

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

**Přírodovědecká fakulta**

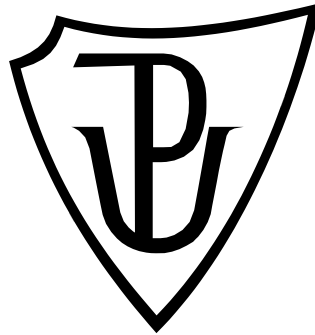


**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

**2024**

**Bc. Natália Harnádková**

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



**Frekvencia nondisjunkcie B chromozómu kukurice  
u krížencov línií B73US(2B) x B104(B0)**

**Diplomová práce**

**Bc. Natália Harnádková**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

**Olomouc 2024**

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

# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Akademický rok: 2022/2023

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Natálie HARNÁDKOVÁ**  
Osobní číslo: **R220027**  
Studijní program: **N0511A030046 Molekulární a buněčná biologie**  
Téma práce: **Frekvence nondisjunkce B chromozómu kukurice u křížencov linií B73US (2B) x B104 (B0)**  
Zadávající katedra: **Katedra buněčné biologie a genetiky**

### Zásady pro vypracování

- Selekcja B+/B0 rastlín pomocou Direct PCR
- Izolácia rastlinnej DNA kitom
- Stanovenie počtu B chromozómov v B-pozitívnych rastlinách pomocou droplet-digital PCR (ddPCR)
- Zber zrelého pelu z 1B rastlín
- Príprava oligo-sondy špecifickej pre B chromozóm
- FISH na suspenzii peľových zrn
- Analýza preparátov pomocou fluorescenčného mikroskopu
- Vyhodnotenie frekvencie nondisjunkcie na základe počtu signálov v jednotlivých spermatických bunkách

Rozsah pracovni zprávy:

Rozsah grafických prací:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Jazyk zpracování: **Slovenština**

Seznam doporučené literatury:

- Svačina R, Hloušková L, Karafiátová M, Bartoš J (2022) Scoring the number of B chromosomes in *Zea mays* L. using droplet digital PCR assay. *Plant Methods*. (submitted)
- Birchler JA, Yang H (2011) The supernumerary B chromosome of maize drive and genomic conflict. *Open Biol.* 11: 210197
- Jones RN, Viegas W, Houben A (2008) A century of B chromosomes in plants: So what? *Annals of Botany*, 101, 767-775
- Blavet *et al.* (2021) Sequence of the supernumerary B chromosome of maize provides insight into its drive mechanism and evolution. *PNAS* 118(23)
- Carlson W (2009) The B chromosome of maize. In: Bennetzen JL and Hake S (eds.) *Maize Handbook-Volume II: Genetics and Genomics*, Springer Science+Business Media LLC 2009, 459-479
- Han F, Lamb JC, Yu W, Birchler JA (2007) Centromere function and nondisjunction are independent components of the maize accumulation mechanisms. *The Plant Cell*, 19: 524-533

Vedoucí diplomové práce:

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

Datum zadání diplomové práce: **2. listopadu 2022**  
Termín odevzdání diplomové práce: **31. května 2024**

L.S.

---

**doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.**  
děkan

---

**prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.**  
vedoucí katedry

V Olomouci dne 4. listopadu 2022

## **Bibliografická identifikácia**

Meno a priezvisko: Bc. Natália Harnádková

Názov práce: Frekvencia nondisjunkcie B chromozómu kukurice u krížencov línií B73US(2B) x B104(B0)

Typ práce: Diplomová

Pracovisko: Katedra buněčné biologie a genetiky, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci

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

Rok obhajoby práce: 2024

Kľúčové slová: *Zea mays*, B chromozómy, peľové zrná, nondisjunkcia, FISH

Počet strán: 59

Jazyk: Slovenčina

### **SÚHRN**

B chromozómy sú nadpočetné chromozómy vyskytujúce sa v karyotype mnohých organizmov. Typická je pre nich nemendelistická dedičnosť. B chromozómy sa udržiavajú v populáciách prostredníctvom akumuláčnych mechanizmov. U kukurici satej akumuláčny mechanizmus B chromozómu zahŕňa proces nondisjunkcie, ktorá nastáva v priebehu druhej peľovej mitózy, kedy dochádza k deleniu generatívneho jadra na dve spermatické bunky. Výsledkom nondisjunkcie je prítomnosť B chromozómov iba v jednej z nich. Táto spermatická bunka má tendenciu preferenčne oplodniť vaječnú bunku, vďaka čomu sa zvyšuje frekvencia prenosu B chromozómu do ďalšej generácie.

Cieľom tejto práce bolo stanoviť frekvenciu nondisjunkcie B chromozómu kukurice u hybridnej línie B73US x B104 s 1 B chromozómom. Na vizualizáciu B chromozómov v jadrách peľových zŕn bola využitá fluorescenčná *in situ* hybridizácia s použitím B-špecifickej oligo-sondy odvodenej od špecifickej repetície ZmB lokalizovanej na B chromozóme. Analýza bola vykonaná na 1 200 peľových zrnách v trojjadrovom štádiu a na základe pozorovania sa stanovila frekvencia nondisjunkcie na 96,42 %.

## **Bibliographical identification**

Author's first name and surname: Bc. Natália Harnádková

Title: The frequency of the maize B chromosome nondisjunction in B73US(2B) x B104(B0) hybrids

Type of thesis: Masters

Department: Department of Cell Biology and Genetics, Faculty of Science, Palacký University Olomouc

Supervisor: Mgr. Miroslava Karafiátová, Ph.D.

The year of presentation: 2024

Keywords: *Zea mays*, B chromosomes, pollen grains, nondisjunction, FISH

Number of pages: 59

Language: Slovak

### **SUMMARY**

B chromosomes are supernumerary chromosomes that have been found in the genomes of many organisms. Typically their transmission is not governed by Mendelian inheritance. B chromosomes are maintained in populations by accumulation mechanisms. In maize, the accumulation mechanism involves nondisjunction of the B chromosome that occurs during second pollen mitosis, when the generative nucleus divides into two sperm cells. Due to nondisjunction, B chromosomes are present only in one of the sperm cells. The sperm cell containing B chromosomes has a tendency to preferentially fertilize the egg cell, increasing the frequency of their transmission to the next generation.

The aim of this work was to determine the frequency of maize B chromosome nondisjunction in B73US x B104 hybrids carrying 1 B chromosome. B chromosomes were visualized using fluorescence *in situ* hybridization with B-specific oligo-probe derived from the ZmB B-specific repeat in pollen grain nuclei. A total of 1 200 mature pollen grains were analyzed. Based on the observation, the frequency of nondisjunction was determined to be 96,42 %.

## Prehlásenie

Táto diplomovaná práca bola vykonaná samostatne pod vedením vedúcej práce Mgr. Miroslavy Karafiátovej, Ph.D. a za použitia uvedenej literatúry.

V Olomouci dňa

.....

## Podakovanie

V prvom rade by som veľmi rada podakovala vedúcej diplomovej práce Mgr. Miroslave Karafiátovej, Ph.D. za jej odborné vedenie a rady, dohľad, ochotu pomôcť a hlavne poskytnutý čas, ktorý mi venovala v priebehu spracovávaní diplomovej práce.

Moje podakovanie taktiež patrí Mgr. Magdaléne Stejskalovej a Mgr. Lucii Hlouškovej za ich čas a ochotu mi pomôcť vždy, keď to bolo potrebné a zároveň ďakujem aj ostatným zamestnancom Centra štruktúrnej a funkčnej genomiky rastlín Ústavu experimentálnej botaniky AV ČR za poskytnutie cenných rad.



## OBSAH

ZOZNAM STRATIEK.....	vii
ZOZNAM OBRÁZKOV.....	viii
ZOZNAM TABULIEK.....	ix
1 ÚVOD.....	1
2 CIELE PRÁCE.....	2
3 LITERÁRNY PREHĽAD.....	3
3.1 Kukurica siata ( <i>Zea mays</i> L.).....	3
3.1.1 Morfológická stavba.....	3
3.1.2 Využitie kukurice siatej.....	4
3.1.3 Rozmnožovanie kukurice siatej a vývoj samčieho gametofytu.....	5
3.2 B chromozómy.....	7
3.2.1 Morfológia B chromozómov.....	7
3.2.2 Vplyv B chromozómov na fenotyp.....	8
3.2.3 Sekvenčné zloženie B chromozómov.....	10
3.2.4 Akumulačné mechanizmy B chromozómov.....	11
3.2.5 B chromozóm kukurice siatej.....	13
3.3 B chromozóm kukurice siatej ako model pre štúdium biológie nadpočetných chromozómov.....	14
3.3.1 Cytologická charakterizácia a kvantifikácia B chromozómu kukurice.....	14
3.3.2 Analýza sekvencie B chromozómu kukurice.....	15
3.4 Trend vedeckého výskumu B chromozómov.....	17
4 MATERIÁL A METÓDY.....	19
4.1 Biologický materiál.....	19
4.2 Zoznam použitých chemikálií a roztokov.....	19
4.3 Zoznam použitých prístrojov a zariadení.....	21
4.4 Použité experimentálne a vyhodnocovanie postupy.....	22
4.4.1 Selekcia B-pozitívnych rastlín metódou Direct PCR.....	22
4.4.2 Izolácia genómovej DNA kukurice pre stanovenie počtu B chromozómov.....	23

4.4.3	Stanovenie počtu B chromozómov v B-pozitívnych rastlinách metódou droplet-digital PCR (ddPCR).....	23
4.4.4	Zber a fixácia peľových frakcií .....	24
4.4.5	Príprava oligo-sondy špecifickej pre B chromozóm .....	24
4.4.6	Fluorescenčná <i>in situ</i> hybridizácia na frakciách peľových zŕn .....	26
5	VÝSLEDKY .....	28
5.1.1	Príprava biologického materiálu .....	28
5.1.2	Selekcia B-pozitívnych semenáčikov kukurice siatej <i>Zea mays</i> .....	28
5.1.3	Stanovenie počtu B chromozómov v B-pozitívnych rastlinách .....	30
5.1.4	Detekcia nondisjunkcie B chromozómu v peľových zrnách.....	31
6	DISKUSIA .....	34
7	ZÁVER.....	37
8	LITERATÚRA .....	38

## ZOZNAM STRATIEK

ddPCR	droplet-digital PCR
FAO	Organizácia pre výživu a poľnohospodárstvo (Food Agriculture Organization of the United Nations)
FISH	fluorescenčná <i>in situ</i> hybridizácia (fluorescence <i>in situ</i> hybridization)
LINE	dlhé rozptýlené jadrové elementy (long interspered nuclear element)
LTR	dlhé terminálne repetície (long terminal repeat)
NCR	kontrolná oblasť nondisjunkcie (nondisjunction control region)
PMC	materská peľová bunka (pollen mother cell)
SINE	krátke rozptýlené jadrové elementy (short interspered nuclear element)

## ZOZNAM OBRÁZKOV

<b>Obrázok 1</b> Kukurica siata ( <i>Zea mays</i> L.) .....	4
<b>Obrázok 2</b> Jednotlivé vývojové štádiá peľového zrna u kukurici siatej <i>Zea mays</i> . .....	5
<b>Obrázok 3</b> Vývoj peľu inbrídnej línie kukurice siatej B73US sledovaný metódou ‘The leaf collar method‘ .....	7
<b>Obrázok 4</b> Negatívny vplyv prítomnosti B chromozómov na vitalitu rastliny. ....	9
<b>Obrázok 5</b> Schéma znázorňujúca nondisjunkciu B chromozómu počas dozrievania samčích gametofytov. ....	13
<b>Obrázok 6</b> Metafázne chromozómy kukurice siatej <i>Zea mays</i> referenčnej línie B73US s 12 B chromozómami ( $2n=2x=20+12B$ ). ....	14
<b>Obrázok 7</b> Schematické zobrazenie B chromozómu kukurice siatej v pachytene meiózy. ....	16
<b>Obrázok 8</b> Systém navrhnutia primerov pre syntézu oligo-sondy na príklade ZmB_1F, ZmB_1R. ....	25
<b>Obrázok 9</b> Schéma očakávanej distribúcie B chromozómu v priebehu mitotických delení peľového zrna. ....	27
<b>Obrázok 10</b> Produkty PCR amplifikácie B-špecifickej oblasti B chromozómu semenáčikov kukurice siatej <i>Zea mays</i> hybridnej línie B73US x B104. ....	29
<b>Obrázok 11</b> Príklad vyhodnotenia počtu kópií B chromozómu na vybranom sete kukurice siatej v hybridnej líni B73US x B104 za využitia ddPCR. ....	30
<b>Obrázok 12</b> Vizualizácia B chromozómu pomocou B-špecifickej sondy ZmB a jej <i>in situ</i> lokalizácia na peľových zrnách v trojjadrovom štádiu <i>in vitro</i> . ....	32

## ZOZNAM TABULIEK

<b>Tabuľka 1</b> Podmienky amplifikácie PCR produktov v prostredí Direct PCR .....	22
<b>Tabuľka 2</b> Sekvencie primerov a sond použitých v ddPCR .....	24
<b>Tabuľka 3</b> Sekvencie primerov použitých pre prípravu oligo-sondy špecifickej pre B chromozóm.....	25
<b>Tabuľka 4</b> Podmienky PCR reakcie pre prípravu B-špecifickej oligo-sondy.....	26
<b>Tabuľka 5</b> Distribúcia B-špecifickej sondy ZmB v jadrách zreých peľových zrn .....	33

# 1 ÚVOD

V karyotype niektorých organizmov sa okrem štandardných chromozómov vyskytujú aj nadpočetné tzv. B chromozómy. B chromozómy predstavujú doplnkový genetický materiál k štandardnému genómu. Ich výskyt sa preukázal aj u kukurici siatej *Zea mays* a to až v rozmedzí 34 kópií (Kuwada, 1925; Randolph, 1941).

Napriek tomu, že disponujú niekoľkými unikátnymi vlastnosťami sa B chromozómy líšia od štandardných chromozómov hlavne spôsobom prenosu do ďalších generácií. Typická je pre nich nemendelovská dedičnosť, v dôsledku čoho je ich výskyt značne variabilný v rámci populácie daného druhu (Jones, 1975). V priebehu svojej existencie si dokázali vytvoriť stratégie umožňujúce im pretrvávajúť v populácii. Najčastejšie sa jedná o tzv. ‘drive‘ procesy zahrňujúce proces nondisjunkcie (Jones, 1975). Nondisjunkcia sa chápe ako dôsledok nerozdelenia sesterských chromatíd chromozómu. U väčšiny rastlinných druhov sa jej priebeh pozoroval počas dozrievania samčích gametofytov (Hasegawa, 1934; Roman, 1947). Kukurica siata predstavuje doposiaľ jediný známy druh, u ktorého tento proces nastáva v druhej peľovej mitóze, kedy sa generatívne jadro delí na dve spermatické bunky. Výsledkom tohto delenia je tak nerovnomerný výskyt B chromozómov v spermatických bunkách (Roman, 1947). Bunka nesúca B chromozóm má tendenciu k preferenčnému oplodneniu a približne v 75 % prípadov tak splynie s vaječnou bunkou, čo umožní jeho prenos do ďalšej generácie (Roman, 1948).

Nondisjunkcia B chromozómu kukurice je podmienená dvoma faktormi – *cis* a *trans*. *Cis* faktor predstavuje B-špecifická repetícia ZmB v oblasti centroméry, *trans* faktor bol identifikovaný v dvoch oblastiach – v proximálnom euchromatíne a na distálnom konci dlhého ramena chromozómu (Jin *et al.*, 2005; Blavet *et al.*, 2021). Molekulárny mechanizmus procesu je však stále nejasný. Súčasný výskum sa preto zameriava na funkčnú analýzu kandidátnych génov, ktoré by mohli byť potenciálne zapojené do procesu nondisjunkcie.

## 2 CIELE PRÁCE

Cieľom tejto diplomovej práce bolo pomocou metódy fluorescenčnej *in situ* hybridizácie na frakciách zreých peľových zŕn stanoviť frekvenciu nondisjunkcie B chromozómu kukurice siatej *Zea mays* u hybridnej línie B73US x B104, ktorá niesla vo svojom karyotype 1 B chromozóm.

### 3 LITERÁRNY PREHĽAD

#### 3.1 Kukurica siata (*Zea mays* L.)

Podľa taxonomickej klasifikácie kukurica siata patrí do čeľade lipnicovité (*Poaceae*), podčeľade *Panicoideae*, kmeňa *Andropogoneae*. Na základe morfológických a cytologických odlišností sa druh rozdeľuje na štyri poddruhy – *Zea mays* subsp. *huehuetenangensis*, *Zea mays* subsp. *parviglumis*, *Zea mays* subsp. *mexicana* a *Zea mays* subsp. *mays*, pričom z vyššie uvedených poddruhov je jedine *Zea mays* subsp. *mays* domestikovaný poddruh, zvyšné sú divoké bežne známe ako teosinty (Iltis a Doebley, 1980). Kukurica siata je teplomilná C4 rastlina schopná rýchleho rastu a vysokej produkcie biomasy. Vzhľadom na svoju prirodzenú adaptabilitu sa vyskytuje v tropickom, subtropickom aj v miernom pásme (Gwirtz a Garcia-Casal, 2013).

Na základe archeologických nálezov a fylogenetických analýz sa predpokladá, že domestikácia kukurice siatej začala pred viac ako 9 000 rokmi na území dnešného Mexika, v povodí rieky Balsas a neskôr, vďaka objaveniu Ameriky sa rozšírila do celého sveta (Piperno a Flannery, 2001; Matsuoka *et al.*, 2002). Kukurica siata dnes patrí medzi päť najviac pestovaných plodín na svete, pričom podľa organizácie pre výživu a poľnohospodárstvo (Food and Agriculture Organization of the United Nations; FAO) sa v rámci celosvetovej produkcie obilnín zaraďuje na prvú pozíciu ([www.fao.org](http://www.fao.org)).

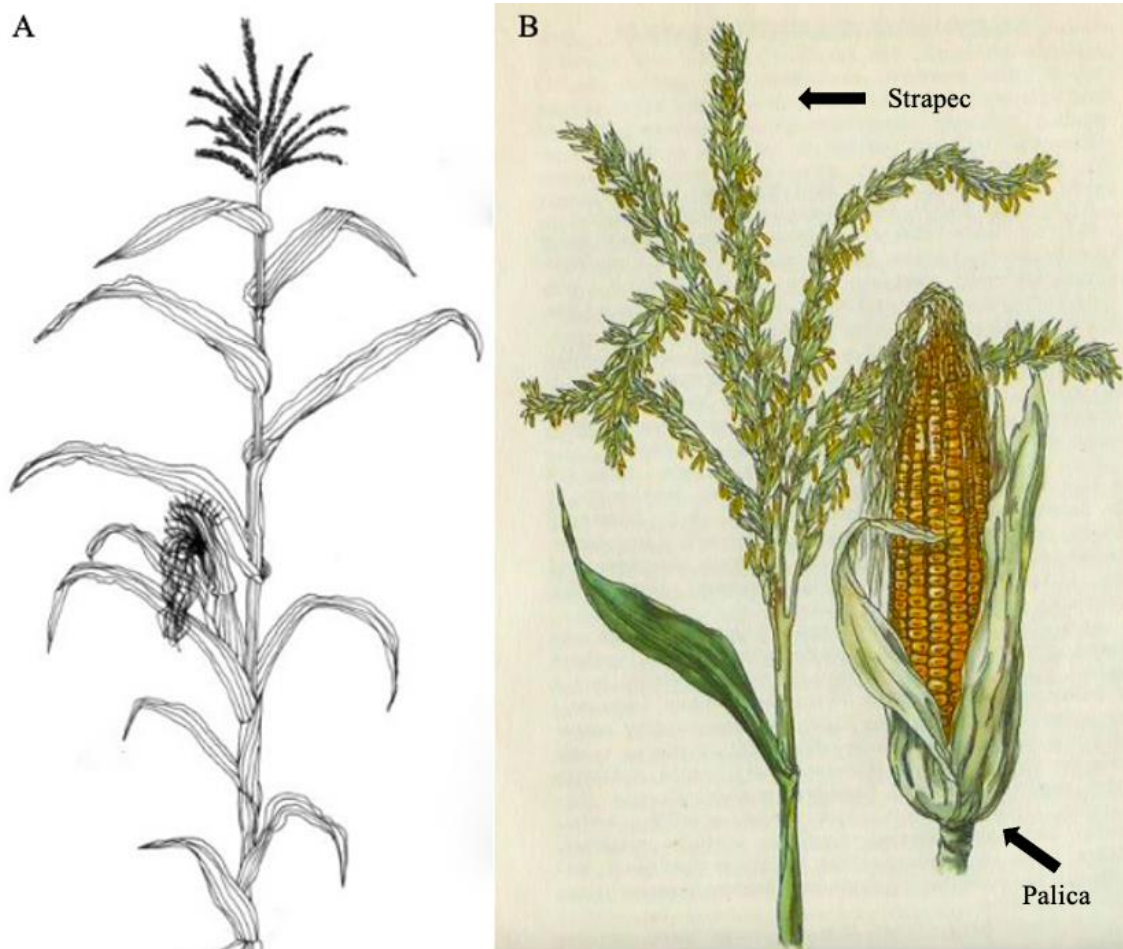
##### 3.1.1 Morfológická stavba

Kukurica siata sa zaraďuje medzi jednoročné trávy, do výšky dorastá v priemere od 1,5 do 3 m. V závislosti na pôdnom zložení, vlhkosti a zasolení pôdy môže výška dosahovať až dvojnásobok (Cook *et al.*, 2005). Steblo kukurice siatej je vzpriamené, s uzlami a internódiami, listy vyrastajú zo stebľa striedavo v dvoch radoch (obr. 1A) (Cook *et al.*, 2005). Boli zaznamenané rozdiely v počte, veľkosti a orientácii listov medzi jednotlivými odrodami kukurice, pričom odrody pestované v miernom podnebnom pásme majú v porovnaní s odrodami pestovanými v tropickom podnebí výrazne nižší počet listov (Esau, 1977). Listy sú prisadnuté s listovými pošvami a charakteristické súbežnou žilnatinou. Čepeľ listu má výrazné stredné rebro, jej tvar je podlhovasto kopijovitý. Dĺžka čepele sa pohybuje v rozpätí 30 až 90 cm, šírka čepele dosahuje 1,5–12 cm (Cook *et al.*, 2005).

Kvety sú charakteristické tvorbou súkvetí. Strapec, samčie súkvetie, je tvorený z dvoch typov kláskov – stopkového a prisadnutého (obr. 1B). Na báze každého klásku na nachádzajú dve plevy. Samčí kvet je tvorený plevicou a plievočkou. Z pazuchy listov vyrastá samičie



kvetenstvo, 2–5 cm hrubý klas tzv. palica, ktorá je obalená pošvami listencov (obr. 1B). Palica sa skladá z mnoho obiliek, kedy obilky sú usporiadané do viacerých radov. Na jej vrchole sa nachádza súbor čneliek a blizien (Smith *et al.*, 2004).



**Obrázok 1** Kukurica siata (*Zea mays* L.) A – schéma celej rastliny. Modifikované z: Ibrahim *et al.*, 2018, B – Detail samčieho (strapec) a samičieho (palica) kvetenstva. Modifikované z: <https://herbar.albumy.biz>

### 3.1.2 Využitie kukurice siatej

Kukurica siata je jednou z najstarších obilnín a zároveň jednou z najviac produkovaných druhov plodín s celosvetovým medziročným výnosom pohybujúcim sa v priemere viac ako jednej miliardy tony, pričom medzi najväčších producentov sa zaraďujú Spojené Štáty, Čína a Brazília ([www.fao.org/faostat](http://www.fao.org/faostat)).

Konkrétne využitie kukurice siatej sa vzťahuje na jednotlivé regióny. V oblasti rozvojových krajín Afriky a Južnej Ameriky predstavuje významný zdroj obživy pre tamojšie obyvateľstvo (Ranum *et al.*, 2014). V rozvinutých krajinách je spotreba obyvateľmi okrajová. Primárne sa pestuje ako krmivo pre hospodársku zver, a to prevažne vo forme zrna a siláže. Svoje uplatnenie nachádza aj v potravinárskom a spracovateľskom priemysle, kde sa

spracováva na rôzne produkty zahrňujúce napríklad olej, kukuričný škrob, sirup, biopalivá (vrátane bioetanolu) a mnoho ďalších (Ranum *et al.*, 2014).

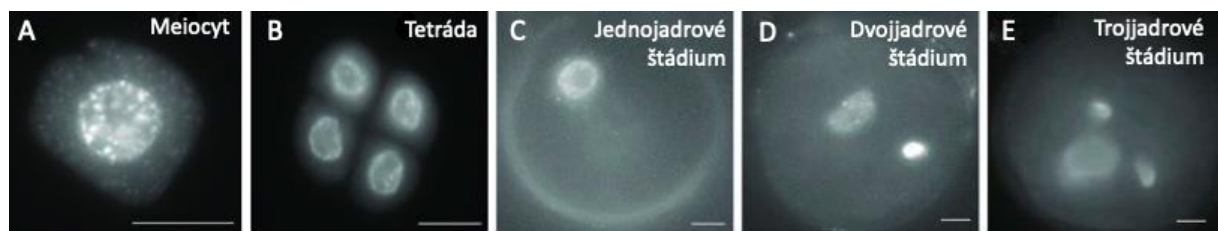
Využitie sa nevzťahuje iba na konzumnú a spracovateľskú sféru. Veľký záujem o túto plodinu javí aj vedecká komunita. Za posledné storočie sa stala jedným z popredných modelových organizmov slúžiacich pre výskumné účely v oblasti vývojovej genetiky, cytogenetiky a genomiky (Page *et al.*, 2001; Strable a Scanlon, 2009; Huang *et al.*, 2016).

### 3.1.3 Rozmnožovanie kukurice siatej a vývoj samčieho gametofytu

Kukurica siata sa vyznačuje prítomnosťou jednopohlavných kvetov, kedy oba typy sú prítomné na jednom jedincovi (Ibrahim *et al.*, 2018). Zaraďuje sa medzi cudzoopelivé rastliny, pričom pre úspešné opelenie a následnú tvorbu semien je potrebný prenos peľu na blizny piestika (Doebly, 2004). Po opelení sa vytvárajú semená, ktorých sfarbenie podlieha značnej variabilite (Coe *et al.*, 1988).

Peľ, súbor peľových zrn, sa vytvára v prašníku, ktorý je súčasťou samčieho pohlavného orgánu – tyčinky (Simpson, 2019a). Prašník je tvorený dvoma párami peľových komôrok, pričom každý pár vytvára peľový vačok inak nazývaný aj *theca* (Simpson, 2019b).

Samotný vývoj peľu (mikrosporogenéza) možno charakterizovať niekoľkými štádiami. U kukurici siatej boli jednotlivé vývojové štádia podrobne preštudované a zdokumentované (Chang a Neuffer, 1989). Na základe pozorovaných cytologických zmien v priebehu vývoja peľu bolo definovaných celkovo päť štádií: štádium meiocytu (obr. 2A), štádium tetrády (obr. 2B), jednojadrové štádium (obr. 2C), dvojjadrové štádium (obr. 2D) a trojjadrové štádium zrelého peľu (obr. 2E) (Chang a Neuffer, 1989; Begcy a Dresselhaus, 2017).



**Obrázok 2** Jednotlivé vývojové štádia peľového zrna u kukurici siatej *Zea mays*. A – Meiocyt, B – Tetráda, C – Jednojadrové štádium, D – Dvojjadrové štádium, E – Trojjadrové štádium. Mierka = 10  $\mu$ m. Modifikované z: Begcy a Dresselhaus, 2017

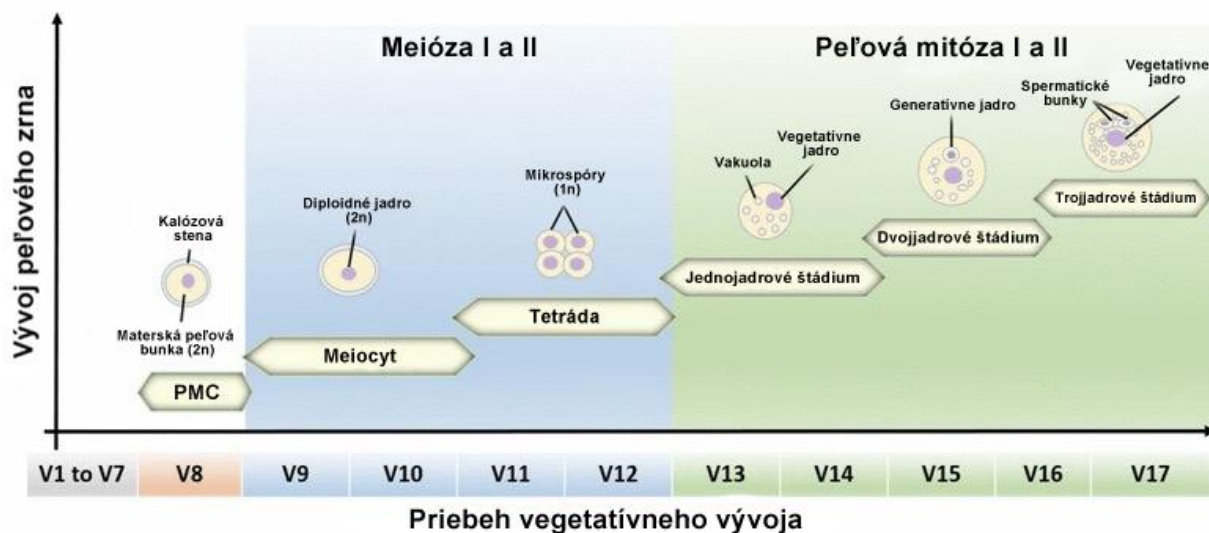
Počiatočným krokom v samčej gametogenéze je dozrievanie materských buniek peľu (PMC) do štádia meiocytov, ktoré sú charakteristické hustou cytoplazmou, jadrom lokalizovaným v strede bunky a bez prítomnosti vakuol (Chang a Neuffer, 1989). Nasleduje sled dvoch meiotických delení vedúce k vytvoreniu tetrád haploidných buniek. Z tohto štádia sa za pôsobenia enzýmu kaláza, produkovaný bunkami prašníka (*tapetum*), uvoľňujú jednotlivé

haploidné mikrospóry s pomerne tenkou bunkovou stenou (Chang a Neuffer, 1989; McCormick, 1993). Pred ďalším delením sa mikrospóry podrobujú výraznej vnútrobunkovej reorganizácii. Bunková stena začína hrubnúť a dochádza k vzniku menších vakuol, ktoré neskôr dávajú za vznik jednej, centrálnej vakuole, čo má za následok zmenu lokalizácie jadra smerom k periférii bunky (Chang a Neuffer, 1989).

Následne podliehajú dvom po sebe nasledujúcim mitotickým deleniam tzv. peľovým mitózam. Výsledkom prvej peľovej mitózy je dvojjadrové štádium peľu. Vzhľadom na to, že sa jedná o asymetrické delenie, vzniká tak veľké jadro vegetatívne a menšie generatívne (Chang a Neuffer, 1989). V tomto štádiu sa generatívne jadro presúva k zárodočnému pólu a nasleduje druhá peľová mitóza – delenie generatívneho jadra. Tá obecné môže mať dve rôzne načasovania. Druhá peľová mitóza môže prebehnúť ešte v rámci dozrievania peľu v prašníkoch – prípad kukurice. Trojjadrové štádium, reprezentujúce zrelý peľ, obsahuje jedno vegetatívne jadro a dve spermatické bunky (Chang a Neuffer, 1989). Druhá možnosť nastáva vtedy, keď rozdelenie generatívneho jadra prebieha až neskôr v peľovej trubici, kedy peľ začne klíčiť, ako príklad možno uviesť rastlinný druh *Annona cherimola* (Lora *et al.*, 2009; Simpson, 2019a).

Zrelý peľ kukurice siatej má charakteristicky guľovitý tvar a bunková stena je modifikovaná na tvrdšiu vonkajšiu vrstvu – exín, pozostávajúca zo sporopollenínu a tenkej vnútornej vrstvy intínu (Chang a Neuffer, 1989; McCormick, 1993).

Kvôli dlhodobému vedeckému záujmu bolo nevyhnutné identifikovať jednotlivé štádia vývoja peľu v priebehu vegetatívneho vývinu rastliny. U kukurice siatej sú užitočnými ukazovateľmi konkrétnych štádií poloha strapca a dĺžka prašníka (Chang a Neuffer, 1989). Počas vývinu kukuričného strapca, odohrávajúc sa vo vnútri stonky, sú peľové zrná v nezrelých štádiách. V čase kedy sa stravec nachádza na vrchole stonky, prašníky obsahujú už zrelé štádium peľu (Bonnett, 1954). Skvelou metódou mapujúcou vývoj nezrelého peľu je tzv. ‘The leaf collar method’, ktorá už je rutinne používaná na definovanie vegetatívnych štádií kukurice (obr. 3) (Abendroth *et al.*, 2011; Begcy a Dresselhaus, 2017). U tejto metódy je vegetatívne štádium určené na základe počtu prítomných listových golierov na báze listových čepelí (Abendroth *et al.*, 2011). Počiatočný krok vo vývoji peľu reprezentovaný prítomnosťou materských peľových buniek (PMC) nastáva už vo vegetatívnom štádiu V8, štádia V9 až V12 predstavujú obdobie dozrievania PMC a tvorbu tetrad haploidných buniek. Bunková reorganizácia mikrospórov bola zaznamenaná v štádiách V13 a V14. Dvojjadrový peľ sa nachádza v štádiách V15 a V16. Vegetatívne štádium V17 je charakteristické už prítomným zrelým trojjadrovým peľom (obr. 3) (Begcy a Dresselhaus, 2017).



**Obrázok 3** Vývoj peľu inbrídnej línie kukurice siatej B73US sledovaný metódou ‘The leaf collar method’. Schéma znázorňuje vývoj nezrelého peľu počas jednotlivých vegetatívnych štádií. Modifikované z: Begy a Dresselhaus, 2017

### 3.2 B chromozómy

U niektorých organizmoch sa okrem genetického materiálu reprezentovaného štandardnými “A“ chromozómami môžu vyskytovať aj nadbytočné chromozómy tzv. B chromozómy. Ich výskyt je značne variabilný a to v rámci populácií daného druhu, a taktiež aj v rámci jednotlivých pletív, respektíve tkanív jedného jedinca (Jones a Rees, 1982; Beukeboom, 1994).

Od doby ich prvej zmienky od roku 1907 kedy sa ich existencia preukázala u hmyzu rodu *Acanthocephala*, boli objavené v genómoch 2 951 druhov organizmov (Gutiérrez *et al.*, 2023). V rastlinnej ríši boli B chromozómy prvýkrát pozorované v 20. rokoch minulého storočia v raži *Secale cereale* a krátko na to sa ich výskyt preukázal v kukurici siatej (Gotoh, 1924; Kuwada, 1925). Pojem “B chromozóm“ prvý raz použil L. F. Randolph v súvislosti s ich identifikáciou v kukurici siatej. Do toho času sa označovali ako nadpočetné chromozómy (Longley, 1927; Randolph, 1928).

Napriek ich objavu pred viac ako storočím, B chromozómy neustále podliehajú štúdiám, ktorých cieľom je odhaliť a objasniť ich unikátne vlastnosti ako sú morfológia, vplyv na fenotyp jedinca, dóza génov a ich spôsob prenosu do ďalších generácií (Su *et al.*, 2018; Chen *et al.*, 2022).

#### 3.2.1 Morfológia B chromozómov

Jedným z charakteristických znakov nadpočetných chromozómov je ich morfológia. Veľmi často sa líšia svojou veľkosťou a mierou kondenzácie chromatínu (Jones, 1995).

Vzhľadom na túto skutočnosť majú tendenciu byť často odlišiteľné od štandardnej sady chromozómov. Zaujímavým zistením je, že nie všetci jedinci v rámci druhu vždy disponujú morfológicky totožnými B chromozómami. Bol preukázaný štrukturálny polymorfizmus, ktorý je pomerne častý (Jones, 1995). Výskyt viacerých variant v populácii preto nie je výnimkou. Ako príklad možno uviesť pažitku *Allium schoenoprasum*, u ktorej sa identifikovalo celkovo deväť variant B chromozómov, pričom výsledným zistením bola prítomnosť prevládajúcej telocentrickej formy (Bougourd a Parker, 1979).

V prevažnej väčšine druhov, u ktorých sú dostupné informácie o ich prítomnosti, B chromozómy vykazujú v porovnaní s A chromozómami menšiu veľkosť (Battaglia, 1964; Jones *et al.*, 1991). Tá v priemere nedosahuje viac ako tri štvrtiny veľkosti najmenšieho A chromozómu (Jones, 1995). Podobná veľkosť s A chromozómami býva skôr nezvyčajná, aj napriek tomu existujú zástupcovia zo živočíšnej ríše ako napríklad ryby druhov *Astyanax scabripinnis* a *Rutilus rutilus*, ktorých B chromozómy sú veľkosťou zrovnateľné so štandardnými chromozómami (Ziegler *et al.*, 2003; Castro *et al.*, 2015). Z rastlinných zástupcov možno uviesť druhy ako psiarka *Alopecurus myosuroides* alebo klarkia *Clarkia elegans* (Lewis, 1951; Sieber a Murray, 1981).

U druhu ryby *Alburnus alburnus*, u ktorej sa objavili dve formy B chromozómov, sa oba typy vyznačujú značne rozdielnou veľkosťou oproti A chromozómom, pričom sa považujú za doteraz najväčšie nadbytočné chromozómy, aké boli objavené u stavovcov (Ziegler *et al.*, 2003). Na druhú stranu, v rastlinnej ríše nie je doposiaľ záznam o výskyte B chromozómu, ktorý by svojou veľkosťou prekonal veľkosť štandardných chromozómov (Jones, 1995).

V minulosti sa B chromozómy považovali za striktné heterochromatické (Battaglia, 1964). Postupným objavovaním týchto elementov u ďalších druhov sa zisťuje, že miera kondenzácie chromatínu je variabilná. U živočíšnych druhov prevláda zastúpenie heterochromatických B chromozómov (Jones, 1995). U rastlinných druhov je pomer zastúpenia výskytu heterochromatických a euchromatických B chromozómov rovnaký (Jones, 1975).

### 3.2.2 Vplyv B chromozómov na fenotyp

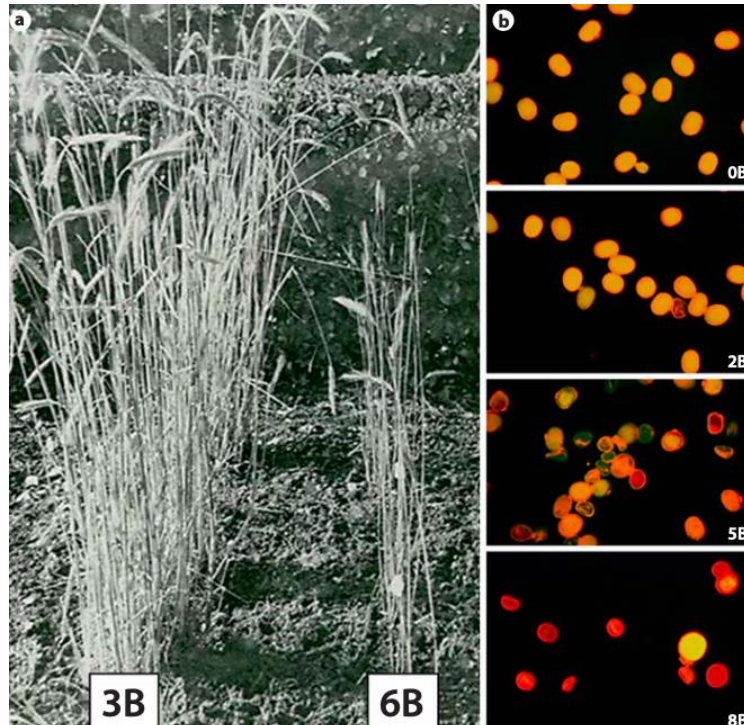
Obecným faktom v rámci biológie B chromozómov je, že nie sú nositeľmi žiadnych génov, ktoré by boli esenciálne pre svojho hostiteľa, a preto nie sú nevyhnutné pre jeho rast a vývoj. V dôsledku toho dostali prívlastky ako sebecké až parazitické elementy (Houben, 2017). Fenotypový prejav spojený s ich prítomnosťou býva druhovo špecifický a do istej miery závisí od počtu B chromozómov vyskytujúcich sa v bunkách (Houben *et al.*, 2014). Treba brať na vedomie, že tolerancia buniek na prítomnosť B chromozómov je značne druhovo špecifická.



Vo väčšine prípadov má výskyt menšieho počtu v organizme buď minimálny, prípadne až nulový fenotypový prejav, zatiaľ čo vysoké počty môžu byť letálne a nepriaznivo ovplyvňovať rôzne aspekty vitality a fertility (Bougourd a Parker, 1979; Camacho *et al.*, 2000).

V populáciách raži *Secale cereale* sa B chromozómy vyskytujú bežne rozmedzí 2–4 kópií bez známok negatívneho vplyvu na jedinca (Jones, 1976). S ich vzrastajúcim počtom sa však prejavuje nápadné zníženie vitality jedinca (obr. 4a). U rastlinného druhu mnohoštetu *Aegilops speltoides* sa pozoroval vplyv prítomnosti rôznych počtov B chromozómov a ich dopad na životaschopnosť peľových zŕn (Jones, 2008). Vo výsledku nemá nízky počet takmer žiadny negatívny vplyv, avšak pribúdajúci počet nadpočetných chromozómov vedie prakticky k sterilite jedinca (obr. 4b) (Jones, 2008).

U druhu skorocelu *Plantago coronopus* sa negatívne účinky prejavujú už pri prítomnosti jedného B chromozómu, čo ma za následok značný pokles samčej fertility (Paliwal a Hyde, 1959). Do kontrastu možno uviesť rastlinný polyploidný druh *Pachyphytum fittkaii*, u ktorého sa zistil doteraz najvyšší počet B chromozómov a to v počte 50, kedy ani pri tak vysokom množstve v bunke neboli u jedincov preukázané fenotypové prejavy (Uhl a Morgan, 1973). Otázkou ostáva, či v tomto prípade polyploidita zohráva úlohu obranného mechanizmu voči tak vysokému počtu B chromozómov (Uhl a Morgan, 1973).



**Obrázok 4** Negatívny vplyv prítomnosti B chromozómov na vitalitu rastliny. a – U raži *Secale cereale* s pribúdajúcim počtom B chromozómov dochádza k zníženiu vitality jedinca; b – Peľ mnohoštetu *Aegilops speltoides* sfarbený fluoresceín diacetátom a propidium jodidom. Žlto sfarbené peľové zrná sú životaschopné, červeno sfarbené sú neživotaschopné. Prevzaté z: Jones *et al.*, 2008

Jedným z najpozoruhodnejších aspektov B chromozómov je spôsob, akým sa ich počet líši medzi jedincami v populácii, prípadne medzi pletivami daného jedinca (Camacho, 2005; Ruban *et al.*, 2020). Za hlavný dôvod rozsiahlych numerických rozdielov v distribúcii B chromozómov sa považuje nemendelovský typ dedičnosti (Jones, 1975). B chromozómy niektorých druhov navyše vykazujú nestabilitu, čo vedie k ich eliminácii v špecifických pletivách (Mendelson a Zohary, 1972).

Hoci nestabilita B chromozómov v pletivách bola pozorovaná u približne 30 rastlinných druhov, len u pár z nich sa vykonali podrobnejšie výskumy, ktoré by zodpovedali otázku týkajúcej sa jej príčiny (Jones, 1975; Ruban *et al.*, 2020). Jedným z preštudovaných prípadov je mnohoštet *Aegilops speltoides* (Mendelson a Zohary, 1972). U mnohoštetu *Aegilops speltoides* sa konštantný výskyt B chromozómov preukázal iba v nadzemných častiach rastliny. Avšak, podliehajú eliminácii v koreňovom meristéme už v ranom štádiu embryonálneho vývoja, v dôsledku čoho absentujú v koreňovom systéme v zrelom vegetatívnom štádiu rastliny (Mendelson a Zohary, 1972; Ruban *et al.*, 2020). Proces eliminácie je v tomto prípade cieleň a prísne riadený (Ruban *et al.*, 2020). Cieleňá eliminácia B chromozómov v špecifických pletivách by mohla predstavovať spôsob, ako minimalizovať ich potenciálne negatívny vplyv na organizmus (Rajpal *et al.*, 2023).

### 3.2.3 Sekvenčné zloženie B chromozómov

Mnoho desaťročí prevládala dogma jasne definujúca zloženie B chromozómov iba z repetitívnych sekvencií, kvôli čomu sa dlhú dobu považovali za transkripčne neaktívne elementy (Houben *et al.*, 2017). Avšak vďaka moderným prístupom ako je sekvenovanie a bioinformatické analýzy sa pomaly odhaľuje ich skutočná povaha (Ahmad *et al.*, 2020).

Vďaka doposiaľ vykonaným sekvenčným analýzám naprieč rôznymi živočíšnymi a rastlinnými druhmi sa identifikovalo niekoľko typov sekvencií nachádzajúcich sa na B chromozómoch. Vo všeobecnosti tieto analýzy poukazujú na výrazné zastúpenie repetitívnych sekvencií, či už tandemovo usporiadaných ako je satelitná DNA, alebo mobilných genetických elementov, z ktorých najčastejšie sú prítomné retrotranspozóny, elementy SINE a LINE (Klemme *et al.*, 2013, Milani *et al.*, 2021). Aj napriek tomu, že sa dlhú dobu považovali za geneticky inertné, novodobé štúdie priniesli nové poznatky, ktoré okrem prevládajúcich repetitívnych sekvencií poukazujú taktiež na prítomnosť pseudogénov, génov pre nekódujúce RNA a množstvo štruktúrnych génov kódujúce proteíny (Ahmad a Martins, 2019; Blavet *et al.*, 2021).

Je potrebné zdôrazniť, že tieto štruktúrne gény zohrávajú významnú úlohu v riadení prenosu B chromozómov do dcérskych buniek. Jedná sa prevažne o gény pôsobiace v rámci bunkového delenia a bunkového cyklu (Valente *et al.*, 2014). Výskumy sa zameriavajú hlavne na druhy rýb z čeľade *Cichlidae*, pričom sa odhalilo zapojenie niekoľkých štruktúrnych génov do organizácie mikrotubulov a štruktúry kinetochoru, čo uľahčuje prenos B chromozómov (Valente *et al.*, 2014). Podobné výskumy ohľadom objasnenia prenosu B chromozómov je taktiež možné nájsť aj u rastlinných druhov, avšak miera o povedomí je menšia. Podrobnejšia analýza sa vykonala u raži *Secale cereale*, u ktorej sa B chromozóm podieľa na regulácii nondisjunkcie v priebehu prvej peľovej mitózy (Carchilan *et al.*, 2007). Na konci dlhého ramena chromozómu bola identifikovaná nondisjunkčná kontrolná oblasť (NCR). V tejto oblasti sa nachádzajú dve rodiny transkripčne aktívnych B-špecifických repetitívnych sekvencií D1100 a E3900 (Sandery *et al.*, 1990; Blunden *et al.*, 1993). NCR ovplyvňuje kohéziu pericentromerických oblastí na chromozómoch, v jej prítomnosti nedôjde k rozdeleniu chromatíd (Endo *et al.*, 2008; Banei-Moghaddam *et al.*, 2012).

### 3.2.4 Akumulačné mechanizmy B chromozómov

B chromozómy sa líšia od štandardných chromozómov hlavne spôsobom prenosu do ďalších generácií, čím sú schopné sa udržiavať v populáciách aj napriek svojej nahraditeľnosti. Typická je pre nich nemendelovská dedičnosť (Jones, 1975). Počas svojej existencie si B chromozómy vytvorili stratégie, umožňujúce im pretrvávajúť v populácii. Tie sa obecné označujú ako akumulčné mechanizmy, najčastejšie sa jedná o tzv. ‘drive’ procesy. Podľa načasovania kedy k nim dochádza, možno identifikovať tri typy: premeiotický, meiotický a postmeiotický (Jones, 1975).

Premeiotický akumulčný mechanizmus sa prvý raz potvrdil u kobyľky *Calliptamus palaestinensis* (Nur, 1963). Počas tohto mechanizmu B chromozómy vykazujú nondisjunkciu. Nerozdelené chromatídy prednostne smerujú k pólu bunky, z ktorého vznikajú bunky zárodočnej línie. Počet B chromozómov je v priemere vyšší než pôvodný počet v zygotе (Nur, 1963).

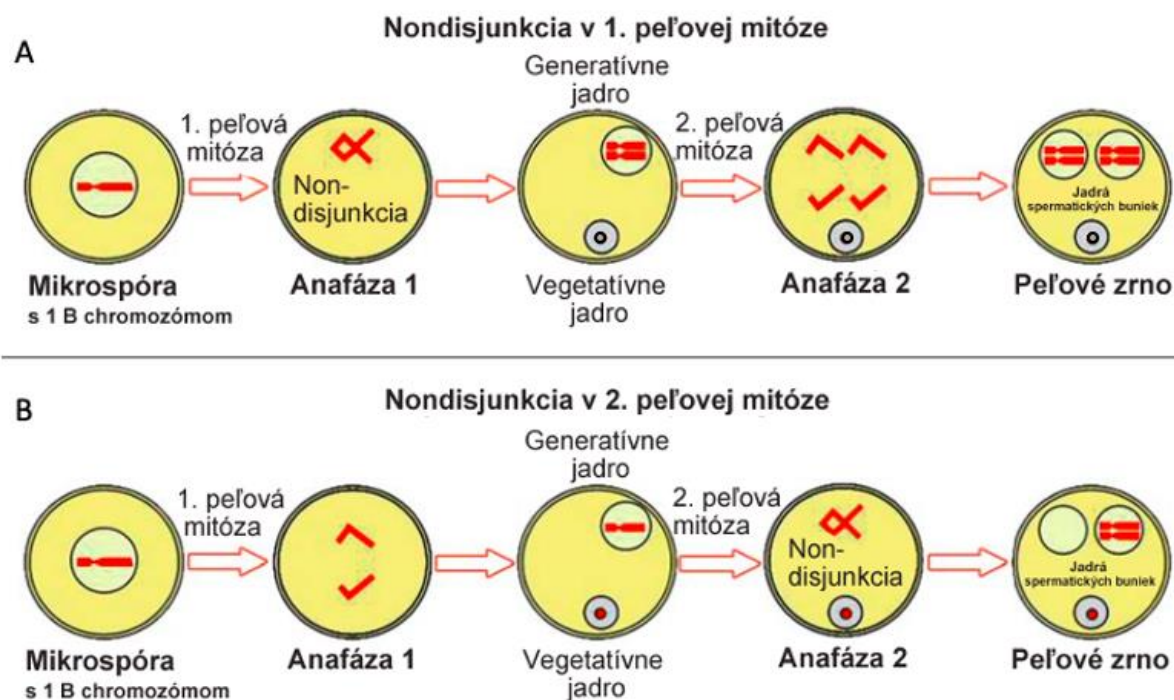
Meiotický akumulčný mechanizmus sa vyskytuje prevažne u živočíšnych druhov (López-León *et al.*, 1991). Samičí meiotický akumulčný mechanizmus je v tomto prípade najbežnejším spôsobom prenosu (Camacho, 2005). V dôsledku asymetrie vretienka v metafáze I meiotického delenia primárneho oocyту, B chromozóm prednostne migruje k životaschopnému pólu bunky, ktorý dáva vznik sekundárnemu oocyту (Hewitt, 1976). U rastlín nie je tento spôsob prenosu príliš frekventovaný, avšak pozorovaný bol. U rastlinného



druhu brezy *Briza humilis* sa vyskytujú dva typy B chromozómu, ktoré sa odlišujú svojou veľkosťou (Murray, 1984). Frekvencia prenosu jednotlivých typov sa odlišuje, pričom prvý typ – B<sup>L</sup> (large) vykazuje mechanizmus nondisjunkcie v priebehu meiózy. U druhého typu – B<sup>S</sup> (small) je frekvencia prenosu nízka a nondisjunkcia nebola doposiaľ zdokumentovaná (Murray, 1984).

Najčastejším akumulárnym mechanizmom u rastlín je postmeiotický drive. Ten sa vyskytuje v priebehu dozrievania gametofytov počas peľových mitóz (Camacho *et al.*, 2000). Existujú dva scenáre prenosu prostredníctvom tohto mechanizmu. Prvý typ tohoto akumulárného mechanizmu bol prvýkrát preukázaný u raži *Secale cereale*, kedy za akumuláciu B chromozómov je zodpovedná nondisjunkcia B chromozómu v anafáze prvej peľovej mitózy a následná prednostná migrácia oboch nerozdelených chromatíd B chromozómu do generatívneho jadra (obr. 5A). Výsledkom je prítomnosť B chromozómu v oboch spermatických bunkách, vďaka čomu zvyšujú frekvenciu svojho prenosu do ďalšej generácie (Hasegawa, 1934).

Ďalší prípad sa doteraz zaznamenal iba v kukurici siatej *Zea mays*, kedy k nondisjunkcii dochádza v druhej peľovej mitóze, čoho dôsledkom je výskyt nadpočetného chromozómu iba v jednej spermatickej bunke (obr. 5B) (Roman, 1947). Zvýhodnený prenos do ďalších generácií je závislý od prednostného oplodnenia vaječnej bunky spermatickou bunkou nesúcu B chromozóm. Tento jav sa nazýva preferenčné oplodnenie. Jedná sa tak o komplexný akumulárný mechanizmus, ktorý využívajú B chromozómy kukurice. Vzhľadom na to, že výsledkom nondisjunkcie je nerovnomerný výskyt B chromozómu v spermatických bunkách, by v prípade neexistencie tohto akumulárného mechanizmu bola 50% pravdepodobnosť eliminácie B chromozómu. Pri preferenčnom oplodnení spermatická bunka nesúca B chromozóm teda prednostne oplodní vaječnú bunku a to približne v 75 % prípadov (Roman, 1948). Existencia preferenčného oplodnenia je tak nutnou súčasťou akumulárného mechanizmu u B chromozómu kukurice.



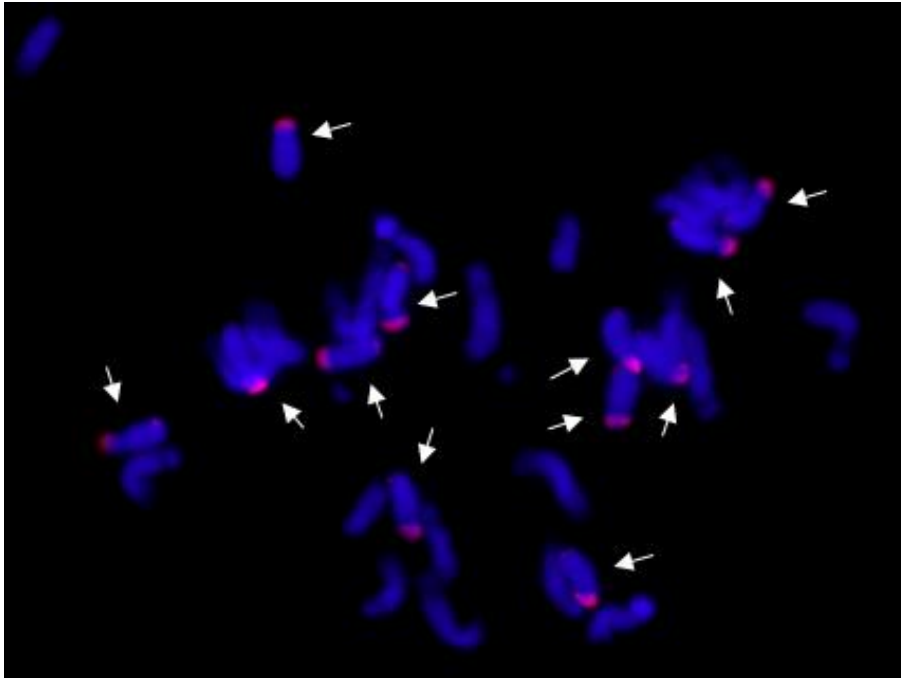
**Obrázok 5** Schéma znázorňujúca nondisjunkciu B chromozómu počas dozrievania samčích gametofytov. A – V prípade nondisjunkcie v prvej peľovej mitóze obe spermatické bunky obsahujú B chromozóm, B – V prípade nondisjunkcie počas druhej peľovej mitózy sa B chromozóm nachádza iba v jednej spermatickej bunke. Modifikované z: Jones *et al.*, 2008

### 3.2.5 B chromozóm kukurice siatej

Prvé pozorovanie B chromozómu kukurice siatej uskutočnil Y. Kuwara už v 20. rokoch minulého storočia (Kuwada, 1925). Od toho času sa ich výskyt preukázal vo viacerých odrodách – *Zea mays* var. *rugosa*, *Zea mays* var. *amylacea* a *Zea mays* var. *everta* a v teosinte *Zea mays* subsp. *mexicana* (Longley, 1927; Kozhuchov, 1933; McClintock, 1981). V porovnaní s inými druhmi vykazuje kukurica pomerne vysokú toleranciu na prítomnosť nadpočetných chromozómov. Najvyšší počet aký bol doposiaľ zaznamenaný je 34 kópií v bunke (Randolph, 1941). Fenotypový prejav jedinca čiastočne súvisí s počtom B chromozómov (Stark *et al.*, 1996). Výraznejšie prejavy sa pozorovali u 15 a viac kópií B chromozómov a s ich pribúdajúcim počtom dochádza postupe k znižovaniu vitality a fertility jedinca, pričom sa taktiež zaznamenala aj produkcia defektných semien (Randolph, 1941).

V rámci morfológie bol doposiaľ identifikovaný jediný variant B chromozómu. Morfologicky sa jedná o akrocentrický chromozóm a v porovnaní so štandardnými chromozómami je veľkostne rovnaký ako najmenší A chromozóm (obr. 6) (Randolph, 1925). Tento akrocentrický chromozóm môže prechádzať rôznymi morfologickými zmenami. V raných štúdiách sa identifikoval výskyt tzv. derivátov B chromozómu. Vznik derivátov sa pripisuje zlomu na konkrétnych miestach chromozómu, pričom sa charakterizovali celkovo

štyri typy derivátov – C, D, E a F. Každý z nich vykazoval približne rovnakú frekvenciu prenosu ako akrocentrický B chromozóm (Randolph, 1941).



**Obrázok 6** Metafázne chromozómy kukurice sietej *Zea mays* referenčnej línie B73US s 12 B chromozómami ( $2n=2x=20+12B$ ). Šípky označujú B chromozómy s B-špecifickou sondou ZmB (červeno). Chromozómy sú farbené DAPI (modro). Zdroj: Karafiátová *et al.*, nepublikované

### 3.3 B chromozóm kukurice sietej ako model pre štúdium biológie nadpočetných chromozómov

Vzhľadom na celosvetový význam kukurice je miera povedomia o B chromozóme výrazne vyššia než u ostatných druhov. Hoci výskumy trvajú už takmer storočie, posledné roky bol podrobený mnohým molekulárnym štúdiám, ktorých zámerom bolo poskytnúť podrobnejšie informácie o pôvode, evolúcii, dedičnosti a funkcií B chromozómu (Marques *et al.*, 2018; Blavet *et al.*, 2021).

#### 3.3.1 Cytologická charakterizácia a kvantifikácia B chromozómu kukurice

Skoré výskumy B chromozómu kukurice, ktoré využívali cytologické prístupy objasnili otázky týkajúce sa jeho morfológie, organizácie chromatinu a zároveň stanovili vlastnosti pôsobiace na jeho udržiavanie v populácii (McClintock, 1933; Randolph, 1941; Roman, 1947).

Prvé poznatky vychádzali z klasického farbenia chromozómov, čo umožnilo ich vizualizáciu (McClintock, 1933). Neskôr bola vyvinutá metóda prúžkovania tzv. ‘banding’, vďaka ktorej už bolo možné získať podrobnejšie informácie ohľadom chromatinového zloženia chromozómu a identifikovať tak heterochromatinové a euchromatinové oblasti B chromozómu

(Carlson, 1978). Miera kondenzácie chromatínu B chromozómu nie je rovnomerná. Nadpočetný chromozóm disponuje jednak euchromatínovými, tak aj heterochromatínovými oblasťami, pričom prevládajúcu časť tvorí práve heterochromatín (Carlson, 1978). Chromozóm pozostáva z krátkeho ramena, centroméry a dlhého ramena, pričom za centromerickou oblasťou sa nachádzajú dva bloky proximálneho euchromatínu (PE1 a PE2), za ktorými nasledujú štyri distálne heterochromatínové bloky (DH1, DH2, DH3 a DH4) (Birchler a Yang, 2021). Koniec dlhého ramena je tvorený distálnym euchromatínom (DE) (obr. 7) (Birchler a Yang, 2021).

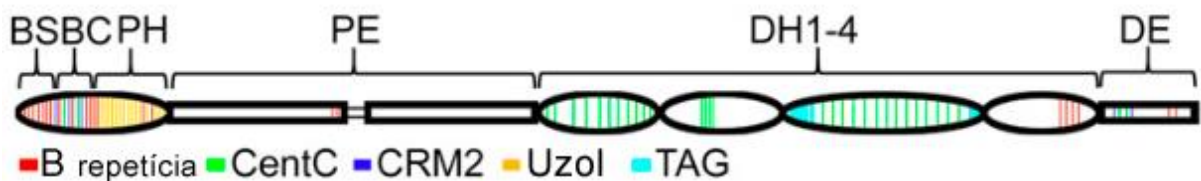
Neskôr sa pre vizualizáciu a stanovenie počtu B chromozómu u kukurici začali využívať cytogenetické metódy založené na sekvencii (Shi *et al.*, 1996; Rusche *et al.*, 1997). Jednou z nich je fluorescenčná *in situ* hybridizácia (FISH) (Langer-Safer *et al.*, 1982). Metóda umožňuje detekciu špecifických sekvencií na interfáznom jadre či chromozómoch pomocou fluorescenčne značených sond. SONDY SÚ NAJČASTEJŠIE ODVODENÉ Z REPETITÍVNYCH SEKVENCIÍ lokalizovaných na B chromozómoch (Alfenito a Birchler, 1993; Stark *et al.*, 1996). Táto metóda je však prácna a časovo náročná. Pre B chromozóm kukurice bola vyvinutá alternatívna metóda pre určenie počtu kópií, ktorá je založená na PCR. Droplet-digital PCR (ddPCR) predstavuje moderný a efektívny prístup, ktorý je možné využiť pre kvantifikáciu B chromozómov (Svačina *et al.*, 2023). Princíp ddPCR spočíva v rozdelení PCR reakčnej zmesi do niekoľko tisíc kvapiek, kedy v každej kvapke prebieha PCR reakcia. Vďaka tomu je kvantifikácia veľmi presná. V tejto metóde sú využívané dve TaqMan sondy – jedna na referenčný lokus a druhá na cieľový lokus (Svačina *et al.*, 2023).

### 3.3.2 Analýza sekvencie B chromozómu kukurice

Komparatívne analýzy sekvencií medzi A a B chromozómami poukázali na vnútrodruhový pôvod B chromozómu (Viotti *et al.*, 1985). V sekvencii B chromozómu sa identifikovali repetície bežne sa nachádzajúce na A chromozómoch a B-špecifické repetície typické iba pre daný chromozóm (Alfenito a Birchler, 1993). Tieto B-špecifické repetície sú lokalizované pozdĺž celého chromozómu. Konkrétne sa jedná o tri typy repetíc. Prvou z nich je CL-1 repetícia o dĺžke ~1500 bp, ktorej výskyt sa zaznamenal v prvých troch blokoch distálneho heterochromatínu (Cheng a Lin, 2004). Ďalšia – StarkB, veľkostne najväčšia (22 kbp) sa nachádza na treťom a štvrtom distálnom heterochromatínovom bloku (Lamb *et al.*, 2007) Sekvenčná analýza odhalila odvodenie repetície StarkB od sekvencií, bežne sa nachádzajúcich v genóme kukurice satej ako aj zo sekvencií špecifických pre B chromozóm (Lamb *et al.*, 2007) V porovnaní s ostatnými repetíciami vykazuje zmeny vo svojich kópiách

v dôsledku inzercií, delécií, duplikácií a jednonukleotidových polymorfizmov (Lamb *et al.*, 2007).

B chromozóm špecifický element ZmB predstavuje tretí typ repetície. Jeho dĺžka je ~1400 bp a nachádza sa v oblasti centroméry a na distálnom konci dlhého ramena chromozómu (Alfenito a Birchler, 1993). Spolu s ďalšími dvoma typmi repetíc, ktorých sekvencie sa našli aj v centromérach A chromozómov – CentC a retrotranspozón CRM, tak tvorí 700kbp veľkú doménu centroméry. Klastre elementu CentC sa okrem výskytu v centromére nachádzajú na dlhom ramene B chromozómu (Lamb *et al.*, 2005; Blavet *et al.*, 2021).



**Obrázok 7** Schematické zobrazenie B chromozómu kukurice siatej v pachytene meiózy. Chromozóm je rozdelený na krátke rameno (BS), centroméru (BC), proximálny heterochromatín (PH), dva bloky proximálneho euchromatínu (PE), štyri bloky distálneho heterochromatínu (DH1–DH4) a distálny euchromatín (DE). B-špecifické repetície ZmB, repetícia CentC, retrotranspozón CRM2, repetície knob a klastre mikrosatelitov TAG sú označené farebne pozdĺž chromozómu. Modifikované z: Blavet *et al.*, 2021

Pericentromerickú oblasť tvorí tzv. gombík (ang. knob). Táto oblasť pozostáva z dvoch tandemovo usporiadaných jednotiek dlhých 180 bp a 350 bp (TR-1) (Peacock *et al.*, 1981; Hsu *et al.*, 2003). Analýzy poukázali na čiastočnú homológiu medzi týmito jednotkami, pričom je možné, že TR-1 sa vyvinula z 180bp dlhej jednotky ako výsledok duplikácie a divergencie (Ananiev *et al.*, 1998). Čiastočná homológia sa preukázala aj medzi B-špecifickou ZmB a 180bp jednotkou gombíka (Page *et al.*, 2001).

Veľkosť sekvencie B chromozómu sa odhadla na približne 125,9 Mbp a v porovnaní so sekvenčnými údajmi, ktoré boli doposiaľ publikované u iných B chromozómov – raži *Secale cereale* (~580 Mbp) a ciroku *Sorghum purpureosericeum* (~421 Mbp) predstavuje tak výrazne menší chromozóm (Martins *et al.*, 2012; Karafiátová *et al.*, 2021; Blavet *et al.*, 2021). Približne 60 % sekvencií nadpočetného chromozómu je reprezentovaných transponovateľnými elementami (TE) (Blavet *et al.*, 2021). Analýza umožnila identifikovať celkovo 42 rôznych TE, z ktorých najrozšírenejšie zastúpenie mali retrotranspozóny LTR z nadrodín *gypsy* a *copia* (Blavet *et al.*, 2021). Pomocou analýzy sa detegovala organelová DNA pochádzajúca z mitochondrií a plastidov o veľkosti ~712 kbp, čo predstavuje približne 0,6 % genetickej informácie chromozómu (Blavet *et al.*, 2021). Mitochondriálna DNA sa nachádzala prevažne v oblasti proximálneho euchromatínu a v distálnej oblasti dlhého ramena B chromozómu.

Zastúpenie chloroplastovej DNA je relatívne malé a predstavuje približne 67 kbp (Blavet *et al.*, 2021).

Podľa najnovších informácií sa v sekvencii nachádza celkovo 758 proteín-kódujúcich génov, a z ktorých vzniká 3 504 transkriptov. Mnoho z týchto génov ovplyvňuje expresiu génov na A chromozómoch. Ďalšie zohrávajú dôležitú úlohu v bunkovom delení a bunkovom cykle, čo zabezpečuje zachovanie B chromozómu (Hong *et al.*, 2020; Blavet *et al.*, 2021).

Štúdia tak priniesla cenné poznatky o štruktúre, zložení a génovej expresii nadpočetného chromozómu, pričom spochybňuje prevládajúci názor o jeho genetickej inertnosti a poukazuje na jeho transkripčne aktívne prvky (Blavet *et al.*, 2021).

Jedným zo skvelých genetických nástrojov, pomocou ktorého bolo možné určiť mnohé vlastnosti B chromozómu kukurice siatej sa považujú B-A translokácie. Tie predstavujú vzájomnú výmenu častí medzi B chromozómom a štandardným chromozómom. Bolo vytvorených mnoho B-A translokačných línií, na základe ktorých bolo možné získať prvé poznatky o genetickej podstate nondisjunkcie (Sheridan a Auger, 2006). Podmienkou priebehu nondisjunkcie je prítomnosť dvoch faktorov – *cis* a *trans* faktora (Ward, 1973; Lin, 1978; Blavet *et al.*, 2021). Nondisjunkcia sa chápe ako dôsledok neschopnosti rozdelenia sesterských chromatíd chromozómu. *Cis* faktor, v tomto prípade B-špecifická repetícia ZmB nachádzajúca v oblasti centroméry, hrá zásadnú úlohu v adhézii chromatíd (Jin *et al.*, 2005; Carlson, 2009). *Trans* faktor sa identifikoval v dvoch oblastiach – v proximálnom euchromatíne a na distálnom konci dlhého ramena chromozómu (Lin, 1978; Beckett, 1991).

Analýzy založené na B–A translokáciách poukázali na dôležitosť prítomnosti distálnej oblasti dlhého ramena chromozómu. Priebeh nondisjunkcie nie je podmienený prítomnosťou tejto oblasti na rovnakom chromozóme. Je však nutné, aby bola v rovnakom jadre, pretože v momente, kedy tento segment v jadre absentuje, priebeh rozdelenia chromatíd vykazuje normálny charakter (Ward, 1973; Auger *et al.*, 2001).

### **3.4 Trend vedeckého výskumu B chromozómov**

V minulosti boli B chromozómy podrobené mnohým cytogenetickým analýzám, výsledkom ktorých je znalosť ich molekulárneho zloženia. U B chromozómov niektorých druhov boli dokonca vykonané sekvenčné analýzy. Tie umožnili okrem iného aj identifikáciu proteín-kódujúcich sekvencií. V súčasnej dobe sa však trend výskumu B chromozómov presúva do oblasti funkčnej genomiky s cieľom zistiť transkripčnú aktivitu génov a prípadnú funkciu proteínov, ktoré sú nimi kódované (Ahmad a Martins, 2019).

Počet analýz snažiacich sa pochopiť otázku biologického významu jednotlivých proteínov stále pribúda. Je však nutné poznamenať, že pomer doposiaľ vykonaných štúdií v rámci rastlinných a živočíšnych druhov je v značnej nerovnováhe. Štúdie tohto typu sú uskutočnené prevažne u živočíchov, konkrétne druhov rýb z čeľade *Cichlidae* a niektorých druhov cicavcov (Valente *et al.*, 2014; Makunin *et al.*, 2016).

Výsledky týchto štúdií poukazujú na funkciu jednotlivých proteínov zohrávajúcu úlohu v procese bunkového delenia a cyklu, pričom sa podieľajú na rôznych aspektoch chromozomálnej segregácie, organizácii mikrotubulov, štruktúry kinetochoru, rekombinácie a zostavovaní deliaceho vretienka (Valente *et al.*, 2014; Makunin *et al.*, 2016)

Vzhľadom na to, že štúdie u rastlinných druhov sú v úzadí a informácie o funkčnej analýze génov B chromozómov úplne chýbajú, je preto zatiaľ možné len predpokladať, že doteraz nájdené gény majú podobný biologický význam. Aj napriek tomu sa u kukurici na základe sekvenčnej analýzy už teraz vie, že B chromozóm si kóduje gény podieľajúce sa na procese nondisjunkcie (Blavet *et al.*, 2021). Avšak informácie na ich transkripčnej a translačnej úrovni zatiaľ nie sú k dispozícii. V dnešnej dobe je však táto problematika predmetom rozsiahlych diskusií a intenzívneho výskumu.

## 4 MATERIÁL A METÓDY

### 4.1 Biologický materiál

Biologický materiál predstavovali dve línie kukurice siatej *Zea mays* – inbredná línia B73US a línia B104 a ich kríženci pochádzajúci z riadeného opelenia. Inbredná línia B73US bola nositeľom B chromozómov ( $2n=2x=20+2B$ ); semená pochádzali z vlastných zdrojov na ÚEB AV ČR. Semená línie B104 bez B chromozómov ( $2n=2x=20$ ) boli získané z Centra pre génové inžinierstvo rastlín (Crop Genome Engineering Facility, VIB, Ghent, Belgicko).

Rodičovské línie B73US a B104 boli vysiate a v línii B73US boli vyselektovaní jedinci nesúci 2 kópie B chromozómu. Línia B73US reprezentovala samičieho rodiča a línia B104 samčieho rodiča. Rastliny oboch línií boli dopestované do štádia kvitnutia a zrelosti. Následne prebehlo riadené kríženie. Selekcia rastlín bola prevedená pred začiatkom diplomovej práce na pracovisku ÚEB AV ČR.

V rámci diplomovej práce potom bolo prevedené kríženie. Získané semená hybridnej línie B73US x B104 pochádzajúce z kríženia slúžili ako východiskový biologický materiál pre ďalšie experimenty. Predmetom experimentov bol peľ krížencov nesúcich 1 B chromozóm. Rastliny boli na počiatku pestované v skleníku za podmienok 16h/deň (24 °C) a 8h/noc (20 °C) a následne boli vyselektovaní jedinci vysadení na pole, kde z nich bol zozbieraný peľ.

### 4.2 Zoznam použitých chemikálií a roztokov

#### Použité chemikálie

- Agaróza (Sigma-Aldrich, kat. č. A9539)
- Brómfenolová modrá (Sigma-Aldrich, kat. č. B0126)
- Citrát sodný (Sigma-Aldrich, kat. č. S1804)
- Destilovaná voda (nuclease-free water) (Thermo Scientific, kat. č. 00956665)
- Dihydrát disodnej soli kyseliny ethylendiamintetraoctovej (Sigma-Aldrich, kat. č. E5134)
- Doceylsulfát sodný (SDS) (Sigma-Aldrich, kat. č. 817034)
- Ethanol 96% (Lach-ner, kat. č. 20025-A26)
- Ethidium bromid (Sigma-Aldrich, kat. č. E8751)
- Formamid 99,5% (Sigma-Aldrich, kat. č. F9037)
- Chlorid sodný (Lach-ner, kat. č. 30423)
- GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Fermentas, kat. č. SM0321)



- Glycerol (Sigma-Aldrich, kat. č. G5516)
- Imerzný olej Immersol 518F (Carl Zeiss, kat. č. 12-624-66A)
- Kyselina boritá (Lach-New, kat. č. 10017-AP0)
- Kyselina octová 99,8% (Lach-ner, kat. č. 10047-A99)
- Nukleotidy: dATP, dCTP, dGTP, dTTP, každý o koncentrácii 100 mM (VWR International, kat. č. 733-1364)
- Pufr pre *Taq* polymerázu (New England Biolabs, kat. č. B7002S)
- Reštrikčná endonukleáza *HaeIII* a rCutSmart™ Buffer (Neb, kat. č. R0108S)
- Salmon sperm DNA (Sigma-Aldrich, kat. č. D7656)
- *Taq* DNA polymeráza (New England Biolabs, kat. č. M0273L)
- Tetramethyl-Rhodamine-5-dUTP (Sigma-Aldrich, kat. č. 11534378910)
- Tris base (Sigma-Aldrich, kat. č. 77-86-1)
- Vectashield s DAPI (Vector Laboratories, kat. č. H-1200-10)
- Xylencyanol (Sigma-Aldrich, kat. č. X4126)

### **Použité kity**

- ddPCR Supermix for Probes (Bio-Rad, kat. č. 1863024)
- NucleoSpin Plant II kit (Macherey-Nagel, kat. č. 740770)
- Phire Plant Direct PCR Master Mix kit (ThermoFisher Scientific, kat. č. F160S)

### **Použité roztoky a ich príprava**

- 0,5M EDTA (1 l): 186,1 g dihydrátu disodnej soli ethylendiamintetraoctovej kyseliny rozpustiť v 800 ml destilovanej vode, doplniť do 1 l a upraviť pH na 8
- 5x TBE pufr (1 l): rozpustiť vo vode 54 g Tris base a 27,5 g kyseliny boritej, pridať 20 ml 0,5M EDTA, doplniť destilovanou vodou do 1 l a upraviť pH na 8
- 0,5x TBE (1 l): zmiešať 100 ml 5x TBE pufru a 900 ml destilovanej vody
- 6x STOP C (10 ml): odvážiť 5 mg brómfenolovej modrej a 5 mg xylencyanolu, pridať 2 ml 0,5M EDTA, 5 ml 42,5% glycerolu, 1 ml 1% SDS, doplniť destilovanou vodou do 10 ml
- 1M Tris-HCl (1 l): rozpustiť 121,1 g Tris base v 800 ml destilovanej vode a upraviť pH na 8
- 20x SSC (1 l): 175,3 g NaCl a 88,2 g citrátu sodného rozpustiť v časti objemu destilovanej vody, upraviť pH na 7 a doplniť destilovanou vodou na 1 l

- 2x SSC (1 l): zmiešať 100 ml 20 SSC a 900 ml destilovanej vody
- 4x hybridizačný pufr (200 µl): 80 µl 20x SSC, 8 µl 1M Tris-HCl (pH 8), 1,6 µl 0,5M EDTA, 11,2 µl Salmon sperm DNA o koncentrácii 10 µg/µl a doplniť deionizovanú vodu do 200 µl
- 90% kyselina octová (100 ml): zmiešať 90 ml 99,8% kyseliny octovej a 10 ml destilovanej vody
- 70% ethanol (100 ml): zmiešať 72,92 ml 96% ethanolu a 27,08 ml deionizovanej vody
- Hybridizačný roztok (20 µl): 10 µl formamidu, 5 µl 4x hybridizačného pufru, 3 µl značenej oligo-sondy a 2 µl destilovanej vody
- Marker molekulovej hmotnosti (520 µl): zmiešať 20 µl GeneRuler 100 bp, 200 µl 6x STOP C a 300 µl destilovanej vody, zvortexovať
- Roztok ethidium bromid (1 l): v 100 ml destilovanej vode rozpustiť 50 g ethidium bromidu, doplniť destilovanou vodou do 1 l

#### 4.3 Zoznam použitých prístrojov a zariadení

- Centrifúga Mega Star 600R (VWR International)
- Digestor (Merci)
- Elektroforetická horizontálna aparátúra Owl A6 (ThermoFisher Scientific)
- Fluorescenčný mikroskop Axio Imager Z.2 (Carl Zeiss) s CCD kamerou, zdrojom Power Supply (Eplax GmbH) a DSD2 modulom
- Laboratórna váha ViBRA AJ-820CE (Shinko Denshi)
- Lyofilizátor CoolSafe s vákuovou pumpou VacSafe (LaboGene)
- Oscilačný mlyn MM301 (Retsch)
- QX200 Droplet Generator (Bio-Rad)
- QX200 Droplet Reader (Bio-Rad)
- Spektrofotomer NanoDrop One/One<sup>C</sup> Microvolume UV-Vis (ThermoFisher Scientific)
- Stolná centrifúga MiniStar silverline (VWR International)
- Thermocycler C1000 Touch<sup>TM</sup> (Bio-Rad)
- Thermocycler Mastercycler (Eppendorf 5333)
- UV transluminátor InGenius3 (Syngene)
- Vodná kúpeľ SUB6 (Grant Instruments)
- Vortex REAX Top (Heidolph)

- Zdroj elektrického napätia Consort E122 (Sigma-Aldrich)

#### 4.4 Použité experimentálne a vyhodnocovanie postupy

##### 4.4.1 Selekcia B-pozitívnych rastlín metódou Direct PCR

Na selekciu B-pozitívnych semenáčikov bola využitá metóda Phire Plant Direct PCR s použitím jedného B-špecifického markeru B008 (Blavet *et al.*, 2021). Direct PCR je veľmi efektívna, pretože umožňuje screening markerov na malom množstve pletiva a bez izolácie genómovej DNA. Táto metóda bola použitá pre selekciu B-pozitívnych krížencov hybridnej línie B73US x B104. Semená boli namočené v destilovanej vode cez noc, nechali sa naklíčiť na Petriho miskách a boli umiestnené do termostatu po dobu štyroch dní. Z naklíčených semenáčikov sa odobrali menšie časti koreňov, preniesli sa do 20  $\mu$ l dilučného pufru a nechali sa za účelom lýzy pletiva inkubovať v termálnom cykleri Touch<sup>TM</sup> (Bio-Rad) 10 minút pri teplote 95 °C. Objem jednej PCR reakcie obsahoval 1x Phire Plant Direct PCR Master Mix (ThermoFisher Scientific), F+R primery (F-TAGTTCGTCTCCACACACGC a R-CGAGGAGGTCATCGTCATGG), každý o koncentrácii 1  $\mu$ M, 0,5  $\mu$ l lyzátu DNA a destilovanú vodu do 10  $\mu$ l. Amplifikácia produktov prebiehala za nasledujúcich podmienok (tab. 1):

**Tabuľka 1** Podmienky amplifikácie PCR produktov v prostredí Direct PCR

Proces	Teplota [°C]	Čas	Počet cyklov
Úvodná denaturácia	98	5 min	
Denaturácia	98	5 s	
Nasadanie primerov	65	5 s	35
Extenzia	72	20 s	
Záverečná extenzia	72	1 min	

Výsledné produkty PCR boli separované pomocou elektroforézy v 1,2% agarózovom géli v 0,5x TBE pufri, farbené v ethidium bromide a detegované pomocou UV transluminátora (Syngene). Rastliny vyhodnotené ako B-pozitívne boli vysadené a ďalej pestované v skleníku.

#### 4.4.2 Izolácia genómovej DNA kukurice pre stanovenie počtu B chromozómov

Genómová DNA bola izolovaná z listov 4-týždňových B-pozitívnych rastlín kukurice siatej hybridnej línie B73US x B104 pestovaných v skleníku. Odobrané listy boli sušené v lyofilizátore (LaboGene) po dobu 24 h a následne homogenizované za pridania sklenených guľičiek v mlynčeku (Retsch) (3 minúty, 27 otáčok/s). Izolácia DNA bola prevedená pomocou komerčného kitu NucleoSpin Plant II (Macherey-Nagel) podľa protokolu výrobcu. Koncentrácia DNA sa stanovila spektrofotometricky pomocou prístroja NanoDrop (ThermoFisher Scientific). Vyizolovaná DNA slúžila ako templát v droplet-digital PCR (ddPCR).

#### 4.4.3 Stanovenie počtu B chromozómov v B-pozitívnych rastlinách metódou droplet-digital PCR (ddPCR)

Počet B chromozómov v krížencoch bol stanovený podľa už zavedeného protokolu (Svačina *et al.*, 2023). Pred vykonaním droplet-digital PCR bola vyizolovaná genómová DNA z analyzovaných B-pozitívnych jedincov kukurice siatej naštiepená pomocou enzýmu reštrikčnej endonukleázy *HaeIII* (New England Biolabs). Objem jednej reakcie činil 1 U enzýmu *HaeIII*, 1x koncentrovaný rCutSmart™ Buffer (New England Biolabs), 10 µl DNA a vodu do 20 µl. Reakčná zmes sa inkubovala pri 37 °C v inkubátore cez noc.

K stanoveniu počtu B chromozómov boli v droplet-digital PCR použité dva páry primerov a dve sondy TaqMan, ktoré boli komplementárne ku každému amplikónu. Referenčné a cieľové primery a sondy boli navrhnuté na základe sekvencie inbrednej línie B73US RefGen\_5 (<https://plants.ensembl.org>) a sekvencie B chromozómu (Blavet *et al.*, 2021). Referenčný pár primerov bol navrhnutý pre gén alkoholdehydrogenázu Zm00001eb056510, lokalizovaný na chromozóme 1 kukurice a je prítomný v dvoch kópiách v somatických bunkách. Cieľový pár primerov bol navrhnutý pre gén špecifický pre B chromozóm Zm00044a000147, ktorý sa nachádza v jednej kópii v proximálnej oblasti dlhého ramena B chromozómu (tab. 2) (Blavet *et al.*, 2021). Pre kvantifikáciu cieľového génu bola TaqMan sonda značená FAM [5(6)-karboxyfluoresceín) a TaqMan sonda pre referenčný gén sa značila VIC (2'-chlór-7'-fenyl-1,4-dichlór-6-karboxyfluoresceín) (Svačina *et al.*, 2023).

Droplet-digital PCR bola prevedená s použitím naštiepenej DNA B-pozitívnych rastlín. Reakčná zmes obsahovala 1x ddPCR Supermix for Probes (Bio-Rad), referenčnú sondu TaqMan o koncentrácii 250 nM, cieľovú sondu TaqMan o koncentrácii 250 nM, referenčné a cieľové primery každý o koncentrácii 900 nM, 10 ng DNA a deionizovanú vodu do 20 µl. Kvapky boli vygenerované pomocou prístroja QX200 Droplet Generator (Bio-Rad) podľa

pokynov výrobcu. PCR amplifikácia sa vykonala v termálnom cykleri C1000 Touch™ (Bio-Rad) za nasledujúcich podmienok: všetky kroky s rýchlosťou nábehu 2 °C/s: aktivácia enzýmu 95 °C/10 min, 39 cyklov 94 °C/30 s, 60 °C/1 min, po ktorých nasledovala deaktivácia enzýmu pri 98 °C/10 min.

Fluorescenčný signál bol detegovaný pomocou prístroja QX200 Droplet Reader (Bio-Rad). Následná analýza prebiehala v softvare QuantaSoft v. 1.7.4 (Bio-Rad) za použitia ‘copy number variation’ protokolu s počtom referenčných kópií nastavených na dve.

**Tabuľka 2** Sekvencie primerov a sond použitých v ddPCR

<b>Primery a sondy</b>	<b>Modifikácia a sekvencia (5′–3′)</b>
ZmADH-AF123535_F	GAATGTGTGTTGGGTTTGCAT
ZmADH-AF123535_R	TACTGTACCTTCTTCGAATCTGCTG
ZmADH-AF123535_probe	VIC-TGCAGCCTAACCATGCGCAGGGTA-QSY
B008_F	TAGTTCGTCTCCACACACGC
B008_R	CGAGGAGGTCATCGTCATGG
B008_probe	FAM-TCCTCCGCTCGACACATGTCCCTG-QSY

#### 4.4.4 Zber a fixácia peľových frakcií

Peľové zrná z krížencov nesúcich 1 B chromozóm boli zbierané v zrelom štádiu dehiscencie (otvorenie prašníkov). Otvorené prašníky sa zaizolovali do vrecúšok, do ktorých sa jemným mechanickým trasením strapca peľ vytrepal. Peľové zrná boli následne fixované v 90% kyseline octovej po dobu 10 minút pri teplote 4 °C. Následne sa odstránilo fixačné činidlo a frakcie peľových zrn boli skladované v 70% ethanole pri teplote -20 °C pre neskoršiu analýzu pomocou fluorescenčnej *in situ* hybridizácie.

#### 4.4.5 Príprava oligo-sondy špecifickej pre B chromozóm

K vizualizácii B chromozómu bola použitá sonda odvodená z B-špecifickej repetície ZmB. Vzhľadom na inertnú povahu obalu peľových zrn bolo potrebné navrhnúť špecifickú sondu tzv. oligo-sondu, ktorá je zložená z viacerých veľmi krátkych fragmentov DNA – oligonukleotidov. Tie sú schopné jednoduchšie prenikať cez klíčiaci pór peľového zrna. Špecifické oligonukleotidy o dĺžke 45 nukleotidov boli v sekvencii ZmB vybrané na základe analýzy k-merov pomocou nástroja OligoMiner (Beliveau *et al.*, 2018; Blavet *et al.*, 2021). Celkom bolo vyselektovaných osem 45-merov. Z nich boli navrhnuté oligonukleotidy

s čiastočným prekrytom o dĺžke 32–35 nukleotidov (obr. 8; tab. 3), a ktoré slúžili pre syntézu oligo-sondy.

\*\*\*\*\*

5'TTAGAGTTT GGGTTT TAGGATTTATGGTTTAGGGTTATGGTTCAGGA 3'  
 3'AATCTCAAACCCAAAATCCTAAATACCAAATCCCAATACCAAGTCCT 5'

\*\*\*\*\*

rev. 5'TCCTGAACCATAACCCTAAACCATAAATCCTAAAACCCAAACTCTAA 3'

**Obrázok 8** Systém navrhnutia primerov pre syntézu oligo-sondy na príklade ZmB\_1F, ZmB\_1R. Farebne zobrazené nukleotidy tvoria komplementárnu sekvenciu pre hybridizáciu oboch reťazcov. Podčiarknuté nukleotidy tvoria vlastnú sekvenciu primerov. V sekvencii označenej \* dôjde v PCR reakcii k začleneniu fluorescenčných značiek

**Tabuľka 3** Sekvencie primerov použitých pre prípravu oligo-sondy špecifickej pre B chromozóm

Primer	Sekvencie (5'– 3')
ZmB_1F	TTAGAGTTTGGGTTT TAGGATTTATGGTTT
ZmB_1R	TCCTGAACCATAACCCTAAACCATAAATCCTA
ZmB_2F	TTAGGGTTTATGATTTAGGGTTTAGGGTCT
ZmB_2R	AACACAAGACCCTAGACCCTAAACCCTA
ZmB_3F	TACAATTTGCTCATTGCTAGCTTATAAACA
ZmB_3R	CAAGCCCTAACCAGTATTGTTTATAAGCTAGC
ZmB_4F	TTTCAAATGTTTATTGGTTATGGACATCAA
ZmB_4R	GTGGCCACAACTTTCATTGATGTCCATAACC
ZmB_5F	AGGAAATTACATGACAATTTGCTCATTGCC
ZmB_5R	AGTATTGTTTACAGTCTGGCAATGAGCAAATT
ZmB_6F	TGTTTGGGCCTGTCCTATAGCGTTTATGTT
ZmB_6R	GCAAACCTCCAGACAACATAAACGCTATA
ZmB_7F	AATTGTTTGGGTTAAATTTACTATGGGTT
ZmB_7R	GAATGTGATTTGCGTCCAACCCATAGTAAAAT
ZmB_8F	AAAAGTCCATGCGTCAGCCTTCAGAACTTA
ZmB_8R	GAACCCAAAACCCTAAGTTCTGAAGGCT

Jednotlivé oligonukleotidy boli značené pomocou PCR reakcie. Reakčná zmes obsahovala zmes neznačených nukleotidov (dATP, dCTP, dGTP každý o koncentrácii 10 mM, dTTP o koncentrácii 2 mM), značený nukleotid tetramethyl-rodamine-5dUTP o koncentrácii 1 mM, F+R primery každý o koncentrácii 0,5 µM, 1 U *Taq* DNA polymerázy,

1x koncentrovaný pufr pre *Taq* polymerázu a vodu do celkového objemu 25 µl. Amplifikácia produktov prebiehala za nasledujúcich podmienok (tab. 4):

**Tabuľka 4** Podmienky PCR reakcie pre prípravu B-špecifickej oligo-sondy

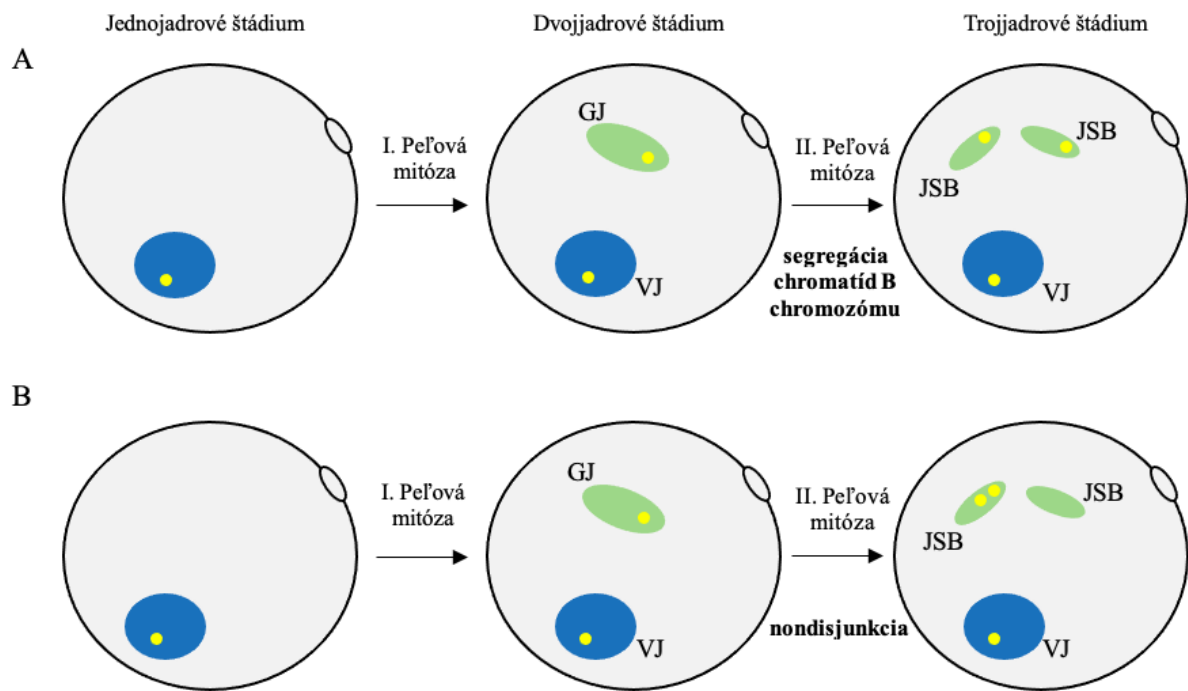
Proces	Teplota [°C]	Čas	Počet cyklov
Úvodná denaturácia	94	5 min	
Denaturácia	94	10 s	
Nasadanie primerov	40	10 s	20
Extenzia	72	10 s	
Záverečná extenzia	72	5 min	

Jednotlivé značené oligonukleotidy sa zlúčili do jednej oligo-sondy ZmB, ktorá následne slúžila pre potrebu vizualizácie B chromozómu v jadrách peľových zŕn v rámci fluorescenčnej *in situ* hybridizácie.

#### 4.4.6 Fluorescenčná *in situ* hybridizácia na frakciách peľových zŕn

Výskyt nondisjunkcie B chromozómu bol stanovený pomocou hybridizácie B-špecifickej sondy na peľových jadrách v zrelom peľi. Z frakcie zafixovaných peľových zŕn sa odobral alikvot o objeme 20 µl, odstránil sa 70% ethanol a následne sa pridal hybridizačný mix. Mix na jeden alikvot obsahoval 5 µl 4x hybridizačného pufru, 4 µl značenej oligo-sondy ZmB, 10 µl formamidu a deionizovanú vodu do 20 µl. Vzorky peľu s hybridizačným mixom boli denaturované po dobu 15 minút pri teplote 80 °C. Hybridizácia sondy prebiehala pri teplote 37 °C cez noc. Nenaviazané sondy boli po hybridizácii dvakrát krátko premyté v 2x SSC pufru. Pufr bol odstránený, k peľovej pelete sa pridalo montovacie médium s DAPI. Peľ bol prenesený na sklíčko a prekrytý krycím sklom. Do vyhodnotenia boli preparáty skladované pri teplote 4 °C. Signály sa vyhodnotili pomocou fluorescenčného mikroskopu Axio Imager Z.2 (Carl Zeiss) a snímky boli vyhotovené pomocou CCD kamery v softwari Andor iQ 3.6.3. Následná úprava snímok prebiehala pomocou softwaru Imaris 9.2 (Bitplane, Oxford Instruments).

Nondisjunkcia B chromozómu bola detegovaná na základe distribúcie B chromozómov v jadrách zreých peľových zŕn. V prípade, že k nondisjunkcii nedošlo, boli B chromozómy prítomné vo všetkých jadrách, v prípade nondisjunkcie bol B chromozóm obsiahnutý iba v jednej zo spermatických buniek (obr. 9).



**Obrázok 9** Schéma očakávanej distribúcie B chromozómu v priebehu mitotických delení peľového zrna. A – normálny priebeh segregácie chromatíd B chromozómu (žltá) počas druhej peľovej mitózy, výsledkom je prítomnosť B chromozómu vo všetkých jadrách, B – výskyt nondisjunkcie B chromozómu v druhej peľovej mitóze, B chromozóm je prítomný vo vegetatívnom jadre (VJ) (modro) a v jednom jadre spermatocytu (JSB) (zeleno)



## 5 VÝSLEDKY

### 5.1.1 Príprava biologického materiálu

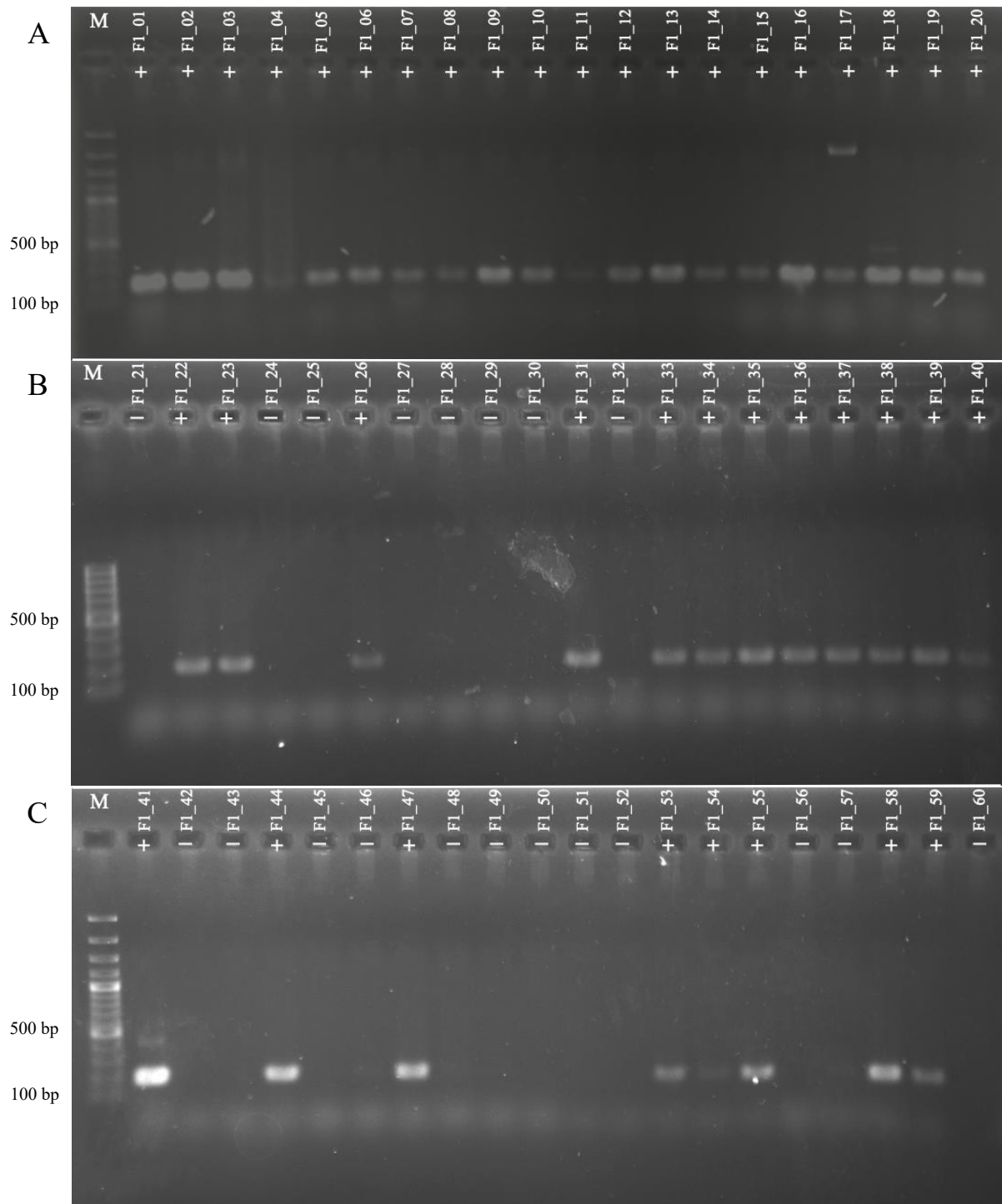
Za účelom stanovenia frekvencie nondisjunkcie B chromozómu boli vytvorení kríženci dvoch línií kukurice siatej – B73US nesúca 2 B chromozómy a B104 bez prítomnosti B chromozómov. Celkom bol peľ z 10 B73US rastlín použitý pre opelenie palíc na 8 B104 rastlinách. Kríženie bolo úspešné a jeho výsledkom bol zisk 25 palíc, ktorých semená mali hybridný pôvod. Tieto semená predstavovali vstupný biologický materiál pre analýzu nondisjunkcie B chromozómu v získaných krížencoch a v ďalšom roku boli pestovaní pre zber peľových frakcií.

### 5.1.2 Selekcia B-pozitívnych semenáčikov kukurice siatej *Zea mays*

Vďaka nepravidelnému prenosu museli byť potomkovia najskôr otestovaní na prítomnosť B chromozómu. Selekcia B-pozitívnych semenáčikov krížencov B73US x B104 bola vykonaná pomocou metódy Direct PCR. Ako selekčný marker bol použitý existujúci marker B008 navrhnutý na génovú sekvenciu kódovanú na B chromozóme.

Pre selekciu boli vybrané tri palice s hybridnými semenami a z každej sa zobralo 20 semien, v ktorých sa vykonala analýza. Jednotlivé semená reprezentovali potomstvo F1 generácie pochádzajúce z troch rôznych krížení. Prítomnosť B chromozómu sa tak otestovala u 60 semenáčikov.

Z celkového počtu 60 semien bol PCR produkt detegovaný u 40 semien na základe čoho boli vyhodnotené ako B-pozitívne (obr. 10 A–C). Tieto semenáčky boli zasadené a pestované v skleníku. U zvyšných 20 semien k amplifikácii PCR produktu nedošlo, čo značí neprítomnosť B chromozómov (obr. 10 B–C). Tieto semenáčky boli z analýzy vyradené.



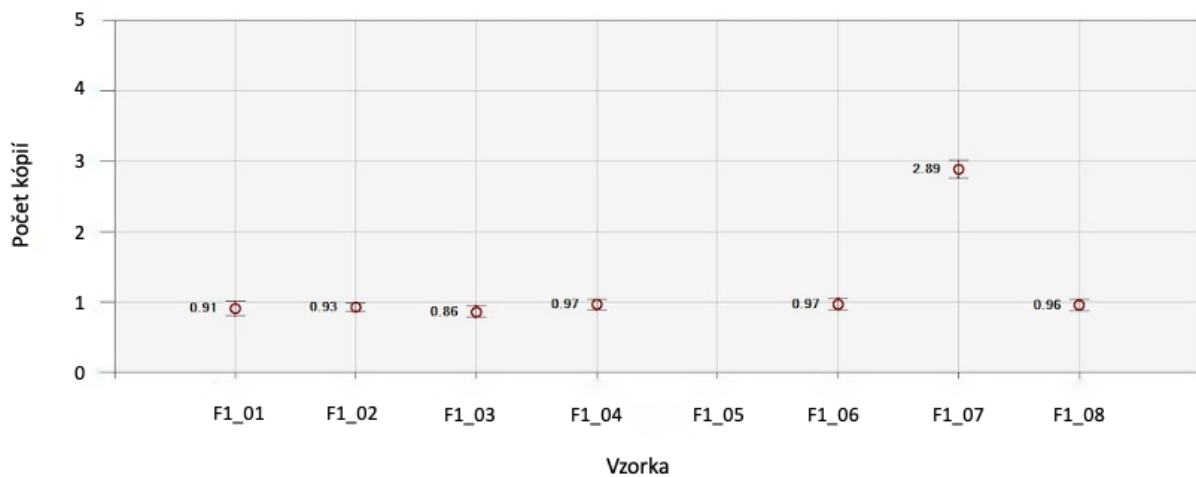
**Obrázok 10** A–C Produkty PCR amplifikácie B-špecifickej oblasti B chromozómu semenáčikov kukurice siatej *Zea mays* hybridnej línie B73US x B104. M – GeneRuler 100 bp DNA Ladder.

### 5.1.3 Stanovenie počtu B chromozómov v B-pozitívnych rastlinách

U rastlín nesúcich B chromozóm bol pre ďalšie účely stanovený počet kópií B chromozómu. Stanovenie počtu kópií B chromozómov bolo prevedené metódou droplet-digital PCR. Ako templát v reakcii slúžila genómová DNA vyizolovaná z B-pozitívnych jedincov získaných v sekcii 5.1.2. DNA bola izolovaná z 39 jedincov z celkového počtu 40. U jednej rastliny nebolo možné DNA izolovať z dôvodu jej uhynutia počas pestovania v skleníku.

Vyhodnotenie počtu B chromozómov v jednotlivých rastlinách prebiehalo pomocou softwaru QuantaSoft v. 1.7.4 (Bio-Rad) za použitia ‘copy number variation’ protokolu. Protokol je navrhnutý na kvantifikáciu a porovnanie počtu kópií cieľového génu s počtom kópií referenčného génu o známom počte.

Analýza bola vykonaná na 39 B-pozitívnych rastlinách. Počet B chromozómov sa stanovil u 37 jedincov. U 36 z nich sa zistila prítomnosť jedného B chromozómu, u jednej rastliny sa určila prítomnosť B chromozómov v počte troch kópií (obr. 11). U dvoch rastlín nebolo možné stanoviť počet B chromozómov z dôvodu zlyhania mechaniky v prístroji QX200 Droplet Generator (Bio-Rad) v priebehu generovania kvapiek. Pre účely ďalšieho experimentu sa tak vybralo 36 jedincov, nesúcich v karyotype jeden B chromozóm, tí sa zasadili na pole a nechali sa vyrásť do štádia kvitnutia. Traja jedinci boli z analýzy vyradení.

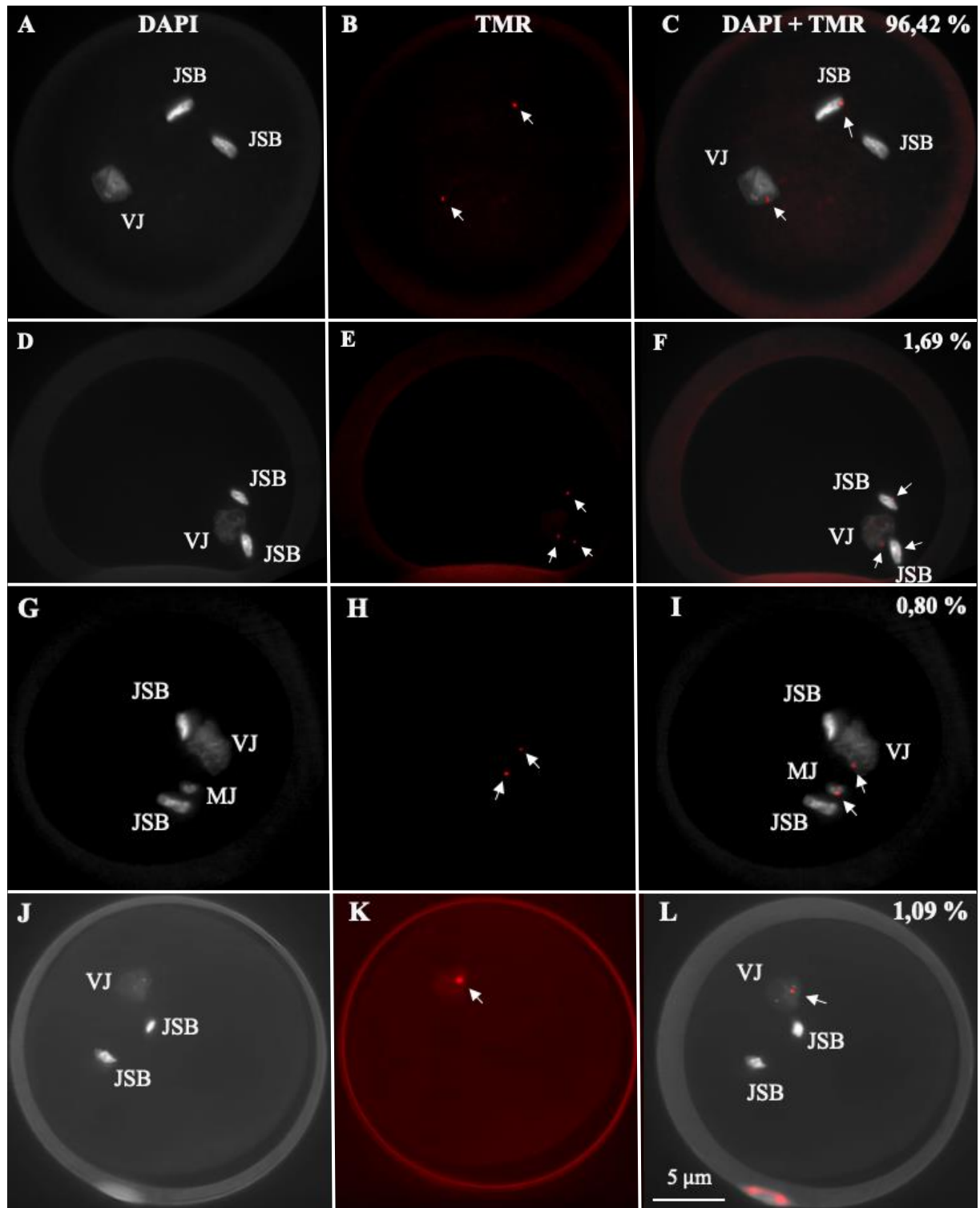


**Obrázok 11** Príklad vyhodnotenia počtu kópií B chromozómu na vybranom sete kukurice sietej v hybridnej línii B73US x B104 za využitia ddPCR. Výsledné hodnoty počtu B chromozómov (osa Y) vo vzorkách (osa X) sú založené na ‘copy number variation’ meraní každej jamky ddPCR s viac ako 10 000 kvapôčkami. Chybové úsečky označujú Poissonov 95% interval spoľahlivosti pre každé meranie počtu kópií.

#### 5.1.4 Detekcia nondisjunkcie B chromozómu v peľových zrnách

Na vizualizáciu B chromozómov bola využitá metóda fluorescenčnej *in situ* hybridizácie na zreľých peľových zrnách. Distribúcia B chromozómov bola stanovená na základe signálu zo sondy, ktorá cielila na špecifickú repetíciu ZmB v oblasti centroméry B chromozómu.

Z celkových 36 1B rastlín hybridnej línie B73US x B104 sa do štádia kvitnutia dopestovalo 12 z nich a v rámci FISH sa tak analyzovalo 12 peľových frakcií, pričom každá frakcia pochádzala z jedného jedinca. Frakcie obsahovali zmes +B:0B peľových zrn v pomere 50:50 ako výsledok pravidelného prenosu meiózou u 1B rastlín. Pre stanovenie frekvencie nondisjunkcie sa v jednotlivých frakciách analyzovalo vždy 100 peľových zrn, ktoré boli nositeľmi B chromozómov (detegoval sa v nich fluorescenčný signál). Peľové zrná bez B chromozómu (bez signálu) boli zo štatistiky vyradené. Celkovo bolo vyhodnotených 1 200 peľových zrn z 12 frakcií. U 1 157 peľových zrn boli pozorované 2 B-špecifické signály – jeden vo vegetatívnom jadre a druhý v jadre spermatickej bunky. V týchto peľových zrnách došlo k nondisjunkcii a frekvencia nondisjunkcie bola stanovená na 96,42 % (obr. 12 A–C; tab. 5). Výskyt signálov vo všetkých troch jadrách bol identifikovaný u 20 peľových zrn (1,69 %) (obr. 12 D–F; tab.5). Okrem očakávanej distribúcie B chromozómu bol v niekoľkých prípadoch detegovaný výskyt abnormalít. V jednej peľovej frakcii boli detegované mikrojadrá obsahujúce B chromozóm, pričom počet zrn v tomto alikvot s mikrojadrom bol 10 (0,80 %) (obr. 12 G–I; tab. 5). Prítomnosť jedného signálu výhradne vo vegetatívnom jadre sa pozorovala u 13 peľových zrn (1,09 %) (obr. 12 J–L; tab. 5). Táto distribúcia odpovedá nondisjunkcii B chromozómu počas prvej peľovej mitózy.



**Obrázok 12** Vizualizácia B chromozómu pomocou B-špecifickej sondy ZmB a jej *in situ* lokalizácia na peľových zrnách v trojjadrovom štádiu *in vitro*. Vegetatívne jadro (VJ), mikrojadro (MJ), jadrá spermatických buniek (JSB) boli farbené DAPI (šedo). Šípky označujú signály repetície ZmB v oblasti centroméry B chromozómu, značené TMR (červeno). A–C distribúcia B chromozómu po nondisjunkcii behom druhej peľovej mitózy, D–F výsledok disjunkcie B chromozómu, G–I abnormálna distribúcia s elimináciou B chromozómu do mikrojadra, J–L výsledok atypickej nondisjunkcie B chromozómu behom prvej peľovej mitózy. Mierka = 5 µm

**Tabuľka 5** Distribúcia B-špecifickej sondy ZmB v jadrách zreých peľových zrn

	Počet signálov repetície ZmB v jadrách:				Počet peľových zrn
	1 MJ + 1VJ	1 VJ	2 JSB + 1 VJ	1 JSB + 1 VJ	
Frakcia 1	–	1	4	95	100
Frakcia 2	–	1	–	99	100
Frakcia 3	–	–	1	99	100
Frakcia 4	–	–	1	99	100
Frakcia 5	–	–	1	99	100
Frakcia 6	–	–	2	98	100
Frakcia 7	–	1	2	97	100
Frakcia 8	–	1	–	99	100
Frakcia 9	–	–	3	97	100
Frakcia 10	–	3	4	93	100
Frakcia 11	–	5	–	95	100
Frakcia 12	10	1	2	87	100
<b>Celkovo:</b>	<b>10</b>	<b>13</b>	<b>20</b>	<b>1 157</b>	<b>1 200</b>
Frekvencia prítomnosti signálov:	0,80 %	1,09%	1,69 %	96,42 %	

MJ = mikrojadro; VJ = vegetatívne jadro; JSB = jadro spermatocytickej bunky

## 6 DISKUSIA

B chromozómy sa vyznačujú nemendelovskou dedičnosťou, v dôsledku ktorej je ich prenos nepravidelný (Jones, 1975). Počas svojej existencie sa im podarilo vytvoriť si niekoľko stratégií, umožňujúce im pretrvávať v populácii. Jednou z nich je mechanizmus nondisjunkcie, ktorou sa zaoberá aj táto diplomovaná práca.

Predmetom práce bola nondisjunkcia B chromozómu u kukurici siatej *Zea mays*, ktorá nastáva počas dozrievania samčích gametofytov – peľových zrn. Kukurica predstavuje doposiaľ jediný známy druh, u ktorého tento proces nastáva v druhej peľovej mitóze, kedy sa generatívne jadro delí na dve spermatické bunky, výsledkom čoho je tak nerovnomerný výskyt chromozómov v týchto bunkách (Roman, 1947).

Cieľom práce bolo stanoviť frekvenciu nondisjunkcie B chromozómu kukurice siatej u hybridnej línie B73US x B104 s 1 B chromozómom v štádiu zrelého trojjadrového peľu. Analýza 1 200 peľových zrn odhalila, že frekvencia akumulácie B chromozómu v jednej spermatickej bunke v hybridnej línii je 96,42 %.

Predošlé analýzy stanovili u inbrednej línie B73US kukurici mieru nondisjunkcie takmer na 100 % (Roman, 1947; Carlson, 1969). Zo štúdií taktiež vyplýva, že B chromozóm podlieha nondisjunkcii hlavne v priebehu druhej peľovej mitózy, avšak vyskytuje sa aj nízka frekvencia nondisjunkcie už počas prvej peľovej mitózy. Štúdie založené na analýze fluorescenčnej *in situ* hybridizácii zistili, že v tomto prípade sa B chromozómy akumulujú vo vegetatívnom jadre (Shi *et al.*, 1996; Rusche *et al.*, 1997). V tejto práci sa pri analýze peľových zrn nadpočetný chromozóm línie B73US x B104 akumuloval vo vegetatívnom jadre v 1,09 % peľových zrn. Vzhľadom na to, že vegetatívne jadro sa nezúčastňuje procesu oplodnenia, akumulácia B chromozómov v tomto jadre vedie k ich zániku a do ďalšej generácie sa tak nepresunú.

V priebehu pozorovania nondisjunkcie B chromozómu sa podľa modelu očakávala prítomnosť dvoch B-špecifických signálov v jednej spermatickej bunke (obr. 9). Avšak v tomto prípade bol vždy pozorovaný iba jeden signál. Tento jav je s najväčšou pravdepodobnosťou spôsobený lokalizáciou B-špecifickej repetície ZmB v oblasti centroméry. Tu podľa posledných štúdií dochádza k nedoreplikovaniu časti sekvencie centroméry B chromozómov kukurice, čo hrá zásadnú úlohu v jeho nondisjunkcii (osobná komunikácia s J.A. Birchlerom). Signály z jednotlivých chromatíd B chromozómov sa teda nachádzajú tak blízko u seba, že ich pri danom rozlíšení nie je možné odlíšiť a zobrazujú sa ako jeden.

Podobne ako v diplomovej práci otázka frekvencie nondisjunkcie bola predmetom aj iných štúdií. Údajov však neexistuje mnoho, no i napriek tomu bol proces analyzovaný napríklad u raži *Secale cereale*, kostravy *Festuca pratensis* alebo mnohoštetu *Aegilops speltoides* (Niwa a Sakamoto, 1995; Wu *et al.*, 2019; Ebrahimzadegan *et al.*, 2023). U týchto druhov podliehajú B chromozómy nondisjunkcii už v prvej peľovej mitóze. Pri druhom mitotickom delení dochádza k normálnej segregácii chromatíd a výsledkom je tak vznik identických spermatických buniek s rovnakým počtom B chromozómov (Hasegawa, 1934). U mnohoštetu *Aegilops speltoides* sa pomocou využitia prietokovej cytometrie zistila akumulácia chromozómov v generatívnych jadrách a to s početnosťou 93 % (Wu *et al.*, 2019). U kostravy *Festuca pratensis* sa použil podobný princíp a v tomto prípade viac ako 82 % generatívnych jadier vykazovalo akumuláciu chromozómov (Ebrahimzadegan *et al.*, 2023). Podobne aj u raži *Secale cereale* je nondisjunkcia pomerne vysoko účinným procesom. V rámci skorších štúdií bolo analyzovaných niekoľko populácií z rôznych oblastí ako je Turecko (93 %), Irán (92 %), Južná Kórea (93 %), Japonsko (96 %) a Čína (88 %) (Niwa a Sakamoto, 1995; Niwa a Sakamoto, 1996). V pakistanskej populácii raži *Secale segetale* bola akumulácia nadpočetného chromozómu pozorovaná približne v 95 % (Niwa a Sakamoto, 1996). Hoci štúdie zahrňovali populácie z rôznych geografických polôh, vzorec akumulácie sa i napriek tomu od seba líšil len veľmi málo. Obe štúdie autorov Niwa a Sakamoto však boli zamerané na sledovanie nondisjunkcie v populáciách, v ktorých sa B chromozóm vyskytuje prirodzene. V rámci iných štúdií bol B chromozóm zavedený do karyotypu planého druhu raži *Secale vavilovii* a hexaploidnej pšenice *Triticum aestivum* (Lindström, 1965; Puertas *et al.*, 1985; Niwa *et al.*, 1997). Miera akumulácie B chromozómu u týchto krížencov bola podobná ako u raži *Secale cereale* (Puertas *et al.*, 1985; Niwa *et al.*, 1997). V diplomovej práci bola analyzovaná akumulácia B chromozómu u krížencov línie kukurice B73US x B104 a na základe výsledkov možno tvrdiť, že miera akumulácie B chromozómu u týchto krížencov je podobná ako u inbrednej línie kukurice siatej B73US.

V tejto práci sa frekvencia nondisjunkcie B chromozómu kukurice siatej u línie B73US x B104 stanovila v zreľých peľových zrnách za využitia metódy fluorescenčnej *in situ* hybridizácie. Peľové zrná sa vyznačujú inertnou povahou obalu, preto skoršie štúdie využívali pre FISH analýzy peľových jadier ich pletivové rezy (Houben *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2019). Tento prístup je však časovo náročný a prácny. Dochádza k narušeniu celistvosti samčieho gametofytu, čo má dopad na interpretáciu výsledných dát. V rámci tejto práce bola FISH prevedená na frakciách peľových zrn a bez narušenia integrity jednotlivých jadier. To bolo umožnené na základe použitia B-špecifickej oligo-sondy odvodennej od B-špecifickej repetície



ZmB (Blavet *et al.*, 2021). Tá je schopná jednoduchšie prenikať cez klíčiaci pór peľového zrna, čo umožní analýzu na neporušených peľových jadrách. Jedná sa o relatívne nový prístup vizualizácie B chromozómu kukurice, ktorý bol zatiaľ použitý iba v analogickej štúdiu u kostravy *Festuca pratensis* (Ebrahimzadegan *et al.*, 2023).

Okrem cytogenetického prístupu sa k stanoveniu frekvencie nondisjunkcie B chromozómov využíva aj prietoková cytometria. Tento prístup bol využitý u mnohoštetu *Aegilops speltoides* a kostravy *Festuca pratensis*. Autori týchto štúdií paralelne použili prietokovú cytometriu a FISH a výsledky porovnali. V oboch prípadoch sa miera akumulácie líšila len minimálne (Wu *et al.*, 2019; Ebrahimzadegan *et al.*, 2023). Cytogenetická analýza ale oproti cytometrickému prístupu poskytuje jednu výhodu, a tou je detekcia mikrojadier. Tie pri analýze u mnohoštetu *Aegilops speltoides* pomocou prietokovej cytometrie nebolo možné detegovať (Wu *et al.*, 2019). Vzhľadom na to, že táto diplomová práca je založená na FISH analýze, mikrojadrá pozorované boli a to celkovo v 0,80 % peľových zrn. Výskyt mikrojadier je však obmedzený a ich samotná tvorba je závislá od jedinca a pravdepodobne ovplyvnená fyziologickými podmienkami. B chromozómy nachádzajúce sa v mikrojadrách podstupujú proces eliminácie, dôsledkom čoho sa tak znižuje ich frekvencia prenosu. Proces eliminácie B chromozómu v peľových zrnách je analogický tomu prebiehajúcemu v somatických pletivách u iných druhov, napr. ciroku *Sorghum purpureosericeum* a mnohoštetu *Aegilops speltoides*, kde je však pevnou súčasťou vývojového programu diferenciácie rastlinných pletív (Karafiátová *et al.*, v prípade; Ruban *et al.*, 2020).

## 7 ZÁVER

Cieľom tejto diplomovej práce bolo stanoviť frekvenciu nondisjunkcie B chromozómu u hybridnej línie kukurice siatej B73US x B104 nesúci vo svojom karyotype 1 B chromozóm. Analýza bola vykonaná na frakciách peľových zŕn v trojjadrovom štádiu. Na vizualizáciu nadpočetných chromozómov v jednotlivých jadrách bola využitá metóda fluorescenčnej *in situ* hybridizácie s použitím B-špecifickej oligo-sondy odvodenej od B-špecifickej repetície ZmB. Celkovo bolo analyzovaných 1 200 peľových zŕn z 12 rôznych peľových frakcií. U 96,42 % peľových zŕn bol signál detegovaný vo vegetatívnom jadre a v jednej spermatickej bunke, čo značí priebeh nondisjunkcie počas druhej peľovej mitózy. Normálny priebeh segregácie chromatíd a teda prítomnosť signálu vo všetkých troch jadrách sa detegoval u 1,69 % zŕn. Vo zvyšných peľových zrnách bol pozorovaný výskyt abnormálneho chovania B chromozómu. U 1,09 % peľových zŕn bol signál iba vo vegetatívnom jadre, v tomto prípade nondisjunkcia B chromozómu prebehla už počas prvej peľovej mitózy. V jednej peľovej frakcii sa pozoroval výskyt mikrojadier, percentuálne zastúpenie bolo 0,80 %.

Na základe výsledkov diplomovej práce je možné tvrdiť, že akumulácia B chromozómu u hybridnej línie B73US x B104 vykazuje podobný charakter ako u inbrednej línie B73US, u ktorej bola frekvencia nondisjunkcie stanovená na takmer 100 %.

## 8 LITERATURA

- Abendroth L.J., Elmore R.W., Boyer M.J. and Marlay S.K., (2011): Corn Growth and Development. PMR 1009. Ames, IA: Iowa State University Extension, PMR 1009, 49.
- Ahmad S.F. and Martins C., (2019): The Modern View of B Chromosomes Under the Impact of High Scale Omics Analyses Cells. 2019,8(2):156.
- Ahmad S.F., Jehangir M., Cardoso A.L., Wolf I.R., Margarido V.P., Cabral-de-Mello D.C., O'Neill R., Valente G.T. and Martins C., (2020): B chromosomes of multiple species have intense evolutionary dynamics and accumulated genes related to important biological processes. BMC Genomics. 2020,21(1):656.
- Alfenito M.R. and Birchler J.A., (1993): Molecular characterization of a maize B chromosome centric sequence. Genetics. 1993,135(2):589–597.
- Ananiev E.V., Phillips R.L. and Rines H.W., (1998): Chromosome-specific molecular organization of maize (*Zea mays* L.) centromeric regions. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1998,95(22):13073–13078.
- Auger D. L., Newton K. J., and Birchler J.A., (2001): Nuclear gene dosage effects upon the expression of maize mitochondrial genes. Genetics. 2001,157(4):1711–1721.
- Banaei-Moghaddam A.M., Schubert V., Kumke K., Weiß O., Klemme S., Nagaki K., Macas J., González-Sánchez M., Heredia V., Gómez-Revilla D., González-García M., Vega J.M., Puertas M.J. and Houben A., (2012): Nondisjunction in favor of a chromosome: the mechanism of rye B chromosome drive during pollen mitosis. The Plant Cell. 2012,24(10):4124–4134.
- Battaglia E., (1964): Cytogenetics of B-Chromosomes. Caryologia. 1964,17(1):245–299.
- Beckett J.B., (1991): Cytogenetic, genetic and plant breeding applications of B–A translocations in maize. In Gupta PK, Tsuchiya (eds) Chromosome engineering in plants: genetics, Breeding, Evolution, Vol 2A, Elsevier, Amsterdam, 493–529.
- Begcy, K. and Dresselhaus T., (2017): Tracking maize pollen development by the Leaf Collar Method. Plant Reproduction. 2017,30(4):171–178.
- Beliveau B. J., Kishi Y.J., Nir G., Sasaki H.M., Saka S.K., Nguyen S.C., Wu C. and Yin P., (2018): OligoMiner provides a rapid, flexible environment for the design of genome-scale oligonucleotide in situ hybridization probes. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2018,115(10):2183–2192.
- Beukeboom L.W., (1994): Bewildering Bs: an impression of the 1st B-Chromosome Conference. Heredity. 1994,73:328–336.

- Birchler J.A. and Yang H., (2021): The supernumerary B chromosome of maize: drive and genomic conflict. *Open Biology*. 2021,11:210197
- Blavet N., Yang H., Su H., Solanský P., Douglas R.N., Karafiátová M., Šimková L., Zhang J., Liu Y., Hou J., Shi X., Chen C., El-Walid M., McCaw M.E., Albert P.S., Gao Z., Zhao C., Ben-Zvi G., Glick L., Kol G., Shi J., Vrána J., Šimková H., Lamb J.C., Newton K., Dawe R.K., Doležel J., Ji T., Baruch K., Cheng J., Han F., Birchler J.A. and 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*. 2021, 118(23):e2104254118.
- Blunden R., Wilkes T.J., Forster J.W., Jimenez M.M., Sandery M.J., Karp A. and Jones R.N., (1993): Identification of the E3900 family, a second family of rye chromosome B-specific repeated sequences. *Genome*. 1993,36,:706–711.
- Bonnett O.T., (1954): The Inflorescences of Maize. *Science*. 1945,120(3107):77–87.
- Bougourd S.M. and Parker J.S., (1979): The B-chromosome System of *Allium schoneoprasum*. *Chromosoma (Berl.)*. 1979,75:369–383.
- Camacho J.P., (2005): B Chromosomes. *The Evolution of the Genome*. Elsevier 223–286.
- Camacho J.P., Sharbel T.F. and Beukeboom L.W., (2000): B-chromosome evolution. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*. 2000,355(1394):163–178.
- Carchilan M., Delgado M., Ribeiro T., Costa-Nunes P., Caperta A., Morais-Cecílio L., Jones R.N., Viegas W. and Houben A., (2007): Transcriptionally Active Heterochromatin in Rye B chromosomes. *The Plant Cell*. 2007,19(6):1738–1749.
- Carlson W.R., (1969): Factors affecting preferential fertilization in maize. *Genetics*. 1969,62(3):543–554.
- Carlson W.R., (1978): The chromosome of corn. *Annual Review of Genetics*. 1978,12(1):5–23.
- Carlson W.R., (2009): The B Chromosome of Maize. In: Bennetzen, J.L., Hake, S. (eds) *Handbook of Maize*. Springer, New York, NY.
- Coe E. H., Neuffer M.G. and Hoisington D.A., (1988): The Genetics of Corn. In: Sprague, G. F. a J. W. Dudley, ed. *Corn and Corn Improvement*. Madison, WI, USA: American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America. 1988,81–258.
- Castro J.P.; Moura M.O., Moreira-Filho O., Shibatta O.A., Santos M.H., Nogaroto V., Vicari M.R., Almeida M.C. and Artoni R.F., (2015): Diversity of the *Astyanax scabripinnis*

- species complex (*Teleostei: Characidae*) in the Atlantic Forest, Brazil: Species limits and evolutionary inferences. *Rev. Fish Biol. Fish.* 2015,25(1):231–244.
- Cook B.; Pengelly. B, Brown S., Donnelly J., Eagles D., Franco A., Hanson J., Mullen B., Partridge I., Peters M. and Schultze-Kraft R., (2005): Tropical Forages: an interactive selection tool. Web Tool. CSIRO, DPI&F(Qld), CIAT and ILRI, Brisbane, Australia.
- Chang M.T. and Neuffer MG., (1989): Maize microsporogenesis. *Genome.* 1989,32:232–244.
- Chen J., Birchler J.A. and Houben A., (2022): The non-Mendelian behavior of plant B chromosomes. *Chromosome Research.* 2022,30(2–3):229–239.
- Cheng Y.M., and Lin B., (2004): Molecular organization of large fragments in the maize B chromosome: indication of a novel repeat. *Genetics.* 2004,166(4):1947–1961.
- Doebley J., (2004): The Genetics of Maize Evolution. *Annual Review of Genetics.* 2004,38(1): 37–59.
- Ebrahimzadegan R., Fuchs J., Chen J., Schubert V., Meister A., Houben A. and Mirzaghaderi G., (2023): Meiotic segregation and post-meiotic drive of the *Festuca pratensis* B chromosome. *Chromosome Research.* 2023,31(3):26
- Endo T.R., Nasuda S., Jones R.N., Dou Q., Akahori A., Wakimoto M., Tanaka H., Niwa K. and Tsujimoto H., (2008): Dissection of rye B chromosomes, and nondisjunction properties of the dissected segments in a common wheat background. *Genes & Genetic Systems.* 2008,83(1):23–30.
- Esau K., (1977): The Stem: Primary state of growth. Chapter 16. Inc., Anatomy of seed plants. Edition 2. John Wiley & Sons, Inc. New York. 1977:257–294.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations; FAO. [online] [navštívené 17.11.2023] [www.fao.org](http://www.fao.org)
- Gotoh K. (1924): Uuml;ber die Chromosomenzahl von *Secale cereale*, L. *Shokubutsugaku Zasshi.* 1924,38:135–152.
- Gwirtz J.A., and Garcia-Casal M.N., (2013): Processing maize flour and corn meal food products. *Ann N Y Acad Sci.* 2013,12(1):66–75.
- Gutiérrez M.L., Rodríguez-González R., Fuentes I., Gálvez-Prada F., Kovařík A. and Garcia S., (2023): First Update to B-Chrom: A Database on B-Chromosomes. In: Garcia, S., Nualart, N. (eds) *Plant Genomic and Cytogenetic Databases. Methods in Molecular Biology*, vol 2703. Humana, New York, NY. 2023:227–236.
- Hasegawa N., (1934): A cytological Study on 8-Chromosome Rye. *Cytologia.* 1934,6(1):68–77
- Herbár, bylinkáreň, popis rastlín [online] [navštívené 3.2.2024] <https://herbar.albumy.biz>

- Hewitt G.M., (1976): Meiotic drive for B-chromosomes in the primary oocytes of *Myrmeleotettix maculatus* (Orthoptera: Acrididae). *Chromosoma*. 1976,56(4):381–391.
- Hong Z.J, Xiao J.X, Peng S.F, Lin Y.P. and Cheng Y.M.,(2020): Novel B-chromosome-specific transcriptionally active sequences are present throughout the maize B chromosome. *Mol Genet Genomics*. 2020,295(2):313–325.
- Houben A., (2017): B Chromosomes - A Matter of Chromosome Drive. *Frontiers Plant Science*. 2017,8:210.
- Houben A., Banaei-Moghaddam A.M., Klemme S. and Timmis J.N., (2014): Evolution and biology of supernumerary B chromosomes. *Cell. Mol. Life Sci*. 2014,71(3):467–478.
- Houben A., Kumke K., Nagaki K. and Hause G., (2011): CENH3 distribution and differential chromatin modifications during pollen development in rye (*Secale cereale* L.). *Chromosome Research*. 2011,19(4):471–480.
- Hsu F.C., Wang C.J., Chen C.M., Hu H.Y. and Chen C.C., (2003): Molecular characterization of a family of tandemly repeated DNA sequences, TR-1, in heterochromatic knobs of maize and its relatives. *Genetics*. 2003,164(3):1087-97.
- Huang W., Yan D.U., Zhao X. and Jin W., (2016): B chromosome contains active genes and impacts the transcription of A chromosomes in maize (*Zea mays* L.). *BMC Plant Biology*. 2016,16,88.
- Jin W., Lamb J.C., Vega J.M., Dawe R.K., Birchler, J.A. and Jiang J., (2005): Molecular and functional dissection of the maize B chromosome centromere. *Plant Cell*. 2005,17(5):1412–1423.
- Jones R.N., (1975): B-chromosome systems in flowering plants and animal species. *Int Rev Cytol*. 1975,40:1–100.
- Jones R.N., (1976): Genome organisation in higher plants. *Chromosomes Today*. 1976,5:117–130.
- Jones R.N., (1991): Cytogenetics of B-Chromosomes in Crops. In: Gupta PK, Tsuchiya T, editors. *Chromosome engineering in plants: genetics, breeding, evolution*. b. Amsterdam: Elsevier; 1991:141–175.
- Jones R.N., (1995): B chromosomes in plants. *New Phytologist*. 1995,131:411–434.
- Jones R.N. and Rees H., (1982): B chromosomes. London: Academic Press; 1982.
- Jones R.N, Viegas W., Houben A., (2008): A century of B chromosomes in plants: so what? *Annals of Botany*. 2008,101(6):767–775.

- Ibrahim K.M., Shruti D., Peterson P.M. and Hosni H.A., (2018): Grasses of Mali. *Smithsonian Contributions to Botany*. 2018,108:146.
- Iltis H.H. and Doubly J.F., (1980): Taxonomy of *Zea (Gramineae)*. II Subspecific Categories in the *Zea mays* Complex and a generic Synopsis. *American Journal of Botany*. 1980, 67(6):994–1004.
- Karafiátová M., Bednářová M., Said M., Čížková J., Holušová K., Blavet N. and Bartoš J. (2021): The B chromosome of *Sorghum purpureosericeum* reveals the first pieces of its sequence. *Journal of Experimental Botany*. 2021,72(5):1606–1616.
- Karafiátová M., Bojdová T., Stejskalová M., Harnádková N., Kumar V., Houben A., Chen J., Doležalová A., Honys D. and Bartoš J., (in prep): Unraveling the unusual: Chromosome Elimination, Nondisjunction, and Extra Pollen Mitosis characterize the B chromosome in Wild *sorghum*. *The New Phytol*, in revisions.
- Klemme S., Banaei-moghaddam A.M., Macas J., Wicker T., Novák P. and Houben A., (2013): High-copy sequences reveal distinct evolution of the rye B chromosome. *New Phytologist*. 2013,199(2):550–558.
- Kozhuchov Z.A., (1933): Uber die Natur der Extrachromosomen bei *Zea mays* L.. *Planta*, 1933,19:91–116.
- Kuwada Y., (1925): On the number of chromosomes in maize. *Botanical Magazine Tokyo*. 1925,39:227–234.
- Lewis H., (1951): The origin of supernumerary chromosomes in natural populations of *Clarkia elegans*. *Evolution*. 1951,5(2):142–157.
- Langer-Safer P.R., Levine M. and Ward D.C., (1982): Immunological method for mapping genes on *Drosophila* polytene chromosomes. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*. 1982,97(14):4281–4385.
- Lamb J.C., Kato A. and Birchler, J.A., (2005): Sequences associated with A chromosome centromeres are present throughout the maize B chromosome. *Chromosoma*. 2005,113(7): 337–349.
- Lamb J.C., Riddle N.C., Cheng Y.M., Theuri, J. and Birchler J.A., (2007): Localization and transcription of a retrotransposon-derived element on the maize B chromosome. *Chromosome Research*. 2007,15(3):383-398.
- Lin B-Y., (1978): Regional control of nondisjunction of the B chromosome in maize. *Genetics*. 1978,90(3):613–627.
- Lindström J. (1965): Transfer to wheat of accessory chromosomes from rye. *Hereditas*. 1965, 54(2):149–155.

- Lora J., María Herrero M. and Hormaza J.I., (2009): The coexistence of bicellular and tricellular pollen in *Annona cherimola* (*Annonaceae*): Implications for pollen evolution. *American Journal of Botany*. 2009,96(4):802–808 .
- Longley A.E., (1927): Supernumerary chromosomes in *Zea mays*. *Journal of Agricultural Research*. 1927,35:769–784.
- López-León M.D., Cabrero J. and Camacho J.P., (1991): Meiotic drive against an autosomal supernumerary segment promoted by the presence of a B chromosome in females of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Chromosoma*, 1991,100:282–287.
- Makunin A.I., Kichigin I.G., Larkin D.M., O'Brien P.C.M., Ferguson-Smith M.A., Yang F., Proskuryakova A.A., Vorobieva N.V., Chernyaeva E.N. and O'Brien S.J., (2016): Contrasting origin of B chromosomes in two cervids (Siberian roe deer and grey brocket deer) unravelled by chromosome-specific DNA sequencing. *BMC Genomics*. 2016,17: 618.
- Marques A., Klemme S. and Houben A., (2018): Evolution of Plant B Chromosome Enriched Sequences. *Genes (Basel)*. 2018,9(10):515.
- Martins M. M., Klemme S., Banaei-Moghaddam A. M., Blattner, F. R., Macas J., Schmutz T., Scholz U., Gundlach H., Wicker T., Šimková H., Novák P., Neumann P., Kubaláková M., Bauer E., Haseneyer G., Fuchs J., Doležel J., Stein N., Mayer K.F. and Houben A., (2012): Selfish supernumerary chromosome reveals its origin as a mosaic of host genome and organellar sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012,109(33):13343–13346.
- Matsuoka Y., Vigouroux Y., Goodman M.M., Sanchez J.G., Buckler E. and Doebley J., (2002): A single domestication for maize shown by multilocus microsatellite genotyping. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2002,99(9):6080–6084.
- McClintock B., (1933): The association of non-homologous parts of chromosomes in the mid-prophase of meiosis in *Zea mays*. *Z.Zellforsch.* 1933,19,:191–237.
- McClintock B., Kato T.A. and 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.
- McCormick S., (1993): Male Gametophyte Development. *Plant Cell*. 1993,(10):1265–1275.
- Mendelson D. and Zohary D., (1972): Behaviour and transmission of supernumerary chromosomes in *Aegilops speltoides*. *Heredity*. 1972,29(3):329–339.



- Milani D., Francisco J.R-R., Camacho J.P. and Cabral-de-Mello D.C., (2021): Out of patterns, the euchromatic B chromosome of the grasshopper *Abracris flavolineata* is not enriched in high-copy repeats *Heredity*. 2021,127(5):475–483.
- Murray B. G., (1984): The structure, meiotic behaviour and effects of B chromosomes in *Briza humilis* Bieb. (*Gramineae*). *Genetica*. 1984,63(3):213–219.
- Niwa K. and Sakamoto S., (1995): Origin of B chromosomes in cultivated rye. *Genome*. 1995,38(2):307–31.
- Niwa K. and Sakamoto S., (1996): Detection of B Chromosomes in Rye Collected from Pakistan and China\*. *Hereditas*. 1996,124(3):211–216.
- Niwa K., Horiuchi G. and Hirai Y., (1997): Production and Characterization of Common Wheat with B Chromosomes of Rye from Korea. *Hereditas*. 1997,126(2):139–146.
- Nur U., (1963): A mitotically unstable supernumerary chromosome with an accumulation mechanism in a grasshopper. *Chromosoma*, 1963,14(4):407–422.
- Page B.T., Wanous M.K. and Birchler J.A, (2001): Characterization of a Maize Chromosome 4 Centromeric Sequence: Evidence for an Evolutionary Relationship With the B Chromosome Centromere. *Genetics*, 2001,159(1):291–302.
- Paliwal R.L., and Hyde B.B., (1959): The association of a single B chromosome with male sterility in *Plantago coronopus*. *Am. J. Bot.* 1959,46:460–466.
- Peacock W.J., Dennis E.S., Rhoades M.M. and Pryor A.J., (1981): Highly repeated DNA sequence limited to knob heterochromatin in maize. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1981,78(7):4490–4494.
- Piperno D. R. and Flannery K.V., (2001): The earliest archaeological maize (*Zea mays* L.) from highland Mexico: New accelerator mass spectrometry dates and their implications . *Proceeding of the National Academy of Science*. 2001,98(4): 2101–2103.
- Puertas M., Romera F. and De la Peña A., (1985): Comparison of B chromosome effects on *Secale cereale* and *Secale vavilovii*. *Heredity*. 1985,55:222–234.
- Rajpal V.R., Sharma S., Sehgal D., Sharma P., Wadhwa N., Dhakate P., Chandra A., Thakur R.K., Deb S., Rao S.R., Mir B.A. and Raina S.N., (2023): Comprehending the dynamism of B chromosomes in their journey towards becoming unselfish. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2023,10:1072716.
- Ranum P., Peña-Rosas J.P. and Garcia-Casal M.N., (2014): Global maize production, utilization, and consumption. *Ann N Y Acad Sci*. 2014,1312(1):105–112.
- Randolph L.F., (1925): Chromosome numbers in *Zea mays* L.. Ithaca, N.Y., Cornell University.

- Randolph L.F., (1928): Types of supernumerary chromosomes in maize. *Anatomical Record*. 1928,41:102.
- Randolph L.F., (1941): Genetic Characteristics of the B Chromosomes in Maize. *Genetics*. 1941,26(6):608–631.
- Roman H., (1947): Mitotic nondisjunction in the case of interchanges involving the B-type chromosome in Maize. *Genetics*. 1947,32(4):391–409.
- Roman H., (1948): Directed Fertilization in Maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1948,34(2):36–2.
- Ruban A., Schmutzer T., Wu D.D., Fuchs J., Boudichevskaia A., Rubtsova M., Pistrick K., Melzer M., Himmelbach A., Schubert V., Scholz U. and Houben A., (2020): Supernumerary B chromosomes of *Aegilops speltoides* undergo precise elimination in roots early in embryo development. *Nature Communications*. 2020,11(1):2764.
- Rusche M.L., Mogensen H.L., Shi L., Keim P., Rougier M., Chaboud A. and Dumas C., (1997): B chromosome behavior in maize pollen as determined by a molecular probe. *Genetics*. 1997,147(4):1915–1921.
- Sandery M.J., Forster J.W., Blunden R. and Jones R.N., (1990): Identification of a family of repeated sequences on the rye B-chromosome. *Genome*. 1990,33(6):908–913.
- Sheridan W.F. and Auger D.L., (2006): Construction and Uses of New Compound B-A-A Maize Chromosome Translocations. *Genetics*. 2006,174(4):1755–1765.
- Shi L., Zhu T., Mogensen H.L. and Keim P., (1996): Sperm identification in maize by fluorescence *in situ* hybridization. *Plant Cell*. 1996,8(5): 815–821.
- Sieber V.K. and Murray B.G., (1981): Structural and numerical chromosomal polymorphism in natural populations of alopecurus (*Poaceae*). *Plant systematics and evolution*. 1981,139:121–136.
- Simpson M.G., (2019a): Plant Embryology. In: *Plant Systematics*. Elsevier. 2019:567–582.
- Simpson M.G., (2019b): Palynology. In: *Plant Systematics*. Elsevier. 2019:583–593.
- Smith C.W., Betrán J. and Runge E.C.A., (2004): Corn: Origin, history, technology, and production. John Wiley & Sons. 2004:976.
- Stark E.A., Connerton I., Bennett S.T., Barnes S.R., Parker J.S. and Forster J.W., (1996): Molecular analysis of the structure of the maize B-chromosome. *Chromosome Research*. 1996,4(1):15–23.
- Strable J. and Scanlon M.J., (2009): Maize (*Zea mays*): A Model Organism for Basic and Applied Research in Plant Biology. *Cold Spring Harbor Protocols*. 2009(10):132.

- Su H., Liu Y., Liu Y., Birchler J.A. and Han F., (2018): The Behavior of the Maize B Chromosome and Centromere. *Genes*. 2018, 9(10):476
- Svačina R., Hloušková L., Karafiátová M. and Bartoš J., (2023): Scoring the number of B chromosomes in *Zea mays* L. using droplet digital PCR assay. *Plant Methods*. 2023,19(1):43.
- Uhl C.H. and Morgan R., (1973): The Chromosomes of *Pachyphytum* (*Crassulaceae*). *American Journal of Botany*. 1973, 60(7):648–656.
- Valente G.T., Conte M.A., Fantinatti B.E.A., Cabral-De-Mello D.C., Carvalho R.F., Vicari M.R., Kocher T.D. and Martins C., (2014): Origin and evolution of B chromosomes in the cichlid fish *Astatotilapia latifasciata* based on integrated genomic analyses. *Mol. Biol. Evol.* 2014,31(8):2061–2072.
- Viotti A., Privitera E., Sala E. and N. Pogna N., (1985): Distribution and clustering of two highly repeated sequences in the A and B chromosomes of maize. *Theoretical and Applied Genetics*. 1985,70(3):234–239.
- Ward E.J., (1973): Nondisjunction: localization of the controlling site in the maize B chromosome. *Genetics*. 1973,73(3):487–391.
- Wu D., Ruban A., Fuchs J., Macas J., Novák P., Vaio M., Zhou Y. and Houben A., (2019): Nondisjunction and unequal spindle organization accompany the drive of *Aegilops speltoides* B chromosomes. *New Phytologist*. 2019,223(3):1340–1352.
- Ziegler C.G., Lamatsch D.K., Steinlein C., Engel W., Schartl M. and Schmid M., (2003): The giant B chromosome of the cyprinid fish *Alburnus alburnus* harbours a retrotransposon-derived repetitive DNA sequence. *Chromosome Res.* 2003,11(1):23–35.