

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory

Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Tereza Vaňková

Mechanismy chromozómových přestaveb a jejich souvislost se vznikem polyploidních druhů

Mechanisms of chromosome rearrangements and their relation to the formation of polyploid species

Bakalářská práce

Vedoucí závěrečné práce: Ing. Martin Knytl, Ph. D.

Praha, 2019

Poděkování:

Ráda bych poděkovala svému školiteli Martinu Knytlovi za jeho trpělivost a vstřícnost.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 10.1. 2019

Abstrakt

Polyploidní druhy jsou výrazně zastoupeny mezi rostlinami, ale své významné, nicméně méně početné místo mají i u živočichů. Polyploidizace je nestabilní proces, při kterém dochází k rychlým změnám genomu a chromozómů. Mezi tyto změny se řadí nejrůznější chromozómové mutace, jako jsou translokace, duplikace, inserce a inverze. Stejně jako chromozómové aberace, tak WGD (whole-genome duplication) neodmyslitelně zastupují své místo v evoluci organismů, a proto je studium jejich mechanismů důležité pro správné pochopení vývoje genomů. V současnosti dochází k významnému rozvoji cytogenetických technik napomáhajících studium polyploidních genomů a připívajících k zařazování polyploidizačních událostí do evolučních souvislostí. Mezi tyto techniky patří pruhování a také fluorescenční *in situ* hybridizace, která díky využitelnosti nejrůznějších sond velmi účinně napomáhá v odhalování chromozomálních přestaveb.

Klíčová slova: chromozómové přestavby, polyploid, WGD, cytogenetické techniky, FISH

Abstract

Polyploid species are significantly represented among plants and some animals. Whole-genome duplication (WGD) is an unstable process with rapid changes in a genome and also changes in chromosomes. These changes includes chromosomal aberrations, such as translocations, duplications, insertion and inversions. Chromosomal aberrations and WGD are strongly represented in the evolution of organisms. Therefore the study of their mechanisms is important for an understanding of genomic development. At present, there are developments in cytogenetic technique helping study polyploid genomes and also helping add polyplodozation events to evolutionary contexts. These techniques includes banding as well as fluorescent *in situ* hybridization, which, thanks to the applicability of various probes, helps to detected chromosomal rearrangements.

Keywords: Chromosome rearrangements, polyploid, WGD, cytogenetic techniques, FISH

Obsah

1	Úvod.....	1
2	Mutace a jejich dělení	2
3	Chromozómové přestavby a jejich dělení	3
3.1	Translokace.....	3
3.2	Duplikace.....	3
3.3	Delece	5
3.4	Inserce.....	5
3.5	Inverze.....	5
3.6	Izochromozom	5
3.7	Ring chromozóm.....	5
3.8	Marker chromozóm	5
4	Polyploidizace.....	7
4.1	Polyploidizace u rostlin.....	7
4.2	Polyploidizace u živočichů.....	12
5	Cytogenetické metody zabývající se detekcí chromozómových přestaveb a polyploidizačních událostí.....	15
5.1	Pruhování.....	15
5.2	FISH	16
5.2.1	Tyr-FISH.....	17
5.2.2	Zoo-FISH	17
5.2.3	GISH	17
5.3	CGH.....	18
6	Závěr	20
7	Seznam zkratek	21
8	Seznam literatury	22

1 Úvod

Život na naší planetě je specifický svou rozmanitostí a různorodostí organismů, které mají rozdílné genotypy i fenotypy. Genotypy jsou určovány geny a ty zase strukturou DNA, která v průběhu evoluce podléhá početným změnám a vývoji, tyto změny nazýváme mutace. Vzhledem k tomu, že mutace v evoluci jsou předávány do dalších generací geneticky, je zkoumání zákonitostí těchto změn klíčové v pochopení současných genomů.

Deoxyribonukleová kyselina je sekvence nukleotidů nesoucí informaci řídící transkripci a translaci, tyto informace jsou na DNA uloženy v genech, které kódují vznik funkčních makromolekul. Genetická výbava jedince podléhá mutacím v různých úrovních od změn nukleotidů, které vedou ke změnám genů až po mutace na úrovni chromozómů a celých genomů.

Chromozómové přestavby jsou mutace, při kterých dochází ke strukturním změnám chromozómu. Tyto změny jsou děleny podle toho, zda je během nich zachováno původní množství genetického materiálu či nikoliv. Kromě strukturních změn chromozómu rozlišujeme i numerické změny označovány jako mutace na genomové úrovni, mezi které řadíme polyploidie a aneuploidie. Skupina těchto chromozómových a genomových abnormalit je velmi početná a má rozdílně klinické významy. Může se jednat jak o takřka žádné fenotypové projevy, tak i rozsáhlé poruchy, v jiných případech jsou tyto změny neslučitelné s životem. Nelze však popřít klíčový význam chromozómalních abnormalit během evoluce, kde nalézáme důkazy o vzniku nových druhů organismů právě díky mutacím ať už jen části chromozómu či celého genomu. Tyto důkazy je možné objevovat a potvrzovat díky rozvoji cytogenetických metod výzkumu.

Mnohdy jsou také polyploidizační události, které vedou ke znásobení genomů, doprovázeny změnami chromozómu v důsledku velké nestability takového genomu a zástupce polyploidních druhů nalézáme v různém spektru rostlin i živočichů. Je snadno představitelné, že vzájemná spolupráce polyploidizačních událostí, chromozómových přestaveb a přírodního výběru vedla ke vzniku mnoha evolučních výhod a vylepšení u různých organismů a nepochybně se tyto události staly pravou rukou evoluce samotné.

Cílem této práce je na základě dostupných publikací shrnout chromozómové přestavby a jejich případnou souvislost se vznikem polyploidních druhů jak rostlinné, tak i živočišné říše. Dalším cílem je uvést cytogenetické metody a způsoby odhalování chromozómových přestaveb a polyploidizací.

2 Mutace a jejich dělení

Pojem mutace si většinou každý dokáže správně zařadit jako změnu genotypu. Nicméně mutací je nepřeberné množství, a proto je žádané a pro lepší orientaci i nutné je dělit několika možnými způsoby, jedním z těchto způsobů dělení je na spontánní (které vznikají zcela náhodně například chybou replikačních mechanismů) a indukované (do této skupiny se řadí mutace vyvolány za použití známých mutagenů). Indukovaná mutagenese se využívá v celém spektru odvětví molekulární biologie a genetiky a v současné době nám již v rámci etických pravidel dovoluje nejrůznější úpravy a zásahy do genomů.

Další možné dělení mutací je podle místa působení na genomové, do kterých řadíme polyploidie a aneuploidie. Během polyploidizace dochází k znásobení celého genomu, aneuploidie je znásobení pouze některého z chromozómu (např. trisomie), polyploidii se v této práci budeme zabývat i dále, aneuploidie je pro člověka významná převážně kvůli možným genetickým poruchám a vývojovým vadám způsobující syndromy, jako je například dobře známý Downův syndrom neboli trisomie 21. chromozómu. Dalšími mutacemi podle místa působení jsou mutace na chromozómové úrovni, jedná se o tzv. chromozómové přestavby (viz níže). Dále jsou mutace na genové úrovni, během kterých dochází k mutacím konkrétních genů. Genové mutace, které se týkají jednoho nukleotidu se nazývají bodové, mohou vzniknout jak v kódujících, tak i v nekódujících oblastech na řetězci DNA. Podle mechanismu genových mutací rozlišujeme adice, kdy dochází k zařazení jednoho nebo více nadbytečných nukleotidových párů a může docházet k posunu čtecího rámce a následné syntéze zcela odlišného polypeptidu. Dochází také k delecí neboli ztrátě jednoho nebo více nukleotidového páru, také může vést k posunu čtecího rámce. Dalším možným mechanismem je substituce neboli záměna nukleotidů, zde se uvádí dělení na tranzice, během kterých dochází k záměně purinové báze za jiný purin nebo pyrimidin za jiný pyrimidin, a transverze, během kterých dochází k záměně purinové báze za pyrimidinovou a naopak. Jednotlivé genové mutace mohou vést k různým následkům, a to mutace měnící smysl (missense), kdy dojde k záměně kodonu pro jednu aminokyselinu za druhou, mutace neměící smysl (silent mutation), při kterých dochází k synonymní nebo neutrální substituci AMK a nesmyslné mutace (nonsense), které zapříčiní vznik terminačního kodonu a syntéza polypeptidu není dokončena.

U organismů můžeme také rozdělovat mutace na somatické a gametické, podle toho, o jaký typ chromozómu se jedná. Mutace v somatických buňkách se nepřenáší na další generace, nicméně mohou vést k nádorovým onemocněním. Nebezpečí u mutací v gametických buňkách spočívá v tom, že po oplození takové buňky se mutace objeví ve všech buňkách vznikajícího organismu a může se přenášet i do dalších generací.

3 Chromozómové přestavby a jejich dělení

Chromozómové přestavby jsou důsledkem nestability genetického materiálu. Mohou být způsobeny například tzv. klastogeny (mutageny způsobující zlomy chromozómů) nebo také chybami replikačních mechanismů. Jedno z možných dělení těchto přestaveb je na balancované a nebalancované. Pokud dojde k balancované strukturní změně chromozómu, celkové množství genetického materiálu se nemění a nemusí tedy nutně docházet ke klinickým projevům, avšak tyto projevy se mohou vyskytnout v potomstvu, kde už se mohou objevit v nebalancované formě. Další možné dělení chromozómových strukturních aberací je podle toho, jakým mechanismem přestavba vzniká. Může se jednat například o duplikace, kdy dochází ke zdvojení části genetického materiálu na raménku chromozómu, delece, při kterých určité části chromozómů zaniknou, nebo mohou nastat inserce či translokace. Některé z těchto mutací budou dále popsány podrobněji.

3.1 Translokace

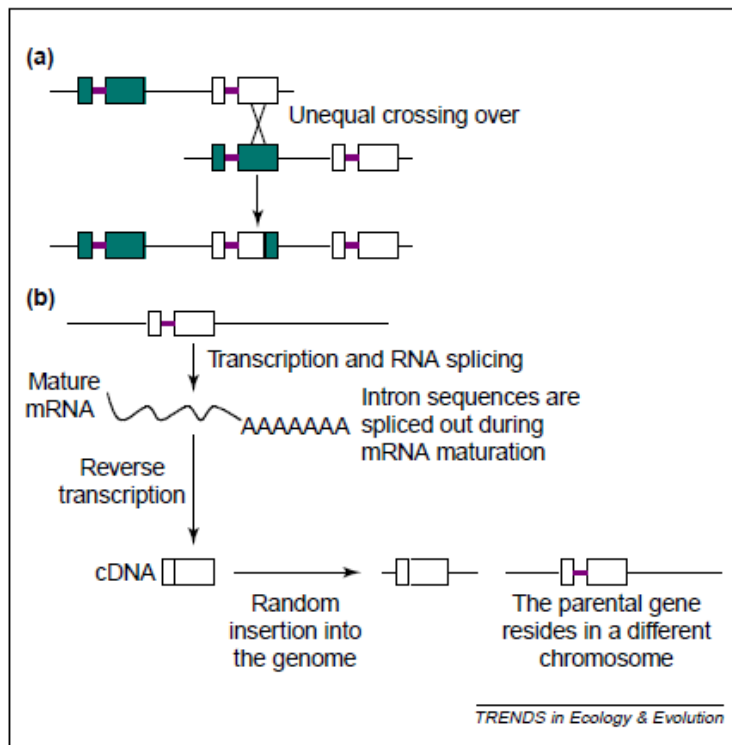
Jedna z běžných strukturních změn chromozómu je translokace. K této abnormalitě chromozómu dochází po dvou-řetězcovém zlomu (double-strand break - DSB) dsDNA při spojování částí chromozómů mezi nehomologními chromozómy (Richardson, Moynahan, & Jasin, 1998). Také bylo dokázáno již dříve, že DSB indukující činidla jako jsou ionizační záření, UV světlo a chemické mutageny mohou vést k translokacím (Janssen & Medema, 2013). Často však dochází k DSB během replikace DNA (Haber, 1999), proto je nutné, aby měla buňka reparační systém. Translokace mají své dělení na reciproké, které jsou podmíněny zlomem nehomologních chromozómů a následnou výměnou oddělných částí a Robertsonské, které jsou definovány jako fúze dvou akrocentrických chromozómů po ztrátě krátkých ramének (Otová et al., 2015). Balancované reciproké translokace většinou neovlivňují fenotyp organismu, ale jsou i výjimky, které podléhají efektu pozice, což znamená, že dojde k přemístění genu na určité místo, kde bude podléhat regulačním vlivům jiného genu (Otová et al., 2015).

3.2 Duplikace

Dalším příkladem chromozómových aberací, při kterých v tomto případě dochází k zachování celkového počtu chromozómů, avšak zdvojení části chromozómu, jsou genové duplikace. První zmínky o genové duplikaci a jejich souvislosti s evolucí pocházejí již z roku 1936, Bridges publikoval vzácnou tandemovou duplikaci pro velikost očí u octomilky (*Drosophila melanogaster*), poukazoval na spojitost mezi genovou duplikací a morfologickými změnami (Bridges, 1936). Se svou teorií přišel roku 1970 genetik Ohno, který prohlásil, že duplikace genů je hlavním hybatelem evoluce v knize „Evoluce genovou duplikací“.

Genová duplikace může nastat při nerovnoměrném crossing-overu nebo retropozici. Když při crossing-overu dochází k tandemové duplikaci vícera genů, znamená to, že geny jsou na

chromozómu spojeny (Yang, Takuno, Waters, & Gaut, 2011). Tandemové duplikace jsou příčinou vzniku například známé genové rodiny Hox-genů (Holland a Takahashi, 2005). V závislosti na poloze crossing-overu může docházet k zdvojení části genu, celého genu nebo i několika genů. Pokud jsou v původních genech přítomny introny, budou také duplikovány – na rozdíl u retropozice (Zhang, 2003).



Na obrázku 2 jsou znázorněny dva běžné modely duplikace. Schéma 2(a) znázorňuje nerovnoměrný crossing-over, jehož výsledkem je rekombinace, ve kterém jsou rekombinantní místa neidentická k oběma rodičovským DNA molekulám. Schéma 2(b) znázorňuje retropozici, ke které dochází je-li mRNA retrotranskribována do komplementární DNA (cDNA) a pak vložena do genomu (obdélníky na obrázku jsou exony, tučné čáry introny). Obrázek převzat a upraven podle Zhang (2003).

Obrázek 1-duplikace

Retropozice (která je znázorněna na obrázku 2 b)) nastává, když je mRNA reverzně transkribována – přepsána do komplementární DNA a poté vložena do genomu. Dochází ke ztrátě intronů a regulačních sekvencí, přítomnosti poly A sekvencí a k přítomnosti krátkých specifických repetitivních (Zhang, 2003). Další velký rozdíl oproti nerovnoměrnému crossing-overu je, že duplikovaný gen je odpojen od původního genu, protože vložení cDNA do genomu je víceméně náhodné (Zhang, 2003). Duplikace se vyskytují u jedince a mohou být udrženy nebo ztraceny v populaci, podobně jako bodové mutace (Yang et al., 2011). Pokud je nově vzniklá alela selektivně neutrální, má jen velmi malou pravděpodobnost, že se udrží v populaci, konkrétně $1/2N$, kde N je efektivní velikost populace. To naznačuje, že většina duplikací je v evoluci ztracena a jejich fixace je časově náročná (Zhang, 2003).

3.3 Delece

Delece jsou chromozómové přestavby, při nichž dojde ke ztrátě části chromozómu, a to ať už konců či prostředních částí ramének, jedná se o nebalancovanou přestavbu. Delece mohou vzniknout jedním zlomem chromozómu a ztrátou acentrické koncové části, ty nazýváme terminální, případně může docházet ke ztrátě části chromozómu mezi dvěma zlomy neboli intersticiální delece (Otová et al., 2015). Další chromozómové přestavby, které jsou spojené s delecí jsou ring chromozóm, izochromozom a dicentrický chromozóm, ten vzniká zlomem obou chromatid dvou chromozómů, následným spojením a ztrátou acentrických fragmentů.

3.4 Inserce

Během inserce dochází k vložení části chromozómu, podle toho odkud pochází daná sekvence a kam se následně vkládá dochází k určitému počtu zlomů. Může například dojít ke třem zlomům, dva na jednom chromozómu, který bude insert poskytovat a jeden zlom na raménku chromozómu, do kterého je insert vložen. Jiný počet zlomů nastane, pokud dojde k odštěpení telomerických částí chromozómu, případně pericentromerických oblastí.

3.5 Inverze

Inverze je otočení části raménka chromozómu, nastává jako důsledek dvou zlomů na jednom raménku chromozómu. Jedná se o balancovanou přestavbu. Může docházet k otočení úseku, který zahrnuje část obou ramének i centromeru (případně jedno raménko a centromeru), taková inverze se nazývá pericentrická. Pokud se týká pouze jednoho raménka, jedná se o inverzi paracentrickou.

3.6 Izochromozom

Tento jev vzniká během mitotického dělení při rozestupu chromozómů, vzniklý izochromozom má buď obě dlouhá nebo obě krátká raménka původního chromozómu. Je podobný Robertsonské translokaci, jedná se však o spojení homologních chromozómů a izochromozom je tvořen dvěma krátkými nebo dlouhými rameny téhož chromozómu.

3.7 Ring chromozóm

Pokud se spojí koncové části dlouhého a krátkého raménka chromozómu, na kterých dochází ke zlomu a terminální acentrické fragmenty jsou ztraceny, vzniká mutace zvaná kruhový (ring) chromozóm. Při této mutaci dochází k znesnadnění dělení buňky.

3.8 Marker chromozóm

Marker chromozóm je malý chromozomální fragment, který je schopný se během buněčného dělení rozdělit, obsahuje tedy nutně centromeru. Jeho původ je různý, od produktu reciproké

Robertsonské translokace, po izochromozom krátkých ramének, ovšem přesný původ není jednoduché odhalit konvenčními cytogenetickými metodami. V přesnější určení původu marker chromozómu nám pomáhá například metoda FISH (viz níže) (Otová et al., 2015).

4 Polyploidizace

Polyploidizace je genomová mutace, při které dochází k znásobení celých sad chromozómů a vytváří se tak velké množství genetického materiálu, který podléhá evoluci. Velmi běžná u kvetoucích rostlin, včetně významných zemědělských plodin (Masterson, 1994), (Leitch & Bennett, 1997) o něco méně častá, ale také s přítomností svých zástupců u bezobratlých (Viktorov, 1997) a obratlovců (Becak & Becak, 1998). Nicméně u vyšších obratlovců jako jsou ptáci a savci polyploidní druhy chybí, je to zejména proto, že tyto skupiny mají rozdílné pohlavní chromozómy a ustálený mechanismus určení pohlaví. Je možné, že právě změna poměru autozomů a chromozómů pohlavních by při polyploidizaci narušovala mechanismy určující pohlaví jedince (Muller, 1925).

4.1 Polyploidizace u rostlin

Původně se předpokládalo, že polyploidní jsou pouze rostliny, a proto se výrazně více studií zaměřovalo právě na jejich výzkum (De Storme & Mason, 2014). U angiospermu kvetoucích rostlin se násobení genomu v průběhu evoluce přiřazuje až 70 % z nich (Yang et al., 2011). Znásobování chromozómových sad prostřednictvím autopolyploidie (v duplikovaném genomu se nachází pouze znásobené sady původního genomu, tedy jednoho předka) a allopolyploidie (v duplikovaném „hybridním“ genomu se vyskytují genomy různých rodičovských druhů) se objevovalo již od prvních objevů angiospermů, které prodělaly několik cyklů polyploidizace v různých časových obdobích. Vznik a rozdíly autopolyploidů a allopolyploidů jsou popsány níže na obrázku 3 z publikace Chen (2007). Kvůli potenciálně rychlému evolučnímu vývoji jsou konkrétní polyploidizace a obnovování diploidního stavu špatně rozeznatelné, nazýváme je „paleopolyploidní“ genomy (Yang et al., 2011), tento proces doprovázený dalšími jevy vizualizuje (obrázek 4 viz níže) publikace Soltis et al. (2016). Pravděpodobně pouze poslední duplikace genomu jsou klasicky uznávány jako polyploidní události, příklady takovýchto polyploidů jsou nejvýznamnější zemědělské komodity jako pšenice, sója, brambory, cukrová třtina a bavlna (Wendel, 2000).

Aplikace molekulárně genetických technik potvrdila, že řada fenoménů a procesů vede k stabilizaci polyploidů a k jejich evoluci. Některé z těchto poznatků jsou popsány pozorováním starších polyploidů, zatímco jiné byly odhaleny analýzou potenciálně mladých polyploidů nebo dokonce analýzou syntetických allopolyploidů. Různé aspekty vývoje genomu lze popsat podle studie Wendel (2000) pomocí následujících kategorií: vývoj chromozomální struktury, rychlé nemendelovské změny genomu, intergenomické invaze a interakce jádra a cytoplazmy. Tyto kategorie jsou popsány níže.

Chromozomální duplikace a strukturní evoluce – jeden z nejdůležitějších poznatků, který se vynořil díky rozsáhlému využití technologií genetického mapování, bylo to, že mnoho rostlin dříve považovaných za diploidní jsou ve skutečnosti stabilizovaní polyploidní. Také *in situ* hybridizace a speciální techniky vizualizace chromozómů jsou mocnými nástroji k objevení a poznání dávných polyploidizačních událostí. Při využívání těchto metod a porovnávání mapovacích studií bylo nalezeno velké množství chromozómových přestaveb, a to i u diploidních rostlin, není tedy překvapením, že se chromozómové přestavby (například inverze a translokace) vyskytovaly i u rostlin, které byly považovány za starověké polyploidy.

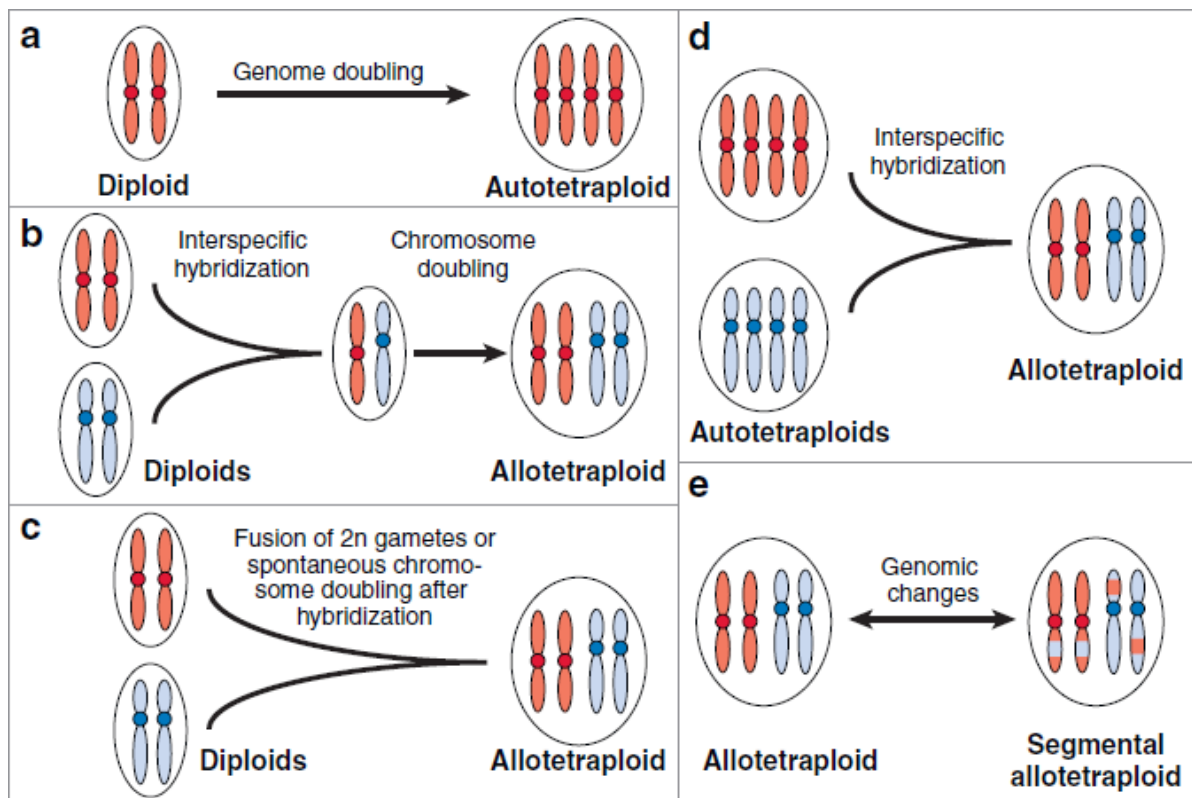
Rychlá genomová evoluce – očekávaným výsledkem fúze dvou jader a následné polyploidizace je kompletní genomová sada obou rodičů. Toto očekávání slouží jako vhodná nulová hypotéza pro predikci podílů polyploidního jádra. Namísto přirozeně se vyskytujících polyploidů, u kterých může stále probíhat stabilizace dřívější polyploidizační události, je vhodnější využít experimentálně syntetizované allopolyploidy. Nedávné studie ukazují, že syntetizovaní allopolyploidi často neodpovídají genomům svých rodičů. Místo toho se v jejich genomech ukazuje výskyt ne-mendelovských změn doprovázených polyplodizací. Tyto studie jsou nemálo zodpovědné za rostoucím povědomím o dynamice polyploidních genomů.

Intergenomické invaze – řada studií založených na Southern blot hybridizačních analýzách ukazuje, že během polyploidizace docházelo i ke kolonizaci genomu genomově-specifickými repetitivními sekvencemi.

Interakce mezi jádrem a cytoplazmou – růst a vývoj rostlin vyžaduje kromě regulace a exprese nukleárních genů také funkci mitochondriálních genů a genů chloroplastů. Při polyploidizaci dojde k znásobení jaderných genů, nikoli však k znásobení genů mitochondrií a chloroplastů. To může mít za následek problémy s interakcí a koordinací některých fyziologických dějů. Tyto problémy mohou být horší u allopolyploidizace, kde původní geny nesou důležité rozdíly. Musí docházet k optimalizaci a stabilizaci během evolučního vývoje.

Chromozomální přestavby jsou častým rysem evoluce po WGD u rostlin (Sémon & Wolfe, 2007). Některé změny jsou rychlé a jsou fixovány hned po polyploidizaci, jiné jsou stochastické a vyskytují se v paleoploidních genomech a stabilních allopolyploidních genomech. Zdvojení genů je primárně pozorovatelná u autopolyploidů, kdežto u allopolyploidů má fúze genů větší efekt na expresi genů než jejich duplikace. Delece, inserce a další chromozómové přestavby jsou pozorovatelné v allopolyploidních genomech, ale nejsou přítomny ve všech. Neopomenutelnou úlohu v expresi genů hrají i epigenetické mechanismy (Jackson & Chen, 2010).

Studie Chen (2007) přibližuje rozdíly mezi auto- a allopolyploidii a jejich příčiny vzniku.



Obrázek 2- allotetraploidie a autotetraploidie

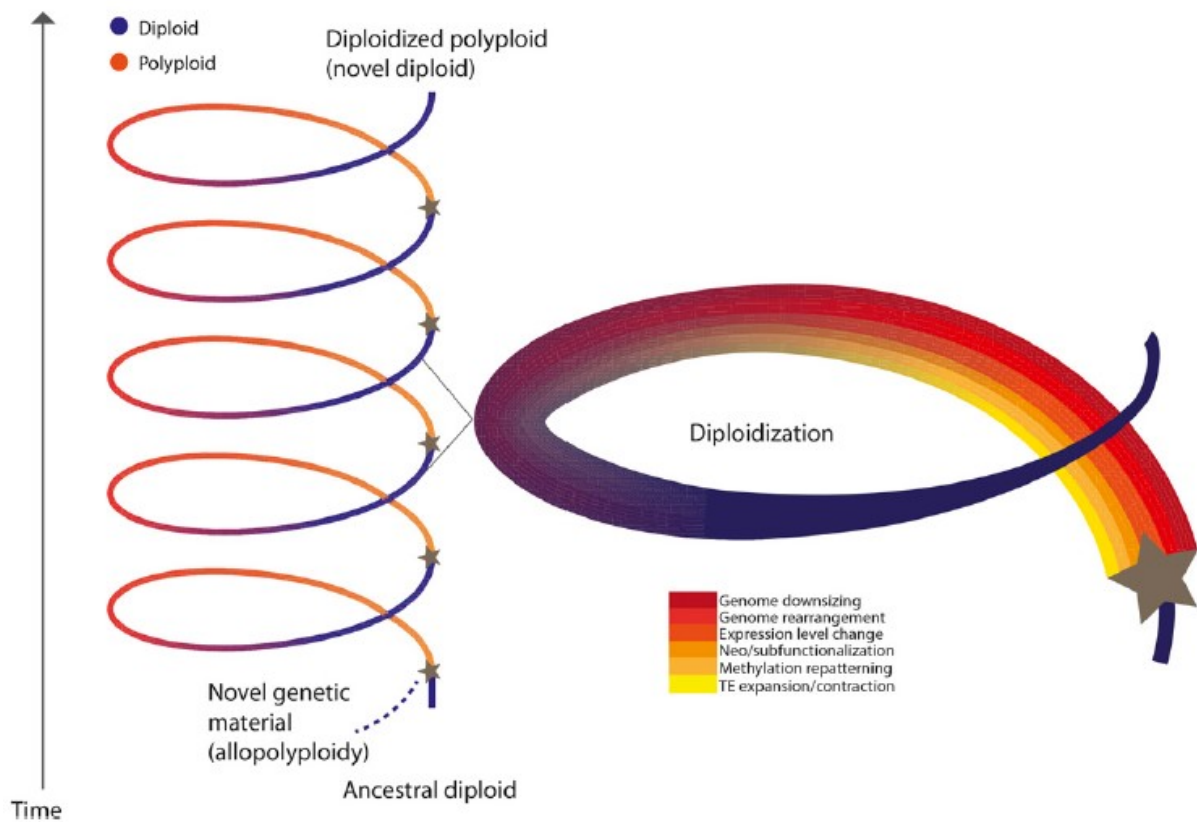
Na obrázku 3 jsou znázorněny a popsány různé případy vzniku allopolyploidů a vznik autopolyploidů. Schéma 3a znázorňuje autotetraploidizaci jako následek duplikace diploidního genomu, schéma 3b zobrazuje hybridizaci dvou diploidních genomů za vzniku hybridního diploidního genomu a následnou genomovou duplikaci za vzniku allotetraploidů. Další schéma 3c zobrazuje vznik allotetraploidů fúzí dvou diploidních genomů. Schéma 3d zobrazuje vznik allotetraploidů hybridizací dvou autotetraploidních genomů. Poslední schéma 3e zobrazuje vznik segmentálního allotetraploidního genomu, tento případ může nastat, když se na homologních chromozómech objeví homologní sekvence a dojde ke změnám genomu u původních allotetraploidů. Obrázek převzat a upraven z (Chen, 2007).

V rámci evolučních výhod, polyploidy jednoho druhu mohou lépe přežívat v nepříznivých podmínkách než diploidní druhy. Pokud se budeme bavit o rozdílných genových expresích mezi allopolyploidy a jejich rodičovskými genomy, v publikaci Chen (2007) je popsáno několik dalších mechanismů. Zaprvé většina genů je koexprimována, zadruhé duplicitní geny se ztrácejí (Blanc & Wolfe, 2004) nebo mutují. Poločas rozpadu aktivního paralogního genu, který se ztrácí nebo mutuje se odhaduje na 2-7 milion let. Zatřetí epigenetické změny mohou ovlivňovat genomu

expresi u nových allopolyploidů. Ovšem dopady těchto mechanismů mohou být u různých polyploidů odlišné, například delece sekvencí je pozorována u pšenice, translokace a transpozice byly nalezeny u brukve a změny genové exprese se zdají být významné u huseníčku. Publikace Chen (2007) dále zmiňuje, že allopolyploidie indukuje širší rozsah genové exprese než autopolyploidie, naznačuje to, že hybridizace má větší účinky na genovou expresi a fenotypové projevy než zdvojení genomu pomocí jednoho rodičovského druhu.

V jiné studii Song & Chen (2015) uvádí, že jako odezva na genomový šok při mezidruhovém hybridizaci musí nově vzniklé polyploidy překonat zvýšení počtu genů. Mnoho duplikovaných genů tedy čeká jeden z dále popsaných procesů. Jeden z možných osudů je ztráta funkce genu (neofunkcionalizace) postihuje mutace, které jsou pro organismus škodlivé a dojde k jejich inaktivaci na tzv. pseudogen (Lynch et al., 2001), (Lynch & Conery, 2000), (Walsh, 1995). Pseudogeny jsou nefunkční geny s homologií k funkčním genům kódující proteiny (Yang et al., 2011). Takový pseudogen setrvává v genomu a podléhá mutacím, dokud není vymazán nebo nedojde k mutaci, která ho znovu aktivuje. Předpokládaná doba vzniku pseudogenu je relativně krátká, uvádí se, že k nim dochází během pár milionů let (Lynch & Force, 2000). Také může nastat zachování původní funkce genu, která je žádoucí v případě, že organismus potřebuje zvýšit množství konkrétního genového produktu, ať už se jedná o proteiny nebo RNA (Ohno, 1970). Dalším možným osudem je rozdělení funkcí mezi duplikované geny (subfunkcionalizace). Vzácně dochází i k těmto případům, protože je pro organismus výhodné nechat si i duplikát. Funkce obou genů je vzájemně ovlivňována a v případě, že duplikáty ztratí část své funkce vzájemně se doplňují (Force et al. 1999), přičemž mohou mít také několik různých funkcí (Piatigorsky & Wistow, 1991). V jiných případech dojde ke vzniku nové funkce genu (tzv. neofunkcionalizaci) (Yang et al., 2011), (Wendel et al., 2018) tento stav je označován za evolučně velmi důležitý, nicméně udržení nově vzniklých genů a nadbytečných kopií, na které působí genetický drift nebo mohou být inaktivovány a přeměněny na pseudogen, je problémem. V tomto případě pomáhá pozitivní selekce, která udržuje geny v populaci, dokud nemají prospěšnou mutaci s novou funkcí (Ohno, 1970).

Publikace Soltis et al. (2016) vizualizuje složitost přechodu mezi polyploidními a zpět diploidními druhy do současného stavu následujícím schématem.



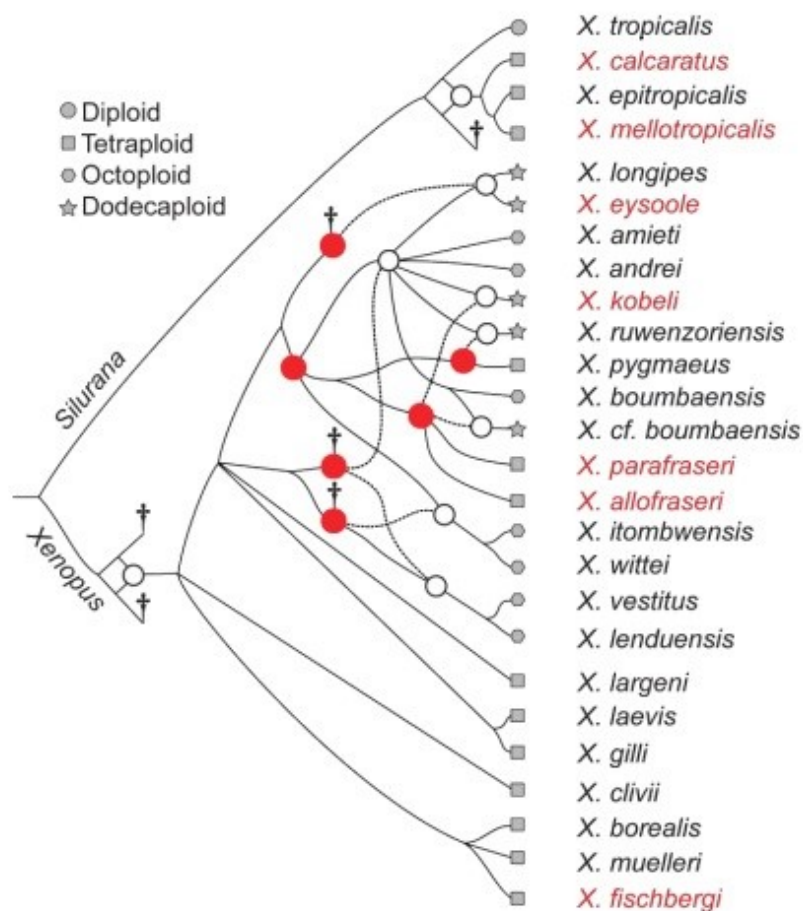
Obrázek 3- Průběh polyploidizace v evoluci

Na obrázku 4 je zobrazen průběh polyploidních událostí následovaných zpětným redukováním genomu na diploidní v průběhu let od dávného předka. Barevně je znázorněno, že přechody doprovází zmenšování genomu, genomové přestavby, změny exprese genu, změny funkcí genu, a taky epigenetické znaky. Převzato a upraveno z (Soltis et al., 2016).

4.2 Polyploidizace u živočichů

Uvádí se, že v evoluci dalo současné zmnožení všech genů vzniknout významným evolučním novinkám jako je například kostra obratlovců (Zhang & Cohn, 2008). V současnosti jsou polyploidní druhy dokumentovány přes menší rozsah živočišné říše než rostlinné (Schmid et al., 2015). Četně se vyskytuje u živočichů s partenogenetickým rozmnožováním, naopak při sexuální reprodukci je vzácná. Možnými bariérami může být přítomnost pohlavních chromozómů nebo histologické složitosti vyšších živočichů (Schmid et al., 2015). Tyto překážky mohou být také důvodem, proč se polyploidie vyskytuje daleko častěji u rostlin (Orr, 2018). Schmid et al. (2015) uvádí, že ze všech tříd obratlovců lze u obojživelníků pozorovat největší diversitu polyploidních biotypů vzniklých nezávisle na sobě.

U obojživelníku nalezneme drápatku (*Xenopus*), která má zástupce mezi polyploidními živočichy (Uno et al., 2013). Studie Evans et al. (2004) uvádí, že u drápatek došlo k více nezávislým polyploidizačním událostem (viz. obrázek 5) a nalezneme u nich diploidní, tetraploidní, oktoploidní i dodekaploidní druhy (Tymowska & Fischberg, 1973), (Knytl et al., 2017). Také se předpokládá významná převaha allopolyploidizací. I v těchto případech jsou popsány pozitivní i negativní dopady znásobení genomu. Allopolyploidní žáby mohou lépe odolávat parazitům svých předků, nicméně nevýhodou může být již dříve zmiňované řešení exprese genů (Evans et al., 2004). Příkladem je *X. leavis*, který má diploidní genom, ale téměř dvojnásobný počet chromozómů než také diploidní *X. tropicalis*. Je možné předpokládat, že v evoluci došlo k allotetraploidizaci a následně došlo k opětovnému obnovení meiotického párování (Session et al., 2016). Kromě polyploidizačních událostí ovlivnila evoluční vývoj žab i bifurkace. Předek dá vzniknout populacím, které postupem vývoje dosáhnou značných odlišností, tyto odlišnosti mohly nastat díky fyzickým překážkám geografického rozptýlení jedinců (Evans, 2008). I přesto však nejsou evolučně natolik vzdáleni a může docházet k jejich křížení tzv. retikulace (Evans, 2008).



Obrázek 4-fylogenetické strom drápatky

Na obrázku 5 je podle publikace Evans et al., (2015) převzat a upraven fylogenetický strom druhů drápatek. Symboly před jmény značí jejich ploidie. Bílé kruhy vyznačují allopolyploidizace, červené kruhy vyznačují známe předky a kříže vyhynulé.

Další polyploidní zástupce obojživelníků nalezneme u axolotlů (Bi & Bogart, 2006).

Ohno (1970) poprvé formuloval myšlenku, známou jako 2R-hypotéza, která vznikla z pozorování skutečnosti, že některé známé rodiny genů (jako jsou například Hox-geny) jsou u obratlovců zastoupeny čtyřikrát na rozdíl od jiných živočichů, kde jsou zastoupeny pouze jednou (Lemons & McGinnis, 2006). Tato hypotéza tvrdí, že v rané evoluci obratlovců proběhla dvě kola duplikací celého genomu (Dehal & Boore, 2005). V publikaci Putnam et al. (2008) je podpora této hypotézy v porovnání sekvence genomu kopinatce s genomem obratlovců. U kopinatce se geny vyskytovaly pouze v jednom shluku genů, naopak u obratlovců byly přítomny čtyři shluky těchto genů, což odpovídá dvěma kolům tetraploidizace genomu. Publikace Klein et al. (1998) uvádí jako další důkaz této teorie příklad genů pro Mhc (major histocompatibility complex), které se u žádného obratlovce nenachází pouze jednou, ale ve vzájemně se ovlivňujících kopiích.

Mnoho polyploidních zástupců nalezneme také u ryb. Některé polyploidní druhy ryb (například Karas stříbřitý) vznikly díky partenogenezi, která je často spojena s hybridizací (Song et al., 2012) a u některých linií kostnatých ryb nalézáme 6 až 7 výše zmiňovaných Hox-genů (Amores et al. 1998). Mezi plazi nalezneme polyploidního zástupce z rodu bičochvostů (Wright &

Lowe, 1968). Studie Wright & Lowe (1968) uvádí další zástupce polyploidních organismů mezi ploštěnci, hlísticemi, kroužkovci (například roupcovití (Christensen, 1961)) , měkkýši, hmyzem (např. někteří zástupci brouků a stejnokřídlých). V studii Gallardo et al. (1999) jsou, i přes původní předpoklad neudržitelnosti polyploidů u savců, uvedeni jejich zástupci žijící na území Jižní Ameriky a to řádu hlodavců čeledi osmákovití. Osmák *T. barrerae* má počet chromozómů $4n = 102$ (Contreras et al., 1990) a také největší známý genom ze všech savců (Gallardo et al., 1999).

I diploidní organismy mohou mít některé buňky nebo celé tkáně polyploidní, tento fenomén se nazývá endopolyploidie (Edgar & Weaver, 2001). Často se jedná o buňky, na které jsou kladeny vyšší nároky z hlediska syntézy určitých genových produktů. Polyploidní buňky nacházíme například v játrech savců a dalších obratlovců. Polyploidního stavu buňky docílí tzv. endomitózou, což je jev, během kterého dochází k opakované replikaci DNA bez následného rozdělení jádra a buňky. Diploidní hepatocyty podstoupí buněčný cyklus, ale nedojde k cytokineze a vznikne dvoujaderný tetraploidní hepatocyt (každé jádro má $2n$), dvoujaderný tetraploid úspěšně dokončí buněčný cyklus včetně mitózy, čímž dá vzniknout dvěma jednojaderným tetraploidům (Duncan, 2013). Také se v biologii objevuje pojem polytenní chromozómy, které jsou přítomny a běžně se vyskytují ve slinných žlázách larev u pakomára a mnoha dalších zástupců hmyzu (Urata et al., 1995). Tyto polytenní chromozómy vznikají mnohonásobnou endomitózou, během které nedochází k rozdělení sesterských chromatid, a ty zůstávají spojené v oblasti centromery. Larvám tento jev umožňuje produkci velkého množství proteinů související s metamorfózou. U rostlin se endopolyploidní buňky nalézají například v endospermu nebo stonku (Galbraith et al., 1991).

Výše zmíněné publikace jsou jen částí popsaných polyploidí u živočichů a my v současnosti víme, že polyploidizační události u živočichů hrály stejně významnou roli jako u rostlin. Těžším úkolem nynějších vědců je odhalování polyploidizačních událostí, které proběhly během evoluce organismů a zároveň odhalování konkrétních přestaveb genů a chromozómů, které tyto polyploidizace doprovázely. Další kapitola je věnována cytogenetickým metodám výzkumu těchto jevů.

5 Cytogenetické metody zabývající se detekcí chromozómových přestaveb a polyploidizačních událostí

5.1 Pruhování

Běžně používanou metodou pro barvení a vizualizaci jednotlivých chromozómů je pruhování. Pruhování je několik druhů, které se od sebe liší způsobem barvení nebo použitím rozdílných barev. G-pruhování je jedna z velmi častých a běžně používaných metod barvení, chromozómy obarvíme pomocí Giemsového roztoku a jsou vystaveny působení trypsinu. Každý chromozóm se specificky obarví a výsledkem jsou tmavší a světlejší proužky různé tloušťky podle toho, zda se jedná o A-T bohaté oblasti (tmavší zbarvení) nebo C-G bohaté oblasti (světlejší proužky), můžeme říct, že pruhování je v přímém vztahu se stupněm kondenzace chromatinu. Získané pruhy jsou specifické pro každý chromozómový pár, a proto je snadné odhalit případné strukturní a numerické abnormality. Při Q-pruhování se chromozómy barví akridinovými deriváty, které slouží jako fluorochromy, akridin se specificky váže na A-T bohatá místa a zbarvení pruhů odpovídá pruhům u G-pruhování. Rozdílné je, že pro vizualizaci je třeba fluorescenční mikroskop a při delší expozici UV světlem fluorescence slábne. R-pruhování, písmeno R zde značí reverse neboli obrácené oproti G, toho se docílí pomocí působení vysoké teploty před samotným barvením, výsledné pruhy jsou pak opačné ke G a Q pruhům. C-pruhování se používá pro vizualizaci konstitutivního heterochromatinu, který se nachází například v oblasti centromer, metoda je založena na denaturaci DNA působením agens (například HCl) a následné reasociaci v teplém pufru. NOR-barvení chromozómů spočívá v tom, že se naváží zrnka stříbra na aktivní oblasti organizátoru jadérka, stříbro získáme z AgNO_3 , které necháme za vyšší teploty v kyselém prostředí.

Také se často využívá barvení pomocí antibiotik, jako jsou například mitramycin, olivomycin a chromomycin, tyto látky se vyznačují preferencí vazby k úsekům bohatým na G-C páry, naopak fluorochrom DAPI se specificky váže na A-T páry.

Pomocí této metody lze detekovat morfologické rozdíly chromozómů. Například C-pruhování nám vizualizuje konstitutivní heterochromatin, který se vyznačuje repetitivními sekvencemi. Tyto sekvence mohou mít při porovnávání homologních a homoeologních párů chromozómu po polyploidizaci rozdílné umístění (Knytl et al., 2017) právě v důsledku přestaveb chromozómu.

5.2 FISH

FISH neboli fluorescenční *in situ* hybridizace je metoda, která se využívá pro vizualizaci námi vybraného genu nebo úseku DNA. Principem je vazba sondy na komplementární úsek DNA, který chceme pomocí FISH vizualizovat, sonda je fluorescenčně značená a lze ji pozorovat pod fluorescenčním mikroskopem, velkým problémem při FISH je pak vysvěcování, které nastává při pozorování preparátu, kdy je vzorek vystaven záření vyvolávající fluorescenci. Toto negativum se dá mírnit rychlou prací nebo chemickým ošetřením vzorku (Johnson et Nogueira-Ajaujo, 1981). Metodu FISH lze také využít pro vizualizaci RNA. Metody barvení založené na sondách umožňují srovnání karyotypů různých fylogenetických skupin (Pawlina & Bugno-Poniewierska, 2012). Tato metoda se dá upravit požadavkům pokusu použitím různých typů sond, jako jsou například centromerické, telomerické sondy, nebo sondy genově specifické. Nevýhodou FISH však je, že neposkytuje celo-genomový pohled. Obvykle se chromozómy vyšetřují v metafázi, ovšem je možné a běžné použít i jádra v interfázích (I-FISH). Metoda FISH se využívá pro početní určování a identifikaci struktury chromozómových odchylek a marker chromozómů, mapování genů a DNA sekvencí a má své nezastupitelné místo při léčbě nádorových onemocnění (např. monitorování výsledků chemoterapie). K identifikaci fluorescenčních signálů nám slouží fluorescenční mikroskop, ovšem moderní výzkumná centra jsou vybavena velmi výkonnou kamerou, která je připojena přímo na počítač s programem pro FISH, tím se zvyšuje citlivost, kvalita obrazu a samozřejmě usnadňuje práce (Otová et al., 2015).

Jak už bylo výše zmíněno, podle potřeb pokusu je možné použít různé typy sond. Existují například centromerické, subtelomerické nebo telomerické sondy, které je možné využít i v nedělicích se buňkách v interfázi. Tyto oblasti chromozómů jsou specifické vysoce repetitivním a tandemovým uspořádáním. Centromerické sondy se využívají převážně k rychlé detekci numerických aberací (Otová et al., 2015). Další skupinou jsou sondy, které mají jedinečné sekvence, obvykle se jedná o genové klony a velikostně se liší v závislosti na klonovacím vektoru, který je například plasmid (500 bp- 5 kb), kosmid (20-50 kb), bakteriofág lambda (8-15 kb) nebo také YAC (umělé kvasinkové klony), BAC (umělé bakteriální klony). Déle jsou používány malovací sondy na tzv. chromosome painting, tyto sondy slouží pro obarvení celých chromozómů nacházejících se v metafázi.

Sondy jsou značeny přímo nebo nepřímo. Přímé značení znamená, že fluorochromy poskytující fluorescenční signál jsou navázány přímo na nukleotidy, výhoda tohoto značení je, že je rychlejší, nicméně citlivost je nižší (Schwarzacher, 2003). Nepřímé značení obnáší navázání reportérové molekuly (například biotin nebo digoxigenin) na sondu, následná reakce s dalšími molekulami (protilátky, např. streptavidin nebo anti-digoxigenin), které konečně nesou fluorochromy poskytující fluorescenční signál.

5.2.1 Tyr-FISH

Některé geny a regulační sekvence se v genomu vyskytují pouze jednou, říká se jim single-copy geny (sekvence) a ty se dají u rostlin detekovat pomocí Tyr-FISH. Zmíněná metoda byla například využita v publikaci Pérez et al. (2009) při lokalizaci genu Rad50 na chromozóm 5 u pšenice. Principem Tyr-FISH je nepřímá detekce sondy protilátkou konjugovanou s peroxidázou a její vazba fluorescenčně značeného tyramidinu. Dochází k zvýšení detekční citlivosti a umožnění detekce sondy menší než 1 kb (Khrustaleva et al., 2001).

5.2.2 Zoo-FISH

Jedna z hlavních metod, která umožňuje porovnat podobnosti a rozdíly v organizaci genomu (Pawlina & Bugno-Poniewierska, 2012). Tato metoda se stala hlavním nástrojem pro určení úrovně konzervatismu chromozómů (Pawlina & Bugno-Poniewierska, 2012). Technika používá specifické barvicí sondy (WCP neboli celo-chromozómové sondy) k nalezení komplementarity chromozómů jiných druhů (Machado et al., 2018). Takto dokážeme zjistit, které části chromozómu jsou stejné, které rozdílné. Díky cytogenetickým metodám bylo možno pozorovat strukturní změny genomu jako jsou delece, inserce, duplikace a translokace i u dalších rostlinných zástupců, například tabák a také translokace u allotetraploidního druhu ovse (Song et al., 2012).

Studie Knytl et al. (2017) odhaluje cytogenetické charakteristiky u tetraploidní drápatky *Xenopus mellotropicalis* a porovnává je s příbuznou diploidní drápatkou *X. tropicalis* a tetraploidní drápatkou *X. epitropicalis*. Zoo-FISH analýza využívající XTR 9 (*X. tropicalis* chromozóm číslo 9) WCP dokázala, že konstitutivní heterochromatický blok z chromozómu 9 u předka se nachází na chromozómech 2a a 9b u *X. mellotropicalis*. Tento výsledek může být vysvětlen existencí dvou diploidních předků, první předek by odpovídal *X. tropicalis*, který má konstitutivní heterochromatin na chromozómu číslo 9 a druhý, pravděpodobně již vyhynulý předek, měl konstitutivní heterochromatin na chromozómu číslo 2. Allotetraploidizace by pak umožnila vnik předků tetraploidních drápatek *X. mellotropicalis* a *X. epitropicalis*. V takovém případě by rozdílné umístění konstitutivního heterochromatinu na chromozómech 2a a 9b bylo způsobeno translokací u diploidních předků.

5.2.3 GISH

Při genomové *in situ* hybridizaci (GISH) se jako sonda používá fluorescenčně značená genomová DNA. GISH je účinná u určování allopolyploidních genomů, hybridů a umožňuje identifikovat strukturní změny v evoluci, například pomohla objasnit strukturní změny

v stádiích evoluce pšenice (Hoplop-Harrisson et al., 1996). Studie Bogart et al. (2009) uvádí, že GISH metoda má velké uplatnění v identifikaci genomové evoluci unisexuálních organismů. Ve studii Majtánová et al., (2016) využili metodu GISH při detekci genomů diploidních a triploidních rybovitých obratlovců, rozmnožujících se asexuálně. Díky červenému a zelenému barvení genomů mohli přiřadit, která haploidní sada genů patří konkrétnímu předkovi. Karyotypy těchto živočichů byly jednotné bez ohledu na stáří jejich původu, a to naznačuje dlouhodobou stabilitu karyotypů těchto asexuálně se rozmnožujících organismů. Tato metoda se ukazuje jako vhodná a rychlá pro zjištění shod v genomech diploidních a polyploidních organismů jednoho druhu. Shoda může vést k předpokladu, že se jedná o předka a případné odchylky genomu mohou odhalit chromozómové přestavby, které můžeme dále a podrobněji zkoumat metodou FISH.

Další možností je využití cytogenetické techniky FISH, za použití sondy rDNA, je užitečná v objevování evolučních mechanismů zodpovědných za vznikem polyploidních druhů, v publikaci Li et al. (2010) se díky této metodě podařilo detekovat NOR v telomerické oblasti jak diploidního tak i tetraploidního piskoře dálnovýchodního, nicméně u tetraploidního druhu FISH odhalovala silnější signál. Pravděpodobně mohlo dojít k zvětšení počtu repetitív během nerovnoměrného crossing-overu.

FISH-TSA další publikované využití FISH, kde zkratka TSA znamená Tyramide Signal Amplification, slouží k světelné mikroskopické vizualizaci antigenů a nukleových kyselin, respektive fluorescenci a enzymatické vizualizaci (Raap, 1998). Při této metodě se používají cDNA sondy. Technika FISH-TSA umožnila přesnou lokalizaci genů v genomu *X. tropicalis* (Krylov, Tlapakova, & Macha, 2007) a také sestavení genetické mapy *X. tropicalis* (Wells et al., 2011). Tuto metodu lze aplikovat při detekování chromozómových přestaveb díky vizualizaci jednotlivých genů a při vzájemném porovnávání diploidních a polyploidních druhů můžeme předpovídat i evoluční souvislosti během polyploidizace na základě změny umístění konkrétních genů na chromozómech.

5.3 CGH

Srovnávací genomová hybridizace (CGH) je metoda příbuzná metodě FISH. Jako sonda se využívá genomová DNA (gDNA), která je připravena z příbuzných druhů sledovaného organismu. Srovnávací genomová hybridizace pracuje na principu hybridizace dvou různě značených sond na genom. Jedna barva odpovídá chromozómové výbavě téhož genomu, na který hybridizujeme a druhou barvou je značena DNA z vyšetřovaných buněk. CGH umožňuje vyšetření celého genomu v jedné hybridizační reakci a není při ní zapotřebí mitotická aktivita buněk a také je dostačující malé množství buněk. Tyto metody odhalují delece, duplikace a amplifikace genomu, které jsou zvýrazněny rozdílnou barvou homologů, to je způsobeno změnou poměru intenzity signálu obou flouorochromů. Poměr intenzit je následně zpracován počítačovým programem a odhalí příslušnou

změnu chromozómu. Nevýhodou však je, že metoda CGH špatně odhaluje změny, při kterých se nemění počet sekvencí (v případě translokací a inverzí), protože se nemění poměry intenzit signálů. Přesnější obdobou metody CGH je array-CGH, kdy se při hybridizaci využívá mikročipů, liší se tím, že podkladem pro hybridizaci neslouží mitotické chromozómy, ale oligonukleotidy natištěné na podložním skle.

6 Závěr

Evoluce skýtá významný počet genotypových změn, které se během ní udály. Tato práce přibližuje a popisuje část těchto běžně se vyskytujících jevů u rostlin i živočichů a snaží se hledat souvislosti a mechanismy s násobením genomu organismů. Polyploidizace s sebou přináší nestabilitu znásobeného genomu a ve většině případů vede k různým chromozómovým aberacím, které mohou být ve výsledku uchovány, pozměněny nebo úplně ztraceny z populace. Posuzování procesů polyploidizace a konkrétních změn chromozómů nám umožňují a usnadňují stále vyvíjející se metody cytogenetického výzkumu. V současné době je mimo jiné významnou a často využívanou metodou fluorescenční *in situ* hybridizace, díky které se vědcům úspěšně daří odhalovat jak evoluční souvislosti, tak i odchylky v současných genomech. Těžším úkolem je posuzování přímých souvislostí polyploidizací a konkrétních chromozómových přestaveb u současných polyploidních organismů, nicméně i tyto úkoly jsou díky cytogenetickým technikám možné. V některých zmíněných studiích již byla tato souvislost dokázána a popsána, ale mnoho dalších druhů na rozklíčování své evoluční podstaty ještě čeká. Tímto směrem by se mohly vydat další práce založené na této rešerši.

7 Seznam zkratek

AMK		Aminokyselina
BAC		Bakteriální klonovací vektor
cDNA	Complementary DNA	Komplementární DNA
CGH	Comparative genomic hybridization	Srovnávací genomová hybridizace
DSB	Double-strand break	Dvou-řetězcový zlom
dsDNA	Double stranded DNA	Dvou-řetězcová DNA
FISH	Fluorescent <i>in situ</i> hybridization	Fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace
GISH	Genomic <i>in situ</i> hybridization	Genomová <i>in situ</i> hybridizace
I-FISH		Interfázová FISH
MHC	Major histocompatibility complex	Hlavní histokompatibilní komplex
NOR	Nucleous organizing region	Region organizátoru jadérka
Tyr-FISH		Tyramidinová FISH
WCP	Whole chromosome probes	Celo-chromozómové sondy
WGD	Whole-genome duplication	Celo-genomová duplikace
XTR 9	<i>X. tropicalis</i> chromosome n. 9	<i>X. tropicalis</i> chromozóm č. 9
YAC		Kvasinkový klonovací vektor

8 Seznam literatury

* označení sekundárních zdrojů

- Amores, A., Force, A., Yan, Y. L., Joly, L., Amemiya, C., Fritz, A., Ho, R. K., Langeland, J., Prince, V., Wang, Y. L. et al. (1998): Zebrafish hox clusters and vertebrate genome evolution. *Science* 282: 1711-1714.
- Becak, M. L. a Becak, W. (1998): Evolution by polyploidy in Amphibia: new insights. *Cytogenet. Cell Genet.* 80:28-33
- Bi, K., & Bogart, J. P. (2006). Identification of intergenomic recombinations in unisexual salamanders of the genus *Ambystoma* by genomic in situ hybridization (GISH). *Cytogenetic and Genome Research*, 112(3-4), 307-312. <https://doi.org/10.1159/000089885>
- Blanc, G., & Wolfe, K. H. (2004). Functional Divergence of Duplicated Genes Formed by Polyploidy during *Arabidopsis* Evolution Author (s): Guillaume Blanc and Kenneth H . Wolfe Source : The Plant Cell , Vol . 16 , No . 7 (Jul . , 2004) , pp . 1679-1691 Published by : American Society of. *The Plant Cell*, 16(7), 1679-1691. <https://doi.org/10.1105/tpc.021410.tion>
- Bogart, J. P., Bartoszek, J., Noble, D. W. A., & Bi, K. (2009). Sex in unisexual salamanders: Discovery of a new sperm donor with ancient affinities. *Heredity*, 103(6), 483-493. <https://doi.org/10.1038/hdy.2009.83>
- Bridges, C. B. (1936): The bar „gene“ a duplication. *Science* 83: 210-11
- Contreras, L., Torres-Murra, J. a Spotorno, A. (1990): The largest known chromosome number for a mammal, in a South American desert rodent, *Experientia* 46: 506-508.
- Dehal, P. a Boore, J. L. (2005): Two rounds of whole genome duplication in the ancestral vertebrate. *Plos Biology* 3: e314.
- De Storme, N., & Mason, A. (2014). Plant speciation through chromosome instability and ploidy change: Cellular mechanisms, molecular factors and evolutionary relevance. *Current Plant Biology*, 1, 10-33. <https://doi.org/10.1016/j.cpb.2014.09.002>
- Duncan, A. W. (2013). Aneuploidy, polyploidy and ploidy reversal in the liver. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 24(4), 347-356. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2013.01.003>
- Edgar, B. A. a Orr-Weaver, T. L. (2001): Endoreplication cell cycles: more for less. *Cell* 105: 297-306.
- Evans, B. J. (2008). Genome evolution and speciation genetics of clawed frogs (*Xenopus* and

- Silurana*). *Frontiers in Bioscience, Volume(13)*, 4687. <https://doi.org/10.2741/3033>
- Evans, B. J., Carter, T. F., Greenbaum, E., Gvodík, V., Kelley, D. B., McLaughlin, P. J., ... Blackburn, D. C. (2015). Genetics, Morphology, Advertisement Calls, and Historical Records Distinguish Six New Polyploid Species of African Clawed Frog (*Xenopus, Pipidae*) from West and Central Africa. *PLoS ONE*, *10*(12), 1–51. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0142823>
- Evans, B. J., Kelley, D. B., Tinsley, R. C., Melnick, D. J., & Cannatella, D. C. (2004). A mitochondrial DNA phylogeny of African clawed frogs: Phylogeography and implications for polyploid evolution. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *33*(1), 197–213. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2004.04.018>
- Force, A., Lynch, M., Pickett, F. B., Amores, A., Yan, Y. L. a Postlethwait, J. (1999): Preservation of duplicate genes by complementary, degenerative mutations. *Genetics* 151: 1531-1545.
- Galbraith, D. W., Karkins, K. R. a Knapp, S. (1991): Systematic endopolyploidy in Arabidopsis
- Gallardo, M. H., Bickham, J. W., Honeycutt, R. L., Ojeda, R. A. a Kfhler, N. (1999): Discovery o tetraploidy in a mammal. *Nature* 401: 341
- Haber, J. E. (1999). DNA recombination: The replication connection. *Trends in Biochemical Sciences*, *24*(7), 271–275. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(99\)01413-9](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(99)01413-9)
- Haber, J. E. (2000). Recombination: A frank view of exchanges and vice versa. *Current Opinion in Cell Biology*, *12*(3), 286–292. [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(00\)00090-9](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(00)00090-9)
- Holland, P. W. H. a Takahashi, T. (2005): The evolution of homeobox genes: Implications for the study of brain development. *Brain Research Bulletin* 66 (4-6): 484-490.
- Hoplop-Harrisson J.S., Schwarzacher T. (1996): Genomic Southern and *in situ* hybridization for plant genome analysis. In: Jauhar PP (ed), *Methods of genome analysis in plants*, pp 163-180, New York, CRC Press
- Chen, Z. J. (2007). Genetic and Epigenetic Mechanisms for Gene Expression and Phenotypic Variation in Plant Polyploids. *Annual Review of Plant Biology*, *58*(1), 377–406. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.58.032806.103835>
- * Christensen, B. (1961). Studies on Cyto-Taxonomy and Reproduction in the Enchytraeidae: With Notes on Parthenogenesis and Polyploidy in the Animal Kingdom. *Hereditas*, *47*(3–4), 387–450. <https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.1961.tb01782.x>
- Jackson, S., & Chen, Z. J. (2010). Genomic and expression plasticity of polyploidy. *Current Opinion in Plant Biology*, *13*(2), 153–159. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2009.11.004>

- Janssen, A., & Medema, R. H. (2013). Genetic instability: Tipping the balance. *Oncogene*, 32(38), 4459–4470. <https://doi.org/10.1038/onc.2012.576>
- Johnson G.D., Nogueira-Araujo G.M. (1981): A simple method of reducing the fading of immunofluorescence during microscopy. *J. Immunol. Methods*, 43:349-350
- Khrustaleva L.I., Kik CH. (2001): Localization of single-copy T-DNA insertion in transgenic shallots (*Allium cepa*) by using ultra-sensitive FISH with tyramide signal amplification. *The Plant Journal* 25(6): 699-707
- Klein, J., Sato, A., & O’Hugin, C. (1998). Evolution by gene duplication in the major histocompatibility complex. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 80(1–4), 123–127. <https://doi.org/10.1159/000014967>
- Knytl, M., Smolík, O., Kubíčková, S., Tlapáková, T., Evans, B. J., & Krylov, V. (2017). Chromosome divergence during evolution of the tetraploid clawed frogs, *Xenopus mello tropicalis* and *Xenopus epitropicalis* as revealed by Zoo-FISH. *PLoS ONE*, 12(5), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177087>
- Krylov, V., Tlapakova, T., & MacHa, J. (2007). Localization of the single copy gene Mdh2 on *Xenopus tropicalis* chromosomes by FISH-TSA. *Cytogenetic and Genome Research*, 116(1–2), 110–112. <https://doi.org/10.1159/000097427>
- Lemons, D. a McGinnis, W. (2006): Genomic evolution of Hox gene clusters. *Science* 313: 1918-1922.
- Li, Y. J., Tian, Y., Zhang, M. Z., Tian, P. P., Yu, Z., Abe, S., & Arai, K. (2010). Chromosome banding and FISH with rDNA probe in the diploid and tetraploid loach *Misgurnus anguillicaudatus*. *Ichthyological Research*, 57(4), 358–366. <https://doi.org/10.1007/s10228-010-0168-0>
- Leitch, I. L. a Bennett, M. D. (1997): Polyploidy in angiosperms. *Trends Plant. Sci.* 2:470– 476
- Lieber, M. R. (1999). The biochemistry and biological significance of nonhomologous DNA end joining: an essential repair process in multicellular eukaryotes. *Genes to Cells*, 4(2), 77–85. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2443.1999.00245.x>
- Lynch, M. a Conery, J. S. (2000): The Evolutionary Fate and Consequences of Duplicate Genes. *Science* 290: 1151-1155
- Lynch, M., a Force, A. (2000): The probability of duplicate gene preservation by subfunctionalization. *Genetics* 154:459–473.
- Lynch, M., O’Hely, M., Walsh, B. a Force, A. (2001): The Probability of Preservation of a Newly

- Arisen Gene Duplicate. *Genetics* 159: 1789-1804.
- Machado, M. de A., Pieczarka, J. C., Silva, F. H. R., O'Brien, P. C. M., Ferguson-Smith, M. A., & Nagamachi, C. Y. (2018). Extensive karyotype reorganization in the fish *Gymnotus arapaima* (*Gymnotiformes, gymnotidae*) highlighted by zoo-fish analysis. *Frontiers in Genetics*, 9(JAN), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00008>
- Majtánová, Z., Choleva, L., Symonová, R., Ráb, P., Kotusz, J., Pekárik, L., & Janko, K. (2016). Asexual Reproduction Does Not Apparently Increase the Rate of Chromosomal Evolution: Karyotype Stability in Diploid and Triploid Clonal Hybrid Fish (*Cobitis, Cypriniformes, Teleostei*). *PLoS One*, 11(1), e0146872. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146872>
- Masterson, J. (1994): Stomatal size in fossil plants: evidence for polyploidy in majority of angiosperms. *Science* 264: 421–424
- Muller, H. J. (1925): Why polyploidy is rarer in animals than in plants. *Amer. Nat.* 59: 346– 353.
- Ohno, S. (1970): *Evolution by Gene Duplication*. Springer-Verlag, Heidelberg, Germany.
- Orr, H. A. (2018). “ Why Polyploidy is Rarer in Animals Than in Plants ” Revisited Author (s): H . Allen Orr Source : The American Naturalist , Vol . 136 , No . 6 (Dec . , 1990), pp . 759-770 Published by : The University of Chicago Press for The American Society of Natu, 136(6), 759–770.
- *Otová, Berta, et al. *Lékařská biologie a genetika (I.díl)*. 2. vydání. Praha : Karolinum, 2015. ISBN 9788024628356.
- Pawlina, K., & Bugno-Poniewierska, M. (2012). The Application of Zoo-Fish Technique for Analysis of Chromosomal Rearrangements in the *Equidae* Family, 12(1), 5–13. <https://doi.org/10.2478/v10220-012-0001-y>
- Piatigorsky, J. a Wistow, G. (1991). The recruitment of crystallins: New functions precede gene duplication. *Science* 252: 1078-1079.
- Putnam, N. H., Butts, T., Ferrier, D. E. K., Furlong, R. F., Hellsten, U., Kawashima, T., Robinson-rechavi, M., Shoguchi, E., Terry, A. a Yu, J-K. et al. (2008): The amphioxus genome and the evolution of the chordate karyotype. *Nature* 453: 1064- 1072.
- Raap, a K. (1998). Advances in fluorescence in situ hybridization. *Mutation Research*, 400(1–2), 287–298. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(98\)00029-3](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(98)00029-3)
- Richardson, C., Moynahan, M. E., & Jasin, M. (1998). Double-strand break repair by interchromosomal recombination: Suppression of chromosomal translocations. *Genes and*

- Development*, 12(24), 3831–3842. <https://doi.org/10.1101/gad.12.24.3831>
- Sémon, M., & Wolfe, K. H. (2007). Consequences of genome duplication. *Current Opinion in Genetics and Development*, 17(6), 505–512. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2007.09.007>
- Session, A.M., ..., Yamamoto, T.S., Takagi, C., Ueno, N., et al. (2016). Genome evolution in the allotetraploid frog *Xenopus laevis*. *Nature*, 538(7625), 336–343. <https://doi.org/10.1038/nature19840>. Genome
- Schmid, M., Evans, B. J., & Bogart, J. P. (2015). Polyploidy in Amphibia. *Cytogenetic and Genome Research*, 145(3–4), 315–330. <https://doi.org/10.1159/000431388>
- Schwarzacher T. (2003): DNA, chromosomes and in situ hybridization, *Genome* 6:953-962
- Soltis, D. E., Visger, C. J., Blaine Marchant, D., & Soltis, P. S. (2016). Polyploidy: Pitfalls and paths to a paradigm. *American Journal of Botany*, 103(7), 1146–1166. <https://doi.org/10.3732/ajb.1500501>
- Song, C., Liu, S. J., Xiao, J., He, W. G., Zhou, Y., Qin, Q. B., ... Liu, Y. (2012). Polyploid organisms. *Science China Life Sciences*, 55(4), 301–311. <https://doi.org/10.1007/s11427-012-4310-2>
- Song, Q., & Chen, J. Z. (2015). Epigenetic and developmental regulation in plant polyploids. *Current Opinion in Plant Biology*, 24, 101–109. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2015.02.007>
- Tymowska, J., & Fischberg, M. (1973). Chromosome complements of the genus *Xenopus*. *Chromosoma*, 44(3), 335–342. <https://doi.org/10.1007/BF00291027>
- Uno, Y., Nishida, C., Takagi, C., Ueno, N., & Matsuda, Y. (2013). Homoeologous chromosomes of *Xenopus laevis* are highly conserved after whole-genome duplication. *Heredity*, 111(5), 430–436. <https://doi.org/10.1038/hdy.2013.65>
- Urata, Y., Parmelee, S. J., Agard, D. A., & Sedat, J. W. (1995): A three-dimensional structural dissection of *Drosophila* polytene chromosomes. *J. Cell Biol.* 131: 279–295.
- Viktorov, A. G. (1997): Diversity of polyploid races in the family Lumbricidae. *Soil Biol. Biochem.* 29: 217-21.
- Walsh, J. B. (1995): How often do duplicated genes evolve new functions? *Genetics* 110: 345-364.
- Wells, D. E., Gutierrez, L., Xu, Z., Krylov, V., Macha, J., Blankenburg, K. P., ... Sater, A. K. (2011). A genetic map of *Xenopus tropicalis*. *Developmental Biology*, 354(1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2011.03.022>
- Wendel, J. F. (2000). Genome evolution in polyploids. *Plant Molecular Biology*, 42(1), 225–249.

<https://doi.org/10.1023/A:1006392424384>

- Wendel, J. F., Lisch, D., Hu, G., & Mason, A. S. (2018). The long and short of doubling down: polyploidy, epigenetics, and the temporal dynamics of genome fractionation. *Current Opinion in Genetics and Development*, 49, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2018.01.004>
- Wright, J. W., & Lowe, C. H. (1968). Weeds, polyploids, parthenogenesis, and the geographical and ecological distribution of all-female species of *Cnemidophorus*. *Copeia*, 1968(1), 128–138. <https://doi.org/10.2307/1441559>
- Yang, L., Takuno, S., Waters, E. R., & Gaut, B. S. (2011). Lowly expressed genes in *arabidopsis thaliana* bear the signature of possible pseudogenization by promoter degradation. *Molecular Biology and Evolution*, 28(3), 1193–1203. <https://doi.org/10.1093/molbev/msq298>
- Zhang, J. (2003). Evolution by gene duplication: An update. *Trends in Ecology and Evolution*, 18(6), 292–298. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(03\)00033-8](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(03)00033-8)
- Zhang, G. J. & Cohn, M. J. (2008): Genome duplication and the origin of the vertebrate skeleton. *Current Opinion in Genetics & Development* 18:387-393