

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta

Diplomová práce

Olomouc 2010

Miroslava Havránková

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra buněčné biologie a genetiky



Cytogenetické mapování genomů rostlin

Diplomová práce

Bc. Miroslava Havránková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2010

Vedoucí práce: Mgr. Jan Bartoš, Ph.D.

Naformátováno: Vpravo:
0,63 cm

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně s použitím citované literatury pod vedením školitele Mgr. Jana Bartoše, Ph.D.

V Olomouci dne 11.5.2010

.....

(podpis)

Naformátováno: Vpravo:
0,63 cm

|

Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala svému školiteli Mgr. Janu Bartošovi Ph.D. a Mgr. Davidu Kopeckému Ph.D. za odborné vedení, a také všem pracovníkům laboratoře Molekulární cytogenetiky a cytometrie na Ústavu experimentální botaniky AV ČR v Olomouci za ochotu a všestrannou pomoc při práci.

Naformátováno: Vpravo:
0,63 cm

Souhrn

Trávy patří mezi nejdůležitější volně rostoucí rostliny a z historického hlediska hrály v Evropě významnou roli při vývoji zemědělství. V současnosti je využití travních porostů víceúčelové. Rozloha tohoto ekosystému je odhadována na $52,5 \times 10^6 \text{ km}^2$ zemského povrchu, což odpovídá 40,5 % celkové pevniny.

Významnou složku travních porostů tvoří rody *Lolium* L. (jílek) a *Festuca* L. (kostřava). Oba rody mají specifické vlastnosti, které je předurčují jako zdroj genů při šlechtění. Kostřavy jsou velmi odolné vůči biotickému a abiotickému stresu a pro jílký je zase charakteristická vysoká nutriční hodnota, vysoký výnos, lehká stravitelnost a uniformita drnu.

Různé techniky mapování umožňují studovat genetickou informaci a dovolují tak porozumět genomu jako celku. Jedním z těchto přístupů je cytogenetické mapování. Jednou z nejužívanějších cytogenetických technik je v současnosti fluorescenční *in situ* hybridizace, která umožňuje vizualizaci sekvencí DNA na chromozómech. Rozlišení a citlivost metody je závislá na typu objektu použitého k mapování.

Cytogenetické mapování je možné také provádět na speciálních liniích. Tyto linie umožňují zamapování určitého markeru na konkrétní chromozóm, rameno nebo určitou část chromozómu podle typu použitých linií. Pro mapování se nejčastěji využívají linie aneuploidní, adiční, deleční, substituční a introgresní.

Cílem této práce byla identifikace klonů vhodných pro *in situ* hybridizaci v DNA knihovně dlouhých inzertů klonovaných ve vektoru BAC a jejich následná lokalizace na metafázních chromozómech pomocí BAC-FISH. Celkem bylo analyzováno 61 BAC klonů a 10 z nich bylo identifikováno jako specifické. Dalším cílem byla analýza frekvence rekombinací u introgresních linií *Lm/Fp* pro všech 7 chromozómů. Analýzou bylo zjištěno, že crossing-over probíhá po celé délce jednotlivých chromozómů. Existují však místa s výrazně vyšším výskytem rekombinací („hotspots“) a naopak místa, kde k rekombinacím téměř nedochází („cold spots“).

Summary

Grasses belong to the most important widely cultivated crops. Historically grasses played major role in agricultural development in Europe. Nowadays, use of grasses is multifunctional. Total area of grassland is estimated to $52,5 \times 10^6$ km² of the Earth surface. It corresponds to 40,5 % of total area of continents.

Ryegrasses and fescues are one of the most important and widely distributed grass species. They have agronomically important characteristics, which can be used in plant breeding. Fescues are tolerant to biotic and abiotic stresses and ryegrasses provide forage of high quality, yield and digestibility and turf with good uniformity and color.

Different mapping techniques enable study of genetic information and understanding genome complexity. Cytogenetic mapping is one of these approaches. Fluorescent *in situ* hybridization is the most useful cytogenetic technique, which provides visualization of DNA sequences directly on chromosomes. Mapping resolution and sensitivity depend on the type of cytological subject.

Cytogenetic mapping can be done on special lines. These lines are available for mapping markers on specific chromosome, chromosome arm or part of chromosome according to lines used. Aneuploid, addition, deletion, substitution and introgression lines are most frequently used for mapping of plant genome.

The main aim of the diploma study was identification of clones suitable for *in situ* hybridization in DNA library of large inserts cloned in BAC vector and subsequent localization on metaphase chromosomes using BAC-FISH. Total of 61 BAC clones were analysed and 10 BAC clones were identified as locus-specific. Analysis of frequency of recombination in introgression lines *Lm/Fp* for all 7 chromosomes was other aim of this work. It was found out that crossing-over can proceed along whole each chromosome. However, regions with high frequency of recombination („hotspots“) and regions with extremely low frequency of recombinations („cold spots“) were detected.

OBSAH

1 Úvod	10
2 Mapování jaderného genomu.....	11
2.1 Genetické mapování	11
2.2 Fyzické mapování	13
2.2.1 Cytogenetické mapování.....	14
3 Cytogenetické techniky	15
3.1 Banding	15
3.2 Primed <i>in situ</i> DNA synthesis (PRINS)	16
3.3 <i>In situ</i> hybridizace (ISH)	16
3.4 Fluorescenční <i>in situ</i> hybridization (FISH).....	18
3.4.1 Sondy pro fluorescenční <i>in situ</i> hybridizaci	20
3.4.2 Značení sond	22
3.4.3 Varianty a aplikace FISH	23
3.4.4 Mapování rostlinných genomů pomocí FISH	25
3.5 Cytogenetické mapování za pomoci speciálních linií.....	29
3.6 Introgresní mapování	31
4 Materiál a metodika	33
4.1 Materiál.....	33
4.1.1 Rostlinný materiál:	33
4.1.2 Přístroje:.....	33
4.1.3 Chemikálie a roztoky	34
4.2 Metodika	37
4.2.1 Izolace genomové DNA	37
4.2.2 Izolace klonů z BAC knihovny	37
4.2.3 Příprava blokovácí DNA pro GISH	38
4.2.4 Příprava sond pro <i>in situ</i> hybridizaci.....	39
4.2.5 Kontrolní detekce intenzity signálu značených sond	39
4.2.6 Příprava roztlakových preparátů pro FISH.....	40
4.2.7 BAC-FISH.....	41
4.2.8 Kolokalizace vybraných BAC klonů se sondou 45S rDNA	42
4.2.9 GISH.....	43
4.2.10 Měření distribuce homeologních rekombinací.....	43

5 Výsledky	45
5.1 Lokalizace vybraných BAC klonů na metafázních chromozómech pomocí BAC-FISH	45
5.2 Charakterizace introgresních linií	52
6 Diskuse	57
7 Závěr	60
8 Seznam použité literatury	61
9 Seznam použitých zkratk a symbolů	71

CÍLE PRÁCE

1. Vypracování literární rešerše na téma cytogenetické mapování genomů rostlin
2. Lokalizace vybraných BAC klonů na metafázních chromozómech pomocí BAC-FISH
3. Charakterizace introgresních linií

1 Úvod

Trávy patří mezi nejdůležitější volně rostoucí rostliny po celém světě. Rozloha tohoto ekosystému je odhadována na $52,5 \times 10^6$ km² zemského povrchu (Reheul *et al.*, 2010). V České Republice pokrývají trávy přibližně 40 % povrchu a jejich využití je velmi pestré. Hojně se využívají v pícninářství a trávnickářství. Mají rovněž estetickou a rekreační funkci. Trávy jsou také důležitou složkou ekosystému a jejich biomasa může být využita jako zdroj energie (Reheul *et al.*, 2010).

Mezi nejvýznamnější trávy patří zástupci rodů kostřava (*Festuca* L.) a jílek (*Lolium* L.), které tvoří dominantní složku většiny travních porostů. Oba rody jsou systematicky řazeny mezi jednoděložné rostliny, čeleď lipnicovité (*Poaceae*). Do rodu *Lolium* patří osm druhů, jeho zástupci jsou diploidní ($2n = 2x = 14$). K agronomicky nejvýznamnějším druhům patří jílek mnohokvětý (*Lolium multiflorum* Lam.) a jílek vytrvalý (*Lolium perenne* L.) (Jauhar, 1993). Jílky se vyznačují vysokou nutriční hodnotou, vysokým výnosem, lehkou stravitelností, uniformitou drnu a vhodným zbarvením. Jejich velkým handicapem je nízká schopnost přežívat abiotické stresové podmínky (zejména nízké teploty v zimě a sucho v letním období). Kostřavy, které naopak vykazují vysokou odolnost přežívat abiotické stresy, tvoří velmi početnou a rozmanitou skupinu trav. Mezi nejdůležitější zástupce tohoto rodu patří kostřava červená (*Festuca rubra* L.), která se hojně využívá v trávnickářství a dále pak dva pícninářské druhy - kostřava luční (*Festuca pratensis* Huds.) a kostřava rákosovitá (*Festuca arundinacea* Schreb.).

Díky genetické příbuznosti obou rodů je možné vytvářet křížence zvané *Festulolium*. Hybridi mohou nést kombinace agronomicky významných vlastností obou rodičů. Tito kříženci vznikají i volně v přírodě, ale jejich potomstvo je sterilní. V dnešní době existuje mnoho registrovaných a komerčně úspěšných odrůd *Festulolium*, které nesou různé kombinace rodičovských znaků. Jsou vhodné jak pro vysoce kvalitní píci, tak pro trávnickové systémy a jsou považovány za alternativu směsných osiv.

2 Mapování jaderného genomu

Mapování genomu je časově zdlouhavý a metodicky náročný proces, jehož cílem je co nejpřesněji určit polohu jednotlivých markerů a znázornit tak jejich rozložení na chromozómu. Velmi často nás zajímá, v jakém pořadí se na chromozómech nacházejí a jaká je jejich vzdálenost. V závislosti na postupu, jakým je mapování prováděno, existuje různé druhy map. Nejkomplexnější informaci o studovaném genomu získáme kombinací více map. Mapování genomu je obvykle rozdělováno do dvou hlavních skupin: genetické mapování a fyzické mapování.

2.1 Genetické mapování

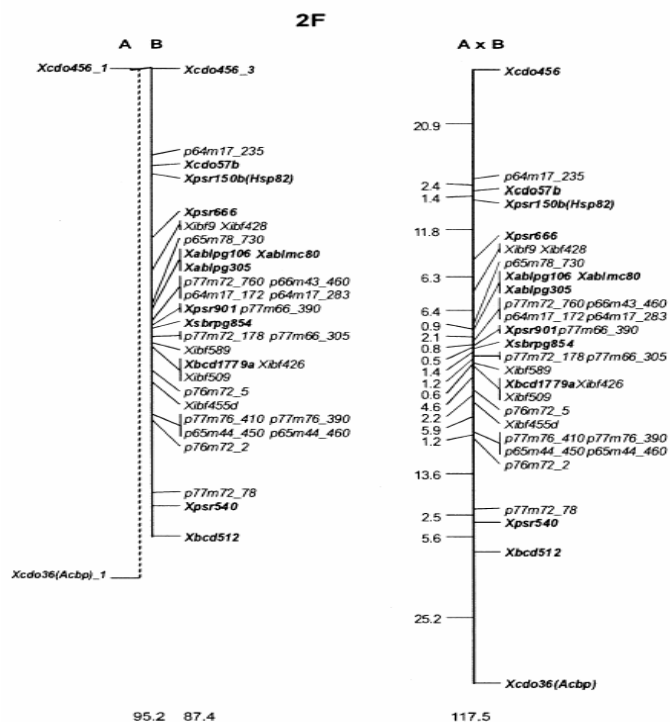
Proces genetického mapování je založen na tvorbě mapy pomocí genetických technik, které jsou postaveny na základních genetických principech jako jsou zákony dědičnosti, existence genetické vazby a možnost rekombinačního procesu. Na základě těchto zákonitostí jsou na chromozómu lokalizovány markery. Postupy genetického mapování vycházejí u rostlin z křížení jedinců s požadovanými vlastnostmi a sledováním jejich potomstev. Pokud jsou markery v těsné vazbě, pak společně kosegregují v potomstvu. Pokud mezi dvěma markery vazba neexistuje, pak se tyto markery společně nedědí. V některých případech je možné, že dva markery v části potomstva kosegregují a v jiné nikoliv. V tomto případě jsou markery jen v částečné vazbě a tento fenomén je možné vysvětlit díky crossing overu. Frekvence rekombinace je zde mírou vzdálenosti mezi dvěma markery (Brown, 1999). Jednotkou genetické vzdálenosti je 1 cM, což znamená, že pravděpodobnost rekombinace mezi danými markery v další generaci je 1 %.

Existuje několik typů markerů, které se pro mapování využívají. Nejstarším typem jsou markery fenotypové (výška, barva, tvar listu...). Další skupinou jsou biochemické markery (např. isozymy). Tyto markery jsou však ovlivnitelné vnějšími podmínkami a jen poměrně malé procento proteinů (resp. enzymů) tvoří izoformy. Díky těmto vlastnostem jsou biochemické markery dnes spíše minoritní skupinou. Nejužívanějším typem markerů jsou DNA markery. Tato poměrně mladá skupina markerů je založena na předpokladu, že určité úseky DNA se u různých genotypů liší. Při mapování genomů trav se využívají např. RFLP (Hulbert *et al.*, 1990), AFLP (Saha *et al.*, 2005, de Nova *et al.*, 2006), SSR (Alm *et al.*, 2003, Asp *et al.*, 2007) a RAPD markery (Cai *et al.*, 2007).

Naformátováno: Vpravo:
0,63 cm

Pro sestavení prvních genetických map trav byly použity hlavně RFLP markery. Pomocí RFLP markerů vytvořili Xu *et al.* (1995) genetickou mapu kostřavy rákosovité (*Festuca arundinacea* Schreb.). Sestavení genetické mapy kostřavy luční se potýkalo s nedostatkem genetických markerů. Chen *et al.* (1998) proto využili některé z RFLP markerů z mapy kostřavy rákosovité a sestavil komparativní mapu *Festuca pratensis* Huds. a *Festuca arundinacea* Schreb. Tato mapa obsahovala 66 RFLP markerů, které byly v sedmi vazebných skupinách. Celková délka mapy byla jen 280,1 cM. Alm *et al.* (2003) sestavili vazebnou mapu *Festuca pratensis* Huds., ve které bylo zamapováno 466 RFLP, AFLP, SSR markerů a isoenzymů (Obr.1). Celková délka mapy byla 658,8 cM.

Hayward *et al.* (1998) sestavili genetickou mapu jílku (*Lolium* sp) o délce 692 cM. Obsahovala celkem 106 markerů (isoenzymů, RFLP a RAPD). Jones *et al.* (2002) sestavili genetickou mapu *Lolium perenne* L., která byla založena především na mikrosatelitech. Z celkového počtu 165 markerů bylo 93 SSR. Další mapy jílku vytvořili např. Inoue *et al.* (2003) a Warnke *et al.* (2004).



Obr 1: Vazebná mapa rodičů A, B a křížence AxB populací *F. pratensis* Huds. Délka mapy je uvedena pod každou vazebnou skupinou (Alm *et al.*, 2003)

Naformátováno: Vpravo: 0,63 cm

2.2 Fyzické mapování

Dalším přístupem studia genomů je fyzické mapování. Potřeba dalšího přístupu mapování genomů je dána mimo jiné i nedostatky genetického mapování. Prvním problémem genetických map je limitovaný stupeň rozlišení a to hlavně u vyšších organismů; druhým pak omezená přesnost těchto map. Přístup fyzického mapování pomáhá překonat obě tato omezení (Brown, 1999). Vzdálenost jednotlivých nukleotidových sekvencí je na fyzické mapě vyjádřena v párech bází (bp), což odpovídá skutečné vzdálenosti daných markerů.

Fyzické mapování dovoluje srovnat vzájemnou polohu genů, což může mít velký význam pro pochopení genové regulace. Dále umožňuje srovnání jednotlivých genomů a výsledných podobností či odlišností lze využít pro objasnění evolučních událostí. Díky fyzickému mapování je možné také určit změny genomu jakými jsou translokace či inserce, studovat genom jako celek či porovnávat jednotlivé genomy mezi sebou. U rostlin s velkými genomy usnadňuje fyzická mapa jejich sekvenování.

Existuje několik technik fyzického mapování. Mezi klasické techniky patří např. mapování pomocí delečních, substitučních či aneuploidních linií, mapování na pachytenních chromozómech nebo proužkování chromozómů. Mezi molekulární techniky pak mapování pomocí radiačních hybridů, optické mapování, FISH a mapování pomocí knihoven klonů s dlouhými inzerty, které patří v současnosti mezi nejvýznamnější (Sambrook *et al.*, 2001). Jedním z přístupů využívajících DNA knihovny je DNA fingerprinting, jehož základní princip byl popsán již v roce 1985 (Jeffreys *et al.*, 1985). Každý klon má specifický restrikční profil, který získáme po naštěpení klonu restrikčním enzymem a následným rozdělením fragmentů DNA elektroforézou. Pomocí počítačových programů se vyhodnotí překryv těchto profilů a klony se seřadí do vyšších celků - kontigů. Seřazením kontigů vznikne kontigová mapa. Integrací s mapou genetickou je pak možné určit polohu kontigu na chromozómu.

Fingerprintovou analýzou byla u rostlin vytvořena fyzická mapa např. u *Arabidopsis* (Marra *et al.*, 1999) nebo sóji (Wu *et al.*, 2004). U zástupců čeledi lipnicovitých existuje fyzická mapa např. pro chromozóm 3B pšenice (Paux *et al.*, 2008). U žádného ze zástupců trav však doposud žádná fyzická mapa vytvořena nebyla.

2.2.1 Cytogenetické mapování

Cytogenetické mapování představuje techniku vizualizace sekvencí DNA na chromozómech. DNA sekvence lze lokalizovat na chromozómech vzhledem k centromere a telomeře, a na základě vzájemné polohy signálů jednotlivých sekvencí lze vytvářet cytogenetické mapy. Ty představuje relativní rozmístění studovaných lokusů a jejich vzdálenost se udává v mikrometrech (μm) nebo v procentech daného ramene či chromozómu. Cytogenetickou mapu lze dále integrovat s mapou fyzickou a genetickou, což umožňuje získat komplexnější informace o studovaném genomu. Vzhledem k zaměření diplomové práce bude cytogenetické mapování a jeho metody rozvinuto v dalších kapitolách.

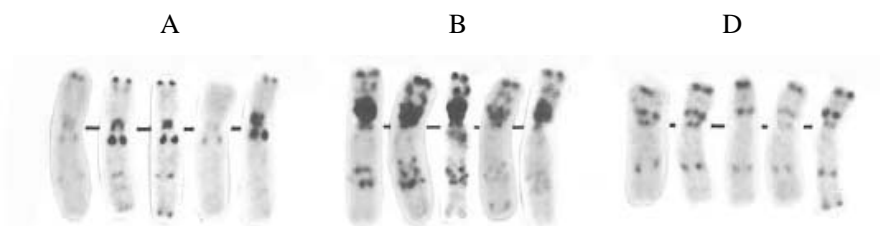
3 Cytogenetické techniky

3.1 Banding

Proužkování (banding) je jednou z prvních cytogenetických technik, která se začala používat již v 70. letech minulého století (Caspersson *et al.* 1968, 1970). Metoda je založena na odlišné barvitelnosti heterochromatinu a euchromatinu různými látkami. Po obarvení jsou na chromozómech patrné pruhy a tento patern je unikátní pro každý chromozóm. Proto je hlavní aplikací těchto metod identifikace jednotlivých chromozómů při sestavování karyotypů. Pomocí bandingu je možné identifikovat na chromozómech některé přestavby, které mohou indikovat různá geneticky podmíněná onemocnění.

V současnosti existuje několik druhů proužkování. Klasický *C-banding* se využívá pro identifikaci konstitutivního heterochromatinu (Obr.2). Světlé pruhy po obarvení odpovídají euchromatinu a tmavé heterochromatinu. Pruhový patern na chromozómech vytváří i *G-banding*, ale zde tmavé pruhy odpovídají pozdně se replikujícím oblastem s vysokým obsahem AT bází. *N-banding* je určen pro identifikaci organizátoru jadérka (NOR). K barvení se využívá dusičnan stříbrný. *Q-banding* je variantou bandingu s fluorescenčními barvivy a u rostlin se shoduje s *C-bandingem*.

Tyto techniky mají různý stupeň rozlišení a jejich výsledkem je různý počet pruhů pro daný chromozóm. Stupeň rozlišení závisí hlavně na kondenzačním stavu chromatinu a na úspěšnosti barvení. Prometafázní chromozómy mají větší rozlišení, ale interpretace bandů je u nich mnohem složitější než u metafázních chromozómů s nižším rozlišením (Trask, 1999). Jednotlivé pruhy jsou označeny vždy příslušným písmenem, které označuje krátké (p) či dlouhé (q) rameno a odpovídajícím číslem. Mapy chromozómu získané technikami bandingu se nazývají ideogramy.



Obr.2: C-banding na chromozómech 5 genomů A, B a D pšenice seté (Friebe *et al.*, 1994)

Naformátováno: Vpravo:
0,63 cm

3.2 Primed *in situ* DNA synthesis (PRINS)

Jednou z metod, kterou lze lokalizovat sekvence na chromozómy je PRINS. Tato technika je považována za alternativní metodu FISH (Koch *et al.*, 1989). Základem metody je PCR se značenými nukleotidy. Templátem v této reakci ale není izolovaná DNA, ale celý chromozóm. Reakce začíná nasednutím neznačených oligonukleotidů na hranici cílové sekvence. Poté dochází k syntéze nového vlákna ze značených nukleotidů. Při klasické PRINS probíhá pouze jedno kolo PCR. V průběhu reakce tedy dochází ke značení chromozómu, který se potom přímo pozoruje pomocí mikroskopu. Detekce může být přímá nebo nepřímá v závislosti na použitém způsobu značení.

Nespornými výhodami PRINS je, že nedochází k poškození chromozómů v průběhu manipulace při hybridizaci, je méně časově náročná a díky použití neznačených oligonukleotidů se nezvyšuje signál pozadí (Kubaláková *et al.*, 2001). Díky těmto výhodám a citlivosti má PRINS a její varianty široké využití. Lze ji využít např. při fyzickém mapování repetice, mapování genů na polytenní chromozómy nebo při studiu a diagnostice lidských chromozómů. U rostlin tuto metodu využili Kubaláková *et al.* (1997, 2000) k detekci tandemových repetice např. u ječmene, hrachu, fazole a pšenice.

Repetice s nižším počtem kopií lze lokalizovat citlivější variantou PRINS tzv. C-PRINS (*cycling-PRINS*), při které probíhá syntéza ve větším počtu reakčních cyklů podobně jako u PCR (Gosden *et al.* 1991). Technikou C-PRINS lze v některých případech lokalizovat i unikátní jednokopiové sekvence, což prokázali Gosden *et al.* (1994) a Vegaletti *et al.* (1997) na chromozómech člověka. K dalším variantám PRINS patří MULTIPRINS (multicolour PRINS; Volpi *et Baldini*, 1993), PRINSES (primed *in situ* labelling en suspension) pro analýzu průtokovou cytometrií (Macas *et al.*, 1995) nebo SPRINS (self-PRINS) pro detekci CpG oblastí (Andersen *et al.*, 1993).

3.3 *In situ* hybridizace (ISH)

Techniky ISH znamenaly velký krok k pochopení organizace a funkce genomu. Poprvé byla tato metoda využita v roce 1969 (Gall *et Pardue*, 1969; John *et al.*, 1969), ale většího významu v biologickém výzkumu nabyla až v devadesátých letech minulého století. Její objev posunul klasickou cytogenetiku mezi moderní molekulární vědy. Při *in situ* hybridizaci dochází k nasednutí denaturované DNA sondy na komplementární úseky denaturovaných chromozómů fixovaných na podložním skle.

Naformátováno: Vpravo:
0,63 cm

Sondou je zde myšlen značený úsek DNA komplementární k cílové sekvenci. Metodu značení je vždy nutno volit s ohledem na dostupná detekční zařízení, citlivost a chemickou strukturu značky. Původně byly sondy značeny pomocí radioaktivních izotopů (Gall *et* Pardue, 1969; John *et al.*, 1969). Toto značení je sice velmi citlivé, ale pro nízké prostorové rozlišení, náročnou manipulaci a zdlouhavost postupu byly radioaktivně značené sondy nahrazeny sondami neizotopickými (enzymaticky či fluorescenčně značenými). Současné techniky neradioaktivního značení jsou založeny na navázání takové chemické látky na sondu, která je za určitých podmínek schopna vyvolat detekovatelnou reakci. Takovými látkami jsou např. fluorochromy, hapteny či chemické skupiny, jejichž přítomnost může být detekována. Jako jedno z prvních neradioaktivních značení sond bylo značení pomocí biotinu (Langer-Safer *et al.*, 1982). Fluorescenční značení umožnilo díky časové nenáročnosti široké využití ISH a fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) zaujala nezastupitelnou pozici v molekulárně-biologickém výzkumu. První fluorescenční látkou využitou pro FISH byl FITC (fluoresceinisothiokyanát) (Langer-Safer *et al.*, 1982; Pinkel *et al.*, 1986; Schwarzacher *et al.*, 1989). Kromě haptenu a fluorochromů lze sondy také značit chemickými látkami, jejichž přítomnost se dá detekovat kolorimetricky. Takový signál je sice silnější než fluorescenční, ale prostorové rozlišení je horší a je tedy problematické signál přesněji lokalizovat na chromozómu. Toto značení se dnes využívá spíše pro RNA *in situ* hybridizaci (Schwarzacher *et* Heslop-Harrison, 2000).

Techniky DNA *in situ* hybridizace mohou být využity k fyzickému mapování, charakterizaci a identifikaci chromozómů a s tím spojenému sledování změn v počtu či ve stavbě chromozómů, dále se také využívají pro evoluční studie či pro prostorové zobrazení sekvencí v průběhu buněčného cyklu. Techniky ISH se neomezují jen na studium DNA, ale existuje obdobně i RNA *in situ* hybridizace, která se zaměřuje především na studium genové exprese (Schwarzacher and Heslop-Harrison, 2000).

Běžně se ISH provádí na metafázních chromozómech (Jiang *et al.*, 1995). Dále lze využít meiotické pachytenní chromozómy (Cheng *et al.*, 2001), natažené chromozómy (Valárik *et al.*, 2004) nebo jednotlivá vlákna DNA, tzv. „fiber-FISH“ (Francz *et al.*, 1996, Jackson *et al.*, 1998).

3.4 Fluorescenční *in situ* hybridization (FISH)

Jak již bylo uvedeno výše, ISH s fluorescenčním značením patří k předním metodám v biologickém výzkumu. Při FISH dochází k hybridizaci denaturované fluorescenčně značené DNA (sondy) ke komplementární sekvenci na templátu (chromozómové DNA) a následně se pomocí fluorescenční mikroskopie lokalizuje signál (Obr.3). Specifičnost hybridizace přitom závisí zejména na koncentraci iontů a na teplotě.

Předpokladem pro správnou hybridizaci sondy a cílového místa na molekule DNA je především jejich sekvenční homologie. Aby bylo dosaženo co největší přesnosti hybridizace, je třeba dodržet velmi striktní reakční podmínky. Přísnost podmínek vyjadřuje tzv. stringence, která představuje procento správně spárovaných nukleotidů sondy a cílové DNA. Stringence pro danou dvouvláknovou molekulu se určuje na základě její teploty tání (T_m). Celková stringence je ovšem závislá i na dalších faktorech jako nukleotidové složení sondy a její délka, koncentrace formamidu, koncentrace monovalentních kationtů v hybridizačním roztoku a reakční teplota (Schwarzacher *et al.*, 2000).

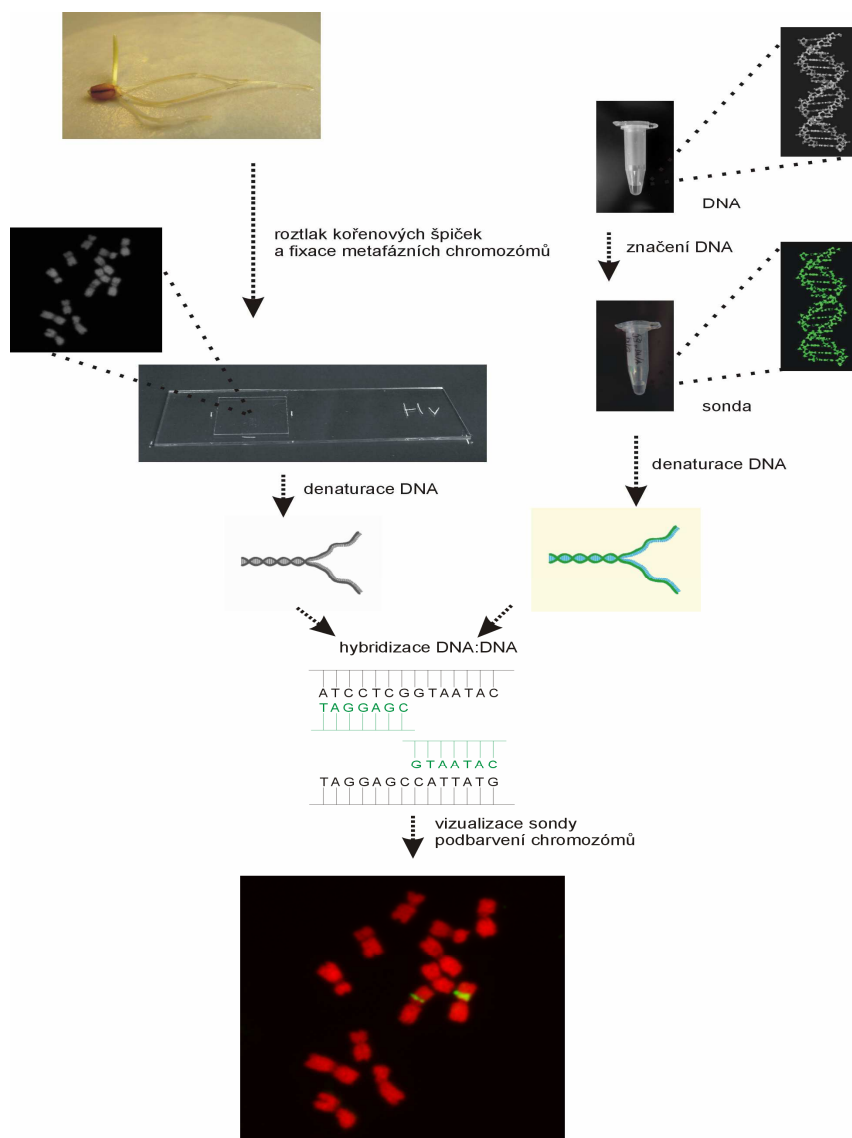
Specifičnost hybridizace sondy k cílovému místu lze také zlepšit přidáním blokovací DNA. Jedná se o neznačenou genomovou DNA, která se využívá v případech, kdy sonda obsahuje repetitivní sekvence. Blokovací DNA hybridizuje s těmito repetitivy a blokuje tak v těchto místech hybridizaci značené sondy, což zabraňuje nespecifickému signálu. Využívá se hlavně v případech, kdy je sonda vytvořena z geneticky blízkého druhu cílové DNA. Kromě klasické blokovací DNA existuje také tzv. kompetitivní DNA (C_0t-1), která je obohacena o repetitivní DNA a může tedy efektivněji potlačit nespecifickou hybridizaci (Zwick *et al.*, 1997). Kompetitivní DNA se využívá při hybridizaci u mnoha rostlinných druhů, např. u bavlníku (Hanson *et al.*, 1995) nebo u čiroku (Kim *et al.*, 2002).

Metoda FISH se skládá z několika po sobě jdoucích kroků a síla výsledného signálu může být tedy ovlivněna v několika bodech. Intenzita signálu závisí na účinnosti značení sondy, na hybridizaci sondy k cílovému místu, na intenzitě vznikajícího signálu a v neposlední řadě také na detekčním zařízení (Trask, 1999). Intenzita signálu je ale také dána velikostí cílového místa. U menších sond (<1 kb) může být signál velmi slabý. Pokud je výsledný signál příliš slabý, je možné jej zesílit (amplifikovat) kombinací většího množství protilátek. Na jednom preparátu je také možné využít větší počet různě značených sond a vizualizovat tak najednou více než jeden lokus.

Naformátováno: Vpravo:
0,63 cm

Jednotlivé sondy však musí být značeny flourochromy, které mají dostatečně rozdílnou emisní vlnovou délku, aby bylo možné signály z jednotlivých sond odlišit.

Velkým problémem při FISH je tzv. *photobleaching* neboli vysvěcování, ke kterému dochází při prohlížení preparátu. Blednutí je úměrné době, po kterou je vzorek vystaven příslušnému záření, jež vyvolává fluorescenci. Vysvěcování lze zmírnit rychlou a přesnou prací nebo ošetřením vzorku chemickými látkami s vysokou afinitou ke kyslíku jako např. *p*-phenylenediamine (Johnson *et* Nogueira-Ajaujo, 1981).



Obr.3: Schéma průběhu fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH)

Naformátováno: Vpravo:
0,63 cm

3.4.1 Sondy pro fluorescenční *in situ* hybridizaci

Sondu pro FISH můžeme vytvořit prakticky z jakékoliv DNA s ohledem na plánovaný experiment. Při výběru zdroje DNA pro sondu bychom měli zvážit např. specifičnost, délku, prostorovou organizaci atd. Délka lokalizované sekvence je variabilní v závislosti na zvoleném zdroji DNA. Pokud se jedná o dlouhý DNA fragment, pak je nutné jej rozdělit na menší fragmenty o velikosti 200 – 600 bp, čímž se zvýší efektivita hybridizace (Trask, 1999).

Sondy můžeme rozdělit podle dvou základních kritérií: podle zdroje DNA (Schwarzacher *et* Heslop-Harrison, 2000) nebo podle velikosti a specifičnosti (Trask, 1999). Nejčastěji se jako sondy využívají klonované sekvence DNA, PCR produkty, syntetické oligonukleotidy nebo genomová DNA. *Sekvence DNA klonované ve vektorech* se pro svou všestrannost v současnosti užívají nejvíce. Velikost inzertu DNA závisí na typu zvoleného vektoru. U plazmidů délka inzertu nepřesahuje 10 kb. Větší inzerty DNA musí být klonovány v BAC, YAC, kosmidu či bakteriofágu. Izolací *genomové DNA* lze získat další typ sond. Sondy z genomové DNA mají velký význam hlavně při evolučních studiích či při studiu allopolyploidů a hybridů (Humphreys *et al.*, 1995; Zwierzykowski *et al.*, 1998). Poslední dobou také vzrůstá význam *syntetických oligonukleotidů* jako sond *pro in situ* hybridizaci. Jde hlavně o takové sekvenční motivy, které se v genomu často opakují. Z hlediska specifičnosti může být sondou unikátní nebo nízkokopiová sekvence, repetitivní sekvence nebo také chromozómově specifická DNA.

Single-copy sekvence

Pro jednokopiovou sekvenci je typické, že se v genomu vyskytuje pouze jednou. Pokud tuto sekvenci naznačíme a použijeme jako sondu, pak na základě tohoto specifického motivu nukleotidů bude sonda hybridizovat pouze v daném místě, což umožní její jednoznačnou lokalizaci na chromozómu. Takovou unikátní sekvencí mohou být například geny nebo regulační sekvence. Jednokopiové sekvence se dají u rostlin detekovat pomocí speciální varianty FISH – Tyr-FISH (viz.str 22). Tuto metodu použili Pérez *et al.* (2009) při lokalizaci genu *Rad50* na chromozómy 5 pšenice a Khrusthaleva *et al.* (2001) pro detekci T-DNA u transgenních rostlin cibule (*Alium cepa*). Jednokopiové BAC klony lze lokalizovat pomocí BAC-FISH. Touto technikou zamapovali Jiang *et al.* (1995) 10 BAC klonů na chromozómy rýže. Lamb *et al.* (2007) se pokusili najít sekvence, kterými by bylo možné identifikovat jednotlivé chromozómy

Naformátováno: Vpravo:
0,63 cm

kukuřice. Jednoznačný identifikační systém se jim podařilo vytvořit lokalizací cDNA, BAC klonů, genů či genových skupin na jednotlivé chromozómy. Některé z těchto sond byly dlouhé pouze 3 kb a byly tedy připravovány cestou PCR amplifikace. Unikátní genové sekvence byly vyhledávány také v databázích. Tento způsob získání jednokopiových sond je vhodný pro všechny organismy, u kterých jsou dostupná sekvenční data.

Wang *et al.* (2006) vyvinuli speciální roztlakovou FISH metodu pro detekci jednokopiových sekvencí na pachytenních chromozómech kukuřice. Touto technikou dosáhly citlivosti 3,1 kb.

Repetitivní sekvence

Repetitivní sekvence mají obvykle celkovou velikost v rozmezí od několika stovek bází po několik kb. Vyskytují se ve větším počtu kopií a mohou být roztroušeny po celém genomu. Právě díky vysokému počtu kopií a tendenci vyskytovat se ve skupinách jsou repetice vhodnými sondami pro FISH. Díky vysokému počtu kopií je hybridizace velmi rychlá a výsledný signál je velmi intenzivní zejména u tandemových repetit. Pro lokalizaci těchto sekvencí se využívají hlavně metafázní chromozómy a interfázní jádra (Trask, 1999).

Vhodnými sondami pro *in situ* hybridizaci jsou tzv. satelity, které jsou tvořeny *tandemovými repeticemi*. Tyto repetice lze izolovat z různých rostlinných druhů a obvykle se vyskytují v heterochromatinových oblastech. Jejich distribuce a množství bývá specifické pro daný chromozóm. Díky tomu jsou vhodným nástrojem pro studium evoluce nebo pro identifikaci chromozómů (Schwarzacher, 2003). Tandemové repetice byly využity např. při evolučních studiích pšenice seté (*Triticum aestivum* L.), kde se sledoval polymorfismus 45S a 5S rDNA lokusů u sedmi příbuzných linií pšenice (Bardsley *et al.*, 1999).

Další skupinou repetitivních sekvencí jsou *mikrosatelity*. Jejich základní repetitivní jednotka má obvykle velikost kolem 5 bp a mohou vytvářet celé bloky repetit. Podobně jako satelity korespondují s heterochromatinem. Mikrosatelity se vyskytují u rostlin asi 5x méně než u živočišných druhů (Wang *et al.*, 1994) a nebyl u nich nalezen žádný dominantní motiv. Sekvenční motivy a jejich četnost se liší u různých rostlinných druhů. Pedersen *et al.* (1996) např. studovali sekvenční motiv GAA u pšenice a žita. Na základě výsledků FISH analýz bylo takto odhadnuto, že organizace

Naformátováno: Vpravo:
0,63 cm

mikrosatelitových lokusů se ustálila ještě před evolučním oddělením žita a pšenice (Cuadrado *et al.*, 1998).

Chromozómově specifické fragmenty DNA

Jako sondu lze také použít DNA odvozenou z jednoho konkrétního chromozómu. Těchto sond se využívá např. při evolučních studiích, analýze hybridů nebo při studiu chromozómových přestavb. Typické je využití těchto sond při tzv. barvení chromozómů (chromosome painting). Chromosome painting se využívá spíše u živočišných druhů. Aplikace této techniky u rostlin nebyla příliš úspěšná pravděpodobně v důsledku velkého obsahu repetitivních sekvencí v genomech rostlin. Přesto se v posledních letech podařilo za použití širokého spektra sond aplikovat barvení jednotlivých chromozómů u huseníčku a jemu příbuzných druhů (Lysák *et al.*, 2003).

3.4.2 Značení sond

Fragmenty DNA, které chceme využít jako sondy pro FISH, je třeba odpovídajícím způsobem naznačit. Metodu značení je vždy nutno volit s ohledem nadostupná detekční zařízení, citlivost a chemickou strukturu značky. Prvotní izotopické značení (viz výše) bylo nahrazeno technikami méně časově náročnými. Současné techniky FISH jsou založeny na navázání takové chemické látky na sondu, která je za určitých podmínek schopna vyvolat detekovatelnou fluorescenci. Takovými látkami mohou být např. fluorochromy či hapteny, jejichž přítomnost může být detekována. Velmi často se využívá značený uridin a ostatní nukleotidy zůstávají neznačené.

Značení sond může být *přímé* nebo *nepřímé*. U přímého značení jsou látky poskytující fluorescenční signál (fluorochromy) vázány přímo na nukleotidy (Wiegant *et al.*, 1991). Toto značení v současnosti nabývá na významu, protože je rychlejší než značení nepřímé, ale jeho citlivost je nižší (Schwarzacher, 2003). Při *nepřímém* značení je na sondu navázána reportérová molekula (např. haptenu), která reaguje s dalšími molekulami nesoucími fluorochromy, jež vyvolávají detekovatelný signál. Haptenem je velmi často biotin (vitamín H) či digoxigenin (steroid z *Digitalis purpurea*). Nukleotidy, které mají navázán haptenu, jsou použity pro tvorbu sondy. Po hybridizaci je nutné přidat protilátku proti příslušnému haptenu (streptavidin, anti-digoxigenin), které nesou fluorochrom. *Fluorochromy* jsou látky se speciální chemickou skupinou, která je

Naformátováno: Vpravo:
0,63 cm

schopna za určitých podmínek poskytovat fluorescenční signál. Ozáření fluorochromu světlem s kratší vlnovou délkou způsobí emisi světla o delší vlnové délce. Jako fluorochromy se dnes nejčastěji užívají Cyanine 3 (Cy3), Cyanine 5 (Cy5), Alexa 488, Texas Red a fluorescein isothiokyanát (FITC).

Metodicky je značení sond možné hned několika způsoby:

- *Nick translace* – touto technikou je možné značit velké úseky DNA jako jsou sekvence DNA klonované ve vektorech BAC či YAC, nebo genomová DNA. VdsDNA jsou činností enzymu DNAsy I vytvořeny zářezy (tzv. nicky). Druhý enzym, DNA polymerasa I v tomto místě odštěpuje další nukleotidy a zároveň místo nich inkorporuje nukleotidy značené.
- *Random primer labeling* – je vhodný pro značení menšího množství a kratších úseků DNA. Reakce začíná na ssDNA, ke které se připojují různé varianty hexanukleotidových primerů. Od nich pak začíná pomocí Klenow fragmentu syntéza nového vlákna ze značených i neznačených nukleotidů.
- *End labeling* – slouží pro značení extrémně krátkých fragmentů (méně než 100 bp). Sonda vzniká za součinnosti enzymů terminální deoxynucleotidyl transferázy a DNA polymerázy. Pro syntézu 3' konce vlákna je možné použít směs značených a neznačených nukleotidů nebo jen nukleotidy značené.
- *PCR labeling* – značení probíhá přímo v průběhu PCR. Do reakce vstupuje směs značených a neznačených nukleotidů. Jinak je celý průběh značení shodný s klasickou PCR (Schwarzacher *et* Heslop-Harrison, 2000). Velmi malé množství DNA potřebné na začátku reakce je nespornou výhodou tohoto způsobu značení.

3.4.3 Varianty a aplikace FISH

Se současnou citlivostí je možné metodu využít k lokalizaci jednotlivých částí chromozómů, jednokopiových genů, sekvencí odvozených od příbuzných druhů atd. Velmi často se jako sondy používají i repetitivní sekvence DNA, které slouží ke karyotypování a fylogenetickým analýzám. Díky FISH můžeme studovat buněčný cyklus či sledovat chování chromatinu jak v interfázi, tak v jednotlivých fázích buněčného dělení. FISH také umožňuje detekovat chromozomální přestavby či změny v ploidii, což se využívá v klinické praxi k identifikaci různých genetických chorob (Trask, 1999).

Naformátováno: Vpravo:
0,63 cm

V současné době existuje několik variant FISH, např.:

- GISH – genomová *in situ* hybridizace, při které se jako sonda používá fluorescenčně značená genomová DNA
- Tyr-FISH – nepřímá detekce sondy pomocí protilátky konjugované s křenovou peroxidázou a následná vazba fluorescenčně značeného tyramidinu jako substrátu pro peroxidázu. Tento amplifikační postup zvyšuje detekční citlivost až 100x a umožňuje detekovat sondy menší než 1 kb (Khrustaleva *et al.*, 2001).
- ZOO-FISH – tato varianta se používá u živočišných druhů pro evoluční studie. Tříděné a značené chromozómy jednoho druhu jsou hybridizovány na chromozómy jiného druhu (Dixkens *et al.*, 1998).
- 3D-FISH – je založena na zalití buněk do polyakrylamidového gelu, ve kterém jsou buňky následně barveny a analyzovány. Výhodou je velmi přesná lokalizace sond v jádře, ale detekční zařízení (konfokální mikroskop) je poměrně drahé (Bass *et al.*, 1997).

Z uvedených variant je nejrozšířenější modifikací FISH genomová *in situ* hybridizace. GISH je velmi cenným nástrojem pro charakterizaci genomů zejména u allopolyploidních druhů, hybridů a rekombinantních linií, kde tato metoda umožňuje identifikaci strukturních změn v průběhu evoluce, odlišení jednotlivých genomů, detekci introgresí, studium homeologního párování atd. GISH byla např. využita k detekci donorových genomů u allopolyploidů rodu *Brassica* (Showdon *et al.*, 1997). Dále byly pomocí GISH v kombinaci s proužkováním chromozómů objasněny strukturní změny v raných stádiích evoluce pšenice (Hespol-Harrison *et al.*, 1996). Kopecký *et al.* (2006) provedli pomocí GISH analýzu genomu hybridních odrůd *Festulolium*. Pro studium párování chromozómů využili GISH Cao *et al.* (2000), kteří studovali párování chromozómů mezi druhy *Lolium perenne* a *Festuca mairei*.

Důležitou aplikací je také tzv. komparativní FISH mapování, kdy dochází k lokalizaci zamapovaných sekvencí jednoho druhu v genomu příbuzného druhu. Pro tento účel se velmi často používají BAC klony. Technika byla několikrát využita pro zamapování klonů z *Arabidopsis thaliana* na chromozómy různých druhů rodu *Brassica* (Howell *et al.*, 2005) a umožnila vizualizaci genetické kolinearity mezi těmito druhy (Jackson *et al.*, 2000). Podobně Iovene *et al.* (2008) použili BAC klony z chromozómu 6 bramboru (*Solanum tuberosum*) pro lokalizaci na rajčeti (*Solanum*

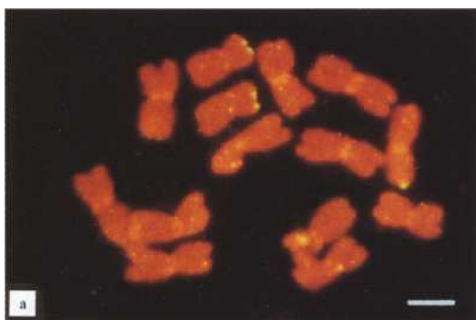
Naformátováno: Vpravo:
0,63 cm

lycopersicum). Z výsledků vyplynula jasná kolinearita mezi těmito dvěma chromozómy a dále bylo zjištěno, že u chromozómu 6 došlo v průběhu evoluce v euchromatinové oblasti k inverzi. Komparativní mapování nízkokopiového genu *Glu-1* kontrolujícího molekulovou hmotnost glutelinu provedli Cabrera *et al.* (2002) u pšenice a hybrida pšenice a ječmene. V obou případech byl gen lokalizován na homeologní skupině 1.

3.4.4 Mapování rostlinných genomů pomocí FISH

Jak již bylo uvedeno výše, jednou z nejdůležitějších aplikací fluorescenční *in situ* hybridizace je její využití pro fyzické mapování. V porovnání s ostatními technikami fyzického mapování je FISH poměrně levná metoda. Z počátku byla využívána hlavně při cytogenetických studiích člověka a živočichů, ale v poslední době vzrůstá význam této metody také u fyzického mapování rostlinných genomů (Kaczmarek *et al.*, 2009; Koo *et al.*, 2009). FISH mapování hrálo stěžejní roli při tvorbě integrované fyzické a cytogenetické mapy genomu člověka (Cheung *et al.*, 2001). U rostlinných druhů se mapování provádí na mitotických i meiotických chromozómech, na natažených chromozómech, na interfázních jádrech a na vláknech DNA.

Citlivost (nejmenší velikost sondy, jakou jsme schopni zaznamenat) a rozlišení (nejmenší vzdálenost mezi dvěma sondami, které jsme schopni ještě rozlišit jako dva samostatné body) se liší v závislosti na stupni spiralizace studovaného chromatinu. U rostlin se běžně mapování provádí na nakapávaných či roztlačkových preparátech mitotických *metafázních chromozómů* (Jiang *et al.*, 1995). Chromatin metafázních chromozómů je však vysoce kondenzován. Aby bylo možné na těchto chromozómech odlišit dvě sekvence, musí být teoreticky vzdáleny alespoň 0,5 – 1 Mb (Trask, 1999). Pedersen a Linde-Laursen (1995) použili metafázní chromozómy při lokalizaci dvou DNA klonů u ječmene a zjistili, že v praxi je tato vzdálenost minimálně 5 – 10 Mb. Toto rozlišení je výrazně menší, než bylo dosaženo u genomu člověka, kde se rozlišení pohybuje v rozmezí 1 – 3 Mb (Lawrence *et al.*, 1990). I citlivost FISH na metafázních chromozómech je poměrně nízká. Jednoznačně lze detekovat sondy, které jsou větší než 10 kb (Svitashev *et al.*, 2002). Tato citlivost se dá částečně zvýšit amplifikací signálu na 1 – 3 kb (de Jong *et al.*, 1999) I přesto, že je u metafázních chromozómů dosahováno nejnižšího rozlišení, patří vzhledem k jejich snadné přípravě stále k nejužívanějším (Obr.4).



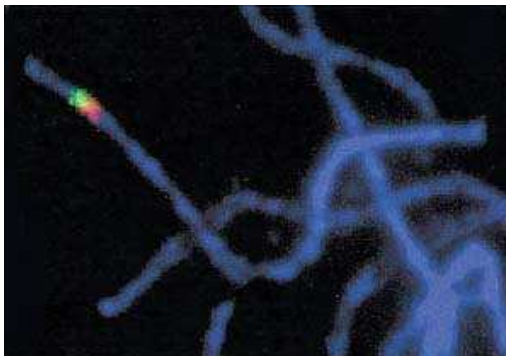
Obr.4: Lokalizace B-hordeinu na metafázních chromozómech ječmene technikou FISH (Pedersen *et* Linde-Laursen, 1995)

Větší rozlišení poskytují *prometafázní chromozómy* (Cheng *et al.*, 2001). Tyto chromozómy jsou méně kondenzované, ale práce s nimi je mnohem náročnější než s metafázními chromozómy. Velkým problémem je různá kondenzace chromatinu v rámci jednoho prometafázního chromozómu. Rozlišení je tedy závislé na tom, v jakém stavu kondenzace je zrovna cílová sekvence (Jiang *et al.*, 2006). Cheng *et al.* (2002) studovali rozlišení fluorescenční *in situ* hybridizace na chromozómech rýže. Při svých pokusech získal u prometafázních chromozómů rozlišení 2 Mb.

Při mapování na *pachytenních chromozómech* se dosahuje většího rozlišení než u prometafázních chromozómů. Délka těchto chromozómů může být až několikanásobně větší než je délka chromozómů v metafázi. Např. u rýže jsou pachytenní chromozómy dvacetkrát delší než metafázní (Cheng *et al.*, 2002). Kondenzace chromatinu se však liší u raně a pozdně pachytenních chromozómů. U raně pachytenních chromozómů lze dosáhnout vyššího rozlišení, což umožňuje jejich využití pro odlišení částečně se překrývajících sekvencí (Obr.5, Cheng *et al.*, 2002). U tohoto stádia jsme schopni rozlišit dvě sekvence vzdálené 40 kb. U pozdně pachytenních chromozómů, kde lze dosáhnout menšího rozlišení, to již možné není (Cheng *et al.*, 2001). Chromozómy v tomto stádiu jsou vhodné pro určení orientace sousedních klonů vzhledem k centromere a telomeře. U raně pachytenních chromozómů je ovšem kondenzace chromatinu tak nízká, že je obtížné jednotlivé chromozómy vzájemně identifikovat a odlišit. V obou stádiích se liší stupeň kondenzace chromatinu v rámci chromozómu. V obou případech se střídají rozvolněnější oblasti euchromatinu s kondenzovanějším heterochromatinem. Celkové rozlišení je tedy navíc závislé i na tom, v jaké oblasti se nachází cílová sekvence DNA. de Jong *et al.* (1999) při mapování na pachytenních chromozómech rajčete dosáhli rozlišení 1,2 Mb v oblasti heterochromatinu a 120 kb u euchromatinu. Tyto hodnoty se ovšem hlavně

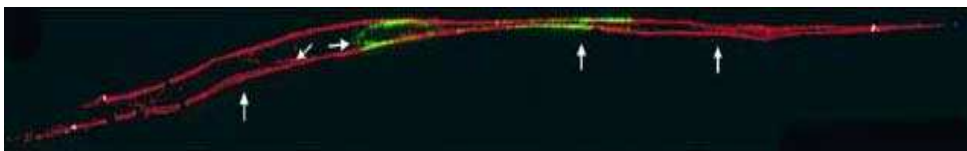
Naformátováno: Vpravo:
0,63 cm

u heterochromatinu výrazně liší od výsledků, které získal u *Arabidopsis thaliana*. Zde bylo v heterochromatinu rozlišení 140 kb a v euchromatinu 60 kb.



Obr.5: FISH dvou překrývajících se BAC klonů na pachytenních chromozómech rýže (Cheng *et al.*, 2002)

Mapování na *natažených chromozómech (super-stretched chromosomes)* bylo poprvé provedeno na tříděných chromozómech žita, ječmene, pšenice a cizrny (Obr.6, Valárik *et al.*, 2004). Autoři při svých pokusech natáhli chromozómy až na stonásobek jejich délky v metafázi a dosáhli rozlišení 70 kb a citlivosti 1 kb. Chromozómy na jednom skle mají různý stupeň dekondenzace. Díky jejich různému roztažení je možné na jednom skle srovnat signál sondy v různém rozlišení. Natažené chromozómy si na rozdíl od vláken DNA zachovávají svou integritu. Metoda je vhodná zejména pro druhy s komplexním chromatinem a velkými chromozómy. Omezením však zůstává fakt, že metodu je možné použít jen u těch rostlinných druhů, u nichž je možné třídění chromozómů pomocí průtokové cytometrie.

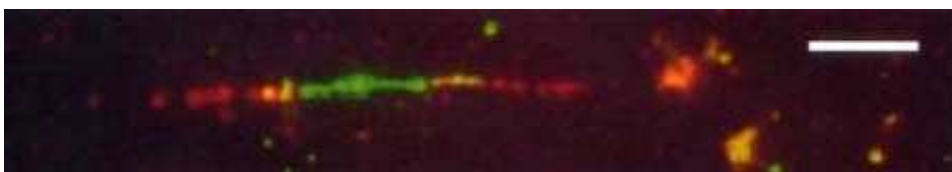


Obr.6: Detekce GAA sekvence v oblasti chromatinových můstků (šipky) na natažených chromozómech 1H ječmene (Valárik *et al.*, 2004)

Největšího rozlišení lze dosáhnout metodou „*fiber-FISH*“, kdy se *in situ* hybridizace provádí přímo na vláknech DNA lyzovaných interfázních jader (Francz *et al.*, 1996; Jackson *et al.*, 1998). V této formě je DNA velmi dobře přístupná pro sondu a proto tato metoda znamenala dramatické zvýšení rozlišení FISH mapování

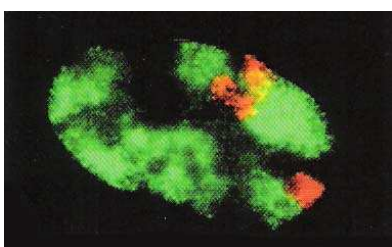
Naformátováno: Vpravo:
0,63 cm

u rostlinných genomů (Obr.7). Techniku poprvé uvedli Heng *et al.* (1992), kteří lokalizovali na natažená DNA vlákna sekvence ve vzdálenosti 21 kb až 350 kb. Při fiber-FISH se dosahuje rozlišení 1-5 kb (Fransz *et al.*, 1996; Ikeuchi, 1997) a lze detekovat sondu menší než 1 kb (Weier, 2001). Natažení DNA vláken je však velmi variabilní a liší se preparát od preparátu. Tato metoda dovoluje tzv. fine-mapping různých sekvencí a je vhodná pro zjišťování velikosti mezer ve fyzických mapách (Jackson *et al.*, 1998). Pomocí fiber-FISH je obtížné lokalizovat na DNA vláknech signál z velkých sond, které obsahují velké množství repetitivních sekvencí (např. BAC klony). Nespecifická hybridizace těchto sekvencí silně ztěžuje orientaci na vláknech a lze ji částečně potlačit přidáním blokovací DNA (Jiang *et al.*, 2006).



Obr.7: Fiber-FISH na DNA vláknech *A.thaliana*. Lokalizace tří kosmidů. Žlutý signál představuje kolokalizaci červeného a zeleného signálu (Heng *et al.*, 1992).

K FISH technikám s vysokým rozlišením patří také mapování na interfázních jádrech. V silně dekonzenzovaném chromatinu interfázních jader jsou chromozómy organizovány do tzv. domén (Obr.8). FISH na těchto jádrech nám umožňuje studovat organizaci chromatinu v interfázi (Sach *et al.*, 1995; Yokota *et al.*, 1995). Mapování sekvencí v interfázi použili Jiang *et al.*, (1996) u kukuřice. Z jejich výsledků vyplynulo, že touto technikou lze rozlišit dvě sondy, které jsou vzdálené méně než 100 kb.



Obr.8: FISH s červeně značeným chromozómem X na interfázním jádře lidské ženské buňky. Lokalizace signálu dokládá doménové uspořádání chromozómů v interfázním jádře (Cremer *et al.*, 1993).

3.5 Cytogenetické mapování za pomoci speciálních linií

Cytogenetické mapování je možné provádět na speciálních liniích studovaného organismu. Tyto linie umožňují zamapování určitého znaku (markeru) na konkrétní chromozóm, rameno nebo určitou část chromozómu podle typu použitých linií. Pro všechny linie jsou charakteristické rozsáhlé změny na úrovni chromozómů. Proto je možné deleční či substituční linie vytvářet pouze u polyploidních druhů, které jsou schopné ztráty určitých genů kompenzovat. Pro diploidní druhy bývají tyto ztráty letální.

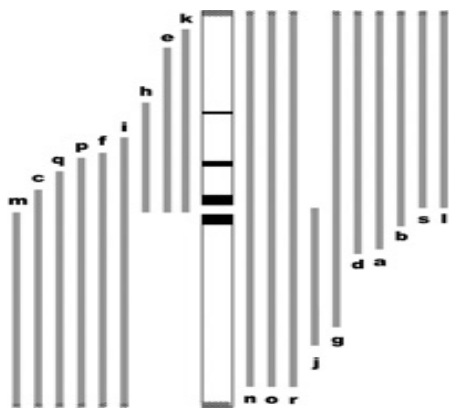
Pro mapování se nejčastěji využívají linie aneuploidní, adiční, deleční, substituční a introgresní. Většina z těchto linií se používá spíše pro mapování fyzické, ale pro jejich tvorbu a následné ověření jsou nezbytné cytogenetické techniky.

Aneuploidní linie

Pro tyto linie je charakteristická absence ramene chromozómu, jednoho celého chromozómu nebo celého chromozómového páru. Podle toho, jaká část genomu chybí, jsou dané linie pojmenovány. Existují linie např. s jedním chybějícím chromozómem (monosomické), s absencí celého homologního páru (nuliosomické) nebo může chybět jedno rameno u jednoho chromozómu (telosomické) nebo jedno rameno u obou homologních chromozómů (ditelosomické). Podle toho, jaké linie využijeme, jsme schopni zamapovat úsek DNA na jednotlivý chromozóm, případně jeho rameno. Díky sérii aneuploidních linií se podařilo zamapovat některé geny pšenice na jednotlivé chromozómy, respektive chromozomální ramena (Nasuda *et al.*, 1993).

Deleční linie

V delečních liniích chybí vždy část daného chromozómu. Pomocí těchto linií lze provádět tzv. deleční mapování. Jako jeden z prvních použili deleční mapování Benzer *et al.* (1961) při analýze fága T4. Deleční linie pro určitý chromozóm jsou reprezentovány souborem jedinců, u nichž je deletována vždy odlišně velká část chromozómu. Tyto delece rozdělují chromozóm na jeho části tzv. biny (Obr.9). Čím větší je počet binů, tím přesněji je možné zamapovat určitý marker. Deleční linie tedy umožňují přesnější mapování než linie aneuploidní. Pomocí delečních a aneuploidních linií zamapovali Qi *et al.* (2004) okolo 16 000 unikátních EST v genomu polyploidní pšenice (*T. aestivum*).



Obr.9 : Deleční linie chromozómu 7H ječmene
(Nasuda *et al.*, 2005)

Adiční linie

U adičních linií je k původní sadě chromozómů přidán jeden nebo více chromozómů ze stejného nebo jiného druhu. Tyto linie jsou ovšem často nestabilní a vykazují tendenci k eliminaci nadbytečných chromozómů. Adiční linie umožňují zamapovat sekvence DNA na jednotlivé chromozómy. Kromě jiných existují např. adiční linie pšenice s chromozómy žita (*Secale cereale*, $2n = 2x = 14$). Jedinci z těchto linií se od původního druhu mimo morfologické odchylky liší i rezistencí k různým škůdcům a chorobám (Rogalska *et al.*, 1999). Šimková *et al.* (2008) využili ditelosomické adiční linie pšenice-žito pro třídění krátkého ramene chromozómu 1R žita. Na tomto rameni leží mnoho genů významných pro odolnost žita vůči biotickým stresům a proto je důležitým objektem pro mapování. Z vytříděného ramene byla zkonstruována BAC knihovna, která může být využita při např. pozičním klonování.

Substituční linie

Substituční linie se využívají přímo pro cytogenetické mapování. V těchto liniích je vždy celý chromozóm nebo jeho část nahrazena částí chromozómu z jiného druhu. Sekvenci DNA zde lze zamapovat do jednotlivých substituovaných segmentů chromozómů (binů) podobně jako u delečních linií. V případě, že jsou k mapování použity linie, u nichž je nahrazena pouze určitá část chromozómu, nazýváme takové mapování jako introgresní.

Naformátováno: Vpravo:
0,63 cm

3.6 Introgresní mapování

Introgresní mapování se úspěšně používá u druhů *Festuca pratensis* (*Fp*) a *Lolium perenne* (*Lp*). U těchto dvou příbuzných druhů lze pomocí GISH diskriminovat rodičovský chromatin. Mají také vysokou míru mezidruhové rekombinace, což velmi usnadňuje přípravu introgresních linií (Thomas *et al.*, 1994; Kopecký *et al.*, 2008).

Introgresní linie lze získat postupným křížením diploidní kostřavy luční *FF* (♂; $2n=2x=14$) se syntetickým tetraploidním jílkiem *LLLL* (♀; $2n=4x=28$). Vzniká triploid *LLF* ($2n=3x=21$), který je podroben zpětnému křížení s diploidním nebo tetraploidním jílkiem. Potomci tohoto křížení mohou nést jednotlivé chromozómy kostřavy. Opětovným zpětným křížením těchto potomků s jílkiem vznikají linie s rekombinovanými chromozómy.

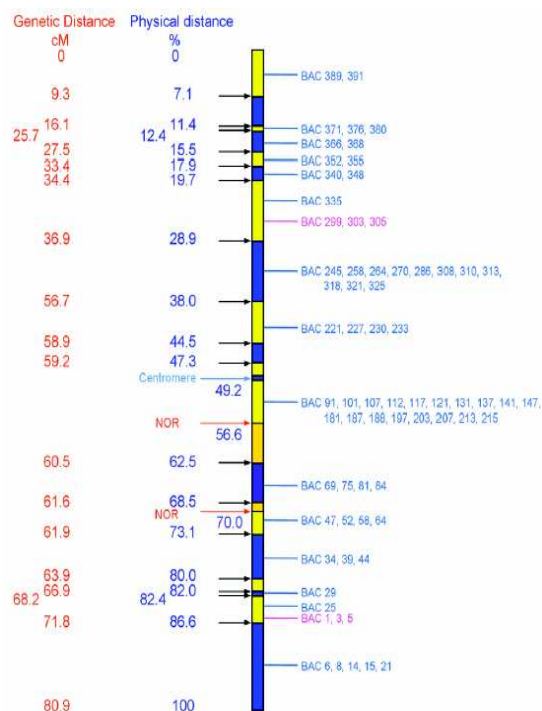
Unikátní charakteristika hybridů těchto druhů je předurčuje jako vhodný model pro studium meiotického párování a rekombinace. Rekombinace mohou probíhat po celé délce chromozómů, ale existují i místa s vyšší četností crossing overů (hotspots) v telomerických oblastech a naopak místa s nízkou úrovní rekombinací (cold spots) zejména v okolí centromery. Úroveň rekombinace mezi chromozómy *Fp* a *Lp* je značně vysoká, což umožňuje přenést jakýkoliv segment genomu kostřavy do genomu jílku. Následná analýza introgresí GISH umožňuje odhadnout jejich fyzickou velikost (Obr.10, King *et al.*, 2007a; Kopecký *et al.*, 2010). Introgresní linie jsou vhodné pro ukotvení markerů na jednotlivé substituované segmenty (King *et al.*, 2002). Mapování v substituovaném segmentu je usnadněno vysokou mírou polymorfismu markerů mezi genomy kostřavy a jílku.

Introgresní mapování se využívá například pro charakterizaci odrůd jílku, které získaly z genomu kostřav rezistenci k biotickým a abiotickým stresům. Poprvé využili introgresní křížení Thomas *et al.* (1994), kteří mapovali segment nesoucí mutaci v genu pro senescenci indukovanou degradací (*sid*), která byla vnesena z kostřavy luční do jílku mnohokvětého. Dále byla vytvořena i introgresní linie příbuzných druhů *Festuca arundinacea* (*Fa*) a *Lolium multiflorum* (*Lm*), na které bylo provedeno mapování genů odolnosti vůči suchu a teplu přenesených z kostřavy do jílku. Pro analýzu míst rekombinace byla opět využita GISH (Humphreys *et al.*, 2005). Přenosem genů odpovědných za rezistenci vůči suchu se zabývali také např. Lesniewska *et al.* (2001) a Kosmala *et al.* (2006). Linie ze stejných rodičů byly použity i pro vnesení genů tolerance k chladu a mrazu do genomu jílku mnohokvětého (*Lm*). Jedinci populací vzniklých zpětným křížením byly analyzovány metodou GISH a v kombinaci s FISH

Naformátováno: Vpravo:
0,63 cm

s rDNA sondami z odolných rostlin byla introgrese těchto genů lokalizována na chromozóm 2 *Lm* (Kosmala *et al.*, 2007).

Kromě genů pro rezistenci k suchu se do genomů jílků z kostřavy mohou vnášet také geny pro odolnost vůči různým patogenům. Roderick *et al.* (2003) přenesl z kostřavy luční gen rezistance proti rzi ovesné (*Puccinia coronata*) do genomu jílku mnohokvětého.



Obr.10: Introgressní mapa chromozómu 3 hybridu *Lm/Fp* s BAC/PAC klony odvozenými z rýže lokalizovanými v binech. Horizontální rozdělení chromozómu představuje místa rekombinací (King *et al.*, 2007b).

Naformátováno: Vpravo:
0,63 cm

4 Materiál a metodika

4.1 Materiál

4.1.1 Rostlinný materiál:

Jako výchozí rostlinný materiál bylo použito sedm substitučních linií *L. multiflorum* ($2n = 4x = 28$) s jedním substituovaným chromozómem *F.pratensis* (linie byly získány z University of California, Riverside, USA). Pro analýzu byli využiti jedinci získaní ze vzájemného křížení těchto substitučních linií. Genomová DNA pro GISH byla izolována z rostlin kostřavy luční (*F. pratensis*) a jílku mnohokvětého (*L. multiflorum*).

Pro lokalizaci BAC klonů na metafázní chromozómy byly využity klony z BAC knihovny *F. pratensis*, odrůda „Laura“. Knihovna byla vytvořena na Ústavu experimentální botaniky AV ČR v Olomouci pomocí restrikčních enzymů *Bam*HI a *Hind*III a obsahuje 21 888 klonů. Průměrná délka inzertu je 95 kb a knihovna pokrývá genom *F. pratensis* 1x. Lokalizace byla prováděna na metafázních chromozómech získaných z kořenových špiček kostřavy luční odrůdy „Fure“.

4.1.2 Přístroje:

Biologický termostat, BT 120, Laboratorní přístroje Praha, ČR

Biologický termostat TH 100, Laboratorní přístroje Praha, ČR

Centrifuga Jouan GR – 20 22, Trigon Plus, Říčany u Prahy, ČR

Centrifuga Jouan CR4i, Trigon Plus, Říčany u Prahy, ČR

Digestoř Merci M, Merci s.r.o., Brno, ČR

Elektroforéza, OWL Separation Systems, Portsmouth, USA

Fluorescenční mikroskop AX70, Olympus, Tokio, Japonsko

Fluorometr, Twener Biosystems, Sunnyvale, California, USA

PCR Termocycler PTC 200TM, Mj Research Inc., Waltham, Massachusetts, USA

Snímací zařízení SensiCam 12 Bit Cooled Imaging, PCO CCD Imaging, Německo

Stolní mikrocentrifuga Stratagene, Tomy Tech USA Inc., CA, USA

Světelný mikroskop CX31, Olympus, Tokio, Japonsko

Termocycler PTC 100TM, MJ Research Inc., Waltham, Massachusetts, USA

Třepačka Forma Orbital Shaker, Trigon Plus, Říčany u Prahy, ČR

Naformátováno: Vpravo:
0,63 cm

Třepačka Reax TOP, Heidolph, Germany

Vlhká komůrka SM30, Boekel Scientific Inc., Feasterville, Pennsylvania, USA

UV Stratalinker 2400, Stratagene

UV Transluminátor Chemi Genius Bio Imaging, Syngene, Cambridge, GB

Vodní lázeň GRANT SUB6, Grant Instruments, Cambridge, GB

Vodní lázeň Jouan, Trigon Plus, Říčany u Prahy, ČR

Vodní lázeň s třepačkou Memmert WNE17 Excellent, Schwabach, Německo

Zdroj napětí pro elektroforézu OSP-300V, OWL separation Systems, Portsmouth, USA

4.1.3 Chemikálie a roztoky

20x SSC (1 l)

175,3 g NaCl a 88,2 g citrátu sodného rozpustíme v části destilované vody, upravíme pH na 7 a doplníme destilovanou vodou na 1 l.

2x SSC (1 l)

100 ml 20x SSC a 900 ml destilované vody

1% blokovací reagent (50ml)

0,5 g blokovacího reagent rozpouštíme v 50 ml 4x SSC+Tween hodinu za stálého míchání při 70°C. Po rozpuštění autoklávovat a skladovat při – 20°C.

10% blokovací reagent (100 ml)

10 g blokovacího reagent rozpustit za stálého míchání při pH 7 ve 100 ml destilované vody.

5x TBE (1 l)

54 g Tris, 27,5 g kyselina boritá (H_3BO_3) a 20 ml 0,5 M EDTA. Doplnit destilovanou vodou do objemu 1 l.

0,5x TBE (1 l)

100 ml 5x TBE a 900 ml destilované vody

Odstraněno: ¶

Naformátováno: Vpravo:
0,63 cm

TE pufr (1 l, pH 8)

10 ml 1 mol. l⁻¹ Tris-HCl (pH 8) a 2 ml 0,5 mol. l⁻¹ EDTA (pH 8) doplnit destilovanou vodou do objemu 1 l.

1x PBS (1 l)

8 g NaCl, 0,2 g KCl, 3,62 g Na₂HPO₄ · 12 H₂O a 0,24 g KH₂PO₄ rozpustit v destilované vodě, pH upravit na 7,4 a doplnit vodou do 1 litru.

GET pufr (100 ml)

0,99 g glukózy, 2 ml 0,5 mol. l⁻¹ EDTA (pH 8) a 2,5 ml 1 mol. l⁻¹ Tris-HCl (pH 8) doplnit destilovanou vodou do objemu 100 ml

50% dextran sulfát

2,5 g dextranu rozpustit za mírného zahřátí v 5ml destilované vody

6x STOP C (10 ml)

2 ml 0,5 M EDTA (pH 8), 1 ml 1% SDS, 5 mg bromfenolové modři, 5 mg xylenecyanolu, 5 ml 42,5% glycerolu. Doporučené ředění: 5:1

2 YT médium (1 l)

16 g kasein enzymu, 10 g kvasinkového autolyzátu a 5 g NaCl rozpustit za stáلهo míchání v 1 litru destilované vody.

5x pufr 1 (100 ml)

5,8 g kyseliny maleinové a 4,4 g NaCl postupně rozpustit ve 100 ml destilované vody a pH upravit na 7,5 pomocí NaOH.

1x pufr 1 + 0,3% Tween (200 ml)

40 ml 5x pufr 1 a 600 µl Tween 20 doplnit destilovanou vodou do 200 ml.

Blokovací pufr II (50 ml)

10 ml 5x pufru 1 a 5 ml 10% blokovacího reagentu a doplnit destilovanou vodou do 50 ml.

Vymývací roztok (100 ml)

5 ml 4M NaOH a 1 ml 10% SDS a doplnit destilovanou vodou do 100 ml.

Ethidium bromid (1 l)

100 µl ethidium bromidu smíchat s 1 l destilované vody.

Chloramfenikol (1 ml)

12,5 mg chloramfenikolu rozpustit v 1 ml 96% ethanolu.

Fixační směs (12 ml)

Ethanol: kyselina octová (3:1), 9 ml ethanolu a 3 ml ledové kyseliny octové

Alkalické SDS (100 ml)

5 ml 4M NaOH a 10 ml 10% SDS doplnit destilovanou vodou do 100 ml.

Neutralizační pufr (100 ml)

60 ml 5M octanu draselného, 11,5 ml koncentrované kyseliny octové a 28,5 ml vody.

Hybridizační roztok I pro stringenci 77 % (1 ml)

100 µl 20x SSC, 200 µl 50% dextranu, 500 µl formamidu a doplnit destilovanou vodou do 1 ml. → výsledná koncentrace SSC je 2x SSC

Hybridizační roztok II pro stringenci 87 % (1 ml)

25 µl 20x SSC, 200 µl 50% dextranu, 500 µl formamidu a doplnit destilovanou vodou do 1 ml. → výsledná koncentrace SSC je 0,5 SSC

Hybridizační roztok III pro stringenci 98 % (1 ml)

5 µl 20x SSC, 200 µl 50% dextranu, 500 µl formamidu a doplnit destilovanou vodou do 1 ml. → výsledná koncentrace SSC je 0,1x SSC

Dále byly použity :

Invisorb Spin Plant Mini Kit , Invitex GmbH, Berlín, Germany

Biotin- Nick Translation Mix , Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany

DIG Nick Translation Mix, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany

Naformátováno: Vpravo:
0,63 cm

4.2 Metodika

4.2.1 Izolace genomové DNA

Izolace genomové DNA byla provedena pomocí Invisorb Spin Plant Mini Kitu (Invitex). DNA byla izolována ze zelených listů trav kostřavy luční a jílků mnohokvětého. 60 mg materiálu z každé rostliny bylo přeneseno do předchlazených třech misek, přelito kapalným dusíkem a homogenizováno tloučkem. Homogenizovaný materiál byl přenesen do 1,5ml mikrozkušavek.

Do každé mikrozkušavky bylo přidáno 400 μ l lyzačního pufru P a 20 μ l proteinázy K. Po opatrném promíchání se vzorky inkubovaly 30 minut při 65°C ve vodní lázni za mírného protřepávání. Lyzovaný materiál byl přenesen do mikrozkušavek s filtrem a centrifugován 1 minutu při 12 000 rpm.

Po centrifugaci bylo k filtrátu přidáno 200 μ l binding pufru P a vzorky byly opět opatrně promíchány. Poté byly vzorky přeneseny do mikrozkušavek se Spin filtrem, inkubovány 1 minutu a centrifugovány 1 minutu při 12 000 rpm. Spin filtr byl přenesen do nových 2ml mikrozkušavek a na něj bylo nanášeno 550 μ l promývacího pufru I. Vzorky byly centrifugovány 1 minutu při 12 000 rpm. Dále byl stejný postup zopakován 2x s 550 μ l promývacího pufru II. Promyté vzorky byly znovu centrifugovány 2 minuty při 12 000 rpm k odstranění zbytkového ethanolu.

Spin filtr byl přemístěn do 1,5ml mikrozkušavek a DNA byla z filtru eluována přidáním 100 μ l předehřátého elučního pufru D. Po tříminutové inkubaci při pokojové teplotě (RT) byly vzorky centrifugovány 1 minutu při 10 000 rpm.

Výsledek izolace byl ověřen pomocí elektroforézy ve 2% agarózovém gelu v 0,5x TBE pufru při napětí 6 V.cm⁻¹. Koncentrace vyizolovaných klonů byla změřena flourometrem s použitím flouorescenčního barviva Picogreen (Invitrogen).

4.2.2 Izolace klonů z BAC knihovny

Do označených 100ml Erlenmayerových baněk s 25 ml 2YT média bylo přidáno po 2 μ l bakterií daného klonu z BAC knihovny a 25 μ l chloramfenikolu (12,5 mg/ml). Erlenmayerovy baňky uzavřené gázovou zátkou byly vloženy na třepačku, kde byly bakterie kultivovány při 37°C a 230 rpm přes noc. Úspěšnou kultivaci lze na druhý den zhodnotit i pouhým okem; zákal v médiu signalizuje úspěšnou kultivaci bakterií.

Z každé bakteriální kultury bylo odebráno 10 ml do centrifugačních kyvet. Odebrané vzorky byly centrifugovány 10 minut při 1 700 g (4°C). Po slití supernatantu

Naformátováno: Vpravo:
0,63 cm

byl sediment resuspendován ve 100 μl GET pufru s RNázou (100 $\text{ng}/\mu\text{l}$) a přenesen do 1,5ml mikrozkušavek. K resuspendovanému sedimentu bylo přidáno 400 μl alkalického SDS. Obsah byl promíchán otáčením zkumavky a inkubován 5 minut na ledu. Po inkubaci bylo do mikrozkušavek přidáno 300 μl neutralizačního roztoku, obsah byl opět jemně promíchán a inkubován 10 minut na ledu. Po inkubaci byly vzorky centrifugovány 10 minut při 15 000 g (4°C). Supernatant byl přenesen do čisté 1,5ml mikrozkušavky a centrifugován 5 minut při 15 000 g (4°C). Po centrifugaci byl supernatant opět přenesen do nové mikrozkušavky a bylo k němu přidáno 750 μl izopropanolu. Precipitace DNA izopropanolem probíhala 5 minut při laboratorní teplotě. Po inkubaci byly vzorky centrifugovány 10 minut při 15 000 g (4°C). Sediment byl postupně omyt ledovým (-20°C) 70% a 96% ethanolem a vysušen. Vysušený sediment byl rozpuštěn ve 100 μl H_2O s RNázou (100 $\text{ng}/\mu\text{l}$) a ponechán 30 minut při 37°C . Po inkubaci bylo ke vzorkům přidáno 100 μl 7,5M octanu amonného (NH_4Ac). Vzorky byly opatrně promíchány a inkubovány 10 minut na ledu. Následovala centrifugace 10 minut při 15 000 g (4°C). Supernatant byl opět přenesen do čisté mikrozkušavky a bylo k němu přidáno 400 μl ledového 96% ethanolu. Obsah mikrozkušavek byl opatrně promíchán a inkubován 1 hodinu při -20°C . Po skončení inkubace byly vzorky centrifugovány 10 minut při 15 000 g (4°C). Získaný sediment byl postupně omyt ledovým 70% a 96% ethanolem a následně vysušen. Vysušený sediment byl na závěr rozpuštěn ve 20 μl H_2O a vyizolovaná DNA byla skladována při -20°C .

Výsledek izolace byl ověřen pomocí elektroforézy ve 2% agarózovém gelu ve 0,5x TBE pufru při napětí $6 \text{ V}\cdot\text{cm}^{-1}$. Koncentrace vyizolovaných klonů byla změřena fluorometrem s použitím flouorescenčního barviva Picogreen (Invitrogen).

4.2.3 Příprava blokovací DNA pro GISH

Blokovací DNA byla připravena z genomové DNA jílku mnohokvětého v celkovém reakčním objemu 400 μl . Součástí reakčního mixu byla DNA (konečná koncentrace $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$), NaOH (konečná koncentrace 0,4M) a H_2O . Promíchaný vzorek byl vložen do vroucí vody na 35 minut. Vroucí voda našťípala DNA na fragmenty o délce kolem 200-500 bp. Mikrozkušavka s fragmentovanou DNA byla umístěna na led. Po zchládnutí bylo ke vzorku přidáno 400 μl 3M octanu sodného ($\text{pH}=5,2$) a obsah byl pečlivě promíchán. Pro dosažení precipitace DNA bylo ke vzorku přidáno 800 μl absolutního ethanolu. DNA lze nechat precipitovat přes noc při -20°C . Po precipitaci

Naformátováno: Vpravo:
0,63 cm

byl vzorek centrifugován 30 minut při 14 000 g (4°C). Supernatant byl odstraněn a sediment byl promyt 2x v 1ml 70% ethanolu. DNA byla vysušena a rozpuštěna v 50 µl TE pufru. Délka DNA fragmentů byla ověřena pomocí elektroforézy ve 2% agarózovém gelu v 0,5x TBE pufru při napětí 6 V.cm⁻¹.

4.2.4 Příprava sond pro *in situ* hybridizaci

Pro GISH byla jako sonda použita genomová DNA kostřavy luční (značení digoxigeninem). Pro BAC-FISH byly sondy vytvořeny z vybraných klonů BAC knihovny (viz tabulka 2 v kapitole Výsledky, značení biotinem).

V obou případech byla DNA značena Nick-translací s využitím biotin Nick-translačního mixu nebo digoxigenin Nick-translačního mixu (Roche). Minimální koncentrace DNA pro značení sond pomocí Nick-translačního mixu byla 63 ng/µl. Reakční objem pro Nick-translaci byl 10 µl. Součástí reakční směsi byli digoxigenin Nick-translační mix nebo biotin Nick-translační mix, DNA a voda. Nick-translačního mixu bylo do každé reakce přidáno po 2 µl. Objem DNA byl variabilní v závislosti na koncentraci výchozí DNA (potřebné množství DNA v reakčním mixu bylo 500 ng). Voda tvořila zbylý objem do 10 µl. Všechny komponenty byly smíchány v 0,5ml mikrozkušavkách na ledu, centrifugovány na mikrocentrifuze a inkubovány v termocykleru 110 minut při 15°C. Po inkubaci byla reakce zastavena přidáním 1 µl 0,5M EDTA (pH 8) a inkubací 10 minut při 65°C.

Výsledek značení byl ověřen elektroforézou ve 2% agarózovém gelu v 0,5x TBE pufru při napětí 6 V. cm⁻¹. Při úspěšném značení bylo získáno spektrum fragmentů o velikosti v rozmezí 200 - 500 bp.

4. 2. 5 Kontrolní detekce intenzity signálu značených sond

V případě slabého výsledného signálu na preparátu je možné ověřit kvalitu fluorescenčně značené sondy a intenzitu signálu. K testované sondě bylo přidáno tolik vody, aby výsledný objem byl alespoň 20 µl (v případě, že je výchozí objem sondy větší než 20 µl, není třeba sondu ředit). K naředěné sondě bylo přidáno stejné množství (20 µl) fenolu. Obsah zkumavky byl jemně promíchán. Následně bylo přidáno 20 µl chloroformu (chloroform očišťuje vzorek od zbytkového fenolu). Po opatrném promíchání byl vzorek centrifugován 3 minuty při 10 000 g. Po centrifugaci se suspenze rozdělila na dvě fáze: horní organickou a spodní vodní fázi, ve které zůstala DNA. Vodní fáze byla odebrána do nové 0,5ml mikrozkušavky a bylo k ní opět přidáno

Naformátováno: Vpravo:
0,63 cm

20 µl chloroformu. Promíchaný vzorek byl centrifugován 3 minuty při 10 000 g a toto přečištění chloroformem bylo zopakováno celkem 3x. Z každé přečištěné sondy byla vytvořena koncentrační řada o šesti koncentracích (objem 10 µl), kde první vzorek byl ředěn vodou 10x a každý další byl vždy 10x zředěnější než předchozí. Vzorky koncentrační řady byly v dostatečných odstupech naneseny na kladně nabitou membránu, vysušeny a vloženy do crosslinkeru, kde došlo k přichycení DNA na membránu. Membrána byla následně ponořena do kyvety s 5x pufr 1, kde byla za mírného třepání promývána při laboratorní teplotě. Po pěti minutách byl pufr 1 vyměněn za block pufr II a membrána byla s pufr 1 inkubována 30 minut za mírného třepání při laboratorní teplotě. Do blok pufru II v kyvetě byla přidána protilátka anti-digoxigenin-AP (1: 10 000) a membrána s protilátkou byla inkubována dalších 30 minut. Po skončení inkubace byla membrána promyta pufr 1 s Tweenem a následně destilovanou vodou.

Vizualizace byla provedena pomocí chromogenního substrátu. Membrána v kyvetě byla zalita několika kapkami BP pyrole substrátu (Roche), kyveta byla zabalena do alobalu a membrána byla ponechána inkubaci minimálně 30 minut. Po skončení inkubace byla vyhodnocena intenzita signálu ze vzorků koncentrační řady. Za použitelnou byla považována taková sonda, jejíž signál byl viditelný při ředění 1000x.

4.2.6 Příprava roztlakových preparátů pro FISH

Metafázní chromozómy pro fluorescenční *in situ* hybridizaci byly získány z kořenových špiček rostlin introgresních linií a kostřavy luční, které byly týden před odběrem umístěny do hydroponického roztoku Hydroponex (Hu-ben, Čerčany). Kořínky byly odebírány v době mezi 11 a 13 hodinou, kdy mají buňky těchto rostlin nejvyšší mitotický index. Byly odebírány pouze mladé kořínky a ty byly umístovány do skleněných zkumavek s ledovou destilovanou vodou. Odebrané kořínky umístěné na ledu byly na 24 hodin uloženy do 4°C, kde proběhla synchronizace buněčného cyklu. Po synchronizaci byly kořínky přeneseny do fixáže 3:1 (ethanol:ledová kyselina octová). Fixace probíhala 7 dní v termostatu při 37°C. Fixované kořínky byly 2 hodiny barveny v 1% acetokarmínu. Nabarvené kořínky byly skladovány ve fixační směsi při -20°C.

Roztlakové preparáty kořenových špiček byly prováděny na důkladně vyleštěných podložních sklech, které byly několik dní umístěny v 96% ethanolu.

Naformátováno: Vpravo:
0,63 cm

Kořínky byly před odstraněním kořenové špičky přeneseny na 10 minut do 1% acetokarmínu. Oddělená kořenová špička byla zakápnuta 45% kyselinou octovou, překryta krycím sklem a byl proveden roztlak. Preparát byl zafixován několik sekund nad plamenem a po zchládnutí dodatečně roztlačen. Takto připravené preparáty byly umístěny na suchý led minimálně na 1 hodinu.

Po inkubaci na suchém ledu byly roztlakové preparáty promyty v kyselině octové. Po opatrném odstranění krycího skla žiletkou byly preparáty nejprve na minutu vloženy do 45% kyseliny octové při laboratorní teplotě a následně přeneseny na 3 minuty do 45% kyseliny octové, předehřáté na 50°C. Po oschnutí byla kvalita roztlakových preparátů vyhodnocena na optickém mikroskopu a preparáty s dostatečným množstvím metafází byly vybrány pro FISH.

4.2.7 BAC-FISH

Na roztlakových preparátech kostřavy luční byla provedena fluorescenční *in situ* hybridizace s oddělenou denaturací se sondami z BAC klonů při stringencích 87 % a 98 %. Při oddělené denaturaci dochází zvlášť k denaturaci sondy a zvlášť k denaturaci chromozómů a výsledný signál je specifitější. Kvůli délce sond byla také provedena amplifikace signálu.

Na preparát bylo nanášeno 100 µl směsi obsahující formamid, 20x SSC a H₂O. Poměr složek byl závislý na zvolené stringenci (viz tabulka 1).

Tabulka 1: Objemové složení roztoku pro oddělnou denaturaci chromozómů v závislosti na stupni stringence.

	Stringence 87 %	Stringence 98 %
formamid (µl)	70	70
20x SSC (µl)	2,5	0,5
H ₂ O (µl)	27,5	29,5

Chromozómy byly denaturovány na Termocykleru 1,5 minuty při 80°C a následně byly promývány 5 minut v 70% ledovém ethanolu při -20°C, 5 minut v 90% ethanolu při -20°C a 5 minut ve 100% ethanolu při laboratorní teplotě. V průběhu promývání preparátů ethanolom byl připraven hybridizační mix. Pro každou sondu bylo připraveno 20 µl mixu do 0,5 ml zkumavky. Hybridizační mix obsahoval 1 µl sondy značené biotinem, 1 µl C₀t 100 DNA (100 ng/µl) z kostřavy luční, 1 µl DNA z Calf thymus (10 mg/ml), 14,5 µl hybridizačního roztoku II a 2,5 µl H₂O (nebo 14,1 µl hybridizačního roztoku III a 2,9 µl H₂O pro stringenci 98 %). Sondy v hybridizačních

Naformátováno: Vpravo:
0,63 cm

mixech byly denaturovány v PCR Termocykleru 10 minut při 90°C. Po denaturaci byly hybridizační mixy nanášeny na osušená skla a vloženy do temné vlhké komůrky předehřáté na 37°C, kde přes noc probíhala hybridizace.

Po hybridizaci byla destilovanou vodou odmyta krycí skla a preparáty byly promývány 10 minut v 2x SSC pufru ve vodní lázni předehřáté na 42°C, 2x 5 minut v 2xSSC pufru při laboratorní teplotě a 5 minut v 1x PBS pufru při laboratorní teplotě. Na osušená skla bylo nanášeno 30 µl 1% blokovacího reagent s 1 µl protilátky Streptavidin Cy3 (1 µg/ml, ředění 1:1000). Preparáty byly inkubovány 2 hodiny při 37°C v temné vlhké komůrce. Po inkubaci první protilátky byla odmyta krycí skla a preparáty byly promývány 3x po 5 minutách v 1x PBS pufru ve tmě. Na osušená skla bylo nanášeno 30 µl 1% blokovacího reagent s 1 µl druhé protilátky - biotinylovaný anti-streptavidin (ředění 1:100). Následovala dvouhodinová inkubace v temné vlhké komůrce při 37°C. Po inkubaci druhé protilátky byla opět odmyta krycí skla, preparáty byly promyty 3x 5 minut v 1x PBS pufru ve tmě, osušeny a bylo na ně nanášeno 30 µl 1% blokovacího reagent s 1 µl třetí protilátky - Streptavidin Cy3. Skla byla inkubovány 2 hodiny v temné vlhké komůrce při 37°C. Po skončení inkubace byla odmyta krycí skla a preparáty byly promyty 3x 5 minut v 1x PBS pufru ve tmě. Po osušení byla skla zakápnuta 7 µl Vectashield uzavíracího média s DAPI a uložena do 4°C.

Preparáty byly hodnoceny pomocí fluorescenčního mikroskopu s použitím dvou filtrů pro DAPI a Cy3. Signály byly snímány CCD kamerou a zpracovány programem MicroImage (Olympus, Japonsko). Finální úpravy byly provedeny v programu Adobe Photoshop v. 8.0.

4.2.8 Kolokalizace vybraných BAC klonů se sondou 45S rDNA

Vybrané specifické BAC klony byly kolokalizovány se sondou 45S rDNA, která hybridizuje na chromozómu 3 v místě sekundární konstrikce. Kolokalizace byla provedena pomocí FISH s oddělenou denaturací. Reakční mix v tomto případě obsahoval dvě sondy – lokalizovaný klon (biotin) a 45S rDNA (digoxigenin). Kvůli různému značení bylo potřeba využití dvou protilátek. Postup hybridizace byl totožný s BAC-FISH, jen byla navíc v prvním kole hybridizace protilátek přidána protilátka proti digoxigeninu anti dig-FITC (1 µg/ml, ředění 1: 200) a ve druhém kole anti sheep-FITC (1 mg/ml, ředění 1: 50).

Preparáty byly hodnoceny pomocí fluorescenčního mikroskopu s použitím tří filtrů pro DAPI, FITC a Cy3. Signály byly snímány CCD kamerou a zpracovány programem

Naformátováno: Vpravo:
0,63 cm

MicroImage (Olympus, Japonsko). Finální úpravy byly provedeny v programu Adobe Photoshop v. 8.0.

4.2.9 GISH

Na vybraných roztlakových preparátech rekombinačních linií byla provedena genomová *in situ* hybridizace se stringencí 77%. Na každý preparát bylo nanášeno 20 μl hybridizačního mixu, který obsahoval 16 μl hybridizačního roztoku, 1 μl blokovací DNA *L. multiflorum*, 1 μl genomové sondy *F. pratensis* značené digoxigeninem a 2 μl H_2O . Hybridizační mix byl překryt krycím sklem a byla provedena současná denaturace sondy a chromozómů na termocykleru 2:30 minuty při 80°C. Denaturované preparáty byly okamžitě umístěny do temné vlhké komůrky předehřáté na 37°C, kde přes noc probíhala hybridizace sondy na cílové sekvence na metafázních chromozómech.

Po hybridizaci byla stříčkou s destilovanou vodou odmyta krycí skla a preparáty byly vloženy do 2x SSC pufru na 10 minut. Poté byly preparáty opláchnuty destilovanou vodou a vysušeny. Na preparáty bylo nanášeno 30 μl roztoku 1% blokovacího reagent (Roche, Vector Laboratories) s protilátkou anti-digoxigenin FITC (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, ředění 1 : 200). Preparát byl inkubován s protilátkou ve vlhké komůrce 2 hodiny při 37°C.

Po inkubaci byla opět destilovanou vodou odstraněna krycí skla, preparáty byly opláchnuty destilovanou vodou, vysušeny a zakápnuty 7 μl Vectashield uzavíracího média s DAPI (4,6-diamidino-2-fenylindol) (Vector Laboratories, USA). Skla byla před prohlížením uchovávána ve tmě při 4°C.

Preparáty byly hodnoceny pomocí fluorescenčního mikroskopu Olympus AX70 s použitím filtrů pro DAPI a FITC. Signály byly snímány CCD kamerou a zpracovány programem MicroImage (Olympus, Japonsko). Finální úpravy byly provedeny v programu Adobe Photoshop v. 8.0.

4.2.10 Měření distribuce homeologních rekombinací

U chromozómu nesoucího homeologní rekombinaci byla v programu MicroImage měřena délka obou ramen a velikost rekombinovaného segmentu. Pro každou rostlinu bylo vždy měřeno pět metafází a z naměřených hodnot byl spočítán aritmetický průměr. Pro každý chromozóm bylo změřeno přibližně 100 míst rekombinace. Každý chromozóm byl rozdělen do 20 stejně velkých úseků, přičemž

jeden úsek představoval přibližně 20 Mbp v závislosti na délce chromozómu. Průměrné hodnoty místa rekombinace pro jednotlivé linie z pěti měření byly přiřazeny do odpovídajících intervalů. Na základě konečného počtu crossing-overů v daných intervalech byly pro jednotlivé chromozómy vytvořeny grafy zobrazující rozložení rekombinačních událostí podél chromozómů.

Kvůli odlišné velikosti chromozómů kostřavy a jílku však nebylo možné jednoduše porovnat místa rekombinací. Na základě obsahu DNA a relativní délky chromozómů obou druhů byla vypočtena kalibrační konstanta pro jednotlivé chromozómy, díky níž bylo možné přepočítat velikost substituovaných segmentů kostřavy.

Výpočet kalibrační konstanty pro daný chromozóm:

$$\text{Konstanta} = 1C_{xL} * RLF / 1C_{xF} * RLL$$

$1C_{xL}$ – velikost genomu monoploida *Lm*

$1C_{xF}$ – velikost genomu monoploida *Fp*

RLL – relativní délka daného chromozómu v genomu *Lm*

RLF – relativní délka daného chromozómu v genomu *Fp*

5 Výsledky

5.1 Lokalizace vybraných BAC klonů na metafázních chromozómech pomocí BAC- FISH

K lokalizaci BAC klonů metodou BAC-FISH bylo na základě předchozích experimentů vybráno celkem 61 BAC klonů z misky 3 BAC knihovny, u nichž byl očekáván specifický signál. Z těchto 61 BAC klonů byla vyizolována DNA a byla změřena její koncentrace. U klonu O19 byla naměřena koncentrace pouhých 35 ng/μl a z takto nízké koncentrace DNA nelze pomocí Nick-translačního mixu připravit značenou sondu. Z toho důvodu byl klon O19 vyřazen z dalších analýz.

Dále byly z testování vyřazeny klony G1, H5 a N24, u kterých nebyl po fluorescenční *in situ* hybridizaci na chromozómech opakovaně zaznamenán žádný signál (Obr.11a). Vyřazeny byly i klony G13, I11, J1 a L7, u kterých se v průběhu značení sond opakovaně vyskytly problémy s fragmentací DNA. Při kontrolní elektroforéze bylo u těchto klonů zjištěno, že v průběhu značení nedošlo k fragmentaci a tedy ani ke značení DNA.

U zbývajících 52 BAC klonů byla testována specifita pomocí BAC-FISH s oddělnou denaturací. Přehled specifity jednotlivých klonů je uveden v tabulce 2. U 36 analyzovaných BAC klonů byl zjištěn nespecifický disperzní signál na všech chromozómech, který se ani změnami stringence nepodařilo více specifikovat (Obr.11b). U dalších 7 BAC klonů nebyl signál úplně disperzní, ale ani zcela specifický. U těchto klonů bylo možné na určitých chromozómech vysledovat jistý hybridizační patern (Obr.11c). U zbývajících 10 BAC klonů byla zaznamenána nejvyšší specifita, ale ani tyto klony nebyly jednoznačně jednokopiové (Obr.11d). Lokalizace jednotlivých specifických BAC klonů je znázorněna na obrázcích č. 12, 13, 14 a 15.

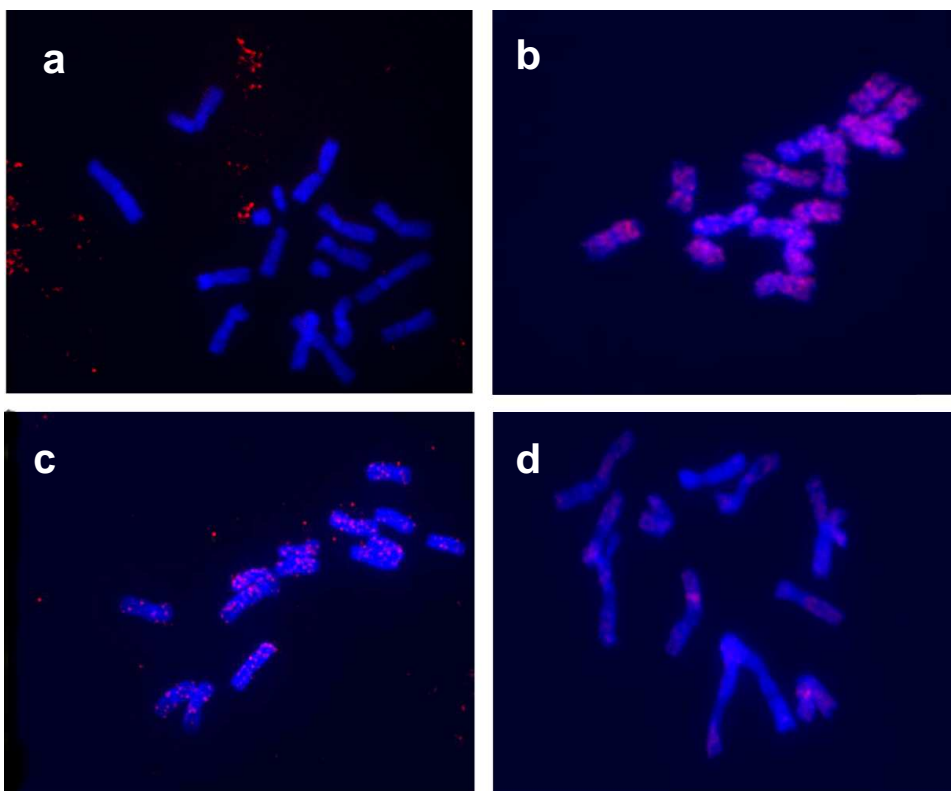
Mikroskopická analýza lokalizovaných specifických BAC klonů naznačovala, že 4 z těchto klonů (N14, J5, O16 a I2) by mohly ležet na chromozómu 3. Pomocí kolokalizace se sondou 45S bylo zjištěno, že pouze dva z těchto klonů jsou opravdu lokalizovány na chromozómu 3 a to klony O16 a I2 (Obr. 16). Oba klony leží v centrální oblasti dlouhého ramene chromozómu 3.

Tabulka 3: Výsledky testování specifity vybraných BAC klonů metodou BAC-FISH. 0= klony, u kterých se nepodařilo vytvořit sondu . D/S= signály na více chromozómech s částečnou specifitou.

Klon	Miska	Koncentrace (ng/μl)	Značení	Specifita
A12	3	119	Biotin	Disperzní
A16	3	93	Biotin	Disperzní
A18	3	102	Biotin	Disperzní
B1	3	116	Biotin	Disperzní
B11	3	116	Biotin	Disperzní
B17	3	81	Biotin	Disperzní
B23	3	113	Biotin	Disperzní
C3	3	116	Biotin	Disperzní
C9	3	114	Biotin	Disperzní
C10	3	100	Biotin	Disperzní
C23	3	114	Biotin	Disperzní
D2	3	107	Biotin	Disperzní
D10	3	109	Biotin	Disperzní
D13	3	117	Biotin	Disperzní
D18	3	122	Biotin	Disperzní
E5	3	122	Biotin	Disperzní
E21	3	113	Biotin	Disperzní
E18	1	101	Biotin	Specifický
E24	3	112	Biotin	Specifický
F11	3	82	Biotin	Disperzní
F16	3	102	Biotin	Disperzní
F19	3	117	Biotin	D/S
G1	3	110	Biotin	bez signálu
G13	3	105	Biotin	0
G15	3	118	Biotin	D/S
G23	3	90	Biotin	Disperzní
H2	3	114	Biotin	Disperzní
H5	3	99	Biotin	bez signálu
H11	3	65	Biotin	Disperzní
H12	3	90	Biotin	Disperzní
H22	3	94	Biotin	Specifický
I2	3	99	Biotin	Specifický
I9	3	67	Biotin	Disperzní
I11	3	80	Biotin	0
I17	3	85	Biotin	Disperzní
I20	3	110	Biotin	Specifický
J1	3	111	Biotin	0
J5	3	102	Biotin	Specifický
J9	3	106	Biotin	Disperzní
J17	3	64	Biotin	Disperzní
J22	3	98	Biotin	Specifický
K11	3	77	Biotin	Disperzní
K11	1	98	Biotin	Specifický
K15	3	122	Biotin	Disperzní
L5	3	68	Biotin	Disperzní
L7	3	115	Biotin	0
L14	3	92	Biotin	Disperzní
M8	3	115	Biotin	D/S
M23	3	105	Biotin	D/S

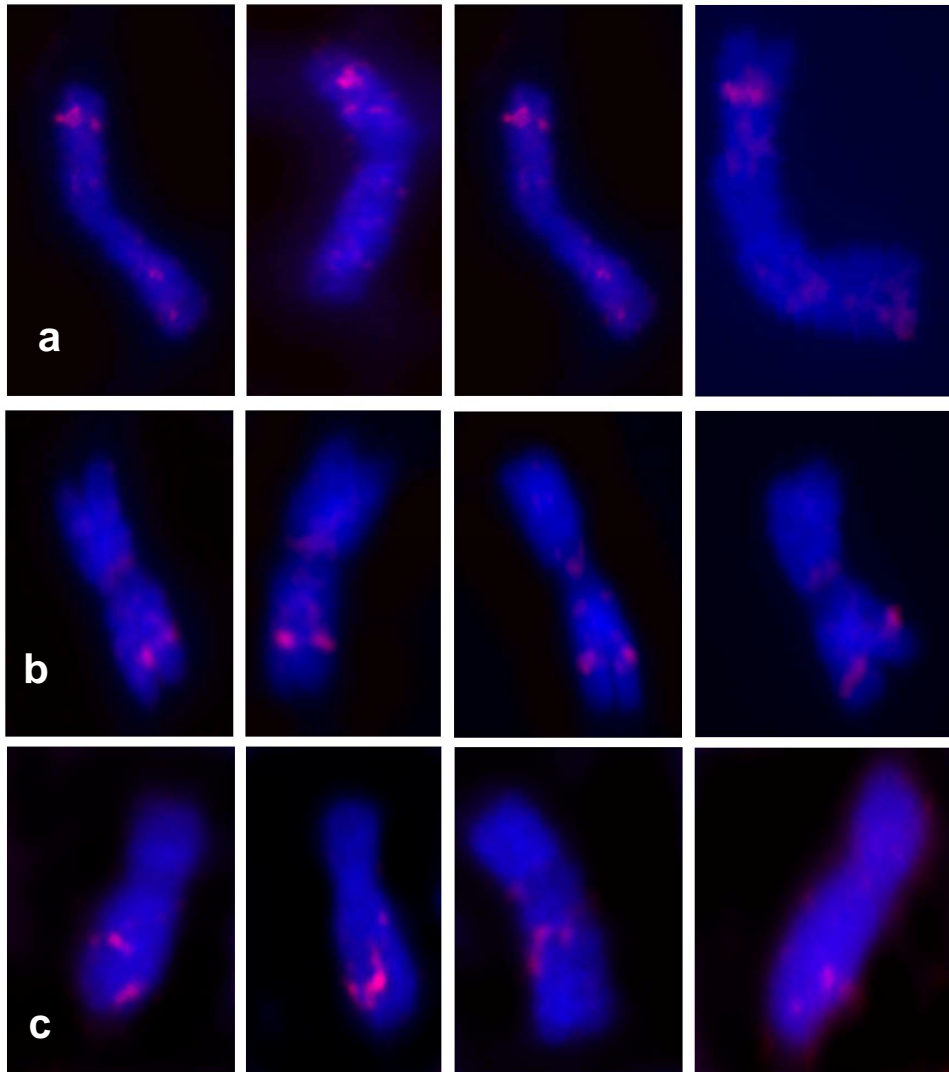
Naformátováno: Vpravo:
0,63 cm

<i>Klon</i>	<i>Miska</i>	<i>Koncentrace (ng/μl)</i>	<i>Značení</i>	<i>Specifita</i>
N5	3	92	Biotin	Disperzní
N14	3	78	Biotin	Specifický
N18	3	79	Biotin	0
N24	3	131	Biotin	bez signálu
O7	3	96	Biotin	D/S
O16	3	90	Biotin	Specifický
O17	3	72	Biotin	Disperzní
O19	3	35		0
P6	3	72	Biotin	D/S
P21	3	122	Biotin	D/S
P23	3	106	Biotin	Disperzní



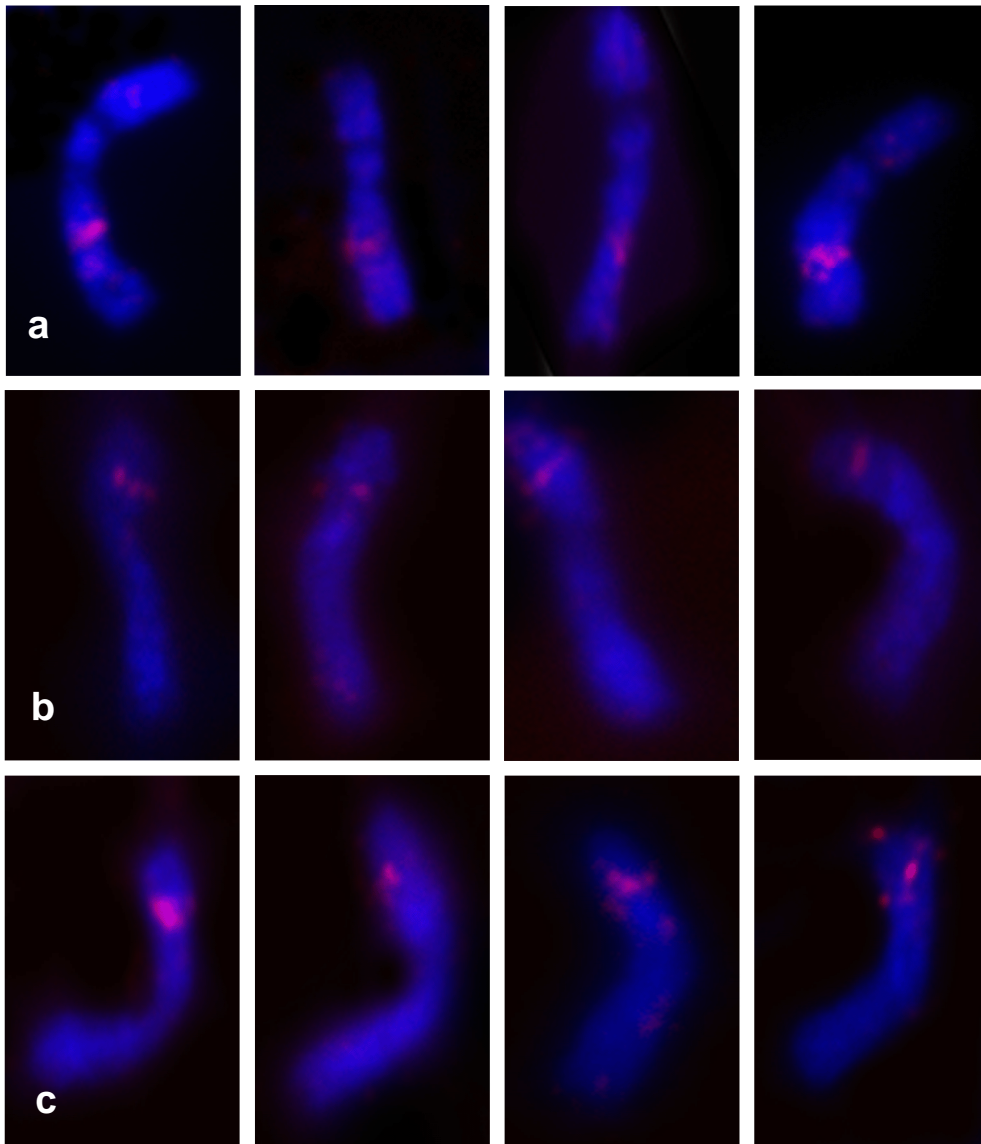
Obr.11: Cytogenetická lokalizace BAC klonů na metafázní chromozómy kostřavy luční metodou BAC-FISH. Modrý signál: chromozómy barvené DAPI. Červený signál: BAC klony značené biotinem. a: lokalizace BAC klonu H5, b: disperzní signál BAC klonu I17, c: částečně disperzní signál BAC klonu G15, d: lokalizace specifického BAC klonu I2.

Naformátováno: Vpravo:
0,63 cm

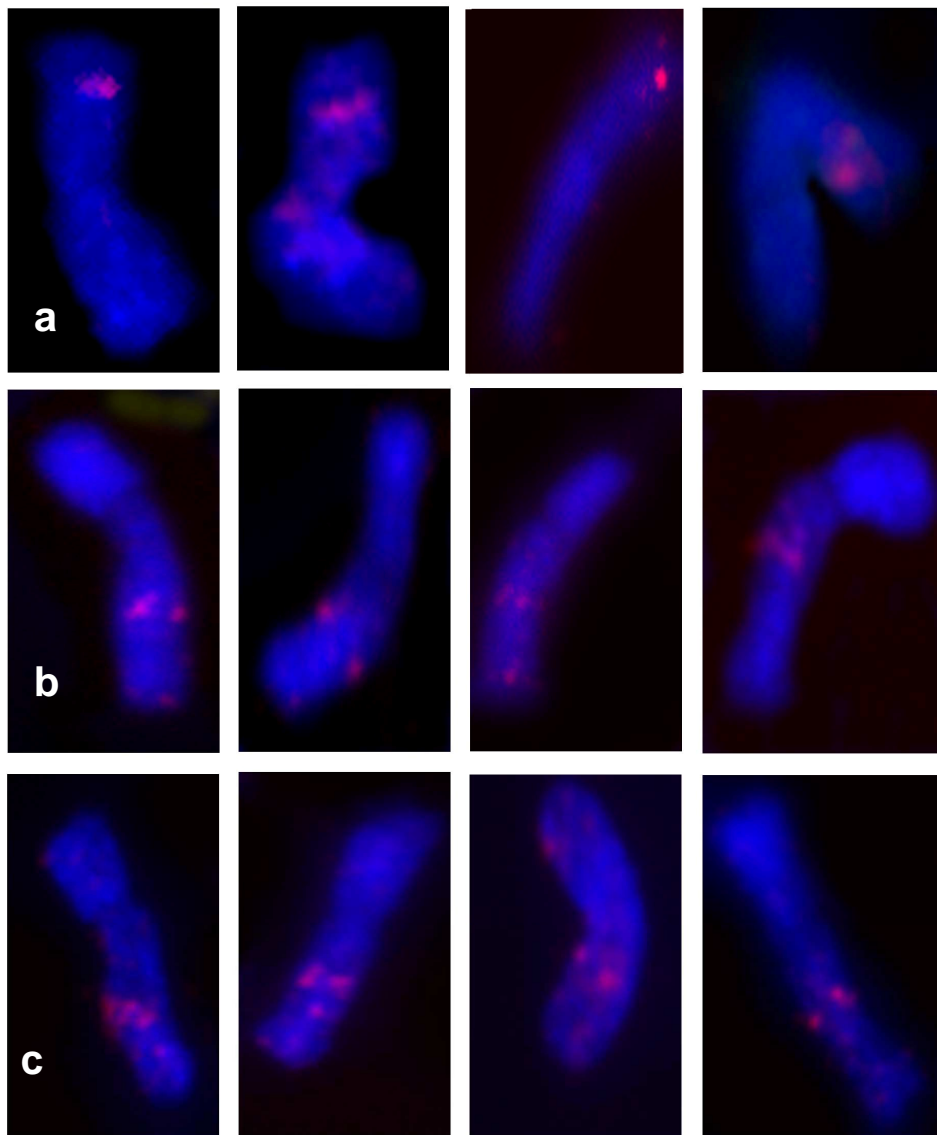


Obr.12: Cytogenetická lokalizace BAC klonů s místně specifickým signálem na metafázních chromozómech kostřavy luční. Modrý signál: DAPI, červený signál: BAC klony značené biotinem. a: BAC klon E18, b: BAC klon F21, c: BAC klon E24.

Naformátováno: Vpravo:
0,63 cm



Obr.13: Cytogenetická lokalizace BAC klonů s místně specifickým signálem na metafázních chromozómech kostřavy luční. Modrý signál: DAPI, červený signál: BAC klony značené biotinem. a: BAC klon I2, b: BAC klon J5, c: BAC klon J22.

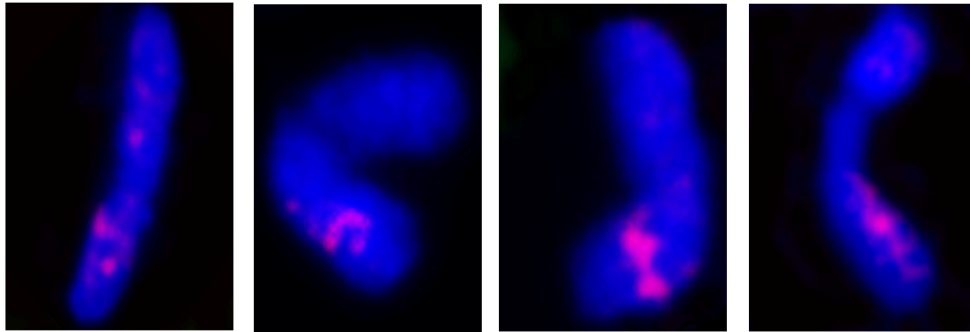


Obr.14: Cytogenetická lokalizace BAC klonů s místně specifickým signálem na metafázních chromozómech kostřavy luční. Modrý signál: DAPI, červený signál: BAC klony značené biotinem. a: BAC klon K11, b: BAC klon N14, c: BAC klon O16.

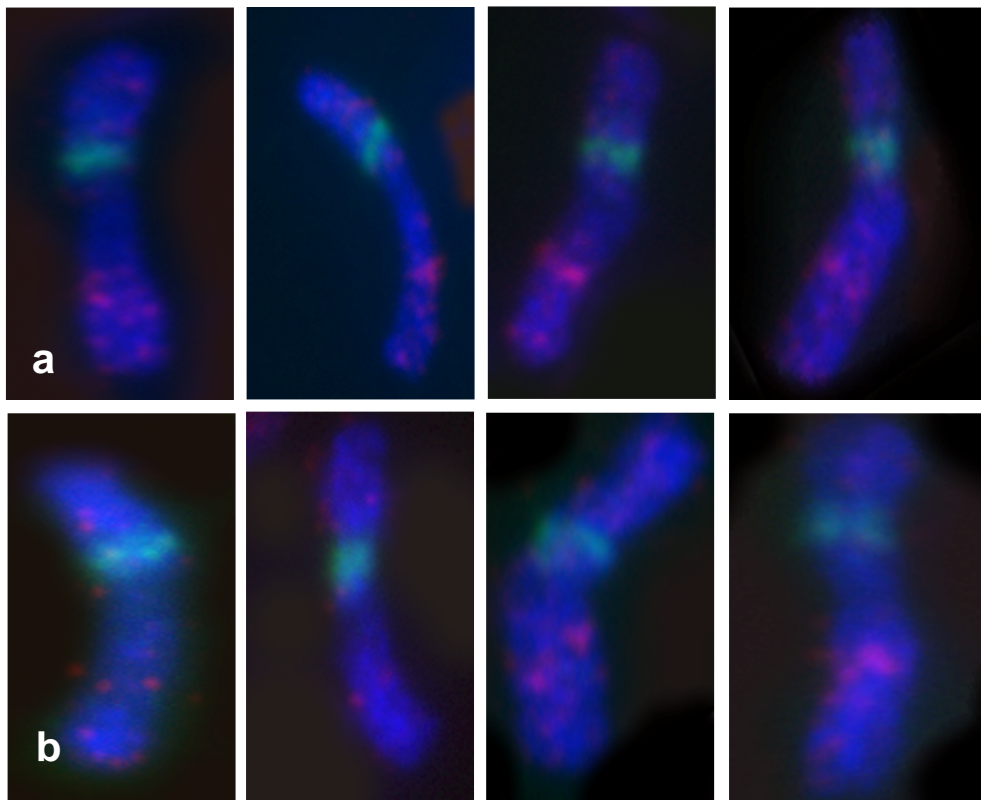
|

50

Naformátováno: Vpravo:
0,63 cm



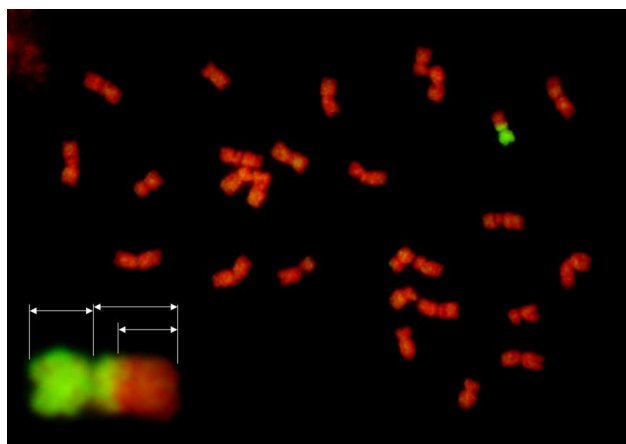
Obr.15: Cytogenetická lokalizace BAC klonů s místně specifickým signálem na metafázních chromozómech kostřavy luční. Modrý signál: DAPI, červený signál: BAC klon H22 značený biotinem.



Obr.16: Kolokalizace BAC klonů se sondou 45S. Modrý signál: DAPI, červený signál: BAC klony značené biotinem, zelený signál: 45S rDNA značená digoxigeninem. a: BAC klon I2, b: BAC klon O16.

5.2 Charakterizace introgresních linií

Charakterizace introgresních linií byla provedena metodou GISH. Jednotlivé linie jílku mnohokvětého nesly ve svém genomu různě velké fragmenty kostřavy luční. U linií byla analyzována frekvence homeologních rekombinací. Celkem bylo analyzováno 251 rekombinačních linií nesoucích jeden chromozóm s introgresí. Z toho bylo 29 rekombinačních linií pro chromozóm 1, 42 linií pro chromozóm 2, 45 linií chromozómu 3, 30 linií chromozómu 4, 42 linií chromozómu 5, 38 linií chromozómu 6 a 25 linií pro chromozóm 7. U každé linie byly vždy měřeny parametry rekombinantního chromozómu u 5 metafází (Obr. 17). Pro každý ze sedmi chromozómů bylo zaznamenáno přibližně 100 rekombinačních zlomů.



Obr. 17: GISH na rekombinační linii *Lm/Fp*. Red signal: *L. multiflorum*. Green signal: *F. pratensis*. V levém spodním rohu detail měřených parametrů u chromozómu s introgresí.

Z naměřených hodnot u jednotlivých rekombinantních chromozómů byly získány informace o délce chromozómů a poloze centromery. Na základě těchto hodnot bylo možné popsat morfologii jednotlivých chromozómů *F. pratensis*. Diploidní *F. pratensis* má sedm párů chromozómů. Tři chromozómové páry jsou metacentrické a čtyři jsou submetacentrické. Nejdelší je chromozóm 4 (6,79 μm) a naopak nejkratší je chromozóm 1 (4,67 μm). Chromozóm 3 nese na krátkém rameni sekundární konstrikcii. Délka daných chromozómů se při měření v jednotlivých metafázích lišila až o 5 %. Tato odchylka byla pravděpodobně způsobena prostorovým rozlišením detekčního systému nebo odlišnostmi v kondenzaci chromatinu u jednotlivých metafází.

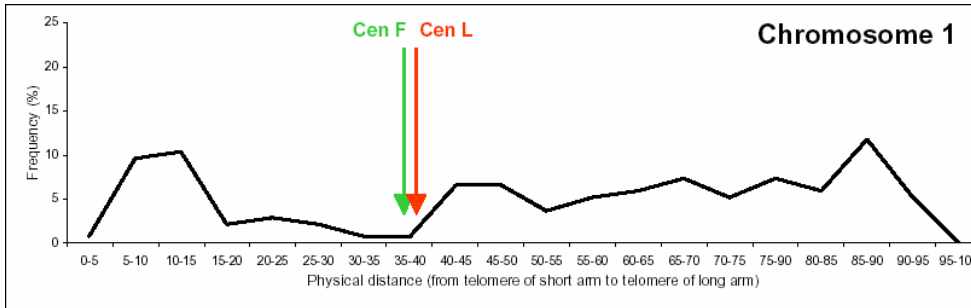
Z naměřených hodnot byly dále získány informace o frekvenci homeologních rekombinací u jednotlivých chromozómů. Průměrné hodnoty místa rekombinace

Naformátováno: Vpravo:
0,63 cm

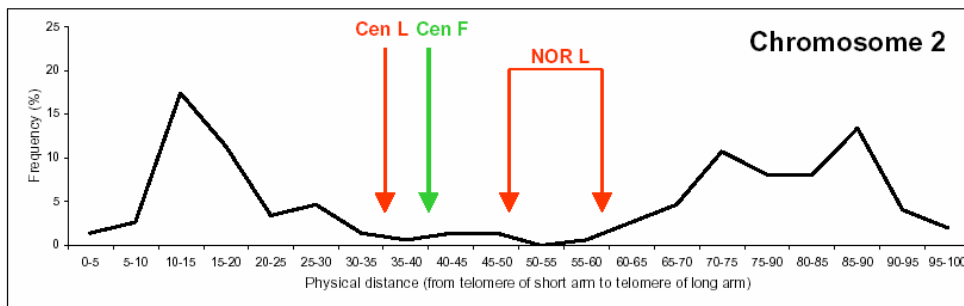
pro jednotlivé linie z pěti měření byly přiřazeny do odpovídajících intervalů, které v součtu představovaly délku chromozómu. Na základě počtu homeologních rekombinací v jednotlivých intervalech byla vypočtena frekvence rekombinačních událostí podél jednotlivých chromozómů.

U chromozómu 1 docházelo ke crossing-overům v podstatě po celé délce chromozómu. Velmi nízká frekvence rekombinací byla dle očekávání v oblasti centromery a dále také v telomerických oblastech. Naopak v subtelomerických oblastech bylo možno pozorovat mírně zvýšenou rekombinační činnost. U chromozómu 2 bylo rozložení rekombinačních událostí velmi nerovnoměrné. Útlum homeologních rekombinací byl zaznamenán v centrální oblasti chromozómu, kde se nachází centromery a u jílu také sekundární konstriktce. Podobně jako u chromozómu 1 byla nízká četnost rekombinací i v telomerických oblastech a častěji docházelo k rekombinacím v oblastech subtelomerických. V centrální části krátkého ramene byl výskyt rekombinace nejvyšší. Chromozóm 3 byl rozložením rekombinací velmi podobný chromozómu 1. Překvapivě zde nebyl zaznamenán pokles rekombinací v místě sekundární konstriktce. Podél chromozómu nebyla zjištěna ani žádná oblast s preferenčním výskytem crossing-overů. U chromozómu 4 byla nejnižší frekvence rekombinací v oblasti centromer a telomer a naopak ve střední části krátkého ramene byla oproti ostatním oblastem chromozómu zaznamenána výrazně zvýšená frekvence crossing-overů. U chromozómu 5 bylo zjištěno poměrně rovnoměrné rozložení rekombinací po celém chromozómu s výjimkou subtelomerické oblasti dlouhého ramene, kde byla četnost rekombinací výrazně zvýšená. K rekombinacím téměř nedocházelo pouze v oblastech telomer. V centromerické oblasti byla u tohoto chromozómu četnost rekombinací srovnatelná s jinými oblastmi. Chromozóm 6 vykazoval velmi nevyvážené rozložení crossing-overů. Kromě centromerické a telomerické oblasti byl téměř nulový stupeň rekombinací zaznamenán také v proximální části krátkého ramene chromozómu. Rekombinace probíhaly hlavně ve středových oblastech chromozomálních ramen, ale jednoznačně nejvyšší výskyt rekombinací byl naměřen v subtelomerické části dlouhého ramene. U chromozómu 7 nedocházelo k téměř žádným rekombinacím v oblasti centromer. Mírně snížený výskyt byl zaznamenán i v oblasti sekundární konstriktce a v telomerických oblastech. I přes tento úbytek měl ale chromozóm 7 v oblasti telomer jednoznačně nejvyšší četnost rekombinací. V žádné oblasti nebyl ale zaznamenán výrazně vyšší počet rekombinací. Popsané výsledky jsou graficky znázorněny v následujících grafech.

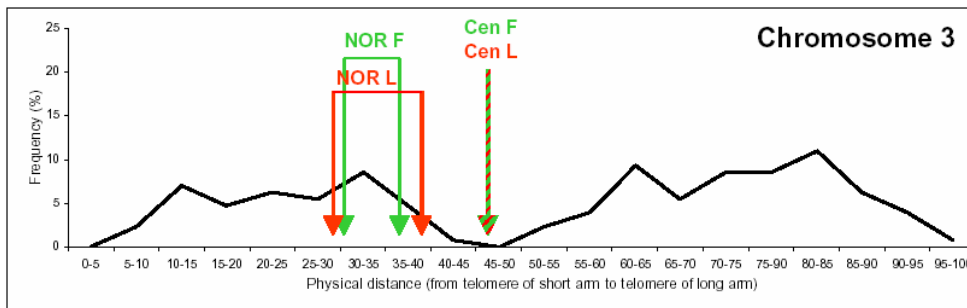
Naformátováno: Vpravo:
0,63 cm



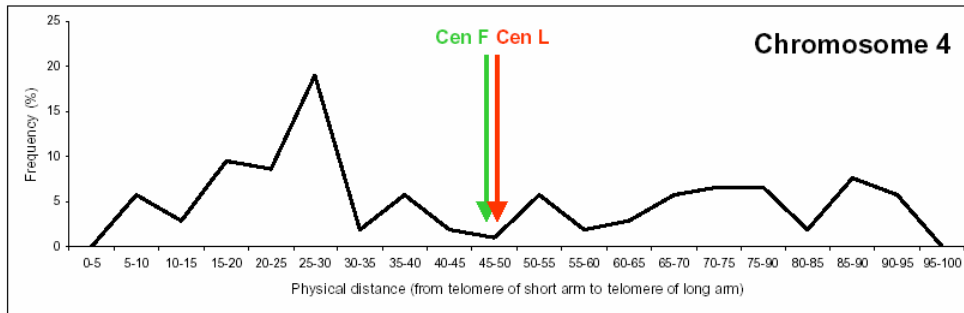
Graf 1: Frekvence rekombinačních zlomů podél chromozómu 1. Zelená šipka ukazuje polohu centromery *F. pratensis*, červená šipka pak polohu centromery *L. multiflorum*.



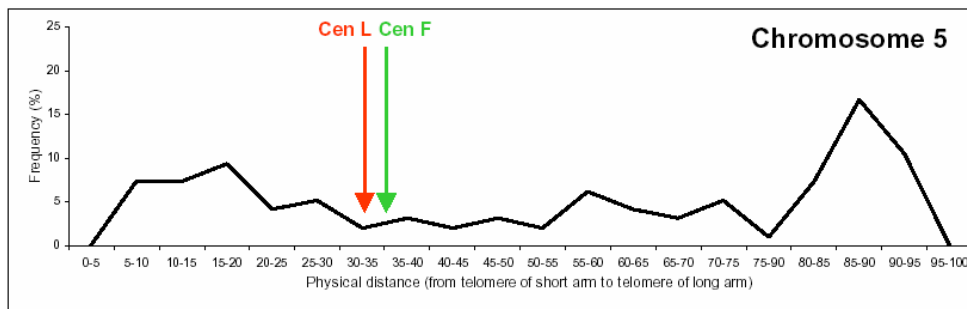
Graf 2: Frekvence rekombinačních zlomů podél chromozómu 2. Zelená šipka ukazuje polohu centromery *F. pratensis*, červená šipka pak polohu centromery *L. multiflorum*. Zdvojená červená šipka naznačuje polohu NOR *L. multiflorum*.



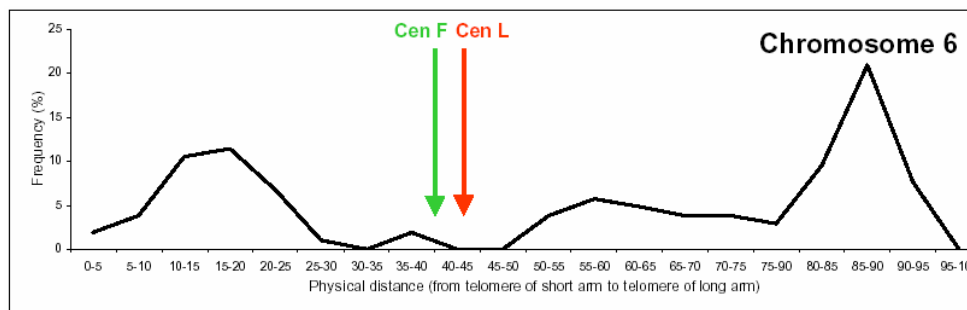
Graf 3: Frekvence rekombinačních zlomů podél chromozómu 3. Červeno-zelená šrafovaná šipka ukazuje polohu centromery *F. pratensis* a *L. multiflorum*. Zdvojené zelené šipky znázorňují umístění NOR *F. pratensis* a červená dvojšipka pak NOR *L. multiflorum*.



Graf 4: Frekvence rekombinačních zlomů podél chromozómu 4. Zelená šipka ukazuje polohu centromery *F. pratensis*, červená šipka pak polohu centromery *L. multiflorum*.

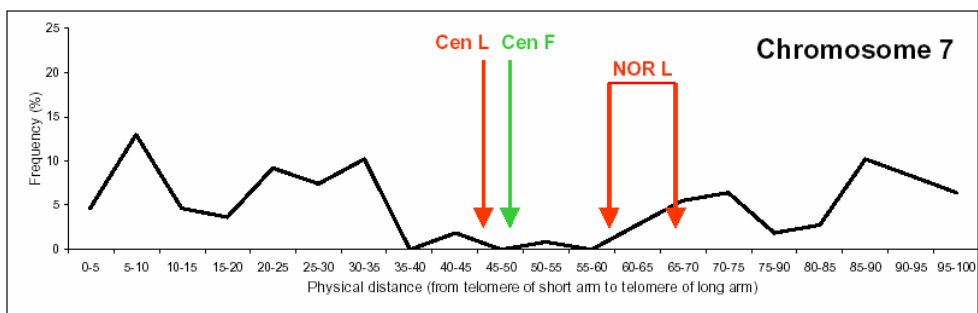


Graf 5: Frekvence rekombinačních zlomů podél chromozómu 5. Zelená šipka ukazuje polohu centromery *F. pratensis*, červená šipka pak polohu centromery *L. multiflorum*.



Graf 6: Frekvence rekombinačních zlomů podél chromozómu 6. Zelená šipka ukazuje polohu centromery *F. pratensis*, červená šipka pak polohu centromery *L. multiflorum*.

Naformátováno: Vpravo:
0,63 cm



Graf 7: Frekvence rekombinačních zlomů podél chromozómu 7. Zelená šipka ukazuje polohu centromery *F. pratensis*, červená šipka pak polohu centromery *L. multiflorum*. Dvojšipka naznačuje místo NOR *L. multiflorum*.

Jak je z grafů patrné, k rekombinačním zlomům dochází téměř po celé délce jednotlivých chromozómů. Výskyt rekombinací ovšem nebyl rovnoměrný. U většiny chromozómů lze se vzrůstající vzdáleností od centromery pozorovat zvyšující se výskyt crossing-overů. Na jednotlivých chromozómech lze také pozorovat místa s častějším výskytem rekombinačních zlomů („hotspots“) a naopak místa, kde ke crossing-overům téměř nedochází („cold spots“). Hotspots se vyskytují převážně v centrálních částech chromozomálních ramen. Nízký výskyt rekombinací byl dle očekávání v centromerických a pericentromerických oblastech. Velmi nízká frekvence crossing-overů byla však překvapivě zaznamenána i v distálních částech chromozómových ramen, tedy v telomerických oblastech.

Snížený výskyt rekombinací částečně koreloval také s existencí organizátoru jádérka (NOR – nucleolus organizing region) u chromozómu 7 a chromozómu 2. Oproti tomu u chromozómu 3 nebyl v oblasti NOR pozorován úbytek rekombinací.

I přesto, že bylo na chromozómech nalezeno několik míst s nízkým výskytem rekombinace, lze říci, že je možné přenést jakýkoliv úsek donorového druhu (*F. pratensis*) do genomu recipienta (*L. multiflorum*). Toho lze využít například k přenosu významných znaků cestou introgresního křížení. Úspěch přenosu ovšem závisí také na velikosti přenášeného segmentu.

6 Diskuse

Jedním z úkolů předkládané práce byla lokalizace vybraných BAC klonů na metafázní chromozómy kostřavy luční. V této části bylo demonstrováno, že BAC klony mohou poskytovat jasný nízkokopiový signál a jsou tedy vhodnými cytogenetickými markery, které mohou být použity k identifikaci jednotlivých chromozómů a k fyzickému mapování. Celkem bylo testováno 61 BAC klonů. Ne všechny testované klony ovšem poskytovaly signál na metafázních chromozómech. U třech BAC klonů nebyl opakovaně zaznamenán signál na chromozómech, ale na interfázních jádrech ano. Absence signálu na metafázních chromozómech je tedy pravděpodobně způsobena strukturou chromatinu v odpovídajícím místě, která neumožňuje hybridizaci komplementární sondy.

V rámci zvýšení specifičnosti a snížení signálu na pozadí byla v průběhu celého experimentu v hybridizačním mixu obsažena kompetitivní genomová DNA kostřavy luční. I přesto se ale u více než 70 % analyzovaných BAC klonů nepodařilo získat specifický signál. U zbývajících BAC klonů se i při využití C_{0t} -100 většinou vyskytoval slabý signál na více chromozómech, ale specifický signál byl vždy snadno odlišitelný od pozadí. Procento specifických klonů bylo ve výsledku velmi nízké. Jiang *et al.* (1995) provedli BAC-FISH na chromozómech rýže s náhodně vybranými BAC klony a i bez použití kompetitivní genomové DNA dávalo 70 % BAC klonů specifický signál. Možným vysvětlením může být obsah repetitivní DNA v jednotlivých genomech. Genom rýže je asi 5x menší než genom kostřavy luční a dá se tedy předpokládat, že obsahuje také méně repetice, což vysvětluje vyšší specifitu signálu a nižší úroveň pozadí. Dále je také možné, že výsledky analýzy byly zkreslené, protože autoři lokalizovali pouze 10 BAC klonů.

Ve většině případů dávaly BAC klony oddělené signály na obou chromatidách homologních chromozómů. V některých případech byl ovšem signál pouze na jednom z páru homologních chromozómů. Tento jev byl pravděpodobně způsoben lokálními individuálními změnami struktury chromatinu, které mohly ovlivnit denaturaci těchto oblastí. Z podobného důvodu nebyly velmi pravděpodobně signály na všech metafázních roztlacích.

Výsledky FISH analýz naznačovaly, že by až 5 BAC klonů mohlo být lokalizováno na chromozómu 3, který nese sekundární konstrikci na krátkém rameni. Dva z těchto klonů byly na krátkém a tři na dlouhém rameni chromozómu. Detailní analýza se sondou specifickou pro 45S rDNA však ukázala, že jednoznačně se na tomto

Naformátováno: Vpravo:
0,63 cm

chromozómu nachází jen 2 z 5 předpokládaných BAC klonů a oba tyto klony byly lokalizovány ve stejné oblasti chromozómu 3. Jednoznačné upřesnění vzájemné polohy těchto dvou BAC klonů by bylo možné pomocí technik s vyšším rozlišením, např. pomocí FISH na pachytenních chromozómech.

Dále byla provedena analýza frekvence rekombinačních událostí u rekombinačních linií *L. multiflorum*/*F. pratensis*. Ve výsledku bylo zjištěno, že u většiny chromozómů může k homeologní rekombinaci docházet po celé jejich délce. Rozložení těchto rekombinací ovšem není rovnoměrné. Ve většině případů lze pozorovat zvyšující se počet rekombinačních událostí se zvyšující se vzdáleností od centromery. Stejný trend byl zaznamenán i v předchozích analýzách triploidních hybridů *L. multiflorum* a *F. pratensis* a také u pentaploidních hybridů *F. arundinacea* x *L. multiflorum* (Zwierzykowski *et al.*, 1998, 1999). Toto rozložení rekombinací není ale charakteristické jen pro trávy. Podobný trend byl pozorován také u mnoha obilovin, např. u žita (Lukaszewski, 1992) nebo u pšenice (Dvořák *et al.*, 1984).

Extrémní úbytek crossing-overů byl u rekombinačních linií zaznamenán v telomerických a subtelomerických oblastech. Ke stejným závěrům dospěli při studiu hybridů kostřav a jílků i Zwierzykowski *et al.* (1998, 1999) a King *et al.* (2002). Tento fenomén je však typický jen pro hybridy, protože u čistých linií kostřavy luční a jílků mnohokvětého dochází k rekombinacím přednostně právě v distálních částech chromozomálních ramen (Ree *et al.*, 1974; Karp *et al.*, 1983). Absenci rekombinačních zlomů v telomerických a subtelomerických oblastech je možné částečně vysvětlit nedostatečně citlivým detekčním systémem. Na druhou stranu distální části chromozómů těchto dvou druhů podléhají také rychlejší evoluci, což může vést k menší sekvenční homologii než u zbývajících oblastí.

Částečný úbytek rekombinací byl zaznamenán i v oblastech, kde se nacházela sekundární konstrikce (NOR). Z našich výsledků ovšem vyplývá, že snížení frekvence crossing-overů v těchto oblastech pravděpodobně přímo nesouvisí s přítomností NOR. Zatímco u chromozómů 2 a 7 byl v oblasti sekundární konstrikce jednoznačně zaznamenán pokles rekombinační činnosti, u chromozómu 3 nedošlo v oblasti NOR k žádnému významnějšímu úbytku rekombinací. Tato nepravidelnost může mít původ v morfologii chromozómů jednotlivých druhů. Sekundární konstrikci na chromozómech 2 a 7 nese pouze jílek. Oproti tomu ale NOR na chromozómu 3 mají oba tyto druhy. Oblasti sekundární konstrikce jsou navíc evoločně velmi konzervované a vyznačují se velkou sekvenční homologii, což podporuje výskyt rekombinačních událostí v těchto

Naformátováno: Vpravo:
0,63 cm

místech. Úbytek rekombinací související s oblastí organizátoru jadérka byl zaznamenán i u chromozómu 1B pšenice (Dvořák *et al.*, 1984) a chromozómu 1R žita (Lawrence *et al.*, 1986). V rozporu s našimi výsledky byl úbytek rekombinačních zlomů překvapivě zaznamenán v NOR oblasti chromozómu 3 substitučních linií *F. pratensis* x *L. perenne* (King *et al.*, 2002), přestože oba chromozómy nesou sekundární konstrikci. Tato odlišnost by mohla být způsobena tím, že mezi druhy *F. pratensis* a *L. perenne* je nižší sekvenční homologie než u dvojice *F. pratensis* a *L. multiflorum*.

7 Závěr

Cílem předkládané práce bylo lokalizovat BAC klony na metafázní chromozómy *F. pratensis* a dále charakterizovat rekombinantní linie *Lm/Fp* z pohledu rekombinačních událostí.

V první části bylo lokalizováno 61 vybraných BAC klonů na metafázní chromozómy kostřavy luční. Na základě výsledků BAC-FISH analýzy vybraných klonů bylo 10 BAC klonů nízkokopiových s místně specifickým signálem. 36 BAC klonů mělo disperzní, místně nespecifický signál na všech chromozómech. U 7 BAC klonů byl zaznamenán částečně disperzní signál, kde bylo ale možné na některých chromozómech vysledovat pravidelný hybridizační patern. Pomocí sondy pro 45S rDNA bylo zjištěno, že dva ze specifických klonů, O16 a I2, leží v centrální části dlouhého ramene chromozómu 3. Získané specifické klony budou využity pro vytvoření molekulárního karyotypu kostřavy luční, jehož sestavení bude součástí další práce.

Ve druhé části bylo analyzováno celkem 251 rekombinantních linií technikou GISH na metafázních chromozómech. U rekombinantních chromozómů byla sledována četnost homeologních rekombinací podél jednotlivých chromozómů. Na základě měření bylo zjištěno, že k rekombinačním zlomům může docházet po celé délce chromozómů, ale jejich výskyt není rovnoměrný. Četnost rekombinací obvykle klesá směrem k centromerické oblasti. U některých chromozómů lze pozorovat oblasti s extrémně nízkou („cold spots“) nebo extrémně vysokou („hotspots“) frekvencí rekombinací. Snížený výskyt rekombinací částečně koreloval také s existencí organizátoru jadérka. Zvýšený výskyt rekombinačních zlomů byl obvykle zaznamenán v centrálních částech chromozómových ramen. Na základě výsledků lze říci, že je možné přenést jakýkoliv úsek donorového druhu (*F. pratensis*) do genomu recipienta (*L. multiflorum*).

8 Seznam použité literatury

- Alm V., Fang C., Busso C.S., Devos K.M., Vollan K., Grieg Z., Rognli O.A. (2003): A linkage map of meadow fescue (*Festuca pratensis* Huds.) and comparative mapping with other *Poaceae* species. *Theor Appl Genet*, 180: 25-40
- Andersen C.L., Koch J., Kjeldsen E. (1998): CpG islands detected by self-primed in situ labelling (SPRINS). *Chromosoma* 107: 260–266.
- Asp T., Frei U.K., Didion T., Nielsen K.K., Lübberstedt T. (2007): Frequency, type, and distribution of EST-SSRs from three genotypes of *Lolium perenne*, and their conservation across orthologous sequences of *Festuca arundinacea*, *Brachypodium distachyon*, and *Oryza sativa*. *BMC Plant Biol.* 2007 Jul 12;7:36.
- Bardsley D., Cuadrado A., Jack P., Harrison G., Castilho A., Heslop-Harrison J.S. (1999): Chromosome markers in the tetraploid wheat *Aegilops ventricosa* analysed by *in situ* hybridization. *Theor. Appl. Genet.* 99: 300-304
- Bass H.W., Marshall W.F., Sedat J.W., Agard D.A., Cande W.Z. (1997): Telomeres cluster de novo before initiation of synapsis: a three-dimensional spatial analysis of telomere positions before and during meiotic prophase. *J Cell Biol.* 137: 5-18
- Benzer, S., 1961 On the topography of the genetic fine structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 47: 403–415
- Brown T.A. (1999): Mapping genomes by genetic techniques. In: *Genomes*. BIOS Scientific Publishers Ltd
- Cabrera A., Martin A., Barro F.. (2002): In-situ comparative mapping (ISCM) of Glu-1 loci in *Triticum* and *Hordeum*. *Chromosome Res.* 2002;10(1):49-54.
- Cai Y., Xiang F., Zhi D., Liu H., Xia G.(2007): Genotyping of somatic hybrids between *Festuca arundinacea* Schreb. and *Triticum aestivum* L.. *Plant Cell Rep.* Oct;26(10):1809-19. Epub 2007 Jun 27.
- Cao M., Sleper D.A., Dong F., Jiang J. (2002): Genomic in situ hybridization (GISH) reveals high chromosome pairing affinity between *Lolium perenne* and *Festuca mairei*. *Genome* 43: 398-403
- Caspersson T. et al. (1968): Chemical differentiation along metaphase chromosomes. *Exp. Cell. Res.* 49: 219
- Caspersson T., Zech L., Johansson C.(1970): Differential binding of alkylating fluorochromes in human chromosomes. *Exp. Cell. Res.* 60: 315 - 319

- Cremer T., Kurz A., Zirbel R., Dietzel S., Rinke B., Schrock E., Speicher M.R., Mathieu U., Jauch A., Emmerich P et al. (1993): Role of chromosome territories in the functional compartmentalization of the cell nucleus. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology LVIII: 777-791
- Chen C., Sleper D.A., Johal G.S. (1998): Comparative RFLP mapping of meadow and tall fescue. Theor Appl Genet 97:255–260
- Cheng Z., Presting G.G., Buell C.R., Wing R.A., Jiang J. (2001): High resolution pachytene chromosome mapping of bacterial artificial chromosomes anchored by genetic markers reveals the centromere location and the distribution of genetic recombination along chromosome 10 of rice. Genetics 157:1749-1757
- Cheng Z., Buell C.R., Wing R.A., Jiang J. (2002): Resolution of fluorescence *in situ* hybridization mapping on rice mitotic prometaphase chromosomes, meiotic pachytene chromosomes and extended DNA fibers. Chromosome Res 10: 379-387
- Cheung V.G., Nowak N., Jang W. et al. (2001): Integration of cytogenetic landmarks into the draft sequence of the human genome. Nature 409: 953–958.
- Cuadrado A., Schwarzacher T. (1998): The chromosomal organization of simple sequence repeats in the wheat and rye genomes. Chromosoma 107: 587-594
- Dixkens C., Klett C., Bruch J., Kollak A., Serov O.L., Zhdanova N., Vogel W., Hameister H. (1998): ZOO-FISH analysis in insectivores: “Evolution extols the virtue of the status quo”. Cytogenet Cell Genet 80: 61-67
- Dvořák J., Chen K.Y. (1984): Distribution of nonstructural variation between wheat cultivars along chromosome 6Bp: evidence from the linkage map and physical map of the arm. Genetics 106: 325-333
- Franz P.F., Alonso-Blanco C., Liharska T.B., Peeters A.J.M., Zabel P., de Jong J.H. (1996): High resolution physical mapping in *Arabidopsis thaliana* and tomato by fluorescence *in situ* hybridization to extend DNA fibers. The Plant Journal 9 (3):421-430
- Friebe B., Gill B.S. (1994): C-band polymorphism and structural rearrangements detected in common wheat (*Triticum aestivum*). Euphytica 74: 1-5
- Gall J.G., Pardue M.L. (1969): Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 63: 378-383
- Gosden J., Hantratty D., Starling J., Fantes J., Mitchell A., Porteous D. (1991): Oligonucleotide primed *in situ* DNA synthesis (PRINS) – A method for

- chromosome mapping, banding and investigation of sequence organization. *Cytogenetic and Cell Genetics* 57: 100-104
- Gosden J., Lawson D. (1994): Rapid chromosome identification by oligonucleotide-primed *in situ* DNA synthesis (PRINS). *Human Mol Genet* 3: 931–936.
- Hanson R.E., Zwick M.S., Choi S., Islam-Faridi M.N., McKnight T.D., Wing R.A., Price H.J., Stelly D.M (1995): Fluorescent *in situ* hybridization of a bacterial artificial chromosome. *Genome* 38(4):646-651.
- Hayward M.D., Forster J.W., Jones J.G., Dolstra O., Evans C., McAdam N.J., Hossain K.G., Stammers M., Will J., Humphreys M.O., Evans G.M. (1998): Genetic analysis of *Lolium*. I. Identification of linkage groups and the establishment of a genetic map. *Plant Breed* 117:451–455
- Heng H.H.Q., Squire J., Tsui L.C. (1992): High-resolution mapping of mammalian genes by *in situ* hybridization to free chromatin. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:9509–9513
- Heplop-Harrsson J.S., Swarzacher T. (1996): Genomic Southern and *in situ* hybridization for plant genome analysis. In: Jauhar PP (ed), *Methods of genome analysis in plants*, pp 163-180, New York, CRC Press
- Howell E.C., Armstrong S.J., Barker G.C., Jones G.H., King G.J., Ryder C.D., Kearsey M.J. (2005): Physical organization of the major duplication on Brassica oleracea chromosome O6 revealed through fluorescence *in situ* hybridization with *Arabidopsis* and *Brassica* BAC clones. *Genome* 48: 1093-1103
- Hulbert S.H., Richter T.E., Axtell J.D., Bennetzen J.L. (1990). Genetic mapping and characterization of sorghum and related crops by means of maize DNA probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 4251-4255.
- Humphreys J., Harper J.A., Armstead I.P., Humphreys M.W. (2005): Introgression-mapping of genes for drought resistance transferred from *Festuca arundinacea* var. *glaucescens* into *Lolium multiflorum*. *Ther. Appl. Genet.* 110: 579-587
- Ikeuchi T. (1997): Extending the capabilities of human chromosome analysis from high-resolution banding to chromatine fiber-FISH. *Human Cell* 10: 121-134
- Iovene M., Wielgus S.M., Simon P., Buell C.R. Jiang J. (2008): Chromatin Structure and Physical Mapping of Chromosome 6 of Potato. *Genetics* 180: 1307-1317
- Inoue M., Zhensheng G., Hirata M., Fujimori M., Cai H. (2004): Construction of a high density linkage map of Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.) using restriction

- fragment length polymorphism, amplified fragment length polymorphism and telomeric repeat associated sequence markers. *Genome* 47:57-65
- Jackson S.A., Cheng Z.K., Wang M.L., Goodman H.M., Jiang J. (2000): Comparative fluorescence *in situ* hybridization mapping of a 431-kb *Arabidopsis thaliana* bacterial artificial chromosome contig reveals the role of chromosomal duplication in the expansion of the *Brassica rapa* genome. *Genetics* 156, 833-838
- Jackson S.J., Wang M.L., Goodman H.M., Jiang J. (1998): Application of fiber-FISH in physical mapping of *Arabidopsis thaliana*. *Genome* 41: 566-572
- Jauhar P.P. (1993): Cytogenetics of the *Festuca-Lolium* complex. Relevance to Breeding. Monographs on Theor Appl Genet Vol. 18, Springer-Verlag, Berlin, pp. 255
- Jeffreys A.J., Wilson V., Thein S.L. (1985): Hypervariable minisatellite regions in human DNA. *Nature* 314: 67-73
- Jiang J., Gill B.S. (1994) Non-isotopic *in situ* hybridization and plant genome mapping: the first 10 years. *Genome* 37: 717-725.
- Jiang J., Gill B., Wang G-L., Ronald P.C., Ward D.C. (1995): Metaphase and interphase fluorescence *in situ* hybridization mapping of the rice genome with bacterial artificial chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92: 4487-4491
- Jiang J., Hulbert S.H., Gill B.S., Ward D.C. (1996): Interphase fluorescence *in situ* hybridization mapping: a physical mapping strategy for plant species with large complex genomes. *Mol Gen Genet* 252(5): 497-502
- Jiang J., Gill B.S. (2006): Current status and the future of fluorescence *in situ* hybridization (FISH) in plant genome research. *Genome* 49: 1057-1068
- John H.A., Birnstiel M.L., Jones K.W. (1969): RNA-DNA hybrids at the cytological level. *Nature* 223:582-587
- Johnson G.D., Nogueira-Araujo G.M. (1981): A simple method of reducing the fading of immunofluorescence during microscopy. *J. Immunol. Methods*, 43:349-350
- Jones E.S., Dupal M.P., Dumsday L.J., Hughes L.J., Forster J.W. (2002): An SSR-based genetic linkage map for perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Theor Appl Genet* 105:577-584
- de Jong J.H., Fransz P., Zabel P. (1999): High resolution FISH in plants – techniques and applications. *Trends Plant Sci* 4: 258-263.

- Kaczmarek A., Naganowska B., Wolko B. (2009): Karyotyping of the narrow-leafed lupin (*Lupinus angustifolius* L.) by using FISH, PRINS and computer measurements of chromosomes. *J Appl Genet* 50(2):77-82.
- Karp A., Jones R.N. (1983): Cytogenetics of *Lolium perenne*. Part 2. Chiasma distribution in inbred lines. *Theor Appl Genet* 64: 137-145
- Khrustaleva L.I., Kik CH. (2001): Localization of single-copy T-DNA insertion in transgenic shallots (*Allium cepa*) by using ultra-sensitive FISH with tyramide signal amplification. *The Plant Journal* 25(6): 699-707
- Kim J.S., Childs K.L., Islam-Faridi M.N., Menz M.A., Klein R.R., Klein P.E., Price H.J., Mullet J.E., Stelly DM. (2002): Integrated karyotyping of sorghum by in situ hybridization of landed BACs. *Genome* 45(2):402-412.
- King J., Armstead I.P., Donnison I.S., Thomas H.M., Jones R.N., Kearsey M.J., Roberts L.A., Thomas A., Morgan W.G., King I.P. (2002): Physical and genetic mapping in the Grasses *Lolium perenne* and *Festuca pratensis*. *Genetics* 161, 315-324
- King J., Armstead I.P., Donnison I.S., Harper J.A., Roberts L.A., Thomas H., Ougham H., Thomas A., Huang L., Kong I.P. (2007a): Introgression mapping in the grasses. *Chromosome research* 15: 105-113
- King J., Armstead I.P., Donnison S.I., Roberts L.A., Harper J.A., Skot K., Elborough K., King I.P. (2007b): Comparative Analyses between *Lolium/Festuca* Introgression lines and Rice Reveal the Major Fraction of Functionally Annotated Gene Models Is Located in Recombination-Poor/Very Recombination-Poor Regions of the Genome. *Genetics* 177:597-606
- Koch J., Kolyraa S., Petersen K.B., Gregersen N., Bolund L. (1989): Oligonucleotide-priming methods for the chromosome-specific labelling of alpha satellite DNA *in situ*, *Chromosoma*. 98, 259-265.
- Koo D.H., Jiang J.(2009): Super-stretched pachytene chromosomes for fluorescence in situ hybridization mapping and immunodetection of DNA methylation. *Plant Journal* 59: 509-516
- Kopecký D., Loureiro L., Zwierzykowski Z., Ghesquiere M., Doležel J. (2006): Genome constitution and evolution in *Lolium* x *Festuca* hybrid cultivars (*Festulolium*). *Theor Appl Genet* 113: 731-742
- Kopecký D., Lukaszewski A.J., Doležel J. (2008): Cytogenetics of *Festulolium* (*Festuca* x *Lolium* hybrids). *Cytogenet Genome Res* 120: 370-383

- Kopecký D., Havránková M., Loureiro J., Castro S., Lukaszewski A.J., Bartoš J., Kopecká J., Doležel J. (2010): Physical distribution of homeologous recombination in individual chromosomes of *Lolium multiflorum*/*Festuca pratensis* substitutions. Cytogenetics and Genome Research, In press
- Kosmala A., Zwierzykowski Z., Gasior D., rapacz M., Zwierzykowska E., Humphreys M.W. (2006): GISH/FISH mapping of genes for freezing tolerance transferred from *festuca pratensis* to *Lolium multiflorum*. Heredity 96: 243-251
- Kosmala A., Zwierzykowski Z., Zwierzykowska E., Luczak M., Rapacz M., Gasior D., Humphreys M.W. (2007): Introgression Mapping of Genes for Winter Hardiness and Frost Tolerance Transferred from *Festuca arundinacea* into *Lolium multiflorum*. Journal of Heredity 98(4): 311-314
- Kubaláková M., Macas J., Doležel J. (1997): Mapping of repeated DNA sequences in plant chromosomes by PRINS and C-PRINS. Theor Appl Genet 94: 758–763.
- Kubaláková M., Lysák M.A., Vrána J., Šimková H., Číhalíková J., Doležel J. (2000): Rapid identification and determination of purity of flow-sorted plant chromosomes using C-PRINS. Cytometry 41: 102–108.
- Kubaláková M., Vrána J., Číhalíková J., Lysák M.A., Doležel J (2001): Localisation of DNA sequences on plant chromosomes using PRINS and C-PRINS. Methods in Cell Science 23, 71-82
- Lamb C.J., Danielova T., Bauer M.J., Meyer J.M., Holland J.J., Jensen M.D., Bichler J.A. (2007): Single-gene Detection and Karyotyping Using Small-Target Fluorescence *in Situ* Hybridization on Maize Somatic Chromosomes. Genetics 175: 1047-1058
- Langer-Safer P.R., Levine M., Ward D.C. (1982): Immunocytological method for mapping genes on *Drosophila* polytene chromosomes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 4381-4395
- Lawrence G.J., Appels R. (1986): Mapping the nucleolar organiser region, seed protein loci and isozyme loci on chromosome 1R in rye. Theor Appl Genet 71:742-749
- Lawrence J.B., Singer R.H., McNeil J.A. (1990): Interphase and metaphase resolution of diferent distance within the human dystrophin gene. Science 249: 928–932.
- Lesniwska A., Ponitka A., Slusarkiewicz-Jarzina A et al. (2001): Androgenesis from *Festuca pratensis* x *Lolium multiflorum* amphidiploid cultivars in order to select and stabilize rare gene combinations for grass breeding. Heredity 86: 167-176

- Lukaszewski A.J.(1992): A comparison of physical distribution of recombination in chromosome 1R in diploid rye and hexaploid *triticale*. *Theor Appl Genet* 83:1048-1053
- Lysak M.A., Pecinka A., Schubert I. :(2003): Recent progress in chromosome painting of *Arabidopsis* and related species, *Chromosome Res.* 11: 195- 204
- Macas J., Doležel J., Gualberti G., Pich U., Schubert I., Lucretti S. (1995): Primer-induced labelling of pea and field bean chromosomes *in situ* and in suspension. *BioTechniques* 19: 402–408.
- Marra M.A., Kucaba T.A., Sekhon M., Hiller L., Martienssen R., Chinwalla A., Crockett J., Fedele J., Grower H., Gund C., McCombie W.R., McDonald K., McPherson J., Mudd N., Parnell L., Schein J., Seim R., Shelby P., Waterston R.H., Wilson R. (1999): A map for sequence analysis of the *Arabidopsis thaliana* genome. *Nat. Genet.* 22:265-270
- Nasuda S., Liu Y.G., Sakamoto A., Nakayama T., Iwabuchi M., Tsunewaki K. (1993): Chromosomal locations of the genes for histones and a histone gene-binding protein family HBP-1 in common wheat. *Plant Mol Biol.* 22(4):603-614
- Nasuda S., Kikkawa Y., Ashida T., Rafiqul Islam A.K.M., Sato K., Endo T.R. (2005): Chromosomal assignment and deletion mapping of barley EST markers. *Genes and Genetics Systems* 80: 357-366
- de Nova P.J., de la Cruz M., Monte J.V., Soler C. (2006): Genetic relationships within and among Iberian fescues (*Festuca* L.) based on PCR-amplified markers. *Genome.* 49(9): 1170-83.
- Paux E., Sourdille P., Salse J., Saintenac C., Choulet F., Leroy P., Korol A., Michalak M., Kianian S., Spielmeyer W., Lagudah E., Somers D., Kilian A., Alaux M., Vautrin S., Bergès H., Eversole K., Appels R., Safar J., Simkova H., Dolezel J., Bernard M., Feuillet C. (2008): A Physical Map of the 1-Gigabase Bread Wheat Chromosome 3B. *Science*, 322:101-104
- Pedersen C., Linde-Laursen I. (1995): The relationship between physical and genetic distances at the *Hor 1* and *Hor 2* loci of barley estimated by 2-color fluorescent *in situ* hybridization. *Theor Appl Genet* 91: 941-946
- Pedersen C., Rasmussen S.K., Linde-Laursen I. (1996): Genome and chromosome identification in cultivated barley and related species of the Triticeae (Poaceae) by *in situ* hybridization with the GAA-satellite sequence. *Genome* 39: 93-104

- Pérez R., de Bustos A., Jouve N., Cuadrado Á. (2009): Localization of Rad50, a Single Copy Gene, on Group 5 Chromosomes of Wheat , Using a FISH Protocol Employing Tyranide for Singal Amplification (Tyr-FISH). *Cytoget. and Geonome Res.* 125: 321-328
- Pinkel D., Straume T., Gray J.W. (1986): Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 83:2934-2938
- Qi L. L., Echalié B., Chao S., Lazo G.R., Butler G.E., Anderson O.D., Akhunov E.D., Dvořák J., Linkiewicz A.M., Ratnasiri A., Dubcovsky J., Bermudez-Kandianis C.E., Greene R.A., Kantety R., La Rota C.M., Munkvold J.D., Sorrells S.F., Sorrells M.E., Dilbirligi M., Sidhu D., Erayman M., Randhawa H.S., Sandhu D., Bondareva S.N., Gill K.S., Mahmoud A.A., Ma X-F., Miftahudin, Gustafson J.P., Conley E.J., Nduati V., Gonzalez-Hernandez J.L., Anderson J.A., Peng J.H., Lapitan N.L.V., Hossain K.G., Kalavacharla V., Kianian S.F., Pathan M.S., Zhang D.S., Nguyen H.T., Choi D-W., Fenton R.D., Close T.J., McGuire P-E., Qualset C.O., Gill B.S. (2004): A Chromosome Bin Map of 16,000 Expressed Sequence Tag Loci and Distribution of Genes Among the Three Genomes of Polyploid Wheat. *Genetics* 168: 701-712
- Rees H., Dale P.J. (1974): Chiasmata variability in *Lolium* and *Festuca* populations. *Chromosoma* 47:335-351
- Reheul D., de Cauwer B., Cougnon M (2010): The Role of Forage Crops in Multifunctional Agriculture. In: Boller B., Posselt U.K., Veronesi F. (ed): *The Handbook of Plant Breeding – Fodder Crops and Amenity Grasses*, Springer, V. 1-12
- Roderick H.M., Morgan W.G., Harper J.A., Thomas H.M. (2003): Introgression of grown rust (*Puccinia coronata*) resistance from meadow fescue (*Festuca pratensis*) into Italian ryegrass (*Lolium multiflorum*) and physical mapping of the locus. *Heredity* 91: 396 – 400.
- Rogalska S., Maluszynska J., Olszewska M.J. (1999): *Podstawy cytogenetyki roślin*, Naukowe PWN, Warszawa, pp:70, 177-209
- Saha MC., Mian R., Zwonizer J.C., Chekhovskiy, Hopkins AA (2005): An SSR- and AFLP-based genetic linkage map of tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb). *Theor Appl Genet*, 110: 323-336
- Sambrook, Russell (2001): *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*; 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor. New York

Naformátováno: Vpravo:
0,63 cm

- Sachs R.K., van den Engh , Trask B., Yokota H., Hearst J.E. (1995): A random-walk/giant loop model for interphase chromosomes. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 58: 755-765
- Schwarzacher T. (2003): DNA, chromosomes and *in situ* hybridization, *Genome* 6:953-962
- Schwarzacher T., Leitch A.R., Bennett M.D., Heslop-Harrison J.S. (1989): *In situ* localization on parental genomes in a wide hybrides. *Ann. Bot.* 64: 315-324
- Schwarzacher Trude and Heslop-Harrison Pat (2000): Practical *in situ* hybridization. BIOS Scientific Publishers Limited, Oxford
- Showdon R.J., Köhler W., Friedt W., Köhler A. (1997): Genimic *in situ* hybridization in *Brassica* amphidiploids and interspecific hybrids. *Theor Appl Genet* 95: 1320-1334
- Svitashev S.K., Somers D.A. (2002): Characterization of transgene loci in plants using FISH: a picture is worth a thousand words. *Plant Cell, Tissue Organ Cult* 69: 202-214
- Šimková H., Šafář J., Suchánková P., Kovářová P., Bartoš J., Kubaláková M., Janda J., Číhalíková J., Mago R., Lelley T., Doležel J. (2008): A novel resource for genomics of Triticeae: BAC library specific for the short arm of rye (*Secale cereale* L.) chromosome 1R (1RS). *BMC Genomics* 9:237
- Thomas H.M., Morgan W.G., Meredith M.R., Humpreys M.W., Thomas H., Leggett J.M. (1994): Identification of parental and recombined chromosomes in hybrid derivates of *Lolium multiflorum* x *Festuca pratensis* by genomic *in situ* hybridization. *Theor Appl Genet* 88: 909-913
- Trask B. (1999): Fluorescence *In situ* Hybridization. In: Birren B., Green E.D., Hieter P., Klapholz S., Myers R.M., Riethman H., Roskams J.: *Genome analysis (a laboratory manual)-Mapping genome*, Volume 4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA, 303-407
- Valárik M., Bartoš J., Kovářová P., Kubaláková M., de Jong J.H., Doležel J. (2004): High resolution FISH on super-stretched flow-sorted chromosomes. *The Plant Journal* 27: 940-950
- Velagaleti G.V.N., Tharapel S.A., Martens P.R., Tharapel A.T. (1997): Rapid identification of marker chromosomes using primed *in situ* labelling (PRINS). *Am J Med Genet* 71: 130–133.
- Volpi E.V., Baldini A. (1993): MULTIPRINS: a method for multicolour primed *in situ* labelling. *Chromosome Res* 1: 257–260.

- Wang Z., Weber J.L., Zhong G., Tanksley S.D. (1994): Survey of plant short tandem DNA repeats. *Theor. Appl. Genet.* 88: 1-6
- Wang CH.-J. R., Harper L., Cande W.Z. (2006): High-Resolution Single-Copy Gene Fluorescence in Situ Hybridization and Its Use in the Construction of a Cytogenetic Map of Maize Chromosome 9. *The Plant Cell* 18: 529–544,
- Warnke S.E., Barker R:E., Jung G., Sim S-CH., Rouf Mian M.A., Saha M.C., Brillman L.A., Dupal M.P., Forster J.W. (2004): Genetic linkage mapping of an annual x perennial ryegrass population. *Theor Appl Genet*, 190: 294-304
- Weier H.-U.G. (2001): DNA Fiber Mapping Techniques for the Assembly of High-resolution Physical Maps. *The Journal of Hystochemistry and Cytochemistry* 49(8): 939-948
- Wiegant J.T., Ried P.M., Nederlof M., van der Ploeg, Tanke H.J., Raap A.K. (1991): *In situ* hybridization with fluoresceinated DNA. *Nucleic Acids Res*, 19:3237-3241
- Wu C., Sun S., Nimmakayala P., Santos F.A., Meksem K., Springman R., Ding D., Lightfoot D.A., Zhang H.-B. (2004): A BAC-and BIBAC-based physical map of the soybean genome. *Genome Res* 14. 319-326
- Xu W.W., Sleper D.A., Chao S. (1995): Genome mapping of polyploid tall fescue (*Festuca arundinaceae* Schreb.) with RFLP markers. *Theor Appl Genet* 91:947–955
- Yokota H., van den Engh G., Hearst J.E., Sachs R.K., Trask B.J. (1995): Evidence for the organisation of chromatin in megabase pair-sized loops arranged along random-walked path in the human G₀/G₁ interphase nuclei. *J. Cell Biol.* 130: 3226-3232
- Zwick M.S., Hanson R.E., Islam-Faridi M.N., Stelly D.M., Wing R.A., Price H.J., McKnight T.D. (1997): A rapid procedure for the isolation of C0t-1 DNA from plants. *Genome* 40(1):138-142.
- Zwierzowski Z., Lukaszewski A.J., Lesniewska A., Naganowska B. (1998): Genomic structure of androgenic progen of pentaploid hybrids, *Festuca arundinacea* x *Lolium multiflorum*. *Plant Breeding* 117, 457-462
- Zwierzowski Z., Lukaszewski A.J., Naganowska B., Lesniewska A. (1999): The pattern of homoeologous recombination in triploid hybrids of *Lolium multiflorum* with *Festuca pratensis*. *Genome* 42: 720-726

9 Seznam použitých zkratk a symbolů

AFLP	délkový polymorfismus amplifikovaných fragmentů (amplified fragment length polymorfism)
BAC	umělý bakteriální chromozóm (bacterial artificial chromosome)
bp	páry báží (base pair)
cM	centimorgan
Cy3	cyanin 3 (Cyanine 3)
Cy5	cyanin 5 (Cyanine 5)
DNA	deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)
DNasa I	DNáza I
dsDNA	dvouvláknová DNA (double stranded DNA)
<i>Fa</i>	kostřava rákosovitá (<i>Festuca arundinacea</i>)
FISH	fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace (fluorescence <i>in situ</i> hybridization)
FITC	fluoresceinisothiokyanát
<i>Fp</i>	kostřava luční (<i>Festuca pratensis</i>)
g	gravitační konstanta
GISH	genomová <i>in situ</i> hybridizace (genomic <i>in situ</i> hybridization)
ISH	<i>in situ</i> hybridizace (<i>in situ</i> hybridization)
kb	kilobáze (kilobase)
<i>Lm</i>	jílek mnohokvětý (<i>Lolium multiflorum</i>)
Mb	megabáze (megabase)
n	haploidní sada chromozómů
NOR	oblast organizátoru jadérka (nucleolus organizer region)
<i>p</i>	krátké chromozomální rameno (petit)
PCR	polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
PRINS	syntéza DNA <i>in situ</i> pomocí primerů (primed <i>in situ</i> DNA synthesis)
<i>q</i>	dlouhé chromozomální rameno
RAPD	náhodně amplifikovaná polymorfnní DNA (random amplified polymorphic DNA)
rDNA	ribozomální DNA (ribosomal DNA)
RNA	ribonukleová kyselina (ribonucleic acid)
RFLP	délkový polymorfismus restričních fragmentů (restriction fragment length polymorfism)
rpm	otáčky za minutu (rotate per minute)

rRNA	ribozomální RNA (ribosomal RNA)
RT	pokojová teplota (room temperature)
SSC	citrát sodný (Saline Podium Citrate)
SSR	jednoduché opakující se sekvence (simple sequence repeat)
T-DNA	DNA z <i>Ti</i> -plazmidu <i>A. tumefaciens</i> (<i>Ti</i> -plazmide DNA)
T _m	teplota tání (melting temperature)
YAC	umělý kvasinkový chromozóm (yeast artificial chromosome)
5S rDNA	ribozomální DNA (ribosomal DNA)
45S rDNA	ribozomální DNA v oblasti sekundární konstrukce (ribosomal DNA in NOR)