

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



Identifikace chromozómů v karyotypu
čiroku halepského

Diplomová práce

Bc. Magdaléna Malurová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2020

Vedoucí práce: Mgr. Miroslava Karafiátová, Ph.D.

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Akademický rok: 2018/2019

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Bc. Magdaléna MALUROVÁ
Osobní číslo: R180458
Studijní program: N1501 Biologie
Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie
Téma práce: Identifikace chromozómů v karyotypu čiroku halepského
Zadávající katedra: Katedra buněčné biologie a genetiky

Zásady pro vypracování

Izolace DNA z listů, příprava sond pomocí PCR a Nick translace, příprava nakapávaných preparátů ze suspenze protoplastů z kořenového meristému, fluorescenční *in situ* hybridizace, analýza preparátů pomocí fluorescenčního mikroskopu.

Rozsah pracovní zprávy:

Rozsah grafických prací:

Forma zpracování diplomové práce: tištěná

Seznam doporučené literatury:

Rakshit S, Ganapathy KN and Visarada KBRS (2016): Cytogenetic of Sorghum. In: Compendium of plant genomes – The sorghum genome. Rakshit and Wang (eds.). Springer Int. Publishers AG.

Price et al. (2015): Genome evolution in the Genus Sorghum (Poaceae). *Annals of Botany* 95, 219-227.

Sharma AK and Bhattacharje D (1957): Chromosome studies in Sorghum I. *Cytologia* 22, 287-311.

Garber ED (1950): Cytotaxonomic studies in the genus sorghum. University of California Press. Berkley and Los Angeles.

Figueroa DM, Davis DJ, Strobel C, Conejo MS, Beckham KD, Ring BC, Bass HW (2011): The Selection and Use of Sorghum (*Sorghum propinquum*) Bacterial Artificial Chromosomes as Cytogenetic FISH Probes of Maize (*Zea mays* L.). *Journal of Biomedicine and Biotechnology* Volume 2011, Article ID 386862, 16 pages.

Kim JS, Klein PE, Klein RR, Price HJ, Mullet JE, Stelly MD (2005): Chromosome Identification and Nomenclature of *Sorghum bicolor*. *Genetics*, 169(2): 1169-1173.

Vedoucí diplomové práce:

Mgr. Miroslava Karafiátová, Ph.D.
UEB Olomouc, AVČR



Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora: Bc. Magdaléna Malurová

Název práce: Identifikace chromozómů v karyotypu čiroku halepského

Typ práce: diplomová

Pracoviště: Katedra buněčné biologie a genetiky

Vedoucí práce: Mgr. Miroslava Karafiátová, Ph.D.

Rok obhajoby práce: 2020

Klíčová slova: *Sorghum*, *Sorghum halepense*, karyotyp, identifikace chromozómů, FISH

Počet stran: 66

Počet příloh: 2

Jazyk: čeština

Souhrn

Čirok halepský (*Sorghum halepense* (L.) Pers.) je planá rostlina blízce příbuzná zemědělsky významné obilovině čiroku dvoubarevnému (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). Zatím není k dispozici karyotyp čiroku halepského založený na molekulárních markerech, ačkoliv by to mohlo do budoucna ulehčit další výzkum genomu tohoto druhu. Cílem této práce bylo získat cytogenetické markery pro identifikaci chromozómů pomocí metody fluorescenční *in situ* hybridizace.

Pro identifikaci chromozómů bylo navrženo 8 repetitivních sond, z nichž jedna byla chromozómově specifická a další 3 repetice tvořily patern na dvou chromozómových párech. Chromozómově specifické byly také sondy pro 5S a 45S ribozomální DNA. Dále bylo navrženo 20 jednokopiových sond kolineárních k distálním oblastem chromozómů čiroku dvoubarevného. 10 z nich na chromozómech čiroku halepského vytvořilo patern na dvou chromozómech a 10 hybridizovalo nespecificky. V rámci práce byla získána také centromerická sonda, která hybridizovala do všech centromer chromozómů čiroku halepského ovšem s dosti specifickým hybridizačním paternem. Během analýzy byla dále pozorována přítomnost fragilních satelitů, které u tohoto druhu nebyly dosud popsány.

Bibliographical identification:

Author's first name and surname: Bc. Magdaléna Malurová

Title: Chromosome identification in karyotype of *Sorghum halepense* L.

Type of thesis: master

Department: Department of Cell Biology and Genetics

Supervisor: Mgr. Miroslava Karafiátová, Ph.D.

The year of presentation: 2020

Keywords: *Sorghum*, *Sorghum halepense*, chromosome identification, karyotype, FISH

Number of pages: 66

Number of appendices: 2

Language: Czech

Summary

Sorghum halepense (L.) Pers. is a wild relative of *Sorghum bicolor* (L.) Moench which is agronomically significant cereal. The molecular karyotype of *Sorghum halepense* has not been available so far, although it could considerably facilitate genomic studies of this species. The aim of this study was to develop chromosome specific cytogenetic markers and identify the individual chromosomes in karyotype using fluorescence *in situ* hybridization.

8 repetitive probes were designed for chromosome identification. Out of them, only one turned up to be chromosome specific and three other repeats revealed specific pattern on two chromosome pairs. In addition, 45S and 5S ribosomal DNA hybridized on single chromosome pair. Further, 20 single-copy probes collinear with distal regions on chromosome of *Sorghum bicolor* were designed. The signals of 10 single-copy probes were detected on two chromosome pairs while remaining single-copy probes hybridized non-specifically. Additionally, centromeric probe was developed. Interestingly, it showed highly diverse pattern on individual chromosomes. During the analysis, the phenomena of fragile satellites was observed. This is the first time that fragile sites have been demonstrated in *Sorghum* genera.

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením vedoucí práce Mgr. Miroslavy Karafiátové, Ph.D. za použití citované literatury.

V Olomouci dne

.....

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucí diplomové práce Mgr. Miroslavě Karafiátové, PhD. za odborné vedení, věnovaný čas, ochotu a vstřícnost. Dále bych chtěla poděkovat zaměstnancům Centra strukturní a funkční genomiky rostlin Ústavu experimentální botaniky AV ČR v Olomouci za jejich ochotu vždy poradit a pomoci.

Tato diplomová práce byla zpracovávána za podpory projektu číslo 18-12338Y Grantové agentury ČR.

OBSAH

SEZNAM ZKRATEK.....	vi
SEZNAM OBRÁZKŮ.....	vii
SEZNAM TABULEK.....	viii
1 ÚVOD.....	1
2 CÍLE PRÁCE.....	2
3 LITERÁRNÍ PŘEHLED.....	3
3.1 Rod <i>Sorghum</i> (čirok).....	3
3.1.1 Čirok dvoubarevný (<i>Sorghum bicolor</i> (L.) Moench).....	4
3.1.2 Čirok halepský (<i>Sorghum halepense</i> (L.) Pers.).....	6
3.1.3 Cytologie rodu <i>Sorghum</i>	8
3.2 Analýza rostlinných genomů.....	10
3.2.1 Cytogenetická analýza rostlinných genomů.....	10
3.2.1.1 Fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace (FISH).....	11
3.2.1.1.1 Značení sond.....	12
3.2.1.1.2 Typy sond.....	13
3.2.1.1.3 Aplikace FISH u rostlin.....	15
4 MATERIÁL A METODY.....	18
4.1 Biologický materiál.....	18
4.2 Použité chemikálie a roztoky.....	18
4.3 Seznam použitých přístrojů a zařízení.....	21
4.4 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy.....	22
5 VÝSLEDKY.....	26
6 DISKUZE.....	36
7 ZÁVĚR.....	39
8 LITERATURA.....	40
9 PŘÍLOHY.....	51

SEZNAM ZKRATEK

AFLP	polymorfizmus délky amplifikovaných fragmentů (amplified fragment length polymorphism)
BAC	umělý bakteriální chromozóm (bacterial artificial chromosome)
CCD	zařízení s vázanými náboji (charged coupled device)
cDNA	komplementární DNA (complementary DNA)
Cy3	cyanin 3
Cy5	cyanin 5
FAO	Organizace pro výživu a zemědělství (Food and Agriculture Organization)
FISH	fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace
FITC	fluorescein isothiokyanát
GISH	genomová <i>in situ</i> hybridizace
ICRISAT	Mezinárodní institut pro výzkum plodin v polovyprahých oblastech (International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics)
PCR	polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
rDNA	ribozomální DNA

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Členění druhů v rámci rodu <i>Sorghum</i>	3
Obrázek 2: Čirok dvoubarevný (<i>Sorghum bicolor</i> (L.) Moench).	4
Obrázek 3: Státy s nejvýznamnější produkcí čiroku dvoubarevného (<i>Sorghum bicolor</i> (L.) Moench) za rok 2018 podle FAO.....	5
Obrázek 4: Čirok halepský (<i>Sorghum halepense</i> (L.) Pers.).....	7
Obrázek 5: Idiogram čiroku halepského (<i>Sorghum halepense</i> (L.) Pers.) (a) a čiroku dvoubarevného (<i>Sorghum bicolor</i> (L.) Moench) (b).....	9
Obrázek 6: Schéma FISH experimentu s použitím přímo a nepřímo značené sondy.	12
Obrázek 7: Hybridizace jednokopiové sondy pšenice (červený signál) na metafázní chromozómy druhu <i>Agropyron cristatum</i>	14
Obrázek 8: Cytogenetická mapa chromozómu 1 čiroku dvoubarevného (<i>Sorghum bicolor</i> (L.) Moench) za použití kombinace 14 BAC sond lokalizovaných na pachytenních chromozómech.....	15
Obrázek 9: Karyotyp čiroku dvoubarevného (<i>Sorghum bicolor</i> (L.) Moench) založený na hybridizaci 17 BAC klonů.	16
Obrázek 10: Výsledek amplifikace primerů pro repetitivní sondy.	26
Obrázek 11: Elektroforetogram sond 5S rDNA (a) značené digoxigeninem (dig) a 45S rDNA (b) značené biotinem (bio) a digoxigeninem (dig).....	27
Obrázek 12: Příklad amplifikace fragmentů (a) a značení jednokopiových sond (b) pro sondy Sh27145 a Sh27097.	28
Obrázek 13: FISH na mitotických chromozómech čiroku halepského (<i>Sorghum halepense</i> (L.) Pers.) s jednolokusovými sondami (a-c) a centromerickou sondou Cl4_1 (d).	30
Obrázek 14: Kombinace specifických sond na mitotických chromozómech čiroku halepského (<i>Sorghum halepense</i> (L.) Pers.).....	31
Obrázek 15: FISH na mitotických chromozómech čiroku halepského (<i>Sorghum halepense</i> (L.) Pers.) s repetitivními sondami se specifickým signálem na dvou párech chromozómů.	31
Obrázek 16: Nespecifická hybridizace sond Cl71 (a) a Cl301 (b) na mitotických chromozómech čiroku halepského (<i>Sorghum halepense</i> (L.) Pers.).....	32
Obrázek 17: Výsledky hybridizace jednokopiových sond se specifickými signály na mitotických chromozómech čiroku halepského (<i>Sorghum halepense</i> (L.) Pers.).....	33
Obrázek 18: Metafáze s fragilními satelity (a) a metafáze s vyšší kondenzací chromatinu (b) při hybridizaci sondy 45S rDNA.....	35

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Seznam navržených repetitivních sond.....	23
Tabulka 2: Seznam jednokopiových sond navržených dle kolinearit k chromozómům čiroku dvoubarevného (<i>Sorghum bicolor</i> (L.) Moench).	24
Tabulka 3: Fragmenty jednokopiových sond a jejich výsledná velikost.....	28
Tabulka 4: Shrnutí výsledků hybridizace repetitivních a rDNA sond.	32
Tabulka 5: Shrnutí výsledků hybridizace jednokopiových sond.	34

1 ÚVOD

Rod *Sorghum* patří do čeledi lipnicovité (*Poaceae*) a zahrnuje celkem 25 druhů. Zemědělsky nejvýznamnějším zástupcem tohoto rodu je čirok dvoubarevný (*Sorghum bicolor* (L.) Moench), který má široké uplatnění ve výživě lidí i zvířat a také je významnou surovinou pro výrobu biopaliv. Jedná se o jednu z nejpěstovanějších obilovin na světě, na níž je potravinově závislá velká část populace v suchých oblastech rozvojových zemí (ICRISAT, www.icrisat.net). Čirok halepský (*Sorghum halepense* (L.) Pers.) je planý druh blízce příbuzný čiroku dvoubarevnému (Price *et al.*, 2005), který však zatím není příliš prostudován. Jedná se o široce rozšířený plevel, který se jeví jako možný zdroj výhodných vlastností pro šlechtění *Sorghum bicolor*. Těmi mohou být například větší odolnost vůči škůdcům a klimatickým změnám nebo tvorba oddenků, které rostlině umožňují přezimovat.

Cílem této práce bylo identifikovat chromozómy čiroku halepského pomocí metody fluorescenční *in situ* hybridizace. Identifikace chromozómů a sestavení karyotypu tohoto druhu, který nebyl zatím detailněji prostudován, může do budoucna zjednodušit další výzkum této rostliny. Pro identifikaci chromozómů bylo nutné získat sondy hybridizující jen do několika málo míst v genomu, nejlépe na jeden chromozómový pár. Při kombinaci takových sond je pak možné získat karyotyp studované rostliny. Pro cytogenetickou analýzu byly v předkládané práci navrženy sondy repetitivní, jednokopiové a sondy pro ribozomální DNA. Jejich lokalizace byla ověřena na metafázních chromozómech kořenových meristémů.

2 CÍLE PRÁCE

Cílem práce bylo získat chromozómově specifické sondy pro sestavení karyotypu široku halepského (*Sorghum halepense* (L.) Pers.) pomocí metody fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH).

Cílem teoretické části práce bylo vypracovat rešerši zaměřenou na rod *Sorghum* s detailnějším popisem jeho dvou blízké příbuzných druhů *Sorghum bicolor* a *Sorghum halepense* a dále na metody studia rostlinných genomů s důrazem na FISH a její využití v této oblasti.

V rámci experimentální části práce byly testovány navržené sondy za účelem získat jednolokusové markery vhodné pro identifikaci chromozómů. Pro dosažení výsledků bylo třeba zvládnutí těchto molekulárních a cytogenetických metod:

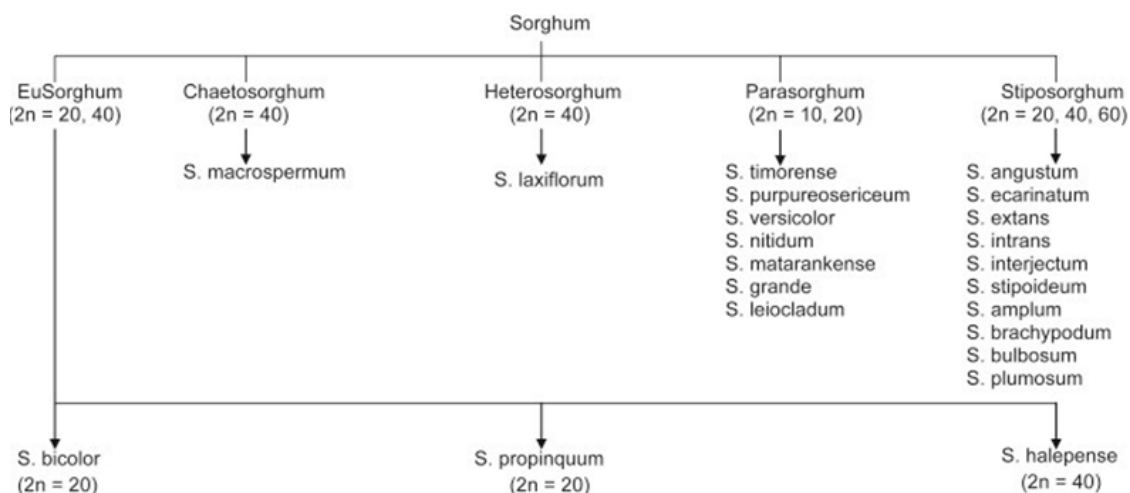
- Izolace DNA z listů.
- Příprava nakapávaných preparátů suspenze protoplastů z kořenového meristému.
- Příprava sond pomocí PCR a nick-translace.
- FISH s připravenými sondami.
- Analýza preparátů pomocí fluorescenčního mikroskopu.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Rod *Sorghum* (čirok)

Rod čirok zahrnuje 25 rostlinných druhů, z nichž některé jsou zemědělsky významné plodiny. Řadí se do čeledi lipnicovité (*Poaceae*), podčeledi *Panicoideae*, kmene *Andropogoneae*. Pro zástupce tohoto rodu je typické, že to jsou teplomilné rostliny poměrně nenáročné na kvalitu půdy. Jsou odolné vůči suchu, a proto se vyskytují zejména v tropických a subtropických oblastech (Morden *et al.*, 1990).

V rámci rodu *Sorghum* je na základě cytologicko-taxonómických vlastností rozlišováno pět subrodů: *Stiposorghum*, *Parasorghum*, *Eusorghum*, *Heterosorghum* a *Chaetosorghum* (obr. 1) (Garber, 1950). Zemědělsky nejvýznamnější je sekce *Eusorghum*, která zahrnuje celosvětově pěstovaný čirok dvoubarevný (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) a jeho poddruhy a také planě rostoucí druhy *Sorghum propinquum* (Kunth.) Hitchc. a *Sorghum halepense* (L.) Pers. (de Wet, 1978). Přirozeným místem výskytu tohoto subrodu je Afrika a jižní Asie. Ostatní čtyři subrody zahrnují druhy, které jsou původní zejména v Austrálii a Střední Americe (Lazarides *et al.*, 1991).



Obrázek 1: Členění druhů v rámci rodu *Sorghum*. Převzato z: Venkateswaran *et al.* (2019).

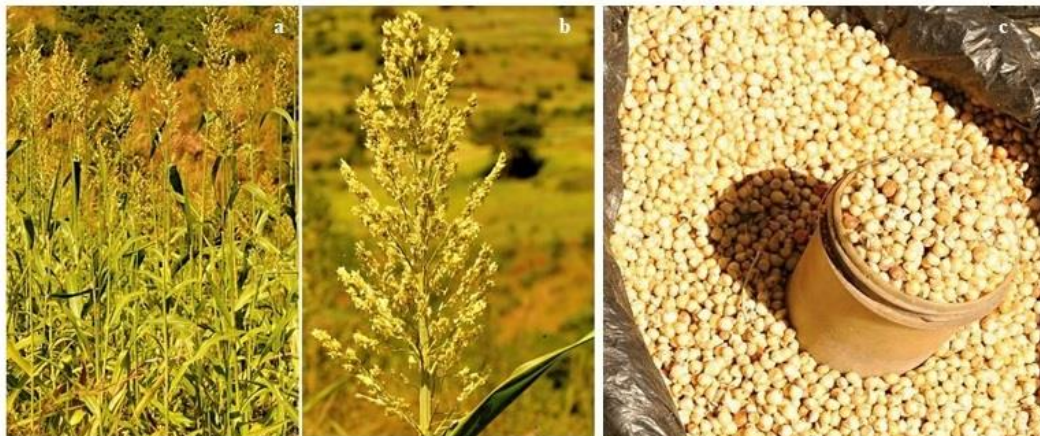
Subrod *Eusorghum* může být dále rozdělen do dvou skupin: komplex *Halepensia* a komplex *Arundinacea*. Snowden (1955) mezi *Halepensia* řadí druhy s oddenky, konkrétně *S. controversum*, *S. halepense*, *S. miliaceum* a *S. propinquum*. Komplex *Arundinacea* pak zahrnuje plané i kulturní druhy zrnového čiroku (Snowden, 1955). Tyto druhy jsou navzájem

křížitelné, a proto se dnes předpokládá, že se jedná o jeden polymorfní druh s velkým množstvím variant (de Wet *et al.*, 1970).

Sekvenční analýzy a na nich založená fylogeneze ale naznačují, že rozdělení rodu čirok na 5 subrodů nekorresponduje s evolučními vztahy jednotlivých druhů (Spangler *et al.*, 1999; Dillon *et al.*, 2001). Na základě sekvenčních dat rozdělil Spangler (2003) rod *Sorghum* do tří podrodů: *Sorghum*, *Sarga* a *Vacoparis* (Spangler, 2003). Ani tato klasifikace však pravděpodobně není definitivní a s novými poznatky bude dále upravována.

3.1.1 Čirok dvoubarevný (*Sorghum bicolor* (L.) Moench)

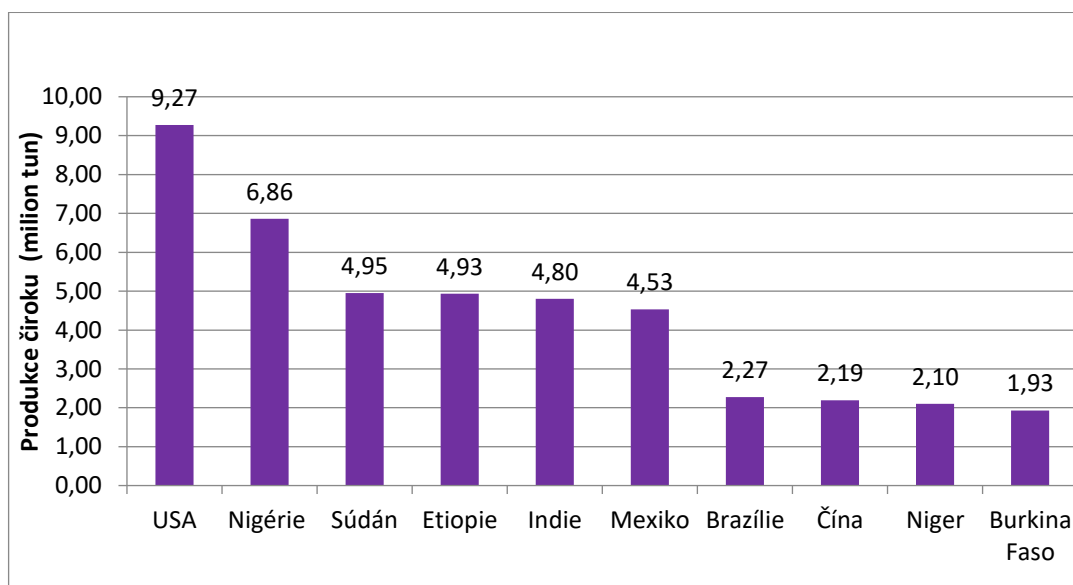
Čirok dvoubarevný je hospodářsky nejvýznamnějším druhem rodu *Sorghum*. Jedná se o jednoletou plodinu vysokého vzrůstu se silným stéblem a velkým počtem listů (obr. 2a). Květenstvím je lata složená z klásků (obr. 2b), obilky jsou kulovité, velké kolem 4 mm zbarvené do různých odstínů hnědé (obr. 2c). Rostlina je samosprašná, ale někdy může být pozorována i cizosprašnost zejména vlivem větru (Hermuth *et al.*, 2012).



Obrázek 2: Čirok dvoubarevný (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). a – celá rostlina, b – květenství, c – zrna. Převzato z: www.botany.cz

Podle organizace FAO (Organizace pro výživu a zemědělství) je čirok dvoubarevný pátá nejpěstovanější obilovina dle výnosu na hektar i oseté plochy po rýži, pšenici, kukuřici a žitu (FAO, www.fao.org/faostat). Mezinárodní institut pro výzkum plodin v polovyprahých oblastech (ICRISAT, www.icrisat.org) udává, že je základem stravy pro 500 milionů lidí žijících v suchých oblastech Afriky, jižní Asie a Střední Ameriky, kde jsou pro ostatní obiloviny nepříznivé podmínky. Za rok 2018 bylo vyprodukováno 59 milionů tun čiroku dvoubarevného (FAO, 2019), což přibližně odpovídá průměru za posledních 20 let. Mezi největší producenty

patří USA, Nigérie a Súdán (obr. 3). Naopak v Evropě se pěstují jen necelé 2 % světové produkce. V České republice je produkce čiroku velmi nízká, ale v posledních letech se zvyšuje import a v roce 2018 bylo dovezeno celkem 230 tun této plodiny (FAO, www.fao.org/faostat). Ta je u nás využívána zejména jako součást krmných směsí pro hospodářská zvířata a na výrobu bioplynu (Podrábský, 2008). Ve světě se v současnosti průměrně za rok zkonsumuje 3,8 kg čiroku na osobu. Toto číslo se však velmi liší mezi jednotlivými státy, přičemž v Severní Americe a Evropě se za rok zkonsumuje jen 0,1-0,2 kg na osobu, ale v afrických státech je to až 90 kg (FAO, 2019).



Obrázek 3: Státy s nejvýznamnější produkcí čiroku dvoubarevného (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) za rok 2018 podle FAO. Převzato z: www.fao.org/faostat.

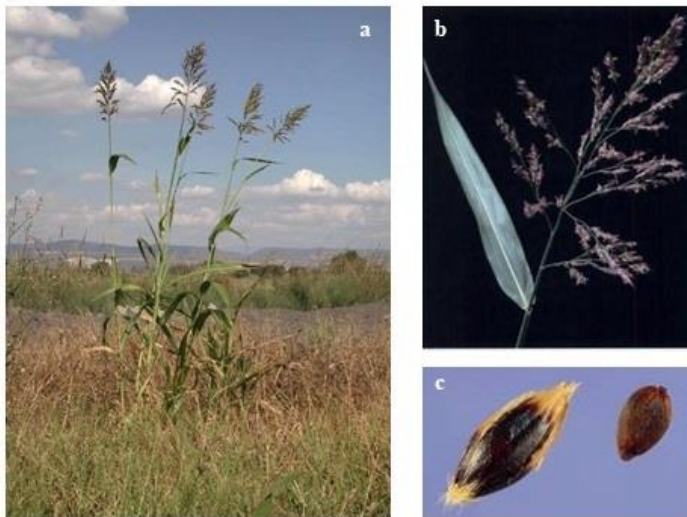
Čirok se využívá zejména jako základní potravina v rozvojových zemích (FAO, 1999). Připravují se z něj hlavně kaše a mouka a v Africe je to také významná surovina pro výrobu piva. Čiroková mouka je bezlepková, což při současných stravovacích trendech a dietologických omezeních celosvětově značně zvyšuje její atraktivitu. Jedna z odrůd čiroku dvoubarevného, tzv. „sladký čirok“ (*Sorghum bicolor* var. *saccharatum*), obsahuje velké množství cukru ve svých stéblech. Z nich se pak připravuje sladký sirup, který se dále používá ke kvašení (Hermuth *et al.*, 2012). Čirok také tvoří významnou složku krmných směsí pro hospodářská zvířata a značná část produkce se zpracovává při výrobě biopaliv (FAO, 1999).

Protože je čirok dvoubarevný hospodářsky významná plodina, brzy se stal předmětem intenzivního výzkumu i v oblasti molekulární biologie. Woo *et al.* (1994) sestavili BAC knihovnu (knihovna bakteriálních umělých chromozómů), která byla později dále využita pro

zamapování některých sekvencí čiroku a pro komparativní studie s příbuznými druhy, například s rýží (Zwick *et al.*, 1998). BAC knihovna byla dále využita v kombinaci s AFLP markery pro vytvoření fyzické mapy s vysokým rozlišením (Klein *et al.*, 2000). Na vzniklou mapu pak byl zamapován například gen *PHYA* pro fytochrom A (Childs *et al.*, 2001). Dále existují cytogenetické studie založené na fluorescenční *in situ* hybridizaci. Gómez *et al.* (1997) použili jako jednokopiovou sondu BAC klon komplementární ke genu *sh2* zamapovaného na fyzickou mapu kukuřice. Díky tomu byly nalezeny části genomu kukuřice a čiroku dvoubarevného, které jsou k sobě homologní (Gómez *et al.*, 1997). Pomocí metody BAC-FISH byl také sestaven karyotyp tohoto druhu (obr. 9) (Kim *et al.*, 2002). S rozvojem sekvenačních technologií došlo k osekvenování také genomu čiroku a sestavení referenční sekvence (Paterson *et al.*, 2009). V současné době se pracuje již s druhou verzí referenční sekvence, kterou publikovali McCormick *et al.* (2018) spolu s atlasem transkriptomu.

3.1.2 Čirok halepský (*Sorghum halepense* (L.) Pers.)

Čirok halepský je trvalá tráva, v anglické literatuře nazývaná také „Johnsongrass“. Dosahuje velikosti 2–2,5 m a mezi typické znaky patří dlouhé oddenky s výhonky, 1-2 cm široké hladké zašpičatělé listy a vztyčený stonek (obr. 4a), který u země vytváří drny. Květy jsou malé a vytváří rozvětvené laty zbarvené do fialova, dlouhé až 30 cm (obr. 4b). Tmavě hnědé obilky mají oválný tvar a měří kolem 3 mm (obr. 4c). Rostlina kvete zejména v červnu a červenci. Původně se čirok vyskytuje ve Středomoří (Meredith, 1955), odkud se rozšířil do dalších oblastí. Vyskytuje se zejména v teplých oblastech, je světlomilný s nízkými nároky na vodu a půdu. Může se množit semeny nebo oddenky.



Obrázek 4: Čirok halepský (*Sorghum halepense* (L.) Pers.). a – celá rostlina, b – květenství, c – obilka s pluchou a bez ní. Převzato z: a - Ljevnaić-Mašić *et al.* (2013), b – Parsons *et al.* (2001), c – FAO (2017).

Tento druh čiroku je jedním z neškodlivějších plevelů na světě a ovlivňuje více než 30 druhů hospodářsky významných rostlin (např. kukuřice, bavlník, cukrová třtina) (Holm *et al.*, 1977). Zároveň ohrožuje biodiverzitu více než 50 států v mírných i tropických oblastech po celém světě (Holm *et al.*, 1977). To, že je čirok halepský škodlivým plevellem, ovlivňuje několik faktorů. Jedním z hlavních je tvorba do široka rozrostlých oddenků, které mohou i po odříznutí snadno regenerovat a rostlina se díky tomu může rozšiřovat i orbou. Dalším faktorem je produkce velkého množství semen, která jsou odolná, dlouho přežívají a mohou být dormantní (Warwick *et Black*, 1983). Jedna rostlina může během celé sezóny vyprodukovat až 28 000 semen (FAO, 2017). Úspěšnost tohoto plevele zvyšuje také jeho kompetiční schopnost, která způsobuje značné snížení výnosu plodin pěstovaných ve stejném místě (Follak *et Essl*, 2012). Čirok halepský patří mezi samosprašné rostliny, ale snadno se kříží také s příbuznými druhy, což zvyšuje variabilitu tohoto druhu, a tím i přizpůsobivost k různým ekologickým i klimatickým podmínkám (Warwick *et Black*, 1983). U čiroku halepského byl pozorován alelopatický efekt, kdy přítomnost tohoto plevele má negativní účinek na klíčení zrn kukuřice (Hessami, 2011).

Existují dvě varianty čiroku halepského, které se od sebe liší počtem chromozómů a ploidií ($2n = 2x = 20$ nebo $2n = 4x = 40$). Diploidní rostliny byly pozorovány v eurasijské populaci čiroku, zatímco v populacích původem ze Středozeří, které se postupně rozšířily zejména do Severní Ameriky, se vyskytují pouze tetraploidní rostliny (de Wet, 1978; Warwick *et Black*, 1983). Velikost genomu tetraploidní varianty je 1,561 Gbp/1C (Šmarda *et al.*, 2014). Původ tohoto druhu zatím nebyl zcela objasněn, ale uvádí se, že tetraploidní varianta ($2n = 4x = 40$)

vznikla hybridizací druhů *Sorghum arundinaceum* ($2n = 2x = 20$) a *Sorghum propinquum* ($2n = 2x = 20$), jedná se tedy o alopolyploida (Ng'uni *et al.*, 2010). Velikost chromozómů je v rozmezí mezi 1,5 a 2,8 μm (Sharma *et Bhattacharjee*, 1957). Gu *et al.* (1984) poukázali na podobnost chromozómů čiroku halepského s chromozómy čiroku dvoubarevného (*Sorghum bicolor*) hlavně s ohledem na poměr ramen a relativní délky chromozómů. Meiotická analýza hybridů těchto dvou druhů, při které bylo pozorováno vícenásobné párování chromozómů a tvorba až hexavalentů, ukázala, že jeden z genomů tetraploidního čiroku halepského je velmi podobný genomu čiroku dvoubarevného (Hoang-Tang *et Liang*, 1988). Jejich vysokou příbuznost také ukázala fylogenetická analýza rodu *Sorghum* (Price *et al.*, 2005).

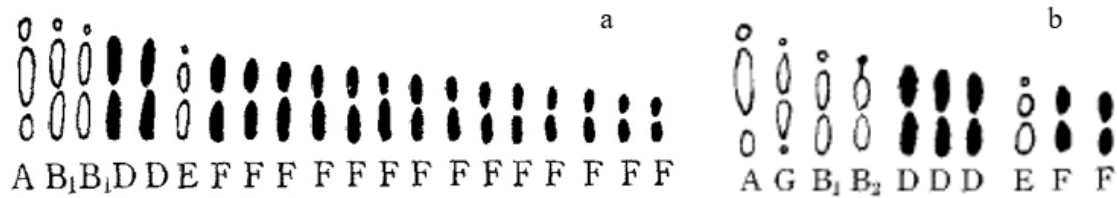
Mezi žádané vlastnosti čiroku halepského patří rezistence ke mšici obilné (*Schizaphis graminum*), přizpůsobivost nízkým teplotám a schopnost přezimovat. Tyto vlastnosti by mohly být přeneseny do hybridních potomků po křížení s pěstovaným čírokem dvoubarevným (*Sorghum bicolor*). Křížení těchto druhů je předmětem výzkumu, nicméně tvorba fertálních hybridů je zatím spíše obtížná. Výzkumy hybridů jsou dosud směřovány zejména k vytvoření čiroku dvoubarevného, který by byl díky tvorbě oddenků trvalou rostlinou (Piper *et Kulakow*, 1994; Dweikat, 2005).

3.1.3 Cytologie rodu *Sorghum*

Rod *Sorghum* zahrnuje druhy s 10, 20, 30 nebo 40 chromozómy v diploidním stavu (Garber, 1950; Lazarides *et al.* 1991). Chromozómy čiroku mají délku mezi 1,1 a 7,6 μm (Sharma *et Bhattacharjee*, 1957). Názory na základní chromozómové číslo u rostlin tohoto rodu nejsou jednotné. Převládají druhy, které mají v diploidním stavu 20 chromozómů ($2n = 2x = 20$). Na druhou stranu výskyt druhů s $n = 5$ naznačuje, že základním chromozómovým číslem čiroku je $x = 5$. Brown (1943) v meióze některých haploidních rostlin ($n = 10$) pozoroval kromě univalentů také tvorbu 1 až 3 bivalentů, což může naznačovat, že je čírok tetraploidního původu. U diploidních rostlin však nebyl podobný důkaz pozorován (Brown, 1943). V meióze tvoří chromozómy diploidních druhů ($2n = 2x = 20$) 10 bivalentů, zatímco u tetraploidní varianty druhu *Sorghum halepense* ($2n = 4x = 40$) bylo pozorováno 10-14 bivalentů a zbytek chromozómů tvoří tetravalenty či dokonce multivalenty (Huskins *et Smith*, 1934).

Sharma *et Bhattacharjee* (1957) detailněji studovali 18 druhů rodu *Sorghum*. Pozorovali, že mezi jednotlivými druhy se liší počet chromozómů se sekundární konstrikcí. Zároveň vytvořili ideogramy (obr. 5) založené na poloze primární a sekundární konstriktce a relativní velikosti chromozómů v rámci celého rodu. Na základě studia jejich morfologie navíc rozdělili chromozómy na 10 typů, které označili písmeny A-J. Satelitní chromozómy typu B jsou dále

děleny ještě na chromozómy se satelitem, u kterého není připojení k chromozómu viditelné (B_1), a satelitem s viditelným zúžením (B_2) (Sharma *et* Bhattacharjee, 1957).



Obrázek 5: Idiogram čiroku halepského (*Sorghum halepense* (L.) Pers.) (a) a čiroku dvoubarevného (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) (b). Převzato z: Sharma *et* Bhattacharjee (1957).

U pěti druhů v rámci rodu *Sorghum* byl popsán výskyt B chromozómů. Poprvé byly pozorovány u druhu *Sorghum purpureosericeum* (Janaki-Ammal, 1939). B chromozómy jsou nadpočetné chromozómy, které nejsou nezbytné pro růst a vývoj rostliny. Vyskytují se jen u některých druhů v rámci rodu *Sorghum* a v rámci druhu jen u některých jedinců. Dále je pro ně typické, že se se dědí nepravidelně (nemendelisticky) a nepárují se s žádným z A chromozómů (Jones *et* Houben, 2003). U čiroku jsou B chromozómy heterochromatické, mohou mít různou velikost a liší se svým chováním v jednotlivých tkáních (Bosemark, 1957). U druhu *Sorghum purpureosericeum* bylo pozorováno, že výskyt B chromozómů v genomu má negativní vliv na samčí fertilitu, přičemž čím více těchto chromozómů rostliny mají, tím menší je životaschopnost produkovaného pylu (Janaki-Ammal, 1940).

Kromě druhu *Sorghum purpureosericeum* se B chromozómy vyskytují taky u další druhů čiroku, kterými jsou *Sorghum halepense* (Raman *et al.*, 1964), *Sorghum nitidum* (Wu, 1980), *Sorghum stipoides* (Wu, 1992) a *Sorghum verticilliflorum* (Huskins and Smith, 1934). U rostlin diploidních populací čiroku halepského (*Sorghum halepense*) bylo pozorováno 4-6 B chromozómů ($2n = 20 + 4-6B$), které se však nevyskytují v tetraploidních ($2n = 2x = 40$) populacích (Raman *et al.*, 1976). Stejně je to u *Sorghum nitidum*, který se rovněž v přírodních populacích vyskytuje v diploidním ($2n = 2x = 20$) i tetraploidním ($2n = 2x = 40$) stavu (Krishnaswamy *et al.*, 1956). B chromozómy však byly pozorovány jen u diploidních rostlin ($2n = 10 + 2B$) (Raman *et al.*, 1976).

3.2 Analýza rostlinných genomů

V současné době se výzkumem rostlinných genomů zabývá mnoho výzkumných týmů po celém světě. Výzkum v této oblasti se zaměřuje zejména na hospodářsky významné rostliny především kvůli zvyšujícím se nárokům na dostatek potravin v důsledku neustálého nárůstu světové populace (FAO, 2012). Analýza genomů těchto rostlin je kromě klasických metod šlechtění jednou z možností, jak zvýšit výnos těchto plodin a jejich odolnost vůči škůdcům a klimatickým změnám. Důležitá je také analýza genomů planých rostlin, které mohou sloužit jako zdroj variability pro druhy domestikované (Henderson *et al.*, 2017) a jsou důležité také pro zachování genetické diverzity (Saeed *et al.*, 2012). V neposlední řadě je výzkum genomů důležitý pro pochopení organizace genetické informace a dějů odehrávajících se v buňce.

Dnešní metody molekulární biologie umožňují zjistit velké množství informací o rostlinných genomech. Pomocí mikroskopických technik můžeme zjistit počet chromozómů, jejich tvar a velikost (Sinoto, 1929). Dále je důležité znát ploidii a velikost genomu, k čemuž se zpravidla využívají cytometrické techniky (Doležel *et al.*, 2007). S rozvojem genomiky se stalo klíčovým nástrojem pro analýzu genomů sekvenování (Sanger *et al.*, 1975). První osekvenovanou rostlinou byl huseníček rolní (*Arabidopsis thaliana* L.), který je modelovým organismem pro rostlinný výzkum (Arabidopsis Genome Initiative, 2000). Následně byly osekvenovány další, zejména zemědělsky významné rostliny jako například rýže (Goff *et al.*, 2002) nebo pšenice (IWGSC, 2018). V získané sekvenci se pak hledají kódující a nekódující oblasti, lokusy významných genů, případně se odkrývají další funkce některých sekvencí (Van de Velde *et al.*, 2016). Jinou oblastí analýzy genomů je pak výzkum genové exprese v jednotlivých částech rostlin či pletivech, na jehož základě se sestavují dále například atlasy transkriptomu (Stelpflug *et al.*, 2016).

Genomy rostlin můžeme zkoumat také pomocí cytologických a cytogenetických metod. Dříve sloužily zejména k pozorování chromozómů během dělení buňky pomocí světelných mikroskopů (Darlington, 1937). Zcela zásadní byl pro cytogenetiku objev metody *in situ* hybridizace, která se stala na celá desetiletí hlavním nástrojem pro zkoumání chromozómů (Gall *et al.*, 1969). Rozvoj cytogenetiky jde pak paralelně s pokrokem v genomice, sekvenačních technologiích a mikroskopii.

3.2.1 Cytogenetická analýza rostlinných genomů

Mezi první cytogenetické metody patřilo tzv. pruhování (banding) chromozómů. Jednou z nich je G-banding, který využívá barvení Giemsovým barvivem (Giemsa, 1904). Tento roztok barví úseky chromozómů s větší hustotou A-T míst. G-banding se stal častou metodou pro výzkum chromozómů živočichů, hlavně pro sestavování karyotypu a sledování chromozómových

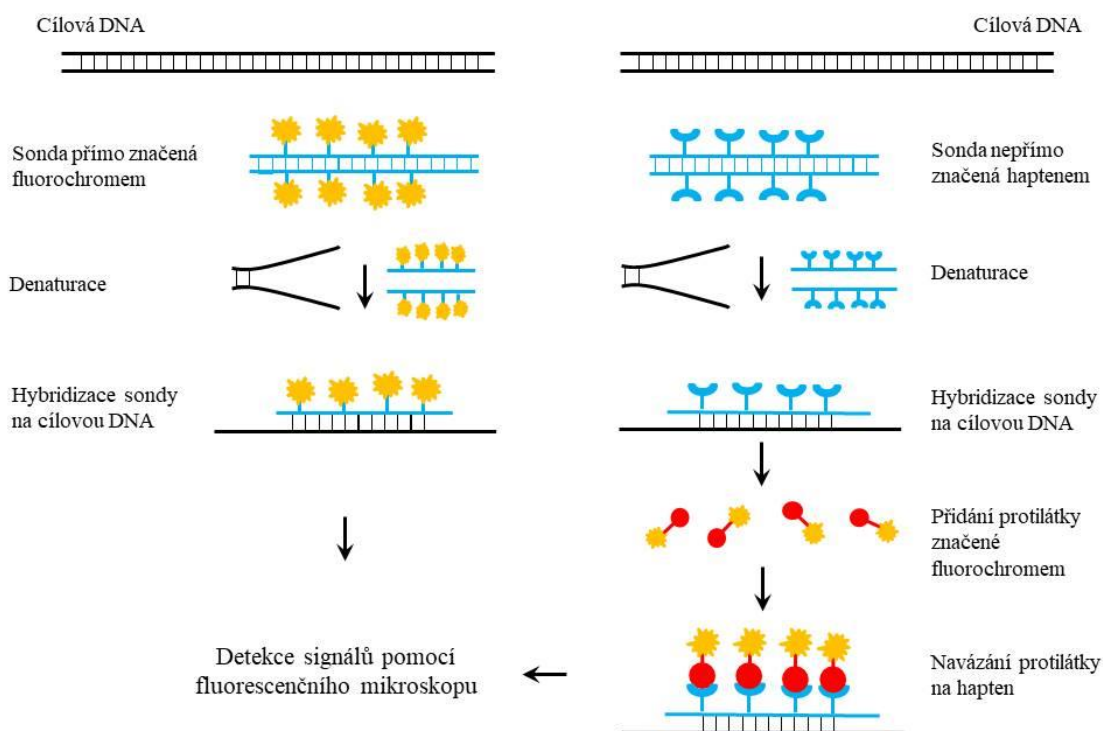
přestaveb. Nicméně u rostlin se tato metoda téměř nevyužívá zejména proto, že mitotické chromozómy rostlin jsou více kondenzované než chromozómy živočichů a G-pruhy tak na nich nejsou rozeznatelné (Greilhuber, 1977). Jen na několika málo rostlinných druzích s velkými chromozómy byl G-banding použit pro získání karyotypu (Chen *et al.*, 1994). Stejně využití má také metoda Q-banding používající jako barvivo fluorescenční chinakrin (quinakrin), který barví stejné oblasti na chromozómech jako G-banding (Cassperson *et al.*, 1970). Mezi méně využívané metody pruhování patří C-banding (Pardue *et Gall*, 1970), který barví heterochromatin v oblasti centromer chromozómů. Příliš se nepoužívá také metoda R-banding (reverzní pruhování), která barví opačné oblasti, než které jsou obarveny při G-bandingu, a slouží spíše jako doplňková metoda (Dutrillaux *et Lejeune*, 1971).

Klíčovou metodou cytogenetiky je *in situ* hybridizace. Principem je vizualizace vybrané DNA sekvence (sondy) na oblasti chromozómu nebo jádra, kde se nachází. Poprvé ji použili Gall *et Pardue* v roce 1969 na drápatce vodní (*Xenopus laevis*), když hybridizovali radioaktivně značenou sekvenci rDNA na DNA oocytů. V dnešní době je *in situ* hybridizace významnou metodou s širokým spektrem použití, nicméně radioaktivní značení se dnes používá jen zřídka zejména kvůli bezpečnostním rizikům spojených s prací s radioaktivním materiálem a dlouhou expozicí signálu. Naopak převládá fluorescenční značení sond a s ním spojená metoda fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH). Její nevýhodou oproti radioaktivnímu značení je nižší citlivost, naopak má ale vyšší rozlišení. Dalšími výhodami jsou rychlost metody a možnost vícenásobného značení (Schwarzacher *et Heslop-Harrison*, 2000).

3.2.1.1 Fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH)

Fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) je nejvýznamnější z cytogenetických technik. Byla vyvinuta na začátku 80. let minulého století (Langer-Safer *et al.* 1982), více se ale rozšířila až v letech devadesátých díky nástupu CCD (charged coupled device) kamer a zobrazovacích systémů pro zpracování FISH signálů (Vroljik *et al.*, 1994).

Metoda je založena na detekci specifických sekvencí na chromozómech nebo v interfázních jádrech pomocí fluorescenčně značených sond (fragmentů DNA). Cílová dvoušroubovice DNA je nejdříve teplem denaturována a na vzniklou jednovláknovou DNA se hybridizuje komplementární sonda (obr. 6). Sekvenci s navázanou sondou pak můžeme pomocí fluorescenčního mikroskopu detekovat jako barevný signál (Langer-Safer *et al.*, 1982).



Obrázek 6: Schéma FISH experimentu s použitím přímo a nepřímo značené sondy.

3.2.1.1.1 Značení sond

Sondou se rozumí fragment DNA, který je přímo značený fluorochromem (Wiegant *et al.*, 1991), nebo značený nepřímo pomocí molekul biotinu/digoxigeninu, které se následně detekují vazbou protilátky označené fluorescenční barvou (Langer-Safer *et al.*, 1982). Výhodou nepřímého značení je vyšší citlivost, naopak nevýhodou je větší časová náročnost a vyšší úroveň nespecifického pozadí (Schwarzacher, 2003). Dlouhodobě jsou velmi často používanými fluorochromy Cyanin 3 (Cy3), Cyanin 5 (Cy5) nebo fluorescein isothiokyanát (FITC). Mezi novější fluorescenční barviva patří Texas Red či série barviv Alexa Fluor a Atto (Kato *et al.*, 2006; Lukumbuzya *et al.*, 2019). Díky široké nabídce fluorochromů v různých spektrech je možné v jednom experimentu použít i několik fluorochromů najednou.

Sondy lze připravit několika metodami podle délky a původu značeného fragmentu. Jednou z častých metod je nick-translace (Yu *et al.*, 1994), kterou se značí dlouhé fragmenty DNA nebo velké inzerty klonované do plazmidu. Pro značení repetitivních sekvencí se nejčastěji používá metoda PCR (polymerázová řetězová reakce), při které jsou do reakční směsi navíc přidány značené nukleotidy (Fuchs *et al.*, 1994). Méně často se pak používá metoda náhodného značení (random-primed labelling) (Yu *et al.*, 1994) nebo koncové značení pomocí enzymu terminální transferáza (Schmitz *et al.*, 1991).

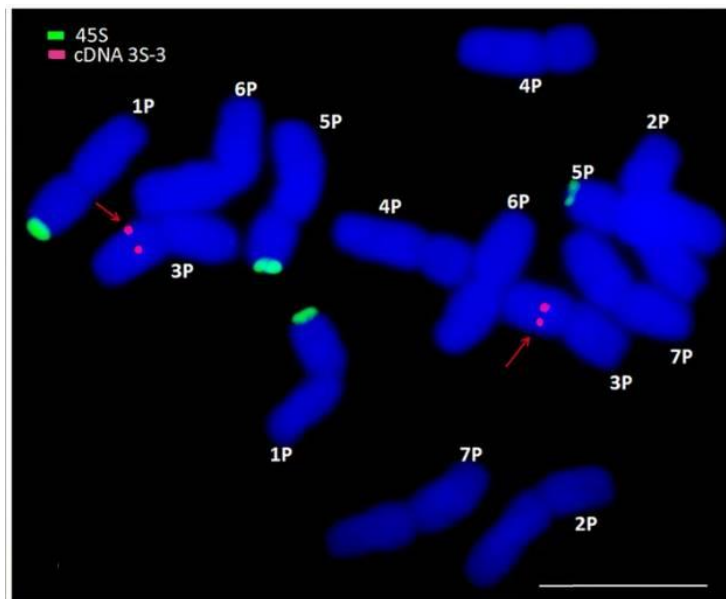
S postupem technologií je dnes možné nechat si sondu komerčně nasyntetizovat přímo podle cílové sekvence (tzv. syntetické oligonukleotidové sondy). Tato syntéza je vhodná zejména pro krátké fragmenty v rámci repetice (Tang *et al.*, 2014). Přes nespornou uživatelskou pohodlnost je tato možnost výrazně dražší oproti standardním, výše uvedeným přístupům.

Variantou oligonukleotidových sond jsou i dnes stále rozšířenější oligopaintingové sondy. Můžou být navrženy na celý chromozóm nebo jen jedno jeho rameno. Alternativou je tzv. barcoding, při kterém jsou sondy navrhovány jen pro malý specifický úsek chromozómu. Pro navržení oligopaintingových sond je nutným předpokladem anotovaná sekvence zkoumaného organismu, ve které se *in silico* hledají krátké a jedinečné oligonukleotidy specifické pro daný chromozóm/úsek. Metodou paralelní syntézy se nasyntetizuje tzv. knihovna, která může mít až přes 20 000 oligonukleotidů a která po označení slouží jako jedna sonda pro FISH (Han *et al.*, 2015). Oligopaintingové sondy se používají například pro získání karyotypu (Braz *et al.*, 2018) nebo sledování chromozómových přestaveb (Šimoníková *et al.*, 2019).

3.2.1.1.2 Typy sond

Sondy můžeme rozdělit na několik typů podle oblastí v genomu, na kterou nasedají. Podle druhu použité sondy se pak liší její příprava i podmínky hybridizace. Při výběru sondy je také důležité zvážit, pro jaký typ cytogenetické studie budou využity.

Jednokopiové sondy jsou komplementární k sekvenci, která se ve sledovaném genomu vyskytuje jen jednou na jednom místě. Takové sondy mohou sloužit k určení pozice dané sekvence v genomu (Sadder *et al.*, 2000), pro komparativní studie příbuzných druhů (obr. 7) (Said *et al.*, 2018) nebo pro zamapování cDNA sekvencí (Karafiátová *et al.*, 2013).



Obrázek 7: Hybridizace jednokopiové sondy pšenice (červený signál) na metafázní chromozómy druhu *Agropyron cristatum*. Měřítko = 10 μ m. Převzato z: Said *et al.* (2018).

Jako jednolokusové se označují sondy, které hybridizují do jednoho místa v genomu, ale sekvence sondy nemusí být unikátní. Často je to několik kopií repetice umístěných za sebou v jednom místě. Jako jednolokusové sondy je možné použít některé BAC klony ječmene (Lapitan *et al.*, 1997) nebo brukve zelné (*Brassica oleracea* L.) (Howell *et al.*, 2005). Mezi jednolokusové sondy se mohou u některých druhů řadit také rDNA sondy, které jsou pro cytogenetickou analýzu často využívány. Hou *et al.* (2018) použili sondu pro 45S rDNA k identifikaci chromozómu 9 v genomu rýže (*Oryza sativa* L.).

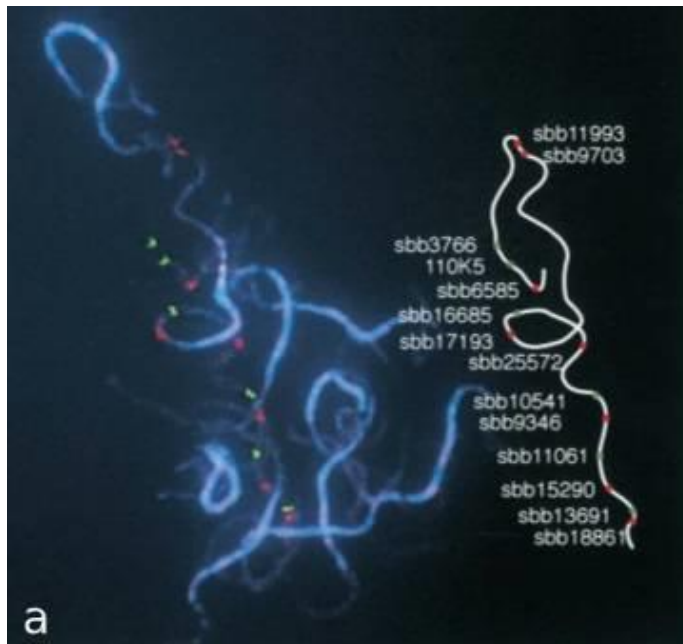
Repetitivní sondy vizualizují sekvence, které jsou v genomu ve velkém počtu kopiích. Mohou být roztroušeny v celém genomu, nebo naopak nahromaděny v určitých oblastech, jako jsou centromery nebo telomery. Používají se k identifikaci chromozómů (Tsujimoto *et al.*, 1997), k určení orientace chromozómu v jádře (Perníčková *et al.*, 2019) nebo v evolučních a komparativních studiích (Murad *et al.*, 2002).

Pro některé studie se jako sonda používá značená genomická DNA studovaného organismu nebo příbuzného druhu. Tato metoda je označována jako GISH (genomická *in situ* hybridizace) a využívá se zejména pro studium hybridů (Kopecký *et al.*, 2006). King *et al.* (2002) využili GISH jako dodatečnou metodu pro fyzické mapování k vizualizaci rekombinantních míst mezi chromozómy dvou příbuzných druhů trav.

3.2.1.1.3 Aplikace FISH u rostlin

Fyzické mapování

Jedna z častých aplikací metody FISH je mapování DNA sond na chromozómy, což umožňuje vytvářet fyzické chromozomální mapy (Howell *et al.*, 2005). Tento přístup se označuje také jako cytogenetické mapování. Nespornou výhodou je přímá vizualizace mapované sekvence v rámci chromozómu a časová a finanční nenáročnost. Na druhou stranu nevýhodou je, že metoda není robustní a univerzální. Vytvořené cytogenetické mapy je možné integrovat s mapami genetickými, které jsou sestaveny na základě frekvence rekombinací. Takto byla vytvořena fyzická cytogenetická mapa pro chromozóm 1 čiroku dvoubarevného (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) (Islam-Fairidi *et al.*, 2002) (obr. 8).



Obrázek 8: Cytogenetická mapa chromozómu 1 čiroku dvoubarevného (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) za použití kombinace 14 BAC sond lokalizovaných na pachytenních chromozómech. Převzato z: Islam-Fairidi *et al.* (2002).

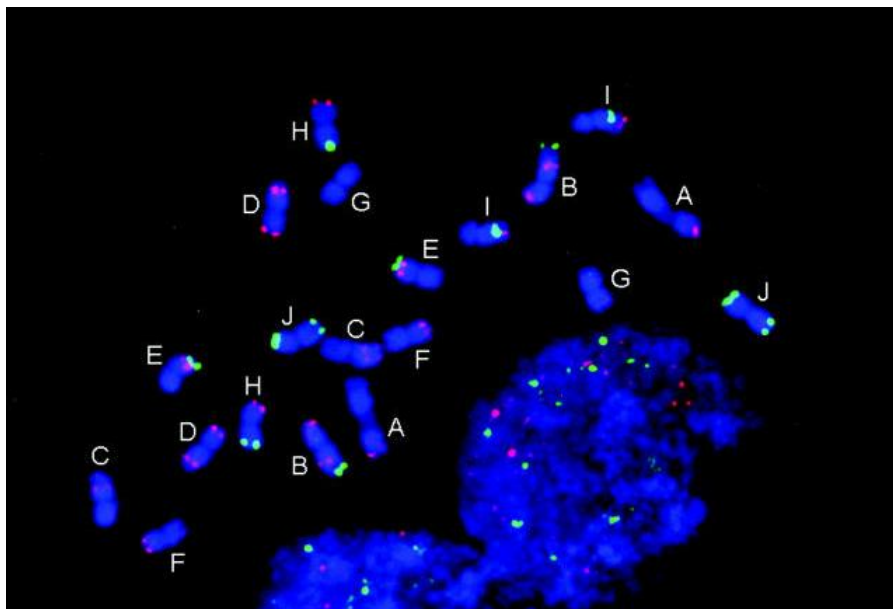
Cytogenetické mapování je také významnou doplňkovou metodou pro ukotvování kontigů a k určení jejich orientace. Při použití DNA s adekvátním rozlišením je navíc možné určit vzdálenost dvou kontigů, mezi kterými je mezera. Van der Knaap *et al.* (2004) takto za použití fiber-FISH stanovili vzdálenost mezi dvěma kontigy ohraničujícími lokus genu zodpovědného za morfologii plodu rajčete (van der Knaap *et al.*, 2004).

Mapování pomocí FISH může být využito také pro porovnávání genomů příbuzných druhů. Tomuto přístupu se také říká komparativní mapování. DNA sekvence určitého druhu se při něm používají jako sondy pro mapování druhů příbuzných. Sang *et* Liang (2000) pomocí FISH zamapovali 18S–5,8S–26S rDNA sekvenci na tři druhy rodu *Sorghum*. Na základě získaných dat lze odvodit fylogenezi a evoluci porovnávaných druhů (Sang *et* Liang, 2000).

Identifikace chromozómů

Fluorescenční *in situ* hybridizace je také významným nástrojem pro identifikaci chromozómů (Pinkel *et al.*, 1986). K tomu se často využívají repetitivní sondy, a to buď jedna, nebo směs více repetit, které po hybridizaci vytvoří specifický vzor, na jehož základě můžeme od sebe jednotlivé chromozómy rozeznat. Například s použitím dvou různě značených sond je možné identifikovat všech 21 chromozómů hexaploidní pšenice (Pedersen *et* Langridge, 1977).

U všech druhů však není možné chromozómy identifikovat pomocí repetit. Alternativou jsou jednolokusové sondy specifické pro určitý chromozóm či více lokusové sondy s omezeným počtem signálů. Robustními sondami mohou být BAC klony s velkými inzerty a sada takových sond vytváří na chromozómech vzor signálů umožňující jednotlivé chromozómy rozpoznat. Na základě sady 17 BAC klonů bylo identifikováno všech 10 chromozómů čiroku dvoubarevného (obr. 9) (Kim *et al.*, 2002; 2005).



Obrázek 9: Karyotyp čiroku dvoubarevného (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) založený na hybridizaci 17 BAC klonů. Písmena označují jednotlivé chromozómové páry. Sondy jsou naznačeny fluorochromy FITC (zelené signály) a Cy3 (červené signály). Převzato z: Kim *et al.* (2005).

Chromozómový painting

Chromozómový painting využívá sondy navržené pro celý chromozóm, případně pro všechny chromozómy daného genomu (Albert *et al.*, 2019). Takové sondy se běžně používají pro analýzu genomu živočichů včetně člověka, u kterého se metoda využívá pro výzkum i pro diagnostiku některých genetických onemocnění (Pinkel *et al.*, 1988; Cremer *et al.*, 1988). Použití klasických paintingových sond pro vizualizaci chromozómů u rostlin je však v podstatě nemožné kvůli velkému zastoupení roztroušených repetitiv, což způsobuje vysokou úroveň nespecifické hybridizace (Schubert *et al.*, 2001). U rostlin s nízkým obsahem repetitiv je možné použít jako sondy chromozómově specifické BAC klony, jejichž koktejl může vizualizovat celý chromozóm. „Painting“ chromozómů pomocí BAC klonů je dobře vypracován například u modelové rostliny huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana* L.) (Mandáková *et al.*, 2016) a u příbuzných druhů v čeledi *Brassicaceae* (Lysak *et al.*, 2010). Cestou pro klasický chromozómový painting u rostlin se ukázaly být oligopaintingové sondy. Tzv. oligo-painting vyvinuli Han *et al.* (2015), kteří jej použili pro sledování párování homeologních chromozómů okurky seté (*Cucumis sativus* L.) v meióze.

3D-FISH

Metoda třídimenzionální FISH (3D-FISH) umožňuje studovat prostorové uspořádání chromatinu. Kombinuje klasickou hybridizaci DNA sond na chromatin se zachovanou prostorovou strukturou s vyhodnocováním pomocí konfokálního mikroskopu a speciálního softwaru. Metoda se liší od běžné hybridizace už v postupu přípravy preparátů, protože je nutné buňky ošetřit tak, aby zůstala zachována 3D struktura chromozómů a zároveň aby byl chromatin přístupný pro navázání sondy. 3D-FISH byla poprvé použita na chromozómech kukuřice při pozorování prostorového uspořádání telomer během meiózy (Bass *et al.*, 1997). Postupně se metoda začala používat také na interfázních jádrech, přičemž se používají buď jádra izolovaná metodou extrakce jader (Lysak *et al.*, 2003) nebo ultratenké řezy pletiv (Tirichine *et al.*, 2009). Trendem v oblasti této aplikace je například studium uložení chromozómových teritorií/domén v rámci interfázního jádra (Pečinka *et al.*, 2004), změn v organizaci jádra s „cizorodými“ chromozómy u hybridů (Perníčková *et al.*, 2019) nebo replikaci chromozómů během S fáze buněčného cyklu (Bass *et al.*, 2014).

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Biologický materiál

Původním materiálem v projektu byla semena čiroku halepského (*Sorghum halepense* (L.) Pers.) linie 777b/1 (genová banka IPK, Gatersleben, Německo); diploidní kultivar $2n = 2x = 20$. Jedna z rostlin byla osekenována. Vzhledem k trvalému charakteru rostliny byly všechny další analýzy prováděny na této rostlině nebo na jejích semenech. Rostlina byla pěstována ve skleníku za kontrolovaných podmínek v režimu 16 °C/10 hodin noc a 24 °C/14 hodin den.

4.2 Použité chemikálie a roztoky

Použité chemikálie

- Agaróza (Sigma-Aldrich, kat. č. A9539)
- Aminoallyl-dUTP-5-FAM (Jena Biosciences, kat. č. NU-803-5FM)
- Anti-digoxigenin-fluorescein isothiokyanát (Sigma-Aldrich, kat. č. 11207741910)
- Biotin-16-dUTP (Roche, kat. č. 11093070910)
- Biotin nick-translační mix (Roche, kat. č. 11745824910)
- Blocking reagent (Amersham Biosciences, kat. č. RPN418)
- Bovinní sérový albumin (BSA) frakce V (Roche, kat. č. BSAV-RO)
- Bromfenolová modř (Sigma-Aldrich, kat. č.: B0126)
- Celuláza Onozuka R-10 (Yakult Honsa, kat. č. 201069)
- Citrát sodný dihydrát (Sigma-Aldrich, kat. č. S1804)
- Dextran sulfát, sodná sůl (SERVA, kat. č. 9011-18-1)
- Digoxigenin nick-translační mix (Roche, kat. č. 11745816910)
- Digoxigenin-11-dUTP, alkali stable (Roche, kat. č. 11093088910)
- DNA polymeráza I (Thermo Fisher Scientific, kat. č. EP0042)
- DNáza I (Thermo Fisher Scientific, kat. č. EN0525)
- Dodecylsírán sodný 20% (SERVA Electrophoresis GmbH, kat. č. 20767.01)
- Ethanol 96% (Lach-Ner, kat. č. 20025-A96)
- Ethanol 99,8% (Lach-Ner, kat. č. 20025-U99)

- Ethidium bromid (Sigma-Aldrich, kat. č. E8751)
- Formamid 99,5% (Sigma-Aldrich, kat. č. F9037)
- Gene Ruler 100 bp DNA Ladder Plus (Fermentas, kat. č.: SM0321)
- Glycerol (Sigma-Aldrich, kat. č.: G5516)
- Chlorid draselný (KCl) (Lach-Ner, kat. č. 7447-40-7)
- Chlorid hořečnatý (MgCl₂) (Finnzymes, kat. č. AB0359)
- Chlorid sodný (NaCl) (Lach-Ner, kat. č. 30423)
- Imerzní olej Immersol 518F (Carl Zeiss, kat. č. 12-624-66A)
- Kyselina boritá (Lach-Ner, kat. č. 10017-AP0)
- Kyselina ethylendiamintetraoctové (EDTA) (Sigma-Aldrich, kat. č. E5134)
- Kyselina octová 99,8 % (Lach-Ner, kat. č. 10047-A99)
- Methanol 99,5 % (Lach-Ner, kat. č. 20038-ATO)
- Nukleotidy: dATP, dCTP, dGTP, dTTP, každý 100mM (VWR International, kat. č. 733-1364)
- Pektolyáza Y-23 (Ducheveva, kat. č. P8004.0001)
- Primestar GXL DNA polymeráza (Takara Biosciences, kat. č. R050A)
- Pufr pro *Taq* polymerázu (New England Biolabs, kat.č. B7002S)
- Salmon sperm DNA (Sigma-Aldrich, kat. č. D7656)
- Streptavidin Cy3 (Invitrogen, kat. č. 434315)
- *Taq* DNA polymeráza (New England Biolabs, kat. č. M0209L)
- Texas Red-12-dUTP (Thermo Fisher Scientific, kat. č. C7631)
- Tris base (Sigma-Aldrich, kat. č. 77-86-1)
- Tween 20 (Sigma-Aldrich, kat. č. P2287)
- Vectashield s DAPI (Vector Laboratories, kat. č. H-1200)
- Xylencyanol (Sigma-Aldrich, kat. č.: X4126)

Použité kity

NucleoSpin Plant II kit (Macherey Nagel, kat. č.: 740770)

Použité roztoky a jejich příprava

- 0,1x SSC (1 l): 0,406 g hexahydrátu chloridu hořečnatého rozpustit v 50 ml 20x SSC, přidat 1 ml Tweenu 20, doplnit destilovanou vodou do 1 l
- 0,5M EDTA (100 ml): 18,61 g dihydrátu disodné soli kyseliny ethylendiamintetraoctové rozpustit ve 100 ml destilované vody a upravit pH na 8
- 1% blokovací pufr (50 ml): 0,5 g blocking reagentu rozpustit v 50 ml 4x SSC a nechat jednu hodinu míchat při 70 °C
- 10x pufr pro nick-translaci (100 ml): 50 ml 1M Tris-HCl (pH 7,5) smíchat s 5 ml 1M MgCl₂ a 50 mg BSA, doplnit vodou na 100 ml
- 1M Tris-HCl (1 l): rozpustit 121,1 g Tris v 800 ml destilované vody a upravit pH na 8 pomocí koncentrované HCl
- 1x KCl pufr (250 ml): ve vodě rozpustit 2,796 g KCl a 0,396 g EDTA, doplnit vodou do 250 ml a upravit pH na 4
- 20x SSC (1 l): 175,3 g NaCl a 88,2 g citrátu sodného rozpustit v části objemu destilované vody, upravit pH na 7 a doplnit destilovanou vodou na 1 l
- 2x SSC (1 l): 100 ml 20x SSC a 900 ml destilované vody
- 4x hybridizační pufr (200 µl): 80 µl 20x SSC, 8 µl Tris-HCl (pH 8) o koncentraci 1 M, 1,6 µl EDTA o koncentraci 0,5 M, 11,2 µl salmon sperm DNA o koncentraci 10 µg/µl, doplnit destilovanou vodou na 200 µl
- 4x SSC (1 l): 2 ml Tween 20, 200 ml 20x SSC a 798 ml destilované vody
- 50% dextran sulfát: 2,5 g dextran sulfátu rozpustit za mírného míchání v 5 ml destilované vody
- 5x TBE pufr (1 l): rozpustit ve vodě 54 g Tris báze a 27,5 g kyseliny borité, přidat 20 ml 0,5M EDTA, doplnit destilovanou vodou na 1 l a upravit pH na 8
- 6x STOP C (10 ml): 2 ml 0,5M EDTA, 1 ml 10% SDS, 4,3 ml 99,9% glycerolu, 5 mg bromfenolové modři, 5 mg xylenecyanolu, doplnit destilovanou vodou na 10 ml
- Marker molekulové hmotnosti (520 µl): 20 µl Gene Ruler 100 bp, 200 µl 6x STOP C, 300 µl vody
- Pracovní roztok ethidium bromidu (1 l): 50 mg ethidium bromidu rozpustit ve 100 ml destilované vody a doplnit destilovanou vodou na 1 l

- Směs enzymů 4 % celulóza a 1 % pektolyáza: 0,2 g celulózy a 0,05 g pektolyázy rozmíchat v 5 ml 1x KCl pufru, rozpipetovat po 20 μ l do mikrokumavek
- TE (Tris-EDTA) pufr (100 ml): 1 ml 1M Tris-HCl smíchat s 200 μ l 0,5M EDTA, doplnit destilovanou vodou na 100 ml a upravit pH na 8

4.3 Seznam použitých přístrojů a zařízení

- Centrifuga Micro Star 17R (VWR International)
- Digestoř (Merci)
- Elektroforetická aparatura Owl A6 (Thermo Fisher Scientific)
- Fluorescenční mikroskop Axio Imager.Z2 (Carl Zeiss) s CCD kamerou, zdroj Power Supply (Eplax GmbH), UV lampa X-Cite exacte (Excelitas)
- Hybridizační komůrka SM30 (Boeckel Scientific)
- Koncentrátor SpeedVac (Thermo Fisher Scientific)
- Lyofilizátor Heto Drywinner (Thermo Fisher Scientific) s vakuovou pumpou (Vacuubrand)
- Oscilační mlýn MM301 (Retsch)
- Spektrofotometr NanoDrop ND – 1000 (Thermo Fisher Scientific)
- Stolní centrifuga MiniStar silverline (VWR International)
- Světelný mikroskop Primo Star (Carl Zeiss)
- Termocycler Mastercycler (Eppendorf)
- Termocycler PCT-200 (MJ Research)
- Tlaková nádoba s oxidem dusným (Foxt)
- Třepačka REAX Top (Heidolph)
- UV transiluminátor InGenius (Syngene)
- Vodní lázeň SUB6 (Grant Instruments)
- Zdroj k elektroforéze Power Pac (Bio-Rad)

4.4 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy

Kultivace a odběr kořínků

Semena čiroku halepského se nechala naklíčit na Petriho miskách na vlhkém filtračním papíru 4 dny při pokojové teplotě. Poté byly semenáčkům odebrány kořeny, u kterých byl buněčný cyklus zastaven působením oxidu dusného (N₂O) po dobu 4,5 h při tlaku 5,0 barů. Kořínky byly následně zafixovány v 90% kyselině octové na ledu po dobu 10 minut. Fixované kořínky byly skladovány v 70% ethanolu při – 20 °C.

Příprava nakapávaných preparátů

Z odebraných kořenů byly na ledu připraveny suspenze protoplastů. Kořeny byly nejdříve v průběhu 10 minut třikrát promyty destilovanou vodou a poté jednou 1x KCl pufrům po dobu 5 minut. Dále byly vždy 2 kořenové špičky přemístěny do 20 µl směsi enzymů 4% celulózy Onozuka R-10 a 1% pektolýázy Y-23 a inkubovány při 37 °C po dobu 45 minut ve vodní lázni. Po inkubaci byly macerované špičky přeneseny na led a k roztoku byl přidán TE pufr pro zastavení enzymatického působení. Po 5 minutách byly kořenové špičky dvakrát promyty 99,8% ethanolem a homogenizovány ve 28 µl fixáže ledové kyseliny octové a methanolu v poměru 1:1. 7 µl takto připravené suspenze bylo nakápnuto na podložní sklo ve vysoce vlhkém prostředí. Po zaschnutí byla kvalita preparátů zkontrolována pomocí světelného mikroskopu s fázovým kontrastem a preparáty s dostatečným počtem mitóz byly dále použity pro FISH.

Izolace genomické DNA čiroku halepského

Genomická DNA byla izolována z mladých listů sekvenované rostliny kultivované ve skleníku. Listy byly po odebrání sušeny v lyofilizátoru ve vakuu za sníženého tlaku po dobu 24 hodin. Vysušené listy byly homogenizovány se skleněnými kuličkami pomocí oscilačního mlýnku 4 minuty při 27 otáčkách/s. Izolace DNA byla provedena pomocí kitu NucleoSpin Plant II dle protokolu výrobce. Koncentrace izolované DNA byla změřena spektrofotometricky pomocí přístroje NanoDrop.

Testování a příprava repetitivních sond pro FISH

S cílem získat chromozómově specifické cytogenetické markery a centromerické sondy bylo testováno 13 párů primerů navržených pro 13 kandidátních repetitiv (tab. 1), které byly identifikovány v sekvenci genomu čiroku halepského (nepublikovaná data) v rámci analýzy repetitiv za využití nástrojů RepeatExplorer2 (Novák *et al.* 2013) a TAREAN (Novák *et al.* 2017) (<https://repeatexplorer-elixir.cerit-sc.cz/galaxy/>). Primery (příloha 1) byly navrženy pomocí nástroje Primer3 (Untergasser *et al.*, 2012; Koressaar *et al.* Remm, 2007) a testovány pomocí PCR.

Reakční směs o objemu 25 µl obsahovala: 1x koncentrovaný pufr pro *Taq* polymerázu, 30 ng genomické DNA čiroku halepského, směs neznačených nukleotidů o koncentraci 100 µM, F a R primery každý o koncentraci 0,5 µM (sekvence primerů jsou uvedeny v příloze 1) a 1 U *Taq* DNA polymerázy. PCR proběhla za následujících podmínek: iniciační denaturace 94 °C/1 min; 30 cyklů denaturace 94 °C/30 s, nasedání primerů 60 °C/50 s a syntézy produktu 72 °C/30 s; a finální extenze 72 °C/10 min. PCR produkty byly zkontrolovány pomocí elektroforézy v 1,5% agarózovém gelu v 1x TBE pufru.

Tabulka 1: Seznam navržených repetitivních sond

Název sondy	Typ sekvence
cl1_1	tandemová repetice
cl1_2	tandemová repetice
cl1_3	tandemová repetice
cl4_1	tandemová repetice
cl4_2	tandemová repetice
cl6	transpozibilní element
cl35	transpozibilní element
cl52_1	tandemová repetice
cl52_2	tandemová repetice
cl71	transpozibilní element
cl108_1	tandemová repetice
cl108_2	tandemová repetice
cl301	tandemová repetice

Vybrané primery byly použity pro přípravu repetitivních sond pro FISH. Sondy byly připraveny analogicky pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR). Reakční směs obsahovala směs neznačených nukleotidů a nukleotidů značených biotinem nebo digoxigeninem o koncentracích: dCTP, dGTP a dATP 200 µM, dTTP 150 µM a bio-16-dUTP nebo dig-11-dUTP 50 µM. Ostatní složky reakční směsi i podmínky reakce byly stejné jako v přechozím kroku.

Stejným způsobem byla připravena sonda pro 5S rDNA, pro kterou byly navrženy primery (příloha 1) na základě získané sekvence čiroku halepského (nepublikovaná data).

Příprava sondy 45S rDNA

Sonda pro 45S rDNA byla připravena z vyizolovaného plazmidu pTa71 pomocí nick-translace (Gerlach *et* Bedbrook, 1979). Pro značení byl použit komerčně dostupný mix pro nick-translaci. Reakce probíhala v objemu 20 µl při 15 °C/2 h dle instrukcí výrobce. Délky fragmentů byly ověřeny elektroforeticky (1,5% agaróza v 1x TBE pufru).

Příprava jednokopiových sond

Vedle repetitivních sond byly pro identifikaci chromozómů použity dále sondy jednokopiové. Pro každý z deseti chromozómů byly navrženy dvě sondy do distálních oblastí krátkého a dlouhého ramene (tab. 2). Primery byly navrženy na sekvenci čiroku halepského (*S. halepense*) na základě homologie se sekvencí čiroku dvoubarevného (*S. bicolor*). Pro analýzu kolinearit GemoneZipper těchto dvou druhů byla využita referenční sekvence *Sorghum bicolor* (McCormick *et al.*, 2018).

Tabulka 2: Seznam jednokopiových sond navržených dle kolinearit k chromozómům čiroku dvoubarevného (*Sorghum bicolor*).

Chromozóm <i>S. bicolor</i>	Krátké rameno <i>S. halepense</i>	Dlouhé rameno <i>S. halepense</i>
Sb01	Sh1319	Sh14254
Sb02	Sh27606	Sh8882
Sb03	Sh27089	Sh27686
Sb04	Sh27145	Sh27097
Sb05	Sh27529	Sh10039
Sb06	Sh27940	Sh3661
Sb07	Sh27244	Sh27060
Sb08	Sh8129	Sh11575
Sb09	Sh27522	Sh27065
Sb10	Sh3340	Sh27681

Ve snaze získat co nejdelsí sondy, které by byly snáze detekovatelné, bylo pro každou sondu navrženo tři až šest fragmentů o velikosti 2,5–4 kb (tab. 3). Tyto fragmenty byly amplifikovány pomocí PCR, pro kterou reakční směs o objemu 20 μ l obsahovala: 0,5 U polymerázy PrimeStar, 1x pufr pro polymerázu PrimeStar, směs nukleotidů o koncentraci 200 μ M dodávaných s polymerázou, 100 ng genomické DNA a F a R primery každý o koncentraci 0,5 μ M (sekvence primerů uvedeny v příloze 2). Reakce probíhala za následujících podmínek: 30 cyklů denaturace 98 °C/10 s, nasedání primerů T_a (příloha 2) /15 s a syntéza produktů 68 °C/4 min. PCR produkty byly zkontrolovány pomocí elektroforézy (1,5% agarózový gel v 1x TBE pufru) a koncentrace výsledných produktů byla změřena spektrofotometricky pomocí přístroje NanoDrop.

Směsi fragmentů pro jednotlivé sondy byly poté značeny pomocí nick-translace. Reakční směs obsahovala ve 40 μ l: 1x pufr pro nick-translaci, merkaptoethanol o koncentraci 10 mM, směs neznačených nukleotidů: dATP, dGTP, dCTP o koncentraci 200 μ M a dTTP o koncentraci 50 μ M, značené nukleotidy (TexasRed-12-dUTP nebo aminoallyl-dUTP-5FAM) o koncentraci

20 μ M, 8 U DNA polymerázy I, 0,3 U DNázy I a 2 μ g DNA (celkové množství tvořené směsí fragmentů dané sondy v rovnoměrném zastoupení). Kvalita štěpení a inkorporace značeného nukleotidu byla ověřena pomocí elektroforézy (1,5% agarózový gel v 1x TBE pufru).

Fluorescenční *in situ* hybridizace

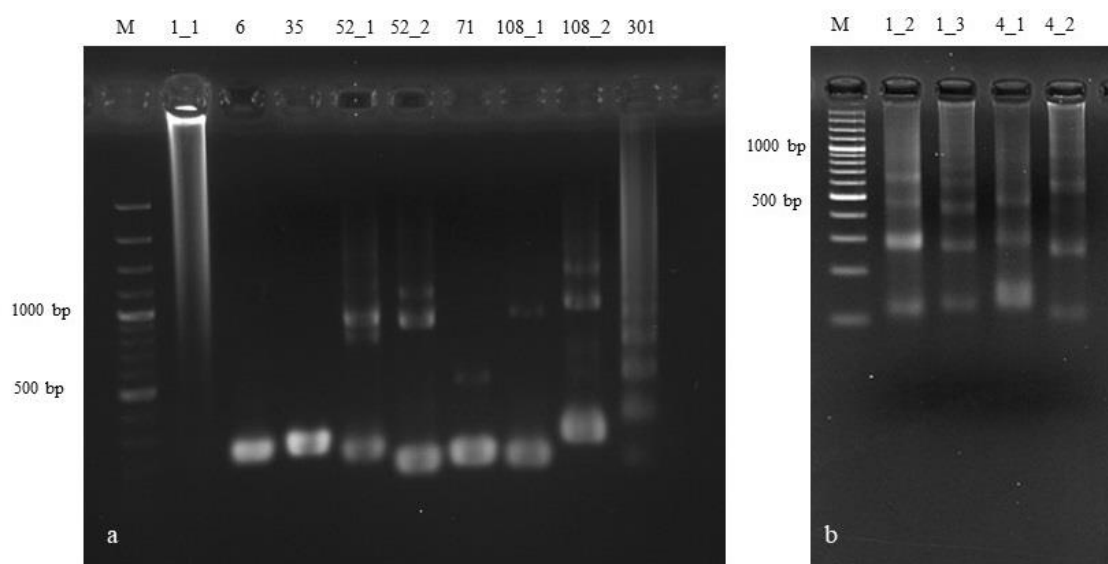
Před samotnou hybridizací byla skla s preparáty post-fixována 4% formaldehydem v sérii promytí: 5 min ve 2x SSC, 10 min ve 45% kyselině octové, 10 min ve 2x SSC, 10 min ve 4% formaldehydu, třikrát 4 min ve 2x SSC a po 2 min v 70%, 90% a 99,8% ethanolu. Na takto připravené preparáty byla hybridizována sonda v reakční směsi o objemu 20 μ l a složení: 2x SSC, 1x hybridizační pufr, 50% formamid a 100 ng jednokopiové nebo 50 ng repetitivní sondy. Preparáty s hybridizační směsí byly denaturovány 3 minuty při 80 °C a hybridizovány přes noc ve vlhkém prostředí při 37 °C. Poté byly preparáty promývány předehřátým pufrům 2x SSC 55 °C/20 min a 2x SSC 5 min při pokojové teplotě. Při použití nepřímo značených sond bylo na každý preparát nanášeno 60 μ l 1% blokovacího pufru se značenými protilátkami streptavidin Cy3 (ředění 1:1000) a anti-DIG FITC (ředění 1:200). Preparáty byly s protilátkou inkubovány v hybridizační komůrce při 37 °C 1,5 hodiny. Nenavázané protilátky byly následně odmyty 3x5 min v 4x SSC pufru. U přímo značených sond byl tento krok vynechán. U obou typů značení následuje po promytí v SSC pufru dehydratace ethanolovou řadou (70%, 90% a 99,8% ethanol), v každém 2 minuty. Po vysušení byl preparát uzavřen do montovacího média s DAPI a preparáty byly skladovány ve tmě při 4 °C.

Signály byly vyhodnoceny pomocí fluorescenčního mikroskopu a vybrané metafáze nasnímány pomocí CCD kamery v softwaru ISIS. Snímky byly upraveny pomocí softwaru Adobe Photoshop CS5 verze 8.

5 VÝSLEDKY

Příprava repetitivních sond

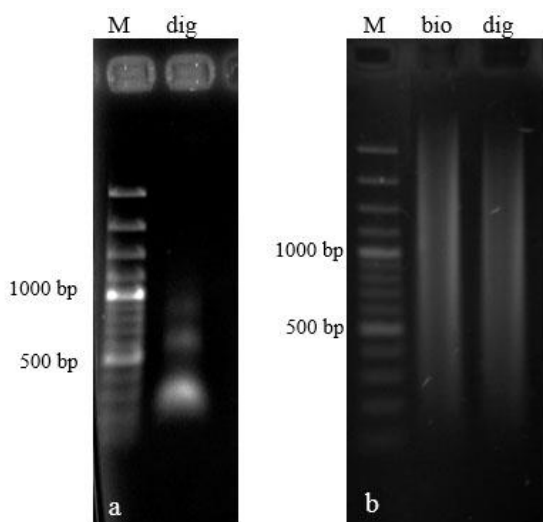
Pro FISH analýzu chromozómů čiroku halepského (*Sorghum halepense* L.) bylo navrženo 8 párů primerů pro 5 tandemových repetic a 3 transpozibilní elementy (tab. 1). Mimo kandidátní repetice na specifické markery byl v tandemových repeticích vytipován i kandidátní klastr C11 pro centromerickou sondu. Primery byly otestovány pomocí PCR a produkty reakce byly zkontrolovány elektroforézou v agarózovém gelu (obr. 10a, b). Na základě této kontroly byly pro klastr 1 navrženy primery nové. V rámci dodatečné analýzy byly navrženy i primery pro klastr C14 jako alternativa k centromerickému klastru C11 (obr. 10b). Ze všech primerů byly připraveny nepřímo označené sondy pomocí biotinu nebo digoxigeninu a ty byly lokalizovány na nakapávaných preparátech připravených z kořenových špiček čiroku halepského.



Obrázek 10: Výsledek amplifikace primerů pro repetitivní sondy. M – 100 bp marker molekulové hmotnosti; čísla nahoře odpovídají jednotlivým sondám.

Příprava rDNA sond

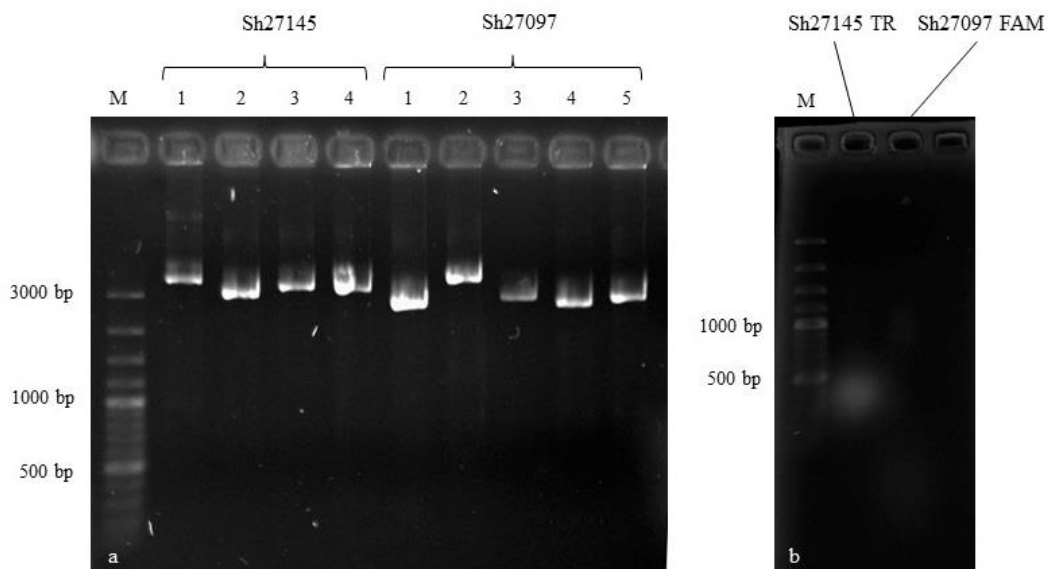
Sonda 5S rDNA byla připravena pomocí PCR, zatímco sonda 45S rDNA byla připravena metodou nick-translace. Obě sondy byly nepřímo značené biotinem nebo digoxigeninem. Připravené a označené sondy byly zkontrolovány pomocí elektroforézy v agarózovém gelu (obr. 11).



Obrázek 11: Elektroforetogram sond 5S rDNA (a) značené digoxigeninem (dig) a 45S rDNA (b) značené biotinem (bio) a digoxigeninem (dig). M – 100 bp marker molekulové hmotnosti.

Příprava jednokopiových sond

Jednokopiové sondy byly navrženy na základě kolinearity čiroku halepského s čirokem dvoubarevným (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). Celkem se pracovalo s 20 sondami navrženými tak, aby každá měla velikost více než 9 kb a byla tak snadno detekovatelná. Aby této velikosti bylo možné dosáhnout, skládala se každá sonda z 3 až 6 fragmentů (tab. 3). Celkem bylo pro všech 20 sond navrženo 88 dlouhých fragmentů, které byly nejdříve amplifikovány pomocí PCR a produkty zkontrolovány gelovou elektroforézou (obr. 12a). Fragmenty, u kterých nebyl na gelu pozorován žádný produkt nebo naopak nespecifické produkty, byly z další analýzy vyřazeny (tab. 3). Zbylé fragmenty pro každou sondu byly po sloučení značeny pomocí nick-translace fluorescencními barvivy Texas Red nebo FAM a označené sondy byly zkontrolovány na agarózovém gelu (obr. 12b).



Obrázek 12: Příklad amplifikace fragmentů (a) a značení jednokopiových sond (b) pro sondy Sh27145 a Sh27097. Sondy jsou označeny barvivou Texas Red (TR) a FAM. Čísla nad jamkami označují sondu a číslo fragmentu. M – 100 bp marker molekulové hmotnosti.

Tabulka 3: Přehled navržených jednokopiových sond a jejich výsledná velikost. Červeně jsou označené fragmenty, které byly po amplifikaci vyřazeny.

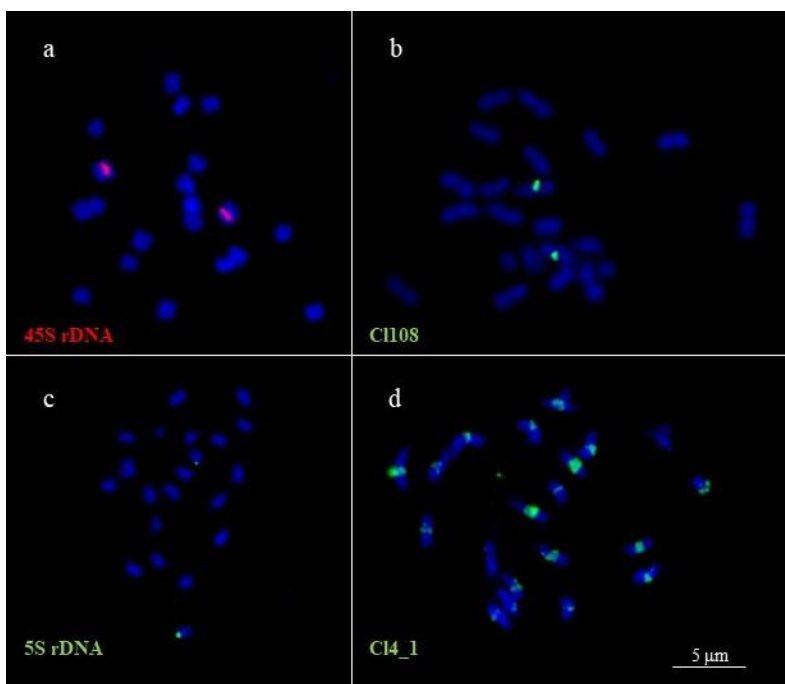
Chromozóm	Krátké rameno				Dlouhé rameno			
	Sonda	Fragment	Velikost fragmentu (bp)	Velikost sondy (bp)	Sonda	Fragment	Velikost fragmentu (bp)	Velikost sondy (bp)
Sh01	Sh1319	Sh1319_1	3123	12456	Sh14254	Sh14254_1	3812	15921
		Sh1319_2	2927			Sh14254_2	2881	
		Sh1319_3	3696			Sh14254_3	2867	
		Sh1319_4	2710			Sh14254_4	3641	
		Sh1319_5	2821			Sh14254_5	2720	
Sh02	Sh27606	Sh27606_1	3220	9187	Sh8882	Sh8882_1	3953	13523
		Sh27606_2	2910			Sh8882_2	3535	
		Sh27606_3	3057			Sh8882_3	2706	
						Sh8882_4	3329	
Sh03	Sh27089	Sh27089_1	3381	13031	Sh27686	Sh27686_1	2997	12541
		Sh27089_2	3010			Sh27686_2	2954	
		Sh27089_3	3043			Sh27686_3	2750	
		Sh27089_4	3597			Sh27686_4	2919	
						Sh27686_5	3671	
Sh04	Sh27145	Sh27145_1	3892	13888	Sh27097	Sh27097_1	2730	15320
		Sh27145_2	3158			Sh27097_2	3974	
		Sh27145_3	3494			Sh27097_3	2932	
		Sh27145_4	3344			Sh27097_4	2742	
						Sh27097_5	2942	

Pokračování tabulky 3: Přehled navržených jednokopiových sond a jejich výsledná velikost. Červeně jsou označené fragmenty, které byly po amplifikaci vyřazeny.

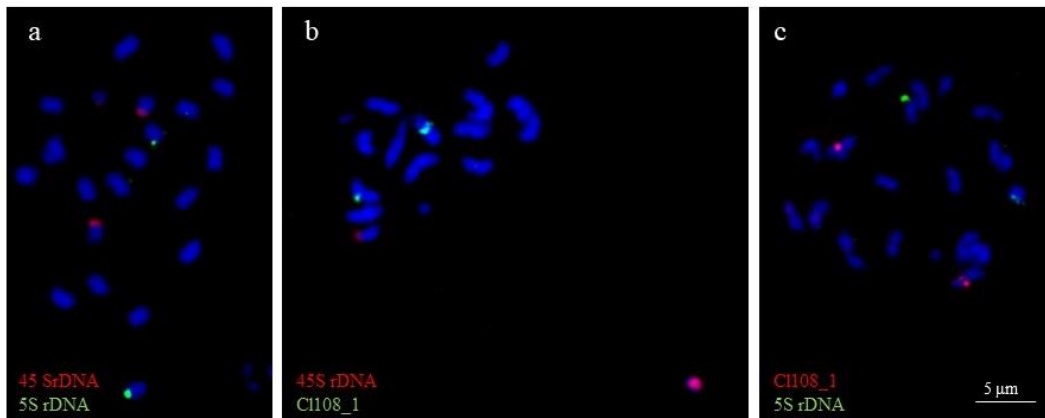
Chromozóm	Krátké rameno				Dlouhé rameno			
	Sonda	Fragment	Velikost fragmentu (bp)	Velikost sondy (bp)	Sonda	Fragment	Velikost fragmentu (bp)	Velikost sondy (bp)
Sh05	Sh27529	Sh27529_1	3360	15782	Sh10039	Sh10039_1	3808	13182
		Sh27529_2	3079			Sh10039_2	3169	
		Sh27529_3	3060			Sh10039_3	3193	
		Sh27529_4	3095			Sh10039_4	3012	
		Sh27529_5	3188			Sh10039_5	3595	
Sh06	Sh27940	Sh27940_1	2910	11922	Sh3661	Sh3661_1	3972	10779
		Sh27940_2	2768			Sh3661_2	3950	
		Sh27940_3	3056			Sh3661_3	2857	
		Sh27940_4	2892					
Sh07	Sh27244	Sh27244_1	2714	11662	Sh27060	Sh27060_1	3936	10072
		Sh27244_2	3172			Sh27060_2	2704	
		Sh27244_3	2884			Sh27060_3	3432	
		Sh27244_4	2887			Sh27060_4	3082	
Sh08	Sh8129	Sh8129_1	2910	12615	Sh11575	Sh11575_1	2869	16289
		Sh8129_2	3942			Sh11575_2	3042	
		Sh8129_3	2818			Sh11575_3	3077	
		Sh8129_4	2945			Sh11575_4	3834	
						Sh11575_5	3467	
Sh09	Sh27522	Sh27522_1	3936	13854	Sh27065	Sh27065_1	2971	11545
		Sh27522_2	3601			Sh27065_2	3988	
		Sh27522_3	3296			Sh27065_3	3591	
		Sh27522_4	3863			Sh27065_4	3966	
		Sh27522_5	3094					
		Sh27522_6	3805					
Sh10	Sh3340	Sh3340_1	3888	13832	Sh27681	Sh27681_1	3568	15568
		Sh3340_2	3643			Sh27681_2	2853	
		Sh3340_3	3298			Sh27681_3	3563	
		Sh3340_4	3003			Sh27681_4	2780	
						Sh27681_5	2804	

FISH s repetitivními a rDNA sondami

Sondy pro ribozomální DNA 5S rDNA a 45S rDNA a pro tandemovou repetici C1108_1 na mitotických chromozómech čiroku hybridizovaly pouze na jeden pár chromozómů (obr. 13a-c). Sonda pro 45S rDNA hybridizovala na jedno z ramen metacentrického chromozómu do místa poblíž centromery (obr. 13a). Sonda C1108_1 měla signál na dlouhém rameni submetacentrického chromozómu v oblasti kolem centromery (obr. 13b) a sonda pro 5S rDNA hybridizovala na koncovou oblast jednoho z ramen menšího metacentrického chromozómu (obr. 13c). Ani v jednom případě nebyla prokázána kolokalizace na stejný chromozóm (obr. 14).



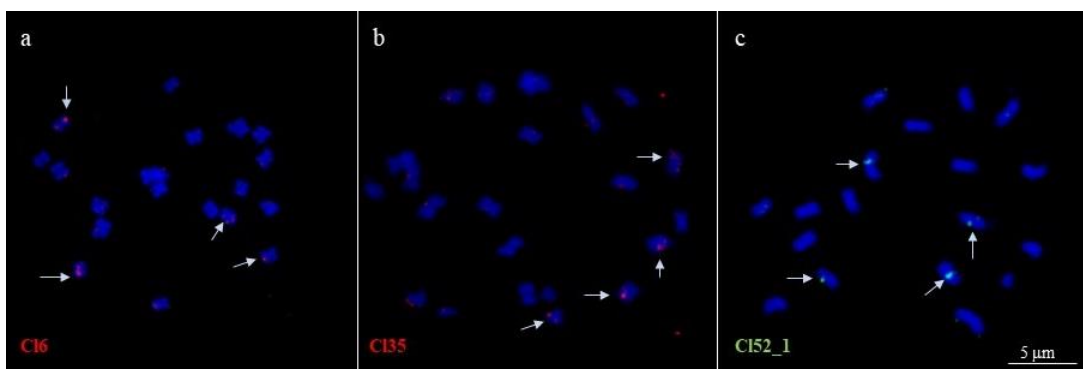
Obrázek 13: FISH na mitotických chromozómech čiroku halepského (*Sorghum halepense* (L.) Pers.) s jednolokusovými sondami (a-c) a centromerickou sondou C14_1 (d). Zvětšení 1000x.



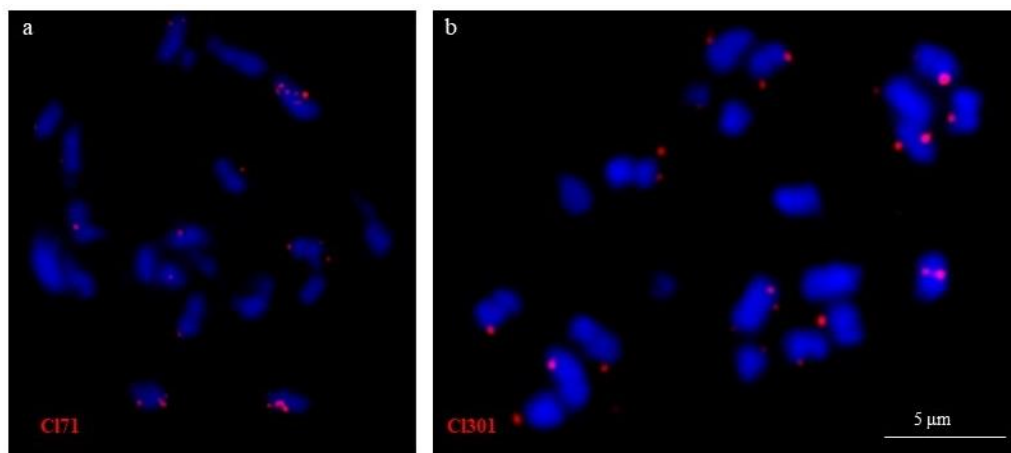
Obrázek 14: Kombinace specifických sond na mitotických chromozómech čiroku halepského (*Sorghum halepense* (L.) Pers.). Zvětšení: 1000x.

Výsledky hybridizace dále potvrdily, že klastry Cl11 a Cl14 jsou centromerické repetice. Sondy Cl11_2, Cl11_3, Cl14_1 a Cl14_2 hybridizovaly do centromer všech chromozómů čiroku halepského (obr. 13d), všechny mají jednotný hybridizační patern a představují tak spolehlivou centromerickou sondu. Centromerický signál nebyl na všech chromozómech uniformní a velikost signálu se mezi jednotlivými chromozómy dost výrazně lišila.

Sondy Cl16, Cl135 a Cl152_1 měly silnější signál na dvou párech chromozómů (obr. 15). Signály zbývajících dvou sond CL71 a Cl301 byly rozptýleny na všech chromozómech bez pravidelného paternu, který by umožnil identifikovat některý z chromozómů (obr. 16). Signály sond Cl108_1 a Cl108_2 byly totožné, proto se dále pracovalo jen s jednou z těchto sond – Cl108_1. Z páru sond Cl152_1 a Cl152_2 dávala sonda 52_2 méně specifický signál, proto byla dále používána jen sonda Cl152_1. Analýzu repetitivních sond a sond pro ribozomální DNA shrnuje tabulka 4.



Obrázek 15: FISH na mitotických chromozómech čiroku halepského (*Sorghum halepense* (L.) Pers.) s repetitivními sondami se specifickým signálem na dvou párech chromozómů. Zvětšení: 1000x.



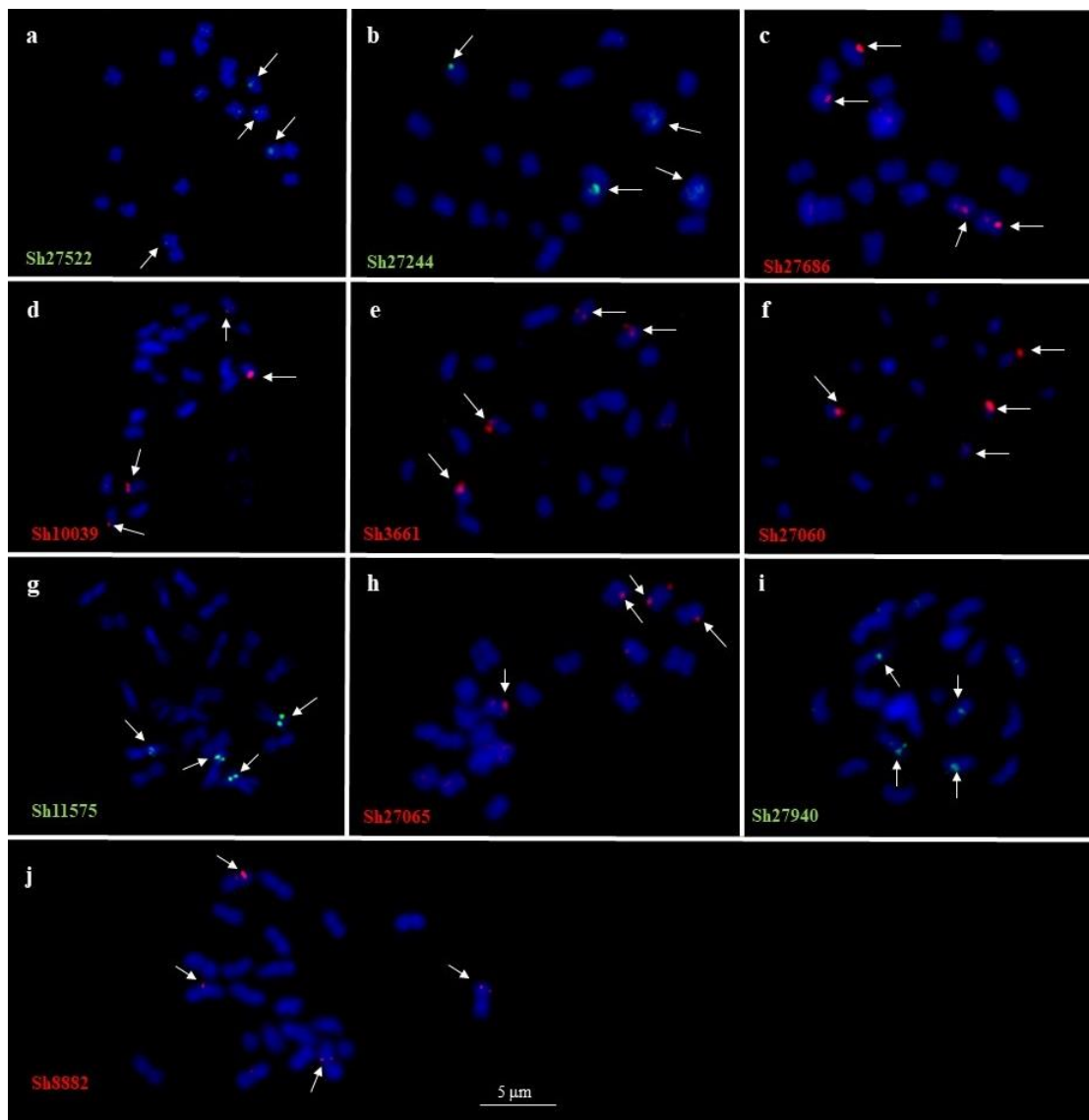
Obrázek 16: Nespecifická hybridizace sond CI71 (a) a CI301 (b) na mitotických chromozómech čiroku halepského (*Sorghum halepense* (L.) Pers.). Zvětšení: 1000x

Tabulka 4: Shrnutí výsledků hybridizace repetitivních a rDNA sond. Sondy se specifickým signálem jsou barevně zvýrazněny.

Název sondy	Místo hybridizace
CI1_1	x
CI1_2	centromery
CI1_3	centromery
CI4_1	centromery
CI4_2	centromery
CI6	dva páry chromozómů
CI35	dva páry chromozómů
CI52_1	dva páry chromozómů
CI71	nespecifické
CI108_1	jeden pár chromozómů
CI301	nespecifické
5S rDNA	jeden pár chromozómů
45S rDNA	jeden pár chromozómů

FISH s jednokopiovými sondami

U jednokopiových sond se předpokládala lokalizace do distálních částí chromozomálních ramen, která však nebyla potvrzena. Žádná ze sond navíc nehybridizovala pouze do jednoho místa. 10 z 20 připravených sond hybridizovalo specificky na dva chromozómové páry (obr. 17). V závislosti na výsledcích pokračujících analýz kolokalizace jednotlivých sond by i některé z těchto sond mohly posloužit jako marker pro identifikaci. Zbylých 10 sond hybridizovalo nespecificky. Hybridizaci jednokopiových sond shrnuje tabulka 5.



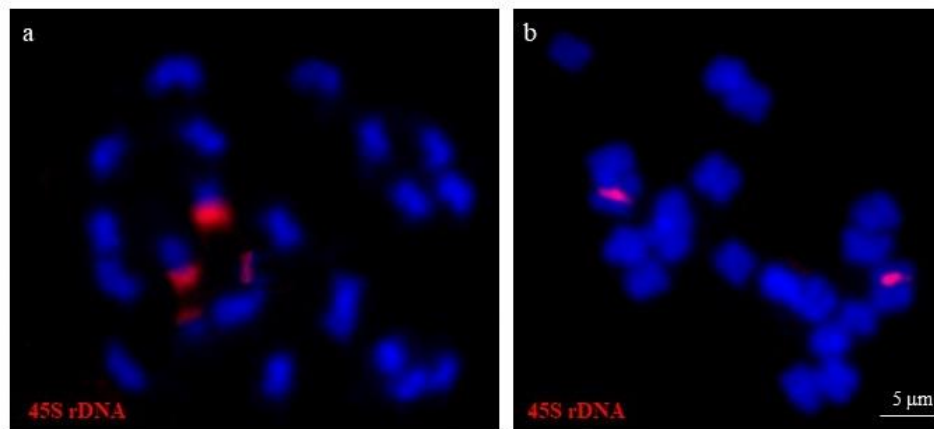
Obrázek 17: Výsledky hybridizace jednokopiových sond se specifickými signály na mitotických chromozómech čiroku halepského (*Sorghum halepense* (L.) Pers.). Zvětšení 1000x.

Tabulka 5: Shrnutí výsledků hybridizace jednokopiových sond. Sondy se specifickým signálem jsou zvýrazněny.

Chromozóm	Sonda pro krátké rameno	Místo hybridizace	Sonda pro dlouhé rameno	Místo hybridizace
Sh01	Sh1319	nespecifické	Sh14254	nespecifické
Sh02	Sh27606	nespecifické	Sh8882	dva páry chromozómů
Sh03	Sh27089	nespecifické	Sh27686	dva páry chromozómů
Sh04	Sh27145	nespecifické	Sh27097	nespecifické
Sh05	Sh27529	nespecifické	Sh10039	dva páry chromozómů
Sh06	Sh27940	dva páry chromozómů	Sh3661	dva páry chromozómů
Sh07	Sh27244	dva páry chromozómů	Sh27060	dva páry chromozómů
Sh08	Sh8129	nespecifické	Sh11575	dva páry chromozómů
Sh09	Sh27522	dva páry chromozómů	Sh27065	dva páry chromozómů
Sh10	Sh3340	nespecifické	Sh27681	nespecifické

Fragilní satelity

V průběhu analýz byl nepravidelně v některých metafázích pozorován zvýšený počet chromozómů. Místo standardních dvaceti bylo pozorováno 22 chromozómů. Nadbytečné „chromozomy“ lze vzhledem k jejich velikosti spíše charakterizovat jako fragmenty. V následných analýzách při hybridizaci sondy 45S rDNA byl na fragmentech pozorován slabý signál této sondy a silnější signál na jednom páru chromozómů (obr. 18a) místo obvyklého jediného silného signálu na chromozómovém páru (obr. 18b). Jedná se tak zřejmě o satelit oddělený od zbytku chromozómu v místě sekundární konstriktce. K tomuto jevu však dochází pravděpodobně pouze ve stádiu nižší kondenzace chromatinu, protože na metafázních chromozómech, kde je kondenzace chromatinu nejvyšší (obr. 18b), nebyl nikdy pozorován.



Obrázek 18: Metafáze s fragilními satelity (a) a metafáze s vyšší kondenzací chromatinu (b) při hybridizaci sondy 45S rDNA. Zvětšení: 1000x.

6 DISKUZE

Cílem diplomové práce bylo vyvinout specifické cytogenetické markery a identifikovat chromozómy v karyotypu čiroku halepského (*Sorghum halepense* (L.) Pers.) pomocí FISH. S ohledem na typ plánovaných analýz se pracovalo s diploidní variantou tohoto druhu ($2n = 2x = 20$), i přesto že většina vědeckého zájmu se dosud soustřeďuje téměř výhradně na tetraploidní *S. halepense* (Sharma et Bhattacharjee, 1957; Sang et Liang, 2000). S odhadovanou velikostí genomu 0,8 Gbp/1C (nepublikovaná data) a $2n = 20$ jsou chromozómy spíše malé a s minimem morfologických znaků, podle kterých by je bylo možné odlišit. Jediný dostupný karyotyp byl dosud sestaven právě pouze na základě základních znaků jako velikost a poloha primární a sekundární konstrikce (Sharma et Bhattacharjee, 1957). Sestavení detailnějšího karyotypu tohoto druhu je proto možné jen s pomocí molekulárních markerů.

Prvními z potenciálních markerů byly vybrané repetitivní sekvence nalezené v genomu čiroku halepského. Repetitivní sondy jsou častým a pohodlným markerem pro identifikaci chromozómů. Dají se využít například v případě, že vytvářejí specifický patern, na jehož základě lze chromozómy odlišit. Tímto způsobem je možné identifikovat například všechny chromozómy smrku ztepilého (*Picea abies* L.) (Vischi et al., 2003) nebo ječmene setého (*Hordeum vulgare* L.) (Tsujimoto et al., 1997). Pro identifikaci chromozómu jsou vhodné i repetice s paternem na jednom chromozómovém páru. Wu et al. (2019) k identifikaci B chromozómu v karyotypu *Aegilops speltoides* využili satelitní repetice hybridizující do několika míst B chromozómu (Wu et al., 2019). V rámci předkládané studie bylo otestováno 8 repetitivních sond a pouze sonda C1108_1 byla potvrzena jako chromozómově specifická. Hybridizovala na dlouhé rameno submetacentrického chromozómu do místa poblíž centromery a je spolehlivým markerem pro tento chromozómový pár. Sondy C16, C135 a C152_1 mají silné signály na dvou chromozómových párech a v kombinaci by mohly být také potenciálně využity jako markery. Obdobně Said et al. (2018) ve své práci zaměřené na sestavení karyotypu druhu *Agropyron cristatum* získali tandemové repetice se specifickým paternem na dvou chromozómových párech, které použili pro charakterizaci chromozómů.

Pro identifikaci chromozómů byly dále použity sondy pro ribozomální DNA. 5S rDNA i 45S rDNA jsou v genomu čiroku halepského jednolokusové sekvence, které tak mohou sloužit pro identifikaci chromozómů. 45S rDNA již byla na genom čiroku zamapována (Sang et Liang, 2000) v rámci porovnávací studie mezi čtyřmi druhy čiroku, mezi nimiž byla i tetraploidní varianta čiroku halepského ($2n = 4x = 40$), ve které sonda 45S rDNA hybridizuje na dva chromozómové páry. Místo sekundární konstrikce se zde nachází ve střední části chromozómu nedaleko centromery, což je v rámci druhů rodu *Sorghum* méně časté umístění. Mnohem častěji je 45S rDNA lokalizována v oblasti telomer (Sang et Liang, 2000). V předkládané práci byla

u diploidního čiroku halepského pozorována stejná lokalizace poblíž centromery, jakou pozorovali Sang *et al.* (2000) u tetraploidního *S. halepense*. 5S ribozomální DNA nebyla naopak u *S. halepense* dosud lokalizována. V prvotní fázi experimentů byla sonda pro 5S rDNA připravována z primerů pro rýži (Kamisugi *et al.*, 1994) a ječmen (Fukui *et al.*, 1994), které univerzálně fungují u některých druhů trav, například u kostřavy luční (*Festuca pratensis*) (Kopecký *et al.*, 2013). Signál byl však velice slabý a nepravidelný. Z toho důvodu byly navrženy primery přímo na sekvenci *S. halepense*. Hybridizace této 5S rDNA sondy byla již reprodukovatelná a signál byl pravidelně detekován na koncové oblasti jednoho ramene menšího metacentrického chromozómu.

V rámci analýzy repetice byly získány 4 centromerické sondy (C11_2, C11_3, C14_1 a C14_2), které hybridizovaly specificky jen do oblasti centromer všech 20 chromozómů čiroku halepského. Miller *et al.* (1998) se zabývali hybridizací repetitivní DNA specifické pro centromeru čiroku dvoubarevného, kterou hybridizovali na metafázní chromozómy 5 druhů rodu *Sorghum*, včetně tetraploidní rostliny *Sorghum halepense*. Při hybridizaci na *Sorghum bicolor* měla sonda pSau3A10 specifický signál v centromerách všech chromozómů. Signál měl různou intenzitu, kdy na 10 chromozómech byl signál silnější než na zbylých. Podobný patern byl pozorován i na ostatních 4 pozorovaných druzích (Miller *et al.*, 1998). Čtyři centromerické sondy použité v této diplomové práci rovněž hybridizují do centromer s různou intenzitou a přibližně polovina chromozómů má signál silnější a polovina slabší. Různé intenzity signálů s velkými rozdíly u těchto sond je možné využít pro identifikaci některých chromozómů, pokud se zkombinují například se sondami specifickými pro dva chromozómové páry.

Za účelem identifikace chromozómů byly testovány také jednokopiové sondy. Byly navrženy do míst v genomu čiroku halepského, které jsou kolineární s distálními konci ramen chromozómů čiroku dvoubarevného. Navržený systém sond měl kromě identifikace také částečně odhalit případné přestavby a odlišnosti v genomech mezi oběma druhy. Podobný postup zvolili Said *et al.* (2018), když na chromozómy druhu *Agropyron cristatum* hybridizovali jednokopiové cDNA sondy z pšenice, která je příbuzným druhem. V jejich výzkumu se u většiny cDNA sond potvrdila jednolokusová hybridizace a jen u 20 % z nich byl detekován signál na více místech v genomu, což poukazuje na chromozómové přestavby během evoluce těchto dvou druhů (Said *et al.*, 2018). V této diplomové práci bylo navrženo 20 jednokopiových sond, u kterých se předpokládalo, že každá bude specifická pro jedno rameno chromozómu čiroku halepského. Jednolokusová lokalizace se však u žádné ze sond nepotvrdila, zřejmě v důsledku rozsáhlých chromozómových přestaveb nebo kvůli chybám v sestavené sekvenci.

Během cytogenetické analýzy chromozómů čiroku byly pozorovány fragilní satelity, které vzhledem připomínají nadbytečné chromozómy s menší velikostí. Podobně vypadají případné

chromozómy, které u čiroku halepského popsali Raman *et al.* (1964 a 1976) a zařadili mezi B chromozómy. V našem případě lze však přítomnost B chromozómů vyloučit. Nadbytečné chromozómy byly u čiroku prokázány téměř výhradně v meióze, případně v mitóze v pletivech reprodukčních orgánů (Raman *et al.*, 1964). Nikdy však ne v kořenech, které byly hlavním materiálem pro naši studii. Hybridizace sondy 45S rDNA odhalila přítomnost fragilních míst v genomu čiroku halepského. Při hybridizaci sondy rDNA na figurách s dvěma nadbytečnými fragmenty byly detekovány dva páry signálů místo jednoho. Na fragmentech byl detekován slabší signál a zároveň byl zachován silnější, hlavní signál této sondy, který byl ze svého obvyklého místa poblíž centromery posunut až do koncové oblasti chromozómu. Tato změna v detekci signálu byla pozorována jen u méně kondenzovaných chromozómů. Fragilní 45S rDNA byla poprvé pozorována u několika druhů rodu jílků (*Lolium*) (Huang *et al.*, 2008; Bustamante *et al.*, 2014). Dále byla prokázána u pomerančovníku čínského (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) (Lan *et al.*, 2016) a také čiroku dvoubarevného (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) (Karafiátová, nepublikovaná data).

7 ZÁVĚR

Cílem předkládané diplomové práce bylo získat sondy vhodné pro identifikaci chromozómů v karyotypu čiroku halepského (*Sorghum halepense* (L.) Pers.). To se podařilo u sond C1108_1, 45S rDNA a 5S rDNA, které byly jednolokusové a každá z nich hybridizuje na jeden chromozómový pár. Další 3 repetitivní a 10 jednokopiových sond mělo hybridizační patern na dvou chromozómových párech. U zbylých dvou repetitivních sond a deseti jednokopiových byl signál nespecificky rozptýlen v celém genomu a pro identifikaci chromozómů tak nejsou vhodné. Z testovaných sond zároveň vzešly čtyři identické centromerické sondy se značně specifickým signálem na některých párech chromozómů. Vhodné kombinace i těchto vícelokusových sond mohou vést k identifikaci některých z dosud neurčených chromozómů *Sorghum halepense*. Vedlejším výsledkem této studie bylo objevení fragilních míst, které nebyly dosud zdokumentovány u žádného druhu čiroku.

8 LITERATURA

Albert, P. S., Zhang, T., Semrau, K., Rouillard, J. M., Kao, Y. H., Wang, C. J. R., Danilova, T. V., Jiang, J., Birchler, J. A. (2019): Whole-chromosome paints in maize reveal rearrangements, nuclear domains, and chromosomal relationships. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(5), 1679-1685.

Arabidopsis Genome Initiative (2000): Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, 408(6814).

Bass, H. W., Hoffman, G. G., Lee, T. J., Wear, E. E., Joseph, S. R., Allen, G. C., Hanley-Bowdoin, L., Thompson, W. F. (2015): Defining multiple, distinct, and shared spatiotemporal patterns of DNA replication and endoreduplication from 3D image analysis of developing maize (*Zea mays* L.) root tip nuclei. *Plant molecular biology*, 89(4-5), 339-351.

Bass, H. W., Marshall, W. F., Sedat, J. W., Agard, D. A., Cande, W. Z. (1997): Telomeres cluster de novo before the initiation of synapsis: a three-dimensional spatial analysis of telomere positions before and during meiotic prophase. *The Journal of cell biology*, 137(1), 5-18.

Bor, N. L. (1960): *Grasses of Burma, Ceylon, India and Pakistan*. London, Pergamon Press.

Bosemark, N. O. (1957): Further studies on accessory chromosomes in grasses. *Hereditas*, 43(2), 236-297.

Braz, G. T., He, L., Zhao, H., Zhang, T., Semrau, K., Rouillard, J. M., Torres, G. A., Jiang, J. (2018). Comparative oligo-FISH mapping: an efficient and powerful methodology to reveal karyotypic and chromosomal evolution. *Genetics*, 208(2), 513-523.

Brown, M. S. (1943): Haploid plants in sorghum. *Journal of Heredity*, 34(6), 163-166.

Bustamante, F. O., Rocha, L. C., Torres, G. A., Davide, L. C., Mittelman, A., Techio, V. H. (2014): Distribution of rDNA in diploid and polyploid *Lolium multiflorum* Lam. and fragile sites in 45S rDNA regions. *Crop Science*, 54(2), 617-625.

Caspersson, T., Zech, L., Johansson, C. (1970). Differential binding of alkylating fluorochromes in human chromosomes. *Experimental cell research*, 60(3), 315-319.

Cremer, T., Lichter, P., Borden, J., Ward, D.C., Manuelidis, L. (1988): Detection of chromosome aberrations in metaphase and interphase tumor cells by *in situ* hybridization using chromosome specific library probes, *Human Genetics*, 80, 235-246.

Darlington, C. D. (1937). *Recent advances in cytology*. Recent advances in cytology., (2nd Ed).

- Darlington, C. D., Thomas, P. T. (1941): Morbid mitosis and the activity of inert chromosomes in Sorghum. Proceedings of the Royal Society of London. Series B-Biological Sciences, 130(859), 127-150.
- de Wet, J. M. J. (1978): Special paper: systematics and evolution of sorghum sect. Sorghum (*Gramineae*). American journal of botany, 65(4), 477-484.
- de Wet, J. M. J., Harlan, J. R., Price, E. G. (1970): Origin of variability in the spontanea complex of *Sorghum bicolor*. American journal of botany, 57, 704-707.
- Dillon, S. L., Lawrence, P. K., Henry R. J. (2001): The use of ribosomal ITS to determine phylogenetic relationships within *Sorghum*. Plant Systematics and Evolution 230, 97-110.
- Doležel, J., Greilhuber, J., Suda, J. (2007): Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. Nature protocols, 2(9), 2233.
- Dutrillaux, B., Lejeune, J. (1971): A new technic of analysis of the human karyotype. Comptes rendus hebdomadaires des seances de l'Academie des sciences. Serie D: Sciences naturelles, 272(20), 2638-2640.
- Dweikat, I. (2005): A diploid, interspecific, fertile hybrid from cultivated sorghum, *Sorghum bicolor*, and the common Johnsongrass weed *Sorghum halepense*. Molecular breeding, 16(2), 93-101.
- FAO (1999): Sorghum: Post-harvest Operations, Natural Resource Institute.
- FAO (2012): World agriculture towards 2030/2050. ESA Working Papers.
- FAO (2017): ISPM 27 Diagnostic protocols for regulated pests: *Sorghum halepense*. Dostupné z: www.ippc.net.
- FAO (2019): Food Outlook - Biannual Report on Global Food Markets, November 2019, Rome.
- FAO, FAOSTAT statistical database. Dostupné z: www.fao.org/faostat [navštíveno 7. 4. 2020].
- Follak, S., Essl, F. (2012): Spread dynamics and agricultural impact of *Sorghum halepense*, an emerging invasive species in Central Europe. Weed Research, 53, 53–60.
- Fuchs, J., Pich, U., Meister, A., Schubert, I. (1994): Differentiation of field bean heterochromatin by *in situ* hybridization with a repeated *FokI* sequence. Chromosome Research, 2(1), 25-28.
- Fukui, K., Kamisugi, Y., Sakai, F. (1994): Physical mapping of 5S rDNA loci by direct-cloned biotinylated probes in barley chromosomes. Genome, 37(1), 105-111.

- Gall J. G., Pardue M. L. (1969): Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 63, 378–383.
- Garber. E. D. (1950): Cytotaxonomic studies in the genus *Sorghum*. University of California Publications in Botany, 23, 283-361.
- Gerlach, W. L., Bedbrook, J. R. (1979): Cloning and characterization of ribosomal RNA genes from wheat and barley. *Nucleic acids research*, 7(7), 1869-1885.
- Giemsa, G. (1904): Eine Vereinfachung und Vervollkommnung meiner Methylenblau-Eosin-Färbemethode zur Erzielung der Romanowsky-Nocht'schen Chromatinfärbung. *Centralblatt für Bakteriologie*, 32, 307-313.
- Goff, S. A., Ricke, D., Lan, T. H., Presting, G., Wang, R., Dunn, M., Glazebrook, J., Sessions, A., Oeller, P., Varma, H., Hadley, D., Hutchison, D., Martin, C., Katagiri, F., Lange, B. M., Moughamer, T., Xia, Y., Budworth, P., Zhong, J., Miguel, T., Paszkowski, U., Zhang, S., Colbert, M., Sun, W. L., Chen, L., Cooper, B., Park, S., Wood, T. C, Mao, L., Quail, P., Wing, R., Dean, R., Yu, Y., Zharkikh, A., Shen, R., Sahasrabudhe, S., Thomas, A., Cannings, R., Gutin, A., Pruss, D., Reid, J., Tavtigian, S., Mitchell, J., Eldredge, G., Scholl, T., Miller R. M., Bhatnagar. S., Adey, N., Rubano, T., Tusneem, N., Robinson, R., Feldhaus, J., Macalma, T., Oliphant, A., Briggs, S. (2002): A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*). *Science*, 296(5565), 92-100.
- Gómez, M. I., Islam-Faridi, M. N., Woo, S. S., Czeschin Jr, D., Zwick, M. S., Stelly, D. M., Price, H. M., Schertz, F. K., Wing, R. A. (1997): FISH of a maize *sh2*-selected sorghum BAC to chromosomes of *Sorghum bicolor*. *Genome*, 40(4), 475-478.
- Greilhuber, J. (1977): Why plant chromosomes do not show G-bands. *Theoretical and Applied Genetics*, 50(3), 121-124.
- Gu, M. H., Ma, H. T., Liang, G. H. (1984): Karyotype analysis of seven species in the genus *Sorghum*. *Journal of Heredity*, 75(3), 196-202.
- Han Y., Zhang T., Thammaphichai P., Weng Y., Jiang J. (2015): Chromosome-specific painting in Cucumis species using bulked oligonucleotides. *Genetics* 200, 771–779.
- Henderson, I. R., Salt, D. E. (2017): Natural genetic variation and hybridization in plants. *Journal of experimental botany*, 68(20).
- Hermuth, J., Janovská, D., Stražil, Z., Uš'ak, S., Hýsek, J. (2012): Čirok obecný – *Sorghum bicolor* (L.) MOENCH: možnosti využití v podmínkách České republiky: metodika pro praxi. Praha: Výzkumný ústav rostlinné výroby.

- Hessami, E. (2011): The Allopathic effects of *Sorghum halepense* and *Amaranthus retroflexus* extract on the Germination of Corn Grain. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 5(9), 2249-2253.
- Hoang-Tang, Liang, G. H. (1988): The genomic relationship between cultivated sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] and Johnsongrass [*S. halepense* (L.) Pers.]: a re-evaluation. *Theoretical and applied genetics*, 76(2), 277-284.
- Holm, L.G., Plucknett, D.L., Pancho, J.V. Herberger, J.P. (1977): *Sorghum halepense* (L.) Pers. In *The world's worst weeds: Distribution and biology*, 54–61. Honolulu, HI, University of Hawaii Press.
- Hou, L., Xu, M., Zhang, T., Xu, Z., Wang, W., Zhang, J., Yu, M., Ji, W., Zhu, C., Gong, Z., Gu, M., Jiang, J., Yu, H. (2018): Chromosome painting and its applications in cultivated and wild rice. *BMC plant biology*, 18(1).
- Howell, E. C., Armstrong, S. J., Barker, G. C., Jones, G. H., King, G. J., Ryder, C. D., Kearsey, M. J. (2005): Physical organization of the major duplication on *Brassica oleracea* chromosome O6 revealed through fluorescence *in situ* hybridization with *Arabidopsis* and *Brassica* BAC probes. *Genome*, 48(6), 1093-1103.
- Huang, J., Ma, L., Yang, F., Fei, S. Z., Li, L. (2008): 45S rDNA regions are chromosome fragile sites expressed as gaps *in vitro* on metaphase chromosomes of root-tip meristematic cells in *Lolium spp.* *PLoS One* 3(5).
- Huskins, C. L., Smith, S. G. (1934): A cytological study of the genus sorghum Pers. II. The meiotic chromosomes. *Journal of Genetics*, 28, 387-395.
- Childs K. L., Klein R. R., Klein P. E., Morishige D. T., Mullet J. E. (2001): Mapping genes on an integrated sorghum genetic and physical map using cDNA selection technology. *The Plant Journal*, 27, 243-255.
- ICRISAT, The International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics, dostupné z: www.icrisat.org [navštíveno 7. 4. 2020].
- International Wheat Genome Sequencing Consortium (2018): Shifting the limits in wheat research and breeding using a fully annotated reference genome. *Science*, 361(6403).
- Islam-Faridi, M. N., Childs, K. L., Klein, P. E., Hodnett, G., Menz, M. A., Klein, R. R., Rooney W. L., Mullet, W. L., Stelly D. M, Price, H. J. (2002): A molecular cytogenetic map of sorghum chromosome 1: fluorescence *in situ* hybridization analysis with mapped bacterial artificial chromosomes. *Genetics*, 161(1), 345-353.

- Janaki Ammal, E. K. (1939): Supernumerary chromosomes in para-sorghum. *Current Science*, 8(5).
- Janaki Ammal, E. K. (1940): Chromosome diminution in a plant. *Nature*, 146(3713), 839-840.
- Jones, N., Houben, A. (2003): B chromosomes in plants: escapees from the A chromosome genome?. *Trends in plant science*, 8(9), 417-423.
- Kamisugi, Y., Nakayama, S., Nakajima, R., Ohtsubo, H., Ohtsubo, E., Fukui, K. (1994): Physical mapping of the 5S ribosomal RNA genes on rice chromosome 11. *Molecular and General Genetics MGG*, 245(2), 133-138.
- Karafiátová, M., Bartoš, J., Kopecký, D., Ma, L., Sato, K., Houben, A., Stein, N., Doležel, J. (2013): Mapping nonrecombining regions in barley using multicolor FISH. *Chromosome research*, 21(8), 739-751.
- Kato, A., Kato, A., Albert, P. S., Vega, J. M., Kato, A., Albert, P. S., Birchler, J. A. (2006): Sensitive fluorescence *in situ* hybridization signal detection in maize using directly labeled probes produced by high concentration DNA polymerase nick translation. *Biotechnic & Histochemistry*, 81(2-3), 71-78.
- Kidd, H. J. (1952): Haploid and triploid sorghum. *Journal of Heredity*, 43(5), 204-204.
- Kim, J. S., Childs, K. L., Islam-Faridi, M. N., Menz, M. A., Klein, R. R., Klein, P. E., Price H. J., E. Mullet J. E., Stelly, D. M. (2002): Integrated karyotyping of sorghum by *in situ* hybridization of landed BACs. *Genome*, 45(2), 402-412.
- Kim, J. S., Klein, P. E., Klein, R. R., Price, H. J., Mullet, J. E., Stelly, D. M. (2005): Chromosome identification and nomenclature of *Sorghum bicolor*. *Genetics*, 169(2), 1169–1173.
- King, J., Roberts, L. A., Kearsey, M. J., Thomas, H. M., Jones, R. N., Huang, L., Armstead, I. P., Morgan, W. G., King, I. P. (2002): A demonstration of a 1:1 correspondence between chiasma frequency and recombination using a *Lolium perenne/Festuca pratensis* substitution. *Genetics*, 161(1), 307–314.
- Klein P. E., Klein R. R., Cartinhour S. W., Ulanich P. E., Dong J., Obert J. A., Morishige D. T., Schlueter S. D., Childs K. L., Ale M., Mullet J. E. (2000): A highthroughput AFLP-based method for constructing integrated genetic and physical maps: progress toward a sorghum genome map. *Genome Research*, 10, 789-807.

- Kopecký D., Loureiro J., Zwierzykowski Z., Ghesquière M., Doležel J. (2006): Genome constitution and evolution in *Lolium x Festuca* hybrid cultivars (Festulolium). *Theoretical and Applied Genetic*, 113, 731–742.
- Kopecký, D., Martis, M., Číhalíková, J., Hřibová, E., Vrána, J., Bartoš, J., Kopecká, J., Cattonaro, F., Stočes, Š., Novák, P., Neumann, P., Macas, J., Šimková, H., Studer, B., Asp, T., Baird, J. H., Navrátil, P., Karafiátová, M., Kubaláková, M., Šafář, J., Mayer, K., Doležel, J. (2013): Flow sorting and sequencing meadow fescue chromosome 4F. *Plant physiology*, 163(3), 1323-1337.
- Koressaar, T., Remm, M. (2007). Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics*, 23(10), 1289-1291.
- Krishnaswamy, N., Raman V. S., Chandrasekharan, P. (1956): Studies on *Sorghum nitidum* Pers. *Current Science*, 25, 64-65.
- Lan, H., Chen, C. L., Miao, Y., Yu, C. X., Guo, W. W., Xu, Q., Deng, X. X. (2016): Fragile sites of ‘Valencia’ sweet orange (*Citrus sinensis*) chromosomes are related with active 45S rDNA. *PLoS One*, 11(3).
- Langer-Safer, P. R., Levine, M., Ward, D. C. (1982): Immunological method for mapping genes on *Drosophila* polytene chromosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 79(14), 4381-4385.
- Lapitan, N. L., Brown, S. E., Kennard, W., Stephens, J. L., Knudson, D. L. (1997): FISH physical mapping with barley BAC clones. *The Plant Journal*, 11(1), 149-156.
- Lazarides, M., Hacker, J. B., Andrew, M. H. (1991): Taxonomy, cytology and ecology of indigenous Australian sorghums (*Sorghum* Moench: *Andropogoneae*: *Poaceae*). *Australian Systematic Botany*, 4(4), 591-635.
- Ljevnaić-Mašić, B., Džigurski, D., Nikolić, L. (2013): Floristic analysis of weeds in organic production. *Journal on Processing and Energy in Agriculture*, 17(1), 33-38.
- Lukumbuzya, M., Schmid, M., Pjevac, P., & Daims, H. (2019): A multicolor fluorescence *in situ* hybridization approach using an extended set of fluorophores to visualize microorganisms. *Frontiers in microbiology*, 10, 1383.
- Lysak, M. A., Pecinka, A., Schubert, I. (2003): Recent progress in chromosome painting of *Arabidopsis* and related species. *Chromosome Research*, 11(3), 195-204.

- Lysak, M. A., Mandáková, T., Lacombe, E. (2010): Reciprocal and multi-species chromosome BAC painting in crucifers (*Brassicaceae*). *Cytogenetic and genome research*, 129(1-3), 184-189.
- Mandáková, T., Lysák, M. A. (2016): Painting of Arabidopsis chromosomes with chromosome-specific BAC clones. *Current protocols in plant biology*, 1(2), 359-371.
- McCormick, R. F., Truong, S. K., Sreedasyam, A., Jenkins, J., Shu, S., Sims, D., Kennedy D., Amirebrahimi M., Weers B. D., McKinley B., Mattison A., Morishge D. T., Grimwood J., Schmutz J., Mullet J. E. (2018): The *Sorghum bicolor* reference genome: improved assembly, gene annotations, a transcriptome atlas, and signatures of genome organization. *The Plant Journal*, 93(2), 338-354.
- Meredith, D. (1955): *The grasses and pastures of South Africa*. Johannesburg, South Africa, Central News Agency.
- Miller, J. T., Jackson, S. A., Nasuda, S., Gill, B. S., Wing, R. A., Jiang, J. (1998): Cloning and characterization of a centromere-specific repetitive DNA element from *Sorghum bicolor*. *Theoretical and Applied Genetics*, 96(6-7), 832-839.
- Morden, C. W., Doebley, J., Schertz, K. F. (1990): Allozyme variation among the spontaneous species of *Sorghum* section *Sorghum* (*Poaceae*). *Theoretical and Applied Genetics*, 80(3), 296-304.
- Murad L., Lim K. Y., Christopodulou V., Matyasek R., Lichtenstein C. P., Kovarik A., Leitch A. R. (2002): The origin of tobacco's T genome is traced to a particular lineage within *Nicotiana tomentosiformis* (*Solanaceae*). *American Journal of Botany*, 89, 921–928.
- Ng'uni, D., Geleta, M., Fatih, M., Bryngelsson, T. (2010): Phylogenetic analysis of the genus *Sorghum* based on combined sequence data from cpDNA regions and ITS generate wellsupported trees with two major lineages. *Annals of Botany*, 105, 471–480.
- Novák, P., Ávila Robledillo, L., Koblížková, A., Vrbová, I., Neumann, P., Macas, J. (2017): TAREAN: a computational tool for identification and characterization of satellite DNA from unassembled short reads. *Nucleic acids research*, 45(12), e111-e111.
- Novák, P., Neumann, P., Pech, J., Steinhaisl, J., Macas, J. (2013): RepeatExplorer: a Galaxy-based web server for genome-wide characterization of eukaryotic repetitive elements from next-generation sequence reads. *Bioinformatics*, 29(6), 792-793.
- Pardue, M. L., Gall, J. G. (1970): Chromosomal localization of mouse satellite DNA. *Science*, 168(3937), 1356-1358.

- Parsons, W. T., Parsons, W. T., Cuthbertson, E. G. (2001): Noxious weeds of Australia. CSIRO publishing.
- Paterson, A.H., Bowers, J.E., Bruggmann, R., Dubchak, I., Grimwood, J., Gundlach, H., Haberer, G., Hellsten, U., Mitros, T., Poliakov, A. (2009): The *Sorghum bicolor* genome and the diversification of grasses. *Nature*, 457, 551–556.
- Pecinka, A., Schubert, V., Meister, A., Kreth, G., Klatte, M., Lysak, M. A., Fuchs J., Schubert, I. (2004): Chromosome territory arrangement and homologous pairing in nuclei of *Arabidopsis thaliana* are predominantly random except for NOR-bearing chromosomes. *Chromosoma*, 113(5), 258-269.
- Pedersen C., Langridge P. (1997): Identification of the entire chromosome complement of bread wheat by two-colour FISH. *Genome*, 40, 589–593.
- Pernickova, K., Linc, G., Gaal, E., Kopecky, D., Samajova, O., Lukaszewski, A. J. (2019): Out-of-position telomeres in meiotic leptotene appear responsible for chiasmate pairing in an inversion heterozygote in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Chromosoma*, 128(1), 31-39.
- Pinkel, D., Straume, T., Gray, J. W. (1986). Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83(9), 2934-2938.
- Pinkel, D., Landegent, J., Collins, C., Fuscoe, J., Segraves, R., Lucas, J., Gray, J.W (1988): Fluorescence *in situ* hybridization with human chromosome specific libraries: detection of trisomy 21 and translocation of chromosome 4, *National Academy of Sciences*, 85, 9138-9142.
- Piper, J. K., Kulakow, P. A. (1994): Seed yield and biomass allocation in *Sorghum bicolor* and F1 and backcross generations of *S. bicolor* × *S. halepense* hybrids. *Canadian Journal of Botany*, 72(4), 468-474.
- Podrábský, M. (2008): Nový hybrid čiroku se súdánskou trávou. *Agromanuál*, 3, 36-37.
- Price, H. J., Dillon, S. L., Hodnett, G., Rooney, W. L., Ross, L., Johnston, J. S. (2005): Genome evolution in the genus *Sorghum* (*Poaceae*). *Annals of Botany*, 95(1), 219-227.
- Raman, V. S., Meenakshi, K., Thangam M. S. (1976): Accessory chromosomes and their meiotic behaviour in hybrids of grain sorghum and Johnson grass. *Cytologia*, 41(2), 193-200.
- Raman, V. S., Meenakshi, K., Thangam, M. S., Sivagnanam, L. (1964): The cytogenetical behaviour of B-chromosomes in *Sorghum halepense*. *Madras Agricultural Journal*, 51, 72–73.

- Sadder, M. T., Ponelies, N., Born, U., Weber, G. (2000): Physical localization of single-copy sequences on pachytene chromosomes in maize (*Zea mays* L.) by chromosome *in situ* suppression hybridization. *Genome*, 43(6), 1081-1083.
- Saeed, S., Barozai, M. Y. K. (2012): A review on genetic diversity of wild plants by using different genetic markers. *Pure and Applied Biology*, 1(3), 68.
- Said, M., Hřibová, E., Danilova, T. V., Karafiátová, M., Čížková, J., Friebe, B., Doležel, J., Gill, B. S., Vrána, J. (2018): The *Agropyron cristatum* karyotype, chromosome structure and cross-genome homoeology as revealed by fluorescence *in situ* hybridization with tandem repeats and wheat single-gene probes. *Theoretical and Applied Genetics*, 131(10), 2213-2227.
- Sang, Y., Liang, G. H. (2000): Comparative physical mapping of the 18S-5.8 S-26S rDNA in three sorghum species. *Genome*, 43(5), 918-922.
- Sanger, F., Coulson, A. R. (1975). A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *Journal of Molecular Biology*, 94(3), 441-448.
- Sharma, A. K., Bhattacharjee, D., (1957): Chromosome studies in sorghum. *Cytologia*, 22, 287-311.
- Schmitz, G. G., Walter, T., Seibl, R., Kessler, C. (1991): Nonradioactive labeling of oligonucleotides *in vitro* with the hapten digoxigenin by tailing with terminal transferase. *Analytical biochemistry*, 192(1), 222-231.
- Schubert, I., Franz, P. F., Fuchs, J., de Jong, J. H. (2001): Chromosome painting in plants. *Methods in cell science*, 23(1-3), 57-69.
- Schwarzacher T., Heslop-Harrison P. (2000): Practical *in situ* hybridization. BIOS Scientific Publishers Ltd, Oxford.
- Sinoto, Y. (1929): Chromosome studies in some dioecious plants, with special reference to the allosomes. *Cytologia*, 1(2), 109-191.
- Snowden, J. D. (1955): The wild fodder sorghums of the section Eu-sorghum. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 55, 191-260.
- Spangler, R., Zaitchik, B., Russo, E., Kellogg, E. (1999): *Andropogoneae* evolution and generic limits in *Sorghum* (*Poaceae*) using *ndhF* sequences. *Systematic Botany*, 267-281.
- Spangler, R. E. (2003). Taxonomy of Sarga, Sorghum and Vacoparis (Poaceae: Andropogoneae). *Australian Systematic Botany*, 16(3), 279-299.

- Stelpflug, S. C., Sekhon, R. S., Vaillancourt, B., Hirsch, C. N., Buell, C. R., de Leon, N., Kaeppler, S. M. (2016): An expanded maize gene expression atlas based on RNA sequencing and its use to explore root development. *The plant genome*, 9(1).
- Šimoníková, D., Němečková, A., Karafiátová, M., Uwimana, B., Swennen, R., Doležel, J., Hřibová, E. (2019): Chromosome painting facilitates anchoring reference genome sequence to chromosomes *in situ* and integrated karyotyping in banana (*Musa* spp.). *Frontiers in Plant Science*, 10, 1503.
- Šmarda, P., Bureš, P., Horová, L., Leitch I. J., Mucina L., Pacini, E., Tichý, L., Grulich V., Rotreklová, O. (2014): Genomic GC content significance in monocots. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111 (39).
- Tang, Z., Yang, Z., & Fu, S. (2014). Oligonucleotides replacing the roles of repetitive sequences pAs1, pSc119. 2, pTa-535, pTa71, CCS1, and pAWRC. 1 for FISH analysis. *Journal of Applied Genetics*, 55(3), 313-318.
- Tirichine, L., Andrey, P., Biot, E., Maurin, Y., Gaudin, V. (2009): 3D fluorescent *in situ* hybridization using Arabidopsis leaf cryosections and isolated nuclei. *Plant methods*, 5.
- Tomás, D., Rodrigues, J., Varela, A., Veloso, M. M., Viegas, W., Silva, M. (2016): Use of repetitive sequences for molecular and cytogenetic characterization of *Avena* species from Portugal. *International journal of molecular sciences*, 17(2), 203.
- Tsujimoto, H., Mukai, Y., Akagawa, K., Nagaki, K., Fujigaki, J., Yamamoto, M., Sasakuma, T. (1997): Identification of individual barley chromosomes based on repetitive sequences: conservative distribution of Afa-family repetitive sequences on the chromosomes of barley and wheat. *Genes & genetic systems*, 72(5), 303-309.
- Van der Knaap, E., Sanyal, A., Jackson, S. A., Tanksley, S. D. (2004): High-resolution fine mapping and fluorescence *in situ* hybridization analysis of *sun*, a locus controlling tomato fruit shape, reveals a region of the tomato genome prone to DNA rearrangements. *Genetics*, 168(4), 2127-2140.
- Venkateswaran, K., Sivaraj, N., Pandravada, S. R., Reddy, M. T. Babu, B. S. (2019): Classification, Distribution and Biology. In *Breeding Sorghum for Diverse End Uses* (pp. 33-60). Woodhead Publishing.
- Vischi, M., Jurman, I., Bianchi, G., Morgante, M. (2003): Karyotype of Norway spruce by multicolor FISH. *Theoretical and Applied Genetics*, 107(4), 591-597.

- Vrolijk, J., Sloos, W. C. R., Verwoerd, N. P., Tanke, H. J. (1994): Applicability of a noncooled video-rated CCD camera for detection of fluorescence *in situ* hybridization signals. *Cytometry: The Journal of the International Society for Analytical Cytology*, 15(1), 2-11.
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., Remm, M., & Rozen, S. G. (2012): Primer3—new capabilities and interfaces. *Nucleic acids research*, 40(15), e115-e115.
- Warwick, S. I., Black, L. D. (1983): The biology of Canadian weeds: 61. *Sorghum halepense* (L.) PERS. *Canadian Journal of Plant Science*, 63(4), 997–1014.
- Wiegant, J., Ried, T., Nederlof, P. M., Ploeg, M. V. D., Tanke, H. J., Raap, A. K. (1991): *In situ* hybridisation with fluoresceinated DNA. *Nucleic acids research*, 19(12), 3237-3241.
- Woo, S. S., Jiang, J., Gill, B. S., Paterson, A. H., Wing, R. A. (1994): Construction and characterization of bacterial artificial chromosome library of *Sorghum bicolor*. *Nucleic acids research*, 22(23), 4922-4931.
- Wu, D., Ruban, A., Fuchs, J., Macas, J., Novák, P., Vaio, M., Houben, A. (2019): Nondisjunction and unequal spindle organization accompany the drive of *Aegilops speltoides* B chromosomes. *New Phytologist*, 223(3), 1340–1352.
- Wu, T. P. (1980): Cytogenetic studies of the B chromosomes in *Sorghum nitidum*. *Proceedings of the National Science Council*, 4, 297-306.
- Wu, T. P. (1992): B-Chromosomes in *Sorghum stipoides*. *Heredity*, 68(5), 457-463.
- Yu, H., Chao, J., Patek, D., Mujumdar, R., Mujumdar, S., Waggoner, A. S. (1994): Cyanine dye dUTP analogs for enzymatic labeling of DNA probes. *Nucleic acids research*, 22(15), 3226-3232.
- Zwick, M. S., Islam-Faridi, M. N., Czeschin, D. G., Wing, R. A., Hart, G. E., Stelly, D. M., Price, H. J. (1998): Physical mapping of the liguleless linkage group in *Sorghum bicolor* using rice RFLP-selected sorghum BACs. *Genetics*, 148(4), 1983-1992.

9 PŘÍLOHY

Příloha 1: Seznam primerů pro repetitivní sondy a sondu 5S rDNA.

Sonda	Primer	Sekvence primeru (5' → 3')	Velikost produktu (bp)
cl1_1	Sh_cl1_F	GCTTCCACTTGAGCCACTTC	99
	Sh_cl1_R	GCAAGATAGGTGCACGGTTT	
cl1_2	Sh_cl1_F	GCTTCCACTTGAGCCACTTC	97
	Sh_cl1_2R	AAGATAGGTGCACGGTTTGC	
cl1_3	Sh_cl1_3F	CGTCCAAATTGATTTCTTAGCC	62
	Sh_cl1_3R	GAAGTGGCTCAAGTGGAAAGC	
cl4_1	Sh_cl4_1F	GACCGAACCGAGATTCCATA	108
	Sh_cl4_1R	AAGATAGGTGCACGGTTTGC	
cl4_2	Sh_cl4_2F	TCTTAGCCTATGGTGCATTTCG	64
	Sh_cl4_2R	GGTGAAGTGGCTCATATGGAA	
cl6	Sh_cl6_F	CCAACCGATTAGCCTCTTCA	222
	Sh_cl6_R	GCTTTGATCAAGGGATTGGA	
cl35	Sh_cl35_F	TCCAATGAAAGCTCTCAAGACA	244
	Sh_cl35_R	GCTATCGCCATCCTATTCCA	
cl52_1	Sh_cl52_1F	AACACACCCTTTGACCGAAC	164
	Sh_cl52_1R	GCTGCGTGGCTATGAGTTCT	
cl52_2	Sh_cl52_2F	TTCAAGATTTGGTGGGTATTGTT	196
	Sh_cl52_2R	TTGAGCCAATCCTAAGCACA	
cl71	Sh_cl71_F	GCCCATGTTCTTCAGCACTC	187
	Sh_cl71_R	CCCCAAGACAGCCTTTGTAA	
cl108_1	Sh_cl108_1F	TTGTTGCGAAACTGGATTGA	167
	Sh_cl108_1R	GGGACGAACACAAGGACACT	
cl108_2	Sh_cl108_2F	CGGACCGTTTTGTCTCTAA	244
	Sh_cl108_2R	CGTGGCCTGTGGAATTTTAT	
cl301	Sh_cl301_F	GAAAAAGTCTAGGACTCCAAACCA	126
	Sh_cl301_R	TGGTCCTCAAGCTTTCACAA	
5S rDNA	5S_rDNA_S.hal_F	GGAATGCAACACGAGGACTT	124
	5S_rDNA_S.hal_R	ATGTCCGATGCGATCATACC	

Příloha 2: Seznam primerů pro jednokopiové sondy. Červeně vyznačené sondy byly z analýz vyřazeny.

Sonda	Primer	Sekvence primeru (5' → 3')	Teplota nasedání primerů (°C)	Velikost produktu
Sh1319	Sh1319_1F	GCCTTGCAACTCAACCTCTC	60	3123
	Sh1319_1R	TCATGCTTCTTGCAACTTGG		
	Sh1319_2F	CCAGGATTCCAAAAACGAGA	60	2927
	Sh1319_2R	CCTGCAACATTTCCCAGATT		
	Sh1319_3F	GCTCAATCAAACCCGAAAAA	53	3696
	Sh1319_3R	TGTATACGCCGGCCTTAATC		
	Sh1319_4F	ACAGTGGCAAATGACCAACA	56	2710
	Sh1319_4R	TTCATTTGGAGCTGGGAAAG		
	Sh1319_5F	TTCCCAGCTCCAAATGAATC	x	2821
	Sh1319_5R	CCCTAACCGTACCTGCAAAA		
Sh14254	Sh14254_1F	TGTTTGTGACCTCGCTTCAC	60	3812
	Sh14254_1R	CATGAATGCTTGCCCTTCA		
	Sh14254_2F	TTGCAGGTGCTGAACTTGAC	60	2881
	Sh14254_2R	AAACTCCGTCATCCCAACAC		
	Sh14254_3F	CTACATCAATGCGCCAACAC	60	2867
	Sh14254_3R	ACCACAGCACCTTCAATTCC		
	Sh14254_4F	CCCCGAAAGAATTCTGATGA	60	3641
	Sh14254_4R	GGACAGCTCACCTTGCTTTC		
	Sh14254_5F	GTCAAGGATGTTTGGCCACT	60	2720
Sh14254_5R	TTCGTTGGGCAATATGAACA			
Sh27606	Sh27606_1F	GAACTTCGTGGGTTGGAAAA	60	3220
	Sh27606_1R	CTGCCAAACACCCCTGTAGT		
	Sh27606_2F	GCCATTTGTACCCTCTTGGA	55	2810
	Sh27606_2R	GTCTCAGCGTCACAGGCATA		
	Sh27606_3F	ATGCACGTGGTCTAGGTTCC	55	3057
	Sh27606_3R	TACGTGTGGTCTGCATCCAT		
Sh8882	Sh8882_1F	TGTTATCCACGCACCACACT	60	3953
	Sh8882_1R	ACGGATTACAAGGCAACAGG		
	Sh8882_2F	GCTGAAGTGTGGATGAGCA	55	3535
	Sh8882_2R	CACACGCAAAGACAGGAAGA		
	Sh8882_3F	AGCCCTTCTCGAACACAGAA	53	2706
	Sh8882_3R	CGCATATGGGTGTTCAACTG		
	Sh8882_4F	CCTAGCATGAAGCAACGACA	60	3329
	Sh8882_4R	ACGACAGCACCCACATGATA		

Pokračování přílohy 2: Seznam primerů pro jednokopiové sondy. Červeně vyznačené sondy byly z analýz vyřazeny.

Sonda	Primer	Sekvence primeru (5' → 3')	Teplota nasedání primerů (°C)	Velikost produktu
Sh27089	Sh27089_1F	TCGAGTCATCCAACATGGAA	55	3381
	Sh27089_1R	GAGAGGGAGGGATGTTGTGA		
	Sh27089_2F	ATCTACCCCCTGCCTGTTCT	60	3010
	Sh27089_2R	ACATGTAGCGGGAACCTGTC		
	Sh27089_3F	ATCATAACAAACCCGGGACA	53	3043
	Sh27089_3R	TTGATGATGGTGTTCGAGGAA		
	Sh27089_4F	CCCAGACACAGGTATGTTTT	60	3597
Sh27089_4R	TGAGTGTTTCATGTGGGCATT			
Sh27686	Sh27686_1F	AAGGACGGATGTTTTGCATC	60	2997
	Sh27686_1R	GTGCCATGTCAAACAAGGTG		
	Sh27686_2F	CCTCAGGTCGCCTCTTGTAG	60	2954
	Sh27686_2R	AGCCAAATACGGAACACGAC		
	Sh27686_3F	CAAGGGATAGGTGGCGAGTA	x	2750
	Sh27686_3R	CGAGGAGCGAATAGATCGAG		
	Sh27686_4F	TGCAAACCTCTGCGACAAATC	53	2919
	Sh27686_4R	TCAGAGGAGCAGCAGTCTCA		
	Sh27686_5F	GCTTGCACAGGAAAGCTACC	56	3671
Sh27686_5R	GTCATGTGCCAAAGGTGTTG			
Sh27145	Sh27145_1F	AAGATGATCCTGCCACAACC	63	3892
	Sh27145_1R	GCAGTGGATCTAGCGTGTCA		
	Sh27145_2F	TTCAGGCACAGAAGTGCATC	60	3158
	Sh27145_2R	GGTGCTAACCCCTTCGGTGTA		
	Sh27145_3F	CGCATCTCTCCCCTACTAC	60	3494
	Sh27145_3R	CTCAGCTCCGCATGATACAA		
	Sh27145_4F	ACCTCACGACCTGTTTTTGG	60	3344
Sh27145_4R	CTCGGCTATCAGGAAACTGC			
Sh27097	Sh27097_1F	GCTGCACGCTTAGGATTTTC	60	2730
	Sh27097_1R	AGGCCTTTGCCTACCTCTTC		
	Sh27097_2F	TCCCTCTTGCGTCTGATCTT	60	3974
	Sh27097_2R	AGGAACAGGTCCAGGTTGTG		
	Sh27097_3F	GCGGCAATAAGCTTCTCAAC	60	2932
	Sh27097_3R	CATTGCGGCAACTCTGTCTA		
	Sh27097_4F	CCCTGGGGAAAGAATATGGT	53	2742
	Sh27097_4R	CCGCGGTAACGTTAGTTTGT		
	Sh27097_5F	GGCCACAAGCCCAATTAATA	53	2942
Sh27097_5R	GTCAGATGGAACGGCATTTC			

Pokračování přílohy 2: Seznam primerů pro jednokopiové sondy. Červeně vyznačené sondy byly z analýz vyřazeny.

Sonda	Primer	Sekvence primeru (5' → 3')	Teplota nasedání primerů (°C)	Velikost produktu
Sh27529	Sh27529_1F	AGGTGGTTTTTTGCAACCAAG	60	3360
	Sh27529_1R	GCAGCTGCAAGCATACCATA		
	Sh27529_2F	AGTCACATGGTGC GACTGAG	56	3079
	Sh27529_2R	CGAATTTGGTACGTGCATTG		
	Sh27529_3F	ACAGCCCTGGAGAAGCTACA	60	3060
	Sh27529_3R	ACAAGTCCCAAAGGCAACAC		
	Sh27529_4F	TGCCCTTAGCAAGCTGAAAT	56	3095
	Sh27529_4R	GGAAGTGAGCAGCGATAAGG		
	Sh27529_5F	GGATCAATCCCCACAATCAC	56	3188
Sh27529_5R	GAAACTGAGCGGTTTCGAAAG			
Sh10039	Sh10039_1F	TGGGAGTTTGCTTTGCTTCT	53	3808
	Sh10039_1R	TCCGATCATGTTCCCTTGACA		
	Sh10039_2F	CAAAAAGTGTTGGTG CATGG	60	3169
	Sh10039_2R	CCAAACAGGACAAAGCCAAT		
	Sh10039_3F	CTCGCAAGCGATGACATTTA	60	3193
	Sh10039_3R	TGCTGATGTAAGCGTCCAAG		
	Sh10039_4F	GCGTCCGGAGTATGTTGTTT	60	3012
	Sh10039_4R	TGGTGGGGGTCCATATCTAA		
	Sh10039_5F	CAGGACCTAGGCTGAAGACG	x	3595
	Sh10039_5R	AGGAGATTGGCATCCATGAG		
Sh27940	Sh27940_1F	TGCCCAAATCACTTGTGTGT	x	2910
	Sh27940_1R	GCAGTCAAGATCCCACGAAT		
	Sh27940_2F	TGCGCGCTCTGTCAATATAC	60	2768
	Sh27940_2R	TGAAGAAACGCATTCTGCAC		
	Sh27940_3F	GCTTGGGACTTCGGATAACA	60	3056
	Sh27940_3R	GACAAGCACATAGCGACGAA		
	Sh27940_4F	CCACCAGTCCTCCTGACAAT	60	2892
	Sh27940_4R	CAGGAGCTTGATCCTCTTGG		
Sh3661	Sh3661_1F	CCAATACTGGAGGCGAGTCT	62	3972
	Sh3661_1R	GCACACTGATTGCTTCCTGA		
	Sh3661_2F	GGATTGTGTGCTTCCCTTGT	63	3950
	Sh3661_2R	ACCACTAATGCACCCCTCTG		
	Sh3661_3F	GCTGGACGCTCTCTCGATAC	60	2857
	Sh3661_3R	CATGGTCAAGCATCAGCACT		

Pokračování přílohy 2: Seznam primerů pro jednokopiové sondy. Červeně vyznačené sondy byly z analýz vyřazeny.

Sonda	Primer	Sekvence primeru (5' → 3')	Teplota nasedání primerů (°C)	Velikost produktu
Sh27244	Sh27244_1F	CAAGACAACCAAAGCAAGCA	x	2714
	Sh27244_1R	ACAGGCACCAAAATCGAAAC		
	Sh27244_2F	TGGTCTTGGAGCTCTGTGTG	64	3172
	Sh27244_2R	CCATCTTGCACATGATCGTC		
	Sh27244_3F	TGCCGTTTCATGTACCACAGT	61	2884
	Sh27244_3R	TAGTTTCCAGATGCCCTTGG		
	Sh27244_4F	GCATGTGCGAGAGTGACATT	63	2887
Sh27244_4R	CGATTCGGTAAGACGTCCAT			
Sh27060	Sh27060_1F	G TTCAGATGCGCTCACAAAA	60	3936
	Sh27060_1R	TTTGGTGCTTGTCATGGTGT		
	Sh27060_2F	CAAGTTACCTTCGCCTGCTC	60	2704
	Sh27060_2R	CGCAGAAACATGTGAGGCTA		
	Sh27060_3F	CCCCTATGTTCCTGCAA	60	3432
	Sh27060_3R	TAAGGCCAAAGCCATACACC		
	Sh27060_4F	GAAGAGCACTTGGACCTTGC	x	3082
Sh27060_4R	TTCTGCTCTTGCTTTGCTCA			
Sh27065	Sh27065_1F	GGGAAGGGACTCAGCATGTA	x	2971
	Sh27065_1R	ACCCTAGGGAAACAGGAGGA		
	Sh27065_2F	GGTGT TTTGAAGGCCTGTGT	60	3988
	Sh27065_2R	CAATGCCAACAAAACGAATG		
	Sh27065_3F	ATGCATCAGCAAAGCAACAG	60	3591
	Sh27065_3R	CCTTTGGATGGAGGGGTTAT		
	Sh27065_4F	TTCAGGCACGAAACAGACAG	60	3966
Sh27065_4R	CTCGTTCAAACGTCAGCAA			
Sh27522	Sh27522_1F	GCATACGGTTTCTTGCCATT	60	3936
	Sh27522_1R	GCGTTGCAAAGTCTCAATCA		
	Sh27522_2F	ATGGAAACCCAGCACTTACG	60	3601
	Sh27522_2R	TTCCTTACGCAGAGGCAAGT		
	Sh27522_3F	AGGCAGTTGCTTCGTCAGAT	63	3296
	Sh27522_3R	AGAGTCGTCGACCCAAGCTA		
	Sh27522_4F	GTCCAGGCACA ACTTGGATT	60	3863
	Sh27522_4R	ATGGCACAACACAAGGACAA		
	Sh27522_5F	CCTTCATCTTCGTCCTCCTG	65	3094
	Sh27522_5R	AACTTTTCAGCCAAGCTCCA		
	Sh27522_6F	GGAGCTTGGCTGAAAAGTTG	60	3805
Sh27522_6R	TGGATGTCTGAGTGCTTTGC			

Pokračování přílohy 2: Seznam primerů pro jednokopiové sondy. Červeně vyznačené sondy byly z analýz vyřazeny.

Sonda	Primer	Sekvence primeru (5' → 3')	Teplota nasedání primerů (°C)	Velikost produktu
Sh11575	Sh11575_1F	CGAAATCTCCAAATCCCAGA	60	2869
	Sh11575_1R	GATTCAGGTGCCCGATAGA		
	Sh11575_2F	TCAGCGAGAGATCAACATGC	60	3042
	Sh11575_2R	TACGTGCTTCCTTGCTTCCT		
	Sh11575_3F	AGAAACCGGTCCAAGTGTTG	60	3077
	Sh11575_3R	CGTACCCAAACTTCACCAT		
	Sh11575_4F	GCTCCGTGTTGTAACGGAAT	60	3834
	Sh11575_4R	GGTTAGGTGTGCAGCCATTT		
	Sh11575_5F	AGAACGTCAGGGATCACACC	60	3467
	Sh11575_5R	CAGTACTGAGCGGCAATGAA		
Sh8129	Sh8129_1F	CACCACCAAATCTCGTCCT	60	2910
	Sh8129_1R	GTGATGTTGGCCCTTTGAGT		
	Sh8129_2F	GCAGGTCACAGACAGCACAT	60	3942
	Sh8129_2R	GAGGCTTCCAAGTGCAGAAC		
	Sh8129_3F	TGTGGTGGCCATGTTAAGAA	60	2818
	Sh8129_3R	AATGTGGGGAGTGTCTTGG		
	Sh8129_4F	ACCACAATGCCAGTGACAAA	60	2945
	Sh8129_4R	GGAGCATGTGAGCTGTTCAA		
Sh3340	Sh3340_1F	GGCATGACTACGTGGGAACT	60	3888
	Sh3340_1R	TTCCTGAGAAACGGCTCCT		
	Sh3340_2F	GCTTCCCCATTATTTCCAT	55	3643
	Sh3340_2R	GGGTGTGGACAGGAGGACTA		
	Sh3340_3F	GTGAACACCATGCACAGACC	55	3298
	Sh3340_3R	GCCACTAGCGAAAAAGCATC		
	Sh3340_4F	ATGGCAATTTGGGCACTAAG	64	3003
	Sh3340_4R	GTTGACATTCTGCAGCCTCA		
Sh27681	Sh27681_1F	GTAGCTTTGAGGCCAACGAG	60	3568
	Sh27681_1R	TCTTGGGAGGATGAGAATGG		
	Sh27681_2F	CAAACACACACTCCCCACAG	64	2853
	Sh27681_2R	ACGTTACAGCTCTGGAATGCT		
	Sh27681_3F	TTTCTCGCTTTGACACATGC	60	3563
	Sh27681_3R	TGCAAGCTCACCAGAATCAC		
	Sh27681_4F	GTTGTCGACATTGGGGTCTT	56	2780
	Sh27681_4R	GTCCAGCTCCAGGTTGATGT		
	Sh27681_5F	CATGCTTTGACTCGCCACTA	60	2804
	Sh27681_5R	CTGGTCAGCATGGAGTGCTA		