

Mendelova univerzita v Brně

Agronomická fakulta

Ústav biologie rostlin



**Identifikace genů vázaných na pohlavní chromozomy
u *Silene latifolia* a *Silene dioica***

Diplomová práce

Vedoucí práce:

RNDr. Roman Hobza, Ph.D.

Vypracoval:

Bc. Zuzana Machálková

Brno 2017

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem práci: **Identifikace genů vázaných na pohlavní chromozomy u *Silene latifolia* a *Silene dioica*** vypracoval/a samostatně a veškeré použité prameny a informace uvádím v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách ve znění pozdějších předpisů a v souladu s platnou *Směrnicí o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací*.

Jsem si vědom/a, že se na moji práci vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., autorský zákon, a že Mendelova univerzita v Brně má právo na uzavření licenční smlouvy a užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona.

Dále se zavazuji, že před sepsáním licenční smlouvy o využití díla jinou osobou (subjektem) si vyžádám písemné stanovisko univerzity, že předmětná licenční smlouva není v rozporu s oprávněnými zájmy univerzity, a zavazuji se uhradit případný příspěvek na úhradu nákladů spojených se vznikem díla, a to až do jejich skutečné výše.

V Brně dne:.....

.....
podpis

PODĚKOVÁNÍ

Zde bych ráda poděkovala svému školiteli RNDr. Romanu Hobzovi, Ph. D za nedocenitelné rady a pomoc při zpracování diplomové práce.

Jeden z mých největších díků patří mému konzultantovi Ing. Václavu Bačovskému za obrovskou pomoc, ochotu a trpělivost, kterou projevoval po celou dobu zpracovávání mé diplomové práce.

Další z velkých díků patří doktoru Jose Rodriguezovi za pomoc a projevení nebývalé trpělivosti při zpracování expresních analýz a bez jehož přítomnosti by tato část vůbec nemohla vzniknout.

Na závěr nesmím opomenout poděkovat všem členům oddělení Vývojové genetiky rostlin za menší i větší pomoc a rady, které byli vždy ochotni se mnou sdílet.

ABSTRAKT

Silene latifolia a *Silene dioica* jsou blízce příbuzné dvoudomé druhy rostlin s odděleným pohlavím, které je determinováno přítomností pohlavních chromozomů X a Y. Pohlavní chromozomy *S. latifolia* a *S. dioica* jsou mladší (10-20 milionů let) než u savců (cca 200 milionů let). Tyto dva druhy jsou proto důležitým modelem pro studium časných stádií evoluce pohlavních chromozomů. V této práci byla analyzována skupina genů vázaných na pohlavní chromozomy (*Sl3*, *Sl7*, *DD44*). Tyto geny byly *de-novo* izolovány pro *S. dioica* pomocí screenování BACové knihovny. Společně pro *S. latifolia* a *S. dioica* byly následně metodami Real-Time PCR a HRM porovnány exprese těchto genů v různých pletivech. Metodou „low-copy“ FISH (fluorescenční *in situ* hybridizace) vytvořena fyzická mapa pro jednotlivé geny. Tato mapa je doposud nejpodrobnější fyzickou mapou, vytvořenou pro blízce příbuzné druhy rodu *Silene*.

Klíčová slova: evoluce, BAC knihovny, Real-Time PCR, HRM, low-copy FISH

ABSTRACT

Silene latifolia and *Silene dioica* are closely related dioecious plant species where sex is determined by the presence of sex chromosomes, X and Y. The sex chromosomes of *S. latifolia* and *S. dioica* are younger (10-20 million years) than in mammals (about 200 million years). These two species are thus important models for the study of early stages of sex chromosomes evolution. In this work a group of genes linked to sex chromosomes (*Sl3*, *Sl7*, *DD44*) was analyzed. These genes were *de-novo* isolated from *S. dioica* by screening of the BAC library. The expression of these genes in different tissues was compared using Real-Time PCR and HRM in *S. latifolia* and *S. dioica*. Using the "low-copy" FISH (fluorescence *in situ* hybridization) method, a physical map for individual genes was created. This map is the most detailed physical map created for closely related *Silene* species.

Key words: evolution, BAC library, Real-Time PCR, HRM, low-copy FISH

Obsah

1	ÚVOD.....	8
2	LITERÁRNÍ PŘEHLED	9
2.1	Dvoudomost	9
2.2	Determinace pohlaví	11
2.3	Pohlavní chromozomy	12
2.3.1	Evoluce pohlavních chromozomů	12
2.4	Rostlinné modely pro studium vývoje pohlaví	15
2.4.1	<i>Diospyros lotus</i> L.....	15
2.4.2	<i>Cucumis melo</i> L.	16
2.4.3	<i>Carica papaya</i> L.	16
2.4.4	<i>Populus trichocarpa</i> L.....	16
2.4.5	Rod: <i>Rumex</i>	17
2.4.6	Rod: <i>Silene</i>	17
3	CÍLE PRÁCE.....	22
4	Materiál a metody	23
4.1	Materiál	23
4.2	Metody	23
4.2.1	Izolace DNA	23
4.2.2	PCR amplifikace	24
4.2.3	Horizontální elektroforéza	25
4.2.4	Izolace PCR produktů z agarózového gelu.....	25
4.2.5	Screening BAC knihovny pomocí radioaktivně značené sondy.....	25
4.2.6	Izolace RNA	27

4.2.7	Přepis RNA do cDNA – reverzní transkripce.....	28
4.2.8	Klonování.....	28
4.2.9	Sekvenace	30
4.2.10	RT-PCR a HRM.....	32
4.2.11	Fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace – FISH.....	34
5	VÝSLEDKY	39
5.1	Identifikace BAC klonů vybraných rostlin s markery vázanými na pohlaví... 39	39
5.2	Expresní analýzy	39
5.2.1	Vyhodnocení sekvenace	39
5.2.2	Vyhodnocení referenčních genů	41
5.2.3	Vyhodnocení exprese studovaných genů v květu, poupěti a listu pro <i>S. latifolia</i> a <i>S. dioica</i>	41
5.2.4	HRM	47
5.3	FISH	53
5.3.1	Vyhodnocení techniky FISH pro <i>S. latifolia</i> a <i>S. dioica</i>	53
5.3.2	Srovnání fyzikálních map <i>S. latifolia</i> a <i>S. dioica</i>	55
6	DISKUZE	56
6.1	Identifikace BAC klonů genů <i>DD44</i> , <i>Sl3</i> , <i>Sl7</i> pro <i>S. dioica</i>	56
6.2	Expresní analýzy <i>DD44</i> , <i>Sl3</i> , <i>Sl7</i>	56
6.3	FISH	58
7	ZÁVĚR	59
8	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	60
9	SEZNAM OBRÁZKU A TABULEK	68
10	SEZNAM ZKRATEK	70

1 ÚVOD

Na rozdíl od živočichů, je oddělené pohlaví u rostlin velmi vzácné. Pouze 6% krytosemenných rostlin je dvoudomých. Přesto z tohoto malého množství nacházíme druhy, které jsou agronomicky velmi významné. Mezi nejvýznamnější zástupce patří konopí, chmel nebo topol, ale i exotičtější zástupci jako kaki, papája nebo datlovník. Pochopení determinace pohlaví a utváření samčích a samičích pohlavních orgánů by mohlo být tedy přínosem i pro zemědělství po celém světě.

S. latifolia je častým modelem pro studium dvoudomosti a evoluce pohlavních chromozomů, díky jejímu rychlému růstu a nenáročnosti na prostor. Vhodným modelem pro studium je *S. latifolia* díky pohlavním chromozomům. Stejně jako u člověka se nachází u *S. latifolia* samčí heterogametický systém určující pohlaví, tedy chromozomy X a Y. Stáří pohlavních chromozomů u *S. latifolia* se odhaduje zhruba na 20 miliónů let, zatímco u savců až na 200 milionů let. To znamená, že *S. latifolia* je v časném evolučním stádiu a je proto jedním z vhodných modelů pro studium evoluce pohlavních chromozomů.

V této práci jsou studovány dva blízce příbuzné druhy rodu *Silene*, *S. latifolia* a *S. dioica*. V dnešní době převažují studie založené na porovnávání obrovských souborů sekvenačních dat. Tato práce se zaměřila na charakterizaci genů vázaných na pohlaví. Byly vybrány tři geny: *DD44*, *SI3* a *SI7*. Tyto geny byly nedávno identifikovány u *S. latifolia*, žádná ze studií se však nezabývá hlubší analýzou těchto genů u *S. dioica*. Všechny tři geny byly podrobeny expresním analýzám RT-PCR pro zjištění exprese těchto genů v samčím a samičím pohlaví. Exprese samčí alely (Y) a samičí alely (X) pak byla studována u samčích rostlin obou druhů analýzou HRM. Technika Tyr-FISH byla použita pro lokalizaci těchto genů na chromozomech X a Y u obou druhů. Byla vytvořena fyzická mapa a byla porovnána lokalizace genů mezi výše zmíněnými druhy.

2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 Dvoudomost

Dvoudomost (dioecie), která je ekvivalentem gonochorismu v říši živočichů, je charakterizována samčí a samičí funkcí u odlišných jedinců (RENNER, RICKLEFS, 1995). Znamená to tedy, že dvoudomý rostlinný druh má jedince pouze se samčími pohlavními orgány nebo se samičími pohlavními orgány. Na rozdíl od vyšších živočichů je u rostlin oddělené pohlaví poměrně vzácné (KÄFER, MARAIS, PANNELL, 2017). Pouze asi 6 % druhů krytosemenných rostlin (to je přibližně 14 620 z 240 000) je dvoudomých (RENNER, RICKLEFS, 1995). Předpokládáme, že se dvoudomost vyvinula nezávisle u několika oboupohlavných a jednodomých rostlinných druhů prostřednictvím série nezávislých mutací samčího a samičího typu, které se v průběhu evoluce staly vázané na pohlavní chromozomy (GOLENBERG, WEST, 2013) (Tab. 1). Poměrně velký počet studií je zaměřen na výzkum evoluce dvoudomosti, méně studií se však již zabývá tím, proč je oddělené pohlaví v říši rostlin tak vzácné. Dřívější fylogenetické a teoretické studie naznačily, že dvoudomost může být slepou uličkou evoluce. Nicméně, novější výzkumy naznačují, že fylogenetická podpora pro tuto hypotézu lze připsat metodologickému zkreslení, a že neexistuje žádný důkaz pro redukci diverzifikace dvoudomých rostlin (KÄFER *et al.*, 2017). V práci KÄFER *et al.* (2017) se domnívají, že důvodem méně častého výskytu dvoudomých rostlin je snadnější reverze k oboupohlavnosti.

Je známo mnoho studií, které se zabývají výzkumem dvoudomosti kvůli možnému agronomickému využití. Výzkumy se zabývají převážně hledáním vhodných genetických markerů pro rozeznání pohlaví rostlin ještě v počátečním vývojovém stádiu. Například palma *Phoenix dactylifera* L., využívána pro produkci datlů, je jedním z takových příkladů. Datle produkují pouze samičí rostliny, a proto jsou samčí rostliny nežádoucí. Časové rozmezí, než rostlina vytvoří květy, může trvat až 30 let, a proto zde metody molekulární biologie nacházejí své nezastupitelné místo právě díky možnosti rozeznat pohlaví již v raných stádiích vývoje (CHERIF, *et al.*, 2013). Vhodným příkladem je také konopí (*Cannabis sativa* L.), jehož průmyslové využití se stále rozšiřuje ve zdravotnictví, potravinářství, pro získávání konopných vláken a také jako bioremediační rostlina. V případě druhu *C. sativa* je možné dokonce rozlišit dvoudomé a jednodomé kultivary (FAUX *et al.*, 2016; VERGARA *et al.*, 2017).

Tab. 1: Přehled studovaných dvoudomých rostlin (VYSKOT, HOBZA, 2004).

Stručný seznam dvoudomých druhů a jejich taxonomické začlenění.

System. skupina	Čeleď	Druhy
<i>Bryophyta</i> (mechorosty)	<i>Hepaticaceae</i> (játrovky)	<i>Merchantia polymorpha</i> (Porostnice mnohotvárná)
<i>Coniferophyta</i> (nahosemenné)	<i>Ginkgoaceae</i> (jinanovité)	<i>Ginkgo biloba</i> (jinan dvoulaločný)
<i>Magnoliopsida</i> (krytosemenné, dvouděložné)	<i>Caryophyllaceae</i> (hvozdíkovité)	<i>Silene latifolia</i> (silenka širokolistá), <i>Silene dioica</i> (silenka dvoudomá), <i>Silene otites</i> (silenka uškátá), <i>Silene diclinis</i>
	<i>Polygonaceae</i> (rdesnovité)	<i>Rumex acetosa</i> (šťovík kyselý), <i>Rumex thyrsiflorus</i> (šťovík rozvětvený), <i>Rumex rothschildianus</i> , <i>Rumex hastatulus</i>
	<i>Cannabaceae</i> (konopovité)	<i>Humulus lupulus</i> (chmel otáčivý), <i>Humulus japonicus</i> , <i>Cannabis sativa</i> (konopí seté)
	<i>Euphorbiaceae</i> (pryšcovité)	<i>Mercurialis annua</i> (bažanka roční)
	<i>Chenopodiaceae</i> (merlíkovité)	<i>Atriplex garrettii</i> , <i>Spinacia oleracea</i> (špenát setý)
	<i>Actinidiaceae</i> (Aktinidiovité)	<i>Actinidia deliciosa</i> (aktinidie lahodná)
	<i>Caricaceae</i> (Papájovité)	<i>Carica papaya</i> (papája obecná)
	<i>Loranthaceae</i> (ochmetovité)	<i>Viscum fisheri</i>
	<i>Rosaceae</i> (růžovité)	<i>Fragaria elatior</i> (jahodník truskavec)
	<i>Salicaceae</i> (vrbovité)	<i>Salix viminalis</i> (vrba košíkářská), <i>Populus tremola</i> (topol osika)
<i>Liliopsida</i> krytosemenné dvouděložné	<i>Asparagaceae</i> (chřestovité)	<i>Asparagus officinalis</i> (chřest lékařský)
	<i>Dioscoreaceae</i> (smlidinovité)	<i>Dioscorea tokoro</i>

2.2 Determinace pohlaví

Určení pohlaví je důležitou událostí v životním cyklu všech dvoudomých rostlin. Jedná se o proces, kterým vznikají jednopohlavní květy. To má za následek navýšení četnosti křížení a tím zvýšení genetické variability, což může být evolučně výhodné (MARTIN *et al.*, 2009). Na základě mnoha studií předpokládáme, že se jedná o složitý proces řízen genetickými a epigenetickými mechanismy, ovlivněn růstovými regulátory, prostředím a dalšími vlivy (JUAREZ, BANKS, 1998). Ačkoli je obecně přijímáno, že se dvoudomé rostliny vyvinuly z předků s oboupohlavními květy, přesné mechanismy stále nejsou úplně známy (MONÉGER, 2007). Studium aspektů určování pohlaví je stejně důležité ve vývojové a evoluční biologii, jako například v ekologii. Vzhledem k obrovskému významu pro organismy se může zdát, že tento systém bude vysoce konzervativní. Provedené studie však ukazují, že mechanismus determinující pohlaví a vývoj genů je překvapivě labilní (CHARLESWORTH, MANK, 2010). Právě z důvodu několikrát opakovaného nezávislého vývoje dvoudomých rostlin z hermafroditních předků, jsou mechanismy řízení pohlaví extrémně rozdílné. Ve všech druzích je pohlaví nejsilněji řízeno genotypem, ovšem nacházíme zde obrovské rozpětí mechanismů od kontroly jednoho jediného lokusu po složitě provázané mechanismy vyžadující velký počet genů často na více chromozomech. Rostlinné hormony mají také vliv na výsledné pohlaví, ovšem jejich působení se liší druh od druhu (GRANT *et al.*, 1994). Stejně hormony, které reagují na stresové podmínky, mohou působit i na geny ovlivňující vývoj reprodukčních orgánů. Hormony tak působí jako zapínače a vypínače regulačních drah. V důsledku odlišných koncentrací tak mohou ovlivňovat celé vývojové dráhy, což může vést k odlišnostem u jedinců téhož druhu. V případě mutací genů pro rostlinné regulátory, které způsobí nadprodukcí nebo naopak velmi nízkou produkci těchto látek, může ve výsledku dojít i k selekci jednoho pohlaví v rámci populace. Vlivem hormonů se zabývalo velké množství studií, jako jeden z příkladů je uváděn vliv auxinu u špenátu (*Spinacia oleracea* L.) a opuncie (*Opuntia stenopetala* Engelm.), který stimuluje tvorbu převážně samičích květů, ale u bažanky (*Mercurialis annua* L.) či luštěnice (*Cleome spinosa* Jacq.) je pozorován spíše opačný efekt a tvoří se samčí květy (GOLENBERG, WEST, 2013).

Nejvíce specializovaným mechanismem determinace pohlaví, který je popsán, je výskyt pohlavních chromozomů, tj. XY a ZW. V přírodě nacházíme tři základní typy řízení

určení pohlaví chromozomy. Nám nejznámější a nejbližší je samčí heterogametický systém, tedy XY, známý především u savců, ale jak již bylo zmíněno i u rodu *Silene*. Dále samičí heterogametický systém – ZW, také označován jako ptačí typ a nakonec nejméně známý determinace pomocí haploidní fáze, někdy nazýván jako UV systém, který můžeme najít u některých řas a mechů. Tyto systémy mají mnoho společných vlastností, existují však mezi nimi rozdíly, které mají hluboké evoluční a genomické důsledky (BA-CHTROG, 2011).

2.3 Pohlavní chromozomy

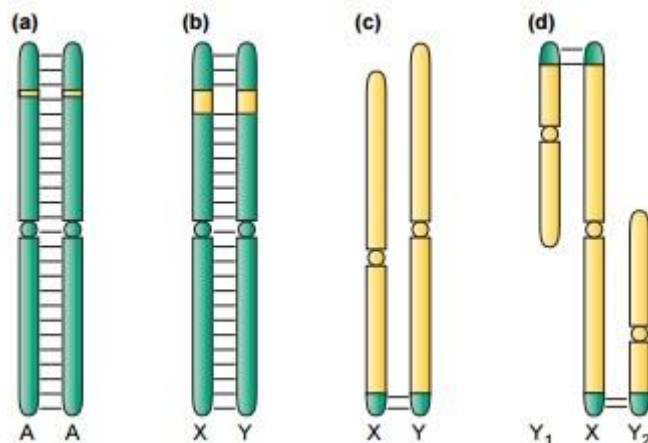
Pohlaví u dvoudomých rostlin je řízeno přítomností pohlavních chromozomů. Pohlavní chromozomy reprezentují oblast genomu se sníženou schopností rekombinace (HOBZA *et al.*, 2015). Zajišťují tak stabilní oddělení pohlavních fenotypů tím, že brání rekombinaci specifických pohlavně vázaných genů. Ačkoli existuje celá řada studií zabývajících se pohlavně vázanými geny, geny pohlavní determinace nebyly u dvoudomých druhů doposud izolovány (ARYAL, MING, 2014).

2.3.1 Evoluce pohlavních chromozomů

Strukturní a funkční divergence pohlavních chromozomů se v průběhu evoluce objevila u mnoha zvířat, stejně tak i u některých rostlin (HOBZA *et al.*, 2015). Obecně přijímaná hypotéza o vzniku pohlavních chromozomů tvrdí, že se pravděpodobně vyvinuly z autozomů, které obsahovaly pohlavně specifické geny. Prvním krokem v evoluci pohlavních chromozomů byly pravděpodobně dvě mutace, první pro samčí sterilitu a druhá pro samičí sterilitu. Tyto mutace musely být vázány na jeden autozomální pár, aby se staly stabilními. Dále došlo k selekci alel výhodných pro samčí pohlaví a nevýhodných pro samičí na nově vznikajícím chromozomu Y a naopak na formujícím se chromozomu X (podobně tak i u ZW). Dle dosavadních studií může být dobrým příkladem *Carica papaya* L., u níž se na základě provedených studií předpokládá, že její pohlavní chromozomy jsou právě v tomto stádiu evoluce. Předpokládá se, že na nově se tvořícím chromozomu Y (nebo W) došlo k omezení rekombinace nejdříve v malých oblastech okolo lokusu určujícího pohlaví. Postupnou akumulací organelové DNA a některých repetitivních sekvencí jako jsou transponovatelné elementy, tandemové repetice (satelity a mikrosatelity), začalo docházet k rozšíření nerekombinující oblasti po celé délce chromozomu.

Tento jev je dobře popsán například u lidí, kde na pohlavních chromozomech jsou homologní části velmi malé. Tyto oblasti se nazývají jako PAR oblasti z anglického „pseudoautosomal region“ neboli pseudoautozomální oblast (HOBZA *et al.*, 2015; LI *et al.*, 2016; RICE, 1996; ROSS *et al.*, 2005).

Akumulace repetitivních sekvencí má tedy za následek zvětšování chromozomu Y a potlačení rekombinace s původně homologním X chromozomem. V této fázi evoluce se nachází právě již zmíněná silenka širokolistá a silenka dvoudomá, kde chromozom Y je rozeznatelně větší než ostatní chromozomy. A zjevně právě ztráta rekombinace má za následek počátek postupné degenerace, ztráty kódujících i nekódujících oblastí, chromozomu Y. Dochází tedy k výraznému zmenšení chromozomu Y tak jak je známo u savců (BERGERO, CHARLESWORTH, 2011). Obrázek 1 znázorňuje různá evoluční stádia pohlavních chromozomů u vybraných rostlinných druhů. Obrázek 2 schématicky shrnuje evoluci pohlavních chromozomů X a Y.

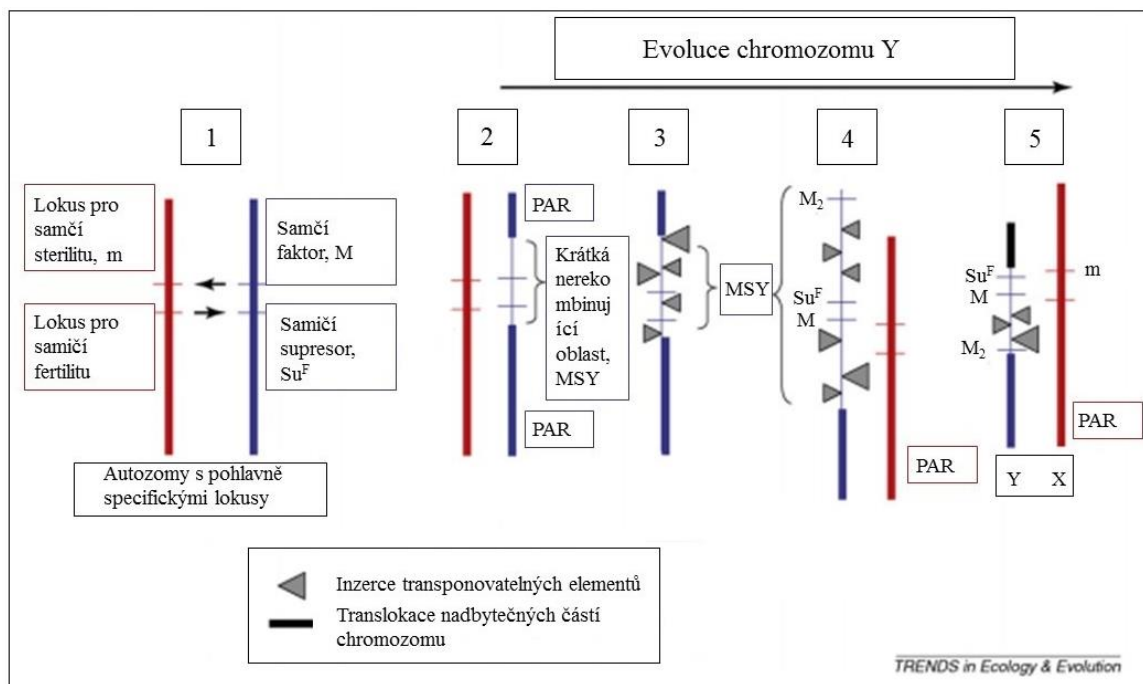


Obr. 1: Hlavní stádia evoluce pohlavních chromozomů

Obrázek znázorňuje čtyři hlavní fáze evoluce. (a) Tykvice (Ecballium elaterium): na jednom páru autozomů lokusy pro řízení pohlaví (vyznačeno žlutě). (b) Papája (Carica papaya): Krátké nerekombinující oblasti v blízkosti lokusu pro determinaci pohlaví na nově se formujícím chromozomu Y. (c) Silenka (Silene latifolia): má již Y větší než X, téměř po celém chromozomu Y je již potlačena rekombinace, pouze krátká rekombinantní PAR oblast na konci chromozomu (i zeleně). Y je pravděpodobně stále euchromatický. (d) Šťovík (Rumex acetosa): zřejmě v důsledku počínající degenerace došlo k „rozlomení“ chromozomu Y na dvě části. I zde nacházíme PAR oblasti, ovšem Y chromozomy jsou heterochromatické (VYSKOT, HOBZA, 2004).

Repetitivní sekvence tedy pravděpodobně mají několikanásobnou funkci během evoluce pohlavních chromozomů. Způsobují potlačení rekombinace vedoucí ke strukturním rozdílům mezi chromozomy X a Y. Degradace chromozomu Y a ztráta funkčních genů zapříčiňují další šíření heterochromatinu po Y chromozomu (LI *et al.*, 2016).

Ve studii LI *et al.* (2016) předpokládají, že repetitivní sekvence jsou zapojeny do evoluce pohlavních chromozomů zejména díky epigenetickým procesům, jako jsou například methylace DNA a histonů. V práci GRANT *et al.* (1994) byly nalezeny repetitivní sekvence na chromozomu Y u silenky. Práce CERMAK *et al.* (2008) ukazuje unikátní vzor distribuce repetice na chromozomu Y, kde jsou některé specifické repetice nahromaděny ve velkém množství, zatímco jiné zcela chybí a jsou přítomny na jiných chromozomech (CERMAK *et al.*, 2008). Odhaduje se, že pohlavní chromozomy u *S. latifolia* se vyvinuly přibližně před 10 miliony let (PAPADOPULOS *et al.*, 2015). Je však nutné zdůraznit, že nejen akumulace různých elementů formuje nové pohlavní chromozomy. V práci HOBZA *et al.* (2015) je shrnut vliv samotného mechanismu transpozice, „skluz“ DNA polymerázy či nerovnoměrný crossing-over jako opozitní mechanismy k předchozí akumulaci repetitivních sekvencí. Intenzita těchto jevů se také liší v nerekombinujících a rekombinujících oblastech genomu.



Obr. 2: Schématický náčrt jednotlivých kroků evoluce pohlavních chromozomů

V kroku 1 je znázorněn pár homologních autozomů s krátkou oblastí obsahující lokusy specifické pro pohlaví. V kroku 2 se vytváří krátká nerekombinující oblast na chromozomu Y. Formuje se heterologní pár chromozomů s krátkou oblastí specifickou pro samčí pohlaví (MSY – male specific Y), zbylá oblast chromozomu je stále homologní k X. Krok 3 a 4 zahrnuje zvětšení a přestavbu nerekombinující oblasti na chromozomu Y, způsobující odlišnost od chromozomu X. Přidání samčích funkčních genů způsobuje další potlačení rekombinace. V 5. kroku, vlivem formace pseudogenů, inserce a akumulace repetitivních sekvencí dochází k velké ztrátě genetického materiálu, vzniku dávkové kompenzace a přestavbě chromozomu Y, vedoucí k redukci velikosti Y a celkové ztrátě mnoha genů nebo jejich funkce. Modrou barvou je znázorněn formující se chromozom Y a červenou barvou chromozom X (BERGERO, 2009).

2.4 Rostlinné modely pro studium vývoje pohlaví

2.4.1 *Diospyros lotus* L.

Zajímavým modelem je tomel obecný, blízký příbuzný tomelu japonskému (*Diosporus kaki*), jehož plody jsou k dostání i v České republice pod obchodním názvem kaki. Jde o dvoudomou rostlinu s heterogametickým samčím genotypem determinace pohlaví (XY chromozomy). Na základě provedených studií je předpokládáno, že pohlaví je řízeno jediným lokusem. Předpokládá se, že řízení pohlaví tomelu obecného a tomelu

japonského je velmi podobné, a proto nalezení vhodných markerů pro rozlišení pohlaví před tím než rostlina vykvete, by mohlo mít agronomický význam (AKAGI *et al.*, 2014).

2.4.2 *Cucumis melo* L.

Dobře známý meloun cukrový je další z druhů využitelných pro studium procesů řídících vývoj pohlaví. Jde o jeden z druhů, u kterého bylo prokázáno, že produkce fytohormonů, konkrétně ethylenu, má přímý vliv na výsledné pohlaví u ovlivněných jedinců. *Cucumis melo* je gynoecická rostlina, která za normálních podmínek produkuje pouze samičí květy. Pokud je však pěstována v podmínkách zajišťující nízký tlak okolního vzduchu a odstranění endogenních plynů pomocí difúze, rostlina tvoří dokonalé obouhlavní květy. Aplikace inhibitorů tvorby ethylenu zapříčinila tvorbu samčích květů. Jedná se tedy o zajímavý model pro studium ovlivnění determinace pohlaví růstovými regulátory (BYERS *et al.*, 1972).

2.4.3 *Carica papaya* L.

Jedná se o tropický ovocný strom s třemi typy pohlaví – samčím, samičím a obouhlavním. *Carica papaya* obsahuje ve svém genomu XY pohlavní chromozomy a předpokládá se, že je v časném evolučním stádiu. Krátké nerekombinující oblasti byly identifikovány v blízkosti lokusu pro determinaci pohlaví (Obr. 3). Samčí a hermafroditní pohlaví je kontrolováno dvěma různými oblastmi chromozomu Y. Pro samčí genotyp je využíváno velké písmeno Y, hermafroditní typ se pak označuje jako velké písmeno Y s horním indexem malé h (Y^h). Velké množství informací o genetické podstatě papáji bylo popsáno až v několika posledních letech. Relativně krátký životní cyklus, malá velikost genomu, snadno dostupné genetické a genomické zdroje, činí papáju výborným modelem pro studium determinace pohlaví (ARYAL, MING, 2014).

2.4.4 *Populus trichocarpa* L.

Díky nedávnému sekvenování genomu topolu chlupatoplodého a stanovení nových cílů v oblasti genetiky, genomiky a biochemie, nabízí topol nové možnosti uplatnění v oblasti molekulární biologie, které nemohou poskytnout klasické modely jako je huseňiček (*Arabidopsis thaliana* L.) a rýže (*Oryza sativa* L.). Topol je využíván již delší dobu pro výzkumy díky svým zjevným vlastnostem jako produkce dřeva, dlouholetého růstu a sezónností. Je ovšem třeba zmínit, že je vhodným modelem i pro studium kvetení, interakcí způsobených biotickým stresem a adaptace na různé podmínky. V našem případě

je třeba zmínit, že se jedná o dvoudomou vytrvalou rostlinu, u níž dochází k opylení a přenosu pylu větrem, což nabízí nové možnosti a výzvy v oblasti výzkumu (JANSSON, DOUGLAS, 2007).

2.4.5 Rod: *Rumex*

Determinace pohlaví u *Rumex acetosa* L., který má samčí heterogametický systém a dva chromozomy Y, není řízena aktivním chromozomem Y, ale poměrem chromozomu X a autozomů (MANZANO *et al.*, 2016). *Rumex hastalatus* L., pochází ze Severní Ameriky, má dokonce dvě chromozomální rasy. Rasa Texas se vyznačuje jednoduchou XY/XX determinací, rasa Severní Karolína je ovšem podobná *R. acetosa* a v samčím karyotypu se nachází dva chromozomy Y (GRABOWSKA-JOACHIMIAK *et al.*, 2014). *Rumex acetosella* má XY systém.

Výše popsané rozdíly u blízce příbuzných druhů v rámci jednoho rodu nabízejí jedinečnou možnost studia evoluce pohlavních chromozomů.

2.4.6 Rod: *Silene*

Rod *Silene* zahrnuje více než 700 druhů (MAMADALIEVA *et al.*, 2014). Je to jeden z největších rodů čeledi *Caryophyllaceae* (KARAMIAN, 2015). Zástupci rodu *Silene* se vyskytují v teplejších oblastech po celé severní polokouli, můžeme je ovšem nalézt také v Africe a některé druhy byly nalezeny i na jiných kontinentech (MAMADALIEVA *et al.*, 2014).

Na základě morfologických a fyziologických znaků je členění do taxonomického rozdělení následující.

Říše: *Plantae* (rostliny)

Podříše: *Tracheobionta* (cévnaté rostliny)

Oddělení: *Magnoliophyta* (krytosemenné)

Třída: *Rosopsida* (vyšší dvouděložné)

Řád: *Caryophyllales* (hvozdíkotvaré)

Čeleď: *Caryophyllaceae* (hvozdíkovité)

Rod: *Silene* (silenka)

Rod *Silene* je nezastupitelným modelem pro studium evoluce pohlavních chromozomů, epigenetických mechanismů exprese jednotlivých pohlaví, vývojové biologie

a dalších biologických mechanismů (BERNASCONI *et al.*, 2009). Byl studován J. G. Mendelem nebo Ch. Darwinem, a to zejména v oblasti ekologie, evoluční a vývojové biologie.

Rod *Silene* je unikátní tím, že v rámci jednoho rodu odlišujeme rostliny se samčím a samičím heterogametickým pohlavím. Mechanismy určující pohlaví se vyvíjely u různých druhů pravděpodobně odlišně. Vyskytují se zde rostliny s oboupohlavními i jedнопohlavními květy. Dosud nebyly popsány jednodomé druhy, ovšem dvoudomé (dioecické) a mnohomanželné (gynodioecické) jsou poměrně časté. Dvoudomost se vyvinula ve třech sekcích *Melandrium* (*S. latifolia*, *S. dioica*), *Otites* (*S. colpophylla*) a *Nanosilene* (*S. acauli*). Cytogenetická podstata určování pohlaví je v sekci *Melandrium* velmi blízká savcům, to znamená, že zde nacházíme specifický samčí Y chromozom, který nese dominantní samčí geny. V genomu se nachází jen v jedné kopii. Samčí pohlaví je pak určeno dvěma chromozomy X. (GRANT *et al.*, 1994; MONÉGER, 2007). Druhy patřící do sekce *Otites*, mají ZZ/ZW systém (SLANCAROVA *et al.*, 2013). Gynodioecie, v populaci jsou přítomni oboupohlavní a samičí jedinci, je nejčastější a zřejmě původní pohlavní systém. Oboupohlavnost, spojená s vývojem samoopylení nacházíme například u *S. gallica* a *S. conica* (DESFEUX *et al.*, 1996; CHARLESWORTH, 2002). Rod *Silene* se tedy stal vhodným modelem pro studium evoluce pohlavních chromozomů a mechanismů určujících pohlaví.

2.4.6.1 *Silene latifolia* a *Silene dioica*

Silene latifolia Britten & Rendle, 1907 (silenka širokolistá); *Silene dioica* (L.) Clairv., 1811 (silenka dvoudomá)



Obr. 3: *Silene latifolia* Britten & Rendle, 1907 (silenka širokolistá)

Zdroj: <http://www.uniprot.org/taxonomy/37657>



Obr. 4: *Silene dioica* (L.) Clairv., 1811 (silenka dvoudomá)

Zdroj: <https://www.infoflora.ch/de/flora/449-silene-dioica.html>

Oba dva druhy lze nalézt na území větší části Evropy. *S. latifolia* se nachází na sušších stanovištích, zatímco *S. dioica* roste spíše na stinnějších a vlhčích místech. Obě rostliny mohou za příznivých podmínek dorůst do výšky téměř jednoho metru. Hlavním rozpoznávacím znakem mezi druhy je odlišná barva květů, *S. latifolia* (Obr. 3) má čistě bílé květy, zatímco *S. dioica* (Obr. 4) má květy růžové až červené. Dále je možné si všimnout výrazně vyšší hustoty pokrytí listů, pokrytí lodyhy trichomy a celkově mohutnějšího habitu u *S. dioica*. (CIBULKA, 2012; HOUSKA, 2009). Samčí a samičí rostliny vykazují několik morfologických rozdílů. Samčí rostliny mívají obecně více květů a proporcionálně větší listovou biomasu na rozdíl od samičích rostlin. Mají ale menší masu kořenů, stonku a reprodukčních pletiv (DOUST *et al.*, 1987).

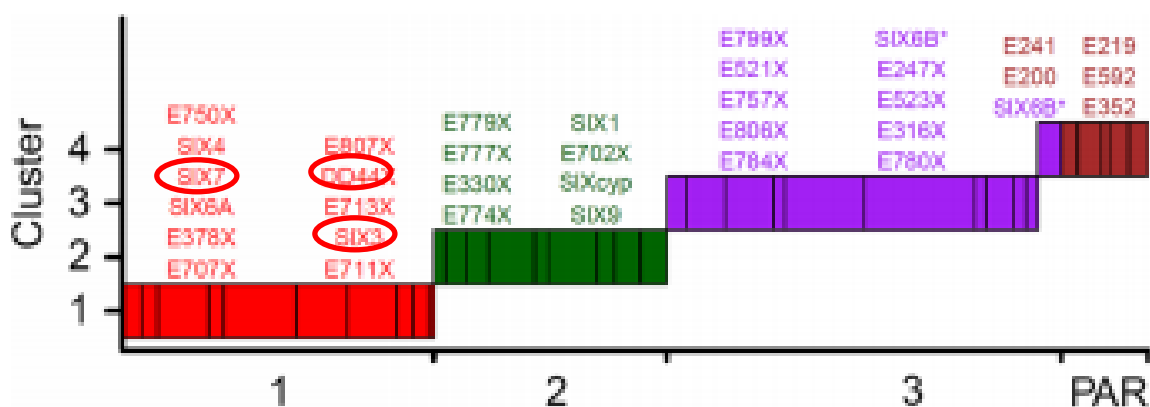
Tyto druhy si jsou blízké příbuzné a mají morfologicky podobné chromozomy. V práci FILATOV, CHARLESWORTH (2002) byly zkoumány dva geny vázané na pohlaví (*Sl1*, *Sl4*). Odlišnost mezi *S. dioica* a *S. latifolia* zkoumaných genů nepřesahuje 3 %.

Předpokládá se, že se pohlavní chromozomy vyvinuly ještě před oddělením těchto dvou druhů. Tomu nasvědčuje i to, že rozdílnost alel X a Y pro gen *Sl4* je u obou druhů 15 %. U genu *Sl1* je rozdíl mezi alelami pouze asi 2 % a předpokládá se, že byly donedávna rekombinující. Výhodou *S. dioica* a *S. latifolia* je, že se jejich pohlavní chromozomy vyvinuly nedávno a proto rozdíly mezi X a Y alelami jsou menší v porovnání s pohlavními chromozomy u savců. Malá divergence homologních X a Y vázaných genů nasvědčuje, že tyto geny mají podobnou funkci a byly vystaveny stejnému selekčnímu tlaku (FILATOV, CHARLESWORTH, 2002).

2.4.6.2 Geny vázané na pohlaví *Silene latifolia*

Postupným potlačováním rekombinace pohlavních chromozomů, jak bylo popsáno v kapitole 1.2.1, vznikly tzv. evoluční vrstvy (straty). Jako evoluční straty můžeme definovat takové oblasti, ve kterých došlo k rozdílným evolučním krokům na nově se tvořícím chromozomu X a Y (HANDELY *et al.*, 2004). Ve studii PANDEY, AZAD (2015) byly u *S. latifolia* identifikovány tři evoluční straty a pseudoautozomální oblast, jak je znázorněno na obrázku 5.

Nedávné studie odhalily řadu zajímavých vlastností genů vázaných na pohlaví, ačkoli je jejich studium poněkud těžší kvůli nepříliš častému výskytu odlišných pohlavních chromozomů u kvetoucích rostlin. Některé z těchto genů byly charakterizovány u dvoudomé rostliny *S. latifolia* (MATSUNAGA, 2006). Dále jsou popsány jen geny použité v této diplomové práci.



Obr. 5: Evoluční straty u *Silene latifolia*

Čísla 1, 2, 3 na ose X označují evoluční vrstvy, PAR (pseudoautozomální oblast). Červeně zakroužkované jsou geny použité v této diplomové práci.

Sl3

V práci NICOLAS *et al.* (2005) byl popsán gen *Sl3*. Tento gen kóduje sekvenci podobnou pro na vápníku závislé proteinové kinázy (CDPKs – calcium-dependent protein kinases) v tabáku, rýži a huseníčku. CDPKs jsou spojeny s odpověďmi na stres. Gen *Sl3* vykazuje velkou divergenci mezi alelami X a Y (NICOLAS *et al.*, 2005). Alely genu *Sl3*, se liší ve více než 15 % (BERGERO *et al.*, 2007).

Sl7

Tento gen byl identifikován jako gen vázaný na pohlaví ve studii BERGERO *et al.* (2007) a dosud není známa jeho funkce. Bylo ukázáno, že exonové sekvence jsou zřejmě konzervativní, ale v intronech byly nalezeny rozdíly. Na základě těchto poznatků bylo zjištěno, že se jeho X a Y alely liší zhruba v 25 %, a to znamená že se jedná zatím o nejvíce divergentní pár alel, které byly do této doby objeveny. Před identifikací genu *Sl7* bylo předpokládáno, že nejvíce divergentní jsou alely genu *Sl4* (BERGERO *et al.*, 2007).

DD44 - Differential Display 44

Ve studii MOORE *et al.*, 2003 byl pomocí metod molekulární biologie studován gen *DD44*. Jedná se o homologní gen k proteinu způsobující citlivost na oligomycin, esenciální komponent mitochondriální ATP-syntázy (adenosintrifosfát-syntázy), který je expri-mován u obou pohlaví. Bylo prokázáno, že je geneticky vázán na lokus potlačující vývoj pestíku (MOORE *et al.*, 2003).

3 CÍLE PRÁCE

- Vypracování literární rešerše na téma využití metod molekulární biologie pro komparativní analýzu blízce příbuzných druhů dvoudomých rostlin *Silene dioica* a *Silene latifolia*.
- Identifikace BAC klonů vybraných rostlin s pohlavně vázanými markery, charakterizace identifikovaných genů a jejich expresní analýza, použití metodiky "low-copy" FISH pro vizualizaci identifikovaných genů na chromozomech

4 Materiál a metody

4.1 Materiál

Pro potřeby diplomové práce byly použity rostliny druhu *Silene latifolia* a *Silene dioica* pěstované ve skleníku při konstantním rozmezí teplot 18 - 22 °C. Rostliny byly poskytnuty oddělením Vývojové genetiky rostlin Biofyzikálního ústavu akademie věd České republiky.

4.2 Metody

4.2.1 Izolace DNA

DNA byla izolována z mladých listů samčích a samičích rostlin *Silene latifolia* a *Silene dioica*.

Přibližně 100 mg rostlinného materiálu bylo rozmělněno ve třecí misce tloučkem s tekutým dusíkem. Nadrcený materiál byl přemístěn do mikrozkušavky o objemu 1,5 ml. Byl přidán 1ml extrakčního pufru (100 mM Tris-HCl; 700 mM NaCl; 50 mM EDTA; pH = 8) o teplotě 65 °C a 0,6 µl merkaptoethanolu. Poté proběhla inkubace vzorků 15 minut při teplotě 65 °C a 5 minut při pokojové teplotě. Po vyrovnání teplot vzorku a prostředí bylo přidáno 500 µl směsi chloroformu a isomylalkoholu v poměru 24:1. Pro správné promíchání se vzorky 5 minut překlápěly. Následně byly 2 minuty centrifugovány při 14 000 RPM (revolutions per minute – otáček za minutu). Směs ve zkumavkách se oddělila na dvě fáze dle hustotního gradientu. Lehčí (horní) fáze obsahovala žádanou DNA a v těžší fázi (dolní) byly obsaženy zbytky rostlinného materiálu, které již nebyly potřeba. Tato fáze nebyla dále použita. Horní fáze byla odpipetována do nové mikrozkušavky o objemu 1,5 ml. Bylo přidáno 700 µl isopropanolu a mikrozkušavky byly opět překlápěny po dobu 2 minut. Poté proběhla centrifugace 10 minut při 14 000 RPM. Supernatant byl odstraněn a k peletu bylo přidáno 500 µl 70 % ethanolu. Po odstranění a vysušení ethanolu byl pelet rozpuštěn ve 100 µl Milli-Q H₂O.

Kvantita a kvalita izolované DNA byla měřena pomocí přístroje UV-VIS spektrofotometru (Nanodrop 2000 od firmy Thermo scientific). Pro měření byl použit 1 µl vzorku DNA. Jako slepý vzorek byl použit 1 µl Milli-Q H₂O. Vzorky byly měřeny při vlnové délce 260 nm a uchovány v mrazáku při teplotě -20 °C do dalšího použití tak, aby bylo zabráněno případné nežádoucí degradaci DNA.

4.2.2 PCR amplifikace

Pro PCR amplifikaci byla použita reakční směs (Tab. 2). Pro každý vzorek bylo použito 24,6 μl reakční směsi a 0,4 μl templátové DNA. Celkový objem reakce byl tedy 25 μl . Celý obsah mikrozkušavky byl šetrně promíchán mikropipetou. Samotná reakce pak probíhala v termocykleru TProfessional Basic Gradient od firmy Biometra. Teplotní profil byl zvolen dle požadavků primerů a očekávané délky produktu (Tab. 3).

Tab. 2: Reakční směs pro PCR amplifikaci

Komponenty reakční směs	Objem pro 1 reakci (25 μl)
Deionizovaná voda	18,4 μl
Pufr	5 μl
dNTP	0,1 μl
Primery F +R	1+ 1 μl
<i>Taq</i> -polymeráza	0,1 μl

Zkratky: dNTP – dinukleotid trifosfát, Primer F + R – forward a reverse primer, *Taq* – *Thermus aquaticus*

Tab. 3: Teplotní profil PCR amplifikace

Fáze reakce	Teplota	Doba trvání	Opakování
Počáteční denaturace	94 °C	3 min	1x
Denaturace	94 °C	30 s	35x
Annealing	55 – 62 °C	30 s	
Elongace	72 °C	1 min	
Konečná elongace	72 °C	10 min	1x

Seznam použitých primerů a jejich sekvence jsou uvedeny v tabulce 4. PCR, s teplotním profilem uvedeným v tabulce 3, byla použita pro ověření funkčnosti primerů s DNA ze *S. latifolia*. Po ověření funkčnosti byla reakce použita k přípravě sondy pro screening BACové knihovny *S. dioica*.

Tab. 4: Seznam a sekvence použitých primerů

Primer	Sekvence	Teplota nasedání
SI7 - R	TTTCAGCAACAACCTCAAGA	55 °C
SI7 -F	TTTCAGCAACAACCTCAAGG	55 °C
DD44- R	ATTAGCTGAGGTAGGGGAGGTT	62 °C
DD44- F	TGCTGCTGCTTCTGATAGGAAA	62 °C

4.2.3 Horizontální elektroforéza

Pro vizualizaci produktů a přípravu sondy pro screening bacové knihovny byl připraven 1% agarózový gel, do kterého bylo přidáno 1 μ l ethidium bromidu na 100 ml gelu. Gel byl vložen do vany s 1xTAE pufrem. Elektroforéza běžela při napětí 100 V po dobu 40 minut. Gel byl nasnímám pod UV světlem přístrojem InGenius LHR od firmy SynGene.

4.2.4 Izolace PCR produktů z agarózového gelu

Pro izolaci produktů z agarózového gelu byl použit kit QIAquick® Gel Extraction Kit (QIAGEN, 2006). Bylo postupováno podle přiloženého protokolu. Výsledná DNA byla extrahována do 30 μ l Milli-Q H₂O namísto EB pufru (krok č. 9) a výsledná koncentrace DNA byla změřena na přístroji NanoDrop (popsáno v kapitole 4.2.1).

4.2.5 Screening BAC knihovny pomocí radioaktivně značené sondy

4.2.5.1 Pozitivní kontrola

Jako pozitivní kontrola byl použit vzorek genomové DNA *S. dioica* (2 μ l, 15 μ l denaturačního pufru: 0,5N hydroxid sodný; 1,5M chlorid sodný), který byl inkubován 5 minut při teplotě 95 °C a poté přenesen na sterilní Hy-band membránu.

4.2.5.2 Prehybridizace

BAC knihovna *S. dioica* je nanesena na 5 membránách. Membrány byly vloženy do roztoku 2xSSC pufru (naředěno z 20xSSC pufru o složení 3M chlorid sodný; 0,3M citronan sodný) a vloženy na stěny hybridizačních válců. Poté bylo do válců aplikováno 24 ml hybridizačního roztoku (10% PEG8000; 0,013M dihydrogenfosforečnan sodný;

0,15M chlorid sodný; 0,001M EDTA; 7% SDS; 125 mg/l heparin; 2,5 µg/ml salmon sperm DNA) a 12 ml QuikHyb Hybridization Solution od firmy Agilent. Hybridizační válce s membránami a hybridizačním roztokem byly 20 minut přehřívány na teplotu 65°C.

4.2.5.3 Příprava sondy

Konkrétní PCR produkty byly použity pro přípravu radioaktivní sondy. Sonda byla vytvořena ze dvou konkrétních PCR produktů. Tyto produkty byly naředěny na koncentraci 25 ng v 12,5 µl Milli-Q H₂O. Dále byl použit Prime-It II Random Primer Labeling Kit od firmy Agilent (AGILENT TECHNOLOGIES, 2015) a radioaktivní izotop od firmy M. G. P. spol., s. r. o., Zlín. Do zkumavky s DNA bylo přidáno 5 µl náhodných primerů a zkumavky byly dále inkubovány 5 minut při teplotě 98 °C a 10 minut při laboratorní teplotě.

Dále bylo přidáno 5 µl 5x dATP pufru a 0,5 µl Klenowova fragmentu a inkubováno 5 minut na ledu. Poté bylo přidáno 2,5 µl $\alpha^{32}\text{P}$ radioaktivně značeného izotopu $\alpha^{32}\text{P}$ (aktivita 0,925 MBq) a vzorky byly inkubovány 20 minut při teplotě 37 °C, 5 minut při teplotě 95 °C, 5 minut na ledu a pak přidány do hybridizačních válců, které byly inkubovány do druhého dne při teplotě 65 °C v hybridizační peci.

4.2.5.4 Odmývání nenavázané sondy

Z válců byl nejprve odstraněn radioaktivní roztok s nenavázanou sondou. Následně bylo do každého hybridizačního válce s membránami přidáno 125 ml prvního promývacího roztoku (1xSSC pufr; 0,1% SDS), který byl odstraněn po 10 minutách, kdy bylo přidáno znovu 125 ml promývacího roztoku 1 po dobu 20ti minut. Obě odmytí 1. roztokem proběhla při teplotě 60 °C. Po odstranění 1. roztoku byl přidán 2. promývací pufr (0,3xSSC pufr; 0,1% SDS) a opět byly válce odmyvány 20 minut při teplotě 60 °C. Membrány byly zabaleny do průhledné fólie SAROGOLD PRO a vloženy do světlo nepropuštějících kazet společně s filmem citlivým na radioaktivitu, které byly uloženy při teplotě -70 °C do druhého dne.

4.2.5.5 *Vyvolání filmu*

Přes noc exponované filmy byly vyvolány v roztoku vývojky a rychloustalovače pro ruční zpracování rentgenových filmů. Z vyvolaných filmů byly pomocí mřížky odečteny kódy pro daný BAC, kde došlo k navázání sondy. Tyto kódy byly následně odeslány výrobci BAC knihovny (Centra strukturní a funkční genomiky rostlin - Ústav experimentální botaniky AV ČR, Olomouc), který provedl izolaci konkrétního klonu a doručil jej k další analýze.

4.2.5.6 *Izolace BACů*

Pro izolaci BACů byl použit kit QIAGEN® Plasmid *Plus* Midi Kit (QIAGEN, 2011) s příloženým postupem pro vysoký výtěžek. Vzorky byly rozpuštěny v 70 µl Milli-Q H₂O ohřáté na 65 °C, která byla ponechána na kolonce po dobu 5 minut.

4.2.5.7 *Ověření BACů*

Protože byly pro vytvoření sondy použity 2 konkrétní PCR produkty, tedy 2 sekvence různých genů, bylo následně třeba ověřit identitu těchto klonů pomocí metody PCR. Amplifikace proběhla stejně jako v kroku 4.2.2, avšak místo templátové DNA byla použita přímo část kultury BAC klonu. PCR byla elektroforeticky vyhodnocena. V případě získání pozitivního produktu, bylo potvrzeno, že identifikovaný BAC obsahuje požadovaný gen. Tyto ověřené geny byly odeslány na sekvenaci do Centra strukturní a funkční genomiky rostlin - Ústav experimentální botaniky AV ČR, Olomouc.

4.2.6 *Izolace RNA*

RNA byla izolována ze tří částí rostlin *S. latifolia* a *S. dioica*, listu, květu a poupěte. Izolace proběhla pomocí komerčně dodávaného kitu NucleoSpin® RNA Plant kit (MACHEREY-NAGEL, 2015). Izolace byla provedena podle příloženého protokolu, byly vynechány kroky 6 a 7. V posledním kroku byla RNA rozpuštěna v 50 µl RNase-free vodě. Izolovaná RNA byla zbavena možných zbytků DNA pomocí kitu TURBO DNA-free™ (THERMO FISHER SCIENTIFIC, 2017) dle protokolu dodávaného s kitem. Čistota RNA byla poté ověřena elektroforeticky na 1 % agarózovém gelu.

Kvantita a kvalita izolované RNA byla měřena pomocí přístroje UV-VIS spektrofotometru (Nanodrop 2000 od firmy Thermo scientific). Pro měření byl použit 1 µl vzorku

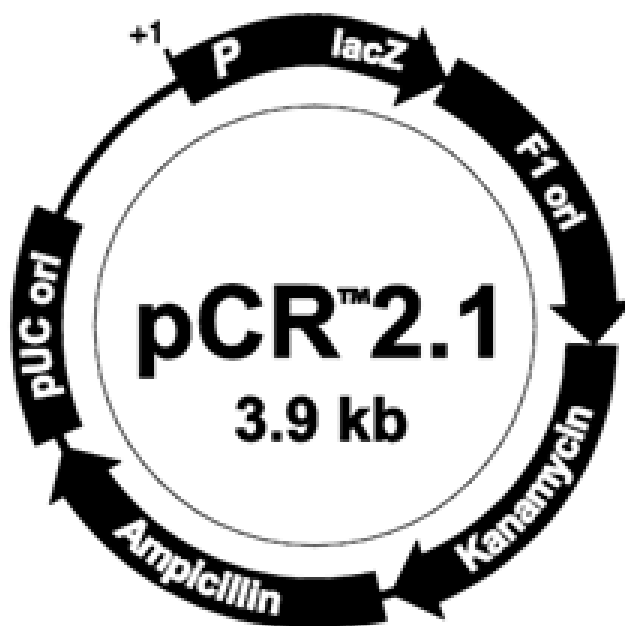
RNA. Jako slepý vzorek byl použit 1 μ l RNase-free H₂O. Vzorky byly měřeny při vlnové délce 260 nm.

4.2.7 Přepis RNA do cDNA – reverzní transkripce

Pro přepis izolované RNA do cDNA byl použit kit High Capacity RNA-to-cDNA Kit (THERMO FISHER SCIENTIFIC, 2017). Dle doporučení protokolu přiloženého s kitem byla koncentrace vzorků pro přepis 2 μ g na 20 μ l směsi. Postup byl zvolen dle doporučení protokolu. Následně byla cDNA měřena pomocí UV-VIS spektrofotometru stejně jako DNA (uvedeno výše). Vzorky byly naředěny na koncentraci 5 ng/ μ l se kterými bylo dále pracováno.

4.2.8 Klonování

Pro klonovací strategii bylo využito metody klonování pomocí pCRTM2.1 vektoru (Obr. 6).



Obr. 6: pCRTM2.1 vektor (Invitrogen)

Plasmid obsahuje dva geny pro rezistenci proti antibiotikům ampicilinu a kanamycinu. Dvě místa počátku replikace (pUC ori, F1 ori). Gen lacZ pro beta-galaktosidázu, jehož funkce způsobuje modré zbarvení bakterií. Při úspěšné transformaci se produkt vloží právě do tohoto genu, funkce je narušena a kolonie tak mají bílé zbarvení.

4.2.8.1 Extrakce požadovaného produktu

Nejdříve byla provedena PCR reakce a vyhodnocena pomocí gelové elektroforézy. Objem vzorků pro elektroforézu byl 23 µl a byl použit 1% agarózový gel. Následně byly pod UV světlem za použití ochranných pomůcek a skalpelu vyříznuty požadované produkty o velikosti přibližně 200 - 400 bp, dle izolovaného genu. Průměrná hmotnost vyříznutých fragmentů byla 0,8 g.

Extrakce DNA fragmentů z agarózového gelu proběhla pomocí protokolu pro QIAquick® Gel Extraction Kit (QIAGEN, 2006).

4.2.8.2 Ligace

Dále bylo přistoupeno k ligaci s pCR™2.1 vektorem. Pro ligaci bylo použito 5 µl vzorku. Poměr inzertu a vektoru byl vypočítán dle vzorce:

$$\frac{\text{hmotnost vektoru (ng)} \times \text{velikost inzertu (kb)}}{\text{velikost vektoru (kb)}} \times \frac{1}{3} = \text{hmotnost inzertu (ng)}$$

Reakční směs je uvedena v tabulce 5. Reakční směs byla rozpipetována do PCR zkumavek o objemu 0,2 ml. Celkový objem reakční směsi pro 1 vzorek byl 6 µl. Reakční směs byla protřepána a po přidání inzertu ještě jemně promíchána pomocí mikropipety.

Tab. 5: Reakční směs pro ligaci

Komponenty reakční směsi	Objem pro 1 reakci (10 µl)
PCR produkt	5 µl
5X T4 DNA Ligase reakční pufer	2 µl
pCR®2.1 vektor (25 ng/µL)	2 µl
ExpressLink™ T4 DNA Ligáza	1 µl

Úspěšnost ligace byla otestována pomocí gelové elektroforézy.

4.2.8.3 Elektroporace

Pro klonování byly použity bakterie *Escherichia coli* kmen Top 10, které byly dlouhodobě uchovávány při teplotě -70 °C. Po rozmrazení bylo k bakteriím přidáno 10 µl ligační směsi. Vzorek byl pomocí mikropipety přenesen do sterilní kyvety. Kyveta byla

umístěna do eletroporátoru a reakce proběhla při 12,5 Kv/cm; 25 μF a 400 Ω. Poté bylo ke vzorku přidáno 1ml LB - Luria-Bertani média (BERTANI, 1951) a byl přenesen do sterilní mikrozkuhavky. Tyto kroky byly opakovány pro všechny vzorky. Mikrozkuhavky byly kultivovány 60 minut na orbitální třepačce při 60 RPM a 37 °C .

4.2.8.4 Výsev bakterií

Pro výsev bylo použito LB se selekčním antibiotikem ampicilinem (100 μg/ml) a komponenty pro modro-bílé zbarvení bakterií Xgal (5-bromo-4-chloro-indolyl-β-D-galactopyranoside) 40 μg/ml. Na médium v Petriho miskách bylo aplikováno přibližně 300 μl bakteriální kultury. Suspenze bakterií byla rozetřena sterilní skleněnou tyčinkou. Misky byly uzavřeny, zapáskovány a popsány. Bakterie byly kultivovány přes noc při 37 °C dnem vzhůru.

4.2.8.5 Vyhodnocení klonování

Po kultivaci narostly na médiu modré a bílé kolonie. Bílá barva značila, že klonování proběhlo úspěšně. Bylo odebráno vždy osm bílých kolonií od každého vzorku. Naamplifikované požadované produkty z těchto kolonií byly sekvenovány. Pomocí vzorce pro transformační úspěšnost byla vypočítána úspěšnost transformace 2×10^9 cfu/μg DNA.

$$\text{Transformační úspěšnost} = \frac{\text{Počet získaných kolonií}}{\text{hmotnost (ng) inzertované DNA}} \left[\frac{\text{cfu}}{\mu\text{g}} \text{DNA} \right]$$

4.2.9 Sekvenace

Bylo sekvenováno 24 vzorků pro geny *Sl7*, *Sl3* a *DD44*. Průběh a detaily sekvenace jsou rozepsány níže.

4.2.9.1 Přečištění amplifikované DNA pomocí ExoSap

Vzorky určené k sekvenaci byly vyčištěny od nezreagovaných primerů a dNTPs. Byly použity roztoky Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP), který odstraní neinkorporované nukleotidy a Exonuclease I *E. coli* (EXO I), která štěpí jednovláknovou DNA, od firmy ThermoFisher Scientific. Byla připravena reakční směs (Tab. 6). K 15 μl vzorku bylo přidáno 10μl reakční směsi. Následně byly vzorky inkubovány 30 min při teplotě 37 °C a pak 5 min při teplotě 95 °C pro deaktivaci enzymů.

Tab. 6: Reakční směs pro přečištění amplifikované DNA pomocí ExoSap

Reakční komponenty	Objem pro 1 reakci (10 μ l)
EXO I	0,075 μ l
SAP	0,75 μ l
H ₂ O	9,175 μ l

4.2.9.2 Příprava sekvenační reakce

Pro přípravu sekvenační reakce byl použit BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (THERMO FISHER SCIENTIFIC, 2016). Složení reakce je uvedeno v tabulce 7. Reakce byly dány do termocykleru, zvolený program (Tab. 8).

Tab. 7: Složení sekvenační reakce

Reakční komponenty	Objem pro 1 reakci (10 μ l)
PCR produkt	3 μ l
5x sekvenační pufr	1,5 μ l
BigDye (směs dNTP)	0,5 μ l
Primer	0,5 μ l
Milli-Q H ₂ O	4,5 μ l

Tab. 8: Program pro sekvenační reakci. Kroky 2., 3., 4., opakovány 60x.

Krok	Teplota	Čas
1.	98°C	5 min.
2.	96°C	10 sec.
3.	50°C	5 sec.
4.	60°C	4 min
5.	4°C	∞

4.2.9.3 Přečištění sekvenační reakce

Pro přečištění byl použit odmyvací roztok Agencourt CleanSeq od firmy Beckman Coulter, který obsahuje kovové kuličky, na které se naváže DNA určena pro sekvenování. Ke každému vzorku bylo přidáno 10 μ l odmyvacího roztoku a 42 μ l 85% ethanolu. Směs

byla důkladně promíchána pomocí pipety. Vzorky byly vloženy do magnetické destičky Agencourt 96 Direct Inject Magnet Plate na 5 minut. Kuličky byly navázány na stěny zkumavky a zbylý roztok odpipetován. Následně byly vzorky 2x promyty 100 µl 85% ethanolem, roztok ethanolu byl odstraněn. Vzorky byly 10 minut inkubovány při pokojové teplotě. K vzorkům bylo přidáno 75 µl Milli-Q H₂O a byly sekvenovány pomocí sekvenátoru ABI Prism, 3100 Genetic analyzer od firmy Applied Biosystems.

4.2.9.4 Zpracování získaných sekvencí

Sekvence byly zpracovány pomocí programu Geneious 9.0.2. Získané sekvence byly porovnány se sekvencemi získanými pomocí screenování BACové knihovny a sekvencemi získanými z databáze NCBI pro X a Y alelu zkoumaných genů. Získané sekvence byly použity pro expresní analýzy.

4.2.10 RT-PCR a HRM

4.2.10.1 Výběr referenčních genů pro vnitřní kontrolu

Jako referenční geny se nejčastěji používají takové geny, u nichž se očekává, že jejich exprese je stejná u všech testovaných vzorků. Bylo zvoleno pět „housekeeping“ genů. Na základě průměrné hodnoty exprese ve všech testovaných částí rostlin byly vybrány dva pro další analýzy. Data byla zpracována pomocí programu GeNorm (VANDESOMPELE *et al.*, 2002). Seznam a sekvence primerů pro „housekeeping“ geny jsou uvedeny v tabulce 9.

Tab. 9 : Seznam a sekvence použitých primerů pro referenční geny

Primer	Sekvence	Teplota nasedání
GADPH - R	GCAACACCTTTCCAACAGCCT	54 °C
GADPH - F	GTTATCATCTCAGCTCCTAG	54 °C
TUB- R	GCTGCTCATGGTAAGCCTTC	55 °C
TUB- F	CCTGAATGTGGATGTGAACG	55 °C
18s - R	GTTGATAGGGCAGAAATTTGAATGAT	55 °C
18s - F	CCGTTGCTCTGATGATTCATGA	55 °C
Actin - R	AGGGCGTAACCCTCGTAAAT	54 °C
Actin - F	CTGCTTACCGAAGCACCATT	54 °C
ELF - R	GTGCAGAGAAGGTCTCGACAA	53 °C
ELF - F	GCGATCAGGTAAGGAGCTTG	53 °C

4.2.10.2 Příprava referenčních vzorků pro rozlišení exprese X a Y alely

Na základě získaných sekvencí byly připraveny směsné vzorky obsahující X a Y alelu pro každý studovaný gen v určitém poměru (Tab. 10). Bylo připraveno pět různých referenčních vzorků pro každý studovaný gen. Vzorky byly následně srovnány s výsledky analýz pro zájmové geny v jednotlivých částech rostlin a sloužily k určení míry exprese jednotlivých alel.

Tab. 10: Poměr X a Y alel v jednotlivých vzorcích

Vzorek	Obsah X alely	Obsah Y alely
1	100 %	0 %
2	75 %	25 %
3	50 %	50 %
4	25 %	75 %
5	0 %	100 %

4.2.10.3 RT-PCR a HRM

Velikost produktů pro studované geny byla požadována maximálně 400 pb. Primery a jejich sekvence jsou uvedeny v tabulce 11. Pro expresní analýzy byl použit Sensi-FAST™ HRM Kit (BIOLINE GMBH, 2017). Samotná reakce pak probíhala v termocycleru Rotor-Gene Q od firmy Qiagen. Program byl složen ze dvou kroků: preamplifikace a samotné HRM (high resolution melt - vysokorozlišovací analýza křivek tání). Složení reakce a teplotní protokol je uveden v tabulce 12 a 13.

Tab. 11 : Seznam a sekvence primerů pro použité geny pro expresní analýzy

Primer	Sekvence	Teplota nasedání
SI3 - R	GACCATGACCCAATAATTTCCCA	57 °C
SI3 - F	TGTACCAACAACAACAATTACCCA	57 °C
SI7 - R	GATGCAGGAGAAATTGGAGGGTA	57 °C
SI7 - F	GATGCGTTCACTGAATTGATGCA	57 °C
DD44 - R	TTGCTACCAAGGCTCCTGTT	58 °C
DD44 - F	ATGTCAATGGCGAACCGCAT	58 °C

Tab. 12: Složení reakce pro RT-PCR a HRM

Reakční komponenty	Objem pro 1 reakci (10 µl)
2x SensiFAST HRM Mix	5 µl
Milli-Q H ₂ O	3 µl
Primer F	0,5 µl
Primer R	0,5 µl
Templátová cDNA	1 µl

Tab. 13: Teplotní protokol pro pre-amplifikaci

Teplota	Čas
95 °C	3 min
95 °C	5 sec
60 °C	30 sec

Pro HRM (High resolution melt - vysokorozlišovací analýza křivek tání) byly zvoleny teploty v rozmezí 65 – 95 °C, teplota se v každém kroku zvýšila vždy o 0,1 °C.

4.2.10.4 Zpracování dat

Data byla podrobena analýze rozptylu (ANOVA) pomocí softwaru R verze 3.4.0 (R Foundation for Statistical Computing, Vídeň). Normálnost a homogenita rozptylu byla hodnocena pomocí Shapiro-Wilkových a Levenových testů. Několik srovnání bylo provedeno významným Tukeyho HSD testem. Úroveň pravděpodobnosti $p < 0,01$ byla považována za významnou pro všechny statistické analýzy.

4.2.11 Fluorescenční *in situ* hybridizace – FISH

4.2.11.1 Příprava fluorescenční sondy

Jeden z limitujících faktorů FISH je vizualizace krátkých úseků DNA. Proto bylo potřeba získat dlouhé produkty studovaných genů. Z tohoto důvodu byly navrženy nové primery (Tab. 14), aby bylo možné získat produkty o velikosti 2.5-10 kb. Produkty byly získány pomocí PCR s MyFi™ DNA polymerázou od firmy Bioline. Složení a teplotní profil je uveden v tabulce 15 a 16. Úspěšnost PCR byla ověřena elektroforeticky.

Tab. 14 : Seznam a sekvence primerů pro použité geny pro metodu FISH

Primer	Sekvence	Teplota nasedání
SI3 - R	TCTCCTTGAGTTCCTTGCACAA	60 °C
SI3 - F	TCCCCTGAATTGTGCTGGTTTA	60 °C
SI7 - R	AGGTTCCCTACTTCCTGCCTAT	62,8 °C
SI7 - F	TCAACAATCGACCATGGACCAA	62,8 °C
DD44 - R	AGATTCCTCATCCACAAACCCC	60 °C
DD44 - F	TCATCACTCATGCATTTCCCCA	60 °C

Tab. 15: Složení reakční směsi pro MyFi™ DNA polymerázu

Reakční komponenty	Objem pro 1 reakci (25 µl)
5x MyFi Reaction Buffer	5 µl
Milli-Q H ₂ O	17,8 µl
Primer F	0,5 µl
Primer R	0,5 µl
MyFi™ DNA polymeráza	0,5 µl
Templátová DNA	0,4 µl

Tab. 16: Teplotní profil reakce

Fáze reakce	Teplota	Doba trvání	Opakování
Počáteční denaturace	95 °C	1 min	1x
Denaturace	95 °C	15 s	35x
Annealing	60-62,8 °C	15 s	
Elongace	72 °C	15 s/kb	
Konečná elongace	72 °C	10 min	1x

Produkty byly naznačeny pomocí NICK translace. Nejdříve byly sonikovány na ledu pomocí sonikátoru UPH50H pro dosažení velikosti produktu 500 – 1500 pb. Úspěšnost byla ověřena elektroforeticky. Složení reakční pro NICK translaci je uveden v tabulce 17.

Tab. 17: Složení reakční směsi pro NICK translaci

Reakční komponenty	Objem pro 1 reakci (20 µl)
10x NT labeling buffer	2 µl
Fluorescenční barva (Cy3/SG)	2 µl
DNA teplát (3 – 4 µg)	2 µl
Enzymatický mix (0,02 U/µL Dnase I, 2U/µL DNA polymeráza I)	2 µl

Reakce byla promíchána a inkubována přes noc při teplotě 15 °C. Druhý den byla reakce zastavena přidáním 5 µl EDTA (kyselina ethylendiamintetraoctová).

4.2.11.2 Příprava chromozomů roztlakovou metodou z kořenových meristémů

Kořínky byly odebrány z živých rostlin. Synchronizace byla provedena ve vodě po dobu 24 hodin při teplotě 4 °C, čímž bylo dosaženo akumulace buněk v metafázi. Fixace kořínků byla provedena ve směsi ethanolu a kyseliny octové v poměru 3:1.

Kořínky byly barveny v acetokramínu (1g karmínu rozpuštěný ve 100 ml 45% kyseliny octové) po dobu 2 – 3 hodin. Poté byly kořínky osušeny a odstraněny přebytečné části meristému tak aby byly ponechány jen kořenové špičky. Kořenové špičky byly umístěny do kapky 45% k. octové na čistém podložním sklíčku a následně roztláčeny přes krycí sklíčko tupým předmětem (tužka s gumou). Preparát se zahříval nad plamenem a byl vnořen do tekutého dusíku. Krycí sklíčko bylo odtrženo a podložní sklíčko s preparátem bylo vloženo do na 3 minuty do 45% k. octové, na 3 minuty do 45% k. octové předehtáté na 50 °C, poté 3 minuty v 50% k. octové předehtáté na 50 °C a naposled opět v 45% k. octové při pokojové teplotě po dobu 3 minut. Po osušení lze preparáty ihned použít pro další analýzy.

4.2.11.3 FISH

Preparáty byly 2x promyty po dobu 5 minut v 2xSSC pufru. Poté byly refixovány po dobu 10-ti minut ve fixačním roztoku 3:1 (etanol:kyselina octová) a opět omyta 2x 5 minut v 2xSSC pufru. Na preparáty bylo napipetováno 100 µL pepsinu (připraven ze zásobního roztoku 5 µL pepsinu o koncentraci 10 mg/mL a 1 mL 10mN HCl), oblast s chromozomy byla překryta krycím sklíčkem a skla byla inkubována při teplotě 37 °C po dobu

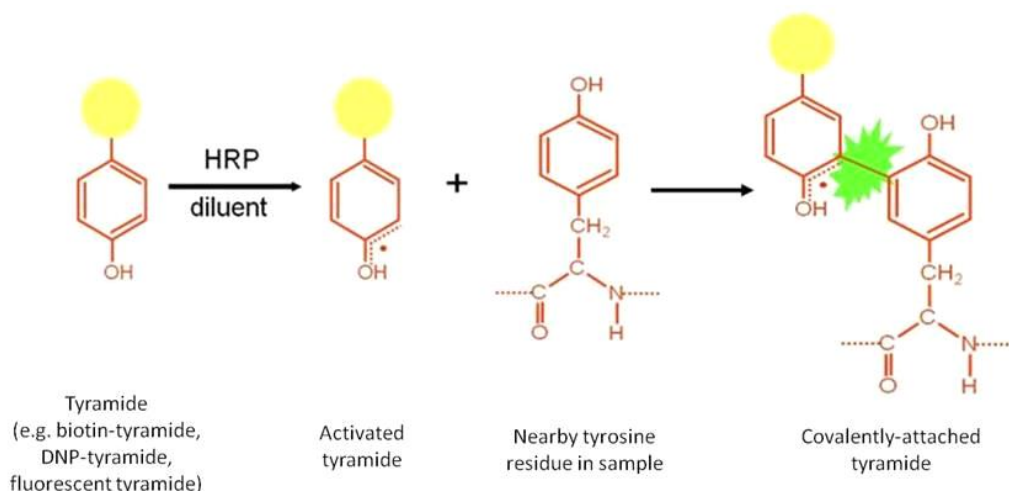
5 - 15 minut. Skla byla opět promyta 2x 5 minut v 2xSSC pufru, fixována při pokojové teplotě 10 minut ve 4% formaldehydu (42 ml 2xSSC; 5ml 37% formaldehydu). Skla byla opět promyta 2x 5 minut v 2xSSC pufru a následně byly chromozomy dehydratovány v ethanolové řadě, vždy po dobu 2 minut v každé koncentraci (50%, 70%, 96%). Na sklíčka byly nanесeny 2 μ l sondy v 18 μ l hybridizační směsi (10 μ l deionizovaný formamid; 5 μ l 4x pufr; 2 μ l Milli-Q H₂O), (4x pufr: 500 μ l deionizovaný formamid; 100 μ l 20x SSC pufr; 100 μ l dextran sulfát; 250 μ l Milli-Q; 50 μ l salmon sperm DNA). Sklíčka se denaturovala přesně 2 minuty na 75 – 80 °C a poté byla uložena do inkubátoru po dobu 48 hodin při teplotě 37 °C.

4.2.11.4 Odmývání sondy

Skla byla odmyta po dobu 1 minuty v 2x SSC pufru při pokojové teplotě. Dále byly preparáty vloženy do 2xSSC pufru předehřátého na 57 °C a takto byly promývány po dobu 20 minut. Při tomto kroku dochází k odmytí nenavázané sondy. Poté byly skla ochlazeny v pufru 2xSSC na pokojovou teplotu a promyta v ethanolové řadě (viz výše). Nakonec se na preparát napipetovalo 12 μ l DAPI v roztoku Vectashieldu (1 μ g DAPI; 1 ml Vectashield), skla se překryla krycím sklíčkem a mikroskopovala se fluorescenčním mikroskopem Olympus AX70. Obraz byl snímán v softwaru ISIS a CCD1 kamerou (MetaSystems).

4.2.11.5 Tyr-FISH (Tyramidová fluorescenční in situ hybridizace)

Tyramidová amplifikace je reakce, při které dochází k integraci peroxidázy selského křenu (HRP) a tyramidového amplifikačního reagentu (TSA). HRP konjugát po depozici váže fluophor- nebo hapten-barvené molekuly na substrát, který je blokován pro nescifickou vazbu proteiny. TSA je fenolická sloučenina, která je v přítomnosti HRP aktivována. Aktivovaná TSA molekula představuje velmi reaktivní radikál, který se kovalentně váže na elektronově bohatý substrát, představovaný především tyrosinovými residui (Obr. 7). Tato residua se vyskytují především v oblastech výskytu HRP. K amplifikaci signálu dochází tedy v místě, kde se nachází enzym peroxidáza.



Obr. 7: Tyramidová amplifikace a vazba aktivovaných radikálů na tyrosinová residua. V prvním kroku dochází k aktivaci pomocí TSA roztoku. Vzniklé radikály jsou pak kovalentně napojeny na substrát v přítomnosti HRP (PERKINELMER, 2017)

Po odmytí sondy po *in situ* hybridizaci bylo pro Tyr-amplifikaci postupováno podle manuálu od dodavatele s malými změnami (PERKINELMER, 2017). Koncentrace TNB pufru (blokační reagent) byla zvýšena na 3 %. Protilátka-anti-Cy3 (ThermoFisher) byla ředěna v poměru 1:300 v 1% TNB pufru. Doba, která je potřeba pro amplifikaci genu o velikosti 2,5 - 10 kb byla experimentálně ozkoušena na 9-10 minut.

4.2.11.6 Analýza obrazu a tvorba fyzické mapy

Jednotlivé snímky získané z Tyr-FISH byly uloženy v programu ISIS v černobílém rozhraní. Do rozhraní RGB (barevné rozhraní) byly převedeny programem AdobePhotoshop 2014.05.08. Pro lepší vizualizaci byly ze snímků separovány jednotlivé X a Y chromozomy. Distální a proximální pozice od konce telomer byla změřena v programu ImageJ2.0. Jako referenční sonda byla použita subtelomerická repetice X43.1, která na Y chromozomu značí PAR oblast. Pouze signály, které byly prokazatelně viditelné se stejnou pozicí alespoň na 5 a více figurách (chromozomové shluky) byly počítány jako prokazatelné. Fyzická mapa byla vytvořena pomocí programu PowerPoint na základě průměrných vzdáleností genů z obou telomer X nebo Y chromozomu. Velikost XY chromozomu byla počítána jako v práci BLAVET *et al.* (2015).

5 VÝSLEDKY

5.1 Identifikace BAC klonů vybraných rostlin s markery vázanými na pohlaví

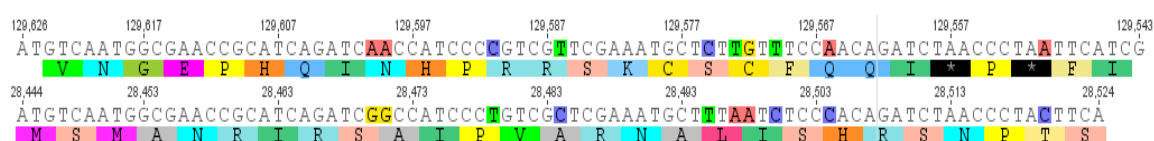
Prvním z cílů této diplomové práce bylo identifikovat geny vázané na pohlaví u *S. dioica*. Geny vybrané pro tuto práci byly *Sl3*, *Sl7*, *DD44*. Jak bylo uvedeno v teoretické části, u *S. latifolia* byly již tyto geny izolovány a popsány. Vzhledem k blízkému evolučnímu vztahu vybraných druhů je možné předpokládat, že tyto geny vázané na pohlaví si budou podobné. Očekávaný rozdíl byl jen v několika nukleotidech. Proto byly vytvořeny sondy z izolovaných genů *S. latifolia*. Radioaktivně značené sondy z *S. latifolia* byly podrobeny hybridizační analýze s BACovou knihovnou. Pro *S. dioica* bylo cílem získat několik různých BAC klonů pro každý gen, aby bylo možné rozlišit samčí a samičí alelu. Sekvence získaných alel každého z genů měly být použity pro další analýzy. Radioaktivní hybridizací byl získán pouze jeden BAC klon pro gen *Sl7* pro samičí alelu. Kód toho klonu je 55K24. Další sondy nehybridizovaly s BACovou knihovnou pro *S. dioica* a proto nebyly získány ani požadované sekvence.

5.2 Expresní analýzy

5.2.1 Vyhodnocení sekvenace

Pomocí sekvenace bylo získáno 11 sekvencí pro studované geny *Sl3*, *Sl7* a *DD44* a pro jejich samčí a samičí alely pro každý rostlinný druh. Získané sekvence byly porovnány se sekvencemi v databázi NCBI, ovšem nebyly detekovány podobné rozdíly v SNPs, které by pomohly identifikovat samčí a samičí alelu. Proto byla pro rozpoznání použita metoda HRM, Vzorky obsahující výše uvedené sekvence byly porovnány se vzorky samičí DNA. Na základě výsledků a podobnosti profilů křivek bylo zjištěno, která ze získaných sekvencí je samičí nebo samčí alela. Poté byly tyto sekvence izolovány z klonovaných bakterií a použity jako referenční vzorky pro odlišení exprese samčích a samičích alel ve studovaných pletivech rostlin, květu, poupěte a listu. Přestože pro každý gen bylo sekvenováno vždy 8 transformovaných kolonií, pro gen *Sl3* se podařilo získat sekvenci jediné alely. Sekvence pro každou kolonii byly shodné. Vzhledem k časové náročnosti sekvenace byl zvolen jiný postup pro získání referenčního vzorku pro druhou alelu. Bylo vzato dalších 10 transformovaných kolonií, které byly otestovány

pomocí HRM a porovnány se vzorkem s již získanou sekvencí pro *Sl3*. Jedna z těchto kolonií se ukázala jako rozdílná a byla proto použita jako referenční. Stejně jako u ostatních vzorků pomocí HRM analýzy se získanými sekvencemi a vzorku samičí cDNA (kde se exprimuje pouze samčí – X alela) bylo základě podobnosti určeno, která alela je samčí a která samičí. Jako příklad jsou uvedeny sekvence pro gen *DD44* pro *S. latifolia* a *S. dioica*. Pomocí programu Geneious 9.0.2. byl vytvořen alignment pro sekvence pro každý druh a byly detekovány jednonukleotidové rozdíly (SNP – single nucleotide polymorphism) (Obr. 8). Ostatní sekvence jsou uvedeny v příloze.

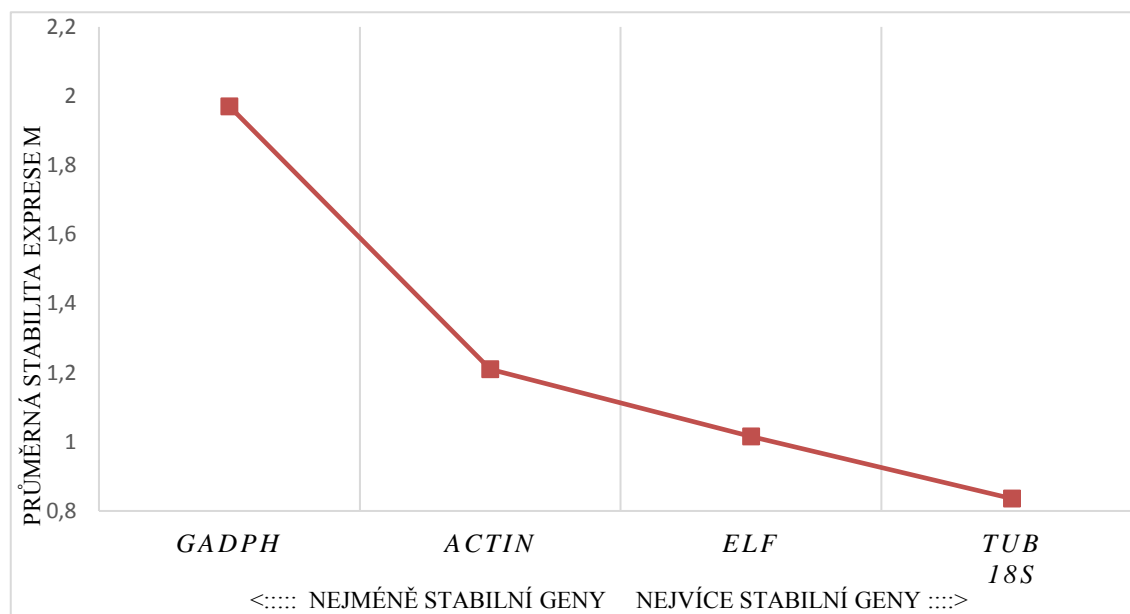


Obr. 8: Alighment pro získané sekvence genu *DD44* pro *S. latifolia*.

Rozdíl mezi sekvencí je znázorněn pomocí barevného zvýraznění nukleotidů.

5.2.2 Vyhodnocení referenčních genů

Data získaná pomocí RT-PCR pro referenční geny byla zpracována programem GeNorm a byly zjištěny nejstabilnější geny. Hodnoty byly znázorněny pomocí grafu (Obr. 9). Pro další analýzy byly použity „housekeeping“ geny pro tubulin (*TUB*) a ribozomální podjednotku 18S (*18S*). Geny *GADPH*, *Actin* a *ELF* byly vyhodnoceny jako nedostatečně stabilní a nebyly použity jako vnitřní kontrola.



Obr. 9: Průměrná stabilita exprese studovaných referenčních genů

Hodnota *M* (průměrná stabilita exprese) byla vypočítána programem GeNorm ze zadaných dat. Geny s nejnižší hodnotou *M* jsou nejvíce stabilní. Pro další analýzy byly tedy vybrány geny *TUB* a *18S*, další geny nevykazovaly dostatečnou stabilitu a nebyly dále použity.

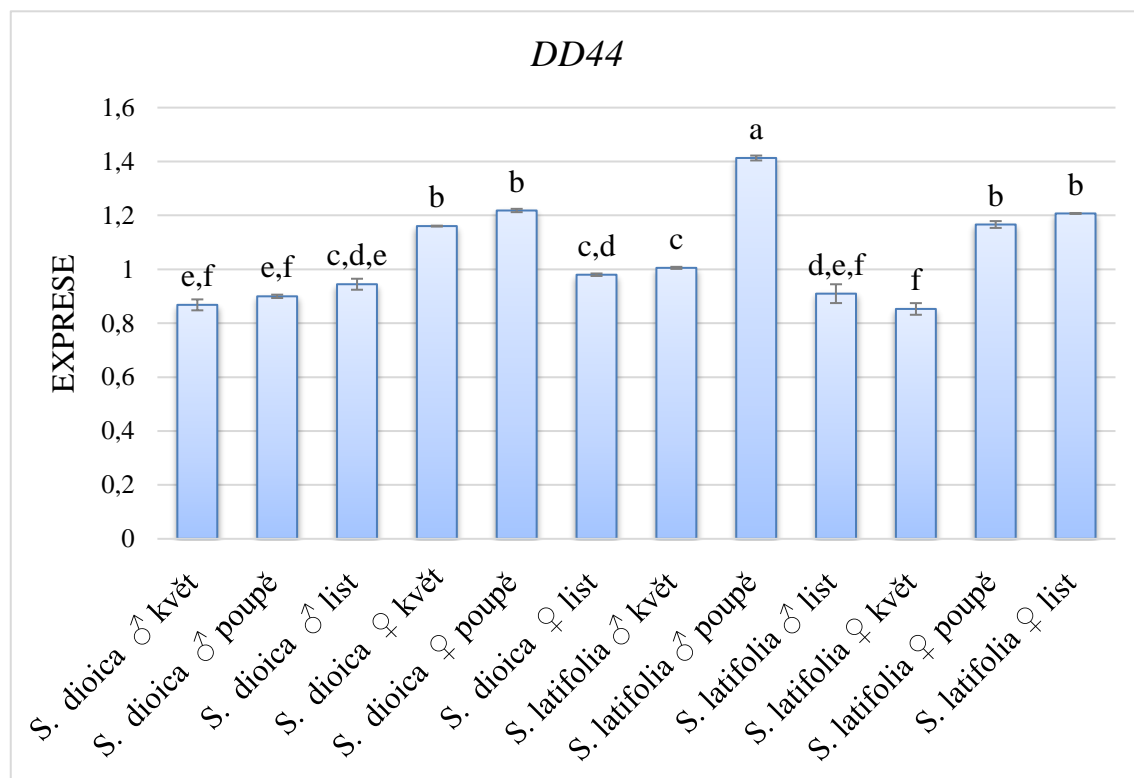
5.2.3 Vyhodnocení exprese studovaných genů v květu, poupěti a listu pro *S. latifolia* a *S. dioica*

Každý gen byl podroben RT-PCR pro zjištění exprese studovaných genů v jednotlivých částech rostliny: květu, poupěti a listu. Pro lepší přehlednost získaných výsledků byly vytvořeny grafy pro každý gen (Obr. 10, 11, 12). V grafu jsou porovnány exprese genů samčího (X a Y alely) a samičího (XX alely) pohlaví pro oba studované rostlinné druhy a pro každou rostlinnou část.

5.2.3.1 *Expresse genu DD44*

Expresse genu *DD44* u obou druhů pro samčí a samičí pohlaví ve třech částech rostliny (květ, poupě, list) je vyjádřena v grafu (Obr. 10).

Byly srovnány exprese v jednotlivých částech rostlin pro samčí a samičí pohlaví (Tab. 18).



Obr. 10: Porovnání exprese genu *DD44* pro *S. latifolia* a *S. dioica*, pro samčí a samičí pohlaví ve studovaných částech rostlin. Písmena znázorňují podobnost mezi jednotlivými expresními stavy.

Tab. 18: Porovnání expresních rozdílů genu *DD44* ve studovaných částech rostlin (květ, list, poupě)

Část rostliny <i>S. dioica</i>	Část rostliny <i>S. latifolia</i>	Rozdíl v expresi
Samčí květ	Samčí květ	Vyšší exprese <i>S. latifolia</i>
Samičí květ	Samičí květ	Vyšší exprese <i>S. dioica</i>
Samčí poupě	Samčí poupě	Vyšší exprese <i>S. latifolia</i>
Samičí poupě	Samičí poupě	Statisticky neprůkazný rozdíl
Samčí list	Samčí list	Statisticky neprůkazný rozdíl
Samičí list	Samičí list	Vyšší exprese <i>S. latifolia</i>

Byla srovnána exprese genu *DD44* pro studované části rostlin mezi pohlavími (Tab. 19).

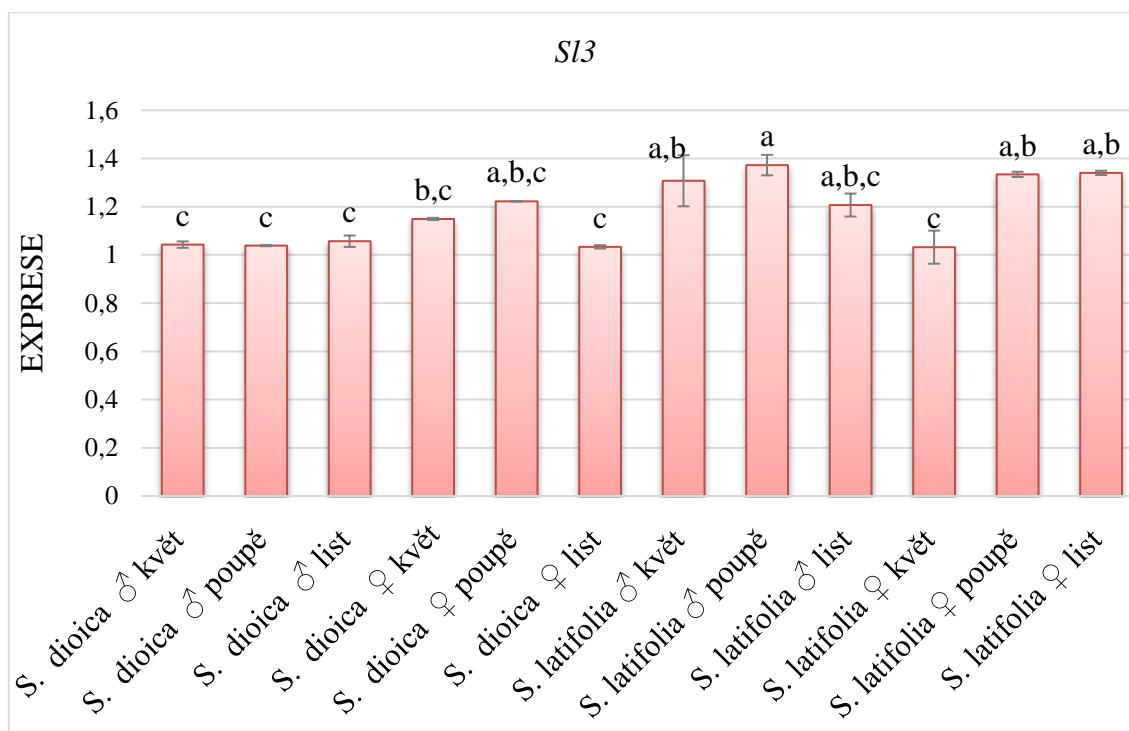
Tab. 19: Porovnání exprese genu *DD44* v květu, poupěti a listu mezi pohlavími

Samčí část rostliny	Samičí část rostliny	Expresse
<i>S. dioica</i> - květ	<i>S. dioica</i> - květ	Vyšší exprese v samičím květu
<i>S. latifolia</i> - květ	<i>S. latifolia</i> - květ	Vyšší exprese v samčím květu
<i>S. dioica</i> - poupě	<i>S. dioica</i> - poupě	Vyšší exprese v samičím poupěti
<i>S. latifolia</i> - poupě	<i>S. latifolia</i> - poupě	Vyšší exprese v samčím květu
<i>S. dioica</i> - list	<i>S. dioica</i> - list	Statisticky neprůkazný rozdíl
<i>S. latifolia</i> - list	<i>S. latifolia</i> - list	Vyšší exprese v samičím květu

5.2.3.2 Expresse genu *Sl3*

Expresse genu *Sl3* u obou druhů pro samčí a samičí pohlaví ve třech částech rostliny (květ, poupě, list) je vyjádřena v grafu (Obr. 11).

Byly srovnány exprese v jednotlivých částech rostlin pro samčí a samičí pohlaví u obou druhů (Tab. 20).



Obr. 11: Porovnání exprese genu *Sl3* pro *S. latifolia* a *S. dioica*, pro samčí a samičí pohlaví ve studovaných částech rostlin. Písmena znázorňují podobnost mezi jednotlivými expresními stavy.

Tab. 20: Porovnání expresních rozdílů genu *Sl3* ve studovaných částech rostlin (květ, list, poupě)

Část rostliny <i>S. dioica</i>	Část rostliny <i>S. latifolia</i>	Rozdíl v expresi
Samčí květ	Samčí květ	Vyšší exprese <i>S. latifolia</i>
Samičí květ	Samičí květ	Vyšší exprese <i>S. dioica</i>
Samčí poupě	Samčí poupě	Statisticky neprůkazný rozdíl
Samičí poupě	Samičí poupě	Vyšší exprese <i>S. latifolia</i>
Samčí list	Samčí list	Vyšší exprese <i>S. latifolia</i>
Samičí list	Samičí list	Statisticky neprůkazný rozdíl

Byla srovnána exprese genu *Sl3* pro studované části rostlin mezi pohlavími (Tab. 21).

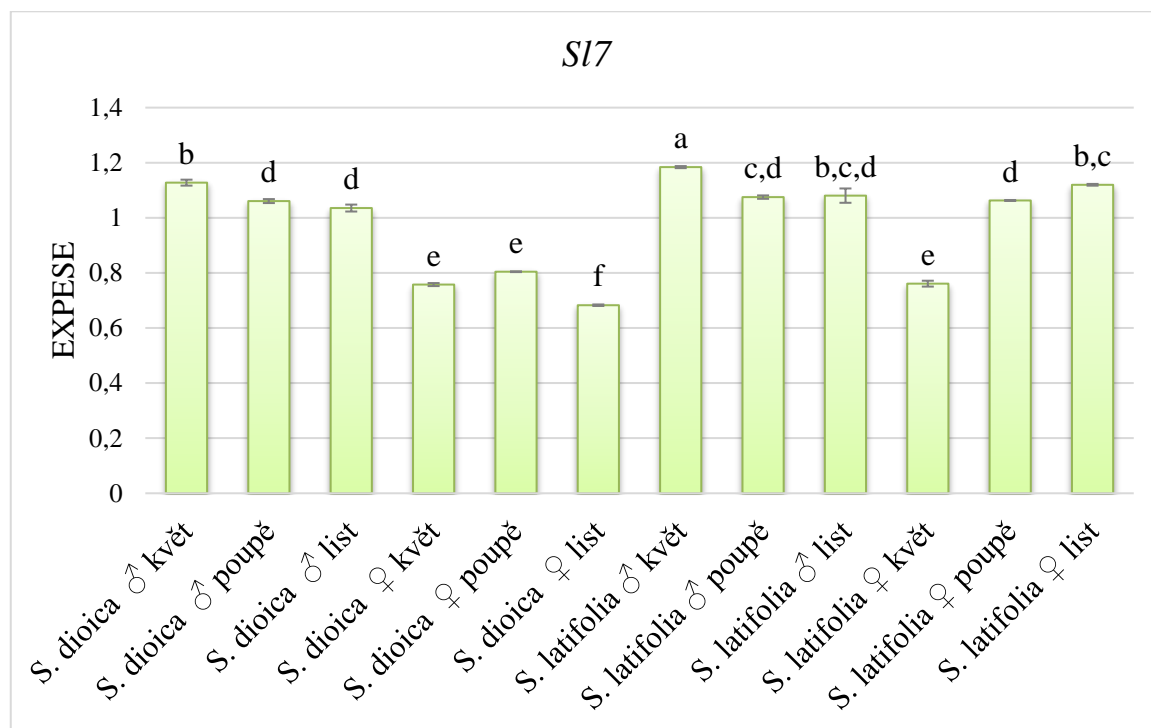
Tab. 21: Porovnání exprese genu *Sl3* v květu, poupěti a listu mezi pohlavími

Samčí část rostliny	Samičí část rostliny	Exprese
<i>S. dioica</i> - květ	<i>S. dioica</i> - květ	Vyšší exprese v samičím květu
<i>S. latifolia</i> - květ	<i>S. latifolia</i> - květ	Vyšší exprese v samčím květu
<i>S. dioica</i> - poupě	<i>S. dioica</i> - poupě	Vyšší exprese v samičím poupěti
<i>S. latifolia</i> - poupě	<i>S. latifolia</i> - poupě	Statisticky neprůkazný rozdíl
<i>S. dioica</i> - list	<i>S. dioica</i> - list	Statisticky neprůkazný rozdíl
<i>S. latifolia</i> - list	<i>S. latifolia</i> - list	Statisticky neprůkazný rozdíl

5.2.3.3 Exprese genu *SI7*

Expresa genu *SI7* u obou druhů pro samčí a samičí pohlaví ve třech částech rostliny (květ, poupě, list) je vyjádřena v grafu (Obr. 12).

Byly srovnány exprese v jednotlivých částech rostlin pro samčí a samičí pohlaví u obou druhů (Tab. 22).



Obr. 12: Porovnání exprese genu *SI7* pro *S. latifolia* a *S. dioica*, pro samčí a samičí pohlaví ve studovaných částech rostlin. Písmena znázorňují podobnost mezi jednotlivými expresními stavy.

Tab. 22: Porovnání expresních rozdílů genu *S17* ve studovaných částech rostlin (květ, list, poupě)

Část rostliny <i>S. dioica</i>	Část rostliny <i>S. latifolia</i>	Rozdíl v expresi
Samčí květ	Samčí květ	Vyšší exprese <i>S. latifolia</i>
Samičí květ	Samičí květ	Statisticky neprůkazný rozdíl
Samčí poupě	Samčí poupě	Statisticky neprůkazný rozdíl
Samičí poupě	Samičí poupě	Vyšší exprese <i>S. latifolia</i>
Samčí list	Samčí list	Statisticky neprůkazný rozdíl
Samičí list	Samičí list	Vyšší exprese <i>S. latifolia</i>

Byla srovnána exprese genu *S17* pro studované části rostlin mezi pohlavími (Tab. 23).

Tab. 23: Porovnání exprese genu *S17* v květu, poupěti a listu mezi pohlavími

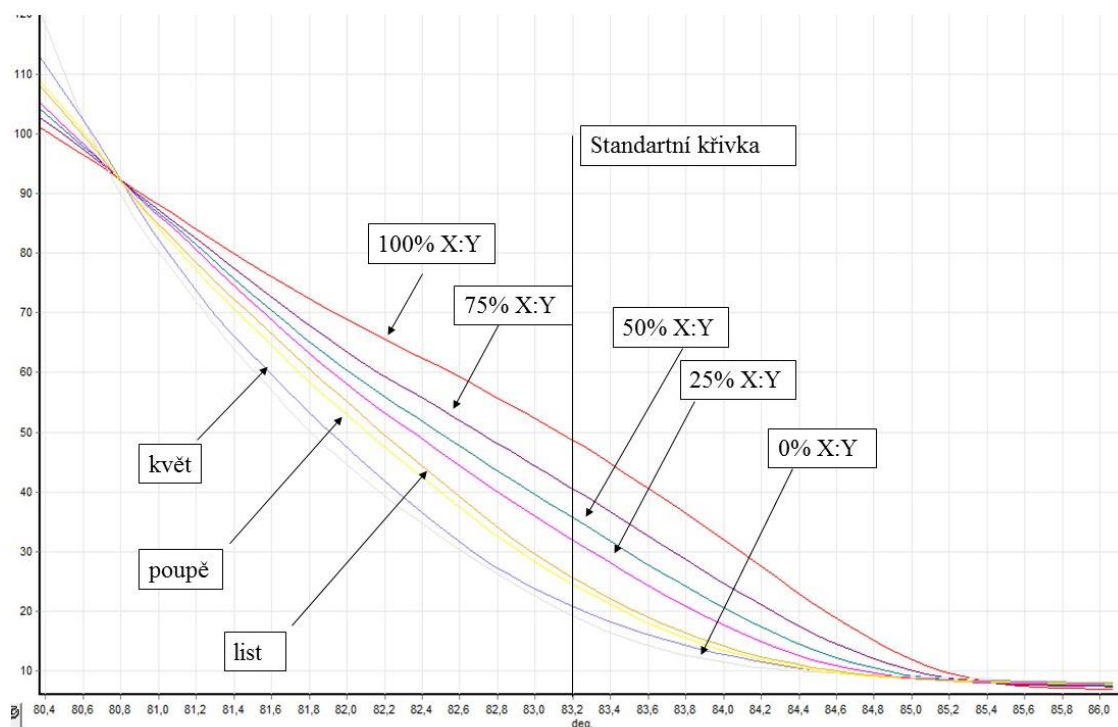
Samčí část rostliny	Samičí část rostliny	Exprese
<i>S. dioica</i> - květ	<i>S. dioica</i> - květ	Vyšší exprese v samčím květu
<i>S. latifolia</i> - květ	<i>S. latifolia</i> - květ	Vyšší exprese v samčím květu
<i>S. dioica</i> - poupě	<i>S. dioica</i> - poupě	Vyšší exprese v samčím poupěti
<i>S. latifolia</i> - poupě	<i>S. latifolia</i> - poupě	Statisticky neprůkazný rozdíl
<i>S. dioica</i> - list	<i>S. dioica</i> - list	Vyšší exprese v samčím listu
<i>S. latifolia</i> - list	<i>S. latifolia</i> - list	Statisticky neprůkazný rozdíl

5.2.4 HRM

Studované geny byly podrobeny High Resolution Melt (HRM) analýze. Jako referenční byly použity vzorky se známým poměrem samčí (Y) a samičí (X) alely (viz Materiál a metody). Oproti těmto vzorkům bylo zjištěno procentuální zastoupení exprese X k Y alele v jednotlivých částech rostlin.

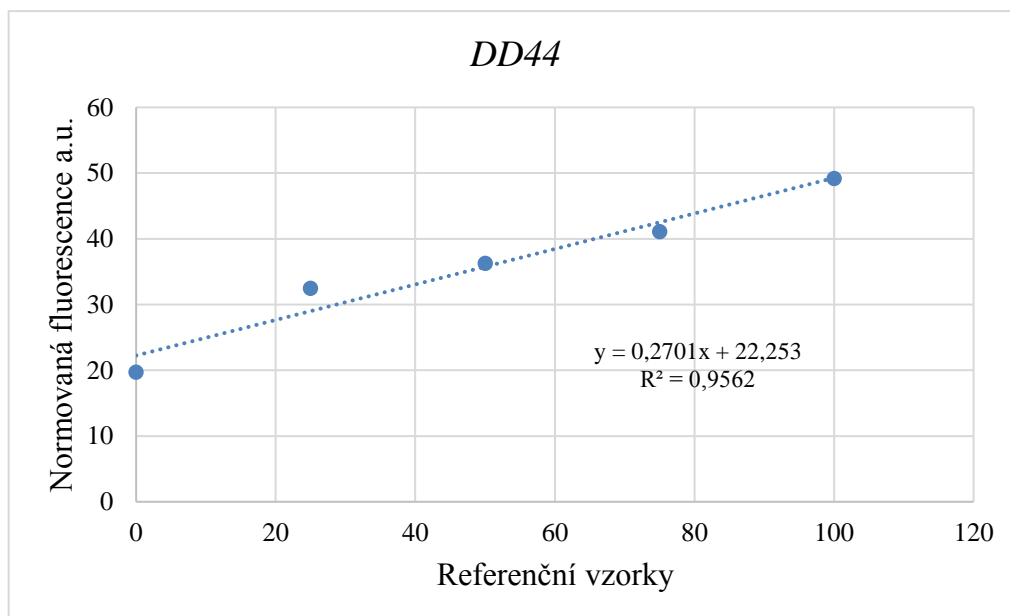
5.2.4.1 HRM pro DD44

Ze získaných dat z HRM analýzy byla zvolena standardní křivka tání pro bod T_m 50% (teplota kdy je denaturováno 50 % cDNA ve vzorku) a zjištěna fluorescence jednotlivých vzorků (Obr. 13). Byl vytvořen graf a získána rovnice regrese (Obr. 14) a na základě této rovnice bylo dopočítán procentuální poměr zastoupení X a Y alely (Tab. 24 a 25).



Obr. 13: Data získaná metodou HRM pro gen DD44 *S. latifolia*

Na základě různého zastoupení bází se lišil tvar křivky pro jednotlivé vzorky. Standartní křivka tání byla stanovena pro teplotu 83,2 °C.



Obr. 14: Graf pro referenční vzorky pro gen DD44 *S. latifolia*

Z tohoto grafu byla získána rovnice regrese, podle které bylo po té dopočítáno procentuální zastoupení exprese X a Y alely.

Tab. 24: Přepočítání normované fluorescence na procentuální poměr exprese X:Y pro gen DD44 *S. latifolia*

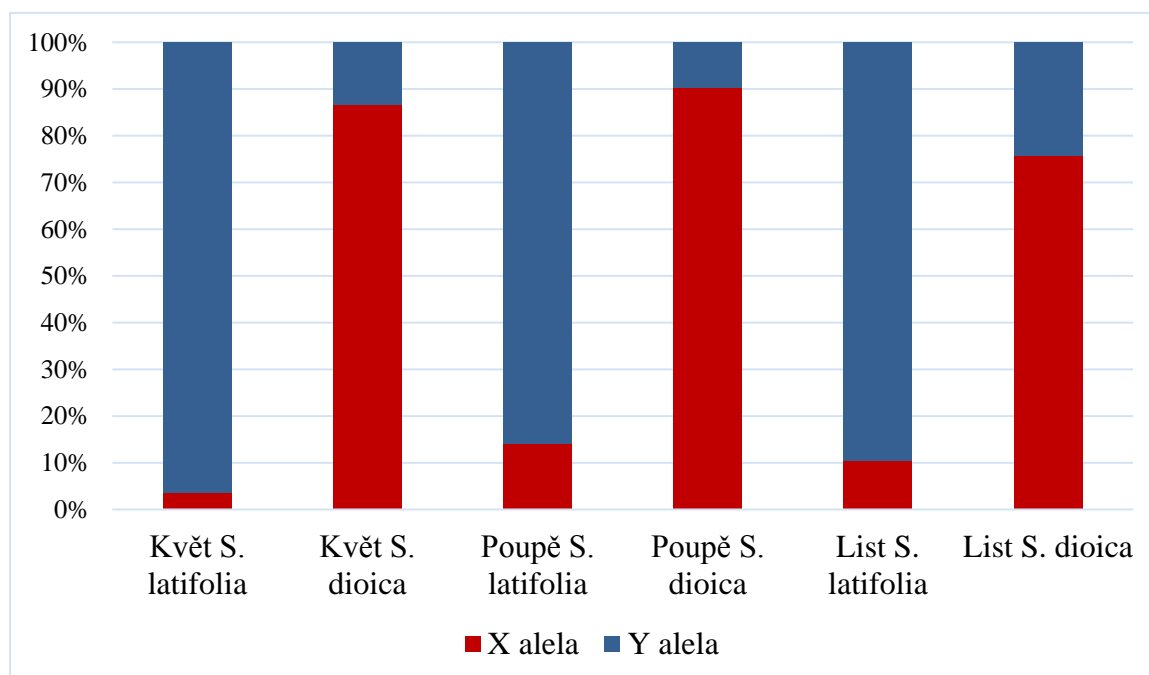
Vzorek	Normovaná fluorescence	Exprese X:Y (%)
100 % X:Y	49,17796	99,68514
75 % X:Y	41,11419	69,83038
50 % X:Y	36,2786	51,92744
25 % X:Y	32,5017	37,94411
0 % X:Y	19,72055	-9,37598
Květ	21,23562	-3,76669
Poupě	25,07148	10,43497
List	26,21971	14,68607

Pro gen *DD44 S. latifolia* a ostatní geny byla použita stejná metodika. Dále budou proto uvedeny pouze tabulky s výsledným procentuálním poměrem exprese X a Y alely.

Tab. 25: Přepočítaná normovaná fluorescence na procentuální poměr exprese X:Y pro gen DD44 *S. dioica*.

Vzorek	Normovaná fluorescence	Expresa X:Y (%)
100 % X:Y	71,35154294	102,2693753
75 % X:Y	69,45009729	92,29327015
50 % X:Y	65,41980113	71,14795978
0 % X:Y	50,02577016	-9,618204834
Květ	68,37832877	86,67014047
Poupě	69,05780723	90,23508514
List	66,28040536	75,66319707

Pro porovnání exprese mezi druhy pro jednotlivé části rostlin byl vytvořen graf (Obr. 15). Byla zjištěna výrazně vyšší exprese samičí alely (X alela) genu *DD44* ve všech studovaných částech rostlin *S. dioica* oproti *S. latifolia*.



Obr. 15: Porovnání exprese X a Y alely genu *DD44* v květu, poupěti a listu *S. latifolia* a *S. dioica*

5.2.4.2 HRM pro gen *Sl3*

Ze získaných dat z HRM analýzy byla zvolena standartní křivka tání pro bod T_m 50% (teplota kdy je denaturováno 50 % cDNA ve vzorku) a zjištěna fluorescence jednotlivých vzorků. Byl vytvořen graf a získána rovnice regrese a na základě této rovnice bylo dopočítán procentuální poměr zastoupení X a Y alely (Tab. 26 a 27).

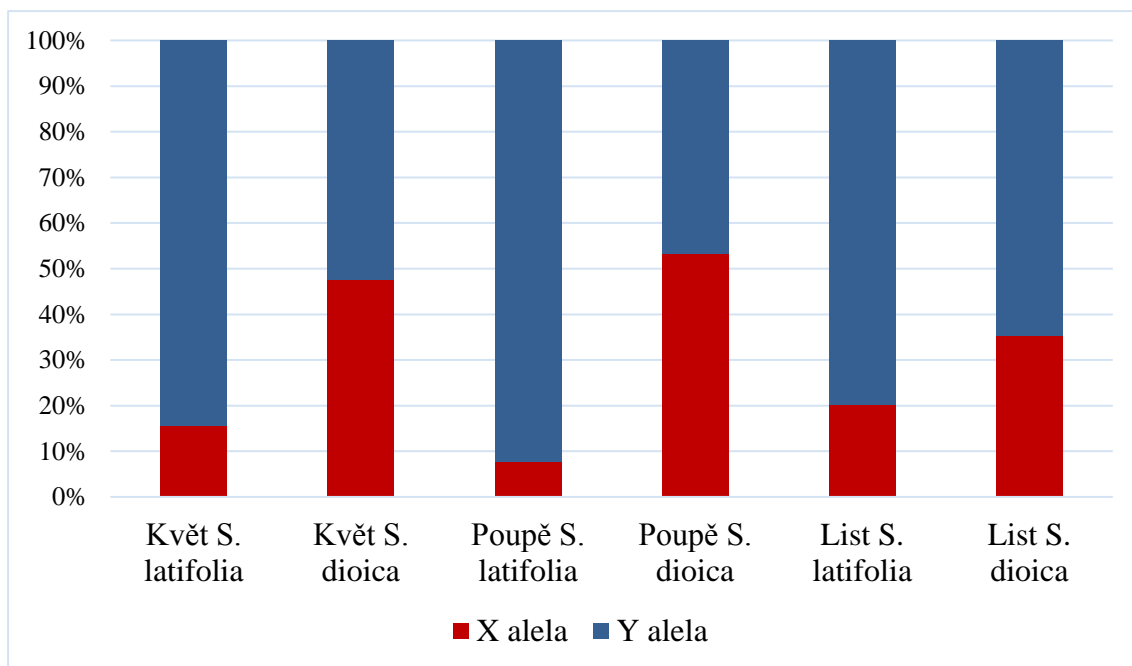
Tab. 26: Přepočítání normované fluorescence na procentuální poměr exprese X:Y pro gen *Sl3* *S. latifolia*.

Vzorek	Normovaná fluorescence	Expresa X:Y (%)
100 % X:Y	54,02136663	100,6755449
75 % X:Y	45,84134158	73,0962292
50 % X:Y	32,43934557	27,91080771
0 % X:Y	23,65310262	-1,71239846
Květ	28,77009291	15,53976033
Poupě	30,11842567	20,08572378
List	26,43876832	7,679596505

Tab. 27: Přepočítání normované fluorescence na procentuální poměr exprese X:Y pro gen *Sl3* *S. dioica*.

Vzorek	Normovaná fluorescence	Expresa X:Y (%)
100 % X:Y	41,75471124	109,3575792
75 % X:Y	21,2121671	33,63865498
50 % X:Y	17,58584434	20,27218703
0 % X:Y	15,26736015	11,72635516
Květ	24,95687607	52,5585106
Poupě	26,52019398	90,23508514
List	21,65206297	46,79618879

Pro porovnání exprese mezi druhy pro jednotlivé části rostlin byl vytvořen graf (Obr. 16). Byla zjištěna vyšší exprese samičí alely (X alela) genu *DD44* ve všech studovaných částech rostlin *S. dioica* oproti *S. latifolia*.



Obr. 16: Porovnání exprese X a Y alely genu SI3 v květu, poupěti a listu *S. latifolia* a *S. dioica*

5.2.4.3 HRM pro gen SI7

Ze získaných dat z HRM analýzy byla zvolena standartní křivka tání pro bod Tm 50% (teplota kdy je denaturováno 50 % cDNA ve vzorku) a zjištěna fluorescence jednotlivých vzorků. Byl vytvořen graf a získána rovnice regrese a na základě této rovnice bylo dopočítán procentuální poměr zastoupení X a Y alely (Tab. 28 a 29).

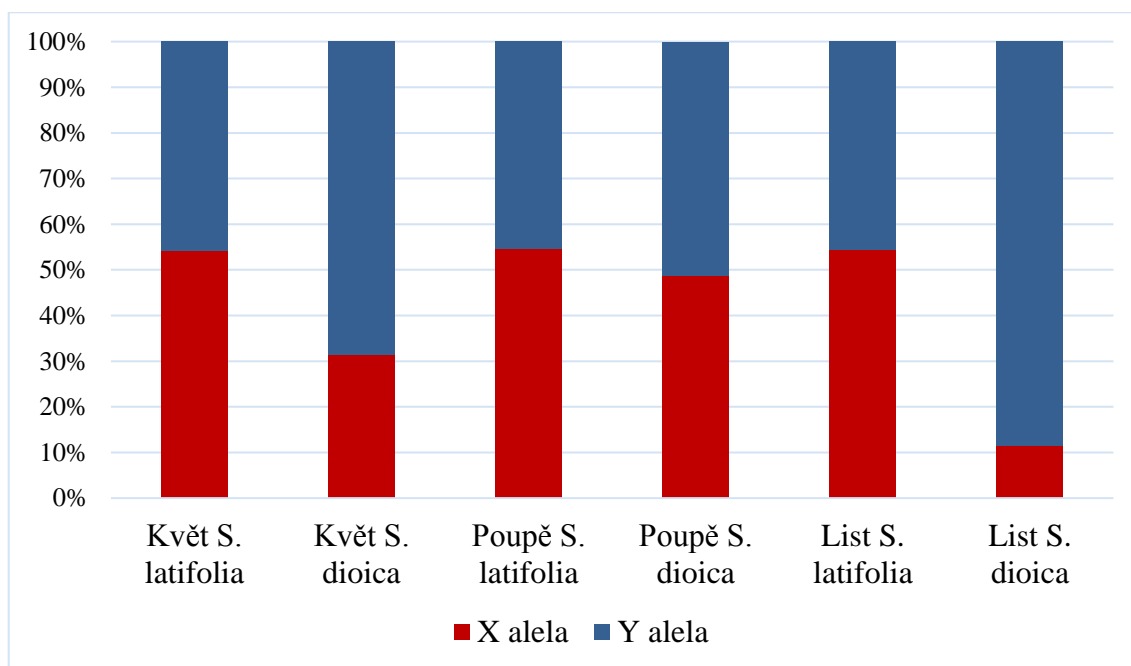
Tab. 28: Přepočítání normované fluorescence na procentuální poměr exprese X:Y pro gen SI7 *S. latifolia*.

Vzorek	Normovaná fluorescence	Expresa X:Y (%)
100 % X:Y	11,58029357	101,4526568
75 % X:Y	18,07095601	71,00864913
50 % X:Y	21,90420556	53,02905458
0 % X:Y	33,32170411	-0,523940464
Květ	21,67492213	45,89550717
Poupě	21,55772077	45,65015045
List	21,62261208	45,34578224

Tab. 29: Přepočítání normované fluorescence na procentuální poměr exprese X:Y pro gen *Sl7* *S. dioica*.

Vzorek	Normovaná fluorescence	Expresa X:Y (%)
100 % X:Y	63,318685	96,81468318
75 % X:Y	58,71025794	81,99182355
50 % X:Y	38,45888227	16,85391532
0 % X:Y	34,57719394	4,368587786
Květ	42,95310629	31,30944449
Poupě	48,41240576	48,78828291
List	36,7589245	11,38605499

Pro porovnání exprese mezi druhy pro jednotlivé části rostlin byl vytvořen graf (Obr. 17). Byla zjištěna nižší exprese samičí alely (X alela) genu *Sl7* ve všech studovaných částech rostlin *S. dioica* oproti *S. latifolia*.

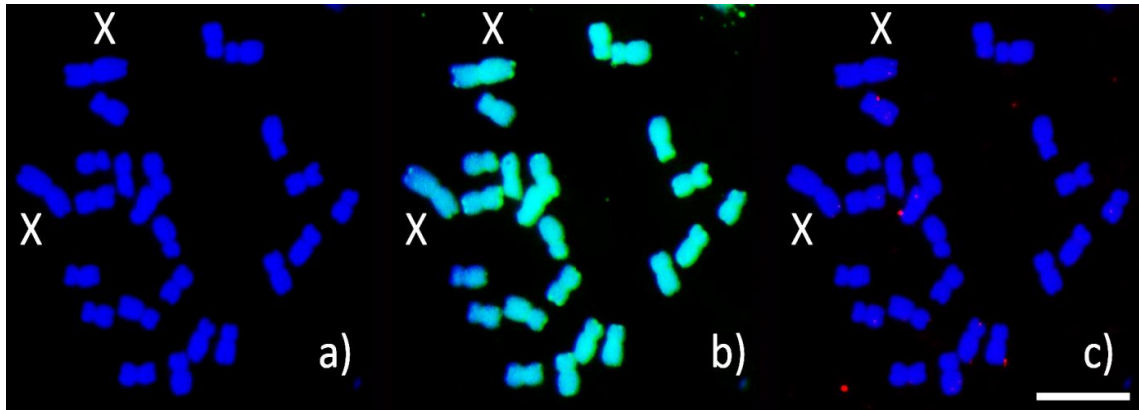


Obr. 17: Porovnání exprese X a Y alely genu *Sl7* v květu, poupěti a listu *S. latifolia* a *S. dioica*

5.3 FISH

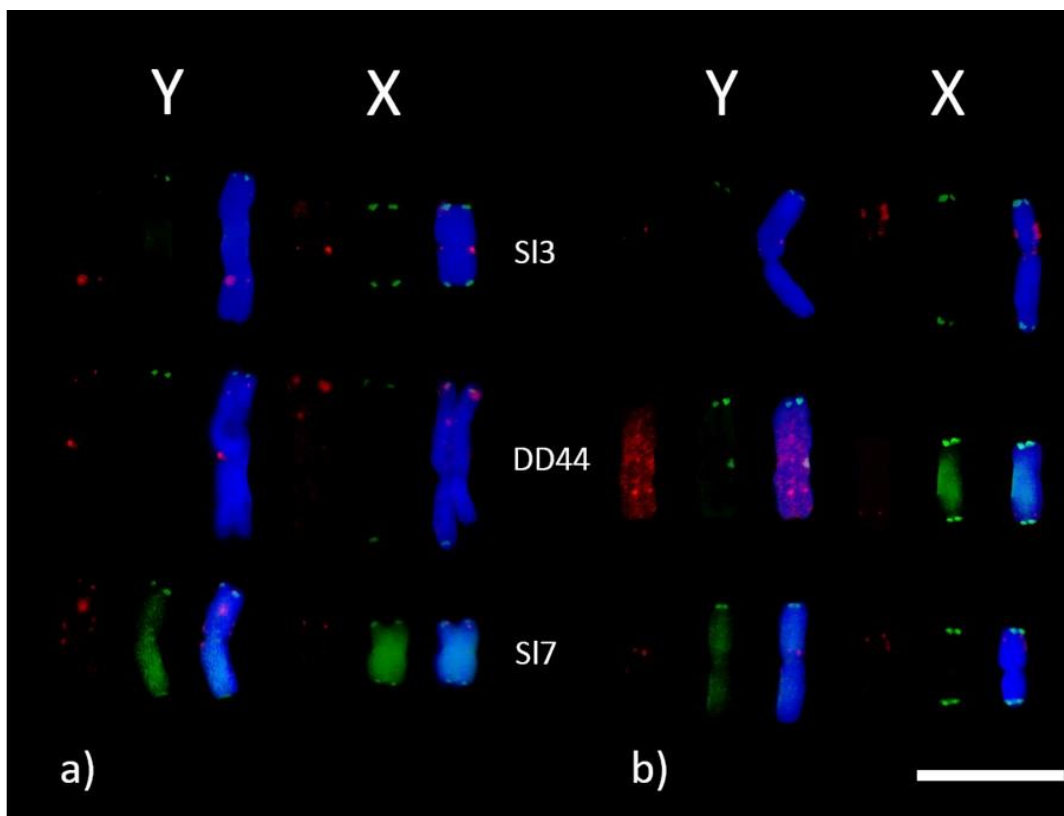
5.3.1 Vyhodnocení techniky FISH pro *S. latifolia* a *S. dioica*

Pomocí „low copy“ FISH techniky byly lokalizovány geny DD44, S13 a S17 na pohlavních chromozomech *S. latifolia* a *S. dioica*. Pro gen S13 je pro příklad uveden celý karyotyp. Pro přehlednost jsou dále uvedeny pouze chromozomy X a Y (Obr. 20).



Obr. 18: Lokalizace genu S13 na chromozomech *S. latifolia* U16.

Chromozomy obarvené v DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole)(a). Referenční subtelomerická sonda X43.1 značená Atto488 (SpectrumGreen) (b). Gen S13 byl značen Cyanin3 a signál byl finálně amplifikován Cy3-HRP konjugovanou protilátkou pomocí Tyr-FISH (c). Měřítko reprezentuje 10 μm .

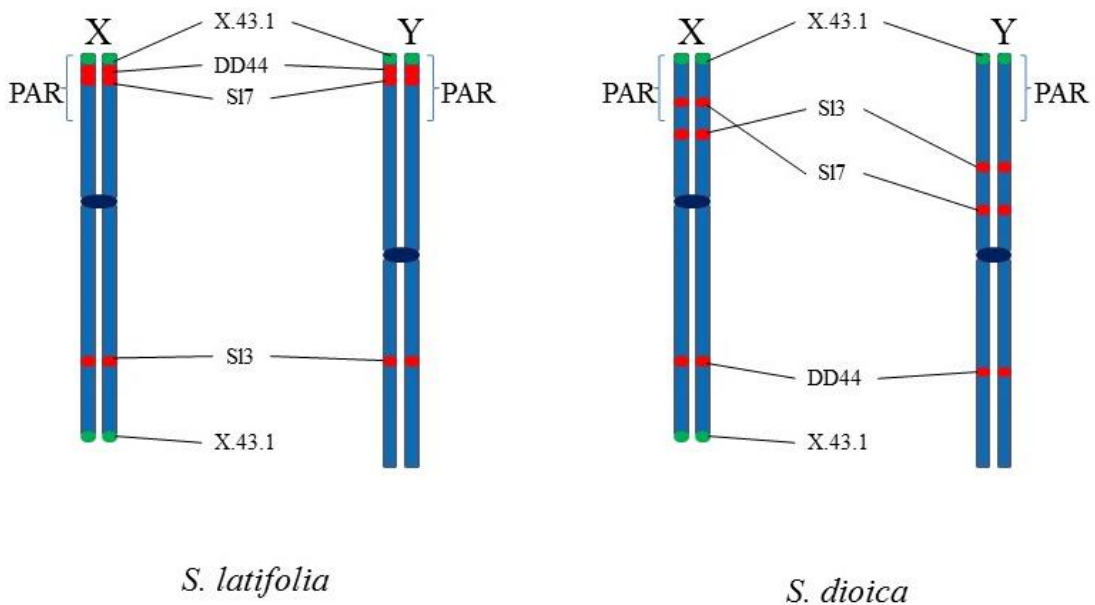


Obr. 20: Lokalizace genů S13, DD44 a S17 na pohlavních chromozomech *S. dioica* a *S. latifolia*

(a) Y a X chromozom *S. latifolia*. (b) Y a X chromozom *S. dioica*. Jednotlivé geny byly značeny Cyanin3 fluochromem a signál byl finálně amplifikován Cy3-HRP konjugovanou protilátkou pomocí Tyr-FISH. Referenční subtelomerická sonda X43.1 byla značena Atto488 (SpectrumGreen). Chromozomy jsou obarvené v DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole). Červeně je znázorněn studovaný gen, zeleně referenční repetice v telomerické oblasti x.43.1. Měřítko reprezentuje 10 μm .

5.3.2 Srovnání fyzikálních map *S. latifolia* a *S. dioica*

Na základě získaných výsledků pomocí techniky FISH byly vytvořeny fyzikální mapy pro *S. latifolia* a *S. dioica* (Obr. 20) a porovnány rozdíly v lokalizaci studovaných genů mezi druhy. Gen *DD44* se vyskytuje v pseudoautozomální oblasti na p raménku chromozomu u *S. latifolia*, zatímco u *S. dioica* je lokalizován na q raménku blíže telomerám. Gen *SI3* je lokalizován na q raménku u *S. latifolia*, ale u *S. dioica* je lokalizován na p raménku. Gen *SI7* se u *S. latifolia* vyskytuje na p raménku v těsné blízkosti genu *DD44*, u *S. dioica* je také lokalizován na p raménku ovšem v jiné části.



Obr. 20: Porovnání fyzikálních map pro *S. latifolia* a *S. dioica*

Červeně jsou znázorněny studované geny *DD44*, *SI3* a *SI7*. Zeleně jsou označeny repetice sloužící jako referenční sonda X. 43. 1. Tmavě modrou barvou jsou označeny centromery. PAR označuje pseudoautozomální oblast.

6 DISKUZE

V této práci bylo cílem identifikovat geny vázané na pohlaví v rostlině *S. dioica*, které byly již dříve popsány u *S. latifolia*. Dále byly studované geny podrobeny expresním analýzám a vizualizovány pomocí metodiky „low-copy FISH“.

6.1 Identifikace BAC klonů genů *DD44*, *SL3*, *SL7* pro *S. dioica*

Pomocí procházení BAC knihovny byl získán pouze jeden BAC klon. Tato nepříznivá situace mohla nastat z několika důvodů. Jedním z nich je, že knihovna nebyla dostatečně velká. Je velmi obtížné vytvořit takovou BAC knihovnu, která by pokrývala 100% genetické informace pro celý genom studovaného druhu. Z tohoto důvodu je možné, že ortologní geny pro použité sondy nebyly v knihovně přítomny. Možným důvodem je, že vzhledem k evolučnímu stádiu pohlavních chromozomů, kdy se předpokládá vyšší výskyt heterochromatinu a repetice, mohla být zhoršena možnost klonování těchto oblastí. Tento důvod by vysvětloval především nenalezení samčích alel. Další možností byla nedostatečná optimalizace screeningu BAC knihovny. Optimalizace metody ovšem nebyla předmětem této diplomové práce. Pro budoucí analýzy by bylo možné se pokusit metodu optimalizovat. Námí použitý postup je standardizován a používán v mnoha jiných laboratořích. Vzhledem k rozvoji sekvenčních technik se jeví jako pravděpodobnější možnost využití některých nových technologií, např. Oxford Nanopore. Tato technologie je vhodná pro získání dlouhých sekvencí, které by pak bylo možné porovnat se sekvencemi ze *S. dioica* a identifikovat tak dané geny *in silico*. Tato technologie se jeví jako pravděpodobná pro nahrazení BAC knihoven u druhu *S. latifolia* a *S. dioica*.

6.2 Expresní analýzy *DD44*, *SL3*, *SL7*

Vybrané geny byly analyzovány pomocí metod RT-PCR a HRM. Na základě dat získaných z těchto analýz byla porovnána exprese genů *DD44*, *SL3* a *SL7* mezi druhy *S. dioica* a *S. latifolia* a mezi jednotlivými pohlavími. Po té byla rozlišena exprese X a Y alely v samčích rostlinách obou druhů.

Míra exprese genu *DD44* byla zjištěna vyšší v samčím květu a poupěti u *S. latifolia*, zatímco v *S. dioica* byla míra exprese vyšší v samičím květu. Exprese v samičím poupěti a samčím listu neměla statisticky průkazný rozdíl. V porovnání samčího a samičího po-

hlaví, bylo zjištěno, že u *S. dioica* je exprese vyšší v samičích květech a poupatech, zatímco v listu nebyl statistický rozdíl. Oproti tomu v *S. latifolia* vykazoval gen *DD44* vyšší expresi v samčích květech a poupatech a v samičím listu. Exprese genu *DD44* byla studována v práci MOORE *et al.* (2003) pro *S. latifolia*. V této studii bylo zjištěno, že exprese není specifická pro rostlinné orgány. Byla vyslovena hypotéza, že gen *DD44* plní funkci „housekeeping“ genu a je potřeba pro správný vývoj celé rostliny. Naše výsledky však nasvědčují tomu, že gen *DD44* je specificky exprimován pro květ, poupě a list, stejně tak pro samčí a samičí pohlaví a rozdíly jsou detekovány i mezi studovanými druhy.

Z výsledků HRM analýzy bylo, zjištěno, že v rostlině *S. dioica* je výrazně vyšší exprese X alely oproti Y alele, zatímco v *S. latifolia* je situace opačná. Přestože jsou morfologicky květy kromě barvy téměř identické v samčích květech *S. dioica* lze občas najít útvary podobné samičím pestíkům (VAN NIGTEVECHT, 1966). To by mohlo naznačovat rozdíly na úrovni transkripce a stejně tak to, že *S. dioica* je v mladším evolučním stádiu. Výsledky u *S. latifolia* naznačují, že pro gen *DD44* vznikla pravděpodobně unikátní specializace na chromozomu Y a proto je exprimována převážně Y alela. Lze tedy říci, že se oba druhy vydaly odlišnou evoluční cestou. V práci MARAISE *et al.* (2007) byla zjištěna vyšší exprese X alely u *S. latifolia*. Jedním z důvodů odlišných výsledků může i být to, že v této práci ve srovnání s MARAISE *et al.* (2007) byla použita jiná populace studovaných rostlin. To by naznačovalo, že dynamika evoluce pohlavních chromozomů je mnohem vyšší, než samotná evoluce celého genomu.

Obdobně tak pro gen *Sl3* bylo zjištěno, že u rostliny *S. dioica* byla ve všech rostlinných částech vyšší exprese X alely oproti *S. latifolia*. Zde však není rozdíl mezi expresí X a Y alely tak markantní jako u genu *DD44*. Oproti tomu exprese Y alely ve všech částech rostliny *S. latifolia* je podobně vysoká jako u genu *DD44*. Gen *Sl3* byl také studován v práci MARAISE *et al.* (2007), a tyto výsledky naznačují opačný expresní poměr než u výsledků získaných v této práci.

Oproti tomu výsledky získané pro gen *Sl7* ukazují, že exprese X alely u *S. dioica* je nižší než exprese Y alely. Oproti tomu exprese X a Y alely v *S. latifolia* je velmi podobná. V práci MARAISE *et al.* (2007) byla detekována vyšší exprese X alely genu *Sl7* oproti Y alele.

Prací, které by se zabývaly expresními analýzami mezi těmito dvěma druhy je velmi málo. V současnosti jsou studie založeny především na masivním sekvenování. Naše studie naznačuje, že tyto studie odvozené od RNA-Seq analýz by měly být vždy potvrzeny detailnějšími analýzami na úrovni jednotlivých genů.

6.3 FISH

Ze získaných dat techniky FISH byla vytvořena fyzická mapa pro gen *DD44*, *Sl3* a *Sl7* pro oba studované rostlinné druhy. Gen *DD44* je u *S. latifolia* lokalizován na p raménku v těsné blízkosti telomer, zatímco u *S. dioica* na q raménku X a Y chromozomu. Gen *Sl3* je lokalizován u *S. latifolia* na q raménku a u *S. dioica* na p raménku X a Y chromozomu. Gen *Sl7* je lokalizován u *S. latifolia* na p raménku v těsné blízkosti genu *DD44* a telomer. U *S. dioica* je lokalizován také na p raménku chromozomu, ale blíže centromere oproti *S. latifolia*.

Fyzická mapa *S. latifolia* byla srovnána s genetickou mapou pro *S. latifolia*, získanou z práce BLAVET *et al.* (2015). Lokalizace genů je v obou mapách rozdílná. Genomická mapa byla vytvořena pomocí sekvenací BAC klonů. Tato metoda není příliš přesná, přesnější metoda byla publikována v práci KAZAMA *et al.* (2016), která je založena na mapování delečních mutantů. Ovšem v práci KAZAMA *et al.* (2016) byla testována jiná populace než v této práci. V práci HOWEL *et al.* (2010) byla zjištěna rozdílná lokalizace genů mezi jednotlivými populacemi a proto by bylo vhodné pro další práce využívat stejné populace.

Pro *S. dioica* dosud neexistuje žádná fyzická ani genetická mapa. Fyzická mapa uvedená v této práci je první mapou pro *S. dioica* vůbec, proto jsou tyto výsledky unikátní.

V porovnání s fyzikální mapou *S. latifolia* pravděpodobně došlo k rozdílným evolučním procesům na pohlavních chromozomech. Pro další práci by bylo dobré použít další „low-copy“ sekvence pro přesnější identifikaci evolučních procesů.

Na základě získaných výsledků lze říci, že ačkoli jsou si rostliny na morfologické úrovni velmi podobné, studie na molekulární úrovni ukázaly velké rozdíly mezi oběma druhy.

7 ZÁVĚR

S. latifolia a *S. dioica* nabízejí jedinečnou možnost studovat evoluci a vznik pohlavních chromozomů u blízce příbuzných druhů v rámci jednoho druhu. Podobnost těchto dvou rostlin lze přirovnat k podobnosti člověka a šimpanze. Díky ranému stádiu evoluce jejich pohlavních chromozomů jsou ideálními modely pro studium evoluce dvoudomosti a pohlavních chromozomů. Mezi mnoha studiemi založených na masivním sekvenování, přináší podrobná analýzy jednotlivých genů nový náhled na tuto problematiku.

V této práci byly studovány geny vázané na pohlaví *DD44*, *SI3* a *SI7*. Tyto geny byly relativně nedávno popsány u *S. latifolia*. Byla analyzována jejich exprese v květu, poupěti a listu pro každé pohlaví u obou druhů. Byla také rozlišena exprese X a Y alely v samčích rostlinách pro oba druhy. Ačkoli jsou rostliny morfologicky téměř totožné, liší se hlavně v barvě květu. Analýza na molekulární úrovni přinesla zajímavé výsledky z hlediska exprese genů a využití krátkých sekvencí pro mapování studovaných druhů. Expresce alel X a Y v květu, poupěti a listu se mezi studovanými rostlinami lišila. Dá se tedy usuzovat, že pro obě rostliny existují rozdílné evoluční procesy. Na základě srovnání s výsledky s ostatními pracemi se dá usuzovat, že významné rozdíly mohou být i mezi populacemi téhož druhu. Tato práce je první, která se zabývá expresními analýzami genů u *S. dioica* a výsledky zde uvedené jsou jedinečné.

Studované geny byly rovněž lokalizovány technikou Tyr-FISH. Na základě získaných výsledků byla vytvořena fyzická mapa pro studované geny. Srovnání fyzických map *S. latifolia* a *S. dioica* ukazují rozdílné evoluční procesy na obou chromozomech. Zároveň byla vytvořena vůbec první fyzická mapa pro *S. dioica*. Fyzická mapa *S. latifolia* byla porovnána s genetickou mapou pro *S. latifolia*. Genetická mapa se ukázala jako nepřiliš přesná jak bylo ukázáno pro ostatní druhy jako např. ječmen, kde rozdílnost mezi genetickou a fyzickou mapou může být až 60%. To nasvědčuje tomu, že nelze studovat geny jen za použití sekvenčních dat.

Práce přinesla zcela nové a unikátní výsledky v oblasti evoluce pohlavních chromozomů a studia genů vázaných na pohlaví. Otevírá tak mnoho možností pro další studium.

8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. AGILENT TECHNOLOGIES, 2015: *Prime-It II Random Primer Labeling Kit - Instruction Manual*. Databáze online [cit. 2017-04-20] Dostupné z: <http://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/300385.pdf>
2. AKAGI T., HENRY I. M., TAO R., COMAI L., 2014: A Y-chromosome–encoded small RNA acts as a sex determinant in persimmons. *Science*, 346(6209): 646-650. ISSN: 1095-9203
3. ARYAL R., MING R., 2014: Sex determination in flowering plants: papaya as a model system. *Plant Science*, 217: 56-62. ISSN: 0168 9452
4. ATANASSOV I., DELICHERE C., FILATOV D. A., CHARLESWORTH D., NEGRUTIU I., MONÉGER F., 2001: Analysis and evolution of two functional Y-linked loci in a plant sex chromosome system. *Molecular Biology and Evolution*, 18(12): 2162-2168. ISSN: 1537-1719
5. BACHTROG D., KIRKPATRICK M., MANK J. E., MCDANIEL S. F., PIRES J. C., RICE W., VALENZUELA N., 2011: Are all sex chromosomes created equal? *TRENDS in Genetics*, 27(9): 350-357. ISSN: 0168 9525
6. BERGERO R., FORREST A., KAMAU E., CHARLESWORTH D., 2007: Evolutionary strata on the X chromosomes of the dioecious plant *Silene latifolia*: evidence from new sex-linked genes. *Genetics*, 175(4): 1945-1954. ISSN: 1943 2631
7. BERGERO R., CHARLESWORTH, D., 2009: The evolution of restricted recombination in sex chromosomes. *Trends in Ecology & Evolution*, 24(2): 94-102. ISSN: 0169-5347
8. BERGERO R., CHARLESWORTH D., 2011: Preservation of the Y transcriptome in a 10-million-year-old plant sex chromosome system. *Current Biology*, 21(17): 1470-1474. ISSN: 0960-9822

9. BERNASCONI G., ANTONOVICS J., BIÈRE A., CHARLESWORTH D., DELPH L. F., FILATOV, D. & PANNELL J. R., 2009: *Silene* as a model system in ecology and evolution. *Heredity*, 103(1): 5-14. ISSN: 0018-067X
10. BERTANI, G., 1951: STUDIES ON LYSOGENESIS I.: The Mode of Phage Liberation by Lysogenic *Escherichia coli* 1. *Journal of bacteriology*, 62(3): 293. ISSN: 1098-5530
11. BIOLINE GMBH, 2017: *SensiFAST™ HRM Kit*. Databáze online [cit. 2017-04-20] Dostupné z: http://www.bioline.com/us/downloads/dl/file/id/2705/pi-50192_sensi-fast_hrm_kit.pdf
12. BLAVET N., BLAVET H., MUYLE A., KÄFER J., CEGAN R., DESCHAMPS C., CHARLESWORTH, D., 2015: Identifying new sex-linked genes through BAC sequencing in the dioecious plant *Silene latifolia*. *BMC genomics*, 16(1): 546. ISSN: 1471-2164
13. BYERS R. E., BAKER L. R., SELL H. M., HERNER R. C., DILLEY D. R., 1972: Ethylene: a natural regulator of sex expression of *Cucumis melo* L. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 69(3): 717-720. ISSN: 1091-6490
14. CIBULKA R., 2012: *SILENE DIOICA* (L.) Clairv. – silenka dvoudomá / silenka červená. In: Botany [vid. 2017_3_14]. Dostupné z: botany.cz/cs/silene-dioica/
15. CHARLESWORTH D., 2002: Plant sex determination and sex chromosomes. *Heredity*, 88(2): 94-101. ISSN: 0018-067X
16. CHARLESWORTH D., MANK J. E., 2010: The birds and the bees and the flowers and the trees: lessons from genetic mapping of sex determination in plants and animals. *Genetics*, 186(1): 9-31. ISSN: 1943-2631
17. CHERIF E., ZEHDİ S., CASTILLO K., CHABRILLANGE N., ABDOULKADE S., PINTAUD J. C., ABERLENC-BERTOSSI F., 2013: Male-specific DNA markers provide genetic

- evidence of an XY chromosome system, a recombination arrest and allow the tracing of paternal lineages in date palm. *New Phytologist*, 197(2): 409-415. ISSN: 1469-8137
18. DESFEUX C., MAURICE S., HENRY J. P., LEJEUNE B., & GOUYON P. H., 1996: Evolution of reproductive systems in the genus *Silene*. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 263(1369): 409-414. ISSN: 1471-2954
19. DOUST J. L., O'BRIEN G., DOUST L. L., 1987: Effect of density on secondary sex characteristics and sex ratio in *Silene alba* (Caryophyllaceae). *American Journal of Botany*, 40-46. ISSN: 1537-2197
20. FAUX A. M., DRAYE X., FLAMAND M. C., OCCRE A., BERTIN P., 2016: Identification of QTLs for sex expression in dioecious and monoecious hemp (*Cannabis sativa* L.). *Euphytica*, 209(2): 357-376. ISSN: 1573-5060
21. FILATOV D. A., CHARLESWORTH D., 2002: Substitution rates in the X-and Y-linked genes of the plants, *Silene latifolia* and *S. dioica*. *Molecular Biology and Evolution*, 19(6): 898-907. ISSN: 1537-1719
22. FILATOV D. A., 2005: Substitution rates in a new *Silene latifolia* sex-linked gene, *SlssX/Y*. *Molecular biology and evolution*, 22(3): 402-408. ISSN: 1537-1719
23. GERALDES A., HEFER C. A., CAPRON A., KOLOSOVA N., MARTINEZ-NUÑEZ F., SOOLANAYAKANAHALLY R. Y., CRONK Q. C., 2015: Recent Y chromosome divergence despite ancient origin of dioecy in poplars (*Populus*). *Molecular ecology*, 24(13): 3243-3256. ISSN: 1365-294X
24. GOLENBERG E. M., WEST N. W., 2013: Hormonal interactions and gene regulation can link monoecy and environmental plasticity to the evolution of dioecy in plants. *American journal of botany*, 100(6): 1022-1037. ISSN: 1537-2197

25. GRABOWSKA-JOACHIMIAK A., KULA A., KSIĄŻCZYK T., CHOJNICKA J., SLIWINSKA E., JOACHIMIAK A. J., 2015: Chromosome landmarks and autosome-sex chromosome translocations in *Rumex hastatulus*, a plant with XX/XY1Y2 sex chromosome system. *Chromosome Research*, 23(2): 187-197. ISSN: 1573-6849
26. HANDLEY L. J. L., CEPLITIS H., ELLEGREN H., 2004: Evolutionary strata on the chicken Z chromosome: implications for sex chromosome evolution. *Genetics*, 167(1): 367-376. ISSN: 1943-2631
27. HOBZA R., KUBAT Z., CEGAN R., JESIONEK W., VYSKOT B., KEJNOVSKY E., 2015: Impact of repetitive DNA on sex chromosome evolution in plants. *Chromosome Research*, 23(3): 561-570. ISSN: 1573-6849
28. HOUSKA J., 2009: *SILENE LATIFOLIA* subsp. *ALBA* (Miller) Greuter et Burdet – silenka širolistá bílá / silenka biela pravá. In: Botany [vid. 2017_3_14]. Dostupné z: botany.cz/cs/silene-latifolia-alba/
29. HOWELL E. C., ARMSTRONG S. J., FILATOV D. A., 2011: Dynamic gene order on the *Silene latifolia* Y chromosome. *Chromosoma*, 120(3), 287-296. ISSN: 1432-0886
30. JANSSON S., DOUGLAS C. J., 2007: *Populus*: a model system for plant biology. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 58: 435-458. ISSN: 1545-2123
31. JUAREZ C., BANKS J. A., 1998: Sex determination in plants. *Current opinion in plant biology*, 1(1): 68-72. ISSN: 1369-5266
32. KARAMIAN R., 2015: The study of saponin contents in the aerial parts and roots of three *Silene* L. species. *Journal of Science Kharazmi University*, 15(2): 1-4. ISSN: 1686-8222

33. KAZAMA Y., ISHII K., AONUMA W., IKEDA T., KAWAMOTO H., KOIZUMI A. ABE T., 2016: A new physical mapping approach refines the sex-determining gene positions on the *Silene latifolia* Y-chromosome. *Scientific reports*, 6. ISSN 2045-2322
34. KÄFER J., MARAIS G. A., PANNELL J. R., 2017: On the rarity of dioecy in flowering plants. *Molecular Ecology*, 26(5): 1225-1241. ISSN: 1365-294X
35. LI S. F., ZHANG G. J., YUAN J. H., DENG C. L., GAO W. J., 2016: Repetitive sequences and epigenetic modification: inseparable partners play important roles in the evolution of plant sex chromosomes. *Planta*, 243(5): 1083-1095. ISSN: 1432-2048
36. MACHEREY-NAGEL, 2015: *RNA isolation - User manual*. [cit. 2017-04-20]
Dostupné z: http://www.mn-net.com/Portals/8/attachments/Redakteure_Bio/Protocols/RNA%20and%20mRNA/UM_TotalRNA.pdf
37. MAMADALIEVA N. Z., LAFONT R., & WINK M., 2014: Diversity of secondary metabolites in the genus *Silene* L.(Caryophyllaceae) - Structures, distribution, and biological properties. *Diversity*, 6(3): 415-499. ISSN 1424-2818
38. MANZANO S., MEGÍAS Z., MARTÍNEZ C., GARCÍA A., AGUADO E., CHILEH T., KUBÁT, Z., 2017: Overexpression of a flower-specific aerolysin-like protein from the dioecious plant *Rumex acetosa* alters flower development and induces male sterility in transgenic tobacco. *The Plant Journal*, 89(1): 58-72. ISSN: 1365-313X
39. MARTIN A., TROADEC C., BOUALEM A., RAJAB M., FERNANDE R., MORIN H., BENDAHDANE A., 2009: A transposon-induced epigenetic change leads to sex determination in melon. *Nature*, 461(7267): 1135-1138. ISSN: 0028-0836
40. MATSUNAGA S., 2006: Sex chromosome-linked genes in plants. *Genes & genetic systems*, 81(4): 219-226. ISSN: 1880-5779
41. MOORE R. C., KOZYREVA O., LEBEL-HARDENACK S., SIROKY J., HOBZA R., VYSKOT B., GRANT S. R., 2003: Genetic and functional analysis of DD44, a sex-linked

- gene from the dioecious plant *Silene latifolia*, provides clues to early events in sex chromosome evolution. *Genetics*, 163(1): 321-334. ISSN: 1943-2631
42. MONÉGER F., 2007: Sex Determination in Plants. *Plant signaling & behavior*, 2(3): 178-179. ISSN: 1559-2316
43. NICOLAS M., MARAIS G., HYKELOVA V., JANOUSEK B., LAPORTE V., VYSKOT B., MONÉGER F., 2004: A gradual process of recombination restriction in the evolutionary history of the sex chromosomes in dioecious plants. *PLoS Biol*, 3(1): e4. ISSN: 1545-7885
44. PAPADOPULOS A. S., CHESTER, M., RIDOUT K., FILATOV D. A., 2015: Rapid Y degeneration and dosage compensation in plant sex chromosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(42): 13021-13026. ISSN: 1091-6490
45. PERKINELMER, 2017: *TSA plus Fluorescence Kits*. Databáze online [cit. 2017-04-20] Dostupné z: https://www.perkinelmer.com/lab-solutions/resources/docs/MAN_TSA_Plus_Fluorescence_Manual_V1-0.pdf
46. QIAGEN, 2006: *QIAquick® Spin Handbook*. Databáze online [cit. 2017-04-20] Dostupné z: http://mvz.berkeley.edu/egl/inserts/QIAquick_Spin_Handbook.pdf
47. QIAGEN, 2011: *Quick-Start Protocol*. Databáze online [cit. 2017-04-20] Dostupné z: <https://www.qiagen.com/cz/search.aspx?q=Quick-StartProtocol#&&pg=1>
48. RICE W. R., 1996: Evolution of the Y sex chromosome in animals. *Bioscience*, 46(5): 331-343. ISSN: 1525-3244
49. RENNER S. S., RICKLEFS R. E., 1995: Dioecy and its correlates in the flowering plants. *American Journal of Botany*, 596-606. ISSN: 1537-2197

50. ROSS M. T., GRAFHAM D. V., COFFEY A. J., SCHERER S., MCLAY K., MUZNY D., FRANKISH, A., 2005: The DNA sequence of the human X chromosome. *Nature*, 434(7031): 325-337. ISSN: 0028-0836
51. SLANCAROVA V., ZDANSKA J., JANOUSEK B., TALIANOVA M., ZSCHACH C., ZLUVOVA J., OXELMAN B., 2013: Evolution of sex determination systems with heterogametic males and females in *Silene*. *Evolution*, 67(12): 3669-3677. ISSN: 1558-5646
52. TANAKA J., YANO K., AYA K., HIRANO K., TAKEHARA S., KOKETSU E., MATSUOKA M., 2014: Antheridiogen determines sex in ferns via a spatiotemporally split gibberellin synthesis pathway. *Science*, 346(6208): 469-473. ISSN: 1095-9203
53. TEITEL Z., PICKUP M., FIEL D. L., BARRETT, S. C. H., 2016: The dynamics of resource allocation and costs of reproduction in a sexually dimorphic, wind-pollinated dioecious plant. *Plant Biology*, 18(1): 98-103. ISSN: 1438-8677
54. THERMO FISHER SCIENTIFIC, 2016: *High-Capacity RNA-to-cDNA™ Kit*. Databáze online [cit. 2017-04-20] Dostupné z: https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/cms_047249.pdf
55. THERMO FISHER SCIENTIFIC, 2016: *BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit User Guide*. Databáze online [cit. 2017-04-20] Dostupné z: https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/cms_081527.pdf
56. THERMO FISHER SCIENTIFIC, 2017: *TURBO DNA-free™ Kit User Guide*. Databáze online [cit. 2017-04-20] Dostupné z: https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/cms_055740.pdf
57. VAN NIGTEVECHT G., 1966: Genetic studies in dioecious *Melandrium*. II. Sex determination in *Melandrium album* and *Melandrium dioicum*. *Genetica*, 37: 307-344. ISSN: 1573-6857

58. VANDESOMPELE J., DE PRETER K., PATTYN F., POPPE B., VAN ROY N., DE PAEPE A., SPELEMAN F., 2002: Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome biology*, 3(7): 0034-1. ISSN: 1474-760X
59. VERGARA D., BAKER H., CLANCY K., KEEPERS K. G., MENDIETA J. P., PAULI C. S., KANE N. C., 2017: Genetic and genomic tools for *Cannabis sativa*. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 1-14. ISSN 0735-2689
60. VYSKOT B., HOBZA R., 2004: Gender in plants: sex chromosomes are emerging from the fog. *TRENDS in Genetics*, 20(9): 432-438. ISSN: 0168-9525
61. VYSKOT B., HOBZA R.: 2015: The genomics of plant sex chromosomes. *Plant Science*, 236: 126-135. ISSN: 0168-9452

9 SEZNAM OBRÁZKU A TABULEK

Obr. 1: Hlavní stádia evoluce pohlavních chromozomů

Obr. 2: Schématický nákres jednotlivých kroků evoluce pohlavních chromozomů

Obr. 3: Silene latifolia Britten & Rendle, 1907 (silenka širokolistá)

Obr. 4: Silene dioica (L.) Clairv., 1811 (silenka dvoudomá)

Obr. 5: Evoluční straty u Silene latifolia

Obr. 6: pCRTM2.1 vektor (Invitrogen)

Obr. 7: Tyramidová amplifikace a vazba aktivovaných radikálů na tyrosinová residua

Obr. 8: Alighment pro získané sekvence genu DD44 pro S. latifolia

Obr. 9: Průměrná stabilita exprese studovaných referenčních genů

Obr. 10: Porovnání exprese genu DD44 pro S. latifolia a S. dioica, pro samčí a samičí pohlaví ve studovaných částech rostlin

Obr. 11: Porovnání exprese genu S13 pro S. latifolia a S. dioica, pro samčí a samičí pohlaví ve studovaných částech rostlin

Obr. 12: Porovnání exprese genu S17 pro S. latifolia a S. dioica, pro samčí a samičí pohlaví ve studovaných částech rostlin

Obr. 13: Data získaná metodou HRM pro gen DD44 S. latifolia

Obr. 14: Graf pro referenční vzorky pro gen DD44 S. latifolia

Obr. 15: Porovnání exprese X a Y alely genu DD44 v květu, poupěti a listu S. latifolia a S. dioica

Obr. 16: Porovnání exprese X a Y alely genu S13 v květu, poupěti a listu S. latifolia a S. dioica

Obr. 17: Porovnání exprese X a Y alely genu S17 v květu, poupěti a listu S. latifolia a S. dioica

Obr. 18: - Lokalizace genu S13 na chromozomech S. latifolia U16.

Obr. 20: Porovnání fyzikálních map pro S. latifolia a S. dioica

Tab. 1: Přehled studovaných dvoudomých rostlin (VYSKOT, HOBZA, 2004).

Tab. 2: Reakční směs pro PCR amplifikaci

Tab. 3: Teplotní profil PCR amplifikace

Tab. 4: Seznam a sekvence použitých primerů

Tab. 5: Reakční směs pro ligaci

Tab. 6: Reakční směs pro přečištění amplifikované DNA pomocí ExoSap

Tab. 7: Složení sekvenační reakce

Tab. 8: Program pro sekvenační reakci. Kroky 2., 3., 4., opakovány 60x.

Tab. 9 : Seznam a sekvence použitých primerů pro referenční geny

Tab. 10: Poměr X a Y alel v jednotlivých vzorcích

Tab. 11 : Seznam a sekvence primerů pro použité geny pro expresní analýzy

Tab. 12: Složení reakce pro RT-PCR a HRM

Tab. 13: Teplotní protokol pro pre-amplifikaci

Tab. 14 : Seznam a sekvence primerů pro použité geny pro metodu FISH

Tab. 15: Složení reakční směsi pro MyFi™ DNA polymerázu

Tab. 16: Teplotní profil reakce

Tab. 17: Složení reakční směsi pro NICK translaci

Tab. 18: Porovnání expresních rozdílů genu DD44 ve studovaných částech rostlin (květ, list, poupě)

Tab. 19: Porovnání exprese genu DD44 v květu, poupěti a listu mezi pohlavími

Tab. 20: Porovnání expresních rozdílů genu S13 ve studovaných částech rostlin (květ, list, poupě)

Tab. 21: Porovnání exprese genu S13 v květu, poupěti a listu mezi pohlavími

Tab. 22: Porovnání expresních rozdílů genu S17 ve studovaných částech rostlin (květ, list, poupě)

Tab. 23: Porovnání exprese genu S17 v květu, poupěti a listu mezi pohlavími

Tab. 24: Přepočítání normované fluorescence na procentuální poměr exprese X:Y pro gen DD44 S. latifolia

Tab. 25: Přepočítání normované fluorescence na procentuální poměr exprese X:Y pro gen DD44 S. dioica

Tab. 26: Přepočítání normované fluorescence na procentuální poměr exprese X:Y pro gen S13 S. latifolia

Tab. 27: Přepočítání normované fluorescence na procentuální poměr exprese X:Y pro gen S13 S. dioica.

Tab. 28: Přepočítání normované fluorescence na procentuální poměr exprese X:Y pro gen S17 S. latifolia.

Tab. 29: Přepočítání normované fluorescence na procentuální poměr exprese X:Y pro gen S17 S. dioica.

10 SEZNAM ZKRATEK

ATP	adenosintrifosfát
BAC	Bacteria artificial chromosome (umělý bakteriální chromozom)
BB	binding buffer
bp	base pairs (páry bází)
cDNA	complementary DNA (komplementární DNA)
Cy3	Indocarbocyanine
Cy3-HRP	Indocarbocyanine- Horseradish Peroxidase
DAPI	4',6-Diamidin-2-fenylindol
DNA	deoxyribonucleic acid (kyselina deoxyribonukleová)
dNTPs	dinukleotidy
E/E	etanol/éter
EB	extraction buffer (extrakční pufr)
EDTA	kyselina ethylendiaminotetraoctová
EXO I	Exonuclease I <i>E. coli</i>
FISH	fluorescenční in situ hybridizace
HRM	High melt resolution - vysokorozlišovací analýza křivek tání
MSY	male specific region on the Y chromosome (oblast specifická pro samce na Y chromozomu)
NCBI	National Center for Biotechnology Information
LB	Luria-Bertani médium
PCR	Polymerase chain reaction (polymerázová řetězová reakce)
RNA	ribonucleic acid (kyselina ribonukleová)
RPM	Revolutions per minute (otáčky za minutu)
RT-PCR	Real-time PCR (PCR v reálném čase)
SAP	Shrimp Alkaline Phosphatase
SDS	sodium dodecyl sulfate (dodecylsírán sodný)
SG	Spectrum Green
SSC	saline-sodium citrate buffer (solno-citrátový pufr)
SNP	single nucleotid polymorfism (jdnokleotidový polymorfismus)
STAR-C	Silene Tandem Array Centromere
TAE	Tris-acetát + EDTA pufr

TE	transponovatelný element
Tm	Teplota tání
Tyr-FISH	Tyramidová fluorescenční in situ hybridizace
UV	Ultrafialové záření
UV-VIS	Ultrafialovo-viditelná spektroskopie