

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Katedra botaniky



Evoluce velikosti genomu v čeledi Zingiberaceae

Evolution of genome size in family Zingiberaceae

Bakalářská práce

Monika Pospíšilová

školitel: Mgr. Tomáš Fér, Ph.D.

Praha 2010

▪ Abstrakt	2
▪ Abstract	2
▪ Klíčová slova.....	2
▪ Key words	2
▪ Poděkování	3
▪ Úvod.....	4
▪ Literární rešerše.....	6
○ Kapitola 1.: TERMINOLOGIE	6
1.1. Velikost genomu	6
1.2. Počet chromozómů.....	7
1.3. C-hodnota	7
1.4. Rozpětí C-hodnot.....	8
1.5. Databáze „ <i>Plant DNA C-value database</i> “	8
1.6. Paradox C-hodnoty	9
1.6.1. Teorie vysvětlující paradox C-hodnoty	10
1.7. Polyploidie	10
○ Kapitola 2.: EVOLUCE VELIKOSTI GENOMU	11
2.1. Velikosti genomu v závislosti s jinými faktory	11
2.2. Úvod do studia evoluce velikosti genomu.....	11
2.3. Vývoj modelu evoluce velikosti genomu	13
2.4. Zvětšování genomu.....	17
2.4.1. Amplifikace retrotranspozónů.....	18
2.4.2. Polyploidizace.....	18
2.5. Zmenšování genomu	19
2.5.1. Ztráty DNA po polyploidní události	19
2.5.2. Nehomologická (ilegitimní) rekombinace	20
2.5.3. Nerovnoměrná homologická rekombinace.....	20
○ Kapitola 3.: VELIKOST GENOMU A FYLOGENEZE.....	21
3.1. Využití velikosti genomu v taxonomii.....	21
3.1.1. Interspecifická (= mezidruhová) variabilita	22
3.1.2. Intraspecifická (= vnitrodruhová) variabilita	22
3.2. Studium velikosti genomu v kontextu fylogenetického stromu	23
3.2.1. Brassicaceae	23
3.2.2. Liliaceae	24
3.2.3. <i>Nicotiana</i>	25
3.2.4. <i>Curcuma</i>	26
3.2.5. Srovnání.....	26
○ Kapitola 4.: ZINGIBERACEAE	30
4.1. Globbeae.....	31
▪ Závěr	34
▪ Literatura	35
▪ Přílohy.....	39

ABSTRAKT

Cílem této práce je zhodnotit dosavadní poznatky o evoluci velikosti genomu a podrobněji se věnovat jeho studiu ve fylogenetickém kontextu. U krytosemenných rostlin nacházíme široké rozpětí C-hodnot ($1C = 0,63 \text{ pg} - 1C = 127,4 \text{ pg}$), ovšem s modální hodnotou rovnou $0,6 \text{ pg}$. O mechanismech a charakteru evoluce velikosti rostlinného genomu stále nevíme mnoho, ale každým rokem se cíli úspěšně přibližujeme. Existují již desítky prací zabývajících se dynamikou velikosti genomu menší taxonomické skupiny a na čtyřech z nich demonstrují možné přístupy. Studium v rámci vyšších taxonomických skupin, jako jsou čeledi, je obtížné a o to cennější. Již započal výzkum evoluce velikosti genomu v čeledi Zingiberaceae, jehož součástí by se měla stát i má diplomová práce zabývající se tribem Globbeae.

ABSTRACT

The purpose of this study is to evaluate the existing knowledge on the evolution of genome size and also to focus on genome in the phylogenetic context. Among angiosperms we find a wide range of C-values ($1C = 0.63 \text{ pg} - 1C = 127.4 \text{ pg}$), but the modal value is 0.6 pg . We still do not know much about the nature and mechanisms of plant genome size evolution, but we are learning more and more every year. There are already dozens of studies dealing with the dynamics of genome size of smaller taxonomic groups and on four of these they demonstrate possible approaches. Researching within higher taxonomic groups such as families is difficult and so more valuable. New research on the evolution of genome size in the family Zingiberaceae has started and my master thesis dealing with the Globbeae tribe should be part of it.

Klíčová slova: genom, evoluce velikosti genomu, C-hodnota, Zingiberaceae, fylogenetika, taxonomie, množství DNA

Key words: genome, genome size evolution, C-value, Zingiberaceae, phylogenetics, taxonomy, DNA amount

Ráda bych poděkovala za podporu, trpělivost a cenné rady při tvorbě bakalářské práce svému školiteli Tomáši Férovi, kamarádům - především Kryštofu Maternovi a celé své rodině.

V této práci se pokusím přehledně shrnout dosavadní poznatky o evoluci velikosti genomu rostlin. Zaměřím se obecně na vývoj představy o evoluci velikosti genomu, na mechanismy změn, ale především na využití studia velikosti genomu v systematice. Srovnám několik vybraných prací, které se zabývají evolucí velikosti genomu ve fylogenetickém kontextu. Jedná se o různé taxonomické skupiny jako rody, čeledi nebo například triby. Získané poznatky by měly být přípravou na následnou studii evoluce velikosti genomu čeledi Zingiberaceae s detailnějším zaměřením na tribus Globbeae.

S rozvojem techniky v posledních desetiletích se objevila nová, velice zajímavá charakteristika rostlin – velikost genomu. Velikostí genomu je myšleno množství DNA v jádře. Pro kvantitativní vyjádření se používá označení C-hodnota, která odpovídá množství DNA nereplikovaného jádra. K jejímu snadnému a rychlému zjištění dnes nejčastěji používáme průtokovou cytometrii. Každá buňka v jedné rostlině (kromě jistých specifických pletiv) a většinou i v jednom druhu (s výjimkou generativních buněk) má v tomto smyslu stejnou velikost. Velikost genomu můžeme kvantifikovat jako hmotnost genetického materiálu v pikogramech (pg). Dalšími doprovodnými charakteristikami jsou počet chromozómů a stupeň ploidie.

Množství DNA poměrně nečekaně nesouvisí s komplexitou organismu. Tento fakt označujeme jako paradox C-hodnoty (Thomas, 1971). V rostlinné říši najdeme rozpětí od méně než 0,01 pg do více než 127 pg (Bennett & Smith, 1991). U živočichů bylo zjištěno rozpětí od 0,04 pg do 133 pg. Tyto hodnoty ale nekorelují s evoluční odvozeností organismu, nýbrž se vyskytují mezi skupinami organismů nepravidelně. To znamená, že ke zvětšení genomu muselo v evoluci rostlin dojít mnohokrát a nezávisle. Množství DNA se u rostlin během evoluce zvětšuje – nejčastějšími způsoby jsou amplifikace retrotranspozónů a polyploidizace. A pravděpodobně, což je známo mnohem méně, i zmenšuje – nelegitimní rekombinací a nerovnoměrnou homologickou rekombinací. Tyto jevy doprovází evoluci rostlin a jejich vliv je studován v široké škále - jak v rámci vyšších taxonů, jako jsou například krytosemenné rostliny (Soltis et al., 2003), nebo v čeledi, například Brassicaceae (Johnston et al., 2005), tak i v nižších taxonech, například v rodu *Curcuma* (Leong-Škorníčková et al., 2007), *Gossypium* (Ohri, 1998; Wendel et al., 2002; Hawkins et al., 2008).

Jedinečnost této charakteristiky spočívá v univerzálnosti jejího použití pro libovolné taxony přes celou rostlinnou a potenciálně i eukaryotickou říši. Našla uplatnění i při studiu šlechtění a hybridizace. Nezřídka lze rozlišovat dva druhy právě podle množství DNA, namísto klasických morfologických znaků, kterými se ani lišit nemusí. A při sledování C-hodnot v kontextu kvalitního fylogenetického stromu získáváme zajímavé výsledky.

V čeledi Zingiberaceae se dosud evolucí genomu nikdo nezabýval. V současné době dostupný materiál světových botanických zahrad a existence kvalitního fylogenetického stromu (Kress et al.,

2002) umožnily české skupině tuto studii zahájit (Šída et al., in prep.). Podobná práce existuje například pro čeledi Brassicaceae (Lysák et al., 2009), Liliaceae (Leitch et al., 2007) a Orchidaceae (Leitch et al., 2009).

Na začátek bych čtenáře ráda seznámila s několika základními pojmy, které budou práci doprovázet.

1.1. Velikost genomu

Genom, v moderním smyslu celkové sekvence nukleotidů, obsahuje velké množství nekódujících sekvencí, které se sice nepřepisují do dalších generací, ale mají svůj význam. Sekvence kódujících genů se podílejí na celkovém genomu pouze malým procentem. Úseky neobsahující geny můžou zaujímat 90–99 % genomu (Flavell, 1980). Velkou část DNA tvoří různé repetitivní sekvence. Nejznámější jsou transponovatelné elementy (= transpozóny, TE). U rostlin mohou zaujímat i 80 % genomu.

Termín „velikost genomu“ se v minulosti užíval dvojím způsobem – nesprávně jako obsah DNA nereplikovaného jádra pohlavní buňky, která má poloviční počet chromozómů (= haploidní sada) a správně jako obsah DNA nereplikovaného jádra normální buňky, která má základní sadu chromozómů (Bennett et al., 1998). Správně vyjádřená velikost genomu je 2C-hodnota vydělená ploidním stupněm (pojem C-hodnota viz níže).

Na příkladu hexaploidní pšenice (*Triticum aestivum*) lze snadno vysvětlit pojmy monoploidní a holoploidní sada chromozómů. Genom pšenice se skládá z 6 monoploidních sad označovaných AABBDD (McFadden & Sears, 1946), **monoploidním** genomem se myslí samotné A, B, nebo C, zapisujeme $2n = 6x$. Monoploidní genom pak značíme chromozómovým číslem x . Jak ale nazvat sadu, ve které chceme zahrnout veškerou genetickou informaci, tedy všechny různé sady chromozómů, čili v případě pšenice ABD? Před pěti lety tento problém řešili Greilhuber et al. (2005) a navrhli pojem **holoploidní** genom (s chromozómovým číslem n). Pro srovnávání velikostí genomů různě ploidních jedinců je vhodnější počítat s monoploidní velikostí genomu. Definice dalších souvisejících pojmů od Greilhubera et al., 2005 viz tabulka č. 1 a příloha č. 1.

Pro snazší orientaci bylo zavedeno několik kategorií velikosti genomu: a) velmi malý (C-hodnota $< 1,4$ pg), b) malý (1,4 – 3,5 pg), c) střední (3,5 – 14 pg), d) velký (14 – 35 pg), e) extrémně velký (> 35 pg) (Soltis et al., 2003). Čtyři okrajové kategorie vznikly jako dvojnásobek, pětinásobek, dvacetinásobek a padesátinásobek modální C-hodnoty, jež byla tehdy ze vzorku 2802 druhů určena jako 0,7 pg (Leitch et al., 1998). Pro představu uvádím několik příkladů C-hodnot běžných rostlin: huseníček (1C = 0,16 pg), rýže (1C = 0,50 pg), rajče (1C = 1,00 pg), sója (1C = 1,10 pg), ječmen (1C = 5,55 pg), fazole (1C = 13,33 pg), cibule (1C = 16,75 pg), pšenice (1C = 17,32 pg), lilie (1C = 35,20 pg).

1.2. Počet chromozómů

Variabilita počtu chromozómů je u rostlin obrovská. Počet chromozómů udává chromozómové číslo, které značíme $2n$. Toto číslo je specifické pro druh. Můžeme se běžně setkat s několika málo chromozómy, ale i s více než stovkou. Poměrně překvapivě mezi počtem chromozómů a velikostí genomu neexistuje přímá souvislost. Příčinou je vysoká variabilita ve velikosti chromozómů. Příklad pro ilustraci: 440 Mb genomu rýže je rozděleno do 12 chromozómů, zatímco 4900 Mb ječmene je v sedmi chromozómech (Kellogg & Bennetzen, 2004).

1.3. C-hodnota

C-hodnota je obsah DNA nereplikované haploidní sady chromozómů jádra. Její velikost se nejčastěji vyjadřuje jako hmotnost v pikogramech (pg). Existuje převod na počet párů bazí: **1 pg = 965 Mb**. Hodnota se nejnázne zjišťuje moderní metodou - průtokovou cytometrií, případně Feulgenovou mikrodensitometrií (Bennett & Leitch, 1997). Velikost genomu odpovídá 2C-hodnotě vydělené ploidním stupněm. 2C-hodnota je 2× větší než právě nadefinovaná C-hodnota = 1C-hodnota, nejde tedy o haploidní sadu, nýbrž o diploidní. V případě diploidních druhů rozumíme velikostí genomu 1C-hodnotu. Původ vzniku písmene „C“ není úplně jasný, časem se k němu přiřadilo slovo „constant“ = konstantní. Další spekulované významy jsou class, category, content, characteristic. (Greilhuber et al., 2005). V roce 2005 byly známy odhady C-hodnot pro více než 4400 druhů (= 1,8 %) krytosemenných rostlin. Pro vyjádření velikosti genomu nejčastěji používáme 1C, 2C a 4C-hodnoty, podle stádia buněčného cyklu a typu buňky měřeného materiálu. 1C znamená množství nereplikované jaderné DNA gamety, 2C se používá pro množství replikované DNA gamety nebo nereplikovaného jádra somatické buňky a 4C odpovídá replikovanému množství DNA somatické buňky. Hodnoty se mezi sebou dají snadno převádět násobením a dělením dvěma. Bylo by vhodné v publikacích používat jednu z těchto hodnot, například 1C, ale neděje se tak (Stace, 2000).

Tab. 1 Terminologický přehled vztahující se k velikosti genomu a C-hodnotě (Greilhuber et al., 2005).

Genome status	Monoploid	Holoploid
Chromosome number designation	x	n
Covering term for genomic DNA content	Genome size	Genome size
Kinds of genome size	Monoploid genome size	Holoploid genome size
Short terms	C x -value	C-value
Short terms quantified	1 C x , 2 C x , etc.	1C, 2C, etc.

1.4. Rozpětí C-hodnot

Rozpětí mezi nejmenší a největší C-hodnotou se tradičně udává jako jejich podíl (C_{\max}/C_{\min}). Uvádí se jako jedna z charakteristik studované skupiny. Například pro krytosemenné rostliny říkáme, že toto rozpětí činí přibližně 2000 násobek. Nejmenší známý genom má *Genlisea margareta* z čeledi Lentibulariaceae ($1C = 0,063 \text{ pg} \approx 63 \text{ Mb}$) a největší *Fritillaria assyriaca* z čeledi Liliaceae ($1C = 127,4 \text{ pg} \approx 120 \text{ Gb}$) (Bennett & Leitch, 2005, Greilhuber et al., 2006). Rozpětí krytosemenných rostlin spočteme jako $127,4/0,063=2022,22$. Pro eukaryotickou říši se uvádí 40 000 násobek. Živočichové představují rozpětí přibližně 3 300 násobku (od $1C = 0,04 \text{ pg}$ u vložkovce *Trichoplax adhaerens* po $1C = 133 \text{ pg}$ u ryby *Protopterus aethiopicus*). Savci varírují pouze čtyřnásobně.

1.5. Databáze „Plant DNA C-value database“

S moderní dobou a mnoha novými daty přišla potřeba ukládat zjištěné hodnoty do internetové databáze. Od dubna 1997 existuje „Angiosperm DNA C-value database“, do které roku 2001 byly přidány další skupiny cévnatých rostlin a nazvala se „Plant DNA C-value database“ (<http://data.kew.org/cvalues/>). O vznik se zasloužili M. D. Bennett a I. J. Leitch. Dnes existuje již 4. verze, aktualizovaná v roce 2005, obsahující údaje o 4427 druzích (= necelé 2 %) krytosemenných rostlin sebraných ze 466 různých zdrojů. Údaje jsou dostupné jak v pikogramech, tak v počtu párů bazí. Volit můžeme i mezi 1C, 2C a 4C. Tato databáze má obrovské využití. Hlavními pozitivy jsou množství dat, snadná a rychlá dostupnost a bezplatná veřejná přístupnost. Nevýhodou je rok poslední aktualizace, tudíž absence výsledků za posledních 5 let! Nicméně na internetových stránkách se dočteme, že letos (2010) by se měla objevit nová aktualizace a mělo by přibýt více než 1600 druhů. Jak vypadá výstup z této databáze na dotaz Zingiberaceae, vidíme na obrázku č. 1.

Mimo tuto hlavní oficiální databázi existují i jiné, například databáze FLOWER (= „Plant DNA Flow Cytometry Database“; <http://botany.natur.cuni.cz/flower/>) (Loureiro et al., 2007). Množstvím záznamů jsou obě databáze srovnatelné, FLOWER nyní obsahuje údaje o 3528 druzích z 826 zdrojů. Hlavním cílem databáze FLOWER je shromažďovat články zabývající se průtokovou cytometrií, pravidelně provádět aktualizace, zprostředkovat přehlednou orientaci v nich a zajistit spolehlivost údajů.

RBG Kew DNA C-values query results

Results

Genus	Species	Chromosome number	Ploidy level	Estimation method	1C (pg)	Original Reference	Paper
Curcuma	xanthorrhiza	63		FC:PI	1.30	Bharathan et al., 1994 (Ref. 272)	1997
Alpinia	speciosa			FC:PI	2.75	Bharathan et al., 1994 (Ref. 272)	1997
Zingiber	officinale	22	2	Fe	6.03	Rai et al., 1997 (Ref. 324)	2000

Query Statistics

Record Count = 3

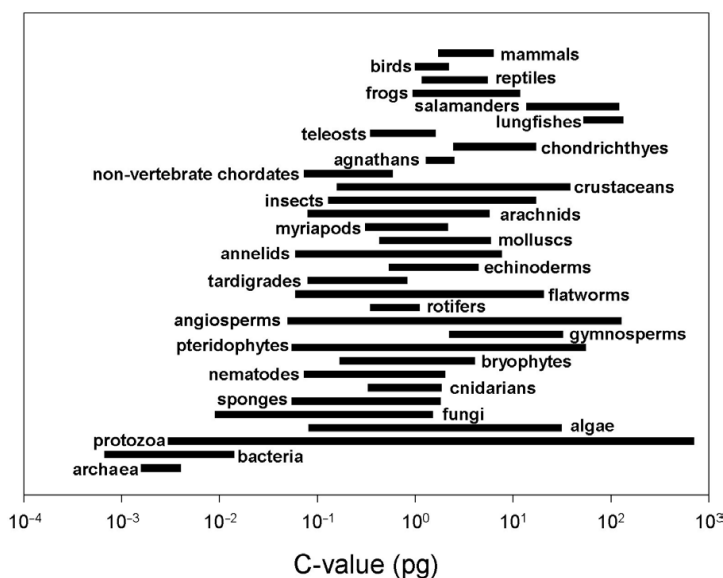
	C Mean	C Min.	C Max.	Standard deviation
1C (pg)	3.36	1.30	6.03	1.98

Obr. 1 Ukázka výstupu databáze „*Pant DNA C-value database*“ na dotaz Zingiberaceae. Zobrazované charakteristiky jsou počet chromozómů, ploidní stupeň, použitá metoda, C-hodnota, odkaz na zdrojovou publikaci a rok zveřejnění.

1.6. Paradox C-hodnoty

Problém lze vystihnout jednou větou, ale jeho podstata je posledních přibližně 60 let předmětem zkoumání, přičemž intenzita zájmu vzrůstá.

Pojem pochází z roku 1971 od C. A. Thomase, nicméně problém známe už z 50. let. Podstata tkví v tom, že komplexita organismu nekoreluje s velikostí genomu, jak bychom možná očekávali. Nevyřešenými otázkami zůstává, s čím tedy koreluje a proč se tolik liší. První otázku objasníme později, druhou v následující podkapitole. Zmíněnou situaci znázorňuje obrázek č. 2:



Obr. 2 Paradox C-hodnoty – rozpětí obsahu DNA v pg u různých organismů nekoreluje s jejich evoluční odvozeností (Gregory, 2004).

Rostliny samotné se chovají obdobně. Není pravdou, že odvozenější rostliny mají větší genom, je částečnou pravdou, že bazální skupiny mají menší genom, což souvisí s tím, že rostliny mají tendenci genom v evoluci spíše zvětšovat (Bennetzen & Kellogg, 1997; Bennett et al., 2000; Hawkins et al., 2008). Touto problematikou se práce zabývá později.

1.6.1. Teorie vysvětlující paradox C-hodnoty

Paradox C-hodnoty přestává být paradoxem, pokud víme, že DNA, která může za variabilitu ve velikosti genomu, je nekódující DNA, tedy DNA bez genů. Problém se proto přejmenoval na „C-value enigma“ (enigma = záhada) a nyní se hledá příčina a následky této variability v množství nekódující DNA. Teorie pokoušející se o vysvětlení můžeme rozdělit podle funkce nekódující DNA na dvě skupiny: a) DNA je nadbytečná b) DNA má adaptivní funkci. Pro první bod jsou známy 2 související teorie, a to o „junk DNA“ (junk = odpad) a o „selfish DNA“ (selfish = sobecký) (Gregory, 2004). Junk DNA teorie hovoří o náhodném zmnožování a ukládání, bez vlivu na funkci buňky, alespoň do určité doby, která je ale poměrně vzdálená. Novější verze této teorie – selfish DNA říká, že DNA (především transponovatelné elementy) se chovají jako parazité, cíleně se množí, fixují a dlouhou dobu škodí jen málo, takže selekční tlak proti nim není dost silný. Druhý bod navrhuje, že nekódující DNA má pozitivní vliv. Povaha přínosu je rozličná. Například je-li poměr sekvencí nesoucí geny a bez genů výrazně ve prospěch DNA bez genů, potom případné mutace s větší pravděpodobností zasáhnou místo bez genů. Jde o jakési „sebeobětování“ ve prospěch cennějších sekvencí. Nebo při určitém ideálním množství nekódující DNA dojde k homeostázi jaderných pochodů, což se pozitivně projeví hlavně při extrémních podmínkách. Případně může mít ochrannou funkci proti chemickým mutagenům. A poslední alternativa, množství negenové DNA může ovlivňovat fenotyp a tím pádem buňka podléhá selekci, třeba i pozitivní (Petrov, 2001; Gregory, 2004; Patrushev & Minkevich, 2008).

1.7. Polyploidie

Polyploidizace je proces, při kterém dojde ke zmnožení základní sady chromozómů. Běžné jsou tetraploidie, hexaploidie (*Triticum aestivum*; $2n = 6x = 42$) a známé jsou i daleko vyšší ploidie (*Curcuma*; $2n = 6x, 9x, 11x, 12x$ a $15x$; Leong-Škorničková et al., 2007). Poměrně méně častá je triploidie (Ramsey & Schemske, 1998). Rozlišujeme eupolyploidii, kdy se výsledný počet chromozómů rovná přesnému násobku počtu v základní sadě, a aneuploidii, kdy se výsledný počet chromozómů od přesného násobku nějak liší, nejčastěji o 1–2 chromozómy. Jiné dělení je na autopolyploidii, jakožto zmnožení vlastního genomu a allopolyploidii, vznikající hybridizací, tedy křížením jedinců různých druhů. Amfidiploid má zdvojené všechny základní sady chromozómů pocházející od různých rodičů (*Raphanobrassica*, *Triticum aestivum*). Rostliny se s polyploidii vyrovnávají velice dobře a nemívají ani narušenou fertilitu. U rostlin se jedná o velmi obvyklý jev, výskyt se předpokládá u cca 70 % krytosemenných rostlin (Leitch & Bennett, 1997). Dokonce většina rostlin, dnes považovaných za diploidní, pravděpodobně v minulosti prošla polyploidní událostí (Soltis et al., 2009). Jediná výjimka je *Amborella*, u které se žádné známky duplikace genomu nenašly. U všech ostatních zkoumaných rostlin máme důvod se domnívat, že paleopolyploidizaci podstoupily (Cui et al., 2006).

2.1. Velikost genomu v závislosti s jinými faktory

Velikost genomu je zajímavá charakteristika organismu, která nám může pomoci vyjasnit evoluční procesy a hrát významnou roli i pro taxonomy. Dnes už o významnosti této charakteristiky není pochyb. Následuje shrnutí zjištěných souvislostí velikosti genomu s evolučními a ekologickými faktory.

Pozitivní korelaci s velikostí genomu vědci našli pro hmotnost semen (Beaulieu et al., 2007), velikost buňky (Beaulieu et al., 2008), délku buněčného cyklu, délku M-fáze, minimální generační dobou (Bennett, 1971), míru rekombinace (Ross-Ibarra, 2007), sklon k extinkci (Vinogradov, 2003; Bennett & Leitch, 2000) a habitat (Dušková et al., 2010).

Negativní korelace je známa v souvislosti s hustotou průduchů (Beaulieu et al., 2008), schopností speciovat (Vinogradov, 2003), indexem SLA (specific leaf area = specifická plocha listu) a maximální rychlostí fotosyntézy (Knight et al., 2005).

Souvislost byla nalezena i mezi velikostí genomu a životní formou. Efemery a jednoletky, rostliny s krátkým buněčným cyklem, nikdy nemají velký genom. Dosud neznáme efemerní druh (s životním cyklem kratším než 6 týdnů), který by neměl velmi malý genom (< 1,4 pg) (Bennett et al., 1998). Trvalky, s delším buněčným cyklem, můžou a nemusí mít velký genom (Bennett, 1972). Epifytické orchideje nikdy nemají velký genom (Leitch et al., 2009). Rostliny s velkým genomem nikdy nemají malá semena a téměř se nenacházejí na extrémních stanovištích (Knight et al., 2005). Najdeme je spíše v temperátním pásu než v tropech (Ohri, 2005) a spíše v oblastech s průměrnou teplotou a srážkami (Knight & Ackerly, 2002). Rody s velkým genomem mají menší druhovou bohatost než příbuzné rody s menším genomem (Knight et al., 2005). Rostliny s malým genomem jsou ekologicky i evolučně flexibilnější, obývají nejrůznější habitaty, výrazněji varírují v různých znacích a snáze speciují.

2.2. Úvod do studia evoluce velikosti genomu

Na téma dynamiky genomu vědci vystupují s různými názory. Dodnes navrhují nové hypotézy, vracejí se k původním nebo je vylepšují. Již v 50. a 60. letech se vědělo o konstantnosti genomu v rámci druhu a odlišnosti mezi druhy. Hledaly se mechanismy způsobující změny velikosti množství DNA, ale muselo se počkat na molekulární revoluci. Pokrok omezoval také kritický nedostatek dostupných dat. Až v devadesátých letech byly popsány transponovatelné elementy a repetitivní sekvence. V této době také vzniklo obrovské množství prací zabývajících se evolucí genomu a velký nárůst zájmu o tuto problematiku neustále pokračuje.

Než se pustím do prezentace možných scénářů evoluce, ráda bych vzpomněla několik zásadních faktů - stavebních kamenů, od kterých se scénáře odrážejí, a o kterých není důvod pochybovat.

(1) Ačkoli variabilita velikosti genomu je obrovská, většina druhů má malý genom (< 3,5 pg). Z údajů C-hodnot pro 4119 druhů krytosemenných rostlin se spočetl modus: 1C = 0,6 pg a medián: 1C = 2,9 pg (Leitch et al., 2005). Srovnání s nižšími rostlinnými skupinami ilustruje tabulka č. 2. Tvar histogramu C-hodnot je specificky prohnutý (Obr. 3).

Tab. 2 Tabulka prezentuje charakteristiky 1C-hodnot (minimum, maximum, průměr, modus, a rozpětí (= max/min)) hlavních rostlinných skupin a podíl druhů se známými 1C-hodnotami (Leitch et al., 2005).

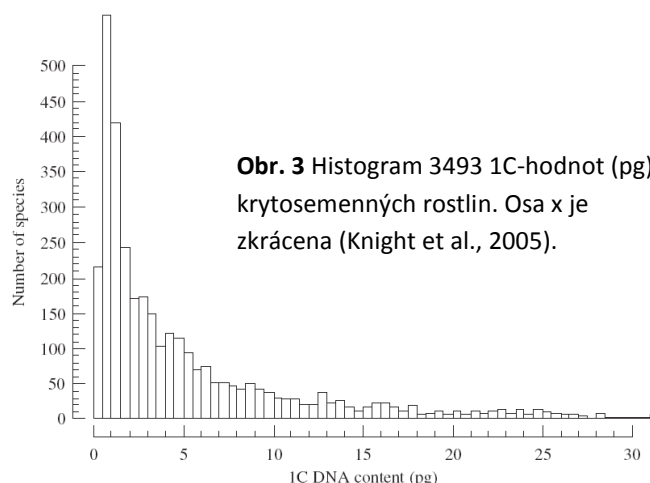
	Min. (pg)	Max. (pg)	Mean (pg)	Mode (pg)	Range (max./min.)	No. of species with DNA C-values	No. of species recognized*	Representation (%)
Bryophytes	0-17	2-05	0-51	0-45	12-1	171	~18 000	~1-0
Lycophytes	0-16	11-97	3-81	n/a	74-8	4	~900	~0-4
Monilophytes	0-77	72-68	13-58	7-80	95-0	63	~11 000	~0-6
Gymnosperms	2-25	32-20	16-99	9-95	14-3	181	730	24-8
Angiosperms	~0-11	127-40	6-30	0-60	~1000	4119	~250 000	~1-4
All land plants	~0-11	127-40	6-46	0-60	~1000	4538	~280 000	~1-6

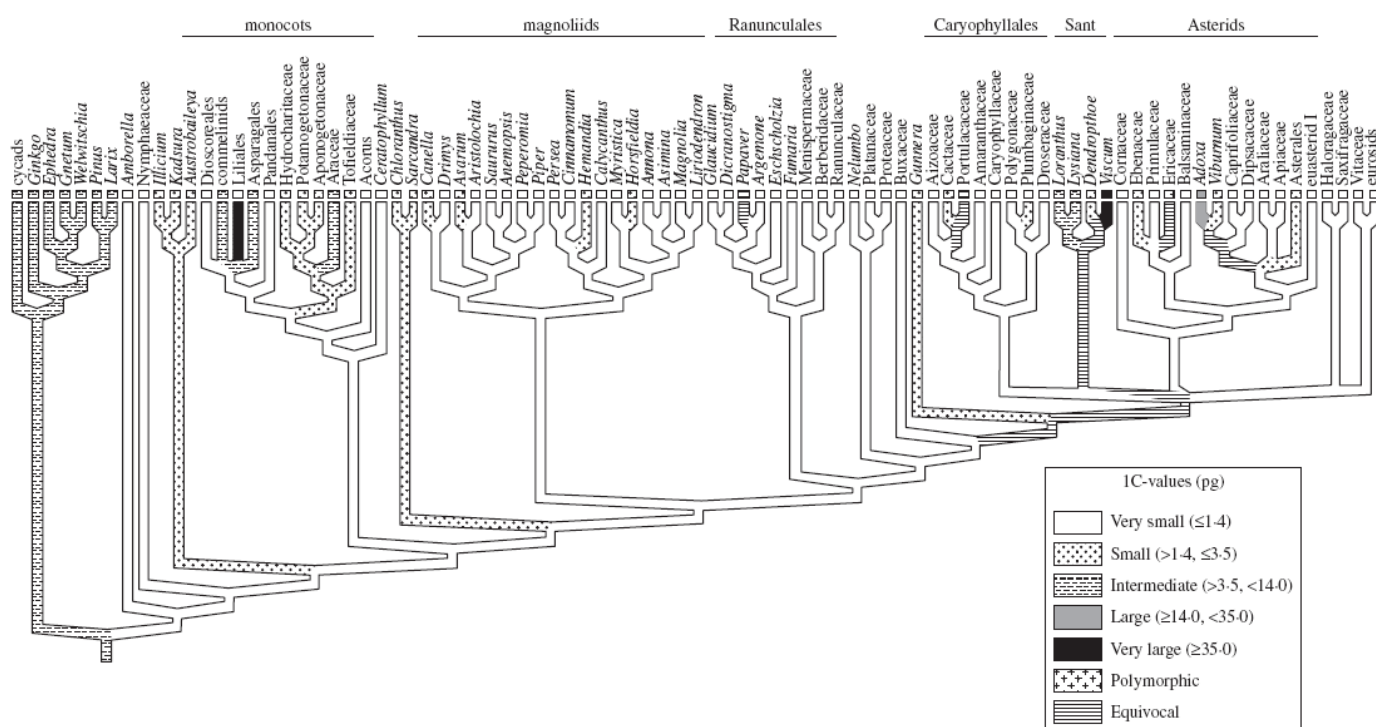
(2) Rozložení velikostí genomu na fylogenetickém stromu nevykazuje žádný zjevný trend, vypadá spíše nahodile (Obr. 4). Extrémně velký genom (> 35 pg) mají pouze zástupci dvou skupin, fylogeneticky poměrně vzdálených, a to jednoděložných a Santalales (Soltis et al., 2003).

(3) Genom se obecně snáze zvětšuje, než zmenšuje. Souvisí to s mechanismy, především s dobře prostudovaným mechanismem zmnožování transponovatelných elementů a obtížně představitelným mechanismem efektivně zmenšujícím genom (např. Bennetzen & Kellogg, 1997; Bennett et al., 2000; Bennetzen et al., 2005).

(4) V souvislosti s evolucí velikosti genomu hovoříme pouze o sekvencích DNA bez genů. Sekvence nesoucí geny se těchto procesů neúčastní, protože ztráta nebo zmnožení genů by pravděpodobně mělo katastrofální následky.

(5) Jedinci jednoho druhu mají ve většině případů konstantní velikost genomu. Je známo mnoho výjimek, takový jev nazýváme intraspecifická variabilita. Obvykle dosahuje několika málo procent. Obecně lze ale konstantnost předpokládat.



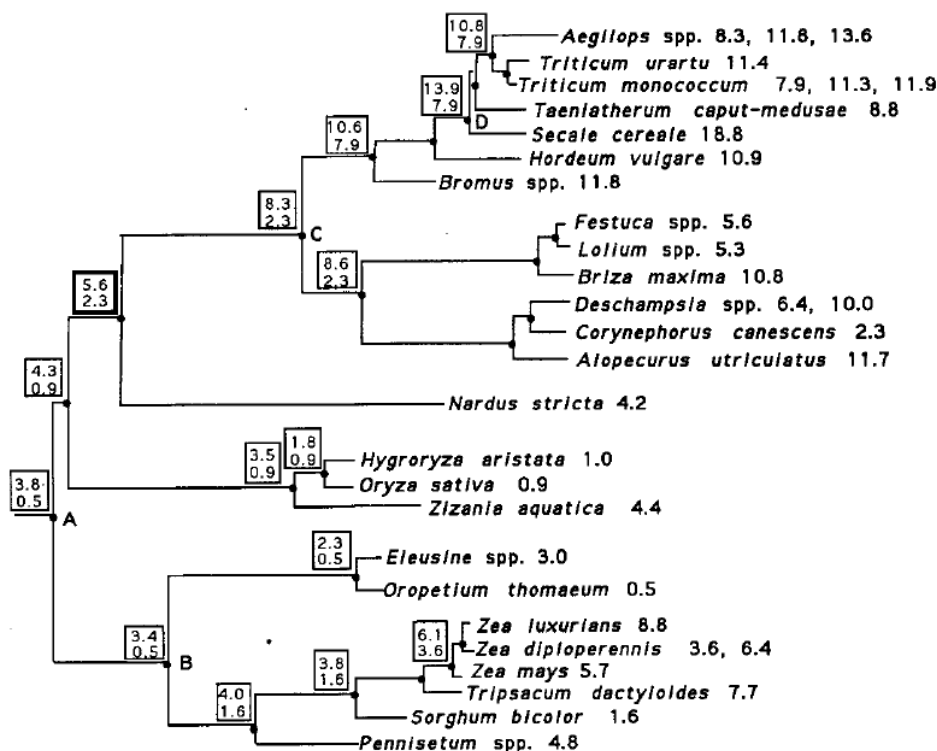


Obr. 4. Strom znázorňuje rekonstrukci evoluce velikosti genomu krytosemenných rostlin (Angiospermae) metodou maximální parsimonie (Soltis et al., 2003).

2.3. Vývoj modelu evoluce velikosti genomu

Následující kapitola se zabývá vývojem poznání v této problematice. Poznatky jsou pro praktičnost řazeny chronologicky a zjednodušené na minimum.

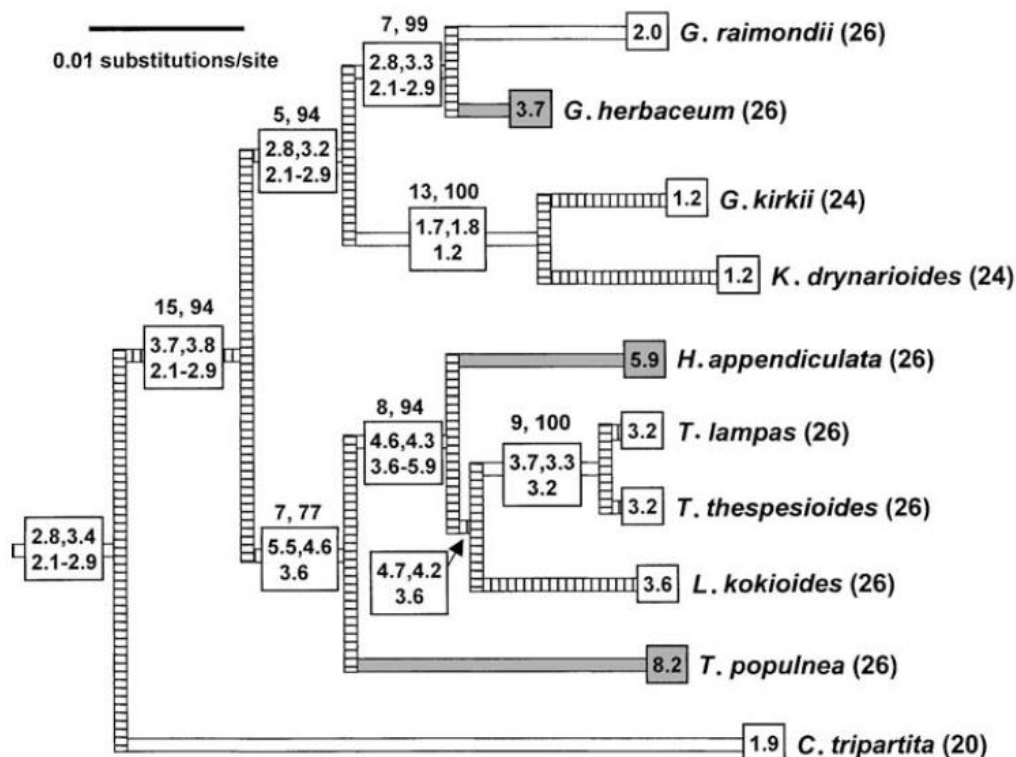
Ještě na konci 90. let nebyl znám efektivní mechanismus zmenšování genomu a to vědecký svět přivedlo k teorii jednosměrné cesty evoluce genomu k „obezitě“. To znamená, že se v evoluci uplatňuje pouze nárůst množství DNA. Tento proces probíhá v různých liniích s různou intenzitou, čímž se vysvětluje obrovská variabilita ve velikosti genomu napříč rostlinnou říší. Mělo se za to, že mechanismy poklesu pravděpodobně nehrají významnou roli, ale bylo ještě třeba počkat na další výzkumy. Na konkrétním příkladu fylogenetického stromu čeledi Poaceae (Obr. 5) byly navrženy dva modely evoluce. První, předpokládající pouze nárůst DNA, by musel přijmout 14 velkých (= 2 a více násobně) zvětšení genomu. Společný předek by tedy musel mít stejný nebo menší genom než nejmenší zahrnutý druh a nárůst DNA by musel být častý, nárazový a nepravidelný. Zatímco druhému modelu, připouštějícímu oba mechanismy se stejnou pravděpodobností, stačí přijmout pouze 4 velká (=2 a více násobně) zmenšení genomu a žádné zvětšení. V průběhu evoluce by nastalo více změn, avšak menších než v prvním modelu, a celkově se proto velikost genomu tolik nezmění (Bennetzen & Kellogg, 1997). Neznalost mechanismu snižování velikosti genomu přinutila autory přijmout méně pravděpodobný první model.



Obr. 5 Fylogeneze některých diploidních druhů čeledi Poaceae. Čísla napravo odpovídají známé 2C-hodnotě (pg). Hodnoty v rámečku teoretické 2C-hodnoty odpovídají dvěma modelům (viz text) za předpokladu minimální změny genomu. Horní údaj je pro model dovolující pokles i nárůst, dolní je pro model připouštějící pouze nárůst množství DNA (Bennetzen & Kellogg, 1997).

Aby se vysvětlily rozdíly v množství repetitivní DNA různých rostlin, musely by alespoň nějaké druhy mít mechanismus zadržující proliferaci retrotranspozónů. Rostlinný genom by tak mohl být schopen držet „diету“. Metylace je jedním z navrhovaných způsobů (Rabinowicz, 2000).

Proti teorii jednosměrné cesty k obezitě byl předložen fakt, že je znám důkaz ztráty DNA pozorovaný na buněčné úrovni. Delece segmentů heterochromatinu z chromozómů žita (*Secale*) byly pozorovány u křížence žita s pšenicí (*Triticale*) a vedly k poklesu detekovatelnému Feulgenovou mikrodenzitometrií (Bennett et al., 2000). C-hodnoty diploidních druhů rodu *Gossypium* vynesené na fylogenetický strom této skupiny mimo to ukázaly, že genom se opakovaně v evoluci nejen zvětšuje, ale i zmenšuje a navíc velmi dynamicky. Na názorně vykresleném stromu s deseti diploidními druhy (obrázek č. 6) byl nalezen minimálně čtyřikrát pokles a šestkrát nárůst množství DNA (Wendel et al., 2002).



Obr. 6 Evoluce velikosti genomu tribu Gossypieae. Ve čtvercích na koncích větví jsou velikosti genomu v pg, v závorkách za jménem jsou počty chromozómů. V rámečcích na vnitřních větvích jsou odhady velikosti genomů společných předků získané třemi metodami. Po řadě jde o „sum-of-squared-changes“ parsimonii, „generalized least squared“ metodu a lineární (=Wagnerova) parsimonii. Šedá barva větve znamená zvětšení genomu, bílá zmenšení, čárkovaně je znázorněna nejednoznačná změna (Wendel et al., 2002).

Byly objeveny minimálně dva mechanismy, které by mohly čelit proliferaci retrotranspozónů. Jsou jimi ilegální rekombinace a nerovnováha inzercí-delecí ve prospěch delecí. Avšak míru jejich uplatnění neznáme. Přítomnost nějakého mechanismu je nutná, protože rostliny s moc velkým obsahem DNA mají tendenci vymírat (Vinogradov, 2003).

Všechny dostupné C-hodnoty krytosemenných rostlin vynesené na fylogenetický strom v zásadě neodporují teorii o jednosměrné dynamice ve prospěch příbytku DNA. Existují však skutečnosti, které podporují obousměrnou dynamiku. Našlo se překvapivě malé množství DNA u rodu *Gnetum*, jehož všechny příbuzné linie mají genom o poznání větší. Jako nejlogičtější vysvětlení se nabízí zmenšení genomu této jedné skupiny. Výrazné rozdíly v rámci menších skupin, jako jsou čeledi a rody, též podporují existenci mechanismu zmenšování velikosti genomu (Soltis et al., 2003). Podle autora práce pravděpodobně dochází k oběma změnám a ohledně mechanismů zmenšování genomu se odkazuje na nedávné práce Rabinowicze (2000) a Wendela et al. (2002).

Pro nutnost přítomnosti delečních mechanismů svědčí rovněž fakt, že LTR-retrotranspozóny studovaných objektů jsou relativně mladé (méně než 5 miliónů let). Nicméně vše nasvědčuje vzniku retrotranspozónů už krátce po vzniku eukaryot. Proč ale v genomech nenacházíme ty staré

LTR-retrotranspozóny? Logické vysvětlení je, že byly nějakým mechanismem úspěšně odstraněny. Genom se takto zřejmě v mnoha liniích musel zmenšit (Kellogg & Bennetzen, 2004).

S jistotou tedy víme, že evoluce velikosti jaderného genomu podléhá mechanismům, jako jsou polyploidie, amplifikace transponovatelných elementů a opakující se delece. Vzhledem k obrovské rozdílnosti ve velikosti genomu blízce příbuzných linií, působí všechny uvedené mechanismy v různých liniích s odlišnou intenzitou (Kellogg & Bennetzen, 2004; Vitte & Panaud, 2005; Leitch et al., 2005).

Rozložení velikosti genomu nezávisle na fylogenezi a vzácně se vyskytující velký genom stále zůstává záhadou. Nabízí se tři možná vysvětlení. První, nejpravděpodobnější, navrhuje kontinuální nárůst DNA s občasnými náhlými ztrátami. Nevyřešenou otázkou zůstává, proč tedy rostliny nemají velké genomy. Druhé připouští tak časté a velké ztráty DNA, že se vyrovnají růstu. Takové ale zatím neznáme. A třetí možné vysvětlení je, že zvětšování genomu je vzácné a vyskytlo se pouze u několika málo linií. To ale odporuje poznatkům o aktivitě transponovatelných elementů a polyploidizaci. Oba tyto procesy se zdají být běžné a v evolučním měřítku rychle se odehrávající (Knight et al., 2005). Existuje selekce proti velkému genomu? Zjistilo se, že rostliny s velkým genomem hůře speciuji, téměř se nevyskytují v extrémních podmínkách a vykazují i další zhoršené vlastnosti (viz kap. 2.1.). Tudíž velikost genomu se musí projevovat fenotypově a proto velký genom může podléhat negativní selekci (Knight et al., 2005). Z předešlých let známe několik důkazů o existenci ztrát DNA a dokonce několik poznatků i o jejich mechanismu, nicméně jejich konkrétní vliv a širě uplatnění zůstávají nadále utajeny (Vinogradov, 2004). Byl zkoumán význam delecí způsobených ilegální rekombinací a nerovnoměrnou homologickou rekombinací u rýže a *Arabidopsis* (Bennetzen et al., 2005). Rozdíly v aktivitě molekulárních mechanismů jednotlivých linií by mohly vysvětlit variabilitu velikosti genomu rostlin bez nutnosti předpokladu působení selekčního tlaku. Při studiu LTR-retrotranspozónů u *Arabidopsis* se 90 % indelů ukázalo být delecemi. Sekvence nazývané solo-LTR jsou pravděpodobně produktem nerovnoměrné homologické rekombinace. U rýže jich bylo nalezeno více než u *Arabidopsis*. Domníváme se tedy, že u rýže je nerovnoměrná homologická rekombinace významnější než u huseničku (Bennetzen et al., 2005). Odhad úbytku DNA v rýži za posledních 5 miliónů let převyšuje 190 Mb. Dnes má rýže 430 Mb (Ma et al., 2004).

Molekulárně se zdá možné pouze zvětšování, ekologicky a fylogeneticky je „dokázané“, že ke snižování dochází. Přesto se Hawkins et al. (2008) přiklání k hypotéze „one-way ticket to genomic obesity“ – dynamika genomu se vyvíjí jednosměrně, a to zvětšováním genomu. Mechanismy poklesu sice mohou genom výrazně redukovat, ale takové situace nastávají ojediněle. Odbourávání přebytečné DNA je z evolučního hlediska neefektivní (Hawkins et al., 2008).

Máme-li jednu linii s malým genomem obklopenou liniemi s velkými genomy, logicky to vysvětlíme zmenšením genomu. Ale existuje i alternativní řešení - u linií s malým genomem dochází k jeho expanzi jen velmi pomalu. Dalším protiargumentem je, jak je možné, že převažují skupiny

s malým genomem? Vysvětlení je obdobné, tyto rostliny podléhají pouze pomalým změnám (Hawkins et al., 2008).

Navzdory rozsáhlému výzkumu trend ve vývoji velikosti genomu zůstává z velké části utajen. Došlo se k závěru, že intenzita ztrát DNA je velice variabilní i v rámci jednoho rodu. Zdá se, že u rostlin s malým genomem je poměr ztrát dostatečný, aby dlouhodobě udržel velikost genomu konstantní. Nadále zůstává řada nezodpovězených otázek: Jak se s proliferací TE vypořádávají jednotlivé linie? Jaké vnitřní faktory nebo vnější síly spouštějí, případně zabraňují, proliferaci TE? Proč jsou některé rodiny TE úspěšnější i u velmi příbuzných taxonů? (Hawkins et al., 2009)

Celé téma je nesmírně zajímavá problematika, jejíž vyřešení se zdá býti blízkou budoucností. Nelze zatím s jistotou říct, jaká je konkrétní cesta evoluce velikosti genomu. Nikdo nepochybuje o dvou předních mechanismech zvětšování (a) amplifikaci TE (b) polyploidizaci. Ohledně zmenšování známe dva důležité mechanismy (a) nehomologickou rekombinaci a (b) nerovnoměrnou homologickou rekombinaci, ale jakou měrou se podílejí na evoluční dynamice, stále nevíme.

Primární schopnosti DNA je seberekoplace, pro delece nemá přirozené dispozice. Mechanismy zmnožování sekvencí DNA jsou proto daleko logičtější než mechanismy ztrát. Očekáváme tedy rostoucí tendenci velikosti genomu, ke které zcela zjevně nedochází.

Závěry o průběhu evoluce jsou negativně ovlivněny studiem molekulárních mechanismů pouze u malého nerepresentativního vzorku, jak na absolutní počet, tak na zastoupení čeledí. Navíc jsou vybírány především modelové rostliny, tedy převážně druhy s malými genomy. Aplikace poznatků je zatížena chybou zobecňování zjištěných mechanismů. Nelze říct, že mechanismy objevené u jednoho druhu budou mít stejný vliv i u jiného, byť blízkého příbuzného druhu, natož nepřibuzného.

Současný model evoluce genomu navrhuje různě rychlý růst velikosti genomu, v závislosti na evoluční linii, s občasnými (dlouhodobě neefektivními) poklesy. Charakter růstu je většinou pomalý až nulový, s neznámými mechanismy iniciace a blokace.

2.4. Zvětšování genomu

Extrémně velký genom (> 35 pg) najdeme u dvou druhů rodu *Viscum* (Santalales) a u jednoděložných skupin: Comelinaceae, v pěti čeledích řádu Asparagales a ve třech čeledích řádu Liliales. Velký genom (> 14 pg) mají zástupci čeledí Papaveraceae, Ranunculaceae, Droseraceae, rosidů (např. Brassicaceae, Rutaceae, Onagraceae), asteridů (např. Rubiaceae, Solanaceae, Asteraceae) a Viscaceae (Soltis et al., 2003).

Velký genom přináší majiteli především omezení, ale existuje i pár potenciálních výhod. Polyploidní jedinci mohou být zdatnější, větší a životaschopnější, než jejich diploidní příbuzní. Větší

genom indikuje větší buňky a ty mohou mít v jistém prostředí kompetiční převahu. Šlechtitelství přináší kvalitnější polyploidní druhy kulturních plodin.

Hlavními známými mechanismy zvětšování genomu jsou amplifikace (=zmnožení) retrotranspozónů a polyploidizace.

2.4.1. Amplifikace retrotranspozónů

Většina repetitivních DNA rostlin je označována jako transponovatelné elementy (TE). Podle způsobu transpozice rozdělujeme dvě třídy. Do první patří retrotranspozóny, které jsou charakteristické úseky LTR=long terminal repeats (např. Ty1 element) a retropozóny (např. LINEs= long interspread nuclear elements, SINEs = short interspread nuclear elements). Do druhé třídy patří například Helitrony. Tato třída má v genomu rostlin menší zastoupení, pohybuje se okolo 10 %. Nejvýznamnější jsou LTR-retrotranspozóny. V kukuřici zauímají až 70 % jaderného genomu. TE mají zásadní význam, jelikož se tyto sekvence mohou přemisťovat systémem copy&paste, tedy vznikají nové okopírované úseky DNA, ale zůstávají přítomny i původní vlákna. Takto vzniklé sekvence se pak transportují na nová místa v genomu. Nepřekvapí, že nových kopií může vzniknout i obrovské množství. Proč se TE začínají nekontrolovatelně množit, není stoprocentně prozkoumané. Jako spouštěče se navrhuje různé formy stresu nebo polyploidizace (Fedoroff, 2000; Kidwell, 2005; Patrushev & Minkevich, 2008). Proces probíhá ve vlnách, v evolučně krátkém období tzn. několik milionů let. Průměrně se v rostlinném jádře za milion let nashromáždí několik tisíc nových transponovatelných elementů (Kellogg & Bennetzen., 2004). U australské rýže (*Oryza australiensis*) se zjistilo, že nedávno propukla aktivita tří rodin LTR-retrotranspozónů. V genomu se za tři miliony let nashromáždilo více než 90 000 kopií retrotranspozónů, což vedlo ke zdvojnásobnění velikosti genomu (Piegu et al., 2006).

2.4.2. Polyploidizace

Za jeden z hlavních cytogenetických mechanismů evoluce rostlin vedoucí ke vzniku nových druhů se považuje polyploidizace. Rostliny jsou k hospodaření se zmnoženou sadou chromozómů velice tolerantní. Vznikají nové genotypy, což může přinášet evoluční výhody. Polyploidní jedinci využívají i té výhody, že při poruše nějakého genu ho nahradí jeho přítomná, plně funkční kopie. Různé ploidních jedinců se v rostlinné říši vyskytuje podle různých odhadů 30–80 % (Leitch & Bennett, 1997; Hegarty & Hiscock, 2008). Nově se uvažuje, že tímto procesem v historii prošly téměř všechny rostliny (Soltis et al., 2009).

Podle způsobu vzniku rozlišujeme autopolyploidii a allopolyploidii. Při autopolyploidii pochází všechny zmnožené sady chromozómů z jednoho druhu, při allopolyploidii z různých druhů. V obou případech je na vině porucha při meióze. Chromozómy, které by se měly rozdělit do dvou buněk, zůstanou v jedné (2n gamety). Podobné následky mají poruchy při prvním i při druhém meiotickém dělení. Liší se v poměru vyprodukovaných normálních haploidních a mutantních diploidních gamet.

Různými kombinacemi splývání haploidních a diploidních gamet vznikají různě ploidní jedinci. Poměrně kuriózním způsobem vzniku polyploidního jedince je oplození vajíčka více spermii.

Zmnožením sad chromozómů výrazně narůstá C-hodnota, je však nutné mít na mysli, že monoploidní C_x -hodnota se v zásadě nemění. Ve skutečnosti lze jistý trend změny najít, a to dokonce snižující C_x -hodnotu (viz zmenšování genomu).

2.5. Zmenšování genomu

Výhod malého genomu je řada (viz kapitola 2.1.), přesto cesta k němu je daleko komplikovanější než od něj (Bennetzen & Kellogg, 1997; Bennett et al., 2000; Wendel et al., 2002; Bennetzen et al., 2005). Do nedávna se o zmenšování genomu příliš nevědělo, hlavně kvůli technickým nedostatkům spojeným s detekcí a kvantifikací. Dodnes je ještě hodně poznatků předmětem budoucích studií. Například jakým způsobem mohou mechanismy ztrát DNA předčít rychlou a masovou proliferaci transpozónů. Ani o způsobu zadržování růstu genomu není mnoho známo. I přesto se zdá, že význam pro evoluci velikosti genomu bude daleko větší, než se předpokládalo v devadesátých letech. V posledních deseti letech se u rostlin našlo několik způsobů ztrát DNA. Nejčastěji se skloňují dva mechanismy: nehomologická rekombinace a nerovnoměrná homologická rekombinace.

2.5.1. Ztráty DNA po polyploidní události

Nedávno se potvrdily dvě již dříve pozorované (Murray et al., 2003) zajímavosti: 1) Pozitivní korelace mezi ploidií a velikostí genomu je logicky očekávatelná, ale není ani zdaleka tak přímá, jak bychom předpokládali (Leitch & Bennett, 2004). Například hexaploid a nonaploid nemusejí být průtokovou cytometrií odlišitelní (Leong-Škorničková et al., 2007). 2) Průměrné množství DNA základní sady chromozómů (C_x) má tendenci klesat s rostoucí ploidií (Leitch & Bennett, 2004). To znamená, že výsledná C-hodnota je menší než součet C-hodnot rodičů, tedy že po polyploidní události následuje redukce genomu. A čím vyšší je ploidie, tím menší je monoploidní velikost genomu. K zapojení širokého vzorku Leitch & Bennett (2004) využili již výše zmíněnou databázi „Angiosperm DNA C-values database“. Nakonec počítali s více než dvěma tisíci diploidních a 800 polyploidních jedinců.

Vzhledem k vysoké četnosti výskytu polyploidních skupin začíná tento mechanismus ztráty genetického materiálu být považován za velice rozšířený a zásadní. Jako nejpravděpodobnější vysvětlení se nabízí zmenšení chromozómů. Na místě je pak otázka, co je spouštěč a jaký je mechanismus? Jiná možná vysvětlení jsou chybné určení ploidního stupně nebo podhodnocená velikost v důsledku technických omezení, či vůbec odhalení samotné polyploidie (Leitch & Bennett, 2004).

2.5.2. Nehomologická (= ilegitimní) rekombinace

Nehomologická rekombinace probíhá mezi mikrohomologními oblastmi. Dochází k delecím o rozsahu několika jednotek až stovek párů bazí. Aby došlo k lokální homologii, stačí krátká, i 1 bp dlouhá sekvence. Devos et al. (2002) ji prohlásil za účinnou u *Arabidopsis*. U rodu *Gossypium* se ukázalo, že neprobíhá (Grover et al., 2008). Diskutuje se, jestli dokáže dlouhodobě čelit proliferaci retrotranspozónů (Vitte & Bennetzen, 2006). Obvykle jde o velice malé delece, menší než 100 bp. Vysokou četností mohou mít tyto delece vliv i na celkovou velikost genomu. Jedná se o hlavní redukční mechanismus (Bennetzen et al., 2005). Nehomologickou rekombinací by se dal částečně vysvětlit pokles množství DNA po polyploidizaci (Grover et al., 2008).

2.5.3. Nerovnoměrná homologická rekombinace v rámci jedné chromatidy

Pokud se rekombinace děje mezi chromatidami, jde o reciprokou výměnu, poměr indelů se vyrovná a na velikosti genomu se neprojeví (Bennetzen, 2002). Ale v rámci jedné chromatidy má rekombinace tendenci přednostně produkovat delece. Odehrává se mezi dlouhými terminálními repeticemi LTR (long terminal repeat) a vede k deleci vnitřního segmentu DNA a vzniku solo-LTR. Údajně k ní dochází v genově chudých oblastech, poblíž centromer, ztráty genů jsou tak minimální. Délka a typ LTR také ovlivňují účinnost delečního procesu. Čím delší je LTR sekvence, tím je rekombinace pravděpodobnější. Například u kukuřice známe pouze krátké LTR a zároveň málo solo-LTR (Rabinowicz, 2000; Vitte & Panaud, 2005; Morgante, 2006). Zda k nerovnoměrné rekombinaci dochází plynule, nebo v náhlých událostech spojených například s amplifikací retrotranspozónů, se zatím neví. U ječmene se za aktivaci považuje překročení prahové hodnoty poměru repetice ku genům (Rabinowicz, 2000). Omezením zůstává fakt, že tímto mechanismem lze vyjmout pouze úsek z obou stran ohraničený velkými (>50 bp) přímými repeticemi, které se v LTR retrotranspozónech sice vyskytují, ale nejsou příliš časté. Podle Grovera et al. (2008) se jedná o jev vzácný, ale vlivnější než jiné mechanismy. Byl pozorován například u rýže (Vitte & Panaud, 2003; Ma et al., 2004; Bennetzen et al., 2005), *Arabidopsis* (Devos et al., 2002; Bennetzen et al., 2005), kukuřice, pšenice a ječmene (Shirasu et al., 2000).

Další možností je chyba při postreplikační opravě (Comai, 2000), po předchozí hybridizaci. Sekvence, ač pocházejí od různých druhů, si jsou dostatečně podobné, aby příslušné chromozómy párovaly. Reparační protein pro opravu nekomplementárních párů bazí a smyček se může vyčerpat a mnohé tak zanechat neopravené, což vede k různě velkým ztrátám DNA. Časté bodové mutace a malé delece se též do jisté míry podílejí na dynamice genomu.

Vhodnou prerekvizitou zkoumání změn velikosti genomu je znalost fylogenetických vztahů studovaných skupin. Zjištěné C-hodnoty, případně i počty chromozómů a ploidní stupně, vynesené na fylogenetický strom vnášejí světlo do studia evoluce. Při prvním pohledu je zřejmé kdy a kde ke změnám velikosti genomu v evoluci došlo a jakým směrem. Z bazálních linií lze také přehledně předpovídat velikost genomu společného předka. V současnosti je největším úskalím nedostatek precizních fylogenetických stromů (Bennett et al., 2000).

3.1. Využití velikosti genomu v taxonomii

Jednou z předností výše popsaného způsobu analýzy je její přínos pro systematiku. Základní princip využití v taxonomii je následující. Pokud mají dva druhy stejně velký genom, je velmi pravděpodobné, že jejich předek měl také takový. Úsudek je ještě více podpořen, pokud se podaří ukázat, že další nejbližší existující příbuzný (= outgroup), má tutéž velikost genomu. Pokud mají dva druhy různé velké genomy, řekněme y a $2y$, pak velikost genomu společného předka závisí na velikosti genomu outgroupu a pravděpodobnostech nárůstu a poklesu DNA. Kdyby pravděpodobnost byla stejná, a outgroup měl $2y$, bylo by nejsnazší řešení považovat velikost genomu předka za $2y$ a předpokládat jedenkrát pokles ze $2y$ na y . Kdyby se ale genom dvakrát pravděpodobněji zvětšoval, dalo by se uvažovat, že předek měl y a outgroup i sledovaný druh podstoupili nárůst na $2y$. Popsaný princip má využití především v užších taxonomických skupinách (Bennetzen & Kellogg, 1997). Na tomto principu pracují softwary, které nám pomáhají získat představu o velikostech genomu na uzlech stromů, tedy hypotetických předků, a tedy celkovém vývoji velikosti genomu. Jedním z často používaných programů je MacClade (Maddison & Maddison, 1992).

Po vnesení C-hodnot na fylogenetický strom se hledá případný vývojový trend nebo jakákoli jiná souvislost. Je-li událost zmenšení nebo zvětšení genomu pro taxonomickou skupinu přítomna, je snadno čitelná. Často se potvrdí podobnost velikosti genomu v rámci jednotlivých příbuzných skupin, jako jsou sekce a clades (*Lactuca* – Doležalová et al., 2002; *Lupinus* – Naganowska et al., 2003, Liliaceae – Leitch et al., 2007; *Narcissus* – Zonneveld, 2008). Někdy se genom v evoluci vyvíjí pozvolna, opakovaně roste a klesá bez výrazných zvrátů (*Festuca* – Šmarda et al., 2008), jindy se vyvíjí nepochopitelně skokově, kdy mnoho sousedících taxonů má velice odlišnou velikost genomu (*Gossypium* – Wendel et al., 2002; *Veronica* – Albach & Greilhuber, 2004). V takových případech je vhodné fylogenetické vztahy přezkoumat. Nebo se taxon diverzifikuje na několik skupin s menším, či větším genomem a charakteristickým chromozomovým číslem (*Sorghum* – Price et al., 2005). Všechny tyto výsledky pomáhají upevňovat nebo zpochybňovat aktuální taxonomický názor.

Bádání taxonomů zásadně ovlivňují dva známé fenomény. Jsou jimi mezidruhová a vnitrodruhová variabilita.

3.1.1. Interspecifická (= mezidruhová) variabilita

Interspecifická variabilita byla objevená mnohem dříve, než intraspecifická. Odlišnosti ve velikosti genomu mezi druhy jsou klíčovou vlastností, která umožnila studium evoluce velikosti genomu. Velikost genomu v rámci rodu průměrně kolísá 3,28 násobně (Bennett & Leitch, 2005). Vysoká mezidruhová variabilita byla popsána například u rodu *Veronica* (Albach & Greilhuber, 2004), *Gossypium* (Wendel et al., 2002) nebo *Allium* (Ohri, 1998). Zjištění významných rozdílů ve velikosti genomu uvnitř rodu napomáhá vymezit jednotlivé druhy, případně i jejich hybridy (Ohri, 1998; Mahelka et al., 2005). Například v rodě *Empetrum* byla u hybridního taxonu zjištěna triploidní úroveň, na rozdíl od diploidního a tetraploidního rodičovského druhu (Suda et al., 2004). Velikost genomu je v případě shodného počtu chromozómů u příbuzných druhů vhodnou diferenční charakteristikou (*Dryopteris* – Ekrt et al., 2010).

3.1.2. Intraspecifická (= vnitrodruhová) variabilita

Obecně je známo, že konzervativnost genomu uvnitř druhu je obrovská (Bennett et al., 2000). Dlouho se dokonce předpokládalo, že výrazné odchylky ani nejsou možné. Mnoho příkladů ale svědčí o opaku (Ohri, 1998). Odchylky velikosti genomu jednoho druhu nezdědky dosahovaly i 30 %. Příčin se zjistilo několik. Na vině mohou být například B-chromozómy, variabilita heterochromatinu nebo aneuploidie. Vliv mají i různé podmínky v laboratoři (teplota), kontaminace vzorku, špatná kalibrace přístroje, dlouhé skladování materiálu a jiné metodologické chyby. Také se může jednat o novou, dosud neznámou taxonomickou úroveň typu varieta nebo forma. Tak či tak, vnitrodruhová variabilita výrazně komplikuje veškeré výzkumy spojené s evolucí velikosti genomu (Bennett & Leitch 2005; Šmarda & Bureš, 2010).

Existuje několik druhů, které při opětovných měřeních vykazují téměř nulové odchylky, takové se využívají jako tzv. standardy. Při proceduře se velikost genomu standardu srovnává se zkoumaným objektem. Jednoduchým přepočtem tak získáme velikost genomu studovaného materiálu. Mezi často užívané standardy patří *Allium cepa*, *Hordeum vulgare*, *Pisum sativum*, *Lycopersicon esculentu*, *Vicia faba* a další (Bennett & Smith, 1991).

Pomocí průtokové cytometrie lze objevit vzácné cytotypy druhu a jejich případné geografické souvislosti (*Lythrum salicaria* - Kubátová et al. 2008). Detekovatelná je i endopolyploidie části buněk ve vzorku (*Kochia scoparia* - Holá et al., 2007). Velikost genomu též slouží ke zjištění způsobu reprodukce, a to díky odlišné ploidii embrya a endospermu (Doležel et al., 2007).

3.2. Studium velikosti genomu v kontextu fylogenetického stromu

Existují odhadem desítky prací na téma evoluce velikosti genomu skupiny určité taxonomické úrovně - například *Cypripedioideae* (Orchidaceae) – Cox et al., 1998; *Lactuca* (Asteraceae) – Doležalová et al., 2002; *Lupinus* (Fabaceae) - Naganowska et al., 2003; *Veronica* (Scrophulariaceae) – Albach & Greilhuber, 2004; *Hordeum* - Jakob et al., 2004; *Oncidiinae* (Orchidaceae) – Chase et al., 2005; *Sorghum* (Poaceae) – Price et al., 2005; *Orobanche* (Orobanchaceae) – Weiss-Schneeweiss et al., 2005; *Narcissus* (Amaryllidaceae) - Zonneveld, 2008; *Gossypium* (Malvaceae) – Wendel et al., 2002, Grover et al., 2008; *Festuca* (Poaceae)- Šmarda et al., 2008, Orchidaceae - Leitch et al., 2009 a *Lasiocephalus* (Asteraceae) – Dušková et al., 2010. Výsledky většiny zmíněných prací jsou shrnuty v tabulce č. 4.

Podrobnějšímu rozboru budou podrobeny čeledi Brassicaceae a Liliaceae a rody *Nicotiana* (Solanaceae) a *Curcuma* (Zingiberaceae). Vybrala jsem podle mého názoru jedny z nejkvalitnějších a nejzajímavějších studií vzhledem ke zkoumanému tématu. Vztahují velikost genomu k fylogenetickému stromu, využívají moderní metody a aktuální poznatky. Po stručném přiblížení jednotlivých studií bude následovat jejich srovnání.

3.2.1. BRASSICACEAE – Lysák et al., 2009

Čeleď brukvovitých je jednou z nejlépe prozkoumaných čeledí, co se evoluce velikosti genomu týče. Podobně jako u čeledi Poaceae k tomu přispívá přítomnost mnoha ekonomicky významných druhů, které se často studují z různých pohledů. Nejnovější práce (Lysák et al., 2009) navazující na mnohé předchozí (Johnston et al., 2005; Bailey et al., 2006) přichází s četnými novými výsledky. Jako cíl si autoři vytyčili určení velikosti genomu předka, rozložení velikosti genomu ve skupině a poznání charakteru evoluce v kontextu fylogenetického stromu. Přispěli více než 100 novými C-hodnotami a tvorbou fylogenetického stromu vytvořeného na základě pěti typů sekvencí (matK, chs, adh, trnLF, ITS).

Brukvovité zahrnují 338 rodů a asi 3700 druhů v 25 tribech. Pro vlastní výzkum bylo zahrnuto 185 taxonů. Zástupci této čeledi mají velice malé (< 1,4 pg) nebo malé (< 3,5 pg) genomy. Nejmenší genom má *Arabidopsis thaliana* (1C = 0,16 pg; 2n = 10). Největší má *Bunias orientalis* (1C = 2,43 pg; 2n = 14). Rozsah je roven 16,2 násobku. Další charakteristiky jsou shrnuté v tabulce č. 3. Autoři využili rozličných metod - průtokové cytometrie, počítání chromozómů a mnoha statistických metod. Některými z nich jsou například rekonstrukce fylogeneze nazvané SuperNetwork (=“SuperSít”) vytvořené z několika genových stromů s překrývajícími se taxony, odhad C-hodnoty předka pomocí Bayesova faktoru, Monte Carlo metody nebo logaritmická transformace pro docílení proporčního vyjádření změny velikosti genomu, které se jeví výhodnější. Z výsledků studie se dozvíme, že některé skupiny stále vycházejí jako parafyletické až polyfyletické a je třeba dalších analýz.

C-hodnota společného předka čeledi byla stanovena jako 0,504 pg, což je od dřívějšího odhadu 0,2 pg (Johnston et al., 2005) poměrně výrazný rozdíl. K tomu došlo, protože Johnston měl výrazně menší soubor dat a nepoužil tolik statistických metod. Dynamiku evoluce čeledi Brassicaceae charakterizuje zmenšení genomu u 52 % druhů a nárůst u zbylých 48 % (viz obr. 6). Povaha změn není neutrální (random-walk model, Brownův pohyb), nýbrž pozvolná a závislá na délce větví. Ztráty a zisky DNA probíhají rychleji na dlouhých větvích. Tento výsledek se zatím objevil pouze u této čeledi, dřívější výsledky ukazují na skokovou evoluci, nezávislou na délce větví.

Počty chromozómů jsou velmi variabilní $2n = 8 - 56$. Poměrně častým počtem je $2n = 14$. Podíl polyploidů se odhaduje na 37 %, ale vzhledem k paleoploidizačním událostem a jiným genomovým úpravám typickým pro tuto čeleď, lze ploidie jen těžko určit. Navíc redukce počtu chromozómů není nutně doprovázena poklesem množství DNA.

Jako vysvětlení dynamické evoluce a velmi úzkého rozpětí velikosti genomu se nabízí diploidizace s velice efektivním mechanismem neustálé eliminace amplifikovaných sekvencí a znemožnění jejich proliferace nebo dosud neznámý mechanismus zabraňující amplifikaci repetitivních sekvencí. Podle Lysáka et al. (2009) se manifestují oba způsoby. Je známo mnoho studií, které ukazují masivní ztráty DNA po polyploidní události u Brassicaceae (např. Song et al., 1995; Town et al., 2006). Samotná podstata mechanismu ztráty DNA není ještě úplně objasněná, ale určitě zde hraje roli nehomologická rekombinace a nerovnoměrný homologický crossing-over.

3.2.2. LILIACEAE – Leitch et al., 2007

Autoři se snaží přiblížit odpovědi na otázku, kdy a proč genom v průběhu evoluce u některých skupin výrazně expanduje. Čeleď liliovitých se zdá být pro výzkum ideální volbou. Liliaceae se vyznačuje mnoha druhy s obrovskými genomy (> 35 pg), včetně rostliny s dosud největším známým genomem - *Fritillaria assyriaca*. Jak již bylo psáno, většina krytosemenných rostlin má malý genom (modus $1C = 0,6$ pg). Tato skupina by tudíž mohla významně přispět k poznání způsobu evoluce velikosti genomu rostlin.

Autoři studovali 32 druhů pocházejících z královské botanické zahrady (RBG Kew) a dalších 44 druhů (+ 2 jako outgroup), jejichž C-hodnoty převzali z „Plant DNA C-values database“. Celkově materiál reprezentoval 15 z 16 rodů. $1C$ -hodnoty pro 78 druhů mají 26 násobné rozpětí, od $1C = 3,4$ pg pro *Prosartes smithii* ($2n = 2x = 16$) do 89,2 pg pro triploidní *Fritillaria uva-vulpis* ($2n = 3x = 36$).

Nedávné molekulární studie poskytly nové fylogenetické stromy čeledi. Na strom se vynesly údaje o 78 druzích, a poté statisticky vyhodnotily. Výsledky analýzy se přiklání ke skokovému vývoji evoluce, spíše než k plynulému průběhu a ukazují, že většina změn se udála v nedávné evoluční historii. Cesta ke genomové „obezitě“ se předpokládá selekčně neovlivněná, tedy pasivní. Velikost genomu společného předka spočetli jako $1C = 6,73$ pg ($SE \pm 0,669$), $1Cx = 6,67$ pg ($SE \pm 0,906$).

Zjistilo se, že velikost genomu je stejná pro blízce příbuzné druhy, tudíž rozložení není náhodné, lze jej totiž v rámci fylogenetického stromu částečně předvídat. Došlo ke dvěma významným divergencím následovanými rychlou radiací velikosti genomu.

3.2.3. NICOTIANA (SOLANACEAE) – Leitch et al., 2008

Rod *Nicotiana* (tabák) byl ve smyslu dynamiky změn genomu a ploidních událostí podroben detailní studii. Jako jeden z hlavních cílů práce si autoři kladli objasnění polyploidních událostí a nalezení rodičovských druhů. K dispozici měli již dříve publikovaný fylogenetický strom zahrnující téměř 40 druhů. Zpracováno bylo 18 druhů (z celkových cca 75 známých), z nichž 9 bylo diploidních a 9 polyploidních. Polyploidie se u tohoto rodu vyskytuje asi ve 40 % případů. Obvyklé počty chromozómů jsou $2n = 2x = 24$ a $2n = 4x = 48$. Zkoumaly se například specifické DNA sekvence (ribozómová DNA, nekódující tandemové repetice, retrotranspozóny) nebo celková organizace genomu pomocí fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH). Velikost genomu měřili průtokovou cytometrií a Feulgenovou mikrodensitometrií. K určení rodičů přispěla rozsáhlá molekulární (př. metoda GISH) a morfologická (např. struktura květů, chromozómů) analýza většiny druhů rodu, což činí odhady velice kvalitními. Stáří nejstarších polyploidních druhů se odhaduje na 3–4 miliony let, nejmladších na 200 000 let. Nenašla se žádná přímá závislost mezi stářím a změnou velikosti genomu. U starších druhů bylo zaznamenáno větší množství změn. Práce podobného typu provázejí dva zásadní předpoklady. (1) Dnešní diploidní druhy jsou blízce příbuzní tehdejšími diploidními druhy, z kterých kdysi polyploidní jedinci vznikli. (2) Velikost genomu tehdejších diploidů zůstala víceméně stejná. Narušení kteréhokoli z předpokladů znehodnotí výsledky. Nicméně je to zatím nejlepší dostupný způsob jakým lze vůbec k nějakým výsledkům dojít. U čtyř polyploidních druhů autoři zaznamenali pokles velikosti genomu a u pěti nárůst. Pokles či nárůst se zjistil porovnáním naměřených C-hodnot s očekávanými, což je suma C-hodnot rodičů.

Zvětšení genomu po polyploidní události je velice vzácné (Leitch & Bennett, 2004). Jeden z mála známých příkladů je v rodu *Hordeum* (Jakob et al., 2004). Daleko běžnějšímu zmenšení pravděpodobně nahrává selekční tlak, který upřednostní mezi polyploidy ty s o trochu menším genomem, protože beztak už ho mají pro daný druh nezvykle obrovský. Je tedy překvapivé, že 5 druhů tabáku po polyploidizaci podstoupilo nárůst genomu. Možné vysvětlení je prosté – nová DNA nemá žádný vliv, tedy alespoň proti ní není silná selekce. Nebo jim dokonce dává kompetiční výhodu a účastní se pozitivní selekce (Leitch et al., 2008).

3.2.4. CURCUMA (ZINGIBERACEAE) – Leong-Škorníčková et al., 2007

Počet druhů rodu *Curcuma* (Zingiberaceae) se odhaduje na více než sto. Centrum rozšíření se nachází v jihovýchodní Asii, především na území Indie a Thajska. *Curcuma longa* je v potravinářství známá jako koření. Běžně se přidává jako barvivo například do kari nebo těstovin.

Cílem práce bylo zhodnotit variabilitu počtu chromozómů a velikosti genomu indických kurkum. Obě charakteristiky se ukázaly být, jak se předpokládalo, užitečným taxonomickým znakem. Zkoumáno bylo 51 taxonů v jejich rámci 161 jedinců. Z toho 46 kurkum (z nichž 31 určených do druhu, 15 neurčených), jeden hybrid a 4 druhy často řazené jako blízce příbuzné rodu *Curcuma*. Pro 26 taxonů byl použit více než jeden vzorek. Materiál se sbíral v indické přírodě v letech 2000–2004 a dále byl pěstován v botanické zahradě na území Indie. Pro 50 vzorků se počítaly chromozómy. Zjištěné počty jsou $2n = 22, 42, 63, >70, 77$ a 105. Nejvyšší dva údaje jsou pro tento rod nové. Počet $2n = 105$ je dokonce maximem i pro čeleď Zingiberaceae. Počty 42 a 63 jsou nejběžnější. Publikovány byly i jiné počty, ale k tomu pravděpodobně došlo chybou, nebo tyto druhy patří k podrodu *Hitcheniopsis*, který zahrnuje především thajské druhy a bude mít jiné základní chromozómové číslo. Dlouhou dobu se za základní chromozómové číslo považovalo $x = 21$. Autoři z několika důvodů navrhují $x = 7$. Hlavním impulzem byl nově objevený počet chromozómů 77. Zkoumané druhy pak odpovídají cytotypům $2n = 6x, 9x, 11x$ a $15x$. Publikované byly i počty $x = 8, x = 9, x = 12$, nebo $x = 16$. Pro druh s 22 chromozómy se navrhuje $x = 11$. Zajímavé je i zjištění, že hexaploid nelze průtokovou cytometrií bezpečně odlišit od nonaploida. Vznik nonaploida se vysvětluje fúzí redukované a neredukované gamety dvou hexaploidních rodičů. Původ 11-ploida v současnosti není znám.

Rozmezí C-hodnot se zjistilo od $2C = 1,66$ pg do $2C = 4,76$ pg, což odpovídá rozpětí 2,87 násobku. Vnitrodruhová variabilita je nízká, v průměru dosahuje 3,4 %. Extrém tvoří druh *C. longa*, kde intraspecifická variabilita činí 15,1 %. Na základě homoploidních velikostí genomu se utvořily 3 skupiny, které si odpovídají i geograficky, což je podpořeno negativní korelací mezi velikostí genomu a zeměpisnou šířkou i nadmořskou výškou. Pro 39 taxonů byl zjištěn velmi malý genom ($1C < 1,4$ pg) a pro zbylých 12 malý (1,4 pg – 3,5 pg). V řádu Zingiberales známe průměrné 1C-hodnoty čeledí od 0,33 pg po 1,00 pg, výjimku tvoří pouze čeleď Lowiaceae s $1C = 3,55$ pg.

Studie přinesla i několik taxonomických poznatků. Díky velikosti genomu se podařilo odlišit dva druhy dříve považované za jeden. Rozdílné měly i počty chromozómů. Tři morfologicky těžko odlišitelné druhy popsané z různých lokalit byly díky shodné velikosti genomu navrženy ke sloučení do jednoho druhu.

3.2.5. SROVNÁNÍ

Každá ze čtyř předcházejících prací následuje trochu jinou myšlenkovou linii, přesto se je pokusím srovnat. Zvolila jsem si k tomu několik hledisek: (1) Kvalita vzorku, (2) (ne)přítomnost C-hodnot,

počtu chromozómů, fylogenetického stromu, zjištění polyploidních jedinců, (3) vyhodnocení směru evoluce a vztah k fylogenezi (4) přednosti a jedinečnost jednotlivých výzkumů. Některé faktické údaje poskytuje tabulka č. 3.

1) Nejlepší soubor se podařilo vytvořit u výzkumu kurkumy. Nejenže vzorek pokrývá přibližně 50% diversity, ale množství zahrnutých jedinců (161) se blíží počtu jedinců zahrnutých do studia celé čeledi (Brassicaceae). Také nadpoloviční většina druhů byla reprezentována více než jedním vzorkem. Dalším pozitivem studia kurkumy je, že se autoři nesnažili určit druhy za každou cenu. Vyhnuli se tak možným desinterpretacím výsledků. I Lysákoví et al., 2009 se podařilo vytvořit kvalitní soubor. Vzorek reprezentuje zhruba 5 % celkové diversity a obsaženy byly druhy 24 tribů z 25 celkových. Zbylé dva soubory se 78 druhy pro čeleď a 18 druhy ze 75 pro rod se mi jeví méně reprezentativní.

2) Všichni použili k měření velikosti genomu průtokovou cytometrii standardním způsobem. U lilí hojně a u tabáku ve dvou případech byla použita Feulgenova mikrodensitometrie. Všichni též počítali chromozómy, většinou části materiálu, protože mnoho dat je dostupných z dřívějších studií. Fylogenetický strom byl ve dvou případech převzat z nedávných dřívějších publikací (*Nicotiana*, Liliaceae), v jednom případě byl vytvořen novými sofistikovanými metodami (Brassicaceae) a v jednom případě zcela scházel (*Curcuma*). Cílem studia kurkumy bylo určit především variabilitu v rodu, a to jak chromozomovou, tak ve velikosti genomu, k čemuž není fylogenetický strom nezbytně nutný. Autoři se tím připravili o možnost sledování vývoje velikosti genomu a nalezení případného trendu.

Problém ploidie - v článku o Liliaceae se ploidii autorka nezabývá, ale poskytuje minimální a maximální Cx, včetně rozpětí, jsou-li data dostupná. Většina zahrnutých druhů je diploidní, případně triploidní. Podobně u Brassicaceae je polyploidie nedořešená. Situaci ztěžují pro tuto čeleď známé paleoploidizační události. U většiny druhů je obtížné ploidii určit. Autorům nezbylo, než použít C-hodnoty místo Cx-hodnot. Artefaktu jsou si vědomi, avšak lepší řešení objektivně momentálně neexistuje. Rod *Curcuma* je z hlediska ploidie velmi kvalitně prozkoumán. Počty chromozómů odpovídají násobkům čísla 7, bylo proto navrženo základní chromozómové číslo $x = 7$, většina druhů je potom hexaploidních nebo nonaploidních. Diploidní druh byl přítomen pouze jeden. Srovnání homoploidní velikosti genomu hexaploidů druhy rozdělilo do tří velikostních skupin, odlišných i geograficky. Průzkum evoluce velikosti genomu tabáku byl poněkud odlišný. Byl založen na pozorování polyploidizačních událostí. Autoři si ke studiu vybrali 9 polyploidních (tetraploidních) druhů a 9 diploidních. Mezi nimi se jim podařilo určit rodičovské a dceřiné druhy. Zaměřili se na změnu velikosti genomu u dceřiných tetraploidů.

Uvedené tabulky vždy obsahovaly 1C (případně 2C) a 2n. Ve třech ze čtyř případů byl uveden i standard, metoda, stupeň ploidie a lokalita. Pro čeledi navíc u jednotlivých nižších taxonů min. 1C, max. 1C, průměr, počet měřených jedinců, procentuelní zastoupení vzorku. Pro kurkumu a lilie byla přítomna ještě 1Cx-hodnota a pro kurkumu i intraspecifická variabilita.

Tab. 3. Srovnání některých charakteristik 4 vybraných studií. Uvedeny jsou minimální a maximální 1C-hodnota, rozpětí (= max1C/min1C), odhad velikosti genomu předka, původ použitého fylogenetického stromu, počet zkoumaných objektů, počet druhů ve skupině, procentuální zastoupení vzorku, přítomnost polyploidie, počet chromozómů a zdroj. NA značí nedostupnost údaje.

	min 1C (pg)	max 1C (pg)	Rozpětí	Předek (pg)	Fylogenetický strom	# zkoumaných objektů	# druhů skupiny	velikost vzorku (%)	polyploidie	2n	Zdroj
Brassicaceae	0,16	2,43	16,20	0,504	SuperNetwork	185	3700	5%	37%	4 až 128	Lysák et al., 2009
Liliaceae	3,40	89,20	26,00	6,73	převzali	78	NA	NA	je	8 až 56	Leitch et al., 2009
Curcuma	0,83	2,38	0,35	NA	není	51 taxonů 161 vzorků	cca 100	51%	Ve vzorku je pouze 1 diploid	22 až 105	Leong-Škorničková et al., 2007
Nicotiana	1,50	5,40	3,60	NA	převzali	18	75	24%	40%	24 nebo 48	Leitch et al., 2008

Tab. 4. Srovnání některých charakteristik několika vybraných studií. Uvedeny jsou minimální a maximální 1C-hodnota, rozpětí (= max1C/min1C), přítomnost C-hodnot v kontextu fylogenetického stromu, sekvence použité pro tvorbu stromu, počet zkoumaných objektů, počet druhů ve skupině, procentuální zastoupení vzorku, přítomnost polyploidie, počet chromozómů a trend ve změně velikosti genomu. Zdroj viz kap 3.2. „NA“ značí nedostupnost údaje, GS = genome size = velikost genomu, FS = fylogenetický strom. Trendy jsou rozdělené do skupin (1) = Příbuzné skupiny (jednotlivé klady) mají podobně velký genom, jiný trend přítomen není (2) = velikost genomu je více ovlivněna jiným faktorem než s fylogenezí (vypsáno slovně v tabulce) (3) nedávná redukce (4) víceméně zvětšující se genom.

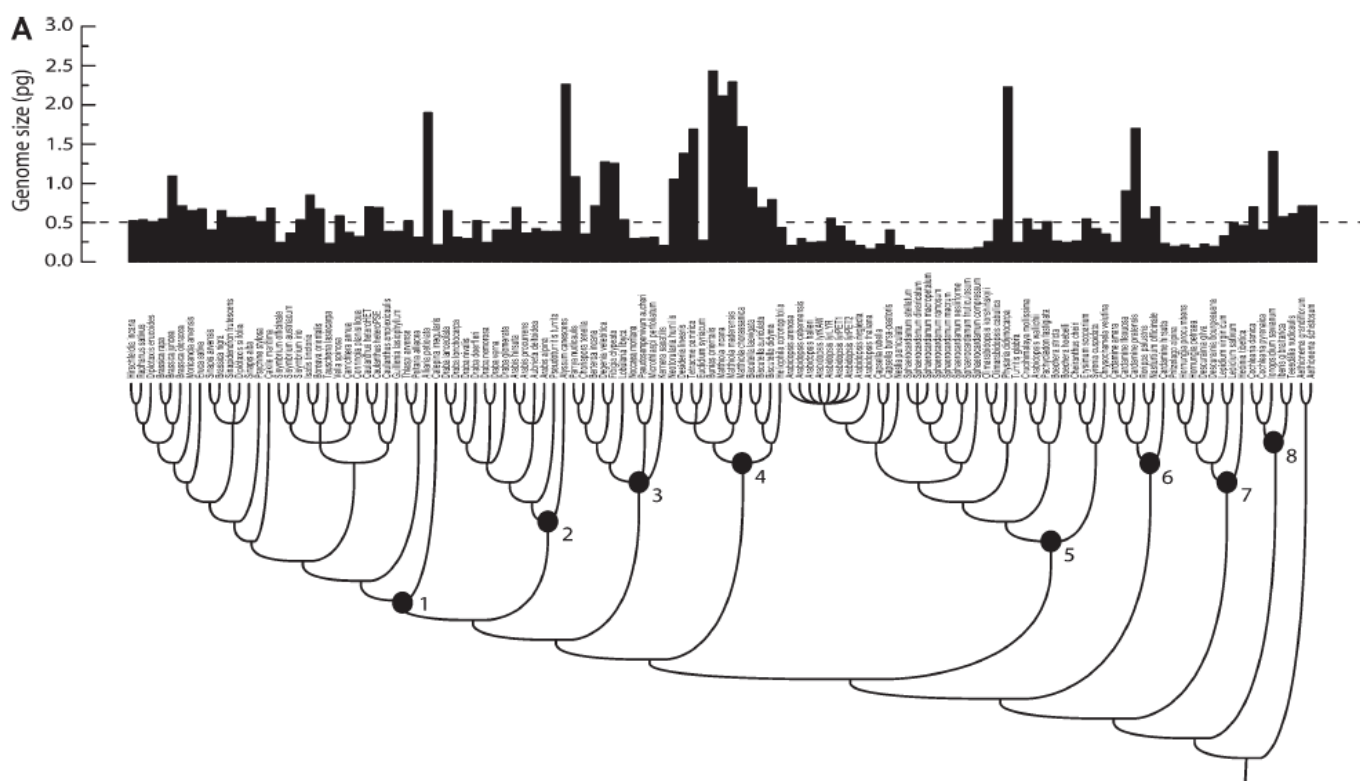
	min 1C (pg)	max 1C (pg)	Rozpětí	GS v kontextu FS	Sekvence pro tvorbu stromu	# objektů	# druhů skupiny	velikost vzorku (%)	polyploidie	2n	Trend změny
Orchidaceae	0,33	55,40	167,88	pro podčeleď	NA	327	25 000	1%	NA	18 až 170	1, 2 Větší genom u epifytů
Oncidiinae	1,70	4,65	2,74	ano	NA	54	1700	3%	NA	10 až 60	2 Menší genom u jednoletek a epifytů
Cypripedioiidae	6,10	34,53	5,66	ano	NA	27	59	46%	NA	18 až 42	4, 2 Fragmentace genomu (Robertsonova fúze)
<i>Lactuca</i>	1,10	8,98	8,16	není	---	25	100	25%	málo	16, 18, 34	1
<i>Sorghum</i>	0,64	5,15	8,11	ano	ITS, ndhF	21	25	84%	přítomná	10, 20, 30, 40	3, 2 Větší genom u trvalek
<i>Lupinus</i>	0,49	1,22	2,52	ano	ITS, rbcl	18	500	4%	častá	32 až 52	1
<i>Festuca</i>	1,94	4,89	2,52	ano	ITS, trnL-F	115	600	19%	70%	14 až 70	3
<i>Veronica</i>	0,32	2,26	7,06	ano	trnL-F	49	NA	NA	častá	12 až 64	2 Větší genom u trvalek a horských druhů
<i>Lasiocephalus</i>	6,91	11,35	1,67	ano	ITS	20	30	67%	přítomná	40	1 Větší genom u lián
<i>Narcissus</i>	7,00	19,00	2,71	není	---	36	87	41%	častá	10 až 75	1

3) V rámci fylogenetického stromu čeledi Liliaceae došlo ke dvěma výrazným událostem rozrůznění velikosti genomu a tím vzniku velkého rozpětí. Ostatní skupiny vykazují podobné genomy s malým rozpětím. Stejně tak fylogeneticky blízcí zástupci kurkumy vykazují podobně velký homoploidní genom, a navíc podobné geografické uskupení.

Nicotiana vykazovala po polyploidní události skoro stejně často pokles jako nárůst množství DNA. Tyto změny v rámci fylogenetického stromu nenasvědčují přítomnosti žádného zjevného trendu. Podobně v Brassicaceae polovina vzorku vykazovala zmenšení a polovina zvětšení genomu

oproti společnému předkovi. K výraznějšímu zvětšení došlo pouze ve dvou tribech. Evoluce se ukázala být dynamická, záhadou pak je malé rozpětí velikosti genomu čeledi. Tempo evoluce bylo určeno jako pasivní, odpovídající neutrální selekci. Ke změnám dochází nepoměrně rychleji v dlouhých větvích.

4) Pro Brassicaceae a Liliaceae byly použity rozsáhlejší statistické analýzy pro určení způsobu a rychlosti evoluce genomu. Lysák et al., 2009 poskytl velice názorné a přehledné vyjádření evoluce velikosti genomu ve fylogenetickém kontextu (Obr. 7). *Nicotiana* byla podrobena analýze speciálního vývoje z časového hlediska. Pro zjištění charakteru chromozómových přestaveb tetraploidů byla použita fluorescenční metoda GISH. Překvapivým objevem bylo časté zmenšení genomu po polyploidní události. Leong-Škorníčkové et al. (2007) se podařilo pracovat s obrovským vzorkem, kvalitně karyologicky zhodnotit taxon a navíc najít geografické souvislosti s genomovými charakteristikami. Lilie představují příklad skupiny s nenáhodným rozložením velikostí genomu.



Obr. 7 Rozložení C-hodnot 120 taxonů Brassicaceae vynesných na fylogenetický strom. Tečkováná linie představuje odhad velikosti genomu společného předka čeledi ($1C_{anc} = 0,504$ pg) (Lysák et al., 2009).



Obr. 8 Rozšíření čeledi Zingiberaceae (<http://www.mobot.org/mobot/research/APweb/orders/zingiberalesweb.htm>).

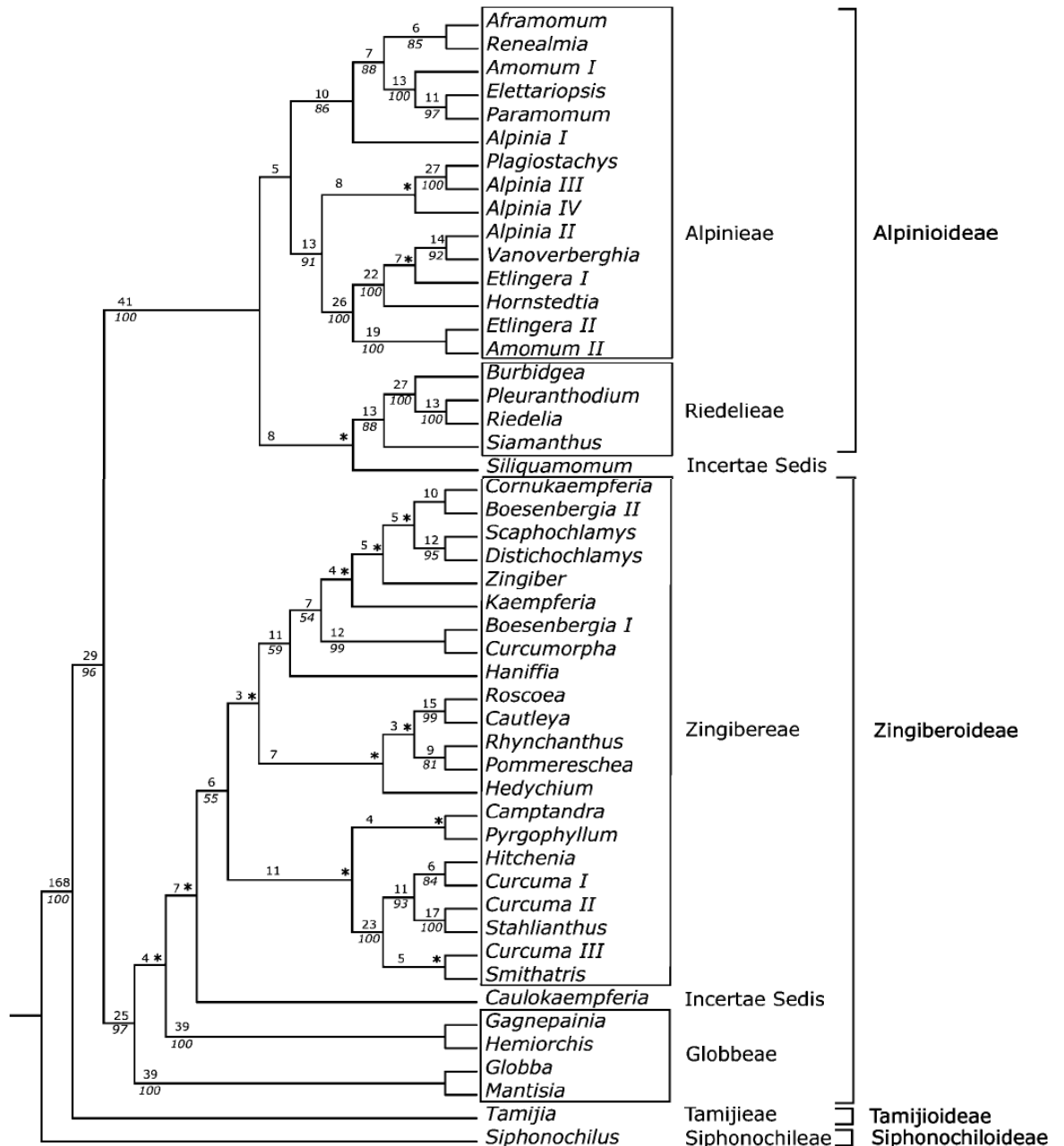
Pantropická čeleď Zingiberaceae zahrnuje 53 rodů a přes 1200 druhů s rozšířením v Asii a Tichomořských ostrovech, čtyřmi rody v Africe a jediným rodem v Neotropích (Obr. 8). Zázvorovitě jsou vytrvalé rostliny bylinného patra tropických lesů. Známé jsou i epifytické druhy. Ve vždyzeleném lese a v trvale zamokřených oblastech opadavého lesa si Zingiberaceae nechávají listy celoročně. V oblastech se suchým obdobím lesa listy shazují a přežívají v podobě podzemních kořenů. Čeleď má obrovský ekonomický význam. Zahrnuje druhy poskytující potraviny (zázvor, kurkuma, kardamon), barviva, léčiva i okrasné květiny (Burt & Smith, 1972).

Rozlišujeme čtyři podčeledi – dvě malé: Siphonochiloideae, Tamijioideae a dvě větší: Alpinioideae, Zingiberoideae. Nejaktuálnější fylogenetické poznatky o čeledi podává práce z roku 2002 (Kress et al. 2002). Na rozdíl od dřívějších taxonomických prací, které se zakládaly na morfologii, Kress a kolektiv používají především molekulární metody. Strom vytvořili metodou maximální parsimonie na základě ITS (internal transcribed spacer) a matK sekvencí (Obr. 9).

Počty chromozómu jsou v Zingiberaceae poměrně dobře prostudovány. Nejmenší počet známe u rodů *Mantisia* a *Boesenbergia* ($2n = 20$), největší u druhu *Curcuma raktakanta* ($2n = 105$) (Leong-Škorničková et al., 2007). Polyploidní komplexy v čeledi zázvorovitých nejsou vzácné, zjištěné jsou například v rodech *Curcuma* ($2n = 20, 24, 28, 32, 34, 36, 40, 42, 56, 62, 63, 64, 84$ a 86), *Globba* ($2n = 24, 32, 48, 64, 80, 96$), *Hedychium* ($2n = 24, 34, 68, 52, 56, 66$), *Kaempferia* ($2n = 22, 24, 33, 44, 48, 54$), *Boesenbergia* ($2n = 24, 36$), *Zingiber* ($2n = 22, 55, 66$) (Leong-Škorničková et al., 2007).

Rozpětí velikosti genomu v této čeledi známe od $1C = 1,3$ pg u *Curcuma zantorrhiza* do $6,03$ pg u *Zingiber officinale* (Leong-Škorničková et al., 2007). Nicméně faktem zůstává, že C-hodnot této čeledi je publikováno pramálo. Jediné uveřejněné údaje, kromě rozsáhlé studie kurkumy (viz 3.2.4.), jsou 4C-hodnoty pro *Amonum sublatum* ($4C = 5,88-6,22$ pg), *Zingiber officinale* ($4C = 10,15$ pg) a *Z. rubens* ($4C = 8,33$ pg) (Das et al., 1999).

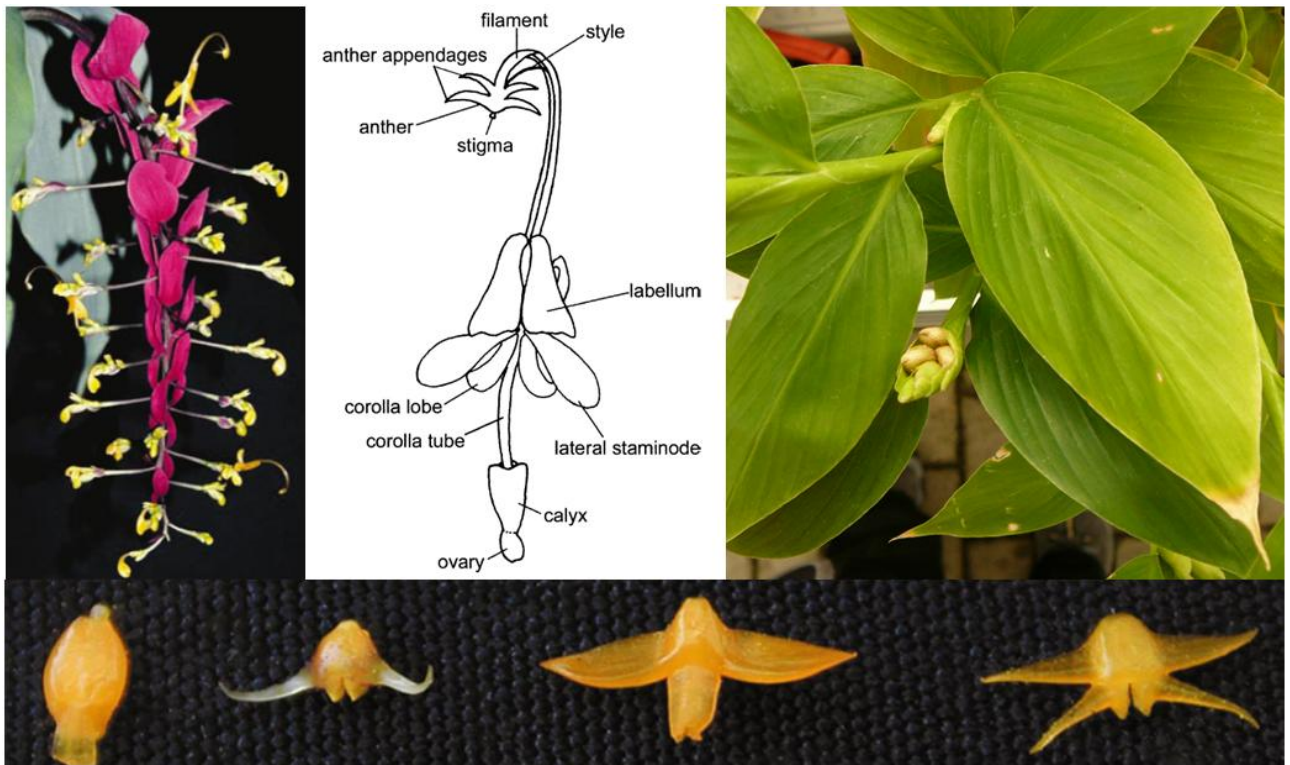
Všechny výše zmíněné vlastnosti činí čeleď Zingiberaceae ideálním objektem pro studium evoluce velikosti genomu. Tedy především existence fylogenetického stromu, znalost počtů chromozómů a ploidních stupňů, významnost a velikost čeledi. Navíc Pražská botanická zahrada (PBG) ve spolupráci s Královskou botanickou zahradou v Edinburgu (RBGE) a Singaporskou botanickou zahradou (SBG) poskytují dohromady poměrně kvalitní materiál zázvorovitých rostlin, což umožnilo české skupině se úkolu objasnění evoluce velikosti genomu v Zingiberaceae ujmout (Šída et al., in prep.). Já bych se ráda v příštích letech na tomto projektu podílela studiem evoluce velikosti genomu tribu Globbeae. V následující kapitole nastíním obsah své budoucí diplomové práce.



Obr. 9 Jeden z 980 stejně pravděpodobných stromů získaných metodou maximální parsimonie. Horní číslo udává délku větve, dolní je hodnota bootstrapu. Hvězdička označuje nody, které ve striktně konsenzuálním stromě kolabují (Kress et al., 2002).

4.1. Globbeae

Tribus Globbeae zahrnuje 4 rody: *Globba*, *Mantisia*, *Hemiorchis* a *Gagnepainia*. *Globba* patří s více než 100 druhy k jednomu z největších rodů v celé čeledi. Zbylé tři rody jsou druhově velmi chudé. Centrum rozšíření skupiny se nachází v jihovýchodní Asii (Obr. 10). Rozšíření *Globby* sahá od východních Himálajů a jižní Číny, přes Indii a Indočínu po Malaisii, s centrem v Thajsku (Larsen, 1996). Rod je rozčleněn do 4 sekcí: *Haplanthera*, *Cerantanthera*, *Globba* a *Nudae* (Obr. 11). Primárním diferenčním znakem je počet výčnělků na tyčinkách (Obr. 12).

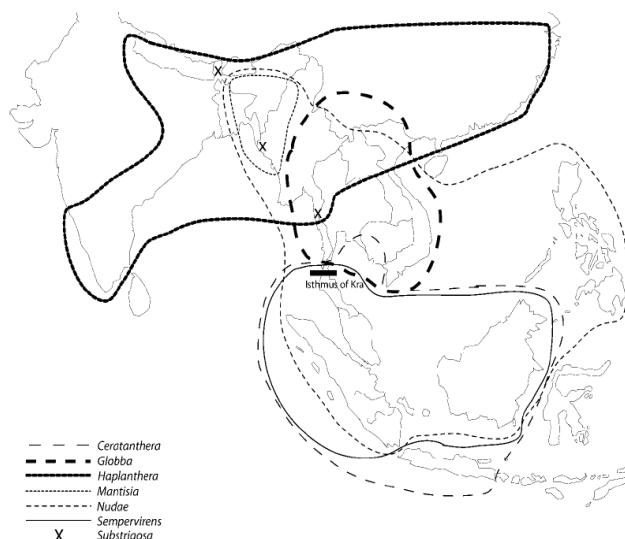


Obr. 12 *Globba*. Zleva květenství (Williams et al., 2004), morfologie květu (Takano & Okada, 2003), listy a rašící květenství (vlastní foto). Dole typy tyčinkových výčnělků (Williams et al., 2004).

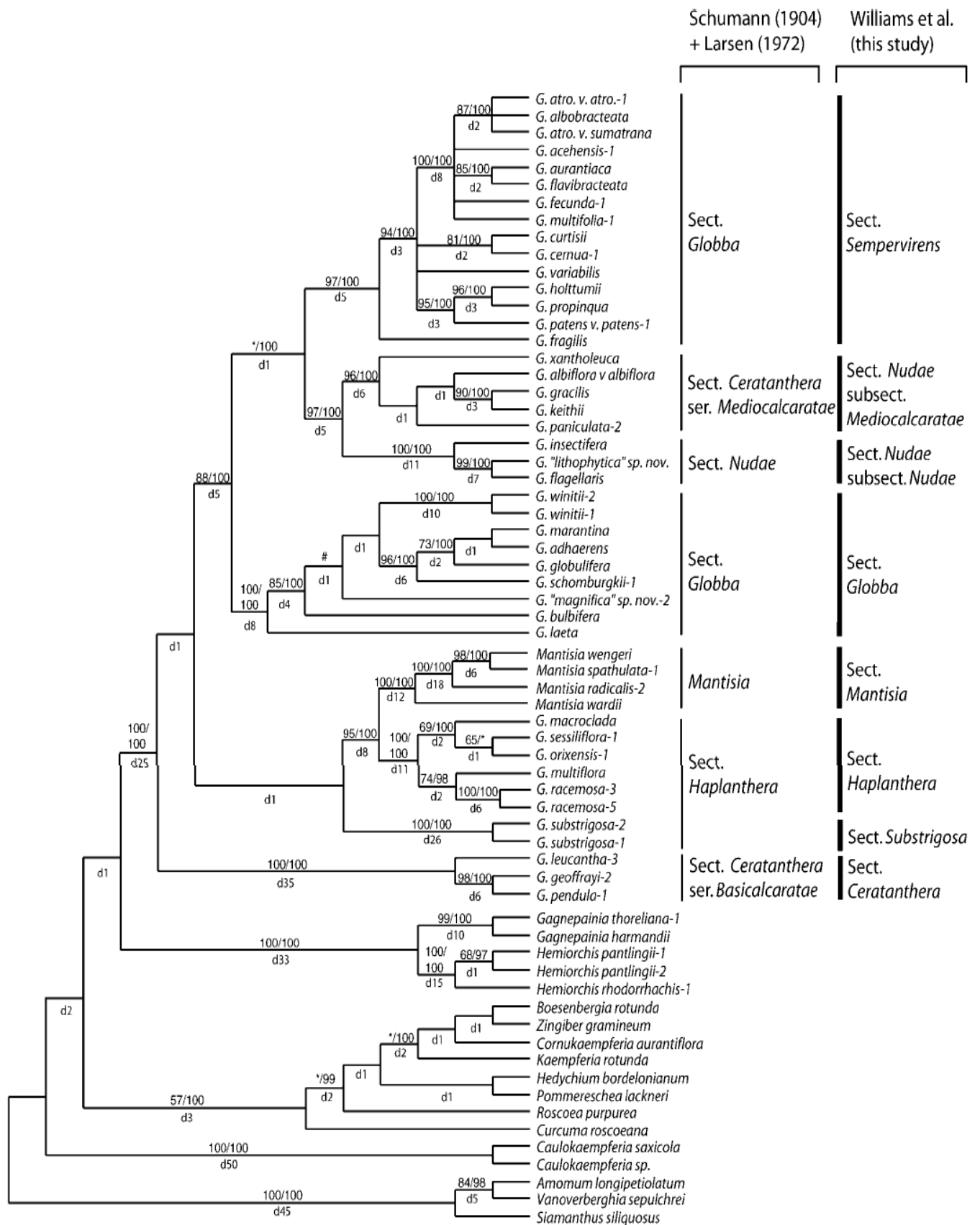
S rekonstrukcí evoluce velikosti genomu se pojí několik metodických přístupů, které budou provázet i moji diplomovou práci:

- (1) **Sekvenování** a následné zjišťování fylogenetických vztahů, porovnání s již existujícím stromem (Obr. 11; Williams et al., 2004),
- (2) **měření absolutní velikosti genomu** průtokovou cytometrií (zjištění 1C-hodnot),
- (3) **počítání chromozómů (ověření stupně polyploidie).**

Získané výsledky vynesu na fylogenetický strom a vyhodnotím dynamiku změn velikosti genomu. Objasnit by se měl i polyploidní scénář. Pokusím se odhalit i případné geografické souvislosti.



Obr. 10 Rozšíření rodu *Globba*. Mapa zobrazuje jihovýchodní Asii. Sekce Globby jsou znázorněny dle klíče (Williams et al., 2004).



Obř. 11 Striktní konsenzuální strom ze čtyř stromů získaných metodou maximální parsimonie z kombinovaných dat ITS-matK. Horní čísla představují bootstrap a Bayesian posterior probability, spodní Bremerovu podporu (Williams et al., 2004).

Evoluce velikosti genomu, ačkoli jde o hojně studovaný fenomén, stále oplývá mnoha nejasnostmi. Co je příčinou vysoké variability ve velikosti genomu přítomné téměř ve všech rostlinných skupinách? Spokojíme se s vysvětlením, že evoluce probíhala v různých liniích s různou intenzitou? Má tato variabilita nějakou vnitřní logiku nebo je dílem náhody? Proč vůbec tak vysoká variabilita vznikla, když velké genomy s sebou nesou téměř samá negativa? Je možné očekávat nějaké trendy ve změnách velikosti genomu? Pokud ano, tak jaké? A jsou předvídatelné? Tyto a mnohé další otázky jistě zodpoví čas - čas věnovaný dalšímu výzkumu mechanismů a trendů ve velikosti genomu jednotlivých skupin. Právě nedostatek informací o vývoji genomu v jednotlivých skupinách, jako jsou čeledi, triby nebo i velké rody, znemožňuje zobecnit tendence evoluce. A kdo ví, jestli se vůbec podaří nějaké obecné tendence prokázat. Dosavadní výzkumy se v tomto směru výrazně liší. Poměrně často se daří nalézat podobně velký genom u skupin, které jsou si blízké na fylogenetickém stromu (Doležalová et al., 2002; Naganovska et al., 2003; Zonneveld, 2008). Někdy je pozorovatelné mírné zvětšování genomu s evoluční odvozeností, ale často je následovné redukcí (Price et al., 2005; Šmarda et al., 2008; Lysák et al., 2009).

Tato práce se pokusila přehledně představit dosavadní úroveň poznání zvoleného tématu a zjednodušit tak základní orientaci v něm. Doufám, že má diplomová práce pozitivně přispěje k projektu evoluce velikosti genomu v Zingiberaceae (Šída et al., in prep.), a že ten, spolu s dalšími, pomůže vnést světlo do celé problematiky.

- Albach D. C., Greilhuber J. (2004):** Genome size variation and evolution in *Veronica*. *Ann. Bot.* 94: 897–911.
- Bailey C. D., Koch M. A., Mayer M., Mummenhoff K., O’Kane S. L., Warwick S. I., Windham M. D., Al-Shehbaz I. A. (2006):** Toward a global phylogeny of the Brassicaceae. *Mol. Biol. Evol.* 23: 2142–2160.
- Beaulieu J. M., Leitch I. J., Patel S., Pendharkar A., Knight C. A. (2008):** Genome size is a strong predictor of cell size and stomatal density in angiosperms. *New Phytol.* 179: 975–986.
- Beaulieu J. M., Moles A. T., Leitch I. J., Bennett M. D., Dickie J. B., Knight C. A. (2007):** Correlated evolution of genome size and seed mass. *New Phytol.* 173: 422–437.
- Bennett M. D., Leitch I. J., Hanson L. (1998):** DNA amounts in two samples of angiosperm weeds. *Ann. Bot.* 82: 121–134.
- Bennett M. D., Leitch I. J. (1997):** Nuclear DNA amounts in angiosperms - 583 new estimates. *Ann. Bot.* 80: 169–196.
- Bennett M. D., Leitch I. J. (2000):** Variation in nuclear DNA amount (C-value) in monocots and its significance. In: Wilson K. L., Morrison D. A., (eds), *Monocots: systematics and evolution*. Melbourne: CSIRO, 137–146.
- Bennett M. D., Leitch I. J. (2005):** Plant DNA C-values database (release 4.0, Oct. 2005) [Internet]. Available from: <http://www.kew.org/genomesize/homepage>.
- Bennett M. D. (1972):** Nuclear DNA content and minimum generation time in herbaceous plants. *Proc. R. Soc. B.* 181: 109–135.
- Bennett M. D. (1998):** Plant genome values: How much do we know? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 2011–2016.
- Bennett M. D. (1971):** Duration of meiosis. *Proc. R. Soc. B.* 178: 277–299.
- Bennett M. D., Smith J. B. (1991):** Nuclear DNA amounts in angiosperms. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 334: 309–345.
- Bennett M. D., Bhandol P., Leitch I. J. (2000):** Nuclear DNA amounts in angiosperms and their modern uses - 807 new estimates. *Ann. Bot.* 86: 859–909.
- Bennetzen J. L., Ma J., Devos K. M. (2005):** Mechanisms of recent genome size variation in flowering plants. *Ann. Bot.* 95: 127–132.
- Bennetzen J. L. (2002):** Mechanisms and rates of genome expansion and contraction in flowering plants. *Genetica* 115: 29–36.
- Bennetzen J. L., Kellogg E. A. (1997):** Do plants have a one-way ticket to genomic obesity? *Plant Cell* 9: 1509–1514.
- Burt B. L., Smith R. M. (1972):** Key species in the taxonomic history of Zingiberaceae. *Notes Roy. Bot. Gard. Edinburgh* 31: 177–228.
- Comai L. (2000):** Genetic and epigenetic interactions in allopolyploid plants. *Plant Mol. Biol.* 43: 387–399.
- Cox A. V., Abdelnour G. J., Bennett M. D., Leitch I. J. (1998):** Genome size and karyotype evolution in the slipper orchids (Cypripedioideae: Orchidaceae). *Am. J. Bot.* 85: 681–687.
- Cui L., Wall P. K., Leebens-Mack J. H., et al. (13 co-authors) (2006):** Widespread genome duplications throughout the history of flowering plants. *Genome Res.* 16: 738–749.
- Das A. B., Rai S., Das P. (1999):** Karyotype analysis and cytophotometric estimation of nuclear DNA content in some members of the Zingiberaceae. *Cytobios* 97: 23–33.
- Devos K. M., Brown J. K. M., Bennetzen J. L. (2002):** Genome size reduction through illegitimate recombination counteracts genome expansion in *Arabidopsis*. *Genome Res.* 12: 1075–1079.
- Doležalová I., Lebeda A., Janeček J., Čihalíková J., Krístková E., Vránová O. (2002):** Variation in chromosomes numbers and nuclear DNA contents in genetic resources of *Lactuca* L. Species (Asteraceae). *Gen. Res. Crop Evol.* 49: 383–395.

- Doležel J., Greilhuber J., Suda J. (2007):** Flow cytometry with plant cells. Wiley-VCH, Weinheim.
- Dušková E., Kolář F., Sklenář P., Rauchová J., Kubešová M., Fér T., Suda J., Marhold K. (2010):** Genome size correlates with growth form, habitat and phylogeny in the Andean genus *Lasiocephalus* (Asteraceae). *Preslia* 82: 127–148.
- Ekrat L., Holubová R., Trávníček P., Suda J. (2010):** Species boundaries and frequency of hybridization in the *Dryopteris carthusiana* (Dryopteridaceae) complex: a taxonomic puzzle resolved using genome size data. *Am. J. Bot.* 97: 1208–1219.
- Fedoroff N. (2000):** Transposons and genome evolution in plants. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 97: 7002–7007.
- Flavell R. (1980):** The molecular characterization and organization of plant chromosomal DNA sequences. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 31: 569–596.
- Gregory T. R. (2004):** Macroevolution, hierarchy theory, and the C-value enigma. *Paleobiology* 30 (2): 179–202.
- Greilhuber J., Doležel J., Lysák M. A., Bennett M. D. (2005):** The origin, evolution and proposed stabilization of the terms 'Genome size' and 'C-value' to describe Nuclear DNA contents. *Ann. Bot.* 95: 255–260.
- Greilhuber J., Borsch T., Müller K., Worberg A., Porembski S., Barthlott W. (2006):** Smallest angiosperm genomes found in Lentibulariaceae, with chromosomes of bacterial size. *Plant Biol.* 8: 770–777.
- Grover C. E., Yu Y., Wing R. A., Paterson A. H., Wendel J. F. (2008):** A phylogenetic analysis of indel dynamics in the cotton genus. *Mol. Biol. Evol.* 25: 1415–1428.
- Hawkins J. S., Grover C. E., Wendel J. F. (2008):** Repeated big bangs and the expanding universe: directionality in plant genome size evolution. *Plant Sci.* 174: 557–562.
- Hawkins J. S., Proulx S. R., Rapp R. A., Wendel J. F. (2009):** Rapid DNA loss as a counterbalance to genome expansion through retrotransposon proliferation in plants. *PNAS* 106 (42): 17811–17816.
- Hegarty M. J., Hiscock S. J. (2008):** Genomic clues to the evolutionary success of polyploid plants. *Curr. Biol.* 18: R435–R444.
- Holá D., Suda J., Kočová M., Rothová O., Salava J., Chodová D. (2007):** Endopolyploidy pattern and efficiency of photosynthetic electron transport in *Kochia scoparia* (L.) Schrad. biotypes resistant/sensitive to atrazine and/or ALS inhibitors. *Herbologia* 8/2: 71–83.
- Chase M. W., Hanson L., Albert V. A., Whitten W. M., Williams N. H. (2005):** Life history evolution and genome size in subtribe Oncidiinae (Orchidaceae). *Ann. Bot.* 95: 191–199.
- Jakob S. S., Meister A., Blattner F. R. (2004):** The considerable genome size variation of *Hordeum* species (Poaceae) is linked to phylogeny, life form, ecology, and speciation rates. *Mol. Biol. Evol.* 21: 860–869.
- Johnston J. S., Pepper A. E., Hall A. E., Chen Z. J., Hodnett G., Drabek J., Lopez R., Price H. J. (2005):** Evolution of genome size in Brassicaceae. *Ann. Bot.* 95: 229–235.
- Kellogg E. A., Bennetzen J. L. (2004):** The evolution of nuclear genome structure in seed plants. *Am. J. Bot.* 91: 1709–1725.
- Kidwell M. G. (2005):** Transposable elements. In: Gregory T. R. (ed), *The Evolution of the Genome*, 165–223, Elsevier.
- Knight C. A., Ackerly D. D. (2002):** Variation in nuclear DNA content across environmental gradients: A quantile regression analysis. *Ecol. Lett.* 5: 66–76.
- Knight C. A., Molinari N. A., Petrov, D. A. (2005):** The large genome constraint hypothesis: Evolution, ecology and phenotype. *Ann. Bot.* 95: 177–190.
- Kress W., Prince L. M., Williams K. J. (2002):** The phylogeny and a new classification of the gingers (Zingiberaceae): evidence from molecular data. *Am. J. Bot.* 89: 1682–1696.
- Kubátová B., Trávníček P., Bastlová D., Čurn V. & Suda J. (2008):** DNA-ploidy level variation in native and invasive populations of *Lythrum salicaria* L. (Lythraceae) at large geographic scale. *Journal of Biogeography* 35 (1): 167–176.
- Larsen K. (1996):** A preliminary checklist of the Zingiberaceae of Thailand. *Thai Forest Bulletin, Botany* 24: 35–49.

- Leitch I. J., Bennett M. D. (2004):** Genome downsizing in polyploid plants. – *Biol. J. Linn. Soc.* 82: 651–663.
- Leitch I. J., Beaulieu J. M., Cheung K., Hanson L., Lysak M., Fay M. F. (2007):** Punctuated genome size evolution in Liliaceae. *J. Evol. Biol.* 20: 2296–2308.
- Leitch I. J., Hanson L., Lim K. Y., Kovarik A., Chase M. W., Clarkson J. J., Leitch A. R. (2008):** The ups and downs of genome size evolution in polyploid species of *Nicotiana* (Solanaceae). *Ann. Bot.* 101: 805–814.
- Leitch I. J., Chase M. W., Bennett M. D. (1998):** Phylogenetic analysis of DNA C-values provides evidence for a small ancestral genome size in flowering plants. *Ann. Bot.* 82: 85–94.
- Leitch I. J., Kahandawala I., Suda J., et al. (2009):** Genome size diversity in orchids: consequences and evolution. *Ann. Bot.* 104: 469–481.
- Leitch I. J., Soltis D. E., Soltis P. S., Bennett M. D. (2005):** Evolution of DNA amounts across land plants (Embryophyta). *Ann. Bot.* 95: 207–217.
- Leitch I. J., Bennett M. D. (1997):** Polyploidy in angiosperms. *Trends in Plant Science* 2: 470–476.
- Leong-Škorničková J., Šída O., Jarolímová V., Sabu M., Suda J. (2007):** Chromosome numbers and genome size variation in Indian species of *Curcuma* (Zingiberaceae). *Ann. Bot.* 100: 505–526.
- Loureiro J., Suda J., Doležel J., Santos C. (2007):** FLOWER: A plant DNA flow cytometry database. – In: Doležel J., Greilhuber J., Suda J. (eds), *Flow cytometry with plant cells*, 423–438, Wiley-VCH, Weinheim.
- Lysák M. A., Koch M. A., Beaulieu J. M., Meister A., Leitch I. J. (2009):** The Dynamic Ups and Downs of Genome Size Evolution in Brassicaceae. *Mol. Biol. Evol.* 26 (1): 85–98.
- Ma J. X., Devos K. M., Bennetzen J. L. (2004):** Analyses of L1retrotransposon structures reveal recent and rapid genomic DNA loss in rice. *Genome Res.* 14: 860–869.
- Maddison W. P., Maddison D. R. (1992):** *Macclade: Analysis of Phylogeny and Character Evolution*. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA, USA.
- Mahelka V., Suda J., Jarolímová V., Trávníček P., Krahulec F. (2005):** Genome size discriminates between closely related taxa *Elytrigia repens* and *E. intermedia* (Poaceae: Triticeae) and their hybrid. *Folia Geobotanica* 40/4: 367–384.
- McFadden E. S., Sears E. R. (1946):** The origin of *Triticum spelta* and its free-threshing hexaploid relatives. *J. Hered.* 37: 81–89, 107–116.
- Morgante M. (2006):** Plant genome organisation and diversity: the year of the junk! *Curr. Opin. Biotechnol.* 17: 168–173.
- Murray B. G., Weir I. E., Ferguson A. R., de Lange P. J. (2003):** Variation in C-value and haploid genome size in New Zealand native grasses. *New Zealand Journal of Botany* 41: 63–69.
- Naganowska B., Wolko B., Sliwinska E., Kaczmarek Z. (2003):** Nuclear DNA content variation and species relationships in the genus *Lupinus* (Fabaceae). *Ann. Bot.* 92: 349–355.
- Ohri D. (2005):** Climate and growth form: the consequences for genome size in plants. *Plant Biol.* 7: 449–458.
- Ohri D. (1998):** Genome size and plant systematics. *Ann. Bot.* 82 (Supplement A): 75–83.
- Patrushev L. I., Minkevich I. G. (2008):** The problem of the eukaryotic genome size. *Biochemistry (Mosc)* 73: 1519–1552.
- Petrov D. A. (2001):** Evolution of genome size: New approaches to an old problem. *Trends Genet.* 17: 23–28.
- Piegu B., Guyot R., Picault N., Roulin A., Saniyal A., Kim H., Collura K., Brar D.S., Jackson S., Wing R.A., Panaud, O. (2006):** Doubling genome size without polyploidization: Dynamics of retrotransposition-driven genomic expansions in *Oryza australiensis*, a wild relative of rice. *Genome Res.* 16: 1262–1269.
- Price H. C., Dillon S. L., Hodnett G., Rooney W. L., Ross L., Johnston J. S. (2005):** Genome evolution in the genus *Sorghum* (Poaceae). *Ann. Bot.* 95: 219–227.
- Rabinowicz P. D. (2000):** Are obese plant genomes on a diet? *Genome Res.* 10: 893–894.

- Ramsey J., Schemske D. W. (1998):** pathways, mechanisms, and rates of polyploid formation in flowering Plants. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 29: 467–501.
- Ross-Ibarra J. (2007):** Genome size and recombination in Angiosperms: a second look. *J. Evol. Biol.* 20: 800–806.
- Shirasu K., Schulman A. H., Lahaye T., Schulze-Lefert P. (2000):** A contiguous 66-kb barley DNA semence provides evidence for reversible genome expansion. *Genome Res.* 10: 908–915.
- Soltis D. E., Soltis P. S., Bennett M. D., Leitch I. J. (2003):** Evolution of genome size in the angiosperms. *Am. J. Bot.* 90: 1596–1603.
- Soltis D. E., Soltis D. E., Albert V. A., Leebens-Mack J., Bell Ch. D., Paterson A. H., Zheng Ch., Sankoff D., Depamphilis C. W., Wall P. K., Soltis P.S. (2009):** Polyploidy and angiosperm diversification. *Am. J. Bot.* 96: 336–348.
- Song K. M., Lu P., Tang K. L., Osborn T. C. (1995):** Rapid genome change in synthetic polyploids of *Brassica* and its implications for polyploid evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92: 7719–7723.
- Suda J., Malcová R., Abazid D., Banaš M., Procházka F., Šída O., Štech M. (2004):** Cytotype distribution in *Empetrum (Ericaceae)* at various spatial scales in the Czech Republic. *Folia Geobotanica* 39/2: 161–171.
- Stace C. A. (2000):** Cytology and cytogenetics as a fundamental taxonomic resource for the 20th and 21st centuries. *Taxon* 49: 451–477.
- Šída O. (in prep.)**
- Šmarda P., Bureš P., Horova L., Foggi B., Rossi G. (2008):** Genome size and GC content evolution of *Festuca*: ancestral expansion and subsequent reduction. *Ann. Bot.* 101: 421–433.
- Šmarda P., Bureš P. (2010):** Understanding intraspecific variation in genome size in plants. *Preslia* 82: 41–61.
- Takano A., Okada H. (2003):** Taxonomy of *Globba* (Zingiberaceae) in Sumatra, Indonesia. *Syst. Bot.* 28: 524–46.
- Thomas C. A. (1971):** The genetic organization of chromosomes. *Ann. Rev. Gen.* 5: 237–256.
- Town C. D., Cheung F., Maiti R., et al. (13 co-authors) (2006):** Comparative genomics of *Brassica oleracea* and *Arabidopsis thaliana* reveal gene loss, fragmentation, and dispersal after polyploidy. *Plant Cell.* 18: 1348–1359.
- Vinogradov A. E. (2003):** Selfish DNA is maladaptive: Evidence from the plant Red List. *Trends Genet.* 19: 609–614.
- Vinogradov A. E. (2004):** Evolution of genome size: Multilevel selection, mutation bias or dynamical chaos? *Curr. Opin. Genet. Dev.* 14: 620–626.
- Vitte C., Bennetzen J. L. (2006):** Analysis of retrotransposon structural diversity uncovers properties and propensities in angiosperm genome evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103: 17638–17643.
- Vitte C., Panaud O. (2003):** Formation of solo-LTRs through unequal homologous recombination counterbalances amplifications of LTR retrotransposons in rice *Oryza sativa* L. *Mol. Biol. Evol.* 20: 528–540.
- Vitte C., Panaud O. (2005):** LTR retrotransposons and flowering plant genome size: emergence of the increase/decrease model. *Cytogenetic and Genome Res.* 110: 91–107.
- Weiss-Schneeweiss H., Greilhuber J., Schneeweiss G. M. (2005):** Genome size evolution in holoparasitic *Orobanche* (Orobanchaceae) and related genera. *Am. J. Bot.* 93: 148–156.
- Wendel J. F., Cronn R. C., Johnston J. S., Price H. J. (2002):** Feast and famine in plant genomes. *Genetica* 115: 37–47.
- Williams K. J., Kress J. W., Manos P. S. (2004):** The phylogeny, evolution and classification of the genus *Globba* and the tribe Globbeae (Zingiberaceae): appendages do matter. *Am. J. Bot.* 91: 100–114.
- Zonneveld B. J. M. (2008):** The systematic value of nuclear DNA content for all species of *Narcissus* L. (Amaryllidaceae). *Plant Syst. Evol.* 275 (1–2): 109–132.

<http://www.mobot.org/mobot/research/APweb/orders/zingiberalesweb.htm>

Příloha č. 1.

$2n$ (5)
Alternation of generations (13)
Alternation of nuclear phases (10)
C-value (23)
Cx-value (25)
Chromosome complement (1)
Chromosome set (2)
Diploid (7)
Endopolyploid (9)
Endospermic (16)
Gametophytic (15)
Genome (nuclear) (17)
Genome size (22)
Haploid (6)
Holoploid genome (19)
 n (4)
Monoploid genome (18)
Non-reduced (12)
Nuclear DNA amount (21)
Nuclear DNA content (21)
Polyploid (8)
Polyploid genome (20)
Reduced (11)

Sporophytic (14)
 x (3)

Definitions of terms in a logical order

(See index above for terms in alphabetical order)

- 1. Chromosome complement (Darlington, 1932):** The endowment of an organism with chromosomes as typically found after fertilization (in number $2n$) or after meiosis (in number n).
- 2. Chromosome set (Dyer *et al.*, 1970):** the chromosomes of a monoploid genome, their number being indicated by x .
- 3. x :** symbol for the chromosome number of the monoploid genome and for the chromosome base number in a generatively polyploid series of related organisms.
- 4. n :** symbol for the meiotically reduced (haplophasic) chromosome number of any organism, generatively polyploid or not.
- 5. $2n$:** symbol for the non-reduced (diplophasic, zygotic) chromosome number.
- 6. Haploid:** (1) the lowest recognized level of generative polyploidy in haplophase, where $n = x$ (e.g. a 'haploid' moss); (2) the meiotically reduced (haplophasic) chromosome number n .
- 7. Diploid:** (1) level of generative polyploidy in haplophase, where $n = 2x$ (e.g. a 'diploid' moss); (2) the lowest recognized level of generative polyploidy in diplophase, where $2n = 2x$ (e.g. a 'diploid' grass); (3) the non-reduced (zygotic, diplophasic) chromosome number $2n$.
- 8. Polyploid:** (1) level of generative polyploidy in haplophase, where n is a multiple of x ; (2) level of generative polyploidy in diplophase, where $2n$ represents multiples of x higher than $2x$; (3) shortcut for somatically polyploid, endopolyploid or endoreduplicated.
- 9. Endopolyploid:** status of nuclei that have undergone endocycles of replication.
- 10. Alternation of nuclear phases:** alternation of n and $2n$ by meiotic reduction and fertilization.
- 11. Reduced:** in nuclear phase with chromosome number n (haplophase).
- 12. Non-reduced:** in nuclear phase with chromosome number $2n$ (diplophase).
- 13. Alternation of generations ('primary a. of g.')**: alternation of gametophyte and sporophyte(s), usually but not necessarily connected with alternation of nuclear phases. (Exceptions, e.g. in apomicts, in which non-reduced embryo-sacs alternate with non-reduced sporophytes.)
- 14. Sporophytic:** belonging to the sporophyte in plants, which is in general but not necessarily non-reduced (diplophasic).
- 15. Gametophytic:** belonging to the gametophyte in plants, which is in general, but not necessarily reduced (haplophasic).
- 16. Endospermic:** belonging to the endosperm in angiosperms, which has variable initial chromosome numbers, given as multiples of n , dependent on the embryo-sac type and variations of the fertilization process.
- 17. Genome (nuclear):** covering term including the chromosome complement and its DNA characteristic for an organism and, in polyploid organisms, also a monoploid chromosome set of the complement and its DNA.
- 18. Monoploid genome:** one chromosome set of an organism and its DNA having the chromosome base number x .
- 19. Holoploid genome:** the whole chromosome complement (with chromosome number n) and its DNA characteristic for the organism, irrespective of the degree of generative polyploidy, aneuploidies, etc.
- 20. Polyploid genome:** a generatively polyploid chromosome complement of an organism and its DNA with the chromosome number n being multiples of x , or being derived from such a multiple.
- 21. Nuclear DNA content or amount:** the amount of DNA in any given cell nucleus irrespective of the state of replication, degree of endopolyploidy, etc.
- 22. Genome size:** covering term for the amount of DNA in the holoploid genome of an organism and also in the monoploid constituent genomes in polyploids.
- 23. C-value:** DNA content of a holoploid genome with chromosome number n ; abbreviation for holoploid genome size.
- 24. 1C-value:** DNA content of one non-replicated holoploid genome with the chromosome number n . Also the half of a non-replicated holoploid non-reduced genome with the chromosome number $2n$.
- 25. Cx-value:** DNA content of a monoploid genome with chromosome base number x ; abbreviation for monoploid genome size.
- 26. 1Cx-value:** DNA content of one non-replicated monoploid genome with chromosome number x .

(Greilhuber *et al.* 2005)