



**MASARYKOVA
UNIVERZITA
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA**



**ÚSTAV EXPERIMENTÁLNÍ BIOLOGIE
ODDĚLENÍ GENETIKY A MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE**

**Studium variability lokusů
ribozomální DNA v genomech druhů
rodu *Trifolium***

Diplomová práce

Radka Vozárová

Bibliografický záznam

Autor:	Bc. Radka Vozárová Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita Ústav experimentální biologie
Název práce:	Studium variability lokusů ribozomální DNA v genomech druhů rodu <i>Trifolium</i>
Studijní program:	Experimentální biologie
Studijní obor:	Molekulární biologie a genetika
Vedoucí práce:	doc. RNDr. Jana Řepková, CSc.
Akademický rok:	2017/2018
Počet stran:	71
Klíčová slova:	rod <i>Trifolium</i> ; ribozomální DNA; lokus 5S rDNA; lokus 45S rDNA; FISH; konsenzuální sekvence

Bibliografický záznam

Autor:	Bc. Radka Vozárová Prírodovedecká fakulta, Masarykova univerzita Ústav experimentálnej biológie
Názov práce:	Štúdium variability lokusov ribozómovej DNA v genómoch druhov rodu <i>Trifolium</i>
Študijný program:	Experimentálna biológia
Študijný odbor:	Molekulárna biológia a genetika
Vedúci práce:	doc. RNDr. Jana Řepková, CSc.
Akademický rok:	2017/2018
Počet strán:	71
Kľúčové slová:	rod <i>Trifolium</i> ; ribozómová DNA; lokus 5S rDNA; lokus 45S rDNA; FISH; konsenzuálne sekvencie

Bibliographic Entry

Author Bc. Radka Vozárová
Faculty of Science, Masaryk University
Department of Experimental Biology

Title of Thesis: Study of variability in ribosomal DNA loci in species of the genus *Trifolium*

Degree programme: Experimental Biology

Field of Study: Molekular Biology and Genetics

Supervisor: doc. RNDr. Jana Řepková, CSc.

Academic Year: 2017/2018

Number of Pages: 71

Keywords: genus *Trifolium*; ribosomal DNA; 5S rDNA loci; 45S rDNA loci; FISH; consensus sequence

Abstrakt

V diplomové práci byla u 39 planých druhů rodu *Trifolium* studována ribozomální DNA, která je jednou z nejdůležitějších funkčních molekul v buňce. Po přepise této DNA se tvoří jednotlivé rRNA a jejich sestavením vzniká ribozom, organela, díky které vznikají strukturální proteiny. Ke studiu počtu a rozmístění jednotlivých lokusů 5S a 45S, konkrétně 25S, v genomech druhů z rodu *Trifolium* byla využita technika fluorescenční *in situ* hybridizace. Získané údaje ukazují různorodé postavení lokusů rDNA v genomech druhů rodu *Trifolium*. V druhé části práce je zpracována srovnávací analýza sekvencí oblastí vnitřních přepisovaných mezerníků ITS1, ITS2, dále oblasti kódující sekvence lokusu 5S a nepřepisující se mezerník u různých druhů z čeledi *Fabaceae* z volně dostupných databází. Tato analýza ukázala vysokou konzervativnost kódující sekvence a naopak vysokou variabilitu u nekódujících oblastí.

Abstrakt

V diplomovej práci bolo u 39 planých druhov rodu *Trifolium* študovaná ribozómová DNA jedna z najdôležitejších funkčných molekúl v bunke. Po prepise tejto DNA sa tvoria jednotlivé rRNA a ich zostavením vzniká ribozóm, organela, vďaka ktorej vznikajú štruktúrne proteíny. Technika fluorescenčnej *in situ* hybridizácie bola využitá k štúdiu počtu a rozmiestnenia jednotlivých lokusov 5S a 45S, konkrétne 25S, v genómoch druhov z rodu *Trifolium*. Získané údaje ukazujú rôznorodé postavenie lokusov rDNA v genómoch druhov z rodu *Trifolium*. V druhej časti práce je spracovaná porovnávací analýza sekvencií prepisovaných medzerníkov ITS1, ITS2, ale aj kódujúca sekvencia lokusu 5S a neprepisujúci sa medzerník u rôznych druhov z čeľade *Fabaceae* z voľne dostupných databáz. Táto analýza ukázala vysokú konzervovanosť kódujúcej sekvencie a naopak vysokú variabilitu u nekódujúcich oblastí.

Abstract

In this thesis I study ribosomal DNA in 39 non-cropped species of genus *Trifolium*. It is one of the most important functional organelles in the cell. Ribosomal DNA is transcribed into the rRNA. Subunits of rRNA form ribosom. Whole ribosom with helping proteins is able to translate information from mRNA into the proteins. Technique of fluorescent *in situ* hybridization was used for analysis of the number and localization of rDNA loci 5S and 45S, specifically loci 25S, in the genomes of species of genus *Trifolium*. Localization of loci is very variable. In the second part of my thesis, there is comparative sequence analysis of different species from family *Fabaceae*. Data of transcribed and non-transcribed spacers ITS1, ITS2, NTS and coding sequence of gene 5S are from free databases. Coding sequence was highly conserved, on the other hand noncoding sequences were under pressure of evolution.



ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Akademický rok: 2016/2017

Ústav: Ústav experimentální biologie

Studentka: Bc. Radka Vozárová

Program: Experimentální biologie

Obor: Molekulární biologie a genetika

Ředitel *Ústavu experimentální biologie* PŘF MU Vám ve smyslu Studijního a zkušebního řádu MU určuje diplomovou práci s názvem:

Název práce: Studium variability lokusů ribozomální DNA v genomech druhů rodu *Trifolium*

Název práce anglicky: Study of variability in ribosomal DNA loci in species of the genus *Trifolium*

Oficiální zadání:

Cílem diplomové práce bude studium variability lokusů rDNA u různých planých i kulturních druhů rodu *Trifolium*. Budou studovány lokusy pro 5S a 45S RNA, které jsou v genomech uspořádány ve formě repeticí a pro druhy je specifický jejich počet a organizace. Bioinformatická analýza bude využita k identifikaci základních motivů studovaných lokusů u jetele a dalších osekvenovaných druhů. Bude provedena srovnávací analýza těchto repeticí a pozicí v genomech příslušných druhů. Fluorescenční in situ hybridizace bude využita k získání experimentálních srovnávacích dat

Jazyk závěrečné práce: slovenština

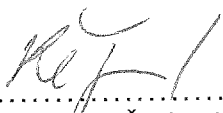
Vedoucí práce: doc. RNDr. Jana Řepková, CSc.

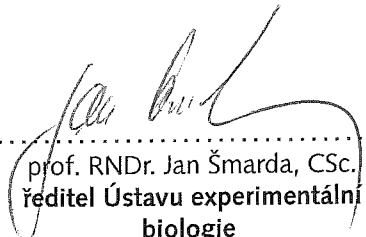
Datum zadání práce: 12. 10. 2016

V Brně dne: 2. 11. 2016

Souhlasím se zadáním (podpis, datum):


Bc. Radka Vozárová
studentka


doc. RNDr. Jana Řepková, CSc.
vedoucí práce


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

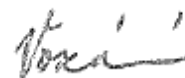
Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala své školitelce doc. RNDr. Janě Řepkové, CSc. za odbornou pomoc, čas a cenné rady, které mi poskytla při psaní mé diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Janě Dluhošové za poskytnutí rad v praktické části práci. Mé velké poděkování náleží také všem pracovníkům Laboratoře molekulární genetiky rostlin.

Prohlášení

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

Brno 3. května 2018



.....
Radka Vozárová

Obsah

1. ÚVOD A PROBLEMATIKA.....	12
1.1. Ribozómová DNA a štruktúra ribozómov	13
1.1.1. Lokus 45S.....	14
1.1.2. Lokus 5S.....	14
1.1.3. Počet lokusov rDNA v genómoch rastlín.....	15
1.1.4. Lokalizácia a usporiadanie lokusov na chromozómoch.....	16
1.2. Rod <i>Trifolium</i>	18
1.2.1. Podrod <i>Chronosemium</i>	20
1.2.2. Podrod <i>Trifolium</i>	21
2. CIELE DIPLOMOVEJ PRÁCE	24
3. MATERIÁL A METÓDY.....	25
3.1. Rastlinný materiál.....	25
3.2. Použité chemikálie.....	26
3.2.1. Cytogenetická analýza	26
3.2.2. Molekulárna analýza	27
3.3. Cytogenetická analýza	27
3.3.1. Izolácia DNA.....	27
3.3.2. Fluorescenčná <i>in situ</i> hybridizácia.....	28
3.4. Analýza <i>in silico</i>	33
4. VÝSLEDKY.....	34
4.1. Cytogenetická analýza	34
4.1.1. Hodnotenie počtu lokusov 5S a 25S rRNA a ich lokalizácie	34
4.2. Sekvenčné vyhodnotenie medzerníkových sekvencií a 5S rDNA.....	48
4.2.1. Oblasť ITS1	48
4.2.2. Oblasť ITS2.....	50
4.2.3. Kódujúca oblasť lokusu 5S a NTS neprepisujúci sa medzerník	52
5. DISKUSIA.....	54
6. SÚHRN	60
7. SUMMARY.....	61
8. LITERATÚRA	62

Zoznam skratiek

NTS	<u>n</u> on <u>t</u> ranscribed <u>s</u> pac <u>e</u> r	(neprepisovaný medzerník)
ETS	<u>e</u> xternal <u>t</u> ranscribed <u>s</u> pac <u>e</u> r	(vonkajší prepisovaný medzerník)
ITS	<u>i</u> nternal <u>t</u> ranscribed <u>s</u> pac <u>e</u> r	(vnútorný prepisovaný medzerník)
ddH ₂ O	<u>d</u> ouble- <u>d</u> istilled <u>h</u> ydrogen <u>o</u> xide	(dvakrát destilovaná voda)
DdRp	<u>D</u> NA <u>d</u> e <u>p</u> endent <u>R</u> NA <u>p</u> olymerase	(DNA dependentná RNA polymeráza)
gDNA	<u>g</u> enomic <u>D</u> NA	(genomická DNA)
cpDNA	<u>c</u> hloroplast <u>D</u> NA	(chloroplastová DNA)
rDNA	<u>r</u> ibosomal <u>D</u> NA	(ribozómová DNA)
tRNA	<u>t</u> ransfer <u>R</u> NA	(transferová RNA)
nrDNA	<u>n</u> uclear <u>D</u> NA	(jadrová DNA)
snRNA	<u>s</u> mall <u>n</u> uclear <u>R</u> NA (U1,U6 spliceosomal)	(malá jadrová RNA spliceozómu)
FISH	<u>f</u> luorescence <i>in situ</i> <u>h</u> ybridization	(fluorescenčná <i>in situ</i> hybridizácia)
NOR	<u>n</u> ucleolus <u>o</u> rganizer <u>r</u> egion	(oblasť organizátoru jadierka)
DAPI	4',6- <u>d</u> iamidino-2- <u>p</u> henyl <u>i</u> ndole	(4',6-diamidin-2-fenylindol)
TRIM	<u>t</u> erminal-repeat <u>r</u> etrotransposons <u>i</u> n <u>m</u> iniature	(terminálne opakované retrotranspozóny v miniatúrnom režime)
LTR	<u>l</u> ong <u>t</u> erminal <u>r</u> ep <u>e</u> at	(dlhé koncové opakovania)

1. ÚVOD A PROBLEMATIKA

Nenahraditeľnou a veľmi významnou súčasťou jadrového genómu eukaryontých organizmov sú okrem kódujúcich sekvencií aj nekódujúce úseky, ku ktorým patria aj repetitívne sekvencie. Nenapĺňajú funkciu matrice pre syntézu bielkovín. Repetitívne sa opakujúce sekvencie môžu byť voľne rozptýlené po genóme alebo umiestnené v tandemových opakovaníach. Práve tandemové repetície tvoria významnú časť genómu. Patria sem centroméry, teloméry ale aj ribozómová DNA a mnohé iné.

V tejto práci sa budem zaoberať jednou z najdôležitejších organel, ktoré sú nevyhnutné k realizácii genetickej informácie umiestenej v jadre bunky. Jedná sa o jedny z najstarších molekúl, ribozómové gény. Zameriam sa na počet a lokalizáciu jednotlivých lokusov, 5S a 45S, v genómoch 39 planých druhov z rodu *Trifolium*. Tento rod sa radí do významnej a veľkej čeľade *Fabaceae*. K spracovaniu bola vybraná rôznorodá vzorka, či už z pohľadu prirodzeného výskytu, doby rastu jednoročné a trvácne druhy, polyploidie genómu, ale aj základného chromozómového čísla.

Bioinformatická časť je zameraná na analýzu prepisovaných a neprepisovaných medzerníkov, ktoré sa vyskytujú medzi jednotlivými génmi tvoriace lokusy. V týchto oblastiach je predpokladaná variabilita, z dôvodu evolúcie na úrovni genómu. Tá však nie je povolená v kódujúcej sekvencií. Dôvodom je veľká dôležitosť výslednej molekuly, ktorej nefunkčnosť by mohla viesť k zániku bunky. K tejto analýze boli vybrané kultúrne druhy a iné osekvenované druhy z čeľade *Fabaceae*.

1.1. Ribozómová DNA a štruktúra ribozómov

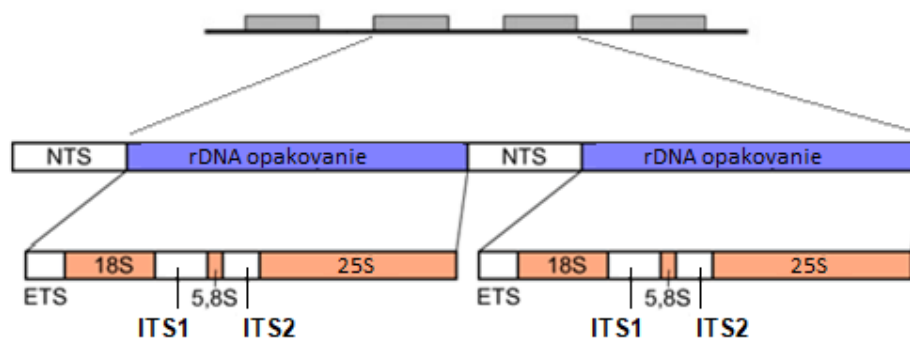
K existencii každého živého organizmu je potrebné mať plne funkčné bunky, ktoré tvoria správne fungujúci organizmus. Bunky pracujú neustále, produkujú proteíny plniace rôznorodé funkcie. Práve ribozómy sú zodpovedné za tvorbu bielkovín. Štruktúra ribozómov je pomerne jednoduchá a dnes veľmi dobre preštudovaná. Funkčné molekuly ribonukleovej kyseliny (RNA) sú zapísané v informačnej molekule deoxyribonukleovej kyseliny (DNA). Gény kódujúce ribozómovú RNA (rRNA) majú charakter transpozónových elementov. Mechanizmus množenia tandemových sekvencií zahŕňa procesy ako je translokácia, inverzia štruktúrne zmeny, duplikácie celej oblasti. V genóme sa vyskytujú v tandemových niekoľko násobných opakovaniach. Najčastejšie sú dve formy lokusov rDNA, 5S a 45S, v niekoľkých sto až tisíc kópiách. Ale aj tu existujú výnimky v usporiadaní jednotlivých génov rDNA, o ktorých sa zmienim neskôr.

K funkcii génov sú potrebné viacpodjednotkové enzýmy, DNA dependentné RNA polymerázy (DdRp). U nižších organizmov, prokaryontov a archeí, je jedným enzýmom prepisovaný celý genóm. U eukaryontov sa využíva viacero skupín DdRp. RNAPol I má 14 podjednotiek a jej aktivita prebieha v jadierku. Prepisuje polycistronický gén 45S na pre-rRNA, ktorá je posttranskripčne zostrihnutá na jednotlivé úseky rRNA, 18S, 5.8S a 25S. RNAPol II je zložená z 12 podjednotiek. V karyoplazme sa účastní prepisu štruktúrnych génov kódujúcich proteíny, ako aj iných malých molekúl. Posledná je RNAPol III, najväčšia v počte podjednotiek, 17. RNAPol III prepisuje rôzne nekódujúce sekvencie, funkčné RNA ako je transferová RNA (tRNA), 5S rRNA, spliceozomálna U6 (snRNA), signál rozoznávajúca častica 7SL RNA a iné krátke regulačné oblasti. O väčšine podjednotiek sa dá povedať, že sú zhodné alebo homologické. Avšak u RNAPol I a RNAPol III sú aj špecifické podjednotky.

Malá a veľká podjednotka vytvárajú ribozóm so sedimentačným koeficientom 80S u eukaryontných organizmov, teda aj u rastlín. Malá podjednotka 40S je tvorená 18S rRNA a veľká 60S podjednotka 25S, 5.8S a 5S rRNA. K funkčnosti celého ribozómu sa pripája ešte ďalších 80 proteínov. Syntéza a zostavovanie molekúl rRNA prebieha v jadierku, tvoreného NOR oblasťou. Plnú funkčnosť ribozóm nadobúda v cytoplazme po spojení podjednotiek s pomocnými proteínmi.

1.1.1. Lokus 45S

Oblasť 45S je označovaná ako L (linked). Tento lokus je polycistronický, zahrňujúci sekvencie 18S-5.8S-25S s dvomi vnútornými prepisujúcimi sa medzerníkmi ITS1, ITS2 (Obr. 1). Prepisu tejto oblasti sa účastní enzým RNAPol I (Garcia *et* Kovařík, 2013). Z pohľadu lokalizácie na chromozóme je častejšia distribúcia lokusu 45S na krátkom ramienku a to na jeho terminálnej časti (Roa *et* Guerra, 2012). U druhov s holokinetickými chromozómami, bez primárneho zúženia, bola 100 % preferencia umiestnenia lokusu 45S na terminálnom konci chromozómu.

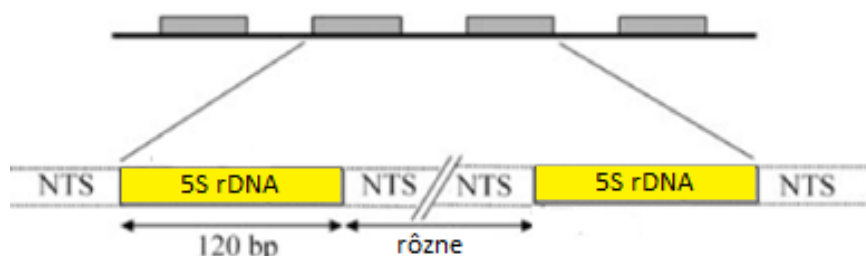


Obr. 1: Lokus 45S usporiadanie polycistronického génu 18S-5.8S-25S. Prevzaté a upravené (Maia *et al.*, 2014) Vysvetlivky: NTS- neprepisovaný medzerník, ETS- vonkajší prepisovaný medzerník, ITS1, 2- vnútorné prepisované medzerníky.

1.1.2. Lokus 5S

Sekvencia lokusu 5S, kde sa tandemovo opakuje len jeden typ génu sa označuje ako S (single). Oblasť 5S je v porovnaní s lokusom 45S jednoduchšia na usporiadanie (Obr. 2). Krátka a vysoko konzervovaná oblasť 5S je oddelená od ďalšej vnútorným neprepisovaným medzerníkom. Počet kópií lokusu 5S je bežne v genóme vyšší oproti lokusu 45S. Počet opakovaní dosahuje hodnoty od 2 000 až po 75 000 kópií (Sastri *et al.*, 1992). Lokalizácia lokusov 5S a 45S je často separovaná na rozličné chromozómy teoreticky kvôli faktu, že oblasť 5S je prepisovaná RNAPol III. Táto teória však nebola oficiálne potvrdená a preukázaná. U lokusu 5S je viditeľná preferencia umiestnenia v proximálnej a intersticiálnej oblasti krátkeho ramienka chromozómu, nie len u rastlín, ale aj u živočíchov (Nakajima *et al.*, 2012). Rozsiahle porovnávacie analýzy v tejto oblasti neboli urobené. Iným typom umiestnenia génu 5S je na retrotranspozóne s názvom *Cassandra*, patriacim medzi TRIM

elementy. Kódujúca oblasť je ohraničená dlhými koncovými opakovanými (LTR) o dĺžke 100-250 nt. LTR nesie promótor pre RNApol III. Táto štruktúra bola zaznamenaná u cievnatých rastlín (Kalendar *et al.*, 2008). Toto umiestnenie podnecuje reštrukturalizáciu genómov u jednoklíčnolistových aj dvojklíčnolistových druhov rastlín (Witte *et al.*, 2001).



Obr. 2: Štruktúra lokusu 5S. Prevzaté a upravené (Maia *et al.*, 2014). Vysvetlivky: NTS- neprepisovaný medzerník

1.1.3. Počet lokusov rDNA v genómoch rastlín

Počet lokusov rDNA sa naprieč rodmi, čeľadami a skupinami výrazne líši. U niektorých vyšších druhov rastlín, ako sú *Nothoscordum*, *Allioideae* z čeľade *Amaryllidaceae*, *Ipheion* z čeľade *Alliaceae*, okrasné kvitnúce rastliny, sa vyskytujú oba lokusy na jednom chromozóme v nesusednej pozícii (Souza *et al.*, 2012). Taktiež aj v tesnej blízkosti, viditeľne odlišiteľné iba v profáze a interfáze mitotického delenia (Barros e Silva *et al.*, 2013). U nižších organizmov, ako sú huby, oomycety, riasy, ale aj u nahosemenných a niektorých krytosemenných druhov z čeľade *Astraceae*, boli nájdené všetky 4 rDNA gény v spoločnom zoskupení v jednej prepisovanej oblasti. V takomto prípade je 5S prepisovaná z rovnakého vlákna ako ostatné sekvencie u *Ginkgo biloba* (Galián *et al.*, 2012), alebo z opačného vlákna u druhov z čeľade *Astraceae* (Garcia *et al.*, 2009) či u *Podocarpus* (Garcia et Kovařík, 2013).

Lokus 5S sa ako dvojica signálov objavuje u 58,7% krytosemenných druhov. Štúdia prebehla na 784 druhoch (Roa *et Guerra*, 2015). 175 rodov pokrýva nahosemenné aj krytosemenné rastliny s monocentromerickými chromozómami. Druhy s holokinetickými chromozómami tvorili samostatnú skupinu. Niekoľko druhov zo skupiny jednoklíčnolistových vykazovali nadpriemerne vysoké počty 5S rDNA lokusov, ako napríklad *Tulipa fosteriana* 71 signálov (Mizuochi *et al.*, 2007), *Iris juncea* 30 signálov (Martinez *et al.*, 2010). Namnožené signály sú fragmentmi po expanzii génu po genóme. Začína redukcia veľkého počtu kópií. Skrátene formy vykazujú nefunkčnosť. Nenachádzajú sa v toľkých opakovaníach ako funkčné gény

lokusov. Bežný počet signálov pre oblasť 5S u krytosemenných rastlín je 2-20 (1-10 párov) pričom viac ako polovica druhov vykazovala signál len pre 1 pár. Konkrétne pre jeden pár lokusu 54,1 % a 25,8 % pre dva páry signálov. V porovnaní s lokusom 45S sú percentá podobné pre 1 aj 2 páry signálov a to 31% (Roa *et* Guerra, 2012). Poukazuje to na nižšiu disperziu 5S než 45S. Je viditeľná negatívna selekcia voči amplikónom lokusu 5S. Nahosemenné rastliny nevykazujú tak rozdielne počty signálov lokusu 5S, bežne je to 2-8 signálov v genóme. U čeľade *Pinaceae* sú to 4 páry signálu 5S (Murray, 2013).

U nižších rastlín, machorastov, konkrétne u druhov *Marcantia* a *Pelia* boli nájdené sekvencie 5S rDNA (Orzechowska *et al.*, 2010), u paprad'orastov neprebehli podobné štúdie. Machy, pečeňovky a rožteky vykazujú výrazne negatívny tlak voči amplifikácii lokusov rDNA (Rosato *et al.*, 2016b).

1.1.4. Lokalizácia a usporiadanie lokusov na chromozómoch

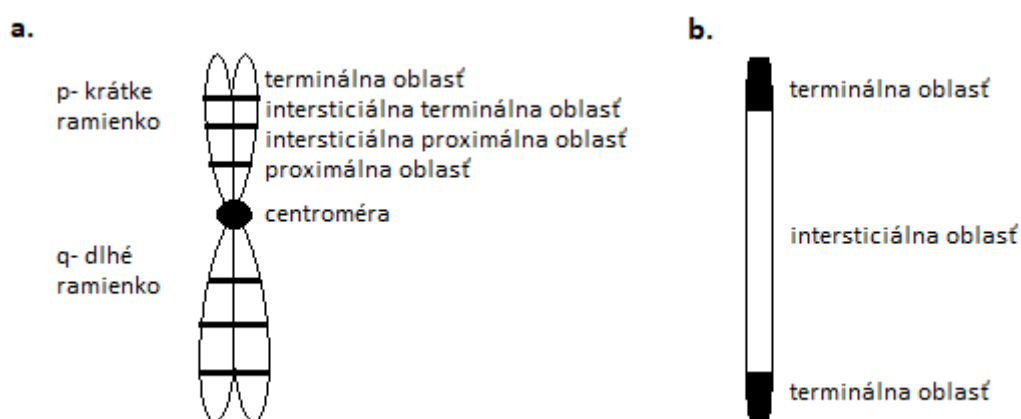
Všeobecne sa u rastlín pracuje s tromi veľkosťami chromozómov. Veľkosť sa určuje v najvyššom kondenzačnom stupni jednotlivých chromozómov. Tento jav nastáva v metafáze mitotického delenia. Dĺžka malých chromozómov sa udáva pod 3 μm , stredné chromozómy v rozmedzí 3 až 6 μm a veľké nad 6 μm . Veľkosť chromozómov často súvisí s ich počtom na bunku. Obr. 3a znázorňuje rozdelenie jednotlivých ramien chromozómu, kde sa vyskytujú lokusy rDNA génov.

Z vyššie spomínanej štúdie (Roa *et* Guerra, 2015) je viditeľná preferencia umiestnenia lokusu 5S, na monocentrickom chromozóme, na kratšom p ramienku. Nebolo tomu tak u viac ako polovice skúmaných druhov, preto sa nedajú vyvodiť definitívne závery. U iných tandemovo sa opakujúcich sekvencií, ako sú gény pre históny (Cabral-de Mello *et al.*, 2011) či U1 snRNA, nebolo zaznamenané preferenčné miesto na chromozómoch (Cabral-de-Mello *et al.*, 2012). Lokus 5S u druhov z čeľadí *Amaryllidaceae*, *Fabaceae*, *Solanaceae*, *Apiaceae* zaujíma vo väčšine pozíciu v proximálnej časti chromozómu. Terminálnu a intersticiálnu oblasť zas zaujal u druhov z čeľadí *Poaceae* a *Astraceae*. U nahosemenných rastlín je výskyt lokusu 5S na terminálnej a intersticiálnej subterminálnej oblasti chromozómu. Signál zasahuje viac než 25 % ramienka chromozómu (Souza *et al.*, 2012). Preferencia umiestnenia je primárne na proximálnej časti a sekundárne v terminálnej časti chromozómu. To je podobný znak so satelitnou DNA, ktorá je často pericentromerická alebo terminálna (Koo *et al.*, 2011). V štúdiách dodnes nebola potvrdená hypotéza závislosti lokalizácie lokusov na veľkosti

chromozómu. V evolúcii rastlinných genómov sa uplatňuje efekt transpozície a veľkých prestavieb.

Lokusy 5S a 45S sa vyskytujú na rôznych chromozómoch, ale aj spolu na jednom chromozóme, často aj v tesnej blízkosti alebo na opačných ramienkach (Barros e Silva *et al.*, 2013). Umiestnenie lokusov na rôznych chromozómoch nevyklučuje ich spoluprácu a tesnú blízkosť v profáze a interfáze mitotického delenia pri stavbe NOR oblasti (Németh *et al.*, 2010). Žiadne veľké výhody v lokalizácii oboch lokusov na jednom chromozóme neboli zaznamenané. Frekvencia výskytu lokusov v tesnej blízkosti na jednom chromozóme je pre zostavy 45S-5S 27,8 %; 5S-5S 13,5 % a 45S-45S 3,4 %. Pre zostavu 45S-5S je typické umiestnenie na krátkom ramienku. Často je nerozlíšiteľné či sa jedná o jeden alebo dva samostatné signály v prípade rovnakých sond, ako je tomu napríklad u *Hordeum vulgare* (Taketa *et al.*, 2005). Technika fluorescenčnej *in situ* hybridizácie (FISH) má isté fyzikálne limity pri väzbe sondy a zaznamenaní signálu.

Špecifickým druhom sú holokinetické chromozómy (Obr. 3b), ktoré nemajú centroméru. Na terminálnych koncoch týchto chromozómov sú často dva signály. V prípade lokusu 5S bola u 2/3 skúmaných druhov lokalizácia v terminálnej oblasti chromozómu a 100 % terminálne umiestnenie lokusu 45S (Roa *et Guerra*, 2012). To sa stotožňuje s rozmiestnením lokusov u druhu *Luzula* (Heckmann *et al.*, 2013).



Obr. 3: a.) Rozdelenie ramien chromozómu, popis umiestnenia lokusov rDNA. b.) Holokinetický chromozómom rozdelenie chromozómu Vytvorené na základe popisu. (Roa *et Guerra*, 2015).

1.2. Rod *Trifolium*

Do tretej najväčšej čeľade, *Fabaceae* (*Leguminosae*), vyšších kvitnúcich rastlín patrí rod *Trifolium* zahŕňajúci viac ako 255 druhov (Ellison *et al.*, 2006). Základnými znakmi tohto rodu sú trojpočetné listy, byliny jednorôčné či viacročné, trvalky dosahujúce výšku do 50 cm u kultúrnych druhov a odrôd aj viac. Kvety sú malej až strednej veľkosti 0,3-2,5 cm vytvárajúce oválne či špicaté súkvetie typu hlávka. Jednotlivé kvety sú súmerné tvorené zo štyroch častí: striedka, člnok a dve krídla. Rastliny bývajú samoopelivé aj cudzoopelivé. Po oplodnení tvoria plody obsahujúce 1 až 2 semená výnimočne viac, do 9 kusov (Zohary *et Heller*, 1984).

Lokalizácia výskytu je mierne až subtropické pásmo severnej a južnej pologuli, so širokým výškovým záberom. Existujú druhy dobre adaptované na chladnú aj teplú klímu. Druhy z tohto rodu sú schopné obývať lúky, prémie, lesy, polopúšte, vysokohorské oblasti (Tab. 1). Spoločným rysom týchto biotopov je slnečné žiarenie, niektoré druhy sú však schopné prosperovať i na tienistom stanovišti. Pôvodná lokalizácia predkov, z ktorých vzišli druhy z rodu *Trifolium* je v mierne teplej až subtropickej oblasti okrem juhovýchodnej Ázie a Austrálie, kde sa d'ateľina prirodzene nevyskytuje. Názory na pôvodnú lokalizáciu vzniku sa rôznia, Zohary (1972) udáva pôvod rodu v západnej Severnej Amerike a ďalšie šírenie po východnej pologuli. Taylor *et al.* 1979 vyslovili domnienku pôvodu rodu v Stredomorskej oblasti, čo sa považuje za pravdepodobnejšie miesto pôvodu. Faktom by mohla byť najväčšia diverzita na úrovni chromozómov práve v tejto lokalite, kde mohlo dochádzať k evolúcii na úrovni genómu. Z tohto dôvodu sa rozrôznilo chromozómové číslo rodu ($x=8, 7, 6, 5$). Existujú aj rôzne počty chromozómov v rámci jedného druhu či sa už jedná o diploidný alebo polyploidný stav.

V roku 2005 bol vznik predkov rodu *Trifolium* stanovený do obdobia pred 17,1 až 30,2 miliónmi rokov. Štúdia prebehla na základe chloroplastovej DNA (cpDNA) (*matK*, *rbcL*). Mimo podrod *Chronosemium* bol stanovený vznik rodu do obdobia pred 12,4 milióna rokov, čo je obdobie skorého Miocénu (Lavin *et al.*, 2005). Africké druhy sú považované za monofyletické. V minulosti museli nastať dve disperzné udalosti smerujúce do subsaharskej Afriky a do Stredomoria. Ťažko je začleniteľný endemický druh z Madagaskaru. K zaradeniu druhov do fylogenetického stromu sa začali používať 2 oblasti genómu, a to jadrového a organelového, prípadne ITS oblasti rDNA 18S-25S. V minulosti to

boli fenotypové znaky či lokalita výskytu. Pre fylogenetickú štúdiu z roku 2006 (Ellison *et al.*, 2006) bola použitá nrDNA sekvencia ITS1 jej počet a vzor. Ako organelová DNA bola využitá cpDNA, tRNA (UAA) pre aminokyselinu leucín (*trnL*). Táto diplomová práca vychádza z údajov spomínanej štúdie.

Tab. 1: Lokalita výskytu druhov z rodu *Trifolium*. Prevzaté a upravené (Ellison *et al.*, 2006). Vysvetlivky: svetové strany S (sever), J (juh), V (východ). Posledný stĺpec ukazuje koľko druhov z jednotlivých sekcií bolo vybraných na spracovanie v tejto práci.

Podrod	Sekcia	Lokalita výskytu	Počet druhov	Spracované druhy
<i>Chronosemium</i>		Stredomorie	20	5
<i>Trifolium</i>	<i>Glycyrrhizum</i>	Alpy, Kaukaz	2	0
	<i>Paramesus</i>	Stredomorie	2	2
	<i>Lupinaster</i>	V Európa, Sibír	3	1
	<i>Trifolium</i>	Stredomorie, J Afrika	73	14
	<i>Trichocephalum</i>	Stredomorie	9	1
	<i>Vesicastrum</i>	Stredomorie, subsaharská Afrika, Madagaskar	54	4
	<i>Trifoliastrum</i>	Stredomorie	20	8
	<i>Involucrarium</i>	S, J Amerika	72	4

Rozmanitosť rodu *Trifolium* je viditeľná v počte chromozómov. Za základné chromozómové číslo sa považuje $x=8$, ktoré sa vyskytuje u 80% zo 185 druhov (Ansari *et al.*, 1999). Ďalej sú možné čísla $x=5, 6, 7$, rod zahŕňa 31 aneuploidov (Vižintin *et al.*, 2006). Veľkú skupinu tvoria diploidné druhy, trvalky so základným chromozómovým číslom $x=8$. Aneuploidné druhy s $x=5, 6, 7$ sú skôr jednoročné byliny. Polyploidia je zas typická pre trvalky (Zohary *et Heller*, 1984). Polyploidia je známa u 24 druhov, tetraploidné, hexaploidné, oktaploidné či hexadekaploidné zostavy genómov. 11 druhov je schopných žiť s diploidnou ale aj aneuploidnou sadou chromozómov (Ellison *et al.*, 2006). Aneuploidné druhy sú vo väčšej miere zastúpené v sekciách *Trifolium* a *Trichocephalum*. Takmer vôbec sa nevyskytujú v sekciách *Vesicastrum*, *Trifoliastrum*, *Involucrarium* podrodu *Trifolium*. Polyploidný typ genómu sa zriedka zakladá z aneuploidných zostáv, typická je polyploidizácia z $x=8$. Polovica druhov je schopná symbiotického spolužitia s hľuzovitou baktériou *Rhizobium leguminosarum* biovar. *trifolii* (Sprent, 2001). Za jej prítomnosti je rastlina schopná viazať vzdušný dusík a ďalej ho spracovať.

Vznik polyploidných druhov je častou evolučnou silou, ktorá podporuje rozrôznenie vyšších kvitnúcich rastlín (Ma *et Gustafson*, 2005.) Aloploidia je spôsob kríženia dvoch príbuzných

druhov, kedy dochádza k zdvojeniu sád chromozómov. V embryu sa stretnú dva genómy a cytoplazmy rodičov. Nastávajú rozsiahle prestavby genómu, umlčovanie určitých génov na epigenetickej úrovni. Nad delením jadra musí prevziať kontrolu jedna oblasť NOR, ktorá je väčšinou maternálneho pôvodu. Nerovnomerné delenie jadra, asymetricky crossing-over môže viesť k homogenizácii alebo k dominancii oblasti od jedného rodiča a druhá je umlčaná. Čiastočná homogenizácia bola zaznamenaná u *Tragopogon mirus* a *T. miscellus* (Kovařík *et al.*, 2005). Nastáva stav amplifikácií a delácií, ako proces prestavieb genómu. Metylácia DNA a histónové modifikácie sú komplexom epigenetických úprav, ktoré ovplyvňujú stav kondenzácie chromatínu a regulujú tým expresiu génov rDNA (Volkov *et al.*, 2007). Aneuploidia je rozšírenejšia než polyploidia naprieč rodom. Podrod *Chronosemium* a sekcia *Trichocephalum* zahŕňajú aneuploidné druhy, jeden je v skupine *Vesicastrum* (*T. resupinatum*) a *Trifoliastrum* (*T. glomeratum*). Nezávisle na sebe sa druhy z rôznych sekcií s chromozómovým počtom $2n=12$, vyvinuli z druhov s počtom chromozómov $2n=14$. Evolúcia na úrovni chromozómov je viditeľná u druhov s počtom chromozómov 16 aj 14 smerujúcim ku nižšiemu základnému chromozómovému číslu.

Významnosť d'atelín sa nedá poprieť. Dnes sa d'atelina pestuje rozšírene po celom svete, najmä ako krmovina pre hospodárske zvieratá. Využíva sa 16 druhov s mnohými odrodami. Získať medzidruhovú hybridy je pomerne náročný proces. V šľachtiteľstve je potrebné prekonať problémy s rozmnožovaním a získaním fertílnej generácie.

1.2.1. Podrod *Chronosemium*

Znakom podrodu *Chronosemium* sú žlté kvety s malými jednosemennými plodmi, sperené trojdielne listy. Tieto znaky sa v podrode *Trifolium* nevyskytujú. Jedná sa o ročné druhy bylín, okrem dvoch druhov, *T. badium* a *T. rytidosemium*. Druh *T. dubium*, jediný polyploid z tejto skupiny, obýva oblasť východnej Euroázie. Dost' rozšírený je aj v severnej Amerike. Diploidné druhy považované za jeho predkov sú *T. campestre* ($2n=14$) a *T. micranthum* ($2n=16$) obývajúce podobné oblasti. Dlhý čas sa považoval za alotetraploida $2n=28$ (Vižintin *et al.*, 2006), až do roku 2008, kedy bol počet chromozómov upravený na $2n=30$ (Ansari *et al.*, 2008). Pri sekvenovaní *T. dubium* boli nájdené dva typy ITS oblasti, ktoré sú veľmi podobné so sekvenciami *T. campestre* a *T. micranthum*. Lokus 45S v dekonenzovanej forme, plne aktívny pochádza od *T. campestre*, ktorý je považovaný za maternálneho predka. Oblasť pochádzajúca od *T. micranthum* je kondenzovaná, transkripčne neaktívna. Signály pre oblasť

5S boli zas oveľa silnejšie od samčieho rodiča *T. micranthum*. Pri štúdií boli zaznamenané u druhu *T. dubium* post-polyploidizačné zmeny smerujúce k diploidizácii genómu (Ansari *et al.*, 2008). Je tu preukázané postupné zjednotenie funkčnosti genómu na úrovni DNA za účasti epigenetických modifikácií po alopolyloidizačnej udalosti, ktorá u tohto druhu prebehla. Ovládnutie nového genómu nastalo nadradením jednej rodičovskej NOR oblasti nad druhou. To je krok k diploidizácii genómu organizmu. V tomto prípade je viditeľná redukcia lokusu 45S aj na úrovni DNA.

1.2.2. Podrod *Trifolium*

Sekcie *Glycyrrhizum*, *Paramesus*, *Lupinaster*

Do sekcie *Glycyrrhizum* patria dva druhy, ktoré sú trvalé byliny. V oblasti Pyrenejí je vo veľkej miere rozšírený vysokohorský druh, *T. alpinum* (Lauga *et al.*, 2009). Druhá dvojčlenná sekcia *Paramesus* zahŕňa druhy *T. glanduliferum* a *T. strictum*. Jedná sa o ročné byliny, pre ktoré sú typickým znakom žľaznaté palisty. Lokalita prirodzeného výskytu je oblasť Stredomoria (Ellison *et al.*, 2006). Do sekcie *Lupinaster* patria tri druhy, *T. lupinaster* má viacero chromozómových zostáv.

Sekcia *Trifolium*

Skupina *Trifolium* je najpočetnejšiu sekciou z rodu *Trifolium*, zahŕňa najviac druhov. Je to najrozmanitejšia skupina. Základné chromozómové čísla sú $x=5, 6, 7, 8$ genómy sú v diploidnom i polyploidnom stave, jedná sa o trvalky aj ročné druhy. Do tejto sekcie patrí *T. pannonicum*, ktorý je polyploidnou trvalkou rastúcou na stepiach strednej a východnej Európy. Má podobnú *trnL* sekvenciu s ďalšími dvomi druhmi zo skupiny, *T. patulum* a *T. squamosum*.

Sekcia *Trichocephalum*

Súkvetie druhov zo sekcie *Trichocephalum* je tvorené veľkým počtom striedajúcich sa fertílých a sterilných kvetov. Typickou črtou je vysoko špecifický mechanizmus šírenia semien, geokarpia. Stonka nesúca kvet sa ohýba k zemi, semená dozrievajú a uvoľňujú sa až v pôde. Do tejto skupiny patria *T. subterraneum* ($2n=8x=16$) *T. israeliticum* ($2n=6x=12$)

a u nich nastala výrazná špecializácia v počte chromozómov. Dodnes neboli objasnené príčiny tejto udalosti. Najbližším predkom *T. israeliticum* bol druh s 12 chromozómami (Falistocco *et al.*, 2013). Druh *T. subterraneum* je diploidný ročný druh $2n=16$ pôvodom zo Stredomoria a bežne rozšírený do miernych oblastí západnej Európy. Pred viac než 100 rokmi bol umelo dovezený do Austrálie, kde je dnes významnou krmovinou, ktorá je schopná sama každoročne obnovovať pasienky. Druh *T. israeliticum* má viac endemický charakter viazaný na oblasť východného Stredomoria. NOR oblasť sa nachádza na satelitných chromozómoch s viditeľným sekundárnym zúžením. V strednej oblasti dlhého ramienka u *T. israeliticum* a druhý pár zas na kratšom ramienku terminálnej oblasti iného páru chromozómov. U *T. israeliticum* bola zaznamenaná výrazná expanzia lokusu 5S a to až na 5 zo 6 párov chromozómov do pericentromerickej oblasti. *T. subterraneum* ma len 1 pár tohto lokusu. Analýzou NTS oblasti lokusu 5S a porovnaním medzi druhmi, bolo potvrdené zaradenie druhov do jednej sekcie. Boli zaznamenané aj zriedkavé substitúcie C na T a G na T. Podobné odchýlky sa vyskytujú aj u poddruhov skúmaných druhov.

Sekcia Vesicastrum

Patria sem druhy vyskytujúce sa v oblasti subsaharskej Afriky. Táto skupina nie je monofyletická a jej pôvod nie je úplne jasný. Preto nemusí byť fylogenetický strom presný (Ellison *et al.*, 2006). Kalichy kvetov majú obličkovitý tvar.

Sekcia Trifolium

Do sekcie *Trifolium* patria euroázijské druhy, medzi ktoré patrí aj významná celosvetovo rozšírená bylina, ďatelina biela *T. repens* ($2n=4x=32$) považuje sa za alotetraploida. Genetické analýzy DNA a pomocné techniky FISH, genómová *in situ* hybridizácia (GISH) ukazujú na diploidných predkov *T. palleescens* ($2n=16$) a *T. occidentale* ($2n=16$). Zaznamenaná bola podobnosť sekvencie intrónu chloroplastovej *trnL* s *T. palleescens* a ITS jadrovej DNA s *T. occidentale*. Výsledkom je medzidruhový hybrid *T. repens*, horského druhu *T. palleescens*, obývajúcего nadmorské výšky aj 1800 m.n.m. (Raffl *et al.*, 2008) a prímorského druhu *T. occidentale*. Dnešné druhy sú si síce morfológicky podobné, ale geneticky odlišné natoľko, že žijú na úplne rozdielnych stanoviskách a kríženie medzi nimi dnes nedáva plodné potomstvo. K overeniu príbuznosti boli použité sondy GISH z *T. palleescens*, kde NOR oblasti nevykazovali hybridizáciu. Predkom bol pravdepodobne blízky príbuzný dnešnému druhu *T.*

pallescens. V prípade *T. occidentale* bola hybridizácia v oblasti telomér, centromér aj NOR oblastí (Williams *et al.*, 2012). V modernej populácii *T. repens* bola jedna dvojica nesúca oblasť NOR eliminovaná z genómu.

Sekcia *Involucrarium*

Typickým znakom tejto skupiny je pôvod na západnej pologuli. Vzťahy v rámci skupiny nie sú úplne vyjasnené. Nejasné je rozšírenie v Amerike. V tejto sekcii sa objavuje najväčší počet polyploidných druhov, 10.

2. CIELE DIPLOMOVEJ PRÁCE

Hlavným cieľom mojej diplomovej práce bolo štúdium variability lokusov ribozómovej DNA z pohľadu umiestnenia a počtu, v genómoch 39 planých druhov z rodu *Trifolium* na cytogenetickej úrovni. Druhou úlohou bola molekulárna analýza *in silico* u osekvenovaných druhov rodu *Trifolium* a príbuzných druhov z čeľade *Fabaceae* z voľne dostupných údajov z databázy GenBank.

Ciele diplomovej práce sa dajú zhrnúť do nasledujúcich bodov:

1. Cytogenetická analýza
 - a. Overenie počtu chromozómov u jednotlivých druhov d'atelín
 - b. Lokalizácia a počet lokusov 5S a 45S rDNA pomocou fluorescenčnej *in situ* hybridizácie
2. Molekulárna analýza
 - a. Bioinformatickým prístupom porovnať prepisované a neprepisované medzerníky v rámci lokusov rDNA u osekvenovaných druhov z čeľade *Fabaceae*.

3. MATERIÁL A METÓDY

3.1. Rastlinný materiál

V práci bolo použitých 39 planých druhov d'atelín rodu *Trifolium*. Semiačka sú pôvodom z troch génových bánk (Tab. 2).

Tab. 2: Zoznam druhov *Trifolium* a zdroje semien.

Druh	Banka	Identifikačné číslo
<i>T. aureum</i> L.	R	13T0500014
<i>T. campestre</i> Schreb.	G	TRIF 97
<i>T. dubium</i> Sibth.	G	TRIF 1128
<i>T. badium</i> Schreb.	NZ	AZ4518, AZ159
<i>T. micranthum</i> Viv.	NZ	AZ2026
<i>T. lupinaster</i> L.	G	TRIF 271
<i>T. strictum</i> L.	G	TRIF 109
<i>T. glanduliferum</i> Boiss.	NZ	AZ6880
<i>T. subterraneum</i> L.	G	TRIF 259
<i>T. montanum</i> L.	G	TRIF 152
<i>T. nigrescens</i> Viv.	G	TRIF 56
<i>T. repens</i> L.	G	TRIF 170
<i>T. glomeratum</i> L.	G	TRIF 136, 142
<i>T. thalii</i> Vill.	NZ	AZ6833
<i>T. pallescens</i> Schreb.	NZ	AZ6429
<i>T. occidentale</i> Coombe	NZ	OCD1210,OCD50
<i>T. uniflorum</i> L.	NZ	AZ7031
<i>T. microcephalum</i> Pursh.	G	TRIF 244
<i>T. amabile</i> Kunth.	NZ	AZ4517
<i>T. microdon</i> Hook. & Arn.	NZ	AZ6256
<i>T. chilense</i> Hook. & Arn.	NZ	AZ1759
<i>T. spumosum</i> L.	R	13T0500086
<i>T. spumosum</i> L.	NZ	AZ198
<i>T. hybridum</i> L.	G	TRIF 191
<i>T. fragiferum</i> L.	G	TRIF 1140
<i>T. resupinatum</i> L.	G	TRIF 1134
<i>T. purpureum</i> Loisel.	G	TRIF 143
<i>T. pannonicum</i> Jacq.	G	TRIF 8
<i>T. cherleri</i> L.	G	TRIF 135
<i>T. hirtum</i> All.	G	TRIF 213
<i>T. hirtum</i> All.	NZ	AZ6762
<i>T. bocconeii</i> Savi.	G	TRIF 81, 93, 40
<i>T. arvense</i> L.	R	13T0500032
<i>T. ligusticum</i> Balb. ex Loisel.	G	TRIF 137

<i>T. stellatum L.</i>	G	TRIF 252
<i>T. rubens L.</i>	G	TRIF 33, 211
<i>T. medium L.</i>	G	TRIF 179, 201
<i>T. alpestre L.</i>	G	TRIF 210
<i>T. squamosum L.</i>	G	TRIF 68
<i>T. diffusum Ehrh.</i>	G	TRIF 250
<i>T. pallidum Waldst & Kit</i>	G	TRIF 253

Vysvetlivky: R- génová banka VÚRV, v.v.i. Praha Ruzyně; G- Gatersleben IPK, Nemecko; NZ- AgResearch, Nový Zéland.

3.2. Použité chemikálie

3.2.1. Cytogenetická analýza

- 2x CTAB: 2% cetyltrimetylamoniumbromid (CTAB), 100mM Tris (pH 8,0), 20mM EDTA (pH 8,0), 1,4M NaCl, 1% polyvinylpyrolidol (PVP, Mr 40000)
- 10% CTAB: 10% CTAB, 0,7M NaCl
- CTAB precipitačný pufo: 1% CTAB, 50mM Tris (pH 8,0), 10mM EDTA (pH 8,0)
- High-salt TE pufo: 10mM Tris (pH 8,0), 1mM EDTA (pH 8,0), 1M NaCl
- Carnoyova fixáž: 96% etanol a 99% k. octová v pomere 3:1
- 10x citrátový pufo: 100mM k. citrónová a 100mM citrát sodný v pomere 2:3, pH 4,8
- roztok pektolytických enzýmov v citrátovom pufo: 0,3% pektinlyáza (Sigma), 0,3% celulóza (Sigma), 0,3% cytohelikáza (Sigma) v 1x citrátovom pufo
- 20x SSC: 3M NaCl, 300mM citrát sodný (pH 7,0)
- RNáza: 100 µg/ml DNase-free ribonuclease A (AppliChem)
- Roztok pepsínu (výsledná koncentrácia 100 µg/ml) miešame z 50 µl pepsínu s koncentráciou 0,1 g/ml s 50 ml 10 mM HCl
- Hybridizačný pufo 77% stringencia: 50% formamid a 10% dextran sulfát v 2x SSC
- 20% formamid v 2x SSC, pH 7,0 (stringencia 64)
- 4T pufo: 4x SSC/Tween; 4x SSC, 0,05% Tween-20 (Sigma - Aldrich)

- blokovací roztok: 5% boviný sérový albumín (Sigma) a 0,2% Tween-20 v 4x SSC
- zmes protilátok: Cy3-streptavidín (Amersham GE Healthcare) o výslednej koncentrácii 1:750 a Anti-digoxigenin-fluorescein (Roche) o výslednej koncentrácii 1:250 v TNB pufrí
- TNB pufor: 100 mM Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 0,5% Blocking Reagent (Roche)
- TNT pufor: 100 mM Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 0,05% Tween-20

3.2.2. Molekulárna analýza

- 50x TAE: 20 ml 2M Tris, 5 ml 0,5M EDTA (pH 8,0)
- Etídiumbromid: 1 g etídiumbromidu v 100 ml ddH₂O
- Elučný pufor: 10mM Tris-HCl, pH 8,5

3.3. Cytogenetická analýza

3.3.1. Izolácia DNA

Izolácia celkovej genómovej DNA (gDNA) prebehla u rastlín *Arabidopsis thaliana* a *T. pratense* odroda Tatra na neskoršie využitie pri výrobe sondy. Pri izolácii gDNA bolo použité 100 mg nastrihaných listov zamrazených v tekutom dusíku, ktoré boli skladované pri teplote -72 °C. Použitá metóda bola izolácia gDNA metódou CTAB (Rogers *et* Bendich, 1988). Homogenizácia zmrazených listov prebehla v tekutom dusíku, kedy bolo pridaných 140 µl 2x CTAB zahriateho na 65 °C. Po premiešaní prebehla inkubácia 5 minút vo vodnom kúpeli na 65 °C. Nasledovalo pridanie 210 µl chloroformu, premiešaná suspenzia bola centrifugovaná 30 sekúnd na 12 000 rpm. Odoberal sa supernatant o objeme 120 µl a pridalo sa 12 µl 10 % roztoku CTAB zohriateho na 65 °C. Po premiešaní sa pridalo 120 µl chloroformu s následnou centrifugáciou 30 s pri 12 000 rpm. 100 µl odoberateľného supernatantu bolo zmiešané so 100 µl CTAB precipitačného pufru. Po premiešaní prebehla centrifugácia pri 14 000 rpm na 60 s. Supernatant bol odstránený a k peletu bolo pridaných 50 µl High-salt TE pufru. Zmes sa po premiešaní inkubovala 10 minút vo vodnom kúpeli pri 65 °C. Po uplynutí času bolo pridaných 100 µl 96 % etanolu vychladeného na -20 °C. Nasledovala centrifugácia v chladiacej centrifúge pri 4 °C na 14 000 rpm po dobu 10 minút. Supernatant bol odpipetovaný. Postup sa potom opakoval s 50 µl 80 % etanolu. Pelet sa nechal vyschnúť pri

laboratórnej teplote po dobu 30 minút a potom bol rozpustený v 40 µl ddH₂O. Takto vyzolovaná DNA sa uchovala v chladničke pri teplote 2-8 °C. Koncentrácia a čistota vyzolovanej gDNA bola zistená spektrofotometricky na prístroji NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, USA)

3.3.2. Fluorescenčná *in situ* hybridizácia

Protokol k technike FISH bol prevzatý z práce Lysáka a Mandákovej (Lysák *et* Mandáková, 2013) a upravený k výrobe preparátov z koreňových špičiek.

Pestovanie rastlín

Pre získanie korenkov pre ďalšie spracovanie bolo využitých niekoľko postupov pestovania.

1) Klasickým prístupom bolo klíčenie semien na Petriho miskách s navlhčeným filtračným papierom. Misky boli zaistené parafilmom proti vyparovaniu vody. Vyklíčené rastliny boli presunuté do zeminy, perlitu s MS médiom alebo priamo odobraté do eppendorfiiek s vodou na ďalšie spracovanie. Pri odbere boli rastliny vytiahnuté z perlitu a odobrali sa koreňky. Podobne sa spracovali aj koreňky z rastlín pestovaných v zemine.

2) Výsev semien na médiu (Murashige *et* Skoog, 1962) s phytagélom prebiehal na Petriho miskách. Sterilizácia semien prebehla vo flowboxe. Do 1,5 ml eppendorfky sa k semiačkam pridalo 200 µl 70 % etanolu a 600 µl ddH₂O. Päťkrát sa premyli ddH₂O. Pridalo sa 200 µl SAVA zriedeného s vodou 1:1 a nechalo sa pôsobiť 5 minút. Šesťkrát sa premyli sterilnou vodou a následne sa premyté semená so zvyškom kvapaliny naniesli na Petriho misku s gélom. Misky zaistené parafilmom sa nechali 24 až 48 hodín v chlade, potom sa umiestnili do kultivačnej miestnosti s fotoperiódou 16/8.

Ďalším spôsobom je priamy odber alebo presun rastlín do perlitu či zeminy. Pri pestovaní na perlite sa aplikoval 20% roztok MS média. Pre urýchlenie odberu a skrátenie času rastu rastlín do štandardných rozmerov boli zvolené skoršie odbery, aj hneď po vyklíčení semien.

Príprava koreňových špičiek

Odobraté koreňky zakončené bielou špičkou boli prenesené do eppendorfiiek s ddH₂O a umiestnené na noc na ľad pre synchronizáciu mitóz. Druhý deň bola voda vymenená za Carnoyovu fixáž, tretí deň sa vymenila za novú fixáž a koreňky sa uskladnili v mraze -20 °C. Pred použitím boli koreňky opláchnuté na 10 minút v ddH₂O. Potom sa koreňky premyli v 1x citrátovom pufri na 5 minút. Koreňové špičky boli odrezané a presunuté do 0,5 ml eppendorfky s 30 µl roztoku pektolytických enzýmov v citrátovom pufri. Ďalej boli vzorky inkubované pri 37 °C po dobu 80-100 minút. Eppendorfky s natrávenými koreňkami sa zvortexovali až do vytvorenia homogénnej suspenzie. Pridalo sa 470 µl ddH₂O a znovu sa vzorky zvortexovali, centrifugovali sa pri 10 000 rpm po dobu 2 minút. Odpipetoval sa supernatant a k peletu bolo pridaných 470 µl 96 % etanolu, zvortexovalo sa a znovu prebehla centrifugácia po dobu 2 minút pri 11 000 rpm. Resuspendácia peletu prebehla v 96 % etanole v pomere 10 µl na 1 sklo.

Výroba a prezeranie preparátu

Vodný kúpeľ bol predhriaty na 55-60 °C, prikrytý alobalom a obráteným lievikom. Pripravili sa dve fixáže prvá je v pomere 400 µl 96 % etanolu s 130 µl 99 % kyseliny octovej a druhá je silnejšia v pomere 240 µl 96 % etanolu a 130 µl 99 % k. octovej. Na čisté podložné sklo sa nakvapkalo 10 µl suspenzie a nechala sa rovnomerne rozprestrieť. Keď boli viditeľné biele kryštály pridala sa prvá fixáž. Približne po 30 sekundách je fixáž odparená, preparát sa zoberie stranou so vzorkou nad vodný kúpeľ do výšky 10-15 cm nad ukončením obráteného lievika. Okamžite sa kvaplo na preparát 5 µl druhej fixáže. Po 5 sekundách sa preparát presunul nad vodnú paru asi na 3 sekundy. Preparát schol voľne na vzduchu. Takto pripravené preparáty sa uskladňujú v chladničke.

Pre výber skla na ďalšie spracovanie sa na sklo napipetovalo 10 µl Vectashieldu s DAPI (Vector Laboratories, H-1200), prikrylo sa krycím sklom 22x22 mm a pozorovalo sa pod fluorescenčným mikroskopom (Olympus BX 51). Overila sa prítomnosť cytoplazmy, počet mitóz vo fáze profázy či metafázy. Po prezretí preparátov sa krycie sklo striaslo a preparát sa postupne omýval v ddH₂O, dvakrát v 2xSSC roztoku a následne sa odvodňoval vzostupnou alkoholovou, etanolovou radou 70 %, 90 % a 96 %, v každom roztoku po dobu 3-5 minút a voľne uschol pri laboratórnej teplote.

Pôsobenie RNázou a pepsínom

Vybrané preparáty sa premývajú dvakrát v 2xSSC. Na veľké krycie sklo 24x50 mm sa napipetovalo 100 µl roztoku RNázy v pomere 1:9 s ddH₂O. Podložné sklo sa položí na krycie a rýchlo sa obráti. Pri tomto procese by nemali vzniknúť bubliny, inak sa odstraňujú pôsobením preparačnej ihly na povrch krycieho skla. Takto pripravené preparáty sa umiestnili do vlhkej komôrky a inkubovali sa pri 37 °C 1 hodinu. Prudkým pohybom sa striaslo krycie sklo a preparáty sa omyli dvakrát v 2xSSC po 5 minút, následne v predhriatom pepsíne na 37°C o objeme 50 ml, presne na 5 minút. Znovu sa dvakrát omyli v 2xSSC. Následne prebehla postfixácia preparátov v 4x formaldehyde v 2xSSC na 10 minút. Premyli sa dvakrát v 2xSSC a odvodnili vzostupnou etanolovou radou 70 %, 90 %, 96 %. Nechali sa voľne uschnúť. Sklá boli po tomto kroku pripravené na nanosenie sondy a skladovali sa v chladničke.

Príprava k výrobe sondy FISH:

Príprava sondy pre oblasť 5S prebehla na základe sekvencie rDNA z GenBank. Primery boli navrhnuté (Tab. 3) z rastliny *T. repens* (AF072692.1). Po polymerázovej reťazovej reakcie (PCR) bol úsek dlhý 117 bp (Obr. 5). Druhá sonda pre lokus 25S, ktorý je súčasťou oblasti 45S, bola vytvorená na základe sekvencie rDNA z *A. thaliana* (X52320.1), primery (Tab. 3). Úsek po amplifikácii mal 899 bp (Obr. 5).

Sekvencia lokusu 5S v smere 5'->3'

```
CCACGCTAGTATGGTCGTGATT 22
|||||
1 AGGTGCGATCATACCAGCACTAATGCACCGGATCCCATCAGAACTCCGCA 50
51 GTTAAGCGTGCTTGGGCGAGAGTAGTACTAGGATGGGTGACCTCCTGGGA 100
||
CT
101 AGTCCTTGTGTTGCACCT 118
|||||
TCAGGAACACAACGTGGAG 21
```

Časť sekvencie génu 25S v smere 5'->3'

```
AAGGGTGACAGGGACAGATGATA 23
|||||
1 TTCCCACTGTCCCTGTCTACTATCCAGCGAAACCACAGCCAAGGGAACGG 50
51 GCTTGGCAGAATCAGCGGGGAAAGAAGACCCTGTTGAGCTTGACTCTAGT 100
101 CCGACTTTGTGAAATGACTTGAGAGGTGTAGGATAAGTGGGAGCTTCGGC 150
151 GCAAGTGAAATACCACTACTTTTAACTTATTTTACTTACTCCGTGAATC 200
201 GGAGGCCGGGGTACAACCCCTGTTTTTGGTCCCAAGGCTCGCTTCGGCGG 250
251 GTCGATCCGGGCGGAGGACATTGTCAGGTGGGGAGTTTGGCTGGGGCGGC 300
```

```

301 ACATCTGTTAAAAGATAACGCAGGTGTCCTAAGATGAGCTCAACGAGAAC      350
351 AGAAATCTCGTGTGGAACAAAAGGGTAAAAGCTCGTTTGATTCTGATTTT      400
401 CAGTACGAATACGAACCGTGAAAGCGTGGCCTATCGATCCTTTAGACTTC      450
451 GGAATTTGAAGCTAGAGGTGTCAGAAAAGTTACCACAGGGATAACTGGCT      500
501 TGTGGCAGCCAAGCGTTCATAGCGACGTTGCTTTTTGATCCTTCGATGTC      550
551 GGCTCTTCCTATCATTTGTGAAGCAGAATTCACCAAGTGTGGATTGTTCA      600
601 CCCACCAATAGGGAACGTGAGCTGGGTTTAGACCGTCGTGAGACAGGTTA      650
651 GTTTTACCCTACTGATGCCCGCGTCGCGATAGTAATTC AACCTAGTACGA      700
701 GAGGAACCGTTGATTTCGCACAATTGGTTCATCGCGCTTGGTTGAAAAGCCA      750
751 GTGGCGCGAAGCTACCGTGCAGCTGGATTATGACTGAACGCCTCTAAGTCA      800
801 GAATCCGGGCTAGAAGCGACGCATGCGCCCGCCGCGCCGATTGCCGACCCT      850
851 CAGTAGGAGCTTAGGCTCCAAAGGCACGTGTCGTTGGCTAAGTCCGTT      899
          |||
          CAGCAACCGATT CAGGCAAG      21

```

Obr. 5: Sekvencie *T. repens* (lokus 5S), *A. thaliana* (lokus 25S), ktoré boli využité k navrhnutiu primerov na vyrobenie sond pre lokusy 5S a 25S. Znázornenie oblastí väzby primerov.

Tab. 3: Prepis primerov v jednotnom smere, ktoré boli použité na výrobu sondy 5S a 25S, na základe sekvencií z GenBank.

Primery	Smer	Dĺžka (nt)	5'→3'	Tm (°C)
5S	F	22	GGT GCG ATC ATA CCA GCA CTA A	62
	R	21	GAG GTG CAA CAC AAG GAC TTC	61
25S	F	23	TTC CCA CTG TCC CTG TCT ACT AT	63
	R	21	GAA CGG ACT TAG CCA ACG ACA	61

K príprave sondy pomocou PCR bolo potrebné namiešať jednotlivé komponenty reakcie na jednu reakciu: 6,3 µl sterilná ddH₂O 18MΩ.cm; 0,2 µl 10 mM dNTPs mix; 2 µl 5x Green GoTaq® Reaction Buffer; 0,2 µl 50 pmol/µl F primer aj R primer; 0,1 µl 5 U/µl GoTaq® DNA polymerase; 1 µl 20 ng/µl gDNA. PCR prebieha v Termocyklery (Biometra) pri cykle: 95 °C-5 min, 40x 95°C -30 s; 68 °C-30 s; 72 °C-30 s a 72°C -5min prípadne 4°C na 24 hod. Ďalším krokom bola elektroforéza na 3 % agarózovom géli s etídiumbromidom. Vzorky po PCR boli vizualizované na géli, následne boli bloky s produktom 5S a 25S vyrezané z gélu a ďalej spracované. Extrakcia z gélu bola urobená za pomoci komerčného kitu QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN). Po odmeraní koncentrácie a absorbancie sa eppendorfky uskladnili. V prípade potreby prebehlo prečistenie, purifikácia. Adekvátne k objemu vzorky bola pridaná 1/10 objemu 3M octanu sodného (pH 5,2) a 2-2,5 objemy vychladeného 96 % etanolu. Takto pripravené vzorky sa vortexovali a inkubovali pri -20 °C 1 hodinu. Centrifugácia v chladiacej centrifúge pri 4 °C na 13 000 rpm 20 minút. Odstránil sa

supernatant a pridal sa rovnaký objem schladeného 70 % etanolu. Znovu prebehla centrifugácia pri 4 °C na 13 000 rpm 2 minúty. Zvyšky etanolu sa nechali voľne odpariť, pelet sa potom rozpustil v destilovanej vode alebo v elučnom pufri. Odmerala sa koncentrácia a absorbancia, DNA sa ďalej použila na výrobu sondy.

Výroba sondy FISH

Sondy sa rozpustili v ddH₂O na koncentráciu 100 μM. Rovnaký objem komplementárnych oligonukleotidov sa zamiešal do 250 μl eppendorfky. Umiestnili sa do termocykleru a zahriali sa na 95°C po dobu 5 minút. Eppendorfky sa následne rýchlo presunuli do 400 ml vody o teplote 90°C. Voda vychladla na teplotu 30 °C. Výsledné denaturované oligonukleotidy boli skladované pri -20°C. Sondy boli značené pomocou nick-translačného kitu 25S digoxigenínom (zelene) a 5S biotínom (červene). Na značenie sondy bolo potrebných 1000 ng DNA na 16 μl čo je minimálna použiteľná koncentrácia. Pridalo sa 4 μl nick-translačného mixu (Roche), premiešalo a stočilo. Ďalej sa inkubovalo pri 15°C 90 minút v cyklery. Po tejto inkubácii sa sondy preniesli na ľad a reakcia bola zastavená pridaním 1 μl 0,5M EDTA zahriatím na 65 °C na 10 minút. Potom sa sondy uskladnili pri -20 °C.

Hybridizácia sondy FISH a detekcia signálov

Pri hybridizácii sondy sa namiešala hybridizačná zmes s výsledným objemom 25 μl na jedno sklo. Pridalo sa 12,5 μl 100 % formamidu; 2,5 μl 20xSSC; 5 μl 50 % dextran sulfátu; 3 μl ddH₂O; 1 μl sondy 1 (zelená, 100 ng DNA); 1 μl sondy 2 (červená, 100 ng DNA). Sonda sa denaturovala pri 96 °C 10 minút. Premiestnila sa do -20 °C na 2 minúty. Celý objem sa dal na vybraný preparát, prikryl sa krycím sklom 24x24 mm , ktoré bolo rámované lepidlom FixoGum. Preparáty sa denaturovali na platničke pri 80 °C na 2 minúty. Takto spracované sklá sa umiestnili do vlhkej komôrky, inkubácia prebehla pri 37 °C minimálne na 12 hodín.

Všetky roztoky použité pri omývaní nenahybridizovaných sond boli umiestnené v digestori vo vodnom kúpeli pri teplote 42 °C. Lepidlo bolo zo skla odstránené pomocou pinzety a krycie sklo strasené. Preparáty boli na 3 minúty umiestnené dvakrát do 2xSSC. Následne boli premyté dvakrát v 20 % formamide s 2xSSC a v 4x SSC/Tween pufri (4T). Na preparát bolo pridaných 50 μl blokovacieho roztoku, prikryté krycím sklom 24x46 mm a inkubované vo vlhkej komôrke pri 37 °C na 30 minút. Preparáty sa opláchli dvakrát v 4T pufri a tento krát

už po tme sa na sklá dali protilátky, ktoré nesú fluorescenčnú značku a prikryli sa krycím sklíčkom 24x24 mm. Inkubácia vo vlhkej komôrke trvala 1-2 hodiny. Od tohto kroku sa pracovalo v tme. Preparáty sa omyli v TNT pufri na 5 minút a odvodnili sa vzostupnou etanolovou radou 70 %, 90 %, 96 % v každom po dobu 3 minút. Nechali sa voľne vyschnúť a následne sa aplikovalo 12 μ l Vectashieldu s DAPI. Preparáty boli pozorované fluorescenčným mikroskopom Olympus BX-51 pri zväčšení okulár x objektív 10x40=400krát. Fotografie boli spracované a upravené pomocou softwaru Adobe® Photoshop® CS6 Extended.

3.4. *Analýza in silico*

V časti spracovania bioinformatických údajov *in silico* boli využité sekvencie vybraných úsekov genómu ITS1, ITS2, NTS a gén pre rRNA 5S. Sekvencie boli získané z databáze GenBank, ktorá je pod NCBI (The National Center for Biotechnology Information) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Sekvencie rôznych druhov z čeľade *Fabaceae* vrátane druhov z rodu *Trifolium* boli uložené vo formáte FASTA. Celkový počet spracovaných sekvencií bol 277, 116 pre ITS1, 117 pre ITS2 a k analýze oblasti lokusu 5S bolo využitých 44 sekvencií. Zoznam použitých sekvencií so zdrojovými kódmi je uvedený v prílohe (Príloha 1-4). Po vytvorení konsenzuálnych sekvencií v softwari Unipro-UGENE <http://ugene.net/> boli sekvencie porovnávané priložením dvoch nukleotidových sekvencií v EMBL-EBI (EMBOSS Needle, Pairwise Sequence Alignment, nucleotide) https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/nucleotide.html. Vyhodnotená bola percentuálna podobnosť priložených sekvencií.

4. VÝSLEDKY

4.1. Cytogenetická analýza

Pracovala som s koreňovým materiálom 26 druhov odobratých v rokoch 2013 a 2014. Následne sa vzorka doplnila o ďalších 13 druhov, ktoré boli pestované a odobraté v rokoch 2017 a 2018. Vo výsledku som u 27 druhov opakovane vyrábala preparáty 1 až 8-krát u 12 druhov to bolo 9 až 19-krát. V priemere to vychádza na každý druh na 8 opakovaní. Pri každom opakovaní sa vyrobilo 3-5 skiel v priemere zo 6 koreňových špičiek. Pri výrobe preparátov bolo použitých okolo 200 koreňových špičiek pochádzajúcich v priemere od 10-15 rastlín pre každý skúmaný druh. Najmenej opakované boli vzorky od druhov *T. campestre*, *T. nigrescens*, *T. microdon*, *T. pallidum* (1-3 opakovania), naopak najviac opakovaní (16-19) bolo u druhov *T. lupinaster*, *T. repens*, *T. purpureum*, *T. pannonicum*. Optimalizáciou sa podarilo získať dostatočný počet hodnotiteľných mitóz aj pre tieto druhy. Vzorky z viacerých rastlín jedného druhu boli odobraté do jednej eppendorfky.

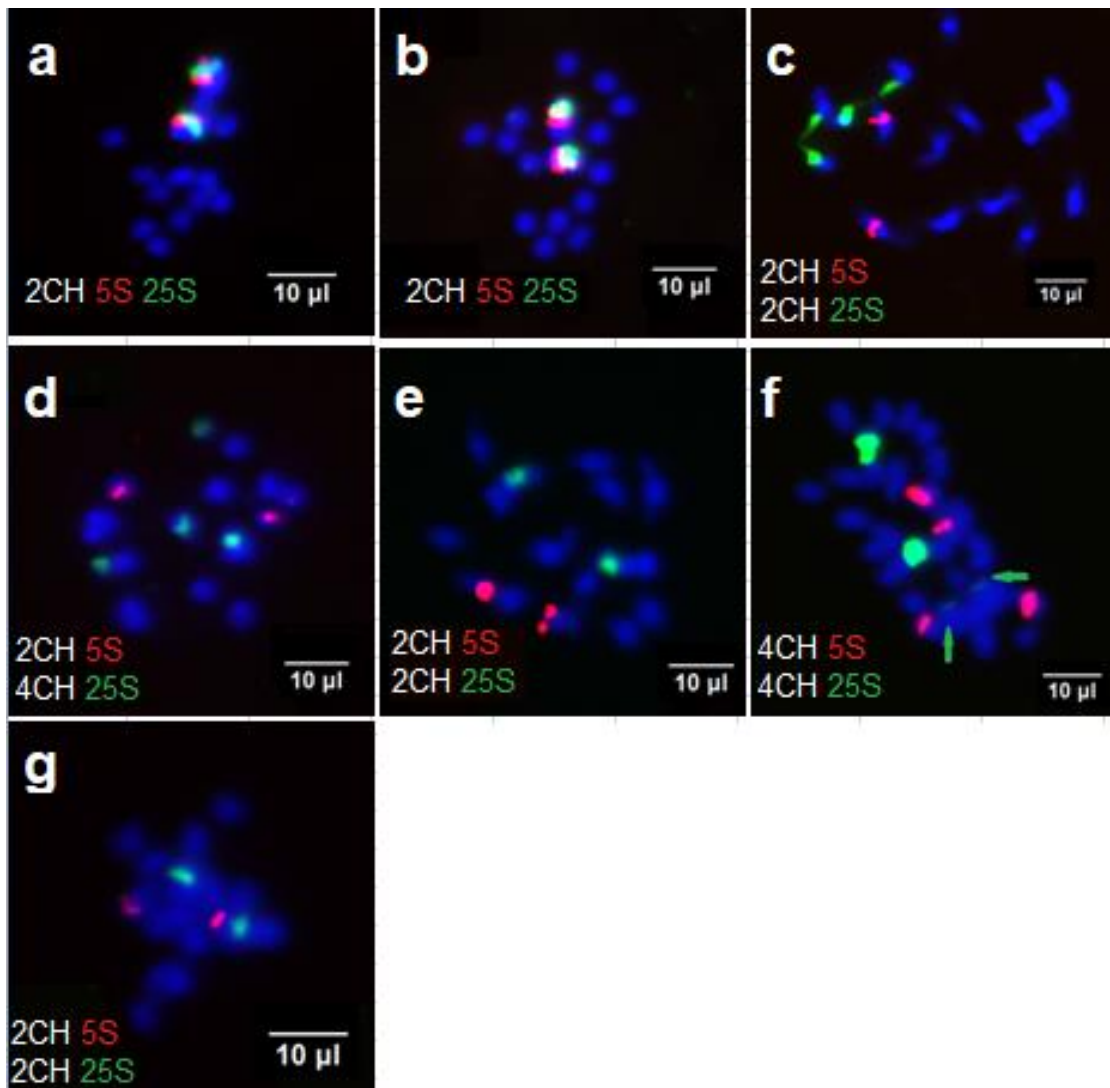
Pri spracovaní vzoriek, pripravených suspenziou koreňových špičiek, bolo často zložité nájsť vyhovujúci stav mitóz. Na preparátoch sa vo veľkom počte vyskytovali interfázne jadrá, mitózy v štádiu metafáze, profáze sa na preparátoch vyskytovali v nižších počtoch v priemer 3-5 mitóz, výnimočne viac. V Tab. 5 a 6 je uvedený počet vyhodnotených mitóz, minimálne 10 použiteľných mitóz. U niektorých druhov nebol získaný takýto počet metafáznych jadier, aj napriek dostatočnému počtu opakovaní výroby preparátov.

4.1.1. Hodnotenie počtu lokusov 5S a 25S rRNA a ich lokalizácie

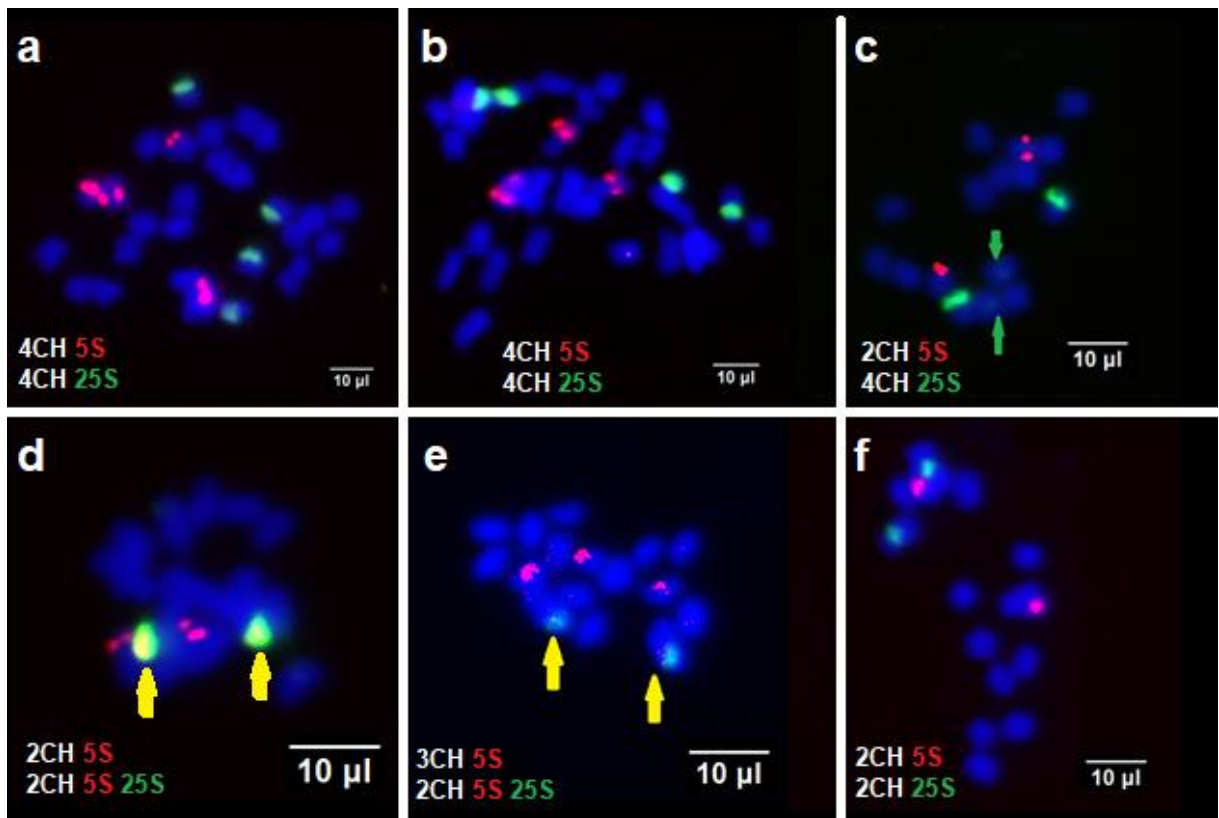
Hodnotila sa veľkosť a počet chromozómov u jednotlivých testovaných druhov d'atelín. Čo sa týka veľkosti chromozómov zväčša to boli stredné, prípadne veľké chromozómy, len výnimočne malé. Všetky mitózy neboli v rovnakom stupni kondenzácie chromatínu. Veľkosť chromozómov bola určená na základe mikroskopickej mierky pri zväčšení 400x. Ďalej boli hodnotené počty chromozómov u jednotlivých druhov. Na základe fotografií získaných technikou FISH boli vytvorené tabuľky zhrňujúce výsledky (Tab. 5 a 6) o počte a lokalizácii lokusov rDNA.

Rod *Trifolium* sa delí na dva podrody, podrod *Chronosemium* a *Trifolium*. V rámci menej početného podrodu *Chronosemium* bolo študovaných 5 druhov. Takmer u všetkých druhov sa podarilo získať viac ako 10 hodnotiteľných mitóz so stabilným počtom chromozómov (Tab. 5). Druh *T. aureum* (Obr. 6-a, b) má umiestnenie 2 lokusov 25S a 4 lokusov 5S na jednom páre chromozómov, jedná sa o diploidný druh $x=7, 8$. Druh *T. campestre* (Obr. 6-c) má taktiež 14 chromozómov. Umiestnenie 2 lokusov 5S a 2 lokusov 25S je na samostatných chromozómových pároch. Podobné usporiadanie lokusov má aj *T. badium* (Obr. 6-d), ktorý má ešte na viac 2 lokusy 25S na inom chromozómovom páre. Druhý typ usporiadania u *T. badium* (Obr. 6-e) je totožný s usporiadaním *T. campestre*. Alotetraploidný druh *T. dubium* (Obr. 6-f) má 30 chromozómov so samostatným usporiadaním 4 lokusov 25S a 4 lokusov 5S na rôznych chromozómoch. Usporiadanie na rôznych chromozómoch má aj *T. micranthum* (Obr. 6-g) v počte 2 lokusov 25S a 2 lokusov 5S.

Podrod *Trifolium* je delený do 8 sekcií v práci sú zahrnuté druhy zo 7 sekcií (Tab. 1). Sekcia *Trichocephalum* s diploidným druhom. Sekcia *Lupinaster* bola zastúpená rovnomenným druhom *T. lupinaster* (Obr. 7-a, b) v tetraploidnej podobe s počtom chromozómov 32 a minoritne na 5 hodnotených mitozách s počtom chromozómov 28. Umiestnenie lokusov je spolu na 4 chromozómoch po 4 lokusy 5S a 25S a ďalšie 4 lokusy 5S sa nachádzajú na iných chromozómových pároch. Druh *T. subterraneum* (Obr. 7-c) patrí do sekcie *Trichocephalum*. Lokalizácia 4 lokusov 25S a 2 lokusov 5S umiestnených na rôznych chromozómoch. Oba druhy z dvojčlennej sekcie *Paramesus* sú diploidné $2n=16$, zhodujú sa v počte 2 lokusov 25S. 2 lokusy 5S sú u druhu *T. glanduliferum* umiestnené spolu s lokusmi 25S na jednom chromozómovom páre. Ďalšie 2 lokusy 5S sú na inom chromozómovom páre (Obr. 7-d), v druhom prípade sú to 3 lokusy 5S (Obr. 7-e). Umiestnenie na dvoch rôznych chromozómových pároch sú 2 lokusy 5S a 2 lokusy 25S u druhu *T. strictum* (Obr. 7-f).

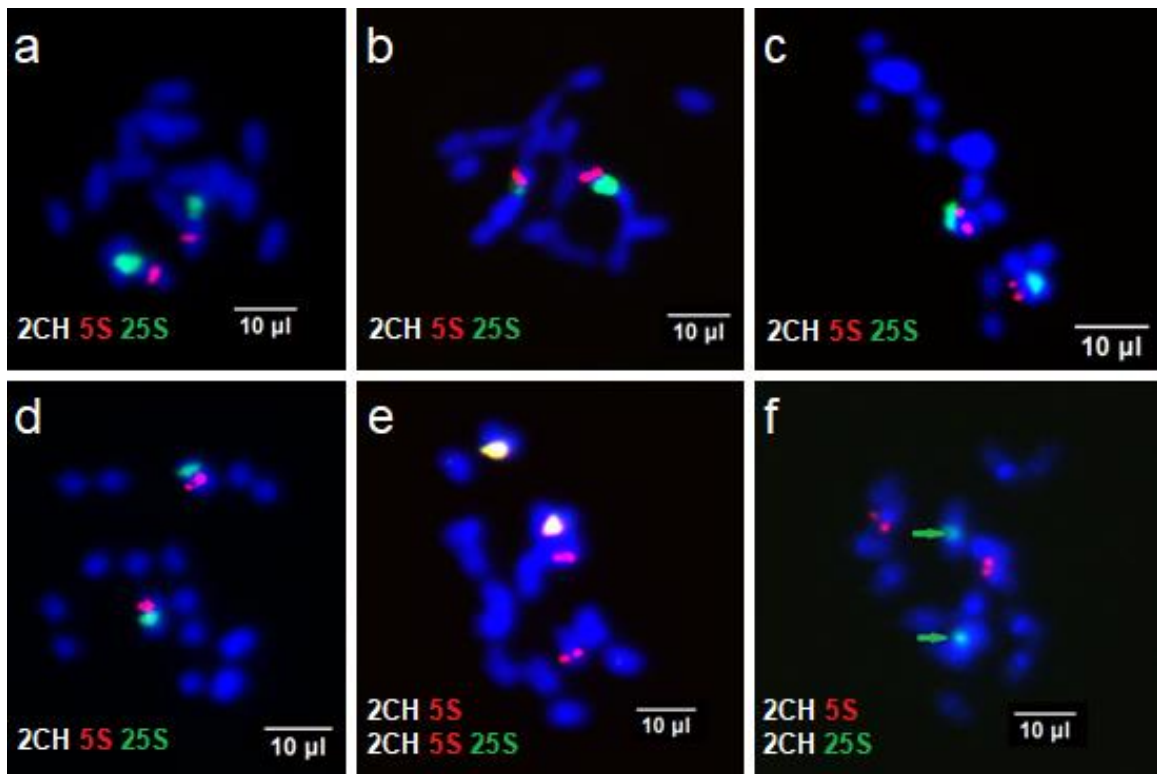


Obr. 6: Výsledky z cytogenetickej analýzy lokusov 5S (červene) a lokusov 25S rDNA (zelene) technikou FISH, podrod CHRONOSEMIUM. **a)** *T. aureum* 14 chromozómov, 4 lokusy 5S a 2 lokusy 25S spolu na 2 chromozómoch; **b)** *T. aureum* 16 chromozómov, 4 lokusy 5S a 2 lokusy 25S spolu na 2 chromozómoch; **c)** *T. campestre* 14 chromozómov, 2 lokusy 5S a 2 lokusy 25S na rôznych chromozómoch; **d)** *T. badium* 14 chromozómov, 2 lokusy 5S a 4 lokusy 25S na rôznych chromozómoch; **e)** *T. badium* 14 chromozómov, 2 lokusy 5S a 2 lokusy 25S na rôznych chromozómoch; **f)** *T. dubium* 30 chromozómov, 4 lokusy 5S a 4 lokusy 25S na rôznych chromozómoch; **g)** *T. micranthum* 16 chromozómov, 2 lokusy 5S a 2 lokusy 25S na rôznych chromozómoch.



Obr. 7: Výsledky z cytogenetickej analýzy lokusov 5S (červene) a lokusov 25S rDNA (zelene) technikou FISH, podrod TRIFOLIUM (sekcie *Lupinaster* a, b; *Trichocephalum* c; *Paramesus* d, e, f). **a)** *T. lupinaster* 32 chromozómov, 8 lokusov 5S a 4 lokusy 25S spolu na 4 chromozómoch ostatné lokusy 5S na rôznych chromozómoch; **b)** *T. lupinaster* 28 chromozómov, 8 lokusov 5S a 4 lokusy 25S spolu na 4 chromozómoch ostatné lokusy 5S na rôznych chromozómoch; **c)** *T. subterraneum* 16 chromozómov, 2 lokusy 5S a 4 lokusy 25S na rôznych chromozómoch; **d)** *T. glanduliferum* 16 chromozómov, 4 lokusy 5S a 2 lokusy 25S spolu na 2 chromozómoch ďalšie 2 lokusy 5S na rôznych chromozómoch; **e)** *T. glanduliferum* 16 chromozómov, 2 lokusy 5S a 2 lokusy 25S spolu na 2 chromozómoch ďalšie 3 lokusy 5S na rôznych chromozómoch; **f)** *T. strictum* 16 chromozómov, 2 lokusy 5S a 2 lokusy 25S na rôznych chromozómoch.

Sekcia *Vesicastrum* zahŕňa diploidné druhy *T. fragiferum*, *T. hybridum*, *T. resupinatum* a *T. spumosum* s prevažujúcim chromozómovým číslom $x=8$ (Obr. 8-a, b, d, e, f) *T. resupinatum* existuje aj v zostave $x=7$ (Obr. 8-c). Lokalizácia lokusov je pomerne jednoznačná a typická takmer pre všetky skúmané druhy. Oba lokusy 5S a 25S sa nachádzajú na jednom páre chromozómov, či sa už jedná o umiestnenie na opačných ramienkach chromozómov, alebo v tesnejšej blízkosti. Výnimkou v tomto prípade je *T. spumosum* (Obr. 8-e). Oba lokusy pre 25S aj 5S nachádzajú na jednom chromozómovom páre. Tento druh má na viac ešte 2 lokusy 5S, ktoré sú na inom chromozómovom páre. Variantou umiestnenia lokusov v rámci tohto druhu (Obr. 8-f) sú 2 lokusy 25S a 2 lokusy 5S na rôznych chromozómových pároch.

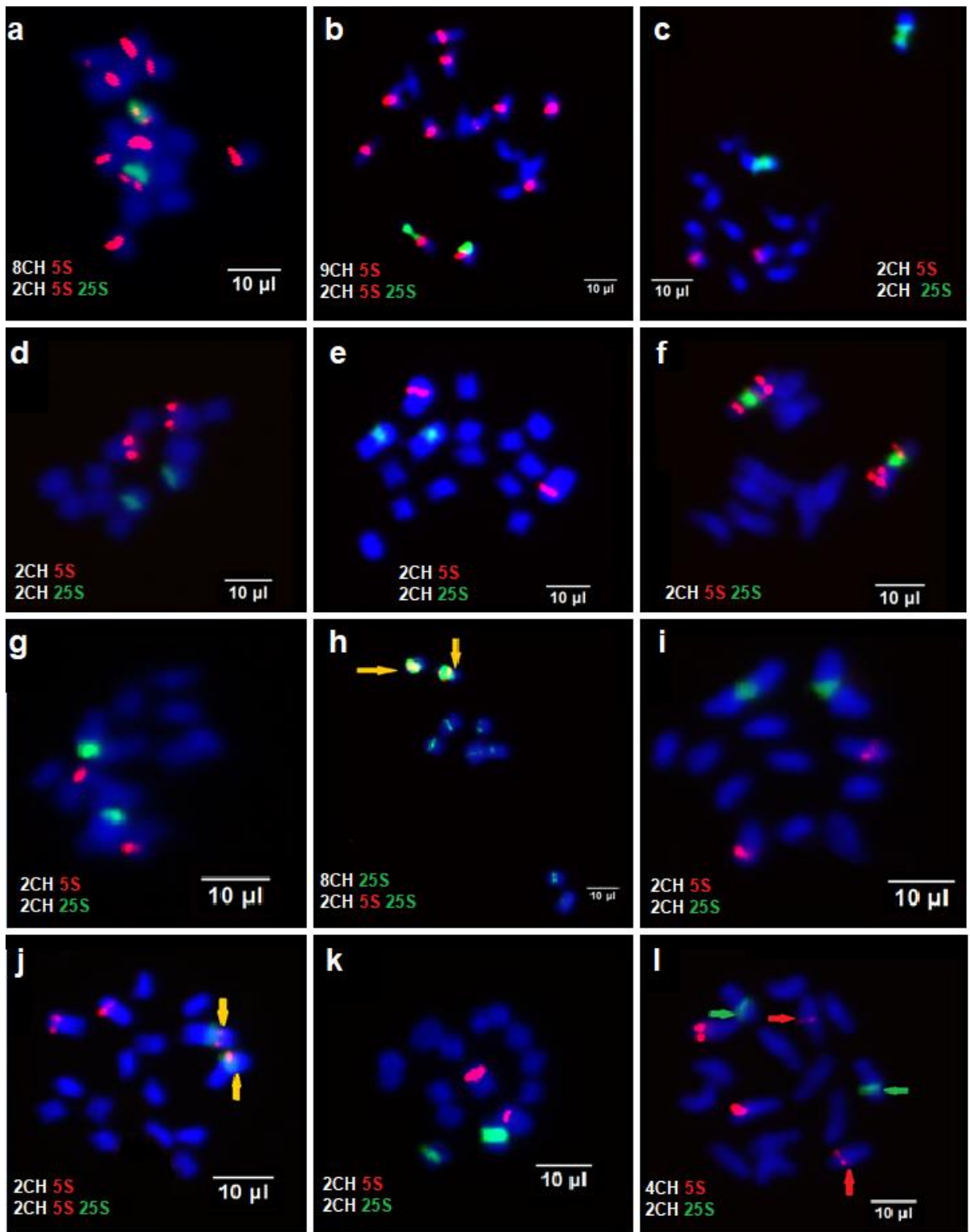


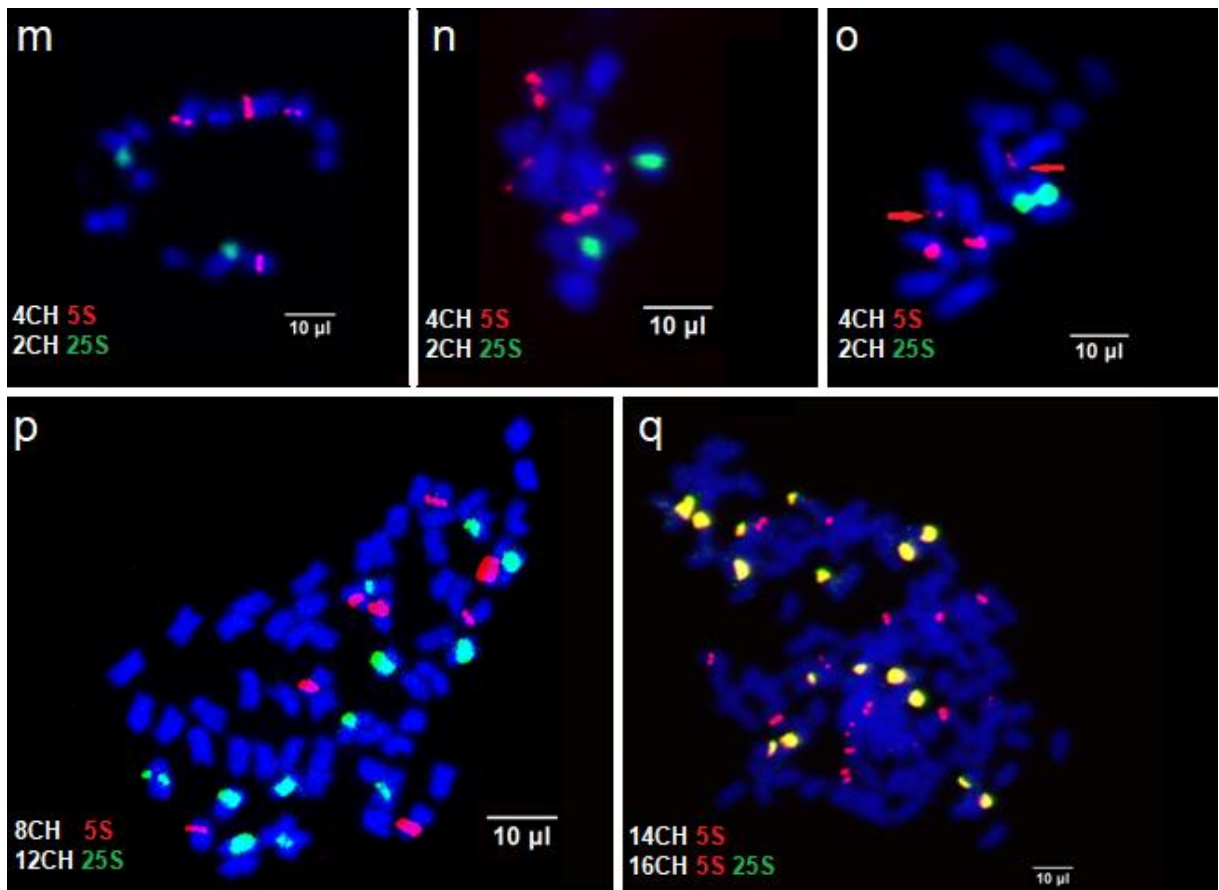
Obr. 8: Výsledky z cytogenetickej analýzy lokusov 5S (červene) a lokusov 25S rDNA (zelené) technikou FISH, podrod *TRIFOLIUM* (sekcia *Vesicastrum*). **a)** *T. fragiferum* 16 chromozómov, 2 lokusy 5S a 2 lokusy 25S spolu na 2 chromozómoch; **b)** *T. hybridum* 16 chromozómov, 2 lokusy 5S a 2 lokusy 25S spolu na 2 chromozómoch; **c)** *T. resupinatum* 14 chromozómov, 2 lokusy 5S a 2 lokusy 25S spolu na 2 chromozómoch; **d)** *T. resupinatum* 16 chromozómov, 2 lokusy 5S a 2 lokusy 25S spolu na 2 chromozómoch; **e)** *T. spumosum* 16 chromozómov, 2 lokusy 5S a 2 lokusy 25S spolu na 2 chromozómoch a ďalšie 2 lokusy 5S na iných chromozómoch; **f)** *T. spumosum* 16 chromozómov, 2 lokusy 5S a 2 lokusy 25S na 2 rôznych chromozómoch.

Najväčšou skupinou v rámci podrodu *Trifolium* je práve sekcia *Trifolium*. Rozmanitosť je viditeľná na úrovni základného chromozómového čísla, ale aj v rámci usporiadania a počtu lokusov rDNA. Dva rôzne počty lokusov 5S 10 a 11 boli zaznamenané u druhu *T. alpestre* (Obr. 9-a, b) pričom lokus 25S sa nachádza spolu na jednom chromozómovom páre. Ostatné lokusy 5S sú na iných chromozómoch. Rovnaké usporiadanie 2 lokusov 5S a 2 lokusov 25S na samostatných chromozómoch majú tri ďalšie druhy, *T. arvense* $x=7$ (Obr. 9-c), *T. bocconeii* $x=6$ (Obr. 9-d), *T. diffusum* $x=8$ (Obr. 9-e). Usporiadanie 6 lokusov 5S a 2 lokusy 25S na jednom chromozómovom páre je viditeľné u *T. hirtum* (Obr. 9-f). Ďalším druhom z 10 chromozómami je *T. cherleri* (Obr. 9-h), u ktorého prevládajú lokusy 25S vyskytujúce sa na každom chromozóme a na jednom páre je aj lokus 5S. Lokalizácia oboch lokusov na jednom chromozómovom páre je u *T. ligusticum* (Obr. 9-g, i). Druh *T. pallidum* (Obr. 9-j) má oba lokusy na jednom chromozómovom páre a ďalšie 2 lokusy 5S na iných

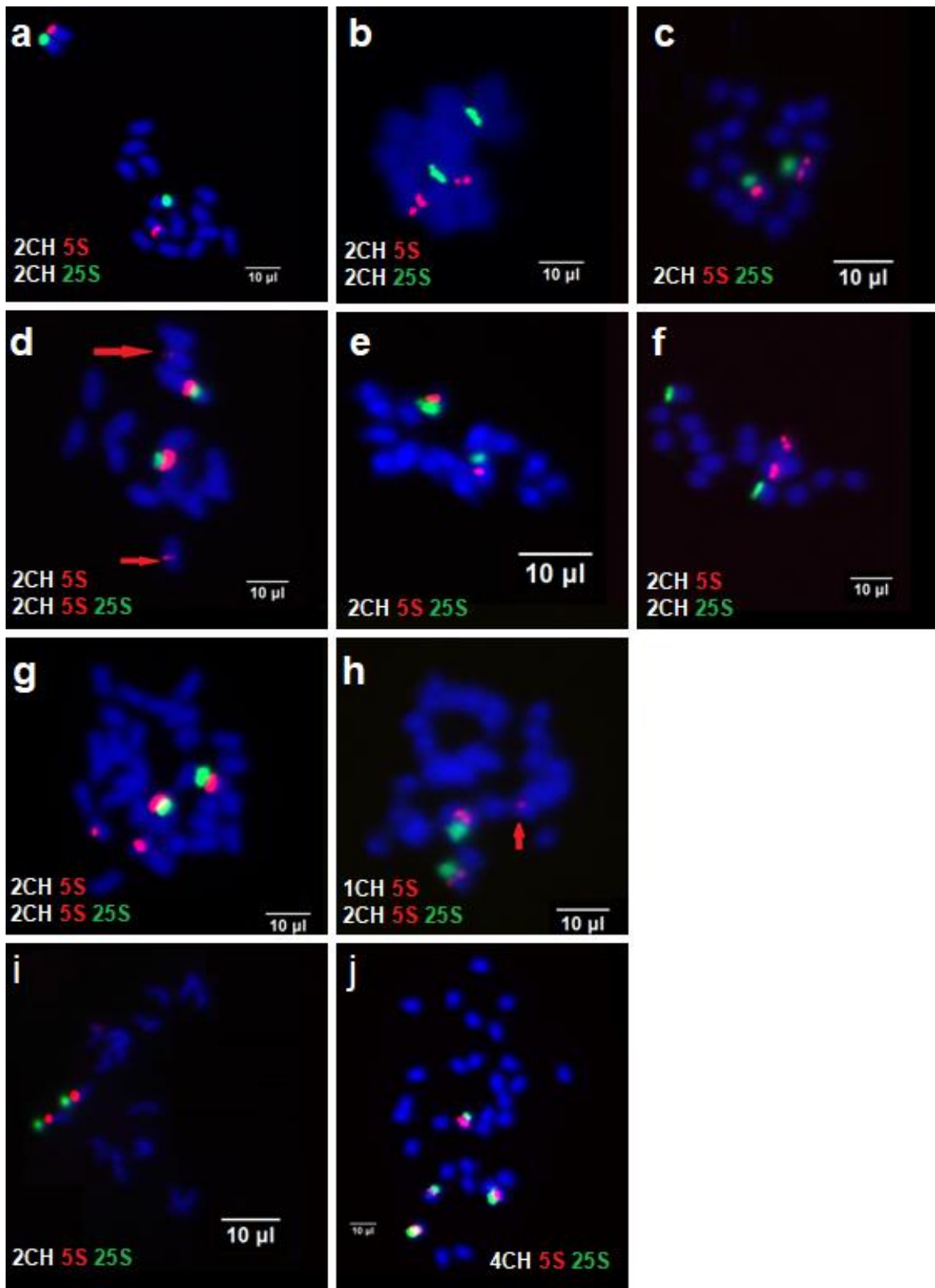
chromozómoch. Štandardné umiestnenie 2 lokusov 5S a 2 lokusov 25S samostatne je u *T. purpureum* (Obr. 9-k). O dva lokusy 5S viac má *T. pallidum* (Obr. 9-l) s rovnakým umiestnením ako *T. purpureum*, podobne ako aj *T. squamosum* (Obr. 9-m) a *T. stellatum* (Obr. 9-n, o). Polyploidné druhy *T. medium* (Obr. 9-p) má umiestnenie 12 lokusov 25S a 8 lokusov 5S na rôznych chromozómoch a *T. pannonicum* (Obr. 9-q) má 30 lokusov 5S z čoho na 16 chromozómoch sú spolu s nimi aj lokusy 25S.

Predposlednou sekciou rodu *Trifolium*, ktorou sa zaoberám v mojej práci, je skupina *Trifoliastrum*. Bolo spracovaných 8 druhov, z ktorých je 6 diploidných a 2 tetraploidné s $x=8$. V tejto skupine prevláda umiestnenie 2 lokusov 5S a 2 lokusov 25S oddelene u *T. glomeratum* a *T. montanum* (Obr. 10-a, b). Druh *T. nigrescens* ich má umiestnené spolu na jednom chromozómovom páre (Obr. 10-c). Dva typy umiestnenia sú u druhu *T. occidentale* (Obr. 10-d, e) pričom jeden je zhodný s *T. nigrescens* a na Obr. 10-d sú ešte na viac ďalšie 2 lokusy 5S na iných chromozómoch. Základné umiestnenie má druh *T. thalii* (Obr. 10-f) po 2 lokusy 5S aj 25S na rôznych chromozómoch. Tetraploid *T. repens* má na jednom chromozómovom páre oba lokusy a ďalšie 2 alebo 1 lokus 5S na iných chromozómoch (Obr. 10-g, h). Diploid $x=8$ *T. pallescens* (Obr. 10-i) má oba lokusy na jednom chromozómovom páre, *T. uniflorum* (Obr. 10-j) má navýšený počet tohto usporiadania lokusov a to na 2 páry.





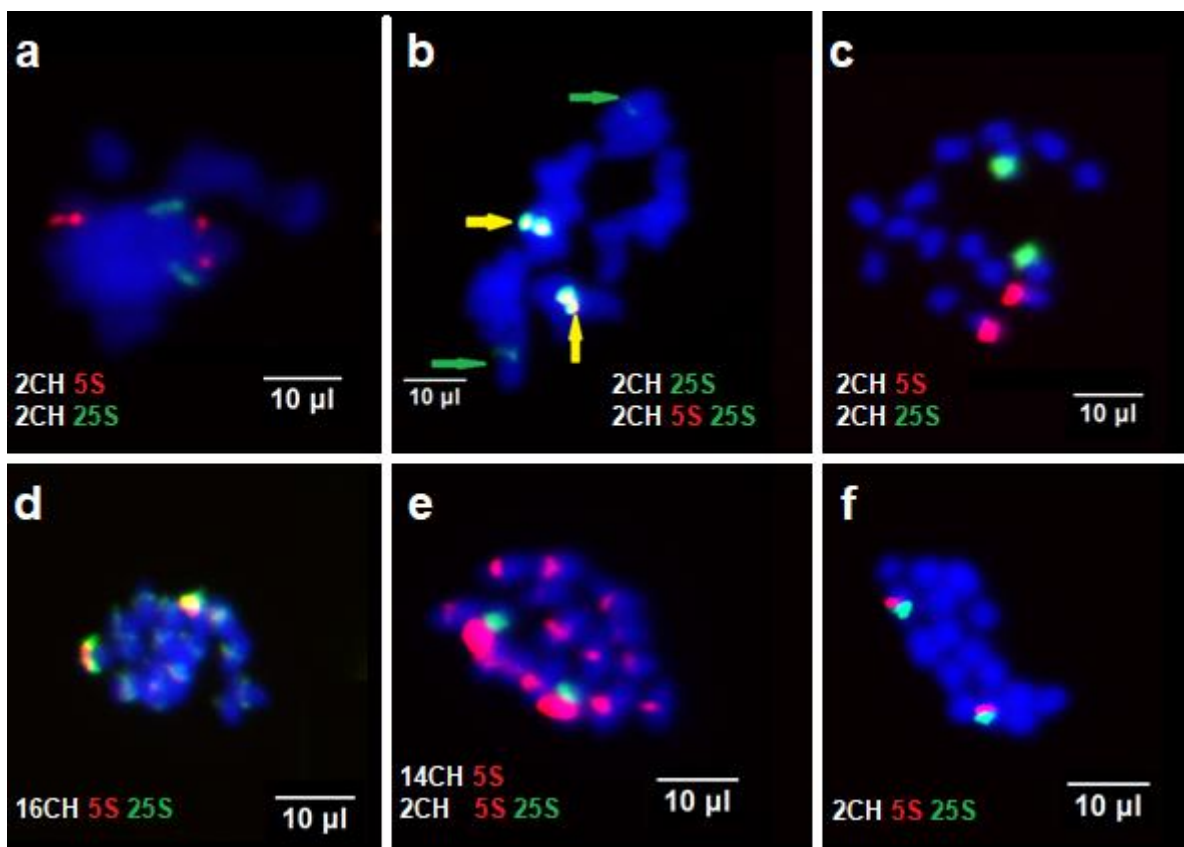
Obr. 9.: Výsledky z cytogenetickej analýzy lokusov 5S (červene) a lokusov 25S rDNA (zelené) technikou FISH, podrod TRIFOLIUM (sekcia *Trifolium*). **a)** *T. alpestre* 16 chromozómov, 10 lokusov 5S a 2 lokusy 25S spolu na 2 chromozómoch ďalších 8 lokusov 5S na iných chromozómoch; **b)** *T. alpestre* 16 chromozómov, 11 lokusov 5S a 2 lokusy 25S spolu na 2 chromozómoch ďalších 9 lokusov 5S na iných chromozómoch; **c)** *T. arvense* 14 chromozómov, 2 lokusy 5S a 2 lokusy 25S na 2 rôznych chromozómoch; **d)** *T. bocconeii* 12 chromozómov, 2 lokusy 5S a 2 lokusy 25S spolu na 2 rôznych chromozómoch; **e)** *T. diffusum* 16 chromozómov, 2 lokusy 5S a 2 lokusy 25S na 2 rôznych chromozómoch; **f)** *T. hirtum* 10 chromozómov, 6 lokusov 5S a 2 lokusy 25S spolu na 2 chromozómoch; **g)** *T. ligusticum* 12 chromozómov, 2 lokusy 5S a 2 lokusy 25S na 2 rôznych chromozómoch; **h)** *T. cherleri* 10 chromozómov, 2 lokusy 5S a 10 lokusov 25S spolu na 2 chromozómoch oba lokusy a ďalších 8 lokusov 25S na iných chromozómoch; **i)** *T. ligusticum* 14 2 lokusy 5S a 2 lokusy 25S spolu na 2 chromozómoch; **j)** *T. pallidum* 16 chromozómov, 4 lokusy 5S a 2 lokusy 25S spolu na 2 chromozómoch a 2 lokusy 5S samostatne na inom chromozómovom páre; **k)** *T. purpureum* 14 chromozómov, 2 lokusy 5S a 2 lokusy 25S na rôznych chromozómoch; **l)** *T. rubens* 16 chromozómov, 4 lokusy 5S a 2 lokusy 25S na rôznych chromozómoch; **m)** *T. squamosum* 16 chromozómov, 4 lokusy 5S a 2 lokusy 25S na rôznych chromozómoch; **n)** *T. stellatum* 12 chromozómov, 4 lokusy 5S a 2 lokusy 25S na rôznych chromozómoch; **o)** *T. stellatum* 14 chromozómov, 4 lokusy 5S a 2 lokusy 25S na rôznych chromozómoch; **p)** *T. medium* 84 chromozómov, 8 lokusov 5S a 12 lokusov 25S na rôznych chromozómoch; **q)** *T. pannonicum* 128 chromozómov, 30 lokusov 5S a 16 lokusov 25S spolu na 16 chromozómoch a ďalších 14 lokusov 5S na iných chromozómoch.



Obr. 10.: Výsledky z cytogenetickej analýzy lokusov 5S (červene) a lokusov 25S rDNA (zelené) technikou FISH, podrod TRIFOLIUM (sekcia *Trifolium*). **a)** *T. glomeratum* 16 chromozómov, 2 lokusy 5S a 2 lokusy 25S na 2 rôznych chromozómoch; **b)** *T. montanum* 16 chromozómov, 2 lokusy 5S a 2 lokusy 25S na 2 rôznych chromozómoch; **c)** *T. nigrescens* 16 chromozómov, 2 lokusy 5S a 2 lokusy 25S spolu na 2 chromozómoch; **d)** *T. occidentale* 16 chromozómov, 2 lokusy 5S a 2 lokusy 25S spolu na 2 chromozómoch a ďalšie 2 lokusy 5S na iných chromozómoch; **e)** *T. occidentale* 16 chromozómov, 2

lokusy 5S a 2 lokusy 25S spolu na 2 chromozómoch; **f**) *T. thalii* 16 chromozómov, 2 lokusy 5S a 2 lokusy 25S na 2 rôznych chromozómoch; **g**) *T. repens* 32 chromozómov, 4 lokusy 5S a 2 lokusy 25S spolu na 2 chromozómoch a 2 lokusy 5S na iných chromozómoch; **h**) *T. repens* 32 chromozómov, 3 lokusy 5S a 2 lokusy 25S spolu na 2 chromozómoch 1 lokus 5S na inom chromozóme; **i**) *T. pallescens* 16 chromozómov, 2 lokusy 5S a 2 lokusy 25S spolu na 2 chromozómoch; **j**) *T. uniflorum* 32 chromozómov, 4 lokusy 5S a 4 lokusy 25S spolu na 4 chromozómoch.

Poslednú sekciu *Involucrarium* tvoria najmä americké druhy. Skupinu *Involucrarium* zastupujú 4 diploidné druhy $x=8$. Skupina vykazuje veľmi rôznorodé usporiadanie lokusov. Dva druhy, *T. amabile* a *T. microcephalum* majú dva typy usporiadania lokusov. Jedno usporiadanie *T. amabile* je po 2 lokusy 5S a 25S na rôznych chromozómoch (Obr. 11-a). Druhý typ je umiestnenie oboch lokusov na jednom chromozómovom páre a ešte ďalší pár lokusov 25S na iných chromozómoch (Obr. 11-b). Podobne aj druh *T. chilense* (Obr. 11-c) má oba lokusy v tesnej blízkosti na jednom chromozómovom páre a ďalšie 2 lokusy 5S na inom páre. Na Obr. 11-d *T. microcephalum* sa na každom chromozóme nachádzajú spolu oba lokusy 5S aj 25S, na ďalšom Obr. 11-e je tomu tak len u lokusu 5S a na jednom chromozómovom páre je spoločná lokalizácia s lokusom 25S. Posledný druh z tejto sekcie je *T. microdon* (Obr. 11-f), kde na jednom chromozómovom páre sú oba lokusy 5S aj 25S.



Obr. 11.: Výsledky z cytogenetickej analýzy lokusov 5S (červene) a lokusov 25S rDNA (zelené) technikou FISH, podrod TRIFOLIUM (sekcia *Involucrarium*). **a)** *T. amabile* 16 chromozómov 2 lokusy 5S a 2 lokusy 25S na rôznych chromozómoch, **b)** *T. amabile* 16 chromozómov 4 lokusy 5S a 2 lokusy 25S spolu na 2 chromozómoch a 2 lokusy 5S na inom páre chromozómov, **c)** *T. chilense* 16 chromozómov 4 lokusy 5S a 2 lokusy 25S spolu na 2 chromozómoch a 2 lokusy 5S na inom páre chromozómov, **d)** *T. microcephalum* 16 chromozómov 16 lokusov 5S a 16 lokusov 25S spolu na všetkých chromozómoch, **e)** *T. microcephalum* 16 chromozómov 16 lokusov 5S a 2 lokusy 25S spolu na 2 chromozómoch a 14 lokusov 5S na ostatných chromozómoch samostatne., **f)** *T. microdon* 16 chromozómov 2 lokusy 5S a 2 lokusy 25S spolu na 2 chromozómoch.

Tab. 5: Počet mitóz, chromozómov a lokusov 25S a 5S a ich umiestnenie na chromozómoch u druhov podrodu *Chronosemium* rodu *Trifolium*.

Druh	Počet				Lokalizácia signálov
	chromozómy	mitózy	lokus 25S	lokus 5S	
<i>T. aureum</i>	14	12	2	4	A
	16	11	2	4	A
<i>T. campestre</i>	14	12	2	2	B
<i>T. dubium</i>	30 ^a	13	4	4	B
<i>T. badium</i>	14	34	2	2	B
	14	12	4	2	B
<i>T. micranthum</i>	16	9	2	2	B

Vysvetlivky: ^a - alotetraploid $2n=4x=30$; A- oba lokusy spolu na rovnakých chromozómoch; B- lokusy sú oddelene umiestnené na rôznych chromozómoch.

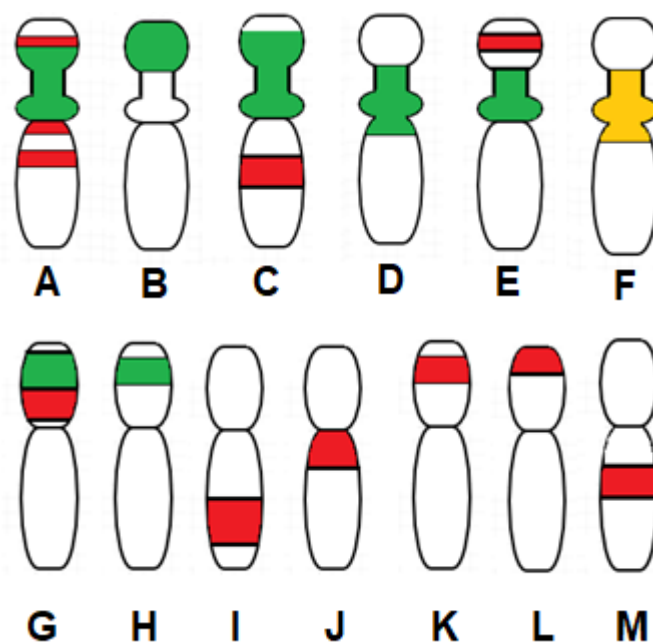
Tab. 6: Počet mitóz, chromozómov a lokusov 25S a 5S a ich umiestnenie na chromozómoch u druhov podrodu *Trifolium* rodu *Trifolium* rozdelených do 7 študovaných sekcií.

Sekcia / Druh	Počet				Lokalizácia signálov
	chromozómy	mitózy	lokus 25S	lokus 5S	
Sekcia TRICHOCEPHALUM					
<i>T. subterraneum</i>	16	15	4	2	B
Sekcia TRIFOLIUM					
<i>T. purpureum</i>	14	10	2	2	B
<i>T. pannonicum</i>	128 ^b	3	16	30	C
<i>T. cherleri</i>	10	25	10	2	C
<i>T. hirtum</i>	10	19	2	6	A
<i>T. bocconeii</i>	12	16	2	2	B
(nie je obr.)	14	4	2	2	B
<i>T. arvense</i>	14	14	2	2	B
<i>T. ligusticum</i>	12	9	2	2	B
	14	8	2	2	B
<i>T. stellatum</i>	12	5	2	4	B
	14	4	2	4	B

<i>T. rubens</i>	16	12	2	4	B
<i>T. medium</i>	64 ^c	10	8	12	B
<i>T. alpestre</i>	16	13	2	10	C
	16	12	2	11	C
<i>T. squamosum</i>	16	16	2	4	B
<i>T. diffusum</i>	16	16	2	2	B
<i>T. pallidum</i>	16	13	2	4	C
Sekcia VESICASTRUM					
<i>T. spumosum</i>	16	11	2	2	B
	16	4	2	4	C
<i>T. hybridum</i>	16	16	2	2	A
<i>T. fragiferum</i>	16	12	2	2	A
<i>T. resupinatum</i>	14	6	2	2	A
	16	16	2	2	A
Sekcia TRIFOLIASTRUM					
<i>T. montanum</i>	16	18	2	2	B
<i>T. nigrescens</i>	16	15	2	2	A
<i>T. repens</i>	32 ^d	10	2	4	C
	32	2	2	3	C
<i>T. glomeratum</i>	16	12	2	2	B
<i>T. thalii</i>	16	19	2	2	B
<i>T. pallescens</i>	16	10	2	2	A
<i>T. occidentale</i>	16	10	2	4	C
	16	4	2	2	A
<i>T. uniflorum</i>	32 ^d	13	4	4	A
Sekcia INVOLUCRARIUM					
<i>T. microcephalum</i>	16	11	16	16	A
	16	28	2	16	C
<i>T. amabile</i>	16	2	4	2	C
	16	1	2	2	B
<i>T. microdon</i>	16	3	2	2	A
<i>T. chilense</i>	16	10	2	4	C
Sekcia LUPINASTER					
<i>T. lupinaster</i>	32 ^d	34	4	8	C
	28 ^e	5	4	8	C
Sekcia PARAMESUS					
<i>T. strictum</i>	16	23	2	2	B
<i>T. glanduliferum</i>	16	10	2	5	C
	16	3	2	4	C

Vysvetlivky: ^b- hexadekaploid $2n=16x=128$; ^c- oktaploid $2n=8x=64$; ^d- tetraploid $2n=4x=32$; ^e- tetraploid hypoteticky $2n=4x=28$; A- všetky lokusy spolu na rovnakých chromozómoch; B- lokusy sú oddelene umiestnené na rôznych chromozómoch; C- oba lokusy na rovnakom páre chromozómov a ostatné lokusy sú oddelene lokalizované na odlišných chromozómoch.

Z pohľadu umiestnenia lokusov som zaznamenala viacero typov lokalizácie 5S a 25S oblastí. Vzájomná poloha oboch lokusov na jednom páre chromozómov je v 5 typoch (Obr. 12-A, C, E, F, G). Spolu takéto postavenie lokusov malo 21 z 38 posudzovaných genómov druhov rodu *Trifolium*, u ktorých bolo možné jednoznačne určiť lokalizáciu lokusu na základe získaných fotografií. V rámci lokusu 25S je viditeľná preferencia umiestnenia na chromozóme do proximálnej oblasti a do okolia centroméry prípadne ešte do terminálnej, satelitnej, intersticiálnej terminálnej oblasti krátkeho ramienka chromozómu. Bolo tomu tak u 20 z 38 posudzovaných genómov druhov. U lokusu 5S sa ťažšie určovalo, či sa jedná o terminálnu oblasť krátkeho alebo dlhého ramienka. Lokalizácia v terminálnej a intersticiálnej terminálnej oblasti bola častejšia u 23 genómov, umiestnenie v proximálnej časti chromozómu u 6 zo študovaných genómov; Tab.7 .



Obr. 12: Zhodnotenie variant lokalizácie lokusov 5S a 25S na 32 druhov, na 38 analyzovaných genómov z rodu *Trifolium*. Vysvetlivky: zelene lokus 25S, červene lokus 5S, žltó oba lokusy v prekryve.

Tab. 7: Vyhodnotenie výskytu jednotlivých typov umiestnenia lokusov 5S a 25S na chromozómoch 38 genómov druhov z rodu *Trifolium*.

Druh	Počet chromozómov	Typ umiestnenia lokusov na chromozóme												
		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M
<i>T. aureum</i>	14	2												
<i>T. aureum</i>	16	2												
<i>T. campestre</i>	14				2					2				
<i>T. dubium</i>	30				4						4			
<i>T. badium</i>	14		2							2				
<i>T. lupinaster</i>	32		4							4				
<i>T. lupinaster</i>	28		4							4				
<i>T. strictum</i>	16								2			2		
<i>T. subterraneum</i>	16		2						2			2		
<i>T. nigrescens</i>	16							2						
<i>T. repens</i>	32			2										2
<i>T. repens</i>	32			2										1
<i>T. glomeratum</i>	16		2											2
<i>T. thalii</i>	16		2							2				
<i>T. pallescens</i>	16							2						
<i>T. occidentale</i>	16			2										
<i>T. occidentale</i>	16			2										2
<i>T. uniflorum</i>	32			4										
<i>T. chilense</i>	16		2											2
<i>T. microdon</i>	16							2						
<i>T. spumosum</i>	16							2					2	
<i>T. spumosum</i>	16							2					2	
<i>T. hybridum</i>	16					2								
<i>T. fragiferum</i>	16			2										
<i>T. resupinatum</i>	14			2										
<i>T. resupinatum</i>	16			2										
<i>T. purpureum</i>	14								2			2		
<i>T. cherleri</i>	10				8		2							
<i>T. hirtum</i>	10	2												
<i>T. bocconeii</i>	12								2			2		
<i>T. arvense</i>	14				2					2				
<i>T. ligusticum</i>	14		2							2				
<i>T. stellatum</i>	12				2							2	2	
<i>T. rubens</i>	16				2					2		2		
<i>T. alpestre</i>	16			2						8				
<i>T. alpestre</i>	16			2						9				
<i>T. squamosum</i>	16		2								2		2	
<i>T. diffusum</i>	16		2							2				
<i>T. pallidum</i>	16					2							2	

Vysvetlivky: žltou farbou sú podfarbené druhy $2n=14$, zelenou $2n=12$, modrou $2n=10$ a ružovou tetraploidné druhy $2n=4x=32/30/28$.

4.2. Sekvenčné vyhodnotenie medzerníkových sekvencií a 5S rDNA

V bioinformatickej časti som sa zamerala na spracovanie údajov z voľne dostupnej databázy GenBank. Pre oblasť lokusu 45S som si vybrala vnútorné prepisované medzerníky, ITS1 a ITS2. Porovnávala som konzervovanosť a dĺžku týchto úsekov. Z výsledkov priložení sekvencií je viditeľné, že ITS1 je konzervovanejšia a to najmä v začiatkovej oblasti sekvencie, prvých 60 nukleotidov. V oblastiach ITS1 a ITS2 je viditeľná veľká variabilita naprieč druhmi z čeľade *Fabaceae*. Vo veľkej miere nepodliehajú konzervovanosti, sú pod vplyvom evolúcie. Zmeny sú tak výrazné, že sú považované za jeden z markerov pri divergencii druhov a zostrojovaní fylogenetických stromov. Pri porovnaní konsenzuálnej sekvencie *Trifolium* k modelovým rastlinným organizmom *A. thaliana* a *Oryza sativa* je vyššia sekvenčná zhoda, ako pri porovnaní konsenzuálnej sekvencie druhov z čeľade *Fabaceae* k modelovým druhom. To je spôsobené tým, že sekvencie v rámci rodu *Trifolium* sú si viac podobné než sekvencie rôznych rodov patriacich do čeľade *Fabaceae*. Je to dôsledok evolučnej príbuznosti v rámci rodu. Oblasť kódujúca gén pre 5S rRNA je vysoko konzervovaná, čo spĺňa očakávania. V tomto prípade ani výrazné zmeny nie sú prípustné.

4.2.1. Oblasť ITS1

Oblasť ITS1 je prvým vnútorným prepisujúcim sa medzerníkom, nachádzajúcim sa medzi kódujúcimi oblasťami pre 18S a 5.8S. Z rodu *Trifolium* bolo spracovaných 57 sekvencií, ktoré boli dlhé 191 nt (*T. subterraneum*) až 241 nt (*T. dasyphyllum*). Pri zhode na 95 % boli najviac konzervované nukleotidy na pozícií 1-11, 13, 14, 22, 30, 31, 40, 45, 50. Ďalej som porovnávala 55 sekvencií rôznych druhov z čeľade *Fabaceae*. Boli vybrané rôzne druhy z rodov *Arachis*, *Astralagus*, *Cicer*, *Galega*, *Glycine*, *Lathyrus*, *Lens*, *Medicago*, *Melilotus*, *Ononis*, *Parachetus*, *Trigonella* a *Vicia* (Príloha 1). S úsekom dlhým od 188 nt (*Ononis viscosa* subs. *breviflora*) až po 263 nt (*Lathyrus palustris* subs. *pilosus*). Konzervovanosť pri identite 95 % bola iba na 1., 13. nt. Identita konsenzuálnych sekvencií po priložení sekvencií bola 78,8 % (205/260 nt) (Obr. 13). Prebehlo aj porovnanie sekvencií k modelovým druhom. Sekvencia ITS1 voči *A. thaliana* je s konsenzuálnou sekvenciou *Fabaceae* podobná na 44,3 % a oproti

konsenzuálnej sekvencii *Trifolium* je to 45,1 %. V prípade porovnania sekvencii *O. sativa* voči konsenzuálnej sekvencii *Fabaceae* bola zhoda 38,4 % a v porovnaní so sekvenciou *Trifolium* je zhoda 43,1 % (Tab. 8). Kultúrny druh *T. pratense* vykazoval zhodu 91,7 % s konsenzuálnou sekvenciou rodu *Trifolium* a so sekvenciou druhov z čeľade *Fabaceae* bola zhoda 73,7 %.

Fabaceae	1	tcgatgccttacatgcagtcacaacacgtgaataagtttgaacacatacgg	50
Trifolium	1	tcgatgccttacatgcagaccaacacgtgaatcagtttgaacacataggg	50
	51	tgggcttgagggtgtccacacctcggctcacctctggtttggggggggac	100
		. .	
	51	ttggtttgagggtgttcaacacctcggcttgctctggttcggaggtggac	100
	101	gacaaagggcnttctcctccccgcaaaaaacaaaccccggcgctgaatg	150
		. .	
	101	gacgaagtgcgttctcctttgtgcaaaaacaaaaccccggcgctgaatg	150
	151	cgtcaaggaaattaaattttgctctgagcgcacccgcatggcaccggaga	200
	151	cgtcaaggaaattaaattttgctctgagcgcacctacatagcaccggaga	200
	201	cggttttggggggggttttttttaanaataataat-tanaatgactctc	249
		
	201	cggttttgtgctgggttggttctga--cacataatatagaa-----	240
	250	ggcaacggat	259
	241	-----	240

Obr. 13: Porovnanie konsenzuálnych sekvencií pre oblasť ITS1 sekvencia *Fabaceae* ku *Trifolium* spp. Spracované EMBL-EBI (Needle, Pairwise Sequence Alignment, nucleotides). V prípade zhody je medzi oproti ležiacimi nukleotidmi zvislá čiara, ak je zmena nukleotidu nachádza sa tam bodka, prítomnosť *n* v sekvencii znamená, že miesto je tak variabilné, že nebolo možné vyhodnotiť preferenciu jedného zo štyroch nukleotidov na danej pozícii.

Tab. 8: Percentuálna zhoda sekvencií ITS1 v porovnaní konsenzuálnych sekvencií rodu *Trifolium* a čeľade *Fabaceae* k modelovým druhom *A. thaliana* (dvojkličnolistové), *O. sativa* (jednokličnolistové) a kultúrnemu druhu *T. pratense*.

Porovnanie	Zhoda (%)
<i>A. thaliana</i> ku konsenzuálnej sekvencii <i>Trifolium</i>	45,1 (144/319 nt)
<i>A. thaliana</i> ku konsenzuálnej sekvencii <i>Fabaceae</i>	44,3 (147/332 nt)
<i>O. sativa</i> ku konsenzuálnej sekvencii <i>Trifolium</i>	43,1 (118/274 nt)
<i>O. sativa</i> ku konsenzuálnej sekvencii <i>Fabaceae</i>	38,4 (117/305 nt)
<i>T. pratense</i> ku konsenzuálnej sekvencii <i>Trifolium</i>	91,7 (220/240 nt)
<i>T. pratense</i> ku konsenzuálnej sekvencii <i>Fabaceae</i>	73,7 (196/266 nt)

4.2.2. Oblasť ITS2

Úsek ITS2 sa nachádza medzi kódujúcimi génmi pre 5.8S a 25S, ktorý je po prepise vystrihnutý. Táto oblasť je súčasťou polycistronického génu, lokus 45S. Pre analýzu oblasti ITS2 bolo z rodu *Trifolium* spracovaných 57 sekvencií (Príloha 2) s dĺžkou od 196 nt (*T. globosum*, *T. isrealiticum*, *T. strain*, *T. paniculatum*, *T. pilulare*) až po 237 nt (*T. repens*). Identita pri 90% bola len v pozícii 19., 20. nt. Z čeľade *Fabaceae* bolo spracovaných 56 druhov s dĺžkou sekvencie od 179 nt (*Lathyrus tukhtensis*) až po 234 nt (*Trigonella kotschyi*). Pri nastavení zhody 90 % neboli nájdené žiadne zhodujúce sa oblasti. Pri 75 % to boli nt v pozícii 2, 8, 9. Priloženie konsenzuálnych sekvencií *Fabaceae* ku *Trifolium* je viditeľné na Obr. 14, s identitou 71,9 % (166/231 nt). V Tab. 9 je ukázaná zhoda po porovnaní so sekvenciami modelových druhov. Sekvencia *A. thaliana* je s konsenzuálnou sekvenciou *Fabaceae* podobná na 43,7 % a voči konsenzuálnej sekvencii *Trifolium* je to 44,0 %. V prípade porovnania sekvencie *O. sativa* bola zhoda o niečo nižšia voči konsenzuálnej sekvencii *Fabaceae* 36,6 % a voči sekvencii *Trifolium* to bolo 40,2 % (Tab. 9). Pridala som aj porovnanie ku kultúrnemu druhu *T. pratense*, ktorý je zo sekcie *Trifolium* zhodu s rodom v tomto úseku vykazuje na 88,4 % a s čeľad'ou 67,1 %.

```

Fabaceae 1 atcgaagcctcctgccaatctcttttgattgg---tgttctgggtggag      47
  |||||.|.|||||.||  |||.|.|||||.|.
Trifolium 1 atcgaagcctcctgccaatctctattgataggattgtgcagggtgaat    50

  48 gttggctctcccgtncgctctntgtnttgctggttggttgaaatnaaac    97
  |||||.|||||.|.|||.|.|.|.|.|.|.|.|.|.|.|.|.|.|.|.|.
  51 gttggcctcccgtgagctccatcgtctcatgggttggtgaaaatcgagac  100

  98 gttgggtggggggggngtgataaaaagggtgggtggtggtt--gcacgagac  145
  .|||||.|||.|.|.|.|.|.|.|.|.|.|.|.|.|.|.|.|.|.|.|.
  101 cttggtagggtgtgccatgatagatgggtg--ggtgtgttacgcacgagac  148

  146 caa-tcatgngctgctntattganttttgcctctttttcccctatgctt   194
  ||| |||| | |||| | |||| | |||.|||||||.|||.|.|||||||
  149 caagtcatgtgctgctctattgaatctctcttttaccacatgctt     198

  195 tttntacgctcgtga-----tgnnnnnnga      219
  |.| .|||||||      ||
  199 tctaaacgctcgtgacgctcgtga-----      222|

```

Obr. 14: Porovnanie konsenzuálnych sekvencií pre oblasť ITS2 sekvencia *Fabaceae* ku *Trifolium*. Spracované EMBL-EBI (Needle, Pairwise Sequence Alignment, nucleotide). V prípade zhody je medzi oproti ležiacimi nukleotidmi zvislá čiara, ak je zmena nukleotidu nachádza sa tam bodka, prítomnosť n v sekvencii znamená, že miesto je tak variabilné, že nebolo možné vyhodnotiť preferenciu jedného zo štyroch nukleotidov na danej pozícii.

Tab. 9: Percentuálna zhoda sekvencií ITS2 v porovnaní konsenzuálnych sekvencií rodu *Trifolium* a čeľade *Fabaceae* k modelovým druhom *A. thaliana* (dvojkličnolistové), *O. sativa* (jednokličnolistové) a kultúrnemu druhu *T. pratense*.

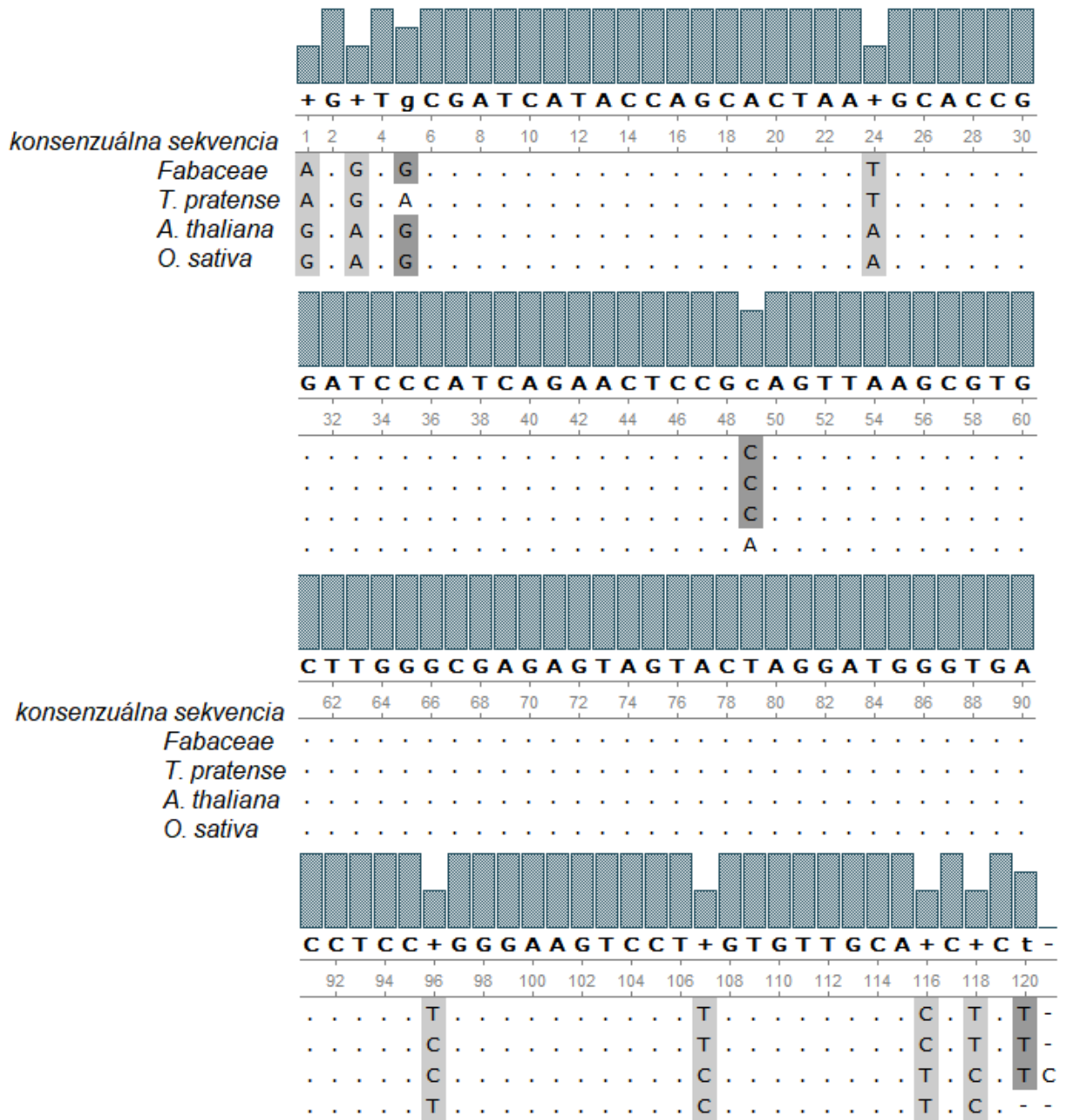
Porovnanie	Zhoda (%)
<i>A. thaliana</i> ku konsenzuálnej sekvencii <i>Trifolium</i>	44,0 (114/259 nt)
<i>A. thaliana</i> ku konsenzuálnej sekvencii <i>Fabaceae</i>	43,7 (110/252 nt)
<i>O. sativa</i> ku konsenzuálnej sekvencii <i>Trifolium</i>	40,2 (119/296 nt)
<i>O. sativa</i> ku konsenzuálnej sekvencii <i>Fabaceae</i>	36,6 (107/292 nt)
<i>T. pratense</i> ku konsenzuálnej sekvencii <i>Trifolium</i>	88,4 (199/225 nt)
<i>T. pratense</i> ku konsenzuálnej sekvencii <i>Fabaceae</i>	67,1 (159/237 nt)

4.2.3. Kódujúca oblasť lokusu 5S a NTS neprepisujúci sa medzerník

Oblasť génu 5S rDNA je pomerne krátka, ale pritom veľmi konzervovaná naprieč rôznymi druhmi. Tento úsek som porovnávala u 20 druhov z čeľade *Fabaceae* (Príloha 3). Dĺžka jednotlivých sekvencií bola 117 až 120 nt. Pri identite 100 % sa len ojedinele vyskytovali jednonukleotidové zámény (Obr. 15), kde sa jednalo skôr o tranzície. Priložená konsenzuálna sekvencia voči sekvencii *A. thaliana* bola zhodná na 93,5 % (115/123 nt) a v porovnaní s *O. sativa* 93,4 % (113/121 nt). Pri porovnaní s kultúrnym druhom *T. pratense* bola zhoda ešte vyššia 98,3 % (118/120 nt), čo sa dalo očakávať.

Neprepisujúci sa medzerník medzi génmi 5S rRNA vykazoval nižšiu zhodu po priložení 20 sekvencií druhov z čeľade *Fabaceae* (Príloha 4), podobne ako oblasť ITS2. Rozpätie sekvencií bolo 159 (*Pisum sativum*) až 234 nt (*Astragalus membranaceus*). Po porovnaní konsenzuálnej sekvencii NTS k sekvencii *A. thaliana* bola zhoda 28,3 % (124/438 nt) a so sekvenciou *O. sativa* bola zhoda 23,1 % (73/316 nt), najvyššia zhoda tohto úseku 46,9 % (114/243 nt) bola so sekvenciou *T. pratense*.

Obr. 15: Priloženia konsenzuálnej sekvencie 20 druhov z čeľade *Fabaceae* k sekvenciám kultúrneho druhu *T. pratense* a k modelovým druhom *A. thaliana* a *O. sativa*.



5. DISKUSIA

Rod *Trifolium* patrí do tretej najväčšej čeľade krytosemenných rastlín, *Fabaceae*. Táto čeľaď je významná z hľadiska veľkého počtu kultúrnych ale aj okrasných druhov. V práci som sa zamerala na spracovanie údajov o jednej z najdôležitejších organel v každej živej bunke, ktorou je ribozóm. Skladá sa z malej a veľkej podjednotky a spolu s komplexom ďalších pomocných proteínov prekladá genetickú informáciu uloženú v jadre bunky. Ribozómová DNA je jedna z najlepšie preskúmaných a stále študovaných oblastí DNA. Voľne dostupná databáza (<http://www.plantrdnadatabase.com/>) zhŕňa informácie z publikácií o počte a lokalizácii lokusov 5S a 18-5.8-25S rDNA (999 publikácií ku dňu 2.5.2018). Databáza pokrýva nižšie, vyššie, nahosemenné aj krytosemenné druhy. Po čeľadiach *Poaceae* (753) a *Astraceae* (424) je čeľaď *Fabaceae* druhmi najviac zastúpená 396. Ja som sa v práci zamerala na rod *Trifolium* na počet a lokalizáciu lokusov 5S a 25S, ktorý je súčasťou polycistronického génu 45S u 39 planých druhoch.

Rastlinný materiál použitý v diplomovej práci bol vypestovaný zo semien, ktoré pochádzali z troch génových bánk. Podľa zamerania štúdií sa využívajú aj voľne rastúce rastliny, ako tomu bolo u rastlín druhu *T. alpinum* rastúcich v Pyrenejach (Lauga *et al.*, 2009) a *Cistus heterophyllus* (Rosato *et al.*, 2016a). Pracuje sa s koreňovými špičkami odobratými tesne po vyklíčení semena (Peng *et al.*, 2016), postup pestovania na agarovom géli a vysadenie do zeminy s pieskom bol zvolený u *Phalaris* z čeľade *Poaceae* (Winterfeld *et al.*, 2018). Ja som pracovala s viacerými možnosťami pestovania rastlín a odberu koreňových špičiek. Za najefektívnejší spôsob kultivácie považujem pestovanie najskôr na Petriho miskách s médiom a následne rast na perlite s výživným MS médiom. Spracovala som aj čerstvo vyklíčené koreňové špičky či už narastené na filtračnom papieri alebo na géli. Klíčivosť semien z génových bánk bola pomerne nízka okolo 10-20 %. Odber rastlinného materiálu prebiehal od marca do októbra. Za najvhodnejšie obdobie pre spracovanie materiálu považujem máj a jún. V týchto mesiacoch bolo viac jadier v mitotickom stave. Je to obdobie najintenzívnejšieho rastu aj u voľne rastúcich rastlín. Rastliny boli pestované v laboratórnych podmienkach pri dlhej fotoperióde.

V priebehu odberu je taktiež viacero postupov spracovania koreňových špičiek. Pri inkubácii vzoriek sa využívajú chemikálie, 2-4 mM 8-hydroxychinolíne (Ansari *et al.*, 1999; Rosato *et al.*, 2016a; Peng *et al.*, 2016), 1,4-dichlórobenzén (Aguilera *et al.*, 2016) alebo

1-bromonaftaléne (Falistocco *et al.*, 2013). Ja som k synchronizácii mitóz využívala odber koreňového materiálu do destilovanej vody a inkubáciu na ľade, ako tomu bolo aj v práci (Winterfeld *et al.*, 2018). Ďalším krokom u každého spomínaného postupu je fixácia v Carnoyovej fixácii.

Vzorky sa spracovali ako suspenzia koreňových špičiek, iným postupom je roztlak vzorky na podložnom skle (Falistocco *et al.*, 2013). Po spracovaní a vyhodnotení preparátov som zisťovala počet mitoticky aktívnych jadier. Vo veľkom zastúpení boli jadrá v interfáze v priemere na 50 interfáznych jadier pripadalo 1 metafázne jadro. Samozrejme sa vyskytovali jadrá v inom štádiu mitotického delenia. Za veľmi dobrý preparát bolo považované sklo z 10 a viac metafáznych jadrami. Príčinou nedostatku mitotických jadier v metafázi aj po viacnásobnom opakovaní výroby preparátov mohlo byť ročné obdobie odberu koreňového materiálu a bunkové delenie nebolo optimálne. K synchronizácii mitóz sa využívajú postupy spomínané pri odbere koreňových špičiek.

Medzi úlohy diplomovej práce patrí overenie počtu chromozómov u vybraných druhov z rodu *Trifolium*. Veľkosť chromozómov bola stredná až veľká, ako aj u druhov *Canavalia* z čeľade *Fabaceae*, kde prevládali veľké chromozómy (She *et al.*, 2017). U všetkých druhov sa mi podarilo overiť údaje o počte chromozómov uvedené v literatúre (Ellison *et al.*, 2006), avšak u troch druhov som zistila aj iný počet chromozómov. Konkrétne to bolo u troch druhov *T. lupinaster* (sekcia *Lupinaster*), ktorý má bežne 16, 32 či 48 chromozómov (Ellison *et al.*, 2006), čo sú násobky základného chromozómového čísla 8. Overila som počet $2n=4x=32$ na 34 hodnotených metafáznych jadrách u ďalších 5 jadier sa vyskytol počet chromozómov 28. To by poukazovalo na tetraploida odvodeného od $x=7$. Kontaminácia pri odbere nebola možná, s druhom ktorý by mal 28 chromozómov som nepracovala. Mohlo by sa jednať o mozaicizmus v počte chromozómov, avšak iná odchýlka od počtu 32 nebola zachytená. Ďalším druhom je *T. stellatum* (sekcia *Trifolium*), kde som napočítala 12 aj 14 chromozómov pri čom literárne zdroje udávajú počet 12 chromozómov (Ellison *et al.*, 2006) alebo 16 chromozómov (Salimpour *et al.*, 2008). Posledným druhom je *T. aureum* (podrod *Chronosemium*), ktorý mal počet chromozómov 14 (Ellison *et al.*, 2006) aj 16 (Salimpour *et al.*, 2008). Z údajov z roku 2011 má tento druh v diploidnom stave 16 chromozómov (Giri *et al.*, 2011). Podobné závery boli zaznamenané v práci z roku 2008 u lokálne sa vyskytujúcich druhov z rodu *Trifolium* v Iráne (Salimpour *et al.*, 2008). Druh *T. angustifolium* má v tejto práci 12 chromozómov čo sa líši od 16 chromozómov zistených v práci autorov Marhold *et*

Feliner (2006). Druh *T. resupinatum* má 14, 16 aj 32 chromozómov podľa autorov Ellison *et al.* (2006), v prácach z rokov 2008 a 2012 v Turecku je uvedený počet 16 chromozómov (Salimpour *et al.*, 2008; Uslu, 2012). Ja som v rámci tohto druhu vyhodnotila počty 14 aj 16. Rozdielnosť v počte chromozómov jedného druhu v tomto prípade, nie je vôbec výnimočná. Jedná sa o bežne vyskytujúci sa jav. Lokálne populácie na rôznych krajinných územiach sa môžu odlišovať v počte chromozómov v génome jedného druhu. Rozličné počty chromozómov boli získané aj u druhov podrodu *Xiphium* z rodu *Iris*, z územia Pyrenejského polostrova a severozápadnej Afriky (Martinez *et al.*, 2010).

Umiestnenie lokusov pre rDNA je veľmi variabilné, môžu sa vyskytovať samostatne na rôznych chromozómoch, ale aj spolu na jednom páre chromozómov voči sebe v rôznych pozíciách. U čeľade *Fabaceae* bola v roku 2012 urobená analýza lokalizácii rDNA lokusu 25S u 100 druhov patriacich do tejto čeľade. V proximálnej časti chromozómu je to 50 % signálov, intersticiálne proximálna oblasť 8 %, intersticiálne terminálna 6 %, terminálna oblasť 19% a úsek celého ramienka chromozómu 17 % (Roa *et Guerra*, 2012). Na základe mojej práce môžem potvrdiť, že lokus 25S má u rodu *Trifolium* preferenčné umiestnenie do proximálnej a intersticiálnej oblasti, menej bol lokalizovaný v terminálnych oblastiach chromozómov. Prípadne pokrýva aj veľkú časť celého jedného ramienka chromozómu čo odpovedá percentuálnemu zastúpeniu v spomínanej práci. Naopak lokalizácia lokusu 5S bola častejšia na terminálnej a intersticiálne terminálnej oblasti chromozómu a to u 23 z 38 posudzovaných genómov rodu *Trifolium*.

U siedmych druhov, *T. badium* (podrod *Chronosemium*), *T. glanduliferum* (sekcia *Paramesus*), *T. repens* a *T. occidentale* (sekcia *Trifoliastrum*), *T. microcephalum* (sekcia *Involucrarium*), *T. spumosum* (sekcia *Vesicastrum*) a *T. alpestre* (sekcia *Trifolium*), som zaznamenala rozdielny počet a lokalizáciu jednotlivých lokusov 5S a 25S na rastlinných chromozómoch. Pri spracovaní jednotlivých druhov sa pracovalo s koreňovým materiálom, ktorý sa odoberal spolu do jednej eppendorfky z viacerých rastlín rovnakého druhu. Preto sa môže jednať o populačné, subpopulačné rozdiely v počte a lokalizácii lokusov rDNA ako tomu bolo aj v prípade počtu chromozómov. Existujú vnútrodrohové aj vnútropopulačné rozdiely v počte a lokalizácii lokusov rDNA (Rosato *et al.*, 2017) u druhov *Anacyclus* z čeľade *Astraceae*. Tento jav je aj na úrovni sekvencií, kde je variabilita v počte opakovaní úseku rDNA. Zmeny v medzerníkových oblastiach sa často vyskytujú. V rámci jedného druhu

sú pozorovateľné len na úrovni sekvencie, avšak dopad na fenotyp nie je viditeľný (Rogers *et* Bendich, 1987).

Pri vyhodnocovaní získaných údajov som zistila, že u piatich druhov dochádza k redukcii počtu lokusov. Signál jedného páru lokusov bol v porovnaní s druhým párom signálu výrazne slabší. Podobný jav je popísaný aj u nahosemenných druhov *Pinus taeda* pre lokus 25S je 12 silných signálov a 8 slabých, v prípade lokusu 5S je to 2 silné a 2 slabé signály (Jacobs *et al.*, 2000). Druh *P. nigra* má 16 lokusov 25S, 2 silné a 2 slabé lokusy 5S (Hizume *et al.*, 2002). Z čoho vyvodzujem zníženie počtu lokusov. V prípade 25S oblasti je tomu tak u *T. dubium* čo je alotetraploid (Obr. 6-f), kde prebral kontrolu nad genómom jeden rodičovský pár NOR oblasti. Ďalej som slabší signál sondy oproti druhej dvojici lokusu 25S pozorovala u *T. subterraneum* a *T. amabile*. Naopak bežnejšia aj u iných rastlinných druhov najmä jednoklíčnolistových bylín je redukcia v prípade lokusu 5S (Mizuochi *et al.*, 2007; Martinez *et al.*, 2010). Tento jav som pozorovala u druhu *T. stellatum* ($2n=14$) a *T. occidentale*. V prípade druhu *T. occidentale* by sa naozaj dalo uvažovať o redukcii, lebo som zaznamenala 2 typy zostavení lokusov na chromozómoch. Podobne ako v publikácii Ansari *et al.* (1999) má na jednom páre oba lokusy 5S aj 25S a samostatný pár lokusu 5S na inom chromozómovom páre. Druhým mnou zaznamenaným typom je umiestnenie oboch lokusov na jednom chromozómovom páre (Obr. 10-d,e). Takto vyhodnotené boli 4 metafázne mitózy čo je menej ako u prvého spomínaného typu umiestnenia lokusov, kde ich bolo 10 (Tab. 6).

Zachytila som aj nepárny počet lokusov u *T. repens* lokus 5S sa vyskytoval v počte 3 (Obr. 10-h). Druh *T. glanduliferum* mal nepárny počet lokusov 5S a to 5 (Obr. 7-e). Rovnaký prípad bol aj u druhu *Phalaroides coerulescens* z čeľade *Poaceae*, ktorý je diploidný $2n=14$ a počet lokusov 5S bol taktiež 3 (Winterfeld *et al.*, 2018). Ďalším javom bolo umiestnenie lokusov na takmer každom chromozóme v genóme. Druh *T. alpestre* má lokus 5S na 10 a 11 chromozómoch zo 16 (Obr. 9-a, b), podobne ako *T. microcephalum* má na 16 chromozómoch lokus 5S (Obr. 11-e) a zároveň aj na každom lokus 25S (Obr. 11-d). Lokus 25S je na každom chromozóme u *T. cherleri* na 10 chromozómoch (Obr. 9-h). Podobný výskyt pomerne veľkého počtu kópií lokusu 5S je aj u *Canavalia gladiata* z čeľade *Fabaceae*; je na 20 z 22 chromozómov a na 4 chromozómoch sa objavuje lokus 25S (She *et al.*, 2017). U druhu *Cucumis sativus* je väčšie rozšírenie lokusu 25S na 10 chromozómoch zo 14 a lokus 5S je na 2 chromozómoch (Peng *et al.*, 2016). Oktaploidný druh *T. medium* s počtom chromozómov 64 má umiestnených 12 lokusov 25S a 8 lokusov 5S na rôznych chromozómoch. Podobne je

tomu aj u druhu *Atropa belladonna* patriaceho do čeľade *Solanaceae*. Tento alohexaploidný druh má 72 chromozómov a umiestnenie 6 lokusov 25S a 4 lokusov 5S je na rôznych chromozómoch (Volkov *et al.*, 2017). Polyploidia je dôležitým javom v evolúcii rastlín, poskytuje vyššiu adaptabilitu polyploidného druhu oproti jeho predkom (Whittemore *et Olsen*, 2011). Z hľadiska počtu lokusov rDNA dochádza prvotne k ich zvýšeniu ale po reštrukturalizácii genómu často dochádza k redukcii signálov oboch lokusov 5S aj 25S. Polyploidný druh z čeľade *Solanaceae* *S. elaeagnifolium* má 24, 48 aj 72 chromozómov. V najvyššom stupni polyploidizácie je viditeľná redukcia oboch typov lokusov (Chiarini, 2014).

Analýza sekvencií ITS1, ITS2, NTS a kódujúcej oblasti génu 5S rDNA *in silico*

Pri konštrukciách fylogenetických stromov a rozlišovaní druhov v rámci rodov, čeľadi sa využívajú sekvenčné údaje, barkódy. Prevládali úseky organelových genómov. Dnes sa často využívajú medzerníkové oblasti medzi kódujúcimi oblasťami rDNA a ich kombinácie s úsekmi chloroplastových genómov. Na rozlíšenie druhov sa využili oblasti ITS s chloroplastovými sekvenciami u druhov z rodu *Trifolium*, podčeľade *Myrsinaceae*, rodu *Gentiana* a nadrodu *Cassinae* (Ellison *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2016; Mishra *et al.*, 2016). V rozsiahlom projekte z roku 2015 bolo spracovaných 852 845 sekvencií ITS oblastí u 10 hlavných skupín eukaryontných druhov. Pokryté tak boli huby, machy, papraďorasty, nahosemenné, jednoklíčnolistové aj dvojklíčnolistové rastliny, hmyz i ryby (Wang *et al.*, 2015). V rámci dvojklíčnolistových druhov bolo hodnotených 31 307 sekvencií a zhoda po sekvenčnom priložení pre ITS1 bola 76 % a ITS2 to bolo 73 %. Tomu zodpovedajú aj moje výsledky v rámci priloženia ITS1 sekvencií rodu *Trifolium* a čeľade *Fabaceae* bola 79 % a pre úsek ITS2 bola zhoda 72 %. V porovnaní dĺžky analyzovaných úsekov pre ITS1 to bolo 100 až 681, v mojej analýze 188 až 263, čo spadá do rozmedzia z rozsiahlejšej analýzy z roku 2015. U oblasti ITS2 to bolo 101 až 522 nukleotidov u rodu *Trifolium* a čeľade *Fabaceae* z mojej analýzy 179 až 237 nukleotidov, čo tiež spadá do rozsahu. Oblasť ITS1 na základe mojich analýz je konzervovanejšia než ITS2 a to najmä v prvých 60 nukleotidoch. Nakoľko sa jedná o prepisované medzerníky, môže tu byť nejaký väzbový úsek pre proteíny, enzýmy zaistujúce vystrihnutie funkčných oblastí z pre-rRNA. V týchto oblastiach je viditeľná veľká variabilita naprieč druhmi z čeľade *Fabaceae*. Vo veľkej miere nepodliehajú konzervovanosti, skôr sú pod vplyvom evolúcie. Zmeny sú tak výrazné, že sú považované za jeden z markerov pri divergencii druhov. Pri porovnaní

konsenzuálnej sekvencie *Trifolium* ku modelovým rastlinným organizmom *A. thaliana* a *O. sativa* je o niečo vyššia zhoda než pri porovnaní sekvencie *Fabaceae* (Tab. 8, 9). To je spôsobené, tým že sekvencie v rámci rodu *Trifolium* sú si viac podobné než sekvencie rôznych rodov patriacich do čeľade *Fabaceae*. V štúdií nadrodu *Cassinae* patriaceho taktiež do čeľade *Fabaceae* po vyhodnotení 54 sekvencií 18 druhov bola zhoda pre ITS1 oblasť 82,15 % a pre ITS2 77,2 % (Mishra *et al.*, 2016). Pri porovnaní tak veľkého súboru ako bol ten z roku 2015 sa za lepší DNA barkód určil práve úsek ITS1 (Wang *et al.*, 2015). U Leguminóz to bolo tiež potvrdené v prospech úseku ITS1 (Yadav *et al.*, 2016). Úsek ITS2 bol v roku 2013 zaradený ako DNA mini barkód pri identifikácii druhov, univerzálny a rýchly identifikačný nástroj (Han *et al.*, 2013). ITS1 a ITS2 sa považujú za významné markery najmä u rastlín, u živočíchoch sa považujú za doplnkové.

V genómoch všetkých organizmov sa nachádzajú životne dôležité gény. Tieto gény sú vysoko konzervované bez povolenia zmien, a to najmä na úrovni sekvencií aminokyselín. Pre kódujúcu oblasť génu 5S rDNA, ktorá je vysoko konzervovaná a prepisuje sa do rRNA, sú zmeny na úrovni kódujúcej sekvencie povolené len minimálne. Na viac než 93 % sú sekvencie kódujúcej oblasti lokusu 5S druhov z čeľade *Fabaceae* zhodné aj so vzdialenejšími rastlinnými druhmi. To je podľa očakávania, v tomto prípade ani nejaké výrazne zmeny nie sú prípustné. Nekódujúce konzervované opakujúce sa sekvencie zohrávajú v genóme významné úlohy podobne ako u živočíchoch (Burgess *et Freeling*, 2014). Jedná sa najmä o oblasť 5'UTR (upstream region) nekódujúcich sekvencií, ktoré sa opakovane vyskytujú v genómoch rastlín. Často nesú sekvenčné motívy (Reineke *et al.*, 2011).

6. SÚHRN

Štúdium variability lokusov rDNA v genómoch druhov z rodu *Trifolium*.

Cieľom diplomovej práce bolo štúdium variability lokusov z hľadiska počtu a umiestnenia na chromozómoch v genómoch 39 planých druhov, z ktorých 28 nebolo publikovaných v literatúre. Druhú časť tvorilo spracovanie údajov z databáz bioinformatickými prístupmi.

V cytogenetickej časti analýz za pomoci fluorescenčnej *in situ* hybridizácie bol zistený počet chromozómov, ktorý po väčšine odpovedal literárnym zdrojom, u troch druhov bol zaznamenaný iný počet chromozómov. V tomto prípade sa môže jednať o subpopulačné rozdiely. Taktiež to môže platiť aj z hľadiska umiestnenia jednotlivých lokusov ribozómovej DNA, 5S a 45S. U siedmych druhoch bolo zachytené odlišné usporiadanie a počet lokusov v rámci jedného druhu, čo tiež môže poukazovať na populačné rozdiely. Pozorovaná bola aj možná redukcia počtu lokusov k základnej zostave 2 lokusy 5S a 2 lokusy 25S, ktorá je skôr typická pre krytosemenné diploidné druhy. Z hľadiska preferencie umiestnenia lokusov na chromozómoch je pre lokus 45S typická lokalizácia v proximálnej časti a v okolí centroméry, menej v terminálnej oblasti krátkeho ramienka chromozómu. Naopak u lokusu 5S sa dá skôr hovoriť o preferencii umiestnenia na terminálnej, prípadne intersticiálnej terminálnej oblasti chromozómu.

Bioinformatická časť priniesla pohľad na študované lokusy na úrovni sekvencií. V tejto časti sa využili údaje z databáze GenBank. Potvrdil sa predpoklad, kódujúca časť je vysoko konzervovaná s minimom povolených substitúcií na úrovni DNA. Ak sa vyskytnú jedná sa vo väčšine o tranzície. Naopak prepisujúce sa a neprepisujúce sa medzerníky sú veľmi variabilné a konzervované minimálne, podliehajú rýchlej evolúcii. Sú dobrým DNA barkódom pri rozlišovaní druhov, nie len u rastlín.

7. SUMMARY

Study of variability in ribosomal DNA loci in species of the genus *Trifolium*.

The main point of my diploma thesis was the study of variability in numbers and localization of rDNA loci in the genomes of 39 non-cropped species of the genus *Trifolium*. 28 of them have not been published from this point of view yet. The second part of the work was *in silico* analysis.

In cytogenetic part of the analyses, a number of rDNA loci were detected by the usage of FISH. Almost all species have the same number of chromosomes as in a literature except for 3 species. In this case it could be the differences between subpopulations. It is the same with localization of rDNA loci 5S and 45S. Seven species have two types of localization and loci numbers in one species. It can point to differences inside populations. The reduction of the locus number into the basic composition of two 5S and two 45S is seen in these results. This is a very common configuration of rDNA loci in angiosperm species. Preferential localization of loci 45S is on the proximal part of a chromosome or around centromere, less on the terminal part of the short arm of a chromosome. On the contrary, the position of 5S rDNA is preferentially on the terminal ends of short or long chromosome arm.

Bioinformatic analyses show different angles to rDNA loci. Sequences are from free available database GenBank. Prediction about conservation of coding sequence was confirmed. Only few changes are allowed, mostly transitions. Transcribed and non-transcribed spacers are very variable, they are under pressure of evolution. It is the reason why they are being used like a DNA barcodes, not only in plant family.

8. LITERATURA

Aguilera P. M., Debat H. J., Scaldaferrero M. A., Marti D. A., Grabile M. 2016. FISH-mapping of 5S rDNA locus in chili peppers (*Capsicum - Solanaceae*). *Ann. Brazil. Academ.* 88(1): 117-125.

Ansari H.A., Ellison N.W., Reader S.M., Badaeva E.D., Frieb B., Miller T.E., Williams W.M. 1999. Molecular cytogenetic organisation of 5S and 18S-26S rDNA loci in white clover (*Trifolium repens* L.) and related species. *Ann. Bot.* 83: 199–206.

Ansari H.A., Ellison N.W., Williams W.M. 2008. Molecular and cytogenetic evidence for an allotetraploid origin of *Trifolium dubium* (Leguminosae). *Chromosoma* 117(2): 159-167.

Barros e Silva A.E., Dos Santos Soares Filho W., Guerra M. 2013. Linked 5S and 45S rDNA sites are highly conserved through the subfamily *Aurantioideae (Rutanceae)*. *Cytogen. Gen. Res.* 140: 62-69.

Burgess D., Freeling M. 2014. The most deeply conserved noncoding sequences in plants serve similar functions to those in vertebrates despite large differences in evolutionary rates. *Plant Cell.* 26(3): 946-961.

Cabral-de-Mello D.C., Cabrero J., Lopez-Leon M.D., Camacho J.P. 2011. Evolutionary dynamics of 5S rDNA location in acridid grasshoppers and its relationship with H3 histone gene and 45S rDNA location. *Genetica* 139: 921-931.

Cabral-de-Mello D.C., Valente G.T., Nakajima R.T., Martins C. 2012. Genomic organization and comparative chromosome mapping of the U1 sn-RNA gene in cichlid fish, with an emphasis in *Oreochromis niloticus*. *Chromosome Res.* 20: 279–292.

Ellison N.W., Liston A., Steiner J.J., Williams W.M., Taylor N.L. 2006. Molecular phylogenetics of the clover genus (*Trifolium*- Leguminosae). *Mol. Phylogenet. Evol.* 39(3): 688-705.

Falstocco E., Marconi G., Falcinelli M. 2013. Comparative cytogenetic study on *Trifolium subterraneum* (2n=16) and *Trifolium israeliticum* (2n=12). *Genome* 56(6): 307-313.

Galián J.A., Rosato M., Rosselló J.A. 2012. Early evolutionary colocalization of the nuclear ribosomal 5S and 45S gene families in seed plants: evidence from the living fossil gymnosperm *Ginkgo biloba*. *Heredity* 108: 640–646.

- Garcia S., Kovařík A.** 2013. Dancing together and separate again: gymnosperms exhibit frequent changes of fundamental 5S and 35S rRNA gene (rDNA) organisation. *Heredity* 111: 23–33.
- Garcia S., Lim K.Y., Chester M., Garnatje T., Pellicer J.** 2009. Linkage of 35S and 5S rRNA genes in *Artemisia* (family *Asteraceae*): first evidence from angiosperms. *Chromosoma* 118: 85–97.
- Giri N., Taylor N. L., Collins G. B.** 2011. Chromosome numbers in some *Trifolium* species with a karyotype for *T. physodes*. *Genome*. DOI: 10.1139/g81-068.
- Han J., Zhu Y., Chen X., Liao B., Yao H., Song J., Chen S., Meng F.** 2013. The short ITS2 sequence serves as an efficient taxonomic sequence tag in comparison with the fulllength ITS. *BioMed. Res. Int.* 2013:741–476 DOI: 10.1155/2013/741476.
- Heckmann S., Macas J., Kumke K., Fuchs J., Schubert V., Ma L., Novák P., Neumann P., Taudien S., Platzer M., Houben A.** 2013. The holocentric species *Luzula elegans* shows interplay between centromere and large-scale genome organization. *Plant J.* 73: 555–565.
- Hizume M., Shibata F., Matsusaki Y., Garajova Z.** 2002. Chromosome identification and comparative karyotypic analyses of four *Pinus* species. *Theor. Appl. Genet. Sep.* 105(4): 491-497.
- Chiarini F. E.** 2014. Variation in rDNA loci of polyploid *Solanum elaeagnifolium* (*Solanaceae*). *NZ. J. Bot.* 52(3): 277-284.
- Jacobs M.D., Gardner R.C., Murray B.G.** 2000. Cytological characterization of heterochromatin and rDNA in *Pinus radiata* and *P. taeda*. *Plant System. and Evol.* 223: 71–79.
- Kalendar R., Tanskanen J., Chang W., Antonius K., Sela H., Peleg O., Schulman A. H.** 2008. *Cassandra* retrotransposons carry independently transcribed 5S RNA. *PNAS.* 105(15): 5833-5838.
- Koo D.H., Hong C.P., Batley J., Chung Y.S., Edwards D.** 2011. Rapid divergence of repetitive DNAs in *Brassica* relatives. *Genomics* 97: 173–185.
- Kovařík A., Pires J.C., Leitch A.R., Lim K.Y., Sherwood A.M., Matyašek R., Rocca J., Soltis D.E., Soltis P.S.** 2005. Rapid concerted evolution of nuclear ribosomal DNA in two *Tragopogon* allopolyploids of recent and recurrent origin. *Genetics.* 169: 931–944.

- Lauga B., Malaval S., Largier G., Regnault-Rogert C.** 2009. Two lineages of *Trifolium alpinum* (*Fabaceae*) in the Pyrenees: evidence from random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Acta Botan. Gallica*. 156(3): 317-330.
- Lavin M., Herendeen P., Wojciechowski M.F.** 2005. Evolutionary rates analysis of Leguminosae implicates a rapid diversification of lineages during the Tertiary. *Syst. Biol.* 54: 530–549.
- Liu J., Yan H. F., Ge X. J.** 2016. The Use of DNA Barcoding on Recently Diverged Species in the genus *Gentiana* (*Gentianaceae*) in China. *PLoS One* 11(4): e0153008.
- Lysák M. A., Mandáková T.** 2013. Analysis of plant meiotic chromosomes by chromosome painting. *Methods Mol. Biol.* 990: 13–24.
- Ma X.F., Gustafson J.P.** 2005. Genome evolution of allopolyploids: a process of cytological and genetic diploidization. *Cytogenet. Genome. Res.* 109: 236–259.
- Maia V. H., Gitzendanner M. A., Soltis P. S., Wong G. K., Soltis D. E.** 2014. Angiosperm phylogeny based on 18S/26S rDNA sequence data: constructing a large data set using next-generation sequence data. *J. Plant Sci.* 175(6): 613-650.
- Marhold K., Feliner N.** 2006. Chromosome number reports. *Taxon* 55: 443-445.
- Martinez J., Vargas P., Luceno M., Cuadrado A.** 2010. Evolution of *Iris* subgenus *Xiphium* based on chromosome numbers, FISH of nrDNA (5S, 45S) and *trnL-trnF* sequence analysis. *Plant Syst. Evol.* 289(3-4): 223-235.
- Mishra P., Kumar A., Rodrigues V., Shukla A. K., Sundaresan.** 2016. Feasibility of nuclear ribosomal region ITS1 over ITS2 in barcoding taxonomically challenging genera of subtribe *Cassiinae* (*Fabaceae*). *PeerJ*. 2016(4): e2638.
- Mizuochi H., Marasek A., Okazaki K.** 2007. Molecular cloning of *Tulipa fosteriana* rDNA and subsequent FISH analysis yields cytogenetic organization 5S rDNA and 45S rDNA in *T. gesneriana* and *T. fosteriana*. *Euphytica* 155: 235-248.
- Murashige T., Skoog F.** 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with Tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15(3): 473-497.

- Murray B.** 2013. Karyotype variation and evolution in gymnosperms. *Plant Genome Diver.* (2): 231-243.
- Nakajima R.T., Cabral-de-Mello D.C., Valente G.T., Venere P.C., Martins C.** 2012. Evolutionary Dynamics of rRNA gene clusters in cichlid fish. *Evol. Biol.* 12: 198.
- Németh A., Conesa A., Santoyo-Lopez J., Medina I., Montaner D.** 2010. Initial genomics of the human nucleolus. *PLoS Genet.* 6: e1000889.
- Orzechowska M., Siwinska D., Maluszynska J.** 2010. Molecular cytogenetic analyses of haploid and allopolyploid *Pellia* species. *J. Bryol.* 32: 113–121.
- Peng L. K., Xiang W. Y., Zhao H., Wang Y., Ming L. X., Ming W. J., Xu Y., Yun Z. L., Hua H. Y.** 2016. Cytogenetic relationships among *Citrullus* species in comparison with some genera of the tribe *Benincaseae* (*Cucurbitaceae*) as inferred from rDNA distribution patterns. *Evol. Biol.* 16:85. doi: 10.1186/s12862-016-0656-6.
- Raffl C., Holderegger R., Parson W., Erschbamer B.** 2008. Patterns in genetic diversity of *Trifolium pallescens* populations do not reflect chronosequence on alpine glacier forelands. *Heredity.* 100: 526–532.
- Reineke A. R., Bornberg-Bauer E., Gu J.** 2011. Evolutionary divergence and limits of conserved non-coding sequence detection in plant genomes. *Nucleic Acids Res.* 39(14): 6029-6043.
- Roa F. and Guerra M.** 2012. Distribution of 45S rDNA sites in chromosomes of plants: structural and evolutionary implications. *Evol. Biol.* 12: 225.
- Roa F., Guerra M.** 2015. Non-random distribution of 5S rDNA sites and its association with 45S rDNA in plant chromosomes. *Cytogenet. Genome Res.* 146: 243-249.
- Rogers S. O. a Bendich A. J.** 1988. Extraction of DNA from plant tissues, pp. 1–10. In: Gelvin, S. B. and Schilperoort, R. E. (editors). *Plant Molecular Biology Manual*, A6. Kluwer Academic Publishers. Boston.
- Rogers S. O., Bendich A. J.** 1987. Ribosomal DNA genes in plants: variability in copy number and in the intergenis spacer. *Plant Mol. Biol.* 9: 509-520.

- Rosato M., Alvarez I., Feliner G. N., Rossello J. A.** 2017. High and uneven levels of 45S rDNA sitenumber variation across wild populations of a diploid plant genus (*Anacyclus*, *Asteraceae*). *PLoS ONE* 12(10): e0187131.
- Rosato M., Ferrer-Gallego P., Totta Ch., Laguna E., Rosselló J.A.** 2016a. Nuclear rDNA in *in vitro* generated plants is amplified after sexual reproduction with conspecific wild individuals. *Botanical J.* 181: 127-137.
- Rosato M., Kovařík A., Garilleti R., Rosselló J. A.** 2016b. Conserved organisation of 45S rDNA sites rDNA gene copy number among major clades of early land plants. *PLoS ONE* 11(9): e0162544.
- Salimpour F., Sharifnia F., Mostafavi G., Hajrasoliha Sh., Ukhneh E.** 2008. Chromosome counts and determination of ploid levels in Iranian species of *Trifolium*. *Chrom. Bot.* 3: 53-63.
- Sastri D. C., Hmu K., Appels R., Lagudah E. S., Playford J.** 1992. An overview of evolution in plant 5S DNA. *Plant Syst. Evol.* 183: 169-181.
- She C. W., Wei L., Jiang X. H.** 2017. Molecular cytogenetic characterization and comparison of the two cultivated *Canavalia* species (Fabaceae). *Comp. Cytogenet.* 11(4): 579-600.
- Souza L.G.R., Crosa O., Speranza P., Guerra M.** 2012. Cytogenetic and molecular evidence suggest multiple origins and geographical parthenogenesis in *Nothoscordum gracile* (*Alliaceae*). *Ann. Bot.* 109: 987-999.
- Sprent J.I.** 2001. *Nodulation in Legumes*. Royal Botanic Gardens, Kew, UK.
- Taketa S., Ando H., Takeda K., Ichii M., von Bothmer R.** 2005. Ancestry of American polyploid *Hordeum* species with the I genome inferred from 5S and 18S-25S rDNA. *Ann. Bot.* 96: 23–33.
- Taylor N.L., Quesenberry K.H., Anderson M.K.** 1979. Genetic system relationship in *Trifolium*. *Econom. Bot.* 33: 431-441.
- Uslu E.** 2012. Karyology of nine *Trifolium* L. taxa from Turkey. *Caryologia.* 65:4. 304-310.
- Vižintín L., Javorník B., Bohanec B.** 2006. Genetic characterization of *Trifolium* species as revealed by nuclear DNA content and ITS rDNA analysis. *Plant Sci.* 170:859–866.

- Volkov R. A., Panchuk I. I., Borisjuk N. V., Hosiawa-Baranska M., Maluszynska J., Hemleben V.** 2017. Evolutional dynamics of 45S and 5S ribosomal DNA in ancient allohexaploid *Atropa belladonna*. *Plant Biol.* 17:21. DOI: 10.1186/s12870-017-0978-6.
- Volkov R.A., Komorova N.Y., Hemleben V.** 2007. Ribosomal DNA in plant hybrids inheritance, rearrangement, expression. *Systematics & Biodiversity* 5:261–276.
- Wang X. C. Liu C., Huang L., Bengtsson-Palme J., Chen H., Zhang J. H., Cai D., Li J. Q.** 2015. ITS1: a DNA barcode better than ITS2 in eukaryotes? *Mol. Ecol. Resour.* 15(3): 573-586.
- Whittemore A.T., Olsen R.T.** 2011. *Ulmus americana* (*Ulmaceae*) is a polyploid complex. *Am. J. Bot.* 98: 754–760.
- Williams W.M., Ellison N.W., Ansari H.A., Verry I.M., Hussian S.W.** 2012. Experimental evidence for the ancestry of allotetraploid *Trifolium repens* and creation of synthetic forms with value for plant breeding. *Plant Biol.* 12: 55.
- Winterfeld G., Becher H., Voshell S., Hilu K., Roser M.** 2018. Karyotype evolution *Phalaris* (*Poaceae*): The role of reductional dysploidy, polyploidy and chromosome alteration in a wide-spread and diverse genus. *PLoS ONE* 13(2): e0192869.
- Witte C. P., Le Q. H., Bureau T., Kumar A.** 2001. Terminal-repeat retrotransposons in miniature (TRIM) are involved in restructuring plant genomes. *PNAS.* 98(24): 13778-13783.
- Yadav P., Koul K. K., Srivastava N., Mendki M. J., Bhagyawant S. S.** 2016. ITS-PCR sequencing approach deciphers molecular phylogeny in chickpea. *Plant Biosys.* 151(3): 429-435.
- Zhang D., Duan L., Zhou N.** 2014. Application of DNA barcoding in *Roscoea* (*Zingiberaceae*) and a primary discussion on taxonomic status of *Roscoea cautleoides* var. *Pubescens*. *Biochem. Systemat. and Ecol.* 52: 14–19.
- Zohary M.** 1972. Origins and evolution in the genus *Trifolium*. *Bot. Notiser* 125: 501-511.
- Zohary M., Heller D.** 1984. *The Genus Trifolium*. Israel Academy of Sciences and Humanities, Jerusalem, Israel.

PRÍLOHY

Príloha 1.: Údaje využité pri analýze oblasti úseku ITS1 druhy z rodu *Trifolium* v prvom stĺpci, v druhom druhy z čeľade *Fabaceae* a modelové druhy *A. thaliana* a *O. sativa*.

	zdrojový kód GenBank	názov druhu	zdrojový kód GenBank	názov druhu
1	AF053143.1:37-272	<i>Trifolium albopurpure</i>	AJ320395.1:1-206	<i>Arachis hoehnei</i>
2	AF053144.1:37-272	<i>Trifolium amabile</i>	AF156675.2:229-460	<i>Arachis hypogaea</i>
3	AF053145.1:37-272	<i>Trifolium ambiguum</i>	AJ320396.1:1-206	<i>Arachis palustris</i>
4	AF053146.1:37-272	<i>Trifolium angulatum</i>	AM943374.1:40-266	<i>Astragalus alpinus</i>
5	DQ312005.1:37-262	<i>Trifolium aureum</i>	AM943378.1:40-266	<i>Astragalus exscapus</i>
6	AF053147.2:37-272	<i>Trifolium bejariense</i>	AM943381.1:40-267	<i>Astragalus frigidus</i>
7	AF053156.1:37-272	<i>Trifolium bifidum</i>	AM943384.1:40-266	<i>Astragalus glycyphyl</i>
8	AF053148.1:37-272	<i>Trifolium buckwestior</i>	AB198904.1:1-239	<i>Cicer arietinum</i>
9	DQ312208.1:37-269	<i>Trifolium calocephalum</i>	GQ246112.1:1-208	<i>Galega lindblomii</i>
10	AF053150.1:37-272	<i>Trifolium cernuum</i>	DQ311965.1:37-244	<i>Galega officinalis</i>
11	AF053151.1:37-270	<i>Trifolium cherleri</i>	AY553709.1:1-211	<i>Galega orientalis</i>
12	AF053152.1:37-272	<i>Trifolium ciliolatum</i>	AJ009787.1:17-236	<i>Glycine max</i>
13	KX254378.1:19-259	<i>Trifolium dasyphyllum</i>	JX506057.1:1-259	<i>Lathyrus clymenum</i>
14	AF053153.1:37-272	<i>Trifolium decorum</i>	JX506079.1:1-258	<i>Lathyrus hierosolymita</i>
15	DQ312047.1:37-263	<i>Trifolium dubium</i>	DQ311967.1:37-275	<i>Lathyrus laevigatus</i>
16	AF053154.1:37-272	<i>Trifolium eriocephalum</i>	JX506119.1:1-263	<i>Lathyrus palustris</i>
17	DQ312057.1:37-244	<i>Trifolium globosum</i>	JX506120.1:1-259	<i>Lathyrus polymorphus</i>
18	AF053155.1:37-272	<i>Trifolium glomeratum</i>	JX506151.1:1-259	<i>Lathyrus tukhtensis</i>
19	KX254380.1:19-258	<i>Trifolium gordejvii</i>	JX506155.1:1-259	<i>Lathyrus vernus</i>
20	DQ312062.1:37-263	<i>Trifolium grandiflorum</i>	AJ441321.1:42-276	<i>Lens culinaris</i>
21	AF053157.1:37-272	<i>Trifolium haydenii</i>	AJ441069.1:42-276	<i>Lens ervoides</i>
22	AF053158.1:37-274	<i>Trifolium hirtum</i>	AJ441067.1:42-276	<i>Lens lamottei</i>
23	AF053159.1:37-272	<i>Trifolium hybridum</i>	AJ441070.1:42-278	<i>Lens nigricans</i>
24	AF053160.1:37-270	<i>Trifolium incarnatum</i>	AJ441064.1:42-276	<i>Lens odemensis</i>
25	DQ312069.1:37-244	<i>Trifolium israeliticum</i>	AJ441062.1:42-276	<i>Lens tomentosus</i>
26	AF053161.1:37-274	<i>Trifolium isthmocarpum</i>	Z99216.1:8-240	<i>Medicago lupulina</i>
27	KX254379.1:19-258	<i>Trifolium kingii</i>	DQ311981.1:37-277	<i>Medicago polymorpha</i>
28	AF053162.1:37-272	<i>Trifolium longipes</i>	KC333392.1:8-240	<i>Medicago ruthenica</i>
29	KX254385.1:19-258	<i>Trifolium lupinaster</i>	GQ488541.1:1-202	<i>Medicago sativa</i>
30	KX254372.1:19-258	<i>Trifolium macrocephalum</i>	DQ311984.1:37-274	<i>Melilotus alba</i>
31	AF053164.1:37-272	<i>Trifolium mattirolian</i>	KY968966.1:88-325	<i>Melilotus officinalis</i>
32	DQ312090.1:37-244	<i>Trifolium meduseum</i>	GQ488519.1:1-203	<i>Ononis polyphylla</i>
33	AF053165.1:37-272	<i>Trifolium michelianum</i>	GQ488529.1:1-203	<i>Ononis tournefortii</i>
34	AF053166.1:37-272	<i>Trifolium montanum</i>	GQ488536.1:1-188	<i>Ononis viscosa</i>
35	DQ312098.1:37-272	<i>Trifolium multinerve</i>	GQ246124.1:1-217	<i>Parochetus africanus</i>
36	KX254374.1:19-258	<i>Trifolium nanum</i>	DQ311987.1:37-269	<i>Parochetus communis</i>
37	KX254377.1:19-258	<i>Trifolium neurophyllum</i>	AJ288204.1:8-241	<i>Trigonella kotschy</i>
38	AF053167.1:37-272	<i>Trifolium nigrescens</i>	AJ288207.1:8-242	<i>Trigonella spicata</i>

39	AF053168.1:37-271	<i>Trifolium occidentale</i>	AJ288209.1:8-243	<i>Trigonella stellata</i>
40	AF053169.1:37-272	<i>Trifolium ornithopodi</i>	AM087147.1:1-236	<i>Vicia cuspidata</i>
41	KX254387.1:19-258	<i>Trifolium pacificum</i>	AM087146.1:1-236	<i>Vicia dionysiensis</i>
42	AF053170.1:37-275	<i>Trifolium pallescens</i>	X17535.1:228-462	<i>Vicia faba</i>
43	DQ312116.1:37-263	<i>Trifolium patens</i>	AM087151.1:1-220	<i>Vicia grandiflora</i>
44	DQ312118.1:37-244	<i>Trifolium pauciflorum</i>	AJ851220.1:1-236	<i>Vicia hybrida</i>
45	DQ312129.1:37-244	<i>Trifolium pilulare</i>	AJ851221.1:1-236	<i>Vicia hyrcanica</i>
46	DQ312137.1:37-263	<i>Trifolium praetermiss</i>	AM087148.1:1-236	<i>Vicia lathyroides</i>
47	AF053171.1:37-270	<i>Trifolium pratense</i>	AJ851222.1:1-236	<i>Vicia lutea</i>
48	KC572140.1:59-296	<i>Trifolium repens</i>	AJ851223.1:1-236	<i>Vicia melanops</i>
49	AF053173.1:37-272	<i>Trifolium retusum</i>	AJ851224.1:1-236	<i>Vicia noeana</i>
50	AF053174.1:37-272	<i>Trifolium riograndens</i>	AM950283.1:1-236	<i>Vicia oroboides</i>
51	AF053175.1:37-272	<i>Trifolium semipilosum</i>	AJ851225.1:1-236	<i>Vicia pannonica</i>
52	DQ312165.1:37-272	<i>Trifolium stellatum</i>	AM087150.1:1-219	<i>Vicia pyrenaica</i>
53	AF053176.1:37-274	<i>Trifolium stoloniferu</i>	AM087149.1:1-220	<i>Vicia qatmensis</i>
54	AF053177.1:37-227	<i>Trifolium subterraneum</i>	AM087144.1:1-222	<i>Vicia sepium</i>
55	AF053178.1:437-658	<i>Trifolium thalii</i>	AM087145.1:1-235	<i>Vicia truncatula</i>
56	AF053179.1:37-272	<i>Trifolium uniflorum</i>	X52320.1:229-496	<i>Arabidopsis thaliana</i>
57	DQ312188.1:37-263	<i>Trifolium velenovskyi</i>	AF169230.1:30-227	<i>Oryza sativa</i>

Príloha 2. : Údaje využité pri analýze oblasti úseku ITS2 druhy z rodu *Trifolium* v prvom stĺpci, v druhom druhy z čeľade *Fabaceae* a modelové druhy *A. thaliana* a *O. sativa*.

	zdrojový kód GenBank	názov druhu	zdrojový kód GenBank	názov druhu
1	AF053143.1:437-652	<i>Trifolium albopurpure</i>	AJ320395.1:371-591	<i>Arachis hoehnei</i>
2	AF053144.1:437-649	<i>Trifolium amabile</i>	AF156675.2:601-810	<i>Arachis hypogaea</i>
3	AF053145.1:437-658	<i>Trifolium ambiguum</i>	AJ320396.1:371-589	<i>Arachis palustris</i>
4	AF053146.1:437-657	<i>Trifolium angulatum</i>	AM943374.1:432-642	<i>Astragalus alpinus</i>
5	DQ312005.1:427-638	<i>Trifolium aureum</i>	AM943378.1:432-643	<i>Astragalus exscapus</i>
6	AF053147.2:437-649	<i>Trifolium bejariense</i>	AM943381.1:433-643	<i>Astragalus frigidus</i>
7	AF053156.1:437-650	<i>Trifolium bifidum</i>	AM943384.1:432-643	<i>Astragalus glycyphyl</i>
8	AF053148.1:437-649	<i>Trifolium buckwestior</i>	AB198904.1:404-616	<i>Cicer arietinum</i>
9	DQ312208.1:434-650	<i>Trifolium calocephalum</i>	GQ246112.1:373-578	<i>Galega lindblomii</i>
10	AF053150.1:437-658	<i>Trifolium cernuum</i>	DQ311965.1:409-604	<i>Galega officinalis</i>
11	AF053151.1:435-649	<i>Trifolium cherleri</i>	AY553709.1:375-582	<i>Galega orientalis</i>
12	AF053152.1:437-649	<i>Trifolium ciliolatum</i>	AJ009787.1:407-610	<i>Glycine max</i>
13	KX254378.1:420-631	<i>Trifolium dasyphyllum</i>	JX506057.1:424-613	<i>Lathyrus clymenum</i>
14	AF053153.1:437-649	<i>Trifolium decorum</i>	JX506079.1:423-602	<i>Lathyrus hierosolymita</i>
15	DQ312047.1:428-638	<i>Trifolium dubium</i>	MF063804.1:376-582	<i>Lathyrus japonicus</i>
16	AF053154.1:437-649	<i>Trifolium eriocephalum</i>	DQ311967.1:412-619	<i>Lathyrus laevigatus</i>
17	DQ312057.1:409-604	<i>Trifolium globosum</i>	JX506119.1:428-617	<i>Lathyrus palustris</i>
18	AF053155.1:437-658	<i>Trifolium glomeratum</i>	JX506120.1:424-554	<i>Lathyrus polymorphus</i>
19	KX254380.1:419-630	<i>Trifolium gordejevii</i>	JX506151.1:424-602	<i>Lathyrus tukhtensis</i>
20	DQ312062.1:428-638	<i>Trifolium grandiflorum</i>	JX506155.1:424-613	<i>Lathyrus vernus</i>
21	AF053157.1:437-650	<i>Trifolium haydenii</i>	AJ441321.1:441-652	<i>Lens culinaris</i>

22	AF053158.1:439-658	<i>Trifolium hirtum</i>	AJ441069.1:441-651	<i>Lens ervoides</i>
23	AF053159.1:437-649	<i>Trifolium hybridum</i>	AJ441067.1:441-652	<i>Lens lamottei</i>
24	AF053160.1:435-649	<i>Trifolium incarnatum</i>	AJ441070.1:443-654	<i>Lens nigricans</i>
25	DQ312069.1:409-604	<i>Trifolium israeliticum</i>	AJ441064.1:441-652	<i>Lens odemensis</i>
26	AF053161.1:439-660	<i>Trifolium isthmocarpum</i>	AJ441062.1:441-652	<i>Lens tomentosus</i>
27	KX254379.1:419-632	<i>Trifolium kingii</i>	Z99232.1:10-226	<i>Medicago lupulina</i>
28	AF053162.1:437-649	<i>Trifolium longipes</i>	DQ311981.1:442-656	<i>Medicago polymorpha</i>
29	KX254385.1:419-630	<i>Trifolium lupinaster</i>	KC333392.1:369-575	<i>Medicago ruthenica</i>
30	KX254372.1:419-630	<i>Trifolium macrocephalum</i>	GQ488541.1:367-574	<i>Medicago sativa</i>
31	AF053164.1:437-649	<i>Trifolium mattirolian</i>	DQ311984.1:439-658	<i>Melilotus alba</i>
32	DQ312090.1:409-604	<i>Trifolium meduseum</i>	KY968966.1:491-709	<i>Melilotus officinalis</i>
33	AF053165.1:437-650	<i>Trifolium michelianum</i>	GQ488519.1:369-579	<i>Ononis polyphylla</i>
34	AF053166.1:437-657	<i>Trifolium montanum</i>	GQ488524.1:329-537	<i>Ononis spinosa</i>
35	DQ312098.1:437-650	<i>Trifolium multinerve</i>	GQ488529.1:369-576	<i>Ononis tournefortii</i>
36	KX254374.1:419-630	<i>Trifolium nanum</i>	GQ488536.1:354-564	<i>Ononis viscosa</i>
37	KX254377.1:419-630	<i>Trifolium neurophyllum</i>	GQ246124.1:382-594	<i>Parochetus africanus</i>
38	AF053167.1:437-658	<i>Trifolium nigrescens</i>	DQ311987.1:434-648	<i>Parochetus communis</i>
39	AF053168.1:436-657	<i>Trifolium occidentale</i>	AJ288231.1:10-213	<i>Trigonella spicata</i>
40	AF053169.1:437-650	<i>Trifolium ornithopodi</i>	AJ288204.1:8-241	<i>Trigonella kotschyi</i>
41	KX254387.1:419-630	<i>Trifolium pacificum</i>	AM087147.1:401-609	<i>Vicia cuspidata</i>
42	AF053170.1:440-655	<i>Trifolium pallescens</i>	AM087146.1:401-609	<i>Vicia dionysiensis</i>
43	DQ312116.1:428-638	<i>Trifolium patens</i>	X17535.1:627-834	<i>Vicia faba</i>
44	DQ312118.1:409-604	<i>Trifolium pauciflorum</i>	AM087151.1:385-593	<i>Vicia grandiflora</i>
45	DQ312129.1:409-604	<i>Trifolium pilulare</i>	AJ851220.1:401-609	<i>Vicia hybrida</i>
46	DQ312137.1:428-638	<i>Trifolium praetermiss</i>	AJ851221.1:401-609	<i>Vicia hyrcanica</i>
47	AF053171.1:435-649	<i>Trifolium pratense</i>	AM087148.1:401-609	<i>Vicia lathyroides</i>
48	KC572140.1:452-688	<i>Trifolium repens</i>	AJ851222.1:401-609	<i>Vicia lutea</i>
49	AF053173.1:437-658	<i>Trifolium retusum</i>	AJ851223.1:401-609	<i>Vicia melanops</i>
50	AF053174.1:437-649	<i>Trifolium riograndens</i>	AJ851224.1:401-609	<i>Vicia noeana</i>
51	AF053175.1:437-649	<i>Trifolium semipilosum</i>	AM950283.1:401-609	<i>Vicia oroboides</i>
52	DQ312165.1:437-650	<i>Trifolium stellatum</i>	AJ851225.1:401-605	<i>Vicia pannonica</i>
53	AF053176.1:439-651	<i>Trifolium stoloniferu</i>	AM087150.1:384-592	<i>Vicia pyrenaica</i>
54	AF053177.1:392-607	<i>Trifolium subterraneum</i>	AM087149.1:385-592	<i>Vicia qatmensis</i>
55	AF053178.1:437-658	<i>Trifolium thalii</i>	AM087144.1:387-595	<i>Vicia sepium</i>
56	AF053179.1:437-651	<i>Trifolium uniflorum</i>	AM087145.1:400-596	<i>Vicia truncatula</i>
57	DQ312188.1:428-638	<i>Trifolium velenovskyi</i>	X52320.1:661-847	<i>Arabidopsis thaliana</i>
			AF169230.1:395-609	<i>Oryza sativa</i>

Príloha 3.: Údaje využité pri analýze oblasti kódujúceho génu 5S druhy z čeľade *Fabaceae* a modelové druhy *A. thaliana* a *O. sativa*.

	zdrojový kód GenBank	názov druhu
1	AY260161.1	<i>Echinosophora koreensis</i>
2	Z93433.1:62-181	<i>Lupinus luteus</i>
3	KF435091.1:559-677	<i>Medicago arborea</i>
4	KF435090.1:174-292	<i>Medicago citrina</i>

5	KF435096.1:872-990	<i>Medicago strasseri</i>
6	HE797891.1	<i>Trifolium alexandrinum</i>
7	HE797893.1	<i>Trifolium pratense</i>
8	AF072692.1:240-357	<i>Trifolium repens</i>
9	HE797894.1	<i>Trifolium squarrosum</i>
10	HE797898.1	<i>Trifolium subterraneum</i> subsp. <i>brachycalycinum</i>
11	HE797899.1	<i>Trifolium subterraneum</i> subsp. <i>subterraneum</i>
12	HE797901.1	<i>Trifolium subterraneum</i> subsp. <i>yannanicum</i>
13	X06845.1	<i>Vicia faba</i>
14	AY884259.1:1-118	<i>Vigna glabrescens</i>
15	AY884261.1:1-118	<i>Vigna minima</i>
16	M18861.1:35-152	<i>Vigna radiata</i>
17	AY884271.1:1-118	<i>Vigna radiata</i> var. <i>sublobata</i>
18	AY896865.1:1-118	<i>Vigna umbellata</i>
19	AY884266.1:1-118	<i>Vigna mungo</i>
20	AY884274.1:1-118	<i>Vigna trilobata</i>
21	AJ307348.2:42-162	<i>Arabidopsis thaliana</i>
22	KM036302.1:1-119	<i>Oryza sativa</i>

Príloha 4.: údaje využité pri analýze oblasti NTS neprepisovaného vnútorného medzerníku druhy z čeľade *Fabaceae* a modelové druhy *A. thaliana* a *O. sativa*.

	zdrojový kód GenBank	názov druhu
1	AF359585.1	<i>Astragalus austrosibiricus</i>
2	AF239713.1	<i>Astragalus hoantchy</i>
3	AF239714.1	<i>Astragalus lehmannianus</i>
4	AF239711.1	<i>Astragalus membranaceus</i>
5	AF239715.1	<i>Hedysarum polybotrys</i>
6	Z93433.1:182-342	<i>Lupinus luteus</i>
7	KF435091.1:678-874	<i>Medicago arborea</i>
8	KF435090.1:293-419	<i>Medicago citrina</i>
9	KF435099.1:362-490	<i>Medicago strasseri</i>
10	AY499178.1:92-250	<i>Pisum sativum</i>
11	HE797875.1	<i>Trifolium pratense</i>
12	AF072692.1:358-572	<i>Trifolium repens</i>
13	AM258987.1:41-250	<i>Trifolium subterraneum</i> subsp. <i>brachycalycinum</i>
14	AM258986.1:41-250	<i>Trifolium subterraneum</i> subsp. <i>subterraneum</i>
15	AM258988.1	<i>Trifolium subterraneum</i> subsp. <i>yannanicum</i>
16	JF430414.1:90-308	<i>Vigna angularis</i>
17	JF430415.1:90-299	<i>Vigna nakashimae</i>
18	JF430418.1:90-300	<i>Vigna umbellata</i>
19	JF430419.1:90-310	<i>Vigna unguiculata</i>
20	JF430420.1:90-308	<i>Vigna vexillata</i>
21	AJ307361.1:10-387	<i>Arabidopsis thaliana</i>
22	KM036302.1:120-322	<i>Oryza sativa</i>