

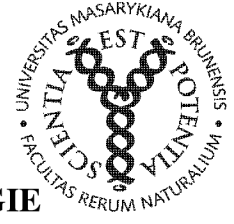


MASARYKOVA UNIVERZITA

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

ÚSTAV EXPERIMENTÁLNÍ BIOLOGIE

ODDĚLENÍ GENETIKY A MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE



Role chromosomových přestaveb v ostrovní druhové radiaci rodu úhorník

(Descurainia, Brassicaceae)

Diplomová práce

Michaela Marečková

Vedoucí práce: doc. Mgr. Martin Lysák, Ph.D.

Brno 2016

Bibliografický záznam

Autorka:	Michaela Marečková Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita Ústav experimentální biologie Oddělení genetiky a molekulární biologie
Název práce:	Role chromosomových přestaveb v ostrovní druhové radiaci rodu úhorník (<i>Descurainia</i> , <i>Brassicaceae</i>)
Studijní program:	Experimentální biologie
Studijní obor:	Molekulární biologie a genetika
Vedoucí práce:	doc. Mgr. Martin Lysák, Ph.D.
Akademický rok:	2015/2016
Počet stran:	85
Klíčová slova:	<i>Brassicaceae</i> , brukvovité, evoluce karyotypu, chromosomové přestavby, srovnávací malování chromosomů, Kanárské ostrovy

Bibliographic Entry

Author: Michaela Marečková
Faculty of Science, Masaryk University
Department of Experimental Biology

Title of Thesis: The role of chromosome rearrangements in the island species radiation in *Descurainia* (*Brassicaceae*)

Degree programme: Experimental biology

Field of Study: Molecular Biology and Genetics

Supervisor: doc. Mgr. Martin Lysák, Ph.D.

Academic Year: 2015/2016

Number of Pages: 85

Keywords: *Brassicaceae*, crucifers, karyotype evolution, chromosome aberrations, comparative chromosome painting, Canary islands

Abstrakt

Tato práce je zaměřena na evoluci karyotypu rodu úhorník (*Descurainia*, *Brassicaceae*). Brukvovité rostliny mají popsáný karyotyp společného předka celé čeledi (ancestrální karyotyp). Jeho srovnáním se současnými druhy lze odvodit chromosomové přestavby, k nimž v průběhu evoluce došlo. Na karyotypech tří endemických úhorníků z Kanárských ostrovů byly zkoumány druhově specifické chromosomové přestavby a jejich možný vliv na druhovou speciaci.

Metodou srovnávacího malování chromosomů byla zrekonstruována struktura karyotypu kanárských druhů *Descurainia gilva*, *D. millefolia* a *D. preauxiana*. Karyotypy se postupně měnily v souvislosti s postupným šířením úhorníků po Kanárských ostrovech. Karyotyp úhorníků je odvozený od ancestrálního karyotypu brukvovitých. Byl identifikován chromosom AK6/8 společný pro všechny studované druhy. V průběhu evoluce vznikl tento fúzní chromosom přestavbami ancestrálních chromosomů AK6 a AK8, a je pravděpodobně společný u celého tribu *Descurainieae*. Druhově specifickými rozdíly v karyotypech byly počty a umístění oblastí ribozomové DNA a heterochromatinových uzlů. Právě velké množství heterochromatinových uzlů odlišuje kanárské úhorníky od pevninských druhů, které je nemají.

Abstract

The thesis is focused on karyotype evolution in *Descurainia* (*Brassicaceae*). The karyotype of a common ancestor has been described in the mustard family. By comparing the ancestral karyotype with a recent plant karyotype, it is possible to identify chromosome rearrangements during species evolution. The species-specific chromosome rearrangements and their possible impact on speciation was studied in three *Descurainia* species endemic to Canary Islands.

Karyotype structure of *Descurainia millefolia*, *D. gilva* and *D. preauxiana* was reconstructed by the cytogenetic method of comparative chromosome painting. Studied karyotypes changed during the evolution in connection with the progressive radiation of *Descurainia* in Canary Islands. Karyotypes of *Descurainia* species derived from ancestral crucifer karyotype. A fusion chromosome AK6/8, originated by a reciprocal translocation between ancestral chromosomes AK6 and AK8, was identified in all investigated karyotypes. It is probably common within whole *Descurainieae* tribe. Number and localization of ribosomal DNA and heterochromatic knobs is species-specific. The heterochromatic knobs are unique for canarian endemic species and differentiate them from the continental *Descurainia* species.



Masarykova univerzita

Přírodovědecká fakulta



ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Student: **Bc. Michaela Marečková**
Studijní program: **Experimentální biologie**
Studijní obor: **Molekulární biologie a genetika**
Studijní směr: **Molekulární biologie a genetika**

Ředitel Ústavu experimentální biologie PpF MU Vám ve smyslu Studijního a zkušebního řádu MU určuje diplomovou práci s tématem:

Role chromosomových přestaveb v ostrovní druhové radiaci v rodu úhorník (*Descurainia*, Brassicaceae)

The role of chromosome rearrangements in the island species radiation in *Descurainia* (Brassicaceae)

Oficiální zadání:

Vliv chromosomových přestaveb na speciaci je jednou z klíčových otázek současné biologie. Rod úhorník (*Descurainia*, Brassicaceae), zahrnující sedm endemických druhů na Kanárských ostrovech, představuje vhodný model pro studium této otázky. Předmětem diplomové práce je rekonstrukce struktury karyotypu úhorníků z Kanárských ostrovů, studium genomové kolinearity a druhově-specifických přestaveb, a komparace těchto struktur s genomy úhorníků z kontinentální Evropy a Nového světa.

Literatura:

Jazyk závěrečné práce: český


Vedoucí diplomové práce: doc. Mgr. Martin Lysák, Ph.D.

Podpis vedoucího práce:


Konzultant: Mgr. Terezie Mandáková, Ph.D.

Datum zadání diplomové práce: 4. listopad 2014

V Brně dne 4. listopad 2014


prof. RNDr. Jan Šmarda, CSc.
ředitel Ústavu experimentální biologie

Zadání diplomové práce převzal dne: 4. listopad 2014


Podpis studenta

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat svému školiteli doc. Mgr. Martinu Lysákovi, Ph.D. za jeho cenné rady, odbornou pomoc a poskytnuté materiály při zpracování diplomové práce.

Dále chci velmi poděkovat Mgr. Terezii Mandákové, Ph.D. za její ochotu, energii, nadšení a důvěru ve mně vloženou nejen během mé laboratorní práce, ale i kdykoli jindy to bylo potřeba.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svoji diplomovou práci vypracovala samostatně s využitím informačních zdrojů, které jsou v práci citovány.

Brno 4. května 2016

.....

Michaela Marečková

OBSAH

1. ÚVOD.....	10
1.1. Čeleď brukvovitých (<i>Brassicaceae</i>).....	11
1.1.1 Původ brukvovitých rostlin.....	14
1.1.2. Původ tribu <i>Descurainieae</i>	14
1.1.3. Rod úhorník (<i>Descurainia</i>).....	15
1.2. Karyotypy, chromosomy a jejich přestavby.....	17
1.3. Speciace.....	20
1.3.1. Izolační bariéry.....	20
1.3.2. Chromosomová speciace.....	21
1.3.3. Polyploidizace.....	24
1.3.4. Ostrovní speciace.....	26
1.3.5. Šíření úhorníků na Kanárských ostrovech.....	28
1.4. Ancestrální karyotyp čeledi brukvovitých.....	30
1.4.1. Změny karyotypu v průběhu evoluce brukvovitých rostlin.....	32
1.5. Malování chromosomů.....	34
2. CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE.....	38
3. MATERIÁL A METODY.....	39
3.1. Příprava chromosomových preparátů	40
3.2. Příprava preparátů k hybridizaci sond	41
3.3. Příprava a značení BAC sond (nick translace).....	42

3.4. Hybridizace <i>in situ</i>	44
3.5. Fluorescenční detekce hybridizovaných sond	45
3.6. Vyhodnocení	46
4. VÝSLEDKY.....	48
4.1. <i>Descurainia millefolia</i>	50
4.2. <i>Descurainia gilva</i>	52
4.3. <i>Descurainia preauxiana</i>	54
5. DISKUZE.....	56
5.1. Evoluční vztahy tribu <i>Descurainieae</i>	56
5.2. Heterochromatinové uzly.....	56
5.3. Ribosomová DNA.....	58
5.4. Fúzní chromosom AK6/8.....	59
5.5. Společný předek rodu úhorník (<i>Descurainia</i>).....	61
5.6. Chromosomové přestavby a speciace úhorníků.....	62
5.7. Srovnání s kontinentálními druhy.....	63
6. ZÁVĚR.....	65
7. LITERATURA.....	67

1. ÚVOD

Čeď brukvovitých (*Brassicaceae*) zahrnuje nejen důležité ekonomické plodiny a okrasné rostliny, ale také klíčové druhy pro mnoho oblastí výzkumu rostlin, jako třeba huseníček rolní (*Arabidopsis thaliana*). Význam této čeledi vede k intenzivnímu studiu fyziologie, anatomie, genetiky, genomiky, a samozřejmě i fylogenetických vztahů mezi rody a druhy. Zejména genetika a genomika nám pak napomáhá porozumět evolučním procesům a mechanismům speciace. Díky intenzivnímu výzkumu brukvovitých byly zavedeny metody umožňující studovat strukturu genomu a tedy i vliv chromosomových přestaveb na speciaci. Významné události v historii vývoje rostlinných druhů totiž zanechávají stopy v genomu. Stopy, které lze vysledovat a doplnit do mozaiky evoluce genomů rostlin.

Metodou srovnávacího malování chromosomů je možné odhalit chromosomové přestavby, ke kterým došlo v průběhu vývoje zkoumaného druhu. Porovnáním struktury karyotypu a nalezených chromosomových přestaveb ostrovních endemitů s druhy rostoucími na pevnině pak lze odvodit, zda chromosomové přestavby mohou souviset se vznikem těchto ostrovních endemitů.

Velkým zdrojem genetické variability jsou chromosomové přestavby. Jejich příčiny a následky jsou zkoumány už desetiletí, přesto je stále nezodpovězená otázka, zda souvisí s druhovou speciací. Jsou dostatečnou silou k rozdělení evolučních linií? Ideálním rostlinným vzorkem pro studium této otázky jsou endemické druhy Kanárských ostrovů. Izolované populace bez vzájemné genetické výměny s pevninskými druhy mohou mít specifické chromosomové přestavby, které potenciálně napomohly reprodukční izolaci a vzniku těchto druhů. Pro tuto diplomovou práci byly vybrány tři druhy z kanárských endemických úhorníků (*Descurainia*, *Brassicaceae*) a metodou srovnávacího malování chromosomů byla rekonstruována struktura jejich karyotypů.

1. 1. Čeleď brukvovitých (*Brassicaceae*)

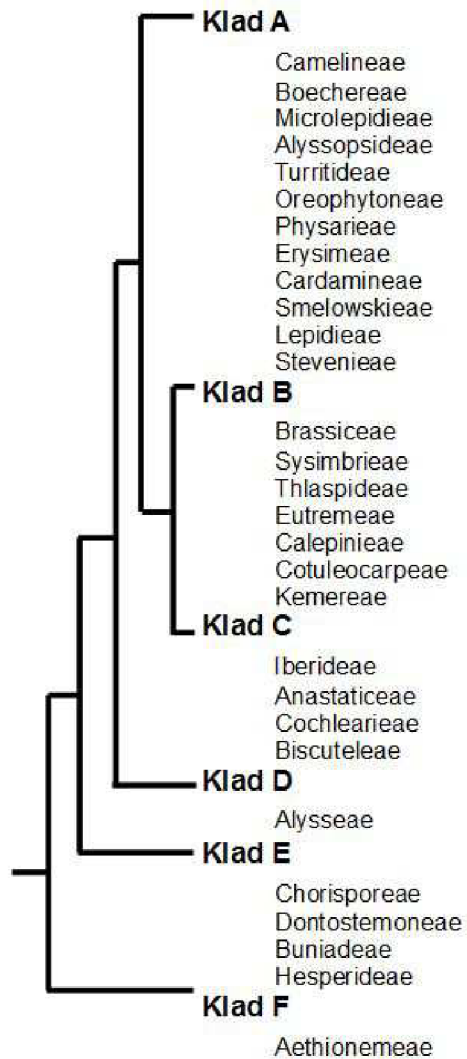
Čeleď brukvovitých je rozsáhlá monofyletická skupina krytosemenných dvouděložných rostlin rozšířených téměř po celém světě. Rostliny mají typicky čtyřčetné květní koruny a charakteristicky vonící silice – glukosinoláty a produkty jejich hydrolýzy enzymem mirosinázou (Radojčić *et al.* 2008). Čeleď zahrnuje mnohé zemědělsky významné plodiny - zeleninu (zelí, brokolice, křen, kapusta atd.), zdroje olejů a maziv (brukev řepka olejka, brukev černá), koření (hořčice, brukev černá) atd. Patří sem také nejdůležitější modelový organismus kvetoucích rostlin: huseníček rolní (*Arabidopsis thaliana*).

V současné době je známo 51 tribů, 325 rodů a více než 3740 druhů patřících do čeledi brukvovitých (Hohmann *et al.* 2015). Sesterskou skupinou ke všem ostatním tribům jsou *Aethionemeae*, k rozdělení došlo před 34 – 40 miliony lety (Schranz a Mitchell-Olds 2006, Fawcett *et al.* 2009, Couvreur *et al.* 2010). Na základě výzkumu chloroplastového genu *ndhF* u 113 různých druhů zastupujících 101 rodů byly druhy čeledi *Brassicaceae* rozděleny do tří hlavních fylogenetických linií (I-III, Beilstein *et al.* 2006, Franzke *et al.* 2011).

Linie I je pravděpodobně monofyletická skupina zahrnující osm tribů *Alyssopsidaeae*, *Boecherae*, *Camelineae* (např. huseníček rolní), *Cardamineae*, *Crucihimalayaeae*, *Descurainieae*, *Erysimeae*, *Halimolobeae*, *Lepidieae*, *Microlepidieae*, *Oreophytoneae*, *Physarieae*, *Smelowskieae* a *Yinshanieae*. Linie II je opět pravděpodobně monofyletická, obsahuje triby *Brassicaceae*, *Isatideae*, *Sysimbrieae* a *Thelypodieae*, rozšířená linie II obsahuje ještě další triby *Alysseae*, *Aphragmeae*, *Arabideae*, *Asteae*, *Calepineae*, *Cochlearineae*, *Conringieae*, *Cremolobeae*, *Eudemeae*, *Eutremeae*, *Heliophileae*, *Iberideae*, *Kernereae*, *Megacarpeae*, *Notothlaspidieae*, *Schizopetaleae*, *Stevenieae* a *Thlaspidieae*. V linii III jsou triby *Anastaticeae*, *Anchonieae*, *Buniadeae*, *Chorisporaeae*, *Donstostemoneae*, *Euclidieae* a *Hesperideae*, její monofyletičnost ale není dostatečně potvrzená (Al-Shehbaz 2012, Beilstein *et al.* 2006, Franzke *et al.* 2011).

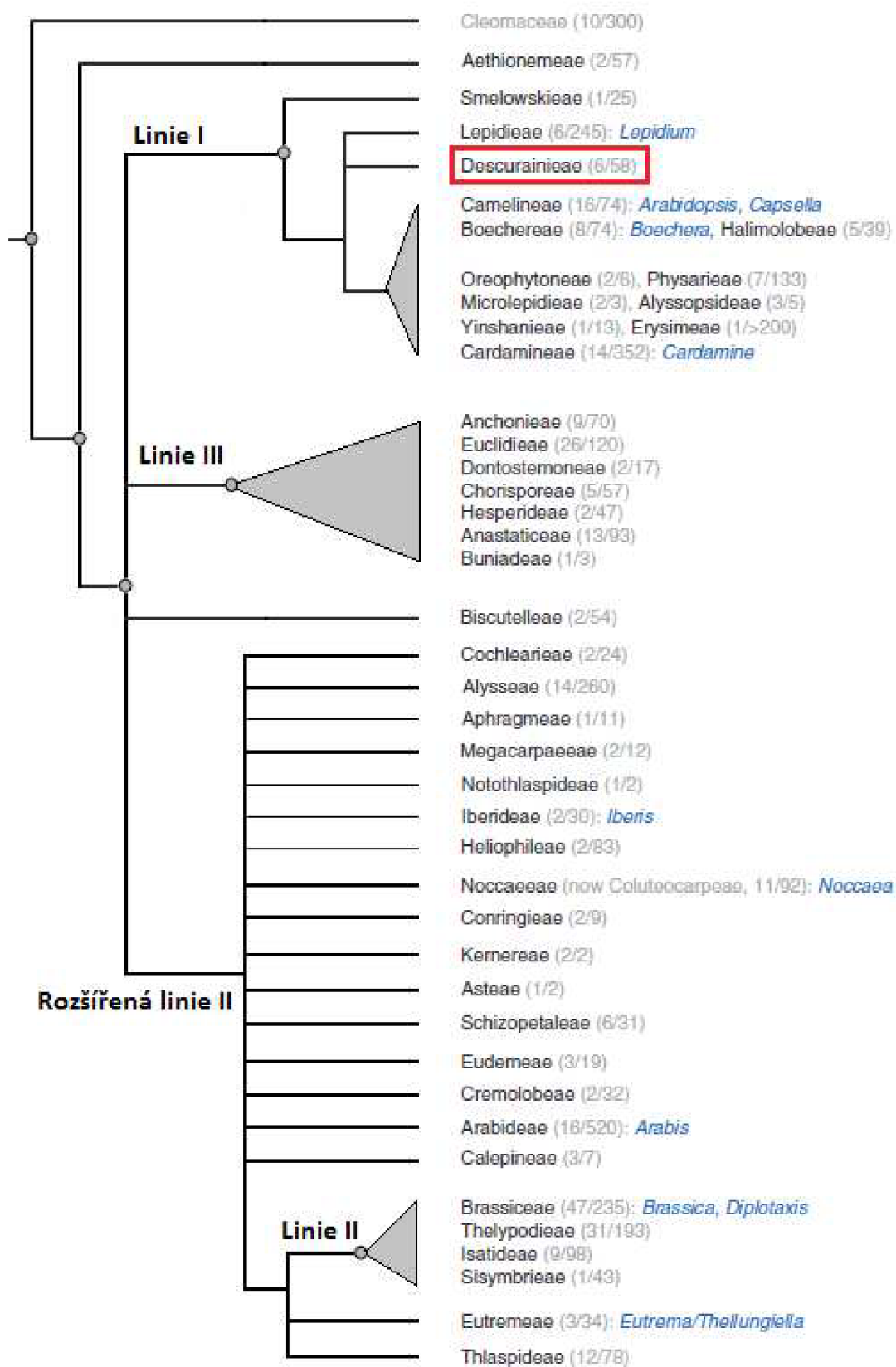
Huang a kolektiv (2016) představili nové pojetí fylogeneze čeledi brukvovitých. Druhy a rody dělí do šesti skupin A-F. Klad A zahrnuje rody linie I a *Macropodium nivale* (rozšířená linie II), a je sesterskou skupinou ke kladům B (linie II a některé druhy rozšířené linie II) a C (*Iberideae*, *Anastaticeae*, *Cochlearieae*, *Biscuteleae* a *Lunaria annua*), dohromady tvoří větev ABC, sesterskou skupinou je klad D (*Alysseae* – rozšířená linie II).

Linie III je nově obsažena v kladu E. Bazální pozici zaujímá *Aethionemeae* (stejně jako u fylogenetického stromu Beilstein *et al.* 2006, Franzke *et al.* 2011), označené jako klad F (Huang *et al.* 2016).



Obr. 1A (vlevo): Fylogenetický strom podle nového dělení (Huang *et al.* 2016).

Obr. 1B (další strana): Fylogenetický strom čeledi Brassicaceae s hlavními liniemi a triby. Čísla v závorkách představují počty rodů / druhů v jednotlivých tribech (Franzke *et al.* 2011, upraveno)



1. 1. 1. Původ brukvovitých rostlin

Původ čeledi sahá až do eocénu, kdy na Zemi převládalo teplé a vlhké klima (Zachos *et al.* 2001). Vyvinula se v Íránsko-Turánské oblasti ve střední Asii, kde je dodnes největší rozmanitost brukvovitých rostlin (Al-Shehbaz *et al.* 2006). Sesterskou čeledí jsou luštěnicovité (Cleomaceae), které pochází z oblasti Středozemního moře (Inda *et al.* 2008), odkud se rozšířily do střední Asie (Feodorova *et al.* 2010).

Čeď brukvovitých prošla obdobím rozsáhlé diversifikace krátce po oddělení tribu *Aethionemeae*. Tento tribus se oddělil od brukvovitých jako první (asi před 32 miliony let, Hohmann *et al.* 2015) a nejvíce diverzifikovaný je právě v Íránsko-Turánské oblasti, obzvláště v Turecku (Al-Shehbaz *et al.* 2006). Náhlá diversifikace brukvovitých rostlin proběhla v období před 32 až 22 miliony let, kdy došlo opět ke zpomalení šíření brukvovitých druhů (Couvreur *et al.* 2010). Rozsáhlé rozšíření těchto rostlin bylo způsobeno globálním ochlazením v raném oligocénu (asi před 33 mil. lety, Zachos *et al.* 2001) a celogenomovou duplikací specifickou pro čeď brukvovitých včetně tribu *Aethionemeae* (před 47 miliony let, Kagale *et al.* 2014), viz. kapitola 1.3.3. Právě duplikace genomu pravděpodobně poskytla rostlinám možnost rychle se přizpůsobit klimatickým změnám (Couvreur *et al.* 2010). Stáří jednotlivých linií je odhadováno na 27 milionů let (linie I), 28 milionů let (linie II) a 32 milionů let (linie III, Couvreur *et al.* 2010) nebo na 36 milionů let (linie I), 31 milionů let (linie II) a 47 milionů let (linie III, Beilstein *et al.* 2010). Nejstarší pyl zástupců čeledi *Brassicaceae* byl nalezen v Turecku a pocházel ze středního miocénu (před 26 mil. lety, Yavuz-Isik a Demirci 2009).

1. 1. 2. Původ tribu *Descurainieae*

Tribus *Descurainieae* zahrnuje šest rodů: *Descurainia* (asi 48 druhů, severní a jižní Amerika, Eurasie a Kanárské ostrovy, základní chromosomové číslo $x = 7$), *Hornungia* (3 druhy, Eurasie, $x = 6$), *Ianhedgea* (1 druh, střední Asie, $x = 14$), *Tropidocarpum* (4 druhy, severní a jižní Amerika, $x = 8$), *Robeschia* (1 druh, Střední východ, $x = 8$) a *Trichotolinum* (1 druh, Patagonie, základní chromosomové číslo neznámé, Al-Shehbaz *et al.* 2006, Warwick a Al-Shehbaz 2006). Podle výzkumu Goodsonové a kolektivu (2011) se od společného předka

tribu *Descurainieae* nejdříve oddělila větev sesterských rodů *Hornungia* a *Tropidocarpum* (asi před 23 miliony let), pak rod *Ianhedgia* a nakonec rody *Robeschia* a *Descurainia* asi před 22,5 miliony lety. Z některých výsledků však vyplývá rod *Ianhedgia* jako blíže příbuzný rodu *Descurainia*, než rod *Robeschia* (Goodson *et al.* 2011).

Původ tribu *Descurainieae* sahá do doby před 23 miliony let (oddělení rodů *Hornungia* a *Tropidocarpum*, Goodson *et al.* 2011) v Íránsko-turanské oblasti, která je také pravděpodobným místem vzniku čeledi brukvovitých rostlin (Al-Shehbaz *et al.* 2006, Franzke *et al.* 2011, Goodson *et al.* 2011). Část tribu se odtud zřejmě rozšířila východní cestou přes Beringovu úžinu do severní Ameriky a posléze do jižní Ameriky. Přestože se v jižní Americe vyskytuje více druhů, genetická diverzita je větší v severní Americe, což naznačuje starší původ severoamerických taxonů. Rozšíření *Descurainieae* tímto způsobem potvrzuje i výskyt druhu *Descurainia sophioides*, která roste na východ od pohoří Ural, přes severní Sibiř, Aljašku až po Kanadu (Aiken *et al.* 2007). Je pravděpodobné, že se touto cestou do severní Ameriky dostaly i další brukvovité druhy – řeřicha (*Lepidium*, Mummenhoff *et al.* 2001), chudina (*Draba*, Koch a Al-Ahehbaz 2002), *Smelowskia* (Carlsen *et al.* 2010), ale i například ječmen (*Hordeum*, čeleď lipnicovité, Blattner 2006) nebo starček (*Senecio mohavensis*, čeleď hvězdicovité, Coleman *et al.* 2003). Poslední společný předek všech amerických druhů *Descurainieae* rostl před 4,7-5,7 miliony let.

1. 1. 3. Rod úhorník (*Descurainia*)

Rod úhorník zahrnuje asi 48 druhů z linie, které rostou v mírném podnebném pásu po celém světě. Poté, co se rod *Descurainia* rozšířil do Evropy, došlo patrně k diversifikaci druhu *D. tanacetifolia* (Pyreneje, severní Španělsko). První úhorník se dostal na Kanárské ostrovy asi před 1 až 2,8 miliony let, pravděpodobně z Pyrenejského poloostrova. Tato oblast byla útočištěm mnoha druhů během vrcholné doby ledové v pleistocénu (Hewitt 1996, Goodson *et al.* 2011, Al-Shehbaz 2012).

Seznam druhů *Descurainia* podle oblasti původu (The International Plant Names Index):

Jižní Amerika:	Severní Amerika:	Eurasie:	Kanárské ostrovy:
<i>D. antarctica</i>	<i>D. obtusa</i>	<i>D. tanacetifolia</i>	<i>D. artemisioides</i>
<i>D. appendiculata</i>	<i>D. cf. streptocarpa</i>	<i>D. kolchii</i>	<i>D. bourgeana</i>
<i>D. cf. erodiifolia</i>	<i>D. impatiens</i>	<i>D. sophia</i>	<i>D. gilva</i>
<i>D. cumingiana</i>	<i>D. incisa</i>	<i>D. irio</i>	<i>D. gonzalezii</i>
<i>D. heterotricha</i>	<i>D. pinnata</i>	<i>D. boryi</i>	<i>D. lepsii</i>
<i>D. glaucescens</i>	<i>D. virletii</i>		<i>D. millefolia</i>
<i>D. pimpinellifolia</i>	<i>D. paradisa</i>		<i>D. preauxiana</i>
<i>D. athrocarpa</i>	<i>D. californica</i>		
<i>D. depressa</i>	<i>D. incana</i>		
<i>D. myriophylla</i>	<i>D. sophioides</i>		
<i>D. leptoclada</i>	<i>D. kenheilii</i>		
<i>D. stricta</i>	<i>D. ramosissima</i>		
<i>D. cleefii</i>	<i>D. torulosa</i>		
<i>D. macbridei</i>	<i>D. richardsonii</i>		
<i>D. nuttallii</i>	<i>D. brachycarpa</i>		
<i>D. adpressa</i>	<i>D. menziesii</i>		
<i>D. altoandina</i>	<i>D. intermedia</i>		
<i>D. bravifruca</i>	<i>D. longepedicellata</i>		
<i>D. pulcherrima</i>	<i>D. brevisiliqua</i>		
<i>D. nana</i>	<i>D. hartwegiana</i>		
<i>D. argentea</i>			

V diplomové práci se zabývám výhradně sedmi endemickými druhy úhorníků, které rostou na Kanárských ostrovech, a to *D. artemisioides* (ostrov Gran Canaria), *D. bourgeana* (Tenerife, La Palma), *D. gilva* (La Palma), *D. gonzalezii* (Tenerife), *D. lemsii* (Tenerife) a *D. preauxiana* (Gran Canaria). Druh vyskytující se na nejvíce ostrovech (Tenerife, La Gomera, La Palma) je úhorník tisícilistý (*D. millefolia*), viz obr. 2 (Schönfelder a Schönfelder 2002, Goodson *et al.* 2006). Všechny kanárské úhorníky jsou diploidní ($2n = 2x = 14$, Suda *et al.* 2003).

Většina evropských pevninských úhorníků jsou byliny s drobnými žlutými nebo bílými čtyřčetnými květy. Oproti tomu sedm endemických druhů z Kanárských ostrovů má květy větší a jsou to dřevité vytrvalé rostliny. Podle výzkumů jaderné a chloroplastové DNA jsou endemické druhy Kanárských ostrovů odvozeny z jediné kolonizace. Pravděpodobným centrem adaptivního šíření původních úhorníků po Kanárských ostrovech byla nížinná oblast křovin na Tenerife, odkud se úhorníky rozšířily nejdříve na ostrov La Palma a následně na ostrovy Gran Canaria, La Gomera a zpět na Tenerife (Goodson *et al.* 2006). Nejbližším příbuzným na pevnině je druh *D. tanacetifolia* (*D. tanacetifolia* subsp. *suffructicosa*, Goodson

et al. 2011), trvalá bylina rostoucí v horách jihozápadní Evropy. Stejně jako kanárské úhorníky má *D. tanacetifolia* sedm párů chromosomů, zatímco jiný evropský úhorník *D. sophia* má chromosomový počet $2n = 4x = 28$ (Goodson *et al.* 2006).



Obr. 2: Úhorník tisícilistý (*Descurainia millefolia*, Manuel Luis Gil González 2015, upraveno).

1. 2. Karyotypy, chromosomy a jejich přestavby

Pojmem karyotyp se označuje soubor všech chromosomů v jádře buňky. Karyotypy se mění mutacemi v počtu chromosomů, v počtu celých sad (ploidní mutace) nebo změnami ve struktuře chromosomů. Mezi základní chromosomové přestavby patří delece, inserce, duplikace, inverze a reciproké translokace (Schubert a Lysak 2011). Strukturální přestavby jsou způsobeny zlomem obou vláken DNA, většinou v oblasti bohaté na repetitivní sekvence – zvláště, pokud jsou repeticce rozptýlené v genomu (Devos 2010). Přestavby mohou být přirozené nebo uměle vyvolané. Laboratorně se indukují působením mutagenů nebo paprsky X, které způsobují zlomy chromosomů a opravný systém organismu někdy zařadí sekvenci v obráceném pořadí nebo do jiného zlomu (Snustad a Simmons 2009). Přestavby mohou vzniknout i přirozenou cestou, a to náhodnými mutacemi (působení mutagenů) nebo působením transponovatelných elementů - jsou to obvykle krátké úseky DNA, které mají schopnost vyštěpit se z chromosomu a na jiném místě se opět zařadit (poprvé objeveno u kukuřice, *Zea mays*, McClintock 1950). Enzym transponáza rozstřihne DNA na koncích

transpozonu. Oba volné konce se zařadí na nové místo chromosomu, čímž může dojít k inverzi segmentu mezi koncem a novou pozicí, nebo i k delecí tohoto úseku (Krishnaswamy *et al.* 2008).

Delece je ztráta části jaderného genomu, zmenšuje tedy genomovou velikost. Dva zlomy na různých místech chromosomu způsobí vnitřní (intersticiální) delecí. Jediný dvouvláknový zlom způsobí terminální delecí, která ale musí být na zkráceném konci chromosomu stabilizována de novo syntézou telomery, nebo získkem nové telomerové sekvence ze sesterské chromatidy nebo z konce nehomologního chromosomu (Yu a Graf 2010). Pokud jsou v genomu zdvojené chromosomy (polyploidie), jsou delece více tolerovány z důvodu rezervní kopie funkčních genů (toto platí i pro další přestavby, Snustad a Simmons 2009, Schubert a Lysak 2011).

K **inzerci** dojde vložením extrachromosomové DNA (např. kruhový chromosom, DNA infikujících virů nebo bakterií apod.). Vliv této události záleží na místě inzerce a na vložené sekvenci. Pokud je DNA vložena dovnitř genu, pak tento přestane fungovat nebo jeho expresí vzniká mutantní protein neschopný zastávat původní funkci. Dalším významným faktorem je vkládaná DNA, pokud obsahuje geny, pak může docházet k jejich expresi. Míra exprese závisí na regulační oblasti daného genu a na místě inzerce (Schubert a Lysak 2011). Pokud je začleněna cizorodá DNA, může dojít i k expresi bakteriálních nebo virových genů v buňce. Inzerce vedou k zvětšování genomu i délky chromosomů.

Duplikace je způsobena zdvojením části chromosomu. Duplikovaný gen pak může ztratit svou funkci, získat funkci novou nebo si svou funkci ponechat, pokud je dvojnásobná dávka genu pro rostlinu výhodná nebo tolerována. Duplikovaná kopie je buď zařazena hned za původní segment (vznikají tak tandemové duplikace) nebo na jiné místo (inzerční duplikace, Nelson a Schoemaker 2006, Lysak a Schubert 2013). Duplikace způsobují zvětšování genomu. Duplikovány mohou být nejen části chromosomu, ale i celé chromosomy (obvykle v důsledku chybného rozestupu chromosomů během meiózy) nebo chromosomové sady (jev označovaný jako polyploidizace genomu).

Inverze nastane, když je úsek chromosomu dvěma zlomy vystřižen a opět zařazen do stejného místa v převrácené orientaci. Paracentrická inverze je pouze na jednom raménku chromosomu. Nezahrnuje centromeru a nemění morfologii chromosomu. U pericentrické

inverze je každý zlom na jiném raménku a mění pozici centromery na chromosomu. Během meiotického párování může dojít k vytvoření smyčky invertovaného segmentu a homologní nepřevrácené oblasti. Pokud následně dojde v této oblasti k rekombinaci, vznikají duplikace a delece na sesterských chromatidách (Snustad a Simmons 2009, Lysak a Schubert 2013). Inverze obvykle vzniká mezi dvěma oblastmi obrácených repetic. Nijak nemění velikost genomu, ale mění pořadí genů na chromosomu, tedy i vazebné skupiny genů. Gen se může inverzí dostat z oblasti silné exprese do oblasti s velice nízkou expresí genů a naopak.

Reciproká translokace je mutace, v rámci které si chromosomy vzájemně vymění úseky (většinou koncové části), a to beze ztráty genetického materiálu. Translokace zvětšuje vazebnou vzdálenost mezi geny, může také vymezit nové vazebné vztahy. Může být i příčinou klesajícího chromosomového počtu, pokud proběhne mezi dvěma akrocentrickými chromosomy. Dlouhá raménka vytvoří velký chromosom a z krátkých ramének vznikne minichromosom, často s centromerou, který se postupně z karyotypu ztratí. Translokací někdy vzniknou chromosomy s dvěma centromerami (translokace mezi chromosomovými konci). Pro dosažení stability dicentrického chromosomu je jedna z centromer vždy inaktivována nebo deletována (Snustad a Simmons 2009, Murat *et al.* 2010). Reciproké translokace mohou vést i k tzv. inzerčním fúzím chromosomů, které jsou zdokumentovány zejména v čeledi *Poaceae* (Luo *et al.* 2009, Murat *et al.* 2010). Po vytvoření zlomů na koncích ramének jednoho chromosomu dojde k chybné opravě a navázání ramének do zlomu v centromerické oblasti jiného chromosomu (Schubert a Lysak 2011).

Mezi nejčastější chromosomové přestavby nejen u brukvovitých rostlin patří translokace a inverze – tedy přestavby způsobující pouze přesun částí DNA mezi chromosomy, ne jejich ztrátu nebo znásobení. K translokacím a inverzím často dochází mezi chromosomovými zlomy v oblastech se stejnými repeticemi, např. oblasti ribosomální DNA (rDNA). Jedná se o oblasti obsahující tandemové repetice genů pro ribosomovou RNA: 45S a 5S rDNA. Počet a umístění rDNA je jednou ze základních charakteristik karyotypu. 45S rDNA je navíc oblastí organizátoru jadérka (NOR: nucleolus organizer region) – části chromosomů, které během interfáze společně tvoří jadérko (Snustad a Simmons 2009). Další časté zlomy jsou v pericentromerických a v subtelomerických oblastech bohatých na repetice. U rostlin jsou velmi časté polyploidizace, tedy duplikace celých chromosomových sad (viz kapitola 1. 3. 3. Polyploidizace).

1. 3. Speciace

Pojmem speciace rozumíme evoluční proces vzniku nových druhů odštěpením evolučních linií od společného předka. Jak ale snadno rozlišit, co je ještě variabilita jedinců v rámci stejného druhu a co už je nový druh? Mayr a Dobzhansky (1945, Dobzhansky 1975) definovali na základě pokusů s různými druhy octomilek (*Drosophila sp.*) druh jako skupinu se společným genofondem reprodukčně oddělenou od ostatních. Dnes je obvykle druh charakterizován jako reprodukčně izolovaná skupina organismů s podobnými vlastnostmi, se společným původem a historií. Evoluční genetici určují druh zejména podle sdíleného genofondu - sekvenací genomů a porovnáváním karyotypů jedinců a jednotlivých populací (Snustad a Simmons 2009).

Speciace může probíhat několika základními mechanismy podle rozložení populací a míry jejich izolace. U alopatrické speciace jsou od sebe populace oddělené geografickou bariérou a postupně dochází k divergenci hromaděním specifických mutací, přírodní selekcí, pohlavním výběrem a genovým driftem. Dojde k vývoji reprodukční izolace, a i když je následně geografická bariéra odstraněna, tyto populace už nejsou schopny vzájemně se křížit. Sympatrická speciace probíhá na rozdíl od alopatrické speciace na stejné lokalitě. U menší subpopulace se vyvine reprodukční bariéra bez geografického rozdělení. Část jedinců se přizpůsobí novému hostiteli nebo se členové subpopulace selektivně kříží jen mezi sebou, takže nedochází k výměně genů se zbytkem populace (Snustad a Simmons 2009). U rostlin může být sympatrická speciace způsobena i velkými změnami karyotypu, jako je polyploidizace. Peripatrická speciace probíhá, když se z původní populace oddělí malá skupinka, která kolonizuje nové území, tam se rozmnoží a založí tak novou populaci. Do nové lokality se dostane jen pár jedinců. Proto je nová populace ze začátku malá a dochází k rychlé divergenci s častým nedostatkem fosilních záznamů. Tento fenomén je označován jako efekt zakladatele (Mayr 1954).

1. 3. 1. Izolační bariéry

Reprodukční izolovanost je jednou ze základních podmínek speciace. Pokud by mezi populacemi stále docházelo ke genovému toku, zmenšovala by se rozdílnost mezi populacemi a nemohlo by se nahromadit tolik změn, aby vznikly nové druhy. Reprodukční bariéry jsou prezygotické (před splynutím rodičovských gamet) a postzygotické (po splynutí gamet, tedy

po vzniku zygoty).

Prezygotické bariéry brání jedincům z odlišných skupin tvořit hybridní potomstvo. Buď zabraňují páření, nebo blokují spojení gamet v zygotu. Patří sem geografická izolace (jedinci se vůbec neseťkají), ekologická izolace (preferance různých stanovišť v rámci společné lokality) a také etologická (různé typy chování, různé pářící rituály) a časová izolace (různá doba aktivity jedinců, odlišný životní cyklus, ale i vazba na hostitele s různým životním cyklem, tedy například různá doba kvetení stromů apod.). Do prezygotických reprodukčních bariér se řadí i anatomické a chemické neslučitelnosti partnerů různých druhů (inkompatibilita pylu u rostlin apod., Snustad a Simmons 2009). Příkladem geografické izolace jsou populace endemického druhu *Cardamine apennina* (*Brassicaceae*) v Toskánské provincii a v provincii Abruzzo, vzdálené od sebe 350 km. Míra jejich genetické divergence odpovídá dlouhodobé izolaci bez genového toku mezi populacemi (Lihová *et al.* 2004).

Postzygotické izolační mechanismy brání hybridnímu potomstvu předávat geny do dalších generací. Zygoty nepřežívají, hybridní potomci mají sníženou životaschopnost a poruchy plodnosti. Sem patří i chromosomové přestavby, které ovlivňují reprodukční bariéru snížením schopnosti párování chromosomů a jejich pravidelné segregace v hybridních genomech (Basset *et al.* 2006).

1. 3. 2. Chromosomová speciace

Jednou z možných projevů postzygotické reprodukční izolace jsou poruchy rozestupu chromosomů během buněčného dělení. Lichý počet chromosomů v zygotě mezidruhového hybrida ztěžuje tvorbu funkčních gamet. V důsledku chromosomových přestaveb, zvláště inverzí a přestaveb mezi více chromosomy, dochází často k delecím a duplikacím genetického materiálu v dceřiných buňkách (Coyne a Orr 2004, Snustad a Simmons 2009). Genetické bariéry zahrnující chromosomové přestavby jsou mnohem silnější než bariéry způsobené jedním lokusem. Je u nich tedy mnohem pravděpodobnější, že odstartují akumulaci postzygotických inkompatibilit vedoucí k reprodukční izolaci (Navarro a Barton 2003). Bonasora a kolektiv popsali nový druh *Paspalum schesslii* (čeleď lipnicovité, *Poaceae*), kvůli jeho neobvyklému chromosomovému počtu ($n = 6$), přestože druh morfologicky odpovídá

Paspalum malmeanum ($n = 10$) a vyskytuje se i na stejné lokalitě. Původ sníženého chromosomového počtu ($n = 6$) sice ještě nebyl stanoven, ale pravděpodobně se jedná o fúzi chromosomů a chromosomové přestavby (Bonasora *et al.* 2015).

Podle hypotézy chromosomové speciace tvoří chromosomové přestavby reprodukční izolaci mezi populacemi, a tudíž napomáhají speciaci (White 1978). Bylo navrženo mnoho modelů chromosomové speciace (shrnutí např. King 1995). Základní myšlenka je u všech stejná: heterozygotní jedinci mají sníženou fertilitu, chromosomové přestavby působí jako genetická bariéra a zabraňují toku genů mezi populacemi s různými zafixovanými přestavbami (White 1978). Výzkum ostřic (*Carex scoparia*) odhalil variabilní chromosomový počet mezi populacemi (od $n = 31$ do $n = 34$), pravděpodobně v důsledku fúzí a rozdělení chromosomů. I mezi populacemi se stejným chromosomovým počtem je variabilní velikost genomu způsobená chromosomovými přestavbami (při chromosomovém počtu $n = 34$ je velikost genomu od 334,9 Mbp do 347,4 Mbp). Ostřivce mají tzv. holocentrické chromosomy (bez lokalizované centromery, tvorba kinetochoru a vazba mitotických vřetének probíhá po celé délce chromosomu), proto nejsou různé chromosomové počty překvapivé. Nicméně z této studie vyplývá, že rychlá chromosomová evoluce zřejmě hraje velkou roli v diversifikaci ostřic (Chung *et al.* 2011). Chromosomové přestavby omezují genový tok mezi populacemi a zvyšují tak možnosti lokální adaptace a diferenciací populací (Hipp *et al.* 2010, Chung *et al.* 2011).

Nejvýznamnějším modelem chromosomové speciace je Whitův stasipatrický speciální model. Podle něj vzniká v rámci populace chromosomová mutace, heterozygotní jedinci jsou pak evolučně znevýhodněni oproti homozygotům a mutace se v populaci fixuje. Evoluce chromosomů způsobí i speciaci taxonů, které geograficky zůstávají v kontaktu. Dceřiné druhy obvykle vznikají ve středu původní populace, kterou využívají k vlastnímu šíření (White 1978). Vystává zde ale problém, který řešil už Charles Darwin a jeho kolegové – jak se zvýší frekvence chromosomové přestavby v populaci, pokud mají heterozygoti sníženou fitness? Jak zdůraznili Sturtevant a Muller v letech 1938 a 1940 (v Coyne a Orr 2004), čím větší je reprodukční izolace způsobená chromosomovou přestavbou, tím je už od počátku silnější selekce proti ní (Coyne a Orr 2004). Futuyma a Mayer (1980) také upozorňují na selekci proti novým přestavbám chromosomů, dokud nedosáhnou dostatečné frekvence v populaci.

Možným řešením otázky zvýšení frekvence chromosomové přestavby v populaci je

epistáze genů způsobujících reprodukční izolaci. Tedy nadřazené působení genů reprodukční izolace oproti ostatním genům (Coyne a Orr 2004). Další možností je fixace změny v malých populacích, kde genový drift převáží vliv selekce. Bylo však spočítáno, že efektivní velikost takovéto populace by musela být velmi malá (méně než 50 jedinců, Walsh 1982). Populace této velikosti s největší pravděpodobností vyhyne nebo se spojí s jinou větší populací dříve, než dojde k zafixování chromosomové přestavby. Tato studie také ukazuje, že je reprodukční izolace mnohem častěji způsobena více přestavbami s malým vlivem na fitness heterozygota, než několika změnami velkého účinku (Walsh 1982).

V malých populacích jsou dvě vysvětlení fixace mutace – zvýhodnění homozygotů a meiotický drive. Zvýhodnění homozygotů s danou přestavbou by mohlo vyvážit snížené fitness heterozygotů (White 1978). Pokud však není toto zvýhodnění opravdu výrazné, pak má jen malý vliv na frekvenci přestavby v populaci. Mutace jsou nejnáchylnější ke ztrátě, když jsou v populaci vzácné. Nicméně vzácné přestavby jsou většinou v heterozygotním stavu a vliv homozygotů na populaci je minimální (Hedrick 1981, Walsh 1982). Druhým vysvětlením fixace mutace je meiotický drive - častější přenos určité kopie genu nebo určitého heteromorfního chromosomu na potomstvo, než je očekávaných 50 % (White 1978, Lyttle 1991, King 1995). Segregační nerovnováha může být způsobena například mírnou interakcí mezi určitými oblastmi chromosomu a částmi meiotického aparátu (Freeling a Thomas 2006). Meiotický drive se obvykle vyskytuje u samičích pohlavních buněk, kdy se po meiotickém dělení pouze jedna ze čtyř sesterských buněk změní v oocyt. Toto vajíčko pak častěji obsahuje chromosomy se zvýhodněním při pohybu po meiotickém vřeténku k buněčným pólům. Tedy např. kratší chromatida chromosomu asymetrického v důsledku crossing-overu (Zimmering a Bendbow 1973), nebo chromosom obsahující heterochromatinové uzly, které způsobují předčasný pohyb chromosomů po dělicím vřeténku (Rhoades a Dempsey 1966). Heterochromatinové uzly se často vyskytují u kukuřice (*Zea mays*), způsobují meiotický drive a změny genomu (Buckler *et al.* 1999). Výpočty ale prokázaly, že by meiotický drive chromosomových přestaveb musel působit opakovaně pro vytvoření silné izolace během nepřilíh dlouhé doby (Futuyma a Mayer 1980, Walsh 1982). Přestože se toto vysvětlení zdá nepravděpodobné, faktory meiotického drivu rozdělují několik blízce příbuzných druhů (kukuřice setá, *Zea mays ssp. parviglumis* a *mexicana*, Buckler *et al.* 1999) a jsou časté u nových mutací dalších prozkoumaných organismů (šťovík kyselý *Rumex acetosa*, Wilby a Parker 1988, hraboš polní *Microtus arvalis*, Gileva a Rakitin 2006,

octomilka *Drosophila simulans*, Montchamp-Moreau 2006).

Rieseberg (2001) se domnívá, že pokud jsou geny reprodukční izolace umístěny v oblasti chromosomové přestavby rozlišující dva alopatrické taxony, pak asociace mezi těmito geny a přestavbou přetrvává i po sekundárním kontaktu obou taxonů. Je to z toho důvodu, že heterozygotnost pro tyto přestavby brání rekombinaci obsažených genů. Menší rekombinace znamená sníženou eliminaci genů přírodní selekcí znevýhodňující hybridy. Celkovým výsledkem je tedy oddálení fúze taxonů po sekundárním kontaktu. Popsaný mechanismus poskytne taxonům dostatek času pro nahromadění izolačních bariér procesem reinforcementu (silné znevýhodnění hybridů, vytvoření úplné reprodukční izolace) a dokončení speciace (Rieseberg 2001, Noor *et al.* 2001). Hipp a kolektiv (2010) svým výzkumem ostřic (*Carex scoparia*) potvrdili, že geografická vzdálenost a počet chromosomových přestaveb, které rozdělují populace, výrazně ovlivňuje genový tok mezi zmíněnými populacemi (Hipp *et al.* 2010).

Chromosomová speciace tedy spočívá v hromadění chromosomových přestaveb, dokud nezpůsobí reprodukční izolaci a sníží tak životaschopnost heterozygotních potomků po zpětném křížení s původní populací. Rekombinační speciace je méně prozkoumaná. Druhy vznikají rekombinací rodičovských genomů, obsahují chromosomy obou rodičů a liší se ve složení karyotypu (Harini a Ramachandra 2003). K reprodukční izolaci dochází bez změny v počtu chromosomových sad, podobně jako u chromosomové speciace. Pokud se rodičovské druhy liší nejméně dvěma chromosomovými přestavbami (translokace nebo inverze), crossing-over u potomka sníží počet životaschopných gamet (duplikace a delece rozsáhlých segmentů chromosomů). V následující generaci jsou pak dostatečně plodní pouze potomci s homozygotní variantou rodičovských přestaveb. Vzniká tak částečná izolační bariéra snížené plodnosti v případě zpětného křížení s rodičovskými druhy nebo se sesterskými druhy homozygotními pro jinou přestavbu (McCarthy *et al.* 1995).

1. 3. 3. Polyploidizace

Nové druhy nemusí vznikat pouze rozdělením druhu společného předka, lze také zkřížit dva druhy pro vznik druhu společného potomka (Coyne a Orr 2004). Polyploidie je

stav, kdy je počet chromosomových sad v buňce větší než dvě. Při polyploidizační speciaci vzniká nový druh znásobením počtu chromosomových sad oproti původnímu druhu. Nový druh je v podstatě ihned reprodukčně izolovaný: u diploidní rostliny (2x) nedojde k rozestupu chromosomů a vznikne tetraploidní potomek (4x). Pokud by se zpětně křížil s rodičovským druhem, byl by výsledkem triploidní jedinec (3x) s poruchami meiózy, problémy s párováním chromosomů a s často aneuploidními gametami (Coyne a Orr 2004, Snustad a Simmons 2009).

Jsou rozeznávány dva typy polyploidie: autopolyploidie a allopolyploidie. V případě autopolyploidie pochází chromosomové sady ze stejného druhu, často z jednoho jedince. Nejčastěji je příčinou polyploidie je porucha rozestupu chromosomů do dceřiných jader (Coyne a Orr 2004, Snustad a Simmons 2009). Některé druhy trpí sníženou fertilitou v důsledku vzniku aneuploidních gamet (Ramsey a Schemske 2002).

Allopolyploidie vzniká hybridizací mezi různými druhy. Genom obsahuje kompletní chromosomové sady nejméně dvou druhů. Pokud jsou tyto sady chromosomů dostatečně strukturně rozdílné, vzájemně se nepárují. Chromosomy tvoří během meiózy pouze bivalenty (dvojice), gametogeneze probíhá standardně a fertilita je obvykle vysoká (Coyne a Orr 2004, Stebbins 1947). U segmentové allopolyploidie jsou některé chromosomy dostatečně rozdílné a nepárují se. Jiné jsou podobnější a seskupují se ve větších počtech. Segmentová polyploidie je nestabilní a v genomu probíhají další změny, dokud většina chromosomů netvoří klasické bivalenty (genom *Leucaena confertiflora* nebo *L. pallida*, Boff *et al.* 2003). Také tyto rostliny mohou mít sníženou plodnost. Nicméně i velmi nízká fertilita polyploidů může být kompenzována jejich rychlejším růstem a vysokou schopností přežít v prostředí (Ramsey a Schemske 2002).

Znásobení chromosomového počtu působí ztrátu buněčné rovnováhy. Je exprimováno příliš mnoho proteinů, dochází k poruchám při rozestupu chromosomů a genom je celkově nestabilní. Právě genomová nestabilita je spojována s poruchami mitózy a s rakovinou (Tan *et al.* 2015). Následuje tedy fáze diploidizace, která zahrnuje výrazné chromosomové přestavby a delece genomových sekvencí, dokud není genom opět funkčně podobný diploidnímu. Duplikovaný gen je prostorem pro mutace. Může získat novou prospěšnou funkci (je zachován), může být umlčen, nebo si zachová svoji funkci, pokud je jeho zvýšená exprese pro rostlinu výhodná (Lynch a Conery 2000). Celogenomová duplikace také zvyšuje

pravděpodobnost rekombinace mezi homeologními chromosomy, především v oblasti repetic. Asi nejvýraznější diploidizace proběhla u australského druhu *Stenopetalum nutans* (*Brassicaceae*), kde byl karyotyp redukován z $n = 16$ (po celogenomové duplikaci) na $n = 4$ (Mandáková *et al.* 2010a).

Většina kvetoucích rostlin prošla v průběhu své evoluce celogenomovou duplikací. Podle analýzy genomových sekvencí proběhla před 175-235 miliony let (Yang *et al.* 1999) před rozdělením jednoděložných a dvouděložných rostlin triplikace genomu, označovaná jako triplikace γ (Ziolkowski *et al.* 2006, Tang *et al.* 2008a, Baker *et al.* 2009, Jiao *et al.* 2011). Pro čeleď brukvovitých rostlin následovaly dvě další znásobení genomu. Celogenomová duplikace β je datovaná po oddělení čeledi *Caricaceae* od zbytku řádu Brassicales před 124 miliony let (Ming *et al.* 2008, Baker *et al.* 2009, Kagale *et al.* 2014). Nejnovější celogenomovou duplikací je duplikace α , která je typická pro čeleď brukvovitých. Proběhla před 47 miliony let, před oddělením sesterské skupiny *Aethionemeae* (Schranz a Mitchell-Olds 2006, Franzke *et al.* 2011, Kagale *et al.* 2014, Hohmann *et al.* 2015).

1. 3. 4. Ostrovní speciace

Ostrovní speciace se velmi liší od speciace probíhající na pevnině. Hlavním důvodem je geografická izolace ostrova a také omezené množství vhodných stanovišť pro růst zavlečených rostlin. Semena a spory se na ostrovy obvykle dostávají větrem, s ptáky nebo jsou zaneseny mořem. Akumulace druhů na ostrovech závisí na rychlosti evoluce a frekvenci kolonizace ostrova. V extrémních případech dojde k rychlé adaptivní radiaci druhu vlivem stabilizovaných mutací spolu s adaptací na osidlování nových stanovišť (Gillespie 2007, Qiao *et al.* 2016). Na odlehlejších ostrovech je tempo kolonizace novými druhy velmi pomalé, proto mají výraznou roli mutace. Nové varianty genů nejsou přinášeny migrujícími jedinci a diversifikace proto probíhá hlavně prostřednictvím mutací. Nejvýraznější diversifikace je na větších ostrovech vyskytujících se na hranici distribučního dosahu pevninských taxonů (Gillespie 2007, Whittaker *et al.* 2008). Biodiverzita odlehlých ostrovů z velké části vychází z evoluční adaptace několika prvních pionýrských druhů a obvykle tedy zahrnuje velké množství endemických druhů.

Úspěch druhů kolonizujících ostrov závisí z velké části na dostupnosti životního prostoru, kde se daný druh může uchytit, růst a rozmnožovat se. Výhodou jsou v tomto případě mladší ostrovy, kde ještě není tak velká konkurence dalších druhů. Kolonizující druhy prochází mnoha změnami. Jednak to jsou změny ekologické, které umožní expanzi druhů na další volná stanoviště. Dalšími významnými změnami jsou evoluční změny. Na mnoha odlehlých souostrovích je časté adaptivní šíření druhu z jediného kolonizujícího jedince nebo malé skupiny. Může se stát, že se v této malé skupině vyskytne určitá chromosomová aberace, která se pak ve vznikající populaci snadno rozšíří a stabilizuje. Tento jev se označuje jako tzv. efekt zakladatele. Geografická izolace ostrovní populace umožní hromadění dalších mutací v genomu, až nakonec může vzniknout i nový druh se specifickou chromosomovou přestavbou.

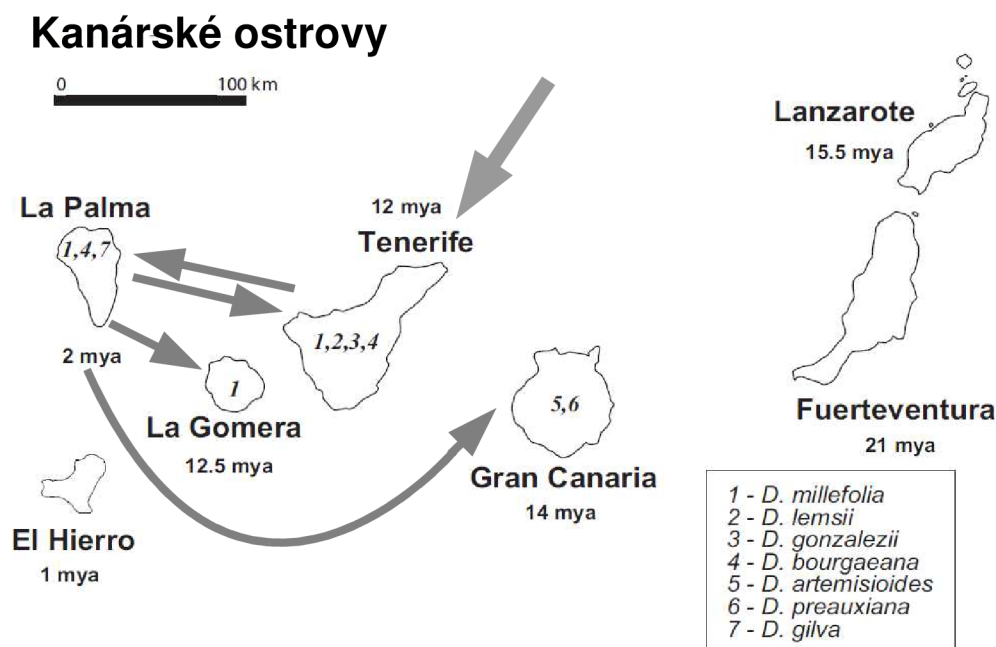
Pevninské taxony, ze kterých pochází kolonizující druhy, obvykle rostou ve velmi odlišných podmínkách oproti druhům ostrovním. Z tohoto důvodu mohou ostrovní populace postupně vyhynout, nebo se naopak zachovávají, přestože rodičovský taxon na pevnině už zaniknul. Důvody přežití jsou různé – menší kompetice ostatních druhů na ostrovech, mírnější klima, ekologická katastrofa na pevnině. Ostrovní druhy se pak považují za relikty a obvykle se vyskytují na starších ostrovech (Gillespie 2007). Příkladem jsou druhy *Myrica faya* a *Myrica rivas-martinezii* z rodu voskovník (čeleď voskovníkovité, *Myricaceae*) rostoucí na Havaji a na Kanárských ostrovech (Huguet *et al.* 2005). Druhy rostoucí na ostrovech jsou ale také více náchylné k vyhynutí vlivem náhodných jevů. Mívají omezený rozsah šíření a populace jsou obvykle malé. Vyhynutí populace může způsobit kompetice invazivních druhů, znehodnocení místa výskytu geologickými a klimatickými změnami a další klíčové události formující ostrovní biotu. V neposlední řadě je potřeba zmínit vliv lidské činnosti, a to nejen jako příčinu vyhynutí ostrovních druhů, ale také jejich šíření na další ostrovy (Gillespie 2007).

Kanárské ostrovy se nachází západně od pobřeží jižního Maroka v Atlantickém oceánu a jsou sopečného původu. K vyzvednutí nejstarších částí nad hladinu oceánu došlo na konci oligocénu (před asi 25 miliony let). Stálá sopečná činnost má silný vliv na podobu jejich krajiny. Mladší lávy zatuhlé v nejrůznějších tvarech ještě netvoří půdu, ale jsou často osidlovány lišejníky a pionýrskými druhy rostlin zavlečenými větrem nebo prostřednictvím ptáků z pevniny (Schönfelder a Schönfelder 2002, Padilla *et al.* 2012). Některé druhy nekolonizují ostrovy pouze jednou, jako například endemický druh večernice kanárská *Matthiola bolleana* (*Brassicaceae*). Její jednotlivé populace na ostrovech Lanzarote a Fuerteventura jsou geneticky značně odlišné. Proto je pravděpodobné, že došlo k více

nezávislým kolonizacím z pevniny (Jaén-Molina *et al.* 2009). Na Kanárských ostrovech je přes 40 % druhů kvetoucích rostlin endemických (Gillespie 2007). Patří do nich i sedm druhů úhorníků (*Descurainia*), jejichž karyotyp je předmětem výzkumu této diplomové práce.

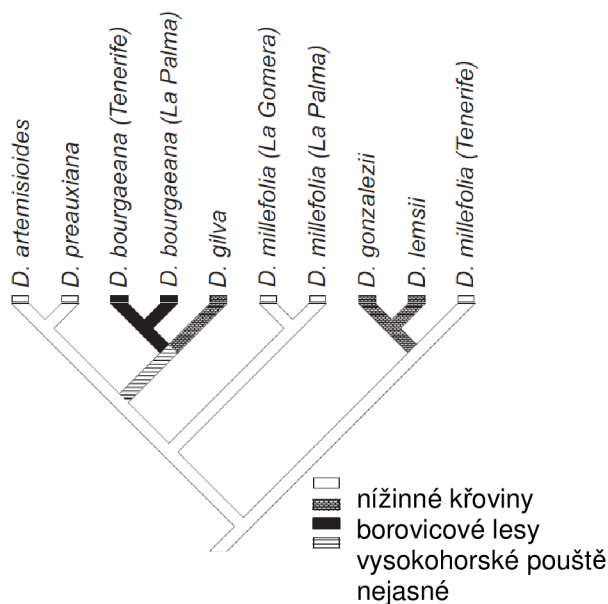
1. 3. 5. Šíření úhorníků na Kanárských ostrovech

Celá skupina kanárských úhorníků je monofyletická, pochází tedy z jediné kolonizace. Jejím počátkem byl ostrov Tenerife, kam úhorníky přišly před 1,8-2 miliony let (Goodson *et al.* 2011, Hewitt 1996). Z analýzy sekvencí chloroplastové DNA (cpDNA, Goodson *et al.* 2006) vyplývá, že se úhorníky po příchodu na Kanárské ostrovy rozdělily na dvě hlavní linie. Jedna zůstala na ostrově Tenerife, který byl kolonizován jako první. Sem patří *D. lemsii*, *D. gonzalezii* a některé populace *D. millefolia*. Druhou větev tvoří úhorníky, které se rozšířily na další ostrovy. Po Tenerife byl kolonizován ostrov La Palma. Sem se rozšířil druh *D. millefolia* a vznikly druhy *D. gilva* a *D. bourgaeana*. Expanze úhorníků probíhala i opačným směrem, a proto se na Tenerife dostal druh *D. bourgaeana*. Z ostrova La Palma pokračovalo šíření nejdříve na ostrov La Gomera (*D. millefolia*) a později na ostrov Gran Canaria (*D. preauxiana*, *D. artemisioides*). Výměna genů z populací těchto ostrovů zpět na ostrov La Palma nebo mezi sebou zatím nebyla prokázána.



Obr. 3: Kolonizace Kanárských ostrovů úhorníky – směr jejich šíření od první kolonizace. Čísla označují rozšíření jednotlivých druhů. Stáří ostrovů je udáno v milionech let (mya – millions years ago). Upraveno z Goodson *et al.* 2006.

Kanárské úhorníky se během kolonizace nových ostrovů přizpůsobily různým životním prostředí. Adaptace jednotlivých úhorníků na nové ekologické stanoviště by mohla souviset s druhově specifickými přestavbami chromosomů. Obsazení různých stanovišť zřejmě koreluje s postupným šířením úhorníků. První úhorník se dostal na ostrov Tenerife přes moře (větrem, vodou nebo s ptactvem) a rozšířil se v oblasti nížinných křovin. Tam vznikl druh *D. millefolia* a ze stejné větve se pak úhorníky rozšířily na horní hranici borových lesů ostrova (*D. gonzalezii* a *D. lemsii*). Předek *D. millefolia* se dále rozšířil do nížinných křovin ostrova La Palma. Odtud se úhorníky šířily do vyšších poloh borových lesů (*D. gilva*) a stále výše do pouští ve velkých nadmořských výškách, kde nejspíše vznikl druh *D. bourgeana* (a posléze se rozšířil zpět na ostrov Tenerife). Druhy *D. preauxiana* a *D. artemisioides* rostou především v nížinných křovinách ostrova Gran Canaria a vyvinuly se pravděpodobně z nížinného předka *D. millefolia* (Goodson *et al.* 2006).



Obr. 4: Rekonstrukce vztahů mezi kanárskými úhorníky metodou maximální parsimonie fylogenetické analýzy cpDNA, jejich souvislost s ekologickou zónou výskytu (Goodson *et al.* 2006).

Je zajímavé, že populace *D. gonzalezii* z Las Canadas (Tenerife) byla analýzou cpDNA zařazena do větve úhorníků rozšířených na další ostrovy, zatímco jiná populace *D. gonzalezii* z lokality Vilaflor (Tenerife) byla zařazena do větve zůstávající na Tenerife. Je možné, aby se populace *D. gonzalezii* rozšířila na jiný ostrov a migrovala zpět na Tenerife, aniž by na ostrově La Palma zanechala jakékoliv stopy? Odpověď se podařilo nalézt díky analýze chromosomových počtů (Bramwell 1977, Suda *et al.* 2003). V populaci *D. gonzalezii* v Las Canadas byli zjištěni nejen diploidní rostliny, ale i jedinci s triploidním a tetraploidním

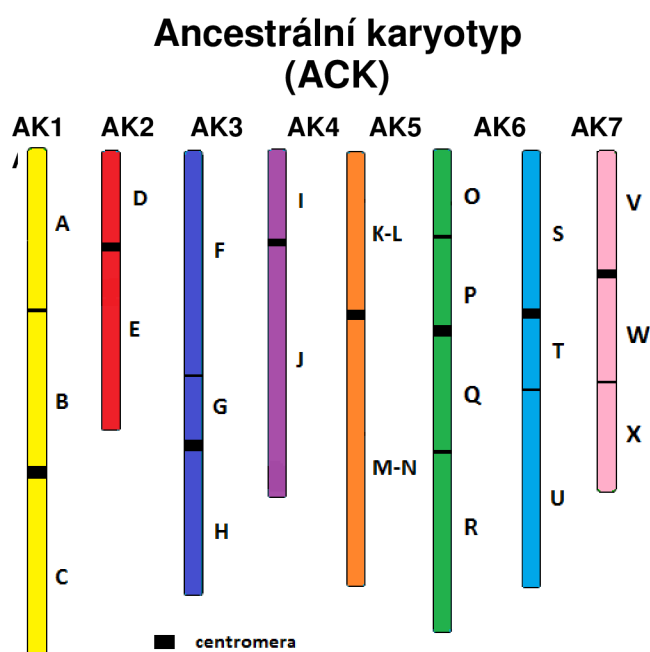
počtem chromosomů. Všechny ostatní druhy Kanárských úhorníků jsou výhradně diploidní. Populace zde není příliš velká a roste sympatricky s druhem *D. bourgeana*. Je tedy pravděpodobné, že *D. gonzalezii* zde hybridizuje s dalším druhem a *D. bourgeana* je geograficky nejpříhodnější. Smíšené geny cpDNA těchto dvou druhů v populaci pak způsobily zařazení druhu *D. gonzalezii* do větve úhorníků expandujících na další ostrovy, přestože nikam neexpandoval (Bramwell 1977, Suda *et al.* 2003, Goodson *et al.* 2006).

1. 4. Ancestrální karyotyp čeledi brukvovitých (ACK)

S postupujícím výzkumem karyotypů brukvovitých rostlin byla stále důležitější otázka: jak vypadal karyotyp společného předka celé čeledi? Na základě fylogenetických analýz rDNA (rody *Arabidopsis* a *Arabis*) měl předek chromosomové číslo $n = 8$, ze kterého pochází odvozené počty $n = 5$, $n = 6$ a $n = 7$ (Koch *et al.* 1999), a které je také nejčastějším chromosomovým počtem v čeledi (Warwick a Al-Shehbaz 2006).

První studie evoluce karyotypu byly cílené na huseníček rolní (*Arabidopsis thaliana*), jeho blízké příbuzné druhy a ekonomicky významné druhy patřící zejména do tribu *Brassicaceae*. Problémy však způsoboval paleopolyploidní původ tribu *Brassicaceae*, i jeho relativně velká fylogenetická vzdálenost od tribu *Camelineae* (*A. thaliana*, Lysak *et al.* 2005, Parkin *et al.* 2005). *Arabidopsis thaliana* je první rostlinou s osekvenovaným genomem (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000). Vybrána byla hlavně kvůli nízkému chromosomovému počtu ($n = 5$) a malé velikosti genomu. Protože ale většina brukvovitých rostlin má základní chromosomové číslo $x = 8$, *A. thaliana* není ideálním referenčním genomem při rekonstrukci evoluce genomu v čeledi brukvovitých. Srovnávacím genetickým mapováním byly analyzovány genomy dvou druhů tribu *Camelineae* s osmi chromosomovými páry – *Arabidopsis lyrata* (Kuittinen *et al.* 2004, Yogeewaran *et al.* 2005) a *Capsella rubella* (Boivin *et al.* 2004), a tyto porovnány s genomem *A. thaliana*. Ukázalo se, že oba genomy (*A. lyrata* i *C. rubella*) jsou z většiny kolineární s genomem *A. thaliana*. Studované genomy také sdílejí rozsáhlé konzervované genomické bloky. Srovnávací sekvenční analýzy druhu *Brassica napus* pomohly identifikovat nejméně 21 konzervovaných genomických bloků v genomu *A. thaliana*, které (s duplikacemi a přestavbami) zahrnují 90 % genomu *B. napus* (Parkin *et al.* 2005). Mimo jiné také vyšlo najevo, že diploidní druhy *Brassica* pochází z

hexaploidního předka (Lysak *et al.* 2005, Parkin *et al.* 2005). Schranz a kolektiv (2006) na základě porovnání genetických map *A. lyrata*, *A. thaliana* a *C. rubella* s genomem brukve (*Brassica rapa*) navrhli ancestrální karyotyp (ancestral crucifer karyotype, ACK) s osmi páry chromosomů ($n = 8$). Ancestrální chromosomy byly rozděleny do 24 konzervovaných genomických bloků (rozšíření 21 genomických bloků dle Parkin *et al.* 2005), označených písmeny A-X (Schranz *et al.* 2006). V nejnovější studii Lysak a kolektiv (2016) vyhodnotili organizaci genomických bloků na základě cytogenetických analýz 35 brukvovitých druhů a navrhli redukcí čtyř genomických bloků (K, L, M a N) na dva (K-L, M-N). V nově definovaném ancestrálním karyotypu je tedy 22 konzervovaných genomických bloků, z nichž 10 zahrnuje celé chromosomové raménko a 12 zbývajících je v párech na šesti různých chromosomových raménkách (Lysak *et al.* 2016).



Obr. 5: Ancestrální karyotyp brukvovitých rostlin (ACK), 8 chromosomových párů, 22 konzervovaných genomických bloků A-X (podle Lysak *et al.* 2016).

Pro následné srovnávací malování chromosomů byly použity sondy ze sad chromosomově specifických BAC klonů *A. thaliana* (bacterial artificial chromosome - umělý bakteriální chromosom s vloženou cizí DNA, viz kapitola 3.3.), seřazených a nabarvených podle kolineárních genomických bloků *A. lyrata* a *C. rubella* (Lysak *et al.* 2006). Tyto sondy byly hybridizovány na chromosomy druhů z tribu *Camelineae*: *A. lyrata*, *A. thaliana*, *C. rubella*, *Neslia paniculata* ($n = 7$), *Turritideae*: *Turritis glabra* ($n = 6$) a tribu *Descurainieae*: *Hornungia alpina* ($n = 6$). Byla potvrzena kolinearita konzervovaných chromosomových

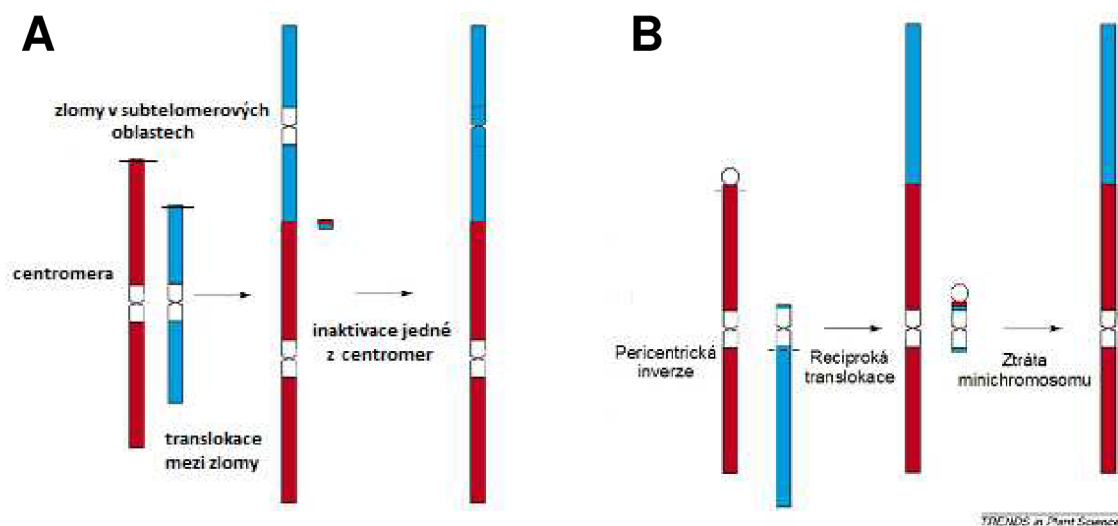
bloků mezi všemi studovanými druhy. Tímto byl potvrzen ACK, coby předek studovaných druhů, a byla umožněna rekonstrukce evoluce karyotypu odvíjející se od pravděpodobného ancestrálního karyotypu (Lysak *et al.* 2006).

1. 4. 1. Změny karyotypu v průběhu evoluce brukvovitých rostlin

Po celogenomové duplikaci α (společné pro čeleď *Brassicaceae*) prošly některé skupiny brukvovitých rostlin i dalšími polyploidizacemi. Tyto druhy prochází diploidizací genomu, tedy snižováním chromosomového počtu, zatím ale mají chromosomové číslo stále vyšší než ACK ($n = 8$), nebo diploidizace už proběhla a druhy jsou tedy podle chromosomového počtu diploidní, přestože mají většinu nebo i všechny genomické bloky duplikované oproti ACK. Na příklad v tribu brukví (*Brassicaceae*, linie II, klad B) došlo k hexaploidizaci genomu, patrně před 7,9-14,6 miliony let (Lysak *et al.* 2005, 2007). Předek tribu *Brassicaceae* prošel celogenomovou duplikací za vzniku tetraploidní rostliny. Ta se zkřížila s jedincem s diploidním genomem za vzniku hexaploidního předka dnešních brukví. Po této události proběhla diploidizační redukce genomu, a proto je současná brukev zelná (*Brassica oleracea*, $2n = 18$) funkčně diploidní (Parkin *et al.* 2005, Ziolkowski *et al.* 2006). V tribu *Microlepidieae* (linie I, klad A) proběhla celogenomová duplikace před asi 5,9 miliony let. Následovala diploidizační redukce karyotypu, a to až na chromosomový počet nižší, než je u ACK ($n = 8$): *Stenopetalum nutans* $n = 4$, *Stenopetalum lineare* $n = 5$, *Ballantinia antipoda* $n = 6$. Po této celogenomové duplikaci a diploidizaci prošly přeskládané genomy některých druhů další duplikací bez následné diploidizační redukce karyotypu: *S. anfractum* ($n = 10$) a *S. velutinum* ($n = 8$, Mandáková *et al.* 2010a).

Klesající chromosomový počet je ale patrný i u diploidních rostlin, které po celogenomové duplikaci α neprošly žádnou další polyploidizací. Společný předek čeledi měl osm chromosomových párů, ale mnoho druhů jich má méně (např. úhorník, *Descurainia*, $n = 7$). Jaké jsou nejčastější mechanismy redukce karyotypu? Z analýz druhů se sníženým chromosomovým počtem ($n = 5, 6, 7$) vyplývá, že nejčastějšími přestavbami chromosomů u brukvovitých rostlin jsou inverze a translokace. Redukce chromosomového počtu je typicky zprostředkovaná vytvořením fúzního chromosomu translokací mezi chromosomovými konci dvou nehomologních chromosomů. Tím vznikne chromosom se dvěma centromerami a

chromosomový fragment dvou subtelomerických oblastí, který je v průběhu dělení buňky ztracen. Jedna z centromer fúzního chromosomu je později inaktivována nebo vyštěpena, aby se zabránilo roztržení chromosomu během anafáze (viz obr. 6A, Mandáková *et al.* 2010a, Murat *et al.* 2015). Jiným velmi častým mechanismem je tvorba akrocentrických chromosomů pericentrickou inverzí, reciprokou translokací mezi dvěma chromosomy a následně eliminací minichromosomu vzniklého při translokaci. Tímto způsobem vznikl například karyotyp *A. thaliana* (viz obr. 6B, Lysak *et al.* 2006)

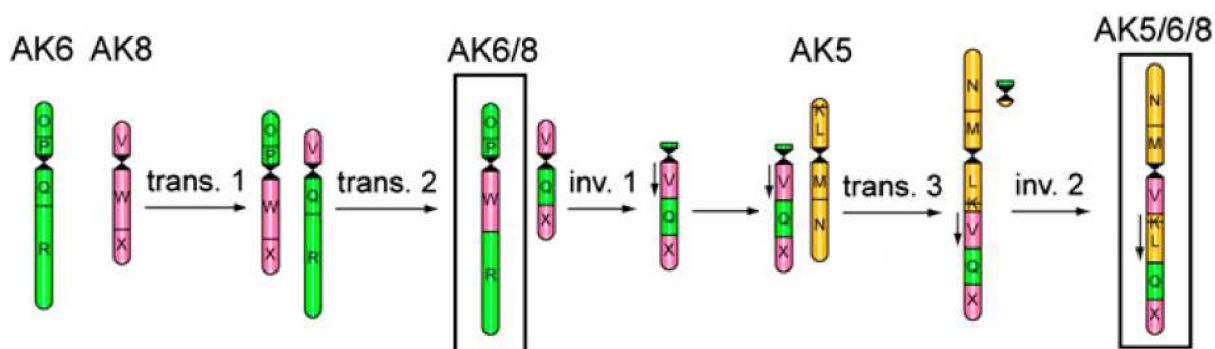


Obr. 6.: Mechanismy redukce chromosomového počtu u brukvovitých. **Varianta A:** schéma translokace mezi zlomy v subtelomerických oblastech dvou chromosomů, inaktivace jedné z centromer (podle Mandáková *et al.* 2010a). **Varianta B:** Schéma redukce karyotypu prostřednictvím pericentrické inverze a reciproké translokace (Schranz *et al.* 2006, upraveno).

Mandáková a Lysak (2008) zkoumali evoluci karyotypu šesti rodů z rozšířené linie II (klad B) s chromosomovým číslem $n = 7$. Triby *Coringieae*, *Calepineae* a *Coluteocarpeae* (dříve *Noccaeae*) sdílejí strukturu dvou fúzních chromosomů AK6/8 a AK5/6/8. Některé druhy (*Goldbachia laevigata*, *Calepineae* a *Noccaea caerulescens*, *Coluteocarpeae*) pak mají navíc další inverze a rody *Calepina* a *Goldbachia* prošly celogenomovou duplikací. Všechny tyto rody ale pochází ze společného předka se sedmi chromosomovými páry. Pět chromosomů odpovídá struktuře ACK (AK1-4, AK7) a dva jsou přestavěné (chromosomy AK6/8 a AK5/6/8, viz obr. 7). Karyotyp je odvozený z ACK ($n = 8$) a označuje se jako Proto-Calepineae Karyotyp (PCK). Chromosom AK6/8 pravděpodobně vznikl díky dvěma reciprokým translokacím mezi chromosomy AK6 a AK8 (viz obr. 7, Mandáková a Lysak 2008). U dalších zkoumaných tribů *Isatideae*, *Sysimbrieae* a *Eutremeae* byla objevena

evolučně mladší varianta PCK, obsahující navíc jednu další reciprokní translokaci. Výměnou krátkých ramének chromosomu AK2 (genomický blok D) a chromosomu AK5/6/8 (blok M-N) vznikly rekombinantní chromosomy AK2/5 a AK2/5/6/8. Tato odvozená varianta PCK se označuje jako tPCK (Mandáková a Lysak 2008, Cheng *et al.* 2013). Genomová struktura tPCK byla potvrzena sekvenováním genomů druhů *Thellungiella salsuginea* (Wu *et al.* 2012) a *Schrenkiella parvula* (Dassanayake *et al.* 2011). Analýzy karyotypů dalších druhů potvrdili tPCK jako společného předka i u tribu *Brassiceae* (Cheng *et al.* 2013).

Vznik rekombinantních chromosomů PCK



Obr. 7: Schéma vzniku rekombinantních chromosomů AK6/8 a AK5/6/8 (Proto-Calepineae Karyotyp, PCK, Mandáková a Lysak 2008, upraveno).

1. 5. Malování chromosomů

Malování chromosomů je značení rozsáhlých chromosomových oblastí nebo celých chromosomů metodou FISH (fluorescenční in situ hybridizace). Termín malování chromosomů (chromosome painting) poprvé použil Pinkel *et al.* (1988), když hybridizovali chromosomově specifické sondy. Jejich fluorescence identifikovala chromosomy 4 a 21 karyotypu člověka a usnadnila tak identifikaci translokace a aneuploidie těchto chromosomů (Pinkel *et al.* 1988). Metoda se běžně používá při studiu savců (Yang *et al.* 1997), ptáků (Nie *et al.* 2009), hmyzu (Fuchs *et al.* 1998b) i při klinických diagnostických testech (Liehr *et al.* 2013).

Obtížnější bylo docílit malování chromosomů rostlin. Hlavním důvodem bylo množství repetit (retroelementy, tandemové repetice) rozptýlených mezi více chromosomy. U živočichů bylo zabráněno vazbě sond na tyto repetice přidáním nadbytečného množství

neoznačené celogenomové DNA. Technika se nazývá chromosomová in situ suprese (CISS, Lichter *et al.* 1988), bohužel u rostlin nezabránila nespecifické vazbě sondy na celé chromosomy. Pravděpodobnou příčinou selhání této metody byl nadbytek roztroušených repetitivních sekvencí ve srovnání s genomy živočichů. Navíc u rostlin bývají unikátní chromosomové sekvence pro vazbu sondy příliš daleko od sebe, odděleny oblastmi repetitivních sekvencí. Výsledný signál po malování chromosomů je proto příliš slabý, než aby se daly rozlišit konkrétní chromosomy (Schubert *et al.* 2001). Další možnou příčinou je rozdílná organizace rostlinného genomu. Jednotlivé chromosomy rostlin mají velmi podobný poměr bází AT:CG, což bylo vyloženo jako známka aktivní mezichromosomové homogenizace sekvencí. Prostřednictvím nerovnoměrného crossing-overu mezi homologními chromosomy a genové konverze (změna sekvence jedné alely genu podle druhé alely na sesterském chromosomu) jsou původně specifické sekvence šířeny mezi ostatní chromosomy (Schwarzacher *et al.* 1997).

Prvního malování chromosomů rostlin bylo dosaženo tzv. genomovou in situ hybridizací (GISH) s využitím genomové DNA jako sondy. Rodičovské genomy rostlinného hybridu (*Hordeum chilense* × *Secale africanum*) byly označeny rozdílnými fluorescenčními barvami a následně hybridizovány k chromosomům hybridu (Schwarzacher *et al.* 1989). Tato metoda funguje pouze u mezidruhových hybridů a jejich rodičů, přesto je často využívána. Pomocí GISH byl zjištěn původ allotetraploidního druhu *Cardamine flexuosa* (*Brassicaceae*, $2n = 32$), který vznikl zkřížením druhů *C. amara* a *C. hirsuta* (obě $2n = 16$, Mandáková *et al.* 2014). Také u řeřichy (*Lepidium*, *Brassicaceae*) byla metoda GISH využita k odhalení původu polyploidních druhů z Austrálie a Nového Zélandu. Tyto řeřichy vznikly hybridizací afrického druhu *L. africanum* ($2n = 16$) a australského/novozélandského druhu *Lepidium muelleriferdinandi* ($2n = 56$, Dierschke *et al.* 2009).

Další pokusy o malování jednotlivých chromosomů byly provedeny s chromosomově specifickými repetitivními sekvencemi. Sonda byla připravena z amplifikované DNA, která byla získána mikrodisekcí cílového chromosomu. Tímto způsobem byla například připravena knihovna sekvencí chromosomu Y šťovíku kyselého (*Rumex acetosa*, *Polygonaceae*) a následně byly vyhledány chromosomově specifické repetice (Shibata *et al.* 1999), nebo byly také touto metodou označeny repetitivní sekvence B chromosomů rodu všelicha (*Brachycome*, *Asteraceae*). B chromosomy jsou nadpočetné k základnímu chromosomovému počtu rostliny, jsou zpravidla menší, do dceřiných buněk při dělení se rozestupují náhodně a jsou plně postradatelné, neobsahují žádné důležité geny (Houben *et al.* 1997). Dalším příkladem využití

popisované metody je nabarvení cizího chromosomu TAI-27 linie vzniklé křížením pšenice (*Triticum aestivum*, $2n = 42$) a *Thinopyrum intermedium* ($2n = 42$). Tato linie hybridů ($2n = 44$) nese nejméně dva chromosomy druhu *T. intermedium*. Sonda byla opět připravena mikrodisekcí cizího chromosomu (nápadně menší než ostatní), amplifikací a nabarvením získané DNA (Deng *et al.* 2013). Do malování chromosomů s použitím chromosomově specifických repetitivních sekvencí patří i sondy satelitové DNA a ribosomové DNA (Schubert *et al.* 2001).

U některých druhů s malým genomem a relativně nízkým obsahem repetitivních sekvencí byla úspěšně provedena metoda FISH se sondou z jednotlivých BAC-klonů (brambor *Solanum tuberosum*, *Solanaceae*, Dong *et al.* 2000, rýže *Oryza sativa*, *Poaceae*, Jiang *et al.* 1995). Systém použití BAC-klonů pro přípravu sond na malování chromosomů je blíže popsán v kapitole 3. 3. Příprava a značení BAC sond (nick translace). Výhoda této metody je vynechání amplifikace DNA. Není tedy riziko amplifikace jiného než cílového úseku v důsledku nedostatečné specifity primerů PCR.

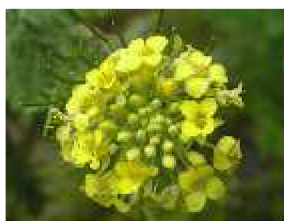
V roce 2001 se podařilo malování jednoho chromosomu *Arabidopsis thaliana* použitím sond sestavených z celých sad chromosomově specifických BAC klonů. Rozdílným barvením jednotlivých BAC-klonů bylo možné zvýraznit specifickou oblast, nebo i celý chromosom v průběhu vývoje buněk (Lysak *et al.* 2001). Vysokého rozlišení (vzdálenost rozlišitelných sond až 75 kb, Fransz *et al.* 2000) je dosaženo malováním chromosomů v pachytenní fázi profáze prvního meiotického dělení, kdy jsou chromosomy natažené v bivalentech (Lysak *et al.* 2001). Předpokladem pro úspěšné malování celých chromosomů s využitím sad BAC klonů je vytvoření knihovny BAC klonů se známým pořadím jednotlivých BAC klonů na chromosomech a relativně malý genom, který neobsahuje velké množství rozptýlených repetitivních sekvencí. Dosud byla metoda BAC-FISH úspěšně provedena u čeledi brukvovitých (Fransz *et al.* 2000, Lysak *et al.* 2001, 2005, 2007, Mandáková *et al.* 2010a, 2010b, 2013, 2015), lipnicovitých (Cheng *et al.* 2001, Ma *et al.* 2010, Wolny *et al.* 2011, 2012), bobovitých (Bonifácio *et al.* 2012, Almeida a Pedrosa-Harand 2013, Fonséca a Pedrosa-Harand 2013, Vasconcelos *et al.* 2015), lilkovitých (Tang *et al.* 2008b, Szinay *et al.* 2012) a tykvovitých (Koo *et al.* 2010, Pawelkiewicz *et al.* 2016). Malování celých chromosomů se však podařilo pouze u brukvovitých (Lysak *et al.* 2001, 2005, 2007, Mandáková *et al.* 2010a, 2010b, 2013, 2015), lipnicovitých (Idziak *et al.* 2011, Betekhtin *et al.* 2014) a u tykvovitých rostlin (bez použití BAC klonů, Han *et al.* 2015).

Srovnávací malování chromosomů (CCP, comparative chromosome painting) je velmi efektivní metodou studia evoluce chromosomů a genomů. Využívá mezidruhovou hybridizaci fluorescenčně značených chromosomově specifických sond, čímž jsou odhaleny homologní chromosomy nebo jejich části sdílené příbuznými druhy. S použitím referenčního genomu pro přípravu sond lze porovnávat strukturu jednotlivých chromosomů u různých druhů a odvodit tak změny, ke kterým došlo v průběhu evoluce celého karyotypu (Lysak *et al.* 2006) i jednotlivých aberantních chromosomů (Mandáková *et al.* 2015). V případě brukvovitých rostlin se jako referenční genom používá ACK. Skupiny BAC-klonů *A. thaliana* jsou rozděleny do 22 genomických bloků (A-X) referenčního genomu ACK. Pořadí genomických bloků na jednotlivých chromosomech pak odhalí chromosomové přestavby v průběhu evoluce (např. Lysak *et al.* 2006).

2. CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

- Určení struktury karyotypu endemických druhů úhorníků (*Descurainia*) z Kanárských ostrovů
- Hledání mezidruhové genomové kolinearity a druhově specifických chromosomových přestaveb
- Srovnání struktury karyotypu mezi ostrovními a kontinentálními druhy rodu *Descurainia*
- Stanovení vlivu chromosomových přestaveb na druhovou radiaci rodu *Descurainia* na Kanárských ostrovech

3. MATERIÁL A METODY

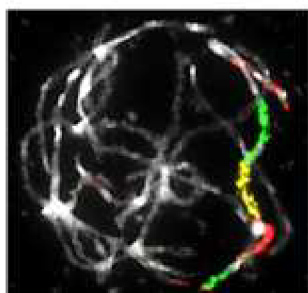


Malování chromosomů



- 3. Sběr materiálu, fixace
- 3.1. Příprava chromosomových preparátů
- 3.2. Odstranění RNA a cytoplasmy

- 3.3. Izolace BAC DNA
- 3.3. Značení sond (nick translace)
- 3.3. Příprava sondy



- 3.4. *In situ* hybridizace
- 3.5. Detekce chromosomových sond
- 3.6. Mikroskopické pozorování
- 3.6. Vyhodnocení

Obr. 8: Schéma postupu metody malování chromosomů, podrobně popsáno v následujících kapitolách. Fotky: *D. millefolia*, *E. coli*, FISH ancestrálního chromosomu 4 na chromosomech *D. gilva* (fotky *D. millefolia* González, *E. coli* Chandra).

Pro přípravu chromosomových preparátů a srovnávací malování chromosomů byl použit následující protokol (upraveno z Lysak a Mandáková 2013, Mandáková a Lysak 2008).

Použitý rostlinný materiál, původ:

- *Descurainia gilva* (La Palma)
- *Descurainia millefolia* (Tenerife)
- *Descurainia preauxiana* (Gran Canaria)

Semena rostlin byla nasbírána na Kanárských ostrovech, rostliny byly pěstovány v Botanické zahradě Přírodovědecké fakulty MU Brno.

Sběr materiálu:

- čerstvě připravená Carnoyova fixáž (96 % etanol + ledová kyselina octová, 3:1)
- 70 % etanol

1. Sběr celých květenství nebo jednotlivých poupat, fixace v Carnoyově fixáži
2. Výměna fixáže za 70 % etanol, skladování materiálu při -20 °C

3. 1. Příprava chromosomových preparátů

Většinou jsou pro cytogenetické analýzy používané mitotické chromosomy. U brukvovitých rostlin jsou však příliš malé (5 μm) a kondenzované, proto neumožňují dostatečné rozlišení fluorescenčních signálů pro malování chromosomů. Proto se zde využívají méně kondenzované chromosomy ve fázi pachytene. Pachytenní chromosomy jsou rozprostřené v bivalentech a snadno se analyzuje umístění hybridizovaných sond (Lysák *et al.* 2003). Rostlinným materiálem jsou fixovaná květenství s poupaty v různých stupních vývoje. Buňky prochází meiotickým dělením za vzniku haploidních gamet. Na preparátech z poupat různého stáří budou chromosomy v různých fázích meiózy. Mitotické chromosomy umožní snadné počítání chromosomů a lokalizaci rDNA. Jsou k nalezení ve velmi malých poupatech nebo u velkých květů v prašnicích (konkrétně v prašných pouzdrech obalujících zralé pylové buňky), někdy se využívají i dělivé meristémy kořenových špiček. Jejich použití má tu výhodu, že není potřeba, aby rostlina kvetla, stačí vyklíčený semenáček.

Fixovaná květenství se nejdříve tráví ve směsi pektolytických enzymů (pektolyáza, celuláza, cytohelikáza). Enzymy naruší pektiny a celulózu buněčné stěny, takže rostlinný materiál je měkký, snadno se z něj dělá suspenze a chromosomy nejsou překryty tak silnou vrstvou cytoplazmy. Doba trávení enzymy se liší mezi jednotlivými druhy, hlavně podle tloušťky a složení buněčné stěny.

- 1×citrátový pufr (10×citrátový pufr: 40 ml 100 mM kyseliny citronové, 60 ml 100 mM citrát trisodný, pH 4.8)
 - směs pektolytických enzymů v citrátovém pufru (0.3 % pektolyázy, 0.3 % celulázy, 0.3 % cytohelikázy)
 - 60 % ledová kyselina octová v destilované vodě
 - čerstvě připravená Carnoyova fixáž (96 % etanol + ledová kyselina octová, 3:1)
 - čerstvě připravený 4 % formaldehyd v destilované vodě
1. Opláchnout květenství destilovanou vodou, odstranit přebytečné části (poupata se zralými pylovými zrny v tyčinkách, malé lístky)

2. Vyměnit vodu za citrátový pufr, proplachovat 2×5 min
3. Vyměnit pufr za směs pektolytických enzymů, inkubovat 3 h při 37 °C ve vlhké komůrce (poupata by měla být ponořena)
4. Vyměnit směs enzymů za citrátový pufr (možno skladovat při 4 °C přes noc i déle)
5. Dát jedno z pupat na podložní sklíčko, odstranit přebytečnou tekutinu, rozsuspendovat pomocí preparační jehly
6. Přidat 20 µl 60 % kyseliny octové, položit na horkou plotýnku (50 °C) a roztírat po sklíčku asi 30 s
7. Zafixovat chromosomy 100 µl Carnoyovy fixáže, okapat a vysušit sklo fénem
8. Prohlédnout preparát na světelném mikroskopu s fázovým kontrastem, hledat pachytenní fázi chromosomů
9. Vybraná skla propláchnout 1-2 min v destilované vodě, finální fixace v 4 % formaldehydu (7 min), nechat oschnout

3. 2. Příprava preparátů k hybridizaci sond

Přípravené preparáty je nutné zbavit cytoplasmy, která překrývá chromosomy a brání přístupu značené sondy. Cytoplasma se odstraní působením roztoku pepsinu v kyselině chlorovodíkové. Také se musí z preparátu odstranit RNA enzymem ribonukleázou A, protože by způsobila pomalejší trávení cytoplasmy pepsinem a zvýšené pozadí výsledného fluorescenčního signálu (Lysak a Mandáková 2013).

- 2×SSC (20×SSC: 3 M chlorid sodný, 300 mM citrát trisodný, pH 7.0)
 - RNáza (zásobní roztok 1 µg mL⁻¹ ribonukleázy A v destilované vodě, bez obsahu DNázy)
 - pepsin (0.1 mg mL⁻¹)
 - čerstvě připravený 4 % formaldehyd v 2×SSC
 - etanol (70 %, 80 %, 96 %)
 - DAPI: 4,6-diamido-2-fenylindol ve Vectashieldu (mediu proti vyblednutí)
1. Propláchnout skla 2×5 min v 2×SSC
 2. Přidat 100 µl roztoku RNázy (10 µl RNázy + 90 µl 2×SSC), přikrýt krycím sklíčkem a inkubovat 1 h při 37 °C ve vlhké komůrce

3. Odstranit krycí sklíčko, promýt skla 2×5 min v 2×SSC
4. Pro odstranění cytoplasmy působíme pepsinem 2 min (50 µl pepsinu v 50 ml HCl, ve vodní lázni při 37 °C)
5. Opět promýt 2×5 min v 2×SSC
6. Dehydratace v etanolové řadě (70 %, 80 % a 96 % etanol), nechat oschnout
7. Přidat 15 µl DAPI ve Vectashieldu, krycí sklíčko a zkontrolovat pod fluorescenčním mikroskopem. Pokud je okolo chromosomů stále cytoplasma, propláchnout 2×5 min v 2×SSC a opakovat působení pepsinem (body 4-7.)
8. Pokud jsou chromosomy bez cytoplasmy, propláchnout 2×5 min v 2×SSC
9. Fixovat skla v 4 % formaldehydu v 2×SSC
10. Propláchnout 2×5 min v 2×SSC
11. Dehydratace v etanolové řadě (70 %, 80 % a 96 % etanol), nechat oschnout

3. 3. Příprava a značení BAC sond (nick translace)

System BAC je založený na dobře prostudovaném jednokopiovém F-plasmidu bakterie *Escherichia coli*. Do tohoto plasmidu se vloží přibližně 300 kb inzerť DNA spolu s genem pro rezistenci k antibiotiku, který umožňuje selekci transformovaných kolonií (např. chloramfenikol, Schizuya *et al.* 1992). Bakterie obsahující upravený F-plasmid jsou pak kultivovány a uloženy do speciálních sbírek – knihoven BAC klonů. Ty jsou pak využívány jako zdroj jednoduše izolovatelné DNA například k sekvenaci genomů (Farrar a Donnison 2007) nebo pro přípravu fluorescenčních sond metodou nick translace. Při tvorbě BAC knihovny *A. thaliana* (Wang *et al.* 1996) bylo použito 9,000 klonů s kratšími 60 kb inzerty. Pro sekvenaci genomu *A. thaliana* byly použity BAC klony s inzerty velikosti 100kb (The Arabidopsis Genome Initiative 2000). Plasmidové vektory mohou nést inzerť o velikosti až 500 kb, obvykle se ale používají menší. Tvorba BAC knihoven je u rostlin obtížnější než u živočichů kvůli náročné izolaci čisté DNA o velké molekulové hmotnosti. Problémy při izolaci DNA pro tvorbu BAC jsou hlavně s buněčnými stěnami a zásobními uhlovodíky v rostlinných buňkách (Peterson *et al.* 2000).

Dalším krokem při přípravě sond pro FISH je značení DNA izolované z BAC klonů *E. coli*. Metoda nick translace umožňuje začlenění značených nukleotidů do molekuly DNA. Zahrnuje dva enzymy – savčí deoxyribonukleázu I (DNáza I) a DNA polymerázu I z *E. coli*. Dále je potřebná směs neoznačených nukleotidů (dATP, dCTP a dGTP) a označených dUTP (deoxiuridin trifosfát). Na dUTP je navázáno přímo fluorescenční barvivo (např. Cy3) nebo

molekula haptenu (digoxigenin, biotin) a do molekuly se začleňují místo tyminu (Zhu *et al.* 1994). DNáza I tvoří náhodné zlomy v dvoušroubovici DNA (tzv. nicky). DNA polymeráza I svojí exonukleázovou aktivitou odstraní následující bázi ve směru od 5' k 3' a polymerázovou aktivitou doplní značené a neznačené nukleotidy podle templátu druhého vlákna (Schwarzacher a Heslop-Harrison 2000).

Značení sond probíhá v zatemněné místnosti, mikrozkuhavky s připravovanými sondami a roztoky jsou po celou dobu chlazené na ledové tříšti.

- izolovaná BAC DNA
- 10×NT pufr: 500 mM Tris.HCl (pH 7.5), 50 mM MgCl₂, 0.05 % kravské sérum albumin
- nukleotidový mix: 2 mM dATP, dCTP, dGTP, 400 mM dTTP
- 0.1 mM x-dUTP (x je biotin, digoxigenin nebo Cy3 podle cílové barvy sondy)
- 0.1 M β-merkaptóetanol
- DNáza I (1:250 ředění roztoku 1 mg mL⁻¹ DNázy v 0.15 M NaCl v 50 % glycerolu)
- DNA polymeráza I (10 μL⁻¹)
- 0.5 M EDTA (pH 8.0)
- 100 bp DNA marker (úseky DNA po 100 bp pro stanovení délky DNA vzorku)

1. Do 0.5 ml mikrozkuhavky smíchat:

- 1 μg BAC DNA v 32 μl deionizované destilované vody
- 5 μl 10×NT pufr
- 5 μl nukleotidový mix
- 1 μl komerčně dodávaného x-dUTP
- 5 μl β-merkaptóetanol (0.1 M)
- 1 μl DNázy I
- 1 μl DNA polymerázy I

2. Jemně protřepat, stočit směs

3. Inkubovat 2 h při 15 °C

4. Přenést mikrozkuhavky na led

5. Kontrola délky fragmentů elektroforézou: nanést 5 μl reakční směsi na 1 % agarózový gel spolu s 100 bp DNA markerem (elektroforéza 40 min, 100 V).

6. Pokud jsou značené fragmenty 200-500 bp dlouhé (srovnání pozice s 100 bp DNA markerem), ukončit nick translaci - přidat 1 μ l EDTA (0.5 M) a zahřát na 60 °C po dobu 10 min. Pokud jsou fragmenty delší, prodloužit inkubaci a opakovat body 4., 5.
7. Až do použití skladovat při -20 °C

3. 4. Hybridizace in situ

Původ této metody sahá až do roku 1969, kdy Pardue a Gall vyvinuli metodu zvýraznění tandemových repetitív připojením jednovláknové radioaktivní molekuly DNA komplementární k cílovým sekvencím.

Fluorescenční in situ hybridizace je metoda mikroskopické detekce specificky značených sekvencí na chromosomu. Využívají se fluorescenčně značené sondy (krátké úseky umělé DNA). Krátké zahřátí preparátu na 80 °C denaturuje chromosomovou DNA. Během pozvolné rehybridizace se krátké úseky sondy navážou ke komplementárním chromosomovým sekvencím rychleji než původní dlouhé řetězce a zviditelní tak cílovou DNA. Na sondy se následně navážou protilátky a fluorescenční barviva (tzv. detekce hybridizovaných sond).

- 3 M octan sodný (pH 5.2)
 - 70 % etanol, 96 % 0 °C etanol
 - hybridizační pufr (50 % formamid a 10 % dextran sulfát v 2 \times SSC)
 - lepidlo
1. Smíchat jednotlivě nabarvené BAC klony - 5 μ l každého BAC klonu barveného biotinem nebo digocyninem (tedy asi 100 ng DNA) a 10 μ l každého BAC klonu barveného Cy3 do 2 ml mikrokumavky
 2. Pro snížení objemu a odstranění přebytečných nukleotidů vysrážet DNA přidáním 0.1 násobek objemu směsi 3 M octanu sodného a 2.5 násobek objemu 0 °C 96 % etanolu
 3. Důkladně protřepat, ponechat nejméně 30 min při -20 °C
 4. Centrifugace 13500 \times g 30 min (předem vychlazené na 4 °C)
 5. Opatrně odstranit tekutinu (supernatant)
 6. Přidat 500 μ l 70 % etanolu, centrifugace 5min
 7. Opatrně odstranit tekutinu (supernatant) Vysušit pelet v exsikátoru

8. Rozpustit v 20 µl hybridizačního pufru, inkubovat při 37 °C přes noc (nejméně 2 h)
9. Přidat 20 µl připravené sondy na chromosomový preparát, přikrýt krycím sklíčkem, utěsnit okraje lepidlem proti vyschnutí
10. Denarovat sondu a chromosomovou DNA - zahřát na horké ploténce (80 °C, 2 min)
11. Inkubovat preparáty ve vlhké komůrce (37 °C) přes noc

3. 5. Fluorescenční detekce hybridizovaných sond

Pokud byly použity pouze přímé fluorochromy (Cy3, emise záření 570 nm), není po hybridizaci na preparát potřeba dalších imunohistochemických metod vizualizace. U sond nepřímo značených biotinem a digoxigeninem je nezbytná detekce a amplifikace signálu. Na biotin je během detekce navázána molekula fluorochromu Texas Red (avidin-Texas Red). Je však nezbytná amplifikace signálu, proto následuje vazba protilátky (anti-avidin-biotin) a opět fluorochromová molekula avidin-Texas Red (emise 610 nm). SONDY značené digoxigeninem jsou značené molekulou anti-digoxigeninu a fluorochromu Alexa Fluor 488 (emise 520 nm, Schwarzscher a Heslop-Harrison 2000).

Promývání v roztocích probíhá ve vodní lázni při 42 °C, inkubace jsou ve vlhké komůrce při 37 °C, preparáty přikryté krycím sklíčkem. Během celé detekce by preparáty neměly oschnout ani být vystaveny přímému světlu.

- 2×SSC
- 20 % formamid v 2×SSC
- 4T pufr (4×SSC, pH 7,0 + 0,05 % Tween-20)
- Blokovací roztok (5 % albumin – kraví sérum + 0,2 % Tween-20 v 4×SSC)
- TNT pufr (100 mM Tris-HCl, pH 7,5 + 150 mM NaCl + 0,05 % Tween-20)
- TNB pufr (100 mM Tris-HCl, pH 7,5 + 150 mM NaCl + 0,5 % blokovací činidlo)
- protilátky: kozí anti-avidin-biotin, kozí anti-myšičí Alexa Fluor 488, avidin-Texas Red, myšičí anti-digoxigenin
- etanol (70 %, 80 %, 96 %)
- DAPI: 4,6-diamido-2-fenylindol ve Vectashieldu (mediu proti vyblednutí)

1. Opatrně odstranit lepidlo i s krycím sklíčkem
2. Promýt 2×5 min v 2×SSC

3. Promýt 3×5 min v 20 % formamid (pro mezidruhovou in situ hybridizaci, pokud je hybridizace vnitrodruhová – homologní sekvence, pak použít 50 % formamid)
4. Promýt 2×2 min v 2×SSC
5. Promýt v 5 min 4T pufru
6. Inkubovat 30 min se 100 µl blokovacího roztoku
7. Promýt skla v 4T pufru 2×5 min
8. Inkubovat 30 min s 100 µl avidin-Texas Red v TNB pufru (1:1000)
9. Promýt skla v TNT pufru 2×5 min
10. Inkubovat 30 min s 100 µl směsi kozího anti-avidin-biotinu (1:200) a myšího anti-digoxigeninu (1:250) v TNB pufru
11. Promýt v TBT pufru 2×5 min
12. Inkubovat 30 min s 100 µl směsi avidin-Texas Red (1:1000) a kozí anti-myší Alexa Fluor 488 (1:200) v TNB pufru
13. Promýt 2×5 min v TNT pufru
14. Dehydratovat v etanolové řadě (70 %, 80 % a 96 %), nechat oschnout
15. Přidat 15 µl DAPI ve Vectashieldu, přikrýt krycím sklíčkem

3. 6. Vyhodnocení

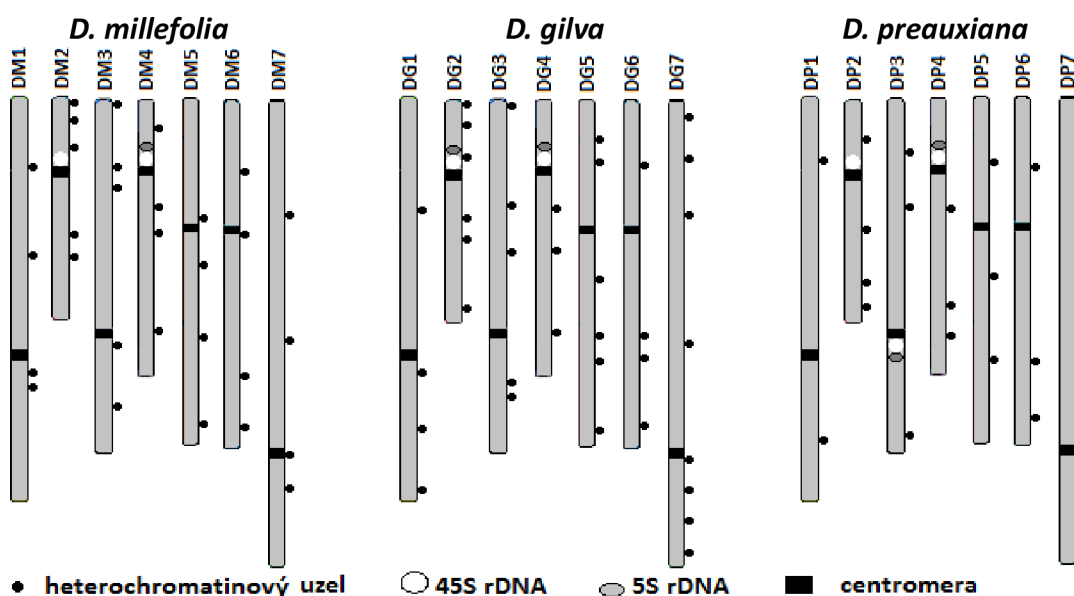
Výsledné chromosomové preparáty se prohlíží pod fluorescenčním mikroskopem. Světlo prochází přes soustavu kondenzorových čoček a tzv. budící filtr. Ten zachycuje většinu procházejícího světla s výjimkou toho, které odpovídá vlnové délce excitačního světla fluorochromu. Dopadá na obarvený preparát, fluorochromy zachytí excitační záření a přemění na emitované. Následuje bariérový filtr, který do okulárů mikroskopu propustí pouze emitované záření o delší vlnové délce a odfiltruje přebytečné záření excitační. Používají se filtry vizualizující zeleně, žlutě a červeně emitující fluorochromy na značených sondách a filtr propouštějící emitované modré záření pro viditelnost celých chromosomů. Interkalační fluorescenční barvivo 4,6-diamido-2-fenyloindol (DAPI) se váže na vazby mezi adeninem a thyminem. Pohlcuje excitační UV záření a emituje modré světlo, čímž zviditelní celé chromosomy. Vlnová délka excitačního záření se liší podle jednotlivých fluorochromů, vždy je však kratší než u záření emitovaného. Během absorpce a emise záření ve fluorochromu totiž záření přijde o část energie. Proto má např. fluorochrom Texas Red vlnovou délku excitačního záření 595 nm (žluté) a emisního záření 610 nm (červené, Schwarzacher a Heslop-Harrison 2000).

Figury chromosomových sad jsou vyfotografovány kamerou připojenou k mikroskopu. Nejdříve je vyfocena figura všech chromosomů (DAPI), pak fotografie signálů jednotlivých fluorochromů (Schwarzacher a Heslop-Harrison 2000). Po vyfocení reprezentativního počtu chromosomových figur jsou fotografie převedeny do černobílého zobrazení a exportovány. V některém z programů pro úpravu fotografií jsou pak signály sloučené do jediného barevného obrázku. Získají se tak barevné signály hybridizovaných sond na černobílém pozadí celých chromosomů. Pro vyhodnocení výsledků byl v tomto případě použit program Adobe Photoshop CS2.

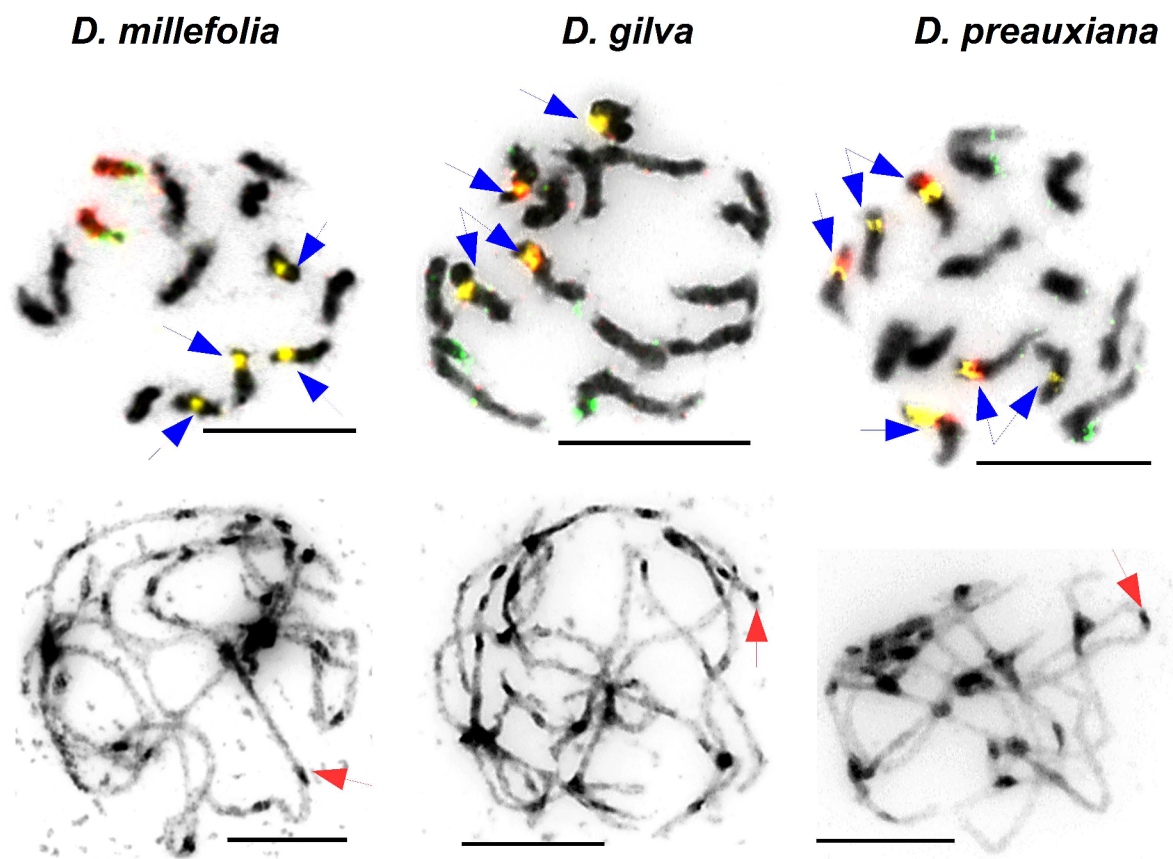
4. VÝSLEDKY

Metodou srovnávacího malování chromosomů byly zrekonstruovány karyotypy tří endemických úhorníků z Kanárských ostrovů – *Descurainia gilva*, *D. millefolia* a *D. preauxiana*. Byly použity sondy odpovídající jednotlivým chromosomům ACK, nabarvené fluorescenčními barvivy Cy3, Texas Red a Alexa Fluor 488. Podle pořadí nabarvených úseků je možné rozlišit genomické bloky na chromosomu a jejich orientaci. Všechny studované druhy mají sedm chromosomových párů. Jeden chromosomový pár je metacentrický, ostatní jsou submetacentrické (viz obr. 9).

Na chromosomech úhorníků bylo zjištěno množství heterochromatinových uzlů (viz obr. 10 spodní řada). Jedná se o akumulované repetice, na které se nehybridizují sondy pro srovnávací malování chromosomů. Počet a umístění těchto uzlů je jedním z rozdílů v karyotypech studovaných druhů. Byla určena pozice ribozomální DNA lokusů (45S a 5S rDNA). U druhu *D. millefolia* byla sonda pro rDNA použita společně se sondami pro jednotlivé ancestrální chromosomy. U druhů *D. gilva* a *D. preauxiana* byly sondy pro rDNA navázány na mitotické chromosomy spolu se sondami sestavenými z pěti markerových BAC-klonů umožňujících rozlišit jednotlivé chromosomy. Struktura chromosomů byla porovnána s chromosomy ancestrálního karyotypu ACK. U všech studovaných druhů šest chromosomů odpovídalo šesti chromosomům ACK, na sedmý chromosom se vážaly sondy ancestrálních chromosomů AK6 a AK8.



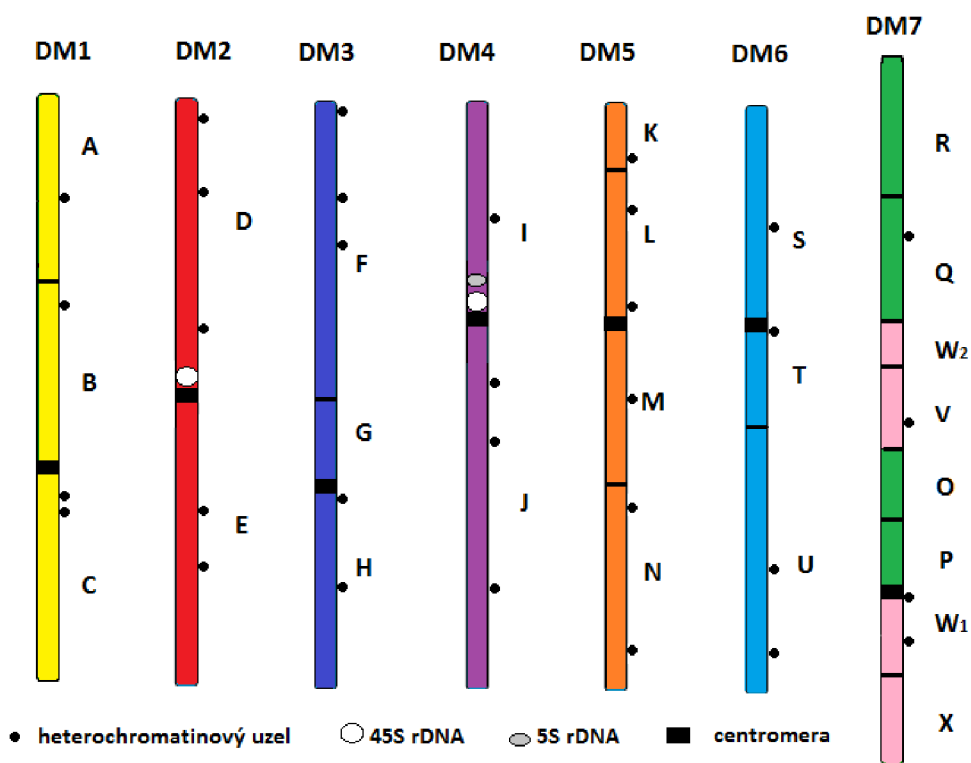
Obr. 9: Lokalizace 45S a 5S rDNA a heterochromatinových uzlů u kanárských druhů rodu *Descurainia*.



Obr. 10: Srovnání chromosomů studovaných druhů *D. millefolia*, *D. gilva* a *D. preauxiana*. V **horní řadě** jsou mitotické chromosomy, modré šipky označují lokalzaci rDNA (žlutě nabarvená sonda 45S rDNA a červeně označená 5S rDNA). *D. millefolia* má označené i mitotické chromosomy AK5 (zeleno-červený chromosomový pár), *D. gilva* a *D. preauxiana* mají na mitotických chromosomech navázány sondy markerových BAC klonů bloku X (zelené signály). V **spodní řadě** jsou fotografie pachytenních chromosomů jednotlivých druhů, červené šipky upozorňují na příklady heterochromatinových uzlů. Všechna měřítka: 10 μ m.

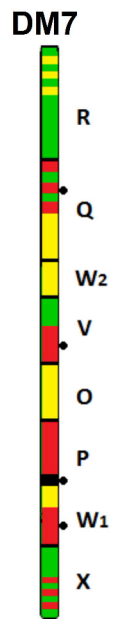
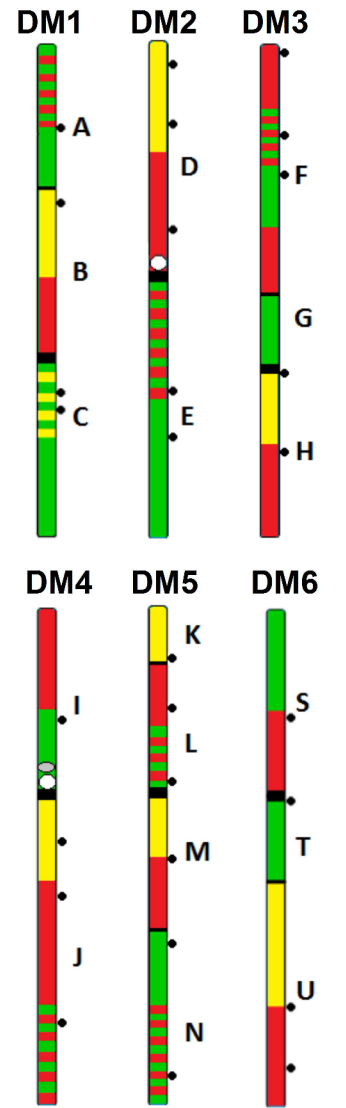
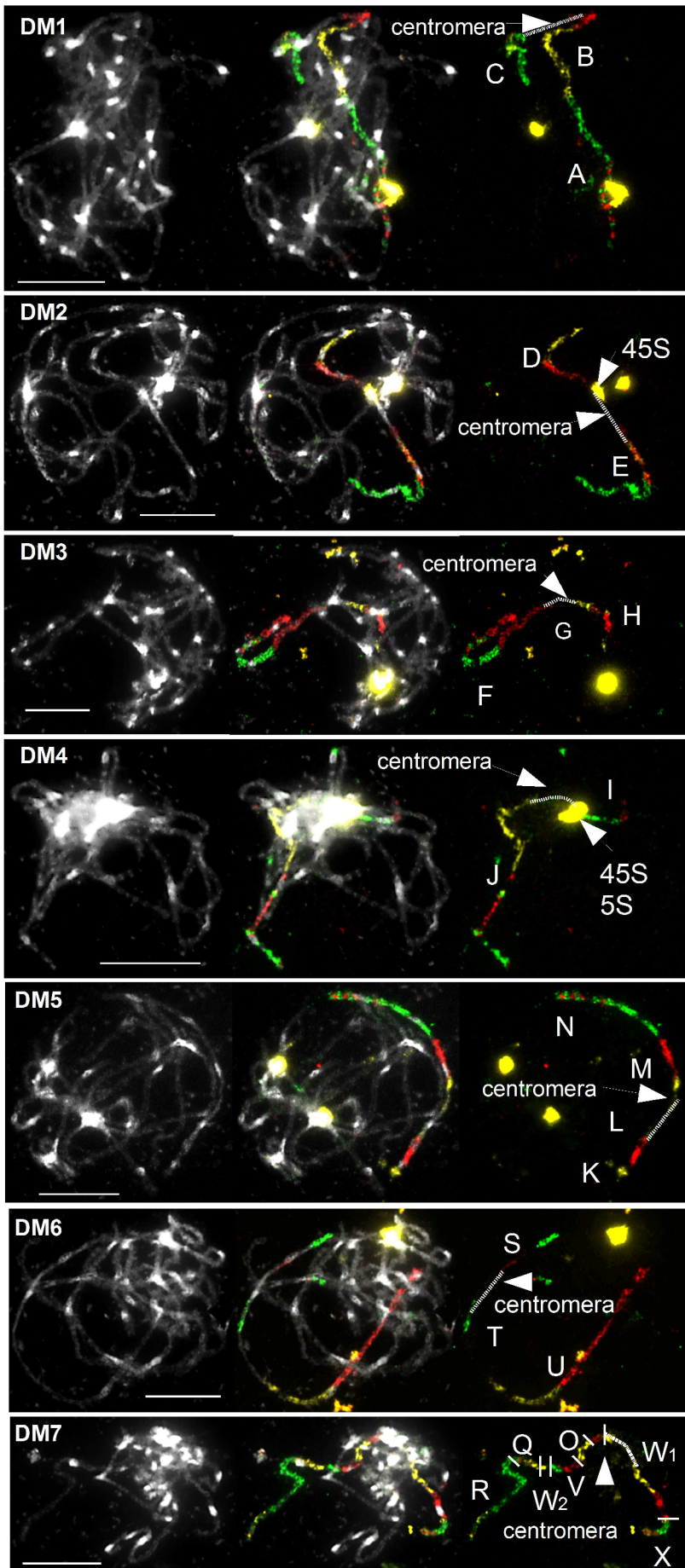
4. 1. *Descurainia millefolia*

Tento druh má dva páry chromosomů nesoucích oblasti 45S rDNA (chromosomy DM2 a DM4) a jednu oblast 5S rDNA (chromosom DM4). Bylo spočítáno celkem 32 heterochromatinových uzlů. Chromosom DM7 vznikl z ancestrálních chromosomů AK6 a AK8.



Obr. 11: Karyotyp druhu *Descurainia millefolia*. Písmeny A-X jsou označeny konzervované genomické bloky, blok W je rozdělen na dvě části (W₁ a W₂). Barva genomických bloků odpovídají jejich umístění na chromosomech ACK.

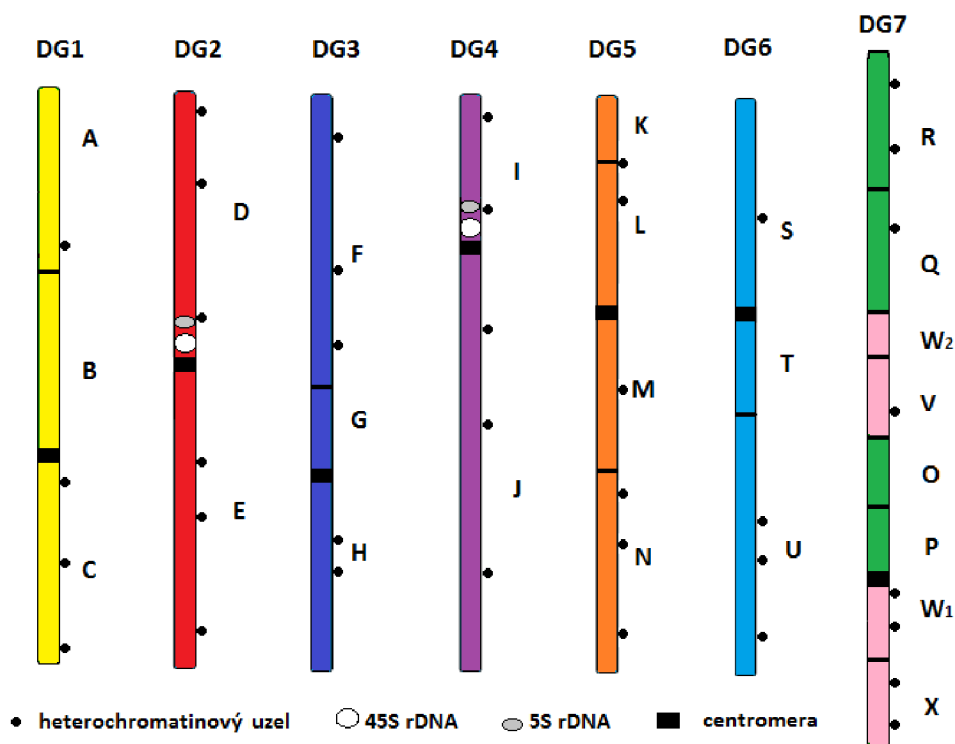
Obr. 12 (následující strana): Fotografie srovnávacího malování chromosomů *D. millefolia*. Lokalizace 45S rDNA na chromosomech DM2 a DM4, lokalizace 5S rDNA na chromosomu DM4. Písmeny A-X jsou označeny konzervované genomické bloky ACK. Žluté signály odpovídají sondám značeným Cy3, zelené signály odpovídají sondám značeným Alexa Fluor 488 a červené signály odpovídají sondám značeným Texas Red. DNA chromosomu byla vizualizována pomocí DAPI. Všechna měřítka: 10μm.



- 45S rDNA
- 5S rDNA
- centromera
- heterochromatinový uzel

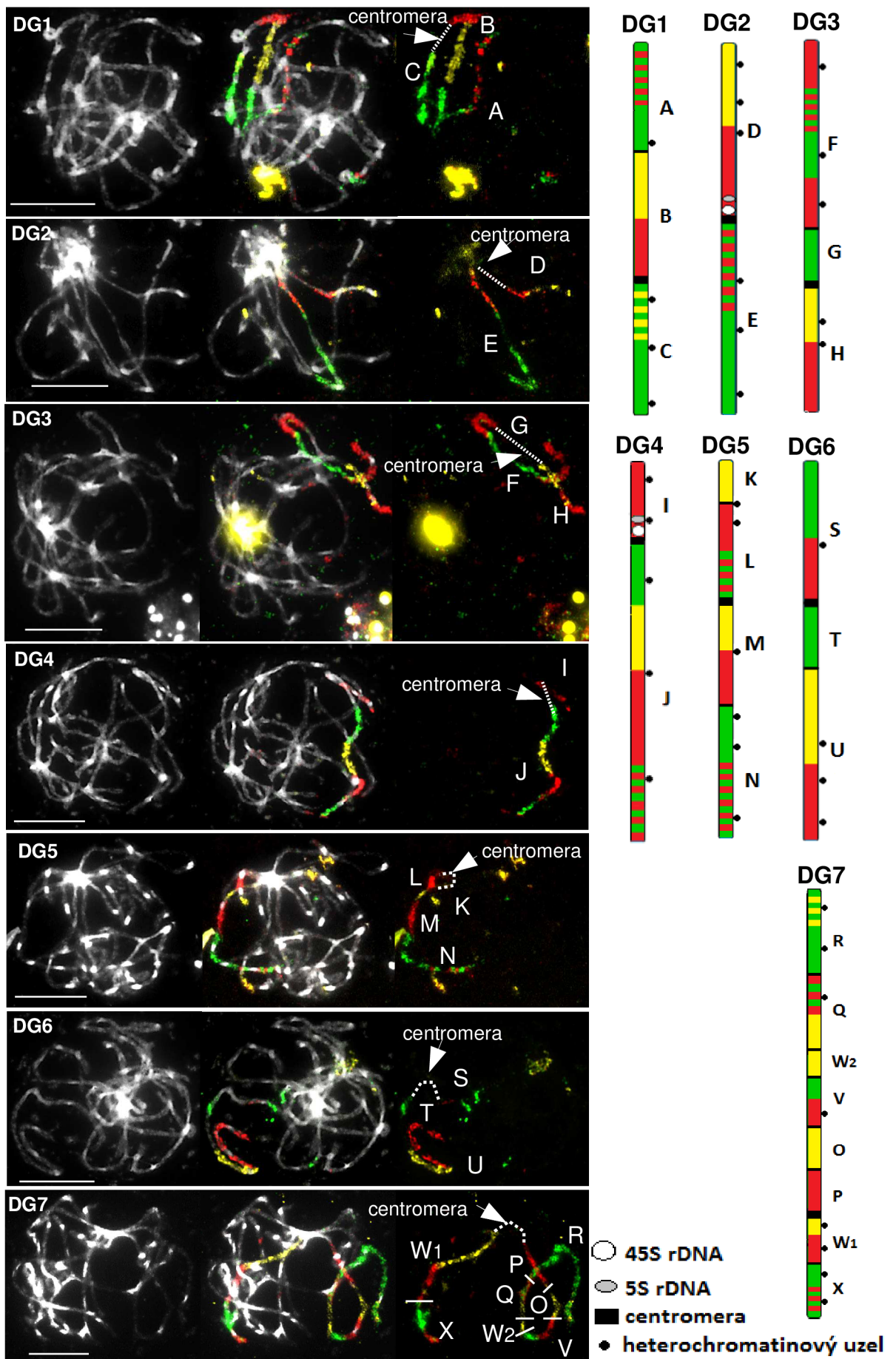
4. 2. *Descurainia gilva*

Druh *Descurainia gilva* se od předchozího studovaného druhu se liší v pozici a počtu heterochromatinových uzlů (celkem 38). Na mitotické chromosomy byla hybridizovaná sonda 45S a 5S rDNA a markerových bloků pro identifikaci chromosomů. Tímto byly lokalizovány dvě oblasti 45S a 5S rDNA (chromosomy DG2, DG4). Chromosom DG7 je stejný jako u *D. millefolia* (hybridizace sond ancestrálních chromosomů AK6, AK8).



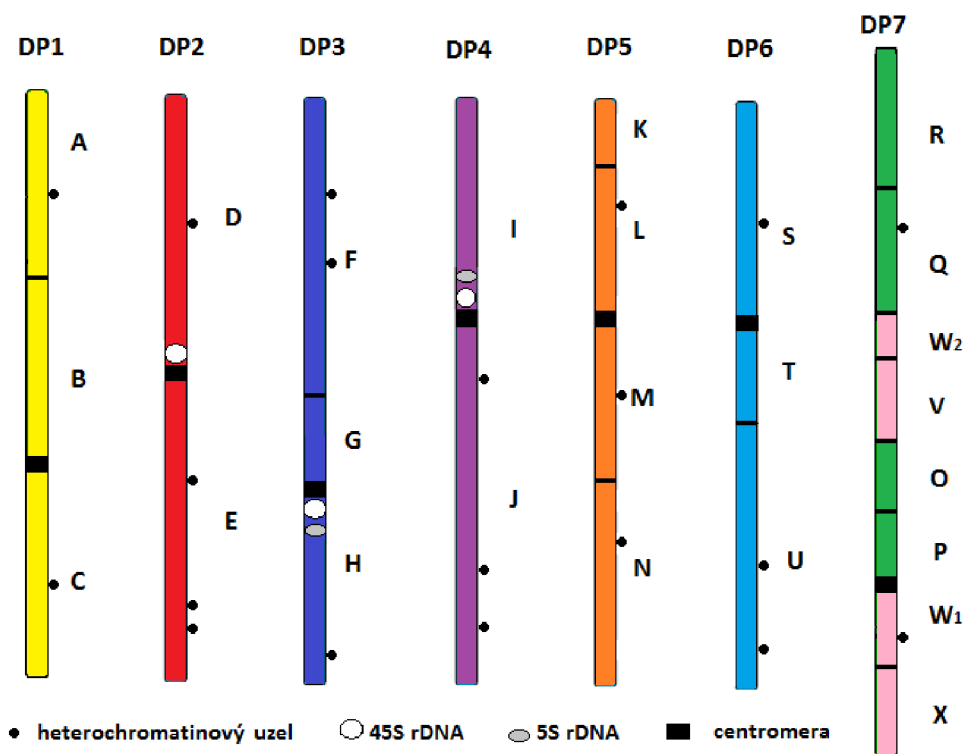
Obr. 13: Karyotyp druhu *Descurainia gilva*. Písmeny A-X jsou označeny konzervované genomické bloky, blok W je rozdělen na dvě části (W₁ a W₂). Barva genomických bloků odpovídají jejich umístění na chromosomech ACK.

Obr. 14 (následující strana): Fotografie srovnávacího malování chromosomů *Descurainia gilva*. Lokalizace 45S a 5S rDNA na chromosomech DG2 a DG4, byla zjištěna navázáním sond pro rDNA a markerové BAC-klony na mitotické chromosomy. Písmeny A-X jsou označeny konzervované genomické bloky ACK. Žluté signály odpovídají sondám značeným Cy3, zelené signály odpovídají sondám značeným Alexa Fluor 488 a červené signály odpovídají sondám značeným Texas Red. DNA chromosomu byla vizualizována pomocí DAPI. Byla změněna hranice genomického bloku I oproti *D. millefolia* a *D. preauxiana* – blok I je barven pouze biotínem a Texas Red (červená) a blok J je nově rozdělen na čtyři části (viz níže schéma DG4). Všechna měřítka: 10 μ m.



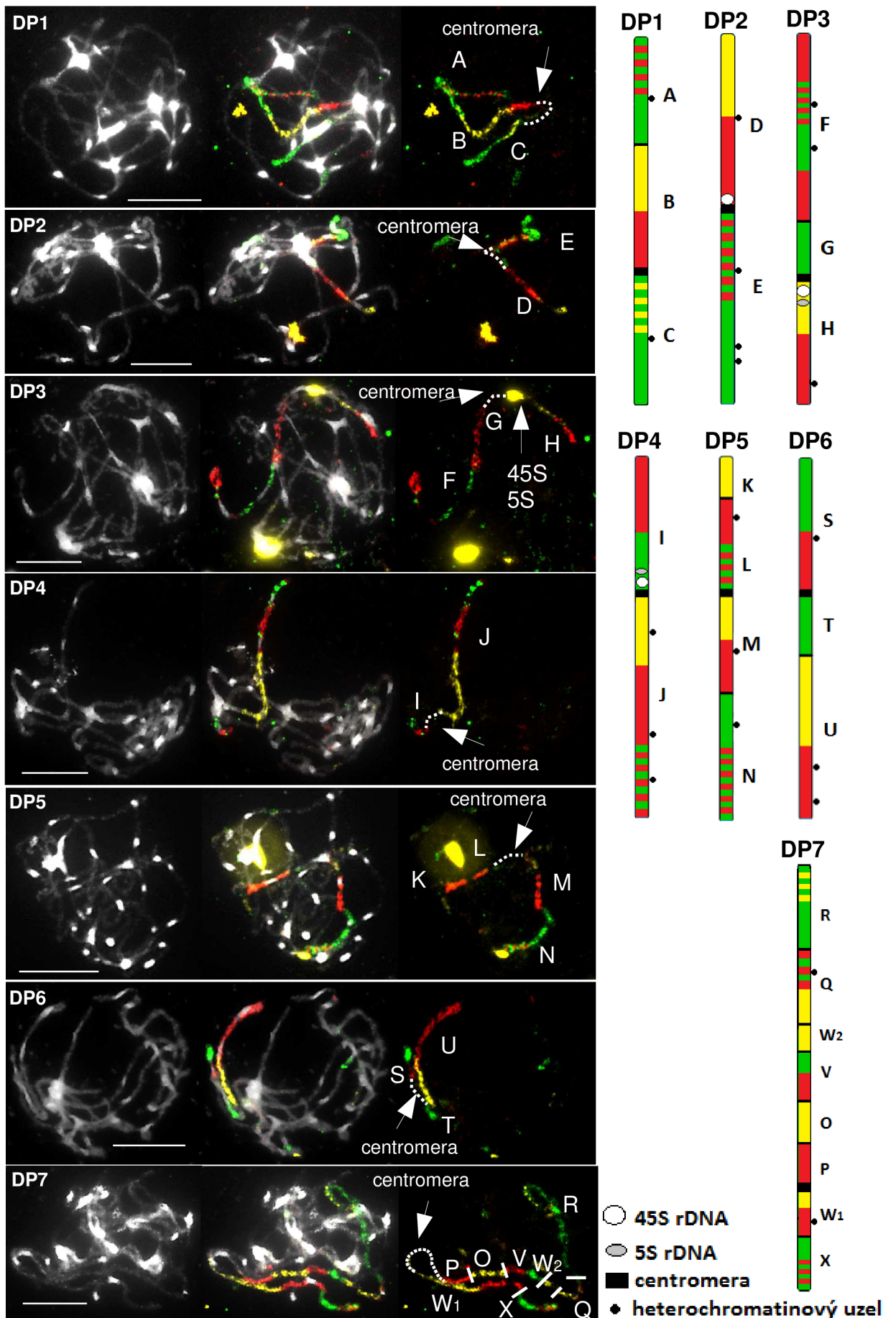
4. 3. *Descurainia preauxiana*

Druh *D. preauxiana* má celkem 20 heterochromatinových uzlů. Na mitotické chromosomy byla hybridizovaná sonda 45S a 5S rDNA a markerových bloků jednotlivých chromosomů pro identifikaci chromosomů. Tímto byly lokalizovány dva páry chromosomů s oblastmi 45S a 5S rDNA (chromosomy DP3, DP4) a jeden pár chromosomů s oblastí 45S rDNA (chromosom DP2). Na chromosom DP7 se vážou sondy ancestrálních chromosomů AK6 a AK8.



Obr. 15: Karyotyp druhu *Descurainia preauxiana*. Písmeny A-X jsou označeny konzervované genomické bloky, blok W je rozdělen na dvě části (W_1 a W_2). Barvy genomických bloků odpovídají jejich umístění na chromosomech ACK.

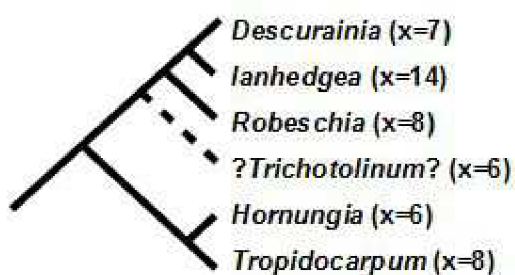
Obr. 16 (následující strana): Fotografie srovnávacího malování chromosomů *D. preauxiana*. Lokalizace rDNA na chromosomech DP2 (45S rDNA), DP3 a DP4 (45S a 5S rDNA) byla zjištěna navázáním sond pro rDNA a markerové BAC-klony na mitotické chromosomy. Písmeny A-X jsou označeny konzervované genomické bloky ACK. Žluté signály odpovídají sondám značeným Cy3, zelené signály odpovídají sondám značeným Alexa Fluor 488 a červené signály odpovídají sondám značeným Texas Red. DNA chromosomu byla vizualizována pomocí DAPI. Všechna měřítko: 10 μ m.



5. DISKUZE

5. 1. Evoluční vztahy tribu *Descurainieae*

Tato diplomová práce byla zaměřena na rekonstrukci karyotypu endemických druhů úhorníků z Kanárských ostrovů, identifikaci mechanismů zodpovědných za současnou strukturu karyotypů, chromosomové přestavby v průběhu evoluce a jejich potenciální souvislost s chromosomovou speciací u těchto druhů. Rod úhorník (*Descurainia*) patří do tribu *Descurainieae* spolu s pěti dalšími rody. Všechny zkoumané druhy úhorníků měly chromosomový počet $n = 7$. Také ostatní úhorníky (rod *Descurainia*) mají základní chromosomový počet $x = 7$. Pouze na základě základních chromosomových počtů by bylo pravděpodobné, že rod *Ianhedgea* ($x = 14$) je bližší příbuzný úhorníkům ($x = 7$) než rod *Robeschia* ($x = 8$, Warwick a Al-Shehbaz 2006). Dá se usuzovat, že po oddělení rodu *Robeschia* došlo k redukci chromosomového počtu na $x = 7$ (*Descurainia*) a následnou polyploidizaci u rodu *Ianhedgea* ($x = 14$). Podle sekvenční analýzy ITS oblastí a chloroplastové DNA je naopak rod *Robeschia* bližší příbuzný rodu *Descurainia* a k jejich rozdělení došlo před 22,5 miliony let (Goodson *et al.* 2011). U rodu *Ianhedgea* by potom muselo dojít k nezávislé redukci karyotypu (z původních $x = 8$ na $x = 7$) a následné celogenomové duplikaci ($x = 14$), nebo by společný předek *Descurainieae* měl už karyotyp redukovaný a u rodu *Robeschia* došlo k rozdělení jednoho z chromosomů na dva. Tento model je pravděpodobnější, protože i rod *Hornungia*, který se evolučně odštěpil jako první, má redukovaný karyotyp ($x = 6$).



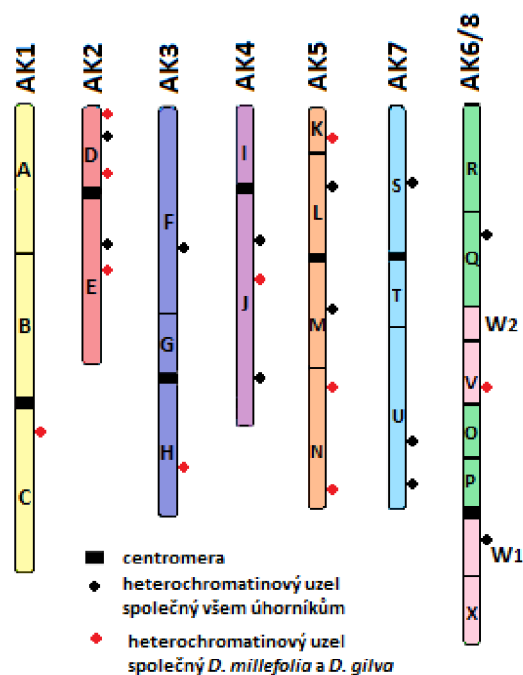
Obr. 17: Jeden z možných fylogenetických stromů tribu *Descurainieae*, v závorkách jsou uvedeny základní chromosomové počty. Rod *Trichotolinum* obsahuje jediný druh, který stále není prozkoumán (Warwick a Al-Shehbaz 2006).

5. 2. Heterochromatinové uzly

Na chromosomech studovaných druhů se vyskytuje mnoho heterochromatinových uzlů. Heterochromatin je označení konstitutivně kondenzovaného chromosomového

materiálu. Histony heterochromatinu jsou většinou metylované, což přispívá ke kondenzaci chromatinu. Transkripční aparát buňky se nemůže dostat k DNA a nedochází k expresi genů. Heterochromatinové uzly jsou malé izolované oblasti heterochromatinu oddělené většími či menšími úseky euchromatinu. Uzly obsahují akumulované repetitivní sekvence, mívají jen málo exprimovaných genů a nízkou rekombinační aktivitu. Poprvé byly objeveny u kukuřice v roce 1950 (McClintock 1950). Velké oblasti satelitní DNA jsou v subtelomerické a pericentrické oblasti a prolínají se s elementy odvozenými od retrotranspozonů (Hemleben *et al.* 2005). Také sekvenace heterochromatinových uzlů často obsahují velké množství retrotranspozonů. Opakovaná integrace retrotranspozonů do jedné oblasti může vést k tandemovým repetitím, akumulaci heterochromatinu a vytvoření uzlu (CSHL/WUGSC/PEB Arabidopsis Sequencing Consortium, 2000). Také satelitní repeticie se nejspíše mohou amplifikovat, a to nerovnoměrnou výměnou sekvencí po excizi transpozonů. Chybou excizí mezi dvěma transpozony se pak satelitní sekvence mohou šířit podobně jako mobilní element genomu (CSHL/WUGSC/PEB Arabidopsis Sequencing Consortium, 2000).

Počty a pozice těchto uzlů se liší mezi analyzovanými druhy, u 12 uzlů je však společná pozice u všech tří druhů úhorníků (viz obr. 18). Druhy *D. millefolia* a *D. gilva* jsou si zřejmě bližší než je k nim *D. preauxiana* - mají společných dalších 10 heterochromatinových uzlů (viz obr. 18). *D. preauxiana* má oproti nim výrazně méně heterochromatinových uzlů – pouze 20 oproti 32 (*D. millefolia*) a 38 (*D. gilva*). Bližší příbuznost mezi *D. millefolia* a *D. gilva* odpovídá i předpokládanému šíření úhorníků po Kanárských ostrovech. Na prvním osídleném ostrově Tenerife se vyvinul druh *D. millefolia* a dále se rozšířil na ostrov La Palma. Tam se se pak vyvinul další druh – *D. gilva* (Goodson *et al.* 2006). Proto mají mezi sebou více společného než s druhem *D. preauxiana*. Ten vznikl až později po rozšíření předka *D. millefolia* na ostrov Gran Canaria (*D. preauxiana* a *D. artemisoides*). Protože má ale *D. preauxiana* výrazně méně uzlů (jen 20) přestože je evolučně mladší, došlo zde buď ke stagnaci počtu uzlů (zatímco u ostatních druhů se jejich počet zvyšoval), nebo byly uzly v průběhu evoluce *D. preauxiana* z genomu eliminovány. Počet heterochromatinových uzlů pravděpodobně souvisí i s velikostí genomů. Bohužel je zatím známá genomová velikost jen dvou ze tří studovaných druhů – *D. millefolia* a *D. gilva* (oba mají 216 Mb, Suda *et al.* 2003), které mají podobný počet uzlů (32 a 38). Srovnání s velikostí genomu *D. preauxiana* (20 uzlů) tedy zatím není možné.



Obr. 18: Srovnání pozic a počtu heterochromatinových uzlů na chromosomech společného předka tří studovaných úhorníků. Písmena A-X značí jednotlivé genomické bloky ancestrálního karyotypu, blok W je rozdělen na dvě části (W_1 a W_2).

5. 3. Ribosomová DNA

Další ze studovaných charakteristik karyotypu byla lokalizace ribosomální DNA (rDNA) – oblasti 45S a 5S. Tyto oblasti obsahující tandemové repetice genů pro ribosomovou RNA pro malou (5S) a velkou (45S) podjednotku ribosomu. 45S rDNA je navíc oblastí organizátoru jádérka NOR (nucleolus organizer region) – části chromosomů, které během interfáze společně tvoří jádérko (Snustad a Simmons 2009).

V počátcích cytogenomických výzkumů se počet a umístění 45S a 5S rDNA využívalo k rozlišení blízkých druhů a k charakterizaci chromosomů. Tyto sekvence byly poprvé využity při sekvenování hvězdicovitých (*Compositae*) a už tehdy byly ITS slibným fylogenetickým markerem (Baldwin 1992). Při studiu rDNA však byla objevena vnitrodruhová variabilita u některých brukvovitých rostlin (*Arabidopsis arenosa*, *A.thaliana*, *Brassica juncea*, *B. napus*, *Camelina microcarpa* a další, Ali *et al.* 2005) i u dalších skupin (např. různé kultivary hrachu *Pisum sativum*, Fuchs *et al.* 1998a). Rozlišení jednotlivých druhů výhradně na základě rDNA proto není vždy spolehlivé a dnes se používá jen jako jeden z mnoha markerů.

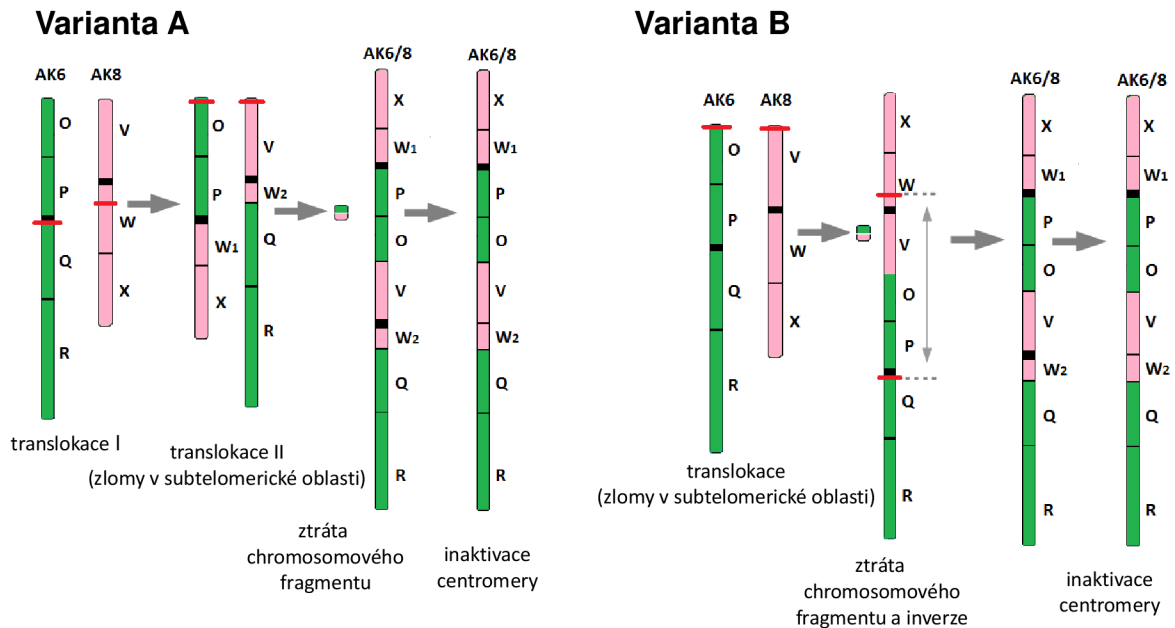
Všechny tři studované druhy mají oblasti rDNA na kratším raménku blízko centromery, 45S je vždy blíže centromere než 5S rDNA. Všechny studované druhy mají 45S i

5S na čtvrtém chromosomovém páru (krátké raménko poblíž centromery). Druh *D. gilva* má další oblast rDNA (45S i 5S) na druhém chromosomovém páru. *D. millefolia* a *D. preauxiana* má na chromosomu 2 pouze oblast 45S rDNA. Druh *D. preauxiana* má oblast 45S a 5S rDNA i na třetím chromosomovém páru. Je možné, že společný předek kanárských úhorníků měl 45S a 5S rDNA nejen na čtvrtém, ale i na druhém chromosomu. Po rozšíření z prvotní lokality ostrova Tenerife na ostrov La Palma došlo ke ztrátě 5S rDNA na druhém chromosomovém páru. Tato delece se pak dostala s úhorníky na Gran Canaria (*D. preauxiana*) a zpátky na Tenerife (*D. millefolia*).

5. 4. Fúzní chromosom AK6/8

Metodou srovnávacího malování chromosomů byl zrekonstruován karyotyp tří studovaných druhů v porovnání s ancestrálním karyotypem ACK. Většina chromosomů (1-6) odpovídá ancestrálním chromosomům (AK1-5, AK7). U všech druhů byl zjištěn chromosom 7 s hybridizovanými sondami ancestrálních chromosomů AK6 a AK8.

Fúzní chromosom studovaných druhů mohl vzniknout dvěma způsoby. Podle prvního scénáře (obr. 19, varianta A) došlo k reciproké translokaci mezi zlomem v centromerické oblasti chromosomu 6 a zlomem uvnitř bloku W na chromosomu 8. Vznikly tak dva rekombinované chromosomy, které se v následujícím kroku spojily výměnou mezi dvěma zlomy v subtelomerických oblastech krátkých ramének. Proběhla inaktivace centromery původního chromosomu 8 a fúzní chromosom AK6/8 byl stabilizován. Druhou možnou cestou (obr. 19, varianta B) vzniku chromosomu AK6/8 by byla nejdříve translokace mezi zlomy v subtelomerických oblastech kratšího raménka (a tedy fúze chromosomů 6 a 8), následovaná inverzí mezi zlomem v oblasti centromery původního chromosomu 6 a zlomem v bloku W. Opět by byla nutná stabilizace chromosomu inaktivací centromery původního chromosomu 8. Oba popsané způsoby zahrnují stejný počet evolučních kroků, nedá se proto určit, který je pravděpodobnější. Translokace i inverze patří mezi nejčastější chromosomové přestavby, protože se organismus nemusí vyrovnávat se ztrátou nebo získáním genů, jako je tomu u duplikace nebo delece. Translokace mezi chromosomovými konci za vzniku dicentrického chromosomu a ztráta zbylého fragmentu je u brukvovitých častým způsobem redukce karyotypu (např. Mandáková *et al.* 2010a).



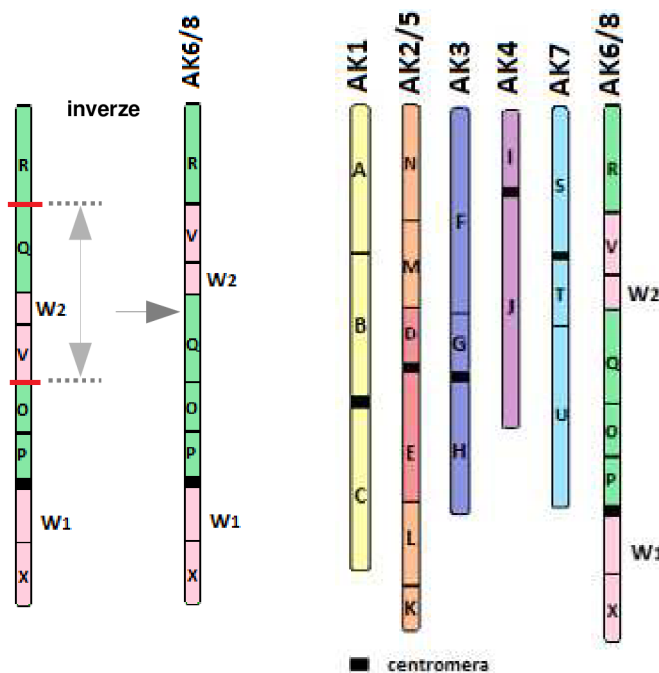
Obr. 19: Dva možné způsoby vzniku fúzního chromosomu AK6/8 s popsanými jednotlivými kroky. Červené úsečky označují místa zlomů na chromosomech, písmeny A-X jsou označeny jednotlivé genomické bloky. Blok W je rozdělen na části W1 a W2.

V obou případech vzniku dicentrického fúzního chromosomu byla nutná inaktivace jedné z centromer. Funkční centromera zajišťuje správnou segregaci chromosomů při meioze a mitóze. Pokud by byly zachovány obě centromery fúzního chromosomu, byly by často taženy mitotickými vřeténky k opačným pólům dělící se buňky a docházelo by k trhání chromosomu. Osud dvou centromer na chromosomu závisí na jejich vzdálenosti. Pokud jsou dostatečně blízko sebe, mohou zůstat obě aktivní a fungovat jako jedna velká centromera. Čím vzdálenější jsou centromery na společném chromosomu, tím pravděpodobnější je vznik zlomu mezi nimi. Je to v důsledku možného přetočení sesterských chromatid mezi centromerami a jejich tažením mitotickým aparátem k opačným pólům (Lysak 2014). Maximální vzdálenost mezi dvěma centromerami byla stanovena na 20 Mb u upravených lidských dicentrických chromosomů (Higgins *et al.* 2005). Pokud je vzdálenost větší, chromosom musí být stabilizován inaktivací nebo delecí jedné z centromer. K tomu dochází rekombinací mezi okrajovými repeticemi (a tedy delecí) nebo epigenetickým umlčením prostřednictvím metylovaných histonů v centromeře. Možná je samozřejmě i kombinace – částečná ztráta DNA centromery spolu s inaktivací (Lysak 2014, Mandáková *et al.* 2015, Murat *et al.* 2015).

Stejná fúze ancestrálních chromosomů 6 a 8 byla objevena i v karyotypu rostliny

Hornungia alpina ($n = 6$, Lysak *et al.* 2006, T. Mandáková - nepublikováno). Fúzní chromosom AK6/8 druhu *H. alpina* obsahuje navíc jednu další inverzi s chromosomovými zlomy mezi bloky R a Q a mezi bloky V a O (viz obr. 20). Rod *Hornungia* se od zbývajících rodů tribu *Descurainieae* oddělil jako první. Zdá se tedy, že je stejná fúze chromosomů společná nejen pro předka rodu úhorník (*Descurainia*), ale i pro celou skupinu *Descurainieae*. Pro potvrzení tohoto předpokladu jsou však nutné výzkumy dalších druhů a rodů tribu.

Inverze chromosomu *Hornungia alpina*
karyotyp podle přestaveb ACK

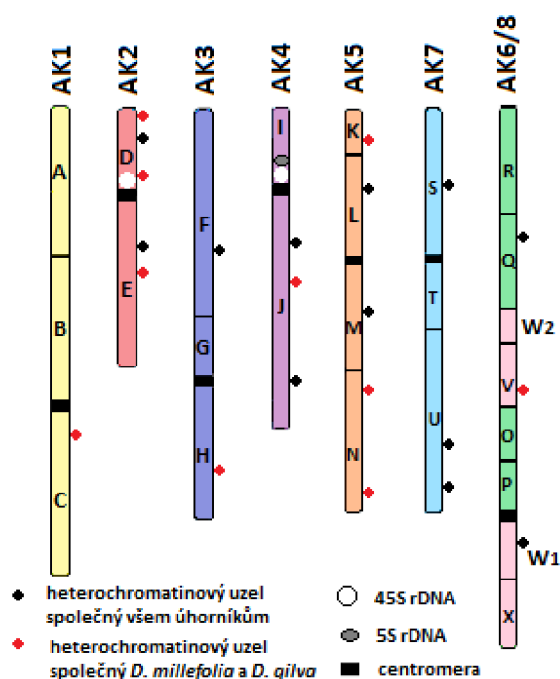


Obr. 20: Paracentrická inverze na chromosomu AK6/8 a schéma karyotypu *Hornungia alpina* ($n = 6$). Červené úsečky označují místa chromosomových zlomů. Genomické bloky jsou označeny písmeny A-X. Barvy genomických bloků odpovídají jejich pozici na chromosomech ACK (T. Mandáková – nepublikováno).

5. 5. Společný předek rodu úhorník (*Descurainia*)

Pokud shrneme výsledky diplomové práce a jejich zasazení do souvislostí s evolucí druhů, můžeme odhadovat podobu karyotypu společného předka kanárských úhorníků. Tento společný předek měl sedm chromosomových párů, na kterých bylo nejméně 12 heterochromatinových uzlů, ale spíše více (*D. millefolia* a *D. gilva* mají společnou pozici dalších 10 uzlů). Na chromosomu 2 byla poblíž centromerické oblasti na krátkém raménku lokalizována 45S ribosomální DNA, na chromosomu 4 byla ve stejné pozici 45S a 5S rDNA. Karyotyp předka zahrnoval i fúzní chromosom formován translokací mezi ancestrálními

chromosomy AK6 a AK8 (viz obr. 21).



Obr. 21: Pravděpodobný karyotyp společného předka kanárských úhorníků má sedm chromosomových párů, rDNA lokalizované blízko centromery na krátkém raménku druhého (45S) a čtvrtého (45S a 5S) chromosomu. Písmena A-X označují konzervované genomické bloky ancestrálního karyotypu, barvy genomických boků odpovídají jejich pozici na chromosomech ACK.

5. 6. Chromosomové přestavby a speciace úhorníků

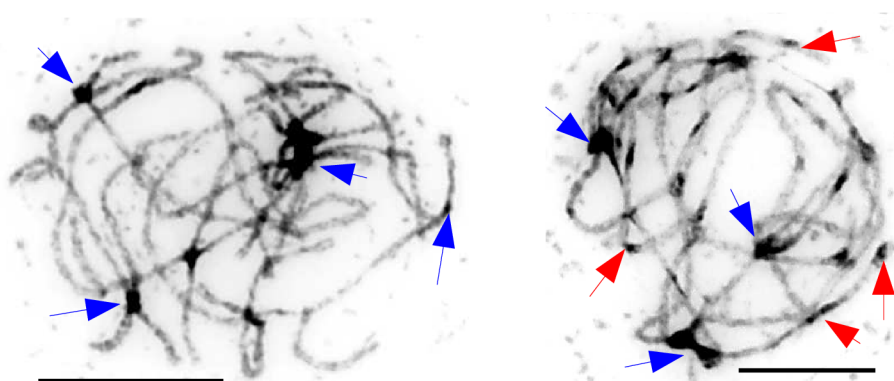
Mezi jednotlivými studovanými druhy kanárských endemických úhorníků nebyly prokázány žádné druhově specifické přestavby chromosomů. Fúzní chromosom AK6/8 je stejný u všech zkoumaných karyotypů a byl zjištěn i u zástupce jiného rodu (*Hornungia alpina*, T. Mandáková - nepublikováno). Chromosomové přestavby zde tedy se speciací nejspíše nesouvisí. Jediným viditelným rozdílem mezi druhy jsou počty a pozice heterochromatinových uzlů a rDNA. Podobně se také čtyři karyotypy rodu *Pachycladon* (*Pachycladon cheesemaniae*, *P. enysii*, *P. exile* a *P. nova-zelandie*) z Nového Zélandu liší pouze v počtu heterochromatinových uzlů a v pozici rDNA (Mandáková *et al.* 2010b). Je možné, že tyto akumulace heterochromatinu mohou mít vliv na speciaci. Protože však jde o heterochromatin - kondenzovanou DNA s nízkou transkripcí a pravděpodobně bez genů, je tento vliv diskutabilní a bude nezbytné ho prokázat dalšími studiemi.

Studie rodu *Pachycladon odhalila* genomová stabilita a karyotypová stáze beze změn od doby společného předka rodu (Mandáková *et al.* 2010b), podobně jako u druhů

Descurainia. Právě tato stabilita prokazuje, že druhová radiace rodu *Pachycladon* na Jižním ostrově Nového Zélandu během pleistocénu (Heenan *et al.* 2003) nebyla spojena s velkými chromosomovými přestavbami. Také další studie krytosemenných druhů z ostrova Ullung-do (Korea) prokázala, že většina endemických taxonů neprošla během speciace většími chromosomovými přestavbami nebo změnami chromosomového počtu (Weiss *et al.* 2002). Tato tendence karyotypové stáze je překvapivá vzhledem ke geografické izolaci ostrovů a jejich proměnlivému prostředí. Nicméně kolonizace ostrovů a následné adaptivní šíření druhů často proběhlo evolučně relativně nedávno (jednotky milionů let). Mnoho endemických druhů tedy představuje blízce příbuzné monofyletické skupiny na jednotlivých ostrovech, které mají stále ještě stejný počet chromosomů a velmi podobnou strukturu karyotypu (Mandáková *et al.* 2010b).

5. 7. Srovnání s kontinentálními druhy

Během dalšího výzkumu evoluce tribu *Descurainieae* budou zrekonstruovány karyotypy dalších endemických druhů z Kanárských ostrovů spolu s úhorníky z jiných částí světa – Amerika (*D. californica*, *D. paradisa*), Evropa (*D. sophia*) a další. Bude možno lépe popsat vztahy mezi jednotlivými úhorníky i jejich specifické chromosomové přestavby. Podle prvních výsledků Mandákové a kolektivu (nepublikováno) má *D. sophia* stejný karyotyp jako kanárské úhorníky, ale neobsahuje žádné heterochromatinové uzly (viz obr. 22). Ani u druhů *D. californica* a *D. paradisa* nebyly objeveny. Je zřejmé, že heterochromatinové uzly jsou specifickým znakem endemitů rodu *Descurainia* z Kanárských ostrovů.



Obr. 22: Srovnání pachytenních chromosomů kontinentálního druhu *Descurainia sophia* ($2n = 28$, fotografie vlevo, T. Mandáková - nepublikováno) a kanárského endemitu *D. gilva* ($2n = 14$, fotografie vpravo). U *D. sophia* jsou výrazné pouze centromery (některé označeny modrými šipkami), zatímco u *D. gilva* jsou patrné centromery i heterochromatinové uzly (některé označeny červenými šipkami).

V navazujícím studiu úhorníků je v plánu také sekvenace genomu úhorníků, identifikace a kvantifikace repetic. Následná FISH se sondami odpovídajícími těmto repetickým umožní jejich přiřazení k heterochromatinovým uzlům. Snad tak bude odpovězena otázka, zda mají uzly společný původ nebo jsou tvořeny více různými satelity, případně zda je obsah repetic uzlů druhově specifický. Výsledkem bude širší studie evoluce genomu rodu *Descurainia* publikovaná v některém z mezinárodních vědeckých časopisů.

6. ZÁVĚR

Poznání mechanismů evoluce a speciace rostlin nám pomáhá porozumět přírodě okolo nás. Mnoho faktorů má vliv na rozdělování druhů – změny v prostředí, izolovanost části populace od zbytku, kolonizace nových lokalit a také mutace a chromosomové přestavby. Jedním z efektů vzniklé izolace skupiny rostlin je zastavení genové výměny s mateřskou populací. Přirozeně vznikající mutace se hromadí, dokud jedinci izolované a mateřské populace už nejsou schopni tvořit fertilitní potomstvo. Pak se považují za oddělené druhy. Chromosomové přestavby výrazně ovlivňují evoluci rostlin a ve své diplomové práci jsem se pokusila prokázat jejich vliv i na speciaci druhů. K tomuto účelu byly vybrány tři druhy endemických úhorníků (*D. gilva*, *Descurainia millefolia*, *D. preauxiana*) z Kanárských ostrovů. Jejich karyotyp byl analyzován metodou srovnávacího malování chromosomů s využitím ancestrálního karyotypu brukvovitých jako reference.

V karyotypech bylo lokalizováno množství heterochromatinových uzlů a pozice ribosomální DNA. Podobnost mezi karyotypy studovaných kanárských úhorníků odpovídá jejich předpokládanému šíření od prvního kolonizujícího předka. Společný předek se dostal na ostrov Tenerife, odtud na ostrov La Palma. Následně se úhorníky šířily i na ostrovy Gran Canaria a La Gomera. Počet heterochromatinových uzlů a jejich umístění je podobnější mezi *D. millefolia* (Tenerife) a *D. gilva* (La Palma) než u *D. preauxiana* (Gran Canaria). Větší podobnost mezi těmito druhy byla i u pozice oblastí ribosomové DNA.

Srovnávacím malováním chromosomů byl zjištěn fúzní chromosom vzniklý translokací mezi ancestrálními chromosomy AK6 a AK8. Zbývajících šest chromosomů všech studovaných druhů odpovídá ancestrálním chromosomům AK1-5, AK7. Fúzní chromosom je strukturně shodný u všech tří studovaných druhů. Tuto přestavbu měl zřejmě společný předek kanárských úhorníků a možná dokonce i předek celého tribu *Descurainieae*. Stejná fúze byla totiž dříve objevena i u rodu *Hornungia* (Lysak *et al.* 2006). Byly navrženy dva možné mechanismy vzniku tohoto fúzního chromosomu AK6/8. Oba zahrnují stejný počet evolučních kroků. Nedá se tedy s jistotou říci, který z nich je pravděpodobnější. Vztah mezi chromosomovými přestavbami a speciací kanárských úhorníků nebyl prokázán.

Z výsledků byl odvozen karyotyp společného předka kanárských úhorníků. Tento karyotyp obsahoval sedm chromosomových párů s nejméně 12 heterochromatinovými uzly. Ribosomální DNA byla lokalizována na krátkém raménku poblíž centromer chromosomu 2 (45S rDNA) a 4 (45S a 5S rDNA). Karyotyp předka byl porovnán s kontinentálními druhy

Descurainia sophia, *D. californica* a *D. paradisa*. Karyotyp *D. sophia* je strukturně shodný s karyotypy kanárských úhorníků, ale neobsahuje heterochromatinové uzly. Heterochromatinové uzly jsou tedy zřejmě specifickým znakem kanárských endemitů rodu *Descurainia* a je možné, že jejich vznik souvisí s jejich speciací.

8. LITERATURA

- Aiken, S. G., M. J. Dallwitz, L. L. Consaul, C. L. McJannet, R. L. Boles, G.W. Argus, J. M. Gillett, P. J. Scott, R. Elven, M. C. LeBlanc, L. J. Gillespie, A. K. Brysting, H. Solstad, and J. G. Harris.** 2007. Flora of the Canadian Arctic Archipelago: Descriptions, Illustrations, Identification, and Information Retrieval. *NRC Research Press*, National Research Council of Canada, Ottawa [online].
- Ali, H. B. M., M. A. a Schubert I.** 2005. Chromosomal localization of rDNA in the *Brassicaceae*. *Genome*. roč. 48 č. 2, s. 341-346. DOI: 10.1139/g04-116. ISSN 0831-2796.
- Almeida, C. a A. Pedrosa-Harand.** 2013. Highmacro-collinearity between lima bean (*Phaseolus lunatus L.*) and the common bean (*P. vulgaris L.*) as revealed by comparative cytogenetic mapping. *Theoretical and Applied Genetics* roč. 126 č. 7, s. 1909-1916. DOI: 10.1007/s00122-013-2106-9. ISSN 0040-5752.
- Al-Shehbaz I. A., M. A. Beilstein a E. A. Kellogg.** 2006. Systematics and phylogeny of the *Brassicaceae* (*Cruciferae*). *Plant Systematics and Evolution*, roč. 259 č. 2-4, s. 89-120. DOI: 10.1007/s00606-006-0415-z.
- Al-Shehbaz, I. A.** 2012 A Synopsis of the South American *Descurainia* and Description of the Colombian New Species *D. cleefii* (*Brassicaceae*). *Harvard Papers in Botany*, roč. 17 č. 2, s. 221-229. DOI: 10.3100/025.017.0202. ISSN 1043-4534
- Baker, M. S., H. Vogel a M. E. Schranz.** 2009. Paleopolyploidy in the *Brassicales*: Analyses of the Cleome Transcriptome Elucidate the History of Genome Duplications in *Arabidopsis* and Other *Brassicales*. *Genome Biology and Evolution*, roč. 1, s. 391-399. DOI: 10.1093/gbe/evp040. ISBN 10.1093/gbe/evp040.
- Baldwin, B. G.** 1992. Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA in plants: An example from the compositae. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, roč. 1 č. 1, s. 3-16. DOI: 10.1016/1055-7903(92)90030-K. ISSN 10557903.
- Basset, P., G. Yannic, H. Brünner a J. Hausser.** 2006. Restricted Gene Flow at Specific Parts of the Shrew Genome in Chromosomal Hybrid Zones. *Evolution*, roč. 60 č. 8, s.

1718-1730. DOI: 10.1554/06-181.1. ISSN 0014-3820.

- Beilstein M. A., I. A. Al-Shehbaz a E. A. Kellogg** 2006. *Brassicaceae* phylogeny and trichome evolution. *American Journal of Botany*, roč. 93 č. 4, s. 607-619. DOI: 10.3732/ajb.93.4.607.
- Beilstein, M. A., N. S. Nagalingum, M. D. Clements, S. R. Manchester a S. Mathews.** 2010. Dated molecular phylogenies indicate a Miocene origin for *Arabidopsis thaliana*. *American Journal of Botany* roč. 93 č. 4, s. 607-619. DOI: 10.1073/pnas.0909766107. ISBN 10.1073/pnas.0909766107. ISSN 0002-9122.
- Betekhtin, A., G. Jenkins, R. Hasterok a S. P. Hazen.** 2014. Reconstructing the Evolution of *Brachypodium* Genomes Using Comparative Chromosome Painting. *PLoS ONE* roč. 9 č. 12, DOI: 10.1371/journal.pone.0115108. ISBN 10.1073/pnas.0909766107. ISSN 1932-6203.
- Blattner, F. R.** 2006. Multiple intercontinental dispersals shaped the distribution area of *Hordeum* (*Poaceae*). *New Phytologist*, roč. 169 č. 3, s. 603-614. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2005.01610.x. ISBN 10.1073/pnas.0909766107. ISSN 0028646x.
- Boff, T. a M. T. Schifino-Wittmann.** 2003. Segmental allopolyploidy and paleopolyploidy in species of *Leucaena* Benth: evidence from meiotic behaviour analysis. *Hereditas*, roč. 138, s. 27-35. DOI: 10.1034/j.1601-5223.2003.01646.x. ISBN 10.1034/j.1601-5223.2003.01646.x.
- Boivin, K., A. Acarkan, A.-S.Mbulu, O. Clarenz a R. Schmidt.** 2004. The *Arabidopsis* Genome Sequence as a Tool for Genome Analysis in *Brassicaceae*. A Comparison of the *Arabidopsis* and *Capsella rubella* Genomes. *Plant Physiology*, roč. 135 č. 2, s. 735-744. DOI: 10.1104/pp.104.040030. ISBN 10.1104/pp.104.040030.
- Bonasora, M. G., Marisa T. Pozzobon, A. I. Honfi, G. H. Rua.** 2015. *Paspalum schesslii* (*Poaceae, Paspaleae*), a new species from Mato Grosso (Brazil) with an unusual base chromosome number. *Plant Systematics and Evolution*, roč. 301 č. 10, s. 2325-2339. DOI:10.1007/s00606-015-1231-0. ISBN 10.1104/pp.104.040030. ISSN 0378-2697.
- Bonifácio, E. M., A. Fonsêca, C. Almeida, K. G. B. dos Santos a A. Pedrosa-Harand.** 2012. Comparative cytogenetic mapping between the lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) and the common bean (*P. vulgaris* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, roč. 124, s. 1513-1520. DOI: 10.1007/s00122-012-1806-x. ISBN 10.1007/s00122-012-1806-x.

- Bramwell, D. A.** 1977. Revision of *Descurainia* Webb & Breth. Section *Sisymbriodendron* (Christ) O. E. Schultz in the Canary Islands. *Botanica Macaronesica*, roč. 4, s. 32-53. ISSN 0211-7150.
- Buckler IV, E. S., T. L. Phelps-Durr, C. S. K. Buckler, R. K. Dawe, J. F. Doebley a T. P. Holtsford.** 1999. Meiotic Drive of Chromosomal Knobs Reshaped the Maize Genome. *Genetics*. 1999, roč. 153, s. 415-426.
- Carlsen, T., R. Elven a Ch. Brochmann.** 2010. The evolutionary history of Beringian *Smelowskia* (*Brassicaceae*) inferred from combined microsatellite and DNA sequence data. *Taxon*, roč. 59 č. 2, s. 427-438.
- Coleman, M., A. Liston, J. W. Kadereit a R. J. Abbott.** 2003. Repeat intercontinental dispersal and Pleistocene speciation in disjunct Mediterranean and desert *Senecio* (*Asteraceae*). *American Journal of Botany*, roč. 90 č. 10, s. 1446-1454. DOI: 10.3732/ajb.90.10.1446. ISBN 10.3732/ajb.90.10.1446.
- Couvreur, T. L. P., A. Franzke, I. A. Al-Shehbaz, F. T. Bakker, M. A. Koch a K. Mummenhoff.** 2010. Molecular Phylogenetics, Temporal Diversification, and Principles of Evolution in the Mustard Family (*Brassicaceae*). *Molecular Biology and Evolution*, roč. 27 č.1, s. 55-71. DOI: 10.1093/molbev/msp202. ISBN 10.3732/ajb.90.10.1446. ISSN 0737-4038.
- Coyne, J. A. a H. A. Orr.** 2004. *Speciation*. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates. ISBN 08-789-3089-2.
- CSHL/WUGSC/PEB Arabidopsis Sequencing Consortium.** 2000. The Complete Sequence of a Heterochromatic Island from a Higher Eukaryote. *Cell*, roč. 100, s. 377-386. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)80673-X. ISBN 10.1016/S0092-8674(00)80673-X.
- Dassanayake, M., D.-H. Oh, J. S Haas, A. Hernandez, H. Hong, S. Ali, D.-J. Yun, R. A. Bressan, J.-K. Zhu, H. J. Bonhert, J. M. Cheeseman.** 2011. The genome of the extremophile crucifer *Thellungiella parvula*. *Nature Genetics*, roč. 43 č. 9, s. 913-918. DOI: 10.1038/ng.889. ISBN 10.1038/ng.889.
- Deng C., Bai L., Fu S., Yin W., Zhang Y., Chen Y., Wang R. R.-C., Zhang X., Han F., Hu Z. a Scott K. C.** 2013. Microdissection and chromosome painting of the alien chromosome in an addition line of wheat - *Thinopyrum intermedium*. *PLoS ONE*, roč. 8 č. 8, s. 1-7. DOI: 10.1371/journal.pone.0072564.

- Devos, K. M.** 2010. Grass genome organization and evolution. *Current Opinion in Plant Biology*, roč. 13, s. 139-145. DOI: 10.1016/j.pbi.2009.12.005. ISBN 10.1016/j.pbi.2009.12.005.
- Dierschke, T., T. Mandakova, M. A. Lysak a K. Mummenhoff.** 2009. A bicontinental origin of polyploid Australian/New Zealand *Lepidium* species (*Brassicaceae*)? Evidence from genomic in situ hybridization. *Annals of Botany*. roč. 104 č. 4, s. 681-688. DOI: 10.1093/aob/mcp161. ISBN 10.1093/aob/mcp161. ISSN 0305-7364
- Dobzhansky, T.** 1975. Analysis of incipient reproductive isolation within a species of *Drosophila*. *Genetics*, roč. 72 č. 9, s. 3638-3641. ISBN 10.1093/aob/mcp161.
- Dong, F., J. Song, S. K. Naess, J. P. Helgeson, C. Gebhardt a J. Jiang.** 2000. Development and applications of a set of chromosome-specific cytogenetic DNA markers in potato. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, roč. 101 č. 7, s. 1001-1007. DOI: 10.1007/s001220051573. ISBN 10.1093/aob/mcp161. ISSN 0040-5752.
- Farrar K. a Donnison I. S.** 2007. Construction and screening of BAC libraries made from *Brachypodium* genomic DNA. *Nature Protocols*, roč. 2, č. 7, s. 1661-1674. DOI: 10.1038/nprot.2007.204.
- Fawcett J. A., Maere S. a Van de Peer Y.** 2009. Plants with double genomes might have had a better chance to survive the Cretaceous-Tertiary extinction event. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, roč. 106 č. 14, s. 5737-5742. DOI: 10.1073/pnas.0900906106.
- Feodorova, T. A., E. V. Voznesenskaya, G. E. Edwards a E. H. Roalson.** 2010. Biogeographic Patterns of Diversification and the Origins of C4 in *Cleome* (*Cleomaceae*). *Systematic Botany*, roč. 35 č. 4, s. 811-826. DOI: 10.1600/036364410X539880. ISBN 10.1600/036364410X539880.
- Fonsêca, A., A. Pedrosa-Harand a G. J. Scoles.** 2013. Karyotype stability in the genus *Phaseolus* evidenced by the comparative mapping of the wild species *Phaseolus microcarpus*. *Genome*, roč. 56 č. 6, s. 335-343. DOI: 10.1139/gen-2013-0025. ISBN 10.1600/036364410X539880. ISSN 0831-2796.
- Fransz, P. F., S. Armstrong, J. H. de Jong, L. D. Parnell, C. van Drunen, C. Dean, P. Zabel, T. Bisseling, G. H. Jones.** 2000. Integrated Cytogenetic Map of Chromosome Arm 4S of *A. thaliana*. *Cell*, roč. 100 č. 3, s. 367-376. DOI: 10.1016/S0092-

8674(00)80672-8. ISBN 10.1600/036364410X539880. ISSN 00928674.

Franzke, A., M. A. Lysak, I. A. Al-Shehbaz, M. A. Koch a K. Mummenhoff. 2011. Cabbage family affairs: the evolutionary history of *Brassicaceae*. *Trends in Plant Science*, roč. 16 č. 2, s. 108-116. DOI: 10.1016/j.tplants.2010.11.005. ISBN 10.1600/036364410X539880. ISSN 13601385.

Freeling, M. a B. C. Thomas. 2006. Gene-balanced duplications, like tetraploidy, provide predictable drive to increase morphological complexity. *Genome Research*, roč. 16 č. 7, s. 805-814. DOI: 10.1101/gr.3681406. ISBN 10.1600/036364410X539880. ISSN 1088-9051.

Fuchs, J., M. Kühne a I. Schubert. 1998a. Assignment of linkage groups to pea chromosomes after karyotyping and gene mapping by fluorescent in situ hybridization. *Chromosoma*, roč. 107 č. 4, s. 272-276. DOI: 10.1007/s004120050308. ISBN 10.1600/036364410X539880. ISSN 0009-5915.

Fuchs, J., S. Kuhfittig, G. Reuter a I. Schubert. 1998b. Chromosome painting in *Drosophila*. *Chromosome Research*, roč. 6, s. 335-336. ISBN 10.1600/036364410X539880.

Futuyma, D. J. a G. C. Mayer. 1980. Non-Allopatric Speciation in Animals. *Systematic Biology*, roč. 29 č. 3, 254-271. DOI: 10.1093/sysbio/29.3.254. ISBN 10.1600/036364410X539880. ISSN 1063-5157.

Gileva, E. A. a S. B. Rakitin. 2006. Factors of maintaining chromosome polymorphism in common vole *Microtus arvalis pallas*, 1779: Reduced fertility and meiotic drive. *Russian Journal of Genetics*, roč. 42 č. 5, s. 498-504. DOI: 10.1134/S1022795406050061. ISBN 10.1600/036364410X539880. ISSN 1022-7954.

Gillespie, R. G. 2007. Oceanic Islands: models of diversity. *Encyclopedia of Biodiversity*, s. 1-13. DOI: 10.1016/B0122-2686(52)00517-4. ISBN 10.1600/036364410X539880.

González M. L. G. 2015. *Flora de Canarias* [online]. Dostupné z: www.floradecanarias.com

Goodson, B. E., A. Santos-Guerra a R. K. Jansen. 2006. Molecular Systematics of *Descurainia* (*Brassicaceae*) in the Canary Islands: Biogeographic and Taxonomic Implications. *Taxon*, roč. 55 č. 3, s. 617-982. DOI: 10.2307/25065643. ISBN 10.2307/25065643.

- Goodson, B. E., S.K. Rehman a R. K. Jansen.** 2011. Molecular Systematics and Biogeography of *Descurainia (Brassicaceae)* based on Nuclear ITS and Non-Coding Chloroplast DNA. *Systematic Botany*, roč. 36 č. 4, s. 957-980. DOI: 10.1600/036364411X604976. ISBN 10.1600/036364410X539880. ISSN 03636445.
- Han, Y., T. Zhang, P. Thammapichai, Y. Weng a J. Jiang.** 2015. Chromosome-Specific Painting in *Cucumis* Species Using Bulked Oligonucleotides. *Genetics*, roč. 200 č. 3, s. 771-779. DOI: 10.1534/genetics.115.177642. ISBN 10.2307/25065643. ISSN 0016-6731.
- Harini, B. P. a N. B. Ramachandra.** 2003. Evolutionary experimentation through hybridization under laboratory condition in *Drosophila*: Evidence for Recombinational Speciation. *BMC Evolutionary Biology*, roč. 3 č. 1. DOI: 10.1186/1471-2148-3-20. ISBN 10.2307/25065643. ISSN 14712148.
- Hedrick, P. W.** 1981. The Establishment of Chromosomal Variants. *Evolution*, roč. 35 č. 2, s. 322-332. DOI: 10.2307/2407841. ISBN 10.2307/2407841. ISSN 14712148.
- Heenan, P. B. a A. D. Mitchell.** 2003. Phylogeny, biogeography and adaptive radiation of *Pachycladon (Brassicaceae)* in the mountains of South Island, New Zealand. *Journal of Biogeography*, roč. 30, s. 1737-1749. DOI: 10.1046/j.1365-2699.2003.00941.x. ISBN 10.1046/j.1365-2699.2003.00941.x.
- Hemleben, V., A. Kovarik, R. A. Torres-Ruiz, R. A. Volkov a T. Beridze.** 2007. Plant highly repeated satellite DNA: Molecular evolution, distribution and use for identification of hybrids. *Systematics and Biodiversity*, roč. 5 č. 3, s. 277-289. DOI: 10.1017/S147720000700240X. ISBN 10.1046/j.1365-2699.2003.00941.x. ISSN 1477-2000.
- Hewitt, G. M.** 1996. Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biological Journal of the Linnean Society*, roč. 58, s. 247-276. DOI: 10.1111/j.1095-8312.1996.tb01434.x. ISBN 10.1111/j.1095-8312.1996.tb01434.x.
- Higgins, A. W., K. M. Gustashaw a H. F. Willard.** 2005. Engineered human dicentric chromosomes show centromere plasticity. *Chromosome Research*, roč. 13 č. 8, s. 745-762. DOI: 10.1007/s10577-005-1009-2. ISBN 10.1111/j.1095-8312.1996.tb01434.x.
- Hipp, A. L., P. E. Rothrock, R. Whitkus a J. A. Weber.** 2010. Chromosomes tell half of the story: the correlation between karyotype rearrangements and genetic diversity in

sedges, a group with holocentric chromosomes. *Molecular Ecology*, roč. 19 č. 15, s. 3124-3138. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2010.04741.x. ISBN 10.1111/j.1095-8312.1996.tb01434.x. ISSN 09621083.

Hohmann, N., E. M. Wolf, M. A. Lysak a M. A. Koch. 2015. A Time-Calibrated Road Map of *Brassicaceae* Species Radiation and Evolutionary History: the correlation between karyotype rearrangements and genetic diversity in sedges, a group with holocentric chromosomes. *The Plant Cell*, roč. 27, s. 2770-2784. DOI: 10.1105/tpc.15.00482. ISBN 10.1111/j.1095-8312.1996.tb01434.x. ISSN 1040-4651.

Houben, A., C. R. Leach, D. Verlin, R. Rofe a J. N. Timmis. 1997. A repetitive DNA sequence common to the different B chromosomes of the genus *Brachycome*. *Chromosoma*, roč. 106 č. 8, s. 513-519. DOI: 10.1007/PL00007689. ISBN 10.1007/PL00007689. ISSN 0009-5915.

Huang, Ch.-H., R. Sun, Y. Hu, L. Zeng, N. Zhang, L. Cai, Q. Zhang, M. A. Koch, I. Al-Shehbaz, P. P. Edger, J. Ch. Pires, D.-Y. Tan, Y. Zhong, H. Ma. 2016. Resolution of *Brassicaceae* Phylogeny Using Nuclear Genes Uncovers Nested Radiations and Supports Convergent Morphological Evolution. *Molecular Biology and Evolution*, roč. 33 č. 2, s. 394-412. DOI: 10.1093/molbev/msv226. ISBN 10.1007/PL00007689. ISSN 0737-4038.

Huguet, V., E. O. Land, J. G. Casanova, J. F. Zimpfer a M. P. Fernandez. 2005. Genetic Diversity of Frankia Microsymbionts from the Relict Species *Myrica faya* (Ait.) and *Myrica rivas-martinezii* (S.) in Canary Islands and Hawaii. *Molecular Biology and Evolution*, roč. 49, s. 617-625. DOI: 10.1007/s00248-004-0107-6. ISBN 10.1007/s00248-004-0107-6.

Chandra, G. [online, cit. 2016-04-03]. Dostupné z: <http://www.iaszoology.com/>

Cheng, F., T. Msndáková, J. Wu, Q. Xie, M. A. Lysak a X. Wang. 2013. Deciphering the Diploid Ancestral Genome of the Mesoheptaploid *Brassica rapa*. *The Plant Cell*, roč. 25, s. 1541-1554. DOI: 10.1105/tpc.113.110486. ISBN 10.1105/tpc.113.110486.

Cheng, Z., G. G. Presting, C. R. Buell, R. A. Wing a J. Jiang. 2001. High-resolution pachytene chromosome mapping of bacterial artificial chromosomes anchored by genetic markers reveals the centromere location and the distribution of genetic recombination along chromosome 10 of rice. *Genetics*, roč. 157 č. 4, s. 1749-1757.

- Chung, K.-S., J. A. Weber a A. L. Hipp.** 2011. Dynamics of chromosome number and genome size variation in a cytogenetically variable sedge (*Carex scoparia* var. *scoparia*, *Cyperaceae*). *American Journal of Botany*, roč. 98 č. 1, s. 122-129. DOI:10.3732/ajb.1000046. ISBN 10.1105/tpc.113.110486. ISSN 0002-9122.
- Idziak, D., A. Betekhtin, E. Wolny, K. Lesniewska, J. Wright, M. Febrer, M. W. Bevan, G. Jenkins, R. Hasterok.** 2011. Painting the chromosomes of *Brachypodium*- current status and future prospects. *Chromosoma*, roč. 120 č. 5, s. 469-479. DOI: 10.1007/s00412-011-0326-9. ISBN 10.1105/tpc.113.110486. ISSN 0009-5915.
- Inda, L. A., P. Torrecilla, P. Catalána, T. Ruiz-Zapata.** 2008. Phylogeny of *Cleome* L. and its close relatives *Podandroyne* Ducke and *Polanisia* Raf. (*Cleomoideae*, *Cleomaceae*) based on analysis of nuclear ITS sequences and morphology. *Plant Systematics and Evolution*, roč. 274 č. 1-2, s. 111-126. DOI: 10.1007/s00606-008-0026-y. ISBN 10.1105/tpc.113.110486. ISSN 0378-2697.
- Jaén-Molina, R., J. Caujapé-Castells, J. A. Reyes-Betancort, H. Akhani, O. Fernández-Palacios, J. P. de Paz, R. Febles-Hernández a Á. Marrero-Rodríguez.** 2009. The molecular phylogeny of *Matthiola* R. Br. (*Brassicaceae*) inferred from ITS sequences, with special emphasis on the Macaronesian endemics. *Molecular phylogenetics and Evolution*, roč. 53, s. 972-981. DOI: 10.1016/j.ympev.2009.08.031. ISBN 10.1016/j.ympev.2009.08.031
- Jiang, J., B. S. Gill, G. L. Wang, P. C. Ronald a D. C. Ward.** 1995. Metaphase and interphase fluorescence in situ hybridization mapping of the rice genome with bacterial artificial chromosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, roč. 92 č. 10, s. 4487- 4491. DOI: 10.1073/pnas.92.10.4487. ISBN 10.1073/pnas.92.10.4487.
- Jiao Y., N. J. Wickett, S. Ayyampalayam, A. S. Chanderbali, L. Landherr, P. E. Ralph, L. P. Tomsho, Y. Hu, H. Liang, P. S. Soltis, D. E. Soltis, S. W. Clifton, S. E. Schlarbaum, S. C. Schuster, H. Ma, J. Leebens-Mack a C. W. Depamphilis.** 2011. Ancestral polyploidy in seed plants and angiosperms. *Nature*, roč. 473 č. 7345, s. 97-100. DOI: 10.1038/nature09916.
- Kagale, S., S. J. Robinson, J. Nixon, R. Xiao, T. Huebert, J. Condile, D. Kessler, W. E.**

- Clarke, P. P. Edger, M. G. Links, A. G. Sharpe, I. A. P. Parkin.** 2014. Polyploid Evolution of the *Brassicaceae* during the Cenozoic Era. *The Plant Cell*, roč. 26 č. 7, s. 2777-2791. DOI: 10.1105/tpc.114.126391. ISBN 10.1073/pnas.92.10.4487. ISSN 1040- 4651.
- King, M.** 1995. Species evolution: the role of chromosome change. *Cambridge: Cambridge University Press*. ISBN 978-052-1484-541.
- Koch, M. a I. A. Al-Shehbaz.** 2002. Molecular Data Indicate Complex Intra- and Intercontinental Differentiation of American *Draba* (*Brassicaceae*). *Annals of the Missouri Botanical Garden*, roč. 89, s. 88-109. DOI: 10.2307/3298659. ISBN 10.2307/3298659.
- Koch, M., J. Bishop, T. Mitchell-Olds a M. Koch** 1999. Molecular systematics and evolution of *Arabidopsis* and *Arabis*. *Plant Biology*, roč. 1 č. 5, s. 529-537. DOI: 10.1111/j.1438-8677.1999.tb00779.x.
- Koo, D.-H., Y.-W. Nam, D. Choi, J.-W. Bang, H. de Jong a Y. Hur.** 2010. Molecular cytogenetic mapping of *Cucumis sativus* and *C. melo* using highly repetitive DNA sequences. *Chromosome Research*, roč. 18, s. 325-336. DOI: 10.1007/s10577-010-9116-0. ISBN 10.1007/s10577-010-9116-0.
- Krishnaswamy L., J. Zhang a T. Peterson.** 2008. Reversed end Ds element: a novel tool for chromosome engineering in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology*, roč. 68, 4-5, s. 399-411. DOI: 10.1007/s11103-008-9377-6.
- Kuittinen, H., A. de Haan, C. Vogl, S. Oikarinen, J. Leppälä, M. Koch, T. Mitchell-Olds, Ch. H. Langley, O. Savolainen.** 2004. Comparing the Linkage Maps of the Close Relatives *Arabidopsis lyrata* and *A. thaliana*. *Genetics*, roč. 168, s. 1575-1584. DOI: 10.1534/genetics.103.022343. ISBN 10.1534/genetics.103.022343
- Liehr, T., A. Weise, A. B. Hamid, X. Fan, E. Klein, N. Aust, M. A. K. Othman, K. Mrasek, N. Kosyakova.** 2013. Multicolor FISH methods in current clinical diagnostics. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, roč. 13 č.3, 251-255. DOI: 10.1586/erm.12.146. ISBN 10.1534/genetics.103.022343. ISSN 1473-7159.
- Lihová, J., A. Tribsch a T. F. Stuessy.** 2004. Cardamine apennina: a new endemic diploid species of the *C. pratensis* group (*Brassicaceae*) from Italy. *Plant Systematics and evolution*, roč. 245, s. 69-92. DOI: 10.1007/s00606-003-0119-6. ISBN

- Lichter P., T. Cremer, J. Borden, L. Manuelidis a D. C. Ward.** 1988. Delineation of individual human chromosomes in metaphase and interphase cells by *in situ* suppression hybridization using recombinant DNA libraries. *Human Genetics*, roč. 80 č. 3, s. 224-234. DOI: 10.1007/BF01790090.
- Luo M. C., K. R. Deal, E. D. Akhunov, A. R. Akhunova, O. D. Anderson, J. A. Anderson, N. Blake, M. T. Clegg, D. Coleman-Derr, E. J. Conley, C. C. Crossman, J. Dubcovsky, B. S. Gill, Y. Q. Gu, J. Hadam, H. Y. Heo, N. Huo, G. Lazo, Y. Ma, D. E. Matthews, P. E. McGuire, P. L. Merrell, C. O. Qualset, J. Renfro, D. Tabanao, L. E. Talbert, C. Tian, D. M. Toleno, M. L. Warburton, F. M. You, W. Zhang a J. Dvorak** 2009. Genome comparisons reveal a dominant mechanism of chromosome number reduction in grasses and accelerated genome evolution in *Triticeae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, roč. 106 č. 37, s. 15780-15785. DOI: 10.1073/pnas.0908195106.
- Lynch M. a J. S. Conery.** 2000. The Evolutionary Fate and Consequences of Duplicate Genes. *Science*, roč. 290, s. 1151-1155. DOI: 10.1126/science.290.5494.1151. ISBN 10.1126/science.290.5494.1151.
- Lysak M. A., A. Berr, A. Pecinka, R. Schmidt, K. McBreen a I. Schubert.** 2006. Mechanisms of chromosome number reduction in *Arabidopsis thaliana* and related *Brassicaceae* species. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, roč. 103, č. 13, s. 5224-5229. DOI: 10.1073/pnas.0510791103.
- Lysák M. A., A. Pecinka a I. Schubert.** 2003. Recent progress in chromosome painting of *Arabidopsis* and related species. *Chromosome Research*, roč. 11, s. 195-204. DOI: 10.1023/A:1022879608152. ISBN 10.1023/A:1022879608152.
- Lysak M. A., K. Cheung, M. Kitschke a P. Bures** 2007. Ancestral chromosomal blocks are triplicated in *Brassicaceae* species with varying chromosome number and genome size. *Plant Physiology*, roč. 145 č. 2, s. 402-410. DOI: 10.1104/pp.107.104380.
- Lysak M. A., M. A. Koch, A. Pecinka a I. Schubert.** 2005. Chromosome triplication found across the tribe *Brassicaceae*. *Chromosome Research*, roč. 15, s. 516-525. DOI: 10.1101/gr.3531105. ISBN 10.1101/gr.3531105.
- Lysak M. A., P. F. Fransz, H. B. M. Ali a I. Schubert.** 2001. Chromosome painting in

- Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, roč. 28 č. 6, s. 689-697. DOI: 10.1046/j.1365-313x.2001.01194.x. ISBN 10.1046/j.1365-313x.2001.01194.x.
- Lysak, M. A.** 2014. Live and let die: centromere loss during evolution of plant chromosomes. *New Phytologist*, roč. 203, s. 1082-1089. DOI: 10.1111/nph.12885. ISBN 10.1111/nph.12885
- Lysak, M. A. a I. Schubert.** 2013. Mechanisms of Chromosome Rearrangements. *Plant Genome Diversity*, roč. 2, s. 137-147. DOI: 10.1007/978-3-7091-1160-4_9. ISBN 10.1007/978-3-7091-1160-4_9.
- Lysak, M. A. a T. Mandáková.** 2013. Analysis of Plant Meiotic Chromosomes by Chromosome Painting. *Methods in Molecular Biology*, roč. 990, s. 13-24. DOI: 10.1007/978-1-62703-333-6_2. ISBN 10.1007/978-1-62703-333-6_2.
- Lysak, M. A., T. Mandáková a M. E. Schranz.** 2016. Comparative paleogenomics of crucifers: ancestral genomic blocks revisited. *Current Opinion in Plant Biology*, roč. 30, s. 108-115. DOI: 10.1016/j.pbi.2016.02.001. ISBN 10.1016/j.pbi.2016.02.001.
- Lyttle, T. W.** 1991. Segregation Distorters. *Annual Reviews*, roč. 25, s. 511-557. DOI: 10.1146/annurev.ge.25.120191.002455. ISBN 10.1146/annurev.ge.25.120191.002455.
- Ma, L., G. T. H. Vu, V. Schubert, K. Watanabe, N. Stein, A. Houben a I. Schubert.** 2010. Synteny between *Brachypodium distachyon* and *Hordeum vulgare* as revealed by FISH. *Chromosome Research*, roč. 18, s. 841-850. DOI: 10.1007/s10577-010-9166-3. ISBN 10.1007/s10577-010-9166-3.
- Mandáková T. a M. A. Lysak** 2008. Chromosomal phylogeny and karyotype evolution in $x=7$ crucifer species (*Brassicaceae*). *The Plant Cell*, roč. 20 č. 10, s. 2559-2570. DOI: 10.1105/tpc.108.062166.
- Mandakova, T., A. Kovarik, J. Zozomova-Lihova, R. Shimizu-Inatsugi, K. K. Shimizu, K. Mummenhoff, K. Marhold a M. A. Lysak.** 2013. The More the Merrier: Recent Hybridization and Polyploidy in *Cardamine*. *The Plant Cell*, roč. 25, s. 3280-3295. DOI: 10.1105/tpc.113.114405. ISBN 10.1105/tpc.113.114405.
- Mandáková, T., M. E. Schranz, T. F. Sharbel, H. de Jong a M. A. Lysak.** 2015. Karyotype evolution in apomictic *Boechera* and the origin of the aberrant chromosomes. *The Plant Journal*, roč. 82, s. 785-793. DOI: 10.1111/tpj.12849. ISBN 10.1111/tpj.12849.

- Mandáková, T., K. Marhold a M. A. Lysak.** 2014. The widespread crucifer species *Cardamine flexuosa* is an allotetraploid with a conserved subgenomic structure. *New Phytologist*, roč. 201, s. 982-992. DOI: 10.1111/nph.12567. ISBN 10.1111/nph.12567.
- Mandáková, T., P. B. Heenan a M. A. Lysak.** 2010b. Island species radiation and karyotypic stasis in *Pachycladon allopolyploids*. *BMC Evolutionary Biology*, roč. 10 č. 367. DOI: 10.1186/1471-2148-10-367. ISBN 10.1186/1471-2148-10-367.
- Mandakova, T., S. Joly, M. Krzywinski, K. Mummenhoff a M. A. Lysak.** 2010a. Fast Diploidization in Close Mesopolyploid Relatives of *Arabidopsis*. *THE PLANT CELL ONLINE*, roč. 22 č. 7, s. 2277-2290. DOI: 10.1105/tpc.110.074526. ISBN 10.1007/s10577-010-9166-3. ISSN 1040-4651.
- Mayr, E.** 1954. Change of Genetics Environment and Evolution. *Evolution as a Process*, s. 157-180.
- Mayr, E. a T. Dobzhansky.** 1945. Experiments on Sexual Isolation of *Drosophila*. *Genetics*, roč. 31, s. 75-83.
- McCarthy, E. M., M. A. Asmussen a W. W. Anderson.** 1995. A theoretical assessment of recombinational speciation. *Heredity*, roč. 74 č. 5, s. 502-509. DOI: 10.1038/hdy.1995.71. ISBN 10.1111/tpj.12849. ISSN 0018-067x.
- McClintock, B.** 1950. The Origin and Behavior of Mutable Loci in Maize. *Genetics*, roč. 36, s. 344-355. ISBN 10.1111/tpj.12849.
- Ming, R., S. Hou, Y. Feng, Q. Yu, A. Dionne-Laporte, J. H. Saw, P. Senin, W. Wang, B. V. Ly, K. L. T. Lewis, S. L. Salzberg, L. Feng, M. R. Jones, R. L. Skelton, J. E. Murray, C. Chen, W. Qian, J. Shen, P. Du, M. Eustice, E. Tong, H. Tang, E. Lyons, R. E. Paull, T. P. Michael, K. Wall, D. W. Rice, H. Albert, M.-L. Wang, Y. J. Zhu, M. Schatz, N. Nagarajan, R. A. Acob, P. Guan, A. Blas, Ch. M. Wai, Ch. M. Ackerman, Y. Ren, Ch. Liu, J. Wang, J. Wang, J.-K. Na, E. V. Shakirov, B. Haas, J. Thimmapuram, D. Nelson, X. Wang, J. E. Bowers, A. R. Gschwend, A. L. Delcher, R. Singh, J. Y. Suzuki, S. Tripathi, K. Neupane, H. Wei, B. Irikura M. Paidi, N. Jiang, W. Zhang, G. Presting, A. Windsor, R. Navajas-Pérez, M. J. Torres, F. A. Feltus, B. Porter, Y. Li, A. M. Burroughs, M.-Ch. Luo, L. Liu, D. A. Chrostopher, S. M. Mount, P. H. Moore, Taf Sugimura, J. Jiang, M. A. Schulter, V. Friedman, T. Mitchell-Olds, D. E. Shippen, C. W. de Pamphilis, J. D. Palmer,**

- M. Freeling, A. H. Paterson, D. Gonsalves, L. Wang, M. Alaml.** 2008. The draft genome of the transgenic tropical fruit tree papaya (*Carica papaya* Linnaeus). *Nature*, roč. 452 č. 24, s. 991-999. DOI: 10.1038/nature06856. ISBN 10.1038/nature06856.
- Montchamp-Moreau, C.** 2006. Sex-ratio meiotic drive in *Drosophila simulans*: cellular mechanism, candidate genes and evolution. *Biochemical Society Transactions*, roč. 34 č. 4, s. 562-565. DOI: 10.1042/BST0340562. ISSN 0300-5127.
- Mummenhoff, K., H. Brüggemann, J. L. Bowman.** 2001. Chloroplast DNA phylogeny and biogeography of *Lepidium* (*Brassicaceae*). *American Journal of Botany*, roč. 88 č. 11, s. 2051-2063.
- Murat F., J.-H. Xu, E. Tannier, M. Abrouk, N. Guilhot, C. Pont, J. Messing a J. Salse.** 2010. Ancestral grass karyotype reconstruction unravels new mechanisms of genome shuffling as a source of plant evolution. *Genome Research*, roč. 20 č. 11, s. 1545-1557. DOI: 10.1101/gr.109744.110.
- Murat, F., A. Louis, F. Maumus, A. Armero, R. Cooke, H. Quesneville, H. R. Crollius a J. Salse.** 2015. Understanding *Brassicaceae* evolution through ancestral genome reconstruction. *Genome Biology*, roč. 16 č. 262. DOI: 10.1186/s13059-015-0814-y. ISBN 10.1186/s13059-015-0814-y.
- Navaro, A. a N. H. Barton.** 2003. Accumulating Postzygotic Isolation Genes in Parapatry: A New Twist on Chromosomal Speciation. *Evolution*, roč. 57 č. 3, s. 447-459. DOI: 10.1554/0014-3820(2003)057[0447:APIGIP]2.0.CO;2.
- Nelson R. T a R. C. Shoemaker.** 2006. Identification and analysis of gene families from the duplicated genome of soybean using EST sequences. *BMC Genomics*, roč. 7 č. 1, s. 204-219. DOI: 10.1186/1471-2164-7-204.
- Nie, W., P. C. M. O'Brien, B. L. Ng, B. Fu, V. Volobouev, N. P. Carter, M. A. Ferguson-Smith a F. Yang.** 2009. Avian comparative genomics: reciprocal chromosome painting between domestic chicken (*Gallus gallus*) and the stone curlew (*Burhinus oedicephalus*, *Charadriiformes*) - An atypical species with low diploid number. *Chromosome Research*, roč. 17, s. 99-113. DOI: 10.1007/s10577-009-9021-6. ISBN 10.1007/s10577-009-9021-6.
- Noor, M. A. F., K.L. Grams, L. A. Bertucci, Y. Almendarez, J. Reiland a K. R. Smith.** 2001. The genetics of reproductive isolation and the potential for gene exchange

between *Drosophila pseudoobscura* and *D. persimilis* via backcross hybrid males. *Evolution*, roč. 55 č. 3, s. 512-521. DOI: 10.1554/0014-3820(2001)055[0512:TGORIA]2.0.CO;2. ISBN 10.1007/s10577-009-9021-6. ISSN 0014-3820.

- Padilla, D. P., A. González-Castro a M. Nogales.** 2012. Significance and extent of secondary seed dispersal by predatory birds on oceanic islands: the case of the Canary archipelago. *Journal of Ecology*, roč. 100 č. 2, s. 416-427. DOI: 10.1111/j.1365-2745.2011.01924.x. ISSN 00220477
- Pardue M. L. a J. G. Gall.** 1969. Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, roč.64 č. 2
- Parkin, I. A. P., S. M. Gulden, A. G. Sharpe, L. Lukens, M. Trick, T. C. Osborn a D. J. Lydiate.** 2005. Segmental Structure of the *Brassica napus* Genome Based on Comparative Analysis With *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*, roč. 171, s. 765-781. DOI: 10.1534/genetics.105.042093. ISBN 10.1534/genetics.105.042093.
- Pawełkowicz, M., K. Zieliński, D. Zielińska, W. Pląder, K. Yagi, M. Wojcieszek, E. Siedlecka, G. Bartoszewski, A. Skarzyńska, Z. Przybecki.** 2016. Next generation sequencing and omics in cucumber (*Cucumis sativus* L.) breeding directed research. *Plant Science*, roč. 242, s. 77-88. DOI: 10.1016/j.plantsci.2015.07.025. ISBN 10.1534/genetics.105.042093. ISSN 01689452.
- Peterson D. G., J. P. Tomkins, D. A. Frish, R. A. Wing a A. H. Paterson.** 2000. Construction of plant bacterial artificial chromosome (BAC) libraries: an illustrated guide. *Journal of Agricultural Genomics*, č. 5.
- Pinkel, D., J. Landegent, C. Collins, J. Fuscoe, R. Segraves, J. Lucas a J. Gray.** 1988. Fluorescence in situ hybridization with human chromosome-specific libraries: Detection of trisomy 21 and translocations of chromosome 4. *Genetics*, roč. 85, s. 9138-9142. ISBN 10.1534/genetics.105.042093.
- Qiao, Q., Q.Wang, X. Han, Y. Guan, H. Sun, Y. Zhong, J. Huang a T. Zhang.** 2016. Transcriptome sequencing of *Crucihimalaya himalaica* (*Brassicaceae*) reveals how *Arabidopsis* close relative adapt to the Qinghai-Tibet Plateau. *Scientific Reports*, roč. 6. DOI: 10.1038/srep21729. ISBN 10.1038/srep21729.

- Radojčić, I. R., P. Peharec, M. Krsnik-Rasol, K. Delonga, K. Brkić a J. Vorkapić-Furać.** 2008. Glucosinolate Profiles, Myrosinase and Peroxidase Activity in Horseradish (*Armoracia lapathifolia* Gilib.) Plantlets, Tumour and Teratoma Tissues. *Food Technology and Biotechnology*, roč. 46 č. 3, s. 317-321. ISBN 10.1111/j.1365-313X.2006.02762.x.
- Ramsey, J. a D. W. Schemske.** 2002. Neopolyploidy in Flowering Plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*, roč. 33 č. 1, s. 589-639. DOI: 10.1146/annurev.ecolsys.33.010802.150437. ISBN 10.1038/srep21729. ISSN 0066-4162.
- Rhoades, M. M. a E. Dempsey.** 1966. The Effect of Abnormal Chromosome 10 on Preferential Segregation and Crossing over in Maize. *Genetics*, roč. 53 č. 5, s. 989-1020. DOI: 10.1146/annurev.ecolsys.33.010802.150437. ISBN 10.1038/srep21729.
- Rieseberg, L. H.** 2001. Chromosomal rearrangements and speciation. *Trends in Ecology and Evolution*, roč. 16 č. 7, s. 351-358. DOI: 10.1016/S0169-5347(01)02187-5. ISBN 10.1016/S0169-5347(01)02187-5.
- Shibata, F., M. Hizume a Y. Kuroki.** 1999. Chromosome painting of Y chromosomes and isolation of a Y chromosome-specific repetitive sequence in the dioecious plant *Rumex acetosa*. *Chromosoma*, roč. 108, s. 266-270. DOI: 10.1007/s004120050377. ISBN 10.1007/s004120050377.
- Shizuya H., B. Birren, U. J. Kim, V. Mancino, T. Slepak, Y. Tachiiri a M. Simons** 1992. Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using an F-factor-based vector. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, roč. 89 č. 18, s. 8794-8797. DOI: 10.1073/pnas.89.18.8794.
- Schönfelder, P. a I. Schönfelder.** 2002. Květena Kanárských ostrovů. Praha: Academia. ISBN 80-200-0998-1.
- Schranz M., M. A. Lysak a T. Mitchell-Olds.** 2006. The ABC's of comparative genomics in the *Brassicaceae*: building blocks of crucifer genomes. *Trends in Plant Science*, roč. 11 č. 11, s. 535-542. DOI: 10.1016/j.tplants.2006.09.002.
- Schranz M. E. a T. Mitchell-Olds.** 2006. Independent ancient polyploidy events in the sister families *Brassicaceae* and *Cleomaceae*. *The Plant Cell*, roč. 18 č. 5, s. 1152-1165.

DOI: 10.1105/tpc.106.041111.

- Schubert I. a M. A. Lysak.** 2011. Interpretation of karyotype evolution should consider chromosome structural constraints. *Trends in Genetics*, roč. 27 č. 6, s. 207-216. DOI: 10.1016/j.tig.2011.03.004.
- Schubert I., Fransz P. F., Fuchs J. a de Jong J. H.** 2001. Chromosome painting in plants. *Methods in Cell Science*, roč. 23 č. 1-3, s. 57-69. DOI: 10.1023/A:1013137415093.
- Schwarzacher T., Heslop-Harrison J.** 2000. Practical *in situ* hybridization. Oxford, UK: BIOS, 2000, xii, 203 p. ISBN 18-599-6138-X.
- Schwarzacher, T., A. R. Leitch, M. D. Bennett a J. S. Heslop-Harrison.** 1989. In Situ Localization of Parental Genomes in a Wide Hybrid. *Annals of Botany*, roč. 64, s. 315-324. ISBN 10.1007/s004120050377.
- Schwarzacher, T., M. L. Wang, A. R. Leitch, G. Moore, J. S. Heslop-Harrison a N. Miller.** 1997. Flow cytometric analysis of the chromosomes and stability of a wheat cell-culture line. *Theoretical and Applied Genetics*, roč. 94 č. 1, s. 91-97. DOI: 10.1007/s001220050386. ISBN 10.1007/s004120050377. ISSN 0040-5752.
- Snustad, D. P. a M. J. Simmons.** 2009. *Genetika*. Editor J. Relichová, překlad A. Matalová. Brno: Masarykova univerzita, 2009. ISBN 978-80-210-4852-2.
- Stebbins, G. L.** 1947. Types of Polyploids: Their Classification and Significance. *Advances in Genetics*, roč. 1, s. 403-429. DOI: 10.1016/S0065-2660(08)60490-3. ISBN 10.1016/S0065-2660(08)60490-3.
- Suda, J., T. Kyncl a R. Freiová.** 2003. Nuclear DNA Amounts in Macaronesian Angiosperms. *Annals of Botany*, roč. 92, s. 153-164. DOI: 10.1093/aob/mcg104. ISBN 10.1093/aob/mcg104.
- Szinay, D., E. Wijnker, R. van den Berg, R. G. F. Visser, H. de Jong a Y. Bai.** 2012. Chromosome evolution in *Solanum* traced by cross-species BAC-FISH. *Phytologist*, roč. 195, s. 688-698. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2012.04195.x. ISBN 10.1111/j.1469-8137.2012.04195.x.
- Tan, E. H., I. M Henry, M. Ravi, K. R Bradnam, T. Mandakova, M. P. A. Marimuthu, I. Korf, M. A. Lysak, L. Comai, S. W. L. Chan.** 2015. Catastrophic chromosomal restructuring during genome elimination in plants. *eLIFE.*, roč. 4. DOI:

10.7554/eLife.06516. ISBN 10.7554/eLife.06516.

- Tang, H., X. Wang, J. E. Bowers, R. Ming, M. Alam a A. H. Paterson.** 2008a. Unraveling ancient hexaploidy through multiply-aligned angiosperm gene maps. *Genome Research*, roč. 18, s. 1944-1954. DOI: 10.1101/gr.080978.108. ISBN 10.1101/gr.080978.108.
- Tang X., D. Szinay, C. Lang, M. S. Ramanna, E. A. G. van der Vossen, E. Datema, R. Klein Lankhorst, J. de Boer, S. A. Peters, Ch. Bachem, W. Stiekema, R. G. F. Visser, H. de Jong and Y. Bai.** 2008b. Cross-Species Bacterial Artificial Chromosome-Fluorescence in Situ Hybridization Painting of the Tomato and Potato Chromosome 6 Reveals Undescribed Chromosomal Rearrangements. *Genetics*, roč. 180, s. 1319-1328. DOI: 10.1534/genetics.108.093211. ISBN 10.1534/genetics.108.093211.
- The Arabidopsis Genome Initiative** 2000, Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, roč. 408, č. 6814, s. 796-815. DOI: 10.1038/35048692.
- The International Plant Names Index** [online]. 2005 [cit. 2016-04-03]. Dostupné z: <http://www.ipni.org/>
- Vasconcelos, E. V., A. F. de Andrade Fonsêca, A. Pedrosa-Harand, K. C. de Andrade Bortoleti, A. M. Benko-Iseppon, A. F. da Costa a A. C. Brasileiro-Vidal.** 2015. Intra- and interchromosomal rearrangements between cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] and common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) revealed by BAC-FISH. *Chromosome Research*, roč. 23, s. 253-266. DOI: 10.1007/s10577-014-9464-2. ISBN 10.1007/s10577-014-9464-2.
- Walsh, J. B.** 1982. Rate of Accumulation of Reproductive Isolation by Chromosome Rearrangements. *The American Naturalist*, roč. 120 č.4, s. 510-532. DOI: 10.1007/s10577-014-9464-2. ISBN 10.1007/s10577-014-9464-2.
- Wang G-L., Warren R., Innes R., Osborne B., Baker B. a Ronald P. C.** 1996. Construction of an *rabidopsis* BAC library and isolation of clones hybridizing with disease-resistance, gene-like sequences. *Plant Molecular Biology Reporter*, roč. 14 č. 2, s. 107-114. DOI: 10.1007/BF02684899.

- Warwick, S. I. a I. A. Al-Shehbaz.** 2006. *Brassicaceae*: Chromosome number index and database on CD-Rom. *Plant Systematics and Evolution*, roč. 259, s. 237-248. DOI: 10.1007/s00606-006-0421-1. ISBN 10.1007/s00606-006-0421-1.
- Weiss, H., B.-Y. Sun, T. F. Stuessy, Ch. H. Kim, H. Kato a M. Wakabayashi.** 2002. Karyology of plant species endemic to Ullung Island (Korea) and selected relatives in peninsular Korea and Japan. *Botanical Journal of the Linnean Society*, roč. 138, s. 93-105.
- White, M. J.** 1978. Modes of Speciation. *Paleobiology*, roč. 4 č. 3, s. 373-379
- Whittaker, R. J., K. A. Triantis a R. J. Ladle.** 2008. A general dynamic theory of oceanic island biogeography. *Journal of Biogeography*, roč. 35 č. 6, s. 977-994. DOI: 10.1111/j.1365-2699.2008.01892.x. ISBN 10.1093/sysbio/27.4.478. ISSN 03050270.
- Wilby, A. S. a J. S. Parker.** 1988. Recurrent patterns of chromosome variation in a species group. *Heredity*, roč. 61, s. 55-62. DOI: 10.1038/hdy.1988.90. ISBN 10.1038/hdy.1988.90.
- Wolny, E., K. Lesniewska, R. Hasterok a T. Langdon.** 2011. Compact genomes and complex evolution in the genus *Brachypodium*. *Chromosoma*, roč. 120, s. 199-212. DOI: 10.1007/s00412-010-0303-8. ISBN 10.1007/s00412-010-0303-8
- Wolny, E., W. Fidyk a R. Hasterok.** 2012. Karyotyping of *Brachypodium pinnatum* (2n = 18) chromosomes using cross-species BAC-FISH. *Genome*, roč. 56, s. 239-243. DOI: 10.1139/gen-2013-0012. ISBN 10.1139/gen-2013-0012.
- Wu, H.-J., Z. Zhang, J.-Y. Wang, D.-H. Oh, M. Dassanayake, B. Liu, Q. Huang, H.-X. Sun, R. Xia, Y. Wu, Y.-N. Wang, Z. Yang, Y. Liu, W. Zhang, H. Zhang, J. Chu, C. Yan, S. Fang, J. Zhang, Y. Wang, F. Zhang, G. Wang, S. Y. Lee, J. M. Cheeseman, B. Yang, B. Li, J. Min, L. Yang, J. Wang, Ch. Chu, S.-Y. Chen, H. J. Bohnert, J.-K. Zhu, X.-J. Wang a Q. Xie.** 2012. Insights into salt tolerance from the genome of *Theilungiella salsuginea*. *PNAS*, roč. 109 č.30, s. 12219-12224. DOI: 10.1073/pnas.1209954109. ISBN 10.1073/pnas.1209954109.
- Yang, F., S. Müller, R. Just, M. A. Ferguson-Smith a J. Wienberg.** 1997. Comparative Chromosome Painting in Mammals: Human and the Indian Muntjac (*Muntiacus muntjak vaginalis*). *Genomics*, roč. 39, s. 396-401. DOI: 10.1006/geno.1996.4497. ISBN 10.1006/geno.1996.4497.

- Yang, Y.-W., K.-N. Lai, P.-Y. Tai a W.-H. Li.** 1999. Rates of Nucleotide Substitution in Angiosperm Mitochondrial DNA Sequences and Dates of Divergence Between *Brassica* and Other Angiosperm Lineages. *Journal of Molecular Evolution*, roč. 48, s. 597-604. DOI: 10.1007/PL00006502. ISBN 10.1007/PL00006502
- Yavuz-Işık, N. a C. Demirci.** 2009. Miocene spores and pollen from Pelitçik Basin, Turkey–environmental and climatic implications. *Comptes Rendus Palevol*, roč. 8, s. 437-446. DOI: 10.1016/j.crpv.2009.02.002. ISBN 10.1016/j.crpv.2009.02.002.
- Yogeeswaran, K., A. Frary, T. L. York, A. Amenta, A. H. Lesser, J. B. Nasrallah, S. D. Tanksley, M. E. Nasrallah.** 2005. Comparative genome analyses of *Arabidopsis* spp: Inferring chromosomal rearrangement events in the evolutionary history of *A. thaliana*. *Genome Research*, roč. 15, s. 505-515. DOI: 10.1101/gr.3436305. ISBN 10.1101/gr.3436305.
- Yu, S. a W.D. Graf.** 2010. Telomere Capture as a Frequent Mechanism for Stabilization of the Terminal Chromosomal Deletion Associated with Inverted Duplication. *Cytogenetics and Genome research*, roč. 129, s. 265-274. DOI: 10.1159/000315887. ISBN 10.1159/000315887.
- Zachos J., Pagani M., Sloan L., Thomas E. a Billups K.** 2001. Trends, rhythms, and aberrations in global climate 65 Ma to present. *Science*, roč. 292, č. 5517, s. 686-693. DOI: 10.1126/science.1059412.
- Zhu, Z., J. Chao, H. Yu a A. S. Waggoner.** 1994. Directly labeled DNA probes using fluorescent nucleotides with different length linkers. *Nucleic Acids Research*, roč. 22 č. 16, s. 3418- 3422. DOI: 10.1093/nar/22.16.3418. ISBN 10.1093/nar/22.16.3418.
- Zimmering, S. a E. B. Bendbow.** 1973. Meiotic behavior of asymmetric dyads in the male *Drosophila*. *Genetics*, roč. 73 č. 4, s. 631-638.
- Ziolkowski, P. A., M. Kaczmarek, D. Babula a J. Sadowski.** 2006. Genome evolution in *Arabidopsis/ Brassica*: conservation and divergence of ancient rearranged segments and their breakpoints. *The Plant Journal*, roč. 47, s. 63-74. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2006.02762.x. ISBN 10.1111/j.1365-313X.2006.02762.x.