

**M A S A R Y K O V A
U N I V E R Z I T A**

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

**Evoluce karyotypu v rodu
penízek (*Noccaea*)**

Diplomová práce

MICHAELA KUBOVÁ

Vedoucí práce: RNDr. Terezie Mandáková, Ph.D.

Ústav botaniky a zoologie

Brno 2019

Bibliografický záznam

Autor:	Bc. Michaela Kubová Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita Ústav botaniky a zoologie
Název práce:	Evoluce karyotypu v rodu penízek (<i>Noccaea</i>)
Studijní program:	Ekologická a evoluční biologie
Studijní obor:	Botanika, směr Biosystematika rostlin
Vedoucí práce:	RNDr. Terezie Mandáková, Ph.D.
Akademický rok:	2018/2019
Počet stran:	84
Klíčová slova:	brukvovité; <i>Brassicaceae</i> ; <i>Coluteocarpeae</i> ; <i>Noccaea</i> ; srovnávací malování chromozomů; evoluce karyotypů

Bibliographic Entry

Author: Bc. Michaela Kubová
Faculty of Science, Masaryk University
Department of Botany and Zoology

Title of Thesis: Karyotype evolution in the genus *Noccaea*

Degree programme: Ecological and Evolutionary Biology

Field of Study: Botany, Plant Biosystematics

Supervisor: RNDr. Terezie Mandáková, Ph.D.

Academic Year: 2018/2019

Number of Pages: 84

Keywords: Brassicaceae; Coluteocarpeae; *Noccaea*;
comparative chromosome painting; karyotype
evolution

Abstrakt

Rod *Noccaea* je jediným rodem tribu *Coluteocarpeae* a zahrnuje ca 128 druhů s rozšířením primárně v Evropě a Asii. Jde o taxonomicky jeden z nejvíce problematických rodů celé čeledi *Brassicaceae*. V této studii prezentují výsledky chromozomových počtů, *in situ* lokalizace rDNA a rekonstrukce struktury karyotypu metodou srovnávacího malování chromozomů. Počet chromozomů stanovený u 26 *Noccaea* druhů je $2n = 2x = 14$ a $2n = 4x = 28$, s převládajícím počtem diploidním. Počet lokusů 5S a 45S rDNA je v celém rodě variabilní. Korelace mezi počtem chromozomů a rDNA s fylogenetickým postavením druhů nebyla nalezena. S pomocí metody srovnávacího malování chromozomů byla rekonstruována struktura karyotypu u pěti druhů rodu *Noccaea* (*N. fendleri* subsp. *glauca*, *N. meyeri*, *N. aucheri*, *N. hastulata* a *N. perfoliata*). Podrobná chromozomová struktura vybraných druhů odhalila u čtyřech z analyzovaných druhů sdílenou strukturu šesti chromozomů ze sedmi, liší se pouze specifickými inverzemi na chromozomu 6/8. Byl rekonstruován karyotyp společného předka celého tribu *Coluteocarpeae*. Tento ancestrální karyotyp tribu *Coluteocarpeae* obsahoval sedm chromozomových párů a vznikl odtržením z ancestrálního proto-Calepineae karyotypu (PCK, $n = 7$) prostřednictvím neobvykle vysokého počtu pericentrických inverzí. Což naznačuje pravděpodobný vznik celého tribu *Coluteocarpeae* z PCK karyotypu.

Abstract

The genus *Noccaea*, belonging to the tribe Coluteocarpeae and comprising about 128 species with distribution primarily in Europe and Asia, is taxonomically one of the most problematic genera of the entire family Brassicaceae. In this study, I present results of chromosome counts, *in situ* localization of rDNA probes and karyotype reconstructions using the method of comparative chromosome painting. Chromosome numbers counted in 26 *Noccaea* species correspond to $2n = 2x = 14$ and $2n = 4x = 28$, with a predominant diploid chromosome number. The number of 5S and 45S rDNA loci is highly variable throughout the genus. No correlation was found between the chromosome numbers, rDNA and ITS phylogeny. Karyotype structure was reconstructed in five *Noccaea* species (*N. fendleri* subsp. *glauca*, *N. meyeri*, *N. aucheri*, *N. hastulata* and *N. perfoliata*). Comparative chromosome painting revealed that four of the analyzed species share the structure of six of the seven chromosomes, differing with species-specific inversions on chromosome 6/8. The karyotype of the common ancestor of the entire Coluteocarpeae tribe was reconstructed. This ancestral karyotype of the Coluteocarpeae tribe contained seven chromosome pairs. It was formed by detachment from the proto-Calepineae karyotype and then six out of seven chromosomes experienced one or more inversions. And thus, probably the entire Coluteocarpeae tribe, have descended from the proto-Calepineae Karyotype.



Masarykova univerzita

Přírodovědecká fakulta



ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Student: **Bc. Michaela Kubová**
Studijní program: **Ekologická a evoluční biologie**
Studijní obor: **Botanika**
Studijní směr: **Biosystematika rostlin**

Ředitel Ústavu botaniky a zoologie PřF MU Vám ve smyslu Studijního a zkušebního řádu MU určuje diplomovou práci s tématem:

Evoluce karyotypu v rodu penízek (*Noccaea*)

Karyotype evolution in the genus *Noccaea*

Oficiální zadání:

Penízek modravý (*Noccaea caerulescens*, syn. *Thlaspi caerulescens*; Brassicaceae) je významným rostlinným modelem. Tento druh vykazuje toleranci vůči těžkým kovům a je schopen v listech akumulovat zinek, kadmium a nikl. Rekonstrukce struktury karyotypu penízku prokázala, že vznikl redukcí chromozomového počtu z $n = 8$ na $n = 7$, která byla následovaná několika pericentrickými inverzemi. Pericentrické inverze mohly hrát důležitou roli v modifikaci genové exprese a adaptaci na těžké kovy. Předmětem diplomové práce je rekonstrukce a porovnání cytogenetických map různých druhů a populací rodu penízek (*Noccaea*) s již známou cytogenetickou mapu penízku modravého, a to především s použitím metody srovnávacího malování chromozómů. Cílem práce je identifikace a detailní charakterizace druhově a populačně specifických chromozomových přestaveb v rodu penízek a rekonstrukce evoluce karyotypu v tomto rodě.

Mandáková T., Lysak M.A. 2008. Chromosomal phylogeny and karyotype evolution in $x=7$ crucifer species (Brassicaceae). *Plant Cell* 20:2559-2570.

Mandáková T., Singh V., Krämer U., Lysak M.A. 2015. The genome of the heavy metal hyperaccumulator *Noccaea caerulescens* and its stability on metalliferous and non-metalliferous soils. *Plant Physiology*, 169: 674-689.

Lysak M.A., Mandáková T., Schranz M.E. 2016. Paleogenomics of Crucifers: Ancestral Genomic Blocks Revisited. *Current Opinion in Plant Biology* 30:108-115.

Mandáková T., Lysak M.A. 2016. Painting of *Arabidopsis* chromosomes with chromosome-specific BAC clones. *Current Protocols in Plant Biology* 1: 359-371.

Mandáková T., Lysak M.A. 2016. Chromosome preparation for cytogenetic analyses in *Arabidopsis*. *Current Protocols in Plant Biology* 1: 1-9.

Jazyk závěrečné práce: Český

Vedoucí diplomové práce: Mgr. Terezie Mandáková, Ph.D.

Podpis vedoucího práce:

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat své školitelce Terezii Mandákové za její cenné rady, dohled nad mojí prací, za její nadšení a vstřícný přístup během mého studia. Dále paní Coufalové, Rotkovské a dalším členům laboratorního týmu za obětavou pomoc a cenné rady.

Prohlášení

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

Brno, 2. května 2019

.....

Michaela Kubová

Obsah

1 ÚVOD.....	10
1.1 Čeleď brukvovité (<i>Brassicaceae</i>).....	10
1.2 Malování chromozomů.....	14
1.3 Srovnávací malování chromozomů v čeledi <i>Brassicaceae</i>	16
1.4 Ancestrální karyotyp brukvovitých (ACK).....	17
1.5 Proto-Calepineae karyotyp.....	19
1.6 Rod <i>Noccaea</i>	21
1.7 Struktura chromozomů v rodu <i>Noccaea</i>	28
2 CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE.....	30
3 MATERIÁL A METODIKA.....	31
3.1 Rostlinný materiál.....	31
3.2 Chemikálie.....	33
3.3 Příprava chromozomových preparátů.....	34
3.4 Příprava chromozomů k hybridizaci sond.....	35
3.5 Příprava a značení sond nick translací.....	36
3.6 Fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace.....	37
3.7 Odmytí po hybridizaci a imuno detekce hybridizovaných sond.....	38
3.8 Fluorescenční mikroskopie a vyhodnocení hybridizačních signálů.....	39
4 VÝSLEDKY.....	40
4.1 Chromozomové počty.....	40
4.3 Konstrukce srovnávacích cytogenetických map vybraných druhů rodu <i>Noccaea</i>	48
4.3.1 Karyotyp <i>Noccaea fendleri</i> subsp. <i>glauca</i>	49
4.3.2 Karyotyp <i>Noccaea meyeri</i>	54
4.3.3 Karyotyp <i>Noccaea aucheri</i>	58
4.3.4 Karyotyp <i>Noccaea hastulata</i>	61
4.3.5 Karyotyp <i>Noccaea perfoliata</i>	66
5 DISKUZE.....	70
5.1 Chromozomové počty a ribozomální DNA u zkoumaných druhů.....	70
5.2 Evoluce karyotypu v rodu <i>Noccaea</i>	71
6 ZÁVĚR.....	76
7 LITERATURA.....	77

1 ÚVOD

1.1 Čeleď brukvovité (*Brassicaceae*)

Čeleď brukvovité je rozsáhlá monofyletická skupina krytosemenných dvouděložných rostlin. Od jiných kvetoucích rostlin je odlišuje křížová koruna (květní obaly tvoří 2 kruhy volných kališních lístků po dvou lístcích v každém kruhu a jeden kruh 4 lístků korunních), šest volných tyčinek (2 vnější a 4 vnitřní) a přítomnost glukosinolátů, které se enzymem myrozinázou štěpí na cukernou složku a štiplavou silici. Čeleď brukvovitých zahrnuje mnohé významné okrasné druhy a plodiny (zelenina jako je např. zelí, květák, ředkev, hořčice, řeřicha aj. a okrasné druhy jako je měsícnice či večernice), zdroje průmyslových a kuchyňských olejů (brukev řepka olejka) a krmiva. *Brassicaceae* zahrnují také velmi významné modelové organismy. Huseníček rolní (*Arabidopsis thaliana*) patří mezi nejstudovanější organismy na světě a je první kvetoucí rostlinou, u které byl sekvenován celý genom (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000). Druhým modelovým systémem je zemědělsky významný rod *Brassica* (*B. oleracea*, *B. rapa*, *B. nigra* a jejich tři významné hybridy *B. juncea*, *B. napus* a *B. carinata*), který poskytl vhled do genetiky doby kvetení (Schrantz et al. 2002), na hybridizaci a umlčování genů (Pires et al. 2004) a mnoho jiných jevů.

Čeleď brukvovité je jedna z největších čeledí na světě a v současné době čítá 52 tribů, 351 rodů a 3977 druhů (URL1). Před nástupem molekulárně fylogenetických metod byla klasifikace této čeledi plně závislá na jednom nebo více morfologických znacích. Nicméně mnoho studií prokázalo, že morfologické znaky brukvovitých jsou vysoce homoplasní (útvary mají stejnou funkci, jsou však jiného původu), což znemožňuje použití těchto znaků při stanovení fylogenetických vztahů v rámci čeledi (Koch et. al 2003). V minulosti se jako nejpoužitelnější znak pro oddělení velmi příbuzných rodů ukázala morfologie trichomů (Prantl 1891; Rollins and Banerjee 1976; Al-Shehbaz et al. 1999). Do roku 2006 se veškeré taxonomické studie čeledi brukvovitých zaměřovaly na vyřešení určitého taxonomického problému u pár desítek rodů (Warwick and Sauder 2005; O’Kane and Al-Shehbaz 2003; Koch 2003; Bleeker et al. 2002; Koch and Al-Shehbaz 2000, 2002, 2004). V roce 2006 Beilstein et al. publikovali článek, kde

zkoumali 101 rodů čeledi brukvovitých se využitím chloroplastového genu *ndhF*. Na základě těchto sekvencí bylo v čeledi rozpoznáno 21 monofyletických skupin (A–U) a byly navrženy tři hlavní fylogenetické linie (I – III) s bazálním sesterským tribem *Aethionemeae* (Obr. 1A).

Linie I je pravděpodobně monofyletická skupina a aktuálně obsahuje 15 tribů: *Alyssopsidaeae*, *Boechereae*, *Camelineae*, *Cardamineae*, *Crucihimalayaeae*, *Descurainieae*, *Erysimeae*, *Halimolobeae*, *Lepidieae*, *Microlepidieae*, *Oreophytoneae*, *Physarieae*, *Smelowskieae*, *Turritidaeae* a *Yinshanieae* (Al-Shehbaz 2012; Beilstein et al. 2006, 2008; Franzke et al. 2011; Obr. 1).

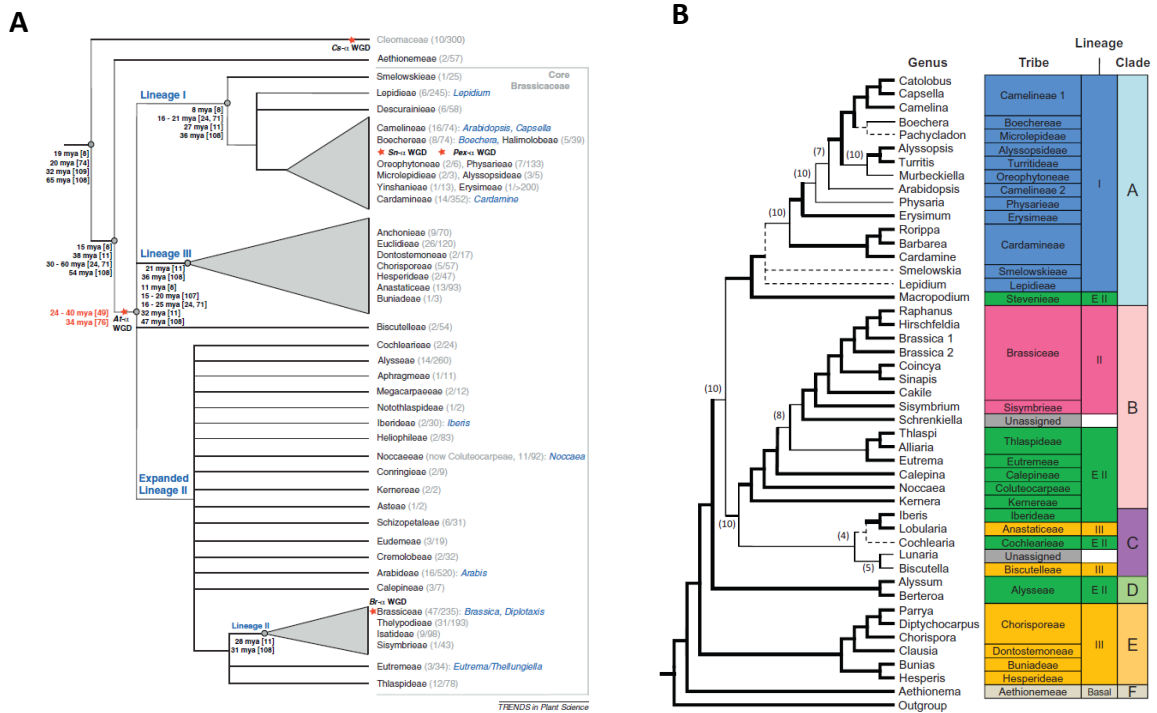
Linie II je opět pravděpodobně monofyletická a hlavní linie zahrnuje 7 tribů: *Brassicaceae*, *Isatidaeae*, *Sisymbrieae* a *Thelypodieae*. Rozšířená linie II obsahuje triby: *Alyseae*, *Aphragmeae*, *Arabideae*, *Astaeae*, *Calepineae*, *Cochlearieae*, *Coluteocarpeae*, *Conringieae*, *Cremolobeae*, *Eudemeae*, *Eutremeae*, *Heliophileae*, *Iberideae*, *Kernereae*, *Megacarpaeaeae*, *Notothlaspidieae*, *Schizopetaleae* a *Thlaspidieae* (Al-Shehbaz 2012; Beilstein et al. 2006, 2008; Franzke et al. 2011; Obr. 1).

Linie III nemá dostatečně potvrzenou monofyletičnost a zahrnuje sedm tribů: *Anastaticaeae*, *Anchonieae*, *Buniadaeae*, *Chorisporaeae*, *Dontostemoneae*, *Euclidieae* a *Hesperidaeae*. (Al-Shehbaz 2012; Beilstein et al. 2006, 2008; Franzke et al. 2011; Obr. 1).

S rozvojem používání molekulárních postupů a metod v systematice se radikálně změnila i klasifikace čeledi *Brassicaceae* do tribů. Od té doby vzrostl počet monofyletických tribů z 25 (Al-Shehbaz et al. 2006) na současných 52 (BrassiBase, URL1).

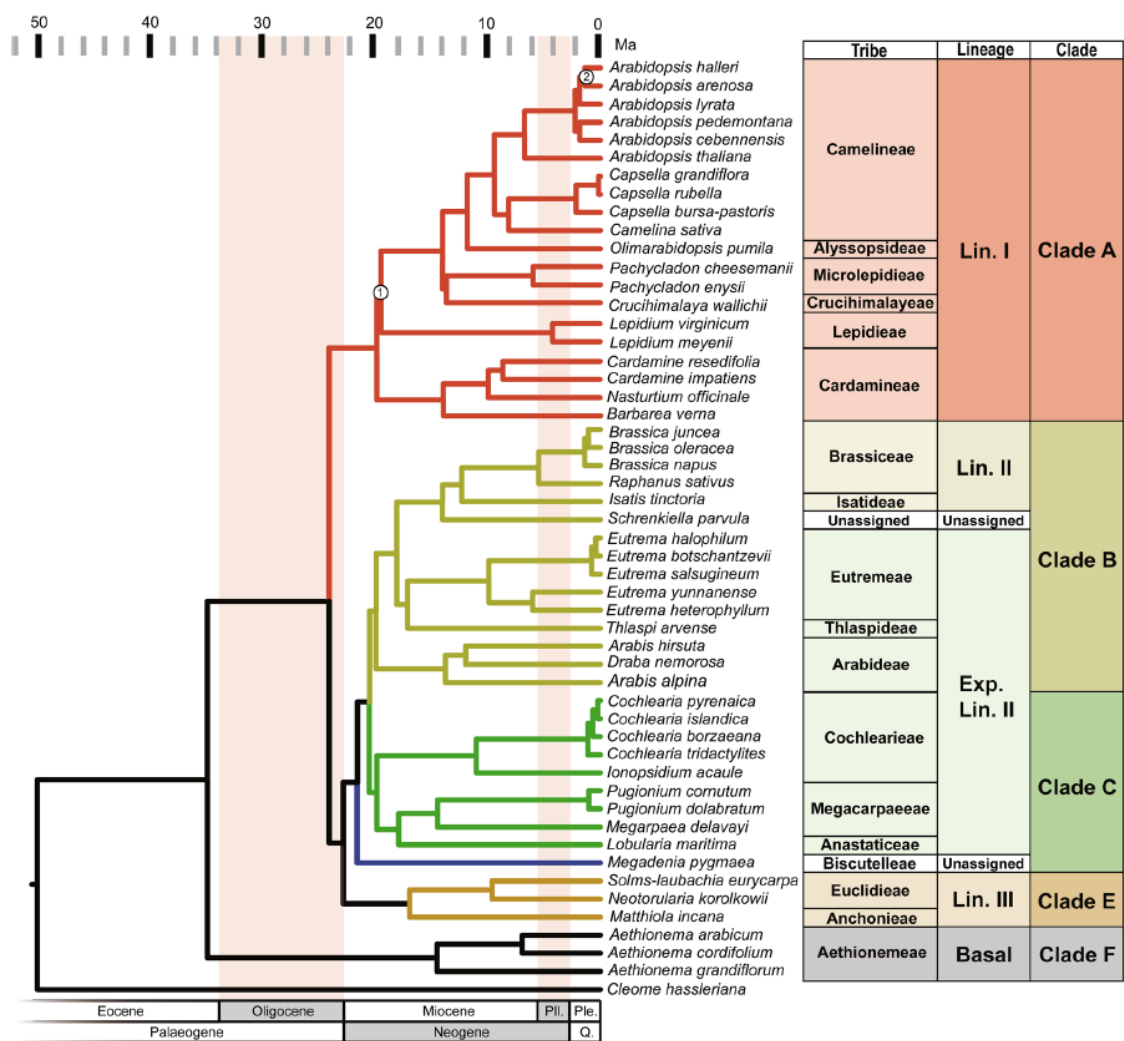
V roce 2015 Huang et al. představili nové pojetí fylogeneze této čeledi s použitím jaderných markerů z nově sekvenovaných transkriptomů 32 druhů čeledi *Brassicaceae* (Obr. 1B). Rody a druhy dělí do šesti skupin (kladů A–F). Klad A zahrnuje linii I a *Macropodium nivale* a je sesterský ke kladu B (linie II a druhy rozšířené linie II) a C (*Anastaticaeae*, *Biscutelleae*, *Cochlearieae*, *Iberideae* a *Lunaria annua*). Všechny tři dohromady (A+B+C) tvoří sesterskou skupinu k kladu D (*Allyseae* – rozšířená linie II). Klad D tvoří linii III, která je sesterská k větvi A+B+C+D. Klad F (*Aethionemeae*) je bazální

sesterskou skupinou k celé čeledi, stejně jako u fylogenetických stromů (Beilstein et al. 2006, Franzke et al. 2011).



Obr. 1: Fylogeneze čeledi *Brassicaceae*: (A) Fylogenetický strom podle Franzke et al. 2011 rozdělující čeleď na linie I – III. Čísla v závorkách udávají počet rodů/počet druhů. (B) Fylogenetický strom podle Hung et al. 2015, kteří rozdělili čeleď na 6 hlavních kladů A – F.

Guo et al. v roce 2017 publikovali prozatím nejnovější studii zabývající se fylogenezí v čeledi *Brassicaceae* s použitím kompletních plastonů z 51 druhů reprezentujících všechny čtyři linie, popř. 5 ze šesti kladů (A, B, C, E a F). Potvrdili vzájemné vztahy mezi liniemi I – III a sesterskou skupinou *Aethionemeae*. Ukázalo se, že dříve definovaný klad C je parafyletický (rod *Magadenia* tvoří samostatnou linii), zatímco ostatní klady jsou monofyletické. Klad E (linie III) byl upraven jako sesterský ke kladům B+C (Obr. 2).



Obr. 2: Nejnovější publikovaný časově kalibrovaný fylogenetický strom čeledi *Brassicaceae* podle Guo et al. 2017 (Ma = miliony let, Pli = pliocén, Ple = pleistocén).

Všechny současné studie uvádějí, že po oddělení bazálního tribu *Aethionemeae*, prodělala čeleď *Brassicaceae* (tzv. *Brassicaceae* crown group) rozsáhlou diverzifikaci. Koch et al. (2000, 2001) určili dobu oddělení tribu *Aethionemeae* od ostatních tribů čeledi před 30 – 60 miliony let, Ermolaeva et al. (2003) před 24 – 40 miliony let, Schranz and Mitchell-Olds (2006) před 34 miliony lety, Henry et al. (2006) před 24 – 40 miliony lety, Fawcett et al. (2009) před přibližně 40 miliony lety, Franzke et al. (2009) před 15 miliony let a Beilstein et al. (2010) před 54,3 miliony let. Couvreur et al. (2010) určili počátek čeledi před 37,6 miliony let, čímž potvrdili výsledky předchozích studií. Molekulární datování potvrdilo vznik hlavních linií nebo kladů mezi pozdním oligocénem

a brzkým miocénem (Obr. 2) a následnou velmi rychlou diverzifikací v celé čeledi (Guo et al. 2017). Stáří jednotlivých linií podle Couvreur et al. (2010) je odhadováno na 27,3 milionu let u linie I, na 28,2 milionu let u linie II a 21,4 milionu let u linie III. Ve stejném roce publikovali Beilstein et al. (2010) studii, kde určili stáří jednotlivých linií na 35,6 milionu let u linie I, 30,8 milionu let u linie II a 35,5 milionu let u linie III.

Čeďed' brukvovitých má centrum největší druhové diverzity ve střední Asii (Íránsko-Túranská oblast), odkud také s největší pravděpodobností pochází (Al-Shehbaz et al. 2006). To podporuje i fakt, že nejstarší pyl čeledi *Brassicaceae* byl nalezen v Turecku a pocházel z období středního miocénu (Yavuz-Isik and Demirci 2009).

1.2 Malování chromozomů

Malováním chromozomů (chromosome painting, CP) se rozumí vizualizace chromozomových úseků nebo celých chromozomů metodou FISH (fluorescenční *in situ* hybridizace, fluorescence *in situ* hybridization). FISH spočívá v detekci specifické sekvence na chromozomu s použitím fluorescenčně značené sondy, kde sonda je fragment nukleové kyseliny komplementární k cílové sekvenci. Při hybridizaci dojde k párování bází podle pravidel komplementarity a spojí se tedy vlákno studované DNA s druhým vláknem, kterým je fluorescenčně značená sonda. *In situ* znamená, že k hybridizaci dojde ‚v místě‘, tedy na chromozomovém preparátu (Mandáková 2014).

Srovnávací malování chromozomů (comparative chromosome painting, CCP) je založeno na mezidruhové hybridizaci fluorescenčně značených chromozomově specifických sond. To nám umožňuje porovnávat strukturu jednotlivých chromozomů nebo jejich částí u různých druhů, identifikovat evolučně sdílené chromozomy nebo jejich části, umožňuje rekonstrukci vývojově původních karyotypů a pomáhá k pochopení evoluce chromozomů.

Poprvé termín ‚chromosome painting‘ použil ve své studii Pinkel et al. (1988), kde se zabývali translokací a aneuploidii lidského chromozomu 4 a 21 v metafázních buňkách. Malování chromozomů se poté začalo běžně používat při výzkumech savců (Ferguson-Smith 1997), ptáků (Shetty et al. 1999; Zimmer et al., 1997; Nie et al. 2009),

plazů (Muhlmann-Diaz et al. 2001) a hmyzu (Fuchs et al. 1998). Stalo se významným nástrojem při identifikaci chromozomů a chromozomových aberací pro diagnostické účely (Fergusom-Smith 1997; Liehr et al. 2013), pro zjišťování mutagenicity (Cremer et al. 1990, Marshall and Obe 1998) a pro studie karyotypových změn v průběhu evoluce (Shetty et al. 1999).

V cytogenetice živočichů se sondy získávají z chromozomů nebo jejich částí izolací průtokovou cytometrií nebo laserovou mikrodisekcí chromozomů. Izolovaná DNA je následně amplifikována metodou DOP-PCR, fluorescenčně označena a je hybridizována na chromozomy na preparátu. Pro zajištění specifické hybridizace sond na cílová místa (zpravidla chromozomy nebo buněčná jádra), musí sonda obsahovat chromozomově specifické sekvence nukleotidů. K dosažení specifity hybridizačních signálů, je nutné potlačit vazbu sekvencí mimo cílový chromozom, především roztroušených repetitivních sekvencí. Toho dosáhneme přidáním neznačené celogenomové DNA nebo DNA obohacené o repetice do hybridizační sondy (Mandáková 2014).

V případě malování rostlinných chromozomů nelze použít sondy připravené z celých chromozomů nebo velkých chromozomových úseků získané cytometrií popř. mikrodisekcí, jak je tomu v cytogenetice živočichů. Rostliny mají ve svém genomu rozprostřeno velké množství nejrůznějších typů repetitivních sekvencí (retroelementy, tandemové repetice), které při malování chromozomů rostlin způsobují nespecifickou hybridizaci. Navíc rostliny mají unikátní sekvence pro vazbu sondy na chromozomech daleko od sebe a jsou odděleny oblastmi repetic. Proto je výsledný signál po CP příliš slabý pro rozlišení konkrétních chromozomů. (Schubert et al. 2001).

Výraz malování chromozomů se začal používat v širším slova smyslu: zahrnuje např. genomickou *in situ* hybridizací (GISH) s použitím genomické DNA jako hybridizační sondy (Schwarzacher et al. 1989). Znamená to hybridizaci celkové genomické DNA určitého druhu na chromozomy nebo buněčná jádra jiného druhu. Tato metoda umožňuje identifikaci rodičovského chromatinu v chromozomovém komplexu mezidruhových hybridů. Pomocí GISH metody byl například identifikován původ allotetraploidního druhu *Cardamine flexuosa*, který vznikl zkřížením druhů *Cardamine*

amara a *Cardamine hirsuta* (Mandáková et al. 2014). Malováním chromozomů u rostlin se také označuje FISH se sondami odvozenými na základě chromozomově specifických repetit, např. chromozomu Y u *Rumex acetosa* (Shibata et al. 1999).

Alternativní strategií malování rostlin je metoda FISH se sondou z jednotlivých BAC (umělý bakteriální chromozom) nebo YAC (umělý chromozom kvasinek) klonů. Pomocí tohoto přístupu lze u druhů s malým genomem a nízkým počtem repetit, jako je rýže (Jiang et al. 1995), bavlna (Hanson et al. 1995), rajče a brambor (Fuchs et al. 1996; Dong et al. 2000) a druhy čeledi brukvovité, identifikovat specifické chromozomové segmenty. FISH s použitím jednoho nebo několika málo BAC klonů jako sondy se nazývá BAC-FISH. Použije-li se jako sonda velké množství BACů, které pokrývají velké chromozomální oblasti nebo celé chromozomy, je možné získat srovnatelné informace jako při malování chromozomů živočichů. Ve své práci budou metodou malování chromozomů nazývat právě tento metodický přístup.

1.3 Srovnávací malování chromozomů v čeledi *Brassicaceae*

Vznik a rozvoj metody malování chromozomů u čeledi brukvovité se pojí s osekvenováním celého genomu huseníčku rolního (*Arabidopsis Genome Initiative* 2000). Předpokladem pro úspěšné malování chromozomů s využitím BAC klonů je vytvoření tzv. BAC knihoven, které obsahují velký počet chromozomově specifických BAC klonů nesoucích známou sekvenci DNA, a které jsou uspořádané na chromozomech. Tím, že známe přesnou pozici jednotlivých BAC klonů na chromozomech, mohou být tyto klony různě kombinovány a použity jako sondy pro vizualizaci velkých chromozomových úseků, chromozomových ramen nebo celých chromozomů. V roce 2001 bylo úspěšně provedeno malování chromozomu 4 huseníčku pomocí sond, které byly sestaveny z celých sad chromozomově specifických BAC klonů (Lysak et al. 2001). O tři roky později se podařilo úspěšně vizualizovat všech pět párů chromozomů (Pecinka et al. 2004) a tím se *A. thaliana* stal první rostlinou s rekonstruovaným karyotypem pomocí metody malování chromozomů. Aplikace metody CP u huseníčku umožňuje analýzu struktury

jeho chromozomů a následné studium vnitrochromozomových a mezichromozomových přestaveb.

Úspěšné zavedení metody CP u huseníčku vedlo k její aplikaci na další zástupce brukvovitých (srovnávací malování chromozomů, CCP). Při CCP se chromozomově specifické BAC klony pocházející z huseníčku hybridizují na chromozomy jiných rostlin z čeledi *Brassicaceae* (Lysak et al. 2006; Mandáková and Lysak 2008; Mandáková et al 2010a, b, 2012). CCP s použitím jiných BAC klonů než pocházejících z *A. thaliana* byla také testována (Lysak et al. 2010), nicméně BAC klony z huseníčku jsou stále nejpoužívanějšími sondami ve srovnávací cytogenetice brukvovitých. Oproti jiným mají řadu výhod: známe jejich přesnou pozici na chromozomech a jsou dostupné kompletní BAC knihovny. Nejpodstatnější však je, že evolučně mladý genom *A. thaliana* obsahuje malé množství repetitivních sekvencí (přibližně 15 %). Pomocí metody CCP můžeme v čeledi *Brassicaceae* identifikovat velké chromozomové oblasti a celé chromozomy, které mohou být společné pro různé druhy (tzn. můžeme studovat syntenii a kolinearitu chromozomových oblastí nebo celých chromozomů mezi různými brukvovitými druhy), dokážeme rozpoznat chromozomové přestavby, kterými se jednotlivé chromozomy/karyotypy mohou odlišovat a dokážeme odhalit mechanismy zodpovědné za současnou podobu karyotypů (Lysak et al. 2006).

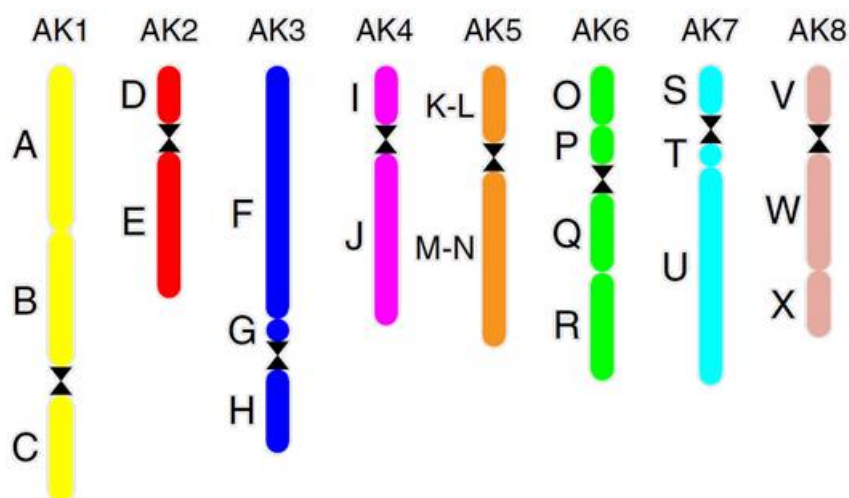
Dosud byla metoda CCP úspěšně aplikována u čeledi *Brassicaceae* (Lysak et al. 2001, 2005, 2007; Mandáková et al. 2010a, 2010b, 2013, 2015, 2019), *Poaceae* (Betekhtin et al. 2014), *Fabaceae* (Almeida and Pedrosa-Harand 2013; Fonséca and Pedrosa-Harand 2013), *Solanaceae* (Tang et al. 2008) a *Cucurbiaceae* (Yang et al. 2014).

1.4 Ancestrální karyotyp brukvovitých (ACK)

Abychom mohli rozlišit evoluční změny karyotypů, je důležité odlišovat původní karyotypy od odvozených. Srovnávací genetické a cytogenetické práce tribu *Camelineae* ukázaly, že *A. thaliana* má vysoce přestavěný a odvozený karyotyp (Boivin et al. 2004; Kuittinen et al. 2004; Koch and Kiefer 2005; Lysak et al. 2006), což znemožňuje jeho použití jako reference pro srovnávací studie v čeledi brukvovitých (Schrantz et al. 2006).

Srovnávací genetické mapování mezi druhy *A. thaliana* (n=5), *A. lyrata* (n=8) a *Capsella rubella* (n=8) odhalilo vysoce konzervovanou strukturu genomu sdílenou mezi *A. lyrata* a *C. rubella* a vysoký stupeň chromozomové kolinearity (konzervativní uspořádání genů v určitých oblastech chromozomů) mezi všemi druhy (Koch and Kiefer 2005). Podobnost mezi karyotypy *A. lyrata* a *C. rubella* a skutečnost, že n=8 je nejběžnějším chromozomovým číslem v tribu *Camelineae*, stejně jako v celé čeledi *Brassicaceae* (Warwick and Al-Shehbaz 2006), vedly k vytvoření hypotetického ancestrálního karyotypu brukvovitých (Ancestral Crucifer Karyotype, ACK, Obr. 3) s osmi chromozomy (n = 8, AK1- AK8) podobajícími se chromozomům *A. lyrata* a *C. rubella* (Lysak et al. 2006, Schranz et al. 2006). Byla také ověřena hypotéza o redukci počtu chromozomů z n = 8 na n = 7, 6 a 5. Genomy také sdílejí rozsáhlé konzervované genomické bloky (GBs; Schranz et al. 2006). Srovnávací sekvenční analýzy druhu *Brassica napus* napomohly k identifikaci nejméně 21 genomických bloků v genomu *A. thaliana*, které společně s přestavbami a duplikacemi pokrývají 90 % genomu *B. napus* (Parkin et al. 2005). ACK byl na základě toho rozdělen na 24 konzervovaných GBs, které jsou označeny A – X (Schranz et al. 2006). V nejnovější studii z roku 2016 (Lysak et al. 2016) vyhodnotili na základě cytogenetických analýz 35 druhů organizaci GBs a navrhli redukci 4 genomických bloků (K, L, M, N) na dva (K-L, M-N). Důvodem bylo to, že GBs K a L jsou ve skutečnosti oddělené pouze u *A. thaliana* a GBs M a N jsou oddělené pouze u rodu *Brassica*. V současné době je tedy uznáván koncept ACK s 22 GBs (Obr. 3). Od svého zavedení byl koncept ACK s GBs použit v řadě srovnávacích studií genomů brukvovitých (Mandáková et al. 2010a, b, 2012; Mandáková and Lysak 2008; Nelson et al. 2011; Schranz et al. 2007; Wang et al. 2011).

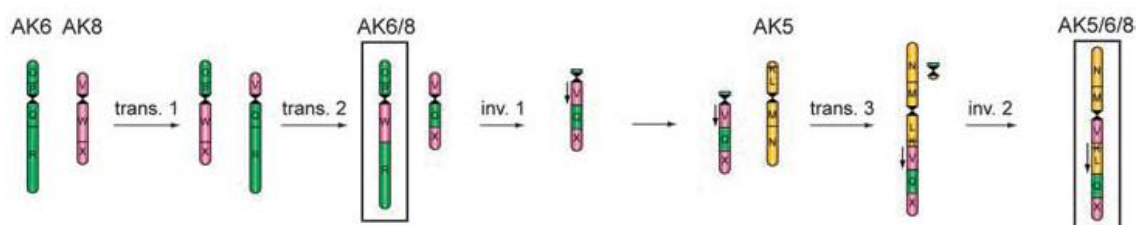
Ancestral Crucifer Karyotype (ACK)



Obr. 3: Ancestrální karyotyp brukvovitých (ACK). ACK má 8 chromozomů (AK1, AK2, ..., AK8) skládajících se z 22 genomických bloků (A – X). Obrázek převzat z Lysak et al. 2016.

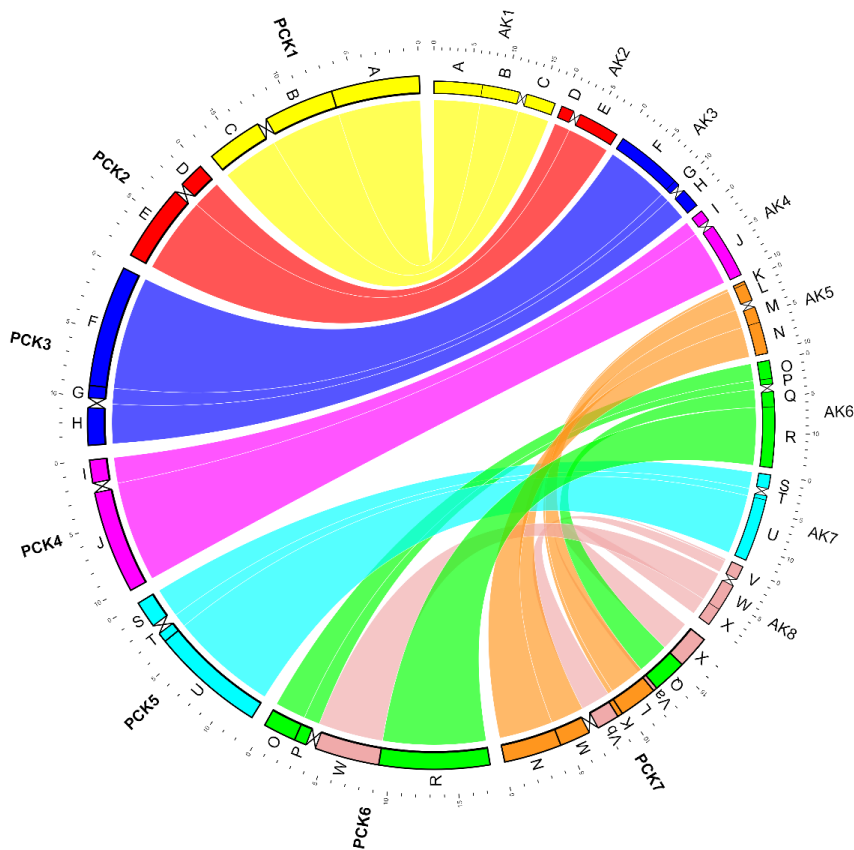
1.5 Proto-Calepineae karyotyp

Mandáková and Lysak (2008) zkoumali evoluci karyotypu rozšířené linie II, která obsahuje triby s chromozomovým číslem $n=7$ ($2n = 14, 28$). Tato studie zahrnuje osm druhů ze šesti různých tribů: *Calepina irregularis* a *Goldbachia laevigata* (*Calepineae*), *Conringia orientalis* (*Conringieae*), *Glastaria glastifolia* (*Isatideae*), *Noccaea caerulescens* (*Coluteocarpeae*), *Ochthodium aegyptiacum* (*Sisymbrieae*) a *Thellungiella salsuginea* (*Eutremeae*). Všechny zkoumané druhy měly společné 2 translokované chromozomy, které vznikly rekombinací ze tří ancestrálních chromozomů (Obr. 4).



Obr. 4: Předpokládaný scénář vzniku translokačních chromozomů AK6/8 a AK5/6/8 z chromozomů AK5, AK6 a AK8. Genomické bloky jsou označeny písmeny K – X. Šipky směřující dolů ukazují opačnou orientaci GB ve srovnání s pozicí v ACK.

Chromozom AK6/8 pravděpodobně vznikl dvěma po sobě jdoucími translokacemi mezi chromozomy AK6 a AK8. Centromera pochází z chromozomu AK6 nebo AK8. Translokovaný chromozom V/Q/X prodělal pericentrickou inverzi krátkého raménka (blok V) a stal se akrocentrickým. Následně došlo k translokaci dlouhého raménka (bloky V/Q/X) na krátké raménko chromozomu AK5. Chromozom AK5/6/8 prodělal paracentrickou inverzi a jeho krátké raménko a centromera tak pochází z AK5 (blok M/N), zatímco delší raménko je složeno z GBs z AK5 (blok K/L), AK6 (blok Q) a AK8 (blok V/X). Zbýlých pět chromozomů se neliší od ACK (Obr. 5). Tyto přestavby poskytly důkaz o existenci společného předka linie II se sedmi chromozomy. Tento karyotyp odvozený od ACK se označuje jako proto-Calepineae karyotyp (PCK, Obr. 5). U tribů *Calepineae* a *Conringieae* zůstal PCK v nezměněné podobě, tribe *Coluteocarpeae* byl pozměněn sekundární inverzí (Mandáková et al. 2015). Triby *Isatideae*, *Sisymbrieae* a *Eutremeae* mají evolučně mladší PCK, který prodělal jednu reciprokou translokaci celého raménka (označuje se jako tPCK).



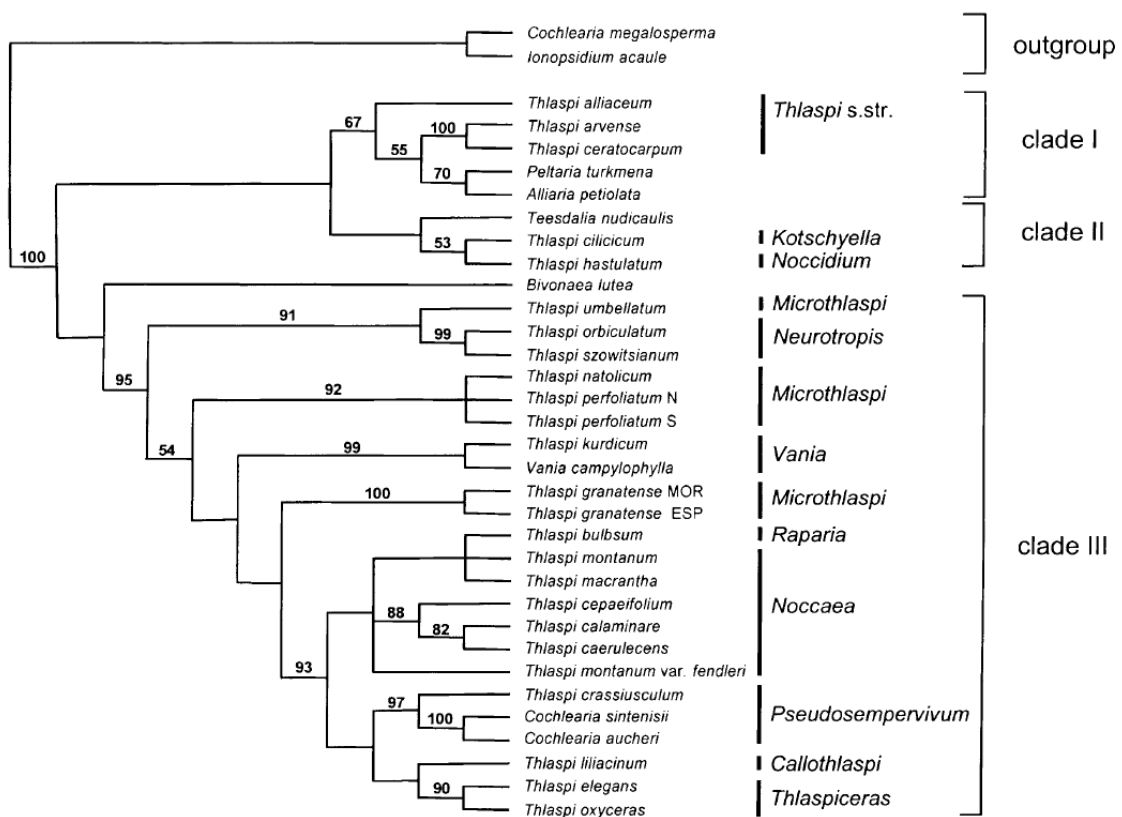
Obr. 5: Struktura karyotypu PCK. Cirkulární diagram znázorňující rozsah kolinearit mezi ACK (chromozomy AK1 – AK8) a proto-Calepineae karyotypem (chromozomy PCK1 – PCK7). Písmena A – X značí 22 konzervovaných genomických bloků.

1.6 Rod *Noccaea*

Noccaea Moench, triba *Coluteocarpeae*, je jeden z nejvíce problematických rodů celé čeledi *Brassicaceae* z hlediska rodového vymezení. Tento rod byl oddělen z rodu *Iberis* L. (Moench 1802) a jeho jediný zástupce *Noccaea rotundifolia* (L.) Moench byl od té doby řazen do rodu *Thlaspi*. Meyer (1973) rozdělil rod *Thlaspi* do dvanácti oddělených rodů podle anatomie osemení, kde rod *Noccaea* byl nejpočetnější. V následujících letech Meyer (2001a, b, 2003a-d, 2006a-e, 2010) detailně zkoumal a popsal skoro veškeré *Thlaspi* segregáty, které popsal v roce 1973. Jeho rozsáhlá kompletní bibliografie, typifikace všech taxonů, rozšíření a ilustrace listů, květů, plodů a semen jsou cenným

zdrojem pro každou studii zabývající se tímto problémem. Nevýhodou Meyerových studií je neparalelní klíč druhů, který je těžké následovat a spoléhá jen na vegetativní znaky a anatomii semen.

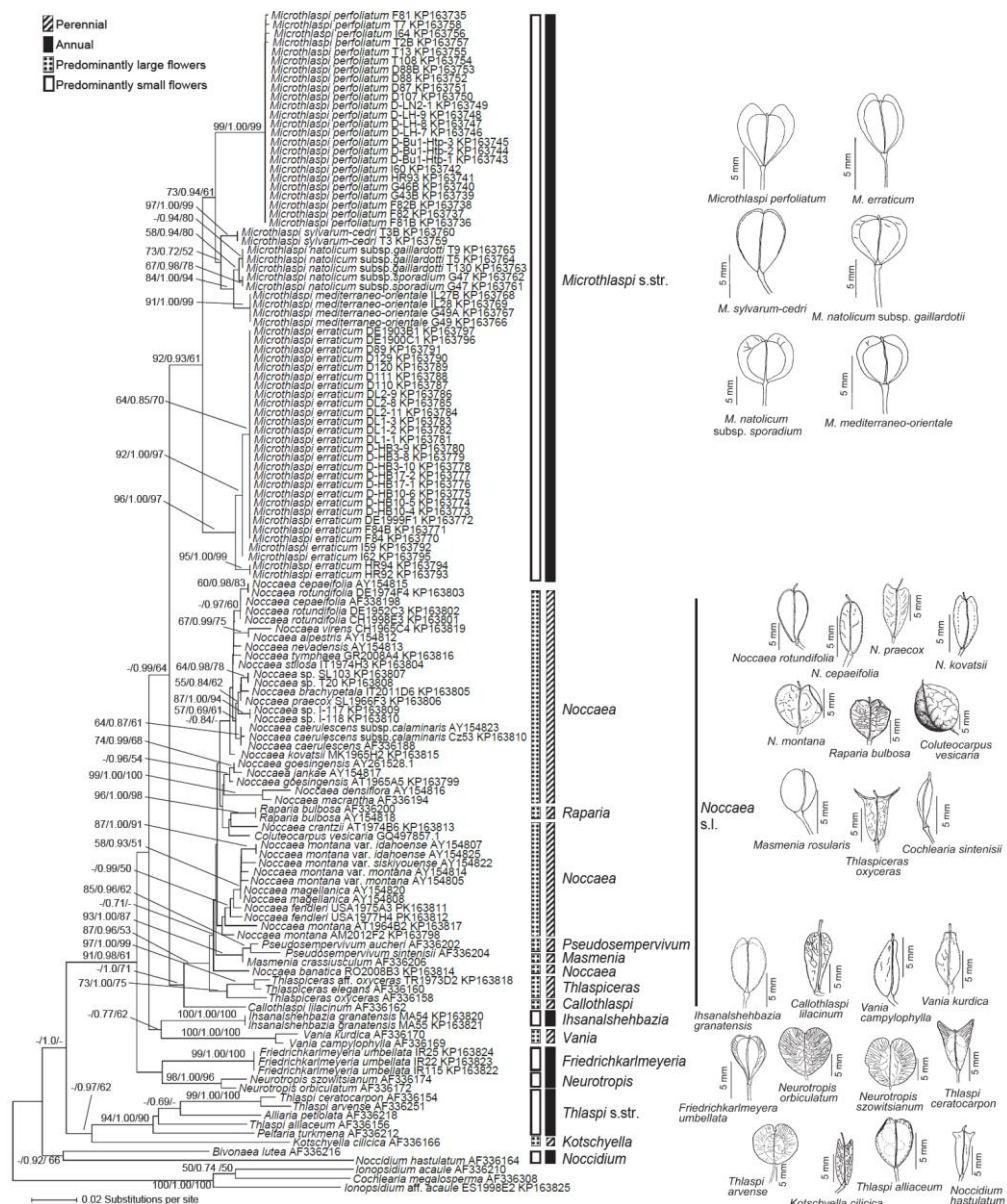
Meyerovy segregáty (zahrnující rody *Thlaspi*, *Neurotropis*, *Microthlaspi*, *Thlaspiceras*, *Noccidium*, *Kotschyella*, *Callothlaspi*, *Raparia*, *Noccaea*, *Atropatenia*, *Vania* a *Masmenia*) byly objektem zkoumání v řadě molekulárně fylogenetických studií, které vedly k více či méně podobným výsledkům (Koch 1995; Zunk et al. 1996; Mummenhoff et al. 1997a, b; Koch et al. 1998; Koch and Mummenhoff 2001, Obr. 6; Koch and Bernhardt 2004; Koch and Al-Shehbaz 2004). Mezi tyto výsledky patří: (i) *Thlaspi* s. str., *Noccidium* a všechny zbývající Meyerovi segregáty patří do různých linií, (ii) s výjimkou *Noccaea* a *Microthlaspi* v tribu *Coluteocarpeae* všechny zbývající segregáty jsou monofyletické. Také ukázaly, že obecná vymezení rodu *Thlaspi* před Meyerovými studiemi (1973) jsou velmi nepřirozené a daly základ umístění rodu *Noccaea* do tribu *Noccaeae* a rodu *Thlaspi* s. str. do tribu *Thlaspideae* (Al-Shehbaz et al. 2006).



Obr. 6 (předchozí strana): Fylogenetický strom 11 z 12 rodů dříve zahrnutých do *Thlaspi* s. l. založený na jaderných ribozomálních sekvencích (ITS). Převzato z Koch & Mummenhoff 2001.

Následné molekulární studie jasně ukázaly, že komplex *Thlaspi* s. l. zahrnuje minimálně tři rozdílné rody (*Thlaspi* s. str., *Noccidium* a *Noccaea*). Al-Shehbaz et al. (2006) umístili rod *Thlaspi* s. str. (zahrnující 6 druhů) a *Noccidium* (zahrnující 2 druhy) do samostatných tribů *Thlaspidaeae* a *Camelineae*. Toto umístění bylo potvrzeno následnou molekulární studií z roku 2010 (Warwick et al. 2010). Následně byly všechny ostatní Meyerovy segregáty rodu *Thlaspi* (kromě *Thlaspi* s. str. a *Noccidium*) umístěny do rodu *Noccaea* a přejmenovány (Al-Shehbaz 2014). Počet druhů v rodě *Thlaspi* s. str. byl v roce 2018 zredukován z původních šesti (Meyer 1973, 2001a) na čtyři. A to tak, že dva druhy byly přesunuty do nového rodu *Mummenhoffia* Esmailbegi & Al-Shehbaz (Esmailbegi et al., 2018).

Ali et al. v roce 2016 publikovali molekulárně fylogenetickou studii založenou na jaderných (ITS) a dvou chloroplastových (*matK*, *trnL-F*) genech zabývající se rodem *Microthlaspi* (Obr. 7). Neřídili se zde taxonomií podle Al-Shehbaz (2014) a všechny Meyerovy segregáty byly zachovány jako samostatné rody. Oddělily 7 monofyletických linií: *Ihsanalshehbazia*, *Friedrichkarlmeyeria*, *Microthlaspi*, *Neurotropis*, *Vania/Eunomia*, *Callothlaspi* a *Noccaea*. Navíc oddělili *Microthlaspi umbellatum* F.K.Mey. a *Microthlaspi granatense* (Boiss. & Reut.) F.K.Mey. do nových rodů *Friedrichkarlmeyeria* Tahir Ali & Thines a *Ihsanalshehbazia* Tahir Ali & Thines.



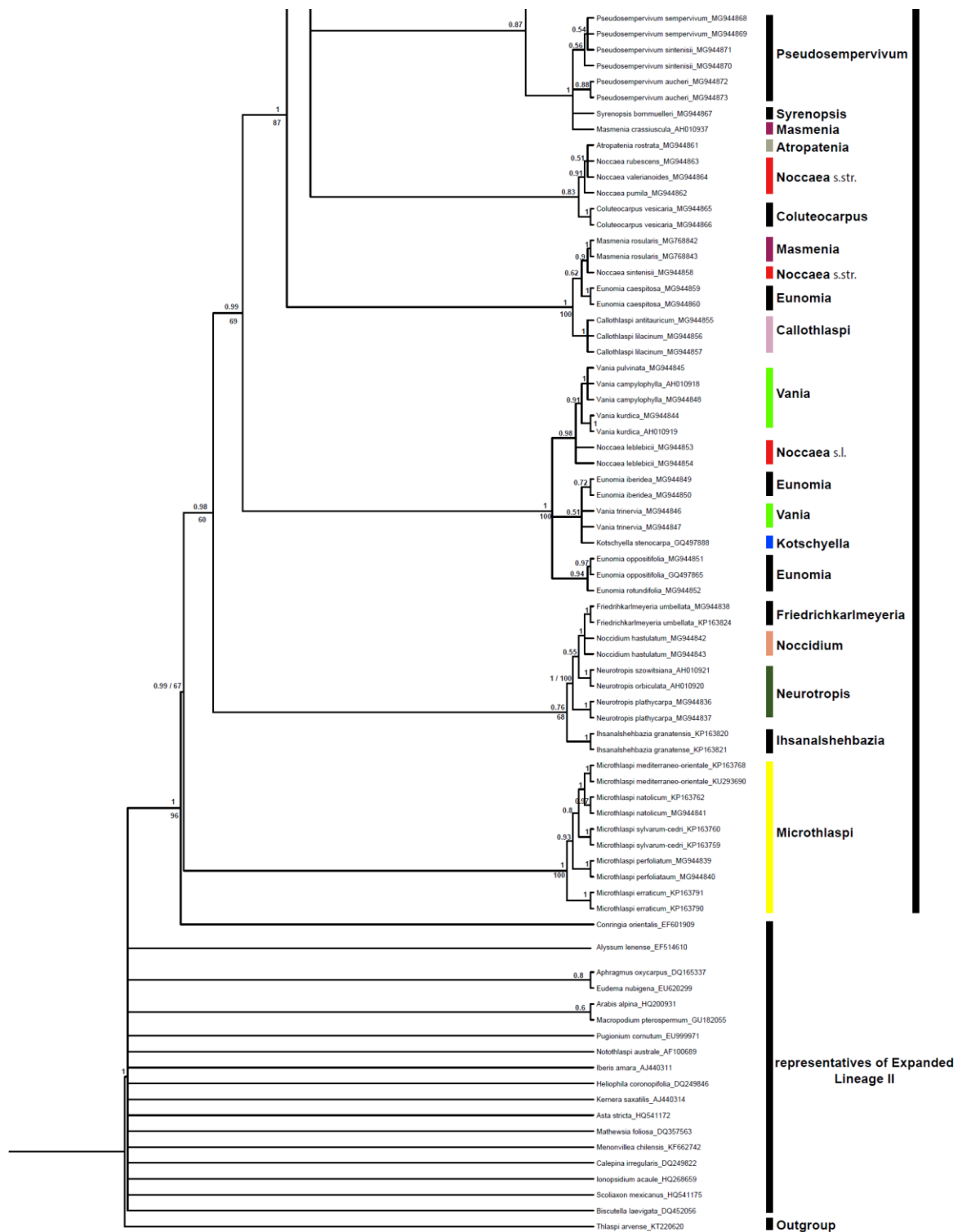
Obr. 7: Fylogenetický strom založený na ITS sekvencích a přehled rozmanitosti šesulek v tribu *Coluteocarpeae*. Převzato z Ali et al. 2016.

Prozatím nejnovější studie zabývající se fylogenezí rodu *Noccaea* pokrývá 92 druhů, což je ca 70 % všech druhů tribu *Coluteocarpeae* a zahrnuje všech dvanáct Meyerových segregátů (Özüdoğru et al., nepubl.). Fylogenetické analýzy založené na jaderném (ITS) (Obr. 8) a chloroplastovém (trnL-F) markeru ukázaly, že Meyerovy *Thlaspi* s. l. segregáty jsou, s výjimkou rodu *Microthlaspi*, parafyletické. Předěšlé umístění druhu *Noccidium hastulatum* do tribu *Camelineae*, založené na ITS markerech z velmi starého

herbářového vzorku, bylo vyvráceno. Tento fakt byl podpořen mitochondriálními daty (Couvreur et al. 2010) a tento druh je řazen do tribu *Coluteocarpeae*. Ukázali také, že Meyerovy *Thlaspi* s. l. segregáty by měly být zahrnuty do široce vymezeného rodu *Noccaea* s. l..

Dříve používaný název tribu *Noccaeae* byl změněn v roce 2012 (Al-Shehbaz 2012) na už dříve publikovaný název *Coluteocarpeae* (Dorofeyev 2004).

Vědci zabývající se touto problematikou stále nenašli odpověď na to, do kolika rodů by tribe *Coluteocarpeae* měl být rozdělen. První možností je sloučení všech Meyerových segregátů, s výjimkou *Thlaspi* a včetně *Microthlaspi*, do jednoho obsáhlého rodu *Noccaea* (Appel and Al-Shehbaz 2003; Al-Shehbaz 2012, 2014). Druhou možností je rozdělení na 14 rodů zahrnující všechny Meyerovy segregáty a dva nové rody *Friedrichkarmayeria* a *Ihsanalshehbazia*. Střední cestou by bylo rozdělení celého tribu na čtyři rody – *Noccaea*, *Microthlaspi*, *Friedrichkarmayeria* a *Ihsanalshehbazia* (Ali et al. 2016). Jediným uspokojivým řešením tohoto přetrvávajícího problému by bylo vytvoření fylogeneze založené na několika stovkách až tisících jaderných genů s jednou kopií a plastidovou DNA (Özüdoğru et al., nepubl.).

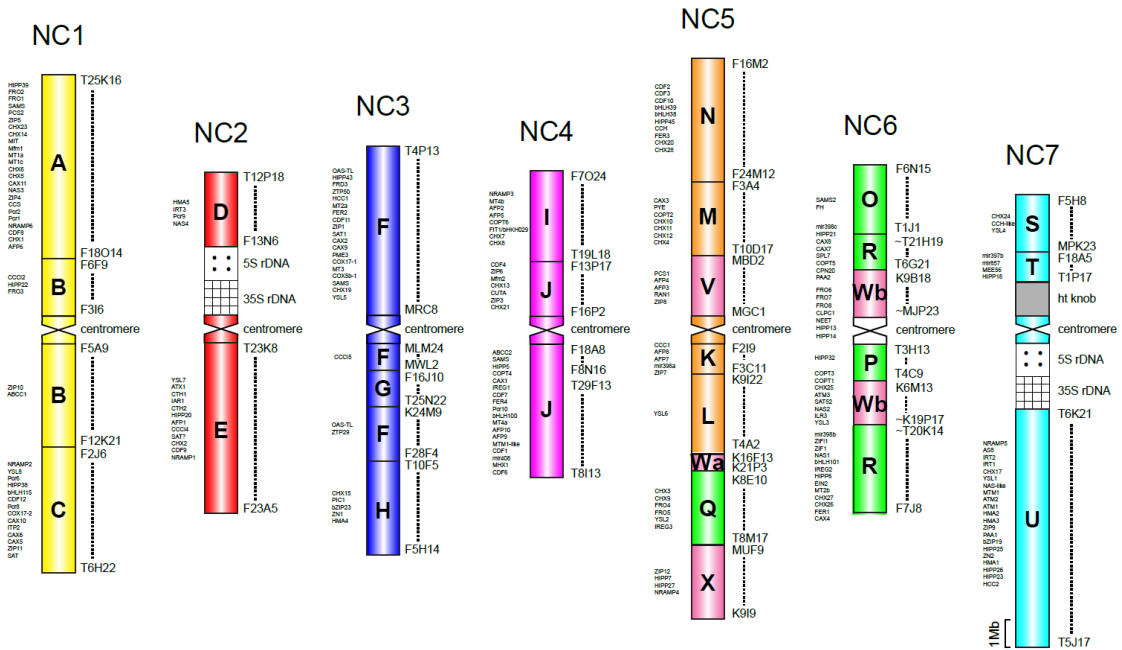


Obř. 8: Fylogenetický strom tribu *Coluteocarpeae* založený na ITS sekvencích – pokračování z předchozí strany (Özudođru et al., nepubl.). *Thlaspi* s. l. segregáty a další příbuzné rody jsou označeny barevnými a černými pruhy.

1.7 Struktura chromozomů v rodu *Noccaea*

Noccaea caerulescens (dříve známá jako *Thlaspi caerulescens*) je diploidní ($2n = 14$) dvouletá nebo krátkověká trvalka s původem v Evropě. Společně s *Arabidopsis halleri* patří *N. caerulescens* mezi nejvýznamnější modelové druhy pro studium hyperakumulace těžkých kovů a s tím související hypertolerance (Krämer 2010; Hanikenne and Nouet 2011). Ačkoliv je *N. caerulescens* nejběžnějším druhem studovaným v souvislosti s hyperakumulací těžkých kovů s více než 210 studiemi publikovanými na toto téma (Pollard et al. 2014), podrobná struktura genomu *N. caerulescens* (Obr. 9) byla odhalena až v roce 2015 (Mandáková et al.). Ukázali, že genom *N. caerulescens* (NC1 – NC7) vznikl z proto-Calepineae karyotypu a všechny chromozomy, kromě chromozomu NC2, prodělaly pericentrické nebo paracentrické inverzní změny.

Současná struktura GBs na chromozomech NC1 a NC4 vznikl dvěma po sobě jdoucími pericentrickými inverzemi přeskupením bloků B a J, popř. změnou polohy centromery. Jedna paracentrická a jedna pericentrická inverze vysvětlují původ chromozomu NC3. Současná struktura chromozomů NC5 a NC7 je vysvětlena pomocí jednotlivých pericentrických inverzí. Vznik NC6 s největší pravděpodobností vyžadoval tři inverzní události, jednu paracentrickou a dvě pericentrické. Celkově v průběhu evoluce *N. caerulescens* došlo k devíti pericentrickým a dvěma paracentrickým inverzím (Mandáková et al. 2015).



Obř. 9: Karyotyp *Nocca caerulea* zrekonstruovaný pomocí metody CCP. Konzervované genomické bloky (A – X) jsou zbarveny v závislosti na jejich poloze na ACK. U každého chromozomu vpravo jsou uvedeny souřadnice BAC klonů každého kontigu. Geny pro akumulaci těžkých kovů jsou uvedeny vlevo od každého chromozomu.

Chromozomové přestavby u *N. caerulea* se ukázaly jako unikátní v porovnání s dalšími triby čeledi brukvovitých (Mandáková and Lysak 2008). Proto byly analyzovány karyotypy dalších dvou druhů tribu *Coluteocarpeae* – *N. jankae* ($2n = 4x = 32$; chromozomy NJ1 – NJ7) a *N. bulbosa* ($2n = 2x = 14$; chromozomy RB1 – RB7). CCP analýza těchto dvou druhů ukázala, že šest ze sedmi chromozomů, včetně rDNA lokusů, má stejnou strukturu jako *N. caerulea*. Tyto dva druhy se liší od *N. caerulea* v uspořádání genomických bloků na chromozomech NJ6 a RB6. Zatímco chromozom *N. caerulea* NC6 byl přeskupen třemi inverzemi, chromozomy NJ6 a RB6 si zachovaly svou strukturu podobnou ancestrálnímu PCK6. To naznačuje, že genomy *N. jankae* a *R. bulbosa* mají více původní karyotyp než *N. caerulea*. Nicméně, původní karyotyp pro tyto druhy, popř. pro celý tribus *Coluteocarpeae* nebyl stanoven.

2 CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

1. Identifikace struktury karyotypu vybraných pěti druhů z rodu penízek (*Noccaea*) pomocí metody srovnávacího malování chromozomů
2. Identifikace a detailní charakterizace druhově specifických chromozomových přestaveb
3. Rekonstrukce ancestrálního karyotypu rodu penízek
4. Zhodnocení potenciální role chromozomových přestaveb ve speciaci v rodu penízek
5. Porovnání struktury karyotypu v rodu penízek s ostatními známými karyotypy v čeledi brukvovitých

3 MATERIÁL A METODIKA

3.1 Rostlinný materiál

Studované druhy (Tab. 1) tribu *Coluteocarpeae* byly vybrány na základě jejich kontrastní pozice na ITS fylogenetickém stromě (Obr. 8; Özüdoğru et al., nepubl.). Experimentální rostliny byly pěstované ze semen v kultivačních komorách (fytotronech) a ve skleníku Středoevropského technologického institutu Masarykovy univerzity (CEITEC MU). Původ semen je uveden v Tab. 1.

Tab. 1: Seznam analyzovaných druhů rodu *Noccaea*, původ materiálu a přehled analýz, které byly u jednotlivých druhů udělány. HUB = Hacettepe University Biology Department Herbarium; CC = druhy, u kterých byly zjišťovány počty chromozomů; RD = druhy, u kterých byla provedena rDNA FISH; CCP = druhy, které byly použity pro srovnávací malování chromozomů

Druh	Synonyma	Experiment	Sběratel/číslo vzorku/herbář	Původ
<i>Noccaea aghrica</i> (P.H.Davis & Kit Tan) Firat & Özüdoğru	<i>Thlaspi aghricum</i> P.H. Davis & Kit Tan	RD, CC	B.Özüdoğru 4000 & K.Özgişi (HUB)	Turkey, Kahramanmaraş ,Between Göksun and Geben, Meryemçil pass, meadows, 1680 m, Latitude 37.82231, Longitude 36.40699, 01.07.2015.
<i>Noccaea aucheri</i> (Boiss.) Özüdoğru & Al-Shehbaz	<i>Pseudosempervivum aucheri</i> (Boiss.) Pobed., <i>Cochlearia aucheri</i> Boiss.	CCP, RD, CC	B.Özüdoğru 4490 & K.Özgişi (HUB)	Turkey, Erzincan, Sakaltutan Pass, Latitude 39.88683, Longitude 39.13757, 2230 m.
<i>Noccaea bulbosa</i> (Spruner ex Boiss.) Al-Shehbaz	<i>Thlaspi bulbosum</i> Spruner in Boiss., <i>Raparia bulbosa</i> (Spruner) F.K.Mey.	CC (1493.)	Marcus Koch, B-2011-0170	
<i>Noccaea caerulescens</i> (J.Presl & C.Presl) F.K.Mey.	<i>Thlaspi caerulescens</i> J.Presl & C.Presl	RD, CC	Terezie Mandáková and Martin Lysak	Czech Republic, Kořenec
<i>Noccaea camlikensis</i> Aytaç, Nordt & Parolly	<i>Callothlaspi camlikense</i> (Aytaç, Nordt & Parolly) F.K. Mey.	RD, CC	B.Özüdoğru 3797 & K.Özgişi (HUB)	Turkey, Konya, Derebucak, between Kuyucak and Çamlık Villages, Latitude 37.35430, Longitude 31.65779, 1365 m.
<i>Noccaea cilicica</i> (Schott & Kotschy ex Boiss.) Al-Shehbaz	<i>Kotschyella cilicica</i> (Schott & Kotschy ex Boiss.) F.K.Mey., <i>Carpoceras cilicicum</i> Schott & Kotschy ex Boiss.	RD, CC	B.Özüdoğru 4031 & K.Özgişi (HUB)	Turkey, Mersin, between Findikpinari and Arslankoy, Latitude 36.97547 , Longitude 34.32444 E, 1750 m

<i>Noccaea densiflora</i> (Boiss. & Kotschy) F.K.Mey.	<i>Thlaspi densiflorum</i> Boiss. & Kotschy	RD, CC (2824.)	B.Özüdoğru 4009 & K.Özgişi (HUB)	Turkey, Osmaniye, above Zorkun plateau, Karanlıkdere, Latitude 36.97471, Longitude 36.37833.
<i>Noccaea eigii</i> (Zohary) Al-Shehbaz	<i>Carpoceras eigii</i> Zohary, <i>Thlaspiceras eigii</i> (Zohary) F.K.Mey.	RD, CC	B.Özüdoğru 4020 & K.Özgişi (HUB)	Turkey, Hatay, Kızıldağ, on the road of radar, open places, 36.30389 N, 36.05105 D, 1420 m.
<i>Noccaea elegans</i> (Boiss.) Al-Shehbaz	<i>Thlaspiceras elegans</i> (Boiss.) F.K. Mey.	RD, CC	B.Özüdoğru 4029 & K.Özgişi (HUB)	Turkey, Mersin, Fındıkpınarı, around Bozon village, 36.89083 N, 34. 36098 E, 1255 m
<i>Noccaea fendleri</i> subsp. glauca (A. Nelson) Al-Shehbaz & M.A. Koch	<i>Thlaspi fendleri</i> A.Gray	CCP, RD, CC	Terezie Mandáková	USA, Sedona
<i>Noccaea hastulata</i> (DC.) Steud.	<i>Noccidium hastulatum</i> (DC.) F.K. Mey., <i>Hutchinsia hastulata</i> DC.	CCP, RD, CC (2747.)		Iran, Mazanderan Rulan
<i>Noccaea huber-morathii</i> (F.K.Mey.) Al-Shehbaz	<i>Thlaspiceras huber-morathii</i> F.K.Mey.	RD, CC	Bariş Özüdoğru 4486, BÖ 3679 (HUB)	Turkey, 1 km North of Refahiye, Latitude 39.9115, Longitude 38.77014, 1580 m.
<i>Noccaea iberidea</i> (Boiss.) Al-Shehbaz & Menke	<i>Eunomia iberidea</i> Boiss.	RD, CC	B.Özüdoğru 3993 & K.Özgişi (HUB)	Turkey, Kayseri, between Pınarbaşı and Sarız, 15 km to Sarız. 38.55779 N, 36.45042 E, 1810 m.
<i>Noccaea jankae</i> (A. Kern.) F.K. Mey.	<i>Thlaspi jankae</i> Kern.	RD, CC (953.)	Terezie Mandáková and Martin Lysak	Slovakia, Zubor
<i>Noccaea lilacina</i> (Boiss. & A. Huet) Al-Shehbaz	<i>Thlaspi lilacinum</i> Boiss. & A.Huet, <i>Callothlaspi lilacinum</i> (Boiss. & A. Huet) F.K. Mey.	RD, CC (2521.)	B.Özüdoğru 3660 & K.Özgişi (HUB)	Turkey, Erzincan, Refahiye, Norther part of Sağlık Village, Latitude 39.92139, Longitude 38.7775, 1670 m.
<i>Noccaea meyeri</i> Al-Shehbaz	<i>Thlaspiceras crassifolium</i> Hub.-Mor. & F.K. Mey.	RD, CC	B.Özüdoğru 3623 & K.Özgişi (HUB)	Turkey, Osmaniye, South of Yarpuz Village, under Pinus nigra, 1100 m, Latitude 37.05388, Longitude 36.45869, 29.06.2015.
<i>Noccaea papillosa</i> (Boiss.) F.K. Mey.	<i>Thlaspi papillosum</i> Boiss., <i>Apterigia papillosa</i> (Boiss.) V.I. Dorof.	RD, CC	Kurtuluş Özgişi 1042 (HUB)	Kaş, Saklıkent Milli Parkı, 36°83'05.90" K, 30°32'91.70" D, 17.05.2015, 2033 m.
<i>Noccaea perfoliata</i> (L.) Al-Shehbaz	<i>Thlaspi perfoliatum</i> L., <i>Microthlaspi perfoliatum</i> (L.) F.K.Mey.	CCP, RD, CC (393.)	Terezie Mandáková	Czech Republic, Vranov nad Dyjí
<i>Noccaea platycarpa</i> (Fisch. & C.A. Mey.) Al-Shehbaz	<i>Thlaspi platycarpum</i> Fisch. & C.A.Mey., <i>Neurotropis platycarpa</i> (Fisch. & C.A.Mey.) F.K.Mey.	RD, CC	B.Özüdoğru 4034 & K.Özgişi (HUB)	Turkey, Antalya, Gazipaşa, Sugözü village, Atçıl Hill, 36.50539 N, 32. 49295 E, 1755 m
<i>Noccaea rechingeri</i> (F.K.Mey) Al-Shehbaz	<i>Thlaspiceras rechingeri</i> F.K.Mey.	RD, CC	B.Özüdoğru 4005 & K.Özgişi (HUB)	Osmaniye, on the road of Zorkun, before Erzin intersection, 36.98179 N, 36.32093 E, 1320 m

<i>Noccaea tatiana</i> (Bordz.) F.K.Mey.	<i>Thlaspi tatiana</i> Bordz.	RD, CC (2525.)	B.Özüdoğru 3681 & K.Özgişi (HUB)	Turkey, 22 km from Erzincan to Gümüşhane, marshy meadows, 2100 m, Latitude 39.89054, Longitude 39.3601, 18.07.2015.
<i>Noccaea triangularis</i> (F.K.Mey.) Al-Shehbaz	<i>Thlaspiceras triangulare</i> F.K.Mey.	RD, CC	B.Özüdoğru 4006 & K.Özgişi (HUB)	Turkey, Osmaniye, above Zorkun plateau, Karanlıkdere. 36.97471 N, 36.37833 E.
<i>Noccaea vesicaria</i> (L.) Al-Shehbaz	<i>Alyssum vesicaria</i> L., <i>Coluteocarpus vesicaria</i> (L.) Holmboe	RD, CC	B.Özüdoğru 4489 & K.Özgişi (HUB)	Turkey, Erzincan, Sakaltutan Pass, Latitude 39.88683, Longitude 39.13757, 2230 m.
<i>Thlaspi ceratocarpum</i> (Pall.) Murray	<i>Lepidium ceratocarpum</i> Pall.	RD, CC	BG Danmark	

3.2 Chemikálie

Citrátový buffer, 10x: 40 ml 100 mM kyselina citronové, 60ml 100mM citrát trisodný, pH 4,8

Směs pektolytických enzymů: 1x citrátový buffer, 0,3 % pektolyáza, 0,3% celuláza, 0,3 % cytohelikáza

Carnoyova fixáž: 96% ethanol + ledová kyselina octová (3:1)

SSC, 20x: 3 M chlorid sodný; 300 mM citronan sodný, pH 7,0

Pepsin, 0,1 mg/ml: zásoba pepsinu 100 mg/ml ze sliznice žaludku prasat (Sigma) v 10 mM HCl

NT pufr, 10x: 500mM Tris-Cl, pH 7,5; 50mM MgCl₂; 0,05 hovězí sérový albumin

DNase I: 1:250 ředění roztoku 1 mg mL⁻¹ DNázy v 0,15 M NaCl v 50 % glycerolu

Hybridizační pufr: 50 % formamid; 10 % dextran sulfát v 2 x SSC

4T pufr: 4 x SSC, pH 7.0; 0,05 % Tween-20

Blokovací směs: 5 % hovězí sérový albumin; 0,2 % Tween-20 v 4 x SSC

TNB pufr: 100mM Tris-Cl, pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,5 % blokovací činidlo

TNT pufr: 100 mM Tris-Cl, pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,05 % Tween-20

Vectashield antifade (Vector Laboratories) s 2 µg/ml **DAPI** (4',6-diamidino-2-phenylindole, Sigma)

Přípravu chromozomových preparátů a metodika srovnávacího malování chromosomů vychází z publikovaných protokolů Mandáková, T. a Lysak, M. A. 2016a, 2016b.

3.3 Příprava chromozomových preparátů

Sbíráme mladá a uzavřená květenství obsahující bílé prašníky (Obr. 10). Tyto květenství přes noc fixujeme v čerstvě připravené Carnoyově fixáži při 4°C následně uchováváme v 70 % ethanolu při -20°C. Květenství promyjeme v destilované vodě (2 x 5 min) a pod binokulárním mikroskopem odstraníme žlutá poupata obsahující pyl, která nejsou vhodná pro přípravu preparátu vzhledem ke svému stádiu vývoje. Destilovanou vodu nahradíme citrátovým pufrem a poupata promyjeme na orbitální třepačce (2 x 5 min). Po promytí inkubujeme



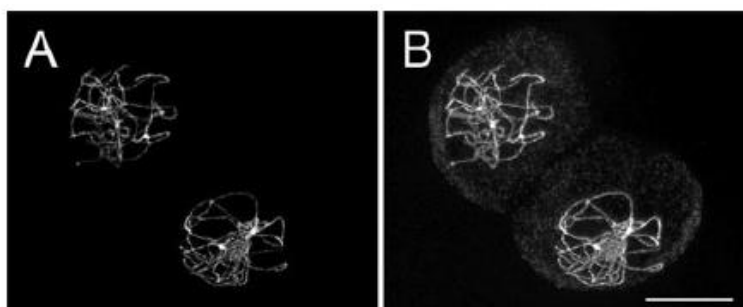
Obr. 10: Fixovaná mladá květenství huseníčku. Žlutá poupata obsahují prašníky s pylem a nejsou vhodná pro přípravu preparátů. Obrázek převzat z Mandáková and Lysak 2016a.

poupata ve vlhké komůrce při 37 °C po dobu ca 5 hodin ve směsi pektolytických enzymů za účelem rozrušení buněčné stěny jednotlivých buněk. Po uplynutí této doby nahradíme směs enzymů citrátovým pufrem. Z celého květenství vybereme poupě s předpokládaným stádiem buněčného cyklu (největší bílá poupata obsahují prašníky s pylem nebo pylové tetrády, druhá největší bílé poupata mají prašníky s pylovými mateřskými buňkami a pachytenní chromozomy se obvykle nacházejí v třetím nebo čtvrtém bílém poupěti) a pomocí Pasteurovy pipety přeneseme vybrané poupě na podložní sklo. Fáze pachytene (Obr. 11A) je jedinou fází buněčného cyklu, které je vhodná pro uplatnění CCP, protože pachytenní chromozomy poskytují nejvyšší rozlišení. Preparáty s mitotickými chromozomy mohou být připraveny z poupat různých velikostí. Pod binokulárním mikroskopem poupě v kapce citrátového pufru lehce poklepeme preparační jehlou, dokud se nevytvoří bílá suspenze buněk. Přebytečné květní obaly odstraníme pinzetou. Přidáme 20μl 60 % kyseliny octové a suspenzi na horké plotýnce

(50 °C) roztíráme preparační jehlou po sklíčku ca 30 vteřin. Dáváme pozor, abychom se jehlou nedotýkali sklíčka a chromozomy v suspenzi si tím nepoškodili. Následně fixujeme preparát postupným přidáváním 100µl Carnoyovy fixáže, nejprve okolo suspenze buněk a poslední kapkou do středu suspenze. Fixáž necháme stéci po sklíčku a vysušíme fénem. Preparát pozorujeme pod světelným mikroskopem s fázovým kontrastem a kontrolujeme kvalitu chromosomového roztěru (chromozomy a jádra se nepřekrývají, neobsahují velké množství cytoplazmy a jsou na preparátu ve větším množství), hledáme pachytenní fáze pro následné srovnávací malování chromozomů, hodnotíme, zda jsou chromozomy a jádra pokryta cytoplazmou a vyhodnocujeme počet mitotických anebo meiotických chromozomů. Skla s větším množstvím námi požadovaných chromozomů fixujeme ve 4 % formaldehydu po dobu 7 minut. Takto připravené preparáty mohou být uchovávána při 4 °C několik týdnů či měsíců.

3.4 Příprava chromosomů k hybridizaci sond

Připravené preparáty promyjeme na orbitální třepačce v 2x SSC v Coplinově dóze (2 x 5 min). Veškeré promývání preparátů je prováděno v Coplinově dozách a je velmi důležité, aby preparáty mezi jednotlivými kroky nevyschly. Přidáme 100µl roztoku RNázy na každý preparát (abychom



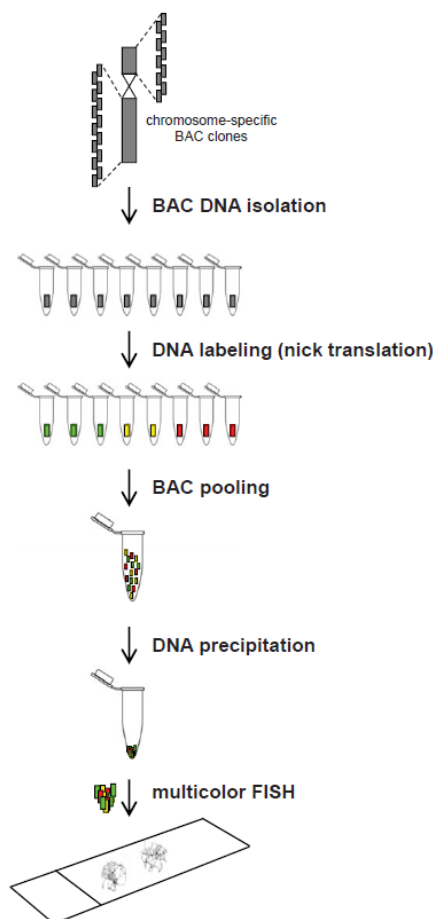
Obr. 11: Pachytenní chromosomy před (B) a po (A) působení RNázy a pepsinu. Chromosomy byly zviditelněny pomocí DAPI. Převzato z Mandáková and Lysak 2016b.

odstranili RNA, která způsobuje zvýšené pozadí výsledného fluorescenčního signálu), přikryjeme krycím sklíčkem (24 x 50 mm) a inkubujeme 1 hodinu při 37 °C. Po uplynutí této doby promyjeme preparáty 2 x 5 min v 2x SSC. Zbývající cytoplasmu odstraníme pomocí pepsinu. Do Coplinovy dózy umístěné ve vodní lázni (37 °C) s roztokem pepsinu umístíme na dobu 2–5 minut preparáty a následně promyjeme tyto preparáty 2 x 5 min v 2x SSC. Preparáty následně dehydratujeme v ethanolové řadě (3 min v 70 %, 80 %, 96

% ethanolu) a necháme uschnout ve stojánku. Přidáme 15 μ l DAPI ve Vectashield na každý preparát a přikryjeme krycím sklíčko. Preparáty zkontrolujeme pomocí fluorescenčního mikroskopu. Chromosomy by měly být nepoškozené (např. příliš dlouhým působením pepsinu) a bez cytoplazmy (Obr. 11A). Pokud stále obsahují značné množství cytoplazmy (Obr. 11B), promyjeme preparáty 2 x 5 min v 2x SSC a opakujeme působení pepsinem. Pokud jsou preparáty bez cytoplazmy, pod proudem tekoucí vody odstraníme krycí sklíčko, odmyjeme DAPI v 2x SSC (2x 5 min) a fixujeme skla ve 4 % formaldehydu po dobu 10 minut. Znova promyjeme v 2x SSC (2x 5 min) a dehydratujeme v ethanolové řadě (3 min v 70 %, 80 % a 96 % ethanolu).

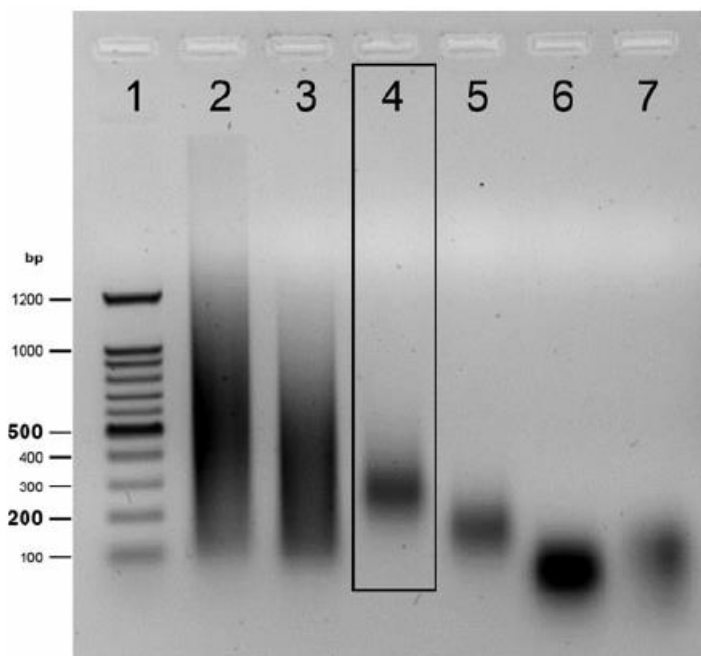
3.5 Příprava a značení sond nick translací

BAC klony se značí nick translací pomocí biotin-dUTP, digoxigenin-dUTP a Cy3-dUTP. Do 0,5 ml mikrozkušavky smícháme: 1 μ g BAC DNA v destilované vodě, 5 μ l 10x NT bufferu, 5 μ l nukleotidového mixu, 1 μ l komerčně dodávaného 1 mM x-dUTP, 5 μ l 0,1 M β -merkaptoethanol, 1 μ l DNasa I, 1 μ l DNA polymeráza I. Množství destilované vody, kterou do reakce přidáváme, záleží na koncentraci BAC DNA vzorku a přidáváme jí tolik, aby byl výsledný objem 50 μ l. Směs inkubujeme 90 minut při 15 °C. Po uplynutí této doby přeneseme mikrozkušavky na ledovou tříšť a zkontrolujeme délku fragmentů elektroforézou: 5 μ l reakční směsi nanese na 1 % agarosový gel společně s 100 bp DNA žebříčkem. Pokud jsou značené fragmenty dlouhé \approx 200–500 bp, ukončíme nick translaci přidáním 1 μ l 0,5 M EDTA a zahřátím



Obr. 12: Schématický pracovní postup protokolu založeného na BAC malování chromozomů. Převzato z Mandáková and Lysak 2016b.

na 60 °C po dobu 10 minut. Pokud jsou fragmenty delší než 500 bp, prodloužíme dobu inkubace při 15 °C a opakujeme elektroforézu (Obr. 13). Sondu skladujeme při -20 °C až do jejího použití.



Obr. 13: Analýza délky fragmentů sondy po nick translaci na agarózovém gelu. Sloupec 1 – 100 bp DNA žebříček, sloupec 2 a 3 – příliš dlouhé DNA fragmenty, sloupec 4 – optimální délka fragmentu mezi 200 až 500 bp, sloupec 5, 6 a 7 – fragmenty kratší než 200 bp. Převzato z Mandáková and Lysak 2016b.

3.6 Fluorescenční *in situ* hybridizace

FISH (fluorescenční *in situ* hybridizace) je metoda mikroskopické detekce specificky značených sekvencí. Využívají se fluorescenčně značené sondy, které odpovídají krátkým úsekům umělé DNA).

Vybereme *Arabidopsis* BAC klony podle potřeby daného experimentu. Napipetujeme 5 μ l (100 ng) každého jednotlivě značeného BAC klonu do 2 ml zkumavky. Pro snížení objemu sondy a přečištění sondy, vysrážíme DNA přidáním 0,1násobku objemu směsi 3 M octanu sodného a 2,5násobku objemu ledového 96 % ethanolu. Důkladně protřepeme a ponecháme alespoň 30 minut při 20 °C. Následně centrifugujeme po dobu 30 minut při 13 000 x g a 4 °C. Opatrně odstraníme supernatant. Pelet smícháme s 500 μ l 70 % ethanolu, 5 minut centrifugujeme a odstraníme supernatant. Získaný pelet vysušíme ve vakuovém exsikátoru. Pelet rozpustíme v 20 μ l hybridizačního pufru a inkubujeme při 37 °C přes noc abychom dosáhly resuspendace sondy. Naneseme 20 μ l připravené sondy na chromosomový preparát, přikryjeme

krycím sklíčkem (24 x 24 mm) a utěsníme okraje krycího sklíčka lepidlem, abychom zabránili vyschnutí sondy. Umístěním sklíčka na plotýnku vyhřátou na 80 °C po dobu 2 minut, čímž současně denaturujeme sondu a chromosomální DNA. Preparáty inkubujeme při teplotě 37 °C ve vlhké komůrce 48 až 72 hodin.

3.7 Odmytí po hybridizaci a imuno detekce hybridizovaných sond

Pokud byly při značení sondy použity přímé fluorochromy jako je Cy3 (emise záření 570 nm) není preparát potřeba vizualizovat pomocí imunodetekce. U sond nepřímo značených pomocí biotinu a digoxigeninu je nezbytná detekce sond pomocí protilátek asociovaných s fluorochromy. Na biotin se během detekce váže molekula avidin Texas Red. Pro amplifikaci signálu následuje vazba protilátky anti-avidin-biotin a znovu molekula avidin Texas Red (emise záření 610 nm). Na digoxigenin se váže anti-digoxigenin a fluorochrom Alexa Fluor 488 (emise záření 520 nm).

Pinzetou odstraníme lepidlo i s krycím sklíčkem a preparát promyjeme 2 x 5 min v 2x SSC. Pro odstranění nenavázaných sond promyjeme preparát 3 x 5 min ve 20 % formamidu. Následně promyjeme preparát v 2x SSC po dobu 2 minut a následně 5 minut v 4T pufru. Na preparát přidáme 100 µl blokovacího roztoku a inkubujeme 30 minut, poté promyjeme 2 x 5 minut v 4T pufru. Na preparát nanese 100 µl avidin-Texas Red v TNB pufru (1:1000) a inkubujeme 30 minut. Po inkubaci promyjeme 2 x 5 min v TNT pufru. Dále nanese 100 µl směsi goat biotinylated goat anti-avidin (1:200) a mouse anti-digoxigenin (1:250) v TNB pufru a inkubujeme 30 minut. Následně promyjeme 2 x 5 min v TNT pufru. Jako poslední nanese 100 µl směsi avidin-Texas Red (1:1000) a goat anti-mouse-Alexa Fluor 488 (1:200) v TNB pufru a inkubujeme 30 minut. Po inkubaci promyjeme 2 x 5 min v TNT pufru. Následně dehydratujeme v ethanolové řadě (3 min v 70 %, 80 % a 96 % ethanolu) a necháme uschnout. Na preparát přidáme 15 µl DAPI ve Vectashield a překryjeme krycím sklíčkem (24 x 32 mm).

3.8 Fluorescenční mikroskopie a vyhodnocení hybridizačních signálů

Výsledný preparát je pozorován pomocí fluorescenčního mikroskopu s příslušnými filtry – použity byly filtry, které vizualizují zeleně (~ 520 až 565 nm), žlutě (~ 565 až 590 nm) a červeně (~ 625 až 750 nm) emitující fluorochromy na značených sondách. Pro zviditelnění celých chromosomů nabarvených DAPI se používá filtr propouštějící emitované modré záření (~ 430 až 500 nm).

Hledané figury jsou vyfotografovány jako čtyři samostatné fotografie v následujícím pořadí: (1) figura všech chromosomů (2) zelený signál (3) žlutý signál a (4) červený signál. Veškeré fotografie jsou vyfoceny v šedé barevné škále. Pro vyhodnocení karyotypů musí být tyto fotografie pseudokolorovány a sloučeny do jednoho výsledného barevného obrázku pomocí programu Adobe Photoshop.

Pro tuto práci byl použit mikroskop Zeiss Axio Imager.Z2 a MetaSystems CCD kamera. Veškeré fotografie byly pořízeny se zvětšením 1000. K následné úpravě fotografií byl použit Adobe Photoshop SC6.

4 VÝSLEDKY

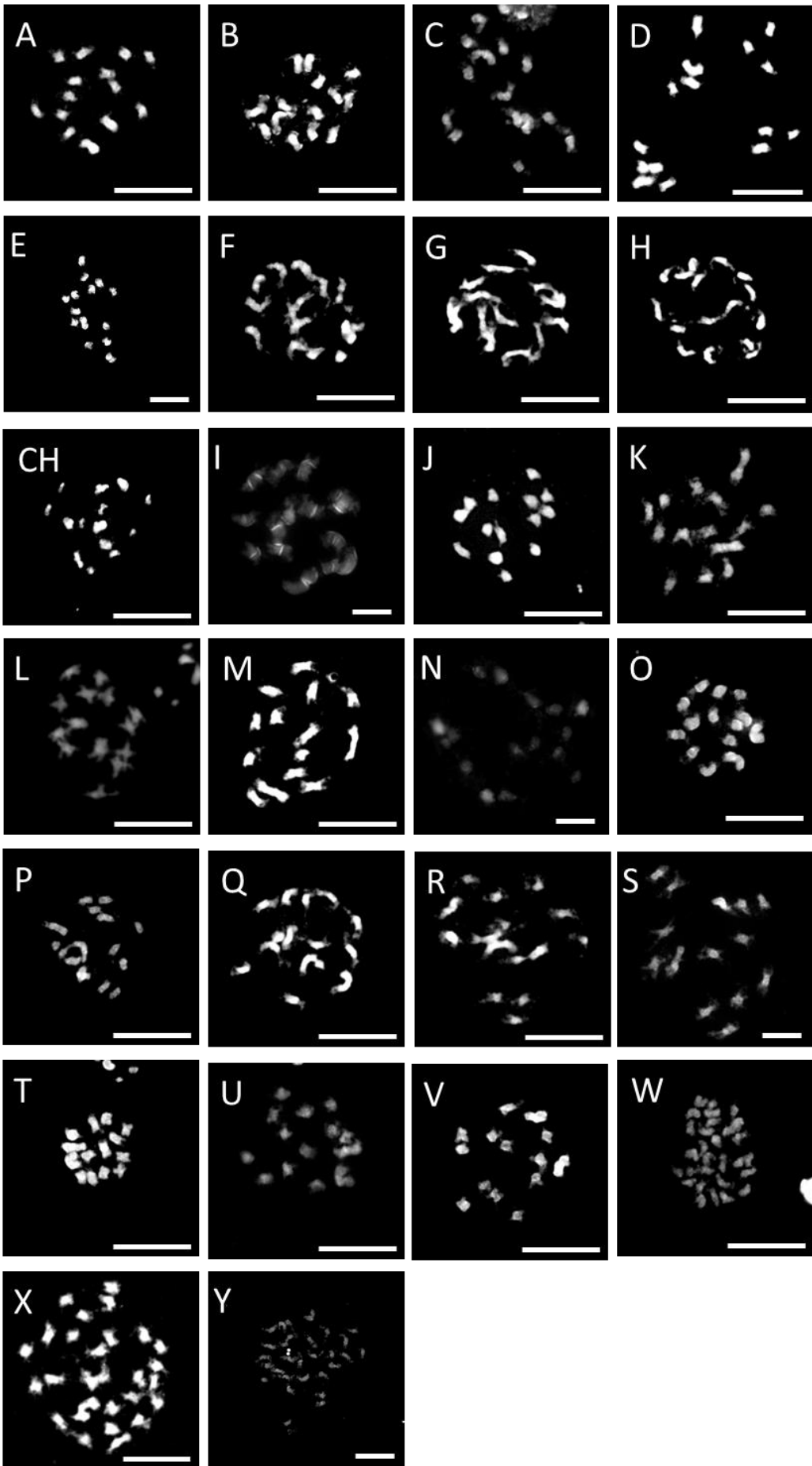
4.1 Chromozomové počty

Pro získání prvotní informace o variabilitě chromozomových čísel v rodu *Noccaea* byly stanoveny chromozomové počty u 26 druhů (Tab. 2, Obr. 14). U 23 druhů (*Noccaea aghrica*, *N. annua*, *N. aucheri*, *N. bulbosa*, *N. caerulescens*, *N. camlikensis*, *N. ceratocarpum*, *N. cilicica*, *N. densiflora*, *N. eigii*, *N. elegans*, *N. fendleri*, *N. hastulatum*, *N. huber-morathii*, *N. jankae*, *N. lilacina*, *N. meyeri*, *N. oxyceras*, *N. papillosa*, *N. platycarpa*, *N. rechingerii*, *N. triangularis*, *N. vesicaria*) bylo zjištěno 14 mitotických chromozomů ($2n = 2x = 14$). Pouze tři druhy (*N. iberidea*, *N. perfoliata*, *N. tatiana*) mají 28 mitotických chromozomů ($2n = 4x = 28$). Tetraploidní druhy se vyskytují v různých kladech ITS stromu (Özüdoğru et al., nepubl.).

Tab. 2: Chromozomové počty a počty lokusů 45S a 5S rDNA u analyzovaných druhů rodu *Noccaea*.

Species	2n	rDNA loci		Chromosomes with 45S a 5S
		45S	5S	
<i>Noccaea aghrica</i>	14	2	2	2
<i>Noccaea aucheri</i>	14	4	6	4
<i>Noccaea bulbosa</i>	14			
<i>Noccaea caerulescens</i>	14	4	4	4
<i>Noccaea camlikensis</i>	14	2	2	2
<i>Noccaea cilicica</i>	14	2	2	2
<i>Noccaea densiflora</i>	14	6	2	2
<i>Noccaea eigii</i>	14	4	2	2
<i>Noccaea elegans</i>	14	4	2	2
<i>Noccaea fendleri subsp. glauca</i>	14	2	4	2
<i>Noccaea huber-morathii</i>	14	4	2	2
<i>Noccaea iberidea</i>	28	6	4	4
<i>Noccaea jankae</i>	14	4	4	4
<i>Noccaea lilacina</i>	14	2	2	2
<i>Noccaea meyeri</i>	14	4	2	2
<i>Noccaea papillosa</i>	14	4	2	2
<i>Noccaea perfoliata</i>	28	2	2	0
<i>Noccaea platycarpa</i>	14	2	6	2
<i>Noccaea rechingeri</i>	14	2	2	2
<i>Noccaea tatianae</i>	28	2	4	2
<i>Noccaea triangularis</i>	14	4	2	2
<i>Noccaea vesicaria</i>	14	2	2	2
<i>Noccaea hastulata</i>	14	4	4	4
<i>Thlaspi ceratocarpum</i>	14	2	2	0
<i>Noccaea annua</i>	14	2	2	0
<i>Noccaea oxyceras</i>	14	4	2	2

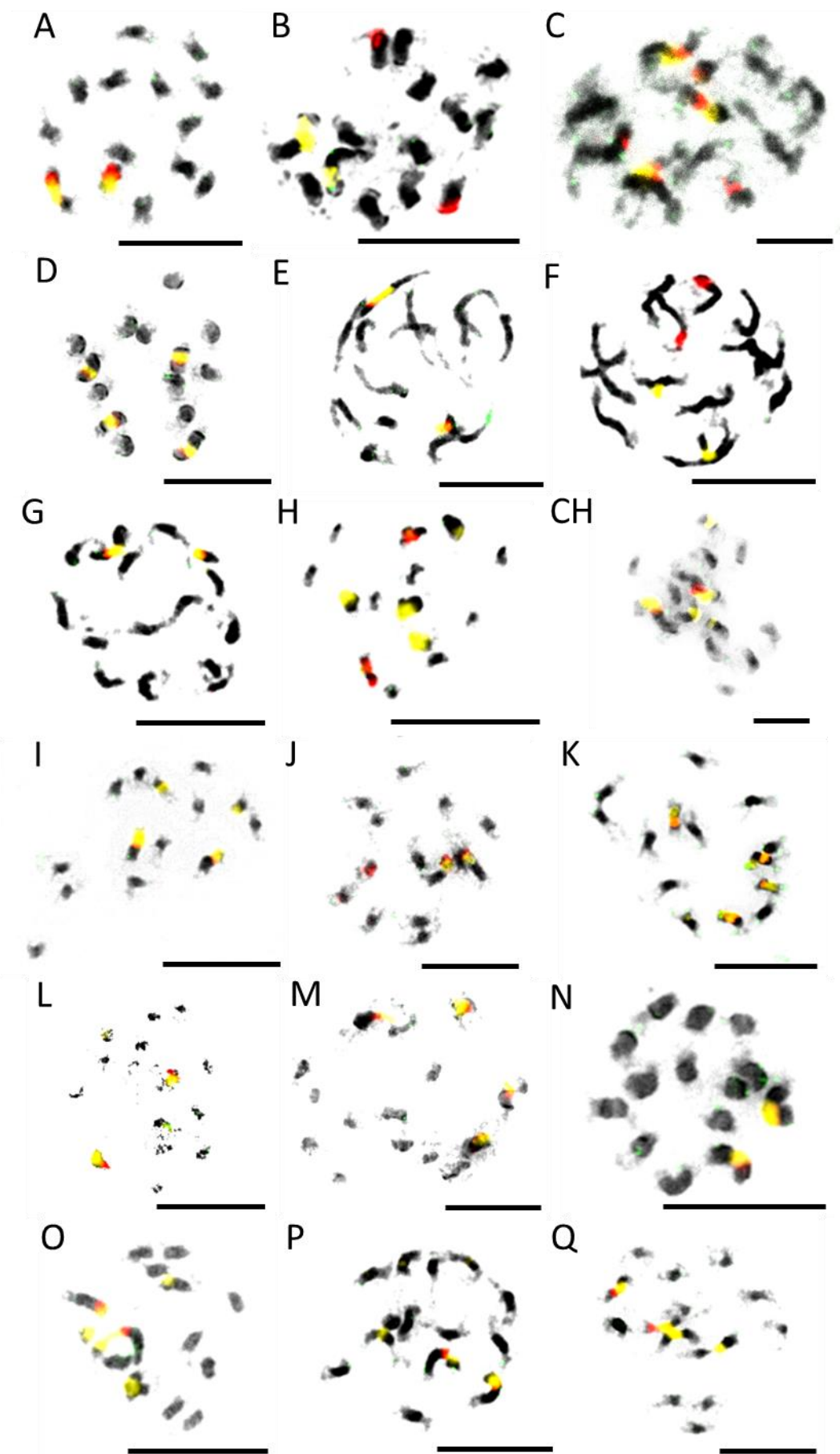
Obr. 14 (následující strana): Mitotické chromozomy analyzovaných druhů rodu *Noccaea*. Počet chromozomů je roven $2n = 2x = 14$ (A–W) a $2n = 4x = 28$ (X–Z). **A** – *Noccaea aghrica*, **B** – *N. annua*, **C** – *N. aucheri*, **D** – *N. bulbosa*, **E** – *N. caerulescens*, **F** – *N. camlikensis*, **G** – *Thlaspi ceratocarpum*, **H** – *N. cilicica*, **CH** – *N. densiflora*, **I** – *N. eigii*, **J** – *N. elegans*, **K** – *N. fendleri*, **L** – *N. hastulatum*, **M** – *N. huber-morathii*, **N** – *N. jankae*, **O** – *N. lilacina*, **P** – *N. meyeri*, **Q** – *N. oxyceras*, **R** – *N. papillosa*, **S** – *N. platycarpa*, **T** – *N. rechingeri*, **U** – *N. triangularis*, **V** – *N. vesicaria*, **W** – *N. iberidea*, **X** – *N. perfoliata*, **Y** – *N. tatianae*. Chromozomy jsou barveny pomocí DAPI. Měřítka 10 μ m.

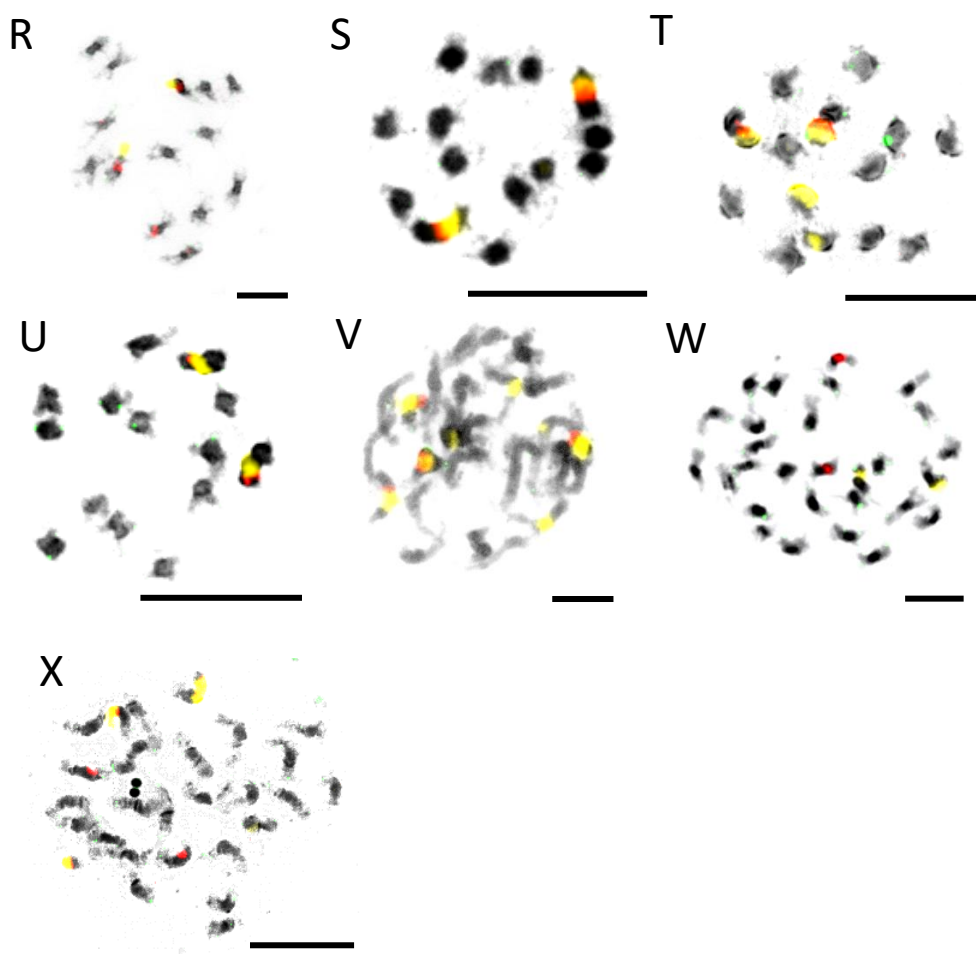


4.2 Lokalizace lokusů ribozomální DNA (45S a 5S rDNA)

Pro získání prvotního vhledu do struktury a variability chromozomů studovaných u druhů rodu *Noccaea* jsem provedla FISH se sondami odpovídajícími 45S a 5S rDNA (Tab. 2) a stanovila jsem počet jednotlivých rDNA lokusů a jejich lokalizaci na mitotických chromozomech. Počet lokusů 45S rDNA se u studovaných druhů pohybuje od jednoho do tří párů. Většina druhů má jeden (12 druhů) nebo dva (11 druhů) lokusy. Tři lokusy byly pozorovány pouze u diploidního druhu *N. densiflora* (Obr. 15H) a tetraploidního druhu *N. iberidea* (Obr. 15V). Počet lokusů 5S rDNA se u studovaných druhů pohybuje taktéž od jednoho do tří párů. Jeden lokus se vyskytuje nejčastěji (17 druhů), dva lokusy má šest druhů. Tři lokusy byly pozorovány u druhu *N. aucheri* (Obr. 15C) a *N. platycarpa* (Obr. 15R). Pouze u třech druhů (*N. perfoliata*, *Thlaspi ceratocarpum*, *N. annua*, Obr. 15W, F, B) nebyly lokusy 5S a 45S rDNA lokalizovány společně. U druhu *N. bulbosa* počty a lokalizace rDNA lokusů nebyly stanoveny z důvodu nedostatku mitotických chromozomů. Lokusy 45S i 5S rDNA se nacházejí na intersticiálních pozicích na chromozomech. Pouze u druhu *N. annua* lze pozorovat lokusy 5S rDNA v terminálních oblastech. U druhu *N. densiflora* lze pozorovat lokusy 45S rDNA v terminálních oblastech.

Na chromozomy studovaných druhů byla také hybridizována rostlinná telomerická sonda (TTAGGG)_n. Tato sonda hybridizovala pouze na konce chromozomů, a tedy nebyly pozorovány žádné intersticiální telomerické lokusy u žádného ze studovaných druhů rodu *Noccaea*.





Obr. 15: FISH na mitotických chromozomech vybraných *Noccaea* druhů: **A** – *Noccaea aghrica*, **B** – *N. annua*, **C** – *N. aucheri*, **D** – *N. caerulescens*, **E** – *N. camlikensis*, **F** – *Thlaspi ceratocarpum*, **G** – *N. cilicica*, **H** – *N. densiflora*, **CH** – *N. eigii*, **I** – *N. elegans*, **J** – *N. fendleri*, **K** – *N. hastulatum*, **L** – *N. huber-morathii*, **M** – *N. jankae*, **N** – *N. lilacina*, **O** – *N. meyeri*, **P** – *N. oxyceras*, **Q** – *N. papillosa*, **R** – *N. platycarpa*, **S** – *N. rechingeri*, **T** – *N. triangularis*, **U** – *N. vesicaria*, **V** – *N. iberidea*, **W** – *N. perfoliata*, **X** – *N. tatiana*. Na mitotické chromozomy byla hybridizována 5S rDNA (červené signály), 45S rDNA (žluté signály) a telomerická sonda (TTTAGGG) značená digoxigeninem (zelené signály). Vzhledem k uniformitě signálů telomerické sondy na konci chromozomů, a naopak variabilitě signálů rDNA sond byly fotografie upraveny tak, aby byly primárně dobře patrné rDNA lokusy (s vědomím toho, že koncové telomerické signály jsou hůře patrné). Chromozomy jsou obarveny pomocí DAPI. Měřítko: 10 μ m.

Chromozomy jednotlivých *Noccaea* druhů nesoucí 5S a 45S rDNA byly schematicky vyneseny na ITS fylogenetický strom tribu *Coluteocarpeae* (Obr. 16, Özüdoğru et al., nepubl.) ve snaze zhodnotit, (i) koreluje-li pozorovaný rDNA pattern s fylogenetickým postavením, (ii) je-li možné vypočítat rDNA pattern sdílený mezi příbuznými druhy a na základě toho zrekonstruovat rDNA karyotypy jednotlivých kladů v rámci rodu *Noccaea*, a (iii) pokusit se zrekonstruovat ancestrální stav rDNA pro celý rod *Noccaea*.

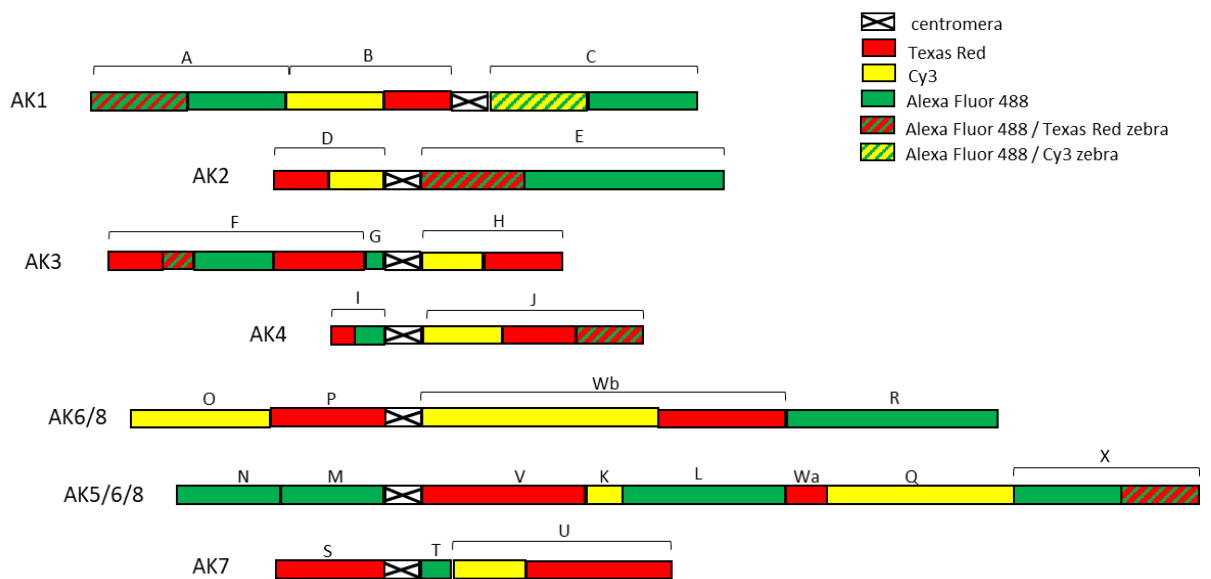
Zjištěné pozice a počet rDNA lokusů jsou velmi variabilní a nebyla zjištěna žádná korelace s fylogenetickým postavením jednotlivých druhů rodu penízek. Nejancestrálnější druh *N. perfoliata* má pouze jeden lokus 45S a jeden lokus 5S rDNA umístěné na odlišných chromozomech. Stejný pattern má i odvozený druh *N. annua*. U kladu *Thlaspiceras* (*Noccaea meyeri*, *N. huber-morathii*, *N. elegans*, *N. eigii*, *N. triangularis*, *N. rechingeri*, *N. oxyceras*) lze pozorovat určitý pattern, ne však u všech druhů stejný. Většina druhů tohoto kladu má na jednom chromozomu umístěny lokusy 45S i 5S a na druhém chromozomu pouze 45S rDNA.

Obr. 16 (následující strana): Fylogenetický ITS strom tribu *Coluteocarpeae* (Özüdoğru et al., nepubl.) s vyznačenými studovanými druhy. U těchto druhů jsou schematicky znázorněny chromozomy nesoucí rDNA zobrazené jako bílé obdélníčky. Žluté a červené body reprezentují lokusy 45S a 5S rDNA a jejich uspořádání na chromozomu.

4.3 Konstrukce srovnávacích cytogenetických map vybraných druhů rodu *Noccaea*

Metodou CCP byly v porovnání s PCK zrekonstruovány karyotypy pěti vybraných druhů z rodu *Noccaea*. Pro tyto účely byly vybrány druhy s různým fylogenetickým postavením (Obr. 16). Jako nejpůvodnější druh byl vybrán *Noccaea perfoliata*, následně *N. hastulata*, *N. aucheri*, *N. meyeri* a jako evolučně nejodvozenější druh *N. fendleri* subsp. *glauca*.

Na pachytenní chromozomy těchto pěti druhů byly hybridizovány sondy navržené na základě proto-Calepineae karyotypu (Obr. 17, Mandáková and Lysak 2015). Na přípravu sondy odpovídající chromozomu AK1 bylo použito 97 BACů, chromozomu AK2 bylo použito 72 BACů, chromozomu AK3 bylo použito 75 BACů, chromozomu AK4 bylo použito 50 BACů, chromozomu AK6/8 bylo použito 142 BACů, chromozomu AK5/6/8 bylo použito 172 BACů a chromozomu AK7 bylo použito 63 BACů.



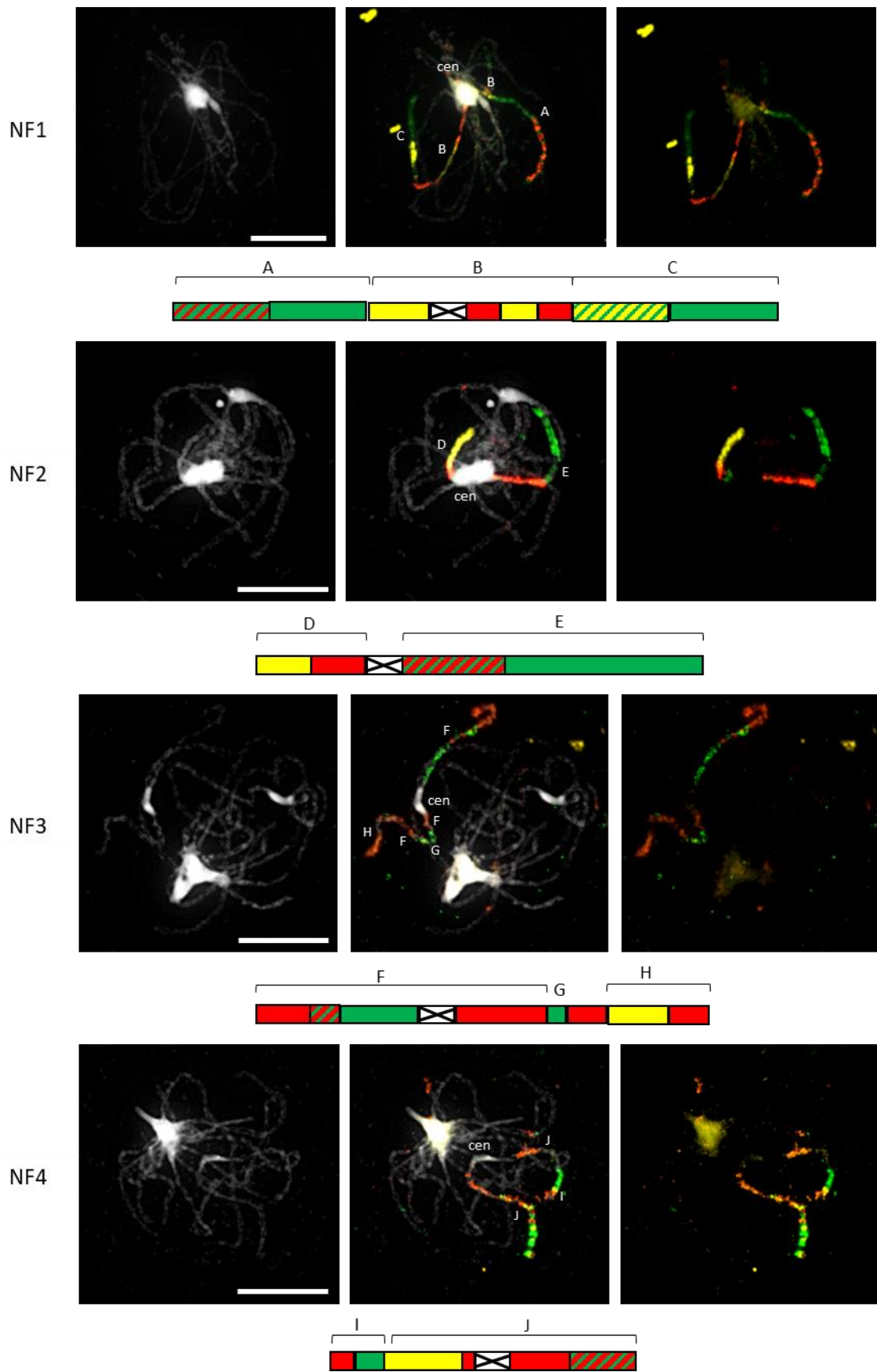
Obr. 17: Barevný pattern CCP sond navržený na základě znalosti struktury sedmi chromozomů PCK (chromozomy AK1, AK2, AK3, AK4, AK6/8, AK5/6/8 a AK7). V rámci každé sondy jsou GBs označeny různým barevným patternem k identifikaci jejich počtu, pozice nebo orientace na jednom nebo více chromozomech. GBs jsou pojmenovány písmeny A – X. Červeně značené úseky odpovídají po sobě jdoucím BACům nabarvených biotinem (> Texas Red), zelené oblasti odpovídají digoxigeninem značeným BACům (> AF488) a žluté oblasti signalizují skupinu BACů značených Cy3

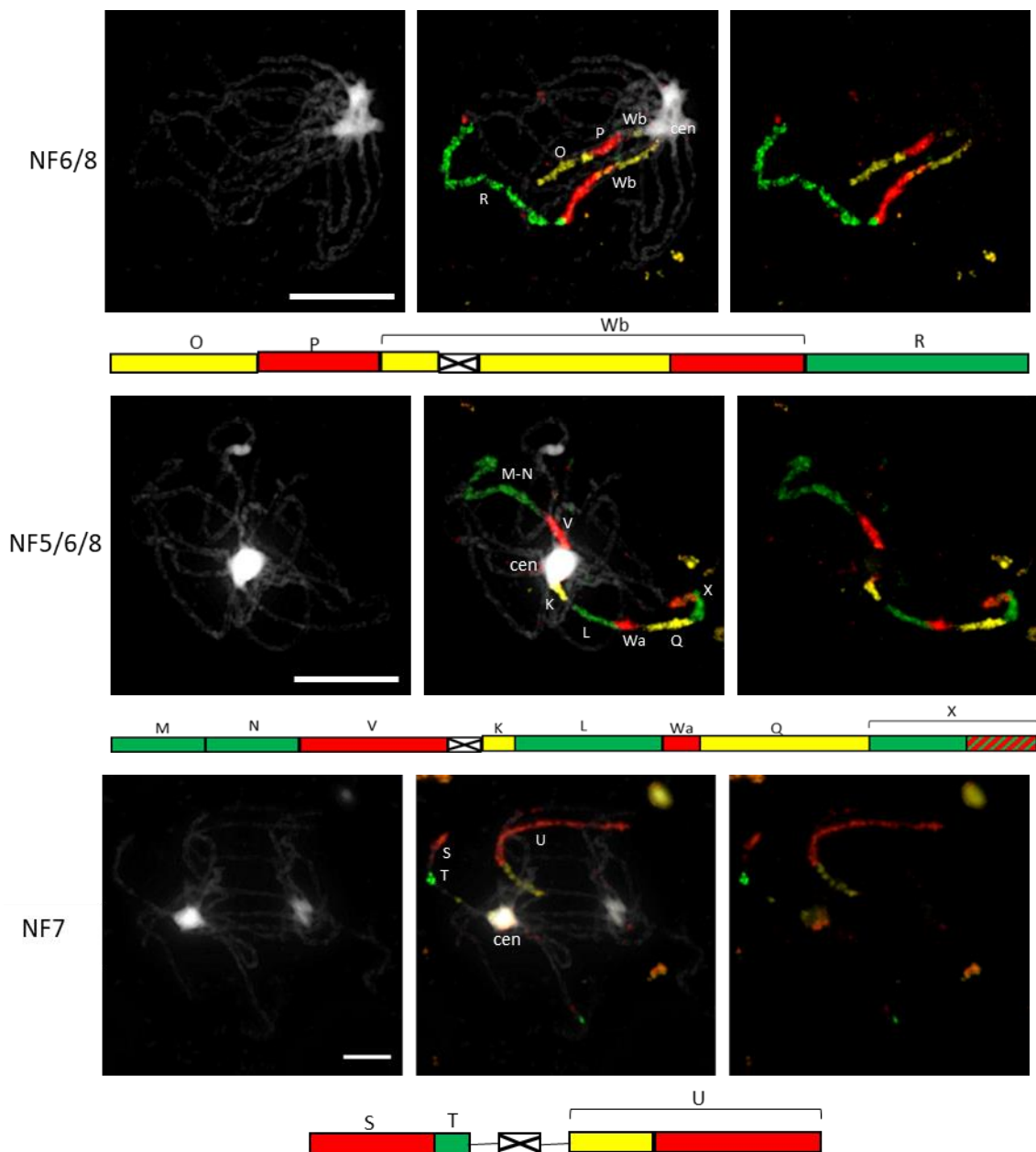
Pro každý barevný pattern chromozomů u pěti studovaných druhů je níže vyobrazena jedna fotografie pachytenních chromozomů. Nicméně barevný pattern sond nebyl vyhodnocován pouze na základě jednoho pozorování. Pro správné interpretaci bylo potřeba analyzovat nejméně pět jednoznačně nabarvených pachytenních chromozomů. Chromozomy jsou ve fázi pachytene v tzv. bivalentech, tzn. že pokud má druh 14 mitotických chromozomů, ve fázi pachytene vidíme pouze 7 meiotických chromozomů apod. Na fotografiích je tedy jeden bivalent v případě diploidních druhů a dva chromozomy v případě tetraploidních druhů.

4.3.1 Karyotyp *Noccaea fendleri* subsp. *glauca*

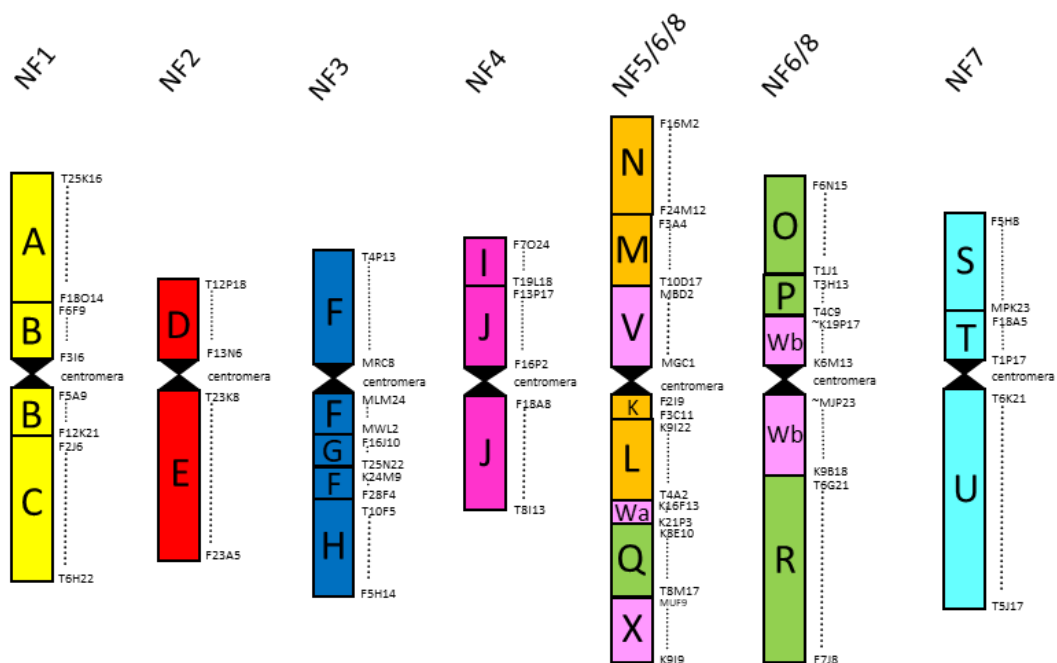
N. fendleri subsp. *glauca* je diploidní druh se sedmi chromozomy (NF1 – NF7). Ve struktuře karyotypu *N. fendleri* (Obr. 18) byla u chromozomu NF2 prokázána shodná struktura konzervovaných genomických oblastí jako u ancestrálního PCK. Zbýlých šest chromozomů je přestavěných (NF1, NF3 – NF7).

Současnou strukturu genomických bloků na chromozomu NF1 lze vysvětlit dvěma po sobě následujícími pericentrickými inverzemi v genomickém bloku B (Obr. 20A). Jedna paracentrická a jedna pericentrická inverze jsou zodpovědné za vznik chromozomu NF3 (Obr. 20B). Chromozom NF4 (Obr. 20C) vznikl dvěma po sobě jdoucími pericentrickými inverzemi genomického bloku J. Chromozom NF6/8 (Obr. 20D) prošel jednou pericentrickou inverzí v genomickém bloku Wb. Jednou pericentrickou inverzí genomického bloku V prošel chromozom NF5/6/8 (Obr. 20E). U chromozomu NF7 došlo k jedné pericentrické inverzi v genomickém bloku T (Obr. 20F). Na základě těchto pozorování byl vytvořen karyotyp *N. fendleri* (Obr. 19).



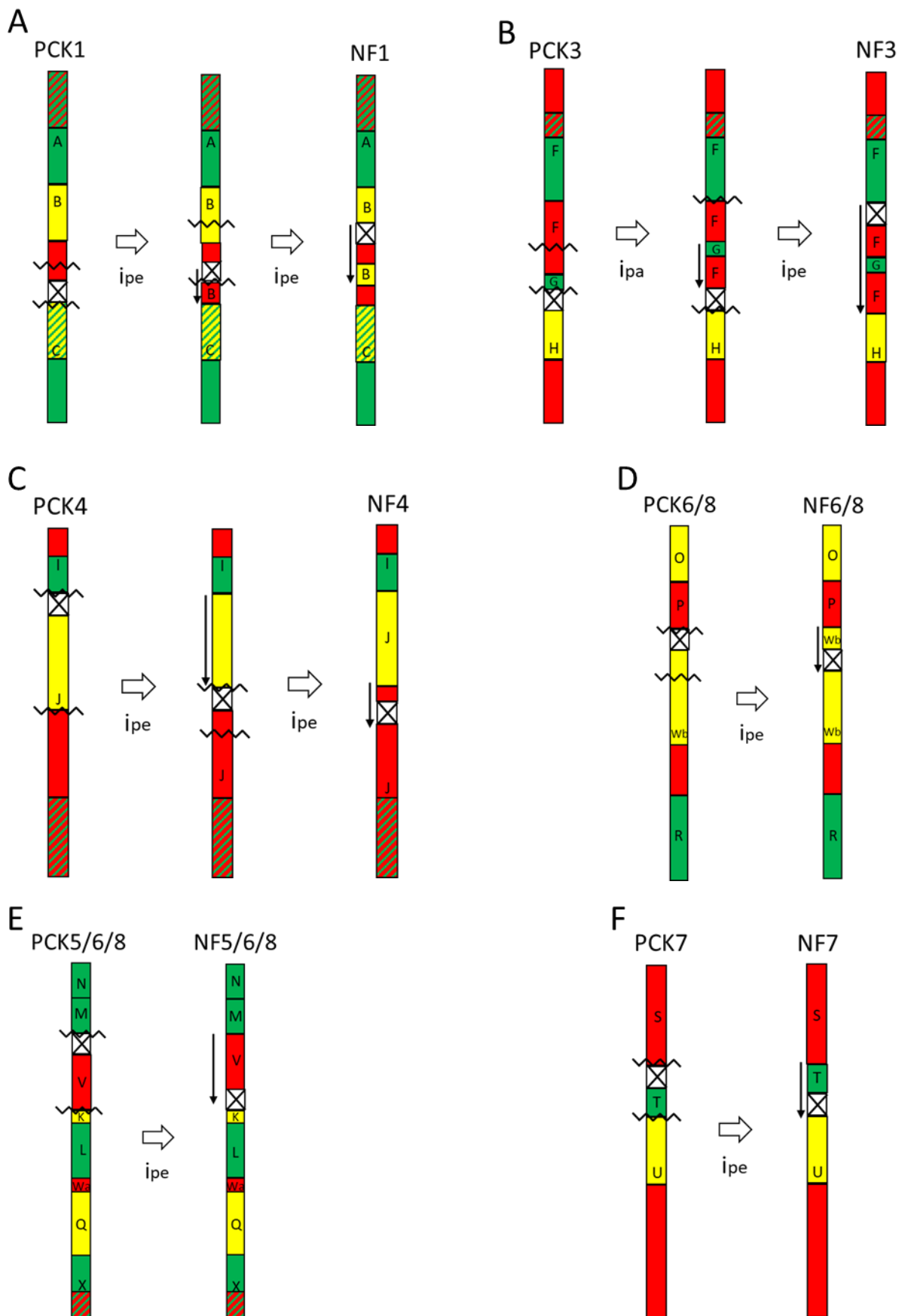


Obr. 18: CCP druhu *N. fendleri* subsp. *glauca* (NF1 – 7): na pachytenní chromozomy byly hybridizovány značené sondy odpovídající GBs vždy jednoho chromozomu PCK. Chromozomy jsou obarveny pomocí DAPI (levý obrázek). Obrázek uprostřed je kombinací dvou předchozích. Schéma pod fotografiemi reprezentuje uspořádání GBs zobrazených na fotografiích. Měřítka: 10 μ m.



Obr. 19: Karyotyp *N. fendleri* subsp. *glauca* zrekonstruovaný pomocí metody CCP. GBs (A – X) jsou zbarveny v závislosti na jejich poloze na ACK. Bloky rozdělené na dvě části jsou označeny ,a' a ,b'. U každého chromozomu jsou uvedeny souřadnice BAC klonů každého kontigu.

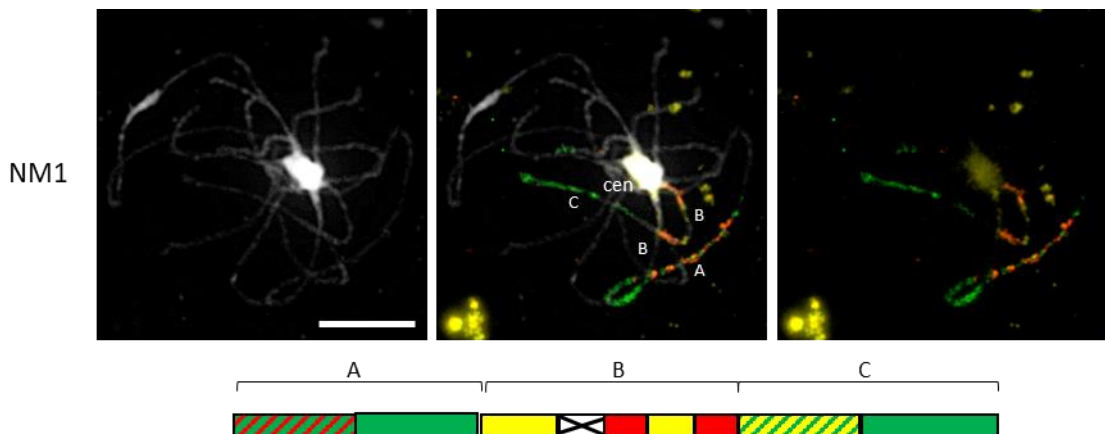
Obr. 20 (následující strana): Rekonstrukce vzniku chromozomů *N. fendleri* subsp. *glauca* z ancestrálního PCK genomu. Chromozom NF2 má ancestrální strukturu, proto zde není uváděn. *ipe* – pericentrická inverze, *ipa* – paracentrická inverze. Podélné šipky značí změnu orientace chromozomových úseků po inverzní události. Vlnovka znázorňuje chromozomový zlom (tzn. breakpoint). Centromera je značena křížkem. Barvy odpovídají fluorescenčním signálům v daném experimentu, tzn. Korespondují s CCP fotografiemi prezentovanými v Obr. 18.

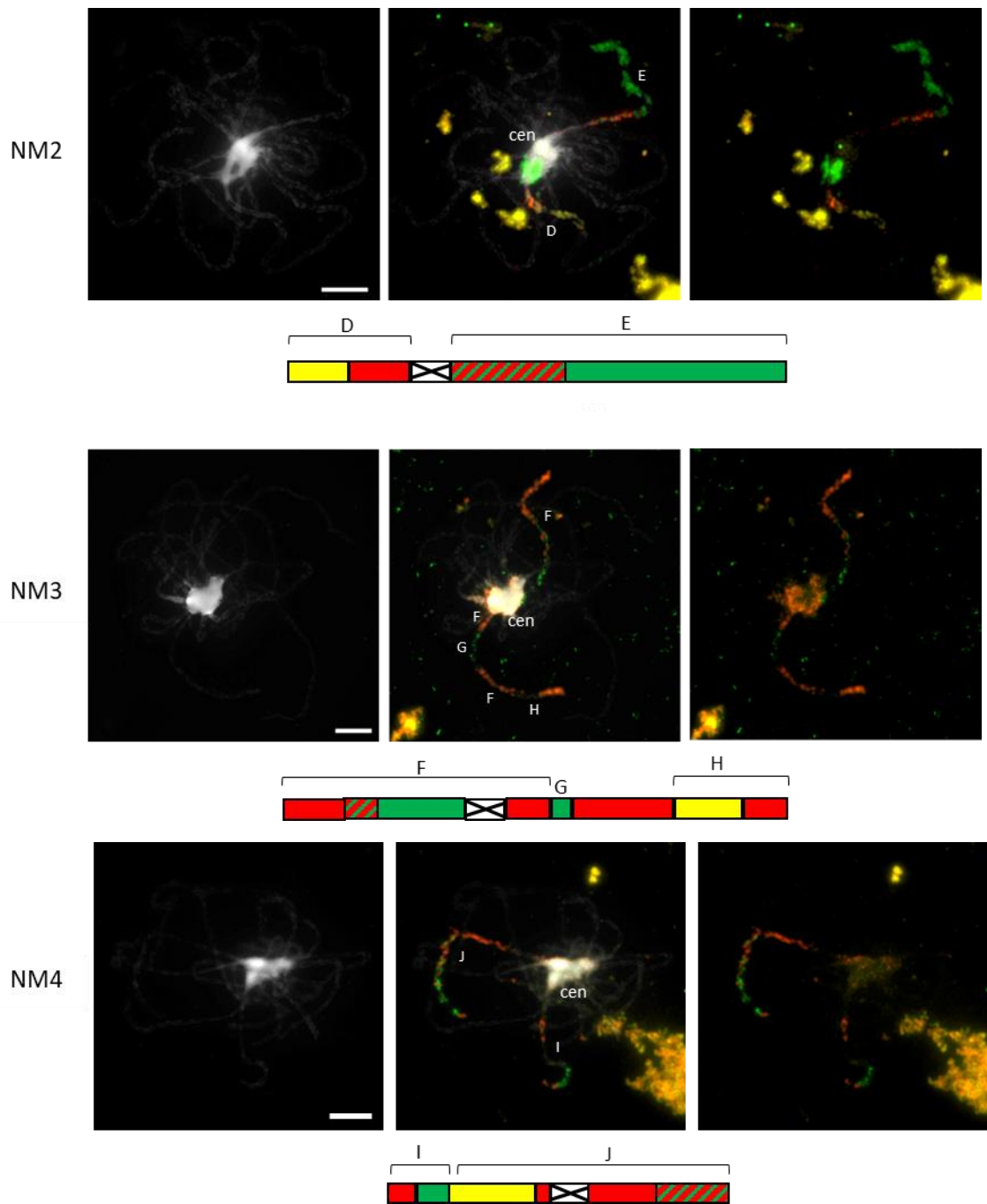


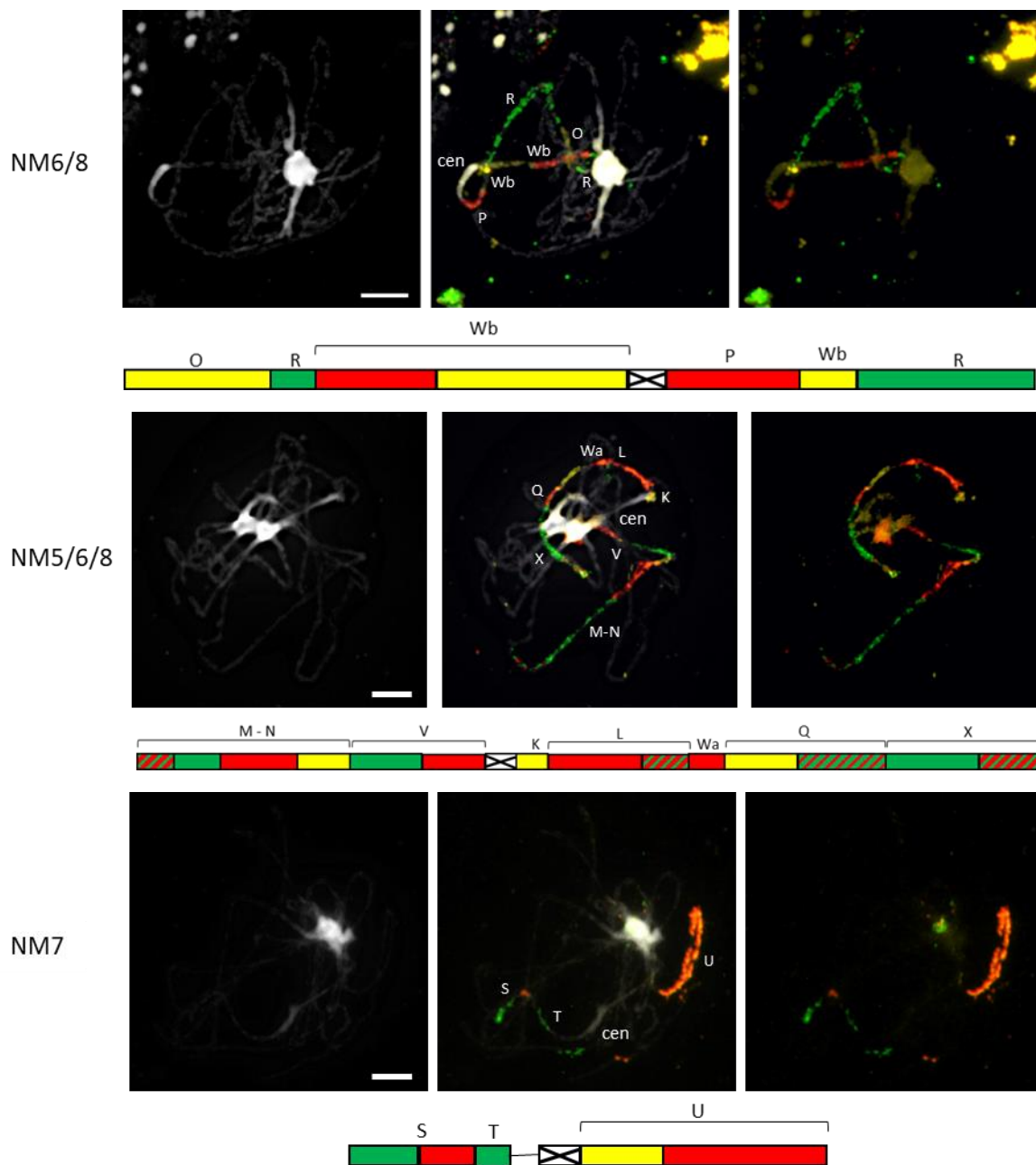
4.3.2 Karyotyp *Noccaea meyeri*

N. meyeri je diploidní druh se sedmi chromozomy (NM1 – NM7). Ve struktuře karyotypu *N. meyeri* (Obr. 21) byla u chromozomu NF2 prokázána shodná struktura konzervovaných genomických oblastí jako u ancestrálního proto-Calepineae karyotypu. Zbýlých šest chromozomů je přestavěných (NM1, NM3 – NM7).

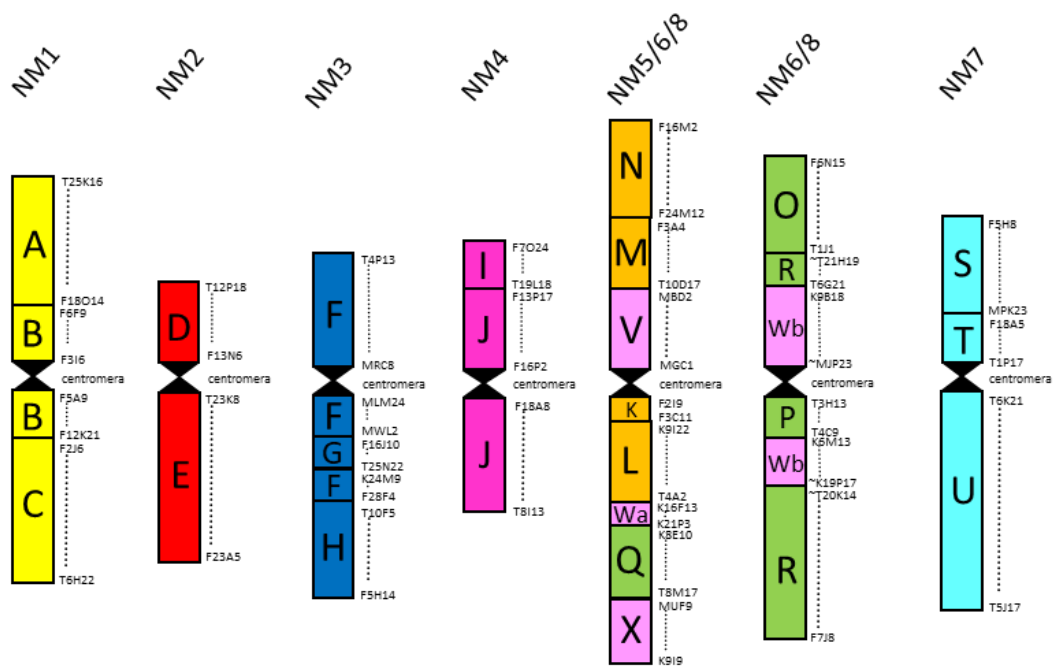
Současnou strukturu genomických bloků na chromozomu NM1 lze vysvětlit dvěma po sobě následujícími pericentrickými inverzemi v genomickém bloku B (Obr. 20A). Jedna paracentrická a jedna pericentrická inverze jsou zodpovědné za vznik chromozomu NM3 (Obr. 20B). Chromozom NM4 vznikl dvěma po sobě jdoucími pericentrickými inverzemi genomického bloku J (Obr. 20C). Chromozom NM6/8 prošel dvěma po sobě jdoucími pericentrickými inverzemi následované jednou paracentrickou inverzí (Obr. 23A). Jednou pericentrickou inverzí genomického bloku V prošel chromozom NM5/6/8 (Obr. 23B). U tohoto chromozomu byla navíc použita podrobnější sonda, která odhalila nejprve již zmíněnou pericentrickou inverzi genomického bloku V a následně došlo k paracentrické inverzi samotného bloku V. U chromozomu NM7 došlo k jedné pericentrické inverzi v genomickém bloku T (Obr. 20F). Na základě těchto pozorování byl rekonstruován karyotyp *N. meyeri* (Obr. 22).



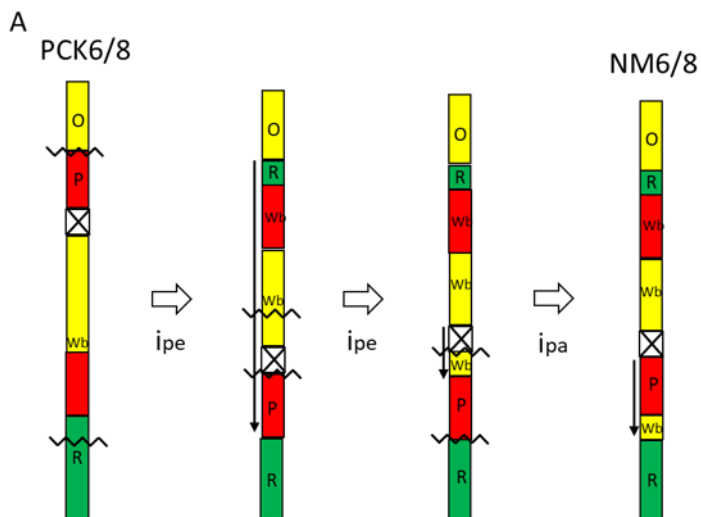


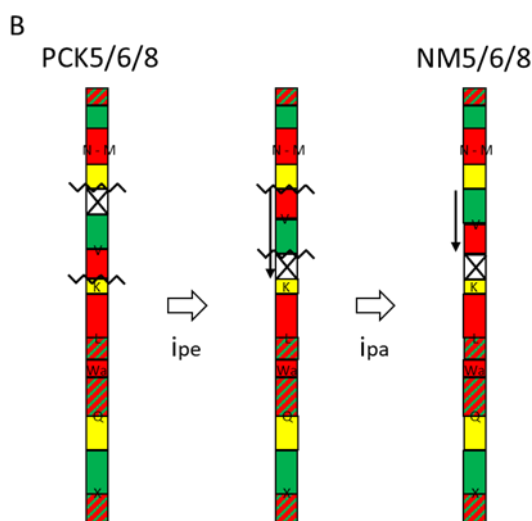


Obr. 21: CCP druhu *N. meyeri* (NM1 – 7): na pachytenní chromozomy byly hybridizovány značené sondy odpovídající různým konzervovaným GBs vždy jednoho chromozomu PCK. Chromozomy jsou obarveny pomocí DAPI (levý obrázek). Obrázek uprostřed je kombinací dvou předchozích. Schéma pod fotografiemi reprezentuje uspořádání GBs zobrazených na fotografiích. Měřítka: 10 μ m.



Obr. 22: Karyotyp *N. meyeri* zrekonstruovaný pomocí metody CCP. GBs (A – X) jsou zbarveny v závislosti na jejich poloze na ACK. Bloky rozdělené na dvě části jsou označeny ,a' a ,b'. U každého chromozomu jsou uvedeny souřadnice BAC klonů každého kontigu.



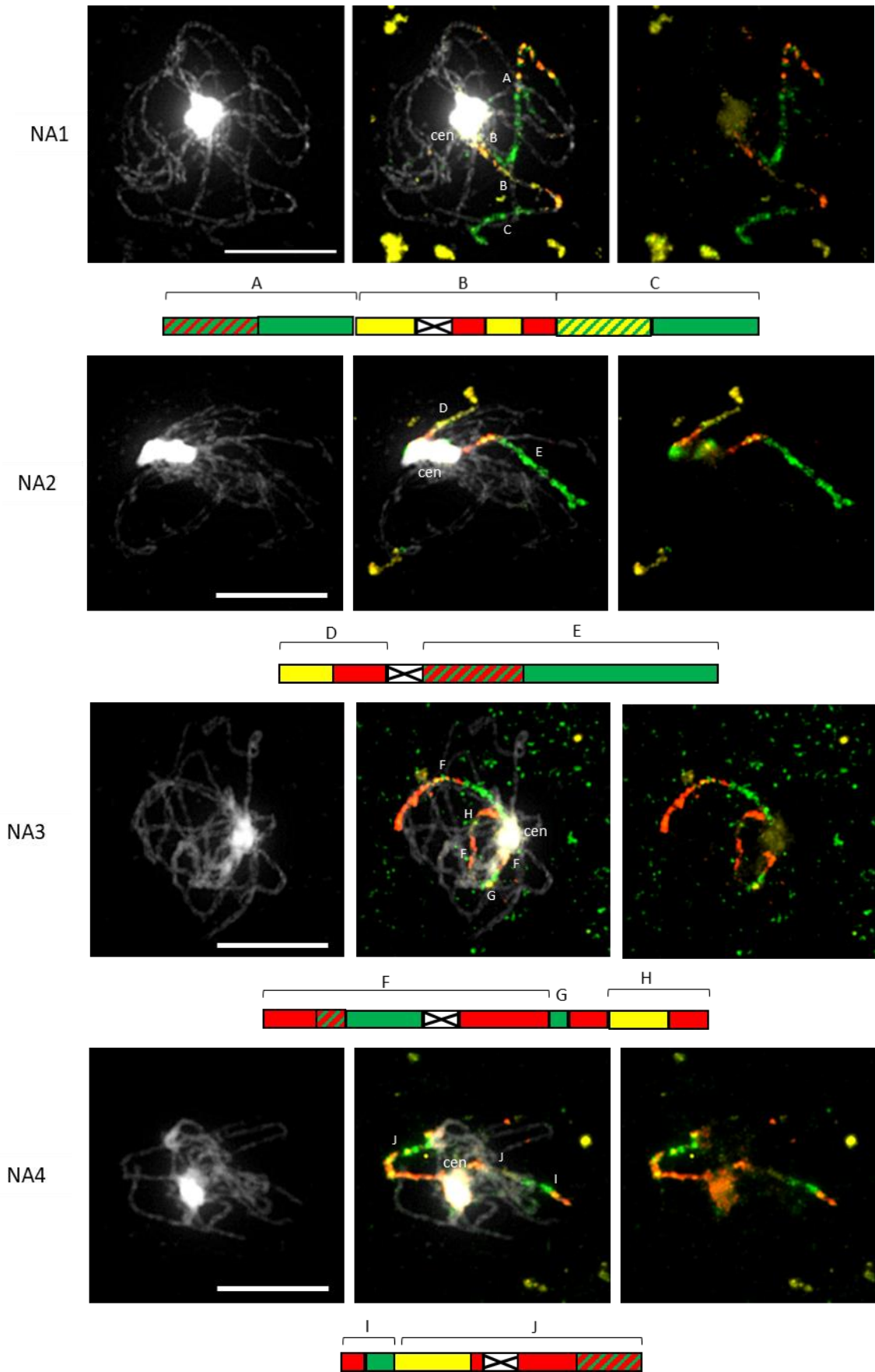


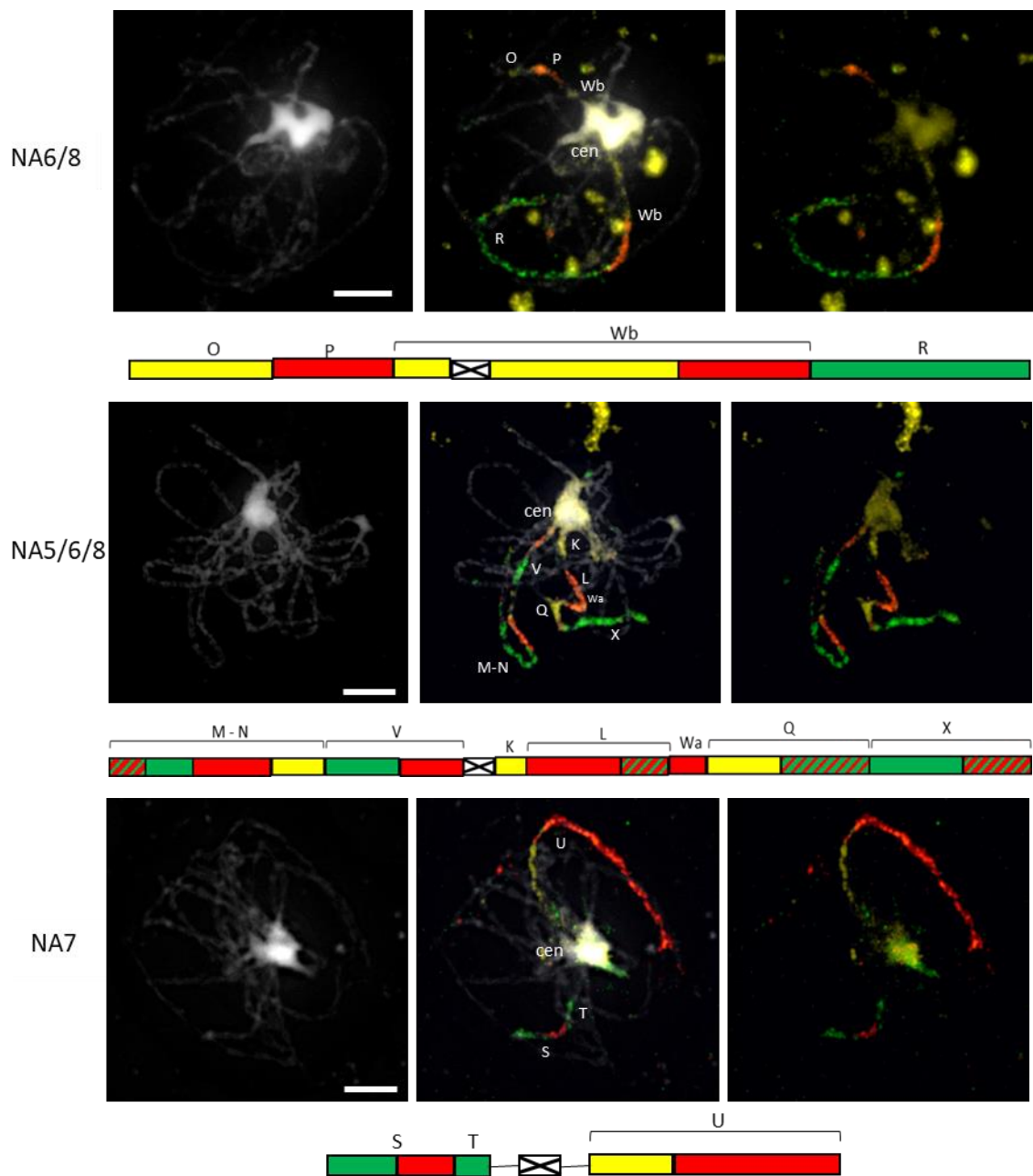
Obr. 23 (pokračování z předchozí strany): Rekonstrukce vzniku chromozomů *N. meyeri* z ancestrálního PCK genomu. ipe – pericentrická inverze, ipa – paracentrická inverze. Podélné šipky značí změnu orientace chromozomových úseků po inverzní události. Centromera je značena křížkem. Barvy odpovídají fluorescenčním signálům v daném experimentu, tzn. Korespondují s CCP fotografiemi prezentovanými v Obr. 21.

4.3.3 Karyotyp *Noccaea aucheri*

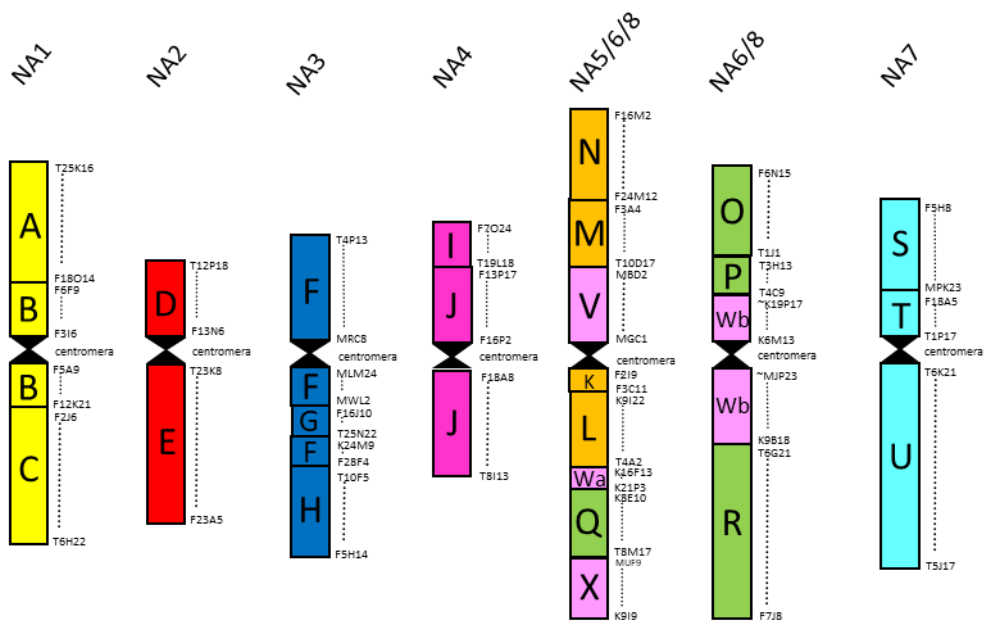
N. aucheri je diploidní druh se sedmi chromozomy (NA1 – NA7). Ve struktuře karyotypu *N. aucheri* (Obr. 24) byla u chromozomu NA2 prokázána shodná struktura konzervovaných genomických oblastí jako u ancestrálního PCK.

Současnou strukturu genomických bloků na chromozomu NA1 lze vysvětlit dvěma po sobě následujícími pericentrickými inverzemi v genomickém bloku B (Obr. 20A). Jedna paracentrická a jedna pericentrická inverze jsou zodpovědné za vznik chromozomu NA3 (Obr. 20B). Chromozom NA4 vznikl dvěma po sobě jdoucími pericentrickými inverzemi genomického bloku J (Obr. 20C). Chromozom NA6/8 prošel jednou pericentrickou inverzí v genomickém bloku Wb (Obr. 20D). U chromozomu NA5/6/8 byla použita podrobnější sonda, která odhalila nejprve jednu pericentrickou inverzi genomického bloku V a následnou paracentrickou inverzi samotného bloku V (Obr. 23B). U chromozomu NA7 došlo k jedné pericentrické inverzi v genomickém bloku T (Obr. 20F). Na základě těchto pozorování byl rekonstruován karyotyp *N. aucheri* (Obr. 25).





Obr. 24: CCP druhu *N. aucheri* (NA1 – 7): na pachytenní chromozomy byly hybridizovány značené sondy odpovídající GBs vždy jednoho chromozomu PCK. Chromozomy jsou obarveny pomocí DAPI (levý obrázek). Obrázek uprostřed je kombinací dvou předchozích. Schéma pod fotografiemi reprezentuje uspořádání GBs zobrazených na fotografiích. Měřítka: 10 μ m.



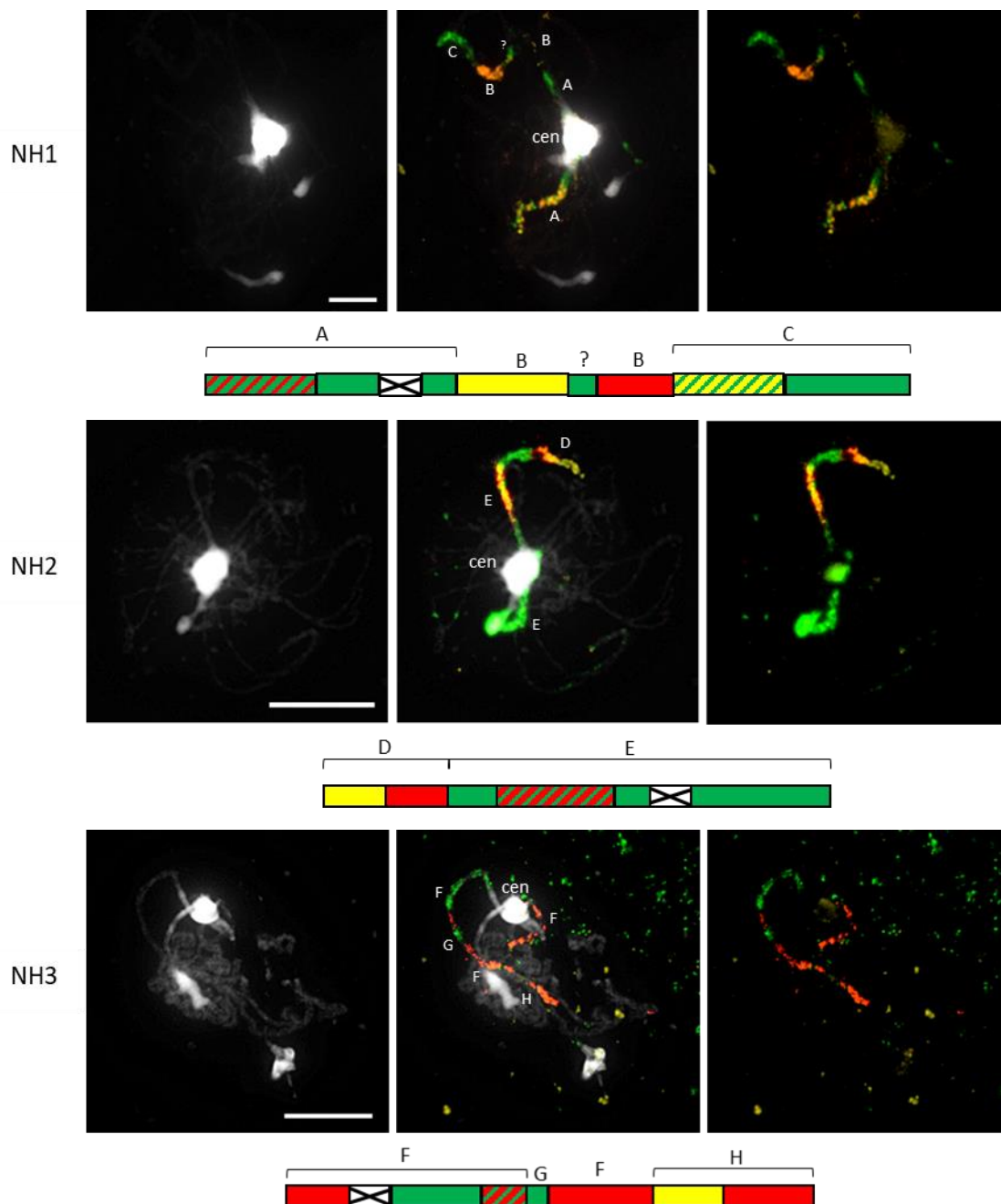
Obr. 25: Karyotyp *N. aucheri* zrekonstruovaný pomocí metody CCP. GBs (A – X) jsou zbarveny v závislosti na jejich poloze na ACK. Bloky rozdělené na dvě části jsou označeny ,a' a ,b'. U každého chromozomu jsou uvedeny souřadnice BAC klonů každého kontigu.

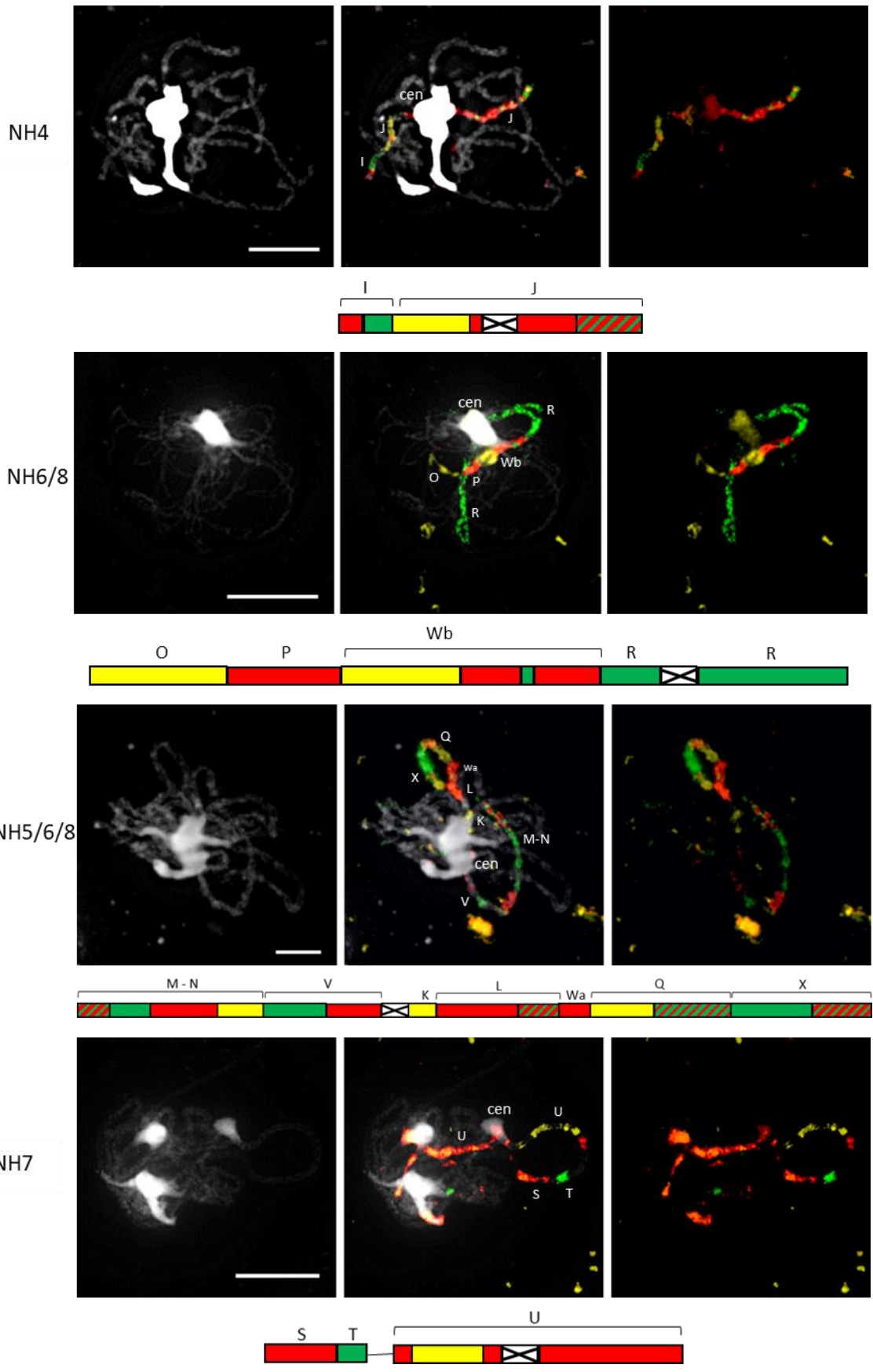
4.3.4 Karyotyp *Noccea hastulata*

N. hastulata je diploidní druh se sedmi chromozomy (NH1 – NH7). Genom *N. hastulata* je nejvariabilnějším genomem z pěti studovaných druhů (Obr. 26).

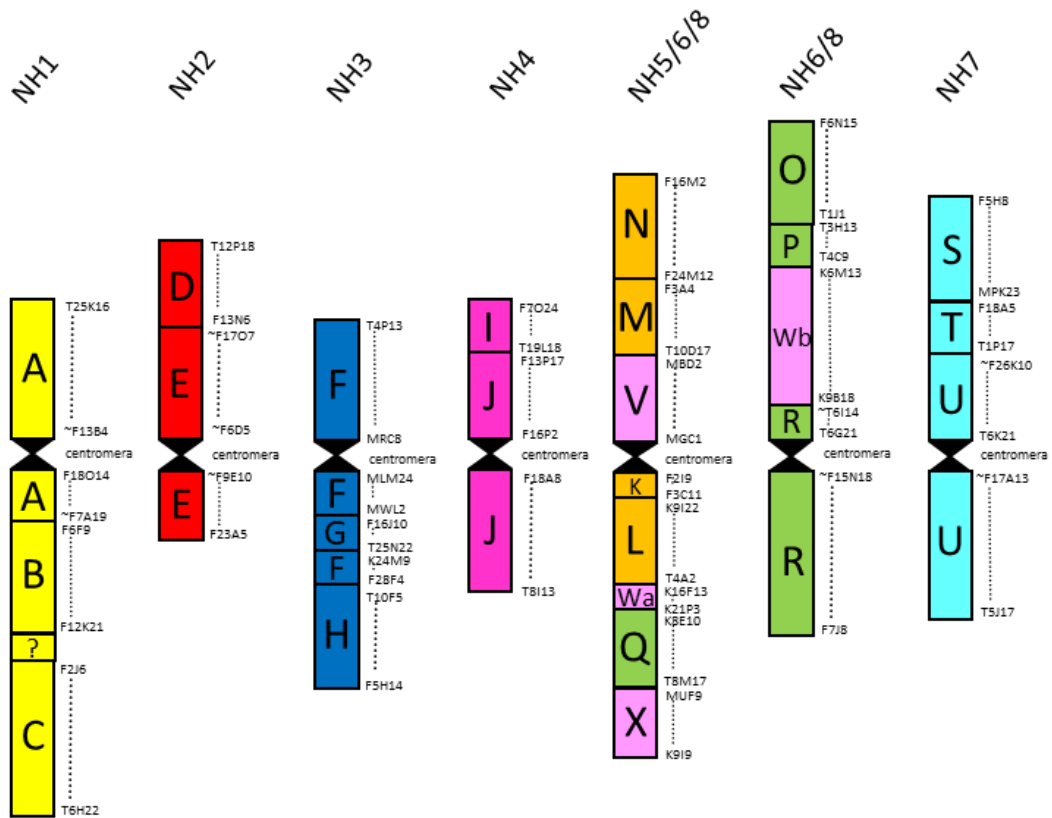
Chromozom NH1 byl do současné podoby přestavěn pomocí minimálně tří pericentrických inverzí (Obr. 28A). Zelený blok s otazníkem mezi dvěma bloky B má prozatím nejasný původ a vyžaduje podrobnější CCP. Dvě pericentromerické inverze, týkající se genomického bloku E, stojí za vznikem chromozomu NH2 (Obr. 28B). Jedna paracentrická a jedna pericentrická inverze jsou zodpovědné za vznik chromozomu NH3 (Obr. 20B). Chromozom NH4 vznikl dvěma po sobě jdoucími pericentrickými inverzemi genomického bloku J (Obr. 20C). Chromozom NH6/8 prošel jednou pericentrickou inverzí následovanou dvěma paracentrickými inverzemi (Obr. 28D). U chromozomu NH5/6/8 byla použita podrobnější sonda, která odhalila nejprve jednu pericentrickou inverzi genomického bloku V a následnou paracentrickou inverzi samotného bloku V (Obr. 23B). Tři po sobě jdoucí pericentromerické inverze jsou zodpovědné za současnou

podobu chromozomu NH7 (Obr. 28C). Na základě těchto pozorování byl rekonstruován karyotyp *N. hastulata* (Obr. 27).

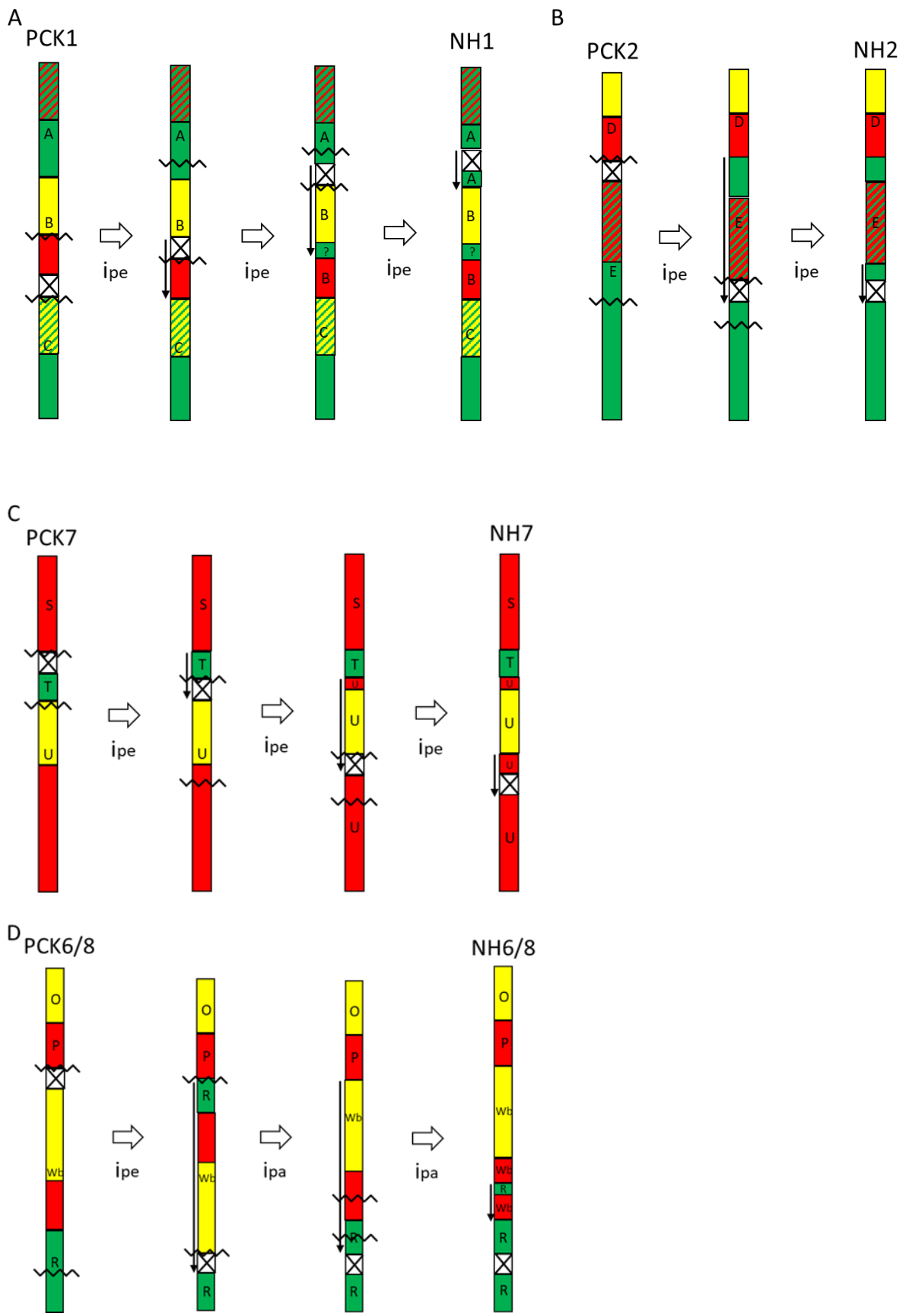




Obr. 26 (předchozí strana): CCP druhu *N. hastulata* (NH1 – 7): na pachytenní chromozomy byly hybridizovány značené sondy odpovídající GBs vždy jednoho chromozomu PCK. Chromozomy jsou obarveny pomocí DAPI (levý obrázek). Obrázek uprostřed je kombinací dvou předchozích. Schéma pod fotografiemi reprezentuje uspořádání GBs zobrazených na fotografiích. Měřítka: 10 μ m.



Obr. 27: Karyotyp *N. hastulata* zrekonstruovaný pomocí metody CCP. GBs (A – X) jsou zbarveny v závislosti na jejich poloze na ACK. Bloky rozdělené na dvě části jsou označeny ,a' a ,b'. U každého chromozomu jsou uvedeny souřadnice BAC klonů každého kontigu.

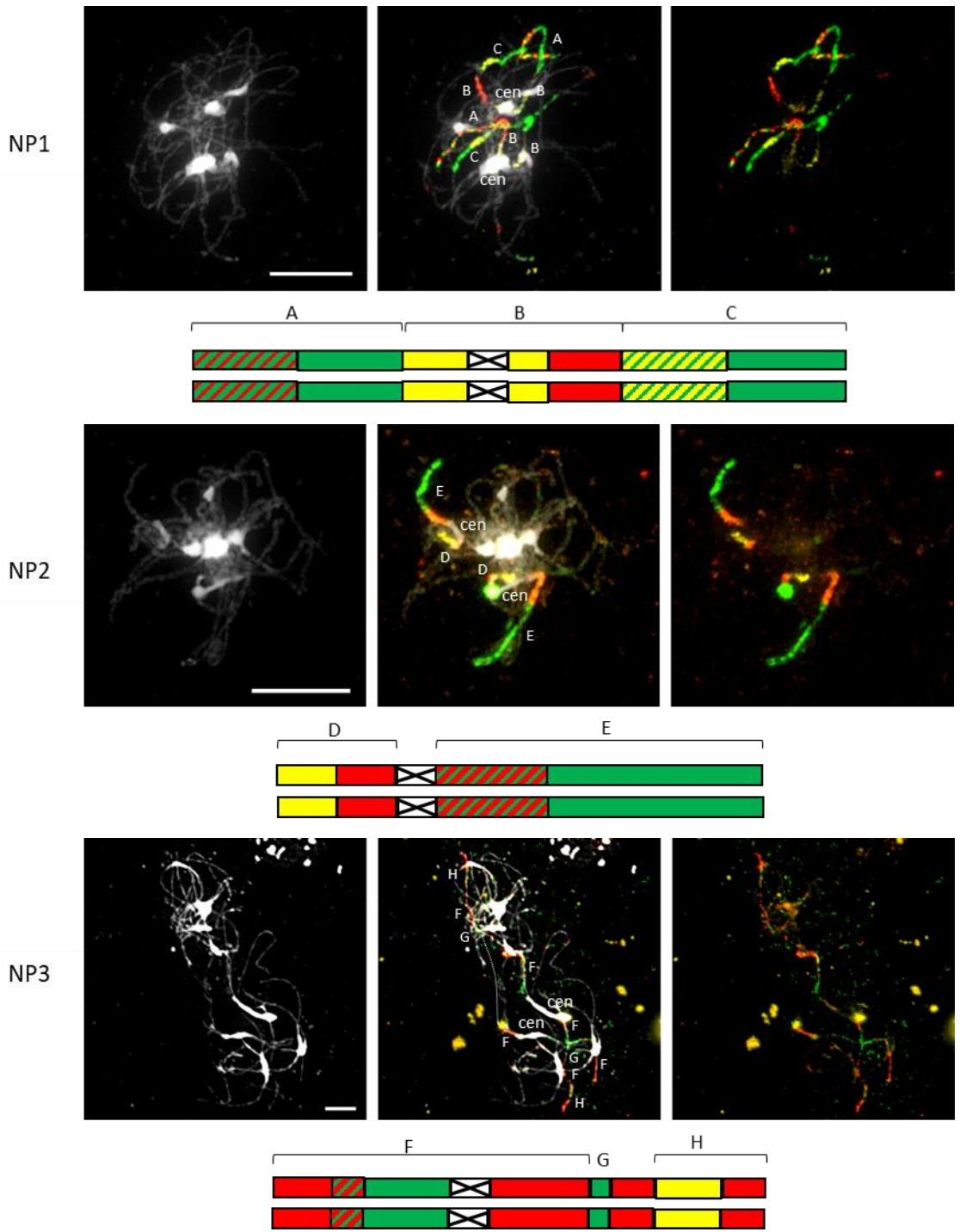


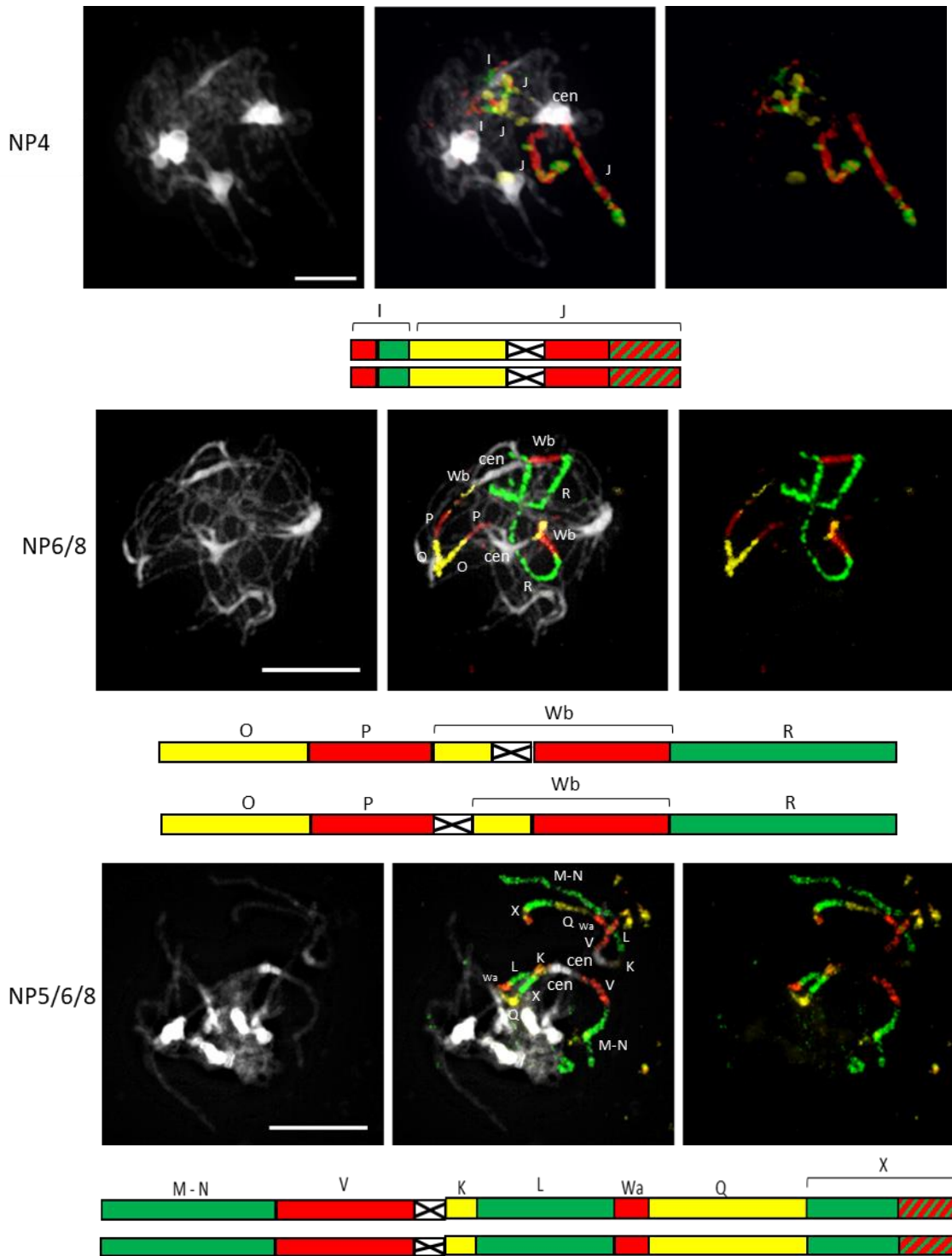
Obr. 28 (předchozí strana): Rekonstrukce vzniku chromozomů *N. hastulata* z ancestrálního PCK genomu. *ipe* – pericentrická inverze, *ipa* – paracentrická inverze. Podélné šipky značí změnu orientace chromozomových úseků po inverzní události. Vlnovka znázorňuje chromozomový zlom (tzn. breakpoint). Centromera je značena křížkem. Barvy odpovídají fluorescenčním signálům v daném experimentu, tzn. Korespondují s CCP fotografiemi prezentovanými v Obr. 26.

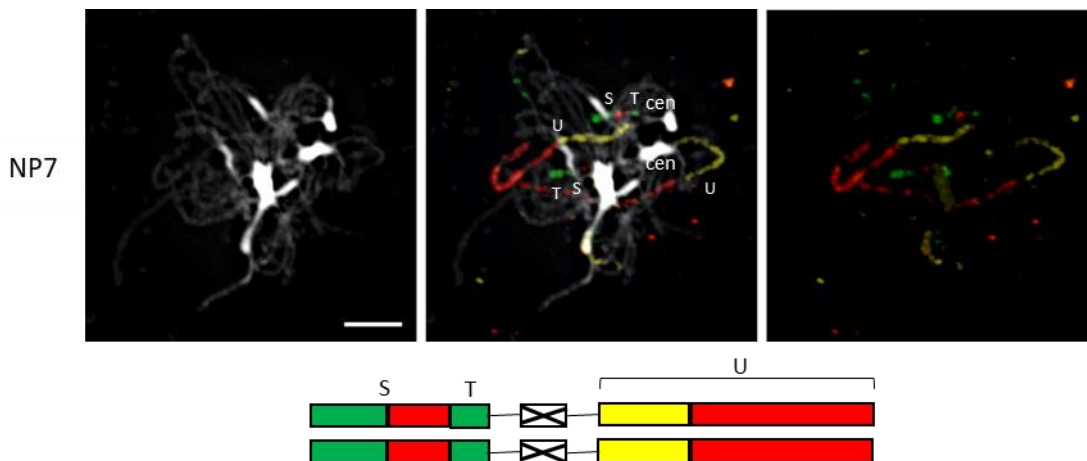
4.3.5 Karyotyp *Noccaea perfoliata*

Druh *N. perfoliata* je tetraploidní, tudíž má 28 mitotických chromozomů. Fluorescenční signály se tedy objevují současně na dvou bivalentních chromozomech (Obr. 29).

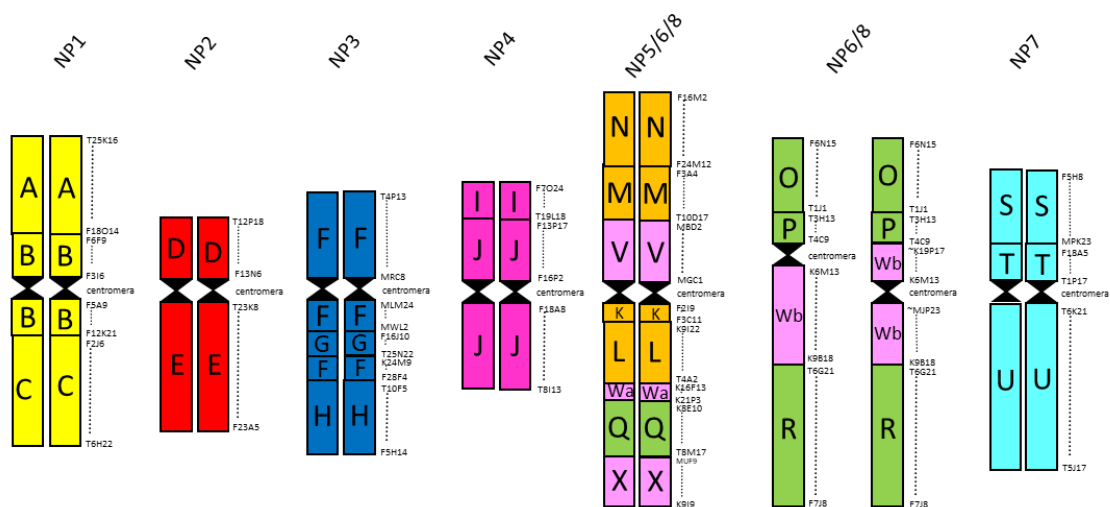
Současnou strukturu genomických bloků na chromozomu NP1 lze vysvětlit dvěma po sobě následujícími pericentrickými inverzemi v genomickém bloku B (Obr. 20A). U chromozomu NP2 prokázána shodná struktura konzervovaných genomických oblastí jako u ancestrálního PCK. Jedna paracentrická a jedna pericentrická inverze jsou zodpovědné za vznik chromozomu NP3 (Obr. 20B). Chromozom NP4 vznikl jednou pericentrickou inverzí genomického bloku J (Obr. 20C). Jeden homologní chromozom NP6/8 má ancestrální strukturu shodnou s proto-Calepineae karyotypem a druhý homologní chromozom NP6/8 prošel jednou pericentrickou inverzí (Obr. 20D). Jednou pericentrickou inverzí genomického bloku V prošel chromozom NP5/6/8 (Obr. 20E). U chromozomu NP7 došlo k jedné pericentrické inverzi v genomickém bloku T (Obr. 20F). Na základě těchto pozorování byl rekonstruován karyotyp *N. perfoliata* (Obr. 30).







Obr. 29: CCP druhu *N. perfoliata* (NP1 – 7): na pachytenní chromozomy byly hybridizovány značené sondy odpovídající GBs vždy jednoho chromozomu PCK. Chromozomy jsou obarveny pomocí DAPI (levý obrázek). Obrázek uprostřed je kombinací dvou předchozích. Schémata reprezentují uspořádání GBs zobrazených na fotografiích. Měřítka: 10 μ m.



Obr. 30: Karyotyp *N. perfoliata* zrekonstruovaný pomocí metody CCP. GBs (A – X) jsou zbarveny v závislosti na jejich poloze na ACK. Bloky rozdělené na dvě části jsou označeny ,a' a ,b'. U každého chromozomu jsou uvedeny souřadnice BAC klonů každého kontigu.

5 DISKUZE

5.1 Chromozomové počty a ribozomální DNA u zkoumaných druhů

Čeleď *Brassicaceae* je velmi bohatá na počet druhů a je zároveň jednou z cytogeneticky nejlépe prozkoumaných čeledí. Warwick and Al-Shehbaz (2006) publikovali chromozomové počty pro 232 rodů z 338 (69 %) a 1558 druhů z 3709 (42 %). Od roku 2006 se počet známých chromozomových počtů pro čeleď brukvovitých zvýšil (počty chromozomů jsou průběžně aktualizovány v databázi BrassiBase, URL1). Nejnižší známý chromozomový počet tribu *Coluteocarpeae* je $2n = 14$, dále pak $2n = 28$, 42 a nejvyšší $2n = 56$ (Warwick and Al-Shehbaz 2006). Mnou zjištěné chromozomové počty u tribu *Coluteocarpeae* jsou konzervované, většina druhů má $2n = 14$. Pouze tři druhy (*Noccaea perfoliata*, *N. iberidea* a *N. tatarica*) mají $2n = 28$ a jsou tedy tetraploidní. Dva tetraploidní druhy (*N. perfoliata*, *N. iberidea*) se nacházejí v bazální části fylogenetického ITS stromu (Özüdoğru et al., nepubl.), *N. tatarica* a již dříve publikovaná *N. jankae* (Mandáková et al. 2015) patří mezi druhy odvozené. V postavení tetraploidních druhů na fylogenetickém stromě nebyl pozorován žádný pattern. Vzhledem k tomu, že ancestrální počet chromozomů v čeledi je $n = 8$, je $n = 7$ specifické pro *Coluteocarpeae* počtem odvozeným, vzniklým redukcí (tzn. descending dysploidy) z 8 na 7.

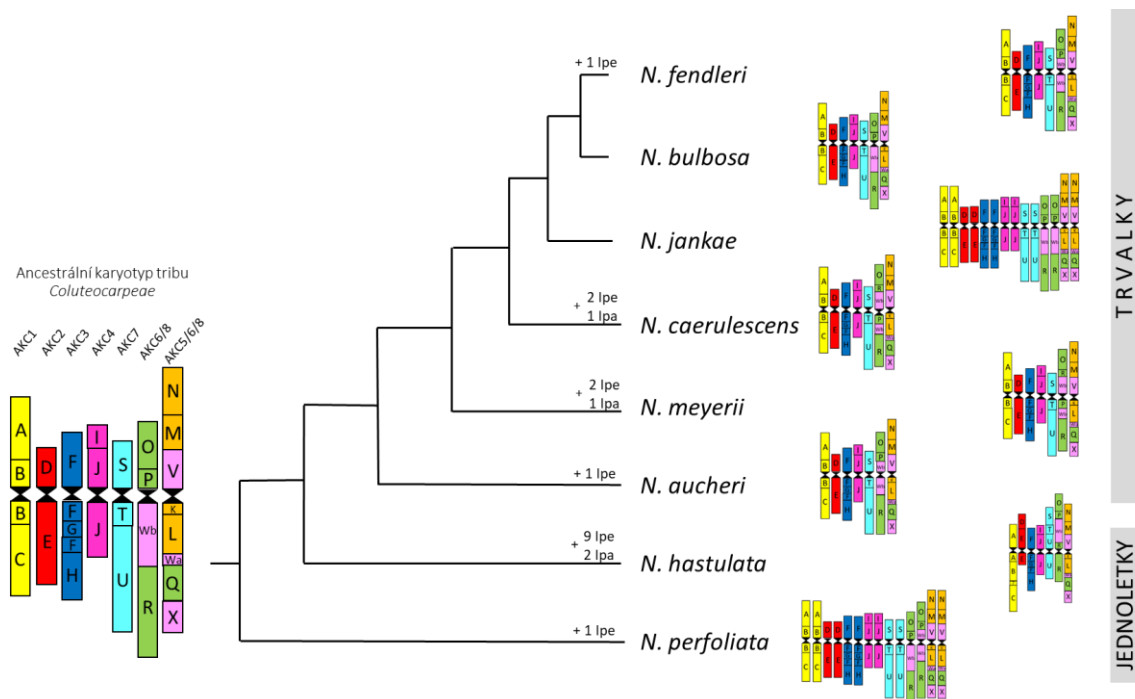
Byl zkoumán počet a umístění genů pro ribozomální RNA. Intersticiální pozice 45S rDNA, jinak vzácná u *Brassicaceae* (Ali & al. 2005), je zjevně běžná u druhů rodu *Noccaea*, podobně jako u tribu *Heliophilleae* (Mandáková et al. 2012). Podle studie Roa a Guerra (2012) je 5S rDNA většinou umístěna v proximálních oblastech a u krytosemenných rostlin bývá přítomna v karyotypu pouze jako jeden pár lokusů. Ali et al. (2004) zjistili, že většina *Brassicaceae* druhů má lokusy 5S rDNA umístěny intersticiálně. I v rodě *Noccaea* byla 5S rDNA pozorována převážně v intersticiálních oblastech. Zjištěný počet lokusů rDNA u *Noccaea* druhů je variabilní a nebyla nalezena korelace mezi počtem rDNA a fylogenetickým postavením druhů. Druhy patřící do bývalého *Thlaspiceras* kladu (*Noccaea meyeri*, *N. huber-morathii*, *N. elegans*, *N. eigii*, *N. triangularis*, *N. rechingeri*, *N. oxyceras*) sdílejí stejný pattern. Navíc patří jako jediná skupina mezi dvouletky. Vývojově nejstarší je *N. perfoliata*, která má jeden 45S rDNA

lokus a jeden 5S rDNA umístěné na rozdílných chromozomech. Stejnou strukturu rDNA má i *N. annua*, která ale leží ve vrcholové části ITS stromu, patří tedy mezi vývojově nejmladší. Vzhledem k tomu, že heterozygotnost rDNA lokusů v čeledi brukvovitých a dalších krytosemenných rostlin je běžná, nelze jednoznačně použít tyto lokusy jako indikátor auto – nebo allopolyploidního původu.

Intersticiální telomerické repetice (ITR) jsou známy u řady živočišných i rostlinných druhů. Většina ITRs je organizována jako krátká tandemová řada a jsou pravděpodobně evolučním pozůstatkem odvozeným od chromozomálních přestaveb a oprav DNA. FISH s telomerickou sondou neodhalila žádné ITRs u studovaných druhů rodu *Noccaea*.

5.2 Evoluce karyotypu v rodu *Noccaea*

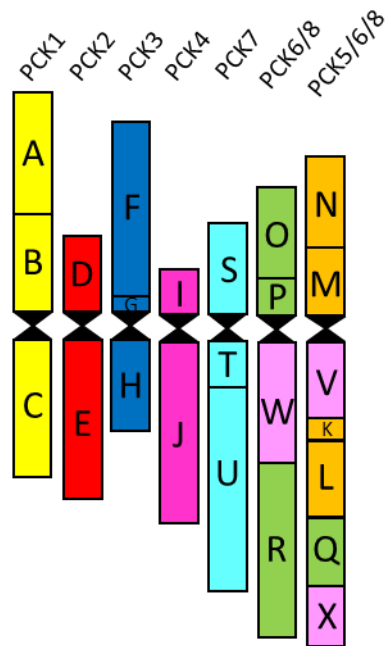
Srovnávací cytogenetické mapy pěti *Noccaea* druhů byly rekonstruovány pomocí CCP. Tyto karyotypy společně se třemi karyotypy známými z literatury (Mandáková et al. 2015) byly porovnány mezi sebou a korelovány s fylogenetickým postavením daných druhů (Obr. 31). Karyotypy byly porovnány s PCK a na základě tohoto porovnání byly rekonstruovány přestavby zodpovědné za současnou podobu těchto karyotypů. Chromozomové přestavby se ukázaly jako unikátní v porovnání s pěti dalšími triby z rozšířené linie II, do které patří i triba *Coluteocarpeae* (Mandáková and Lysak 2008). Zjistila jsem, že pozměněná struktura u pěti ze sedmi ancestrálních chromozomů je sdílena u sedmi druhů (*N. aucheri*, *N. bulbosa*, *N. caerulescens*, *N. fendleri* subsp. *glauca*, *N. jankae*, *N. meyeri* a *N. perfoliata*). U chromozomu AK6/8 byla ancestrální struktura zachována u *N. bulbosa*, *N. jankae* a jednoho homologu *N. perfoliata*, zatímco u ostatních pěti druhů a druhého homologu *N. perfoliata* byla pozměněna inverzemi. Tyto výsledky naznačují, že inverzní přestavby na homologních chromozomech PCK1, PCK3 – PCK5 a PCK7 se objevili už u společného předka rodu *Noccaea* a inverzní přestavby na chromozomu PCK6/8 jsou druhově specifické. Je pozoruhodné, že inverzní přeskupení na pěti chromozomech zůstalo nezměněno během speciálního procesu celého tribu *Coluteocarpeae*, podobně jako u tribu *Cardamineae* (Mandáková et al. 2014, 2016; Mandáková and Lysak 2019).



Obr. 31: Rekonstrukce evoluce karyotypů vybraných druhů rodu *Noccaea* z ancestrálního karyotypu celého tribu. Postavení jednotlivých druhů je založeno na fylogenetickém ITS stromě tribu *Coluteocarpeae* (Özdoğan et al., nepubl., Obr. 8). GBs jsou označeny písmeny A -X a barevné značení odpovídá poloze na chromozomech ACK. Karyotypy *N. caerulea*, *N. jankae* a *N. bulbosa* jsou převzaty z Mandáková et al. 2015.

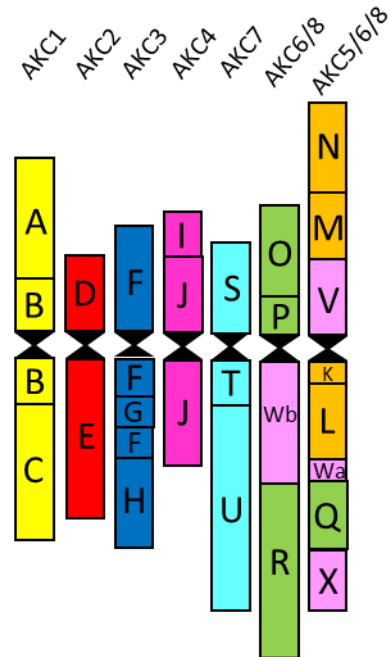
Na základě porovnání chromozomové struktury mnou studovaných druhů rodu *Noccaea* a tří dříve publikovaných druhů (Mandáková et al. 2015) byl rekonstruován ancestrální karyotyp tribu *Coluteocarpeae*. Tento ancestrální karyotyp vznikl z proto-Calepineae karyotypu (Obr. 32) a všechny chromozomy, kromě chromozomu AK2, prodělaly para- a pericentrické inverze. Chromozomy AKC1, AKC3, AKC4, AKC6/8, AKC5/6/8 a AKC7 prodělaly celkem 10 inverzí (7 pericentrických a 3 paracentrické).

Proto-Calepineae Karyotyp
(PCK, n=7)



10 inverzí

Ancestrální karyotyp
tribu *Coluteocarpeae* (n=7)



Obr. 32: Rekonstrukce vzniku ancestrálního karyotypu tribu *Coluteocarpeae* (AKC1 – AKC7) z PCK (PCK1 – PCK7). Genomické bloky jsou označeny písmeny A -X a barevné značení odpovídá poloze na chromozomech ACK.

V rostlinách i zvířatech (které jsou obvykle reprezentovány druhem *Drosophila* spp.) byly pozorovány paracentrické inverze častěji než pericentrické (Coyne et al. 1991, 1993; Kirkpatrick 2010; Auger and Sheridan 2012). Jedním z důvodů menšího výskytu pericentrických inverzí je jejich těžká detekovatelnost pomocí genetického mapování nebo konvenčních chromozomových analýz (Anderson et al. 2010). Navzdory tomu, že jsou pericentrické inverze méně často detekovány, nemusí to znamenat, že jsou méně dominantní, jako je ukázáno na druhu *Drosophila* spp. (Coyne et al. 1991, 1993). Kromě toho mohou být méně časté chromozomové přestavby snadněji fixovány v krátkověkých rostlinách (jednoletky nebo dvouletky) a částečně i v autogamních druzích (Charlesworth 1992; Coyne and Orr 2004). Zde publikovaná rekonstrukce vývoje genomu tribu *Coluteocarpeae* ukázala, že převládajícími přestavbami v tomto tribu jsou pericentrické inverze. Žádné důkazy o duplikacích, delecích nebo translokacích genomických bloků nebyly pozorovány.

V porovnání s trvalkami mají jednoletky rychlejší životní cyklus, kde rychle postupují z fáze vegetativního vývoje do kvetení, aby dokončily svůj životní cyklus během jednoho vegetačního období. Vegetativní fáze u jednoletek je velmi krátká, což vede mimo jiné k obtížnému vysledování, kdy rostliny získávají potenciál ke kvetení. Rychlý životní cyklus může také vést k hromadění více chromozomových přestaveb. Dva z osmi druhů se známou cytogenetickou mapou se řadí mezi jednoleté druhy. Pouze u druhu *N. hastulata* (dříve *Noccidium hastulatum*) byl nalezen vysoký počet přestaveb.

Jelikož inverze ztěžují párování chromozomů a potlačují rekombinanci v heterokaryotypech (karyotyp heterozygotního organismu), jsou důležité v omezování genetického toku a při divergenci a speciaci (Noor et al. 2001; Lowry and Willis 2010; Nosil and Feder 2013). Pericentrické inverze mohly tedy přispět k reprodukční izolaci a genetické divergenci předka tribu *Coluteocarpeae* z PCK předka a hrály možnou roli v adaptaci na životní prostředí.

Dřívější analýzy (Al-Shehbaz et al. 2006) řadily druh *N. hastulata* (dříve *Noccidium hastulatum*) do tribu *Camelineae*. Warwick et al. v roce 2010 molekulárně taktéž potvrdili zařazení *N. hastulata* do tribu *Camelineae*. Nejnovější fylogenetické analýzy založené na ITS markerech prokázaly zařazení druhu *N. hastulata* do rodu *Noccea*, tribu *Coluteocarpeae* (Özüdoğru et al., nepubl.). Cytogenetické analýzy odhalily několikanásobný počet inverzí a odlišnou strukturu karyotypu *N. hastulata* než u ostatních sedmi druhů rodu *Noccea*. Inverze na chromozomech NH1, NH2, NH6/8, NH7 jsou druhově specifické a nevyskytují se u žádného dalšího druhu z tribu *Coluteocarpeae* se známou cytogenetickou strukturou. Karyotyp *N. hastulata*, i přes pozoruhodně vysoký počet inverzí, pravděpodobně vznikl z ancestrálního karyotypu tribu *Coluteocarpeae*. Chromozomy NH3, NH4 a NH5/6/8 sdílejí stejnou strukturu genomických bloků jako ancestrální karyotyp celého tribu.

N. caerulescens má karyotyp se specifickými inverzemi na chromozomu NC6/8, který na svém spodním raménku obsahuje funkčně příbuzné geny akumulace zinku a železa (Mandáková et al. 2015). Současně byly na horním raménku NC6 seskupeny geny pro akumulaci mědi a organelárních kovů, které ale funkčně nesouvisejí s extrémními vlastnostmi charakteristickými pro *N. caerulescens*. Ve srovnání s *A. thaliana* vzdálenější

chromozomální pozice v *N. caerulescens* byly obohaceny o exprimovanější geny akumulace kovů, ale ne mezi jinými skupinami genů. Přeuspořádání chromozomů tak mohlo usnadnit vývoj zvýšené exprese genů a vyústit v hyperakumulaci kovů (Mandáková et al. 2015). Druh *N. meyeri* sdílí stejné inverze, a tedy i strukturu karyotypu chromozomu NM6/8 jako *N. caerulescens*. *N. meyeri* by potenciálně mohl mít geny pro akumulaci těžkých kovů seskupeny podobně.

Můžeme konstatovat, že oba subgenomy tetraploidního druhu *N. perfoliata* se u šesti ze sedmi chromozomů neliší strukturními chromozomovými přestavbami. V případě chromozomu NP6/8 jeden homolog má ancestrální strukturu a druhý se liší jednou pericentrickou inverzí, stejně jako je tomu u chromozomu 4 *Cardamine flexuosa* (tribus *Cardamineae*) (Mandáková et al. 2014). Z toho lze usuzovat, že tetraploidní genom vznikl A) autopolyploidii nebo B) hybridizací mezi dvěma taxony s vysoce podobnou strukturou genomu. Přestavba pouze u jednoho homologu chromozomu NP6/8 může značit počátek post-polyploidní diploidizace, kdy dochází k evolučnímu tlaku na rozrůznění subgenomu k zabránění tvorby multivalentů v meióze. Samotná diverzifikace není iniciována zdvojením genomu jako takovým. Rozlišení primárních polyploidních populací pomocí řady procesů vede spíše k post-polyploidní diploidizaci genomu (Mandáková and Lysak 2018). Strukturní diploidizace postupně vrací polyploidní genom do jednoho funkčně diploidního typu přes chromozomové přestavby, které často vedou k redukci chromozomového počtu (tzv. descending dysploidy, DD). DDs mohou vést k reprodukční izolaci mezi post-polyploidními potomky a významně přispět ke speciačním událostem. DD je jeden z nejvýznamnějších způsobů diploidizace. Dostupná srovnávací genomová data naznačují, že post-polyploidní DD jsou mnohem častější než opačný proces zvyšování chromozomového počtu (ascending dysploidy). Chromozomální diploidizace mohou být doprovázeny různými nedysploidními chromozomovými přestavbami, jako jsou inverze, reciproční translokace, delece a duplikace (Mandáková and Lysak 2018).

6 ZÁVĚR

Tato diplomová práce rozšiřuje znalosti o chromozomální evoluci v čeledi *Brassicaceae* s využitím cytogenetických metod založených především na metodě srovnávacího malování chromozomů (CCP). Zkoumanou skupinou byl jeden z tribů patřící do čeledi brukvovitých, tribus *Coluteocarpeae*. Nejprve byly u 26 druhů spočítány chromozomové počty a zjištěny sekvence 45S a 5S na mitotických chromozomech, ale výsledky neukázaly žádný evoluční pattern v rodě *Noccaea*. K odhalení struktury a objasnění evoluce karyotypu byla použita metoda CCP u pěti druhů rodu *Noccaea*: *N. fendleri* subsp. *glauca* ($2n = 14$), *N. meyeri* ($2n = 14$), *N. aucheri* ($2n = 14$), *N. hastulata* ($2n = 14$) a *N. perfoliata* ($2n = 28$). Získané cytogenomické mapy ukázaly sdílenou genomickou strukturu šesti chromozomů u většiny druhů. Na chromozomu 6/8 leží druhově specifické přestavby. Z výsledků byl odvozen karyotyp společného předka celého tribu *Coluteocarpeae* (AKC). Tento ancestrální karyotyp tribu *Coluteocarpeae* obsahoval sedm chromozomových párů a vznikl z ancestrálního proto-Calepineae karyotypu (PCK, $n = 7$) prostřednictvím neobvykle vysokého počtu pericentrických inverzí.

7 LITERATURA

- Al-Shehbaz, Beilstein, M. A., & Kellogg, E. A. (2006). Systematics and phylogeny of the Brassicaceae (Cruciferae): an overview. *Plant Systematics and Evolution*, 259, 89–120.
- Al-Shehbaz, I. A. (2014). A synopsis of the genus *Noccaea* (Coluteocarpeae, Brassicaceae). *Harvard Papers in Botany*, 19(1), 25–51.
- Al-shehbaz, I. A., Kane, S. L. O., Iowa, N., & Falls, C. (1999). Generic Placement of Species Excluded from *Arabidopsis* (Brassicaceae) *Missouri Botanical Garden Press*, 9(3), 296–307.
- Al-Shehbaz, I. A. (2012). A generic and tribal synopsis of the Brassicaceae (Cruciferae). *Taxon*, 61, 931–954.
- Ali, T., Schmuker, A., Runge, F., Solovyeva, I., Nigrelli, L., Paule, J., ... Thines, M. (2016). Morphology, phylogeny, and taxonomy of *Microthlaspi* (Brassicaceae: Coluteocarpeae) and related genera. *Taxon*, 65(1), 79–98.
- Almeida, C., & Pedrosa-Harand, A. (2013). High macro-collinearity between lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) and the common bean (*P. vulgaris* L.) as revealed by comparative cytogenetic mapping. *Theoretical and Applied Genetics*, 126(7), 1909–1916.
- Anderson LK, Covey PA, Larsen LR, Bedinger P, Stack SM (2010) Structural differences in chromosomes distinguish species in the tomato clade. *Cytogenet Genome Res* 129: 24–34
- Appel, O., Al-Shehbaz, I.A., 2003. Cruciferae, in: Flowering Plants · Dicotyledons, The Families and Genera of Vascular Plants. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 75–174.
- The Arabidopsis Genome Initiative (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, 408(6814), 796–815.
- Beilstein, M. A., Al-Shehbaz, I. A., & Kellogg, E. A. (2006). Brassicaceae phylogeny and trichome evolution. *American Journal of Botany*, 93(4), 607–619.
- Beilstein, M. A., Al-Shehbaz, I. A., Mathews, S., & Kellogg, E. A. (2008). Brassicaceae phylogeny inferred from phytochrome A and *ndhF* sequence data: Tribes and trichomes revisited. *American Journal of Botany*, 95(10), 1307–1327.
- Beilstein, M. A., Manchester, S. R., Mathews, S., Clements, M. D., & Nagalingum, N. S. (2010). Dated molecular phylogenies indicate a Miocene origin for *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(43), 18724–18728.
- Betekhtin, A., Jenkins, G., & Hasterok, R. (2014). Reconstructing the evolution of *Brachypodium* genomes using comparative chromosome painting. *PLoS ONE*, 9(12), 1–26.
- Bleeker, W., Franzke, A., Pollmann, K., Brown, A. H. D., & Hurka, H. (2002). Phylogeny and biogeography of Southern Hemisphere high-mountain *Cardamine* species (Brassicaceae). *Australian Systematic Botany*, 15(4), 575–581.
- Boivin, K. (2004). The Arabidopsis Genome Sequence as a Tool for Genome Analysis in Brassicaceae. A Comparison of the Arabidopsis and *Capsella rubella* Genomes. *PLANT PHYSIOLOGY*, 135(2), 735–744.

- Charlesworth B (1992) Evolutionary rates in partially self-fertilizing species. *Am Nat* 140: 126–148
- Couvreur, T. L. P., Al-Shehbaz, I. A., Bakker, F. T., Mummenhoff, K., Koch, M. A., & Franzke, A. (2010). Molecular Phylogenetics, Temporal Diversification, and Principles of Evolution in the Mustard Family (Brassicaceae). *Molecular Biology and Evolution*, 27(1), 55–71.
- Coyne JA, Aulard S, Berry A (1991) Lack of underdominance in a naturally occurring pericentric inversion in *Drosophila melanogaster* and its implications for chromosome evolution. *Genetics* 129: 791–802
- Coyne JA, Meyers W, Crittenden AP, Sniegowski P (1993) The fertility effects of pericentric inversions in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 134:487–496
- Coyne JA, Orr HA (2004) *Speciation*. Sinauer, Sunderland, MA
- Cremer, T., Popp, S., Emmerich, P., Lichter, P., & Cremer, C. (1990). Rapid metaphase and interphase detection of radiation-induced chromosome aberrations in human lymphocytes by chromosomal suppression in situ hybridization. *Cytometry*, 11(1), 110–118.
- Koo, D.-H, de Jong, H., Hur, Y., Choi, D., Nam, Y.-W., & Bang, J.-W. (2010). Molecular cytogenetic mapping of *Cucumis sativus* and *C. melo* using highly repetitive DNA sequences. *Chromosome Research*, 18(3), 325–336.
- Dong, F., Song, J., Naess, S. K., Helgeson, J. P., Gebhardt, C., & Jiang, J. (2000). Development and applications of a set of chromosome-specific cytogenetic DNA markers in potato. *Theoretical and Applied Genetics*, 101(7), 1001–1007.
- Ermolaeva, M. D., Wu, M., Eisen, J. A., & Salzberg, S. L. (2003). The age of the *Arabidopsis thaliana* genome duplication. *Plant Molecular Biology*, 51(6), 859–866.
- Esmailbegi, S., Al-Shehbaz, I. A., Pouch, M., Mandáková, T., Mummenhoff, K., Rahiminejad, M. R., ... Lysak, M. A. (2018). Phylogeny and systematics of the tribe thlaspidiae (Brassicaceae) and the recognition of two new genera. *Taxon*, 67(2), 324–340.
- Fawcett, J. A., Maere, S., & 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*, 106(14), 5737–5742.
- Ferguson-Smith, M.A. (1997) Genetic analysis by chromosome sorting and painting: phylogenetic and diagnostic applications. *European Journal of Human Genetics* 5, 253–265.
- Fonsêca, A., & Pedrosa-Harand, A. (2013). Karyotype stability in the genus *Phaseolus* evidenced by the comparative mapping of the wild species *Phaseolus microcarpus*. *Genome*, 56(6), 335–343.
- Franzke, A., German, D., Al-Shehbaz, I. A., Mummenhoff, K., Taxon, S., & May, N. (2009). *Arabidopsis* Family Ties : Molecular Phylogeny and Age Estimates in Brassicaceae, 58(2), 425–437.
- Franzke, A., Lysak, M. A., Al-Shehbaz, I. A., Koch, M. A., & Mummenhoff, K. (2011). Cabbage family affairs: The evolutionary history of Brassicaceae. *Trends in Plant Science*, 16(2), 108–116.

- Fuchs, J., Kloos, D.-U., Ganal, M.W. and Schubert, I. (1996) In situ localization of yeast artificial chromosome sequences on tomato and potato metaphase chromosomes. *Chromosome Res.* 4, 277±281.
- Fuchs, J., Kuhfittig, S., Reuter, G., & Schubert, I. (1998). Chromosome painting in *Drosophila*. *Chromosome Research*, 6(4), 335–336.
- Guo, X., Liu, J., Hao, G., Zhang, L., Mao, K., Wang, X., ... Koch, M. A. (2017). Plastome phylogeny and early diversification of Brassicaceae. *BMC Genomics*, 18(1), 1–9.
- Hanikenne M, Nouet C (2011) Metal hyperaccumulation and hypertolerance: a model for plant evolutionary genomics. *Curr Opin Plant Biol* 14: 252–259
- Hanson, R.E., Zwick, M.S., Choi, S., Islam-Faridi, M.N., McKnight, T.D., Wing, R.A., Price, H.J. and Stelly, D.M. (1995) Fluorescent in situ hybridization of a bacterial artificial chromosome. *Genome*, 38, 646±651.
- Henry, Y., Bedhomme, M., & Blanc, G. (2006). History, protohistory and prehistory of the *Arabidopsis thaliana* chromosome complement. *Trends in Plant Science*, 11(6), 267–273.
- Huang, C.-H., Sun, R., Hu, Y., Zeng, L., Zhang, N., Cai, L., Zhang, Q., Koch, M.A., Al-Shehbaz, I., Edger, P.P., Pires, J.C., Tan, D.-Y., Zhong, Y., Ma, H. (2016). Resolution of Brassicaceae Phylogeny Using Nuclear Genes Uncovers Nested Radiations and Supports Convergent Morphological Evolution. *Mol. Biol. Evol.* 33, 394–412.
- Jiang, J., Gill, B. S., Wang, G.-L., Ronald, P. C., & Ward, D. C. (1995). Metaphase and Interphase Fluorescence in situ Hybridization Mapping of the Rice Genome with Bacterial Artificial Chromosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(10), 4487–4491. Retrieved from
- O'Kane, S. L., & I.A, A.-S. (2003). Phylogenetic Position and Generic Limits of *Arabidopsis* (Brassicaceae) Based on Sequences of Nuclear Ribosomal DNA. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 90(4), 603–612.
- Kirkpatrick M (2010) How and why chromosome inversions evolve. *PLoS Biol* 8: e1000501
- Koch, M. A., & Kiefer, M. (2005). Genome evolution among cruciferous plants: A lecture from the comparison of the genetic maps of three diploid species - *Capsella rubella*, *Arabidopsis lyrata* subsp. *petraea*, and *A. thaliana*. *American Journal of Botany*, 92(4), 761–767.
- Koch, M., and Al-shehbaz, I. A. (2004). Taxonomic and Phylogenetic Evaluation of the American "*Thlaspi*" Species : Identity and Relationship to the Eurasian Genus *Noccaea* (Brassicaceae). *Systematic Botany*, 29(2), 375–384.
- Koch, M., and Al-shehbaz, I. A. (2000). Molecular Systematics of the Chinese *Yinshania* (Brassicaceae): Evidence from Plastid and Nuclear Its DNA Sequence Data. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 87(2), 246–272.
- Koch, M., and Al-Shehbaz, I. A. (2002). Molecular Data Indicate Complex Intra- and Intercontinental Differentiation of American *Draba* (Brassicaceae). *Ann. Missouri Bot. Gard.*, 89(1), 88–109.
- Koch, M., Al-shehbaz, I. A., and Mummenhoff, K. (2003). Molecular Systematics , Evolution , and Population Biology in the Mustard Family. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 90(2), 151–171.

- Koch, M., and Bernhardt, K. G. (2004). Comparative biogeography of the cytotypes of annual *Microthlaspi perfoliatum* (Brassicaceae) in Europe using isozymes and cpDNA data: Refugia, diversity centers, and postglacial colonization. *American Journal of Botany*, 91(1), 115–124.
- Koch, M., and Mummenhoff, K. (2001). *Thlaspi* s.str. (Brassicaceae) versus *Thlaspi* s.l.: Morphological and anatomical characters in the light of ITS nrDNA sequence data. *Plant Systematics and Evolution*, 227(3–4), 209–225.
- Koch, M., Mummenhoff, K., & Hurka, H. (1998). Molecular biogeography and evolution of the *Microthlaspi perfoliatum* s.l. polyploid complex (Brassicaceae): chloroplast DNA and nuclear ribosomal DNA restriction site variation. *Canadian Journal of Botany*, 76(3), 382–396.
- Koch M. (2003) Molecular phylogenetics, evolution and population biology in Brassicaceae. In: Sharma A.K., Sharma A. (eds.) Plant genome: biodiversity and evolution, vol. 1 (phanerogams). Science Publishers, pp. 1–35.
- Koch, M. 1995. Biogeographie und Artbildung in Polyploidkomplexen. Molekularsystematische Untersuchungen an *Microthlaspi* F. K. Mey. Und *Cochlearia* L. (Brassicaceae). Doctorate dissertation, Osnabrück University, 155 pages.
- Krämer U (2010) Metal hyperaccumulation in plants. *Annu Rev Plant Biol* 61: 517–534
- Kuittinen, H., De Haan, A. A., Vogl, C., Oikarinen, S., Leppälä, J., Koch, M., ... Savolainen, O. (2004). Comparing the linkage maps of the close relatives *Arabidopsis lyrata* and *A. thaliana*. *Genetics*, 168(3), 1575–1584.
- Lysak, M. A., Cheung, K., Kitschke, M., & Bures, P. (2007). Ancestral Chromosomal Blocks Are Triplicated in Brassicaceae Species with Varying Chromosome Number and Genome Size. *Plant Physiology*, 145(2), 402–410.
- Lysak, M. A., Fransz, P. F., Ali, H. B. M., & Schubert, I. (2001). *Arabidopsis* FISH.pdf. *The Plant Journal*, 28, 689–697.
- Lysak, M. A., Koch, M. A., Pecinka, A., & Schubert, I. (2005). Chromosome triplication found across the tribe Brassicaceae. *Genome Research*, 15(4), 516–525.
- Lysak, M. A., Mandáková, T., & Schranz, M. E. (2016). Comparative paleogenomics of crucifers: Ancestral genomic blocks revisited. *Current Opinion in Plant Biology*, 30, 108–115.
- Lysak, M. A., Mandáková, T., & Lacombe, E. (2010). Reciprocal and multi-species chromosome painting in crucifers (Brassicaceae). *Cytogenetic and Genome Research*, 129(1–3), 184–189.
- Lysak, M. A., Berr A. Pecinka A., Schmidt R., McBreen K., and Schubert, I. (2006). Mechanisms of chromosome number reduction in *Arabidopsis thaliana* and related Brassicaceae species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(13), 5224–5229.
- Lowry DB, Willis JH (2010) A widespread chromosomal inversion polymorphism contributes to a major life-history transition, local adaptation, and reproductive isolation. *PLoS Biol* 8: e1000500

- Mandáková, T., Kovarik, A., Zozomová-Lihová, J., Shimizu-Inatsugi, R., Shimizu, K. K., Mummenhoff, K., ... Lysak, M. A. (2013). The more the merrier: recent hybridization and polyploidy in cardamine. *The Plant Cell*, 25(9), 3280–95.
- Mandáková, T., Joly, S., Krzywinski, M., Lysak, M. A., and Mummenhoff, K. (2010). Fast Diploidization in Close Mesopolyploid Relatives of Arabidopsis. *The Plant Cell Online*, 22(7), 2277–2290.
- Mandáková, T., and Lysak, M. A. (2016a). Chromosome Preparation for Cytogenetic Analyses in Arabidopsis. *Current Protocols in Plant Biology*, 1(May), 43–51.
- Mandáková, T. (2014). Malování rostlinných chromozomů. Živa.
- Mandáková, T., and Lysak, M. A. (2016b). Painting of Arabidopsis Chromosomes with Chromosome-Specific BAC Clones. *Curr Protoc Plant Biol*, 1, 359–371.
- Mandáková, T., and Lysak, M. A. (2018). Post-polyploid diploidization and diversification through dysploid changes. *Current Opinion in Plant Biology*.
- Mandáková, T., and Lysak, M. a. (2008). Chromosomal phylogeny and karyotype evolution in x=7 crucifer species (Brassicaceae). *The Plant Cell*, 20(10), 2559–2570.
- Mandáková, T., Marhold, K., and Lysak, M. A. (2014). The widespread crucifer species *Cardamine flexuosa* is an allotetraploid with a conserved subgenomic structure. *New Phytologist*, 201(3), 982–992.
- Mandáková, T., Mummenhoff, K., Al-Shehbaz, I. A., Mucina, L., Mühlhausen, A., and Lysak, M. A. (2012). Whole-genome triplication and species radiation in the southern African tribe Heliophleae (Brassicaceae). *Taxon*, 61(5), 989–1000.
- Mandáková, T., Schranz, M. E., Sharbel, T. F., De Jong, H., and Lysak, M. A. (2015). Karyotype evolution in apomictic *Boechera* and the origin of the aberrant chromosomes. *Plant Journal*, 82(5), 785–793.
- Mandáková, T., Singh, V., Krämer, U., & Lysak, M. A. (2015). Genome Structure of the Heavy Metal Hyperaccumulator *Noccaea caerulea* and Its Stability on Metalliferous and Nonmetalliferous Soils. *Plant Physiology*, 169(1), 674–689.
- Mandáková, T., Heenan, P. B., & Lysak, M. A. (2010). Island species radiation and karyotypic stasis in *Pachycladon* allopolyploids. *BMC Evolutionary Biology*, 10(1), 1–14.
- Marshall, R., & Obe, G. (1998). Application of chromosome painting to clastogenicity testing in vitro. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 32(3), 212–222.
- Meyer, F. K. (1973). Conspectus der 'Thlaspi'-Arten Europas, Afrikas und Vorderasiens. *Fedder Repertorium*, 449–470.
- Mummenhoff, K., Franzke, A. & Koch, M.A. (1997a). Molecular phylogenetics of *Thlaspi* s.l. (Brassicaceae) based on chloroplast DNA restriction site variation and sequences of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA. *Canad. J. Bot.* 75: 469-482.
- Mummenhoff, K., Franzke, A., & Koch, M. (1997b). Molecular data reveal convergence in fruit characters used in the classification of *Thlaspi* s. l. (Brassicaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 125(3), 183–199.

- Moench, C. (1802) Supplementum ad Methodum plantas a staminum situ describendi. Officina Nova Libraria Academiae, Marburgi Cattorum, 328 pp.
- Meyer, F.K. 2001a. Kritische Revision der "Thlaspi"-Arten Europas, Afrikas und Vorderasiens, Spezieller Teil, II. Thlaspi L. Haussknechtia 8: 3--42.
- Meyer, F.K. 2001b. Kritische Revision der "Thlaspi"-Arten Europas, Afrikas und Vorderasiens, Spezieller Teil, I. Neurotropis (DC.) F.K. Mey. Haussknechtia 8: 43--58.
- Meyer, F.K. 2003a. Kritische Revision der "Thlaspi"-Arten Europas, Afrikas und Vorderasiens, Spezieller Teil, III. Microthlaspi F.K.Mey. Haussknechtia 9: 3--59.
- Meyer, F.K. 2003b. Kritische Revision der "Thlaspi"-Arten Europas, Afrikas und Vorderasiens, Spezieller Teil, IV. Thlaspiceras F.K.Mey. Haussknechtia 9: 61--113.
- Meyer, F.K. 2003c. Kritische Revision der "Thlaspi"-Arten Europas, Afrikas und Vorderasiens, Spezieller Teil, V. Noccidium F.K.Mey. Haussknechtia 9: 115--124.
- Meyer, F.K. 2003d. Kritische Revision der "Thlaspi"-Arten Europas, Afrikas und Vorderasiens, Spezieller Teil, VI. Kotschyella F.K.Mey. Haussknechtia 9: 125--134.
- Meyer, F.K. 2006a. Kritische Revision der "Thlaspi"-Arten Europas, Afrikas und Vorderasiens, Spezieller Teil, VII. Callothlaspi F.K.Mey. Haussknechtia 11:175--194.
- Meyer, F.K. 2006b. Kritische Revision der "Thlaspi"-Arten Europas, Afrikas und Vorderasiens, Spezieller Teil, VIII. Raparia F.K.Mey. Haussknechtia 11: 195--206.
- Meyer, F.K. 2006c. Kritische Revision der "Thlaspi"-Arten Europas, Afrikas und Vorderasiens, Spezieller Teil, IX. Atropatenia F.K.Mey. Haussknechtia 11: 207--216.
- Meyer, F.K. 2006d. Kritische Revision der "Thlaspi"-Arten Europas, Afrikas und Vorderasiens, Spezieller Teil, X. Vania F.K. Mey. Haussknechtia 11: 217--228.
- Meyer, F.K. 2006e. Kritische Revision der "Thlaspi"-Arten Europas, Afrikas und Vorderasiens. Spezieller Teil. IX. Noccaea Moench. Haussknechtia 12: 1--343.
- Meyer, F.K. 2010. Anmerkungen zu einigen Noccaea-Arten Nordasiens. Haussknechtia 12: 5--18.
- Nelson, M. N., Parkin, I. A. P., & Lydiate, D. J. (2011). The mosaic of ancestral karyotype blocks in the *Sinapis alba* L. genome. *Genome*, 54(1), 33--41.
- Nie, W., O'Brien, P. C. M., Ng, B. L., Fu, B., Volobouev, V., Carter, N. P., ... Yang, F. (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*, 17(1), 99--113.
- Noor MAF, Grams KL, Bertucci LA, Reiland J (2001) Chromosomal inversions and the reproductive isolation of species. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 12084--12088
- Nosil P, Feder JL (2013) Genome evolution and speciation: toward quantitative descriptions of pattern and process. *Evolution* 67: 2461--2467

- özüdođru Barıř, P. D. (2019). Phylogeny of the genus *Noccaea* Moench (Brassicaceae) and a critical review of its generic circumscription. Nepublikováno.
- Parkin, I. A. P., Gulden, S. M., Sharpe, A. G., Lukens, L., Trick, M., Osborn, T. C., & Lydiate, D. J. (2005). Segmental structure of the *Brassica napus* genome based on comparative analysis with *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*, *171*(2), 765–781.
- Pawełkiewicz, M., Zieliński, K., Zielińska, D., Plader, W., Yagi, K., Wojcieszek, M., ... Przybecki, Z. (2016). Next generation sequencing and omics in cucumber (*Cucumis sativus* L.) breeding directed research. *Plant Science*, *242*, 77–88.
- Pecinka, A., Schubert, I., Klatte, M., Schubert, V., Fuchs, J., Kreth, G., ... Lysak, M. A. (2004). Chromosome territory arrangement and homologous pairing in nuclei of *Arabidopsis thaliana* are predominantly random except for NOR-bearing chromosomes. *Chromosoma*, *113*(5), 258–269.
- Pinkel, D., Collins, C., Fuscoe, J., Gray, J., Segraves, R., Lucas, J., & Landegent, J. (1998). Fluorescence in situ hybridization with human chromosome-specific libraries: detection of trisomy 21 and translocations of chromosome 4. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *85*(23), 9138–9142.
- Pires, J. C., Zhao, J., Schranz, M. E., Leon, E. J., Quijada, A., ... Osborn, T. C. (2004). Flowering time divergence and genomic rearrangements in resynthesized *Brassica* polyploids (Brassicaceae). *Biological Journal of the Linnean Society*, *82*, 675–688.
- Pollard AJ, Reeves RD, Baker AJ (2014) Facultative hyperaccumulation of heavy metals and metalloids. *Plant Sci* 217-218: 8–17
- Prantl (1891): Cruciferae. In: Engler A., Prantl K. (eds.) Die natürlichen Pflanzenfamilien III. Verlag von Wilhelm Engelmann, Leipzig, pp. 145–206.
- Roa, F., Guerra, M., 2012. Distribution of 45S rDNA sites in chromosomes of plants: Structural and evolutionary implications. *Bmc Evol. Biol.* 12, 225.
- Rollins and Banerjee (1976): Trichomes in studies of the Cruciferae. In: Vaughan J. G., MacLeod A. J., Jones B. M. G. (eds.) The biology and chemistry of the Cruciferae. Academic Press, London New York San Francisco, pp. 145–166.
- Schranz, M. E., Lysak, M. A., & Mitchell-Olds, T. (2006). The ABC's of comparative genomics in the Brassicaceae: building blocks of crucifer genomes. *Trends in Plant Science*, *11*(11), 535–542.
- Schranz, M. E., Quijada, P., Sung, S. B., Lukens, L., Amasino, R., & Osborn, T. C. (2002). Characterization and effects of the replicated flowering time gene *FLC* in *Brassica rapa*. *Genetics*, *162*(3), 1457–1468.
- Schranz, M. E., Windsor, A. J., Song, B. -h., Lawton-Rauh, A., & Mitchell-Olds, T. (2007). Comparative Genetic Mapping in *Boechera stricta*, a Close Relative of *Arabidopsis*. *PLANT PHYSIOLOGY*, *144*(1), 286–298.
- Schubert I., Franz 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.

- Schwarzacher, T., A. R. Leitch, M. D. Bennett & J. S. Heslop-Harrison. 1989. In Situ Localization of Parental Genomes in a Wide Hybrid. *Annals of Botany*, roč. 64, s. 315- 324.
- Shetty, S., Griffin, D. K., & Graves, J. A. M. (1999). Comparative painting reveals strong chromosome homology over 80 million years of bird evolution. *Chromosome Research*, 7(4), 289–295.
- Shibata, F., Hizume, M., & Kuroki, Y. (1999). Chromosome painting of Y chromosomes and isolation of a Y chromosome-specific repetitive sequence in the dioecious plant *Rumex acetosa*. *Chromosoma*, 108(4), 266–270.
- Tang, X., Szinay, D., Lang, C., Ramanna, M. S., Van Der Vossen, E. A. G., Datema, E., ... Bai, Y. (2008). Cross-species bacterial artificial chromosome-fluorescence in situ hybridization painting of the tomato and potato chromosome 6 reveals undescribed chromosomal rearrangements. *Genetics*, 180(3), 1319–1328.
- Wang, X., Wang, H., Wang, J., Sun, R., Wu, J., Liu, S., ... Zhang, Z. (2011). The genome of the mesopolyploid crop species *Brassica rapa*. *Nature Genetics*, 43(10), 1035–1040.
- Warwick, S. I., & Al-Shehbaz, I. A. (2006). Brassicaceae: Chromosome number index and database on CD-Rom. In *Plant Systematics and Evolution* (Vol. 259, pp. 237–248).
- Warwick, S. I., Mummenhoff, K., Sauder, C. A., Koch, M. A., & Al-Shehbaz, I. A. (2010). Closing the gaps: Phylogenetic relationships in the Brassicaceae based on DNA sequence data of nuclear ribosomal ITS region. *Plant Systematics and Evolution*, 285(3), 1–24.
- Warwick, S. I., & Sauder, C. A. (2005). Phylogeny of tribe Brassiceae (Brassicaceae) based on chloroplast restriction site polymorphisms and nuclear ribosomal internal transcribed spacer and chloroplast trn L intron sequences. *Canadian Journal of Botany*, 83(5), 467–483.
- Wolny, E., Fidyk, W., & Hasterok, R. (2013). Karyotyping of *Brachypodium pinnatum* (2n = 18) chromosomes using cross-species BAC–FISH. *Genome*, 56(4), 239–243.
- Yang, L., Koo, D. H., Li, D., Zhang, T., Jiang, J., Luan, F., ... Weng, Y. (2014). Next-generation sequencing, FISH mapping and synteny-based modeling reveal mechanisms of decreasing dysploidy in Cucumis. *Plant Journal*, 77(1), 16–30.
- Yavuz-Işik, N., & Demirci, C. (2009). Miocene spores and pollen from Pelitçik Basin, Turkey—environmental and climatic implications. *Comptes Rendus - Palevol*, 8(5), 437–446.
- Zimmer, R., King, W.A. and Verrinder Gibbins, A.M. (1997) Generation of chicken Z-chromosome painting probes by microdissection for screening large-insert genomic libraries. *Cytogenet. Cell Genet.* 78, 124-130.
- Zunk K, Mummenhoff K, Koch M, H. H. (1996). Phylogenetic relationships of *Thlaspi* s. l. (subtribe Thlaspidinae, Lepidieae). *Theor Appl Genet*, (92), 375–381.
- URL1: <https://brassibase.cos.uni-heidelberg.de>