, M., Rozen, S.G. (2012): Primer3 – new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research*, **15**(40).

- Valente, G. T., Nakajima, R. T., Fantinatti, B. E. A., Marques, D. F., Almeida, R. O., Simões, R. P., Martins, C. (2016): B chromosomes: from cytogenetics to systems biology. *Chromosoma*, **126**(1), 73-81.
- Viotti, A., Piverta, E., Sala, E., Pogna, N. (1985): Distribution and cmoorstering of two highly repetitive sequences in the A- and B-chromosomes of maize. *Theoretical and Applied Genetics*, **70**, 234-349.
- Vrolijk, J., Sloos, W. C. R., Verwoerd, N. P., Tanke, H. J. (1994): Applicability of a noncooled video-rated CCD camera for detection of fluorescence in situ hybridization signals. *Cytometry: The Journal of the International Society for Analytical Cytology*, **15**(1), 2-11.
- Vujošević, M., Rajičić, M., Blagojević, J. (2018): B Chromosomes in Populations of Mammals Revisited. *Genes*, **9**(10), 487.
- Wang, C.-J. R., Harper, L., Cande, W. (2006): High-Resolution Single-Copy Gene Fluorescence *in situ* Hybridization and Its Use in the Construction of a Cytogenetic Map of Maize Chromosome 9. *The Plant Cell*, **18**(3), 529-544.
- Ward, E. J. (1973): Nondisjunction: localization of the controlling site in the maize B chromosome. *Genetics*, **73**, 387-391.
- Wiegant, J., Ried, T., Nederlof, P.M., van der Ploeg, M., Tanke, H.J., Raap, A.K. (1991): *In situ* hybridization with fluoresceinated DNA. *Nucleic Acids Research*, **19**(12), 3237-3241.
- Wilkes, H. G. (1981): Maize in India. *The Maize Genetics Cooperation Newslette*, **55**, 13-15.
- Wilkes, T.M., Francki, M.G., Langidge, P., Karp, A., R.N., Jones, Forster, J.W. (1995): Analysis of rye B-chromosome structure using fluo-rescence *in situ* hybridization (FISH). *Chromosome Research*, **3**, 466-472.
- Wilson, E. (1907): The supernumerary chromosomes of *Hemiptera*. *Science*, **26**, 870-871.
- Wilson, E. (1909): Studies on chromosomes. V. The chromosomes of *metapodius*. A contribution to the hypothesis of the genetic continuity of chromosomes. *Journal of Experimental Zoology*, **6**, 147-205.
- Wittwer, C. T., Makrigiorgos, G. M. (2018): *Nucleic Acid Techniques*. Elsevier.
- Wurster, D. (1972): Mouse chromosomes identified by trypsin-Giemsa (T-G) banding. *Cytogenetics*, **11**(5), 379-387.
- Yoshida, K., Terai, Y., Mizoiri, S., Aibara, M., Nishihara, H., Watanabe, M., ... Okada, N. (2011): B Chromosomes Have a Functional Effect on Female Sex Determination in Lake Victoria Cichlid Fishes. *PLoS Genetics*, **7**(8).
- Yu, H., Chao, J., Patek, D., Mujumdar, R., Mujumdar, S., Waggoner, A. S. (1994): Cyanine dye dUTP analogs for enzymatic labeling of DNA probes. *Nucleic acids research*, **22**(15), 3226-3232.

9 Seznam zkratek

BAC	umělý bakteriální chromozóm (bacterial artificial chromosome)
CCD	zařízení s vázanými náboji (charged coupled device)
CIMMYT	Mezinárodní centrum pro zlepšení kukuřice a pšenice (International Maize and Wheat Improvement Center)
CO	crossing-over
Cy3	cyanin 3
Cy5	cyanin 5
DAPI	4',6-diamidin-2-fenylindol
dATP	deoxyadenosintrifosfát
dCTP	deoxycytidintrifosfát
DEAC	7-diethylaminokumarin-3-karboxylová kyselina
dGTP	deoxyguanosintrifosfát
dTTP	deoxythymidintrifosfát
FAM	fluorescein amidát
FAO	Organizace pro výživu a zemědělství (Food and Agriculture Organization)
FISH	fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace
GISH	genomová <i>in situ</i> hybridizace
GMO	geneticky modifikovaný organismus
PCR	polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
rDNA	ribozomální DNA
TMR	tetramethylrhodamin