

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalárska práca

Olomouc 2021

Ľuboslava Ferková

Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta

Katedra buněčné biologie a genetiky



**Prostorová a časová analýza organizace a
modifikací chromatinu v jádrech embryí a
endospermu vyvíjejících se semen ječmene**

Bakalárska práca

Ľuboslava Ferková

Študijní program: Biologie

Študijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma štúdia: Prezenční

Olomouc 2021

Vedúci práce: Mgr. Anna Nowicka, Ph.D.

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Akademický rok: 2019/2020

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Ľuboslava FERKOVÁ**
Osobní číslo: **R18640**
Studijní program: **B1501 Biologie**
Studijní obor: **Molekulární a buněčná biologie**
Téma práce: **Prostorová a časová analýza organizace a modifikací chromatinu v jádrech embryí a endospermu vyvíjejících se semen ječmene**
Téma práce anglicky: **Spatial and temporal analysis of chromatin organization and modifications in embryo and endosperm nuclei of developing barley seed**
Zadávající katedra: **Katedra buněčné biologie a genetiky**

Zásady pro vypracování

1. Zpracování literární rešerše na téma organizace a modifikace chromatinu v jádrech obilných pletiv.
2. Příprava rostlin a sklizeň semen ve vhodné dny po opylení.
3. Příprava materiálu pro třídění jader na mikroskopické sklíčka.
4. Analýza organizace a modifikací chromatinu v jádrech použitím fluorescenční in situ hybridizace a imunobarvení.
5. Zvládnutí molekulárně cytogenetických metod týkajících se přípravy a analýzy modifikací chromatinu.
6. Zvládnutí práce s fluorescenčním a konfokálním mikroskopem.

Rozsah pracovní zprávy:

Rozsah grafických prací:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Jazyk zpracování: **Slovenština**

Seznam doporučené literatury:

1. Sabelli PA, Larkins BA (2009) The Development of Endosperm in Grasses. *Plant Physiology*. doi: 10.1104/pp.108.129437
2. Baroux C, Pecinka A, Fuchs J, Schubert I, Grossniklaus U (2007) The Triploid Endosperm Genome of *Arabidopsis* Adopts a Peculiar, Parental-Dosage-Dependent Chromatin Organization. *Plant Cell*. doi: 10.1105/tpc.106.046235
3. Schubert V, Klatte M, Pecinka A, Meister A, Jasencakova Z, Schubert I (2006) Sister chromatids are often incompletely aligned in meristematic and endopolyploid interphase nuclei of *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 172: 467-475
4. Wegel E, Pilling E, Calder G, Drea S, Doonan J, Dolan L, Shaw P (2005) Three-dimensional modelling of wheat endosperm development. *New Phytologist*, 168(1), 253-262
5. Wegel E, Shaw P (2005) Chromosome organisation in wheat endosperm and embryo. *Cytogenetic and Genome Research*, 109, 175-180
6. Jasencakova Z, Meister A, Schubert I (2001) Chromatin organization and its relation to replication and histone acetylation during the cell cycle in barley. *Chromosoma* 110:83-92.

Vedoucí bakalářské práce:

Mgr. Anna Nowicka, PhD.

Katedra buněčné biologie a genetiky

Datum zadání bakalářské práce: 24. dubna 2020
Termín odevzdání bakalářské práce: 31. července 2021

L.S.

doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.
děkan

prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.
vedoucí katedry

Bibliografické údaje

Meno a priezvisko autora: Ľuboslava Ferková

Názov práce: Prostorová a časová analýza organizace a modifikací chromatinu v jádrech embryí a endospermu vyvíjejících se semen ječmene

Typ práce: bakalárska

Pracovisko: Katedra buněčné biologie a genetiky, PřF UP v Olomouci

Vedúci práce: Mgr. Anna Nowicka, Ph.D.

Rok obhajoby práce: 2021

Kľúčové slová: semeno, embryo, endosperm, fluorescenčná *in situ* hybridizácia, imunofarbenie, chromatín, Rabl organizácia chromatínu, histónové modifikácie, epigenetika

Počet strán: 66

Počet príloh: 0

Jazyk: slovenský

Bibliographical identification

Author's first name and surname: Luboslava Ferkova

Title: Spatial and temporal analysis of chromatin organization and modifications in embryo and endosperm nuclei of developing barley seed

Type of thesis: bachelor

Department: Department of Cell Biology and Genetics, FS UP in Olomouc

Supervisor: Anna Nowicka, Ph.D.

The year of presentation: 2021

Keywords: seed, embryo, endosperm, fluorescent *in situ* hybridization, immunostaining, chromatin, Rabl chromatin organization, histone modifications, epigenetics

Number of pages: 66

Number of appendices: 0

Language: Slovak

Súhrn:

Semená obilnín sú kľúčovým zdrojom potravy pre ľudskú populáciu a hospodárske zvieratá. Výživová hodnota obilnín je daná predovšetkým veľkým endospermom, ktorý je bohatý na sacharidy a bielkoviny. Znalosti o molekulových a cytologických procesoch regulujúcich vývoj a dozrievanie semien sú preto dôležité pre podporu zlepšovania úrody a kvality plodín. Prekvapivo málo odpovedí však poznáme na otázky týkajúce sa epigenetickej kontroly vývoja endospermu obilnín.

Interfázne chromozómy sú vysoko organizované štruktúry. Chromatídy každého chromozómu zaberajú teritória rozprestierajúce sa po celom jadre. Centromérické a telomérické oblasti ležia na opačných stranách jadra. Táto organizácia chromatinu sa nazýva Rabl organizácia.

Hlavným cieľom bakalárskej práce bolo štúdium chromatinovej organizácie v priebehu vývoja embrya a endospermu jačmeňa. Analýza organizácie chromatinu bola založená na pozorovaní distribúcie centromérických a telomérických repetitívnych sekvencií pomocou fluorescenčnej *in situ* hybridizácie (FISH) v izolovaných jadrách. Taktiež bola študovaná kompaktnosť chromatinu v rôznych štádiách vývoja semena. Pomocou imunoznačenia spojeného s FISH bolo možné študovať histónovú variantu CenH3 a jej naviazanie na centromérické oblasti chromozómov. Tieto experimenty ukázali, že endoreduplikované jadrá endospermu strácajú Rabl chromatinovú organizáciu, kompaktnosť chromatinu a organizáciu CenH3 v závislosti od veku a C-hodnoty jadra.

Ďalšou časťou bakalárskej práce bol popis histónových modifikácií. Pomocou imunoznačenia spojeného s FISH bolo možné pozorovať organizáciu naviazania vybraných histónových modifikácií na chromatin. Jadrá endospermu vykazovali iný vzor naviazania modifikácií v porovnaní s diploidnými pletivami.

Summary:

Cereal seeds are a key source of food for the human population and livestock. This is owing to their large and energy-rich triploid endosperm tissues containing carbohydrates and proteins. Therefore, understanding mechanisms controlling seed development is important from the perspectives of both fundamental research and plant breeding. Surprisingly, little is known about epigenetic control of cereal endosperm development.

Interphase chromosomes are very well-organized, chromosome arms of each chromosome occupy elongated territories spanning across the nucleus with the centromeric and telomeric regions lying at opposite sides of the nucleus, defining as Rabl configuration.

The main goal of the bachelor thesis was to investigate the chromatin organization during embryo and endosperm development of barley seed. Distribution of centromeric and telomeric sequences at specific endosperm and embryo developmental stages was analyzed by fluorescence *in situ* hybridization (FISH) using isolated nuclei. This approach also allowed us to study chromatin compactness. Next, using FISH-associated immunolabeling, it was possible to study the histone variant of CenH3 and its binding to centromeric regions of chromosomes. These experiments showed that endoreduplicated endosperm nuclei lose Rabl chromatin organization and compactness, and also CenH3 protein in age and ploidy dependent manner.

To unravel which chromatin modifications undergo repositioning at different endosperm developmental stages, pattern of various histone modifications was studied. Using FISH-associated immunolabeling, it was possible to observe the binding organization of selected histone modifications. In the endosperm nuclei, the histone modification pattern was disrupted compared to diploid tissues.

Prehlásenie

Prehlasujem, že som túto bakalársku prácu vypracovala samostatne s použitím uvedených literárnych zdrojov a pod vedením Mgr. Anny Nowickej, Ph.D.

V Olomouci dňa:

.....

Ľuboslava Ferková

Pod'akovanie

Rada by som pod'akovala svojej školiteľke Mgr. Anne Nowickej, Ph.D. za venovaný čas, ochotu, trpezlivosť a odborné vedenie pri vypracovaní bakalárskej práce. Ďakujem celému vedeckému tímu doc. Pečinku za ochotu a trpezlivosť počas mojej prítomnosti v laboratóriu. Taktiež ďakujem Dr. Mahmoud Said za triedenie jadier na podložné sklička.

OBSAH

ZOZNAM SYMBOLOV A SKRATIEK.....	viii
ZOZNAM OBRÁZKOV	ix
ZOZNAM TABULIEK.....	xi
1 ÚVOD.....	1
2 CIELE PRÁCE	2
3 LITERÁRNY PREHĽAD.....	3
3.1 Popis semena obilnín.....	3
3.1.1 Vývoj a stavba semena.....	3
3.2 Vývoj embrya obilnín a jeho stavba.....	5
3.3 Vývoj endospermu obilnín a jeho stavba.....	6
3.4 Vývoj osemenia obilnín a jeho stavba.....	8
3.5 Chromatín a jeho štruktúra.....	9
3.5.1 Fluorescenčná hybridizácia <i>in situ</i>	10
3.6 Bunkový cyklus a endoreduplikácia	12
3.7 Histónové modifikácie a varianty	13
3.7.1 Histónová metylácia.....	14
4 MATERIÁL A METÓDY	17
4.1 Materiál a pomôcky.....	17
4.1.1 Laboratórne vybavenie.....	17
4.1.2 Malé laboratórne vybavenie.....	17
4.1.3 Použitý software.....	18
4.1.4 Použité chemikálie	18
4.1.5 Použité roztoky a ich príprava.....	20
4.1.6 Použitý rastlinný materiál	21
4.2 Použité experimentálne a vyhodnocovacie postupy.....	22
4.2.1 Podmienky rastu rastlín.....	22
4.2.2 Stanovenie opelenia a zbieranie semien.....	22
4.2.3 Príprava suspenzie jadier.....	23

4.2.4	Triedenie jadier na podložné sklíčka.....	24
4.2.5	Fluorescenčná hybridizácia <i>in situ</i>	25
4.2.6	Imunoznačenie spojené s FISH.....	27
4.2.7	Mikroskopická analýza obrazu.....	29
4.2.8	Štatistická analýza výsledku	29
5	VÝSLEDKY	30
5.1	Všeobecná charakteristika jadra embrya a endospermu.....	30
5.1.1	Plocha a kruhovitosť jadra	30
5.1.2	Objem jadra.....	32
5.2	Analýza Rabl chromatinovej organizácie	33
5.3	Analýza kompaktnosti chromatínu	34
5.4	Analýza CenH3 histónovej varianty	35
5.5	Histónové modifikácie	37
5.5.1	Histónová modifikácia H3K4me3.....	39
5.5.2	Histónová modifikácia H3K9me1.....	40
5.5.3	Histónová modifikácia H3K9me2.....	41
5.5.4	Analýza dodatočných histónových modifikácií	42
6	DISKUSIA	43
6.1	Všeobecná charakteristika jadra.....	43
6.2	Organizácia chromatínu	43
6.3	Kompaktnosť chromatínu	44
6.4	CenH3 histónová varianta	45
6.5	Histónové modifikácie	45
7	ZÁVER	47
8	LITERATÚRA.....	48

ZOZNAM SYMBOLOV A SKRATIEK

AGPáza	ADP-glukózo pyrofosforyláza
AL	aleurónová vrstva endospermu (aleurone layer)
ANOVA	analýza rozptylu (analysis of variance)
ATP	adenozíntrifosfát
BETL	transferové bunky endospermu (basal endosperm transfer layer)
BL	blokovací pufor (blocking buffer)
CDK	cyklín-dependentné kinázy
CSE	škrobová vrstva endospermu (central starch endosperm)
DAG	dni po vyklíčení (days after germination)
DAP	dni po opelení (days after pollination)
DOP	deň opelenia (day of pollination)
ESR	embryo obaľujúce bunky (embryo-surrounding region)
FISH	fluorescenčná <i>in situ</i> hybridizácia
<i>foci</i>	definované ako bod pozornosti, množné číslo od <i>focus</i>
HMG	high mobility group proteins
KAM	koreňový apikálny meristém
NIB	jadrový izolačný pufor (nuclei isolation buffer)
NP	nucellar projection
PCD	programovaná bunková smrť (programmed cell death)
RBR	retinoblastoma-related protein
RMS	radiálny mikrotubulárny systém (radial microtubular system)
SAL	subaleurónová vrstva endospermu (subaleurone layer)

ZOZNAM OBRÁZKOV

Obrázok 1: Fenotyp vývoja jačmenných semien, kultivar Compana.....	4
Obrázok 2: Schematické znázornenie dvojitého oplodnenia semien obilnín na príklade jačmeňa.	5
Obrázok 3: Sagitálny rez semenom jačmeňa (16 DAP) a detail stavby embrya semena.....	5
Obrázok 4: Proces celularizácie syncytia.....	6
Obrázok 5: Morfológia semena jačmeňa starého 16 DAP.....	8
Obrázok 6: Štruktúra a úrovne organizácie chromatinu.....	9
Obrázok 7: Schematické znázornenie organizácie chromatinu v jadre.....	10
Obrázok 8: Schématické znázornenie princípu fluorescenčnej <i>in situ</i> hybridizácie.	11
Obrázok 9: Schématické znázornenie fáz bunkového cyklu a endocyklu.	12
Obrázok 10: Reprezentatívny histogram získaný z celého semena jačmeňa starého 20 DAP, kultivar Compana.....	13
Obrázok 11: Schematické znázornenie rozdielu medzi histónovou modifikáciou a histónovou variantou.....	14
Obrázok 12: Štruktúra nukleozómu a histónové modifikácie.....	15
Obrázok 13: Analýza povrchu a kruhovitosti jadier KAM a endospermu.....	30
Obrázok 14: Kvantifikácia plochy a kruhovitosti jadier KAM, embrya a endospermu v rôznych časových bodoch s rôznymi C-hodnotami.	31
Obrázok 15: Kvantifikácia objemu jadier KAM a endospermu s rôznymi C-hodnotami.....	32
Obrázok 16: Analýza Rabl chromatinovej organizácie v jadrách KAM a endospermu pomocou fluorescenčnej <i>in situ</i> hybridizácie (FISH) s centromérickými (<i>Cereba</i> , červená) a telomérickými (ružová) repetitívnymi sekvenciami.....	33
Obrázok 17: Analýza kompaktnosti chromatinu v jadrách (A) KAM, embrya a (B) endospermu s rôznymi C-hodnotami.	34
Obrázok 18: Kvantifikácia centromérických <i>foci</i> v jadrách KAM, embrya a endospermu s rôznymi C-hodnotami.	35
Obrázok 19: Analýza kolokalizácie CenH3 histónovej varianty s centromérami v jadrách KAM a endospermu s rôznymi C-hodnotami.	36
Obrázok 20: Kvantifikácia kolokalizácie centromérických <i>foci</i> a CenH3 <i>foci</i> v KAM a v endosperme s rôznymi C-hodnotami.	37
Obrázok 21: Analýza modifikácii H3K4me3, H3K9me1, H3K9me2 v jadre KAM, ktorý slúžil ako kontrola somatického pletiva.....	38
Obrázok 22: Analýza modifikácie H3K4me3 v jadre endospermu 8 DAP a 24 DAP s rôznymi C-hodnotami.....	39

Obrázok 23: Analýza modifikácie H3K9me1 v jadre endospermu 8 DAP a 24 DAP s rôznymi C-hodnotami.....	40
Obrázok 24: Analýza modifikácie H3K9me2 v jadre endospermu 8 DAP a 24 DAP s rôznymi C-hodnotami.....	41

ZOZNAM TABULIEK

Tabuľka 1: Prehľad kolokalizácie histónových modifikácií s euchromatínom a heterochromatínom v <i>A. thaliana</i> a <i>H. vulgare</i> (jačmeň siaty).	16
Tabuľka 2: Spracovanie vzoriek na suspenzii jadier.....	23
Tabuľka 3: Triedené populácie jadier pre daný deň po opelení.....	25
Tabuľka 4: Príprava hybridizačného mixu 1.....	26
Tabuľka 5: Kombinácie použitých primárnych a sekundárnych protilátok.....	27
Tabuľka 6: Príprava hybridizačného mixu 2.....	28

1 ÚVOD

Semená predstavujú zabalené embryonálne štádium jedinečné pre krytosemenné a nahosemenné rastliny. Medzi funkcie semien patrí ochrana embrya, jeho šírenie do okolia, prežitie v náročných podmienkach a výživa embrya počas klíčenia. Vývoj semien sa začína dvojitým oplodnením, počas ktorého dve jadrá v peľovom zrne putujú do embryonálneho vaku vo vajíčku. Jedno jadro sa spája s vaječnou bunkou, zatiaľ čo druhé sa spája s diploidným centrálnym jadrom. Následne vzniká diploidné embryo ($2x$, genóm samčích a genóm samičích) a triploidný endosperm ($3x$, dva samičie genómy a jeden samčích). Vyvíjajúce sa embryo a endosperm sú obklopené osemením ($2x$) materského pôvodu.

Chromatín je štruktúra v jadre, ktorá sa skladá z dvojzávitnice DNA usporiadanej do chromozómov vďaka histónovým proteínom. Jadrá buniek obilnín sa vyznačujú Rabl organizáciou chromatínu. To znamená, že centroméry chromozómov sa nachádzajú na jednej strane jadra a teloméry na opačnej strane. Otázkou je, či sa daná organizácia chromatínu vyskytuje vo všetkých pletivách v rastline a či časový vývoj semena ovplyvňuje stabilitu chromatínu.

Histónové proteíny podliehajú na N-koncových chvostoch po translácii rôznym chemickým modifikáciám. Takéto modifikácie môžu epigeneticky ovplyvňovať génovú expresiu. Štúdium ich lokalizácie v jadre je dôležité pre popis molekulových a cytologických procesov, ktoré v bunke prebiehajú.

2 CIELE PRÁCE

Pre vypracovanie bakalárskej práce boli stanovené nasledujúce ciele práce:

- Vypracovanie literárnej rešerše na tému organizácie a modifikácie chromatinu v jadrách obilninových pletív
- Príprava rastlín a zber semien vo vybraných dňoch po opelení
- Príprava materiálu pre triedenie jadier na mikroskopické sklíčka
- Všeobecná charakteristika jadra embrya a endospermu (plocha, kruhovitosť, objem)
- Analýza organizácie a modifikácií chromatinu v jadrách pomocou cytomolekulových metód: fluorescenčnej *in situ* hybridizácie (FISH) a FISH spojeného s imunoznačením
- Zvládnutie práce s fluorescenčným a semikonfokálnym mikroskopom
- Zvládnutie práce s programom umožňujúcim mikroskopickú analýzu obrazu
- Zvládnutie interpretácie a prezentovanie výsledkov výskumu.

3 LITERÁRNY PREHĽAD

3.1 Popis semena obilnín

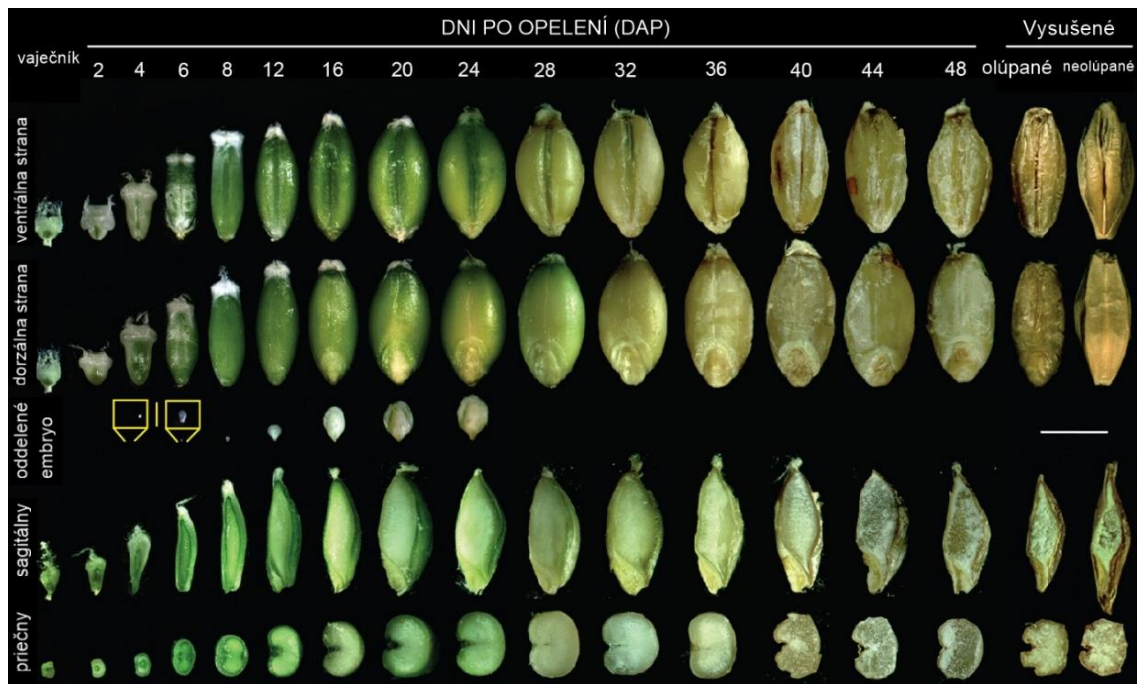
Semeno je rozmnožovacím orgánom semenných rastlín, ktorý nesie genetickú informáciu pre ďalšiu generáciu. Kľúčovou funkciou celého semena je výživa embrya (Sabelli a Larkins, 2009) a ochrana pred mechanickým poškodením. Ďalšou funkciou je šírenie semena do okolia a taktiež dormancia, čo je štádium semena, v ktorom prežíva bez vyklíčenia. Dormancia je dôležitá na prežitie semena počas nepriaznivých podmienok prostredia (Bentsink a Koornneef, 2008).

Obilniny sú rastliny z čeľade *Poaceae* (lipnicovité), ktoré majú väčšinou tenké, dlhé steblo a ich semená obsahujú hlavne škrobové zrná a bielkoviny. Medzi obilniny patrí napríklad pšenica, ryža, kukurica, jačmeň, ovos a raž. Z obilninových semien sa pripravuje veľké množstvo potravín pre ľudí, ako sú múka, chlieb, cestoviny alebo alkoholické nápoje. Taktiež sa z nich pripravuje krmivo pre hospodárske zvieratá (Sarwar *et al.*, 2013).

3.1.1 Vývoj a stavba semena

Zrelé semeno obilnín obsahuje tri hlavné štruktúry. Prvou je embryo, ktoré uchováva genetickú informáciu pre ďalšiu generáciu. Druhou štruktúrou je endosperm, ktorý slúži ako zásobáreň živín počas embryogenézy. Poslednou, treťou štruktúrou je osemenie, ktoré slúži ako ochranný obal celého semena (Dante *et al.*, 2014). Množstvo endospermu v zrelých semenách sa líši v závislosti od druhu. V dvojkľíchnolistových rastlinách, vrátane *Arabidopsis thaliana*, spotrebováva vyvíjajúce sa embryo väčšinu endospermu ešte pres dozretím semena (Pires, 2014). Naopak obilniny, ktoré patria do taxónu jednokľíchnolistových, majú veľké množstvo endospermu a pestujú sa kvôli svojej vysokej nutričnej hodnote (Charalampopoulos *et al.*, 2002).

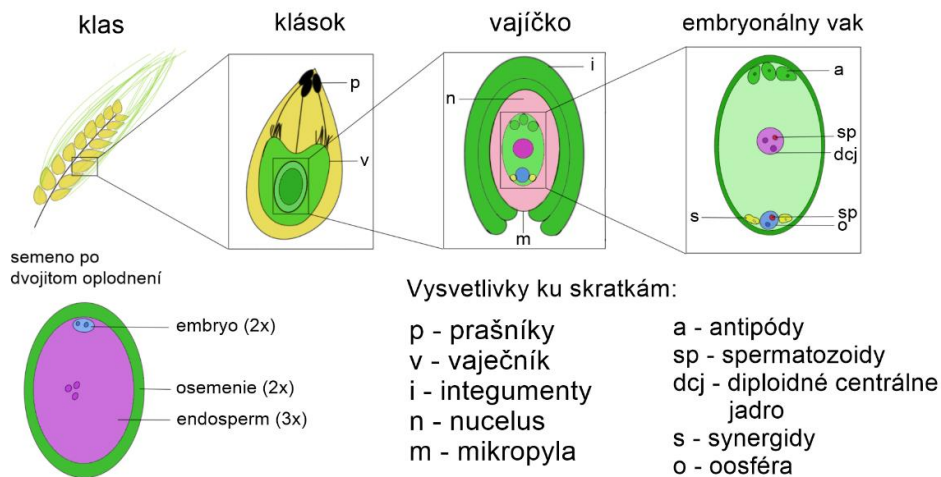
Vývoj obilninových semien pozostáva z troch hlavných fáz. Fáza I začína dvojitým oplodnením, kde následne dochádza k proliferácii buniek a nepatrnému zvýšeniu hmotnosti. Fáza II je charakterizovaná diferenciaciou a následným zvyšovaním hmotnosti, akumuláciou zásobných látok. Vo fáze III je redukovaná hmotnosť, semeno vysychá a prechádza do stavu dormancie (Sabelli a Larkins, 2009; Dante *et al.*, 2014). Všetky tri fázy sa čiastočne prekrývajú s vývinom vodného, mliečneho a cestového zrna (Tottman *et al.*, 1979). V jačmeni prebieha fáza I 0–6 dní po opelení (ang. days after pollination, DAP), fáza II 7–20 DAP, a fáza III sa začína po 21 DAP (Obr.1).



Obrázok 1: Fenotyp vývoja jačmenných semien, kultivar Compana.

Vývojové štádiá semena od 0 (vaječník) do 48 dní po opeľení (DAP), a v suchých semenách. Na analýzu sagitálneho a priečneho rezu boli semená rozrezané na polovicu. Mierka = 5 mm. Žlté obdĺžniky zobrazujú embryá v počiatočnom štádiu s mierkou = 500 μ m. Obrázok prevzatý z publikácie Nowicka *et al.*, 2021.

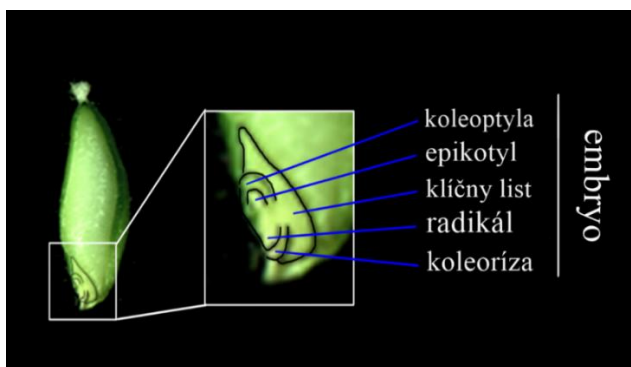
Jačmeň (*Hordeum vulgare*) je samoopelivý druh (Obr.2). Na jeho klase sa nachádzajú klásky, v ktorých sú samčie a samičie reprodukčné orgány. Každý prašník vytvára samčie gametofyty vo forme peľových zŕn. Peľové zrno obsahuje jedno vegetatívne a dve haploidné generatívne jadrá (spermatozoidy). Samičím reprodukčným orgánom je vaječník, v ktorom sa nachádza vajíčko. Samičím gametofytom je embryonálny vak vo vajíčku. Embryonálny vak obsahuje tri antipódy, dve synergidy, jednu oosféru a jedno diploidné centrálné jadro. V embryonálnom vaku dochádza k dvojitému oplodneniu, kde jeden spermatozoid oplodní oosféru a vzniká diploidné embryo (2x, obsahuje jeden samičí a jeden samčí genóm). Druhé oplodnenie nastáva, keď druhý spermatozoid splynie s diploidným centrálnym jadrom zárodočného mieška, čím vzniká triploidné jadro endospermu (3x, dva samičie genómy a jeden samčí). Vytvárajúce sa embryo a endosperm je obklopený diploidným osemením (2x) pochádzajúceho od matky (Olsen, 2004).



Obrázok 2: Schematické znázornenie dvojitého oplodnenia semien obilnín na príklade jačmeňa.

3.2 Vývoj embrya obilnín a jeho stavba

Embryo sa skladá z troch hlavných častí: embryonálny koreň (radikál), embryonálny apikálny meristém (epikotyl) a medzi nimi sa nachádza hypokotyl. Radikál je chránený koleorízou, epikotyl koleoptilou (klíčna pošva). V embryu obilnín sa nachádza jeden klíčny list (ang. cotyledon alebo scutellum) a plumula, primárny list (Obr.3) (Dante *et al.*, 2014; Rodríguez *et al.*, 2015).



Obrázok 3: Sagitálny rez semenom jačmeňa (16 DAP) a detail stavby embrya semena.

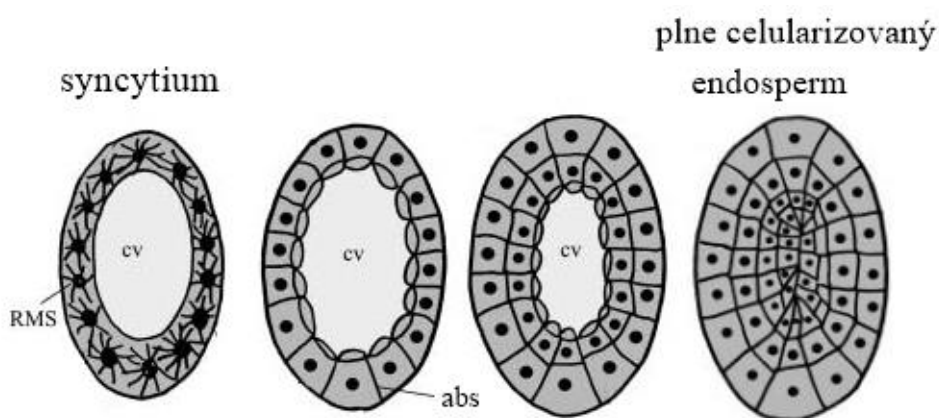
Vývoj embrya začína procesom nazývaným embryogenéza, kde dôjde k oplodneniu oosféry spermatozoidom z peľového zrna. Prvým krokom je proliferácia buniek zygoty, po ktorej nasleduje diferenciácia buniek a morfogenetická špecifikácia. Najprv vznikajú dve bunky, axiálna a bazálna. Z axiálnej bunky vzniká epikotyl a klíčny list, obsahujúci všetky potrebné živiny, zatiaľ čo z bazálnej bunky vzniká hypokotyl a radikál. V neskorších štádiách vývoja embrya môže dôjsť k navodeniu štádia dormancie, ktoré sa preruší, keď sú environmentálne podmienky opäť priaznivé na klíčenie (Sabelli, 2012).

3.3 Vývoj endospermu obilnín a jeho stavba

Vývoj endospermu prebieha v niekoľkých fázach, ktoré sa navzájom môžu prelínať (Olsen, 2001; Sabelli a Larkins, 2009). Po dvojitom oplodnení prebieha tvorba syncytia. Následne prebieha celularizácia a diferenciácia, kde vznikajú hlavné typy buniek endospermu. Nasledujúce fázy sú sprevádzané akumuláciou zásobných látok. Nakoniec prebieha maturácia, v ktorej dochádza k vysychaniu a dormancii.

Prvou fázou po dvojitom oplodnení je tvorba syncytia. Triploidné jadro podstúpi veľké množstvo synchronného delenia bez cytokinézy a tvorby bunkovej steny. Vzniká syncytium, ktoré obsahuje veľké množstvo jadier. Táto fáza je dokončená približne 3–4 DAP, dĺžka fázy závisí od konkrétneho druhu (Sabelli a Larkins, 2009).

Nasledujúca fáza, celularizácia syncytia (Obr.4), je zahájená vytvorením radiálneho mikrotubulárneho systému (ang. radial microtubular system, RMS). RMS sa formuje na obale každého jadra a prebieha vznik trubicovitých štruktúr – alveol. Antiklinálna bunková stena tvorí alveoly okolo každého jadra. Opakované periklinálne delenie smerom k centrálnej vakuole pokračuje až kým centrálna vakuola úplne zanikne a endosperm je plne celularizovaný (Olsen, 2001). Táto fáza je dokončená približne 4–6 DAP (Sabelli a Larkins, 2009).



Obrázok 4: Proces celularizácie syncytia.

Legenda: RMS–radiálny mikrotubulárny systém, cv–centrálna vakuola, abs–antiklinálna bunková stena.

Obrázok prevzatý z publikácie Olsen, 2004.

Po vzniku buniek nastáva v endosperme proces endoreduplikácie (vysvetlené v časti ,3.6 Bunkový cyklus a endoreduplikácia‘) a začne diferencovať. V endosperme obilnín sa nachádza päť základných typov buniek: transferové bunky (ang. basal endosperm transfer layer, BETL), aleuronová vrstva (ang. aleurone layer, AL), subaleuronová vrstva (ang. subaleurone layer, SAL), škrobová vrstva (ang. central starchy endosperm, CSE) a takzvané embryo obaľujúce bunky (ang. embryo-surrounding region, ESR) (Sabelli a Larkins, 2009).

Ešte pred dokončením celularizácie sa niekoľko bunkových vrstiev diferencuje na transferové bunky. Tie sa nachádzajú blízko placenty a majú zvýšený povrch cytoplazmatickej membrány, čo uľahčuje absorpciu živín (Sabelli a Larkins, 2009). Tieto bunky prenášajú aminokyseliny, sacharózu a monosacharidy medzi materskú rastlinu a zvyšok endospermu (Olsen, 2001).

Aleurónová vrstva sa skladá z niekoľkých vrstiev buniek, jeho počet sa líši od druhu rastliny (napr. jačmeň má 3 vrstvy). AL obaľuje celý endosperm (okrem regiónu s transferovými bunkami) a formuje sa 10–12 DAP (Sabelli a Larkins, 2009). Aleurónové bunky obsahujú hustú cytoplazmu s veľkým množstvom aleurónových zrn. Tieto zrná obsahujú zásoby proteínov a sú obalené lipidovými kvapôčkami. Aleurónové bunky obsahujú plne vyvinuté endoplazmatické retikulum a taktiež veľké množstvo mitochondrií. AL ako jediná prežíva proces maturácie, zatiaľ čo celé semeno vysychá (Olsen, 2001).

Najvýznamnejšou časťou endospermu v obilninách je škrobová vrstva, pretože obsahuje dôležitý zdroj živín a je aj najväčšou časťou pletiva, v ktorom sa tvorí a akumuluje škrob. Tvorbu škrobu zabezpečujú 4 enzýmy, ADP-glukózo pyrofosforyláza (AGPáza), škrobové syntázy a rozvetvujúci a odvetvujúci enzým. Zatiaľ čo AGPáza sa nachádza v cytosóle endospermu, ostatné enzýmy sa nachádzajú v amyloplastoch (Sabelli a Larkins, 2009).

V škrobovej vrstve sa taktiež ukladajú proteíny, ktoré sú hlavným zdrojom potravy. Základom daných proteínov sú prolamíny, ktoré reprezentujú 50%–60% všetkých proteínov v endosperme (Sabelli a Larkins, 2009). Ďalšou dôležitou zložkou sú globulíny, ale taktiež rôzne minoritné proteíny. Prolamíny aj globulíny vytvárajú nerozpustné proteínové telieska v lumene drsného endoplazmatického retikula. Tieto telieska prechádzajú do veľkých zásobných vakuol. Bunky škrobovej vrstvy najprv podstúpia proces endoreduplikácie a následne proces programovanej bunkovej smrti (ang. programmed cell death, PCD) (Sabelli a Larkins, 2009).

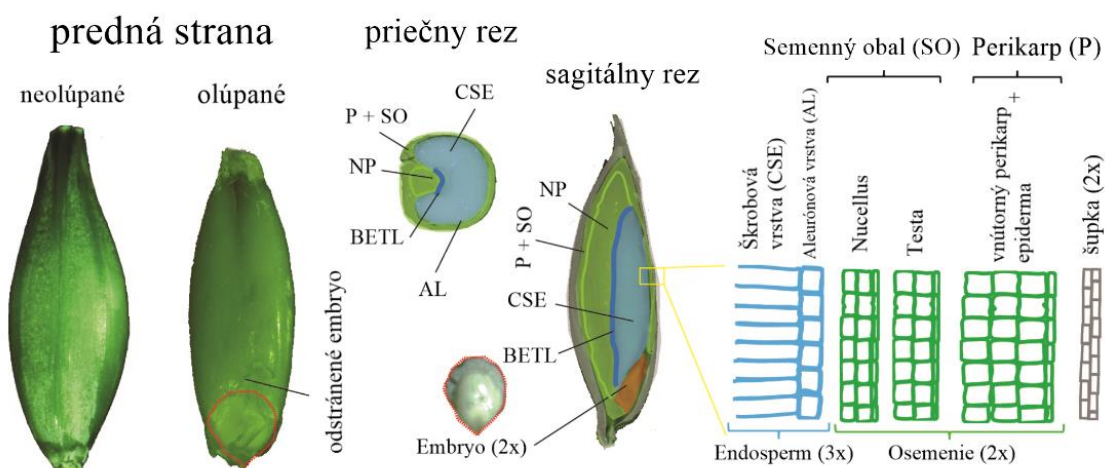
ESR bunky sú kompletne diferencované približne 4 DAP. Ako embryo rastie, tak sa ESR bunky zmenšujú a postupne zanikajú (12 DAP). Tieto bunky obsahujú veľký počet malých vakuol a komplexný membránový systém (Sabelli a Larkins, 2009). Presná funkcia ESR buniek nie je veľmi známa. Predpokladá sa, že dodávajú embryu potrebnú výživu, pretože sú metabolicky aktívne. Ďalej sa predpokladá, že predstavujú akúsi bariéru medzi embryom a endospermom počas vývoja semena a poskytujú zónu komunikácie medzi nimi (Olsen, 2004).

3.4 Vývoj osemenia obilnín a jeho stavba

Osemenie je rastlinné pletivo, ktoré vzniká z integumentov vajíčka, čo znamená, že dané pletivo je materského pôvodu. Integumenty sa diferencujú na osemenie hneď po dvojitom oplodnení a vývoj pokračuje bunkovým delením (do 2–4 DAP), bunkovou elongáciou, diferenciáciou a PCD koordinovane s vývojom embrya a endospermu (Dante *et al.*, 2014).

Počas raného vývoja semena jačmeňa, diploidné materské pletivo (osemenie) predstavuje väčšinu objemu semena. Jeho štruktúru delíme na nucelus, nucellar projection (NP, neexistuje jednoznačný preklad), vonkajšie a vnútorné integumenty a perikarp (Obr.5). Cievne zväzky môžeme nájsť v perikarpe. Nucelus je degenerovaný krátko po vykvitnutí, okrem oblasti pri hlavnom cievnom zväzku, kde formuje NP, ktoré má funkciu transferového pletiva (dodáva asimiláty do endospermu). Bunkové delenie v materskom pletive sa pozastaví krátko po fertilizácii a následuje bunková elongácia, vďaka ktorej pletivo rastie. Po tom, ako degeneruje nucelus, perikarp následne taktiež podstúpi PCD (Radchuk *et al.*, 2010; Radchuk a Borisjuk, 2014).

Funkcia osemenia pozostáva v mechanickej ochrane endospermu a embrya pred vonkajším prostredím, ale taktiež hrá rolu v regulácii asimilátov vo vyvíjajúcich sa semenách, regulácii tekutín a plynov medzi prostredím a v kontrole dormancie a klíčenia (Sabelli, 2012). Taktiež sa v pletive perikarpu nachádzajú gény zodpovedné za rozklad sacharózy, akumuláciu škrobu, fotosyntézu a mitochondriálnu ATP produkciu (Sreenivasulu, 2010).



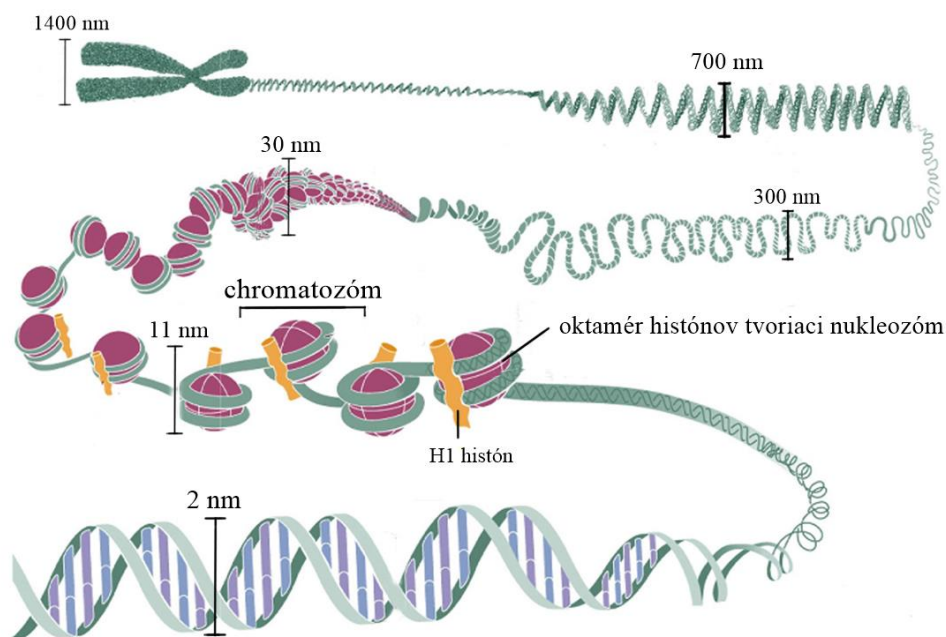
Obrázok 5: Morfológia semena jačmeňa starého 16 DAP.

Legenda: P–perikarp, SO–semenný obal, NP–nucellar projection, BETL–transferové bunky (ang. basal endosperm transfer layer), AL–aleurónová vrstva (ang. aleurone layer) a CSE–škrobová vrstva endospermu (ang. central starch endosperm). Obrázok inšpirovaný z publikácie Rodríguez *et al.*, 2015.

3.5 Chromatín a jeho štruktúra

Chromatín v jadre je vysoko dynamická štruktúra. Organizácia DNA v chromatíne reguluje génovú expresiu a taktiež replikáciu DNA, jej opravy, rekombináciu a segregáciu chromozómov (Fuchs *et al.*, 2006). Chromatín sa skladá z DNA, histónových a nehistónových proteínov (ang. high mobility group proteins, HMG proteíny). Históny sú usporiadané do oktaméru, ktorý sa skladá z dvoch kópii histónov H2A, H2B, H3 a H4. Okolo nich sa obmotáva dvojzávitnica DNA dlhá 147 párov báz (bp) a vzniká nukleozóm (Morales a Richard-Foy, 2000). Histón H1 sa viaže na linkerovú DNA, kde pomáha stabilizovať chromatinovú štruktúru. Štruktúra nukleozómu s H1 sa nazýva chromatozóm (Bianchi a Agresti, 2005).

Histón H1 skladá nukleozómy do chromatinového vlákna, ktoré má priemer 30 nm. Tieto vlákna sú následne poskladané do slučiek 300 nm dlhého stočeného vlákna, ktoré sa ďalej vinie do 700 nm kondenzovaného chromatínu. Chromozóm pozorovaný počas metafázy bunkového delenia má priemer 1400 nm, pretože sú prítomné dve chromatídy (Obr.6).

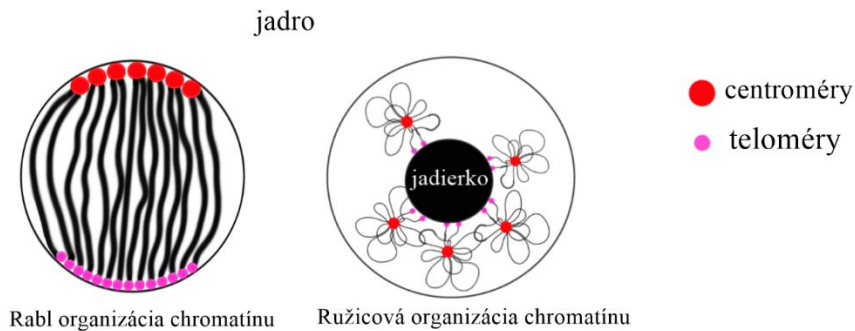


Obrázok 6: Štruktúra a úrovne organizácie chromatínu.

Obrázok prevzatý z publikácie Pray, 2008.

Chromatín v jadre existuje v dvoch konfiguráciách. Euchromatín je oblasť na chromozómoch, kde sú gény transkripčne aktívne. Má dekonzenzovanú štruktúru, umožňujúcu aktivitu RNA polymerázu. Heterochromatín je vysoko kondenzované miesto na chromozóme, kde sú gény neaktívne. Obsahuje repetitívne sekvencie a malé množstvo génov. Heterochromatín môžeme nájsť v oblasti centroméru (Strålfors a Ekwall, 2011).

Počas interfázy bunkového cyklu sa chromozómy nachádzajú v dekonenzovanom stave. Chromatín v rastlinách s malým genómom (napr. *Arabidopsis thaliana*, ~135 Mbp/1C) je nenáhodne usporiadaný do ohraničených jadrových subdomén, tzv. chromozómových teritórií. Teloméry sa zhľukujú okolo jadierka, zatiaľ čo centroméry sa nachádzajú na jadrovej periférii. Centromerický heterochromatín v *Arabidopsis* tvorí zreteľné oblasti nazývajúce sa chromocentrá. Obsahujú väčšinu genómových repetícií a vykazujú epigenetické znaky neaktívneho chromatínu. Z chromocentier vychádzajú euchromatické slučky. Chromozómové teritória v *Arabidopsis* týmto získavajú tzv. ružicovú štruktúru (Obr.7). V rastlinných druhoch s veľkým genómom sa počas interfázy bunkového cyklu vyskytuje tzv. Rabl konfigurácia, kde si jadro ponecháva pozíciu chromozómov z predchádzajúcej mitózy (Rabl, 1885). To znamená, že centroméry a teloméry sa vyskytujú na opačných póloch interfázneho jadra. Táto konfigurácia sa nachádza v rastlinách ako je jačmeň (veľkosť genómu ~5,3 Gbp/1C) alebo pšenica (veľkosť genómu ~17 Gbp/1C) (Tiang *et al.*, 2012; Němečková *et al.*, 2020).



Obrázok 7: Schematické znázornenie organizácie chromatínu v jadre.

Rabl organizácia (naľavo) sa vyskytuje v rastlinných druhoch s veľkým genómom a ružicová organizácia (napravo) sa vyskytuje v rastlinných druhoch s malým genómom. Obrázok inšpirovaný z publikácie Tiang *et al.*, 2012.

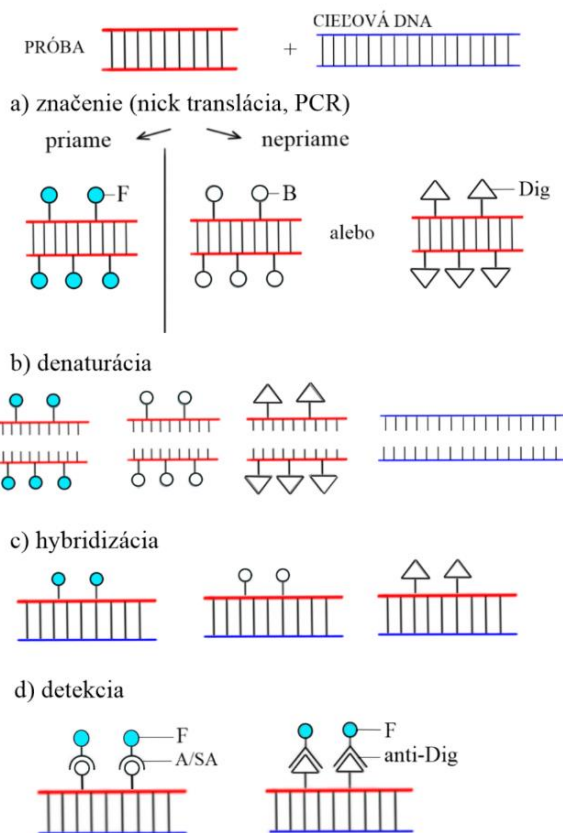
3.5.1 Fluorescenčná hybridizácia *in situ*

Hybridizácia *in situ* umožňuje lokalizovať a detegovať pozíciu špecifických sekvencií DNA alebo RNA v štruktúrne neporušených bunkách. Fluorescenčná *in situ* hybridizácia (FISH) je typ hybridizácie *in situ*, kde sa využívajú fluorescenčné próby, ktoré sa viažu na DNA s vysokou mierou komplementarity daných sekvencií. FISH sa môže využiť na rôzne cieľové sekvencie, vrátane RNA v bunkách, DNA v metafáznych chromozómoch alebo aj v DNA v interfáznom jadre. FISH sa používa vo veľkej miere v klinickej cytogenetike, génovom mapovaní, nádorovej biológii a vo výskumoch chromozómovej evolúcie (Patussi *et al.*, 2013).

Súčasťou FISH metódy je cieľová sekvencia DNA a próba. Ešte pred hybridizáciou je nutné označenie próby, napríklad pomocou nick translácie alebo PCR. V súčasnosti sú bežne používané

dve stratégie označovania próby – nepriame a priame označenie. Priamo označená próba využíva nukleotidy, ktoré sú priamo modifikované aby obsahovali fluorescenčnú značku – fluorochróm. Vo veľkom sa v súčasnosti využívajú napríklad fluorescenčné farbivá fluoresceín (emitácia – 512 nm), Cy3 (emitácia – 570 nm) alebo Cy5 (emitácia – 670 nm) (Farrell, 2010).

Nepriamo označená próba využíva modifikované nukleotidy, ktoré obsahujú haptén. Na haptén sa následne viažu špecifické protilátky, ktoré nesú fluorochróm (Speicher a Carter, 2005). Ak je próba nepriamo označená, tak je potrebné využiť napríklad imunologický systém na detekciu a vizualizáciu (Obr.8). Prvá molekula, ktorá sa využíva na nepriamu detekciu je biotín. Biotín je vitamín rozpustný vo vode a ľahko sa inkorporuje do molekúl. Biotín vo forme biotinylovaných nukleotidov slúži ako analóg deoxytimidíntrifosfátu (dTTP). Následne sa na biotín môže viazať avidín alebo streptavidín, na ktorom je naviazané fluorescenčné farbivo. Ďalšou molekulou používanou na nepriamu detekciu môže byť digoxigenín, čo je steroidný haptén získaný z rastlín rodu *Digitalis*. Na digoxigenín sa viaže protilátka s naviazaným fluorochrómom. Nepriame značenie poskytuje amplifikáciu signálu využitím viacerých vrstiev protilátok a produkuje jasnejší signál v porovnaní s pozadím (O'Connor, 2008; Farrell, 2010). Dané signály sa pozorujú pod fluorescenčným mikroskopom.

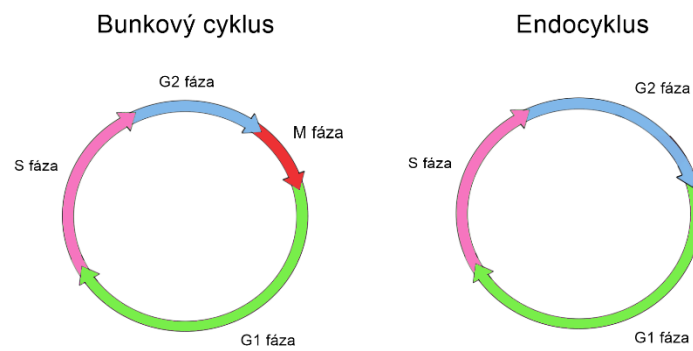


Obrázok 8: Schématické znázornenie princípu fluorescenčnej in situ hybridizácie.

Legenda: F–fluorescenčná značka, B–biotín, DIG–digoxigenín, A–avidín, SA–streptavidín, anti-Dig–anti-digoxigenín.

3.6 Bunkový cyklus a endoreduplikácia

Bunkový cyklus je obdobie od vlastného vzniku bunky do štádia opätovného delenia. Klasický bunkový cyklus zahŕňa replikáciu a segregáciu chromozómovej DNA. Následná cytokinéza vedie k prenosu genetickej informácie z jednej materskej bunky do dvoch dcérskych buniek. Bunkový cyklus pozostáva zo štyroch fáz. G1 fáza zahŕňa DNA presyntetickú fázu, kde je obsah jadrovej DNA v diploidnom organizme 2C (C-hodnota je množstvo jadrovej DNA predstavujúcej jednu kópiu genómu). V tejto fázi bunka syntetizuje nové organely a rastie do veľkosti materskej bunky. Ďalšou fázou je S fáza, v ktorej sa syntetizuje DNA a obsah jadrovej DNA je medzi 2C a 4C. G2 fáza sa vyznačuje prípravou na mitózu, kde je obsah jadrovej DNA 4C. Tieto tri fázy spadajú pod interfázu. Poslednou fázou je M fáza, mitóza, čiže delenie bunky (Joubès a Chevalier, 2000).



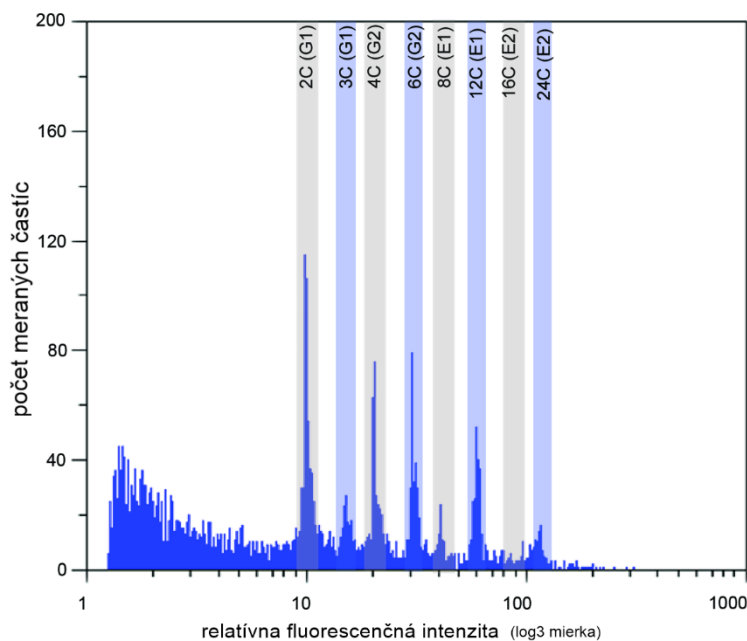
Obrázok 9: Schématické znázornenie fáz bunkového cyklu a endocyklu.

Endocyklus je varianta bunkového cyklu, kde dochádza k replikácii jadrového genómu a zároveň neprebíha mitóza. Mechanizmus prechodu z mitotického bunkového cyklu na endocyklus bol skúmaný z pohľadu regulácie cyklín-dependentných kináz (CDK), inhibítorov CDK (napr. WEE1) a taktiež proteínov súvisiacich s retinoblastómom (RBR). Napriek mnohým snahám sa poznatky o riadení procesu endocyklu stále javia ako nejasné (Sabelli a Larkins, 2009).

Endocyklus vedie k polyploidizácii v bunke. Endopolyploidia môže vzniknúť rôznymi mechanizmami, napríklad endomitózou alebo endoreduplikáciou. Najviac zastúpeným mechanizmom endopolyploidizácie v rastlinnej ríši je endoreduplikácia. Bunky zdvoja obsah DNA v jadre bez kondenzácie chromatinu, segregácie a cytokinézy. Výsledkom endoreduplikácie sú viaceré uniformné kópie chromatíd a polyténne chromozómy (Robinson *et al.*, 2018). Tento proces je bežný v rastlinách aj v živočíchoch, a to hlavne v tkanivách a pletivách, ktoré sú terminálne diferencované a majú vysokú metabolickú aktivitu. Hypotézy naznačujú, že ak sa endoreduplikácia vyskytuje v metabolicky aktívnych bunkách, tak dochádza k nárastu transkripčných faktorov (Lee *et al.*, 2010). Je možné, že endoreduplikácia poskytuje

mechanizmus na zvýšenie úrovne génovej expzie, táto funkcia ale nebola doposiaľ dostatočne preskúmaná (Larkins *et al.*, 2001; Bourdon *et al.* 2012). V rastlinách prebieha endoreduplikácia v rôznych pletivách. Vo vyvíjajúcich sa semenách obilnín prebieha v endosperme, embryu a taktiež v osemeni (Nowicka *et al.*, 2021).

Na detekciu procesu endoreduplikácie sa používa prietokový cytometer alebo mikroskop. Histogram (Obr.10) ukazuje C-hodnoty diploidných pletív v semene jačmeňa (mix embrya a osemenia; 2C=G1, 4C=G2, 8C=E1=prvý endocyklus, 16C=E2=druhý endocyklus) označené šedou farbou. Triploidný endosperm (3C=G1, 6C=G2, 12C=E1=prvý endocyklus, 24C=E2=druhý endocyklus) je označený modrou farbou.



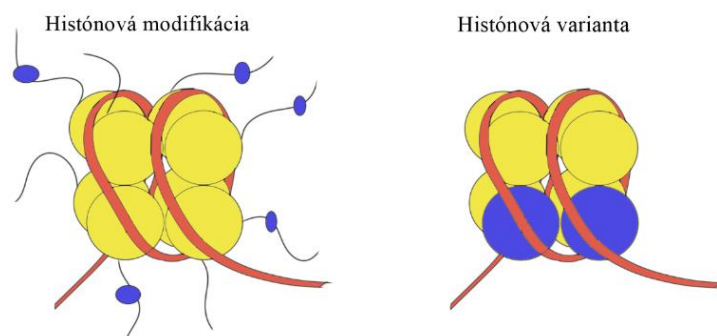
Obrázok 10: Reprezentatívny histogram získaný z celého semena jačmeňa starého 20 DAP, kultivar Compana.

3.7 Histónové modifikácie a varianty

Históny H2A, H2B, H3 a H4, ktoré tvoria jadro nukleozómu, obsahujú N-terminálne chvosty, ktorých sekvencie sú vysoko konzervované. Na N-terminálnych koncoch prebiehajú posttranslačné modifikácie, ako sú napríklad acetylácia, metylácia, fosforylácia, ubikvitinácia a glykozylácia. Všetky tieto modifikácie kontrolujú skladanie nukleozómového zoskupenia do vyšších štruktúrnych jednotiek a sprostredkovávajú signalizáciu bunkových procesov (Morales a Richard-Foy, 2000; Fuchs *et al.*, 2006).

Histónové varianty sú proteíny, ktoré nahrádzajú základné kanonické históny (H3, H4, H2A, H2B) v eukaryotických nukleozómoch a často im prepožičiavajú špecifické štruktúrne a funkčné

vlastnosti. Väčšina histónov je zostavených do nukleozómov za replikačnou vidličkou počas S-fázy bunkového cyklu, aby zabalili novo syntetizovanú DNA. Histónové varianty sú narozdiel od histónov kódované inými génmi a sú inkorporované počas celého bunkového cyklu. Histónové varianty môžu výrazne meniť chromatinové vlastnosti, ktoré ovplyvňujú DNA replikáciu, reparáciu, transkripciu a segregáciu (Talbert a Henikoff, 2016). Centroméra je v eukaryotických jadrách špecifikovaná epigeneticky, kde sa namiesto H3 histónu v jadre nukleozómu nachádza varianta CENH3. Špecifické centromerické DNA sekvencie tak nie sú striktné potrebné ani postačujúce pre centromerickú funkciu (McKinley a Cheeseman, 2015).

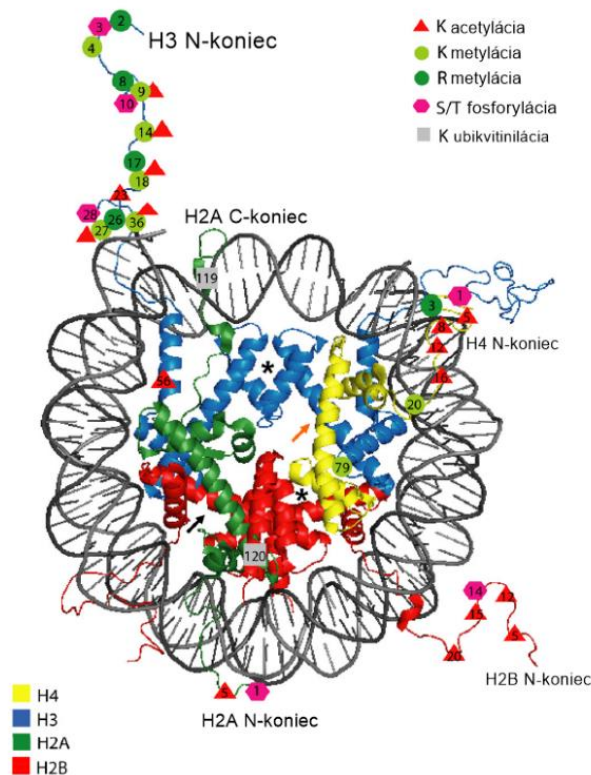


Obrázok 11: Schematické znázornenie rozdielu medzi histónovou modifikáciou a histónovou variantou.

Histónová modifikácia je spôsobená posttranslačnou chemickou reakciou na N-terminálnych chvostoch histónov (naľavo). Histónová varianta obsahuje iný typ histónu v nukleozómovom jadre (napravo).

3.7.1 Histónová metylácia

N-terminálne chvosty histónov môžu podliehať rôznym modifikáciám, ako sú napríklad fosforylácia alebo metylácia. Metylácia je posttranslačná modifikácia, kedy sa CH_3 skupina pripája na aminokyseliny lyzín alebo arginín na N-konci proteínu. Lyzín môže byť mono-, di- alebo trimetylovaný (Obr.12) a keďže sa na chvostoch nachádza viac lyzínových oblastí, vzniká veľký regulačný potenciál pre chromatinové modifikácie. Histónové metylácie sú dôležité modifikácie spájané s transkripčnou aktiváciou a taktiež represiou (Whetstine, 2010).



Obrázok 12: Štruktúra nukleozómu a histónové modifikácie.

Prevzaté a upravené z databázy RCSB PDB, 2021.

Napriek tomu, že histónové modifikácie sú vysoko konzervované, súčasné výskumy poukazujú na to, že chromozómová distribúcia jednotlivých modifikácií sa môže líšiť medzi jednotlivými fázami v bunkovom cykle, ako aj medzi jednotlivými druhmi eukaryótov. Poukazuje to na možnosť evolučnej rozdielnosti v čítaní tzv. „histónového kódu“ (Fuchs *et al.*, 2006).

Lokalizácia rozdielnych typov histónových modifikácií je možná *in situ* pomocou špecifických protilátok. Tieto protilátky dokážu identifikovať posttranslačne modifikované aminokyseliny. Detekcia prebieha naviazaním primárnej protilátky na špecifické miesto modifikácie na históne. Následne sa naviažu sekundárne protilátky s naviazaným fluorescenčným farbivom. Takéto imunoznačené modifikácie sa následne pozorujú pod fluorescenčným mikroskopom.

Väčšinu dát ohľadom metylácie histónov poskytuje modelová rastlina *Arabidopsis*. Imunoznačenie protilátkami rozoznáva rozdiely medzi mono-, di- a trimetyláciou špecifických lyzínov (K4, K9, K27 a K36 histónu H3). V *Arabidopsis* boli modifikácie H3K4me1, 2, 3 a H3K36me1, 2, 3 spolu s H3K9me3 a H3K27me3 kolokalizované s euchromatínom. Naopak modifikácie kolokalizované s heterochromatínom predstavovali H3K9me1, 2 a H3K27me1, 2 (Tab.1) (Fuchs *et al.*, 2006).

Existuje mierna variabilita v distribúciách modifikácii v euchromatíne alebo heterochromatíne medzi rôznymi druhmi rastlín. Jačmeň obsahuje euchromatínové špecifické metylácie H3K4me1, 2, 3, H3K9me3 a H3K27me3. Tieto metylácie vykazovali signál na euchromatickom póle v interfáznom jadre. V *Arabidopsis* vykazovala modifikácia H3K27me2 kolokalizáciu s heterochromatínom, v jačmeni sa ale našla H3K27me2 kolokalizovaná s euchromatickými doménami. Metylácie H3K9me1, 2 a H3K27me1 boli kolokalizované s heterochromatínom v jačmeni aj v *Arabidopsis*. V súčasnosti neexistujú dáta, ktoré by ukazovali chromozomálnu distribúciu metylácie H3K36me1, 2, 3 v jačmeni (Tab.1) (Fuchs *et al.*, 2006).

Tabuľka 1: Prehľad kolokalizácie histónových modifikácii s euchromatínom / heterochromatínom v *A. thaliana* a *H. vulgare* (jačmeň siaty).

Histónová metylácia	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Hordeum vulgare</i>
H3K4me1	Euchromatín	Euchromatín
H3K4me2	Euchromatín	Euchromatín
H3K4me3	Euchromatín	Euchromatín
H3K9me1	Heterochromatín	Heterochromatín
H3K9me2	Heterochromatín	Heterochromatín
H3K9me3	Euchromatín	Euchromatín
H3K27me1	Heterochromatín	Heterochromatín
H3K27me2	Heterochromatín	Euchromatín
H3K27me3	Euchromatín	Euchromatín
H3K36me1	Euchromatín	Neznámy
H3K36me2	Euchromatín	Neznámy
H3K36me3	Euchromatín	Neznámy

4 MATERIÁL A METÓDY

4.1 Materiál a pomôcky

V nasledujúcich podkapitolách budú uvedené materiály a pomôcky, použité pri vypracovaní tejto práce.

4.1.1 Laboratórne vybavenie

Pre vypracovanie bakalárskej práce boli použité nasledujúce prístroje:

- analytické váhy (Sartorius)
- automatické pipety (Nichipet EXII, Nichiryo)
- automatická trepačka (Heidolph Reax)
- epifluorescenčný mikroskop AxioImager Z2 (Zeiss) s vybaveným DSD2 otáčajúcim sa diskom s konfokálnym modulom (Andor), spojený s monochromatickou Zyla 4.2 kamerou (Andor)
- homogenizér (PT1300D, Polytron)
- hydridizér Slide Moat (Boekel Scientific)
- chladničky
- mini miešačka (VWR)
- mrazničky
- pH meter Inolab (WTW)
- prietokový cytometer a triedič (FACSaria II, SORP)
- rastová komora (fytotron, Weiss Technik)
- stereomikroskop (SZX16, Olympus)
- termocyklér Mastercycler nexus (Eppendorf)
- termostat (Biological Thermostat, BT 120)
- vákuový systém (Labobase)
- vodná kúpeľ (Mettler)
- výrobnik ľadu (MF26, Scotsman)

4.1.2 Malé laboratórne vybavenie

Pre vypracovanie bakalárskej práce boli použité nasledujúce pomôcky:

- Coplin nádoba
- diamantové pero

- filter priemer \varnothing 0,22 μm
- jednorazová plastová palička (SP BEL-ART)
- kadičky
- kvetináče (12×12 cm)
- malé kvetináče (5×5 cm, Jiffy)
- nylonová sieťovina s veľkosťou pórov 30 a 50 μm
- Petriho misky (priemer \varnothing 60 a 90 mm)
- pinzety
- poly-L-Lysine Slides (Menzel Gläser, J2800AMNZ)
- preparačné ihly
- skúmavky 0,2; 0,5; 1,5; 2 ml (Eppendorf)
- skúmavky 5ml Polypropylene na prietokovú cytometriu (Fisher Scientific)
- superfrost Plus Slides (Menzel Gläser, J1810AMNZ)
- žiletky

4.1.3 Použitý software

Pre vyhodnotenie a spracovanie dát boli využité dané programy:

- IQ3 (Andor)
- Imaris 9.2.1 (Bitplane, Oxford instruments), základná verzia
- Imaris 9.2 (Bitplane, Oxford Instruments), rozšírená verzia
- ImageJ (verejné vlastníctvo)
- Microsoft Excel (Microsoft)
- Minitab (Minitab Inc.)
- SketchBook (Autodesk)

4.1.4 Použité chemikálie

Pre vypracovanie bakalárskej práce boli použité nasledovné chemikálie:

- 37% formaldehyd (Sigma-Aldrich, kat.č. F8775)
- 37% kyselina chlorovodíková (Sigma-Aldrich, kat.č. 435570)
- 4',6-diamidino-2'-fenylyndol dihydrochlorid, DAPI (Sigma-Aldrich kat.č. 10236276001)
- 96% etanol (Lachner, kat.č. 20025-A96-M1000-1)

- blokovacie činidlo (Roche, kat.č. 11096176001)
- bovinné albumínové sérum, BSA (Sigma-Aldrich, kat.č. A3294-100G)
- deionizovaný formamid (Millipore, kat.č. S4117)
- dextrán sulfát (Carl Roth, kat.č. 9042-14-2)
- dihydrogéncitronan sodný (Roth, kat.č. R.HN13.1)
- dvojnásobne destilovaná voda (ddH₂O)
- chlorid draselný (Sigma-Aldrich, kat.č. 30076-AP0)
- chlorid horečnatý (Sigma-Aldrich, kat.č. 208337)
- chlorid sodný (Lachner, kat.č. 30093-AP0)
- konské sérum (Sigma-Aldrich, kat.č.H0146-5ML)
- kyselina octová (Lachner, kat.č. 61019-001-P0000-1)
- lososie spermie (10 mg·ml⁻¹) (Invitrogen, kat.č. AM9680)
- sacharóza (Millipore, kat.č. 107687)
- tris-hydroxymetyl-aminometán (Tris) (Sigma-Aldrich, kat.č. 77-86-1)
- Triton X100 (Sigma-Aldrich, kat.č. T8787)
- Tween-20 (Sigma-Aldrich, kat.č. P9416)
- Vectashield (Vector Laboratories, kat.č. H-1000-10)
- Primárne protilátky
 - anti-grass-CenH3 (Nagaki *et al.*, 2004, láskavo poskytuje Prof. Dr. Andreas Houben)
 - anti-H3K4me3 (Abcam, kat.č. ab8580)
 - anti-H3K27me1 (Abcam, kat.č. ab194688)
 - anti-H3K27me2 (Abcam, kat.č. ab24684)
 - anti-H3K27me3 (Abcam, kat.č. ab195477)
 - anti-H3K9me1 (Abcam, kat.č. ab 8896)
 - anti-H3K9me2 (Invitrogen, kat.č. 49-1007)
 - anti-H3K36me3 (Abcam, kat.č. ab9050)
 - anti-RNA polymeráza II S2P (fosforylovaný na Ser2, Abcam, kat.č. ab 5095)
- Sekundárne protilátky
 - kozie-anti-kráľičie-Alexa Fluor 488 ((Invitrogen, kat.č. A11008)
 - kozie-anti-myšie-Alexa Fluor 488 (Invitrogen, kat.č. A11001)

4.1.5 Použité roztoky a ich príprava

Príprava zásobných roztokov

- 1M Tris-HCl pH=7,0 ($M_{\text{Tris}}=121,15 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$): Rozpustiť 60,5 g v 400 ml ddH₂O, upraviť pH na 7,0 použitím 37% HCl, doliať ddH₂O do 500 ml. Autoklávovať. Skladovať pri izbovej teplote.
- 1M Tris-HCl pH=7,5 ($M_{\text{Tris}}=121,15 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$): Rozpustiť 60,5 g v 400 ml ddH₂O, upraviť pH na 7,5 použitím 37% HCl, doliať ddH₂O do 500 ml. Autoklávovať. Skladovať pri izbovej teplote.
- 1M MgCl₂ ($M_{\text{MgCl}_2}=95,21 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$): Rozpustiť 47,6 g v 500 ml ddH₂O. Autoklávovať. Skladovať pri izbovej teplote.
- 1M NaCl ($M_{\text{NaCl}}=58,44 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$): Rozpustiť 29,2 g v 500 ml ddH₂O. Autoklávovať. Skladovať pri izbovej teplote.
- 1M KCl ($M_{\text{KCl}}=74,55 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$): Rozpustiť 37,3 g v 500 ml ddH₂O. Autoklávovať. Skladovať pri izbovej teplote.
- 10× PBS (1,37 M NaCl, 27 mM KCl, 100 mM Na₂HPO₄, 18 mM KH₂PO₄, pH=7,4), ($M_{\text{NaCl}}=58,44 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, $M_{\text{KCl}}=74,55 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, $M_{\text{Na}_2\text{HPO}_4}=141,96 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, $M_{\text{KH}_2\text{PO}_4}=136,086 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$). Rozpustiť 80 g NaCl, 2 g KCl, 17,8 g Na₂HPO₄·2H₂O, 2,4 g KH₂PO₄ v 1000 ml ddH₂O. Filtrovat' cez filter \varnothing 0,22 μm . Skladovať pri izbovej teplote.
- 20× SSC (3 M NaCl, 300 mM C₆H₇NaO₇), ($M_{\text{NaCl}}=58,44 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, $M_{\text{C}_6\text{H}_7\text{NaO}_7}=214,10 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$). Rozpustiť 175,3 g NaCl a 64,2 g C₆H₇NaO₇ v 1000 ml ddH₂O. Autoklávovať. Skladovať pri izbovej teplote.

Príprava pracovných roztokov

- Tris pufor (100 mM Tris-HCl pH=7,0; 5 mM MgCl₂, 85 mM NaCl, 0,1% Triton X100). Zmiešať 10 ml 1M Tris-HCl pH=7,0, 500 μl 1M MgCl₂, 8,5 ml 1M NaCl a 100 μl Triton X100. Doplniť vodou do 100 ml. Premiešať na magnetickom miešadle. Pripraviť vždy čerstvé a skladovať pri 4°C až do použitia.
- Fixačný roztok na fixáciu rastlinného materiálu (4% formaldehyd v Tris pufri). Zmiešať 5,4 ml 37% formaldehyd a 50 ml Tris pufri. Pripraviť vždy čerstvé.
- Fixačný roztok na fixáciu jadier na sklíčka (3,7% formaldehyd v 1× PBS). Zmiešať 5 ml 37% formaldehyd a 5 ml 10× PBS. Doplniť vodou do 50 ml. Pripraviť vždy čerstvé.

- Jadrový izolačný pufo (ang. Nuclei Isolation Buffer, NIB. 100 mM Tris pH=7,0, 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 0,05% Tween-20, 5% sacharóza). Rozpustiť 2,5 g sacharózy v 5 ml 1M Tris pH=7,0, 2,5 ml 1M KCl, 0,1 ml 1M MgCl₂ a 25 µl Tween. Doplniť vodou do 50 ml. Filtrovať cez filter ø 0,22 µm a skladovať pri 4°C až do použitia.
- 1× PBS (pH=7,4), (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄). Zmiešať 10 ml 10× PBS s 90 ml ddH₂O. Pripraviť vždy čerstvé.
- 4× SSC s Tween-20 (600 mM NaCl, 60 mM C₆H₇NaO₇, 0,01% Tween-20). Zmiešať 20 ml 20× SSC s 80 ml ddH₂O a 10 µl Tween 20. Premiešať na magnetickom miešadle. Autoklávať. Skladovať pri izbovej teplote.
- 2× SSC s Tween-20 (300 mM NaCl, 30 mM C₆H₇NaO₇, 0,01% Tween-20). Zmiešať 10 ml 20× SSC s 90 ml ddH₂O a 10 µl Tween 20. Premiešať na magnetickom miešadle. Autoklávať. Skladovať pri izbovej teplote.
- 0,1× SSC (15 mM NaCl, 1,5 mM C₆H₇NaO₇). Zmiešať 0,5 ml 20× SSC s 99,5 ml ddH₂O. Autoklávať. Skladovať pri izbovej teplote.
- Blokovací pufo (ang. Blocking buffer, BL; 3% BSA, 10% konské sérum, 1× PBS). Rozpustiť 0,3 g BSA v 1 ml konskom sére, 1 ml 10× PBS a 8 ml ddH₂O. Filtrovať cez filter ø 0,22 µm a skladovať pri -20°C až do použitia.
- AK pufo (1% BSA, 10% konské sérum, 1× PBS, 0,1% Tween-20). Rozpustiť 0,1 g BSA v 1 ml konskom sére, 1 ml 10× PBS a 8 ml ddH₂O. Pridať 10 µl Tween-20. Filtrovať cez filter ø 0,22 µm a skladovať pri -20°C až do použitia.
- TNB pufo (100 mM Tris-HCl pH=7,5, 150 mM NaCl, 0,5% blokovacie činidlo). Rozpustiť 0,05 g blokovacieho činidla v 1 ml 1M Tris-HCl pH=7,5, 1,5 ml 1M NaCl a 7,5 ml ddH₂O. Filtrovať cez filter ø 0,22 µm a skladovať pri -20°C až do použitia.
- TNT pufo (100 mM Tris-HCl pH=7,5, 150 mM NaCl, 0,1% Tween-20). Zmiešať 5 ml 1M Tris-HCl pH=7,5, 7,5 ml 1M NaCl a 50 µl Tween 20. Doplniť ddH₂O do 50 ml. Premiešať na magnetickom miešadle. Pripraviť vždy čerstvé.

4.1.6 Použitý rastlinný materiál

Jačmeň siaty (*Hordeum vulgare* ssp. *vulgare*), 2n=14, kultivar Compana (PI 539111). Semená boli získané z Národnej zbierky malých zŕn národného systému pre rastlinné germplazmy Ministerstva poľnohospodárstva a poľnohospodárskeho výskumu USA (ang. National Small Grains Collection of the National Plant Germplasm System of the United States Department of Agriculture-Agricultural Research Service). Semená boli zhromaždené 4, 8, 16, 24, 32 DAP. Koreňový apikálny meristém (KAM) 4 dní po vyklíčení (ang. DAG; days after germination) bol využitý ako somatická pletivová kontrola.

4.2 Použité experimentálne a vyhodnocovacie postupy

4.2.1 Podmienky rastu rastlín

Na klíčenie semien bola použitá Petriho miska (ø 90 mm), do ktorej bola pripravená buničina s filtračným papierom, následne bola pridaná destilovaná voda. Na navlhčený filtračný papier boli poukladané semená jačmeňa (cca 15 semien). Petriho miska so semenami bola uložená do chladničky pri 4°C na 48 hodín. V chladničke musia semená podstúpiť stratifikáciu, čo znamená, že tvrdý obal semien v štádiu dormancie semena sa zmäkčí a naštartuje sa vývoj embrya.

Petriho miska bola prenesená do termostatu nastaveného v tme pri 25°C na 48 hodín. Následne boli semená premiestnené do malých kvetináčov (5×5 cm, Jiffy) naplnené zmesou zeminy a piesku (3/1; v/v), a boli ponechané na jeden týždeň v klimateckej komore (fytotron) za kontrolovaných celodenných podmienok (16 hodín deň – 8 hodín noc; teplota: 20 °C/deň – 16 °C/noc; intenzita svetla 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$; vlhkosť 60%). Po týždni boli rastliny premiestnené do kvetináčov 12×12 cm a ponechané vo fytotrone na približne dva mesiace pri rovnakých podmienkach spomenutých vyššie.

4.2.2 Stanovenie opelenia a zbieranie semien

Deň od opelenia (DAP) bol definovaný pomocou morfológie stigmatických vetiev a prašníkov podľa Waddingtonovej stupnice (W10) (Waddington *et al.*, 1983) v strednej časti klasu (Weschke *et al.*, 2000). Klasy v deň opelenia (ang. day of pollination, DOP) boli charakterizované rozšíreným trupom, rozšírenou a široko rozvetvenou stigmou a prítomnosťou peľových zrn na stigmatickom povrchu. Daný klas v DOP sa označí číslom (ID) a dátumom, daná informácia sa zaznamená do tabuliek Microsoft Excel. Deň po opelení (DAP) sa počíta podľa vzorca:

$$\text{DAP} = \text{DOP} + x$$

$$x = \text{očakávané DAP}$$

Hodnoty sú vo formáte „Údaje“ v Microsoft Excel (Kovacik *et al.* 2020).

4.2.3 Príprava suspenzie jadier

Z odtrhnutého klasu boli izolované semená, zo semien odstránené trupy použitím pinzety. Následne bolo embryo manuálne rozdelené od zvyšku semena pod stereomikroskopom použitím pinzety a laboratórnej ihly. Fixácia embrya a endospermu prebieha podľa toho, aké je staré (DAP) (Tab.2). Zo zmesi bol pasteurovou pipetou odsatý 4% fixačný roztok a následne bola zmes premytá dvakrát v TRIS pufri (na ľade). Zmes bola homogenizovaná žiletkou alebo paličkou v jadrovom izolačnom pufri NIB. Nakoniec bola zmes prefiltrovaná cez 50µm filter do 5ml skúmaviek.

Tabuľka 2: Spracovanie vzoriek na suspenziu jadier (pokračovanie na ďalšej strane).

Názov vzorky	Počet semien na 1 vzorku	Pomôcky	Fixácia	Oplachovanie	Homogenizácia materiálu
4 DAP endosperm (embryo nebolo možné oddeliť)	~80	kadička	4% formaldehyd v TRIS pufri	2 krát 10 min v TRIS pufri	sekanie žiletkou v 2 ml NIB
			40 min na ľade		
			20 min na ľade vo vákuu		
8 DAP embryo	~80	1,5 ml Eppendorf skúmavka	4% formaldehyd v TRIS pufri	2 krát 5 min v TRIS pufri	paličkou v 500 µl NIB
			15 min na ľade		
			5 min na ľade vo vákuu		
8 DAP endosperm	~80	kadička	4% formaldehyd v TRIS pufri	2 krát 10 min v TRIS pufri	sekanie žiletkou v 2 ml NIB
			40 min na ľade		
			20 min na ľade vo vákuu		
16 DAP embryo	~40	kadička	4% formaldehyd v TRIS pufri	2 krát 10 min v TRIS pufri	sekanie žiletkou v 1 ml NIB
			40 min na ľade		
			20 min na ľade vo vákuu		
16 DAP endosperm	~40	kadička	4% formaldehyd v TRIS pufri	2 krát 10 min v TRIS pufri	sekanie žiletkou v 2 ml NIB
			40 min na ľade		
			20 min na ľade vo vákuu		

24 DAP embryo	~30	kadička	4% formaldehyd v TRIS pufri	2 krát 10 min v TRIS pufri	sekanie žiletkou v 1 ml NIB
			40 min na ľade		
			30 min na ľade vo vákuu		
24 DAP endosperm	~60	kadička	4% formaldehyd v TRIS pufri	2 krát 10 min v TRIS pufri	sekanie žiletkou v 2 ml NIB
			40 min na ľade		
			30 min na ľade vo vákuu		
32 DAP embryo	~30	kadička	4% formaldehyd v TRIS pufri	2 krát 10 min v TRIS pufri	sekanie žiletkou v 1 ml NIB
			40 min na ľade		
			30 min na ľade vo vákuu		
32 DAP endosperm	~60	kadička	4% formaldehyd v TRIS pufri	2 krát 10 min v TRIS pufri	sekanie žiletkou v 2 ml NIB
			40 min na ľade		
			30 min na ľade vo vákuu		
Koreňový apikálny meristém (KAM)	70	kadička	2% formaldehyd v TRIS pufri	2 krát 10 min v TRIS pufri	13 s /15 000rpm Polytron PT1300D homogenizér
			20 min na ľade		

4.2.4 Triedenie jadier na podložné sklíčka

Suspensia jadier bola nafarbená $2 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ DAPI. Triedených bolo približne 500 jadier (na každé stanovenie obsahu DNA) na kvapku tlmivého roztoku NIB na mikroskopické podložné sklíčka pomocou prietokového cytometra a triediča FACS Aria II SORP (BD Biosciences, Santa Clara, CA, USA). Sklíčka boli vysušené na vzduchu a až do použitia skladované pri teplote $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pre FISH boli použité Super frost sklíčka a pre Imuno-FISH polylyzínové sklíčka. Triedenie vykonal Dr. Mahmoud Said.

Tabuľka 3: Triedené populácie jadier pre daný deň po opelení.

Názov vzorky	Triedené populácie jadier
4 DAP endosperm	3C 6C
8 DAP embryo	2C 4C
8 DAP endosperm	3C 6C 12C
16 DAP embryo	2C 4C 8C
16 DAP endosperm	3C 6C 12C 24C
24 DAP embryo	2C 4C 8C
24 DAP endosperm	3C 6C 12C 24C
32 DAP embryo	2C 4C 8C
32 DAP endosperm	3C 6C 12C
KAM	2C 4C

C hodnota je hodnota, ktorá vyjadruje množstvo DNA v konkrétnom súbore chromozómov. V haploidnom súbore chromozómov v jadre sa nachádza 1C množstvo DNA. V diploidnej bunke je pred S-fázou bunkového cyklu počet chromozómov $2n$ a obsah DNA je 2C. V triploidnej bunke je pred S-fázou $3n$ počet chromozómov a obsah DNA je 3C.

4.2.5 Fluorescenčná hybridizácia *in situ*

Použité sondy

Centromerická oligo-sonda špecifická pre jačmeň je pomenovaná *Cereba*, pripravená pre *Ty3/gypsy-like* retroelement *Cereba* (Hudakova *et al.*, 2001). Syntetická sonda dlhá 24 nukleotidov (5'-AGGGAGAGGGAGAGGGAGAGGGAG-3') je označená na 5' konci fluorochrómom Cy3 alebo Cy5 (Eurofins Genomics AT, Viedeň, Rakúsko). Telomerická oligo-sonda (Telo) je syntetizovaná z 28 oligonukleotidov (5'-CCCTAAACCCTAAACCCTAAACCCTAAA-3') telomerickej repetitívnej sekvencie typu *Arabidopsis* označenej na 5' konci fluorochrómom Cy3 alebo Cy5 (Eurofins Genomics AT).

Príprava sklíčok, hybridizácia, premytie po hybridizácii

Sklíčka s jadrami boli vybraté z mrazničky a následne boli vysušené pri izbovej teplote na 10 min. Diamantovým perom bolo určené umiestnenie populácie jadier. Sklíčka boli fixované v 4% formaldehyde v $1\times$ PBS pri izbovej teplote na 15 minút v Coplin nádobe a v digestore. Následne boli premyté trikrát na 5 minút v $1\times$ PBS pri izbovej teplote v Coplin nádobe pri miernom miešaní na mini miešačke. Sklíčka boli použité na hybridizáciu centromerických a telomerických oligo-sond.

Bol pripravený hybridizačný mix, ktorý pozostáva zo zložiek v tabuľke č.4. Na jednu populáciu jadier na sklíčku bolo napipetovaného 10 μl hybridizačného mixu. Sklíčka boli denaturované na 3 minúty pri 80°C. Inkubácia prebiehala vo vlhkej komore cez noc na 37°C.

Tabuľka 4: Príprava hybridizačného mixu 1.

Komponenty	Populácia jadier / 10 μl
Deionizovaný formamid	5 μl
20 \times SSC	0,5 μl
Dextran sulfát	2 μl
Centromérická oligo-sonda	0,5 μl
Telomérická oligo-sonda	0,5 μl
Lososie spermie	0,4 μl
ddH ₂ O	1,1 μl

Ďalší deň boli sklíčka premyté v Coplin nádobe vo vodnom kúpeli na 42°C v nasledujúcom poradí:

2 \times SSC	dvakrát 7 minút
0,1 \times SSC	jedenkrát 10 minút
2 \times SSC	jedenkrát 5 minút

Následne boli sklíčka dvakrát premyté v Coplin nádobe v 4 \times SSC na 7 minút pri izbovej teplote. Sklíčka boli následne dehydratované v 70%, 90% a v 96% etanole, v každom po dve minúty. Nakoniec bolo na sklíčka napipetované DAPI (1 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) vo Vectashield.

Semikonfokálna mikroskopia

Analýza fluorescenčných signálov bola spravená pomocou AxioImager Z2 (Zeiss) epifluorescenčným mikroskopom vybaveným DSD2 otáčajúcim sa diskom s konfokálnym modulom (Andor). Mikroskop je taktiež vybavený monochromatickou Zyla 4.2 kamerou (Andor). Obrázky v Z osi boli fotené osobitne pre každý fluorochróm, využívajúc dané excitačné (DAPI $\lambda=359$ nm, Cy3 $\lambda=554$ nm, Cy5 $\lambda=649$ nm) a emisné (DAPI $\lambda=475$ nm, Cy3 $\lambda=568$ nm, Cy5 $\lambda=666$ nm) filtre v IQ3 systéme (Andor). Fotky boli spracované v Imaris 9.2.1 (Bitplane, Oxford instruments). Pre každé jadro bolo odobratých 30–80 optických rezov v rozmedzí 160–200 nm a následne boli zlúčené do 3D modelu. Bolo zhodnotených aspoň 30 jadier z každej populácie jadier v troch biologických opakovaníach.

4.2.6 Imunozačenie spojené s FISH

Príprava sklíčok a imunozačenie

Sklíčka s jadrami boli vybraté z mrazničky a následne boli vysušené pri izbovej teplote na dobu 10 min. Diamantovým perom bolo určené umiestnenie populácie jadier. Sklíčka boli fixované v 4% formaldehyde v 1× PBS pri izbovej teplote na 15 minút v Coplin nádobe a v digestore. Následne boli premyté trikrát na 5 minút v 1× PBS pri izbovej teplote v Coplin nádobe pri miernom miešaní na mini miešačke. Sklíčka boli použité na imunozačenie primárnymi a sekundárnymi protilátkami a následne na hybridizáciu centromérických a telomérických prób.

Na sklíčko bol nanosený blokovací pufoer na 30 min pri 37°C vo vlhkej komore, následne boli inkubované primárne protilátky (riedenie 1:100 v AK pufri) (Tab.5) na noc vo vlhkej komore pri 4°C v chladničke. Na druhý deň boli sklíčka premyté trikrát na 5 minút v 1× PBS pri izbovej teplote v Coplin nádobe pri miernom miešaní. Boli premyté v TNT na 5 min v Coplin nádobe pri miernom miešaní. Následne boli inkubované so sekundárnymi protilátkami (riedenie 1:300 v TNB pufri) (Tab.5) pri 37°C vo vlhkej komore na 90 minút. Po inkubácii boli sklíčka premyté trikrát na 5 minút v 1× PBS pri izbovej teplote v Coplin nádobe pri miernom miešaní, v tme. Sklíčka boli premyté v TNT na 5 minút v Coplin nádobe pri miernom miešaní, v tme.

Tabuľka 5: Kombinácie použitých primárnych a sekundárnych protilátok.

Primárne protilátky	Hostiteľ	Sekundárne protilátky
Anti-CenH3	králik	kozie-anti-králičie-Alexa Fluor 488
Anti-H3K4me3		
Anti-H3K27me1		
Anti-H3K27me2		
Anti-H3K27me3		
Anti-H3K9me1		
Anti-H3K9me2		
Anti-H3K36me3		
Anti-RNA polymeráza II	myš	kozie-anti-myšie-Alexa Fluor 488

Fixácia

Sklíčka je nutné po imunozačení nechať fixovať, aby sme mohli prejsť na časť FISH. Fixované boli v 96% etanol:kyselina octová (3:1) na 10 minút pri izbovej teplote v Coplin nádobe, v digestori a v tme. Následne boli fixované v 3,7% formaldehyde v 1× PBS na 10 minút pri izbovej teplote v Coplin nádobe, v digestori a v tme. Sklíčka boli premyté trikrát na 5 minút v 1× PBS pri izbovej teplote v Coplin nádobe pri miernom miešaní v tme.

Fluorescenčná hybridizácia *in situ*

Pre túto časť experimentu boli použité rovnaké centromérické a telomérické sondy ako v časti 4.2.5. Bol pripravený hybridizačný mix, ktorý pozostáva zo zložiek v tabuľke č.6. Na jednu populáciu jadier na sklíčku bolo napipetovaného 10 μl hybridizačného mixu. Sklíčka boli denaturované na 3 minúty pri 80°C. Inkubácia prebiehala vo vlhkej komore cez noc na 37°C.

Tabuľka 6: Príprava hybridizačného mixu 2.

Komponenty	Populácia jadier / 10 μl
Deionizovaný formamid	5 μl
20x SSC	0,5 μl
Dextran sulfát	2 μl
Centromérická oligo-sonda	0,5 μl
Telomérická oligo-sonda	0,5 μl
ddH ₂ O	1,5 μl

Ďalší deň boli sklíčka premyté v Coplin nádobe vo vodnom kúpeli na 42°C v nasledujúcom poradí:

2× SSC dvakrát 7 minút
0,1× SSC jedenkrát 10 minút
2× SSC jedenkrát 5 minút

Následne boli sklíčka dvakrát premyté v Coplin nádobe v 4× SSC na 7 minút pri izbovej teplote. Nakoniec bolo na sklíčka napipetované DAPI (1 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) vo Vectashield.

Semikonfokálna mikroskopia

Na analýzu fluorescenčných signálov bol použitý AxioImager Z2 (Zeiss) epifluorescenčný mikroskop vybavený DSD2 konfokálnym modulom a kamerou Zyla 4.2 (oboje Andor). Obrázky v Z osi boli fotené osobitne pre každý fluorochróm, využívajúc dané excitačné (DAPI $\lambda=359$ nm, Alexa-Fluor 488=465 nm, Cy3 $\lambda=554$ nm, Cy5 $\lambda=649$ nm) a emisné (DAPI $\lambda=475$ nm, Alexa-Fluor 488=515 nm, Cy3 $\lambda=568$ nm, Cy5 $\lambda=666$ nm) filtre v IQ3 systéme (Andor). Pre každé jadro bolo odobratých 30–80 optických rezov v rozmedzí 160–200 nm a následne boli zlúčené do 3D modelu. Aspoň 10–15 jadier bolo zhodnotených z každej populácie jadier v troch biologických opakovaníach.

4.2.7 Mikroskopická analýza obrazu

Všetky fotografie boli odfotené v IQ3 systéme (Andor) a uložené vo formáte csv pomocou základnej verzie Imaris 9.2.1 (Bitplane, Oxford instruments). Následné analýzy boli vykonané pomocou rozšírenej verzie softvéru Imaris 9.2 (Bitplane, Oxford instruments). Na manuálnu analýzu každého jadra sa využili funkcie „Surface“ a „Spot Detection“. Objem jadra sa určil vykreslením sfarbenia DAPI pri použití funkcie „Surface“. Počet centromérických, telomérických a CenH3 signálov sa určil použitím funkcie „Spot Detection“. ImageJ (Schneider *et al.*, 2012) bol využitý na spočítanie centromérických signálov, meranie plochy a obvod jadra. Kruhovitosť jadier bola vypočítaná podľa vzorca: $Kruhovitost = 4\pi \times plocha / (obvod)^2$ (Ankam *et al.*, 2018). Obrázky boli upravené v SketchBook softvéri.

4.2.8 Štatistická analýza výsledku

Za účelom zistenia variability v získanom súbore dát bola použitá jednosmerná analýza rozptylu (ang. Analysis of Variance, ANOVA). Pre porovnanie plochy, kruhovitosti, objemu a počtu centromérických signálov bol použitý Tukeyov test s intervalom spoľahlivosti $p=0,05$. Všetky analýzy boli vykonané v programe Minitab (Minitab Inc.). Za účelom vizualizácie závislosti kolokalizácie centromérických sekvencií a CenH3 *foci* boli využité Vennove diagramy. Na zostrojenie Vennových diagramov bol použitý online nástroj dostupný na adrese <http://eulerr.co/>.

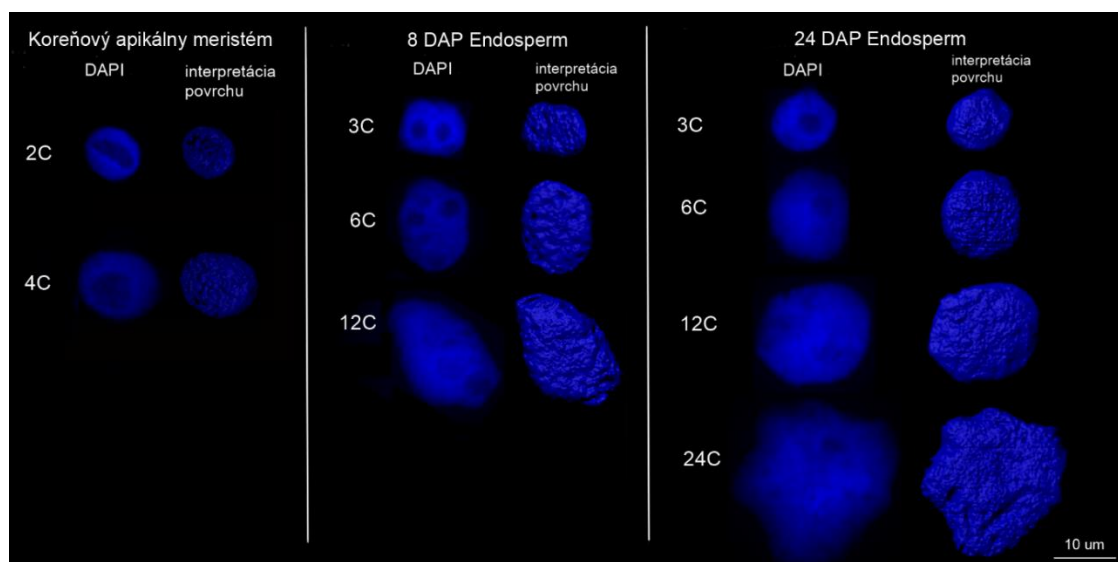
5 VÝSLEDKY

5.1 Všeobecná charakteristika jadra embrya a endospermu

Na vyhodnotenie charakteristiky jadra semena jačmeňa reprezentovaného dvoma pletivami: diploidným embryom a triploidným endospermom, boli využité hodnoty plochy, kruhovitosti a objemu jadra. Jadrá izolované z koreňového apikálneho meristému (KAM) slúžili ako kontrola somatického pletiva. Jadrá boli farbené DAPI a fotografované v IQ3 systéme (Andor).

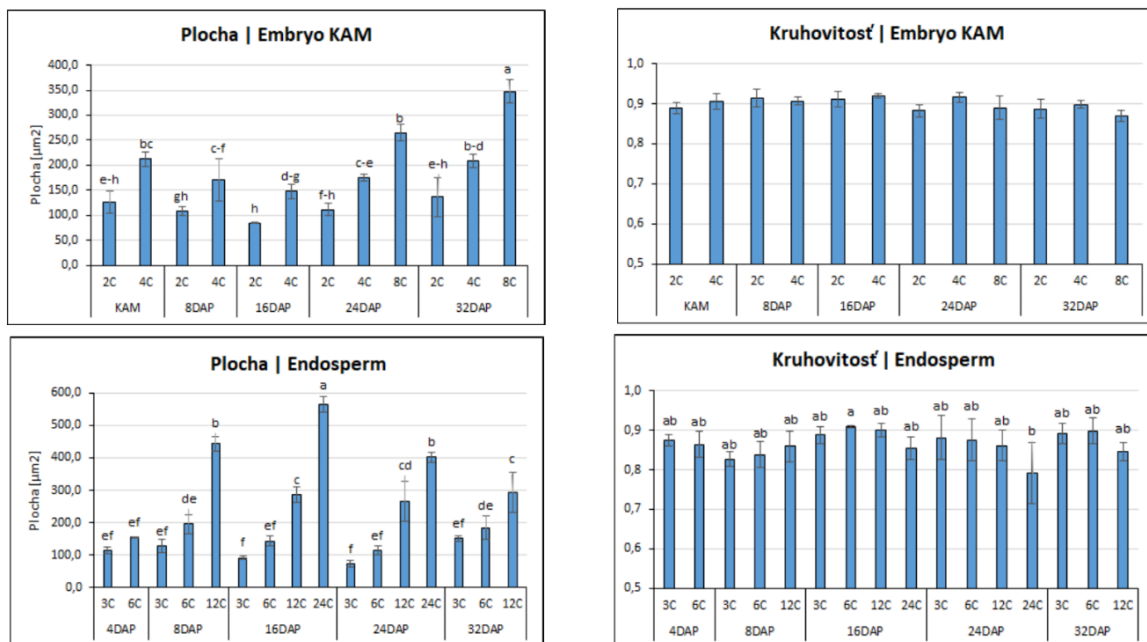
5.1.1 Plocha a kruhovitosť jadra

Na analýzu jadier embrya boli izolované semená jačmeňa staré: 8, 16, 24 a 32 DAP. Hodnoty plochy boli získané v programe Imaris 9.2 po využití funkcie „Surface“. Pre 8 DAP a 16 DAP boli analyzované jadrá s C-hodnotami 2C a 4C, ktoré predstavujú G1 a G2 fázu bunkového cyklu. Pre 24 DAP a 32 DAP embryo boli analyzované jadrá s C-hodnotami 2C, 4C a 8C. Jadrá 8C predstavujú prvý cyklus endoreduplikácie. Jadrá koreňového apikálneho meristému boli izolované s C-hodnotami 2C a 4C. Na analýzu jadier endospermu boli izolované semená staré: 4, 8, 16, 24 a 32 DAP. Pre všetky časové body boli analyzované jadrá s C-hodnotami 3C a 6C, predstavujúce G1 a G2 fázu bunkového cyklu. Jadrá s C-hodnotami 12C a 24C predstavujú prvý a druhý cyklus endoreduplikácie. Vo vzorke 4 DAP endospermu sa neobjavilo endoreduplikované jadro. Jadrá endospermu 12C sa objavili vo vzorkách 8 DAP až 32 DAP, zatiaľ čo jadrá 24C sa objavili vo vzorkách 16 DAP a 24 DAP.



Obrázok 13: Analýza povrchu a kruhovitosti jadier KAM a endospermu.

Reprezentatívne jadrá boli izolované z KAM 4 dni po vyklíčení (ang. days after germination, DAG) a z endospermu 8 a 24 dní po opelení (ang. days after pollination, DAP). KAM slúžil ako kontrola somatického pletiva. Jadrá boli farbené DAPI. Fotografie jadier boli následne upravené v programe Imaris 9.2 pomocou funkcie „Surface“, z ktorej sme získali interpretáciu povrchu jadra.



Obrázok 14: Kvantifikácia plochy a kruhovitosti jadier KAM, embrya a endospermu v rôznych časových bodoch s rôznymi C-hodnotami.

KAM slúžil ako kontrola somatickeho pletiva. Hodnoty sú priemerom (\pm SD) z troch biologických opakovaní (mikroskopické podložné sklíčka), v každom bolo analyzovaných 10 jadier. Analýza rozptylu (ang. Analysis of Variance, ANOVA) bola vykonaná pre všetky pletivá pre jednotlivé C-hodnoty v grafe. Podľa Tukey testu ($p \leq 0,05$) sa hodnoty plochy označené rovnakým písmenom nelíšia. Pre kruhovitosť jadier KAM a embrya neboli určené žiadne významné rozdiely ($p = 0,051$).

Analýza bola vykonaná v troch biologických opakovaní, v každom najmenej 10 analyzovaných jadier. Plocha jadra KAM bola pre 2C $126 \mu\text{m}^2$ a pre 4C $212 \mu\text{m}^2$. Plocha jadier embrya 2C sa pohybovala od $84 \mu\text{m}^2$ pre 16 DAP do $136 \mu\text{m}^2$ pre 32 DAP. Plocha jadier embrya 4C sa pohybovala od $148 \mu\text{m}^2$ pre 16 DAP do $208 \mu\text{m}^2$ pre 32 DAP. Plocha jadier embrya 8C bola $265 \mu\text{m}^2$ pre 24 DAP a $347 \mu\text{m}^2$ pre 32 DAP. Plocha jadier endospermu 3C sa pohybovala od $73 \mu\text{m}^2$ pre 24 DAP do $151 \mu\text{m}^2$ pre 32 DAP. Plocha jadier endospermu 6C sa pohybovala od $113 \mu\text{m}^2$ pre 24 DAP do $196 \mu\text{m}^2$ pre 8 DAP. Plocha jadier endospermu 12C bola dvakrát vyššia ako plocha jadier 6C. Hodnoty sa pohybovali od $266 \mu\text{m}^2$ pre 24 DAP do $444 \mu\text{m}^2$ pre 8 DAP. Plocha jadier endospermu 24C bola $564 \mu\text{m}^2$ pre 16 DAP a $402 \mu\text{m}^2$ pre 24 DAP. So zvyšujúcou sa C-hodnotou je viditeľný nárast plochy jadra (Obr. 14).

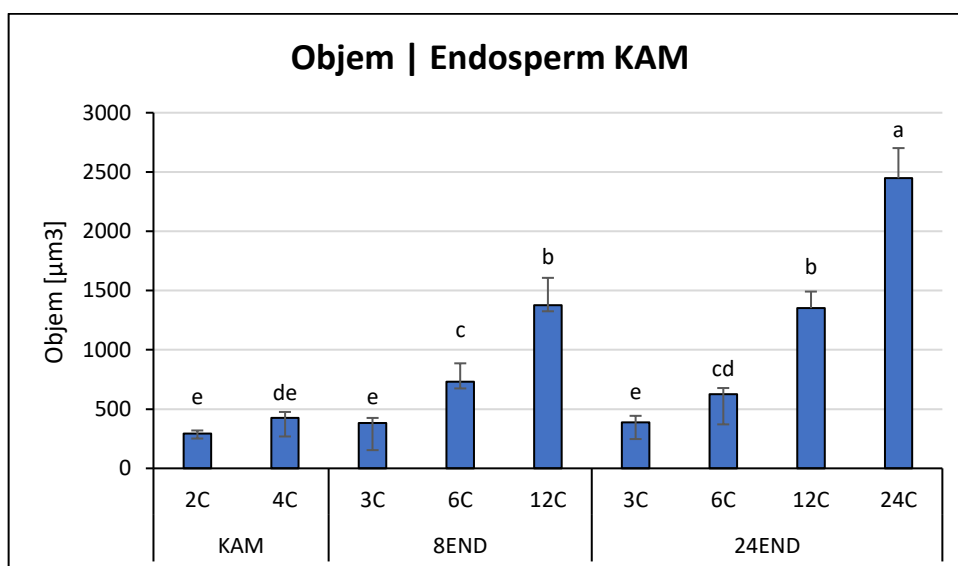
Kruhovitost' jadier bola vypočítaná na základe plochy a obvodu jadra meraného v ImageJ. Pre všetky jadrá KAM a embrya sa kruhovitosť pohybovala okolo hodnoty $\pm 0,9$, čo znamená, že pre rôzne staré jadrá embrya rôznych C-hodnôt sa kruhovitosť nemení.

Pre jadrá endospermu sa kruhovitosť pohybuje od hodnoty 0,79 pre 24C 24 DAP po hodnotu 0,91 pre 6C 16 DAP. Kruhovitost' starších jadier endospermu (24 DAP, 32 DAP) je vo vyšších C-hodnotách nižšia.

5.1.2 Objem jadra

Pre vyhodnotenie objemu jadier sa analyzovali jadrá endospermu starého 8 DAP a 24 DAP. Pre obidva časové body boli analyzované jadrá s C-hodnotami 3C, 6C a 12C. Pre jadrá izolované zo semien 24 DAP bola analyzovaná navyše C-hodnota 24C. Jadrá KAM boli izolované s C-hodnotami 2C a 4C. Hodnoty objemu boli získané v programe Imaris 9.2 po využití funkcie „Surface“. Analýza bola vykonaná s najmenej 10 jadrami.

Objem jadier KAM bol pre 2C 293 μm^3 a pre 4C 425 μm^3 . Objem jadier 3C endospermu pre 8 DAP a 24 DAP bol rovnaký, konkrétne 384 μm^3 (8 DAP) a 387 μm^3 (24 DAP). Objem jadier 6C bol 730 μm^3 pre 8 DAP a o niečo menší pre 24 DAP 626 μm^3 . Objem jadier 12C bol pre obidva časové body rovnaký, konkrétne 1377 μm^3 (8 DAP) a 1351 μm^3 (24 DAP). Objem jadra 24C bol 1,8-krát väčší v porovnaní s 12C jadrom, konkrétne 2447 μm^3 (24 DAP). S rastúcou C-hodnotou rastie aj hodnota objemu (Obr.15).



Obrázok 15: Kvantifikácia objemu jadier KAM a endospermu s rôznymi C-hodnotami.

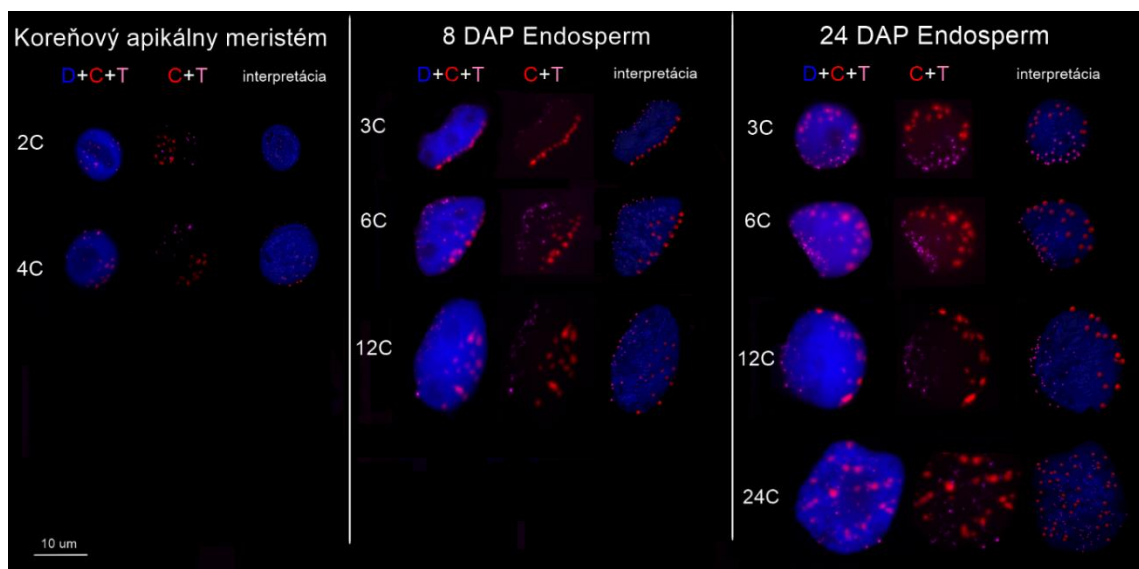
KAM slúžil ako kontrola somatickeho pletiva. Hodnoty sú priemerom (\pm SD) z 10 analyzovaných jadier. ANOVA bola vykonaná pre všetky pletivá jednotlivých C-hodnôt v grafe. Podľa Tukey testu ($p \leq 0,05$) sa hodnoty označené rovnakým písmenom nelíšia.

5.2 Analýza Rabl chromatinovej organizácie

Na vyhodnotenie Rabl organizácie chromatinu v jadre boli izolované jadrá KAM s C-hodnotami 2C a 4C a jadrá endospermu jačmeňa staré 8 DAP a 24 DAP. Pre obidva časové body boli analyzované jadrá s C-hodnotami 3C, 6C a 12C. Pre jadro 24 DAP bola taktiež analyzovaná C-hodnota 24C. Jadrá boli značené centromérickou a telomérickou sondou pomocou FISH a farbené pomocou DAPI. Analyzovaných bolo 10 jadriér pre jednotlivé časové body a C-hodnoty. Pre lepšiu interpretáciu dát a pre vizualizáciu centromérických a telomérických *foci* bola využitá analýza v programe Imaris 9.2.

Jadrá KAM 2C a 4C vykazujú Rabl organizáciu chromatinu, čo znamená, že centroméry sa nachádzajú na jednom póle jadra, zatiaľ čo teloméry sa nachádzajú na opačnom póle. Taktiež jadrá endospermu 8 DAP C-hodnôt 3C a 6C vykazujú Rabl organizáciu. Jadro 12C endospermu 8 DAP začína strácať Rabl konfiguráciu, centroméry sa posúvajú do stredu jadra.

Jadro 3C endospermu 24 DAP vykazuje Rabl organizáciu chromatinu, zatiaľ čo jadro vyššej C-hodnoty 6C, 12C stráca Rabl organizáciu. Centroméry aj teloméry sa postupne posúvajú do stredu jadra. V jadre 24C je Rabl organizácia narušená, centroméry a teloméry sú v jadre usporiadané náhodne.

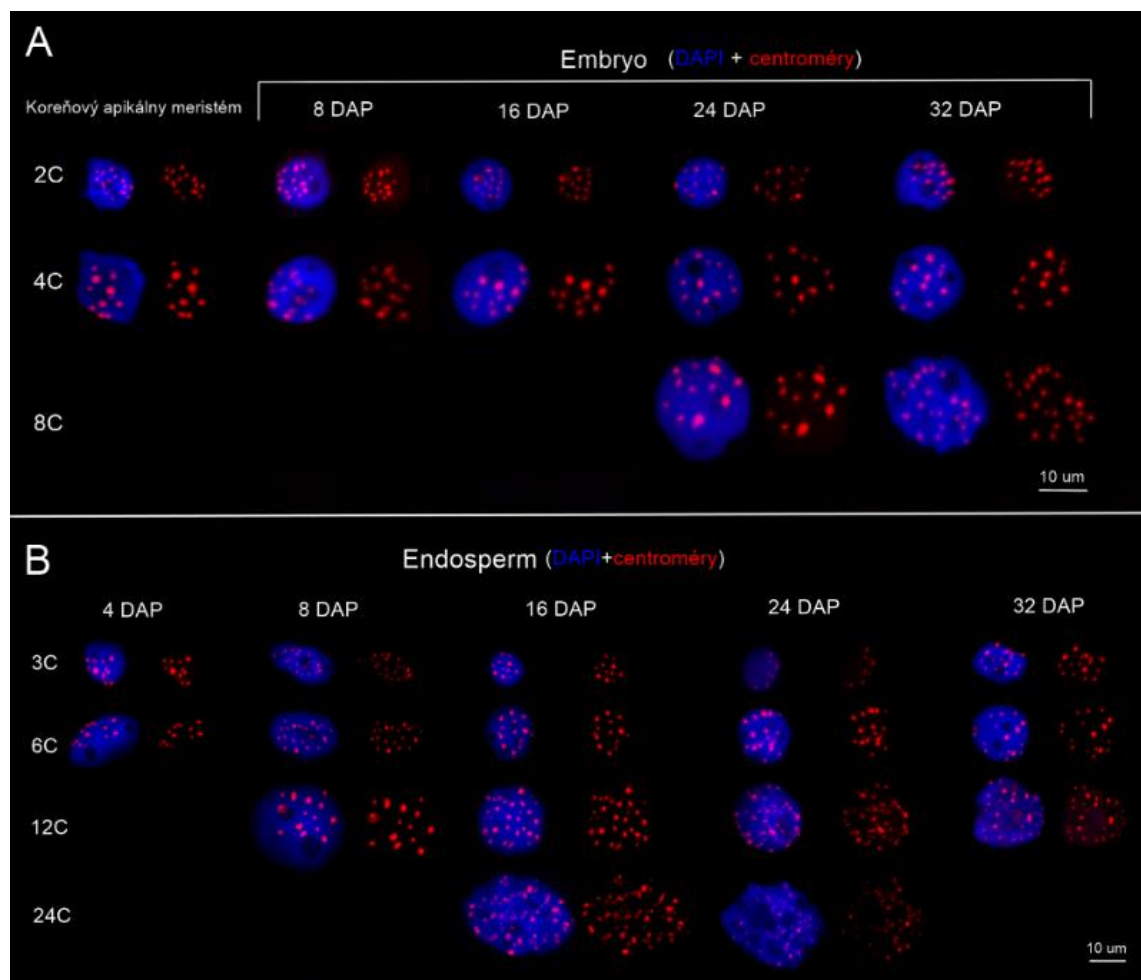


Obrázok 16: Analýza Rabl chromatinovej organizácie v jadrách KAM a endospermu pomocou fluorescenčnej *in situ* hybridizácie (FISH) s centromérickými (*Cereba*, červená) a telomérickými (ružová) repetitívnymi sekvenciami.

Reprezentatívne jadrá 8 DAP a 24 DAP mali rôzne C-hodnoty. KAM slúžil ako kontrola somatického pletiva. Jadrá boli farbené DAPI. Fotografie jadriér boli následne upravené v programe Imaris 9.2 pomocou funkcie „Surface“ a „Spot Detection“, z ktorých sme získali interpretáciu povrchu jadra s centromérickými a telomérickými *foci*.

5.3 Analýza kompaktnosti chromatinu

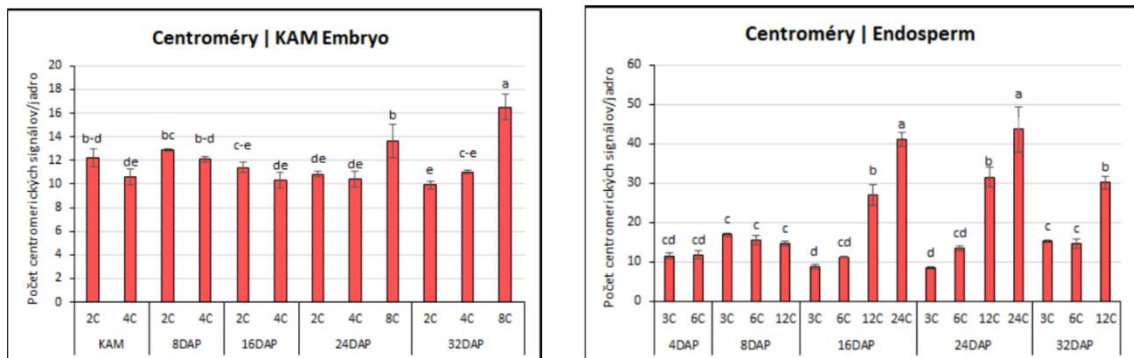
Jadrá boli značené centromérickou sondou pomocou FISH a farbené DAPI. Izolované boli jadrá KAM s C-hodnotami 2C a 4C. Na analýzu kompaktnosti chromatinu embrya boli izolované semená jačmeňa staré: 8, 16, 24 a 32 DAP. Analyzované boli jadrá s C-hodnotou 2C a 4C pre všetky časové body. Pre jadrá 24 DAP a 32 DAP bola analyzovaná C-hodnota 8C. Na analýzu kompaktnosti chromatinu v jadrách endospermu boli izolované semená staré: 4, 8, 16, 24 a 32 DAP. Analyzované boli jadrá s C-hodnotou 3C a 6C pre všetky časové body. Semeno 4 DAP neobsahovalo endoreduplikované jadrá. Jadrá endospermu 12C sa objavili vo vzorkách 8 DAP až 32 DAP, zatiaľ čo jadrá 24C sa objavili vo vzorkách 16 DAP a 24 DAP. Analyzovaných bolo 20 jadriec pre jednotlivé časové body a C-hodnoty.



Obrázok 17: Analýza kompaktnosti chromatinu v jadrách (A) KAM, embrya a (B) endospermu s rôznymi C-hodnotami.

KAM slúžil ako kontrola somatickeho pletiva. Lokalizácia centroméry (červená) bola značená pomocou FISH a jadrá boli farbené DAPI.

Pre analýzu kompaktnosti chromatinu bol spočítaný počet centromerických *foci* (Obr.18). Jačmeň má počet chromozómov $2n=14$, čo znamená, že v diploidných pletivách sa očakáva 14 a v triploidných pletivách 21 centromerických *foci*. Ak je počet *foci* väčší, tak chromatin je v danom jadre menej kompaktný. Hodnoty centromerických *foci* sa v jadrách 2C a 4C KAM aj embrya pohybujú od 10 do 13. Počet *foci* sa zvyšuje pre endoreduplikované 8C jadrá embrya, kde je počet *foci* 14 pre 24 DAP a 17 pre 32 DAP.



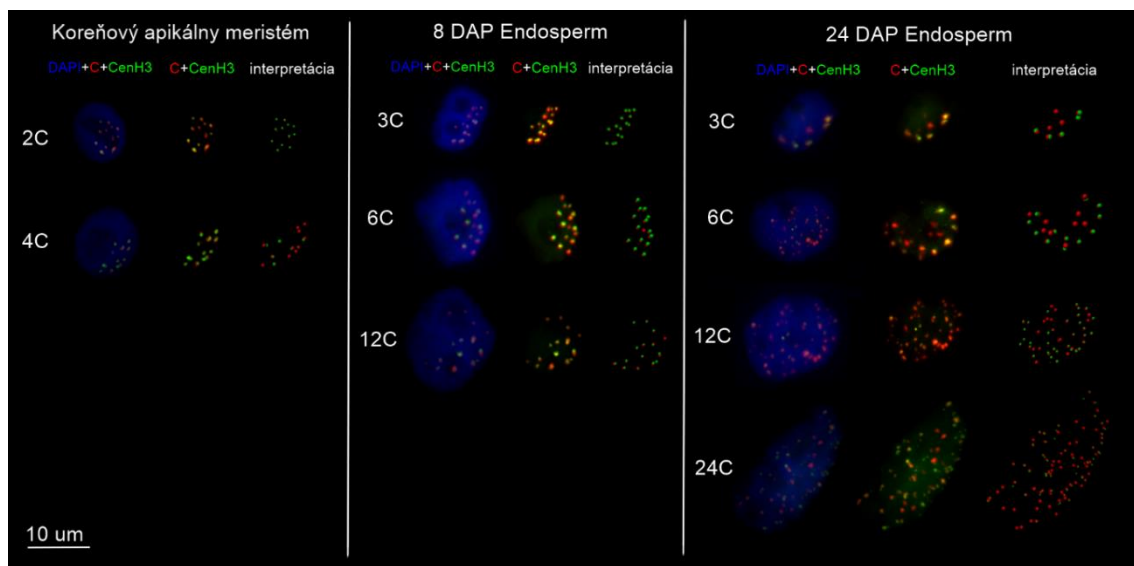
Obrázok 18: Kvantifikácia centromerických *foci* v jadrách KAM, embrya a endospermu s rôznymi C-hodnotami.

KAM slúžil ako kontrola somatickeho pletiva. Hodnoty sú priemerom (\pm SD) z troch biologických opakovaní, v každom bolo analyzovaných najmenej 20 jadier. ANOVA bola vykonaná pre všetky pletivá jednotlivých C-hodnôt v grafe. Podľa Tukey testu ($p \leq 0.05$) sa hodnoty označené rovnakým písmenom nelišia.

Hodnoty centromerických *foci* sa v jadrách endospermu 3C pohybovali od 8 pre 24 DAP do 17 pre 8 DAP. V jadrách endospermu 6C sa hodnoty pohybovali od 11 pre 16 DAP do 15 pre 8 a 32 DAP. V endoreduplikovaných jadrách 12C sa počet *foci* pohyboval od 15 pre 8 DAP do 32 pre 24 DAP. V endoreduplikovaných jadrách 24C bol počet *foci* 41 pre 16 DAP a 44 pre 24 DAP. Kompaktnosť chromatinu významne klesá s vekom semien a so zvyšujúcou sa C-hodnotou.

5.4 Analýza CenH3 histónovej varianty

CenH3 histónová varianta bola značená pomocou nepriameho imunoznačenia primárnymi a sekundárnymi protilátkami. Zároveň boli značené centromerické repetitívne sekvencie pomocou FISH. Následne boli pre lepšiu vizualizáciu dát fotky upravené v Imaris 9.2. Získané boli 3D fotky jadier, 3D imunoznačené signály a FISH signály. Analyzovaných bolo 5–10 jadier pre dané časové body a C-hodnoty.



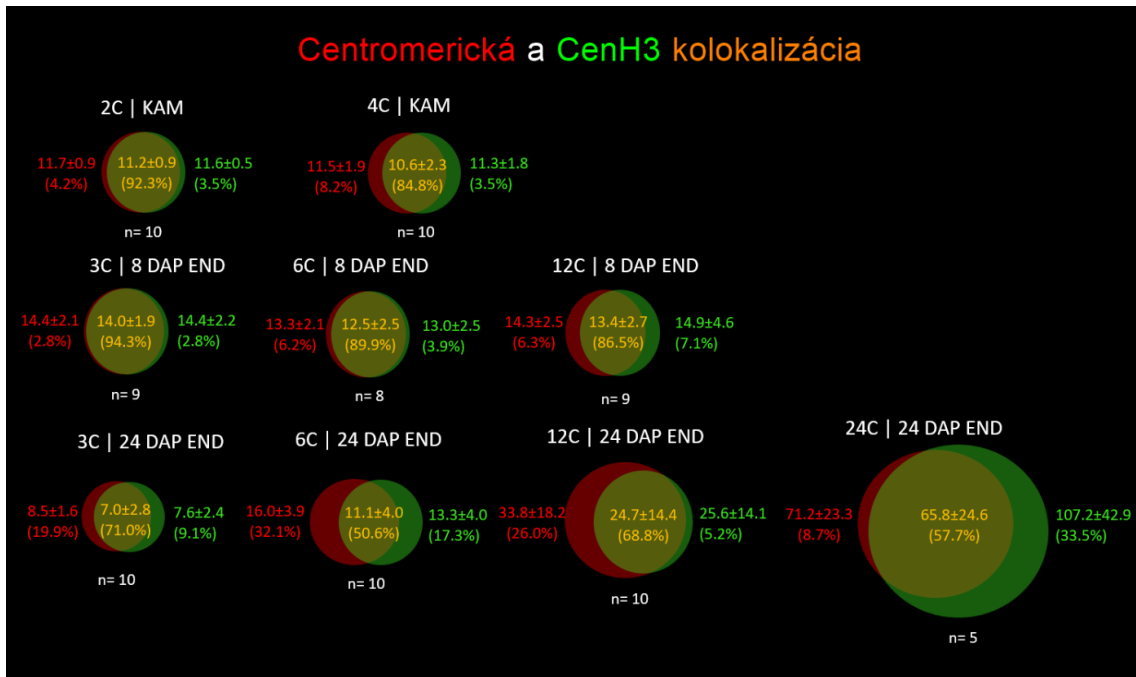
Obrázok 19: Analýza kolokalizácie CenH3 histónovej varianty s centromérmi v jadrách KAM a endospermu s rôznymi C-hodnotami.

KAM slúžil ako kontrola somatického pletiva. Lokalizácia centroméry (C, červená) bola značená pomocou FISH, CenH3 varianta (zelená) bola značená pomocou imunoznačenia, jadrá boli farbené DAPI (modrá). Fotografie jadier boli následne upravené v programe Imaris 9.2 pomocou funkcie „Spot Detection“, z ktorej sme získali interpretáciu centromerických *foci* a CenH3 *foci*.

Izolované boli jadrá KAM s C-hodnotami 2C a 4C. Na analýzu histónovej varianty v jadrách endospermu boli izolované semená staré 8 a 24 DAP. Analyzované boli jadrá s C-hodnotou 3C, 6C a 12C pre obidva časové body. Jadrá 24C sa objavili v jadrách 24 DAP.

Analýza spočívala v pozorovaní prekrytia centromerických FISH a CenH3 imunoznačených *foci*. Ak boli *foci* prekryté, išlo o kolokalizáciu. Miera kolokalizácie jadier KAM bola pre 2C 92% a pre 4C 85%. Miera kolokalizácie 3C jadier endospermu bola 94% pre 8 DAP a 71% pre 24 DAP. Miera kolokalizácie 6C jadier endospermu bola 90% pre 8 DAP a 51% pre 24 DAP. Miera kolokalizácie 12C jadier endospermu bola 87% pre 8 DAP a 69% pre 24 DAP. Miera kolokalizácie 24C jadra endospermu bola 58% pre 24 DAP (Obr.20).

Miera kolokalizácie sa v jadre 8 DAP pri zvyšujúcej sa C-hodnote znižuje. Jadrá 24 DAP endospermu majú v porovnaní s 8 DAP nižšiu mieru kolokalizácie vo všetkých C-hodnotách.



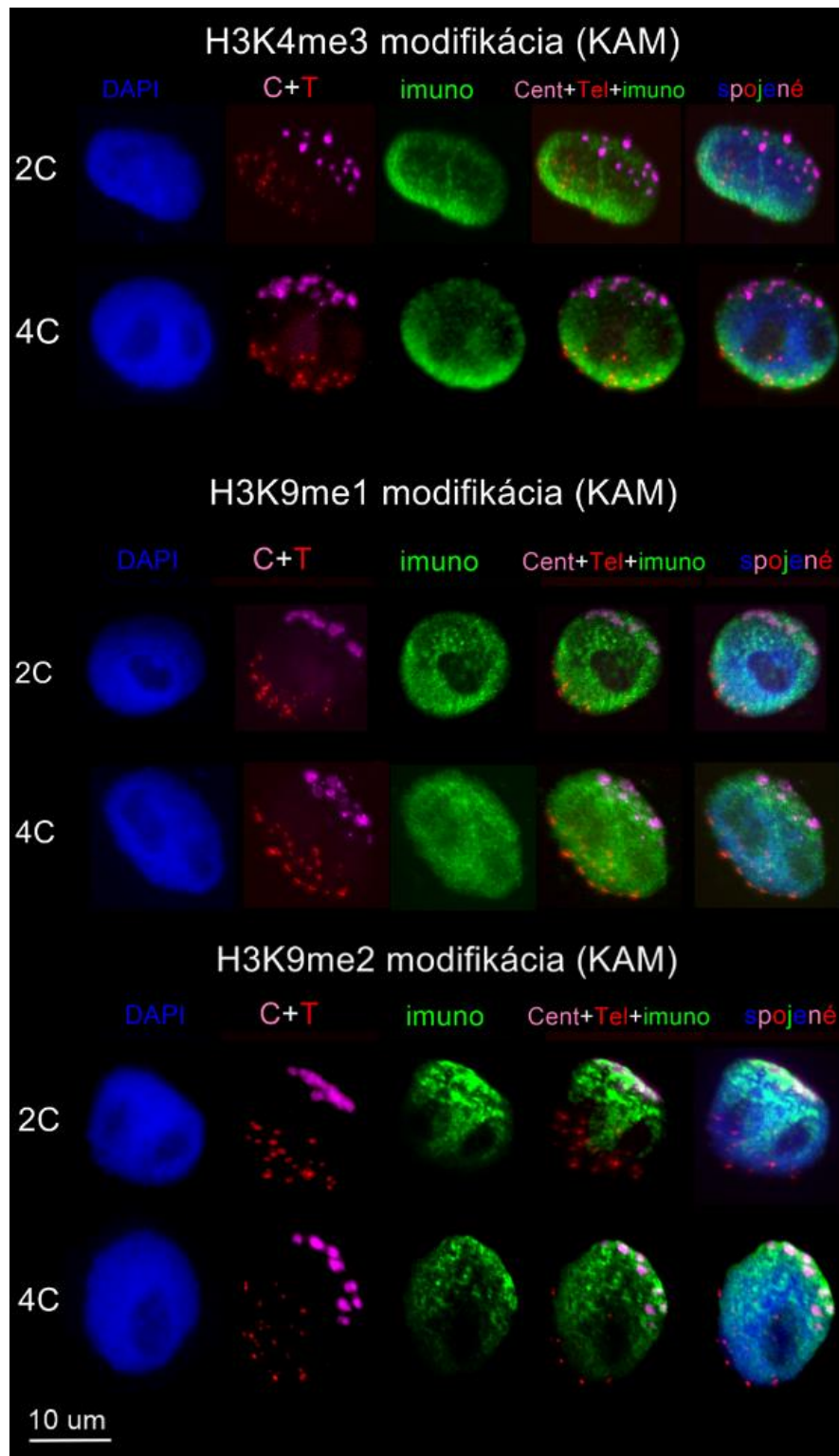
Obrázok 20: Kvantifikácia kolokalizácie centromerických *foci* a CenH3 *foci* v KAM a v endosperme s rôznymi C-hodnotami.

KAM slúžil ako kontrola somatického pletiva. Jednotlivé hodnoty sú priemerom (\pm SD) počtu *foci* v analyzovaných jadrách. Číslo „n“ hovorí o počte analyzovaných jadier vo vzorke. Počet kolokalizovaných *foci* a jednotlivých *foci* bez kolokalizácie bol vyjadrený percentuálne.

5.5 Histónové modifikácie

V jadrách boli histónové modifikácie značené pomocou nepriameho imunoznačenia primárnymi a sekundárnymi protilátkami. Zároveň boli značené centromerické a telomerické repetitívne sekvencie pomocou FISH. Na analýzu jednotlivých histónových modifikácií boli izolované jadrá KAM a jadrá endospermu jačmeňa staré 8 DAP a 24 DAP. Izolované boli jadrá KAM s C-hodnotami 2C a 4C. Jadrá endospermu boli izolované s C-hodnotami 3C, 6C a 12C pre obidva časové body. Jadrá 24C sa objavili vo vzorke 24 DAP.

Na účely bakalárskej práce boli analyzované modifikácie H3K4me3, H3K9me1 a H3K9me2 v endosperme. KAM slúžil ako kontrola somatického pletiva. Modifikácia H3K4me3 sa vyskytuje v telomerickej oblasti jadra, modifikácia H3K9me1 sa vyskytuje v celej oblasti jadra a modifikácia H3K9me2 sa vyskytuje hlavne v centromerickej oblasti (Obr.21). Pre všetky modifikácie bolo analyzovaných 5–10 jadier pre všetky dané časové body a C-hodnoty.

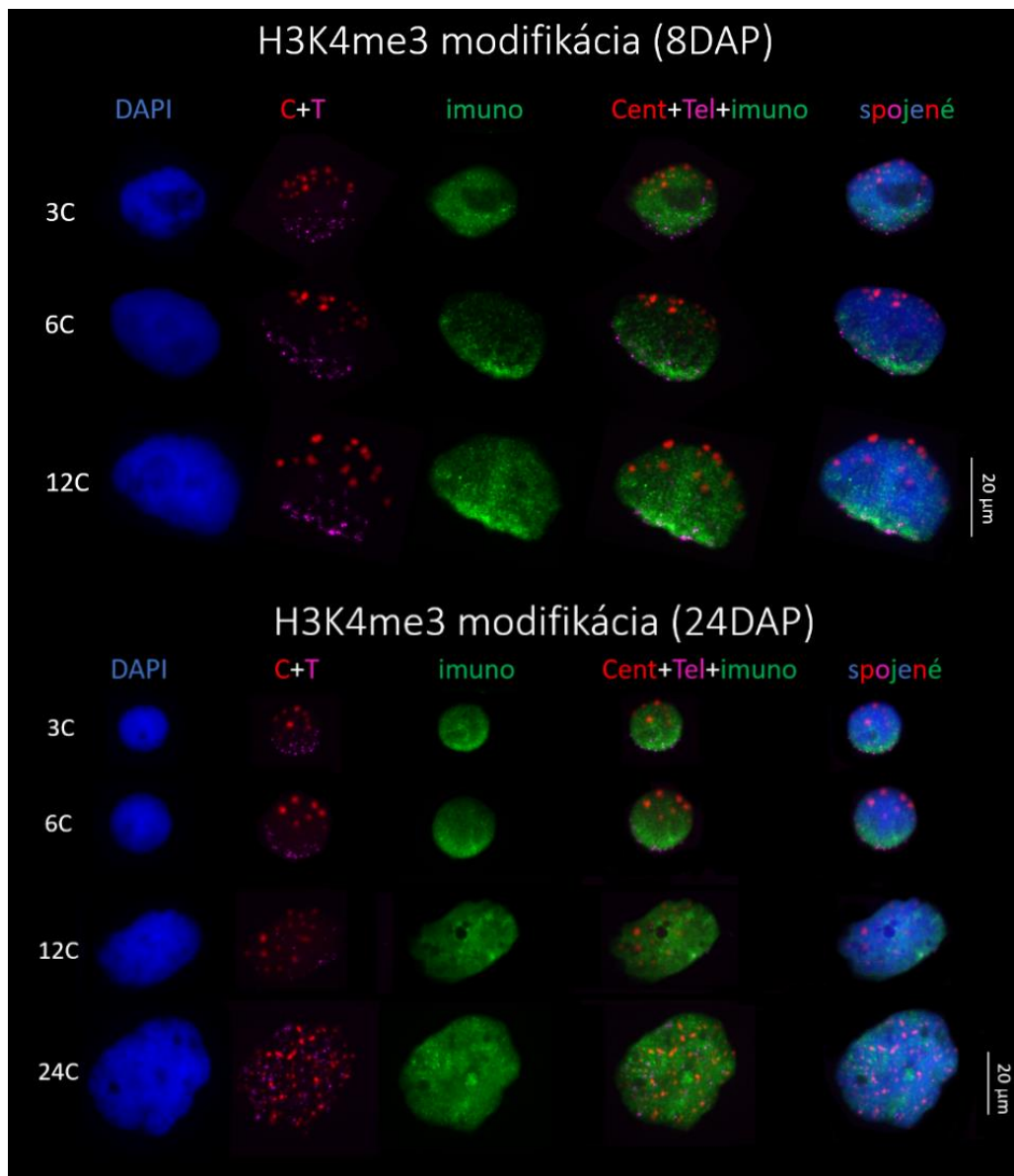


Obrázok 21: Analýza modifikácií H3K4me3, H3K9me1, H3K9me2 v jadre KAM, ktorý slúžil ako kontrola somatického pletiva.

Sekvence centromér (C, Cent; ružová) a telomér (T, Tel; červená) boli značené pomocou FISH, histónové modifikácie (zelená) boli značené pomocou imuno značenia, jadrá boli farbené DAPI (modrá).

5.5.1 Histónová modifikácia H3K4me3

Histónová modifikácia H3K4me3 sa v jadrách KAM viaže do telomérických oblastí. V endosperme 8 DAP sa daná modifikácia vyskytuje v telomérickej oblasti a to v C-hodnotách 6C a 12C. V staršom jadre 24 DAP sa modifikácia viaže do telomérických oblastí v jadre 3C a 6C. V porovnaní s 8 DAP jadrami je ale kolokalizácia s telomérmi menej výrazná, signál sa dostáva do stredu jadra. Jadrá 8 DAP endospermu 3C a 24 DAP endospermu 12C a 24C strácajú kolokalizáciu a signál je rozptýlený do celého jadra. Jadrá endospermu strácajú H3K4me3 organizáciu typickú pre KAM. Okrem toho boli imunologické signály v pletive endospermu slabšie v porovnaní s KAM.

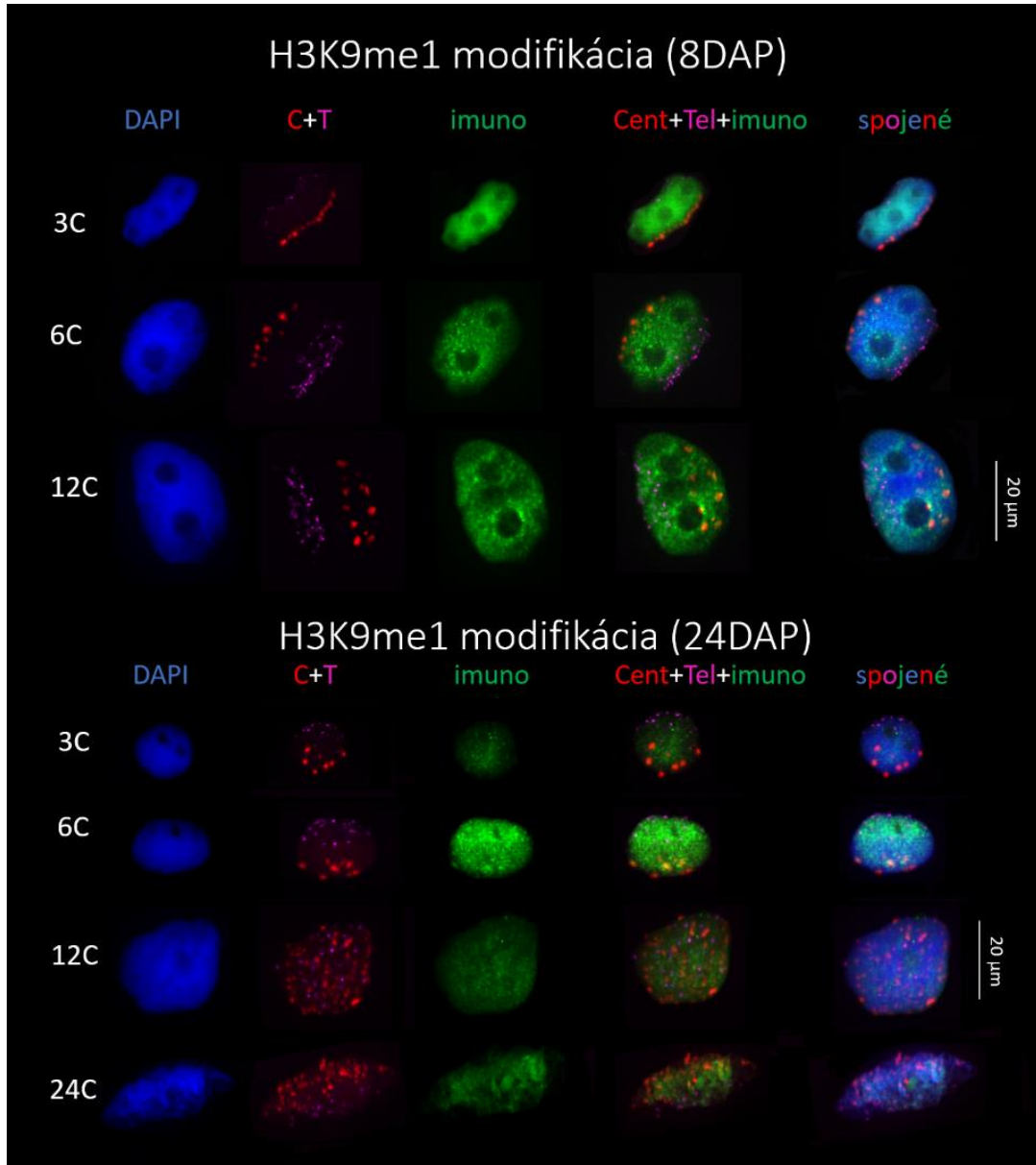


Obrázok 22: Analýza modifikácie H3K4me3 v jadre endospermu 8 DAP a 24 DAP s rôznymi C-hodnotami.

Sekvence centromér (C, Cent; červená) a telomér (T, Tel; ružová) boli značené pomocou FISH, histónové modifikácie (zelená) boli značené pomocou imunoznačenia, jadrá boli farbené DAPI (modrá).

5.5.2 Histónová modifikácia H3K9me1

Modifikácia H3K9me1 sa v jadrách KAM viaže do oblastí heterochromatínu po celom jadre. Jadrá 8 DAP aj 24 DAP všetkých C-hodnôt vykazovali rozptýlené signály po celom jadre okrem oblastí jadierka. Jadrá 24 DAP 3C, 12C a 24C vykazovali slabší signál.



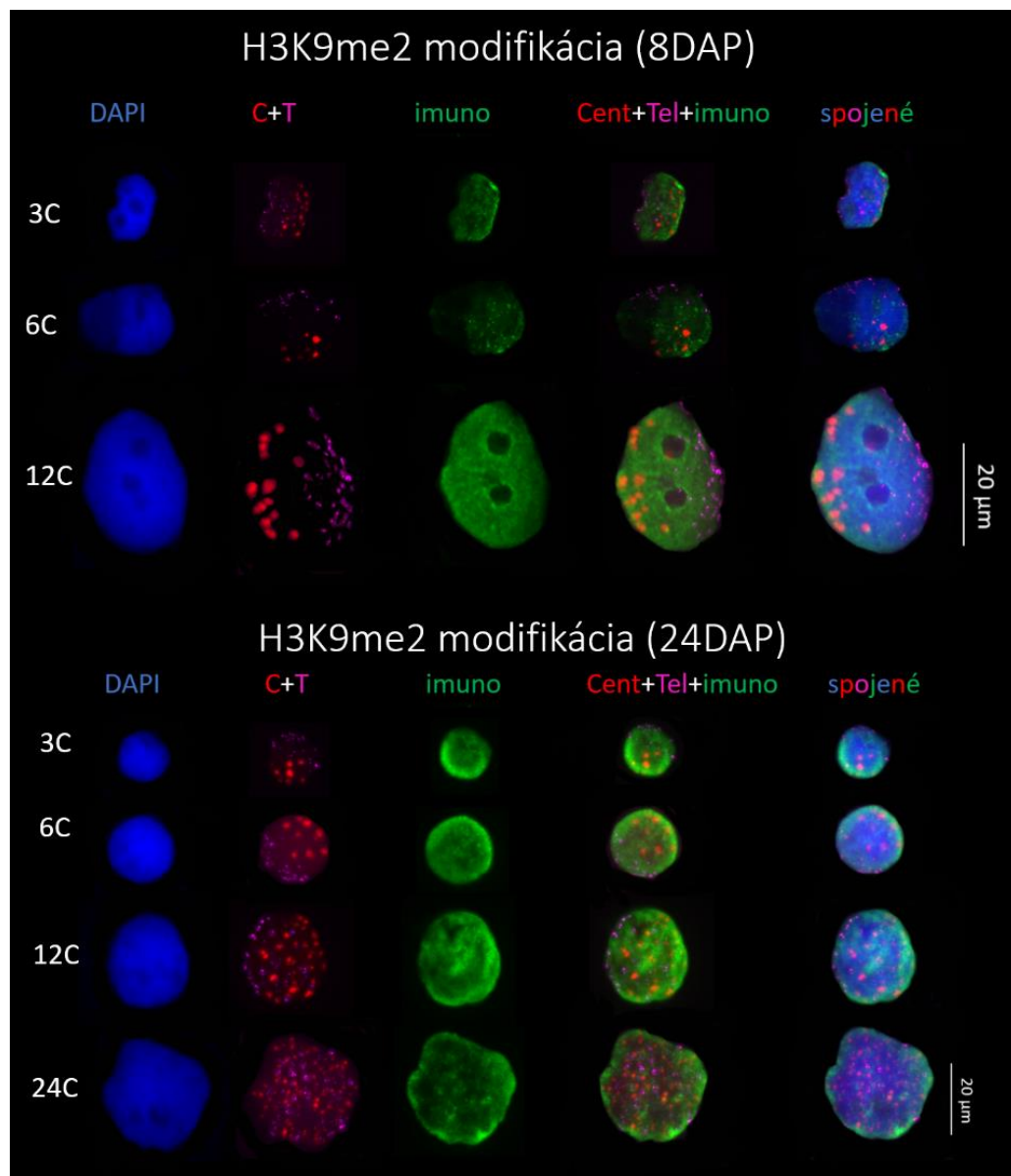
Obrázok 23: Analýza modifikácie H3K9me1 v jadre endospermu 8 DAP a 24 DAP s rôznymi C-hodnotami.

Sekvence centromér (C, Cent; červená) a telomér (T, Tel; ružová) boli značené pomocou FISH, histónové modifikácie (zelená) boli značené pomocou imunoznačenia, jadrá boli farbené DAPI (modrá).

5.5.3 Histónová modifikácia H3K9me2

Histónová modifikácia H3K9me2 sa v jadrách KAM viaže do centromerických oblastí (heterochromatín). V jadre 8 DAP všetkých C-hodnôt je signál rozptýlený v celom jadre, ale mierne nahromadenie signálu sa nachádza v centromerických oblastiach.

V starších jadrách 24 DAP v 3C a 6C sa modifikácia viaže do centromerických oblastí, hromadí sa pri jadrovom obale. Vyššia hodnota C je sprevádzaná narušením Rabl organizácie chromatinu a kvôli tomu je ťažké určiť kolokalizáciu. Napriek tomu sa dá určiť, že modifikácia sa viaže prevažne v blízkosti jadrového obalu.



Obrázok 24: Analýza modifikácie H3K9me2 v jadre endospermu 8 DAP a 24 DAP s rôznymi C-hodnotami.

Sekvence centromér (C, Cent; červená) a telomér (T, Tel; ružová) boli značené pomocou FISH, histónové modifikácie (zelená) boli značené pomocou imuno značenia, jadrá boli farbené DAPI (modrá).

5.5.4 Analýza dodatočných histónových modifikácií

V rámci bakalárskej práce boli taktiež analyzované histónové modifikácie H3K27me1, H3K27me2, H3K27me3, H3K36me3 a aktívna forma RNA polymerázy II. Pretože výsledky sú nejasné a neposkytujú jasný a opakovateľný imuno-vzor, v tejto práci nie sú uvedené.

6 DISKUSIA

6.1 Všeobecná charakteristika jadra

Podľa dosiahnutých výsledkov v bakalárskej práci môžeme vyvodit', že so zvyšujúcou sa C-hodnotou sa zvyšuje veľkosť jadra, čo je spôsobené endoreduplikáciou. Proces endoreduplikácie ešte nie je dostatočne preskúmaný a jeho význam je doposiaľ neznámy. Hypotézy hovoria, že endoreduplikácia pomáha rastline pri raste pletiva počas nepriaznivých environmentálnych podmienok, ako je napríklad deficit vody (Cookson *et al.*, 2006; Scholes *et al.*, 2015). Najviac viditeľná rola endoreduplikácie počas vývoja rastliny je determinácia veľkosti bunky. Podľa teórie „karyoplazmatického pomeru“ endocykly ovplyvňujú konečnú veľkosť bunky, ktorá má sklon upravovať svoj cytoplazmatický objem vzhľadom na obsah jadrovej DNA (Bourdon *et al.*, 2012). Pozorovaný bol vzťah medzi endoreduplikovanými jadrami a veľkosťou týchto jadier, kde s narastajúcou C-hodnotou stúpa aj veľkosť jadra (Barow, 2006). Daný vzťah bol pozorovaný v endoreduplikovaných bunkách v rôznych organizmoch živočíšnej a rastlinnej ríše.

Výskum Bourdon *et al.* (2012) sa zaoberal štruktúrnou analýzou endoreduplikovaných jadier perikarpu rajčiaka na úrovni chromatinovej organizácie. Analyzované boli 3 rôzne pletivá s rôznou C-hodnotou: vonkajšia epiderma vykazujúca 2C a 4C, vnútorná epiderma s 8C až 32C a mezokarp s C-hodnotou 32 až 128C. Veľkosť jadra sa so zvyšujúcou sa C-hodnotou výrazne zvyšovala. Analyzovaná bola taktiež kruhovitosť jadier, kde v mezokarpe s najvyššou C-hodnotou boli jadrá s najnižšou mierou kruhovitosti a vo vonkajšej epiderme s najnižšou C-hodnotou sa nachádzali jadrá s najvyššou kruhovitosťou. Porovnaním daných výsledkov s výsledkami bakalárskej práce vieme povedať, že veľkosť jadier sa v endoreduplikovaných bunkách výrazne zvyšuje a kruhovitosť jadier sa narúša. Endoreduplikácia môže pôsobiť ako spúšť pre rast orgánov v rastlinách (Robinson *et al.*, 2018).

6.2 Organizácia chromatínu

Rabl organizácia chromatínu sa vyskytuje najmä v rastlinách s veľkým genómom (Wegel a Shaw, 2005). V niektorých druhoch, ako je napríklad pšenica alebo jačmeň, sa Rabl konfigurácia vyskytuje vo všetkých bunkách v rastline. V iných druhoch, ako je napríklad ryža, bola Rabl organizácia pozorovaná iba v niektorých pletivách (koreňový xylém, prašníky) (Tiang *et al.*, 2012). V druhoch ako je napríklad kukurica, sa aj napriek veľkému genómu Rabl organizácia nevyskytuje vôbec (Bauer a Birchler, 2006; Němečková *et al.*, 2020).

Rabl organizácia chromatinu bola študovaná v jadrách embrya a endospermu pšenice (*Triticum aestivum*) s rôznymi C-hodnotami (3C,6C,12C) (Wegel a Shaw, 2005). Jadrá endospermu aj embrya všetkých C-hodnôt vykazovali Rabl organizáciu chromatinu, s centromérmi na jednom póle jadra a s telomérmi na opačnom póle. Porovnaním s výsledkami v bakalárskej práci môžeme povedať, že prvý cyklus endoreduplikácie (jadrá s hodnotou 12C) mladých semien (7 DAP pšenica, 8 DAP jačmeň) vykazoval Rabl organizáciu chromatinu. V jačmeni sa ale prvý a druhý cyklus endoreduplikácie (12C a 24C) staršieho semena 24 DAP spájal s rozbitím danej organizácie chromatinu. Môže to byť spôsobené programovanou bunkovou smrťou, kedy je znížená stabilita jadrového genómu a znížená životnosť buniek (Nowicka *et al.*, 2021). Druhé vysvetlenie môže byť, že konfigurácia chromatinu Rabl sa vyskytuje len v typicky mitoticky sa deliacich bunkách, na potvrdenie tejto teórie sú však potrebné pokročilejšie štúdie.

6.3 Kompaktnosť chromatinu

Jednou z možností pozorovania kompaktnosti chromatinu je kvantifikácia centromér (Wegel a Shaw, 2005). Jačmeň obsahuje sedem párov homológnych chromozómov ($2n = 14$) (Kapusí *et al.*, 2011). Teoreticky by malo byť v diploidných tkanivách viditeľných 14 centromérických signálov a v triploidnom endosperme 21 signálov. V bakalárskej práci bolo pozorovaných 10-13 centromérických signálov v jadrách 2C a 4C KAM a embrya, čo je menej ako očakávaných 14. To znamená, že niektoré centroméry chromozómov boli spojené.

V jadrách endospermu pšenice dochádza k disociácii centromér po S-fázi bunkového cyklu, kde bolo pozorované zdvojnásobenie počtu centromér v 6C jadrách oproti jadrám 3C (Wegel a Shaw, 2005). V jadrách endospermu jačmeňa ale nebola pozorovaná disociácia centromér. V jadrách 3C a 6C endospermu a v jadrách diploidných pletív 2C a 4C bol počet centromérických signálov rovnaký, čo poukazuje na asociáciu centromér (Martinez-Perez *et al.*, 2000). V mladých semenách jačmeňa (8 DAP) sa v jadrách 12C vyskytoval rovnaký počet centromér ako v 3C a 6C jadrách. V staršom semene (24 DAP) mali endoreduplikované jadrá 12C a 24C disociované centroméry – pozorovaných bolo viac ako očakávaných 21 signálov.

V endosperme semien kukurice k disociácii centromér v endoreduplikovanom jadre nedochádza (Bauer a Birchler, 2006). Tieto bunky síce nevykazujú Rabl organizáciu, ale podobne ako v jačmeni podliehajú v neskorších fázach vývoja semena endoreduplikácii. Počas endoreduplikácie sa replikuje celý chromozóm a nový zreplikovaný chromozóm zostáva asociovaný s pôvodným chromozómom po celej dĺžke. Centromérické regióny zostávajú zlúčené a tým poskytujú vzhľad nereplikovaných úsekov. Hypotéza pre danú štruktúru

endoreduplikovaných chromozómov v kukurici môže byť prítomnosť proteínov, ktoré sa viažu s vyššou koncentráciou na centromerických oblastiach (Bauer a Birchler, 2006). Z toho môžeme vyvodit' hypotézu, že centromerické proteíny môžu zanikať v starších endoreduplikovaných jadrách endospermu jačmeňa a kompaktnosť chromatinu tým znižovať.

Kompaktnosť chromatinu v endoreduplikovaných jadrách endospermu pšenice bola analyzovaná použitím génu kódujúceho glutenín (Wegel *et al.*, 2005). FISH signály boli rozptýlené, čo znamená, že chromatin v jadrách bol dekonzenzovaný. Ďalšia hypotéza predpokladá, že disperzia chromatinu koreluje so stratou stability genómu (Schubert *et al.*, 2006).

6.4 CenH3 histónová varianta

Histón CenH3 špecifický pre centromerické oblasti v genóme formuje kinetochór, potrebný na správnu segregáciu chromozómov počas bunkového cyklu. Daná funkcia CenH3 bola esenciálna v rôznych testovaných organizmoch (kvasinky, stavovci, rastliny) a odstránenie CenH3 histónu viedlo k neschopnosti formovania ostatných kinetochórových častí (Nagaki *et al.*, 2004). V endoreduplikovaných jadrách nedochádza k segregácii chromozómov a preto nie je potrebné, aby sa tvorili kinetochóry.

V bakalárskej práci bola analyzovaná kolokalizácia CenH3 varianty s centromérami v jadre. V endoreduplikovaných jadrách sa miera kolokalizácie výrazne znižuje. To znamená, že CenH3 proteíny sú odstraňované z nukleozómov a tým zaniká ich funkcia.

Analyzované boli úrovně výskytu CenH3 varianty v koreňových špičkách kukurice, kde boli porovnávané jadrá C-hodnôt 2C a 8C. Zistilo sa, že len časť kanonických histónov nukleozómov bola nahradená variantou CenH3 v endoreduplikovanom jadre (Wear *et al.*, 2020).

Redukcia CenH3 histónovej varianty v 8C jadre (Wear *et al.*, 2020) a rozptyl CenH3 varianty potvrdzuje hypotézu, že centroméry sa inaktivujú, keď ich funkcia nie je naďalej potrebná.

6.5 Histónové modifikácie

Histónové modifikácie môžu epigeneticky ovplyvňovať expresiu génov dvoma spôsobmi: buď expresiu podporujú (permisívne), alebo expresiu génov zastavujú (represívne). Metylovaná H3K4 je považovaná za permisívnu, transkripčne aktívnu modifikáciu. Metylovaná H3K9 sa naopak označuje za represívnu modifikáciu (Fuchs *et al.*, 2006).

V jadrách jačmeňa boli H3K4 modifikácie pozorované v kódujúcich sekvenciách génov, ktoré sa vyskytujú v euchromatíne na telomerickom póle. H3K9 modifikácie boli pozorované na heterochromatíne po celom jadre (Fuchs *et al.*, 2006).

Výsledky v bakalárskej práci ukazujú, že H3K4 trimetylácia sa v mladšom jadre endospermu jačmeňa nachádzala na euchromatíne v telomerických častiach genómu. V staršom endoreduplikovanom jadre bola pozorovaná náhodná lokalizácia v celom jadre. Môže to byť spôsobené tým, že so znižujúcou sa životnosťou bunky nie je potrebná vysoká miera transkripcie, pretože semeno postupne prechádza do stavu dormancie. Tým pádom sa modifikácie neviažu do transkripčne aktívnych miest na euchromatickom póle. Môže to byť taktiež spájané s programovanou smrťou buniek (Latrasse *et al.*, 2016)

V jadrách endospermu jačmeňa bola H3K9 mono- a dimetylácia pozorovaná v celom jadre, v náhodnom usporiadaní. Signály boli slabšie v porovnaní s KAM, čo je v súlade s výsledkami pre endosperm v *Arabidopsis* (Baroux *et al.*, 2007).

7 ZÁVER

V rámci výskumu pod vedením Mgr. Anny Nowickej, Ph.D. na Ústave experimentálnej botaniky AV ČR, som si osvojila metódy štúdia rastlinného chromatinu a naučila som sa samostatnej práci v laboratóriu. Využila som biologické metódy prípravy rastlinnej vzorky, molekulové metódy (PCR amplifikáciu, nick transláciu, elektroforézu) a taktiež cytomolekulové metódy – fluorescenčné značenie chromatinových úsekov a imuno značenie histónových variant a modifikácií pomocou primárnych a sekundárnych protilátok. Medzi najvýznamnejšie metódy, ktoré som si osvojila je mikroskopovanie pomocou fluorescenčného mikroskopu s konfokálnym modulom a taktiež analýza mikroskopických fotiek.

Cieľom bakalárskej práce bolo prispieť všeobecnou charakteristikou jadra embrya a endospermu semien jačmeňa. Hodnotila som veľkosť jadra počas vývoja rastu semien jačmeňa, ako aj tvar jadier vyjadrený pomocou kruhovitosti. Veľkosť jadier sa v endoreduplikovaných bunkách výrazne zvyšovala a tieto jadrá strácali svoj kruhovitý tvar.

Ďalšou časťou bola analýza chromatinu v jadrách jačmeňa. Analyzovala som Rabl organizáciu chromatinu, ktorá sa nachádzala v jadrách endospermu vo vývojovo mladších semenách. Taktiež som študovala kompaktnosť chromatinu, ktorá sa strácala v jadrách endospermu v závislosti od veku a C-hodnoty. Analyzovala som aj štruktúru centromér pomocou histónovej varianty CenH3, ktorá sa nachádzala v centromerických oblastiach v chromatine vývojovo mladších semien. V starších semenách som pozorovala rozptýl CenH3 varianty po celom jadre.

Druhou časťou bakalárskej práce bola analýza histónových modifikácií. V rámci práce som značila 8 rôznych modifikácií, na analýzu do bakalárskej práce som si vybrala 3 modifikácie s najviac jasnými a reprodukovateľnými výsledkami. V porovnaní s pozorovaniami v KAM dané modifikácie v endosperme strácali vzor kolokalizácie s euchromatínom / heterochromatínom. Taktiež vykazovali slabšiu intenzitu signálov. Experimenty s histónovými modifikáciami budú slúžiť k ďalšiemu výskumu.

Výsledky tejto práce poskytujú základy pre ďalšie štúdium chromatinu v jadrách semena pomocou rôznych molekulových metód. Výsledky práce budú navyše predstavené v článku: „Endoreduplication is associated with reorganization and chromatin changes in barley endosperm nuclei” (dočasný názov), v ktorom budem uvedená ako spoluautor.

8 LITERATÚRA

- Ankam S., Teo B. K. K., Pohan G., Ho S. W. L., Lim C. K., Yim E. K. F. (2018): Temporal changes in nucleus morphology, lamin A/C and histone methylation during nanotopography-induced neuronal differentiation of stem cells. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 6.
- Bareke T. (2018): Biology of seed development and germination physiology. *Advances in Plants & Agriculture Research* 8(4): 336–346.
- Baroux C., Pecinka A., Fuchs J., Schubert I., Grossniklaus U. (2007): The triploid endosperm genome of *Arabidopsis* adopts a peculiar, parental-dosage-dependent chromatin organization. *The Plant Cell* 19(6): 1782–1794.
- Barow M. (2006): Endopolyploidy in seed plants. *BioEssays* 28(3): 271–281.
- Bauer M. J., Birchler J. A. (2006): Organization of endoreduplicated chromosomes in the endosperm of *Zea mays* L. *Chromosoma* 115(5): 383–394.
- Bentsink L., Koornneef M. (2008): Seed dormancy and germination. *The Arabidopsis Book* 6, e0119.
- Bianchi M. E., Agresti, A. (2005): HMG proteins: dynamic players in gene regulation and differentiation. *Current Opinion in Genetics & Development* 15(5): 496–506.
- Bourdon M., Pirrello J., Cheniclet C., Coriton O., Bourge M., Brown S., Moïse A., Peypelut M., Rouyère V., Renaudin J. P., Chevalier Ch., Frangne N. (2012): Evidence for karyoplasmic homeostasis during endoreduplication and a ploidy-dependent increase in gene transcription during tomato fruit growth. *Development* 139(20): 3817–3826.
- Cookson S. J., Radziejowski A., Granier C. (2006): Cell and leaf size plasticity in *Arabidopsis*: what is the role of endoreduplication? *Plant, Cell and Environment* 29(7): 1273–1283.
- Charalampopoulos D., Wang R., Pandiella S., Webb C. (2002): Application of cereals and cereal components in functional foods: a review. *International Journal of Food Microbiology* 79(1-2): 131–141.
- Dante R. A., Larkins B. A., Sabelli P. A. (2014): Cell cycle control and seed development. *Frontiers in plant science* 5: 493.
- Farrell R. E. (2010): Nucleic acid probe technology. *RNA Methodologies*: 261–282.
- Fuchs J., Demidov D., Houben A., Schubert I. (2006). Chromosomal histone modification patterns – from conservation to diversity. *Trends in Plant Science* 11(4): 199–208.
- Hudakova S., Michalek W., Presting G. G., Hoopen R., Santos K., Jasencakova Z., Schubert I. (2001): Sequence organization of barley centromeres. *Nucleic Acids Research* 29(24): 5029–5035.
- Joubès J., Chevalier C. (2000): Endoreduplication in higher plants. *Plant Molecular Biology* 43(5/6): 735–745.
- Kapusi E., Ma L., Teo C. H., Hensel G., Himmelbach A., Schubert I., Mette M. F., Kumlehn J., Houben A. (2011): Telomere-mediated truncation of barley chromosomes. *Chromosoma* 121(2): 181–190.
- Kovacik M., Nowicka A., Pecinka A. (2020): Isolation of high purity tissues from developing barley seeds. *J. Vis. Exp.* (164), e61681.
- Larkins B. A., Dilkes B. P., Dante R. A., Coelho C. M., Woo Y., Liu Y. (2001): Investigating the hows and whys of DNA endoreduplication. *Journal of Experimental Botany* 52(355): 183–192.

- Latrasse D., Benhamed M., Bergounioux C., Raynaud C., Delarue M. (2016): Plant programmed cell death from a chromatin point of view. *Journal of Experimental Botany* 67(20): 5887–5900.
- Lee H. O., Davidson J. M., Duronio R. J. (2009): Endoreplication: polyploidy with purpose. *Genes & Development* 23(21): 2461–2477.
- Martinez-Perez E., Shaw P. J., Moore G. (2000): Polyploidy induces centromere association. *The Journal of Cell Biology* 148(2): 233–238.
- McKinley K. L., Cheeseman I. M. (2015): The molecular basis for centromere identity and function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 17(1): 16–29.
- Morales V., Richard-Foy H. (2000): Role of histone N-terminal tails and their acetylation in nucleosome dynamics. *Molecular and Cellular Biology* 20(19): 7230–7237.
- Nagaki K., Cheng Z., Ouyang S., Talbert P. B., Kim M., Jones K. M., Henikoff S., Buell C. R., Jiang J. (2004): Sequencing of a rice centromere uncovers active genes. *Nature Genetics* 36(2): 138–145.
- Němečková A., Koláčková V., Vrána J., Doležel J., Hříbová E. (2020): DNA replication and chromosome positioning throughout the interphase in three-dimensional space of plant nuclei. *Journal of Experimental Botany* 71(20): 6262–6272.
- Nowicka A., Kovacik M., Tokarz B., Vrána J., Zhang Y., Weigt D., Doležel J., Pecinka A. (2021): Dynamics of endoreduplication in developing barley seeds. *Journal of Experimental Botany* 72: 268–282.
- O'Connor C. (2008): Fluorescence in situ hybridization (FISH). *Nature Education* 1(1): 171.
- Olsen O. (2001): Endosperm development: cellularization and cell fate specification. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology* 52: 233–67.
- Olsen O. (2004): Nuclear endosperm development in cereals and *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell* 16: 214–227.
- Patussi S., Vasconcelos S., Balvedi Poersch L., Rafaela A., Christina A. (2013): Genomic in situ Hybridization in Triticeae: A Methodological Approach. *Plant Breeding from Laboratories to Fields*.
- Pires N. D. (2014): Seed evolution: parental conflicts in a multi-generational household. *BioMolecular Concepts* 5(1).
- Pray L. (2008): Eukaryotic genome complexity. *Nature Education* 1.
- Rabl C. (1885): *Über Zelltheilung*. *Morphol. Jahrb.* 10: 214–330.
- Radchuk V., Borisjuk L. (2014): Physical, metabolic and developmental functions of the seed coat. *Frontiers in Plant Science* 5.
- Radchuk V., Weier D., Radchuk R., Weschke W., Weber, H. (2010): Development of maternal seed tissue in barley is mediated by regulated cell expansion and cell disintegration and coordinated with endosperm growth. *Journal of Experimental Botany* 62(3): 1217–1227.
- Robinson D. O., Coate J. E., Singh A., Hong L., Bush M., Doyle J. J., Roeder A. H. K. (2018): Ploidy and size at multiple scales in the *Arabidopsis* sepal. *The Plant Cell* 30(10): 2308–2329.
- Rodríguez M. V., Barrero J. M., Corbineau F., Gubler F., Benech-Arnold R. L. (2015): Dormancy in cereals (not too much, not so little): about the mechanisms behind this trait. *Seed Science Research* 25(02): 99–119.
- Sabelli P., Larkins B. (2009): The development of endosperm in grasses. *Plant Physiology* 149: 14–26.

- Sabelli P. A. (2012): Seed development: A comparative overview on biology of morphology, physiology, and biochemistry between monocot and dicot plants. *Seed Development: OMICS Technologies Toward Improvement of Seed Quality and Crop Yield*: 3–25.
- Sarwar H. (2013): The importance of cereals (Poaceae: Gramineae) nutrition in human health: A review. *Journal of Cereals and Oilseeds* 4(3): 32–35.
- Schneider C. A., Rasband W. S., Eliceiri K. W. (2012): NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods* 9(7): 671–675.
- Scholes D. R., Paige K. N. (2015): Plasticity in ploidy: a generalized response to stress. *Trends in Plant Science* 20(3): 165–175.
- Schubert V., Klatt M., Pecinka A., Meister A., Jasencakova Z., Schubert I. (2005): Sister chromatids are often incompletely aligned in meristematic and endopolyploid interphase nuclei of *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 172(1): 467–475.
- Speicher M. R., Carter N. P. (2005): The new cytogenetics: blurring the boundaries with molecular biology. *Nature Reviews Genetics* 6(10): 782–792.
- Sreenivasulu N., Borisjuk L., Junker B. H., Mock H.-P., Rolletschek H., Seiffert U., Weschke W., Wobus U. (2010): Barley grain development. *International Review of Cell and Molecular Biology*: 49–89.
- Steiner F. A., Henikoff S. (2015): Diversity in the organization of centromeric chromatin. *Current Opinion in Genetics & Development* 31: 28–35.
- Strålfors A., Ekwall K. (2011): Heterochromatin and euchromatin-Organization, boundaries, and gene regulation. *Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine*.
- Talbert P. B., Henikoff S. (2016): Histone variants on the move: substrates for chromatin dynamics. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 18(2): 115–126.
- Tiang C.-L., He Y., Pawlowski W. P. (2011): Chromosome organization and dynamics during interphase, mitosis, and meiosis in plants. *Plant Physiology* 158(1): 26–34.
- Tottman D. R., Makepeace R. J., Broad H. (1979): An explanation of the decimal code for the growth stages of cereals, with illustrations. *Annals of Applied Biology* 93(2): 221–234.
- Waddington S. R., Cartwright P. M., Wall P. C. (1983): A quantitative scale of spike initial and pistil development in barley and wheat. *Annals of Botany* 51(1): 119–130.
- Wear E. E., Song J., Zynda G. J., Mickelson-Young L., LeBlanc C., Lee T.-J., Deppong D. O., Allen G. C., Martienssen R. A., Vaughn M. W., Hanley-Bowdoin L., Thompson W. F. (2020): Comparing DNA replication programs reveals large timing shifts at centromeres of endocycling cells in maize roots. *PLoS Genet* 16(10): e1008623.
- Wegel E., Shaw P. J. (2005): Chromosome organization in wheat endosperm and embryo. *Cytogenetic and Genome Research* 109(1-3): 175–180.
- Wegel E., Vallejos R. H., Christou P., Stöger E., Shaw P. (2005): Large-scale chromatin decondensation induced in a developmentally activated transgene locus. *Journal of Cell Science* 118(5): 1021–1031.
- Weschke W., Panitz R., Sauer N., Wang Q., Neubohn B., Weber H., Wobus U. (2000): Sucrose transport into barley seeds: molecular characterization of two transporters and implications for seed development and starch accumulation. *The Plant Journal* 21: 455–467.
- Whetstine J. R. (2010): Histone Methylation. *Handbook of Cell Signaling*: 2389–2397.

Internetové zdroje

RCSB Protein Data Bank. [online] [navštívené 18.3.2021] Dostupné z
<https://www.rcsb.org/structure/7CRP>